



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA**

QUÍMICA ORGÁNICA

**“NUEVOS DERIVADOS ESTEROIDALES CON POTENCIAL APLICACIÓN EN ENFERMEDADES
HORMONO-DEPENDIENTES”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MARIANA GARRIDO GONZÁLEZ

TUTOR

**DR. EUGENE ATHANAS BRATOEFF TITEFF
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR

**DRA. ROSA LUISA SANTILLAN BACA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

MÉXICO, D.F

SEPTIEMBRE DE 2013



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“NUEVOS DERIVADOS ESTEROIDALES CON POTENCIAL APLICACIÓN EN ENFERMEDADES
HORMONO-DEPENDIENTES”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MARIANA GARRIDO GONZÁLEZ



TUTOR: Dr. EUGENE BRATOEFF T.

AÑO: 2013

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Alfredo Ortega Hernández
Vocal: Dr. Francisco Yuste López
Vocal: Dr. Jesús Sandoval Ramírez
Vocal: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Farmacia. Edificio E. Laboratorio 125. Facultad de Química UNAM

Proyecto dirigido por el Dr. Eugene Bratoeff.

PUBLICACIONES

1. Arellano, Y., Bratoeff, E., Garrido, M., Soriano, J., Heuze, Y., Cabeza, M. **New ester derivatives of dehydroepiandrosterone as 5 α -reductase inhibitors.** *Steroids* 2011; 76 (12), pp. 1241-1246.
2. Garrido, M., Bratoeff, E., Bonilla, D., Soriano, J., Heuze, Y., Cabeza, M. **New steroidal lactones as 5 α -reductase inhibitors and antagonists for the androgen receptor.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 127 (3-5), pp. 367-373.
3. Garrido, M., Bratoeff, E., García-Lorenzana, M., Heuze, Y., Soriano, J., Valencia, N., Cortes, F., Cabeza, M. . **Biological Evaluation of Androstene Derivatives.** *Archiv der Pharmazie.*2013; 346 (1), pp. 62-70
4. Garrido, M, Cabeza, M, Cortés, F, Gutierrez, J, Bratoeff E. **Cytotoxic effect of novel dehydroepiandrosterone derivatives on different cancer cell lines.** *European Journal of medicinal Chemistry.* Aceptado. 2013.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada (**CVU/BECARIO: 253087/216098**) para la realización de mis estudios de doctorado y por el financiamiento para la estancia de investigación realizada en la Universidad de Michigan.

Al proyecto IN211312 que otorgó el soporte financiero para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al CONACYT por el proyecto 54853 por el apoyo financiero para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Especialmente al Dr. Eugene Bratoeff, no solo por la dirección de este proyecto de investigación, sino también por la confianza y la amistad brindada en todo este tiempo.

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas por su apoyo con la evaluación de los compuestos para la inhibición de la enzima 5 α -reductasa.

A la M. en C. María Teresa Ramírez Apán por la evaluación de la citotoxicidad de los compuestos sobre diferentes líneas celulares.

A la Dra. Aliesha González Arenas y Dr. Ignacio Camacho por el soporte en los estudios con la línea celular U373 y también por su amistad.

Al M. en C. Antonio Nieto por los estudios sobre el edema de la oreja de ratón.

Al Dr. Richard Auchus por la asesoría brindada durante mi estancia de investigación en la Universidad de Michigan.

A los miembros de mi comité tutor la Dra. Rosa Santillán y al Dr. Guillermo Delgado por las ideas aportadas durante mis evaluaciones semestrales.

A los miembros de mi jurado: Dr. Alfredo Ortega, Dr. Jesús Sandoval, Dr. José Fausto Rivero, Dr. Francisco Yuste y Dr. Guillermo Delgado; por los comentarios aportados durante la revisión y corrección de esta tesis.

A la Q. Marisela Gutiérrez, Q. Georgina Duarte, M. en C Rosa Isela del Villar, por su colaboración en la realización de los espectros de IR, EM y RMN respectivamente.

Al M en C Juan Francisco Cortés por el apoyo con los cálculos teóricos de HOMO y LUMO.

A los miembros del posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo brindado en los trámites.

A mis compañeros del laboratorio 125 por su compañerismo y amistad.

A los chicos del laboratorio 107 del anexo "F", Facultad de Química por su amistad y apoyo con los experimentos.

A la alumna Belén Alcaraz por la ayuda brindada durante la realización de su servicio social.

Con especial cariño a mis padres (Mario y Carmen), mis hermanos (Flor, José Mario y Rocío) y demás familiares por estar incondicionalmente conmigo.

A aquellas personas que estuvieron en esta etapa de mi vida y que por algún motivo ya no están.

A aquellas personas que han aparecido en mi vida y que han estado conmigo en los momentos difíciles.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. NTECEDENTES	1
1.1 Hormonas y enfermedades relacionadas	1
1.2 Cáncer	2
1.2.1 Cáncer de próstata	2
1.2.2 Cáncer de mama y otras enfermedades hormono-dependientes en la mujer	7
1.2.3 Cáncer de cerebro	10
1.3 El rol de la inflamación en el cáncer	11
2. PROPUESTA	13
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1 Parte química	21
4.1.1 Síntesis de ésteres en la posición C-3	21
4.1.2 Síntesis de los derivados con un formilo en C-16 y un cloro en C-17	22
4.1.3 Síntesis de los derivados con un heterociclo en C-17 y un formilo en C-16 (4a-4j , 5a-5j y 8a-8c)	23
4.1.4 Síntesis de los derivados esteroidales que contiene un epóxido en C-5 (10 y 20a-20d)	24
4.1.5 Síntesis de los derivados esteroidales que contiene un carbonilo en C-6 y un hidroxilo en C-5 (11 y 21a-21d)	25
4.1.6 Síntesis de 4,16-Pregnadien-6,20diona-3 β -il-acetato (12)	26
4.1.7 Síntesis de 3 β -Hidroxi-4,16-pregnadien-6,20diona (13)	26
4.1.8 Síntesis de 17 α -Acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (16)	27
4.1.9 Síntesis de 17 α -Hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (17)	28
4.1.10 Síntesis de los derivados 18a-18e con una función de carbamato aromático en C-17	28
4.1.11 Síntesis de los derivados 3 β -RCOO-5 α ,6 β -dibromo-androstan-17-ona (20a-20d)	29
4.1.12 Síntesis de los derivados 3 β -RCOO-5 α ,6 β -dibromo-D-homo-13(17)a-oxa-androstan-17-ona (21a-21d)	30
4.1.13 Síntesis de los derivados 3 β -RCOO-D-homo-13(17)a-oxa-androstan-5-en-17-ona (19a-19d)	30
4.2 Evaluación biológica	31
4.2.1 Estudios <i>in vitro</i>	31
4.2.1.1 Inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 y 2	31
4.2.1.2 Estudios sobre afinidad del receptor de andrógeno y progesterona	35
4.2.1.3 Estudios sobre la línea celular PC-3	36

4.2.1.4 Estudios sobre el efecto de los derivados heterocíclicos 8a, 8b y 8c sobre la actividad de la enzima CYP17A	38
4.2.1.5 Cáncer de cerebro (Línea celular U373)	42
4.2.1.6 Inhibición de la proliferación celular de la línea MCF-7	44
4.2.2 Estudios <i>in vivo</i>	46
4.2.2.1 Estudios <i>in vivo</i> sobre hámster (HPB y cáncer de próstata)	46
4.2.2.2 Estudio <i>in vivo</i> sobre ratón (ciclo reproductivo, cáncer de mama, endometriosis, anticonceptivos)	49
4.2.2.3 Estudio preliminar del efecto inflamatorio de los derivados 14a-14e sobre el edema de la oreja de ratón	51
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	53
5.1 Parte química	53
5.2 Evaluación biológica	80
5.2.1 Estudios <i>in vitro</i>	80
5.2.1.1 Estudios de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa	80
5.2.1.2 Ensayos de afinidad al receptor de andrógenos	82
5.2.1.3 Ensayos de afinidad al receptor de progesterona	83
5.2.1.4 Citotoxicidad de las líneas celulares cancerosas humanas PC-3 y MCF-7 de los compuestos	85
5.2.1.5 Estudios de inhibición de la enzima CYP17A1	86
5.2.1.6 Estudio del efecto de los compuestos 14a-14e en la proliferación de la línea celular U373-MG	87
5.2.2 Estudios <i>in vivo</i>	88
5.2.2.1 Estudios <i>in vivo</i> en hámsteres	88
5.2.2.2 Experimentos <i>in vivo</i> (útero, glándula mamaria, cuerpo lúteo)	88
5.2.2.3 Disminución del edema de la oreja del ratón	89
5.3 Estudios computacionales	90
6. CONCLUSIONES	91
7. REFERENCIAS PUBLICACIONES	93

ÍNDICE DE FIGURAS

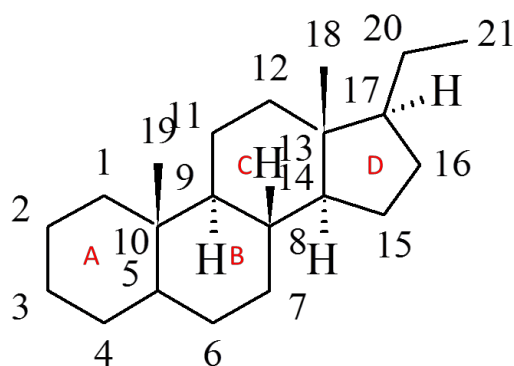
	Página	
Figura 1	Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por la acción de la enzima 5 α -reductasa	2
Figura 2	Mecanismo de acción de la DHT	3
Figura 3	Ruta biosintética de DHT	5
Figura 4	Rutas metabólicas de CYP17A1	6
Figura 5	Mecanismo de acción de la enzima CYP17A1	7
Figura 6	Rol de los estrógenos y progesterona en el ciclo menstrual	8
Figura 7	Ruta biosintética de los estrógenos	9
Figura 8	Conversión de Progesterona a 5 α -progesterona por la acción de la enzima 5 α -reductasa	11
Figura 9	Factores de transcripción involucrados en el proceso inflamatorio	12
Figura 10	Moléculas con actividad para el tratamiento de diversos tipos de cáncer	14
Figura 11	Ruta general de síntesis de los derivados de la dihidroepiandrosterona	15
Figura 12	Ruta sintética para la obtención de los híbridos esteroidales con antiinflamatorios en C-3	16
Figura 13	Ruta sintética para la obtención de los derivados de progesterona con carbamatos en C-17	17
Figura 14	Ruta sintética para la obtención de los derivados de 17-oxo-13(17) α -oxa-D-homoandrostando	18
Figura 15	Mecanismo de la reacción de esterificación	21
Figura 16	Mecanismo de fomicación	22
Figura 17	Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los derivados 4a-4j , 5a-5j y 8a-8c	23
Figura 18	Mecanismo de reacción propuesto para la epoxidación en C-5	24
Figura 19	Mecanismo propuesto para la oxidación	25
Figura 20	Mecanismo propuesto para la deshidratación del alcohol en C-5	26
Figura 21	Mecanismo propuesto para la hidrólisis del éster en C-3	27
Figura 22	Mecanismo propuesto para la oxidación en C-6	27
Figura 23	Mecanismo propuesto para la síntesis de carbamatos	29
Figura 24	Mecanismo propuesto para la bromación de la doble ligadura en C-5 y C-6	29
Figura 25	Mecanismo propuesto para la expansión del anillo D del esqueleto del androstando	30
Figura 26	Mecanismo propuesto para la regeneración de la doble ligadura en C-5	31
Figura 27	Resultados de la inhibición de los compuestos sintetizados sobre la enzima 5 α -R1	32
Figura 28	Relación de parámetros fisicoquímicos entre los compuestos sintetizados con el σ y Log P	33
Figura 29	Resultados de la inhibición de los compuestos sintetizados sobre la enzima 5 α -R2	34
Figura 30	Evaluación de los compuestos en la línea celular PC-3	37
Figura 31	Valoraciones de los compuestos 8a , 8b y 8c con desplazamientos en el UV-visible	39
Figura 32	Gráficas del Log de las concentraciones contra el por ciento de actividad máxima encontrada	41
Figura 33	Gráficas de la evaluación de los compuestos 14a-14e en la línea celular U373	43
Figura 34	Efecto de los compuestos sintetizados en la proliferación de la línea celular MCF-7	45
Figura 35	Efecto de los compuestos sobre el diámetro de la mancha pigmentada	46
Figura 36	Efecto de los compuestos sobre el peso de la próstata	47
Figura 37	Efecto de los compuestos sobre el peso de las vesículas seminales	48
Figura 39	Efecto de los compuestos sobre la histología del útero de ratón	50
Figura 40	Efecto de los compuestos sobre la histología de las glándulas mamarias	50
Figura 41	Efecto antiinflamatorio de los compuestos 14a-14e en el edema de oreja de ratón	52

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Valores de HOMO y LUMO para los sustratos de CYP17A1	40
Tabla 2	Extracción y purificación de los fármacos utilizados	53
Tabla 3	Relación molar para la síntesis de los híbridos con antiinflamatorios	68

ABREVIATURAS

ARN	ácido ribonucleico	LogP	Coefficiente de partición hexano:agua
μL	Microlitro	m	Múltiple
μM	Micromolar	mCPBA	ácido <i>meta</i> -cloroperoxibenzoico
5α-R	5α-reductasa	mg	miligramo
5α-R1	5α-reductasa tipo 1	mL	mililitro
5α-R2	5α-reductasa tipo 2	MMPP	monoperoxifitalato de magnesio
CCF	dromatografía en capa fina	mn	minutos
cm	Dentímetros	nm	nanómetros
COX	Ciclooxigenasa	nM	nanomolar
DCC	Diciclohexilcarbodimida	Pf	Punto de fusión
DCU	Diciclohexilurea	ppm	partes por millón
DMAP	Dimetilaminopiridina	RE	Receptor de Estrógeno
DMF	Dimetilformamida	RMN ¹³ C	Resonancia Magnetica Nuclear de carbono 13
F	Finasterida	RMN ¹ H	Resonancia Magnetica Nuclear de Protón
FDA	Food and Drug Administration	RP	Receptor de Progesterona
g	Gramo	rpm	revoluciones por minuto
h	Hora	s	señal simple
Hz	Hertz	t	triplete
IC ₅₀	concentración para producir al 50 % un efecto biológico	T [³ H]	testosterona tritiada
<i>J</i>	constante de acoplamiento	THF	tetrahidrofurano
Kd	constante de afinidad	UV	ultravioleta
Km	constante de Michael-Menten	δ	desplazamiento químico



Numeración de la estructura esteroideal referenciada en esta tesis

RESUMEN

Las hormonas son sustancias secretadas por diversos órganos, y por lo general, regulan funciones en otros órganos diferentes a los que la sintetizan. Tanto en el hombre como en la mujer, las hormonas sexuales regulan procesos biológicos relacionados con el desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Debido a que estas hormonas realizan la diferenciación sexual desde la concepción, la desregulación de la síntesis y transformación de las mismas se encuentra relacionada con diversas patologías propias de cada género.

Desde que se estableció la relación de los niveles hormonales con diversas enfermedades, se ha tratado de desarrollar tratamientos más selectivos, eficaces y con menos efectos secundarios. Algunas terapias para el tratamiento de enfermedades hormono-dependientes se basan en derivados esteroidales que mimetizan la acción de las hormonas naturales.

En este trabajo se presenta los resultados del diseño, síntesis y evaluación biológica de diversos derivados basados en diferentes esqueletos esteroidales, como son el androstano y pregnano. Estos derivados fueron obtenidos con la finalidad de encontrar una relación entre la estructura de estas moléculas y su selectividad a diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* que están asociados a patologías tales como: cáncer de próstata, cáncer de mama, endometriosis y cáncer de cerebro.

Los resultados encontrados en este trabajo nos ayudan a entender cómo las diversas modificaciones realizadas en el esqueleto esteroide, pueden conferirle selectividad a un blanco terapéutico específico. Por otro lado, los datos experimentales obtenidos nos permiten proponer futuros estudios que nos permitan explicar los posibles mecanismos de acción para estas moléculas.

1. ANTECEDENTES

1.1. HORMONAS Y ENFERMEDADES RELACIONADAS

Las hormonas son las encargadas de catalizar y controlar diversos procesos metabólicos en el cuerpo humano. A pesar de sus diversas acciones y diferentes especificidades, muestran diversas características en común. Las hormonas no siempre son estructuras complejas como las proteínas, también incluyen pequeños polipéptidos, aminoácidos y esteroides.

La acción de estas moléculas en un órgano se encuentra regulada por 5 factores:

- 1) La velocidad con que se sintetiza y se secreta una hormona en la glándula de origen.
- 2) Sistemas de transporte específico en el plasma.
- 3) Transformación a una forma más activa.
- 4) Receptores específicos en células blanco.
- 5) El mecanismo de degradación usualmente se realiza en el hígado o riñón.

Dado que las hormonas son las encargadas de mantener la homeostasis en diferentes órganos, cuando su síntesis y/o metabolismo se altera, pueden surgir diversas patologías. Entre estas se encuentran: el acné, seborrea, cáncer de mama, cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, cáncer de cerebro, entre otras. Debido a esta actividad hormonal, la primera terapia por elección se basa en el uso de moléculas que puedan competir o mimetizar a estas hormonas. Es por ello que los derivados esteroidales han cobrado un gran interés; ya que son similares en estructura química a los metabolitos hormonales naturales, por lo que se puede predecir en qué etapa del metabolismo se regulará y por ende, cuáles serán sus principales efectos secundarios.

En base a esto, los derivados esteroidales han sido diseñados y sintetizados para la obtención de nuevos fármacos que puedan ser utilizados como tratamientos alternos a los ya existentes en diversas enfermedades hormono-dependientes.¹

1.2. CÁNCER

El cáncer es definido como el conjunto de enfermedades donde existe un crecimiento de células malignas con una proliferación y división anormal. Este aumento en la proliferación celular llega a interferir con la función normal del organismo, provocando de esta forma, la muerte. De acuerdo con estudios recientes de la OMS, en el 2008, 7.6 millones de personas en el mundo murieron a causa de presentar algún tipo de cáncer.² Dentro de los tipos de cáncer más agresivos y fulminantes encontramos el de próstata, mama y cerebro. Estos tres tipos de cáncer tienen en común una dependencia hormonal, es decir, que dentro de los mecanismos de regulación de la proliferación celular se depende de una diana biológica que responde a la presencia de una hormona.

1.2.1. Cáncer de próstata

La próstata es un órgano que está constituido por una zona de transición, una central y una periférica. Se encuentra localizada en la pelvis abajo de la vejiga y rodea la porción superior de la uretra. Es susceptible a infecciones, agrandamiento o tumores benignos o malignos.³

En el caso del cáncer de próstata está bien documentado que la sobreexpresión de las células que la constituyen es debida a la alta concentración de DHT. La DHT es obtenida de forma directa de la conversión de T por la acción de la enzima 5α -reductasa (Figura 1). La DHT es un metabolito que posee una mayor afinidad al receptor de andrógeno (RA) en comparación con la testosterona.⁴

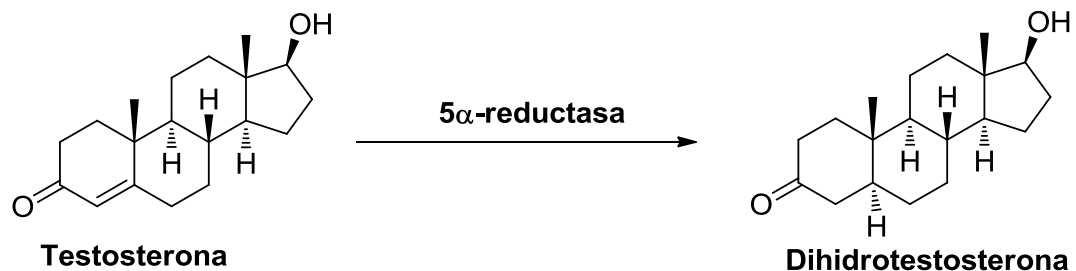


Figura 1. Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por la acción de la enzima 5α -reductasa.

Una vez que se genera la DHT, ésta se enlaza al dominio de unión del RA, localizado en la región carboxi terminal. Esta activación se atribuye al cambio conformacional producido por el complejo RA-DHT, exponiendo el dominio de unión al ADN y la dimerización subsecuente del complejo DHT-RA activado. El dominio de unión para el ADN del homodímero DHT-RA, se caracteriza por secuencias ricas en cisteínas que forman un complejo de Zn, los cuales se introducen en los surcos mayores de los elementos de respuesta hormonal, confiriendo estabilidad a la ARN-polimerasa, al ADN y a diversos factores involucrados en la transcripción (Figura 2). Basados en este mecanismo de regulación, diversos investigadores han relacionado la unión de la DHT al RA al desarrollo del cáncer de próstata, convirtiéndolo en un blanco potencial para el tratamiento de esta enfermedad.⁵

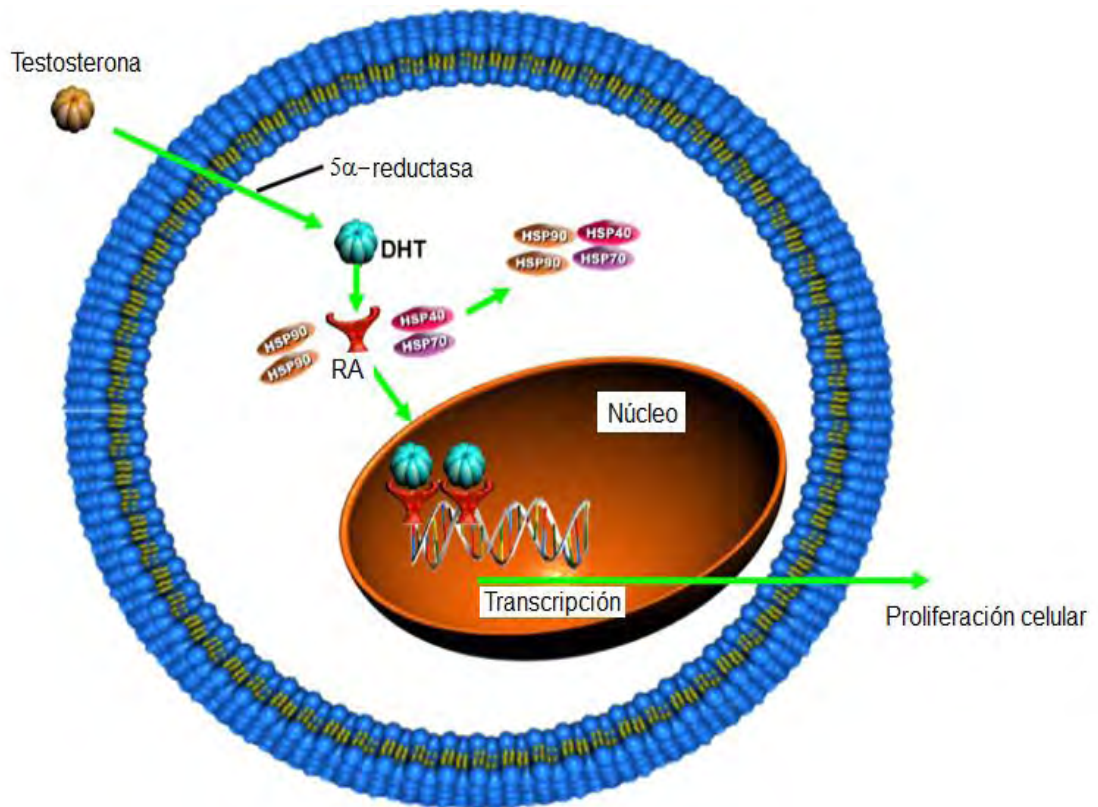


Figura 2. Mecanismo de acción de la DHT.⁶

Métodos modernos de la biología molecular han encontrado e identificado dos tipos de la enzima 5 α -reductasa, denominadas Tipo 1 (5 α R1) y Tipo 2 (5 α R2). Estas isoformas difieren en sus propiedades bioquímicas, localización y función. La Tipo 1 predomina en la piel y el hígado, requiere de concentraciones elevadas de testosterona para saturarse ($K_m=3 \mu\text{M}$) y funciona de modo catabólico en los andrógenos. La enzima tipo 2 predomina en la próstata y testículos, requiere de concentraciones bajas de testosterona para saturarse ($K_m=0.53 \mu\text{M}$) y funciona de modo anabólico en la expresión de andrógenos. A pesar de su diferente localización, hoy en día es bien conocido que la inhibición de ambas enzimas está asociada al desarrollo de moléculas con mayor eficacia en el tratamiento del cáncer de próstata.^{7,8}

Existen diferentes fármacos en el mercado para inhibir la acción de la enzima 5 α -reductasa en ambas isoformas y también para bloquear la unión de la DHT al receptor de andrógenos, sin embargo, con todos los tratamientos existentes y aun con la cirugía, la gran mayoría de los pacientes presentan cáncer de próstata recurrente. En base a esto, y tomando en cuenta la ruta biosintética para la producción de testosterona y DHT (Figura 3), en los últimos años un blanco terapéutico que ha cobrado gran interés es la enzima CYP17A1.

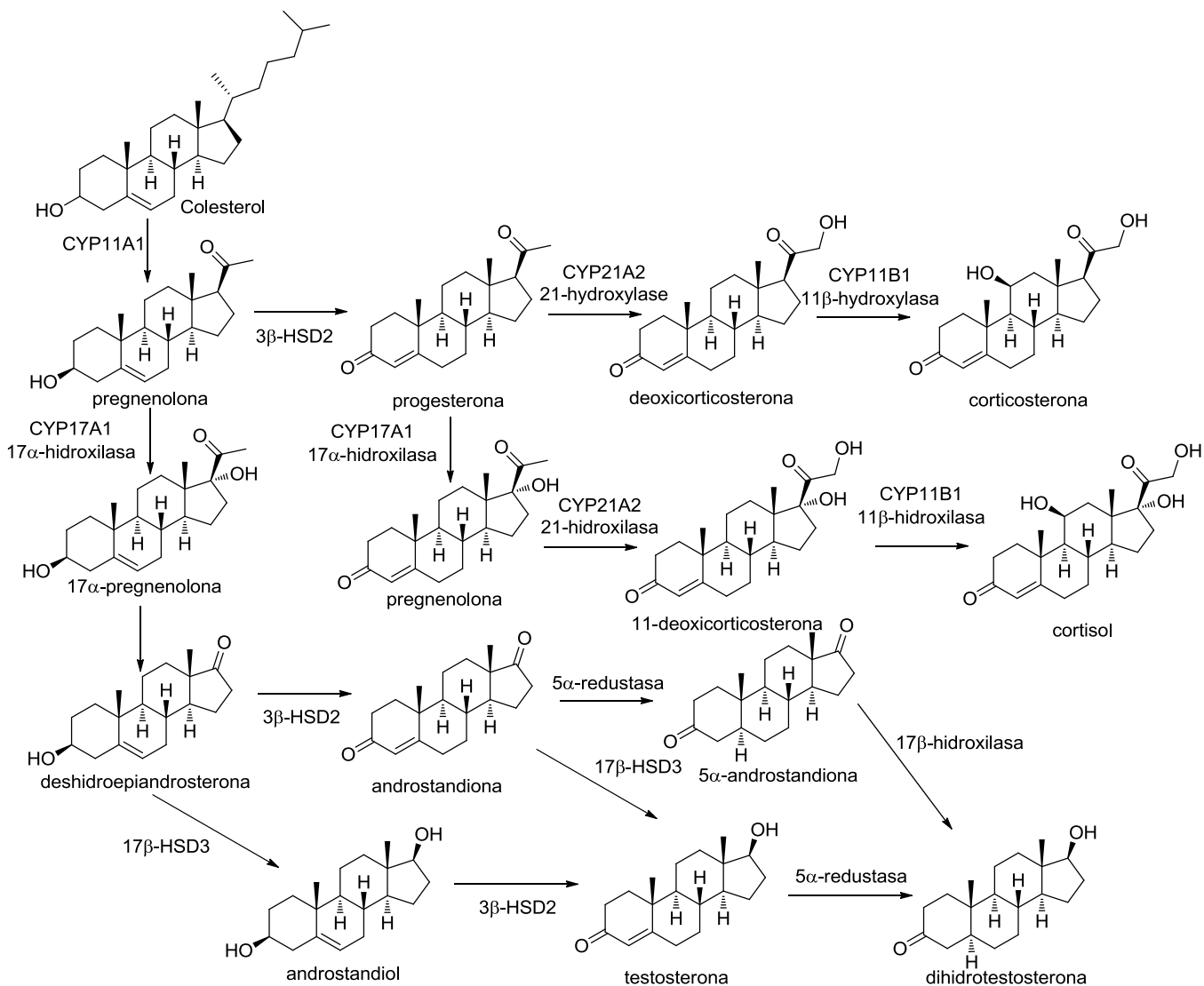


Figura 3. Ruta biosintética de DHT

La enzima CYP17A1 pertenece a la familia del citocromo P450, por lo que su función es hidroxilar la posición 17 en los pregnanos y rompe el enlace existente entre el C-17 y C-20 de la estructura esteroidal (17, 20 liasa). Se ha documentado que su inhibición es un blanco importante en el tratamiento del cáncer de próstata, sobre todo en aquel que es recurrente después de la cirugía, debido a que bloquea la síntesis de testosterona y la síntesis de dihidrotestosterona, no solo por la ruta convencional, sino también por la ruta alterna propuesta por Auchus (Figura 4).⁹

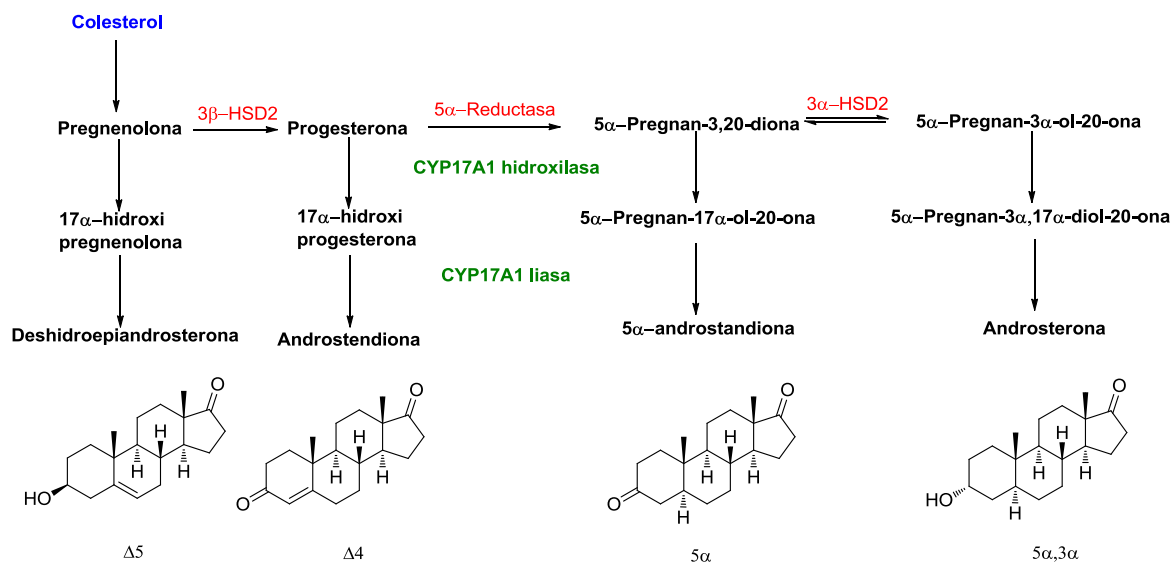


Figura 4. Rutas metabólicas de CYP17A1.⁹

Hoy en día, es bien sabido que el principal mecanismo de inhibición de esta enzima involucra la formación de un enlace de la progesterona o pregnenolona con el hierro del grupo hemo que contiene la enzima CYP17A1, ya que a este sitio activo se le atribuye la actividad tanto de 17-hidroxilación así como de 17,20 liasa.

Dentro del mecanismo de acción de la enzima CYP17A1 tenemos dos posibles modos de inducir la inhibición: el primero involucra una unión en la que el inhibidor desplaza una molécula de agua que se encuentra coordinada al hierro (mecanismo tipo 1) y se identifica por su espectro de UV el cual muestra un máximo de absorbancia aproximadamente en 390 nm y un mínimo alrededor de 430 nm (espectro de UV I, Figura 5). Si el inhibidor se enlaza directamente al hierro este produce un espectro de UV tipo 2 (espectro de UV II, Figura 5), en el que se puede observar un mínimo de absorbancia aproximadamente en 390 nm y un máximo alrededor de 430 nm.¹⁰

Esta técnica permite conocer qué tan fuerte es la afinidad de estos inhibidores por el sitio activo de la enzima y nos ayuda a proponer moléculas con mayor actividad inhibitoria.

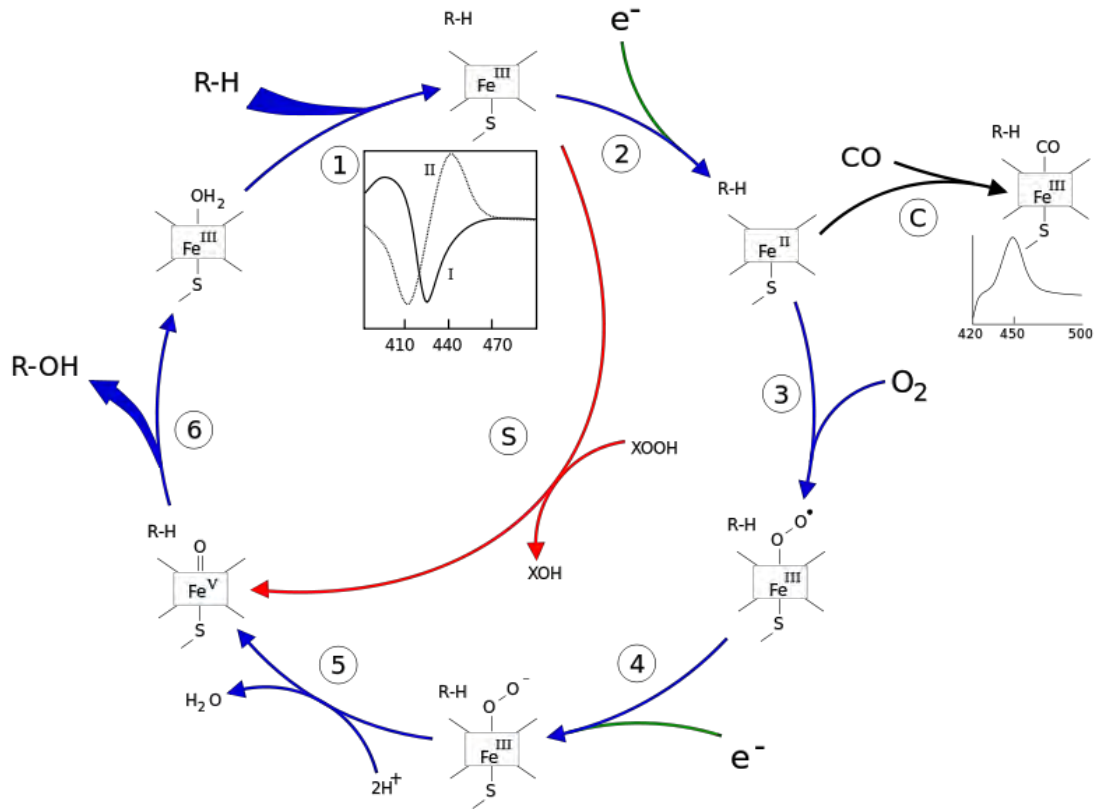


Figura 5. Mecanismo de acción de la enzima CYP17A1.

1.2.2. Cáncer de mama y otras enfermedades hormono-dependientes en la mujer

Existen dos principales tipos de hormonas femeninas que son secretadas por el ovario: las foliculares u hormonas estrogénicas y las hormonas progestacionales. En la mujer las hormonas foliculares preparan la mucosa uterina para la acción de las hormonas progestacionales. Los cambios en el útero incluyen el crecimiento del endometrio, el incremento de tamaño de otras glándulas que dependen del útero y además el incremento de la vascularidad.

El estradiol es una de las hormonas estrogénicas de mayor importancia, este se enlaza específicamente a su receptor y desencadena una vía de señalización para el cumplimiento de diversas funciones biológicas en la mujer. Sin embargo, cuando su

síntesis se encuentra desregulada puede inducir un incremento en la proliferación celular y ocasionar diversas patologías en la mujer.

Entre las hormonas progesteracionales encontramos a la progesterona, la cual se encuentra principalmente en el cuerpo lúteo. Esta hormona aparece después de la ovulación y causa el desarrollo del endometrio, preparando al útero para la recepción del embrión y para su nutrición (Figura 6), además estimula el crecimiento de las glándulas mamarias.¹

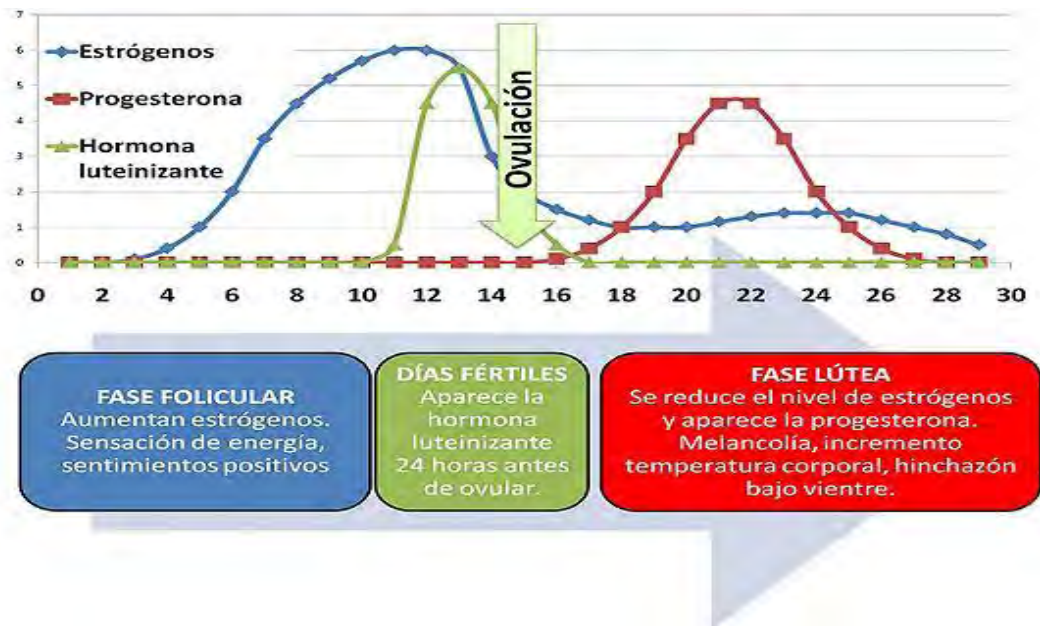


Figura 6. Rol de los estrógenos y progesterona en el ciclo menstrual¹¹

En el cáncer de mama; el mecanismo de proliferación celular, invasión y metástasis es aún desconocido. Dada la amplia atención que las OMS ha dado a este padecimiento, la mortalidad causada por el cáncer de mama en el mundo ha disminuido en un 25 %, gracias al desarrollo de estrategias que han ayudado al diagnóstico temprano así como a su tratamiento.¹² Desde que se demostró que este tipo de cáncer tiene una relación directa con los niveles de estrógenos y progesterona, se han tratado de desarrollar diversos análogos esteroideos; sin embargo, la poca selectividad y alta toxicidad de estos análogos sintéticos han limitado su uso en la clínica.¹³

Al igual que el cáncer de próstata, el cáncer de mama se encuentra regulada por una enzima perteneciente a la familia del citocromo P450 y cuyo sitio activo también está formado por un grupo hemo. Actualmente, el fármaco que recientemente fue aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de próstata recurrente es la abiraterona (Figura 10), este fármaco se encuentra en estudios clínicos para el tratamiento del cáncer de mama ya que también inhibe a la enzima CYP19 cuya función consiste en aromatizar el anillo A de la androstanediona (Figura 7), además de que esta enzima se encuentra directamente asociada al cáncer de mama.¹⁴

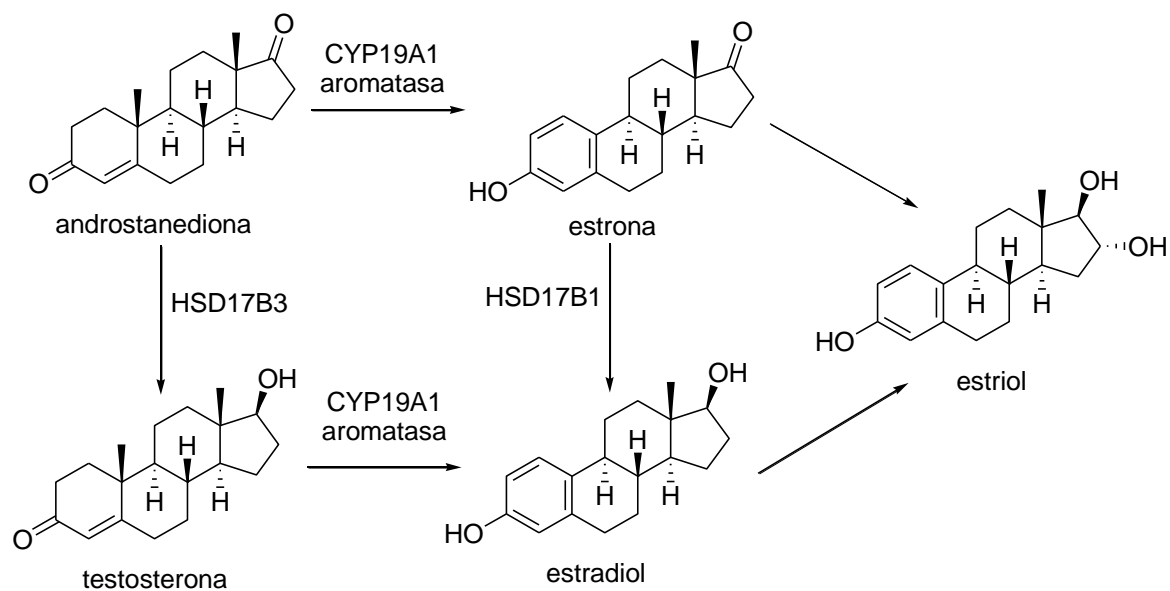


Figura 7 .Ruta biosintética de los estrógenos.

Es bien sabido que no solo el cáncer de mama es dependiente de hormonas; existen otras patologías como son la endometriosis, el cáncer de endometrio, el ovario poliquístico etc.; las cuales se han relacionado con la progesterona y su receptor. La forma en que el RP regula tanto las funciones biológicas como el desarrollo de patologías es la misma que para todos los receptores hormonales y que ha sido anteriormente descrita para el receptor de andrógenos.

1.2.3 Cáncer de cerebro

El cerebro es el centro del sistema nervioso en todos los vertebrados y la mayoría de los invertebrados. Se encuentra localizado en la cabeza y es considerado el órgano más complejo del cuerpo humano. Fisiológicamente, la función del cerebro consiste en controlar otros órganos del cuerpo mediante la secreción de diversas sustancias químicas entre ellas las hormonas.¹⁵

Una enfermedad que algunas personas pueden desarrollar es el cáncer de cerebro. Existen cuatro fases a considerarse en la carcinogénesis, de éstas, la más importante es la fase III (glioblastoma maligno) que es la más agresiva e invasiva. Los glioblastomas malignos son tumores cerebrales altamente agresivos derivados de los astrocitos. Los astrocitos son las células gliales predominantes en el sistema nervioso central y juegan un importante rol en la regulación de diferentes respuestas inmunológicas. El cáncer de glía es una enfermedad que afecta principalmente a adultos de entre 30 y 50 años. El tratamiento de los glioblastomas incluye la cirugía, radiación y quimioterapia y por lo general, la expectativa de vida del pacientes es de unos cuantos meses una vez que es diagnosticada esta enfermedad.¹⁶

En los últimos años se ha establecido una relación de este padecimiento con los diferentes tipos de hormonas que se encuentran en el cerebro. Estudios recientes sugieren que este tipo de cáncer es dependiente de progesterona, que como ya se mencionó, es una hormona que se encuentra principalmente en los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), testículos, glándulas adrenales y placenta. También se sabe que por la acción de la enzima 5α -reductasa, la progesterona es convertida a 5α -progesterona (Figura 8), que tiene una mayor afinidad al receptor de progesterona; estos receptores se encuentran en los astrocitos y podrían atribuírseles la proliferación descontrolada de estas células.¹⁷

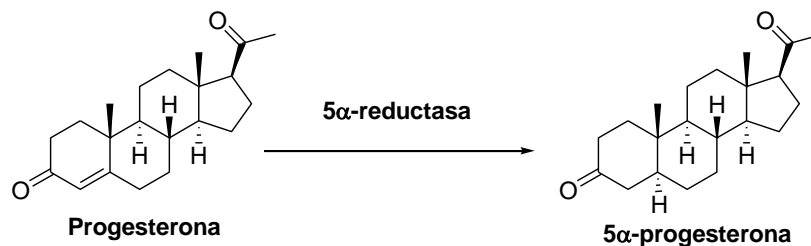


Figura 8. Conversión de Progesterona a 5α-progesterona por la acción de la enzima 5α-reductasa

Diversas investigaciones sugieren que también esta es una enfermedad que responde a la presencia de estradiol, que al unirse a su receptor (presente en los astrocitos) desencadena una vía de señalización que afecta al ciclo celular de las células gliales y por lo tanto tenemos una proliferación anormal.¹⁸

A pesar de los avances en la biología molecular para tratar de encontrar posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad que es fulminante, se tiene escasa información que nos pueda permitir un diseño racional de fármacos para su tratamiento.

1.3 El rol de la inflamación en el cáncer

En los últimos años se ha establecido una relación entre diferentes tipos de cáncer y un posible efecto inflamatorio que los pueden desencadenar. Muchos estudios han demostrado que la enzima COX tiene dos isoformas: COX-1 y COX-2. COX-1 está asociada a la vascularización, reabsorción de agua, acidez gástrica, flujo renal sanguíneo y agregación plaquetaria. Por otro lado, COX-2 esta principalmente involucrada en los procesos de inflamación y ovulación. Se ha demostrado que la enzima COX-2 se encuentra asociada directamente al desarrollo de diversos cánceres y enfermedades cardiovasculares.¹⁹

Técnicas modernas de la biología molecular han permitido identificar y estudiar otros factores de transcripción que regulan los procesos inflamatorios como: NF-kB, STAT3, HIF-1α, IL-1, IL-6 lipooxigenasas, entre otros. Hoy en día es sabido que estos

factores de transcripción pueden regular la expresión de algunas citosinas inflamatorias, moléculas de adhesión, COX-2, óxido nítrico sintetasa y factores angiogénicos (Figura 9). Todas estas expresiones se han relacionado con el desarrollo de diversos tumores cancerosos, por lo que su regulación podría ser un posible blanco terapéutico para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.²⁰

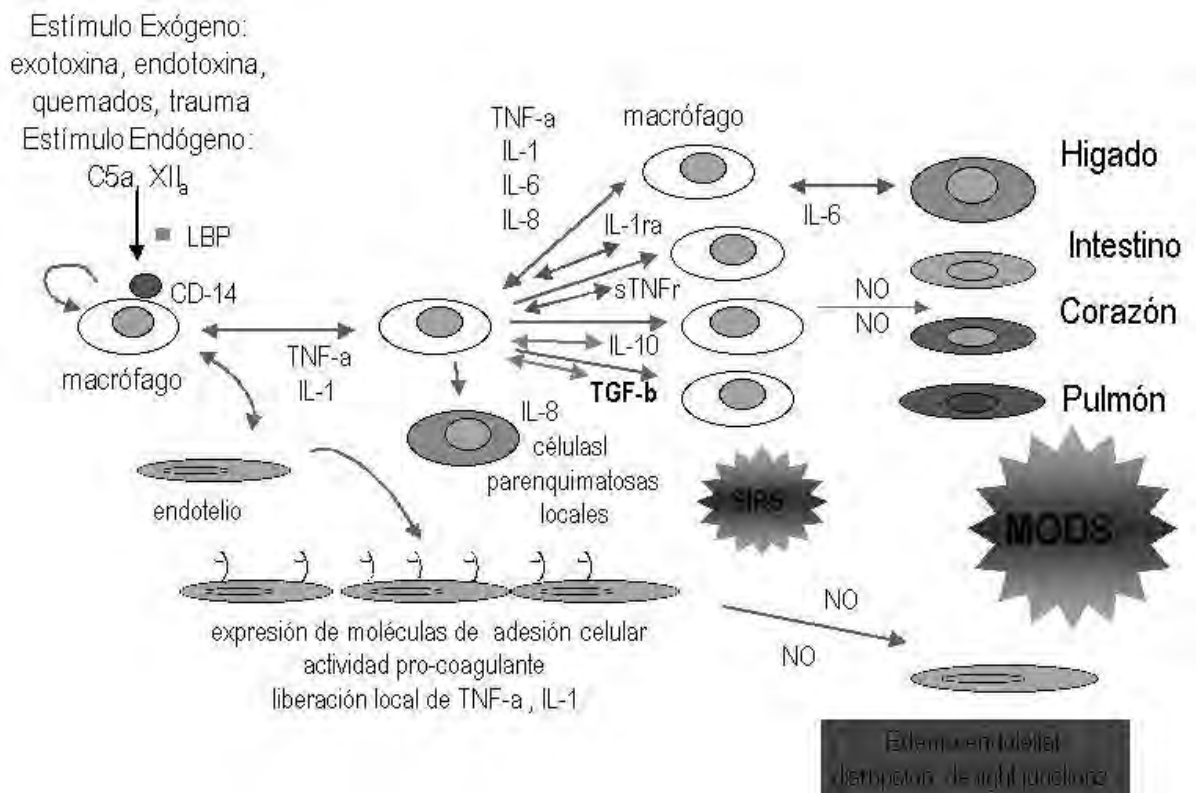


Figura 9. Factores de transcripción involucrados en el proceso inflamatorio²¹

2. PROPUESTA

Basados en los blancos terapéuticos descritos anteriormente, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar nuevas moléculas que puedan ser aplicadas en los padecimientos anteriormente mencionados. La estructura química de algunos de estos fármacos está basada en el esqueleto esteroidal, debido a su propiedades que como estructura privilegiada les confiere (solubilidad, selectividad, etc).²²

Dado a que la enzima 5 α -reductasa no ha podido ser cristalizada, no existe suficiente información sobre el sitio activo en donde se realiza la conversión de T a DHT. En nuestro grupo de investigación se ha realizado una extensa investigación con la finalidad de proponer aquellos requerimientos estructurales que deben de tomarse en cuenta para desarrollar fármacos más activos que los actualmente existentes en el mercado, que son la finasterida (F) y dutasterida (Figura 10). Los requerimientos estructurales encontrados son:

- 1) Un grupo con alta densidad electrónica.
- 2) Un grupo susceptible a un ataque nucleofílico llevado a cabo por los grupos funcionales que no participan en el enlace peptídico de los aminoácidos de la enzima (SH, OH, NH₂).
- 3) Un éster que aumente el carácter lipofílico de la molécula y así facilite la penetración de la molécula por la membrana celular o bien que facilite el metabolismo en modelos *in vivo*.⁸

Por otro lado, desde que se descubrió que la enzima CYP17A1 es un blanco terapéutico importante en el tratamiento del cáncer de próstata y la abiraterona fue desarrollada para inhibir la acción de esta enzima (Figura 10), diversos grupos de investigación han propuesto los requerimientos estructurales necesarios para la inhibición de esta enzima, los cuales son:

- 1) Un heterociclo en la posición 17.
- 2) Un doble enlace en la posición 16.
- 3) Un hidroxilo en la posición 3 de la estructura esteroidal.²³

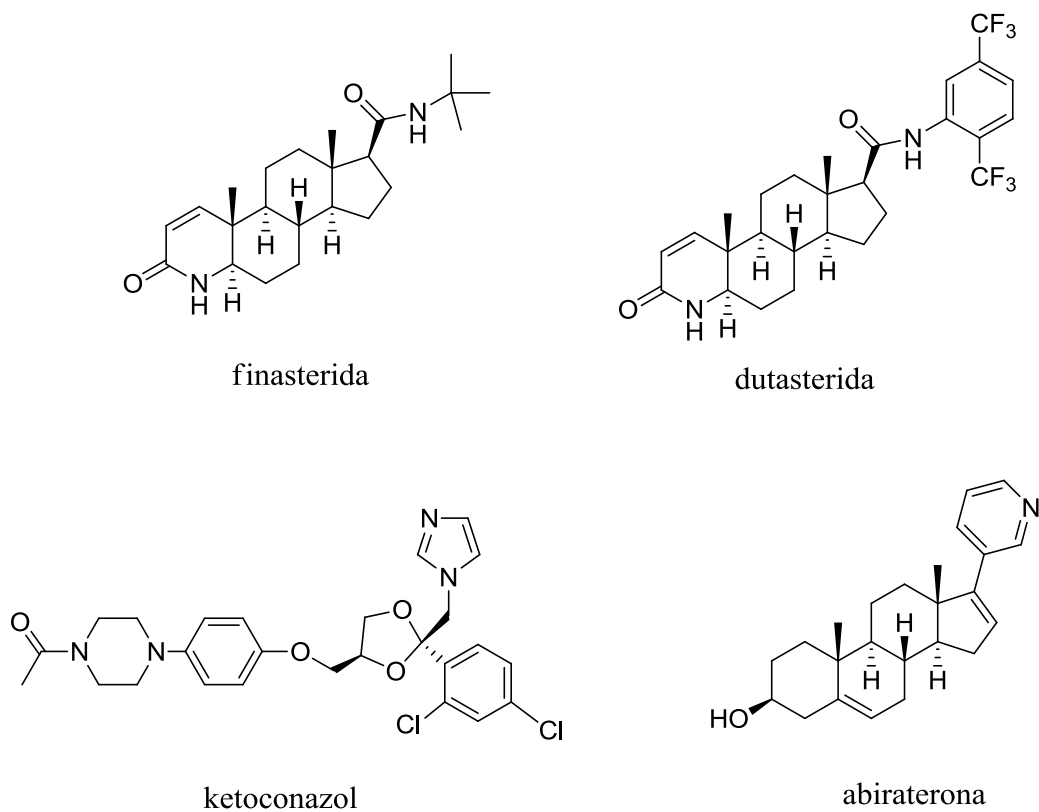


Figura 10. Moléculas con actividad en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

Basados en los requerimientos estructurales anteriormente mencionados, se plantean las siguientes propuestas a desarrollar en este proyecto de investigación:

- La primera propuesta consistió en sintetizar y evaluar compuestos que contienen un heterociclo en C-17, un grupo susceptible a un ataque nucleofílico en C-16 y diversos ésteres en C-3. Estos compuestos se propusieron con la finalidad de que inhibieran tanto a la enzima 5α -reductasa o a la enzima CYP17A1 (Figuras 11-14).
- La segunda propuesta fue diseñar, sintetizar y caracterizar nuevas moléculas basadas en diversos esqueletos esteroidales que puedan unirse al receptor de andrógenos o al receptor de progesterona.

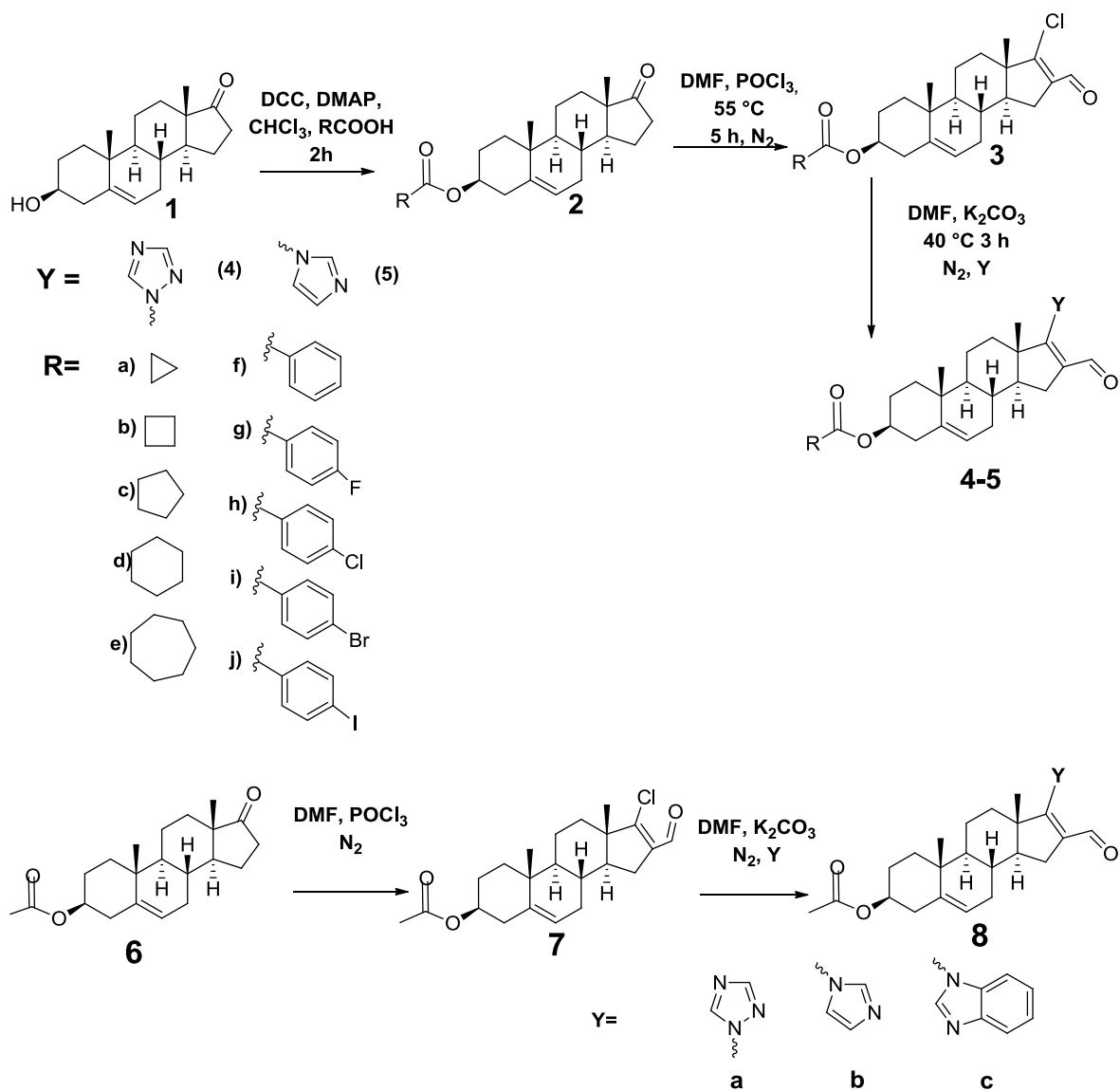
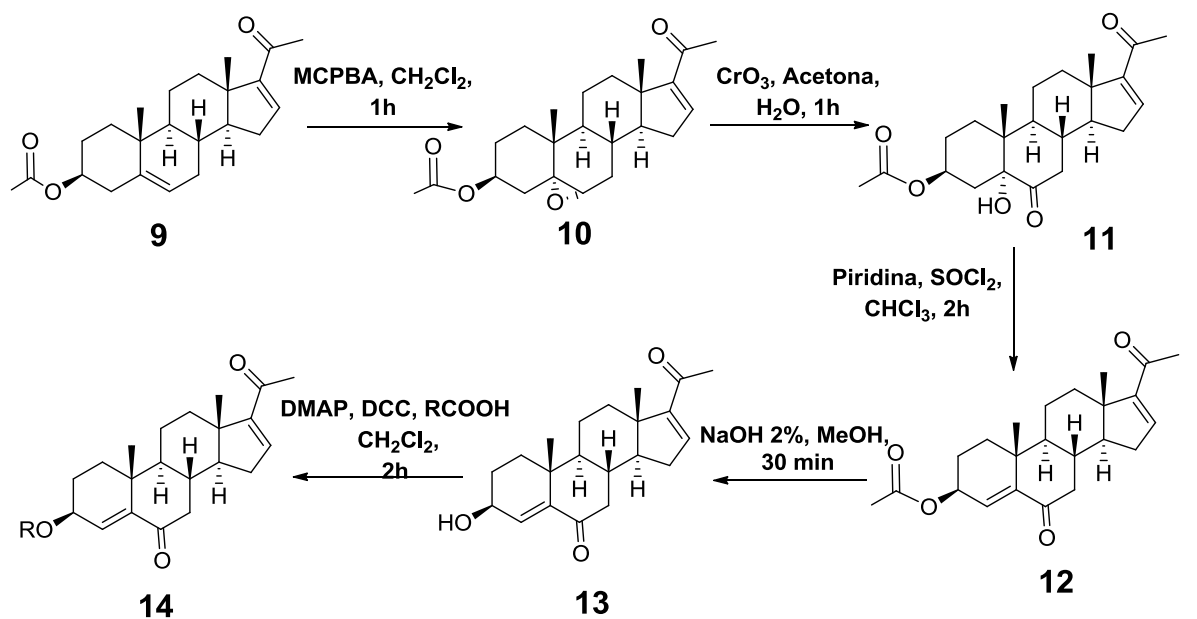
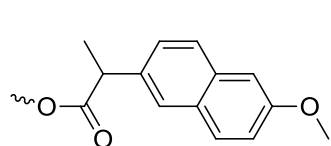


Figura 11. Ruta general de síntesis de los derivados de la dihidroepiandrosterona

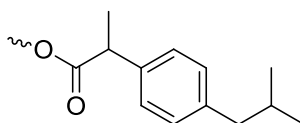
- Una tercera propuesta consistió en diseñar híbridos basados en el esqueleto de pregnano que contengan un grupo antiinflamatorio en la posición C-3 de la estructura esteroideal (Figura 12). Esto con la finalidad de poder mejorar la actividad citotóxica de la molécula **13** (la cual ya ha sido reportada previamente),²⁴ y realizar un estudio del efecto en la actividad biológica de un antiinflamatorio unido covalentemente a la estructura esteroideal .



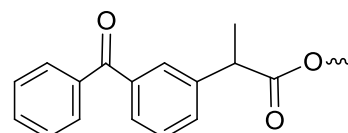
R=



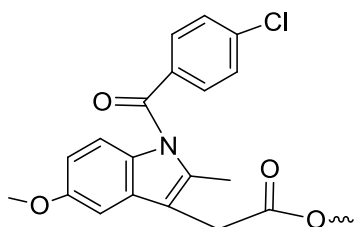
a) Naproxeno



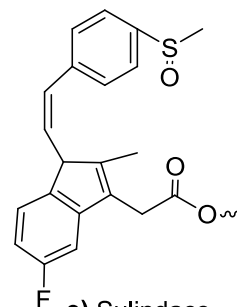
b) Ibuprofeno



c) Ketoprofeno



d) Indometacina



e) Sulindaco

Figura 12. Ruta sintética para la obtención de los híbridos esteroidales con antiinflamatorios en C-3

- Una cuarta propuesta consistió en la síntesis de derivados que contengan una función carbamato en C-17, ya que es bien sabido que este tipo de función aumentan el tiempo de vida media de las moléculas sintetizadas y con esto se mejoraría la actividad biológica (Figura 13).^{25,26}

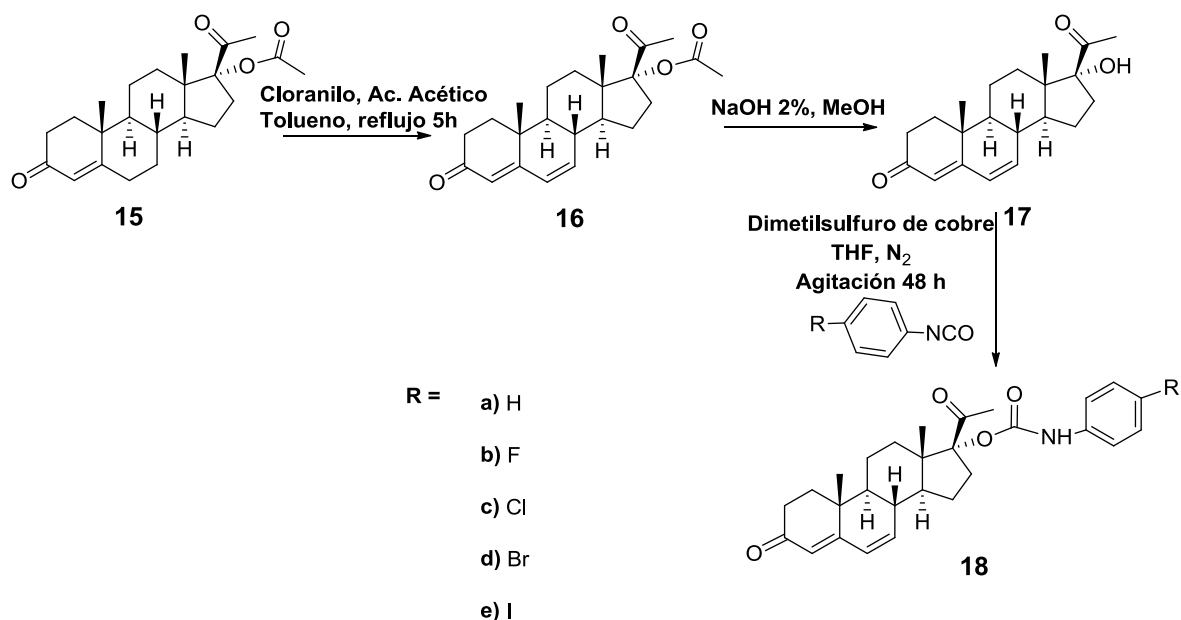


Figura 13. Ruta sintética para la obtención de los derivados de progesterona con carbamatos en C-17

- Como una quinta propuesta, se sintetizaron derivados de androsterona con una lactona en el anillo D, un carbonilo o epóxido en el anillo B y un hidroxilo en C-5. (Figura 14).²⁷

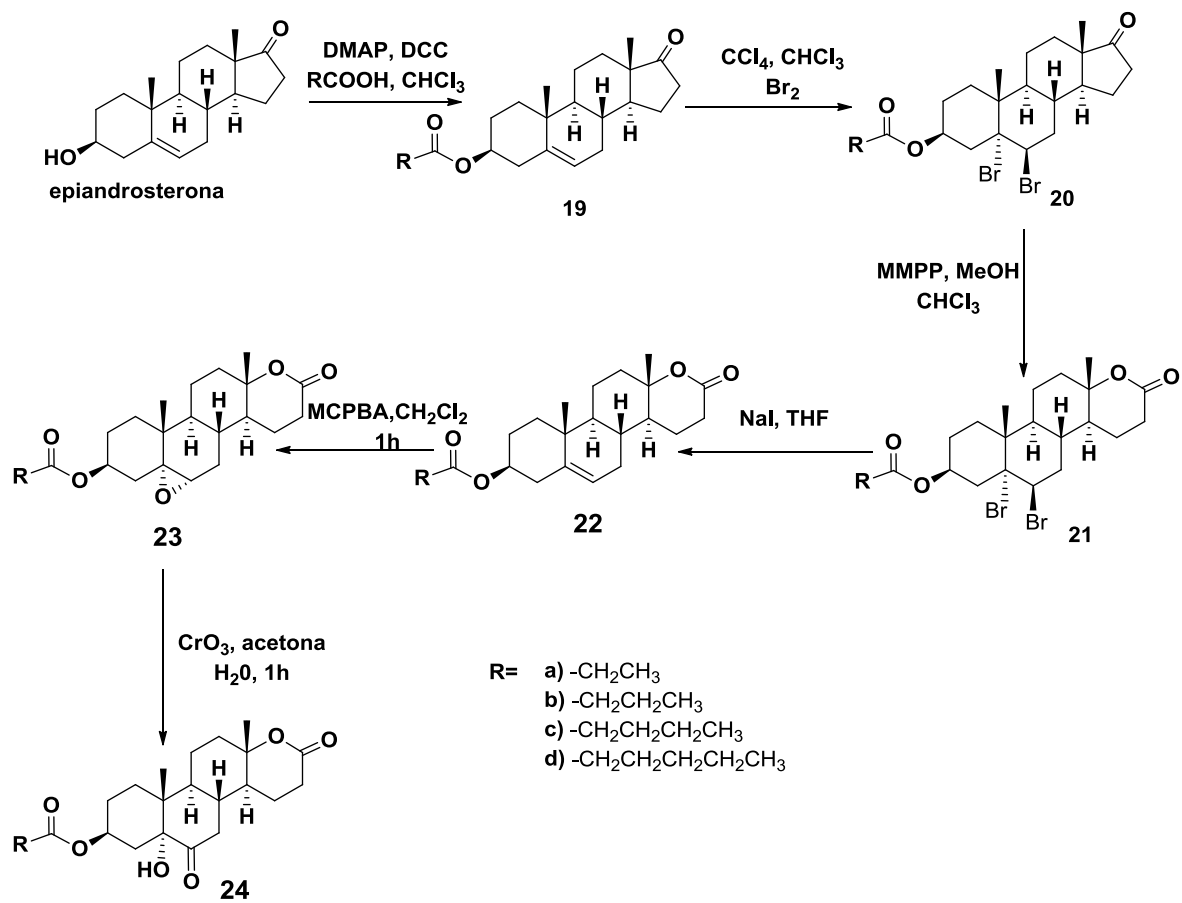


Figura 14. Ruta sintética para la obtención de los derivados de 17-Oxo-13(17) α -oxa-D-homoandrostano

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Diseñar y sintetizar moléculas con base en una estructura esteroidal para estudiar su actividad biológica en modelos *in vivo* e *in vitro* que son representativos de diversas enfermedades hormono-dependientes como son: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cerebro u otras patologías dependientes de hormonas.

3.2 Objetivos específicos

- Diseñar y sintetizar molécula usando como base el núcleo esteroidal del androstano, pregnenolona y progesterona a los que se les adicione diferentes grupos funcionales como ésteres (alifático, alicíclicos, aromático o antiinflamatorio) en la posición C-3, o carbamatos (aromáticos) en C-17.
- Diseñar y sintetizar moléculas derivadas del androstano que contengan un heterociclo en C-17.
- Diseñar y sintetizar derivados que contengan un carbonilo en C-5 y un hidroxilo en C-3 ya sea en la estructura del androstano o pregnano.
- Diseñar y sintetizar derivados de la progesterona introduciendo una doble ligadura en C-5 y C-6.
- Diseñar y sintetizar derivados del androstano que con una lactona en el anillo D.
- Evaluar la actividad biológica de los intermediarios y de los productos finales en los siguientes modelos *in vitro*: inhibición de la enzima 5 α -redustasa (tipo 1 y tipo 2), afinidad por el receptor androgénico, afinidad por el receptor de progesterona, inhibición de la enzima CYP17A1, efecto sobre la proliferación en líneas celulares de cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de cerebro.

- Evaluar la actividad biológica de los intermediarios y de los productos finales en los siguientes modelos *in vivo*: efecto de los compuestos sobre el diámetro de la mancha pigmentada en hámster, el peso de la próstata, de las vesículas seminales; efecto sobre el ciclo reproductivo, sobre el útero, endometrio, glándulas mamarias de la rata. De igual forma el estudio sobre el edema de oreja del ratón.
- Estudiar la posible relación de la estructura de los compuestos sintetizados, así como de algunos de sus parámetros fisicoquímicos (LogP, efectos electrónicos, efectos estéricos) en relación a su actividad biológica tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes modelos biológicos.
- Analizar los resultados obtenidos para predecir su potencial aplicación en enfermedades hormono-dependientes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PARTE QUÍMICA

4.1.1 Síntesis de ésteres en la posición C-3

La síntesis de los ésteres en posición C-3 del esqueleto esteroideal se realizó usando el correspondiente alcohol, DCC y DMAP en cloroformo. Como paso inicial de reacción tenemos la desprotonación del ácido carboxílico correspondiente por el nitrógeno sp^3 de la DMAP. En un paso subsecuente el ion carboxilato realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono sp de la DCC. Una vez formado el intermediario ácido-DCC, el alcohol del derivado esteroideal ataca al carbonilo del ácido, y se desplaza dicitclohexilurea, obteniéndose el correspondiente éster (Figura 15). La relación molar empleada para cada derivado dependió de la naturaleza del ácido y se encuentra reportada en la sección de desarrollo experimental de esta tesis. Los rendimientos de esta reacción dependen de la solubilidad y naturaleza del ácido utilizado.

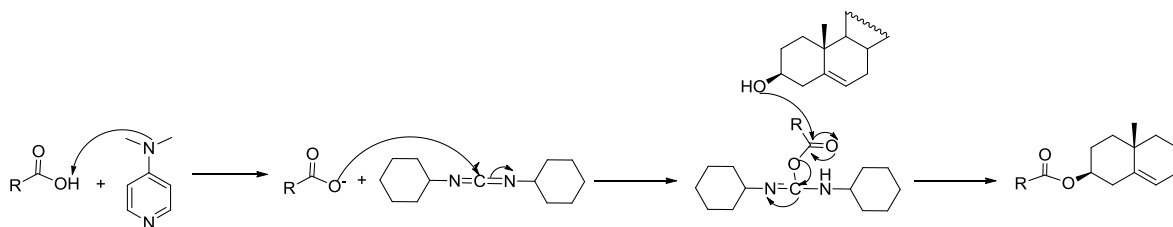


Figura 15. Mecanismo de la reacción de esterificación.

En el espectro de infrarrojo de los ésteres ya no se observa la banda aproximadamente en 3340 cm^{-1} que corresponde al grupo funcional hidroxilo, pero se observa la presencia de una banda característica que corresponde a un grupo carbonilo de éster alrededor de 1730 cm^{-1} (puede variar dependiendo del derivado). En el espectro de RMN ^1H se observó la aparición de las señales propias para cada derivado de éster: alifático, alicíclico o aromático (Capítulo 5). En RMN ^{13}C se observaron las señales

correspondientes a los derivados de éster ya sea alifáticos, alicíclicos o aromáticos, además de que aparece una señal aproximadamente a 170.0 ppm que corresponde al carbonilo de éster. El conjunto de esta información espectroscópica confirma la obtención de los compuestos deseados.

4.1.2 Síntesis de los derivados con un formilo en C-16 y un cloro en C-17

Para obtener los derivados **3a-3j** y **7** se empleó una reacción de formilación, usando el correspondiente éster (**2a-2j** y **6**), POCl_3 , DMF y cloroformo. El primer paso consiste en la formación de la sal de iminio. Una vez que esta sal es formada en un paso subsecuente, tenemos la reacción se realiza entre el carbonilo en C-17 y el oxiclorigeno de fósforo. Posteriormente la sal de iminio ataca al intermediario formado entre el esteroide y el oxiclorigeno de fósforo. Posteriormente se elimina el oxiclorigeno de fósforo seguida por el ataque del agua para obtener el producto deseado (Figura 16).

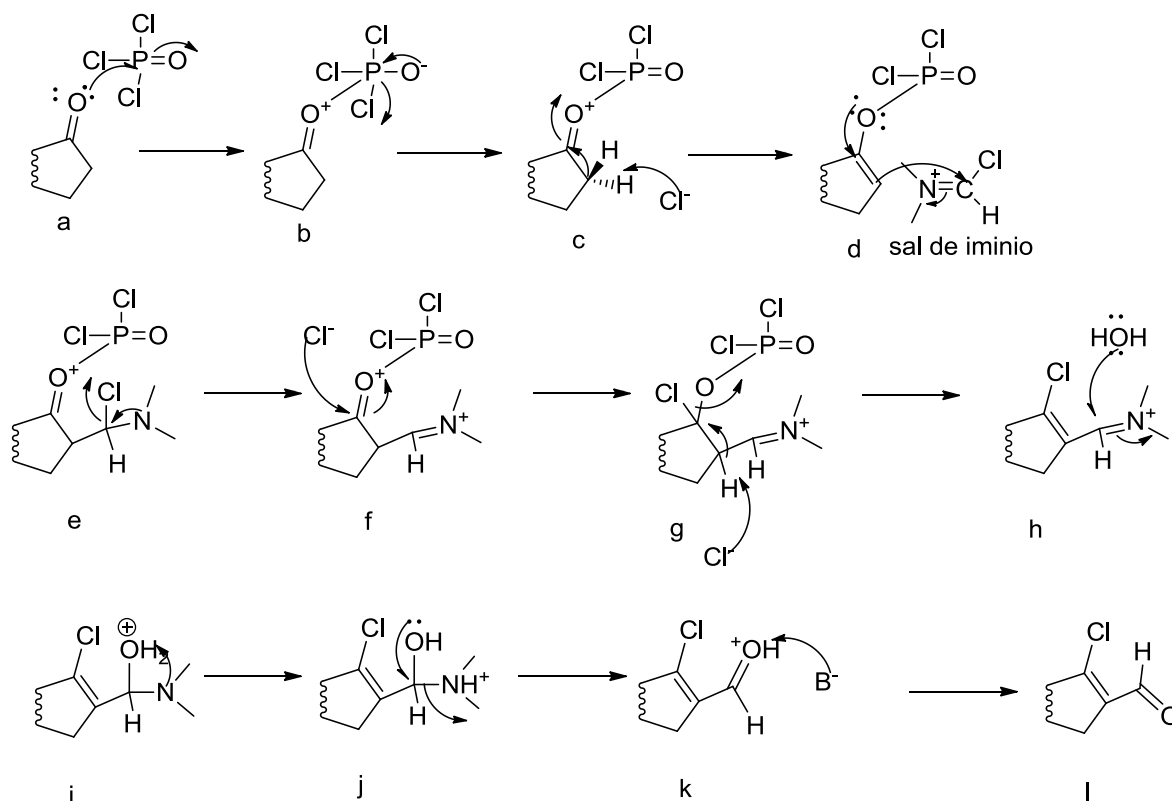


Figura 16. Mecanismo propuesto para la reacción de formilación

Los rendimientos de esta reacción van del 59 al 68%. En esta reacción también se obtiene un producto secundario que corresponde a un derivado similar al compuesto esperado pero sin el formilo en el C-16 de la estructura esteroidal. El espectro de UV muestra una banda a 257 nm^{-1} característica de carbonilos α,β no saturados la cual nos confirma la presencia del grupo formilo conjugado a una doble ligadura. En el espectro de RMN^1H tenemos una señal simple a 9.9 ppm que integra para un protón correspondiente del grupo formilo en C-16. En RMN^{13}C se observa a 136.0 ppm el desplazamiento característico para un carbono cuaternario (C-16) que está unido a un grupo formilo, a 161.0 ppm aparece la señal para el carbono cuaternario unido a un átomo de cloro (C-17) y a 187.7 ppm la señal característica del carbono del formilo.

4.1.3 Síntesis de los derivados con un heterociclo en C-17 y un formilo en C-16 (4a-4j, 5a-5j y 8a-8c)

Para la síntesis de los derivados **4a-4j**, **5a-5j** y **8a-8c** se utilizó como material de partida los compuestos **3a-3j** y **7**. Estas moléculas fueron tratadas con el correspondiente heterociclo y K_2CO_3 en DMF. El mecanismo propuesto para esta reacción consiste en la desprotonación del heterociclo por la base. Como paso subsecuente el anión realiza un ataque nucleofílico sobre el C-17 del esqueleto esteroidal y desplaza el ion cloruro, para obtener así el compuesto deseado (Figura 17). Los rendimientos de esta reacción van del 79 al 95 %.

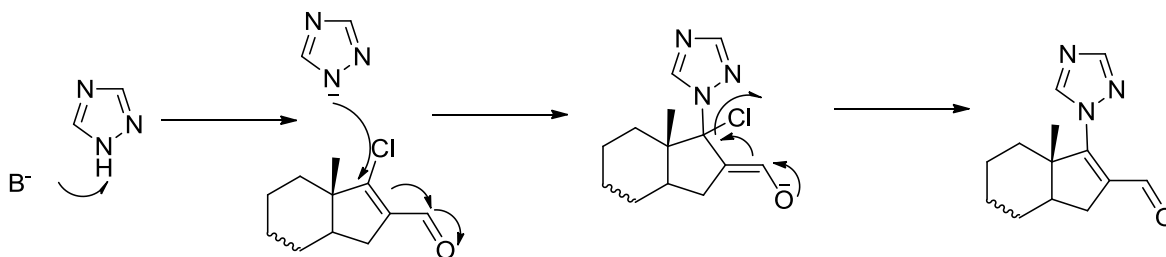


Figura 17. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los derivados **4a-4j**, **5a-5j** y **8a-8c**

En los espectros de UV, estos compuestos (**4a-4j**, **5a-5j** y **8a-8c**) presentan bandas entre 240-260 nm⁻¹. En RMN¹H se observan las señales características de los protones aromáticos, en el caso de los derivados de triazol (**4a-4j** y **8a**) se observan a 8.1 y 8.4 ppm dos señales que integraron para un protón cada una. Los derivados de imidazol (**5a-5j** y **8b**) muestran tres señales a 7.1, 7.2 y 7.6 ppm; y en el caso del derivado de bencimidazol se obtuvieron cuatro señales. En RMN¹³C los derivados de triazol presentan señales con desplazamientos aproximadamente a 153.0 y 156.0 ppm, estos son desplazamientos característicos de los carbonos que constituyen al triazol. En el caso de los derivados de imidazol se observa la aparición de tres señales a 119.0 ppm, 135.0 y 138.0 ppm. Todos estos datos espectroscópicos corroboran la formación de los compuestos deseados.

4.1.4 Síntesis de los derivados esteroidales que contiene un epóxido en C-5 (**10** y **23a-23d**)

Para la síntesis de los derivados **10**, **23a-23d** se utilizó como material de partida los derivados **9** y **22a-22d**. Estos derivados fueron tratados con ácido *meta*-cloroperoxibenzoico en cloroformo. El primer paso de esta reacción se realiza por la cara alfa de la estructura esteroideal debido a que la cara beta se encuentra impedida estéricamente por el metilo angular en C-10 y el sustituyente en C-3, lo que favorece la formación del epóxido alfa como se muestra en la Figura 18.

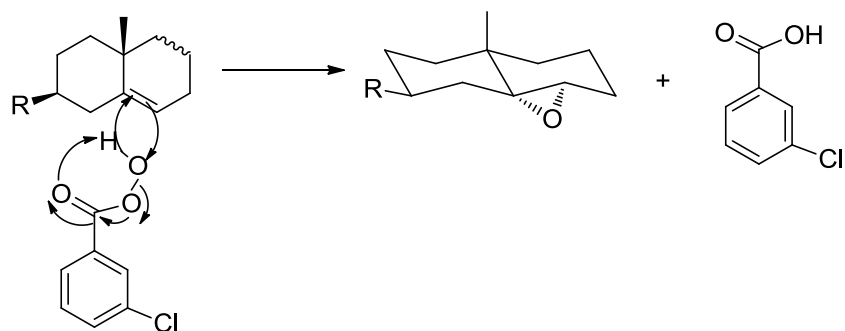


Figura 18. Mecanismo de reacción propuesto para la epoxidación en C-5

Los rendimientos de esta reacción van del 90 al 98 %. En RMN¹H se observa la aparición de una señal doble que integra para un protón con un desplazamiento a 2.9 ppm, esta señal es característica de protones que tienen como grupo base un epóxido. En RMN¹³C aparecen las señales a 65.3 y 63.2 ppm de los carbonos de un doble enlace en C-5 y C-6, confirmando así la obtención del epoxi derivado.

4.1.5 Síntesis de los derivados esteroidales que contiene un carbonilo en C-6 y un hidroxilo en C-5 (11 y 21a-21d)

Para la síntesis de los derivados **11** y **24a-24d** se utilizó la reacción de oxidación. Como material de partida se empleó los derivados **10** y **23a-23d**, los cuales fueron tratados con una solución acuosa de CrO₃. En el mecanismo de reacción, el agua abre el epóxido, y posteriormente el ácido crómico ataca al alcohol secundario formando el éster cromato. Finalmente otra molécula de agua toma el protón en C-5 y se lleva a cabo la oxidación obteniendo el compuesto deseado (Figura 19). Los rendimientos de esta reacción van del 85 al 95%.

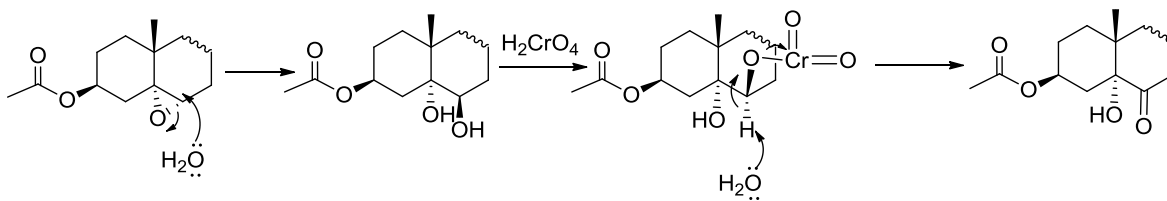


Figura 19. Mecanismo propuesto para la oxidación.

En el espectro de infrarrojo se observó una señal intensa a 3500 cm⁻¹, la cual es una señal característica del grupo hidroxilo. En RMN¹H se observa la señal a 2.9 ppm. En el espectro de RMN¹³C desaparecieron las señales a 65.3 y 63.2 ppm correspondientes al epóxido y se observó una señal a 80.0 que confirma la presencia de un carbono unido a un grupo hidroxilo en C-5. Por otro lado también se observa una señal a 212.0 ppm característica de un carbono de un grupo carbonilo en C-6.

4.1.6 Síntesis de 3 β -Acetoxi-4,16-pregnadien-6,20-diona (12)

El derivado esterooidal **12** (Figura 12) se obtuvo a partir del derivado **11** tratándolo con SOCl₂ y piridina en cloroformo. Como primer paso de reacción el alcohol en C-5 ataca nucleofílicamente al azufre del cloruro de tionilo. Posteriormente la piridina desprotona al carbono C-4 y desplaza al clorosulfito en C-5 (Figura 20). El rendimiento de esta reacción fue de 92 %.

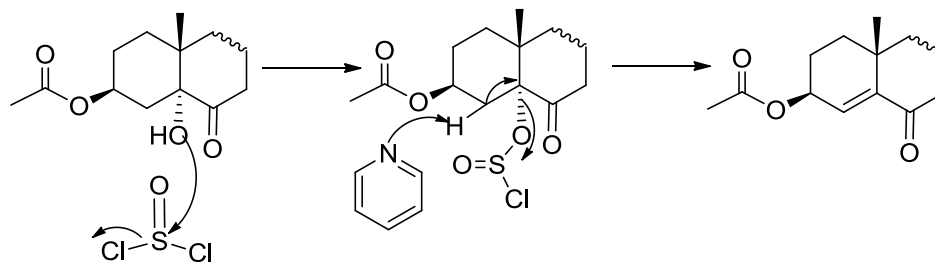


Figura 20. Mecanismo propuesto para la deshidratación del alcohol en C-5

En el espectro de UV, el compuesto **12** mostró una banda a 235 nm correspondiente a un carbonilo α,β no saturado. En el espectro de infrarrojo ya no aparece a 3350 cm⁻¹ la señal característica del grupo hidroxilo en C-5. En RMN¹H aparece una señal simple a 6.0 ppm (H-4), desplazamiento característico de protones vinílicos. En RMN¹³C se tiene dos señales a 129.0 (C-4) y 147.2 (C-5) ppm indicativas de la presencia de un doble enlace que se genera por la reacción de deshidratación estas posiciones.

4.1.7 Síntesis de 3 β -Hidroxi-4,16-pregnadien-6,20-diona (13)

El derivado esterooidal **13** (Figura 12, página 14) se obtuvo usando como materia prima el derivado **12** y una solución acuosa de hidróxido de sodio al 2 %. El mecanismo propuesto para esta reacción (Figura 21) sugiere un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del éster por el grupo hidroxilo y el desplazamiento del grupo alcohol como producto. El rendimiento obtenido para esta reacción fue del 70 %.

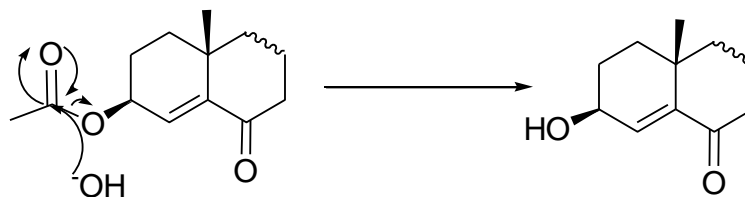


Figura 21. Mecanismo propuesto para la hidrolisis del éster en C-3

En el espectro de infrarrojo para el compuesto **13** se observó una señal intensa a 3375 cm^{-1} , la cual es característica de la presencia de un grupo hidroxilo. La RMN^1H permitió confirmar la obtención del producto y la principal característica observada fue la ausencia de la señal simple en 2.3 ppm que integra para tres protones asignable al metilo del acetoxi en C-3. Por otro lado en el espectro de RMN^{13}C se observa una señal a 67.1 ppm para un hidroximetino.

4.1.8 Síntesis de 17α -Acetoxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (**16**)

El compuesto **16** se sintetizó utilizando como materia prima al compuesto 17α -Acetoxiprogesterona (**15**) cloranilo, ácido acético glacial y tolueno (Figura 22). En medio ácido el carbonilo del cloranilo es protonado, posteriormente el carbonilo del esteroide en C-3 se enoliza y el hidruro en C-7 reacciona con el cloranilo protonado, por tautomería se forma el sistema conjugado $\Delta^{4,6}$. Finalmente el oxígeno del grupo carbonilo es desprotonado para obtener así el derivado deseado (Figura 22). El rendimiento de esta reacción fue de 97%.

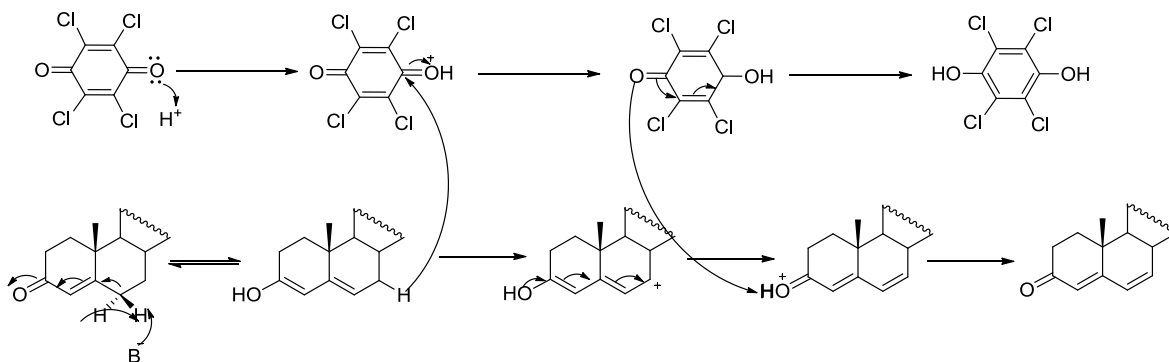


Figura 22. Mecanismo propuesto para la oxidación en C-6

En el espectro de UV del compuesto **16** se observa una banda a 283 nm, la cual es característica de una dienona. En el espectro de RMN¹H se observa una señal simple centrada en 5.7 ppm (H-4) que integró para un protón, a 6.1 ppm (H-6) un doble de doble con $J_1=10$ y $J_2= 1.2$ Hz, a 6.2 ppm (H-7) una doble de dobles con $J_1=9.6$ y $J_2= 2$ Hz, a 6.2 ppm, estos datos confirman la formación de una doble ligadura en las posiciones C-6 y C-7. En el espectro de RMN¹³C se observan señales con desplazamientos característicos para los carbonos de dobles enlaces conjugados a 123.9 (C-4), 128.3 (C-6) y 140.0 (C-7) ppm. Las evidencias descritas previamente permitieron confirmar la estructura del compuesto **16**.

4.1.9 Síntesis de 17 α -Hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (17)

El derivado esteroidal **17** (Figura 13, página 17) fue preparado a partir del compuesto **16** mediante una reacción de hidrólisis en medio básico. El mecanismo propuesto para esta reacción es el mismo que el reportado anteriormente en la Figura 21.

El rendimiento de esta reacción fue del 75%. El espectro de infrarrojo mostró una señal en 3406 cm⁻¹ característica de la presencia de un grupo hidroxilo. El espectro de RMN¹H presentó la ausencia del singulete centrado a 2.1 ppm que integró para tres protones asignable al grupo acetoxi en C-3. En el espectro de RMN¹³C se observa la ausencia de la señal en 170.6 ppm asignable al carbono del carbonilo del éster y la aparición a la señal a 89.5 ppm característica a un carbono unido a un hidroxilo secundario permitió confirmar la obtención del compuesto **17**.

4.1.10 Síntesis de los derivados 18a-18e con una función de carbamato aromático en C-17

Los derivados **18a-18e** (Figura 13, página 17) fueron preparados a partir del derivado **17**, utilizando el correspondiente isocianato y dimetilsulfuro de cobre en THF. Aunque aun no se tiene certeza del posible mecanismo de reacción para la formación de carbamatos, de acuerdo a lo reportado por Hazzard,²⁸ se considera la formación de un complejo disolvente-alcohol-dimetilsulfuro de cobre (I), seguido de un estado de transición entre el complejo I y el isocianato (II) para posteriormente formar el carbamato correspondiente (Figura 23).

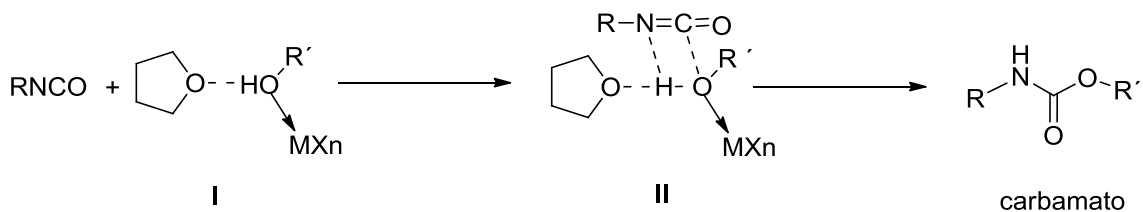


Figura 23. Mecanismo propuesto para la síntesis de carbamatos

Los rendimientos de esta reacción van del 49 al 75%. En el espectro de infrarrojo se observó una banda a 3260 cm^{-1} característica de la vibración N-H. Además en el espectro de RMN^1H se observan señales para protones aromáticos entre 7 y 8 ppm, una señal simple a 10.5 ppm asignable a un protón unido al nitrógeno del carbamato. La presencia del grupo fenilo también fue corroborada en el espectro RMN^{13}C en donde se observaron señales con desplazamientos característicos para carbonos sp^2 aromáticos.

4.1.11 Síntesis de los derivados $3\beta\text{-RCOO-5}\alpha,6\beta\text{-dibromo-androstan-17-ona}$ (20a-20d)

Los compuestos **20a-20d** fueron sintetizados a partir de los derivados **19a-19e** los cuales se disolvieron en diclorometano y se les adicionó una solución de Br_2 en CCl_4 . En el mecanismo propuesto el bromo molecular es atacado nucleofílicamente por la doble ligadura en C-5, generando un ion bromonio cíclico, el cual es atacado por el bromuro y obteniéndose así el compuesto deseado (Figura 24).

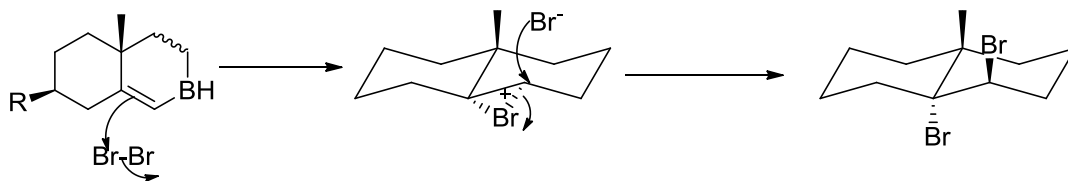


Figura 24. Mecanismo propuesto para la bromación de la doble ligadura en C-5 y C-6

Los rendimientos obtenidos para estos derivados fueron del 67-69%. En el espectro de RMN^1H se observó a 4.8 ppm una señal asignable a C-6, que integró para un protón, este desplazamiento es característico para los protones unidos a un carbono que contiene un

átomo de Br. En el espectro de RMN¹³C se observaron dos señales, en 55.3 ppm (C-6) y 87.9 ppm (C-5). Estos desplazamientos son característicos de carbonos que se encuentran unidos a átomos de bromo.

4.1.12 Síntesis de los derivados 3 β -RCOO-5 α ,6 β -dibromo-D-homo-13(17) α -oxa-androstan-17-ona (21a-21d)

Para la síntesis de los compuestos **21a-21d** se emplearon como material de partida los derivados **19a-19d** los cuales fueron disueltos en una mezcla de diclorometano/metanol y se adicionó MMPP (reacción de Baeyer y Villiger). En el mecanismo propuesto, el primer paso de reacción involucra un ataque nucleofílico sobre el carbono 17 del esteroide. Posteriormente migra el enlace C-13/C-17 de la estructura esteroidea para obtener así el compuesto deseado (Figura 25). Los rendimientos para esta reacción van del 87-93%.

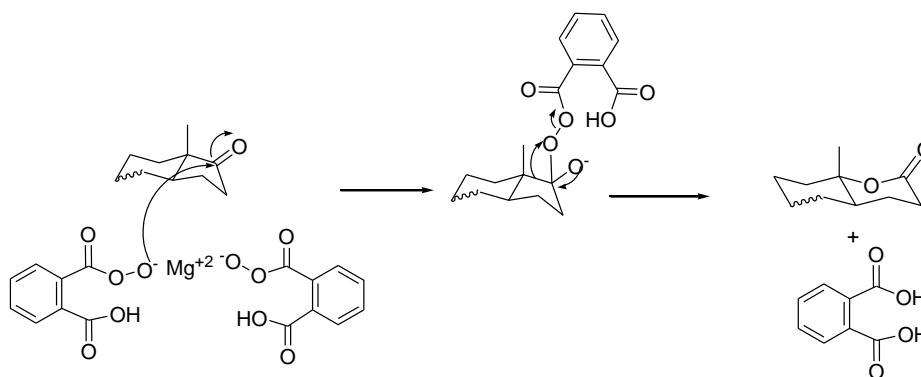


Figura 25. Mecanismo propuesto para la expansión del anillo D del esqueleto del androstano

En el espectro de infrarrojo aparece una banda a 1770 cm⁻¹, la cual es indicativa de la vibración del carbonilo de éster. En el espectro de RMN¹³C se observa una señal a 173 ppm, esta señal corresponde al carbonilo de éster (lactona).

4.1.13 Síntesis de los derivados 3 β -RCOO-D-homo-13(17) α -oxa-5-androsten-17-ona (22a-22d)

Los derivados **22a-22d** (Figura 14) fueron preparados a partir de los compuestos **21a-21d**, los cuales fueron tratados con NaI en THF. El mecanismo propuesto de esta reacción es el siguiente: el ión yoduro ataca al bromo por la cara alfa de la estructura

esteroidal y mediante una eliminación, se forma la ligadura en C-5/C-6 (Figura 26). Los rendimientos obtenidos para esta reacción van del 89-93%.

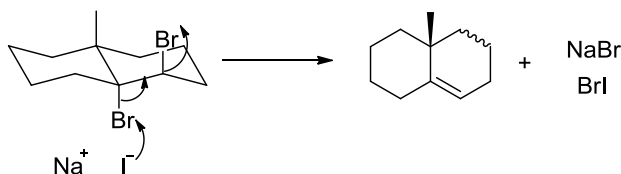


Figura 26. Mecanismo propuesto para la regeneración de la doble ligadura en C-5

En el espectro de RMN¹H aparece una señal doble de doble a 5.3 ppm que integra para un protón. Por otro lado, en el espectro de RMN¹³C se tiene dos señales, una a 121.0 (C-6) y otra a 139.0 ppm (C-5), estas señales corresponden a carbonos de dobles enlaces. Con estos datos espectroscópicos se confirma la presencia de la doble ligadura en C-5 y C-6.

La síntesis y caracterización espectroscópica de los derivados **2a-2j**, **3a-3j**, **6**, **7**, **8c**, **10**, **11**, **12**, **13**, **16**, **17**, **19a-19d**, **20a-20d**, **21a-21d** y **22a-22d** ha sido previamente reportada, sin embargo, en este trabajo se reportan algunas modificaciones a la parte experimental que permitió incrementar los rendimientos.^{27, 29-31}

4.2 PARTE BIOLÓGICA

4.2.1 Estudios *in vitro*

4.2.1.1 Inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 y 2

En este trabajo se realizaron estudios de la acción inhibitoria de la enzima 5 α -R1 con todos los compuestos sintetizados siguiendo el protocolo reportado en la sección de desarrollo experimental. Se encontró que los compuestos **2f-2j**, **3f-3j** y **5a-5j** (Figura 11, página 16) inhibieron a la enzima 5 α -reductasa tipo 1 (Figura 27). Los derivados que mostraron mayor capacidad inhibitoria fueron los derivados **2f-2j** y **3f-3j** (Figura 27), de acuerdo a los resultados encontrados, la presencia de un éster aromático con grupos electroattractores en posición *para* del anillo aromático ayuda a mejorar la capacidad

inhibitoria de estas moléculas ya que los derivados con ésteres alicíclicos no presentaron actividad sobre la enzima 5 α -R1.

Por otro lado, una vez que se cambio el átomo de cloro por el heterociclo en el C-17, solo los derivados de imidazol (**5a-5j**) mostraron inhibir a la enzima 5 α -R1. Sin embargo, con la presencia del heterociclo, no se logró mejorar la actividad mostrada por sus precursores (**3f-3j**), lo cual nos indica que la estructura tridimensional de esta isoforma de la enzima no acepta la presencia de heterociclos con hibridación sp² en el C-17 de la estructura esferoidal.

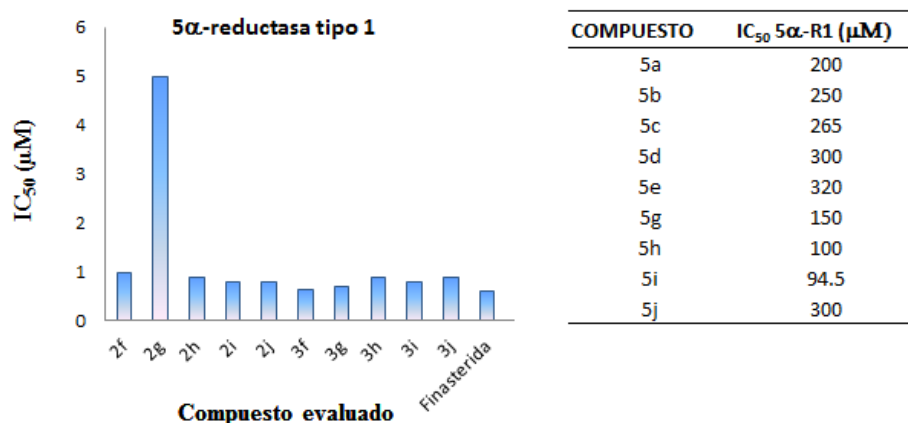


Figura 27. Resultados de la inhibición de los compuestos sintetizados sobre la enzima 5 α -R1.

De acuerdo a la correlación de la actividad biológica con el efecto electrónico de los derivados **3f-3j**, se encontró que la actividad exhibida por estos compuestos muestra una tendencia a disminuir conforme decrece la electronegatividad de los halógenos. En base a esta observación, se trató de establecer una correlación entre el inverso de la actividad inhibitoria de la enzima 5 α -R1 con el parámetro de Hammet (σ)³² (Figura 28), el cual es un descriptor usado para correlacionar la naturaleza del sustituyente en la posición *para* del benzoato y su efecto en la actividad biológica. Se encontró para un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9259, de lo que podemos inferir que para los derivados del androstano con un formilo en C-16 (**3f** y **3g**) y un cloro en C-17, los derivados de ácido benzoico que

tienen un valor de σ de cero o cercano a cero, son los que poseen una IC_{50} parecida a la mostrada por la finasterida (fármaco comercial).

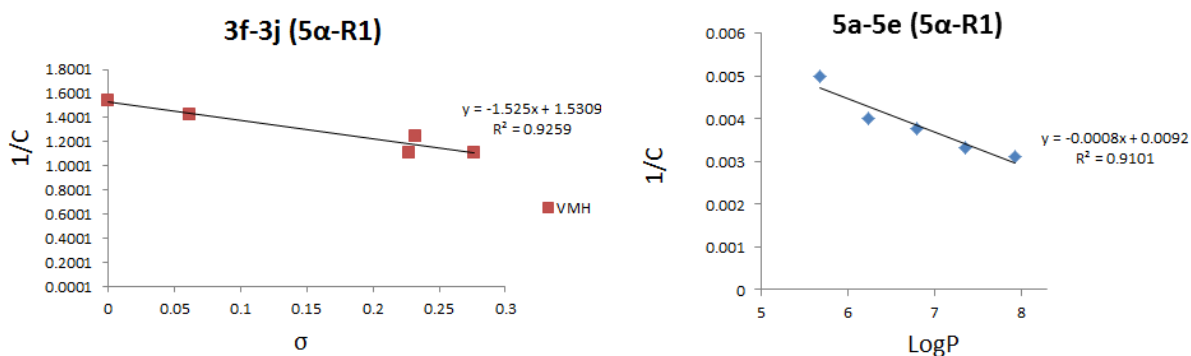


Figura 28. Relación de parámetros fisicoquímicos entre los compuestos sintetizados con el σ y Log P.

Por otro lado, aunque los derivados **5a-5e**, no mostraron mejores valores de IC_{50} que la finasterida en la inhibición de la enzima 5α -R1, se decidió correlacionar esta actividad con el descriptor Log P, el cual es un parámetro usado para correlacionar la lipofilia de la molécula con su actividad biológica. En la Figura 28 se observa que conforme aumenta la lipofilia de la molécula (incrementa el número de carbonos en el anillo cíclico alifático), disminuye su actividad inhibitoria. Esta correlación no fue observada con los derivados de imidazol con un éster aromático en C-3 (**5h-5j**).

La enzima 5α -R2 es expresada principalmente en la próstata y tejidos periféricos, su inhibición es importante para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna, y varios tipos de cánceres (mama, cerebro, etc). En este trabajo se encontró que los derivados **3a** y **3d** mostraron mejor actividad inhibitoria de la enzima 5α -R2 (obtenida de la próstata del hámster) en relación a la finasterida (Figura 29). Aparentemente el arreglo espacial de los esteres cíclicos alifáticos en C-3 influye en la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre la enzima 5α -R2.

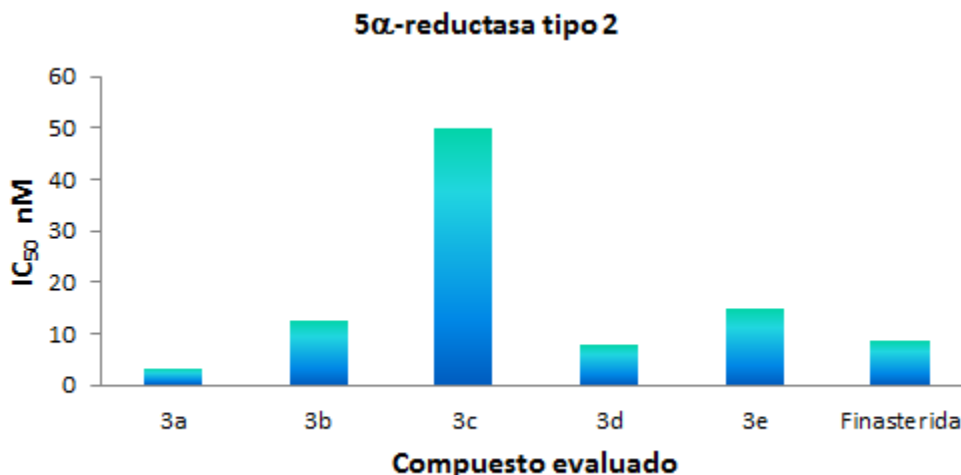


Figura 29. Resultados de la inhibición de los compuestos sintetizados sobre la enzima 5 α -R2.

De los compuestos **22a-22e** (Figura 14) se realizaron los estudios *in vitro* sobre la inhibición de la enzima 5 α -R obtenida de la próstata de humano. Los resultados indican que los compuestos **22a**, **22b**, **22c**, **22d** y **22e** inhiben a la enzima 5 α -reductasa con una IC₅₀ de 1.2 \pm 0.45 nM, 1.2 \pm 0.1 nM, 0.028 \pm 0.003 nM, 0.069 \pm 0.005 nM y 110 \pm 23.6 nM respectivamente. El testigo positivo utilizado fue el fármaco comercial finasterida mostrando una IC₅₀ de 0.19 \pm 0.025 nM. Aunque los compuestos sintetizados no mostraron un valor de IC₅₀ menor que la finasterida, los valores obtenidos son significativos para enfocarnos a futuras modificaciones en la estructura esteroidal para mejorar su actividad biológica sobre la inhibición de la enzima 5 α -reductasa. Se planteo modificar el anillo B del esteroide de acuerdo a lo descrito en la quinta propuesta. Estas modificaciones (compuestos **23a-23d** y **24a-24d**) fueron realizadas en este proyecto de investigación, sin embargo estos compuestos no fueron activos debido a su escasa solubilidad.

4.2.1.2 Estudios sobre afinidad del receptor de andrógenos y progesterona

Los receptores de andrógeno (RA) y progesterona (RP) son miembros de la superfamilia de receptores hormonales nucleares de los factores de transcripción. Se ha documentado que su desregulación desempeña un papel crucial en el desarrollo de diversas enfermedades hormonodependientes debido a que los genes regulados por estos dos receptores son los responsables de la proliferación, supervivencia y diferenciación tanto de las células sanas así como de las cancerígenas.³³

Mientras el RA se ha asociado al desarrollo de enfermedades hormono-dependientes en el hombre como es el caso de la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata; el RP ha sido relacionado con el desarrollo de cáncer de seno, endometrio y ovarios en la mujer.

Es bien sabido que el RA promueve la diferenciación de células epiteliales y regula la transcripción de genes que promueven la síntesis de proteínas necesarias para mantener el funcionamiento de la próstata. Sin embargo, su rol en el desarrollo y progreso del cáncer de próstata no es aún del todo claro. Dada la importancia de su función, se ha tratado de desarrollar terapias más efectivas para su regulación.³⁴

Por otro lado el RP tiene 3 isoformas: RP-A, RP-B y RP-C; se ha comprobado que únicamente las isoformas A y B pueden enlazar al ligando, sin embargo la isoforma C regula a la transactivación de la isoforma B en el útero o potencia las otras isoformas en el seno.³⁵

En este trabajo se decidió evaluar como inhibidores de los receptores de progesterona, a los compuestos sintetizados debido a su semejanza estructural con los sustratos que naturalmente enlazan a estos tipos de receptores. Estos experimentos se realizaron con la finalidad de encontrar moléculas que mostraran selectividad a cualquiera de estos dos receptores y que nos pudiera ayudar a explicar el posible mecanismo de acción en otros experimentos realizados en este proyecto.

En los ensayos realizados se encontró que ninguno de los compuestos sintetizados mostró afinidad por el receptor de andrógenos. Sin embargo, los compuestos **1** y **2f** (Figura

11, página 15) presentaron afinidad por el receptor de progesterona (0.29% y 182% respectivamente). En base a estos resultados podemos inferir que una simple modificación en C-3 como lo es un éster aromático puede incrementar la afinidad del esqueleto esteroidal del androstano por el RP, sin embargo, a medida que se va cambiando el sustituyente (F, Cl, Br, I) estos pierden su actividad. El compuesto **2f** puede ser un buen candidato para futuras modificaciones, con el objetivo de mejorar esta afinidad y así poder tener una molécula con mayor actividad hacia este receptor.

4.2.1.3 Estudios sobre la línea celular PC-3

La diferenciación, crecimiento y mantenimiento de la glándula prostática es regulada por diversas hormonas esteroidales, las más comunes son los andrógenos. En los compartimentos epiteliales, los andrógenos estimulan la proliferación, inhiben la muerte celular y promueven la actividad secretora. Las células cancerosas de próstata que son obtenidas del epitelio, se encuentran reguladas por andrógenos y pueden servir como objeto de estudio para cánceres de próstata andrógeno dependientes.³⁶

La línea celular PC-3 fue usada por primera vez en el año de 1979. Esta es una línea proveniente de células cancerosas de próstata que no responden a andrógenos por lo que se conoce como una línea celular andrógeno-independiente. Se sabe que son células tumorigénicas y se pueden emigrar a otros órganos.³⁷

Dado que la línea celular PC-3 es independiente de andrógenos y que algunos compuestos sintetizados en este trabajo no inhibieron a la enzima 5 α -reductasa ni se unieron al receptor de andrógenos, se realizó la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular en esta línea celular.

Los compuestos que mostraron una actividad considerable fueron aquellos que contenían un grupo de triazol en la posición 17 y un éster aromático con grupos electroattractores en el C-3 de la estructura esteroidal. También mostraron una actividad considerable los compuestos **4a**, **4g** y **8a** (Figura 30), los cuales tienen esteres alicíclicos en C-3 (Figura 30). La inhibición del crecimiento de esta línea celular por la acción de

compuestos similares a los sintetizados en este trabajo (heterociclos en C-17) ya ha sido repostada previamente por Njar.²³ Dado que línea celular PC-3 no responde a androgenos, muy probablemente estos compuestos se encuentren afectando al ciclo celular, por lo que futuros estudios para determinar su mecanismo de acción podrían ser considerados.

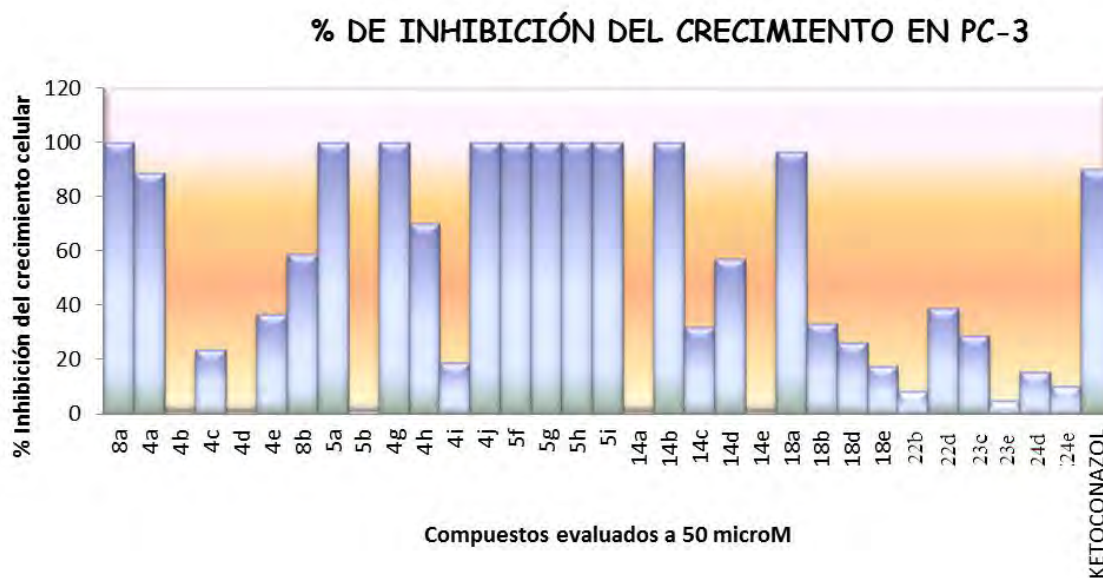


Figura 30. Evaluación de los compuestos en la línea celular PC-3.

Por otro lado, el compuesto híbrido **14b** (Figura 12) que contiene ibuprofeno en C-3 redujo la proliferación de la línea celular PC-3. Anteriormente, ha sido reportado que algunos antiinflamatorios como es el caso del sulindaco, meloxicam e ibuprofeno, lograron disminuir el avance del cáncer de la próstata en algunos pacientes.³⁸ De acuerdo a los resultados obtenidos, de todos los híbridos preparados, solo el derivado **14b** podría ser sujeto a estudios más específicos.

De igual forma el derivado **18a**, con una función carbamato en C-17, disminuyó el crecimiento celular en comparación con el ketoconazol, el cual es un fármaco que a pesar de sus grandes efectos secundarios aun se sigue usando para tratar a pacientes con cáncer de próstata recurrente (Figura 30).

4.2.1.4 Estudios sobre el efecto de los derivados heterocíclicos **8a**, **8b** y **8c** sobre la actividad de la enzima CYP17A

*Estudio de la afinidad de los compuestos **8a**, **8b** y **8c** hacia el grupo hemo de la enzima CYP17A1.*

Debido a que los compuestos **8a** y **8b** (Figura 11, página 15) han inhibido el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata (Figura 30), fue conveniente buscar un posible mecanismo de acción que pudiera explicar su actividad. Aunque no se sabe exactamente si la línea celular PC-3 se encuentra regulada por la enzima CYP17A1, investigaciones han revelado que podría existir una correlación. Por otro lado, Njar y colaboradores han encontrado que moléculas con similitud estructural a las sintetizadas en este trabajo, han presentado actividad en la inhibición de la enzima CYP17A1.⁶ Con base a lo anterior, se decidió estudiar la afinidad de estas moléculas por el hierro del grupo hemo, utilizando la proteína pura aislada de la bacteria *E. coli*. Se encontró que las moléculas **8b** y **8c** presentan un espectro de UV tipo 2 que indica que estos compuestos se enlazan directamente al hierro del grupo hemo. Así mismo, el derivado esteroideal con un heterociclo de imidazol en la posición C-17 mostró el valor más bajo de K_d (262 nM), sin embargo no es comparable con aquel mostrado por la abiraterona que fue de 100 nM. Por otro lado, el derivado **8a** presentó un espectro de UV tipo 1 lo cual indica que se une al hierro del grupo hemo mediante el desplazamiento de agua como paso previo a la unión (Figura 31).

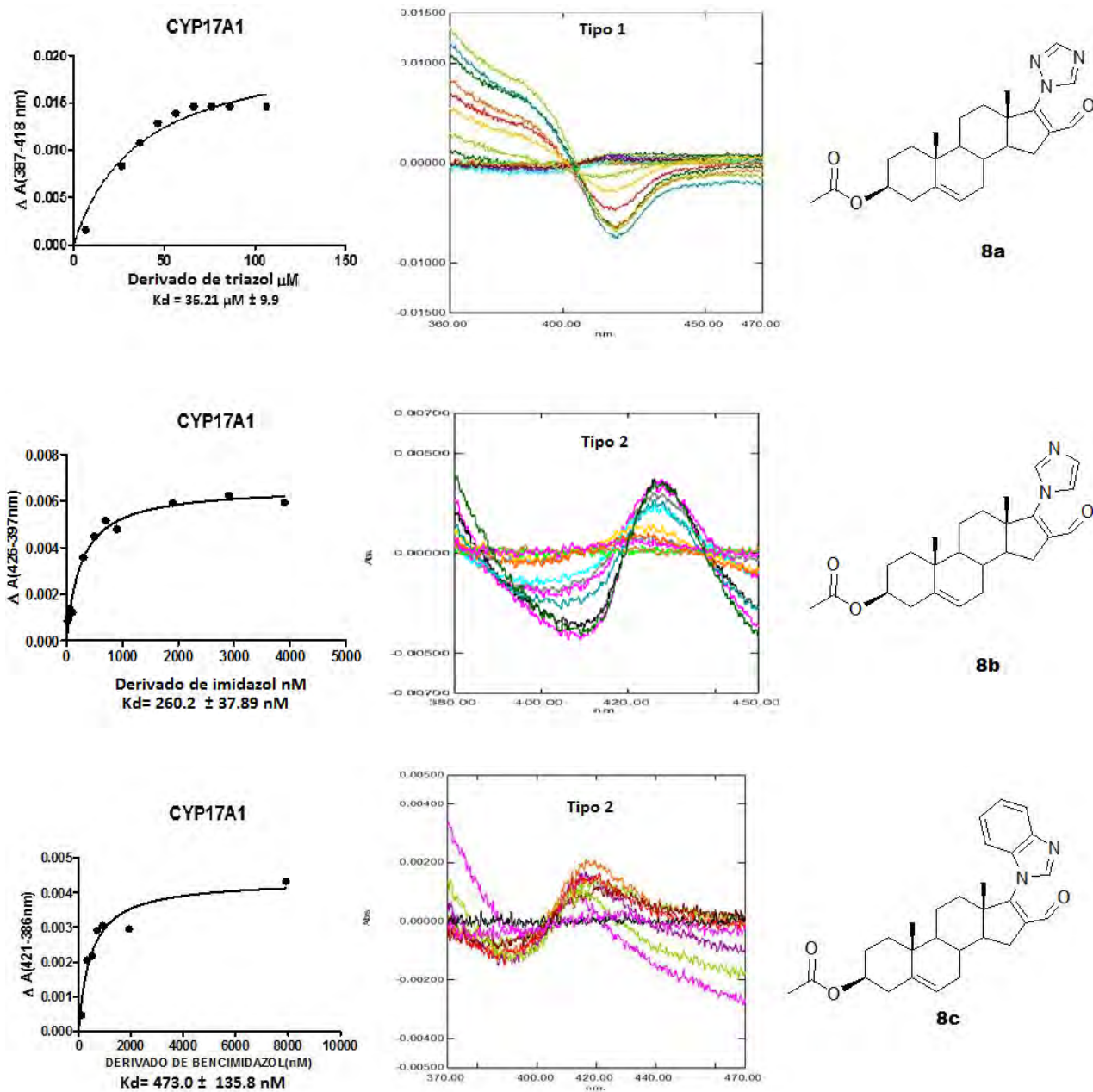


Figura 31. Valoraciones de los compuestos **8a**, **8b** y **8c** con desplazamientos en el UV-visible

En un estudio teórico previo realizado en nuestro laboratorio se encontró que el LUMO de la estructura molecular se encuentra en el heterociclo ubicado en C-17.³⁹ Se ha documentado que la unión más favorecida mediante un mecanismo tipo 2 al hierro del

grupo hemo de la enzima CYP17A1 es aquella en la que el compuesto actuó como un mejor grupo π aceptor,⁴⁰ por lo que en este en este trabajo y dado que el LUMO se encuentra en el heterociclo, ningún de los compuestos sintetizados (**8b** u **8c**) mostraron una mejor actividad que la abiraterona ya que los valores de LUMO de los compuestos **8b** y **8c** calculados por métodos computacionales, no son similares al encontrado para este fármaco (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de HOMO y LUMO para los sustratos de CYP17A1

Compuesto	Mecanismo de unión	Kd	HOMO (eV)	LUMO (eV)
Abiraterona	Tipo 2	100 nM	-8.96	-0.25
Progesterona	Tipo 1	700 nM	-10.07	-0.04
8a	Tipo 1	36.21 μ M	-9.52	-0.77
8b	Tipo 2	260.2 nM	-9.34	-0.77
8c	Tipo 2	473.0 nM	-8.98	-0.75

Sin embargo, en el caso del compuesto **8a** que mostró un mecanismo de unión tipo 1, semejante al encontrado para progesterona, la cual es el sustrato biológico de la enzima CYP17A1, no se puede aplicar el mismo concepto debido a que no se tiene reportes de que tipo de ligando se trata y no se sabe si el LUMO de la molécula puede influir en la afinidad hacia el sitio activo de la enzima CYP17A1.

Determinación de la IC₅₀ de los compuestos 8a, 8b y 8c en la enzima CYP17.

Para los estudios de determinación de la IC₅₀ se usó la fracción microsomal obtenida de un cultivo de *E. coli*; se decidió utilizar esta fracción debido a que es lo más parecido a las condiciones existentes en el cuerpo humano.

Se encontró que la IC₅₀ para la abiraterona y los compuestos **8a**, **8b** y **8c** fue de 100 \pm 5.7 nM, 1000 \pm 8.3 nM, 200 \pm 0.057 nM y 1000 \pm 10.4 nM respectivamente, estos valores fueron obtenidos a partir de las gráficas mostradas en la Figura 32. Ninguno de los compuestos sintetizados mostró un mejor valor de IC₅₀ que la abiraterona, sin embargo estos experimentos ayudan a explicar el posible mecanismo de acción de estos compuestos.

En base a lo reportado por Scott¹⁰ y debido a que es necesario un grupo que pueda formar un puente de hidrógeno en C-3, la baja actividad con respecto a la abiraterona podría ser atribuida a la presencia del grupo acetoxi en C-3. Como un futuro estudio se podría plantear la presencia de un hidroxilo libre en C-3 conservando el grupo formilo en C-16 conjugado con el heterociclo aromático en C-17 ya que estos compuestos no han sido previamente estudiados y no se conoce el efecto del formilo en C-16 en la actividad sobre esta enzima.

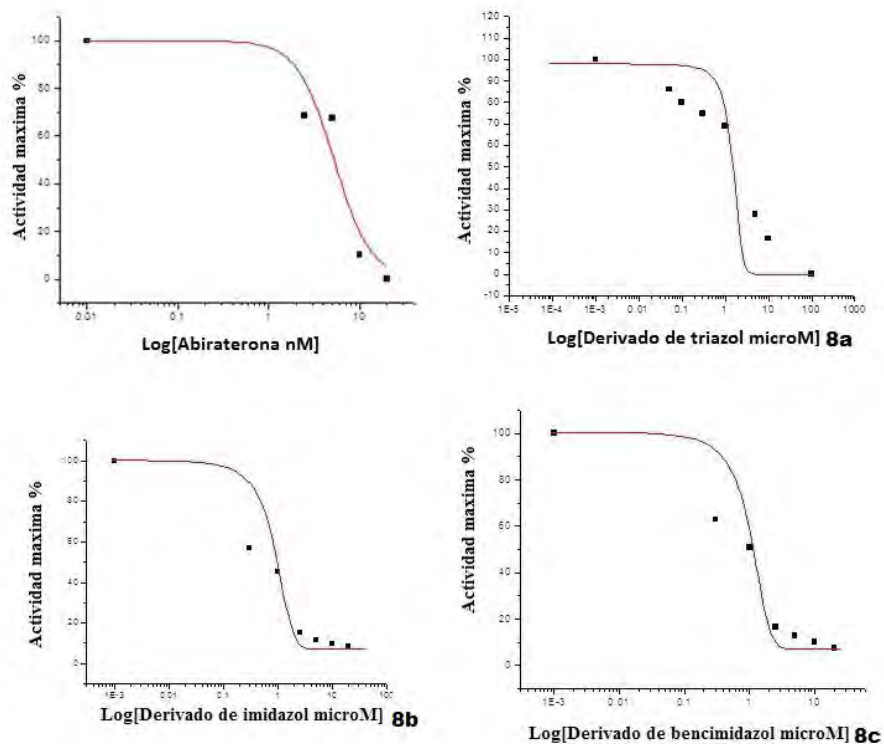


Figura 32. Gráficas del Log de las concentraciones contra el porcentaje de la actividad máxima encontrada

4.2.1.5 Cáncer de cerebro (línea celular U373)

Como ya se había mencionado anteriormente, el cáncer de glioblastoma es una enfermedad muy agresiva y dado a su tardía detección y escasa información sobre los mecanismos de regulación del sistema nervioso central, escasos tratamientos han sido desarrollados contra esta enfermedad.

La línea celular U373 es una línea celular de cáncer grado III y se ha demostrado su relación directa con diversas hormonas esteroideas. En recientes estudios clínicos se ha encontrado una correlación entre expresiones elevadas de la enzima COX con glioblastomas más agresivos y la disminución de la vida del paciente. La enzima óxido nítrico sintetasa es otro mediador inflamatorio que estimula la proliferación celular, pero su regulación en el crecimiento de estas células aun permanece incierto.⁴¹

En el modelo de la línea celular U373, los compuestos híbridos con antiinflamatorios **14a-14e** (Figura 33) fueron evaluados.

El compuesto **14c** no mostró ninguna actividad sobre el crecimiento celular a ninguna concentración. Los derivados **14a**, **14b**, **14d** y **14e** disminuyeron la proliferación celular a una concentración de 10 μM (Figura 33). Solo el derivado **14e** (sulindaco en C-3) podría ser candidato a futuros estudios debido a que a una concentración de 10 μM no permitió el crecimiento celular durante los 6 días de experimento con relación al grupo control (que no contenía ningún tratamiento).

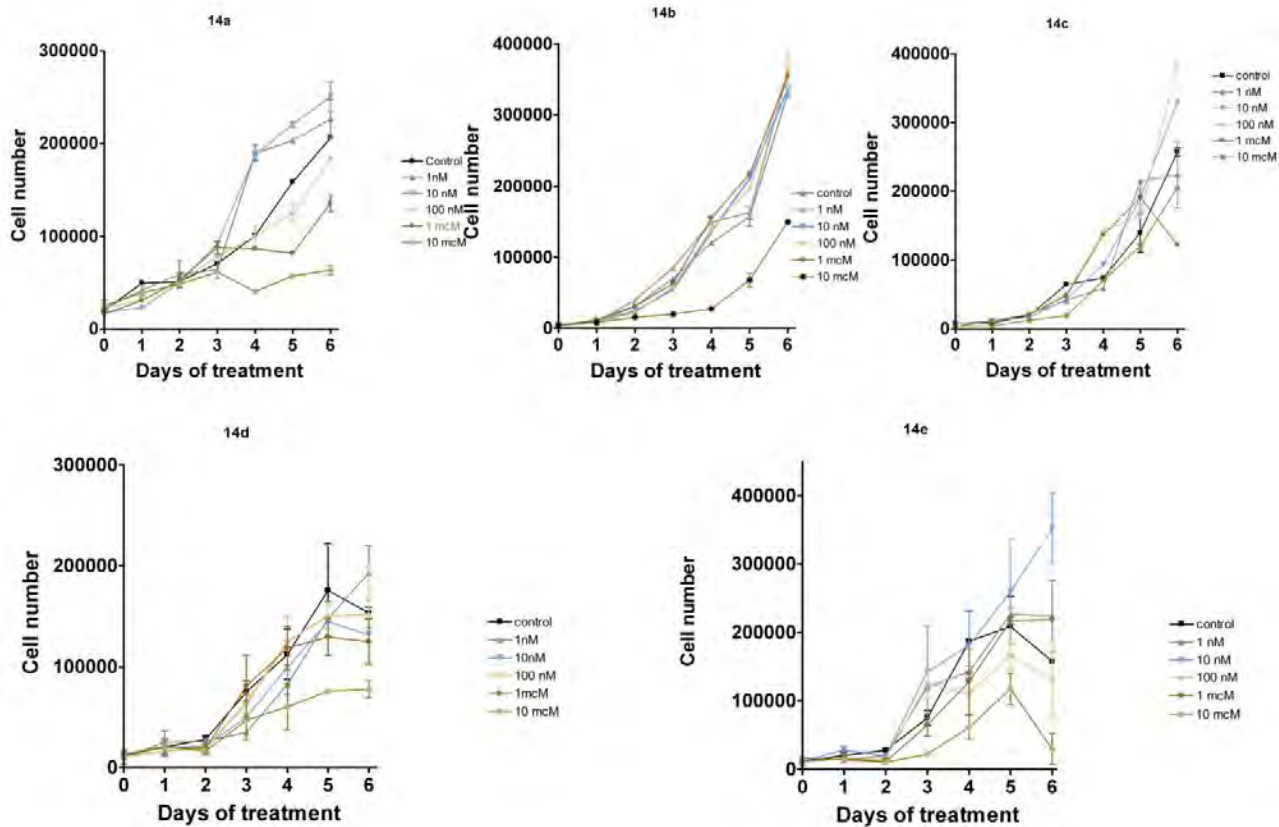


Figura 33. Gráficas de la evaluación de los compuestos 14a-14e en la línea celular de cáncer de glioma U373.

De igual forma se evaluaron las mezclas (no enlace covalente) con el derivado esteroide **13** y los cinco diferentes antiinflamatorios usados para sintetizar los híbridos (Figura 12, página 16), y también se evaluaron estos compuestos por separado. Ninguno de estos mostró inhibición de la proliferación de la línea celular U373 con respecto al grupo control que no contenía ningún compuesto.

En base a los resultados obtenidos en este modelo *in vitro*, se puede inferir que el enlace covalente entre el antiinflamatorio y la estructura esteroide le confiere mayor actividad en la disminución de la proliferación celular de la línea U373 que las mezclas

(esteroide+antinflamatorio) y que el esteroide o los antiinflamatorios evaluados por separados.

4.2.1.6 Inhibición de la proliferación celular de la línea MCF-7

Con la finalidad de estudiar la actividad biológica de los compuestos sintetizados en y posible aplicación en el tratamiento del cáncer de mama, se decidió determinar el efecto de los compuestos sobre la inhibición de la línea celular MCF-7. Se ha demostrado que esta línea celular expresa altos niveles de receptor de estrógeno y responde a estímulos mitogénicos y antimitogénicos de estrógenos y antiestrógenos por lo que provee un excelente modelo para el estudio de la regulación hormonal de los receptores de estrógenos en el cáncer de mama y el estudio de posibles antiestrógenos. Además de este receptor, también se sabe que expresa, aunque a bajas concentraciones, receptores de progesterona y las enzimas 5α -reductasa y CYP19.^{42, 43}

En la Figura 34 podemos observar que el compuesto que mostro mayor porcentaje de inhibición de la proliferación celular fue el compuesto **4a** (triazol en C-17, formilo en C-16 y un éster de ciclopropilo en C-3); seguido del compuesto **4e** (éster cicloheptílico en C-3). Ambos compuestos tiene en común un triazol en C-17, y como ya se ha mencionado anteriormente la presencia de heterociclos en esta posición le confiere a la molécula una cierta selectividad para inhibir a las enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450, por lo que se podría pensar que su actividad se debe a la inhibición de la enzima CYP19 la cual se encarga de la síntesis de estrógenos. Aunado a este efecto y dado que ninguna de estas moléculas se unió al receptor de progesterona, se podría pensar en la unión de **4a** y **4e** al receptor de estrógenos.

Dado que los derivados **22d** y **22e** inhibieron la proliferación de la línea celular MCF-7, podríamos sugerir que el mecanismo de acción de estos compuestos es vía inhibición de la enzima 5α -R2, ya que estos compuestos también mostraron actividad inhibitoria hacia esta enzima.

Debido a que **4a**, **4e**, **22d** y **22e** tienen como estructura esteroidal base al androstano, esto nos lleva a pensar que este esqueleto esteroidal podría ser la base para el diseño de futuras moléculas con mayor actividad para el tratamiento del cáncer de seno.

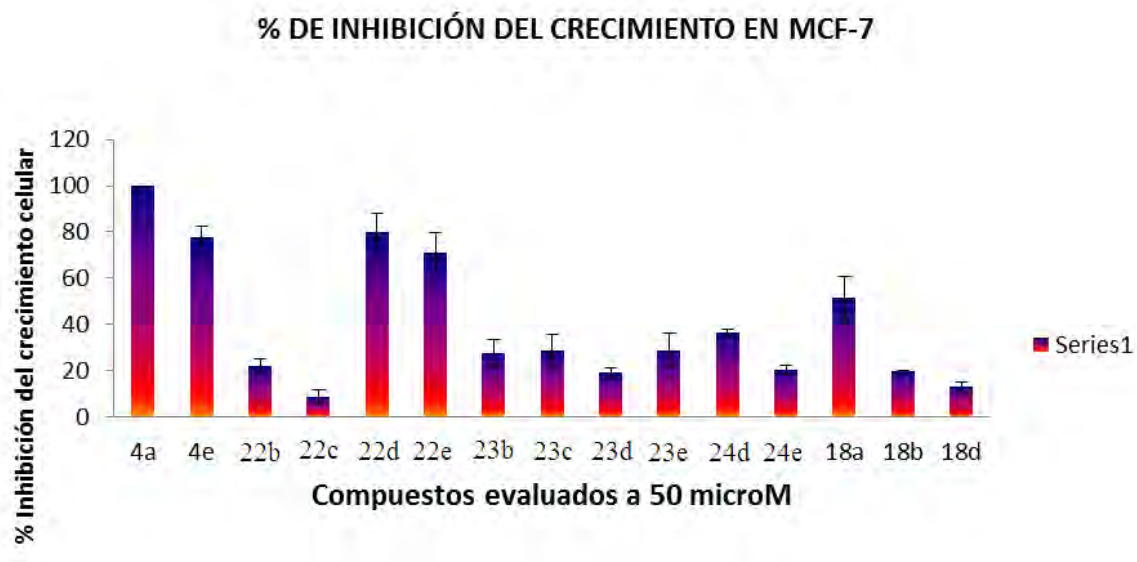


Figura 34. Efecto de los compuestos sintetizados en la proliferación de la línea celular MCF-7.

4.2.2 Estudios *in vivo*

4.2.2.1 Estudios *in vivo* sobre hámster (HPB y cáncer de próstata)

En trabajos anteriores se ha reportado que en el cáncer de próstata avanzado la enzima 5α -R1 se expresa en mayor medida que la 5α -R2. Como ya se mencionó anteriormente ambas enzimas se localizan en diferentes tejidos y órganos en el cuerpo humano.⁴⁴

Los órganos flancos del hámster son dos manchas pigmentadas formadas por un complejo policebásico, localizado en la superficie dorsal de su piel. En las hembras el diámetro de esta mancha es de aproximadamente 2 mm y en los machos es de 8 mm. Y se ha demostrado que cuando los hámsteres machos son castrados, estas disminuyen su tamaño siendo casi igual en diámetro que las de las hembras. Además, cuando se inyecta diariamente testosterona o dihidrotestosterona recuperan su tamaño normal por lo que existe una dependencia de la enzima 5α -R, y la presencia del RA en este tejido.⁴⁵

Dado que algunos de los compuestos sintetizados en este trabajo inhibieron a la enzima 5α -R1 en el modelo *in vitro*, decidimos evaluar este efecto en un modelo *in vivo* (Figura 35).

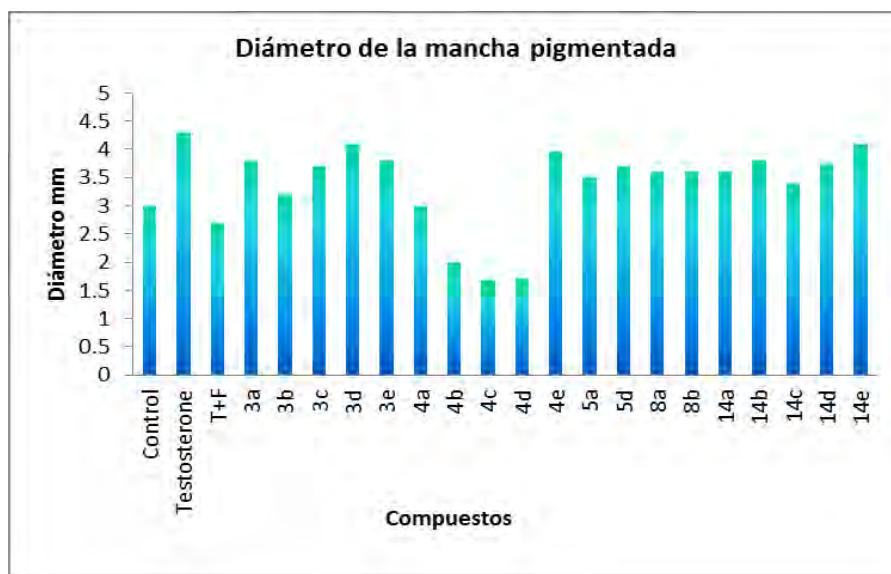


Figura 35. Efecto de los compuestos sobre el diámetro de la mancha pigmentada

De acuerdo a los resultados de los estudios *in vivo*, los compuestos que disminuyeron el diámetro de la mancha pigmentada en comparación con finasterida fueron los compuestos **4a**, **4b**, **4c** y **4d** (Figura 36). En cuanto a los derivados con sustituyentes aromáticos, ninguno de ellos disminuyó el tamaño del órgano flanco. Aparentemente, en el modelo *in vivo*, los derivados aromáticos pierden la actividad que muestran en los estudios *in vitro*. Sin embargo, los derivados de triazol y ésteres alicíclicos parecen ser más favorecidos por el metabolismo, aunque también no se descarta otro posible mecanismo de acción relacionado con la enzima CYP17A1.

Se ha documentado que en la próstata se encuentra una alta concentración de la enzima 5 α -R2. Únicamente los compuestos **5d** y **8b** (imidazol en C-17 y un éster alifático en C-3) produjeron una disminución del peso de la próstata del hámster mejor o igual que la inducida por la finasterida (Figura 36).

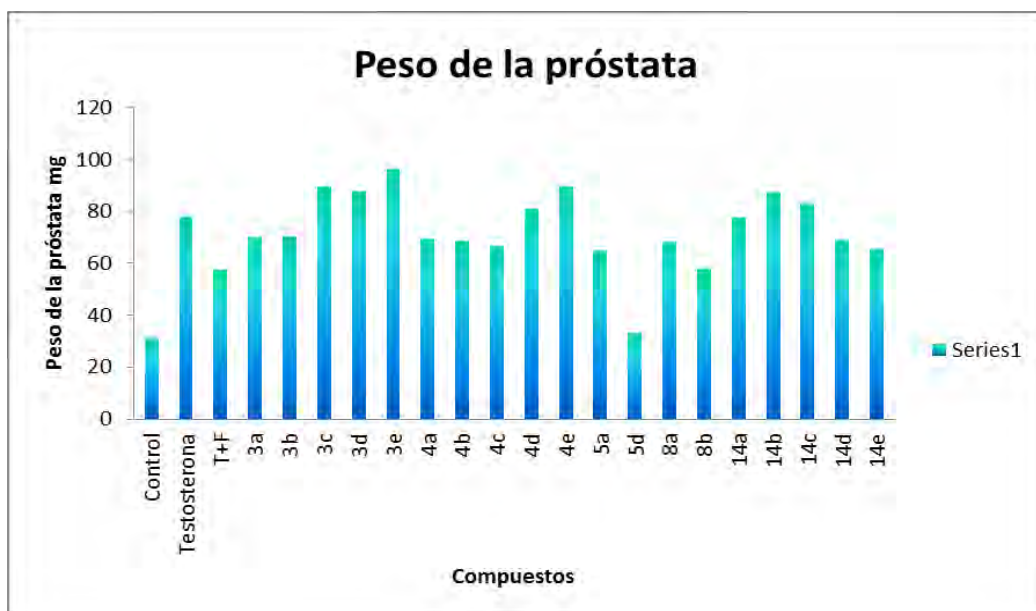


Figura 36. Efecto de los compuestos sobre el peso de la próstata

En los estudios *in vitro* sobre la inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 se encontró que los derivados **3a-3e** inhibieron a esta enzima con una IC₅₀ menor que la encontrada para la finasterida. Sin embargo, estos compuestos no indujeron una disminución del peso de la próstata en los estudios *in vivo*, por lo que su actividad se ve afectada por el metabolismo en los animales. Por otro lado, los derivados de imidazol en C-17 **5d** y **8b** fueron los que mostraron disminuir el peso de la próstata. Sobre la base de que los derivados de imidazol inhiben a la enzima CYP17A1 y que derivados similares reportados por Njar²³ han presentado selectividad hacia esta enzima, podemos decir que probablemente el efecto *in vivo* de estos compuestos sobre el peso de la próstata pueda deberse a la inhibición de esta enzima ya que estos derivados no mostraron inhibir a la enzima 5 α -R2 en los modelos *in vitro* pero si a la enzima CYP17A1.

Al igual que la próstata, las vesículas seminales expresan principalmente 5 α -R2; ninguno de los compuestos sintetizados mostró una mayor disminución del peso de las vesículas seminales que la finasterida (Figura 37).

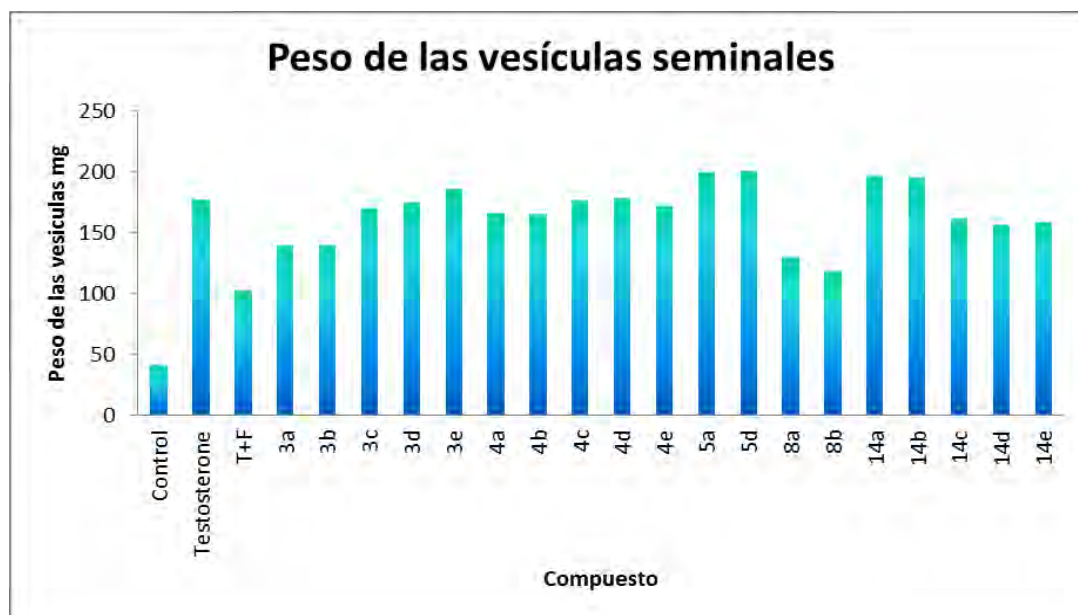


Figura 37. Efecto de los compuestos sobre el peso de las vesículas seminales

4.2.2.2 Estudio *in vivo* sobre ratón (ciclo reproductivo, cáncer de mama, endometriosis, anticonceptivos)

El cuerpo lúteo es una glándula endócrina de secreción interna en el ovario adulto y tiene funciones tales como desarrollo del útero, gestación y lactación. La progesterona es considerada como la hormona lútea y las funciones anteriormente mencionadas son atribuidas a su presencia y metabolismo. Particularmente actúa en el tracto reproductivo para permitir la implantación del embrión en el endometrio y proveer el ambiente maternal durante el proceso de embarazo.⁴⁶

Como ya se mencionó anteriormente, tanto las células de los ovarios, útero, endometrio y senos son dependientes de progesterona. Dado que el compuesto **2f** mostró afinidad por el receptor de progesterona, se decidió estudiar su actividad *in vivo* sobre las el útero de ratón, cuerpo lúteo, endometrio y glándulas mamarias.

En cuanto al ciclo de ovulación del ratón, se observó que los compuestos **6** y **2f** (Figura 11, página 15) reducen el volumen de cuerpo lúteo con valores de 7.3 ± 0.95 y 6.3 ± 1.2 respectivamente en comparación con el grupo control cuyo valor fue de 10.3 ± 1.9 , por lo que se puede inferir que estos compuestos inhiben significativamente la ovulación del ratón a una dosis de 0.22 mg/Kg.

En cuanto a la histología del útero de ratón se encontró que el esteroide **6** (3β -acetoxiepiandrosterona) reduce el diámetro del útero y del lumen mientras que el derivado **2f** (epiandrosterona con un benzoato en C-3) produjo el efecto contrario con respecto al grupo control. En base a estos resultados se puede deducir que mientras **6** se desempeña como un antagonista, **2f** se comporta como un agonista del RP (Figura 39).

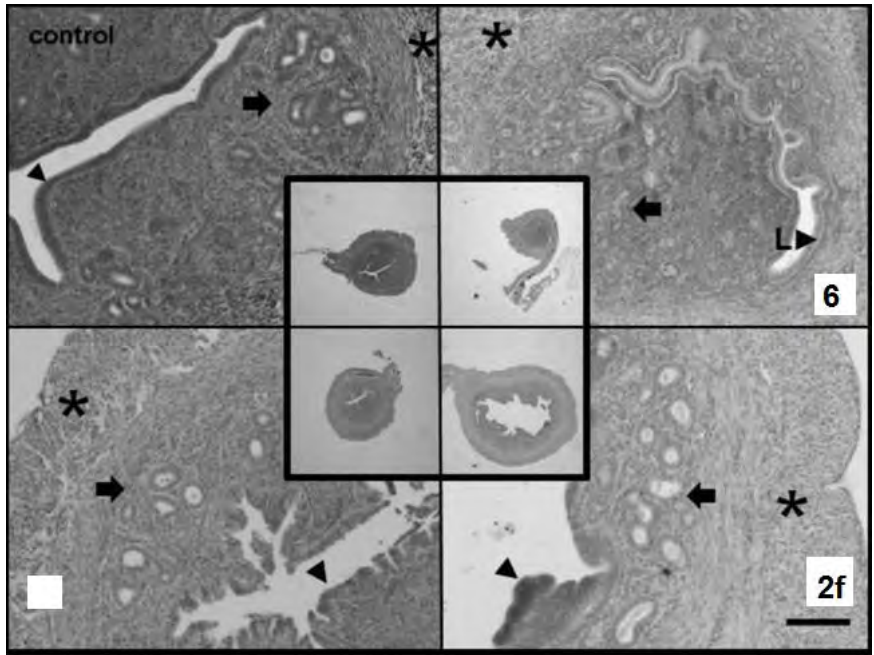


Figura 39. Efecto de los compuestos sobre la histología del útero de ratón

En cuanto a la acción sobre las glándulas mamarias, nuevamente observamos un efecto antagonista para el compuesto **6**, ya que reduce marcadamente la proliferación celular epitelial ductal y alveolar. En contraste, **2f** induce una proliferación de las mismas células (Figura 40).

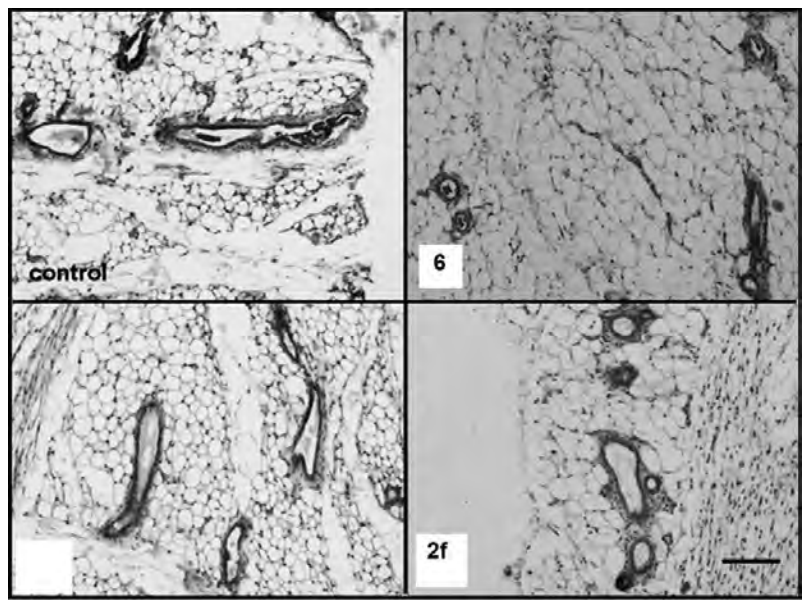


Figura 40. Efecto de los compuestos sobre la histología de las glándulas mamarias

Debido a que en todos los tejidos analizados (útero de ratón, cuerpo lúteo, endometrio y glándulas mamarias) el compuesto **2f** mostró una actividad biológica considerable con respecto al grupo control (sin tratamiento) y que en los estudios *in vitro* se unió al receptor de progesterona con alta afinidad, podemos inferir que su efecto en el modelo *in vivo* se atribuye a la unión con receptor de progesterona ya que no mostró inhibir a la enzima 5 α -R2. Sin embargo, este compuesto inhibió a la enzima 5 α -R1, pero su función de esta isoforma en estos tejidos aún no es clara.

4.2.2.3 Estudio preliminar del efecto inflamatorio de los derivados 14a-14e sobre el edema de la oreja de ratón.

Desde que se estableció una relación entre la aspirina y el casi nulo desarrollo de cáncer, la prevención del cáncer entró a una nueva era en la que se pretende correlacionar directamente el uso de antiinflamatorios no esteroideos con la prevención del desarrollo de cáncer.

En treinta estudios epidemiológicos en los que participaron cerca de 1 millón de sujetos que tomaron constantemente antiinflamatorios no esteroideos se estableció el fenómeno de quimioprevención.²⁰

Desafortunadamente la estructura química de estos antiinflamatorios y la poca selectividad han limitado su uso, por lo que en este trabajo de investigación se decidió preparar híbridos con una unidad de antiinflamatorio y una estructura esteroidea, con la finalidad de que las células cancerosas reconocieran al esteroide y que el fragmento antiinflamatorio le proporcionará a la molécula mayor actividad.

En el caso de las líneas celulares PC-3, se encontró que el híbrido con ibuprofeno **14b** disminuye considerablemente la proliferación celular en comparación con el ketoconazol (Figura 30). Con la finalidad de tener un resultado preliminar que nos permitiera pensar en estudios futuros, se decidió determinar si estas moléculas seguían conservando su actividad antiinflamatoria

El estudio preliminar antiinflamatorio de los derivados esteroidales **14a-14e** fue determinado en el edema de oreja de ratón. Se escogió este modelo debido a que el acetato de tetradecanoil forbol (TPA) produce una irritación en la oreja del ratón. Dicha irritación origina una respuesta inflamatoria que consiste en eritema, edema o infiltración de leucocitos y se liberan mediadores inflamatorios de tipo eicosanoide por lo que las sustancias inhibidoras de la biosíntesis del ácido araquidónico y leucotrienos pueden ser evaluadas mediante esta técnica.

El testigo usado como referencia en este experimento fue indometacina. Se encontró que los derivados que presentaron una disminución en el edema de la oreja de ratón con respecto a la indometacina fueron los compuestos **14b** y **14e** (Figura 41). Estos resultados concuerdan con lo observado en las líneas celulares de cáncer de cerebro, en el cual el derivado de ibuprofeno (compuesto **14b**) y el derivado de sulindaco (compuesto **14e**) son los que mostraron una mejor actividad antiproliferativa a altas concentraciones (Figura 30).

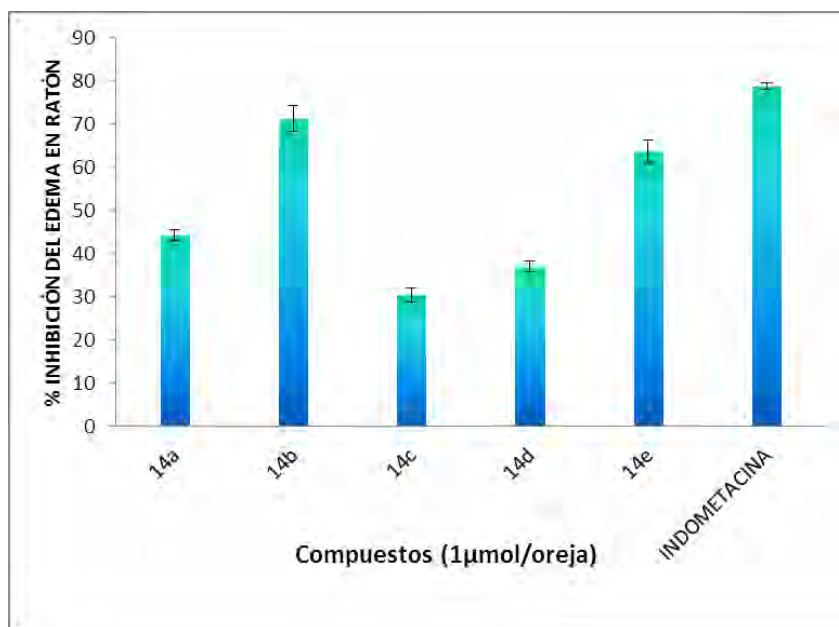


Figura 41. Efecto antiinflamatorio de los compuestos **14a-14e** en el edema de oreja de ratón.

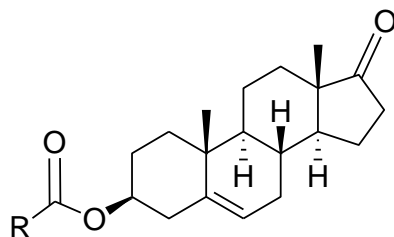
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 PARTE QUÍMICA

En la Figuras 11-14 se muestra la secuencia de reacciones empleadas para la obtención de los diferentes compuestos utilizados en este estudio. Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. La pureza de los productos y el avance de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina (CCF), empleando cromatoplasmas de gel de sílice (60F₂₅₄, Merck), un sistema de elución de n-hexano-acetato de etilo y utilizando como revelador una solución de CoCl₂ al 1% en H₂SO₄ 2N. Algunos productos fueron purificados por cromatografía en columna (CC), utilizando como fase adsorbente sílice 60 (Merck) o Florisil y una mezcla de elución adecuada para cada caso. Los equipos utilizados en la caracterización espectroscópica fueron los siguientes: para la Espectrofotometría de Absorción de Infrarrojo (IR) un equipo Perkin Elmer 549B, utilizando técnica de pastilla de KBr, y para la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y de carbono (RMN¹³C) se emplearon los equipos Varian, Gemini 200 y VRX-300_s, utilizando CDCl₃ como disolvente: los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS). En el caso de los antiinflamatorios, finasterida y ketoconazol fueron aislados y purificados de los fármacos disponibles comercialmente. En la Tabla 2 se resume el método de extracción, purificación y puntos de fusión que nos permiten comparar el fármaco obtenido con lo reportado en la literatura.⁴⁷

Tabla 2. Extracción y purificación de los fármacos utilizados

Compuesto	Método de extracción/disolvente	Método de purificación	Punto de fusión
Finasterida	Soxhlet/ cloroformo	Cromatografía en columna	252-254 °C
Ketoconazol	Soxhlet/acetona	Cromatografía en columna	146-147 °C
Naproxeno	Precipitación ácida	Recristalización AcOEt	152-154 °C
Ketoprofeno	Shoxhlet/acetona	Cromatografía en columna	92-95 °C
Indometacina	Maceración/acetona	Cromatografía en columna	160-163 °C
Sulindaco	Maceración/acetona	Cromatografía en columna	182-185 °C



Síntesis de ésteres. A una solución de la epiandrosterona (**1**) (1 g, 3

mmol), DCC (2.147 g, 10.41 mmol) y DMAP (0.848 g, 6.94 mmol) en cloroformo (20 mL) fue adicionado el correspondiente ácido (14 mmol). La mezcla resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 2 h. Después de este tiempo, hexano (15 mL) fue adicionado y la dicitclohexil urea precipitada fue filtrada. La fase orgánica fue lavada tres veces con una solución de HCl al 10 %, una solución saturada de bicarbonato de sodio y agua. La fase orgánica se secó y se concentró a presión reducida. El compuesto fue recristalizado de metanol.

3 β -Ciclopropanoiloxi-androst-5-en-17-ona (**2a**). **Rendimiento:** 93 %. Pf 199-201 °C. **IR** cm^{-1} : 2935, 1736, 1712, 1176. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 13.2 (C-18), 19.0 (C-19), 73.3 (C-3), 121.4 (C-6), 139.7 (C-5), 173.9 (carbonilo de éster), 220.7 (grupo ceto). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 457 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -Ciclobutiloxi-androst-5-en-17-ona (**2b**). **Rendimiento:** 99 %. Pf 179-181°C. **IR** cm^{-1} : 2942, 1735, 1720, 1170. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 12.5 (C-18), 19.3 (C-19), 72.3 (C-3), 120.7 (C-6), 139.0 (C-5), 173.9 (carbonilo de éster), 219.9 (grupo ceto). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_3$ 371 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -Ciclopentanoiloxi-androst-5-en-17-ona (**2c**). **Rendimiento:** 97 %. Pf 176-178 °C. **IR** cm^{-1} : 2945, 1735, 1723, 1178. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 12.9 (C-18), 19.7 (C-19), 72.6 (C-3), 121.1 (C-6), 139.3 (C-5), 175.6 (carbonilo de éster), 220.4 (grupo ceto). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_3$ 385 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -Ciclohexanoiloxi-androst-5-en-17-ona (**2d**). **Rendimiento:** 96 %. Pf 156-158 °C. **IR** cm^{-1} : 2935, 1736, 1712, 1176. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 12.5 (C-18), 19.3 (C-19), 72.3 (C-

3), 120.7 (C-6), 139.0 (C-5), 173.9 (carbonilo de éster), 219.9 (grupo ceto). **EM-FAB m/z** para $C_{26}H_{38}O_3$ 399 $[M+H]^+$.

3 β -Cicloheptanoiloxi-androst-5-en-17-ona (**2e**). **Rendimiento:** 99 %. Pf 161-166 °C. **IR cm^{-1} :** 2928, 1725, 1736, 1169. **1H -RMN ($CDCl_3$) δ :** 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6). **^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ :** 12.9 (C-18), 19.6 (C-19), 72.6 (C-3), 121.0 (C-6), 139.3 (C-5), 176.0 (carbonilo de éster), 220.8 (grupo ceto). **EM-FAB m/z** para $C_{26}H_{38}O_3$ 413 $[M+H]^+$.

3 β -Benzoiloxi-androst-5-en-17-ona (**2f**). **Rendimiento:** 86 %. Pf 261-262 °C. **UV (nm):** 227. **IR cm^{-1} :** 2948, 1735, 1711, 1272. **1H -RMN ($CDCl_3$) δ :** 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.9 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, dd, $J_1=7.8$ y $J_2=7.6$ Hz, H-3' y H-5'), 7.5 (1H, dd, $J_1=7.4$ y $J_2=6.8$ Hz, H-4'), 8.0 (2H, d, $J=7.6$ Hz, H-2' y H-6'). **^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ :** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 74.2 (C-3), 121.9 (C-6), 128.2 (C-3' y C-5'), 129.5 (C-2' y C-6'), 130.7 (C-1'), 132.7 (C-4') 139.8 (C-5), 165.9 (carbonilo de éster), 221.0 (C-17). **EM-FAB m/z** para $C_{26}H_{32}O_3$ 393 $[M+H]^+$.

3 β -*p*-Fluorobenzoiloxi-androst-5-en-17-ona (**2g**). **Rendimiento:** 90%. Pf 211-112 °C. **UV (nm):** 229. **IR cm^{-1} :** 2927, 1622, 1568. **1H -RMN ($CDCl_3$) δ :** 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.9 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (2H, ddt, $J_1=8.8$ Hz, $J_2=8.4$ Hz, $J_3=2.8$ Hz, H-3' y H-5'), 8.0 (2H, dd, $J_1=9.0$ Hz, $J_2=5.2$ Hz, H-2' y H-6'). **^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ :** 13.9 (C-18), 19.7 (C-19), 74.8 (C-3), 115.8 (C-3' y C-5'), 122.4 (C-6), 127.3 (C-1'), 132.4 (C-2' y C-6'), 140.1 (C-5), 165.3 (C-4'), 167.2 (carbonilo de éster), 221.3 (C-17). **EM-FAB m/z** para $C_{26}H_{31}FO_3$ 411 $[M+H]^+$.

3 β -*p*-Clorobenzoiloxi-androst-5-en-17-ona (**2h**). **Rendimiento:** 89 %. Pf 234-235 °C. **UV (nm):** 238. **IR cm^{-1} :** 2947, 1739, 1719, 1270. **1H -RMN ($CDCl_3$) δ :** 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2' y H-6'), 7.9 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3' y H-5'). **^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ :** 13.5 (C-18), 19.3 (C-19), 74.4 (C-3), 121.9 (C-6), 128.4 (C-3' y C-5'), 128.9 (C-1'), 130.7 (C-2' y C-6'), 138.9 (C-4'), 139.5 (C-5), 164.9 (carbonilo de éster), 221.0 (C-17). **EM-FAB m/z** para $C_{26}H_{31}ClO_3$ 427 $[M+H]^+$.

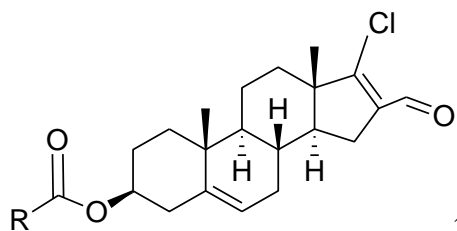
3β-*p*-Bromobenzoiloxi-androst-5-en-17-ona (**2i**). **Rendimiento:** 97 %. Pf 227-228 °C. **UV (nm):** 241. **IR cm⁻¹:** 2947, 1731, 1713, 1269. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, *J*₁= 4 Hz y *J*₂= 2 Hz, H-6), 7.6 (2H, d, *J*= 8.8 Hz, H-2' y H-6'), 7.9 (2H, d, *J*= 8.8 Hz, H-3' y H-5'). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 74.6 (C-3), 122.1 (C-6), 127.8 (C-4'), 129.6 (C-1'), 131.1 (C-2' y C-6'), 131.6 (C-3' y C-5'), 139.8 (C-5), 165.2 (carbonilo de éster), 220.9 (C-17). **EM-FAB *m/z*** para C₂₆H₃₁O₃ 471 [M+H]⁺.

3β-Propanoiloxi-androst-5-en-17-ona (**19a**). **Rendimiento:** 80%. Pf 150-153 °C. **IR cm⁻¹:** 2954, 1739. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.2 (3H, t), 2.3 (2H, q), 4.6 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, *J*₁= 4 Hz y *J*₂= 2 Hz, H-6). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.5 (C-3), 121.8 (C-6), 139.9 (C-5), 173.9 (carbonilo de éster), 221.0 (C-17). **EM-FAB *m/z*** para C₂₂H₃₂O₃ 345 [M+H]⁺.

3β-Butanoiloxi-androst-5-en-17-ona (**19b**). **Rendimiento:** 79 %. Pf 160-162 °C. **IR cm⁻¹:** 2965, 1742, 1730. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, t), 1.1 (3H, s, H-19), 1.7 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.9 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, *J*₁= 4 Hz y *J*₂= 2 Hz, H-6). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.4 (C-3), 121.8 (C-6), 139.9 (C-5), 173.1 (carbonilo de éster), 221.0 (C-17). **EM-FAB *m/z*** para C₂₃H₃₄O₃ 359 [M+H]⁺.

3β-Pentanoiloxi-androst-5-en-17-ona (**19c**). **Rendimiento:** 76 %. Pf 101-106 °C. **IR cm⁻¹:** 2946, 1735, 1725. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, *J*₁= 4 Hz y *J*₂= 2 Hz, H-6). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.2 (C-3), 122.0 (C-6), 139.7 (C-5), 173.3 (carbonilo de éster), 221.0 (C-17). **EM-FAB *m/z*** para C₂₄H₃₆O₃ 373 [M+H]⁺.

3β-Hexanoiloxi-androst-5-en-17-ona (**19d**). **Rendimiento:** 73 %. Pf 72-74 °C. **IR cm⁻¹:** 2953, 1736. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.5 (2H, m), 1.5 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, *J*₁= 4 Hz y *J*₂= 2 Hz, H-6). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.3 (C-3), 121.8 (C-6), 138.9 (C-5), 173.2 (carbonilo de éster), 220.1 (C-17). **EM-FAB *m/z*** para C₂₅H₃₈O₃ 387 [M+H]⁺.



3β-R-COO-16-formil-17-cloroandrosta-5,16-dien. A un

matraz de fondo redondo (sumergido en hielo) que contenía dimetilformamida (43 mmol) se fue adicionado gota a gota oxiclورو de fósforo (36 mmol) seguido de una solución en cloroformo del correspondiente éster (1 mmol). La reacción se calentó a ebullición durante 5 h bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez terminado el tiempo de reacción, se adicionó una solución saturada de bicarbonato de sodio (100 mL). La fase orgánica fue extraída con cloroformo y lavada con agua, secada y concentrada a presión reducida. El compuesto fue purificado por cromatografía en columna usando gel de sílice y una mezcla de hexano-acetato de etilo.

3β-Ciclopropanoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3a**). **Rendimiento:** 66 %. Pf 124-126 °C. **UV (nm):** 257. **IR cm⁻¹:** 2928, 1717, 1674, 1589, 1269. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 9.9 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.2 (C-18), 15.0 (C-19), 73.6 (C-3), 121.8 (C-6), 136.5 (C-16), 140.1 (C-5), 162.3 (C-17), 174.3 (carbonilo de éster), 188.1 (formilo). **EM-FAB *m/z*** para C₂₄H₃₁ClO₃ 403 [M+H]⁺.

3β-Ciclobutanoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3b**). **Rendimiento:** 65%. Pf 152-154 °C. **UV (nm):** 257. **IR cm⁻¹:** 2941, 1719, 1671, 1586, 1173. **H-RMN (CDCl₃) δ:** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 9.9 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 14.6 (C-18), 17.9 (C-19), 72.9 (C-3), 121.4 (C-6), 136.1 (C-16), 139.7 (C-5), 161.9 (C-17), 174.6 (carbonilo de éster), 187.7 (formilo). **EM-FAB *m/z*** para C₂₅H₃₃ClO₃ 417 [M+H]⁺.

3β-Ciclopentanoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3c**). **Rendimiento:** 63%. Pf 180-182. **UV (nm):** 258. **IR cm⁻¹:** 2927, 1728, 1708, 1667, 1590, 1158. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 10.0 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 14.6 (C-18), 18.9 (C-19), 72.9 (C-3), 121.4 (C-6), 136.1 (C-16),

139.8 (C-5), 161.9 (C-17), 175.8 (carbonilo de éster), 187.7 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{26}H_{35}ClO_3$ 431 **[M+H]⁺**.

3 β -Ciclohexanoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3d**). **Rendimiento:** 63%. Pf 166-168. **UV (nm):** 258. **IR cm^{-1} :** 2927, 1727, 1668, 1592, 1169. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 10.0 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 14.6 (C-18), 18.9 (C-19), 72.7 (C-3), 121.4 (C-6), 136.1 (C-16), 139.8 (C-5), 161.9 (C-17), 175.2 (carbonilo de éster), 187.7 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{27}H_{37}ClO_3$ 445**[M+H]⁺**.

3 β -Cicloheptanoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3e**). **Rendimiento:** 68%. Pf 215-217 °C. **UV (nm):** 257. **IR cm^{-1} :** 2946, 1719, 1671, 1585, 1184. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 9.9 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.0 (C-18), 19.3 (C-19), 73.1 (C-3), 121.7 (C-6), 136.5 (C-16), 140.2 (C-5), 162.3 (C-17), 176.5 (carbonilo de éster), 188.1 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{28}H_{39}ClO_3$ 459 **[M+H]⁺**.

3 β -Benzoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3f**). **Rendimiento:** 63%. Pf 205-207 °C. **UV (nm):** 237. **IR cm^{-1} :** 2929, 1708, 1664, 1590, 1272. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (2H, ddt, $J_1=8.8$ Hz, $J_2=8.4$ Hz, $J_3=2.8$ Hz, H-3' y H-5'), 8.0 (2H, dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=9.0$ Hz, H-2' y H-6'), 9.9 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 14.3 (C-18), 18.6 (C-19), 73.8 (C-3), 114.8 (C-3' y C-5'), 121.4 (C-6), 126.3 (C-1'), 131.4 (C-2'), 135.8 (C-16), 139.2 (C-5), 161.5 (C-17), 163.7 (C-6'), 166.2 (carbonilo de éster), 187.4 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{27}H_{31}ClO_3$ 439 **[M+H]⁺**.

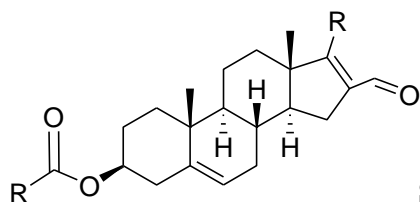
3 β -*p*-Fluorobenzoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3g**). **Rendimiento:** 63%. Pf 194-196 °C. **UV (nm):** 231, 256. **IR cm^{-1} :** 2932, 1714, 1663, 1518, 1278. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (2H, ddt, $J_1=8.8$ Hz, $J_2=8.4$ Hz, $J_3=2.8$ Hz, H-3' y H-5'), 8.0 (2H, dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=9.0$ Hz, H-2' y H-6'), 9.9 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 14.3 (C-18), 18.6 (C-19), 73.8 (C-3), 114.8 (C-3' y C-5'), 121.4 (C-6), 126.3 (C-1'), 131.4 (C-2'), 135.8 (C-16), 139.2 (C-5), 161.5 (C-17), 163.7

(C-6'), 166.2 (carbonilo de éster), 187.4 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{27}H_{30}FCIO_3$ 457 **$[M+H]^+$** .

3 β -*p*-Clorobenzoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3h**). **Rendimiento:** 59%. Pf 174-176. **UV (nm):** 241.66. **IR cm^{-1} :** 2929, 1718, 1669, 1585. **1H -RMN ($CDCl_3$) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3' y H-5'), 8.0 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2' y H-6'), 10.0 (formilo). **^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ :** 14.2 (C-18), 18.5 (C-19), 73.8 (C-3), 121.3 (C-6), 127.9 (C-3' y C-5'), 128.4 (C-1'), 130.2 (C-2' y C-6'), 135.7 (C-16), 138.4 (C-4'), 139.1 (C-5), 161.5 (C-17), 164.3 (carbonilo de éster), 187.3 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{27}H_{30}Cl_2O_3$ 473 **$[M+H]^+$** .

3 β -*p*-Bromobenzoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3i**). **Rendimiento:** 65%. Pf 188-190 $^{\circ}C$. **UV (nm):** 255. **IR cm^{-1} :** 2928, 1711, 1668, 1587, 1269. **1H -RMN ($CDCl_3$) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, d, $J=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.6 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3' y H-5'), 7.9 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2' y H-6'), 10.0 (formilo). **^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ :** 14.3 (C-18), 18.6 (C-19), 73.9 (C-3), 121.5 (C-6), 127.2 (C-4'), 128.9 (C-1'), 130.4 (C-2' y C-6'), 130.9 (C-3' y C-5'), 135.8 (C-16), 139.2 (C-5), 167.6 (C-17), 164.6 (carbonilo de éster), 187.5 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{27}H_{30}BrClO_3$ 517 **$[M+H]^+$** .

3 β -*p*-Iodobenzoiloxi-16-cloro-17-formil-androstan-5,16-dieno (**3j**). **Rendimiento:** 62%. Pf 196-198 $^{\circ}C$. **UV (nm):** 246. **IR cm^{-1} :** 2939, 1707, 1664, 1586, 1271. **1H -RMN ($CDCl_3$) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3' y H-5'), 7.9 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2' y H-6'), 10.0 (formilo). **^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ :** 14.3 (C-18), 19.6 (C-19), 73.9 (C-3), 99.9 (C-4'), 121.4 (C-6), 129.5 (C-1'), 130.4 (C-2' y C-6'), 135.8 (C-16), 136.9 (C-3' y C-5'), 139.2 (C-5), 161.5 (C-17), 164.8 (carbonilo de éster), 187.4 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{27}H_{30}IClO_3$ 565 **$[M+H]^+$** .



Síntesis de los derivados con heterociclos en C-17. En un matraz redondo se colocó el correspondiente derivado (**3a-3j** ó **7**) (1 mmol), K_2CO_3 (3 mmol), el correspondiente heterociclo (3 mmol) y DMF (5 mL) la mezcla de reacción se mantuvo a 60 $^{\circ}C$ durante 3 h. Trascurrido

este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se vertió en agua-hielo y el sólido fue filtrado. El compuesto de purifico por cromatografía en columna de Florisil empleando un sistema de hexano-acetato de etilo.

3β-Cilcopropanoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4a).

Rendimiento: 93%. Pf 190-192 °C. **UV (nm):** 272. **IR cm⁻¹:** 2933, 1721, 1662, 1613. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.5 (C-3), 121.7 (C-6), 132.3 (C-16), 140.0 (C-5), 143.7 (C-17), 153.1 (aromático), 156.7 (aromático), 174.2 (carbonilo de éster), 189.0 (formilo). **EM-FAB m/z** para C₂₆H₃₃N₃O₃ 436 [M+H]⁺.

3β-Cilcobutanoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4b).

Rendimiento: 89%. pf 199-201 °C. **UV (nm):** 273. **IR cm⁻¹:** 2940, 1724, 1664, 1613. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.2 (C-3), 121.6 (C-6), 132.3 (C-16), 140.0 (C-5), 143.6 (C-17), 153.0 (aromático), 156.7 (aromático), 174.9 (carbonilo de éster), 189.0 (formilo). **EM-FAB m/z** para C₂₇H₃₅N₃O₃ 450 [M+H]⁺.

3β-Cilcopentanoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4c).

Rendimiento: 93% pf 232-234 °C. **UV (nm):** 273. **IR cm⁻¹:** 2938, 1728, 1667, 1617. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.5 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.0 (C-3), 121.6 (C-6), 132.3 (C-16), 140.1 (C-5), 143.8 (C-17), 153.0 (aromático), 156.7 (aromático), 175.5 (carbonilo de éster), 188.9 (formilo). **EM-FAB m/z** para C₂₈H₃₇N₃O₃ 464 [M+H]⁺.

3β-Cilcohexanoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4d). C₂₉H₃₉N₃O₃.

Rendimiento: 91%. pf 249-251 °C. **UV (nm):** 271. **IR cm⁻¹:** 2937, 1728, 1667, 1618. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.5 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.2 (C-3), 121.6 (C-6), 132.3 (C-16), 140.1 (C-5), 143.6 (C-17), 152.9

(aromático), 156.4 (aromático), 175.9 (carbonilo de éster), 189.1 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{29}H_{39}N_3O_3$ 478 **[M+H]⁺**.

3 β -Cilcoheptanoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4e).

Rendimiento: 91% fp 195-197 °C. **UV (nm):** 270. **IR cm^{-1} :** 2934, 1728, 1668, 1618. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.0 (C-3), 121.1 (C-6), 132.3 (C-16), 140.1 (C-5), 143.6 (C-17), 153.0 (aromático), 156.6 (aromático), 175.5 (carbonilo de éster), 188.8 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{30}H_{41}N_3O_3$ 492 **[M+H]⁺**.

3 β -Ciclopropanoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (5a). **Rendimiento:**

83.5 % fp 135-137 °C. **UV (nm):** 256. **IR cm^{-1} :** 2939, 1720, 1667, 1610. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, aromático), 7.2 (1H, s, aromático), 7.6 (1H, s, aromático) 9.7 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 19.6 (C-18), 26.9 (C-19), 72.7 (C-3), 119.9 (aromático), 121.7 (C-6), 130.7 (C-16), 133.9 (aromático), 137.8 (aromático), 140.0 (C-5), 160.6 (C-17), 174.2 (carbonilo de éster), 187.6 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{27}H_{34}N_2O_3$ 435 **[M+H]⁺**.

3 β -Ciclobutanoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (5b). **Rendimiento:**

79.8 % fp 181-183 °C. **UV (nm):** 256. **IR cm^{-1} :** 2947, 1727, 1665, 1607. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, aromático), 7.2 (1H, s, aromático), 7.6 (1H, s, aromático) 9.7 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.7 (C-18), 24.9 (C-19), 72.9 (C-3), 119.5 (aromático), 121.3 (C-6), 130.3 (C-16), 133.5 (aromático), 137.4 (aromático), 139.8 (C-5), 160.2 (C-17), 174.5 (carbonilo de éster), 187.3 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{28}H_{36}N_2O_3$ 449 **[M+H]⁺**.

3 β -Ciclopentanoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (5c). **Rendimiento:**

85.7 % fp 188-190 °C. **UV (nm):** 261. **IR cm^{-1} :** 2948, 1726, 1664, 1606. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, aromático), 7.2 (1H, s, aromático), 7.6 (1H, s, aromático) 9.7 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.1 (C-18), 25.0 (C-19), 72.3 (C-3), 119.9 (aromático), 121.6 (C-6), 130.7 (C-16),

133.9 (aromático), 137.8 (aromático), 140.1 (C-5), 160.6 (C-17), 176.2 (carbonilo de éster), 187.6 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{29}H_{38}N_2O_3$ 463 **[M+H]⁺**.

3 β -Ciclohexanoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**5d**). **Rendimiento:** 80.5 % fp 225-227 °C. **UV (nm):** 261. **IR cm^{-1} :** 2948, 1726, 1664, 1606. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, aromático), 7.2 (1H, s, aromático), 7.6 (1H, s, aromático) 9.7 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.9 (C-18), 25.4 (C-19), 73.0 (C-3), 119.9 (aromático), 121.6 (C-6), 130.6 (C-16), 135.0 (aromático), 137.8 (aromático), 140.0 (C-5), 160.9 (C-17), 175.6 (carbonilo de éster), 187.7 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{30}H_{40}N_2O_3$ 477 **[M+H]⁺**.

3 β -Cicloheptanoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**5e**). $C_{31}H_{42}N_2O_3$. **Rendimiento:** 81.3 % fp 216-218°C. **UV (nm):** 256. **IR cm^{-1} :** 2926, 1729, 1661, 1610. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, aromático), 7.2 (1H, s, aromático), 7.6 (1H, s, aromático) 9.7 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.8 (C-18), 25.3 (C-19), 73.1 (C-3), 119.5 (aromático), 121.3 (C-6), 130.3 (C-16), 133.5 (aromático), 137.4 (aromático), 139.8 (C-5), 160.2 (C-17), 174.5 (carbonilo de éster), 187.3 (aldehído). **EM-FAB m/z** para $C_{31}H_{42}N_2O_3$ 491 **[M+H]⁺**.

3 β -Benzoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**4f**). **Rendimiento:** 94%. Pf 244-246 °C. **UV (nm):** 227, 271. **IR cm^{-1} :** 2938, 1709, 1667, 1275. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.9 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, dd, $J_1=8.0$ y $J_2=7.6$ Hz, H-3' y H-5'), 7.5 (1H, dd, $J_1=7.4$ y $J_2=7.2$ Hz, H-4'), 8.0 (2H, d, $J=6.8$ Hz, H-2' y H-6' aromático). 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.6 (C-18), 18.9 (C-19), 73.8 (C-3), 121.5 (C-6), 127.9(C-3' y C-5'), 129.2 (C-2' y C-6'), 130.3 (C-1'), 131.9(C-16) 132.4 (C-4'), 139.5 (C-5), 143.3 (C-17), 152.5 (aromático), 156.3 (aromático), 165.5 (carbonilo de éster), 188.6 (formilo). **EM-FAB m/z** para $C_{27}H_{33}N_3O_3$ 472 **[M+H]⁺**.

3 β -*p*-Fluorobenzoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**4g**). **Rendimiento:** 90%. Pf 225-227 °C. **UV (nm):** 244.15. **IR cm^{-1} :** 2937, 1709, 1667, 1275. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y

$J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (2H, d, $J=9$ Hz, H-3' y H-5'), 8.0 (2H, d, $J=9$ Hz, H-2' y H-6') 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). $^{13}\text{C-RMN (CDCl}_3)$ δ : 15.8 (C-18), 19.1 (C-19), 74.4 (C-3), 121.9 (C-6), 127.7 (C4'), 129.4 (C-3' y C-5'), 130.9 (C-1'), 131.5 (C-16), 132.2 (C-2' y C-6'), 139.7 (C-5), 143.5 (C-17), 152.9 (aromático), 156.6 (aromático), 165.1 (carbonilo de éster), 188.9 (formilo). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{FO}_3$ 490 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -*p*-Clorobenzoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4h).

Rendimiento: 91%. Pf 192-194 °C. **UV (nm):** 244.15. **IR cm^{-1} :** 2937, 1709, 1667, 1275. $^1\text{H-RMN (CDCl}_3)$ δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.6 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3' y H-5'), 7.9 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2' y H-6'), 8.4 (1H, s, aromatic), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). $^{13}\text{C-RMN (CDCl}_3)$ δ : 15.6 (C-18), 18.9 (C-19), 74.0 (C-3), 121.7 (C-6), 126.6 (C4'), 131.8 (C-2' y C-6'), 132.0 (C-3' y C-5'), 132.3 (C-16), 139.6 (C-5), 143.3 (C-17), 152.7 (aromático), 156.4 (aromático), 164.6 (carbonilo de éster), 188.7 (formilo). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{ClO}_3$ 507 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -*p*-Bromobenzoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4i).

Rendimiento: 94%. Pf 233-235 °C. **UV (nm):** 270.15 **IR cm^{-1} :** 2937, 1708, 1661, 1601, 1272. $^1\text{H-RMN (CDCl}_3)$ δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2' y H-6'), 8.1 (2H, d, $J=7.6$ Hz, H-3' y H-5'). 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). $^{13}\text{C-RMN (CDCl}_3)$ δ : 15.6 (C-18), 18.9 (C-19), 74.2 (C-3), 100.2 (C-4'), 121.7 (C-6), 129.7 (C-1'), 130.7 (C-2' and C-6'), 131.9 (C-16), 137.3 (C-3' and C-5'), 139.5 (C-5), 143.3 (C-17), 152.7 (aromático), 156.4 (aromático), 165.1 (carbonilo de éster), 188.7 (formilo). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{BrO}_3$ 550 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -*p*-Iodobenzoiloxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4j). **Rendimiento:**

89%. Pf 218-220 °C. **UV (nm):** 255.12 **IR cm^{-1} :** 2946, 1706, 1666, 1585, 1269. $^1\text{H-RMN (CDCl}_3)$ δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3' y H-5'), 7.8 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2' y H-6'), 8.1 (1H, s, aromático), 8.5 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). $^{13}\text{C-RMN (CDCl}_3)$ δ : 15.6 (C-18), 18.9 (C-19), 74.2 (C-3), 100.2 (C-4'), 121.7 (C-6), 129.8 (C-1'), 130.7 (C-2' y C-6'), 132.0 (C-16), 137.3 (C-3' y C-5'), 139.5 (C-5), 143.3 (C-17), 152.7 (aromático), 156.4 (aromático), 165.1 (carbonilo de éster), 188.7 (formilo). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{IO}_3$ 598 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -Benzoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**5f**). **Rendimiento:** 90%. Pf 228-230 °C. **UV (nm):** 228 **IR cm⁻¹:** 2936, 1708, 1665, 1270. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz y $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.0 (1H, s, imidazol), 7.1 (1H, s, imidazol), 7.3 (2H, dd, $J_1 = 7.7$ y $J_2 = 7.6$ Hz, H-3' y H-5'), 7.4 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ y $J_2 = 7.6$ Hz, H-4'), 7.5 (1H, s, imidazol), 7.9 (2H, dd, $J_1 = 8.4$ y $J_2 = 6.8$ Hz, H-2' y H-6'), 9.6 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 16.0 (C-18), 19.3 (C-19), 74.2 (C-3), 119.9 (C-imidazol), 121.9 (C-6), 128.3 (C-3' y C-5'), 129.5 (C-2' y C-6'), 130.1 (C-1'), 132.8 (C-4') 133.9 (C-imidazol), 137.9 (C-imidazol), 139.9 (C-5), 160.6 (C-17), 165.9 (carbonilo de éster), 187.6 (formilo). **EM-FAB m/z** para C₃₀H₃₄N₂O₃ 471 [M+H]⁺.

3 β -*p*-Fluorobenzoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**5g**). **Rendimiento:** 88%. Pf 260-262 °C. **UV (nm):** 228 **IR cm⁻¹:** 2940, 1713, 1665, 1600, 1273. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz y $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.0 (2H, dd, $J_1 = 6.4$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, H-3' y H-5'), 7.1 (1H, s, imidazol), 7.2 (1H, s, imidazol), 7.6 (1H, s, imidazol), 8.0 (2H, dd, $J_1 = 9.2$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, H-2' y H-6'), 9.7 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.3 (C-18), 18.6 (C-19), 73.7 (C-3), 119.3 (C-imidazol), 121.3 (C-6), 128.12 (C-1'), 130.19 (C-16), 131.3 (C-2' y C-6'), 131.4 (C-2' y C-6'), 133.5 (C-imidazol), 137.1 (C-imidazol), 139.2 (C-17), 159.9 (C-17), 164.3 (carbonilo de éster), 186.7 (formilo). **EM-FAB m/z** para C₃₀H₃₄N₂FO₃ 489 [M+H]⁺.

3 β -*p*-Clorobenzoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**5h**). **Rendimiento:** 92%. Pf 210-212 °C. **UV (nm):** 241 **IR cm⁻¹:** 2937, 1710, 1663, 1604, 1267, 1239. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz y $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, imidazol), 7.2 (1H, s, imidazol), 7.4 (2H, dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, H-3' y H-5'), 7.6 (1H, s, imidazol), 7.9 (2H, dd, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, H-2' y H-6'), 9.7 (formilo). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.9 (C-18), 19.2 (C-19), 74.5 (C-3), 119.9 (C-imidazol), 122.0 (C-6), 128.6 (C-1'), 129.1 (C-3' y C-5'), 130.7 (C-2' y C-6'), 130.9 (C-16), 133.9 (C-imidazol), 137.7 (C-imidazol), 139.2 (C-4') 139.8 (C-5), 160.6 (C-17), 165.1 (carbonilo de éster), 187.6 (formilo). **EM-FAB m/z** para C₃₀H₃₄N₂ClO₃ 505 [M+H]⁺.

3 β -*p*-Bromobenzoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**5i**). **Rendimiento:** 91%. Pf 249-251 °C. **UV (nm):** 244 **IR cm⁻¹:** 2937, 1710, 1662, 1604, 1267, 1238. **¹H-RMN**

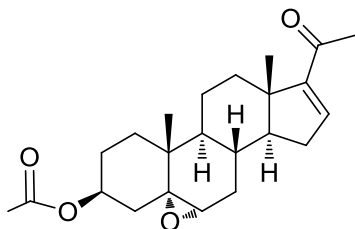
(CDCl₃) δ: 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.9 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, imidazol), 7.2 (1H, s, imidazol), 7.5 (2H, dd, $J_1=8.8$ Hz, $J_2=2.0$ Hz, H-3' y H-5'), 7.6 (1H, s, imidazol), 7.9 (2H, dd, $J_1=8.8$ Hz, $J_2=2$ Hz, H-2' y H-6'), 9.7 (formilo). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 15.7 (C-18), 18.9 (C-19), 74.2 (C-3), 119.6 (C-imidazol), 121.7 (C-6), 127.6 (C-4'), 129.3 (C-1'), 130.4 (C-16), 130.7 (C-2' y C-6'), 131.3 (C-3' y C-5'), 133.6 (C-imidazol), 137.5 (C-imidazol), 139.5 (C-5), 160.3 (C-17), 164.9 (carbonilo de éster), 187.3 (formilo). EM-FAB *m/z* para C₃₀H₃₄N₂BrO₃ 549 [M+H]⁺.

3β-*p*-Iodobenzoiloxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**5j**). Rendimiento: 89%. Pf 230-232 °C. UV (nm): 227 IR cm⁻¹: 2939, 1709, 1606, 1273. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, imidazol), 7.2 (1H, s, imidazol), 7.5 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3' y H-5'), 7.6 (1H, s, imidazol), 7.8 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2' y H-6'), 9.7 (formilo). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 15.9 (C-18), 19.3 (C-19), 74.5 (C-3), 100.5 (C-4'), 119.9 (C-imidazol), 122.0 (C-6), 128.8 (C-2' y C-6'), 130.1 (C-16), 130.9 (C-3' y C-5'), 133.9 (C-imidazol), 137.9 (C-imidazol), 139.9 (C-5), 160.6 (C-17), 165.5 (carbonilo de éster), 187.6 (formilo). EM-FAB *m/z* para C₃₀H₃₄N₂IO₃ 597 [M+H]⁺.

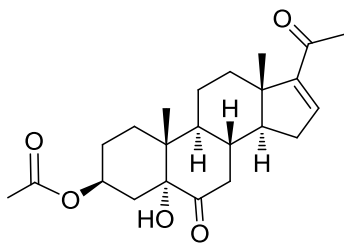
3β-Acetoxi-16-formil-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**8a**). Rendimiento: 95%. Pf 167-169 °C. UV (nm): 272. IR cm⁻¹: 2935, 1729, 1662, 1615, 1236. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.0 (H-1'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromático), 8.4 (1H, s, aromático) 10.1 (formilo). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 13.9 (C-18), 15.7 (C-19), 72.3 (C-3), 121.5 (C-6), 132.0 (C-16), 139.7 (C-5), 143.4 (C-17), 152.7 (aromático), 156.4 (aromático), 170.2 (carbonilo de éster), 188.7 (formilo). EM-FAB *m/z* para C₂₄H₃₁N₃O₃ 410 [M+H]⁺.

3β-Acetoxi-16-formil-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**8b**). Rendimiento: 93 % fp 225-227 °C. UV (nm): 257. IR cm⁻¹: 2947, 1731, 1659, 1616, 1234. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.0 (H-1'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, s, aromático), 7.2 (1H, s, aromático), 7.6 (1H, s, aromático) 9.7 (formilo). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 15.8 (C-18), 19.0 (C-19), 73.4 (C-3), 119.7 (aromático), 121.5 (C-6), 130.6 (C-16), 133.7 (aromático), 137.6 (aromático), 139.8 (C-5), 160.4 (C-17), 170.2 (carbonilo de éster), 187.2 (formilo). EM-FAB *m/z* para C₂₅H₃₂N₂O₃ 409 [M+H]⁺.

3 β -Acetoxi-16-formil-17-(1H-benzimidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (**8c**). **Rendimiento:** 89 %. Pf 228-230. **IR** cm^{-1} 2951, 2359, 1725. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ :** 1.1 (6H, s, H-18 y H-19), 2.0 (3H, s, acetoxi), 4.6 (1H, m, H-3), 5.43 (1H, s, H-6), 7.3 (2H, s, aromáticos), 7.8 (1H, s, aromaticos), 7.9 (s, 1H, aromatic-H), 9.6 (formilo).

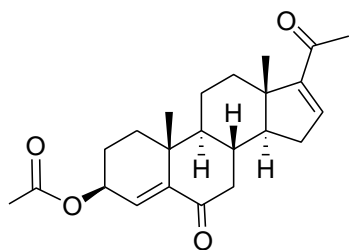


3 β -Acetoxy-5 α ,6 α -epoxipregnan-16-ene-20-ona (10). Se colocó en un matraz de fondo redondo 1 mmol del compuesto **9** y se disolvió en 70 mL de CHCl_3 , se adicionó 3.33 mmol de mCPBA y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se adicionó 200 mL de una solución saturada de NaHCO_3 que contenía 2 g de bisulfito de sodio. La fase orgánica se lavó con agua, se secó y se concentró en el rotavapor. El sólido obtenido se recristalizó de MeOH. **Rendimiento:** 98%. Pf 170-172 $^\circ\text{C}$. **UV (nm):** 236. **IR** cm^{-1} : 2938, 1731, 1659, 1238. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ :** 0.8 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, H-21), 2.2 (3H, s, acetoxi), 2.9 (1H, d, $J=2$ Hz, H-6), 4.7 (1H, m, H-3), 6.6 (1H, d, $J=2$ Hz, H-16),. **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ :** 15.8 (C-18), 16.9 (C-19), 21.3 (C-21), 27.2 (acetoxi), 63.2 (C-6), 65.3 (C-5), 144.1 (C-3), 132.0 (C-16), 139.7 (C-5), 144.1 (C-16), 155.2 (C-17), 170.5 (carbonilo de éster), 196.7 (C-20). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

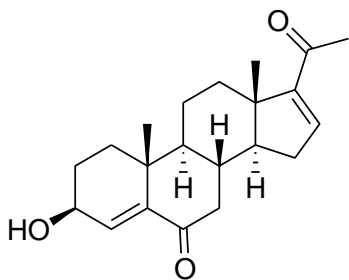


3 β -Acetoxy-5 α -hidroxi-16-ene-6,20-diona (11). Se disolvió 1 mmol del compuesto **10** en 50 mL de acetona y se sumergió en un baño de hielo, posteriormente se adicionó gota a gota una solución acuosa que CrO_3 (3.75mmol/10 mL). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se adicionó una cantidad igual de la solución de CrO_3 y se agitó durante 30 min. Una vez consumida la materia prima, se evaporó 50 % del volumen de la acetona y se vertió en agua-hielo. El compuesto fue extraído con CHCl_3 , la fase orgánica se lavó con agua, se secó y se evaporó. El sólido obtenido se

recristalizó de MeOH. **Rendimiento:** 90 %. Pf 244-245 °C. **UV (nm):** 235. **IR cm⁻¹:** 3357, 2950, 1734, 1699. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.8 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, H-21), 2.2 (acetoxi), 4.8 (1H, m, H-3), 6.6 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-16). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.8 (C-18), 17.0 (C-19), 22.0 (C-21), 28 (acetoxi), 80.0 (C-5), 143.8 (C-16), 155.0 (C-17), 173 (carbonilo de éster), 197.2 (C-20), 212.8 (C-6). **EM-FAB *m/z*** para C₂₃H₃₂O₅ 389 [M+H]⁺.

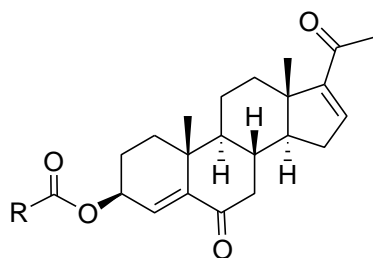


3β-Acetoxy-4,16-pregnadien-6,20-diona (12). Se disolvió 1 mmol del esteroide **11** en 4 mL de CHCl₃ anhidro, se adicionó 4.82 mmol de piridina y 3.21 mmol de SOCl₂ (ambos recién destilados). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y bajo atmosfera de nitrógeno. Transcurrido el tiempo de reacción se adicionó 30 mL de CHCl₃, se lavó con HCl al 10 %, con una solución saturada de NaHCO₃, con agua, se secó y concentró a presión reducida. El compuesto se purificó en una columna de gel de sílice empleando un gradiente de hexano-acetato de etilo. **Rendimiento:** 83%. Pf 193-195 °C. **UV (nm):** 235. **IR cm⁻¹:** 2933, 1734, 1657, 1231. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.1 (3H, s, H-21), 2.3 (3H, s, acetoxi), 5.1 (1H, m, H-3), 6.0 (1H, H-4), 6.7 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-16). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 22.0 (C-21), 29.5 (acetoxi), 70.1 (C-3), 129.0 (C-4) 143.7 (C-16), 147.2 (C-5), 154.6 (C-17), 170.6 (carbonilo de éster), 195.0 (C-20), 201.7 (C-6). **EM-FAB *m/z*** para C₂₃H₃₀O₄ 371 [M+H]⁺.



3β-Hidroxi-4,16-pregnadien-6,20diona (13). En un matraz de fondo redondo se disolvió 200 mg del derivado **12** en metanol (10 mL), se adicionó 10 mL de una solución acuosa de NaOH al 2% y se agitó a temperatura ambiente durante 2h. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el metanol a presión reducida. Posteriormente el residuo

contenido en el matraz se adicionó sobre agua y hielo. El sólido fue filtrado al vacío y purificado por cromatografía en columna de gel de sílice empleando un gradiente de hexano-AcOEt. **Rendimiento:** 70%. Pf 168-170 °C. **UV (nm):** 238. **IR cm^{-1} :** 3375, 2935, 1687. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ :** 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.2 (3H, s, H-21), 4.3 (1H, m, H-3), 6.2 (1H, H-4), 6.7 (1H, d, $J=2$ Hz, H16). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ :** 15.7 (C-18), 19.8 (C-19), 22.1 (C-21), 67.1 (C-3), 133.2 (C-4) 143.9 (C-16), 146.5 (C-5), 154.8 (C-17), 196.6 (C-20), 202.4 (C-6). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 329 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Derivados de 3 β -Hidroxi-4,16-pregnadien-6,20diona con antiinflamatorios en C-3. La metodología para la esterificación con los antiinflamatorios fue la misma que la descrita para la síntesis de los 17-oxaantrost-5-eno-3 β -il-derivados. En la Tabla 3 se muestra la relación estequiométrica utilizada para la síntesis de cada derivado.

Tabla 3. Relación molar para la síntesis de los híbridos con antiinflamatorios

Compuestos	Relación milimolar				
	ÁCIDOS				
	Naproxeno	Ibuprofeno	Ketoprofeno	Indometacina	Sulindaco
Esteroides	1	1	1	1	1
DCC	5	5	5	5	5
DMAP	3	3	3	3	3
ÁCIDO	6	6	5	5	5

4,16-Pregnadien-6,20-diona-3 β -il-[(s)-6-metoxi- α -metil-2-naftalen]acetato (**14a**), aducto de naproxeno. **Rendimiento** 78 %. Pf: 150-152 °C. **UV (nm):** 230. **IR cm^{-1} :** 2941, 1723, 1667, 1605, 1236. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ :** 0.8 (3H, s, H-18), 0.9 (3H, s, H-19), 1.5 (2H, d, naproxeno), 2.2 (3H, s, H-21), 3.7 (1H, m, naproxeno), 4.5 (1H, m, H-3), 5.2 (1H, d, $J=2$ Hz, H-16), 6.6 (1H, H-4), 7.62 (1H, d, $J=8.8$ Hz, aromático), 7.63 (1H, d, $J=8.8$ Hz, aromático), 7.38 (1H, d, $J=8.4$ Hz, aromático), 7.1 (1H, d, $J=11$ Hz, aromático). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ :** 14.7 (C-18), 17.6 (C-19),

54.2 (O-Me), 73.1 (C-13), 104.5 (C-aromático), 117.8 (C-aromático), 120.9 (C-aromático), 124.8 (C-aromático), 125.2 (C-aromático), 126.0 (C-aromático), 127.9 (C-aromático), 128.2 (C-aromático), 132.6 (C-aromático), 134.9 (C-aromático), 139.1 (C-5), 143.9 (C-17), 154.3 (C16), 156.5 (C-aromático), 173.0 (carbonilo de éster), 195.8 (C-6), 196.0 (C-20). **EM-FAB m/z** para $C_{35}H_{40}O_5$ 541 **[M+H]⁺**.

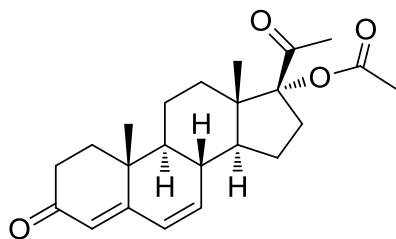
4,16-Pregnadien-6,20-diona-3 β -il-[α -metil-4-(2-metilpropil)fenil]acetato (**14b**), aducto de ibuprofeno. **Rendimiento**: 81%. **Pf**: 213-115 °C. **UV (nm)**: 223. **IR cm^{-1}** : 2949, 1722, 1689, 1638, 1237. **¹H-RMN (CDCl₃) δ** : 0.876 (3H, s), 0.890 (3H, d), 0.896 0.876 (3H, d), 0.9 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, H-21), 3.7 (1H, m, ibuprofeno), 5.3 (1H, m, H-3), 5.9 (1H, s, H-4), 6.7 (1H, dd, $J_1=13.2$ y $J_2=1.2$ Hz, H-16), 7.8 (2H, aromático), 7.18 (1H, d, $J=8$, aromático), 7.19 (1H, d, $J=8.4$ Hz, aromático). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ** : 15.2 (C-18), 18.6 (C-19), 70.5 (C-3), 127.1 (C-aromático), 127.2 (C-aromático), 129.3 (C-aromático), 129.4 (C-aromático), 137.4 (C-aromático), 137.6 (C-4), 140.5 (C-aromático), 143.8 (C-17), 147.8 (C-5), 154.9 (C-16), 174.4 (carbonilo de éster), 196.6 (C-6), 201.4 (C-20). **EM-FAB m/z** para $C_{34}H_{40}O_5$ 517 **[M+H]⁺**.

4,16-Pregnadien-6,20-diona-3 β -il-2-(3benzoilfenil)propionato (**14c**), aducto de ketoprofeno. **Rendimiento** 67%. **Pf**: 78-81 °C. **UV (nm)**: 247. **IR cm^{-1}** : 2930, 2851, 1730, 1692, 1658, 1625. **¹H-RMN (CDCl₃) δ** : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.5 (2H, d, ketoprofeno), 2.0 (3H, s, H-21), 5.5 (1H, m, H-3), 6.0 (1H, H-4), 6.1 (1H, d, $J=2$ Hz, H16), 7.43 (1H, d, $J=7.6$ Hz, aromático), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, aromático), 7.49 (1H, d, $J=7.6$ Hz, aromático), 7.53 (1H, d, $J=6.4$ Hz, aromático), 7.57 (1H, d, $J=6$ Hz, aromático), 7.58 (1H, d, $J=6.8$ Hz, aromático), 7.64 (1H, d, $J=7.2$ Hz, aromático), 7.72 (1H, d, $J=8$ Hz, aromático), 7.77 (1H, d, $J=7.8$ Hz, aromático), 7.8 (1H, s, aromático). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ** : 15.2 (C-18), 18.4 (C-19), 70.5 (C-13), 128.3 (C-aromático), 128.5 (C-aromático), 128.6 (C-aromático), 128.9 (C-aromático), 129.1 (C-aromático), 129.2 (C-aromático), 130.0 (C-aromático), 131.4 (C-aromático), 131.5 (C-aromático), 132.5 (C-aromático), 137.5 (C-aromático), 137.9 (C-aromático), 140.5 (C-aromático), 143.8 (C-17), 147.6 (C-5), 157.0 (C-16), 196.5 (C-6), 201.3 (carbonilo de ketoprofeno), 204.5 (C-20). **EM-FAB m/z** para $C_{37}H_{40}O_5$ 565 **[M+H]⁺**.

4,16-Pregnadien-6,20-diona-3 β -il-1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acetato (**14d**), aducto de indometacina. **Rendimiento** 80%. **Pf**: 75-77 °C **UV (nm)**: 316. **IR cm^{-1}** : 2916, 2848,

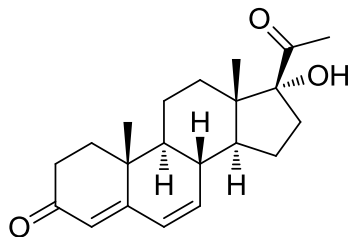
1727. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0.6 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.1 (3H, s, H-21), 2.9 (3H, s, CH_3 -indometacina), 3.7 (2H, s, CH_2 -indometacina), 3.8 (3H, s, OCH_3), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, H-4), 6.70 (1H, d, $J=2$ Hz, H16), 6.71 (1H, aromático), 6.9 (1H, aromático), 7.01 (1H, aromático), 7.04 (1H, aromático), 7.6 (1H, aromático), 7.7 (1H, aromático). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 14.2 (C-19), 70.6 (C-13), 101.3 (C-aromático), 111.6 (C-aromático), 112.7 (C-aromático), 114.9 (C-aromático), 129.1 (C-aromático), 130.7 (C-aromático), 131.0 (C-aromático), 135.9 (C-aromático), 145.7 (C-17), 149.8 (C-aromático), 150.5 (C-5), 156.0 (C-16), 168.8 (C-aromático), 170.9 (C-aromático), 173.5 (carbonilo de indometacina), 178.6 (carbonilo de éster), 201.0 (C-6), 204.0 (C-20).

4,16-Pregnadien-6,20-diona-3 β -il-(Z)-5-fluoro2-metil-1-[[4-(metilsulfinil)fenil]-1H-inden-3-acetato (**14e**), aducto de sulindaco. **Rendimiento** 75%. **Pf.** 149-151 °C. **UV (nm)**: 226, 283, 327. **IR cm^{-1}** : 2927, 2850, 1731, 1694, 1660, 1626, 1602, 1589. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (3H, s, sulindaco), 2.1 (3H, s, H-21), 2.8 (3H, s, sulindaco), 3.7 (1H, s, sulindaco), 3.8 (2H, s, sulindaco), 4.4 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, d, sulindaco), 6.1 (1H, H-4), 6.6 (1H, d, $J=2$ Hz, H-16), 6.8 (1H, d, sulindaco), 7.17 (1H, aromático), 7.18 (1H, aromático), 7.24 (1H, aromático), 7.68 (1H, aromático), 7.74 (1H, aromático), 7.55 (1H, aromático), 7.77 (1H, aromático). **EM-FAB m/z** para $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{FO}_5\text{S}$ 554 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

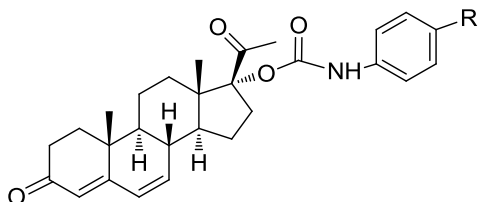


17 α -Acetoxy-4,6-pregnadien-3,20-diona (16). En un matraz de fondo redondo se mezclaron 0.5 g de 17 α -acetoxiprogesterona, 1g de cloranilo, 10 mL de ácido acético glacial y 2 mL de tolueno. La mezcla se mantuvo a ebullición durante 5 h. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró al vacío. El filtrado se vertió en una mezcla hielo-agua y se extrajo con CHCl_3 , se lavó con una solución de NaOH al 11%, hasta alcanzar un pH neutro. Se secó y evaporó. El compuesto se purificó en columna utilizando gel de sílice y un gradiente de hexano-acetona. Se obtuvo un compuesto sólido blanco. **Rendimiento** 97%. **Pf.** 224-226 °C. **UV (nm)**: 283. **IR cm^{-1}** : 2946, 1733, 1718, 1652. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0.7 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.1 (3H, s, H-17), 2.1 (3H, s, H-21), 5.7 (1H, s, H-4), 6.1

(1H, dd, $J_1=10$ y $J_2=1.2$ Hz, H-6), 6.2 (1H, dd, $J_1=9.6$ y $J_2=2$ Hz, H-7). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 14.3 (C-18), 16.3 (C-19), 22.2 (acetoxi), 26.4 (C-21), 123.9 (C-4), 128.3 (C-6), 140.0 (C-7), 163.4 (C-5), 170.6 (carbonilo de éster), 199.3 (C-3), 203.8 (C-20).



17 α -Hidroxi-4,6-pregnadien-3,20-diona (17). En un matraz de fondo redondo se mezclaron 0.1 g de esteroide **16**, 5 mL de metanol y 5 mL de una solución de NaOH al 2 %. Se dejó en agitación durante 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se calentó a reflujo durante 30 min, se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó el metanol. Al sólido obtenido se adicionó agua-hielo y el precipitado se filtró. El producto se recristalizó de MeOH. Se obtuvo un sólido blanco. **Rendimiento** 75%. **Pf:** 254-256 °C. **UV (nm):** 283. **IR cm^{-1} :** 3406, 2941, 1698, 1636, 1612. ^1H -RMN (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.9 (3H, s, H-21), 5.7 (1H, s, H-4), 6.1 (1H, dd, $J_1=10$ y $J_2=1.2$ Hz, H-6), 6.2 (1H, dd, $J_1=9.6$ y $J_2=2$ Hz, H-7). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 15.2 (C-18), 16.2 (C-19), 26.4 (C-21), 89.5 (C-17), 123.7 (C-4), 128.1 (C-6), 140.5 (C-7), 163.4 (C-5), 199.3 (C-3), 203.8 (C-20).



17 α -Fenilcarbamoiloxipregna-4,6-dien-3,20-diona (18a-18e). En un matraz de fondo redondo se disolvió el derivado esteroide **17** (1 mmol), bromuro de dimetilsulfuro de cobre (3 mmol), el correspondiente isocianato (6 mmol) en 3 mL de THF anhidro. La mezcla de reacción se agitó durante 48 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de N_2 . Terminado el tiempo de reacción, se adicionó un volumen igual de THF y se filtró. La fase orgánica se lavó tres veces con 50 mL una mezcla CHCl_3 /Agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró. El compuesto fue purificado en alúmina básica, utilizando un gradiente de hexano-acetona.

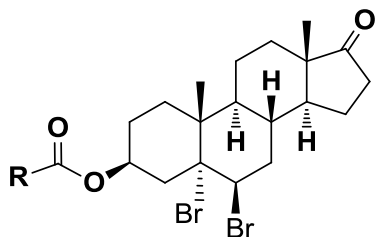
17 α -Fenilcarbamoiloxipregna-4,6-dien-3,20-diona (**18a**). **Rendimiento** 65%. **Pf:** 224-226 °C. **UV (nm):** 224, 281. **IR cm⁻¹:** 3264, 2944, 1728, 1660. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.7 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 2.2 (3H, s, H-21), 5.8 (1H, s, H-4), 6.0 (1H, dd, $J_1=13.2$ y $J_2=1.2$ Hz, H-6), 6.2 (1H, dd, $J_1=$ y $J_2= 3.2$ Hz, H-7), 7.1(dd, $J_1=12.8$ y $J_2=3.2$ Hz, aromático), 7.3 (1H, d, $J= 17.2$, aromático), 7.4 (1H, d, $J= 10$, aromático), 7.5 (1H, d, $J= 9.2$, aromático), 7.6 (1H, d, $J= 9.2$, aromático), 10.6 (1H, s, N-H). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 13.6 (C-18), 15.9 (C-19), 26.1 (C-21), 89.5 (C-17), 119.6 (C-aromático), 123.6 (C-aromático), 123.9 (C-4), 127.8 (C-aromático), 128.1 (C-6), 128.7 (C-aromático), 129.1 (C-aromático), 131.4 (C-7), 137.0 (C-aromático), 139.3 (C-aromático), 154.3 (carbonilo del carbamato), 162.7 (C-5), 199.1 (C-3), 202.9 (C-20). **EM-FAB m/z para C₂₈H₃₃NO₄ 448 [M+H]⁺.**

17 α -*p*-Fluorofenilcarbamoiloxipregna-4,6-dien-3,20-diona (**18b**). **Rendimiento:** 55%. **Pf:** 220-221 °C. **UV (nm):** 244, 283. **IR cm⁻¹:** 3264, 2944, 1728, 1661. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.7 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.3 (3H, s, H-21), 5.9 (1H, s, H-4), 6.0 (1H, dd, $J_1=13.2$ y $J_2=1.2$ Hz, H-6), 6.2 (1H, dd, $J_1= 9.6$ y $J_2= 3.0$ Hz, H-7), 7.3 (1H, d, $J= 17.2$, aromático), 7.4 (1H, d, $J= 10$, aromático), 7.5 (1H, d, $J= 9.2$, aromático), 7.6 (1H, d, $J= 9.2$, aromático), 10.6 (1H, s, N-H). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 13.6 (C-18), 15.9 (C-19), 26.1 (C-21), 89.5 (C-17), 120.0 (C-aromático), 123.6 (C-aromático), 124.0 (C-4), 127.9 (C-aromático), 128.2 (C-6), 128.9 (C-aromático), 129.0 (C-aromático), 134.5 (C-7), 137.0 (C-aromático), 139.3 (C-aromático), 154.3 (carbonilo del carbamato), 162.7 (C-5), 199.3 (C-3), 202.9 (C-20). **EM-FAB m/z para C₂₈H₃₂FNO₄ 466 [M+H]⁺.**

17 α -*p*-Clorofenilcarbamoiloxipregna-4,6-dien-3,20-diona (**18c**). **Rendimiento** 75%. **Pf:** 170-172 °C. **UV (nm):** 283. **IR cm⁻¹:** 3264, 2944, 1728, 1661. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.6 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.3 (3H, s, H-21), 5.7 (1H, s, H-4), 5.9 (1H, dd, $J_1=13.2$ y $J_2=1.2$ Hz, H-6), 6.2 (1H, dd, $J_1= 10$ y $J_2= 3.2$ Hz, H-7), 7.1 (1H, d, $J= 9.8$, aromático), 7.2 (1H, d, $J= 8.8$, aromático), 7.3 (1H, d, $J= 8.8$, aromático), 7.4 (1H, d, $J= 8.8$, aromático), 10.5 (1H, s, N-H). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 13.9 (C-18), 16.3 (C-19), 26.1 (C-21), 99.1 (C-17), 124.2 (C-4), 128.6(C-6), 129.1 (C-aromático), 129.5 (C-aromático), 130.1 (C-aromático), 134.5 (C-7), 135.8 (C-aromático), 154.5 (carbonilo del carbamato), 162.7 (C-5), 199.4 (C-3), 202.9 (C-20). **EM-FAB m/z para C₂₈H₃₂ClNO₄ 482 [M+H]⁺.**

17 α -*p*-Bromofenilcarbamoiloxipregna-4,6-dien-3,20-diona (**18d**). **Rendimiento** 58%. **Pf:** 206-208 °C **UV (nm):** 244, 281. **IR cm⁻¹:** 3287, 2949, 1721, 1659. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.6 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.1 (3H, s, H-21), 5.7 (1H, s, H-4), 5.9 (1H, dd, $J_1=13.2$ y $J_2=1.2$ Hz, H-6), 6.2 (1H, dd, $J_1=9.6$ y $J_2=3.1$ Hz, H-7), 7.1 (1H, d, $J=8.8$, aromático), 7.3 (1H, d, $J=10.0$, aromático), 7.4 (1H, d, $J=10.4$, aromático), 7.6 (1H, d, $J=9.2$, aromático), 10.5 (1H, s, N-H). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 14.0 (C-18), 16.5 (C-19), 26.5 (C-21), 90.3 (C-17), 124.0 (C-4), 128.7 (C-6), 129.0 (C-aromático), 130.1 (C-aromático), 130.7 (C-aromático), 135.3 (C-7), 136.1 (C-aromático), 154.7 (carbonilo del carbamato), 162.9 (C-5), 199.5 (C-3), 202.9 (C-20). **EM-FAB m/z para C₂₈H₃₂BrNO₄ 526 [M+H]⁺.**

17 α -*p*-Iodofenilcarbamoiloxipregna-4,6-dien-3,20-diona (**18e**). **Rendimiento** 50%. **Pf:** 217-219 °C. **UV (nm):** 253, 283. **IR cm⁻¹:** 3287, 2946, 1726. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.6 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.1 (3H, s, H-21), 5.7 (1H, s, H-4), 5.9 (1H, dd, $J_1=10$ y $J_2=1.2$ Hz, H-6), 6.2 (1H, dd, $J_1=2.4$ y $J_2=9.6$ Hz, H-7), 6.9 (1H, d, $J=8.4$, aromático), 7.3 (1H, d, $J=9.2$, aromático), 7.3 (1H, d, $J=9.2$, aromático), 7.6 (1H, d, $J=8.8$, aromático), 10.5 (1H, s, N-H). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 13.8 (C-18), 16.0 (C-19), 26.2 (C-21), 90.0 (C-17), 124.1 (C-4), 128.5 (C-6), 129.3 (C-aromático), 129.8 (C-aromático), 130.0 (C-aromático), 135.2 (C-7), 135.9 (C-aromático), 154.6 (carbonilo del carbamato), 162.9 (C-5), 199.5 (C-3), 202.9 (C-20). **EM-FAB m/z para C₂₈H₃₂IINO₄ 554 [M+H]⁺.**



3 β -RCOO-5 α ,6 β -dibromo-androstan-17-ona (20a-20e). En un

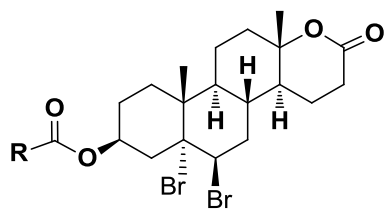
matraz redondo se colocó 1g del correspondiente derivado esteroideal (**19a-19e**) disuelto en 7 mL de CCl₄ y 8 mL de CH₂Cl₂ y se adicionó 2.4 mL de una solución de Br₂/ CCl₄ (0.9 mL de Br₂ en 10 mL de CCl₄). Se mantuvo en agitación por 2 h a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción se adicionó 2 mL de una solución de tiosulfato de sodio al 10 %. La fase orgánica se lavó con agua, se secó y se concentró a presión reducida. El sólido obtenido se recristalizó de MeOH.

3β-Propanoiloxi-5α,6β-dibromoandrostan-17ona (**20a**). **Rendimiento:** 67%. Pf 96-98 °C. **IR** cm^{-1} : 2947,1741. **¹H-RMN (CDCl₃)** δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (3H, t), 2.3 (2H, q), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). **¹³C-RMN (CDCl₃)** δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 55.3 (C-6), 71.6 (C-3), 87.4 (C-5), 173.8 (carbonilo de éster), 220.3 (C-17). **EM-FAB m/z** para C₂₂H₃₂Br₂O₃ 503 [M+H]⁺.

3β-Butanoiloxi-5α,6β-dibromoandrostan-17ona (**20b**). **Rendimiento:** 68 %. Pf 128-130 °C. **IR** cm^{-1} : 2946, 1726. **¹H-RMN (CDCl₃)** δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, t), 1.1 (3H, s, H-19), 1.7 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). **¹³C-RMN (CDCl₃)** δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 55.3 (C-6), 71.5 (C-3), 87.4 (C-5), 173.0 (carbonilo de éster), 220.1 (C-17). **EM-FAB m/z** para C₂₃H₃₄Br₂O₃ 517 [M+H]⁺.

3β-Pentanoiloxi-5α,6β-dibromoandrostan-17ona (**20c**). **Rendimiento:** 68 %. Pf 126-128 °C. **IR** cm^{-1} : 2935, 1739, 1731. **¹H-RMN (CDCl₃)** δ : 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 5.4 (1H, m, H-3). **¹³C-RMN (CDCl₃)** δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 55.3 (C-6) 73.2 (C-3), 87.4 (C-5), 173.2 (carbonilo de éster), 220.1 (C-17). **EM-FAB m/z** para C₂₄H₃₆Br₂O₃ 533[M+H]⁺.

3β-Hexanoiloxi-5α,6β-dibromoandrostan-17ona (**20d**). **Rendimiento:** 69 %. Pf 133-135 °C. **IR** cm^{-1} : 2954, 1731. **¹H-RMN (CDCl₃)** δ : : 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.5 (2H, m), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). **¹³C-RMN (CDCl₃)** δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 55.3 (C-6), 73.3 (C-3), 87.4 (C-5), 173.2 (carbonilo de éster), 220.2 (C-17). **EM-FAB m/z** para C₂₅H₃₈Br₂O₃ 547 [M+H]⁺.



3β-RCOO-5α,6β-dibromo-D-homo-13(17)a-oxa-androstan-17-

ona (21a-21d). En un matraz redondo se colocó 200 mg del correspondiente derivado esteroide (**20a-20e**) en 30 mL de una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH. Se adicionó 3.2 g de MMPP y 1 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de reacción se adicionó una solución saturada de NaHCO₃, la fase orgánica se separó, se

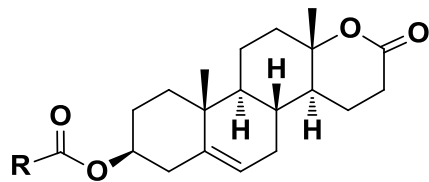
lavó con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El sólido se purificó en columna de gel de sílice empleando como mezcla de elución hexano-acetato de etilo.

3β-Propanoiloxi-5α,6β-dibromoandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-17-ona (**21a**). **Rendimiento:** 92%. Pf 147-149°C. **IR** cm^{-1} : 2943, 1732. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.2 (3H, t), 2.3 (2H, q), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 55.3 (C-6), 71.6 (C-3), 82.8 (C-13), 87.4 (C-5), 171.0 (carbonilo de éster), 173.8 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{Br}_2\text{O}_4$ 521 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3β-Butanoiloxi-5α,6β-dibromoandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-17-ona (**21b**). **Rendimiento:** 89%. Pf 129-131 °C. **IR** cm^{-1} : 2952, 1729. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, t), 1.1 (3H, s, H-19), 1.7 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 54.9 (C-6), 71.4 (C-3), 82.8 (C-13), 86.4 (C-5), 171.0 (carbonilo de éster), 173.0 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{O}_4$ 535 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3β-pentanoiloxi-5α,6β-dibromoandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-17-ona (**21c**). **Rendimiento:** 88%. Pf 143-145 °C. **IR** cm^{-1} : 2941, 1730. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 54.9 (C-6), 71.4 (C-3), 82.7 (C-13), 86.4 (C-5), 170.9 (carbonilo de éster), 173.3 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{Br}_2\text{O}_4$ 549 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3β-Hexanoiloxi-5α,6β-dibromoandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-17-ona (**21d**). **Rendimiento:** 87%. Pf 137-139 °C. **IR** cm^{-1} : 2950, 1732. **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : : 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.5 (2H, m), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz y $J_2=2$ Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 55.3 (C-5), 73.3 (C-3), 82.8 (C-13), 87.4 (C-5), 173.1 (carbonilo de éster), 173.2 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{Br}_2\text{O}_4$ 563 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



3β-R-COO-D-Homo-13(17)a-oxa-androstan-5-en-17-ona

(**22a-22d**). En un matraz de fondo redondo se colocó 300 mg de derivado correspondiente (**21a-21b**) disuelto en 5 mL de THF y se adicionó 3.5 mmol de NaI disuelto en 5 mL de THF. La mezcla se reflujo durante 3.5 h, terminado el tiempo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionó una solución saturada de tiosulfato de sodio, se extrajo tres veces con 5 mL de CHCl₃, se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El sólido obtenido se purificó en columna de gel de sílice empleando un gradiente de hexano-acetato de etilo.

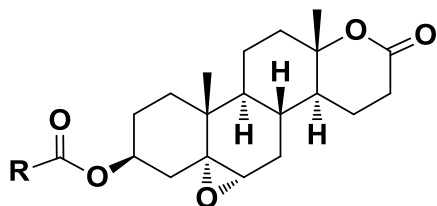
3β-Propanoiloxi-D-homo-13(17)a-oxa-androst-5-en-17-ona (**22a**). **Rendimiento:** 93%. Pf 170-172 °C. **IR cm⁻¹:** 2950-1731. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.2 (3H, t), 2.3 (2H, q), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz y $J_2 = 2$ Hz, H-6). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.3 (C-3), 83.1 (C-13), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.4 (carbonilo de éster), 173.9 (carbonilo de éster). **EM-FAB m/z para C₂₂H₃₂O₄ 361 [M+H]⁺.**

3β-Butanoiloxi-D-homo-13(17)a-oxa-androst-5-en-17-ona (**22b**). **Rendimiento:** 92 %. Pf 189-191 °C. **IR cm⁻¹:** 2948,1731. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, t), 1.1 (3H, s, H-19), 1.7 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz y $J_2 = 2$ Hz, H-6). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 71.4 (C-3), 83.1 (C-13), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.4 (carbonilo de éster), 173.1 (carbonilo de éster). **EM-FAB m/z para C₂₃H₃₄O₄ 375 [M+H]⁺.**

3β-Pentanoiloxi-D-homo-13(17)a-oxa-androst-5-en-17-ona (**22c**). **Rendimiento:** 91 %. Pf 106-108 °C. **IR cm⁻¹:** 2949, 1730. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz y $J_2 = 2$ Hz, H-6). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.2 (C-3), 83.1 (C-13), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.2 (carbonilo de éster), 173.3 (carbonilo de éster). **EM-FAB m/z para C₂₄H₃₆O₄ 389 [M+H]⁺.**

3β-Hexanoiloxi-D-homo-13(17)a-oxa-androst-5-en-17-ona (**22d**). **Rendimiento:** 89 %. Pf 117-119 °C. **IR cm⁻¹:** 2948, 1731. **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** : 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-

19), 1.3 (2H, q), 1.5 (2H, m), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz y $J_2 = 2$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.2 (C-3), 83.1 (C-13), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.2 (carbonilo de éster), 173.2 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_4$ 403 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



3 β -RCOO-5 α -epoxi-D-homo-13(17)a-oxa-androstan-17-

ona (23a-23e). En un matraz de fondo redondo se colocó 1 mmol del correspondiente derivado esteroidal **22a-22e**, CHCl_3 (10 mL) y se adicionó 3.33 mmol *m*-CPBA. La mezcla se agitó durante 1h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se adicionó 50 mL de una solución saturada de NaHCO_3 que contenía 0.5 g de bisulfito de sodio. Se realizaron 3 extracciones de 100 mL de CHCl_3 . La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se concentró a presión reducida. El compuesto se purificó en columna de gel de sílice empleando un gradiente de hexano-acetato de etilo.

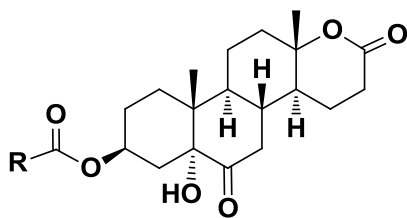
3 β -Propanoiloxi-5 α ,6 α -epoxiandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-17-ona (**23a**). **Rendimiento:** 94%. Pf 168-170 °C. **IR** cm^{-1} : 2940, 1724. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.2 (3H, t), 2.3 (2H, q), 2.9 (1H, d, $J_1 = 4.4$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-3). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 63.1 (C-5), 64.8 (C-6), 70.7 (C-3), 82.8 (C-13), 171.1 (carbonilo de éster), 173.2 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_5$ 377 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -Butanoiloxi-5 α ,6 α -epoxiandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-17-ona (**23b**). **Rendimiento:** 96 %. Pf °C. **IR** cm^{-1} : 2942, 1725. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, t), 1.1 (3H, s, H-19), 1.7 (2H, m), 2.3 (2H, t), 2.9 (1H, d, $J_1 = 4.4$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-3). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 63.0 (C-5), 64.7 (C-6), 71.3 (C-3), 82.9 (C-13 y C-5), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.0 (carbonilo de éster), 173.0 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_5$ 391 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -Pentanoiloxi-5 α ,6 α -epoxiandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-17-ona (**23c**). **Rendimiento:** 95 %. Pf 199-201 °C. **IR** cm^{-1} : 2939, 1725. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1

(3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 2.9 (1H, d, $J_1=4.4$ Hz, H-6), 4.8 (1H, m, H-3). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 62.9 (C-5), 64.5 (C-6), 73.2 (C-3), 82.7 (C-13), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.2 (carbonilo de éster), 173.3 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_5$ 405 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3β -Hexanoiloxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxiandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-17-ona (**23d**). **Rendimiento**: 93 %. Pf 154-156 °C. **IR** cm^{-1} : 2940, 1727. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : : 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.5 (2H, m), 1.6 (2H, m), 2.3 (2H, t), 2.9 (1H, d, $J_1=4.4$ Hz, H-6), 4.9 (1H, m, H-3). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 63.2 (C-5), 64.9 (C-6), 70.6 (C-3), 82.7 (C-13), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.2 (carbonilo de éster), 172.8 (carbonilo de éster). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_5$ 419 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



3β -RCOO- 5α -hidroxi-D-homo-13(17)a-oxa-androstan-6,17-

diona (24a-24e). Se disolvió 1 mmol del correspondiente epóxido (**23a-23e**) en 10 mL de acetona y se sumergió en un baño de hielo. Posteriormente se adicionó gota a gota una solución de CrO_3 en agua (3.75 mmol/). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min., transcurrido este tiempo se adicionó otra cantidad igual de CrO_3 y la mezcla se agitó durante 30 min. Una vez que reaccionó toda la materia prima, la mitad del volumen de acetona fue evaporada a presión reducida. La mezcla se vertió en hielo-agua, se extrajo tres veces con cloroformo. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con sulfato y se concentró a presión reducida. El compuesto se recristalizó de hexano:acetato de etilo (50:50). En cada caso se obtuvo un sólido blanco.

3β -Propanoiloxi- 5α -hidroxiandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-6,17-diona (**23a**). **Rendimiento**: 85%. Pf 182-184 °C. **IR** cm^{-1} : 3415, 2951, 1704. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, t), 1.3 (3H, s, H-19), 2.3 (2H, q), 5.4 (1H, m, H-3). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.0 (C-3), 82.7 (C-13), 171.3 (carbonilo de éster), 173.7 (carbonilo de éster), 215.2 (C-6). **EM-FAB** m/z para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_6$ 393 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3 β -Butanoiloxi-5 α -hidroxiandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-6,17-diona (**23b**). **Rendimiento:** 88 %. Pf °C. **IR cm⁻¹:** 3415, 2940,1705. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, t), 1.1 (3H, s, H-19), 1.7 (2H, m), 2.3 (2H, t), 5.4 (1H, m, H-3). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 71.4 (C-3), 83.1 (C-13 Y C-5), 171.3 (carbonilo de éster), 173.0 (carbonilo de éster), 215.0 (C-6). **EM-FAB *m/z*** para C₂₃H₃₄O₆ 407 [M+H]⁺.

3 β -Pentanoiloxi-5 α -hidroxiandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-6,17-diona (**23c**). **Rendimiento:** 89 %. Pf °C. **IR cm⁻¹:** 3415, 2951, 1705. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.5 (2H, m), 1.6 (2H, m,2.3 (2H, t), 5.4 (1H, m, H-3). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.2 (C-3), 82.9 (C-13 y C-5), 171.1 (carbonilo de éster), 173.1 (carbonilo de éster), 215.4 (C-6). **EM-FAB *m/z*** para C₂₄H₃₆O₆ 421 [M+H]⁺.

3 β -Hexanoiloxi-5 α -hidroxiandrostan-D-homo-13(17)a-oxa-6,17-diona (**23d**). **Rendimiento:** 88 %. Pf 179-181 °C. **IR cm⁻¹:** 3413, 2940. 1715. **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** : 0.9 (3H, t), 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q), 1.5 (2H, m), 1.6 (2H, m,2.3 (2H, t), 5.4 (1H, m, H-3). **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 73.0 (C-3), 82.9 (C-13 y C-5), 171.3 (carbonilo de éster), 173.2 (carbonilo de éster), 215.0 (C-6). **EM-FAB *m/z*** para C₂₅H₃₈O₆ 435.

El procedimiento seguido para la síntesis de abiraterona es aquel descrito en la literatura, la caracterización espectroscópica así como el punto de fusión encontrados fueron los mismos que los valores que se han reportado anteriormente.⁴⁸

5.2 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

5.2.1 Estudios *in vitro*

5.2.1.1 Estudios de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa.

Extracción de la enzima 5 α -R1

Con la finalidad de obtener el microsoma que contenía la isoenzima 5 α -R1 fueron extirpados dos hígados de ratas macho adultas (8 meses de edad). Los hígados de las ratas fueron resuspendidos (15-30 mg) en un volumen del buffer A. A menos de que se especifique otra cosa, los siguientes procedimientos fueron realizados a 4 °C. El tejido fue homogenizado y centrifugado a 10, 000 revoluciones por minuto durante 30 min (ultracentrífuga Beckman L70K) y el pellet fue separado. La fase líquida del sobrenadante fue filtrado y centrifugado a 10,000 revoluciones por minuto durante 60 min. El pellet microsomal fue lavado y resuspendido en 5 volúmenes del buffer A empleando un homogenizador y la cantidad de proteínas fueron determinadas por el método de Bradford. La suspensión fue centrifugada a 1,000,000 revoluciones por un minuto y el pellet obtenido fue suspendido en el buffer A para obtener concentraciones de 10-20 mg de proteína/mL; la solución microsomal fue mantenida a -80 °C antes de cada experimento.

Determinación de la actividad de la isoenzima 5 α -R1

La actividad de la isoenzima 5 α -R1 fue determinada siguiendo la conversión de T a DHT a pH 7.5, 2 nM de [1,2,6,7 ³H] T, y diferentes concentraciones de testosterona no marcada (5×10^{-7} - 6.3×10^{-6} M) o DHT (5×10^{-7} - 2.7×10^{-6} M) y 2 mM de NADPH. Las reacciones se hicieron por duplicado y comenzaron cuando la fracción conteniendo 5 α -R1 (60 μ g de proteína en un volumen de 7.5 μ L) fue adicionada a la mezcla de reacción e incubada a 37 °C durante 60 min.

Extracción de la isoenzima 5 α -R2

La próstata de cadáver humano se cortó y homogenizó utilizando un medio A (20 mM fosfato de sodio, 0.32 M sucrosa, 0.1 mM ditioneitol, pH=6.5). El homogenizado se centrifugó a 1,500 rpm durante 20 min. El pellet formado se separó y lavó con tres volúmenes del medio A, una vez mas se centrifugó a 4,400 rpm durante 10 min. Finalmente el pellet se resuspendió en el medio A y se almacenó a -70 °C. Se determinó el contenido de proteínas del pellet utilizando el método de Bradford y albúmina sérica bovina como referencia.

La actividad de la enzima fue determinada como se encuentra reportado previamente en la literatura.

Determinación de la IC₅₀ de los compuestos sobre la inhibición de las isoenzimas 5 α -R1 y 2.

Para cada uno de los compuestos se prepararon series de seis tubos conteniendo concentraciones crecientes (10^{-11} - 10^{-3} M) disueltos en DMSO y conteniendo T [³H] a una concentración final de 2 nM; así mismo se incluyeron tubos controles a los que solo se adicionó T [³H] a una concentración final de 2 nM. Los tubos se colocaron en un baño de agua y en atmósfera de nitrógeno hasta evaporar totalmente el disolvente; enseguida se añadió 720 μ L de buffer de fosfatos (40 mM), pH=6.5 (para la isoenzima 5 α -R2), 80 μ L de fracción microsomal de próstata de cadáver humano, que contenía 360 μ g/mL de proteína. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de DTT (1 mM) y 100 μ L de NADPH (2 mM) con los que se dio inicio a la reacción. Para la isoenzima tipo 1 se utilizó un pH de 7.5, 2 mM NADPH, 6.31 μ M de testosterona no marcada, esta reacción inició cuando se adicionó 60 μ g de esta isoforma.

Los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron a 37 °C por 1 h, finalizado el tiempo de incubación se agregó 1 mL de diclorometano para detener la reacción y se agitó nuevamente. Se extrajo la fase orgánica en la que se encontraba la DHT [³H] realizando tres extracciones más y una vez reunidos los extractos, el disolvente se evaporó a baño de agua. El sólido se resuspendió con 0.5 mL de metanol y se aplicó gota a gota en una placa cromatográfica para separar la DHT [³H] formada; el procedimiento se repitió 5 veces; adicionalmente se aplicaron

los estándares de T y DHT en cada extremo de la placa. Se eluyó 3 veces en un sistema de elusión cloroformo-acetona 9:1.

Para la visualización de los estándares, las placas se observaron bajo la luz UV ($\lambda=254$ nm) y posteriormente se revelaron con una solución de ácido fosfomolibdico en metanol al 8 %. Se marcó y cortó la zona correspondiente a la DHT [^3H] en el analizador de centelleo. La actividad de la enzima se calculó en base a los controles que se incubaron en presencia únicamente de T [^3H]. Cada experimento se realizó por duplicado.

La concentración de finasterida y de los compuestos sintetizados para inhibir el 50 % (IC_{50}) fue determinado usando el programa SigMPlot 3.

5.2.1.2 Ensayos de afinidad al receptor de andrógenos

Preparación de la fracción citosólica

Para determinar la afinidad de los compuestos sintetizados al receptor de progesterona, se utilizaron ratas adultas (8 meses) con peso de 500 g. La próstata de las ratas fue removida, pesada y sumergida en TEMD frio (conteniendo: Tris-HCl 40 mM, EDTA 3 mM, molibdato de sodio 20 mM, ditioteitol 0.5 mM, glicerol 10 % a pH 8.0). A menos que se especifique otra cosa, todos los experimentos se realizaron en baño de hielo. Los tejidos fueron homogenizados en un volumen de buffer TEMD enriquecido con inhibidores de proteasas ((PMSF 2 mM, antipaína 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptina 5 mM, Tris-HCl 40 mM, EDTA 3 mM, ditioteitol 0.5 mM, glicerol 10 % a pH 7.4). Estos homogenados fueron centrifugados a 140,000 revoluciones durante 60 minutos en un rotor SW 60 Ti (Beckman, Palo Ato, California). La fracción citosólica obtenida de la fracción líquida fue mantenido a -70 °C. Las proteínas prostáticas (6 mg de proteína en 200 μL) fueron determinadas por el método de Bradford.

Análisis por competencia por el receptor de androstano

Se preparó una serie de tubos que contenían 1 nM de miboleronona [³H] más cantidades crecientes de miboleronona no radioactiva (10⁻¹⁰-10⁻⁷) o los compuestos a evaluar disueltos en etanol o cloroformo. A estos tubos se le agregó 300 µL de solución amortiguadora TEMD más 200 µL de citosol. Los tubos se incubaron por 18 h a 4°C. Se centrifugaron a 3700 rpm durante 1.5 h, el pellet formado se separó y se resuspendió vigorosamente, posteriormente se agregó 0.5 mL de carbón-dextran, los tubos se agitaron e incubaron a 4 °C por 40 min y posteriormente se centrifugaron a 3700 rpm por 5 min. Posteriormente se colocaron en viales en donde se adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold para finalmente leer la radioactividad producida por el complejo Miboleronona-[³H]-receptor en el analizador de centelleo. La IC₅₀ de cada compuesto fue calculada de acuerdo a lo obtenido de graficar la concentración contra el porcentaje de enlace. Este experimento se realizó por duplicado en diferentes tiempos. La afinidad de enlace al receptor (AER) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{AER} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ [}^3\text{H] del compuesto de miboleronona} \times 100}{\text{IC}_{50} \text{ del inhibidor}}$$

5.2.1.3 Ensayos de afinidad al receptor de progesterona

Preparación de la fracción citosólica

El útero fue aislado de conejos maduros, los cuales fueron tratados 7 días con valerato de estradiol 10 µg/animal. Después del tiempo de tratamiento los animales fueron sacrificados con CO₂ y el útero fue removido, pesado y sumergido en un baño de hielo y se adicionó buffer TEMD. Posteriormente, el tejido fue seccionado y homogenizado en volúmenes iguales de buffer TEMD enriquecido con inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, antipaína 10 µg/mL, leupeptina 5 mM, Tris-HCl 40 mM, EDTA 3 mM, ditioteitol 0.5 mM, glicerol 10 % a pH 7.4). El homogenizado fue centrifugado a 140,000 revoluciones durante 2h a 0°C en un rotor SW 60 Ti (Beckman, Palo Ato, California)

Análisis por competencia por el receptor de progesterona

Para los experimentos de competencia por el receptor de progesterona se prepararon tubos que contenían 4 nM de [³H] R5020 más un rango de concentraciones de 1×10^{-10} – 4×10^{-6} M de progesterona no radiactiva, R5020 ó los compuestos sintetizados en un rango de concentraciones de 1×10^{-10} – 4×10^{-6} M en cloroformo o etanol. En los tubos que no contenían competidor se adicionó disolvente (cloroformo o etanol) y se evaporó al vacío. Posteriormente a cada tubo se adicionó alícuotas de 200 μ L de la fracción citosólica del útero de conejo (4 mg de proteína) y se incubó en la presencia de 300 μ L de buffer TEMD enriquecido con inhibidores de proteasa durante 18 h a 4 °C (cada tubo se realizó por duplicado). Después del periodo de incubación se adicionó una solución de sulfato de amonio (0.21 mL) en medio TEMD (30%), se incubó durante 1h con ocasional agitación. El precipitado fue colectado por centrifugación a 10,000 revoluciones durante 10 minutos y el pellet fue redisolto en 0.5 mL de TEMD y mezclado con 0.5 mL de una mezcla de 0.1% de dextran revestido con 1% de carbón en buffer TEMD. La mezcla fue incubada por 10 minutos a 4 °C, transcurrido este tiempo, los tubos fueron agitados vigorosamente, centrifugados a 800 revoluciones durante 10 minutos. Se tomaron alícuotas de 600 μ L y se determinó la radiactividad. La IC₅₀ de cada compuesto fue calculada de acuerdo a lo obtenido de graficar la concentración contra el porcentaje de enlace. Este experimento se realizó por duplicado en diferentes tiempos. La afinidad de enlace al receptor (AER) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{AER} = \frac{\text{IC}_{50} [^3\text{H}] \text{ del compuesto de referencia} \times 100}{\text{IC}_{50} \text{ del inhibidor}}$$

5.2.1.3 Citotoxicidad en las líneas celulares cancerosas humanas PC-3 y MCF-7 de los compuestos sintetizados

Se utilizaron dos líneas cancerosas humanas (de cáncer de próstata y de mama) que fueron proporcionadas por Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Estas células se cultivaron en un medio RPMI-1640, enriquecido con 10 % suero fetal bovino 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina B y 1 % de aminoácidos no esenciales; se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Posteriormente se tomó 100 µL de la línea celular correspondiente, el contenido de células varía de 5000 a 40000 dependiendo de la línea celular; se incubó durante 24 h. Se preparó una solución stock en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada compuesto a evaluar, estas concentraciones se adicionaron a cada pozo para obtener una concentración final de 50 µM, los pozos se incubaron durante 48 h. Adicionalmente se preparó otro pozo al cual se adicionó únicamente medio de cultivo, este último se incubó por 1 h, ambas incubaciones se realizaron a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 100 % de humedad relativa. Finalizado el tiempo correspondiente se realizó los cultivos celulares *in situ* por la adición de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) (p/v) frío, se incubó por 60 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se realizaron 5 lavados con agua desionizada y se dejó secar por 24 h. Posteriormente se realizó el tinte adicionando 100 µL de sulforodamina B (SRB) (0.4 % p/v en 1 % de ácido acético) a cada pozo, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se hicieron lavados con una solución de ácido acético al 1% y se dejó secar por 24 h. Las células fijas se resuspendieron utilizando 10 mM de buffer Tris, pH=10 en agitación por 5 min. Finalmente, se determinó la densidad óptica a 515 nM utilizando un lector de ELISA.

5.2.1.4 Estudios de inhibición de la enzima CYP17A1

Estudios de afinidad de los compuestos al hierro del grupo hemo de la enzima CYP17A1

Se realizaron titulaciones de la unión de los diferentes compuestos a la enzima CYP17A1 purificada a temperatura ambiente usando un espectrofotómetro de UV-Visible (UV-2600; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD). La proteína fue diluida a 0.2 μM en 100 mM de un buffer de fosfato de potasio (20 % de glicerol) a pH 7.4, fue dividida igualmente en dos cubas de 1 mL (1cm de longitud), y la línea base fue colectada (350-500 nm). Alícuotas preparadas recientemente de los compuestos a evaluar en 100 % de etanol fueron adicionadas a la cuba. Un volumen igual de etanol fue adicionado a la cuba de referencia. Diferentes espectros fueron colectados (350-500 nm) hasta alcanzar un periodo de equilibrio. Durante las valoraciones, el total de etanol no excedió el 2% del volumen total contenido en cada cuba. La unión de los compuestos a la enzima fue monitoreada como la diferencia de absorbancia (ΔA) producida entre el mínimo (~ 398 nm) y el máximo (~ 420 nm). La constante de enlace aparente (K_d) fue calculada usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Determinación de la IC_{50} en la inhibición de la enzima CYP17A1

Se incubaron los compuestos **8a**, **8b**, **8c** y abiraterona como inhibidores. Diferentes viales que contenían enzima humana recombinante CYP17A1 (microsomas de levadura), progesterona (0.4 a 10 μM), [^3H]-progesterona (0.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$) y el correspondiente compuesto o vehículo de etanol en 0.247 ml de tampón de fosfato de potasio fueron pre-incubados a 37 °C durante 3 min. Posteriormente se adicionó 2.5 μl de NADPH, 100 nM, se incubó a 37 °C durante 20 min. La reacción se detuvo por adición de 1 mL de cloruro de metileno y la fase orgánica se secó bajo un flujo de nitrógeno. Los esteroides se analizaron en el HPLC Agilent 1260 con detector de UV y una línea de contador de centelleo β -Ram4 (LabLogic, Brandon, FL). Los extractos de incubación se disolvieron en 20 μL de metanol y 5 μL se resolvieron con una columna C8 de Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA) 50 mm X 2.1 mm, 26 micras, equipado con una columna de seguridad con flujo de 0.4mL/min. Gradientes de metanol acuoso fueron empleados (27% de metanol a 0.5 min, cambiando a 39% de metanol, y luego de 39 a 75% durante 30 min). Los

productos fueron identificados por los tiempos de retención , en comparación con los estándares resueltos al principio del experimento usando detección radiactiva de esteroides marcados con tritio, empleando cóctel de centelleo Bio-Safe II (Reserch Products International, Mount Prospect, IL) a una velocidad de flujo de 1.2 ml / min. Los datos fueron procesados con Laura (LabLogic).

5.2.1.5 Estudio del efecto de los compuestos 14a-14e en la proliferación de la línea celular U373-MG

La línea celular U373-MG derivada de un cáncer de astrocitoma humano grado III (ATCC, Manassas, VA) fueron donadas por el Dr. Andrés Gutiérrez de los laboratorios Dr. Sontheimer (Bringham, AL). Las células fueron crecidas en cajas de 10 cm de diámetro y mantenidas en un medio DMEM rojo fenol enriquecido con 10% de suero fetal bovino, con hormonas, piruvato 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM (GIBCO, NY) a una temperatura de 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% bajo 95% de aire.

En cajas de cultivo de 12 pozos fueron sembradas 5×10^3 células de la línea U373-MG en las condiciones mencionadas anteriormente. 24 horas antes del tratamiento con los compuestos, el medio fue removido y cambiado por DMEM sin rojo fenol enriquecido con 10 % de suero fetal bovino, sin hormonas (Hyclone, Utah), piruvato 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM (GIBCO, NY) a una temperatura de 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% bajo 95 % de aire. Posteriormente los siguientes tratamientos fueron aplicados: los compuestos **14a-14e** (en un rango de 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM y 1 nM), el esteroide+el antiinflamatorio (en un rango de 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM y 1 nM), el esteroide y los antiinflamatorios por separado (en un rango de 5 μ M, 1 μ M, 500 nM y 100 nM). Cada experimento fue repetido tres veces. Y la proliferación fue seguida durante 6 días empezando como día 0 cuando se aplicó el tratamiento. El número de células vivas fue medido por exclusión de azul de tripan usando un microscopio invertido (Olimpus CKX41, Center Valley, PA). Todos los datos fueron analizados y graficados usando el programa GraphPad versión 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Los análisis estadísticos entre grupos fueron realizados usando ANOVA con la preprueba Bonferronis. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativamente estadístico.

5.2.2 Estudios *in vivo*

5.2.2.1 Estudios *in vivo* en hámsteres

En las pruebas realizadas se emplearon tres modelos de estudio: los órganos flanco, las vesículas seminales y la próstata de hámsteres macho castrados.

El efecto antiandrogénico de los esteroides sobre las vesículas seminales de hámsteres machos (150-200 g) castrados, de la cepa Syrian Golden, fue determinado en 8 grupos de cuatro animales por experimento. Los animales fueron seleccionados al azar y gonadectomizados quince días antes del experimento, manteniéndolos a una temperatura controlada de 22 °C y en periodos de luz-oscuridad de 12 h. A cada animal de los diferentes grupos se le administró subcutáneamente (s.c.) 200 mg de testosterona (T) y cada uno de los esteroides evaluados 0.5 mL de aceite de castor (vehículo), por periodos de 24 h durante tres días. Se utilizaron como controles a un grupo que se le administró finasterida (F) más testosterona (T+F), otro que se le administró únicamente testosterona disuelta en el vehículo. Después del tratamiento, los hámsters fueron sacrificados mediante la anestesia con éter y posteriormente se realizó la disección de las vesículas seminales para ser pesadas.

Los esteroides sintetizados fueron comparados contra la finasterida por que es el medicamento que comercialmente esta disponible para el tratamiento del cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna y fue utilizado como control negativo en el experimento.

5.2.2.2 Experimentos *in vivo* (útero, glándula mamaria, cuerpo lúteo)

Cuatro grupos de 4 animales (ratones CD1) los cuales fueron sincronizados con 2 µg de LHRH (Sigma, en buffer de fosfato conteniendo 0.1 % de albumina bovina) por ratón, la dosis se administró subcutáneamente a las 9:00 h y posteriormente una segunda dosis a las 14:00 h. Después de esta administración se dejó descansar a los ratones durante 8 días. En la mañana del noveno día a los ratones previamente tratados con LHRH se le administró los compuestos a

evaluar (0.22 mg/Kg en 100 μ L de aceite de sésamo) una vez al día, durante cuatro días consecutivos. Como grupo control se inyectó solo 200 μ L de aceite de sésamo. Este experimento se realizó por triplicado en dos diferentes tiempos para obtener las desviaciones estándar.

Posteriormente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical en la mañana del décimo día de tratamiento. Los ovarios, glándulas mamarias y útero de los ratones fueron removidos y preparados para su examinación histológica.

Los tejidos fueron fijados con formaldehído en buffer (10%), procesados de acuerdo a las técnicas histológicas convencionales e insertados en paraplast (Oxford Labware, St Louis, MO, 63103, USA). Los ovarios de cada grupo fueron cortados sigitalmente (5 μ m) y el útero así como las glándulas mamarias fueron cortadas transversalmente (5 μ M). Estas secciones fueron impregnadas de hematoxilina-eosina y analizadas bajo una luz de campo claro en el microscopio (Axiovision, 4.5, Carl Zeiss). De la misma forma, el cuerpo lúteo que contenía cada ovario de cada ratón fue cuantificado. Los resultados fueron estadísticamente analizados usando el análisis de varianza “one-way” y el método Dunnett para comparar significancias (JMP IN 5.1 software).

5.2.2.3 Disminución del edema de la oreja del ratón

Transcurrido 4 h todos los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂ y se tomó una biopsia de la oreja inflamada (derecha) así como de la no inflamada (izquierda) empleando un sacabocados de 7 mm de diámetro. La inflamación se determinó como la diferencia de peso entre cada porción circular de ambas orejas. La actividad antiinflamatoria de los compuestos se reportó como el porcentaje de inhibición del edema y fue determinada empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [\text{peso promedio de prueba} / \text{peso promedio control}] * 100$$

Los resultados se analizaron mediante una prueba de t de student con un nivel de confianza de $p \leq 0.01$.

5.3 Estudios computacionales

Con la finalidad de correlacionar la afinidad por el hierro del grupo hemo de la enzima CYP17A1 se decidió calcular el LUMO de las moléculas 8a, 8b, 8c, abiraterona y progesterona. Este estudio se realizó en una computadora Laptop TOSHIBA modelo Satellite A505 con un procesador Intel Core i3 de 2.13 GHz y 4 GB de memoria RAM, utilizando el programa Spartan 08. Inicialmente las moléculas fueron pre-optimizadas usando un campo de fuerza Merck (MMFF94), se eligió el conformero de mínima energía. Posteriormente se realizó una optimización empleando una mecánica molecular AM1 y se calculó el LUMO y HOMO de las moléculas anteriormente mencionadas.

En el caso de los cálculos de CLogP se utilizó el programa ACD/LabsLogP versión 9.

6. CONCLUSIONES

En este proyecto de investigación se sintetizaron diferentes derivados esteroidales basados en diversos esqueletos como son la progesterona, androsterona y pregnolona. Los compuestos sintetizados se obtuvieron en buenos rendimientos, estos derivados fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas .

En el estudio de los derivados sintetizados para el tratamiento del cáncer de próstata se encontró que los compuestos que inhiben a la enzima 5α -reductasa tipo 1 son: **2h**, **2i**, **2j**, **3h**, **3i** y **3j**, teniendo en común un éster aromático en C-3, un carbonilo en C-17 o C-16, o un átomo de cloro en C-17. Aunque los derivados de estos ésteres que tienen un imidazol en C-17 presentaron actividad, ésta no es comparable a la mostrada por sus precursores con cloro en C-17, con lo que se concluye que la enzima 5α -R1 no tolera la presencia de un heterociclo en C-17. En cuanto a la enzima 5α -reductasa tipo 2, los compuestos que mostraron una mejor actividad inhibitoria con respecto al fármaco comercial que es la finasterida fueron los compuestos **3a**, **3d**, **22a-22e**.

En el estudio de inhibición de la proliferación celular de la línea de cáncer de próstata PC-3, los compuestos: **4a**, **4g**, **4i**, **5a**, **5f-5i**, **8a** y **14b** mostraron un porcentaje de inhibición mayor que aquel encontrado para ketoconazol.

En los estudios de afinidad al hierro del grupo hemo de la enzima CYP17A1, se encontró que el compuesto **8a** exhibe un mecanismo de unión tipo 1, por el contrario los compuestos **8b** y **8c** presentan una unión de tipo 2. Aunque ninguno de estos compuestos mostró un mejor valor de IC_{50} que el encontrado para abiraterona, estos resultados nos ayudan a explicar el posible mecanismo de regulación de este tipo de compuestos.

En los estudios *in vivo*, los que mostraron mayor disminución del diámetro de la mancha pigmentada fueron los compuestos **4b**, **4c** y **4d**. Los derivados estroidales que disminuyeron el peso de la próstata fueron los compuestos **8b** y **5d**. Aunque ninguno de estos compuestos mostraron inhibir a la enzima 5α -reductasa y en base a los resultados

obtenidos de la inhibición de la enzima CYP17A1, se puede pensar en que la actividad en este modelo biológico se deba a la inhibición de esta enzima en el metabolismo del hámster.

Los compuestos híbridos **14b** y **14e** mostraron inhibir considerablemente la proliferación de la línea celular U373, lo cual no es observado en las mezclas físicas evaluadas del esteroide **13** con los cinco antiinflamatorios, por lo que se puede inferir, que el enlace covalente le ayuda a mejorar su actividad de inhibición en este tipo de línea de cáncer de cerebro. Estos resultados también concuerdan con los estudios de disminución del edema de la oreja de ratón que está asociada a un fenómeno inflamatorio; donde se encontró que los compuestos **14b** y **14e**, reducen significativamente la inflamación de la oreja del ratón.

En cuanto al cáncer de seno, únicamente los compuestos derivados de triazol **4a** y **4e** redujeron el crecimiento celular de la cepa MCF-7. Por otro lado, el compuesto **2f** inhibió la ovulación y mostró un efecto agonista en las glándulas de mama de rata, este efecto *in vivo* se puede atribuir a que este compuesto se enlaza fuertemente al receptor de progesterona lo cual fue corroborado por los estudios *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación nos permiten aportar más información al requerimiento estructural que deben de presentar las moléculas para poder desarrollar compuestos más potentes para el tratamiento del cáncer de próstata, seno y cerebro. También estos resultados nos ayudan a comprender la importancia del efecto inflamatorio en el cáncer de próstata y de cerebro.

7. REFERENCIAS

1. Harper, HA; Rodwell, VW; Mayes, PA. **Review of physiological chemistry**. Cuarta edición. Lange Medical Publications 1979, 1258
2. <http://www.who.int/cancer/en/index.html> página consultada el 10 de diciembre del 2012.
Fuente: <http://www.who.int/en/>
3. Rosario, J; Derek, BR. **Benign Prostatic Hyperplasia**. *The Medicine Publishing Company Lid* 2002, 268-272
4. Steers,W. **5 α -Reductase activity in the prostate**. *Urology. Supplement 6A* 2001, 17-23
5. Evans, RM; Hollenberg, SM. **Zinc Fingers: Gilt by association**. *Cell* 1988, 52, 1-3
6. Vasaitis, T; Bruno, R; Njar, V. **CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy**. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2011, 125, 23-31
7. Bratoeff, E; Ramirez, E; Murillo, E.; Flores, G; Cabeza, M. **Steroid antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors**. *Current Medicinal Chemistry* 1999, 6, 501-517
8. Flores, E; Bratoeff, E; Cabeza, M; Ramirez, E; Quiroz, A; Heuze, I. **Steroid 5 α -reductase Inhibitors**. *Mini reviews in Medicinal Chemistry* 2003, 3 (3), 225-237
9. Auchus, RJ. **The back door pathway to dihydrotestosterone**. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2004, 15(9), 432-438
10. DeVore, NM; Scott, EE. **Structure of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001**. *Nature* 2012, 482, 116-120
11. www.bioloahun.blogspot.com.mx página consultada el 17 de junio del 2013
12. Yue,W; Yager, JD; Wang, JP; Jupe, ER; Santen, RJ. **Estrogen receptor-dependent and independent mechanism of breast cancer carcinogenesis**. *Steroids* 2013, 78, 161-170
13. Seralini, GE; Moslemi, S. **Aromatase inhibitors: past, present and future**. *Molecular and cellular endocrinology* 2001, 178, 117-131
14. Gluck, S; Minckwitz, GV; Untch, M. **Aromatase inhibitors in the treatment of elderly women with metastatic breast cancer**. *The Breast*. 2013, 22, 142-149
15. Vay, LD. **Anatomía y fisiología humana**. Segunda edición. Ed. Paidotribo. 1999, 345

16. Stupp, R; Reni, M; Gatta, G; Mazza, E; Vecht, C. **Anaplastic astrocytoma in adults.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2007, 63, 72-80
17. González-Arenas, A; Hansberg-Pastor, VJ; Lemus-Hernández, D; Cruz-Barrios, A; Camacho-Arroyo, I. **Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, 1823 (2), 379-386
18. Gonzalez, GT. **Papel de la progesterona en la regulación de la expresión de VEGF y EGFR en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54.** Tesis de licenciatura. UNAM. 2011. 4.
19. Sooriakumaran, P; Kaba, R. **The risk and benefits of cyclo-oxygenase-2 inhibitors in prostate cancer: A review.** *International Journal of Surgery* 2005, 3, 278-285
20. Kashfi, K. **Anti-inflammatory agents as cancer therapeutics.** *Advances in Pharmacology* 2009, 57, 31-89
21. <http://escuela.med.puc.cl/publ/MedicinaIntensiva/Disfuncion.html> página consultada el 1 de agosto del 2013.
22. Silverman, R. **The organic Chemistry of Drug Design and Drug Action.** *Academic Press* 1992, 442
23. Moreira, VMA; Vasaitis, TS; Njar, VCO; Salvador, JAR. **Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androsterone derivatives designed as CYP inhibitors.** *Steroids* 2007, 72, 939-948
24. Cabeza, M; Bratoeff, E; Ramírez, E; Heuze, I; Recillas, S; Berrios, H; Cruz, A; Cabrera, O; Perez, V. **Biological activity of novel progesterone derivatives having a bulky ester side chains at C-3.** *Steroid* 2008,73, 838-843
25. Bratoeff, E; Sainz, T; Cabeza, M; Heuze, I; Recillas, S; Pérez, V; Rodríguez, C; Ramírez, E. **Steroids with a carbamate function at C-17, a novel class of inhibitors for human and hamster steroid 5 α -reductase.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007, 107 (1-2), 48-56
26. Bratoeff, E; García, P; Hueze, Y; Soriano, J; Mejia, A; Labastida, AM; Valencia, N; Cabeza, M. **Molecular interactions of progesterone derivatives with 5 α -reductase types 1 and 2 and androgen receptors.** *Steroids* 2010, 75(7), 499-505
27. Garrido, M; Bratoeff, E; Bonilla, D; Soriano, J; Heuze, Y; Cabeza, M. **New steroidal lactones as 5 α -reductase inhibitors and antagonists for the androgen receptor.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011, 127 (3-5), 367-373

28. Hazzard, G; Lammiman, SA; Poon, NL; Satchell, DPN; Satchell, RS. **The kinetics of the Addition of ethanol to p-chlorophenyl isocyanate in diethyl ether solution in the presence of covalent metal halides.** *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1985, 1029-1033
29. Pérez-Ornelas, V; Cabeza, M; Bratoeff, E; Heuze, I; Sánchez, M; Ramírez, E; Naranjo-Rodríguez, E. **New 5 α -reductase inhibitors: In vitro and in vivo effects.** *Steroids* 2005, 70, 217-224
30. Posada Salgado, JA. **Síntesis de antiandrógenos esteroidales basados en el esqueleto de la Deshidroepiandrosterona con un heteroátomo en C-17.** Tesis de maestría. UNAM. 2012
31. Bratoeff, E; Sánchez, A; Arellano, Y; Heuze, Y; Soriano, J; Cabeza, M. **In vivo and in vitro effect of androsterone derivatives as 5 α -reductase type 1 enzyme inhibitors.** *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* DOI: 10.3109/14756366.2012.729827.
32. Hammet, LP. **The effect of structure upon the reactions of organic compounds. Benzene derivatives.** *Journal American Chemical Society* 1937, 59, 96-103
33. Culing, Z; Santer, FR. **Molecular aspects of androgenic signaling and possible targets for therapeutic intervention in prostate cancer.** *Steroids.* 2013, 78 (9), 851-859
34. Chng, KR; Cheung, E. **Sequencing the transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer.** *Cancer Letters.* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.009>.
35. Hagan, CR; Faivre, EJ; Lange, CA. **Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors.** *Steroids* 2009, 74, 568-572
36. Sobel, RE; Sadar, MD. **Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines-part1.** *The Journal of Urology* 2005, 173, 342-359
37. Heisler, LE; Evangelov, A; Lew, AM; Trachtenberg, J; Elsholtz, HP; Brown, TJ. **Androgen-dependent cell cycle arrest and apoptotic death in PC-3 prostatic cell cultures expressing a full-length human androgen receptor.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 1997, 126, 59-73
38. Montejo, C; Barcia, E; Fernández-Carballido, A. **Effective antiproliferative effect of meloxicam on prostate cancer cells: Development of a new controlled release system.** *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 387, 223-229

39. Coretés-Benítez, JF. **Síntesis y evaluación biológica de derivados de deshidroepiandrosterone con un grupo azol en C-17 como antiandrógenos.** Tesis de maestría. UNAM. 2013
40. Luthra, A; Denisov, IG; Sligar, SG. **Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2011, 507, 26-35
41. Kim, SJ; Jeong, HJ; Lee, KM; Ryu, HH; Lee, KS; Moon, BS; Cho, KH; Kim, HH. **Zingansikpoongtang modulates β -amyloid and IL-1 β -induced cytokine production and cyclooxygenase-2 expression in human astrocytoma cell U373MG.** *Journal of Ethnopharmacology* 2005, 96, 279-285
42. Khissiin, AE; Journé, F; Laïos, I; Seo, HS; Leclercq, G. **Evidence of an estrogen receptor form devoid of estrogen binding ability in MCF-7 cells.** *Steroids* 2000, 65, 903-913
43. Pawlak, KJ; Zhang, G; Wiebe, JP. **Membrane 5 α -pregnane-3,20-dione (5 α -P) receptors in MCF-7 and MCF-10A breast cancer cells are up-regulated by estradiol and 5 α -P and down-regulated by the progesterone metabolites, 3 α -dihydroprogesterone and 20 α -dihydroprogesterone, with associated changes in cell proliferation and detachment.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2005, 97, 278-288
44. Thomas, LN; Douglas, RC; Rittmasters, RS; Too, CK. **Overexpression of 5-alpha-reductase type 1 increases sensitivity of prostate cancer cells to low concentrations of testosterone.** *Prostate* 2009, 69, 595-602
45. Chen, C; Puy, LA; Simard, J; Li, X; Shingh, SM; Labrie, F. **Local and systemic reduction by topical finasteride or flutamide of hamster flank organ size and enzyme activity.** *Journal of Investigative Dermatology* 1995, 105, 678-682
46. Stouffer, RL. **Structure, function and regulation of the corpus luteum.** Physiology of the reproduction. Tercera edición, Capítulo 12, 2006, 526.
47. The Merck Index. Edición 12, 1996, 10330.
48. Potter, GA; Hardcastle, IR; Jarman R. **A convenient, large-scale synthesis of abiraterone acetate [3P-acetoxy-17-(3-pyridyl)androsta-5,16-diene] a potential new drug for the treatment of prostate cancer.** *Organic Preparations and Procedures International* 1997, 29(1), 123-134.

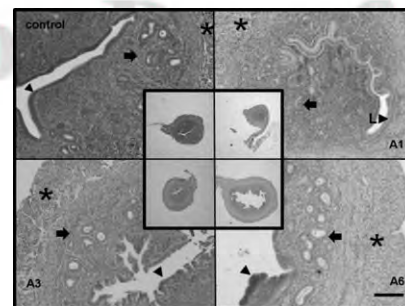
Full Paper

Biological Evaluation of Androstene Derivatives

M. Garrido, E. Bratoeff, M. García-Lorenzana, Y. Heuze, J. Soriano, N. Valencia, F. Cortes, M. Cabeza

The binding of several new dihydroepiandrosterone ester derivatives **A2–A6** to the progesterone receptor (PR) was evaluated. **A1** binds to the PR and inhibits the ovulation in female cycling mice stimulated with luteinizing hormone-releasing hormone. **A6** binds to the PR with the highest affinity and induces a synergistic activity with progesterone. Furthermore, **A6** inhibits ovulation in the same manner as **A1**. These results suggest that **A1** and **A6** block gonadotropin secretion. 1

DOI: 10.1002/ardp.201200335



Full Paper

Biological Evaluation of Androstene Derivatives

Mariana Garrido¹, Eugene Bratoeff¹, Mario García-Lorenzana², Yvonne Heuze³, Juan Soriano⁴, Norma Valencia⁵, Francisco Cortes¹, and Marisa Cabeza³

¹ Faculty of Chemistry, Department of Pharmacy, National University of Mexico City, Mexico, D. F., Mexico

² Department of Biology of Reproduction. Metropolitan University-Iztapalapa, Mexico, D. F., Mexico

³ Department of Biological Systems and Animal Production, Metropolitan University-Xochimilco, Mexico, D. F., Mexico

⁴ Department of Pathology of the General Hospital of Mexico (SS), Mexico, D. F., Mexico

⁵ Faculty of Sciences, Department of Pharmacy, National University of Colombia, Bogotá, Colombia

1 The effect of several new dihydroepiandrosterone ester derivatives **A2–A6** was demonstrated using
2 female cycling mice, which were synchronized for estrus with luteinizing hormone-releasing
3 hormone (LHRH) and injected with the steroids. The binding to the progesterone receptor (PR),
4 was obtained from uteri's cytosol of adult estrogen-primed rabbits. **A1** binds to the PR and
5 inhibited the ovulation in cycling mice stimulated with LHRH. The activity of the endometrium
6 and mammary glands in these mice was markedly reduced as compared to the control. **A2, A4, and A5**
7 were not active; nevertheless, **A3** binds to the PR with high affinity. However, this steroid did not
8 produce any effect as compared to that observed for the control in the endometrial and mammary
9 glands. **A6** binds to the PR with the highest affinity and induces a synergistic activity with
10 progesterone (P) in these tissues. Furthermore, **A6** inhibited the ovulation in the same manner as
11 **A1**. These results suggested that **A1** and **A6** are blocking the gonadotropin secretion. Since **A1**
12 inhibited the conversion of progesterone to 5 α -progesterone, as a result of this a blockage of the
13 ductal and alveolar epithelial cell produces proliferation in the mammary and endometrial glands,
14 which depends on 5 α -P was also observed.

15 **Keywords:** Dehydroepiandrosterone derivatives / Endometriosis / Endometrium / Mammary gland / Progesterone
16 receptors
17

18 Received: August 23, 2012; Revised: October 3, 2012; Accepted: October 9, 2012

19 DOI 10.1002/ardp.201200335

Introduction

20 Steroidal molecules are broadly distributed in nature. They
21 bind to specific receptors distributed inside the cells that
22 make up a super family of steroid-inducible transcription
23 factors that regulate the transcription of complex gene net-
24 works [1]. These steroidal molecules induce a wide variety of
25 biological processes, such as: cell growth, development, and
26 differentiation [2]. When these molecules bind to their
27 respective receptors, they could effect a conformational
28 change of the proteins resulting in the dimerization of

two ligand receptor complexes and binding to a specific
DNA sequence known as hormone response element. The
interaction of the receptor complex with specific coactivator
proteins and general transcription factors form a productive
transcription of their specific target genes [3].

The development of different synthetic steroids that could
modify the mechanism of action of the natural hormones
could be a useful tool for the treatment of different hormone
dependent diseases such as: benign prostatic hypertrophy,
acne, prostate cancer in males [4, 5], endometriosis, polycyst
ovary, uterine fibroids, and breast cancer in women [6]. The
aim of this study was to determine the activity of different
steroids on diverse biological targets.

Steroid receptors and the enzyme 5 α -reductase could be
therapeutic targets for new steroidal compounds with anti-
progestational activity. 5 α -Reductase converts Δ^4 -3-ketoste-
roids to 5 α -dihydro-3-ketosteroids in androgen dependent

Correspondence: Marisa Cabeza, Departamento de Sistemas
Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del
Hueso No. 1100, México, D.F C.P. 04960, México.

E-mail: marisa@correo.xoc.uam.mx

Fax: +(5255)54837260

tissues. The activity of this enzyme has been known for a long time [7]. Amino acid identities between 5 α -reductase present in different species had been reported in almost all protein data bases. Compositional substitution matrix adjustment is now available in NCBI's protein-protein version of blast [8]. These technologies had allowed us to compare the homology of sequences between human, mice, and rat's 5 α -reductase enzymes which are of 75% for mice and 78% for rats [8].

In view of the fact that 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-acetate (A1) inhibited the enzyme 5 α -reductase [9] this fact prompted us to synthesize similar compounds and evaluate them *in vitro* as well as *in vivo*. In this paper, we describe the synthesis and biological evaluation of the following new androstene derivatives: 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-acetate (A1), 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-bromobenzoate (A2), 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-methylbenzoate (A3), 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-chlorobenzoate (A4), 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-nitrobenzoate (A5), and 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-benzoate (A6) as inhibitors of 5 α -reductase enzyme as well as the binding of these steroids

to the progesterone receptor (PR). In addition, we also investigated the pharmacological activity of these steroids.

Results

Concentration of the novel compounds that inhibited 50% of 5 α -reductase activity from human prostate

The concentrations of finasteride (A7) and compounds A2–A6 (Fig. 1) required for inhibiting 5 α -reductase activity by 50% (IC₅₀) were determined from the inhibition plots using Sigma Plot software. The results from this experiment indicated that steroids A2–A5 in spite of the fact that they have an androstene-17-one skeleton did not inhibit the activity of the human 5 α -reductase enzyme. These compounds were reported as non-active (NA) in Fig. 1. However, A6 and A8 inhibited very weakly this enzyme with an IC₅₀ value of 100 \pm 5 μ M and 25 \pm 5 nM; these values were much higher than that determined for finasteride (A7) and previously reported for steroid A1 [9] Fig. 1.

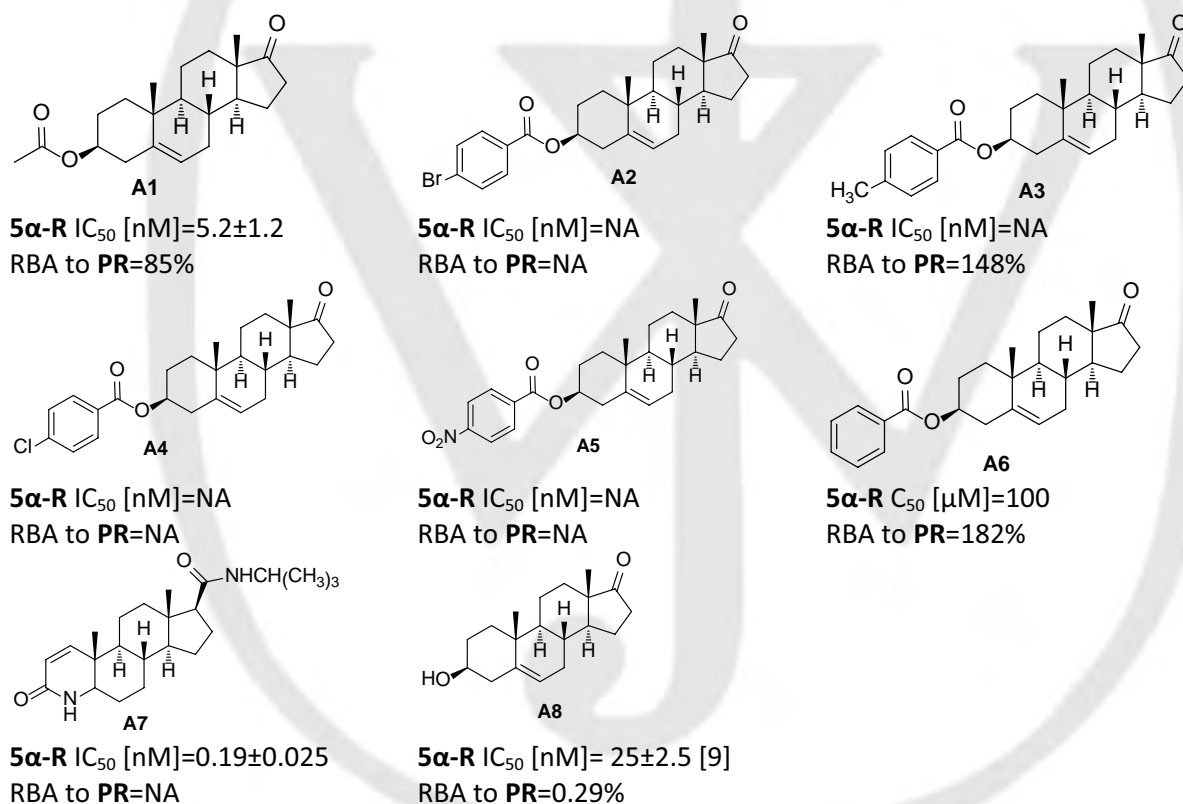


Figure 1. Effect of different androstane-compounds (A1–A8) on the activity of 5 α -reductase enzyme obtained from the membrane fraction of human prostate (5 α -R). The IC₅₀ values \pm standard deviations indicate the minimum concentration required of the novel steroids for the inhibition of 50% of the activity of 5 α -R. This Figure shows also the relative binding affinity (RBA) of these derivatives to the progesterone (PR) receptor obtained from the cytosol of rabbit's uteri. All experiments were carried out by duplicate in two different times. NA = not active compound.

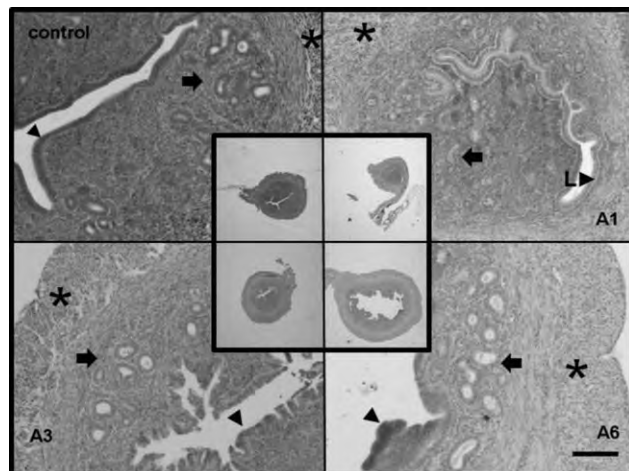


Figure 2. Effect produced by the novel steroids in the histology of the mice uteri. Important changes can be observed under different treatments. The square of the center shows transverse sections of control and experimental groups (**A1**, **A3**, and **A6**) (H–E, bar 1000 μm). Photomicrograph **A1** exhibits an evident reduction of the uterus diameter and lumen (L) as compared to the control group, but **A3** does not show this difference. **A6** shows a clear enhancement in the diameter of the uterus and the lumen as demonstrated by the presence of glands, epithelium, and miometrial increase. Framed regions were enlarged to show endometrial glands (arrow), epithelium (arrow head), and miometrial (*). Experimental groups show differences with the control group (H–E, bar 130 μm).

Relative binding affinities (RBA) of the androstane derivatives to the progesterone receptor (PR)

We evaluated the new steroidal compounds **A1–A6** and **A8** (Fig. 1) for the inhibition of [^3H]R5020 binding to the PR. The RBA values of these steroids for the PR are shown in Fig. 1.

The IC_{50} values for the displacement of [^3H]R5020 binding to the PR for unlabeled progesterone and R5020 were similar: 0.4 ± 0.02 and 0.4 ± 0.03 nM, respectively. IC_{50} values for steroids **A1**, **A3**, **A6**, and **A8** (dehydroepiandrosterone) were: 0.47 ± 0.03 , 0.27 ± 0.003 , 0.22 ± 0.001 , and 307 ± 10 nM, respectively.

Ovulation produced in mice stimulated with LHRH

After 13 days following luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) treatment, the cycling mice of the control group showed the presence of 10.3 ± 1.9 corpora lutea, thus indicating that the ovulation was carried out and the corpora lutea were secreting progesterone. The groups treated with **A3** and **A8** showed similar results, 8.3 ± 1.9 and 9.1 ± 2.0 corpora lutea, respectively. On the other hand, the animals treated with steroids **A1** and **A6** exhibited lower values of corporal lutea (7.3 ± 0.95 and 6.3 ± 1.2 , respectively). The statistical analysis indicated that **A1** and **A6** significantly inhibited the ovulation in these animals at a dose of 0.22 mg/kg.

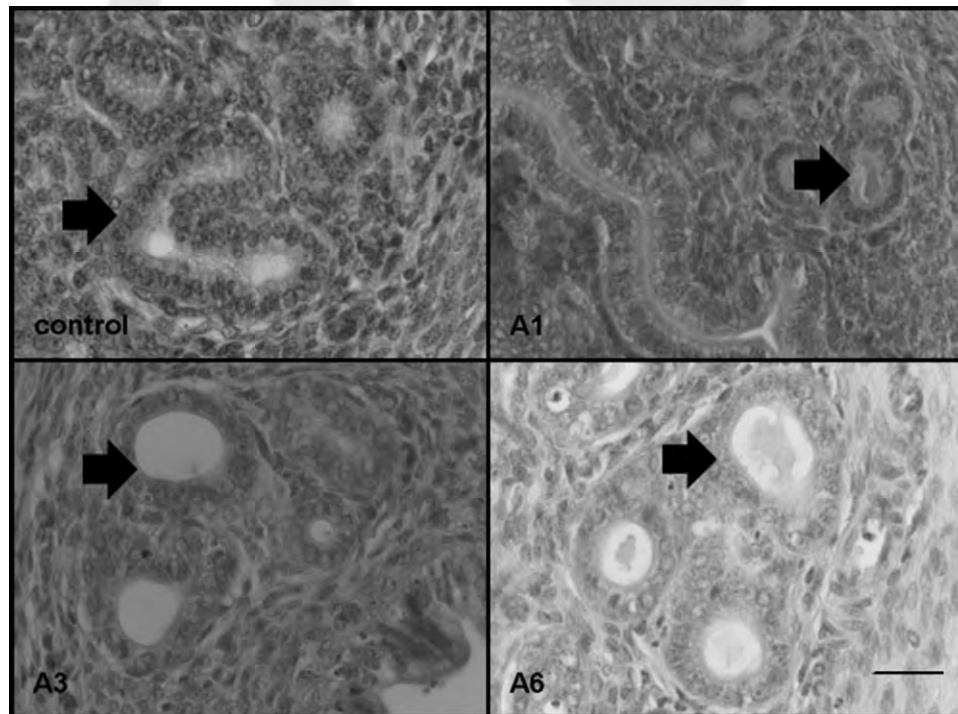


Figure 3. These micrographs show the number and activity of endometrial glands from uteri of mice (control) and also of steroids (**A1**, **A3**, and **A6**) treated mice. The size and dilation of glands as well as of an abundant secretion can be observed (arrows; H–E bar 30 μm).

Mice uterine transformations

After 13 days following LHRH treatment, the uterus specimens of the cycling mice of the control group showed an enlargement of the endometrial thickness, which is characteristic of the progestational phase. An intense secretory activity and an increase of the luminal folding of the endometrium were also observed, both indicating a progestational activity (Figs. 2 and 3). In view of the fact that P was present in the serum, the treatment with steroid A3 did not produce any effect on the endometrium as compared to the control; this fact was also observed with the treatment with A8 (data not shown). However, the diameter and the lumen (L) from uterus of the mice treated with steroid A1 exhibited a noticeable reduction as compared to that of the control group (Fig. 2). The endometrial thickness showed a reverse progesterone induced transformation effect. Furthermore, we also observed a large reduction of the secretory activity and luminal folding in the endometrium of the treated mice (Fig. 3). On the contrary A6 showed a clear enhancement in the diameter of the uterus and the lumen. This is demonstrated by the presence of glands, epithelium, and myometrial increase. The pictures of the histological sections are shown in Figs. 2 and 3.

Mammary glands transformation

The morphological changes in ductal side branching and lobular alveolar development in the mammary glands of mice treated with A1 and A6 compared with control (following LHRH and vehicle-treated) are exhibited in Fig. 4. Furthermore, this figure shows also a similar development of the mammary glands between the control and the A3 treated mice. However, steroid A1 markedly reduced ductal and alveolar epithelial cell proliferation, whereas A6 induced a proliferation of this tissue (Fig. 4) which indicates an increasing effect produced by this compound.

On the other hand the treatment with A8 did not show any activity as compared to the control (following LHRH and vehicle-treated).

Discussion

In this study, we demonstrated the activity of several dehydroepiandrosterone derivatives A1–A6. Steroid A1 having an acetoxy group at C-3, inhibited the enzyme 5 α -reductase present in human prostate [9] and also binds to the PR. On the other hand, A2 to A6 failed to show an inhibitory effect for this enzyme. Steroid A3 binds to the PR with a high affinity showing a RBA value of 148%. On the other hand

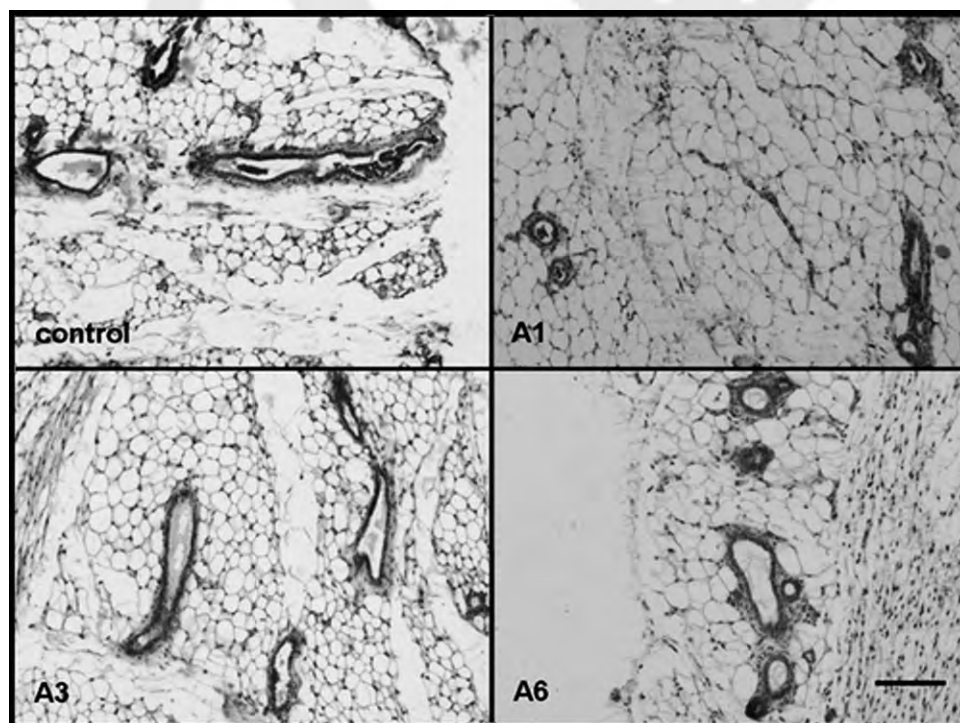


Figure 4. These photomicrographs show the histology of mice mammary glands. There are important differences observed as compared to that of the control group. A1 shows a poor development (antagonist effect), whereas A3 exhibits evidences of normal development (progestogen effect). A6 induced a greater development of the mammary glands (H–E, bar 130 μ m).

A6 which lacks any substituents in the phenyl group of the ester moiety at C-3 binds to the PR with the highest affinity (RBA value of 182%).

The binding assay showed that the concentration of unlabeled promegestone required for the displacement of 50% of the labeled promegestone (0.4 nM) bound to the PR was around 0.4 nM; this fact indicated a high reliability for this assay. The competition studies reported previously by Ref. [10] showed an IC_{50} value for unlabeled progesterone of 4 nM, when they used labeled promegestone in a concentration of 0.4 nM. The difference between Palmer's and our studies is that we could precipitate the PR with ammonium sulfate [11]. This procedure permitted us to obtain a purified fraction of the PR [12] and improve the competition analysis.

The fact that **A1** had demonstrated a pharmacological activity surprised us, since we expected that this ester is easily hydrolyzed by the esterase enzymes present in the mice blood and could form **A8** which results non-active. However **A1** showed *in vivo* activity. This fact could be explained by considering the previously reported results in the classical paper of Hunter and Strachan [13]. These authors informed that the esterase enzymes present in mouse blood hydrolyzed naphthol butyrate but not naphthol acetate. We plan to investigate this question in the near future.

The finding that **A1** and **A6** showed a pharmacological activity, could be advantageous for its use in the control of fertility (menses-induction and abortion) [14, 15], as well as for the treatment of hormone dependent tumors (**A1**) (e.g., breast cancer), the control of cell growth and tissue differentiation (**A1**) (endometriosis) [16, 17].

Previously, it had been shown by several authors [14–21] that endocrine bioassays using the uterine and mammary transformation assays, as parameter for the measurement of progestational activity is a reliable method for the *in vivo* evaluation. In this respect, it is generally accepted a correlation between the RBA values of steroid hormones *in vitro* and their biological activity *in vivo*.

The results of this study indicated that **A1** binds to the PR and inhibited the ovulation in mice stimulated with LHRH, 8 days prior to the treatment with the novel compounds. The activity of the endometrium and mammary glands was also markedly reduced in these mice as compared to that of the control (stimulated with LHRH, 8 days and treated with vehicle). On the other hand **A3** that binds also to the PR did not increase the *in vivo* activity, since it showed a similar effect observed for progesterone in the vehicle-treated cycling mice. These studies suggested that metabolic changes occurring in this molecule were sufficient to avoid its biological activity. However, **A6** which lacks any substituent in the phenyl group of the ester moiety at C-3 and binds to the PR with the highest affinity (RBA value of 182%) induced a larger *in vivo* activity as compared to that of the control

(stimulated with LHRH, 8 days and treated with vehicle) and **A3**. This fact could be explained on the ground that **A6** occupied a larger number of receptors PRA or PRB which are present in the endometrial and mammary glands [3, 22].

The atrophy of the mammary tissue observed in the mice treated with **A1** suggested that this steroid inhibited the enzyme 5α -reductase [9] and as a consequence of this a non- 5α -dihydroprogesterone (5α -P) metabolite was formed. 5α -P binds to a specific receptor present on the plasma membrane of breast cancer cell lines [23]. The physiological role of this metabolite of P in the mammary glands had been previously demonstrated. It had been reported that 5α -P stimulates mitosis and suppresses apoptosis in normal as well as in tumorigenic cells [24, 25]. As a result of both cellular processes, a growth of the mammary tissue is observed.

In addition 5α -P is an active metabolite produced by *copus luteum* during the ovarian cycle and throughout pregnancy in several species [26, 27] and it shows high affinity for the endometrial intracellular PR [28]. These data suggested also that the absence of 5α -P could induce an atrophy of the endometrial glands in a similar way as we have observed in the uterus of the mice treated with **A1**.

On the other hand it had been previously reported that P increased the LH and FSH levels during the normal preovulatory gonadotropin surge and this phenomenon doesn't occur in ovariectomized estrogen-primed rats [29–32]. In addition, the effect of P on gonadotropin release is exerted via the classical intracellular receptor [29, 31]; however, 5α -P metabolite regulates via GABA receptor the LH liberation [29, 31] by the hypothalamus. It is a well known fact that the progesterone antagonists, such as RU486 reduce the LH and FSH levels [19, 29]. The overall data taking together suggested that **A1** inhibited the 5α -reductase enzyme [9] which could convert P to 5α -P and binds to the PR. As a result of this **A1** could have inhibited ovulation in the cycling-treated mice. In the future, additional studies will be carried out to clarify this hypothesis.

Alternatively **A6**, which inhibited very weakly the 5α -reductase enzyme and binds to the PR with the highest affinity of the steroids studied, inhibited also the ovulation and showed a progestogen activity *in vivo* in a similar way as that previously reported for some synthetic steroids [32].

From these studies it could be concluded that small structural modifications in the skeleton of these dehydroepiandrosterone derivatives enhanced or decreased the progestogen activity leading to very selective progestogen compounds.

Experimental

Chemical and radioactive materials^{Q1}

Solvents were laboratory grade or better. Melting points were determined on a Fisher Johns melting point apparatus and are

uncorrected. ^1H NMR and ^{13}C NMR were taken on a Varian Gemini 200 and a VRX-300, respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me_4Si ($\delta = 0$) in CDCl_3 (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet, t, triplet; m, multiplet). High resolution mass spectra were obtained with a Thermo electron DFS (double focus sector) spectrometer. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 200 spectrometer.

The radioligands: (1,2,6,7- ^3H) testosterone [^3H] T specific activity: 95 Ci/mmol and promegestone (17 α -methyl- ^3H) [^3H] R5020 (Synthetic progestin with high affinity for the PR [33]) specific activity: of 87 Ci/mmol; were provided by Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, Ma). R5020, were supplied by Steraloids (Wilton, NH, USA) and Perkin Elmer Life Sciences, Inc., respectively. DL-Dithiothreitol and protease inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Activated charcoal (acid washed with hydrochloric acid) and Dextran (Mr 70 000) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis).

The radiolabeled steroids were purified by TLC using silica gel G plates, which were developed with the same solvent mixture used by the manufacturer.

Finasteride (A7) (Fig. 1) was used as a reference compound and is an inhibitor of 5 α -reductase enzyme. This very popular drug used for the treatment of prostatic hyperplasia was obtained by extraction from Proscar[®] (Merck, Sharp & Dohme). The tablets were crushed, extracted with chloroform and the solvent was eliminated in vacuum; the crude product was purified by silica gel column chromatography using 80% hexane and 20% ethyl acetate as mobile phase. The melting point of the isolated Finasteride (252–254°C) was identical to that reported in the literature.

Animals and tissues

Adult New Zealand white female rabbits weighing 4 kg were used for determine PRs. CD1 female mice (20–25 g) were used for the histological studies. The animals were housed in a room with controlled temperature (22°C) and light-dark periods of 12 h during all experiments. Food (commercially available chow) and water were provided *ad libitum*.

The animals (mice and rabbits) were obtained from the Metropolitan University-Xochimilco of Mexico. The protocols for the experiments carried out in this study were approved by the Institutional Care and Use Committee of the Metropolitan University of Mexico.

Human prostate of a 53 years old man, who died from diabetes and renal insufficiency was used (it was obtained from the Department of Pathology, The General Hospital in Mexico City). The gland was introduced to a solution of NaCl 150 mM and stored at –70°C. Frozen human prostate was thawed on ice and minced with scissors. Unless specified, the following procedures were carried out at 4°C.

Synthesis of the steroidal derivatives

Compounds A2–A6 were obtained from the commercially available dehydroepiandrosterone acetate A1. This compound was treated with a diluted sodium hydroxide solution and the resulting alcohol (A8) was used for the preparation of the above-mentioned esters. The NMR, UV, IR, and mass spectra of the final products confirmed unequivocally the structure of these compounds.

Preparation of 3 β -hydroxyandrost-5-ene-17-one (A8)

To a solution of 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-acetate (A1) (commercially available; 1 g, 4.23 mmol) in methanol (60 mL) was added 20 mL of an (10%) aqueous sodium hydroxide solution. The mixture was stirred under reflux for 1 h. Upon termination of the reaction, 40 mL of methanol was eliminated by distillation and 10 g of ice was added. The precipitated crude product was isolated by filtration and recrystallized from methanol. Yield: 92%, mp 135–137°C. IR (KBr) cm^{-1} : 3425, 2931, 1742, 1646. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 3.5 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 71.5 (C-3), 120.9 (C-6), 141.1 (C-5), 221.1 (C-17). HRMS calc for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$ 288.2089 found 288.9207.

General procedure for the preparation of esters

To a solution of 3 β -hydroxyandrost-5-ene-17-one (1 g, 3 mmol), DCC (2.147 g, 10.41 mmol), DMAP (0.848 g, 6.94 mmol) in chloroform (20 mL) was added the corresponding acid (14 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. Hexane (15 mL) was added and the precipitated dicyclohexyl urea was filtered. The organic phase was washed three times with an 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous sodium bicarbonate, and water. It was dried with anhydrous sodium sulfate and the crude ester was recrystallized from methanol.

17-Oxaandrost-5-ene-3 β -yl-p-bromobenzoate (A2)

Yield 97%, mp 227–228°C. UV (nm): 241 ($\epsilon = 14$ 600). IR (KBr) cm^{-1} : 2947, 1731, 1713, 1269. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.6 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6'), 7.9 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' and H-5')^{Q2}. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 74.6 (C-3), 122.1 (C-6), 127.8 (C-4'), 129.6 (C-1'), 131.1 (C-2' and C-6'), 131.6 (C-3' and C-5'), 139.8 (C-5), 165.2 (ester carbonyl), 220.9 (C-17). HRMS calc for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{BrO}_3$ 470.1477 found 470.9365.

17-Oxaandrost-5-ene-3 β -yl-p-methylbenzoate (A3)

Yield 91%, mp 220–222°C. UV (nm): 251 ($\epsilon = 15$ 200). IR (KBr) cm^{-1} : 2924, 1736, 1701, 1270. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.4 (3H, s, CH_3 aromatic ring), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.1 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-2' and H-6'), 7.9 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-3' and H-5'). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 21.9 (CH_3 aromatic ring) 73.9 (C-3), 121.7 (C-6), 127.8 (C-1'), 128.8 (C-3' and C-5'), 129.4 (C-2' and C-6'), 139.8 (C-5), 143.2 (C-4'), 165.8 (ester carbonyl), 220.9 (C-17). HRMS calc for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_3$ 406.2508 found 406.8359.

17-Oxaandrost-5-ene-3 β -yl-p-cholobenzoate (A4)

Yield 89%, mp 234–235°C. UV (nm): 238 ($\epsilon = 13$ 600). IR (KBr) cm^{-1} : 2947, 1739, 1719, 1270. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6'), 7.9 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3' and H-5'). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.3 (C-19), 74.4 (C-3), 121.9 (C-6), 128.4 (C-3' and C-5'), 128.9 (C-1'), 130.7 (C-2' and C-6'), 138.9 (C-4'), 139.5 (C-5), 164.9 (ester carbonyl), 221.0 (C-17) HRMS calc for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{ClO}_3$ 426.1962 found 426.8758.

17-Oxaantrost-5-ene-3 β -yl-p-nitrobenzoate (A5)

Yield 90%, mp 204–205°C. UV (nm): 240 ($\epsilon = 13\ 200$). IR (KBr) cm^{-1} : 2943, 1736, 1716, 1525 1271. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.9 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 8.2 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-2' and H-6'), 8.3 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-3' and H-5'). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.6 (C-18), 19.4 (C-19), 75.4 (C-3), 122.3 (C-6), 123.4 (C-3' and C-5'), 130.6 (C-2' and C-6'), 136.0 (C-1'), 139.4 (C-5), 150.4 (C-4'), 164.0 (ester carbonyl), 220.9 (C-17). HRMS calc for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{NO}_5$ 437.2202 found 437.9172.

17-Oxaantrost-5-ene-3 β -yl-benzoate (A6)

Yield 86%, mp 261–262°C. UV (nm): 232 ($\epsilon = 16\ 200$). IR (KBr) cm^{-1} : 2948, 1735, 1711, 1272. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.9 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, dd, $J_1 = 7.8$ and $J_2 = 7.6$ Hz, H-3' and H-5'), 7.5 (1H, dd, $J_1 = 7.4$ and $J_2 = 6.8$ Hz, H-4'), 8.0 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-2' and H-6' aromatic ring). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 74.2 (C-3), 121.9 (C-6), 128.2 (C-3' and C-5'), 129.5 (C-2' and C-6'), 130.7 (C-1'), 132.7 (C-4') 139.8 (C-5), 165.9 (ester carbonyl), 221.0 (C-17). HRMS calc for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 392.2351 found 392.7946.

Biological activity of steroids A1–A6

The biological activity of A1–A6 (Fig. 1) was determined *in vivo* as well as *in vitro* experiments using different tissues.

In view of the fact that steroid A1 (17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-acetate) was previously reported as a 5 α -reductase inhibitor [9]. This fact prompted us to synthesize similar steroidal derivatives (A2–A6) and determine their effect on 5 α -reductase activity.

Preparation of human prostatic enzyme

Human prostate was homogenized in two volumes of medium A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5 containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM dithiothreitol Sigma-Aldrich, Inc.) with a tissue homogenizer. Homogenates were centrifuged at $1500 \times g$ for 20 min [34, 35] in a SW 60 Ti rotor (Beckman instruments, Palo Alto, CA). The pellets were separated, suspended in medium A and kept at -70°C . The suspension, 5 mg of protein/mL for human prostates, determined by the Bradford's Method [36] was used as source of 5 α -reductase.

Determination of 5 α -reductase activity

The enzyme 5 α -reductase was assayed as previously described [34, 35]. The reaction mixture for human prostate contained: 1 mM dithiothreitol, sodium phosphate buffer 40 mM, at pH 6.5, 2 mM, NADPH, 2 nM [$1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$]T in a final volume of 1 mL. The reaction in duplicate was started when it was added to the enzymatic fraction (500 μg protein in a volume of 80 μL) incubated at 37°C for 60 min and stopped by mixing with 1 mL of dichloromethane; this was considered as the end point. Incubation without tissue was used as a control. The mixture (incubation medium/dichloromethane) was agitated on a vortex for 1 min and the dichloromethane phase was separated and placed in another tube. This procedure was repeated four more times. The dichloromethane extract was evaporated to dryness under a nitrogen stream and suspended in 50 μL of methanol that was spotted on HPTLC Keiselgel 60 F₂₅₄ plates. T and DHT were used as carriers and were applied in different lanes on both lateral sides of the plates (T, T + DHT, and DHT). The plates were developed in chloroform-acetone = 9:1 and were air-dried; the chromatography

was repeated two more times. The steroid carriers were detected using phosphomolibdic acid reagent (DHT) and T with an UV lamp (254 nm). After the plates were segmented in areas of 1 cm each, they were cut off and the strips soaked in 5 mL of Ultima Gold (Packard). The radioactivity was determined in a scintillation counter (Packard tri-carb 2100 TR). The radioactivity content in the segment corresponding to T and DHT carriers was identified. The radioactivity that has identical chromatographic behavior as the DHT standard was considered as the DHT transformation. Control incubations, chromatography separations, and identifications, were carried out in the same manner as described above except that the tubes did not contain tissue. The DHT transformation yields were calculated from the strips, taking into account the entire radioactivity in the plate.

These experiments were realized by duplicate in two different times.

Determination of 50% of the inhibitory concentration of steroids A2–A6 in human prostatic 5 α -reductase

In order to calculate the IC₅₀ values (the minimum concentration of steroids A2–A6 or finasteride (A7) required to inhibit 5 α -reductase activity by 50%), six series of tubes containing increasing concentrations of these steroids (10^{-11} – 10^{-3} M) were incubated in duplicate, in the presence of: 1 mM of dithiothreitol, 40 mM sodium phosphate buffer pH of 6.5; 2 mM NADPH, 2 nM [$1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$]T and 500 μg of protein from enzymatic fraction in a final volume of 1 mL. The reaction was carried out in duplicate at 37°C for 60 min; 1 mL of dichloromethane was added to stop the reaction. The extraction and the chromatographic procedures were carried out as described above.

After the chromatography, the plates were segmented in areas of 1 cm each, cut off and the strips were soaked in 10 mL of Ultima Gold (Packard). The radioactivity was determined in a scintillation counter (Packard tri-carb 2100 TR). The radioactivity content in the segments corresponding to T and DHT carriers was identified. The fraction that has identical chromatographic behavior as the DHT standard was considered as the DHT transformation in the presence of the tested compounds. Control incubations, chromatography separations, and identifications, were carried out in the same manner as described above except that these tubes did not contain tissue. The DHT transformation yields were calculated from the strips by taking into account the entire radioactivity in the plate. These experiments were realized by duplicate in two different times.

Progesterone receptor binding assays

In this study, we evaluated also the binding of the steroidal derivatives A1–A6 to the PRs; A8 was previously evaluated for its ability to form a complex with the AR [9].

The binding of steroids A1–A6 to the PR was determined using the cytosol from rabbit's uteri.

It is well known that the protein–protein sequence analysis showed that PR has a homology between rabbit and mice 81%, rabbit and humans 88% [8]. These data allowed us to use rabbit uterus cytosol as the source of PR instead of mice uterus cytosol. Rabbit uterus is bigger than that of the mice and this allowed us to obtain a larger amount of cytosol for several PR assays.

Preparation of the cytosol fraction from rabbit's uteri

Uteri were isolated from mature rabbits treated for 7 days with 10 μg /animal/estradiol valerate. At the end of the treatment with

estradiol valerate, the animals were sacrificed with CO₂ and the uteri were removed, blotted, weighed in ice bath, and soaked in cold TEMD. Later, tissues were minced and homogenized in equal volume of TEMD buffer plus protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 μg/mL antipain, 5 mM leupeptin [37]; 40 mM Tris-HCl, 3 mM EDTA, and 20 mM, dithiothreitol 0.5 mM, 10% glycerol at pH 7.4) [38]. The homogenate was centrifuged at 140 000 × g for 2 h at 0°C in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

The cytosolic fraction obtained from the supernatant liquid of the rabbit's uteri homogenate described above, was stored at –70°C. Uteri cytosol proteins (4 mg of protein in 200 μL) were determined by the Bradford method [36].

Determination of the binding of steroids A1–A6 and A8 to the progesterone receptor (PR)

For competitive studies, tubes containing 0.4 nM of [³H] R5020 [20]; plus a range of increasing concentrations (1 × 10^{–10}–4 × 10^{–6} M) of cold P or R5020 or steroids A1–A6 (1 × 10^{–10}–4 × 10^{–6} M) in ethanol or chloroform, or in absence of the competitor were prepared the solvent was eliminated in vacuum.

Aliquots of 200 μL of uteri cytosol (4 mg of protein) were added and incubated in the presence of 300 μL of TEMD buffer containing protease inhibitors in the tubes (duplicate) for 18 h at 4°C as previously described [37, 38]. After incubation saturated ammonium sulfate solution (0.21 mL) in TEMD buffer (30%) was added [12]. The mixture was further incubated for 1 h with occasional shaking for the precipitation of the [³H] R5020-complex. The precipitate was collected by centrifugation at 10 000 × g, 10 min and the pellet was redissolved in 0.5 mL of TEMD and mixed with 0.5 of 0.1% dextran-coated 1% charcoal in TEMD buffer. The mixture was incubated for an additional 10 min at 4°C. The tubes were vortexed and immediately centrifuged at 800 × g for 10 min to pellet the charcoal; aliquots (600 μL) were taken and the radioactive counting was determined. The IC₅₀ of each compound was calculated according to the plots of concentration *versus* percentage of binding. This experiment was carried out in duplicate for two different times.

The RBAs were calculated according to the following equation:

$$\text{RBA} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ of } [^3\text{H}] \text{ labeled reference compound} \times 100}{\text{IC}_{50} \text{ of Inhibitor}}$$

In vivo experiments

In view of the fact that the steroidal derivatives A1, A3, and A6 bind to the PR with high RBAs values, it was of interest to study their *in vivo* activity. With this aim, four groups of four mice/each of CD1 mice, which were synchronized for estrus with 2 μg of LHRH (Sigma; in phosphate-buffered saline containing 0.1% of bovine serum albumin) per mouse were administered subcutaneously at 9:00 h and again at 16:00 h [38]. This specie was chosen for the *in vivo* experiments, since the amount of the evaluated steroids was limited and we wanted to estimate the *in vivo* effect, which could be quite different to that observed in the *in vitro* assays due to its metabolism and pharmacokinetics.

After the treatment with LHRH, the mice were allowed to rest for 8 days before the administration of the test compounds. In the morning of the 9th day following LHRH treatment, the cycling mice of the three different groups were injected with compounds A1, A3, and A6 (0.22 mg/kg in 100 μL of sesame oil,

[38] once daily subcutaneously for 4 consecutive days. One vehicle-treated group injected with 200-μL of sesame oil was maintained as a control. This *in vivo* experiment was carried out in quadruplicate for two different times in order to obtain the standard deviations.

The animals were sacrificed by cervical dislocation in the morning following the last treatment. The ovaries, mammary glands, and the uteri from mice of each group were removed and prepared for histological examination.

Tissues were fixed with buffered formaldehyde (10%) [39] Processed with conventional histological techniques and inserted in Paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO 63103, USA). The ovary from each group of mice was cut sagittally, whereas the uteri and mammary glands were cut transversally; 5 μm of serial sections of the included tissues were obtained. These sections were stained using hematoxylin–eosin [40] and analyzed under a clear field light microscope (Axioskope II, Carl Zeiss) with an image analyzer (Axiovision 4.5, Carl Zeiss). The corpora lutea present in the ovary of each animal/group were counted. Micrographs of the specimen were taken with an AxioCamMrc5 (Carl Zeiss). The results were analyzed using one-way analysis of variance and Dunnett's Method to compare means, with JMP IN 5.1 software.

This study was supported by a Grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project number 54853).

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] D. J. Magelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, [et al.](#)^{Q3}, *Cell* **1995**, 83, 835–839.
- [2] M.-J. Tsai, B. W. O'Malley, *Ann. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 451–486.
- [3] O. M. Conneely, B. Mulac-Jericevic, J. P. Lyndon, *Steroids* **2003**, 68, 771–778.
- [4] M. Marberger, *Nat. Clin. Pract. Urol.* **2006**, 3, 495–503.
- [5] H. J. Lee, C. Chang, *Cell Mol. Life Sci.* **2003**, 60, 1613–1622.
- [6] F.-A. Kang, J. Guan, N. Jain, G. Allan, O. Linton, [et al.](#)^{Q4}, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2531–2534.
- [7] W. D. Russell, J. D. Wilson, *Ann. Rev. Biochem.* **1999**, 463, 25–61.
- [8] S. F. Altschul, J. C. Wootton, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A. A. Schäffer, Y. K. Yu, *FEBS J.* **2005**, 272, 5101–5109.
- [9] Y. Arellano, E. Bratoeff, M. Garrido, J. Soriano, Y. Heuze, M. Cabeza, *Steroids* **2011**, 76, 1241–1246.
- [10] S. Palmer, C. A. Campen, G. F. Allan, P. Rybczynski, D. Haynes-Johnson, A. Hutchins, P. Kraft, M. Kiddoe, M.-T. Lai, E. Lombardi, P. Pedersen, G. Hodgson, D. W. Combs, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, 75, 33–42.
- [11] M. Cabeza, E. Bratoeff, G. Gómez, I. Heuze, A. Rojas, M. Ochoa, M. A. Palomino, C. Revilla, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 111, 232–239.
- [12] R. G. Smith, M. d'Istria, N. T. Van, *Biochemistry* **1981**, 20, 5557–5565.
- [13] R. L. Hunter, D. S. Strachan, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*^{Q5} **1961**, 94, 450–861.

- 1 [14] J. P. Rayanaud, T. Ojasoo, *J. Steroid Biochem.* **1986**, 25, 811–833. 1
2 [15] A. Ulman, G. Teutsch, D. Philibertm, *Sci. Am.* **1990**, 262, 38– 2
3 42. 3
4 [16] A. A. Murphy, P. Z. Castellanno, *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 4
5 **1994**, 6, 269–278. 5
6 [17] H. Honda, F. F. Barrueto, J. Gogusev, D. D. Im, P. J. Morin, 6
7 *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2008**, 6, 1–13. 7
8 [18] A. Philips, K. Demarest, D. W. Hahn, F. Wong, J. L. Mc Guire, 8
9 *Contraception* **1990**, 41, 399–410. 9
10 [19] J. F. H. M. van Uem, J. G. Hsiu, C. F. Chillik, *Contraception* **1989**, 10
11 40, 171–184. 11
12 [20] U. Fuhrmann, H. Hess-Stumpp, A. Cleve, G. Neef, W. 12
13 Schweede, J. Hoffmann, K. H. Fritzemeter, K. J. Chwalisz, 13
14 *Med. Chem.* **2000**, 43, 5010–5016. 14
15 [21] D. Philibert, M. Hardy, M. Gaillard-Moguilewski, F. Nique, C. 15
16 Tournemine, L. J. Nédélec, *Steroid Biochem.* **1989**, 34, 413–417. 16
17 [22] B. Mulac-Jericevic, R. A. Mullinax, F. J. De Mayo, J. P. Lyndon, 17
18 O. M. Connely, *Science* **2000**, 289, 1751–1754. 18
19 [23] B. D. Cuevas, A. N. Abell, G. L. Johnson, *Oncogene* **2007**, 26, 19
20 3159–3171. 20
21 [24] J. P. Weibe, D. Muzia, J. Hu, D. Szwajcer, S. A. Hill, J. L. 21
22 Seachrist, *Cancer Res.* **2000**, 69, 936–943. 22
23 [25] J. P. Weibe, M. Beausoleil, G. Zhang, V. Cialacu, *J. Steroid* 23
24 *Biochem. Mol. Biol.* **2010**, 118, 125–132. 24
25 [26] W. R. Allen, *Reprod. Domest. Anim.* **2011**, 36, 121–131. 25
26 [27] J. K. Hodges, M. Heistermann, A. Beard, R. J. van Aarde, *Biol.* 26
27 *Reprod.* **1997**, 56, 640–646. 27
- [28] M. Ford, MSc Thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa **2007**. 1
2
[29] D. W. Brann, J. L. O’Conner, M. F. Wade, P. L. Zamorano, 3
V. B. Mahesh, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1993**, 46, 427– 4
437. 5
[30] V. B. Mahesh, T. G. Muldoon, *J. Steroid Biochem.* **1997**, 27, 665– 6
675. 7
[31] R. Attardi, R. Scott, D. Pfaff, G. Fink, *J. Neuroendocrinol.* **2007**, 8
19, 988–1000. 9
[32] E. Deckers, W. G. E. J. Schoonen, H. J. Kloosterboer, *J. Steroid* 10
Biochem. Mol. Biol. **2000**, 74, 83–92. 11
[33] F. Z. Stanczyk, *Endocr. Metab. Disord.* **2000**, 23, 211–224. 12
[34] J. Hirosumi, O. Nakayama, T. Fagan, K. Sawada, N. Chida, M. 13
Inami, S. Takahashi, H. Kojo, Y. Notsu, M. J. A. Okuhara, 14
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **1995**, 52, 357–363. 15
[35] E. Bratoeff, M. Cabeza, V. Pérez-Ornelas, S. Recillas, I. Heuze, 16
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. **2008**, 111, 275–281. 17
[36] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1986**, 72, 248–254. 18
[37] W. J. Hendry, B. J. Danzo, *J. Steroid Biochem.* **1985**, 23, 883– 19
893. 20
[38] M. Cabeza, M. García-Lorenzana, M. Garcés, I. Heuze, N. 21
Terán, E. Bratoeff, *Steroids* **2010**, 75, 101–108. 22
[39] E. B. Prophet, B. Mills, J. B. Arrington, L. H. Sobin, *AFIP* 23
Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of 24
Pathology, Washington DC **1992**. 25
[40] J. K. Presnell, M. P. Schreiberman, *Animal Techniques*, Baltimore, 26
The Johns Hopkins University Press, Baltimore **1997**. 27

Q1: Author: Please check the hierarchy of all the section heading.

Q2: Author: Please check the change made.

Q3: Author: Please provide the list of all the authors.

Q4: Author: Please provide the list of all the authors.

Q5: Author: Please check the page number.

Please correct your galley proofs and return them within 48h of receipt.

Note: The editors reserve the right to publish your article without your corrections if the proofs do not arrive in time.

Important

Please note that, due to the size constraints of emailed attachments, the attached proofs are low resolution; however high resolution versions will be used for printing.

Check the enclosed galley proofs very carefully, paying particular attention to the formulae, figures, numerical values, and tabulated data. An author query (AQ) in the border indicates unclear or missing information that requires your attention. For the complete query, please consult the list following the proofs in this file. Note that the author is liable for damages arising from incorrect statements, including misprints.

Your corrections should be provided as a list (*e.g.* in Word format), including the page number, column (left or right) and line at which the correction occurs. In addition, we ask that you provide a scanned pdf of the proof with corrections, to reduce the risk of errors.

Please return your corrections by email to the following address:

E-Mail: wileyvch.j@thomsondigital.com

Please limit corrections to printing errors; costs incurred for any further changes or additions will be charged to the author, unless such changes have been accepted by the editor.

Reprints may be ordered by filling out the accompanying form, which should be returned to the Editorial Office.

The most important correction marks

Typesetting error	Correction mark in the text	Correction mark in the right-hand margin
Wrong letter, wrong word	Metal ty ke was the try to	p H key
Missing letter(s)	the i nt ention of print er ,	nr T ting
Missing word	and the assembly into the printed page	T its L the
Wrong word division, missing punctuation mark	was the only step a print er could take until recently	T nt y ((2x)) b,
Defect letter, soiled text (in case of illegibility to be treated as a wrong letter or word)	to w ards obtaining a surface from <u>which</u> impressions can	O O
Letters/words to be deleted	be made d . Printing of from	y H y
Letters in wrong sequence	movab le type st at ed	T le U ar
Two words in wrong sequence	1440 <u>around</u> Since	L U
Several words in wrong sequence	in this ⁵ of ⁶ printing ⁷ account ⁸ type ⁹ found ^{ing} place ¹ has ² no	1-9
Wrong space, missing space	we ma ¹ ² y dispense with an ³ ⁴ account of ⁵ how type	C ((2x)) L
Space between words too large or too small	comes ¹ into being and start ² ³ with ⁴ the type itself.	P ((2x)) A
Characters not on a straight line	<u>Initially we may concentrate</u>	=====
Space between lines too narrow	on a single process - letterpress - because metal type was once the	<-----> <----->
Space between lines too wide	only printing surface available to that process.	----->
Wrong typeface	A <u>historical</u> view of printing would <u>have</u> to take into account a period in <u>which</u> type casting	~~~~~ ((italics)) ----- ((normal typeface))
Start new paragraph	and type-setting remained unchanged. <u>But</u> type has	w
Undesired new paragraph	<u>continuously</u> consolidated and extended	J
Undesired indentation	the domain of the printed word. The most important changes came with:	T
Missing indentation	- automatic composing,	E
Blockade	¹ H-NMR (■-MHz)	/ 300

Please complete
this form and return
it with your proofs.

Manuscript No. _____

Reprints/Issues

You have the opportunity to order reprints, issues or a PDF for an unlimited number of hardcopies at the quoted rates.

Reprints are usually popular and are available at the rates given on the reverse side only if ordered now. After publication the prices of reprints are substantially higher. **For overseas orders please note that you will receive your issues/reprints by airmail. An appropriate surcharge will be levied to cover the higher postal rates. If you are interested in receiving them by surface mail please sign below.**

Please send me and bill me for

reprints by surface mail
 FedEx
(FedEx. No.: _____)

Please send me and bill me for

entire issues by surface mail
 FedEx
(FedEx. No.: _____)

Mail reprints and/or issues to (no P.O. Boxes)

Send bill to

► To prevent delays with the processing,
please provide us with the VAT
number with this order.

For Institutions/Companies in the EU only:

VAT number _____

Purchase Order No.:

(This number MUST be given)

VISA, MasterCard and AMERICAN EXPRESS.
Please use this link (Credit Card Token Generator) to
create a secure Credit Card Token and include this
number in the form instead of the credit card data.

https://www.wiley-vch.de/editorial_production/index.php

CREDIT CARD TOKEN NUMBER:

PDF

Please send me and bill me for

a PDF file (high resolution).

E-mail address

Please note: It is not permitted to present the PDF file on the web.

Mail bill to _____

Special Offer: If you order 200 or more
reprints you will get a PDF file for half price
_____ reprints and a PDF file

Subscriptions

As an author in *Archiv der Pharmazie* you obviously appreciate the quality of the journal and value it as a medium for the distribution of your results. We thank you for this support. With the aim of ever increasing the dissemination of information we have maintained low (personal) subscription rates for *Archiv der Pharmazie*. Please take advantage of these, ensuring yourself a regular supply of top information and helping us to keep subscription rates down and the accessibility of the journal up. Information about the low subscription rates "Personal/First time rate (personal)" can be obtained by your bookseller or directly at the publisher.

Please send me and bill me for

- the remaining issues of this volume
- the complete current volume
- next year's volume
- a library subscription

Mail bill and journal to _____

Signature _____

Date _____

Price List for Reprints (2013)

The prices listed below are valid only for orders received in the course of 2013 and before the proofs pass for press. Minimum order is 50 copies. Delivery time will be approximately 3 weeks after the date of publication.

If more than 500 copies are ordered, special prices are available upon request. **Single issues are available to authors at a reduced price.** The prices include mailing and handling charges (with the exception of the additional costs incurred for airmail delivery and courier services). The prices are exclusive of VAT. **Reprints, posters, and issues for overseas orders are shipped by airmail (25.00 Euro surcharge).** If you would like to receive them by surface mail please indicate this on the accompanying order form (postage for shipping posters within Europe: 15.00 Euro). If you would like to use a courier service please indicate this on the order form. The cost for the courier service is 75.00 Euro unless you provide your FedEx number, in which case you will be charged the appropriate amount based on your contract with FedEx.

Reprints	Price for orders (in Euro)					
	50 copies	100 copies	150 copies	200 copies	300 copies	500 copies
Size (pages)						
1 – 4	345.–	395.–	425.–	445.–	548.–	752.–
5 – 8	490.–	573.–	608.–	636.–	784.–	1077.–
9 – 12	640.–	739.–	786.–	824.–	1016.–	1396.–
13 – 16	780.–	900.–	958.–	1004.–	1237.–	1701.–
17 – 20	930.–	1070.–	1138.–	1196.–	1489.–	2022.–
for every additional 4 pages	147.–	169.–	175.–	188.–	231.–	315.–
Issues	1 copy: 20 Euro		PDF (high resolution)		330 Euro	
Cover Posters	<ul style="list-style-type: none"> • DIN A2 (42 x 60 cm/ 17 x 24in): 29 Euro • DIN A1 (60 x 84 cm/ 24 x 33in): 39 Euro 					

★Special Offer★

If you order 200 or more reprints you will get a **PDF (high resolution)** for half-price.

Archiv der Pharmazie

Annual subscription rates 2013

	Institutional*
Europe	Euro 1951.00/1696.00
Switzerland	SFr. 3126.00/2718.00
All other areas	US\$ 2504.00/2177.00

*Print and electronic/print only or electronic only

Postage and handling charges included.

All Wiley-VCH prices are exclusive of VAT. Prices are subject to change.



New steroidal lactones as 5 α -reductase inhibitors and antagonists for the androgen receptor

Mariana Garrido^a, Eugene Bratoeff^a, Dulce Bonilla^b, Juan Soriano^c, Yvonne Heuze^b, Marisa Cabeza^{b,*}

^a Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, National University of Mexico, Mexico, D.F., Mexico

^b Department of Biological Systems and Animal Production Metropolitan University-Xochimilco, Mexico, D.F., Mexico

^c Department of Pathology of the General Hospital of Mexico (SS), Mexico, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2011

Received in revised form 1 July 2011

Accepted 3 July 2011

Keywords:

Human prostate

5 α -Reductase inhibitors

Androgen receptor

Steroidal lactones

Pharmacological activity and antiandrogens

ABSTRACT

This study reports the synthesis of several new steroidal lactones: 5 α ,6 β -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-3'-oxapentanoate (**11**), 5 α ,6 β -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-propanoate (**12**), 5 α ,6 β -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-butanoate (**13**), 5 α ,6 β -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-pentanoate (**14**), 5 α ,6 β -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-hexanoate (**15**), 17 α -oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-3'-oxapentanoate (**16**), 17 α -oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-propanoate (**17**), 17 α -oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-butanoate (**18**), 17 α -oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-pentanoate (**19**) and 17 α -oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-hexanoate (**20**) with a therapeutic potential as antiandrogens.

The biological effect of these steroids was demonstrated in *in vivo* as well as *in vitro* experiments. In the *in vivo* experiments, we measured the activity of ten new steroidal derivatives on the weight of the prostate and seminal vesicle glands of gonadectomized hamsters treated with testosterone. For the *in vitro* studies, we determined the IC₅₀ values by measuring the concentration of the steroidal derivatives that inhibits 50% of the activity of the 5 α -reductase enzyme present in human prostate and also its binding capacity to the androgen receptors (AR) obtained from rat's prostate cytosol. The results from these experiments indicated that compounds **11–20**, significantly decreased the weight of the prostate and seminal vesicles as compared to testosterone treated animals; this reduction of the weight of these glands was comparable to that produced by Finasteride. On the other hand, compounds **11–20** inhibited the enzyme 5 α -reductase, with compounds **14–19** (IC₅₀ values of 4.2 \pm 0.95, 0.025 \pm 0.003, 1.2 \pm 0.45, 1.2 \pm 0.1, 0.028 \pm 0.003, and 0.069 \pm 0.005 nM, respectively) showing the highest inhibitory activity. The results from the *in vitro* experiments indicated that only **15–17** bind to the AR.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The 5 α -reductase enzyme (EC 1.3.99.5) converts testosterone (T) to 5 α -dihydrotestosterone (DHT) in androgen dependent tissues. The activity of this enzyme in androgen dependent tissues has long been known. Two types of 5 α -reductase (5 α -R) enzymes had been identified: 1 and 2, each encoding for different genes, which have been characterized in several species [1,2]. 5 α -R type 2 isozyme plays a major role in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia as it is predominantly expressed in this tissue. However, some evidence indicates that type 1 enzyme is expressed in prostate epithelial cells while the type 2 is mainly located in the

stromal compartment [3,4]. 5 α -Reductase type 1 is also located in the liver and skin and acts in a neutral or basic medium, whereas type 2 is active in acidic pH [1,2].

The primary structures of the rat and human 5 α -reductase isozymes were determined from their respective cDNAs [1]. They are hydrophobic proteins composed of 254–260 aminoacids. There are no consensus sequences for N-linked glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) or for O-linked glycosylation (Ser/Thr/Pro-rich regions). The hydrophobic aminoacids Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Val are distributed throughout both type 1 and 2. 5 α -R enzymes which characterized these isozymes as intrinsic membrane proteins deeply embedded into the lipid bilayer [1].

On the other hand, androgen action is mediated by the androgen receptors (AR), a ligand-dependent transcriptional factor. DHT formed from T in target cells interacts more efficiently with the AR than T. The binding of these hydrophobic ligands induces the AR to assume a configuration that leads to transcription activation (or inhibition) and allows transmission of extracellular signals into

* Corresponding author at: Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, México, D.F., C.P. 04960, Mexico. Tel.: +52 55 5483 72 60; fax: +52 55 5483 72 60.

E-mail address: marisa@correo.xoc.uam.mx (M. Cabeza).

intracellular responses by targeting promote response elements and recruiting cofactors [5].

It had previously been reported that the suppression of androgen action by 5α -reductase inhibitors, as well as with antagonists of AR are the logical treatment for 5α -reductase activity and AR disorders such: prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, acne and male pattern baldness [6,7], which are androgen dependent illnesses.

Compounds incorporating a lactone ring are known to interact covalently with biological nucleophiles, and some have been reported to inhibit enzymes that contain in their molecule a cysteine, lysine or serine amino acid or threonine-based enzymes [8].

On the basis of the above mentioned considerations, we synthesized the following dehydroepiandrosterone lactone derivatives:

$5\alpha,6\beta$ -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostan-3 β -yl-3'-oxapentanoate (**11**), $5\alpha,6\beta$ -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostan-3 β -yl-propanoate (**12**), $5\alpha,6\beta$ -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostan-3 β -yl-butanoate (**13**), $5\alpha,6\beta$ -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostan-3 β -yl-pentanoate (**14**), $5\alpha,6\beta$ -dibromo-17 α -oxa-D-homoandrostan-3 β -yl-hexanoate (**15**), 17 α -oxa-D-homoandrostan-5-en-17-one-3 β -yl-3'-oxapentanoate (**16**), 17 α -oxa-D-homoandrostan-5-en-17-one-3 β -yl-propanoate (**17**), 17 α -oxa-D-homoandrostan-5-en-17-one-3 β -yl-butanoate (**18**), 17 α -oxa-D-homoandrostan-5-en-17-one-3 β -yl-pentanoate (**19**) and 17 α -oxa-D-homoandrostan-5-en-17-one-3 β -yl-hexanoate (**20**). The effect of these steroidal lactones was evaluated *in vivo* as well as *in vitro*, as potential therapeutic antiandrogens.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and radioactive materials

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

(1,2,6,7- ^3H) testosterone [^3H] T specific activity: 95 Ci/mmol and Mibolerone (17 α -methyl- ^3H) [^3H] MIB (Fig. 2) specific activity 70–87 Ci/mmol were provided by a Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA). Radioinert T, 5α -dihydrotestosterone and MIB were supplied by Steraloids (Wilton, NH, U.S.A.). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) provided DCC, DMAP, MMPP and NADPH; Finasteride (Fig. 2) was obtained by extraction from Proscar[®] (Merck, Sharp & Dohme). The tablets were crushed, extracted with chloroform and the solvent was eliminated in vacuum; the crude product was purified by silica gel column chromatography. The melting point of the isolated Finasteride (252–254 °C) was identical to that reported in the literature.

2.2. Synthesis of the steroidal derivatives (Fig. 1)

2.2.1. General procedure for the preparation of esters

To a solution of steroid (1 g, 3 mmol), DMAP (0.848 g, 6.94 mmol), DCC (2.147 g, 10.41 mmol) in chloroform (15 mL) was added the corresponding acid (14 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. Hexane (15 mL) was added and the mixture was filtered to remove the precipitated dicyclohexylurea. The organic phase was washed three times with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous bicarbonate and water. The crude ester was recrystallized from methanol.

2.2.1.1. 17-Oxaandrost-5-ene-3 β -yl-3'-oxapentanoate (1). Yield: 96.1% of pure product, mp 143–145 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2954, 1758 and 1740. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (3H, t, H-5'), 3.6 (2H, q, H-4'), 4.1 (2H, s, H-2'), 4.7 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 14.9 (C-5'), 19.5 (C-19), 67.1 (C-4'), 68.2 (C-2'), 74.3 (C-3), 122.1 (C-6), 140.0 (C-5), 168.9 (ester carbonyl), 220.9 (C-17). FAB-MS calc for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 375.3287 (M+H) found 375.5436.

2.2.1.2. 17-Oxaandrost-5-ene-3 β -yl-propanoate (2). Yield: 90.4% of pure product, mp 150–153 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2954, 1739 and 1666. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.1 (3H, t, H-3'), 2.3 (2H, q, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 9.1 (C-3'), 13.7 (C-18), 19.5 (C-19), 31.4 (C-2'), 73.5 (C-3), 121.8 (C-6), 139.9 (C-5), 173.9 (ester carbonyl), 221.0 (C-17). FAB-MS calc for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 345.4378 (M+H) found 345.4583.

2.2.1.3. 17-Oxaandrost-5-ene-3 β -yl-butanoate (3). Yield: 93.0% of pure product, mp 160–162 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2965, 1742 and 1730. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, t, H-4'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.6 (C-18), 13.7 (C-4'), 18.5 (C-3'), 19.5 (C-19), 36.2 (C-2'), 73.4 (C-3), 121.8 (C-6), 139.9 (C-5), 173.1 (ester carbonyl), 221.0 (C-17). FAB-MS calc for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_3$ 359.7623 (M+H) found 359.6532.

2.2.1.4. 17-Oxaandrost-5-ene-3 β -yl-pentanoate (4). Yield: 96.7% of pure product, mp 101–103 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2946, 1735 and 1725. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, t, H-5'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-4'), 1.5 (2H, m, H-3'), 2.2 (2H, t, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 13.8 (C-5'), 19.4 (C-19), 23.8 (C-4'), 31.4 (C-3'), 34.7 (C-2'), 73.2 (C-3), 122.0 (C-6), 139.5 (C-5), 173.3 (ester carbonyl), 221.0 (C-17). FAB-MS calc for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_3$ 373.5408 (M+H) found 373.5397.

2.2.1.5. 17-Oxaandrost-5-ene-3 β -yl-hexanoate (5). Yield: 92.7% of pure product, mp 72–74 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2953, 1736 and 1736. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, t, H-6'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-5'), 1.5 (2H, m, H-4'), 1.6 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-6'), 19.4 (C-19), 22.3 (C-5'), 24.7 (C-4'), 31.5 (C-3'), 34.6 (C-2'), 73.3 (C-3), 121.8 (C-6), 138.9 (C-5), 173.1 (ester carbonyl), 220.2 (C-17). FAB-MS calc for $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_3$ 387.3478 (M+H) found 387.3598.

2.2.2. General procedure for the preparation of $5\alpha,6\beta$ -dibromo derivatives

A solution of the corresponding ester (2.9 mmol) in dichloromethane was cooled to 0–5 °C, a solution (2.4 mL) of bromine in carbon tetrachloride (bromine 0.9 mL and carbon tetrachloride 9.1 mL) was slowly added. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. Upon termination of the reaction, 10% aqueous sodium thiosulfate was added. The reaction mixture was extracted three times with dichloromethane. It was dried with sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The crude product was recrystallized from methanol.

2.2.2.1. $5\alpha,6\beta$ -Dibromo-17-oxaandrostane-3 β -yl-3'-oxapentanoate (6). Yield: 93.1% of pure product, mp 123–125 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2947, 1736 and 1727. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (3H, t, H-5'), 3.6 (2H, q, H-4'), 4.1 (2H, s, H-2'), 4.9 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 5.6 (1H, m, H-3). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-5'), 19.4 (C-19), 55.2 (C-6), 67.2 (C-4'), 68.2

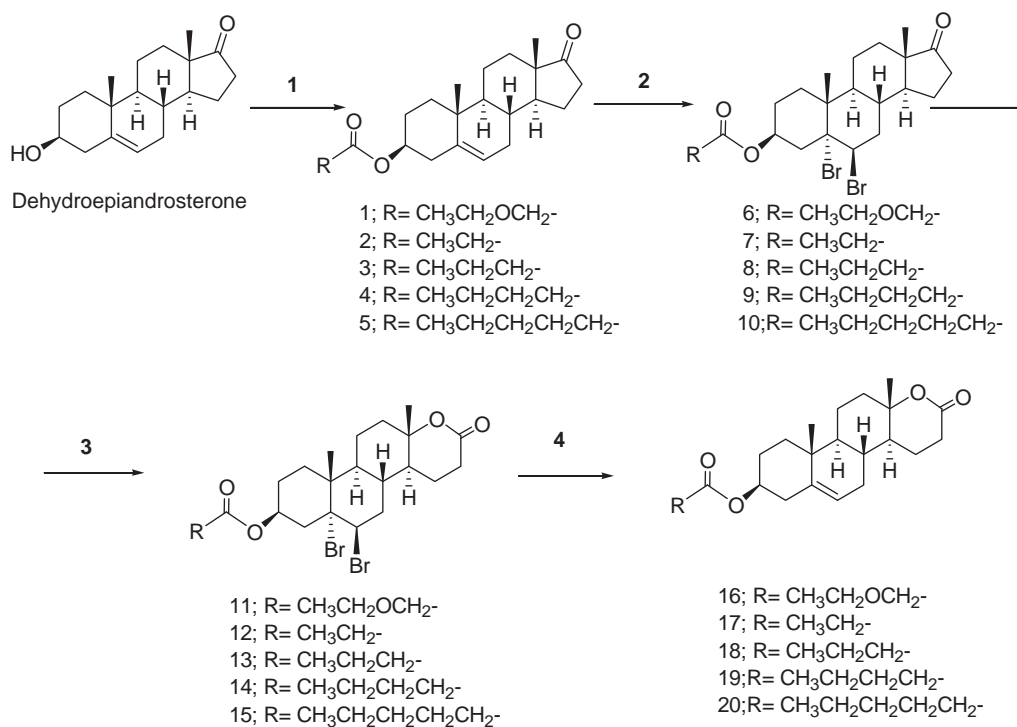


Fig. 1. Synthesis of novel steroidal lactones.

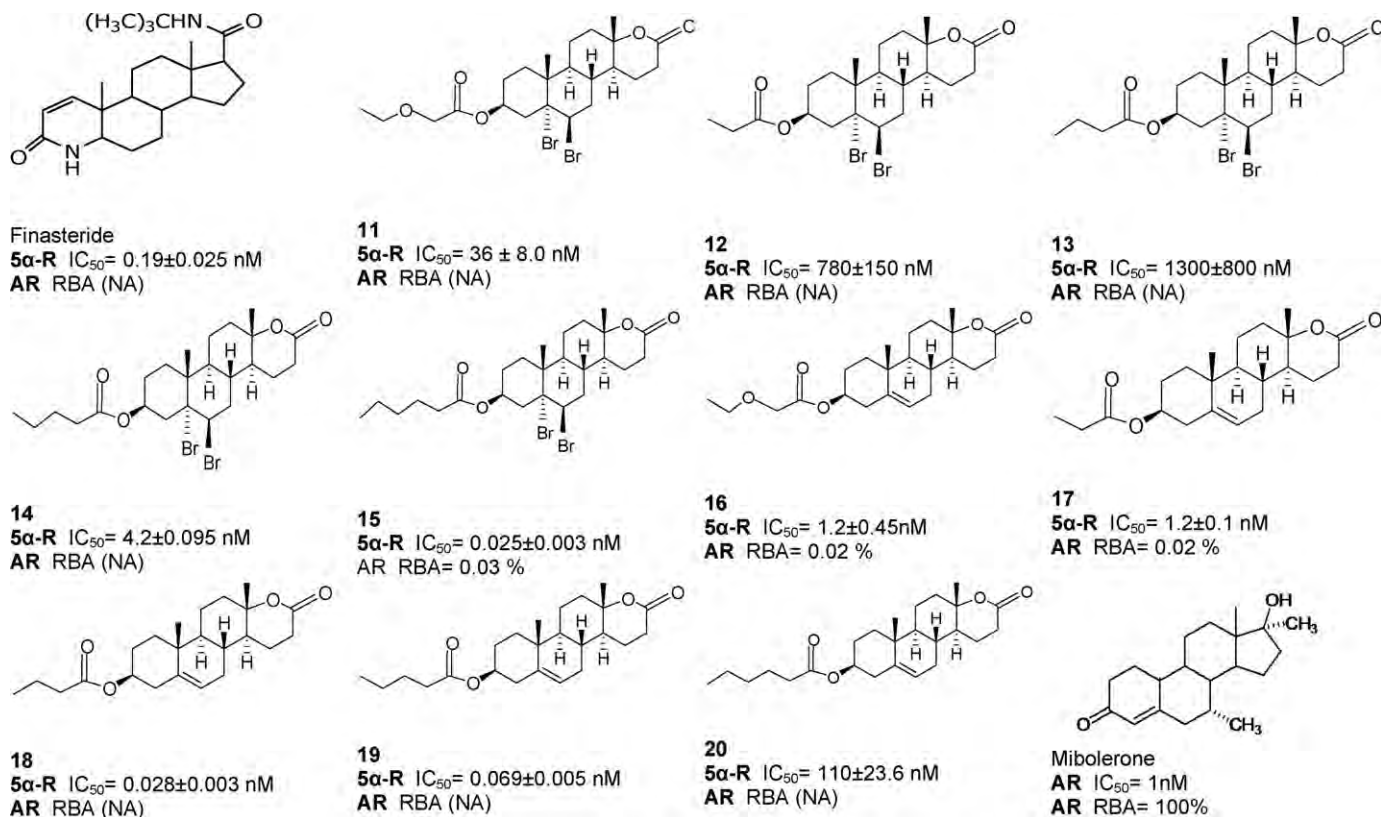


Fig. 2. Steroidal structures and effect of different lactones on the activity of 5 α -reductase enzyme (5 α -R): 13–22. The IC₅₀ values indicate the required concentration of the novel steroids for the inhibition of 50% of the activity of 5 α -R. This figure shows also the relative binding affinity (RBA) of these derivatives to the androgen receptor (AR). NA, non active compound.

(C-2'), 72.5 (C-3), 87.1 (C-5), 170.2 (ester carbonyl), 220.1 (C-17). FAB-MS calc for C₂₃H₃₄Br₂O₄ 533.8734 (M+H) found 533.6594.

2.2.2.2. 5 α ,6 β -Dibromo-17-oxaandrostane-3 β -yl-propanoate (7). Yield: 94.2% of pure product, mp 96–98 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2947, 1731 and 1766. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.1 (3H, t, H-3'), 2.3 (2H, q, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.4 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 9.1 (C-3'), 13.6 (C-18), 19.5 (C-19), 27.7 (C-2'), 55.3 (C-6), 71.6 (C-3), 87.1 (C-5), 173.8 (ester carbonyl), 220.3 (C-17). FAB-MS calc for C₂₂H₃₂Br₂O₃ 503.6578 (M+H) 503.4398.

2.2.2.3. 5 α ,6 β -Dibromo-17-oxaandrostane-3 β -yl-butanoate (8). Yield: 88.7% of pure product, mp 128–130 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2946, 1726 and 1665. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-4'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.6 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-4'), 18.5 (C-3'), 19.5 (C-19), 36.4 (C-2'), 55.3 (C-6), 71.5 (C-3), 87.4 (C-5), 172.9 (ester carbonyl), 220.1 (C-17). FAB-MS calc for C₂₃H₃₄Br₂O₃ 517.5428 (M+H) 517.5347.

2.2.2.4. 5 α ,6 β -Dibromo-17-oxaandrostane-3 β -yl-pentanoate (9). Yield: 91.6% of pure product, mp 126–128 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2935, 1739 and 1731. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-5'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-4'), 1.5 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.8 (C-5'), 19.4 (C-19), 21.5 (C-4'), 31.4 (C-3'), 34.8 (C-2'), 55.3 (C-6), 71.5 (C-3), 87.4 (C-5), 173.1 (ester carbonyl), 220.1 (C-17). FAB-MS calc for C₂₄H₃₆Br₂O₃ 533.3488 (M+H) 533.3375.

2.2.2.5. 5 α ,6 β -Dibromo-17-oxaandrostane-3 β -yl-hexanoate (10). Yield: 91.8% of pure product, mp 133–135 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2954, 1736 and 1731. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-6'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-5'), 1.5 (2H, m, H-4'), 1.6 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-6'), 19.4 (C-19), 22.3 (C-5'), 24.7 (C-4'), 31.5 (C-3'), 34.5 (C-2'), 55.3 (C-6), 71.5 (C-3), 87.4 (C-5), 173.2 (ester carbonyl), 220.2 (C-17). FAB-MS calc for C₂₅H₃₈Br₂O₃ 547.3754 (M+H) found 547.3781.

2.2.3. General procedure for the preparation of 3 β -acyloxy-5 α ,6 β -dibromo-D-homoandrostane lactones

To a solution of the corresponding 5 α ,6 β -dibromo derivative (0.38 mmol) in dichloromethane-methanol (1:2, 50 mL) was added monoperoxyphthalic acid magnesium salt hexahydrate (MMPP) (6.5 mmol) and 1 mL of water. The mixture was stirred at room temperature for 18 h. Upon termination of the reaction, the reaction mixture was washed three times with 5% aqueous bicarbonate and water. It was dried with sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The compound was purified by silica gel column chromatography; the corresponding lactone was eluted with hexane/Ethyl acetate (90:10).

2.2.3.1. 5 α ,6 β -Dibromo-17a-oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-3'-oxapentanoate (11). Yield: 93.0% of pure product, mp 157–159 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2943 and 1732. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (3H, t, H-5'), 3.6 (2H, q, H-4'), 4.1 (2H, s, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.6 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 14.5 (C-5'), 19.4 (C-19), 54.8 (C-6), 67.2 (C-4'), 68.1 (C-2'), 72.9 (C-3), 82.7 (C-5), 169.9 (carbonyl of the 3 β ester function), 171.0 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₃H₃₄Br₂O₅ 551.3211 (M+H) found 551.3199.

2.2.3.2. 5 α ,6 β -Dibromo-17a-oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-propanoate (12). Yield: 92.0% of pure product, mp 147–149 °C. IR

(KBr) cm⁻¹: 2943 and 1741. ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.1 (3H, t, H-3'), 2.3 (2H, q, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 9.1 (C-3'), 13.7 (C-18), 19.4 (C-19), 27.8 (C-2'), 54.9 (C-6), 71.5 (C-3), 82.8 (C-5), 171.0 (carbonyl of the 3 β ester function), 173.8 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₂H₃₂Br₂O₄ 521.2951 (M+H) 521.2907

2.2.3.3. 5 α ,6 β -Dibromo-17a-oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-butanoate (13). Yield: 89.5% of pure product, mp 129–131 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2952 and 1729. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-4'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.7 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-4'), 18.5 (C-3'), 19.5 (C-19), 38.9 (C-2'), 54.9 (C-6), 71.4 (C-3), 86.4 (C-5), 171.0 (carbonyl of the 3 β ester function), 172.9 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₃H₃₄Br₂O₄ 535.3217 (M+H) 535.3159.

2.2.3.4. 5 α ,6 β -Dibromo-17a-oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-pentanoate (14). Yield: 88.6% of pure product, mp 143–145 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2941 and 1730. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-5'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-4'), 1.5 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.8 (C-5'), 19.4 (C-19), 22.3 (C-4'), 26.1 (C-3'), 33.5 (C-2'), 54.9 (C-6), 71.4 (C-3), 86.4 (C-5), 171.0 (carbonyl of the 3 β ester function), 173.1 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₄H₃₆Br₂O₄ 549.3482 (M+H) 549.3378.

2.2.3.5. 5 α ,6 β -Dibromo-17a-oxa-D-homoandrostane-3 β -yl-hexanoate (15). Yield: 87.0% of pure product, mp 137–139 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2950 and 1732. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-6'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-5'), 1.5 (2H, m, H-4'), 1.6 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.9 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-6'), 19.4 (C-19), 22.3 (C-5'), 24.6 (C-4'), 31.6 (C-3'), 34.5 (C-2'), 54.9 (C-6), 71.4 (C-3), 86.4 (C-5), 173.1 (carbonyl of the 3 β ester function), 173.2 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₅H₃₈Br₂O₄ 563.3748 (M+H) found 563.3696.

2.2.4. General procedure for the preparation of the final lactone derivatives

To a solution of the corresponding 5 α ,6 β -dibromo-17a-oxa derivative (0.55 mmol) in 5 mL of tetrahydrofuran was added sodium iodide (3.5 mmol). The mixture was refluxed for 3 h; it was cooled off to room temperature, 20% aqueous sodium thiosulfate was added. The reaction mixture was extracted three times with dichloromethane. It was dried with sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The crude product was purified by column chromatography (hexane/ethyl acetate, 90:10).

2.2.4.1. 17a-Oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-3'-oxapentanoate (16). Yield: 92.0% of pure product, mp 124–126 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2933 and 1723. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (3H, t, H-5'), 3.6 (2H, q, H-4'), 4.1 (2H, s, H-2'), 4.7 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 14.9 (C-5'), 67.1 (C-4'), 68.2 (C-2'), 74.3 (C-3), 122.0 (C-6), 141.0 (C-5), 170.1 (carbonyl of the 3 β ester function), 171.0 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₃H₃₄O₅ 391.5131 (M+H) found 391.5054.

2.2.4.2. 17a-Oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-propanoate (17). Yield: 93.0% of pure product, mp 170–172 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2950 and 1731. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.1 (3H, t, H-3'), 2.3 (2H, q, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 9.1 (C-3'), 13.7

(C-18), 19.4 (C-19), 27.9 (C-2'), 73.3 (C-3), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.4 (carbonyl of the 3 β ester function), 173.9 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₂H₃₂O₄ 361.4871 (M+H) 361.4807.

2.2.4.3. 17 α -Oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-butanoate (18). Yield: 92.3% of pure product, mp 189–191 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2948 and 1731. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-4'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.7 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.6 (C-18), 13.7 (C-4'), 18.5 (C-3'), 19.5 (C-19), 38.9 (C-2'), 73.2 (C-3), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.4 (carbonyl of the 3 β ester function), 173.1 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₃H₃₄O₄ 375.5137 (M+H) 375.5098.

2.2.4.4. 17 α -Oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-pentanoate (19). Yield: 91.0% of pure product, mp 106–108 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2949 and 1730. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-5'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-4'), 1.6 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-5'), 19.4 (C-19), 22.3 (C-4'), 31.3 (C-3'), 34.4 (C-2'), 73.2 (C-3), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.2 (carbonyl of the 3 β ester function), 173.3 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₄H₃₆O₃ 389.5402 (M+H) 389.5374.

2.2.4.5. 17 α -Oxa-D-homoandrost-5-en-17-one-3 β -yl-hexanoate (20). Yield: 89% of pure product, mp 117–119 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2948 and 1731. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-6'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, m, H-5'), 1.5 (2H, m, H-4'), 1.6 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, J₁ = 4 Hz and J₂ = 2 Hz, H-6). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-6'), 19.4 (C-19), 22.3 (C-5'), 24.7 (C-4'), 31.2 (C-3'), 34.4 (C-2'), 73.2 (C-3), 121.4 (C-6), 139.6 (C-5), 171.2 (carbonyl of the 3 β ester function), 173.3 (ester carbonyl of the lactone function). FAB-MS calc for C₂₅H₃₈O₄ 403.5668 (M+H) found 403.5591.

The biological activity of steroids **1–10** is currently being carried out.

2.3. Biological activity of the novel compounds

The human prostate from a man of 53 years old, who died from diabetes and renal insufficiency, was introduced to a solution of NaCl 150 mM and stored at –70 °C. This gland was obtained from the Department of Pathology, The General Hospital (SS) in Mexico City. Frozen human prostate was thawed on ice and minced with scissors. Unless specified, the following procedures were carried out at 4 °C.

2.3.1. Animals and tissues

Adult male golden hamsters 2.5 month old (150–200 g) were obtained from the Metropolitan University in Xochimilco, Mexico. In order to carry out the *in vivo* experiments, several male hamsters were gonadectomized. Gonadectomies were performed under pentobarbital anesthesia and the castrated hamsters were kept in a room with controlled temperature (22 °C) and light-dark periods of 12 h. Food and water were provided *ad libitum*. After 30 days of maintaining these conditions, the hamsters were sacrificed with CO₂ [9]. This protocol was approved by the Institutional Care and Use Committee of the Metropolitan University of Mexico (UAM). This study with gonadectomized animals was carried out on 8 groups of 4 animals/experiment.

In order to determine the binding of steroids **11–20** to the androgen receptors, adult rats 8 months old weighing 500 g were used [10,11]. In this study we used rats because they have a bigger

prostate gland and there is no difference in the binding activity between rats and hamsters cytosol.

The prostate of the rats was removed, blotted, weighed and soaked in cold TEMD (40 mM Tris-HCl, 3 mM EDTA and 20 mM sodium molybdate, dithiothreitol 0.5 mM, 10% glycerol at pH 8) prior to their use. Unless specified, all procedures were carried out in ice bath. Tissues were homogenized with a tissue homogenizer (Teckmar, Cincinnati, OH).

Tissues were homogenized in one volume of buffer TEMD plus protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 μ g/mL antipain, 5 mM leupeptin [12]) in an ice bath with a tissue homogenizer. Homogenates were centrifuged at 140,000 \times g for 60 min [13] in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

The cytosolic fraction obtained from the supernatant liquid of the rat prostate homogenate described above, was stored at –70 °C. Prostatic cytosol proteins (6 mg of protein in 200 μ L) were determined by the Bradford's method [14].

2.3.2. In vitro experiments

2.3.2.1. Competitive studies. For competitive studies, tubes containing 1 nM of [³H] MIB plus a range of increasing concentrations (1 \times 10⁻¹⁰–4 \times 10⁻⁷ M) of cold MIB (Fig. 2) and **11–20** in ethanol or chloroform, or in absence of the competitor were prepared [15]. Incubates contained also 200 nM of triamcinolone, in ethanol (Sigma) to prevent interaction of MIB with glucocorticoid and progesterone receptors. Later, the solvent was evaporated from the tubes.

Aliquots of 200 μ L of prostate cytosol were added and incubated in the presence of 300 μ L of TEMD buffer containing protease inhibitors (duplicate) for 24 h at 4 °C in the tubes as previously described. After incubation, 0.27 mL saturated ammonium sulfate in TEMD buffer (35%) was added [15,16]. The mixture was further incubated for 1 h with occasional shaking to facilitate the precipitation of the [³H] MIB-complex. The precipitate was collected by centrifugation at 10,000 \times g, 10 min and the pellet was redissolved in 0.5 mL of TEMD and mixed with 0.5 of 0.1% dextran-coated 1% charcoal in TEMD buffer. The mixture was incubated for 40 min at 4 °C. To prepare the dextran-coated charcoal mixture, the dextran was agitated for 30 min before adding the charcoal to the mixture. The tubes were agitated on a vortex and immediately centrifuged at 800 \times g for 10 min to pellet the charcoal; aliquots (600 μ L) were taken and submitted for radioactive counting. The IC₅₀ of each compound was determined according to the plots of concentration versus percentage of binding using Sigma Plot software.

2.3.2.2. Determination of the activity of 5 α -reductase in the nuclear fraction from prostate homogenates. Human prostate was homogenized in 2 volumes of medium A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5 containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM dithiothreitol Sigma-Aldrich, Inc) with a tissue homogenizer. Homogenates were centrifuged at 1500 \times g for 20 min [17,18] in a SW 60 Ti rotor (Beckman instruments, Palo Alto, CA). The pellets were separated, suspended in medium A and kept at –70 °C. The suspension, 5 mg of protein/mL for human prostates, determined by the Bradford's method [14] was used as source of 5 α -reductase.

The enzyme 5 α -reductase was assayed as previously described [16,17]. The reaction mixture for human prostate contained: 1 mM dithiothreitol, sodium phosphate buffer 40 mM, at pH 6.5, 2 mM, NADPH, 2 nM [1,2,6,7-³H]T [16] in a final volume of 1 mL. The reaction in duplicate was started when it was added to the enzymatic fraction (500 μ g protein in a volume of 80 μ L) incubated at 37 °C for 60 min [18] and stopped by mixing with 1 mL of dichloromethane; this was considered as the end point. Incubation without tissue was used as a control. The mixture (incubation medium/dichloromethane) was agitated on a vortex

for one minute and the dichloromethane phase was separated and placed in another tube. This procedure was repeated 4 more times. The dichloromethane extract was evaporated to dryness under a nitrogen stream and suspended in 50 μ L of methanol that was spotted on HPTLC Keisegel 60 F₂₅₄ plates. T and DHT were used as carriers and were applied in different lanes on both lateral sides of the plates (T, T+DHT and DHT). The plates were developed in chloroform–acetone 9:1 and were air-dried; the chromatography was repeated 2 more times. The steroid carriers were detected using phosphomolibdic acid reagent (DHT) and T with an UV lamp (254 nm). After the plates were segmented in areas of 1 cm each, they were cut off and the strips soaked in 5 mL of Ultima Gold (Packard). The radioactivity was determined in a scintillation counter (Packard tri-carb 2100 TR). The radioactivity content in the segment corresponding to T and DHT carriers was identified. The radioactivity that has identical chromatographic behavior as the DHT standard was considered as the DHT transformation. Control incubations, chromatography separations and identifications, were carried out in the same manner as described above except that the tubes did not contain tissue. The DHT transformation yields were calculated from the strips, taken into account the entire radioactivity in the plate.

2.3.2.3. Determination of 50% of the inhibitory concentration of steroids 11–20 in human prostatic 5 α -reductase. In order to calculate the IC₅₀ values (the concentration of steroids **11–20** or finasteride required to inhibit 5 α -reductase activity by 50%), six series of tubes containing increasing concentrations of these steroids (10⁻¹¹–10⁻³ M) were incubated in duplicate, in the presence of: 1 mM of dithiothreitol, 40 mM sodium phosphate buffer pH of 6.5; 2 mM NADPH, 2 nM [1,2,6,7-³H]T and 500 (g of protein from enzymatic fraction in a final volume of 1 mL. The reaction was carried out in duplicate at 37 °C for 60 min; 1 mL of dichloromethane was added to stop the reaction. The extraction and the chromatographic procedures were carried out as described above.

After the chromatography, the plates were segmented in areas of 1 cm each, cut off and the strips were soaked in 10 mL of Ultima Gold (Packard). The radioactivity was determined in a scintillation counter (Packard tri-carb 2100 TR). The radioactivity content in the segments corresponding to T and DHT carriers was identified. The fraction that has identical chromatographic behavior as the DHT standard was considered as the DHT transformation in the presence of the tested compounds. Control incubations, chromatography separations and identifications, were carried out in the same manner as described above except that these tubes did not contain tissue. The DHT transformation yields were calculated from the strips, taken into account the entire radioactivity in the plate.

The IC₅₀ of each compound was determined according to the plots of concentration versus percentage of binding using Sigma Plot software.

2.3.2.4. In vivo experiments. For the daily subcutaneous injections, 2 mg/kg of the steroids **11–20** were dissolved in 200 μ L of sesame oil and administered for 6 days to the gonadectomized animals, together with 1 mg/kg of testosterone. Three groups of gonadectomized animals were kept as control; one was injected with 200 μ L of sesame oil, the second one with 1 mg/kg of testosterone and the third one with T plus 1 mg/kg of finasteride for 6 days. After the treatment, the animals were sacrificed by CO₂. The prostate and seminal vesicles of each animal were dissected and weighed. Two separate experiments were performed for each group of steroid treated animals. The results were analyzed using one-way analysis of variance and Dunnett's method for compare means, with JMP IN 5.1 software.

3. Results

3.1. In vitro experiments

3.1.1. Competitive studies

The results showed that non labeled MIB as well as compounds **15–17** competed for the androgen receptor with labeled MIB and exhibited an IC₅₀ value of 1, 6.2, 9.5 and 9.5 nM respectively. Their relative binding affinities (RBAs) to the AR are shown in Fig. 2. These data showed also that steroids **13, 14, 18–22** did not inhibit labeled MIB binding to the androgen receptor. The RBAs were calculated according to the following equation:

$$RBA = \frac{IC_{50} \text{ of } [^3\text{H}] \text{ mibolerone}}{IC_{50} \text{ of inhibitor}} \times 100$$

3.1.2. 5 α -Reductase activity

The *in vitro* biological activity of steroids **11–20** was determined in human 5 α -reductase enzyme. The radioactive zone that had identical chromatographic behavior as the standard T (Rf value of 0.56) corresponds to 70% of the accounted radioactivity in the plate. The radioactivity contained in the zone corresponding to DHT standard (Rf value of 0.67) of the experimental chromatogram was identified as the transformed DHT and corresponds to 27% of the total radioactivity accounted in the plate. This result was considered to be 100% of the activity of 5 α -reductase for the development of inhibition plots. Unmodified [³H]T was identified (Rf value of 0.56) from control incubations which did not contain tissue and had identical chromatographic behavior as the non labeled standard. The radioactivity contained in the zone corresponding to DHT standard (Rf value of 0.67) of the control chromatogram is of 1% of the total radioactivity accounted in the plate and was considered as an error; it was subtracted from the experimental chromatograms.

3.1.3. Concentration of the new compounds that inhibits 50% of 5 α -reductase activity in human prostate

The concentrations of finasteride and compounds **11–20** required for inhibiting 5 α -reductase activity by 50% (IC₅₀) were determined from the inhibition plots using Sigma Plot software and are shown in Fig. 2.

These data showed that all steroidal lactones described in this paper inhibited the activity of human 5 α -reductase with compounds **14–19** exhibiting the highest inhibitory activity with IC₅₀ values of 4.2 \pm 0.95, 0.025 \pm 0.003, 1.2 \pm 0.45, 1.2 \pm 0.1, 0.028 \pm 0.003 and 0.069 \pm 0.005 nM respectively (Fig. 2).

3.1.4. In vivo experiments

3.1.4.1. Weight of the prostate and seminal vesicles. After castration, the weight of the hamster prostate and seminal vesicles decreased ($p < 0.05$) compared to the normal glands. Treatment with vehicle alone did not change this condition, whereas s.c. injections of 1 mg/kg of T for 6 days significantly increased ($p < 0.05$) the weight of these glands in castrated male hamsters (Fig. 3). When T (1 mg/kg) and finasteride or compounds **11–20** were injected together, the weight of the prostate and seminal vesicles decreased significantly ($p < 0.05$) as compared to that of T-treated animals (Fig. 3). This reduction of the weight of these glands was comparable to that produced by finasteride (2 mg/kg). Compound **20** showed the lowest weight of the prostate and seminal vesicles, thus indicating a higher effect, whereas **13, 14, and 19** did not significantly reduce the weight of these glands in the treated hamsters ($p > 0.05$), however the statistical results exhibited a tendency to decrease the weight of these glands.

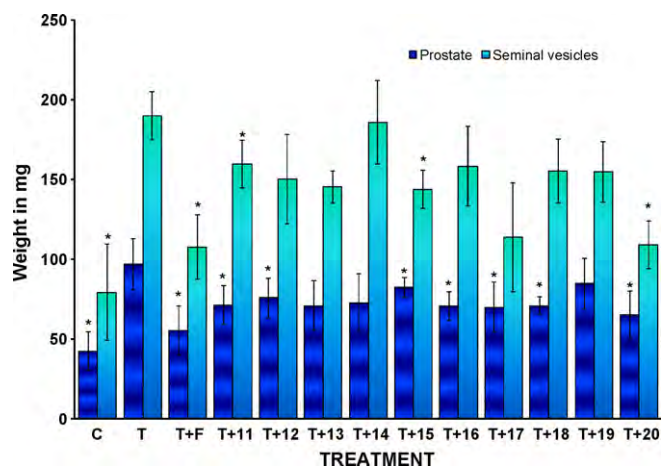


Fig. 3. Weight of prostate and seminal vesicles glands \pm standard deviation from castrated hamsters receiving different s.c. treatments for 6 days. The control animals (C) were treated with vehicle only. The pharmacological experiment was carried out in duplicate. The asterisk shows the statistically significant difference between the group of hamsters treated with T and those treated with finasteride or the synthesized steroids.

4. Discussion

In this paper, we report the synthesis and biological activity of several new steroidal lactones **11–20**. All compounds described in this paper are good inhibitors for the human 5α -reductase enzyme (*in vitro* evaluation) with compounds **15**, **18** and **19** showing higher inhibitory activity (lower IC_{50} value) as compared to that of finasteride, the drug of choice for the treatment of benign prostatic hyperplasia.

Since all steroidal lactones are lipophilic compounds, they could interact with the enzyme sites, thus forming more readily a steroid-enzyme activated complex and this fact could explain their enhanced activity *in vitro* as well as *in vivo*. On the other hand, the lactone functional group in the D-ring of the steroidal skeleton could react with the nucleophilic residue [8] present in the hydrophobic interior of the enzyme 5α -reductase (cysteine, serine and lysine) to form a thioester, ester or an amide respectively. This reaction could inhibit the enzyme 5α -reductase and as a result of this, the conversion of T to DHT will be blocked.

Previous studies carried out by our group had demonstrated that some dehydroepiandrosterone derivatives inhibited human 5α -reductase enzyme activity. The results from these experiments indicated that a lactone functional group incorporated into the D-ring of the dehydroepiandrosterone skeleton enhanced the inhibitory activity for 5α -reductase enzyme as indicated by the low IC_{50} values. Compounds **11–15** have a bromine atom at C-5 and C-6 position showed a lower inhibitory activity for this enzyme as compared to steroids **15**, **18** and **19** lacking the bromine atoms at C-5 and C-6. It is possible that the two halogen atoms decreased the solubility of the steroidal molecule in the reaction medium and thus decreased the efficiency of the nucleophilic reaction of cysteine, lysine and serine with the carbonyl group of the lactone moiety.

Finasteride as well as compounds **15**, **18** and **19** showed a high 5α -reductase inhibitory activity. As a result of this, the decrease of the prostate and seminal vesicles weight produced by these compounds was a consequence of the inhibition of 5α -reductase enzyme present in this tissue [19]. This decrease of the weight of these glands could possibly be explained by considering that steroids **15–17** have also a low affinity for the androgen receptor. On the other hand steroids **11–14** and **18–20** did not inhibit the binding of labeled mibolerone to the androgen receptor.

Furthermore, it has to be considered that steroids **11**, **12**, **15–18**, **20** which showed pharmacological activity, have a short ester that could be hydrolyzed *in vivo* during the six day treatment. This reaction could produce another structure in the ring A of the steroidal lactones. As a result of this, they could bind to the AR producing an antagonistic activity. This explanation could elucidate the *in vivo* activity observed with these steroidal derivatives.

In view of the fact that the steroidal lactones **15**, **18** and **19** showed a high 5α -reductase inhibitory activity and also decreased the weight of the prostate and seminal vesicles as compared to the testosterone only treated animals, these steroidal lactones could have a therapeutic potential for the treatment of androgen dependent diseases.

Acknowledgement

We would like to thank CONACYT for its support for the project No.54853.

References

- W.D. Russell, J.D. Wilson, Steroid 5α -reductase: two genes/two enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 25–61.
- T. Liang, M.A. Cascieri, A.H. Cheung, G.F. Reynolds, G.H. Rasmuson, Species differences in prostatic steroid 5α -reductases of rat, dog, and human, *Endocrinology* 117 (1985) 571–579.
- L.N. Thomas, C.B. Lazier, R. Gupta, R.W. Norman, D.A. Troyer, S.P. O'Brien, R.S. Rittmaster, Differential alterations in 5α -reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer, *Prostate* 6 (2005) 231–239.
- H. Bonkhoff, U. Stein, G. Aumuller, K. Remberger, Differential expression of 5α -reductase isozymes in the human prostate and prostatic carcinomas, *Prostate* 29 (1996) 261–267.
- H.J. Lee, C. Chang, Recent advances in androgen receptor action, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1613–1622.
- F. Marchetti, A. Gupta, Novel inhibitors of 5α -reductase, *Expert Opin. Ther. Pat.* 12 (2002) 201–215.
- P.E. Pochi, J.S. Strauss, Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland, *J. Invest. Dermatol.* 62 (1974) 191–201.
- C. Solórzano, F. Antonietti, A. Duranti, A. Tontini, S. Rivara, A. Lodola, F. Vacondio, G. Tarzia, D. Piomelli, M. Mor, Synthesis and structure-activity relationships of N-(2-oxo-3-oxetanyl) amides as N-acethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibitors, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5770–5781.
- M. Cabeza, Y. Heuze, H. Quintana, E. Bratoeff, Comparison between two different hamster models used for the determination of testosterone and finasteride activity, *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 5 (2010) 202–209.
- C.M. Gaubert, R.R. Trembla, Y.Y. Bubé, Effect of sodium molybdate on cytosolic androgen receptor in rat prostate, *J. Steroid Biochem.* 13 (1980) 931–937.
- P. Davies, P. Thomas, K. Griffiths, Measurement of free and occupied cytoplasmic and nuclear androgen receptor sites in rat prostate ventral prostate gland, *J. Endocrinol.* 74 (1977) 393–404.
- P.W.J. Hendry, B.J. Danzo, Structural conversion of cytosolic steroid receptors by an age-dependent epididymal protease, *J. Steroid Biochem.* 21 (1985) 883–893.
- T. Liang, E.J. Heiss, Inhibition of 5α -reductase, receptor binding and nuclear uptake of androgens in the prostate by a 4-methyl-4-aza-steroid, *Biol. Chem.* 256 (1981) 7998–8005.
- M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1986) 248–254.
- M. Cabeza, F. Vilchis, A. Lemus, L. Díaz de León, G. Pérez-Palacios, Molecular interactions of levonorgestrel and its 5α -reduced derivative with androgen receptors in hamster flanking organs, *Steroids* 60 (1995) 630–635.
- G.H. Rasmuson, G.F. Reynolds, N.G. Steinberg, E. Walton, G.F. Patel, T. Liang, M.A. Cascieri, A.H. Cheung, J.R. Brooks, C. Berman, Azasteroids: structure-activity relationships for inhibition of 5α -reductase and of androgen receptor binding, *J. Med. Chem.* 29 (1986) 2298–2315.
- J. Hirosumi, O. Nakayama, T. Fagan, K. Sawada, N. Chida, M. Inami, S. Takahashi, H. Kojo, Y. Notsu, M.J.A. Okuhara, FK143, A novel non steroidal inhibition of steroid 5α -reductase: *in vitro* effects of human and animal prostatic enzymes, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52 (1995) 357–363.
- E. Bratoeff, M. Cabeza, V. Pérez-Ornelas, S. Recillas, I. Heuze, *In vivo* and *in vitro* effect of novel 4, 16-pregnadiene-6,20 dione derivatives, as 5α -reductase inhibitors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 111 (2008) 275–281.
- N. Bruchovsky, J.D. Wilson, The conversion of testosterone to 5α -androstan-17- β -ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro*, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 2012–2022.

Accepted Manuscript

Cytotoxic effect of novel dehydroepiandrosterone derivatives on different cancer cell lines

Mariana Garrido, Marisa Cabeza, Francisco Cortés, José Gutiérrez, Eugene Bratoeff



PII: S0223-5234(13)00138-4

DOI: [10.1016/j.ejmech.2013.02.031](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.031)

Reference: EJMECH 6026

To appear in: *European Journal of Medicinal Chemistry*

Received Date: 10 December 2012

Revised Date: 18 February 2013

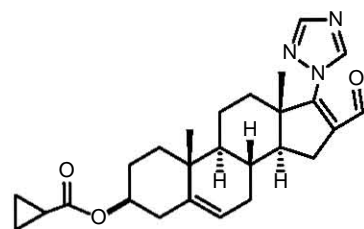
Accepted Date: 21 February 2013

Please cite this article as: M. Garrido, M. Cabeza, F. Cortés, J. Gutiérrez, E. Bratoeff, Cytotoxic effect of novel dehydroepiandrosterone derivatives on different cancer cell lines, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2013), doi: 10.1016/j.ejmech.2013.02.031.

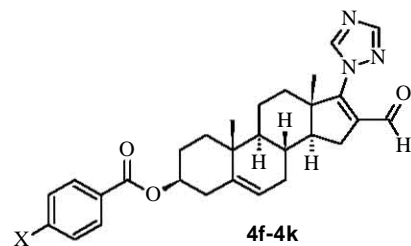
This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Graphical Abstract

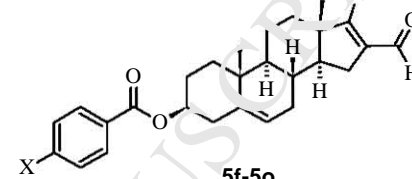
Cytotoxic effect of novel steroids on cancer cell lines



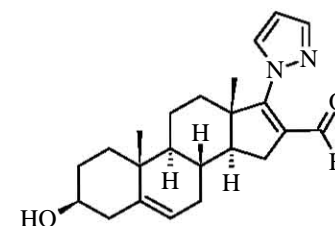
4a-4e



4f-4k



5f-5o



6

Highlights

1. Cytotoxic effect of three series of dehydroepiandrosterone derivatives was determined
2. The following cancer cell lines were used in this study: PC-3, MCF-7 and SKLU-1.
3. The steroids with triazol ring produced higher cytotoxicity than those with pyrazol.
4. Electronegative groups in the ester moiety increased citotoxicity in cell lines.
5. Steroids **4a**, **4e**, **4i-4k**, **5o** and **5f** exhibited the highest citotoxic effect.t

Cytotoxic effect of novel dehydroepiandrosterone derivatives on different cancer cell lines

Mariana Garrido^a, Marisa Cabeza^b, Francisco Cortés^a, José Gutiérrez^a and Eugene Bratoeff^a.

Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry^a, National University of Mexico, Mexico, D. F., Mexico.

Department of Biological Systems Metropolitan University-Xochimilco^b, Mexico, D. F., Mexico.

Address correspondence to:

Marisa Cabeza Ph.D.

Departamento de Sistemas Biológicos.

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Calzada del Hueso No. 1100.

México, D.F. C.P 04960, México.

Phone: (011-52-55) 5483-72-60.

FAX: (52-55) 5483-72-60.

E-mail: marisa@correo.xoc.uam.mx.

Abstract

The aim of this study was to determine the cytotoxic effect of human cancer cells on three series of novel dehydroepiandrosterone derivatives containing triazol or pyrazol rings at C-17 and an ester moiety at C-3 of the androstane skeleton. The panel cancer cells used in this study were the following: PC-3, MCF-7 and SKLU-1.

The results from this study indicated that the steroidal derivatives **4a-4e** and **4f-4k** showed the highest cytotoxic potency. This difference in this activity could be attributed to the ability of the triazole (three nitrogen atoms) to form stronger hydrogen bonds with the active site of the cell as compared to the pyrazole group having two nitrogen atoms.

Compounds **4f-4k** having an aromatic ester at C-3 showed an enhanced cytotoxic activity as compared to their aliphatic counterpart's **4a-4e**. Apparently the electronegative phenyl ring increased the polarity of the molecule, thus increasing the dipole-dipole association of the steroidal molecule with the reactive site of the cell.

Key words: Cancer cell lines, PC-3, MCF-7, SKLU-1, synthesis of dehydroandrosterone derivatives, cytotoxic effect, triazol ring, pyrazol ring.

1. Introduction

Steroids are important physiological and pharmacological regulators of cell growth and survival. There are several examples in the literature that indicate the use of natural and synthetic steroids for the treatment of sex hormone-dependent cancer tumors, including breast cancer [1], endometrial cancer [2], cervical cancer [3] and prostate cancer [4]. These hormone-dependent tumor cells can control tumor growth through hormone receptor antagonists [1-4], whereas in sex hormone-independent organs, some synthetic steroids had been previously described as inducers of apoptosis [5].

The pharmacological studies using synthetic steroids offer an important strategy for tumor control growth and tumor cell apoptosis. In this respect, 7 β -hydroxyepiandrosterone, a derivative of dehydroepiandrosterone at low doses induced anti-proliferative effect in the mammary cancer cells MCF-7 [6]. Others dehydroepiandrosterone derivatives had been also reported having antitumor properties on ovarian cancer cells (ES-2), human lung cells (A549) and liver carcinoma cell (HepG2) lines [7]. These compounds induce apoptosis in cancer cell lines. Mifepristone is another synthetic steroid capable of inducing apoptosis in sex-hormone independent organ as receptor-positive gastric cancer cell [5].

Heterocyclic compounds had been reported as anti-tumorigenic agents [8], therefore the investigation of various heterocyclic derivatives has generated a great interest, since most of them can interact with the steroidal receptors due to their similarity of shape. Njar had demonstrated that dehydroepiandrosterone derivatives having an azole ring at C-17

inhibited the proliferation of cancer cell lines [9). On the other hand, similar compounds synthesized by our group having an ester moiety at C-3 improved the lipophilicity and exhibited an ability to penetrate the cell membrane thus showing an enhanced biological effect [10).

The results from these investigations inspired us to synthesize several new dehydroepiandrosterone derivatives containing heterocyclic function at C-17 and an aliphatic or an aromatic ester moiety at C-3 and test them as antitumoral agents.

In the present study three series of novel dehydroepiandrosterone derivatives were synthesized; having a triazol or pyrazole function at C-17 and an ester moiety at C-3.

Series 1:

16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-cyclopropanoate **4a**; 16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-,16 -diene-3 β -yl-cyclobutanoate **4b**; 16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-cyclopentanoate **4c**; 16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-cyclohexanoate **4d**; 16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl- cycloheptanoate **4e**.

Series 2:

16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-methoxybenzoate **4f**; 16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-methylbenzoate **4g**; 16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-benzoate **4h**; 16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-trifluorobenzoate **4i**; 16-formyl-17-

(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-cyanobenzoate **4j**; 16-formyl-17-(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-nitrobenzoate **4k**.

Series 3:

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-methoxybenzoate **5f**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-methylbenzoate **5g**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-benzoate **5h**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-trifluoromethylbenzoate **5i**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-cyanobenzoate **5j**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-nitrobenzoate **5k**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-fluorobenzoate **5l**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-chlorobenzoate **5m**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-bromobenzoate **5n**; 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5, 16-diene-3 β -yl-p-iodobenzoate **5o** and 16-formyl-3-hydroxyandrosta-5, 16-diene-(1H-1, 2, 4-pyrazole-1-yl) **6**.

These compounds were evaluated *in vitro*, in order to determine its cytotoxic effect in a panel of human cancer cells. The panel used in this study was the following: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF-7 (human breast cancer cell line) and SKLU-1 (human lung cancer cell line).

Ketoconazole was used as a reference compound for the *in vitro* assays. This compound is an antimycotic drug that had previously been described as an agent that inhibits cytochrome P450 enzymes, which are required for the synthesis of androgens [11].

Ketoconazole had shown cytotoxic activity in prostate cancer cell lines in the *in-vitro* studies [11,12). Furthermore, it had previously been demonstrated that at low-dose, this compound can be used for the treatment of prostate cancer which has failed androgen deprivation therapy and whose cytotoxic chemotherapy would have a significant impact on the quality of life [11).

2. Results and discussion

2.1 Chemistry

The synthetic pathways for the preparation of **4a-4e**, **4f-4k** and **5f-5o** are outlined in figures 1, 2 and 3 respectively. Commercially available dehydroepiandrosterone (1) was treated with the corresponding acid, *p*-dimethylaminopyridine and dicyclohexylcarbodiimide. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. After the usual work-up, the desired esters were obtained with a yield of 90-95%.

The following step in this synthesis involved the Vilsmeier-Haack reaction. The ester derivatives **2a-2p** were refluxed with phosphorus oxychloride in DMF and chloroform for 5 h. After the usual work-up, the desired 16-formyl derivatives **3a-3p** (Figures 1, 2 and 3) were obtained with a yield of 70-93%.

The final compounds **4a-4e**, **4f-4k** (triazole ring at C-17) and **5f-5o** (pyrazole ring at C-17), were prepared using the corresponding steroidal derivative (**3a-3p**), potassium carbonate or cesium carbonate (Figure 1, 2 and 3) in DMF; each mixture was warmed at 50 °C for 3 h. The yields of the final compounds in the three series were between 60-70%. The desired compounds and intermediates were characterized by IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and mass spectrometry.

2.2. Biological activity

The effect of the synthesized compounds (**4a-4e**, **4f-4k** and **5f-5o**) on the growth of three cancer cell lines: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF-7 (human breast cancer cell line) and SKLU-1 (human lung cancer cell line) was determined using SRB

assay method. The values of the cell growth inhibition are shown in the Table 1. These data showed that the cyclopropane ring present in the ester moiety of compound **4a** (series 1) produced a higher cytotoxicity as compared to compounds **4b-4e** having 4-7 C-atoms in their ring, and a triazole ring at C-17. Steroid **4e** inhibited the cell growth, albeit in a lower percentage as compared to **4a** (Table 1). These results suggested that the size of the ring of the ester moiety could be related to the cytotoxic activity. The cyclopropane ring is a strained, planar and very reactive moiety and could form much easier a complex with the reactive sites present in the cell. Probably, the highest cytotoxicity of steroid **4a** could be explained on the ground of this phenomenon.

The activity of compound **4e** (series 1) could be explained by considering the conformation of the cycloheptane ring. It is a well known fact that the twisted chair conformation has a low energy and as result of this, this conformation could interact with the active sites of the cell and produce a cytotoxic effect. The replacement of the cycloalkane ring in series 1 with a benzene group in the ester moiety increased the coplanarity of the molecule and thus enhanced the cytotoxic activity; this fact was evident when the cytotoxic activity of **4d** from series 1, and **4h** from series 2 were compared. Compound **4d** (series 1) has a puckered nonplanar cyclohexane ring and failed to exhibit a cytotoxic activity. On the other hand, compound **4h** having a planar benzene ring, did exhibit a moderate cytotoxic activity (See Table 1).

Ketoconazole showed also a cytotoxic activity in all three cancer lines studied; however, its effect was similar to that observed for **4a** on PC-3 cell line. Nevertheless, ketoconazole exhibited a lower percentage of inhibition of cytotoxicity on SKLU-1 cells than steroid **4a** (Table 1).

Compounds **4i** and **4j** (Series 2) exhibited a higher cytotoxic activity than steroid **4h** (non substituted benzene ring) and ketoconazole in all cell lines studied (Table 1). The difference between **4h** and the other steroids from series 2 is the substitution pattern of the benzene ring at C-3. The introduction of polar groups in this position increases the polarity of the molecule (stronger dipole-dipole interaction with the active site on the cell) and this phenomenon increased their cytotoxic activity (**4i and 4j**). However, the stable ether group in **4f**, is very hydrophobic and did not increase the cytotoxic effect in PC-3, MCF-7 and SKLU-1 cell lines, as compared to that of **4h**. Steroid **4k** increased the cytotoxic activity as compared to **4h**, since the nitro group increased the hydrogen bonding association. On the other hand the stable methyl group in C-4 of the benzene ring in the ester moiety (steroid **4g**) slightly increased the cytotoxic activity of MCF-7 and SKLU-1 as compared to that of **4h** (Table 1). The overall, data indicated that an increase of the polarity of the molecule increases the cytotoxic activity

The activity of the compounds of series 3 on PC-3, MCF-7, and SKLU-1 cancer cell lines is also exhibited in Table 1. These results showed that none esterified-pyrazole derivative **6** with a free OH group in C-3 is an active steroid that produces a higher cytotoxic effect in PC-3 and SKLU-1 cancer cell lines. Thus, the cytotoxicity of this compound was linked to the presence of the free OH group. This functional group allowed strong hydrogen bonds formation of the steroidal compound with polar active groups in the cells and as a result of this, a stronger cytotoxic effect was observed.

Apparently the methyl group in C-4 of the ester moiety of compound **5g** did not induce cytotoxicity in the studied cancer cell lines as compared to the ether function of compound **5f**. The non polar methyl group could thwart a binding interaction of the steroid

with the active sites in the cancer cell lines; on the other hand the methoxy group in **5f** forms hydrogen bonds with the active sites in the cells and this phenomenon explains very well the high cytotoxic effect of compound **5f**.

Compounds **5l**, **5m** and **5n**, all containing a halogen atom, fluorine, chlorine and bromine respectively, showed a low cytotoxic activity in all cancer lines tested. On the other hand, compound **5o** having an iodine atom in the ester group, surprisingly showed a much higher activity than the other halogen containing compounds. Compound **5o** has a much higher Log P (partition coefficient) (higher lipophilicity) and can penetrate much easier the cell membrane and as a result of this, it exhibited an enhanced cytotoxic activity. Steroid **5k** having a nitro group showed a low cytotoxicity. Although compounds **5k** and **4k** are very similar (both having a nitro groups), steroid **4k** having a triazole group in C-17 has a much higher cytotoxic activity than **5k** with a pyrazole group in C-17. This difference in the biological activity of both compounds can be attributed to the nature of the azole groups in C-17. Compounds **4k**, having a triazole group at C-17 could form easier hydrogen bonds with the binding sites of the cells as compared to the pyrazole ring at the same position in **5k** and as a result of this steroid **5k** has a much lower biological activity.

Previously it had been reported that 7β -hydroxy-epiandrosterone (17β -OH-EpiA) is an endogenous androgenic derivative of dehydroepiandrosterone that decreases the synthesis of DGE2, a prostaglandin that induces an inflammatory effect [13]. On the other hand 17β -estradiol produces an anti-inflammatory effect notably via NF κ B, chemokine production [14] and also via a decrease of PGE2 synthesis [15, 16]. These responses are mediated through an estrogen receptor (ER).

Furthermore other studies demonstrated that 17β -OH EpiA exerted an anti-estrogenic effect in MCF-7 cancer cell line associated with cell proliferation inhibition and cell cycle arrest. These data indicated that this dehydroepiandrosterone derivative is capable of interacting with the ER and also with the membrane GPR30 receptors thus producing an antiproliferative effect [6]. The overall data suggested that steroids **4a**, **4i-5f** reported in this study could act through an ER and GPR30 receptors and as a result of this an antiproliferative effect was observed in MCF7 cell line [18].

On the other hand, previously it had been reported that the prostate cancer cell line PC3 expresses ER β 1 or ER β 2 [17]. ER β 1 represses the expression of bone metastasis regulator genes in PC3, whereas ER β 2 increases the expression of the genes that regulate this metastasis [17]. Since 17β -OH EpiA exerts its action through an ER, steroids **4a**, **4i-4k** and **6** reported in this study could inhibit the proliferation of this PC3 cell via the ER β 1.

Earlier it had been reported that some transcription factors as hepatocyte nuclear factor 3 β (HNF3 β) and CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) are strongly expressed in the lung, and both are tumor suppressors in lung cancer [18]. This effect is different between both genders [19]. On the other hand, recently it had been demonstrated that lung adenocarcinomas express ER α and β . These receptors might be coupled to G-protein (GPER/GPR30) whose expression is increased in lung cancer cells as well as in tumors when compared to normal lung [20]. The overall data from this study suggested that the novel dehydroepiandrosterone derivatives reported in this study **4a**, **4e**, **4i-4k**, **5f**, **5o** and **6** could induce an apoptotic effect via the activation of the ER in SKLU-1 cell line.

Conclusion

On the ground of the biological results, described in this paper, we can infer that the steroidal compounds having a triazole ring at C-17 showed a much higher cytotoxic activity as compared to compounds **5f-5o** having a pyrazole functional group at the same position. Apparently, this difference can be explained on the base that the triazole ring having three nitrogen atoms can form much easier hydrogen bonds with the reactive site of the cell as compared to that of the pyrazole ring (two nitrogen atoms in the ring) at the same position. It is important to note that compound **6** having a free hydroxyl group at C-3 and a pyrazole ring at C-17 showed a very high cytotoxic activity. This is probably due to the ability of the hydroxyl group to form hydrogen bonds with the reactive site of the cell.

Compounds **4f-4k** having an aromatic ester at C-3 showed an enhanced cytotoxic activity as compared to their aliphatic counterpart's **4a-4e**. On the other hand, the aromatic esters having an electronegative group in the phenyl ring of the ester moiety (**4i-4j**), showed a higher activity as compared to those having an electropositive group (**4f and 4g**). Apparently, the electronegative substituent on the phenyl ring of the ester moiety increases the polarity of the molecule thus increasing the dipole-dipole association of the steroidal molecule with the reactive site of the cell.

Experimental section

Reagents and solvents were purchased from commercial sources and were used without further purification. Melting points were determined on a Fisher Johns melting point apparatus and are uncorrected. ^1H NMR and ^{13}C NMR were taken on a Varian Gemini 200 and a VRX-300 respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me_4Si ($\delta=0$) in CDCl_3 (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet, t, triplet; m, multiplet). Mass spectra were obtained with a HP5985-B spectrometer. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 200 spectrometer.

Steroid synthesis

For the synthesis of the new esters derivatives described in this paper, we used the commercially available dehydroepiandrosterone **1**. The preparation of these compounds is briefly described below.

General preparation of esters.

To a solution of steroid **1** (1g, 3 mmol), DCC (2.147 g, 10.41 mmol), DMAP (0.848 g, 6.94 mmol) in chloroform (20 mL) was added the corresponding acid (14 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2 hours. Hexane (15 mL) was added and the precipitated dicyclohexyl urea was filtered. The organic phase was washed three times with 10 % aqueous hydrochloric acid, 5 % aqueous sodium bicarbonate, water and was dried over anhydrous sodium sulfate. The crude ester was recrystallized from methanol.

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-cyclopropanoate (2a) Yield 92%.mp. 199-201°C, IR (KBr) cm^{-1} : 2947, 1736, 1712. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19),

4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.3 (C-18), 20.3 (C-19), 73.6 (C-3), 121.7 (C-6), 139.9 (C-5), 174.2 (ester carbonyl), 220.9 (C-17). HRMS cal. For $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 356.2351, found 356.2299.

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-cyclobutanoate (2b) Yield 98%.mp. 179-178°C, IR (KBr) cm^{-1} : 2942, 1735, 1720. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.3 (C-18), 20.3 (C-19), 73.3 (C-3), 121.7 (C-6), 139.7 (C-5), 174.8 (ester carbonyl), 220.9 (C-17). HRMS cal. For $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_3$ 370.2508, found 370.2256.

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-cyclopentanoate (2c) Yield 96%.mp. 176-178°C, IR (KBr) cm^{-1} : 2945, 1735, 1723. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.3 (C-18), 20.3 (C-19), 73.2 (C-3), 121.7 (C-6), 140.3 (C-5), 176.1 (ester carbonyl), 221.0 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_3$ 384.2664 found 384.2695.

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-cyclohexanoate (2d) Yield 95%.mp. 156-158°C, IR (KBr) cm^{-1} : 2928, 1736, 1725. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.3 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.3 (C-18), 20.3 (C-19), 73.4 (C-3), 121.7 (C-6), 139.9 (C-5), 175.8 (ester carbonyl), 220.8 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_3$ 398.2821 found 398.2885.

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-cycloheptanoate (2e) Yield 99%.mp. 161-163°C, IR (KBr) cm^{-1} : 2923, 1737, 1725. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.3 (C-18), 20.3 (C-19), 73.2 (C-3), 121.7 (C-6), 139.9 (C-5), 176.6 (ester carbonyl), 221.4 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_3$ 412.2977 found 412.2945.

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-methoxybenzoate (2f) Yield 95%.mp. 209-211°C, IR (KBr) cm^{-1} :3034, 2936, 2890, 2853, 1736, 1702, 1606, 1512. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 3.86 (s, 3H, Ar-OCH $_3$),4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd. $J_1=$ 4 Hz and $J_2=$ 2Hz, H-6), 6.9 (2H, d, $J=$ 8 Hz, benzoic ring), 8.0 (2H, d, $J=$ 8 Hz, benzoic ring). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 19.5 (C-19), 74.1 (C-3), 122.0 (C-6), 140.2 (C-5), 113.6, 123.3, 131.7 and 163.2 (benzoic ring), 166.9 (ester carbonyl), 221.1 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 422.5564 found 422.5612

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-methylbenzoate (2g) Yield 88%.mp. 220-222°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3028, 2967, 2947, 2924, 2851, 2822, 1736, 1701, 1608, 1575. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 2.40 (s, 3H, Ar-CH $_3$),4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=$ 4 Hz and $J_2=$ 2Hz, H-6), 7.2 (2H, d, $J=$ 8 Hz, benzoic ring), 7.9 (2H, d, $J=$ 8 Hz, benzoic ring). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 19.5 (C-19), 74.2 (C-3), 122.1 (C-6), 140.1 (C-5), 128.1, 129.1, 129.7, 143.5 (benzoic ring), 166.2 (ester carbonyl), 221.3 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_3$ 406.5570 found 406.5512

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-benzoate (2h) Yield 86%. mp. 242-246°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3081, 2960, 2948, 2916, 2893, 2839, 2822, 1735, 1711, 1602, 1585. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19),4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=$ 4 Hz and $J_2=$ 2Hz, H-6), 7.4 (2H, d, $J=$ 8 Hz, benzoic ring), 7.6 (1H, t, $J=$ 8 Hz, benzoic ring), 8.0 (2H, d, $J=$ 8 Hz, benzoic ring). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 19.6 (C-19), 74.5 (C-3), 122.2 (C-6), 140.1 (C-5), 128.4, 129.7, 130.9, 132.9 (benzoic ring), 166.1 (ester carbonyl), 221.2 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 392.5304 found 392.5292

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-trifluoromethylbenzoate (2i) Yield 83%.mp. 225-227°C, IR (KBr) cm^{-1} :3068, 2934, 2886, 2857, 1793, 1721, 1650, 1585. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)

δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 8.1 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 19.5 (C-19), 75.2 (C-3), 122.4 (C-6), 139.8 (C-5), 119.7, 122.4, 125.1, 127.9 (Ar- CF_3), 125.4, 125.5, 133.9, 134.2, 134.6, 134.9, 134.1 (benzoic ring), 164.8 (ester carbonyl), 221.0 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{O}_3$ 460.5284 found 460.5212

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-cyanobenzoate (2j) Yield 70%.mp. 236-238 $^\circ\text{C}$, IR (KBr) cm^{-1} : 3064, 2933, 2909, 2823, 2879, 3054, 2232, 1736, 1710, 1627, 1570. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 8.1 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.5 (C-19), 75.5 (C-3), 118.2 (Ar- CN), 122.5 (C-6), 139.7 (C-5), 116.4, 130.2, 132.3, 134.7 (benzoic ring), 164.4 (ester carbonyl), 221.0 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{NO}_3$ 417.5399 found 417.5313

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-nitrobenzoate (2k) Yield 79%.mp. 204-206 $^\circ\text{C}$, IR (KBr) cm^{-1} : 3113, 2943, 2890, 2853, 1736, 1716, 1525, 1605. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 8.2 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 8.3 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.5 (C-19), 75.7 (C-3), 122.5 (C-6), 139.7 (C-5), 130.8, 123.6, 136.2, 150.6 (benzoic ring), 164.2 (ester carbonyl), 221.1 (C-17). HRMS cal. for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{NO}_5$ 437.5285 found 437.5198

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-fluorobenzoate (2l) Yield 88%.mp. 208-209 $^\circ\text{C}$, IR (KBr) cm^{-1} : 3111, 2948, 285, 2825, 1741, 1709. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (2H, dd, $J_1=8$ Hz and $J_2=2$ Hz, benzoic ring), 8.1 (2H, dd, $J_1=7$ Hz, $J_2=5$ Hz, benzoic ring). ^{13}C -NMR

(CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 19.6 (C-19), 74.6 (C-3), 122.2 (C-6), 139.9 (C-5), 115.4, 115.6, 127.1, 127.1, 132.1, 132.2, 164.5, 167.1 (benzoic ring), 165.1 (ester carbonyl), 221.1 (C-17). HRMS cal. for C₂₆H₃₁FO₃ 410.5209 found 410.4985

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-chlorobenzoate (2m) Yield 87%.mp. 231-234°C, IR (KBr) cm⁻¹:3041, 2947, 2888, 2844, 1739, 1719, 1626, 1592. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1= 4$ Hz and $J_2= 2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, d, $J= 8$ Hz, benzoic ring), 8.0 (2H, d, $J= 8$ Hz, benzoic ring). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 19.6 (C-19), 74.8 (C-3), 122.3 (C-6), 139.9 (C-5), 128.8, 129.3, 131.1, 139.3 (benzoic ring), 165.3 (ester carbonyl), 221.2 (C-17). HRMS cal. for C₂₆H₃₁ClO₃ 426.9755 found 426.9712

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-bromobenzoate (2n) Yield 91%.mp. 223-225°C, IR (KBr) cm⁻¹:3035, 2927, 2849, 1736, 1703, 1622, 1570. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1= 4$ Hz and $J_2= 2$ Hz, H-6), 7.6 (2H, d, $J= 8$ Hz, benzoic ring), 7.9 (2H, d, $J= 8$ Hz, benzoic ring). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 19.6 (C-19), 74.8 (C-3), 122.3 (C-6), 139.9 (C-5), 128.0, 129.8, 131.2, 131.8 (benzoic ring), 165.4 (ester carbonyl), 221.3 (C-17). HRMS cal. for C₂₆H₃₁BrO₃ 471.4265 found 471.4295

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-iodobenzoate (2o) Yield 89%.mp. 235-239°C, IR (KBr) cm⁻¹:3035, 2947, 2908, 2893, 2839, 1731, 1713, 1585. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1= 4$ Hz and $J_2= 2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, d, $J= 8$ Hz, benzoic ring), 7.8 (2H, d, $J= 8$ Hz, benzoic ring). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 19.6 (C-19), 74.8 (C-3), 122.3 (C-6), 139.9 (C-5), 100.7, 130.3, 131.2,

137.7(benzoic ring), 165.6 (ester carbonyl), 221.2 (C-17). HRMS cal. for $C_{26}H_{31}IO_3$ 518.4270 found 518.4298

Synthesis of 17-oxoandrost-5-en-3-yl-3 β -formate (2p)

In a round-bottomed flask, fitted with a magnetic stirrer, was added 500 mg of dehydroepiandrosterone (1.7 mmol) and 40 mL of formic acid, the reaction was refluxed for 5 hours. The solution was quenched a saturated solution of sodium bicarbonate, the white precipitate was filtered under vacuum to obtain 490 mg of 3 β -formyl-oxy-5-androsten-17-one. Yield 89.3%. mp. 143-145°C, IR (KBr) cm^{-1} : 2964.45, 2941.61, 2890.43, 2824.65, 1736.86, 1702.53. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 8.03 (1H, s, formate). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 13.7 (C-18), 19.5 (C-19), 73.8 (C-3), 122.4 (C-6), 139.7 (C-5), 160.7 (formate), 221.1 (C-17). HRMS cal. for $C_{20}H_{28}O_3$ 316.4352 found 316.4312

Synthesis of 16-formyl-17-chloroandrosta-5,16-diene derivatives

Into a round-bottomed flask, fitted with a magnetic stirrer and cold dimethylformamide (43 mmol) was added dropwise phosphorus oxychloride (36 mmol) followed by a solution of the corresponding ester in chloroform (1 mmol) (5 mL). The mixture was refluxed for 5 h under N_2 . The reaction was quenched with a saturated solution of sodium bicarbonate (10 mL). The compound was extracted with chloroform, and the organic phase was washed with water and dried over anhydrous sodium sulfate. The compound was purified on silica gel chromatography.

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-cyclopropanoate (3a) Yield 72%. mp. 124-126 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2928, 1717, 1674, 1589. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.3 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 9.9

(1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2 (C-18), 20.3 (C-19), 73.5 (C-3), 121.7 (C-6), 136.4 (C-16), 140.1 (C-5), 162.2(C-17), 174.2 (ester carbonyl), 188.0 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{ClO}_3$ 402.1962 found 402.1922.

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-cyclobutanoate (3b) Yield 69%. mp. 152-154 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2941, 1719, 1671, 1586. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 9.9 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.1 (C-18), 20.2 (C-19), 73.2 (C-3), 121.6 (C-6), 136.3 (C-16), 139.9 (C-5), 162.2 (C-17), 174.8 (ester carbonyl), 187.9 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{ClO}_3$ 416.2118 found 416.2189.

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-cyclopentanoate (3c) Yield 70%. mp. 180-182 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2927, 1728, 1708, 1667, 1590. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 9.9 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2 (C-18), 20.2 (C-19), 73.2 (C-3), 121.6 (C-6), 136.4 (C-16), 140.1 (C-5), 162.1 (C-17), 176.2 (ester carbonyl), 186.0 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{ClO}_3$ 430.2275 found 430.2210.

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-cyclohexanoate (3d) Yield 71%. mp. 166-168 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2929, 1727, 1668, 1592. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 9.9 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2 (C-18), 20.3 (C-19), 72.9 (C-3), 121.6 (C-6), 136.4 (C-16), 140.1 (C-5), 162.2 (C-17), 175.5 (ester carbonyl), 188.0 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{ClO}_3$ 444.2431 found 444.2487.

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-cycloheptanoate (3e) Yield 70%. mp. 215-217 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2946, 1719, 1671, 1667, 1585. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9

(3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 4.5 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 9.9 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2 (C-18), 20.3 (C-19), 73.1 (C-3), 121.6 (C-6), 136.4 (C-16), 140.1 (C-5), 162.2 (C-17), 176.5 (ester carbonyl), 188.0 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{ClO}_3$ 458.2588 found 458.2514.

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-methoxybenzoate (3f) Yield 62%. mp. 204-206 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3031, 2960, 2930, 2960, 2891, 2844, 2861, 1700, 1669, 1603, 1511. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 3.9 (3H, s, Ar- CH_3), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 6.6 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 8.0 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 55.6 (Ar- OCH_3), 74.1 (C-3), 113.6, 123.3, 131.7, 163.4 (benzoic ring), 122.0 (C-6), 136.6 (C-16), 140.2 (C-5), 162.5 (C-17), 165.9 (ester carbonyl), 188.3 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{ClO}_4$ 469.0122 found 469.0195

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-methylbenzoate (3g) Yield 60%. mp. 219-221 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3033, 2928, 2893, 2857, 2727, 1706, 1672, 1608, 1589. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 3.9 (3H, s, Ar- CH_3), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 6.6 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 8.0 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 74.1 (C-3), 113.6, 123.3, 131.7, 163.4 (benzoic ring), 122.0 (C-6), 136.6 (C-16), 140.2 (C-5), 162.5 (C-17), 165.9 (ester carbonyl), 188.3 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{ClO}_3$ 453.0128 found 453.0198

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-benzoate (3h) Yield 47%. mp. 177-179 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3032, 2940, 2926, 2892, 2833, 2860, 1708, 1664, 1590. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1=4$ Hz and

$J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, t, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 7.5 (1H, ddd, $J_1 = 7, J_2 = 4, J_3 = 1$ Hz, benzoic ring), 8.0 (2H, t, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 74.4 (C-3), 128., 129.7, 130.8, 132.9 (benzoic ring), 122.1 (C-6), 136.6 (C-16), 140.1 (C-5), 162.5 (C-17), 166.1 (ester carbonyl), 188.2 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{ClO}_3$ 438.9862 found 438.9812

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-trifluorobenzoate (3i) Yield 83%. mp. 198-200 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2948, 2912, 2869, 2825, 2723, 1716, 1674, 1588. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 8.1 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 75.1 (C-3), 119.72, 122.43, 125.14, 127.86 (Ar- CF_3), 125.4, 125.5, 130.1, 134.0, 134.1, 134.3, 134.6, 134.9 (benzoic ring), 122.2 (C-6), 136.6 (C-16), 139.9 (C-5), 162.3 (C-17), 164.9 (ester carbonyl), 188.2 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{ClO}_3$ 506.9842 found 506.9812

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-cyanobenzoate (3j) Yield 36%. mp. 212-215 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3052, 2936, 2905, 2852, 2228, 1715, 1669, 1588. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 8.1 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 75.4 (C-3), 118.2 (Ar- CN), 132.3, 134.7, 130.2, 116.4 (benzoic ring), 122.5 (C-6), 136.6 (C-16), 139.8 (C-5), 162.4 (C-17), 164.4 (ester carbonyl), 188.2 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{ClNO}_3$ 463.9957 found 463.9913

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-nitrobenzoate (3k) Yield 65%. mp. 238-241 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3057, 2950, 2936, 2912, 2958, 2824, 2724, 1711, 1668,

1586, 1526. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 8.2 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 8.3 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 75.6 (C-3), 123.6, 130.8, 136.3, 150.6 (benzoic ring), 122.5 (C-6), 136.6 (C-16), 139.7 (C-5), 162.3 (C-17), 164.2 (ester carbonyl), 188.2 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{ClNO}_5$ 483.9843 found 483.9814

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-fluorobenzoate (3l) Yield 79%. mp. 166-168 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3052, 2977, 2957, 2932, 2853, 1714, 1663, 1601, 1585. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 7.1 (2H, dd, $J_1=8$ Hz, $J_2=2$ Hz benzoic ring), 8.0 (2H, ddd, $J_1=5$, $J_2=2$, $J_3=1$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 74.6 (C-3), 115.4, 115.6, 127.1, 132.1, 132.2, 164.5, 167.1 (benzoic ring), 122.2 (C-6), 136.6 (C-16), 140.0 (C-5), 162.3 (C-17), 165.1 (ester carbonyl), 188.1 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{ClFO}_3$ 456.9767 found 456.9716

16-formyl-17-chloroandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-chlorobenzoate (3m) Yield 46%. mp. 186-187 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3038, 2975, 2960, 2929, 2905, 2852, 2735, 1718, 1669, 1585. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 8.0 (2H, d, $J_1=8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 74.7 (C-3), 128.76, 129.32, 131.08, 139.35 (benzoic ring), 122.3 (C-6), 136.6 (C-16), 140.0 (C-5), 162.4 (C-17), 165.2 (ester carbonyl), 188.2 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{O}_3$ 473.4313 found 473.4378

16-formyl-17-chloroandrosta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-bromobenzoate (3n) Yield 65%. mp. 178-180 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3036, 2928, 2888, 2855, 1711, 1668, 1587. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 7.6 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 7.9 (2H, d, $J_1=8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 74.7 (C-3), 128.0, 129.7, 131.2, 131.7 (benzoic ring), 122.2 (C-6), 136.6 (C-16), 140.0 (C-5), 162.4 (C-17), 165.4 (ester carbonyl), 188.2 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{BrClO}_3$ 517.8823 found 517.8869

16-formyl-17-chloroandrosta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-iodobenzoate (3o) Yield 53%. mp. 170-173 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3035, 2939, 2858, 1707, 1664, 1586.4. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 7.8 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.4 (C-19), 74.8 (C-3), 100.7, 130.3, 131.1, 137.8 (benzoic ring), 122.2 (C-6), 136.6 (C-16), 140.0 (C-5), 162.4 (C-17), 165.6 (ester carbonyl), 188.2 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{ClIO}_3$ 564.8827 found 564.8893

16-formyl-17-chloroandrosta-5,16-diene-3 β -yl-formate (3p) Yield 64%. mp. 159-161 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2952, 2922, 2905, 2893, 2866, 2854, 2830, 2730, 1712, 1665, 1584. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.7 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 8.0 (1H, s, formate), 10.0 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 15.1 (C-18), 19.3 (C-19), 73.7 (C-3), 122.3 (C-6), 136.6 (C-16), 139.8 (C-5), 162.4 (C-17), 162.4 (ester carbonyl), 188.2 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClO}_3$ 362.8902 found 362.8975

Synthesis of 16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl derivatives.

A mixture of 1,2,4-triazole (3 mmol), K_2CO_3 (6 mmol) and the corresponding 16-formyl-17-chloroandrosta-5,16-diene-3 β -yl derivative (1 mmol) in dry DMF (5 mL) was heated at 50 °C under N_2 atmosphere for 3 h. Cold water was added and the solid was filtered. The compound was purified by column chromatography on florisil.

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-cyclopropanoate (4a). Yield 93%. mp. 190-192 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2933, 1721, 1662, 1613. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromatic), 8.4 (1H, s, aromatic), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.5 (C-3), 121.7 (C-6), 132.3 (C-16), 140.5 (C-5), 143.7 (C-17), 153.1 (aromatic), 156.7 (aromatic), 174.2 (ester carbonyl), 189.0 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{26}H_{33}N_3O_3$ 435.5585 found 435.5518.

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-cyclobutanoate (4b). Yield 89%. mp. 199-201 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2940, 1724, 1664, 1613. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromatic), 8.4 (1H, s, aromatic), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.2 (C-3), 121.6 (C-6), 132.3 (C-16), 140.0 (C-5), 143.6 (C-17), 153.0 (aromatic), 156.7 (aromatic), 174.9 (ester carbonyl), 189.0 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{27}H_{35}N_3O_3$ 449.5851 found 449.5812.

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-cyclopentanoate (4c). Yield 91%. mp. 249-251 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2937, 1728, 1667, 1618. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.5 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromatic), 8.4 (1H, s, aromatic), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.2 (C-3), 121.6 (C-6), 132.3 (C-16), 140.1 (C-

5), 143.6 (C-17), 152.9 (aromatic), 156.4 (aromatic), 175.9 (ester carbonyl), 189.1 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{28}H_{37}N_3O_3$ 463.6117 found 463.6167.

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-cyclohexanoate

(4d). Yield 93%.mp. 232-234 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2938, 1728, 1667, 1617. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.5 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromatic), 8.4 (1H, s, aromatic), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.0 (C-3), 121.6 (C-6), 132.3 (C-16), 140.1 (C-5), 143.8 (C-17), 153.0 (aromatic), 156.7 (aromatic), 175.5 (ester carbonyl), 189.9 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{29}H_{39}N_3O_3$ 477.6383 found 477.6319.

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-cycloheptanoate

(4e). Yield 91%.mp. 195-197 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2934, 1728, 1668, 1618. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, aromatic), 8.4 (1H, s, aromatic), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 73.0 (C-3), 121.1 (C-6), 132.3 (C-16), 140.1 (C-5), 143.6 (C-17), 153.0 (aromatic), 156.6 (aromatic), 175.5 (ester carbonyl), 188.8 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{30}H_{41}N_3O_3$ 491.6648 found 491.6699.

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-4-methoxybenzoate

(4f). Yield 70.4% mp. 209-211 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 3116, 2939, 1702, 1663, 1579, 1275. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH $_3$), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1=4$ Hz and $J_2=2$ Hz, H-6), 6.9 (2H, d, $J=8$ Hz, benzoic ring), 7.9 (2H, t, $J=8$ Hz, benzoic ring), 8.1 (1H, s, triazole ring), 8.4 (1H, s, triazole ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 19.2 (C-18), 20.4 (C-19), 55.4 (OCH $_3$), 74.1 (C-3); 113.50, 123.1, 131.5 and 163.2 (benzoic ring); 121.7 (C-6), 132.3 (C-16), 156.7 (C-5),

140.1 (C-17), 143.6 and 153.0 (triazole ring), 165.7 (ester carbonyl), 189.0 (aldehyde).

HRMS cal. for C₃₀H₃₅N₃O₄ 501.6166, found 501.6113

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-methylbenzoate (4g). Yield 68.6% mp. 239-241°C, IR (KBr) cm⁻¹: 3110, 2926, 1714, 1661, 1605, 1522. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 2.4 (3H, s, Ar-CH₃); 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.2 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 7.9 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 8.1 (1H, s, triazole ring), 8.4 (1H, s, triazole ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 21.8 (Ar-CH₃), 74.2 (C-3); 143.7 and 153.0 (triazole ring); 128.2, 129.1, 129.7 and 143.5 (benzoic ring); 122.2 (C-6), 140.2 (C-5), 161.2 (C-17), 166.2 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for C₃₀H₃₅N₃O₃ 485.6172 found 485.6115

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-benzoate (4h). Yield 74.3% mp. 239-241°C, IR (KBr) cm⁻¹: 3065, 2938, 1709, 1667, 1599. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.4 (2H, t, $J = 8$ Hz benzoic ring); 7.5 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, benzoic ring); 8.0 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, benzoic ring); 8.1 (1H, s, triazole ring), 8.4 (1H, s, triazole ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 74.4 (C-3), 143.7 and 153.0 (triazole ring); 129.7, 128.4, 130.9, 132.9 (benzoic ring); 122.3 (C-6), 140.2 (C-5), 161.2 (C-17), 166.1 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for C₂₉H₃₃N₃O₃ 471.5906 found 471.5978

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-trifluoromethylbenzoate (4i). Yield 73.7% mp. 228-230 °C, IR (KBr) cm⁻¹: 3065, 2938,

1709, 1667, 1599. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, t, benzoic ring); 8.1 (3H, m, benzoic and triazolering), 8.4 (1H, s, triazole ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 75.1 (C-3), 143.6 and 153.0 (triazole ring); 125.4, 125.5, 130.1, 134.3, 134.1, 134.6 (benzoic ring); 119.6, 122.4, 125.2, 127.2 (-CF₃), 122.6 (C-6), 129.7 (C-16), 139.8 (C-5), 161.2 (C-17), 164.9 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for C₃₀H₃₂F₃N₃O₃, 539.5885 found 539.5817

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3β-yl-*p*-cyanobenzoate (4j). Yield 75.8% mp. 235-237⁰C, IR (KBr) cm⁻¹: 3110, 2926, 2237, 1715, 1497, 1567. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.7 (2H, t, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 8.1 (3H, m, triazole and benzoic ring), 8.4 (1H, s, triazole ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 75.4 (C-3), 118.2 (Ar-CN), 143.7 and 153.0 (triazole ring); 116.4, 130.2, 132.3, 134.7 (benzoic ring); 122.6 (C-6), 129.6 (C-16), 139.7 (C-5), 161.1 (C-17), 164.4 (ester carbonyl), 190.5 (aldehyde). HRMS cal. for C₃₀H₃₂N₄O₃ 496.6000 found 496.6012

16-formyl-17-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3β-yl-*p*-nitrobenzoate (4k). Yield 73.8% .mp. 262-264⁰C, IR (KBr) cm⁻¹: 3110, 2926, 1714, 1661, 1605, 1522. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd. $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 8.1 (1H, s, triazole ring), 8.2 (2H, d, $J = 8.0$ Hz benzoic ring), 8.3 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, benzoic ring), 8.4 (1H, s, triazole ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 75.7 (C-3), 143.7 and 153.0 (triazole ring), 123.6, 131.2, 136.3, 150.6 (benzoic ring); 122.7 (C-6), 129.6 (C-16), 139.7 (C-5), 161.2 (C-17),

165.6 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{29}H_{32}N_4O_5$ 516.5887 found 516.5813

Synthesis of 16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl derivatives.

A mixture of pyrazole (2 mmol), CS_2CO_3 (2 mmol) and the corresponding 16-formyl-17-chloroandrosta-5,16-diene-3 β -yl derivate (1mmol) in dry DMF (5mL) was heated at 60 °C under N_2 atmosphere for 2 h. Cold water was added and the solid was filtered. The compound was purified by column chromatography on florisil.

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-methoxybenzoate (5f). Yield 50.2 %. mp. 208-210 °C, IR (KBr) cm^{-1} :3118, 2937, 2854, 1701, 1642, 1604. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 3.86 (3H, s, Ar-OCH₃), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring); 6.9 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz pyrazole ring); 8.0 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 16.2 (C-18), 19.6 (C-19), 55.6 (OCH₃), 74.1 (C-3); 108.5, 132.1 and 143.4 (pyrazole ring), 113.6, 123.3, 131.7 and 163.2 (benzoic ring); 122.1 (C-6), 129.6 (C-16), 140.2 (C-5), 161.2 (C-17), 166.8 (ester carbonyl), 190.7 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{31}H_{36}N_2O_4$, 500.6285 found 500.6217

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-methylbenzoate (5g). Yield 48.5%.mp. 278-281°C, IR (KBr) cm^{-1} :3124, 2954, 2939, 2911, 2864, 2740, 1707, 1660, 1604. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 2.4 (3H, s, Ar-CH₃); 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.2 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole

ring); 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz pyrazole ring); 7.9 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 21.8 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 74.2 (C-3); 108.1, 130.7 and 143.5 (pyrazole ring); 128.2, 129.1, 129.7 and 143.5 (benzoic ring); 122.2 (C-6), 140.2 (C-5), 161.2 (C-17), 166.2 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3$ 484.6291 found 484.6235

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-benzoate (5h). Yield 56.6%.mp. 244-246°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3123, 2938, 2851, 1709, 1658, 1602. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.4 (2H, t, $J = 8$ Hz benzoic ring); 7.5 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, benzoic ring), 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz pyrazole ring); 8.04 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, benzoic ring); 10.1 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 74.4 (C-3), 108.1, 130.7 and 142.6 (pyrazole ring); 129.7, 128.4, 130.9, 132.9 (benzoic ring); 122.3 (C-6), 140.2 (C-5), 161.2 (C-17), 166.1 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$ 470.6025 found 470.6089

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-trifluoromethylbenzoate (5i). Yield 60.7%.mp. 232-235°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3127, 2944, 2855, 1714, 1655, 1598. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring), 7.7 (3H, m, benzoic ring and pyrazole ring), 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 8.2 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 75.1 (C-3), 108.1, 130.7 and 142.6 (pyrazole ring); 125.4, 125.5, 130.1, 134.3, 134.1, 134.6 (benzoic ring); 119.6, 122.4, 125.2, 127.2 ($-\text{CF}_3$), 122.6 (C-6), 129.7 (C-16),

139.8 (C-5), 161.2 (C-17), 164.9 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{31}H_{33}F_3N_3O_3$, 538.6005 found 538.6086

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-cyanobenzoate

(5j). Yield 51.4%.mp. 179-181°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3124, 2931, 2894, 2857, 2228, 1716, 1646, 1588. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring), 7.6-7.7 (4H, m, pirazol ring and benzoic ring), 8.1 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 75.4 (C-3), 118.2 (Ar-CN), 108.1, 130.7 and 142.6 (pyrazole ring); 116.4, 130.2, 132.3, 134.7 (benzoic ring); 122.6 (C-6), 129.6 (C-16), 139.7 (C-5), 161.1 (C-17), 164.4 (ester carbonyl), 190.5 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{31}H_{33}N_3O_3$ 495.6120 found 495.6182

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-nitrobenzoate

(5k). Yield 50.0%.mp. 262-264°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3125, 2928, 2894, 2851, 1718, 1651, 1590, 1525. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring), 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 8.2 (2H, d, $J = 8.0$ Hz benzoic ring), 8.3 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, benzoic ring); 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 75.7 (C-3), 108.1, 130. 515.60697 and 142.6 (pyrazole ring); 123.6, 131.2.136.3, 150.6. (benzoic ring); 122.7 (C-6), 129.6 (C-16), 139.7 (C-5), 161.2 (C-17), 165.6 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $C_{30}H_{33}N_3O_5$ 515.6006 found

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-fluorobenzoate

(5l). Yield 66.7%.mp. 226-228°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3124, 2960, 2939, 2914, 2894, 2865,

2851, 2744, 1708, 1655, 1600. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.1 (2H, dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, benzoic ring), 8.0 (2H, ddd, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, $J_3 = 1$ Hz, benzoic ring), 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 10.1 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 74.6 (C-3), 108.1, 130.7 and 142.6 (pyrazole ring); 115.43, 115.65, 127.09, 127.12, 132.15, 132.24, 164.55 and 167.08 (benzoic ring); 122.3 (C-6), 129.7 (C-16), 140.0 (C-5), 161.2 (C-17), 166.1 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{FN}_2\text{O}_3$ 488.5930 found 488.5989

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-chlorobenzoate

(5m). Yield 52.2%. mp. 235-237°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3121, 2936, 2851, 1709, 1657, 1600. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$ and $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring), 7.40 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 8.0 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring); 10.1 (1H, s, aldehyde). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 74.8 (C-3), 108.1, 130.7 and 142.6 (pyrazole ring); 128.8, 129.3, 131.1, 139.4 (benzoic ring); 122.4 (C-6), 129.7 (C-16), 139.9 (C-5), 161.2 (C-17), 165.2 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_3$ 505.0476 found 505.0412

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-bromobenzoate

(5n). Yield 51.1%. mp. 239-241°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3120, 3032, 2918, 2850, 1710, 1657, 1601. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring), 7.6 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring); 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole

ring); 7.90 (2H, d, $J = 8$ Hz, benzoic ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 74.8 (C-3), 108.1, 130.7 and 142.6 (pyrazole ring); 129.8, 131.2, 131.8, 128.0 (benzoic ring); 122.4 (C-6), 129.7 (C-16), 139.9 (C-5), 161.2 (C-17), 165.4 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{BrN}_2\text{O}_3$ 549.4986 found 549.4914

16-formyl-17-(1H-pyrazole-1-yl)androsta-5,16-diene-3 β -yl-*p*-iodobenzoate (5o).

Yield 51.4%.mp. 179-181°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3124, 2918, 2850, 1711, 1651, 1599. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring), 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring), 7.40-8.01 (6H, m, benzoic ring and pyrazole ring), 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 74.8 (C-3), 108.1, 130.7 and 142.6 (pyrazole ring); 100.7, 130.4, 130.8, 137.8, (benzoic ring); 122.4 (C-6), 129.7 (C-16), 139.9 (C-5), 161.2 (C-17), 165.6 (ester carbonyl), 190.6 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{IN}_2\text{O}_3$ 596.4990 found 596.4916

Synthesis of 16-formyl-3-hydroxyandrosta-5, 16-diene-(1H-pyrazole-1-yl) (6)

A mixture of pyrazole (41 mg, 0.6 mmol), cesium carbonate (195 mg, 0.6 mmol), steroid **12** (100 mg, 0.3 mmol) and dry DMF (2 mL) was heated at 60°C under N_2 atmosphere for 2 h. After this time, cold water was added and the precipitate was filtered; it was dissolved in methanol (2 mL), chloroform (2 mL) and 36% hydrochloric acid (4 drops). The hydrolysis was carried out at 40°C for 3 h. The reaction mixture was neutralized with sodium bicarbonate and the precipitate was filtered. The crude product was purified by column chromatography on florisil.

Yield 72%.mp. 216-218°C, IR (KBr) cm^{-1} : 3373, 3139, 3125, 2930, 2906, 1633, 1602. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.1 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 3.5 (1H, m, H-3), 5.4 (1H,

dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.5 (1H, dd, $J_1 = 3$, $J_2 = 2$ Hz, pyrazole ring), 7.7 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 7.8 (1H, d, $J = 2$ Hz, pyrazole ring); 10.1 (1H, s, aldehyde). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 16.2 (C-18), 19.5 (C-19), 71.7 (C-3), 108.1, 130.6 and 142.6 (pyrazole ring); 121.2 (C-6), 129.6 (C-16), 141.1 (C-5), 161.2 (C-17), 190.8 (aldehyde). HRMS cal. for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2$ 366.4965 found 366.4913

Biological material

The panel cancer cells used in this study were the following: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF-7 (human breast cancer cell line) and SKLU-1 (human lung cancer cell line) and were supplied by the National Cancer Institute (USA). The ketoconazol used as a reference in this experiment was purchased from Sigma Life Science.

Cytotoxicity Assay.

The compounds were screened *in vitro* against three human cancer cell lines: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF-7 (human breast cancer cell line) and SKLU-1 (human lung cancer cell line); the cell lines were supplied by National Cancer Institute (USA). The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth. The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin G sodium, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin sulfate, and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B (Gibco) and 1% nonessential aminoacids (Gibco). They were maintained at 37° in humidified atmosphere with 5% CO_2 . The viability of the cells used in the experiments exceeds 95% as determined with trypan blue.

The cells were removed from the tissue culture flask and diluted with fresh media. Of this cell suspension, 100 μL containing 5000 or 10000 cells per well (depending on the duplication time), were pipetted into microtiter plates (Costar) and the material was incubated at 37 °C for 24 h

in a 5% CO₂ atmosphere, additionally, a plate was prepared with culture medium only and it was incubated for one hour. Subsequently, 100 µL of a solution of the test compounds obtained by diluting the stocks were added to each well.

The cultures were exposed for 48 h to the compounds at concentration of 50 µM; after the incubation period, the cells were fixed to the plastic substrate by the addition of 50 µL of cold 50% aqueous trichloroacetic acid. The plates were incubated at 4 °C for 1 h, washed with tap H₂O and air-dried. The trichloroacetic-acid-fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB. Free SRB solution was removed by washing with 1% aqueous acetic acid. The plates were air dried, and the bound dye was solubilized by the addition of 10 mM of unbuffered tris base (100 µL). The plates were placed on a vortex for 5 min, and the absorption was determinate at 515 nm using an ELISA plates reader (Bio-Tex Instruments). Percentage cell growth inhibition was calculated according to the following expression:

$$\text{Cell growth inhibition (\%)} = \frac{100 - (\text{sample absorption})}{(\text{vehicle absorption})} \times 100$$

Acknowledgement

The authors thank DGAPA, project IN 211312 (UNAM) and CONACYT, project 165049 for the financial support

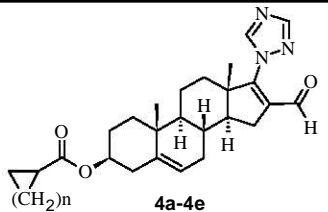
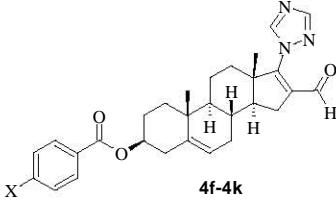
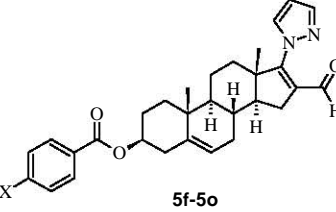
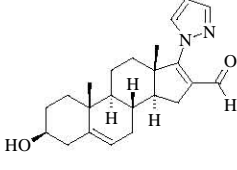
References

1. S.T. Pearce, V.C. Jordan, The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 50 (2004) 3–22.
2. C.C. Schneider, R.K. Cibb, D.D. Taylor, T. Wan, C. Gerçel-Taylor, Inhibition of endometrial cancer cell lines by mifepristone (RU840) , *J. Soc. Gynecol. Investig.* 5 (1998) 334-338.
3. R. Minorics, N. Bózsity, J. Wölfling, E. Mernyák, G. Schneider, Á. Márki, G. Falkay, I. Ocsovszki, I. Zupkó, Antiproliferative effect of normal and 13-epi-d-homoestrone and their 3-methyl ethers on human reproductive cancer cell lines, *J. Steroid Bioch. Mol. Biol.* 132 (2012) 168-175.
4. T. Nishiyama, Androgen deprivation therapy in combination with radiotherapy for high-risk clinically localized prostate cancer. *J. Steroid Bioch. Mol. Biol.* 129 (2012) 179– 190.
5. D.Q. Li, Z.B. Wang, J. Bai, Zhao J, Y. Wang, K. Hu, Y.H Du, Effects of mifepristone on proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 *in vitro*, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 2628-2631.
6. S. Niro, E. Pereira, M.A. Péliissier, R. Morfin, O. Hennebert. The DHEA metabolite 7 β -hydroxy-epiandrosterone exerts anti-estrogenic effects on breast cancer cell lines. *Steroids* 77 (2012) 542-551.
7. X. K. Liu, B. J. Ye, Y. Wu, J. X. Nan, Z. H. Lin, H. R. Piao. Synthesis and antitumor activity of dehydroepiandrosterone derivatives on AS-2, A549, and HepG2 cells *in vitro*. *Chem. Bio. Drug Des.* 79 (2012) 523-529

8. G. A. Elmegeed, W. K. B.Khalil, R. M. Mohareb, H. H. Ahmed, M. M. Abb-Elhalim, G. H. Elsayed. Cytotoxicity and gene expression profiles of novel synthesized steroid derivatives as chemotherapeutic anti-breast cancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 6860-6872.
9. V.M.A. Moreira, T.S. Vasaitis, Z. Guo, V. C. O. Njar, J. A. R. Salvador, Synthesis of novel C17 steroidal carbamates. Studies on CYP17 action, androgen receptor binding and function, and prostate cancer cell growth, *Steroids*. 73 (2008) 1217-1227.
10. M. Cabeza, E. Bratoeff, E. Ramírez, I. Heuze, S. Recillas, H. Berrios, A. Cruz, O. Cabrera, V. Perez, Biological activity of novel progesterone derivatives having a bulky ester side chains at C-3. *Steroid*. 73 (2008) 838-843.
11. S.Wilkinson, G. Chodak, An evaluation of intermediate-dose ketoconazole in hormone refractory prostate cancer, *Eur. Urol.* 45 (2004) 581-4.
12. L.S.M .Ngo, A. Yeo, A.S.C. Wong, M.H. Tay, Efficacy of Low-dose Ketoconazole in Hormone Refractory Prostate Cancer. Patients at the National Cancer Centre and The Cancer Institute, Singapore, *Ann. Acad. Med. Singapore* 36 (2007) 811-814.
13. S. Lee Mee, O. Hennebert, C. Ferrec, E. Morfin. 7β -Hydroxiepandrosterone-mediated regulation prostaglandin synthesis pathway in human peripheral blood monocytes. *Steroids* 73 (2008) 1148-1159.
14. P.L. Harkonen, H.K. Vaananen. Monocyte-macrophage system as a target for estrogen and selective estrogen receptors modulators. *Ann NY Acad. Sci.* 1089 (2006) 218-227.

15. K. Janis, J. Hoeltke, M. Nazareth, P. Fanti, K. Poppenberg, S. M. Aronica. Estrogen decreases expression of chemokine receptors, and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes. *Am J Reprod Immunol* 51 (2004) 22-31.
16. M. Miyagi, M. Morishita, Y. Iwamoto. Effects of sex hormones on production of prostaglandin E2 by human peripheral monocytes. *J. periodontol* 64 (993) 1075-1078.
17. P. Dey, Ponsson, J. Hartman, C. Williams, A. Strom, J. A. Gustafsson. Estrogen receptors β 1 and β 2 have opposing roles in regulating proliferation and bone metastasis genes in the prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* 26 (2012)- 1991-2003.
18. B. Halmos, D. S. Bassàres, S. Monti, F. D'Aló, T. Dayaram, K. Ferenczi, B. J. Wouters, C. S. Huettner, T. R. Golub, D. G. Tenen. A transcriptional profiling study of CCAAT/enhancer binding protein targets identifies hepatocyte nuclear factor 3β as a novel tumor suppressor. *Cancer Research* 64(2004) 4137-4147.
19. C. Kiyohara, Y. Ohno. Sex differences in lung cancer susceptibility: a review. *Gender Medicine* 7(2010) 381-401.
20. V. R Jala, B. N. Radde, B. Haribabu, C. M. Klinge. Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer. *BMC Cancer* 12 (2012) 624-636.

Table 1. Inhibitory activity of different dehydroepiandrosterone derivates on the growth of several cancer cell lines treated with 50 μ M of novel compounds.

Steroid Structure	Compound	n	X	PC-3	MCF7	SKLU-1
 4a-4e	4a	1	--	88.65 \pm 4	100 \pm 1.1	100 \pm 0.5
	4b	2	--	0.0	16.52 \pm 2.1	27 \pm 1.1
	4c	3	--	23.76 \pm 6.2	0.0	0.0
	4d	4	--	0.0	11 \pm 7.0	24.9 \pm 3.0
	4e	5	--	36.78 \pm 2.2	77.95 \pm 4.5	94.68 \pm 2.2
 4f-4k	4f	--	-OCH ₃	0.0	23.0 \pm 3.6	9.2 \pm 0.1
	4g	--	-CH ₃	3.1 \pm 0.3	48.7 \pm 5.7	68.0 \pm 4.2
	4h	--	-H	21.8 \pm 8.1	33.5 \pm 7.0	39.7 \pm 0.2
	4i	--	-CF ₃	100 \pm 1.2	100 \pm 2.3	89.1 \pm 7.0
	4j	--	-CN	100 \pm 2.4	100 \pm 3.3	89.9 \pm 5.9
	4k	--	-NO ₂	85.7 \pm 14.3	100 \pm 2.1	100 \pm 1.0
	5f	--	-OCH ₃	51.5 \pm 9.0	100 \pm 1.1	80.0 \pm 14.4
 5f-5o	5g	--	-CH ₃	0.0	0.0	8.5 \pm 3.1
	5h	--	-H	31.4 \pm 1.4	32.6 \pm 1.1	5.8 \pm 3.0
	5i	--	-CF ₃	78.2 \pm 2.0	0.0 \pm 2.3	73.3 \pm 3.3
	5j	--	-CN	30.4 \pm 8.1	81.2 \pm 7.0	22.5 \pm 2.0
	5k	--	-NO ₂	16.7 \pm 1.1	20.2 \pm 5.3	7.5 \pm 3.4
	5l	--	-F	20.5 \pm 8.9	50.7 \pm 7.4	5.5 \pm 0.9
	5m	--	-Cl	24.6 \pm 1.2	32.4 \pm 1.8	20.7 \pm 3.6
	5n	--	-Br	3.7 \pm 1.2	18.5 \pm 3.0	17.4 \pm 3.6
	5o	--	-I	58.4 \pm 3.4	96.8 \pm 3.2	93.5 \pm 11.2
	6	--	--	100 \pm 1.0	41.61 \pm 2.0	100 \pm 1.0
 6	Ketoconazole	--	--	88.48 \pm 3.9	95.16 \pm 4.8	73.39 \pm 1.6

Results are expressed as a percentage of inhibition \pm standard error

Synthesis of compounds 4a-4e Series 1

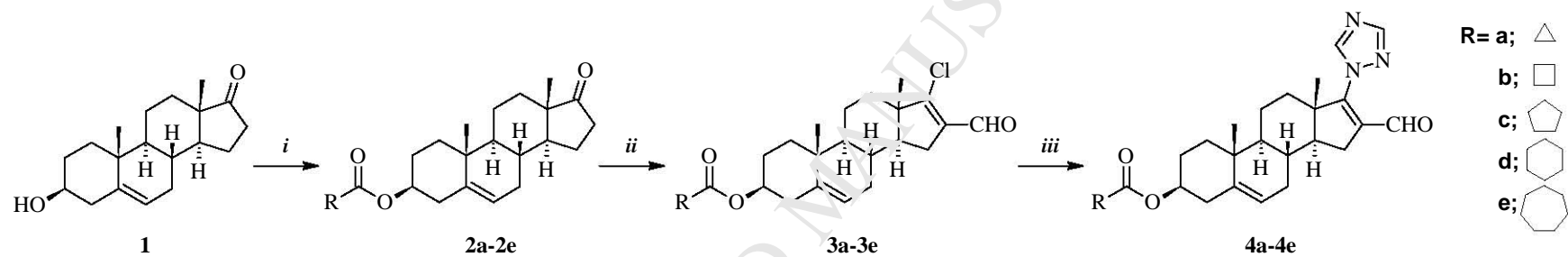


Figure 1. Reagents and conditions: *i*) RCOOH, DMAP, DCC, RT, 2h; *ii*) POCl₃, DMF, CHCl₃, reflux 5h; *iii*) 1,2,4-triazole, K₂CO₃, DMF, 50°C, 3h.

Synthesis of compounds 4f-4k Series 2

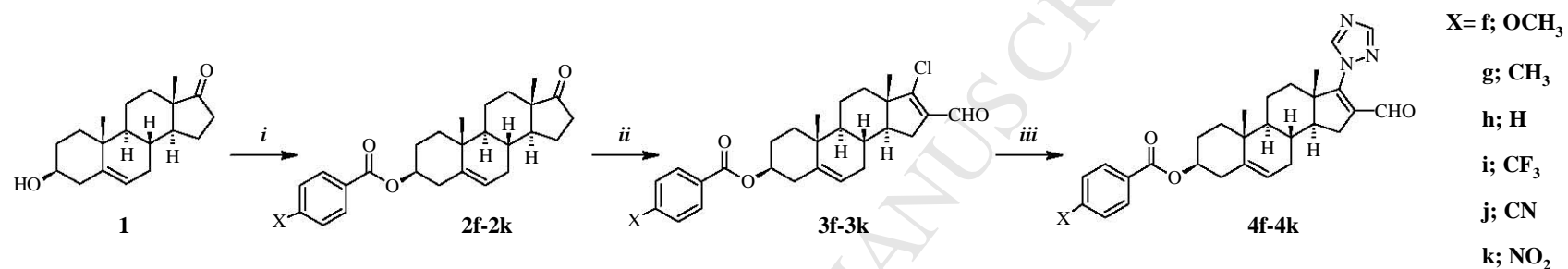


Figure 2. Reagents and conditions: *i*) RCOOH, DMF, DCC, RT 2h; *ii*) POCl₃, DMF, CHCl₃, reflux 5h; *iii*) 1,2,4-triazole, K₂CO₃, DMF, 50°C, 3h.

Synthesis of compounds 5f-5o and 6 Series 3

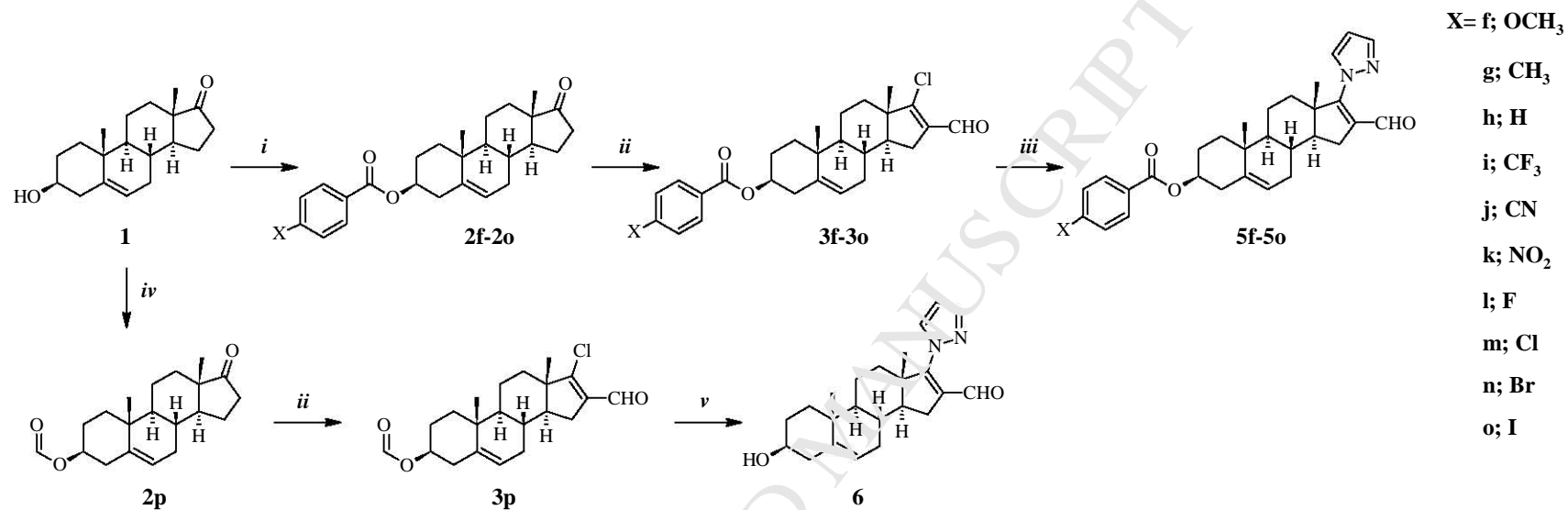


Figure 3. Reagents and conditions: *i*) RCOOH, DMF, DCC, RT 2 h; *ii*) POCl₃, DMF, CHCl₃, reflux 5h; *iii*) pirazole, Cs₂CO₃, DMF, 60°C, 2h; *iv*) Formic acid, reflux 5 h; *v*) 1. pirazole, Cs₂CO₃, DMF, 60°C, 2 h; 2. CHCl₃/MeOH, HCl, 40°C, 3 h.