



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL ANDROSTANO Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA COMO ANTIANDRÓGENOS Y ANTIPROLIFERATIVOS”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JUAN FRANCISCO CORTÉS BENÍTEZ

TUTOR: Dr. EUGENE BRATOEFF TITEFF[†]
SUPERVISOR: Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DEL 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Dr. Manuel Jiménez Estrada
Dr. Guillermo Delgado Lamas
Dr. Francisco Hernández Luis
Dr. José Alfredo Vázquez
Dr. Alejandro Cordero Vargas

Presidente
Vocal
Vocal
Vocal
Secretario

COMITÉ TUTOR

Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff[†]
Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Dr. Manuel Jiménez Estrada
Dra. Marisa Cabeza Salinas

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio 125 del Departamento de Farmacia, ubicado dentro del edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El desarrollo de esta investigación fue supervisado por el Dr. Eugene Bratoeff y, posteriormente, por el Dr. Rafael Castillo Bocanegra. El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto CB 2011/165049) así como por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-UNAM, proyecto IN211312).

Otra parte del proyecto se realizó durante una estancia de investigación (Noviembre 2015 - Noviembre 2016) en el Laboratorio de Química Farmacéutica del *Centre Hospitalier de l'Université Laval* (CHUL), en la ciudad de Québec, Canadá; bajo la supervisión del Dr. Donald Poirier. El financiamiento para el desarrollo de este proyecto provino de la fundación *Prostate Cancer Canada*.

CONACyT otorgó el apoyo económico de manutención durante ambos proyectos mediante los programas de *Becas nacionales* y *Becas mixtas* (número de becario 255249).

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

1. Internacionales:

- **58 Congreso de “Club de Recherches Cliniques du Quebec” (2016), Quebec, Canadá.** Presentación del cartel: “La synthèse chimique d’un dérivé stéroïdien ayant le méthyl-18 inversé comme inhibiteur de la 17 β -HSD3”.
- **250th American Chemical Society National Meeting & Exposition (2015), Boston, MA, U.S.A.** Presentación del cartel: “Synthesis of 17 β -*N*-arylcarbamoilandrost-4-en-3-one derivatives and their in vitro and in vivo effect as potent 5 α -reductase inhibitors”.

2. Nacionales:

- **58vo. Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y 6to. Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas (2015), Quintana Roo, México.** Presentación del cartel: “Síntesis y

actividad antiandrogénica de 17 β -*N*-arilcarbamoilandrost-4-en-3-ones para el tratamiento de neoplasias prostáticas”.

- **Primer simposio de “Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos” (2015), Ciudad de México, México.** Presentación del cartel: “Síntesis y actividad antiandrogénica de derivados de 17 β -*N*-arilcarbamoilandrost-4-en-3-ona”.
- **3er. Congreso de Química de la Universidad “La Salle” (2015), México D.F., México.** Presentación oral del trabajo: “Síntesis y actividad antiandrogénica de 17 β -*N*-arilcarbamoilandrost-4-en-3-onas”.
- **Cuarto congreso de alumnos de posgrado (2014), Ciudad de México, México.** Presentación del cartel: “Síntesis de derivados de 17 β -*N*-fenilcarbamoilandrostenona como antiproliferativos”.
- **10a. Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica (2014), San Luis Potosí, México.** Presentación del cartel: “Síntesis de derivados de 17 β -*N*-fenilcarbamoilandrostenona como inhibidores potenciales de la enzima 5 α -reductasa”.

Del presente trabajo se publicaron los siguientes artículos:

1. **F. Cortés-Benítez**, M. Cabeza, M.T. Ramírez-Apan, B. Alvarez-Manrique, E. Bratoeff, “Synthesis of 17 β -*N*-arylcarbamoilandrost-4-en-3-one derivatives and their anti-proliferative effect on human androgen-sensitive LNCaP cell line”, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 737–746. doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.059.
2. **F. Cortés-Benítez**, J. Roy, R. Maltais, D. Poirier, “Impact of androstane A- and D-ring inversion on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitory activity, androgenic effect and metabolic stability”, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 2065–2073. doi:10.1016/j.bmc.2017.02.008.

Dedicado a mis padres y hermanos por sus ejemplos de constancia y perseverancia

A Maru por su gran apoyo y motivación

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios: la UNAM por una vez más abrirme sus puertas y permitirme adquirir nuevos y valiosos conocimientos.

Quiero agradecer al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM por darme la oportunidad de formarme como Doctor en Ciencias.

Mi más sincero agradecimiento y admiración al Dr. Eugene Bratoeff (Q.D.E.P), no sólo por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, sino por haber sido un gran modelo académico a seguir, así como por su constante preocupación por el desempeño de sus estudiantes. Su labor siempre quedará grabada en mi memoria.

Al Dr. Rafael Castillo le expreso mi más sincero reconocimiento por tomar la responsabilidad de dirigir este proyecto a la mitad de su trayecto, por sus valiosos comentarios y aportes a este trabajo.

Le agradezco al comité tutor por estar al pendiente de que este proyecto saliera adelante. En especial agradezco al Dr. Manuel Jiménez E. por sus constantes palabras de aliento durante mi estancia en el extranjero.

Quiero agradecer a la Dra. Elena Ramírez López, por haber sido la guía que permitió que este trabajo siguiera un buen camino durante todos estos años, así como por su gran apoyo técnico.

A la M. en C. María Teresa Apan por su infinito y bien apreciable esfuerzo al realizar los ensayos sobre las líneas celulares cancerosas.

A la M. en C. María Eugenia Mendoza Jasso por su constante apoyo dentro y fuera del laboratorio, por ser la voz que impulsó muchas decisiones clave en el desarrollo de este proyecto de investigación. Agradezco también su apoyo por la revisión técnica de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mario Alberto Figueroa por su apoyo para la realización de la mayoría de los espectros de masas, así como su gran disposición para que este trabajo tuviera un avance satisfactorio.

A mis compañeros de trabajo del laboratorio 125: Alejandra Chávez, Iván Acevedo Hernández, Alfonsina Reyes, Tania Hernández, Sebastián Florez y Mario Díaz por su gran amistad. En especial, quisiera reconocer el gran apoyo técnico por parte de Mario Díaz, Tania Hernández y Alejandra Chávez.

En nombre del grupo de trabajo del Dr. Eugene Bratoeff, agradezco a la jefatura del Departamento de Farmacia por su respaldo en los momentos difíciles para que nuestros proyectos concluyeran satisfactoriamente.

Agradezco al Prof. Donald Poirier, por haber abierto las puertas de su laboratorio y depositar su confianza en mí para el desarrollo de un proyecto que ahora es parte del presente trabajo, así como por la gran oportunidad de permitirme un crecimiento profesional significativo derivado de su constante atención.

A mis compañeros del laboratorio de Química Farmacéutica del *Centre Hospitalier d'Université Laval*: Dr. René Maltais, Dr. Jean-Yves Sancéau, Marie-Claude Trottier, Dra. Jenny Roy, Dr. Martin Perrault, Raphaël Dutour, Maxime Lesperance y Sophie Boutin por su gran disposición y calidez que hicieron mi estancia fructífera y comfortable.

A los miembros del Jurado que con sus comentarios enriquecieron el contenido de este trabajo.

A la Coordinación de estudios de Posgrado de la UNAM por el apoyo económico de trasportación para la estancia de investigación en Canadá.

A la Dirección General del Personal Académico (DGAPA) por el financiamiento del proyecto IN211312.

Mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento del proyecto CB 2011/165049, así como por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de Doctorado y la estancia en el extranjero (número de becario: 25549).

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) y la hiperplasia prostática benigna (HPB) han sido un problema de salud importante en México ya que afectan a más del 21% y 55% de los hombres, respectivamente. El CaP tiene una alta incidencia, así como mortalidad. De acuerdo al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), 17 mexicanos mueren diariamente debido a un diagnóstico tardío de CaP. Por otra parte, la HPB también conocida como agrandamiento benigno de la próstata, es un problema común en varones por arriba de los 50 años de edad. El constante crecimiento de la próstata en la HPB afecta el tracto urinario haciendo esta enfermedad potencialmente mortal.

La quimioterapia es frecuentemente considerada como uno de las opciones principales para el tratamiento del CaP; sin embargo, debido a su pobre selectividad, esta terapia suele atacar tanto células cancerosas como sanas. Por otro lado, la terapia hormonal es otra opción para el tratamiento del CaP. Esta estrategia mejora significativamente la salud y ayuda a prolongar la esperanza de vida. Desafortunadamente, el CaP, habitualmente, evoluciona a una forma resistente. Por tanto, la terapia hormonal debe ser mejorada por medio del descubrimiento de nuevos candidatos a fármacos, más potentes y selectivos, para suplir estas terapias de primera línea.

El crecimiento anormal de las células prostáticas, ya sea en el CaP o HPB, depende de la testosterona (T) y su metabolito más androgénico, dihidrotestosterona (DHT); ambos andrógenos estimulan a los tumores andrógeno-dependientes de próstata. Entonces, suprimiendo la acción de T y DHT mediante la inhibición de enzimas clave involucradas en su síntesis es una estrategia interesante para disminuir la progresión de CaP e HPB. En este contexto, la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 β -HSD3) y la 5 α -reductasa (5 α R) son enzimas que juegan un papel crítico en la ruta androgénica. Tanto 17 β -HSD3 como 5 α R, son conocidas por catalizar los últimos pasos en la biosíntesis de los andrógenos activos T y DHT, respectivamente.

La presente tesis tiene como objetivo la síntesis de nuevos derivados esteroidales como inhibidores de 17 β -HSD3 y 5 α R. Adicionalmente, este trabajo pretende encontrar nuevas moléculas que puedan inhibir la proliferación del cáncer prostático o disminuir el crecimiento de la próstata con la finalidad de tratar el CaP o la HPB, respectivamente. La primer parte de esta tesis está dedicada a la síntesis química y la actividad biológica de 17 β -*N*-arilcarbamoilandro-4-en-3-onas. Estos compuestos fueron evaluados contra dos isoformas de la enzima 5 α R (5 α R1 y 5 α R2) así como células cancerosas de próstata. Las moléculas más potentes de ambos ensayos fueron, posteriormente, evaluadas en hámsteres gonadectomizados con el objetivo de determinar si estos esteroides son capaces de disminuir el peso de la glándula prostática. Por otro lado, la segunda parte de esta tesis está enfocada en la síntesis por modificaciones estructurales sistemáticas del compuesto RM-532-105 (compuesto líder) para obtener nuevos inhibidores de la 17 β -HSD3 con mejor estabilidad metabólica. Estos derivados fueron evaluados por medio de tres ensayos: inhibición directa de la 17 β -HSD3, actividad androgénica en células LAPC-4 y estabilidad metabólica en microsomas de hígado humano.

Los ensayos biológicos realizados mostraron que en la serie de 17 β -*N*-arilcarbamoilandro-4-en-3-onas, el compuesto 17 β -*N*-[3,5-bis(trifluorometil)fenilcarbamoil]andro-4-en-3-ona (**6k**) y 17 β -*N*-(1,3-tiazol-2-ilcarbamoil)andro-4-ene-3-ona (**6g**) exhibieron un mayor efecto inhibitorio sobre células cancerosas de próstata que los fármacos comerciales finasterida, flutamida y ketoconazol; mientras que los compuestos 17 β -*N*-(4-fluorofenilcarbamoil)andro-4-en-3-ona (**6e**) y 17 β -*N*-(4-clorofenilcarbamoil)andro-4-en-3-ona (**6h**) fueron los inhibidores más potentes de la enzima 5 α R2. Incluso, ambos compuestos disminuyeron el peso de la glándula prostática. Por otra parte, el derivado de RM-532-105 que contiene un grupo 4-picolilo unido a la posición C-16 β (esteroide **14n**) fue identificado como un inhibidor de la 17 β -HSD3 con dos veces menos potencia que el compuesto líder. No obstante, esta molécula mostró un efecto citotóxico en células LAPC-4 y fue seis veces más estable que RM-532-105 en el ensayo de estabilidad metabólica.

ABSTRACT

Prostate Cancer (PCa) and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) have been a major public health concern in Mexico since they affect more than 21% and 55% of men, respectively. PCa has a higher incidence and mortality as well. According to the *Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado* (ISSSTE), 17 mexican men die every day due to a late diagnostic of PCa. On the other hand, BPH also called benign enlargement of the prostate, is a common problem for men over 50 of age. The constant prostate enlargement in BPH affects the urinary tract, thereby making this disease potentially life-threatening.

Chemotherapy is frequently considered one of the first choices to treat PCa; however due to its poor selectivity, this therapy often attacks either cancerous or normal cells. Conversely, Hormonal therapy is another choice for the treatment of PCa. This strategy improves significantly the health and help to prolong the life expectancy. Unfortunately, PCa habitually evolves toward a resistant form. Therefore, hormonal therapy must be improved by discovering new selective and potent drug candidates to supply these first-line therapies.

The abnormal growth of prostate cells either PCa or BPH depends of testosterone (T) and its most androgenic metabolite dihydrotestosterone (DHT); both androgens stimulate the androgen-dependent prostate tumors. Hence, suppressing T and DHT action through the inhibition of key enzymes involved in their synthesis is an interesting strategy to decrease the progression of PCa and BPH. In this context, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17 β -HSD3) and 5 α -reductase (5 α R) are enzymes which play a critical role into the androgenic pathway. Both 17 β -HSD3 and 5 α R are well-known to catalyze the last step in the biosynthesis of the active androgens T and DHT, respectively.

The present thesis deals with the synthesis of new steroidal derivatives as 17 β -HSD3 or 5 α R inhibitors. Additionally, this work attempts to find novel molecules that may inhibit the prostate cancer cell proliferation or decrease the prostate enlargement in order to treat PCa and BPH, respectively. The first part of this thesis is dedicated to the chemical synthesis and biological activity of 17 β -*N*-arylcarbamoyleandrost-4-ene-3-ones. These compounds were assessed against two isoforms of 5 α R (5 α R1 and 5 α R2) as well as prostate cancer cells. The most potent molecules from both assays were further tested on gonadectomized hamsters to find out whether these steroids are able to decrease the weight of the prostate gland. Conversely, the second part is focused on the synthesis by systematic structure modifications of RM-532-105 (a lead compound) to obtain new 17 β -HSD3 inhibitors with better metabolic stability. These derivatives were assessed by using three assays: direct inhibition of 17 β -HSD3, androgenic effect on LAPC-4 cells and metabolic stability on human liver microsomes.

The performed biological assays showed that in the series of 17 β -*N*-arylcarbamoyleandrost-4-en-3-one derivatives, the compound 17 β -*N*-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenylcarbamoyle]androst-4-ene-3-one (**6k**) and 17 β -*N*-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyle)androst-4-ene-3-one (**6g**) exhibited a higher growth inhibitory effect than commercially available drugs finasteride, flutamide and ketoconazole on prostate cancer cells; whereas the compounds 17 β -*N*-(4-fluorophenylcarbamoyle)androst-4-ene-3-one (**6e**) and 17 β -*N*-(4-chlorophenylcarbamoyle)androst-4-ene-3-one (**6h**) were the most potent 5 α R2 inhibitors. Moreover both compounds decreased the weight of the prostate gland. On the other hand, the RM-532-105 derivative which bears a 4-picolyl group attached to C-16 β position (steroid **14n**) was identified as a 17 β -HSD3 inhibitor with two-fold less potency than the lead compound. Nevertheless, this molecule exhibited a cytotoxic effect on LAPC-4 cells and was six-fold more stable than RM-532-105 in the liver metabolic stability assay.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades sobre los tumores benignos y malignos	2
2.2 Esteroides y hormonas esteroidales	3
2.2.1 Mecanismo de acción de una hormona esteroideal	6
2.3 Hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer de próstata (CaP)	6
2.4 Terapia hormonal: fármacos con actividad antiandrogénica	9
2.4.1 Antagonistas del receptor de andrógenos	10
2.4.2 Inhibidores del CYP17	11
2.4.3 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa (5 α R)	13
2.4.3.1 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 desarrollados en el grupo del Dr. Eugene Bratoeff	16
2.4.4 Enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 β -HSD3)	19
2.4.4.1 Inhibidores de la enzima 17 β -HSD3	21
2.4.4.2 Compuesto RM-532-105 como inhibidor potente de la enzima 17 β -HSD3	22
2.5 La modificación estructural en el diseño de nuevos fármacos	24
2.5.1 Concepto de bioisosterismo y su aplicación en el desarrollo y optimización de moléculas activas	24
3. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	31
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	34
5.1 Derivados de 17 β - <i>N</i> -arilcarbamoilandro-4-en-3-ona	34
5.1.1 Parte Química	34
5.1.2 Parte biológica: 17 β - <i>N</i> -arilcarbamoilandro-4-en-3-onas	55
5.1.2.1 Relación Estructura-Actividad de los derivados de 17 β - <i>N</i> -arilcarbamoilandro-4-en-3-ona sobre las enzimas 5 α R1 y 5 α R2	55
5.1.2.2 Actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer de próstata y células sanas	58
5.1.2.2.1 Actividad antiproliferativa sobre la línea celular de cáncer de próstata LNCaP (andrógeno-sensible) y células polimorfonucleares de sangre de rata (PBMC)	58
5.1.2.2.2 Actividad antiproliferativa de los compuestos finales 6a-6u sobre la línea celular de cáncer de próstata PC3 (andrógeno-insensible) y células gingivales de humano	61
5.1.2.3 Actividad antiandrogénica <i>in vivo</i> en hámsteres gonadectomizados	65
5.2 Análogos del compuesto líder RM-532-105 como inhibidores de la enzima 17 β -HSD3	68
5.2.1 Parte Química	68
5.2.2 Parte biológica	86

5.2.2.1 Inhibición de la actividad catalítica de la enzima 17 β -HSD3	86
5.2.2.2 Efecto proliferativo de los análogos de RM-532-105 en la línea celular LAPC-4	90
5.2.2.3 Estabilidad metabólica de los análogos de RM-532-105	92
6. CONCLUSIONES	93
7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	94
7.1 Parte Química: derivados de 17β-N-arilcabamoilandrost-4-en-3ona	94
7.1.1 Reactivos y equipo	94
7.1.2 Descripción de la síntesis	95
7.1.2.1 Metodología general para la síntesis de los derivados 4a-4u	95
7.1.2.2 Metodología general para la síntesis de los derivados 5a-5u	102
7.1.2.3 Metodología general para la síntesis de los derivados 6a-6u	109
7.2 Parte biológica: derivados de 17β-N-arilcarbamoilandrost-4-en-3-ona (6a-6u)	119
7.2.1 Ensayo <i>in vitro</i> : actividad antiproliferativa en células cancerosas y sanas	119
7.2.1.1 Determinación de la actividad antiproliferativa en células LNCaP	120
7.2.1.2 Determinación de la actividad antiproliferativa en células PC3	121
7.2.1.3 Determinación de la actividad antiproliferativa en células sanas (células PBMC y gingivales)	121
7.2.2 Ensayo <i>in vitro</i> : actividad inhibitoria de los derivados de 17 β -N-arilcarbamoilandrost-4-en-3-ona sobre las enzimas 5 α -reductasa 1 y 2	122
7.2.3 Ensayo <i>in vivo</i> : actividad antiandrogénica de los derivados de 17 β -N-arilcarbamoilandrost-4-en-3-ona en próstata de hámsteres gonadectomizados	124
7.3 Parte Química: derivados del compuesto líder RM-532-105 (14a-14n)	125
7.3.1 Descripción de la síntesis	126
7.3.1.1 Síntesis de (3 β)-acetiloxi-17,17-difluoroandrostandano (7)	126
7.3.1.2 Síntesis de (3 β)-hidroxi-17,17-difluoroandrostandano (8)	126
7.3.1.3 Síntesis de (3 β)-hidroxi-13 α -androsta-17-ona (9a)	127
7.3.1.4 Metodología general para la protección del grupo carbonilo en posición C-17	128
7.3.1.5 Metodología general para la oxidación del grupo carbinol en la posición C3 β para la obtención de los intermediarios 11a-11c	129
7.3.1.6 Metodología general para epoxidación de la cetona en C-3 mediante la reacción de Corey-Chaykovsky para la obtención de los intermediarios 12a-12c	130
7.3.1.7 Metodología general para la apertura del oxirano en C-3 con <i>trans</i> -2,5-dimetilpiperazina para la preparación de los intermediarios 13a-13c	132
7.3.1.8 Síntesis de las sulfonamidas 14a-14c como productos finales	133
7.3.1.9 Síntesis de (3 α ,5 α ,17 β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]androstan-3,17-diol (14d)	136
7.3.1.10 Síntesis de (3 α ,5 α ,17 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]androstan-3,17-diol (14e)	137
7.3.1.11 Síntesis de (3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-17-metoxiandrostan-3-ol (14f)	138
7.3.1.12 Síntesis de (3 α ,5 α ,17 β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-17-metilandrostan-3,17-diol (14g)	139
7.3.1.13 Síntesis de (3 α ,5 α ,17 β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-17-etinilandrostan-3,17-diol (14h)	140

7.3.1.14 Síntesis de (3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxiandrostan-17-oxima (14i).....	141
7.3.1.15 Síntesis de (3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxi-17-(2'-spirooxiranil)androstano (14j).....	142
7.3.1.16 Síntesis de (3 α ,5 α ,16 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3,17-dihidroxiandrostan-17-ona (14k).....	143
7.3.1.17 Síntesis de (3 α ,5 α ,16 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-16-fluoro-3-hidroxiandrostan-17-ona (14l).....	144
7.3.1.18 Síntesis de (3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-16,16-dimetil-3-hidroxiandrostan-17-ona (14m).....	145
7.3.1.19 Síntesis de (3 α ,5 α ,16 β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-16-(piridin-4-metil)-3-hidroxiandrostan-17-ona (14n) a partir del compuesto RM-532-105.....	146
7.4 Parte biológica: derivados del compuesto líder RM-532-105 (14a-14n)	151
7.4.1 Inhibición de la enzima 17 β -HSD3 en células LNCaP transfectadas	151
7.4.2 Actividad proliferativa sobre células LAPC-4 (RA ⁺).....	151
7.4.3 Ensayo para la determinación de la estabilidad metabólica	152
7.5 Modelado molecular	152
 ANEXO 1: ESPECTROS	 157
 ANEXO 2: PUBLICACIONES	 291

Lista de abreviaciones

17 β -HSD's: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas

17 β -HSD1: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

17 β -HSD2: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2

17 β -HSD3: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3

17 β -HSD4: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 4

17 β -HSD5: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 5

17 β -HSD6: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 6

17 β -HSD7: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 7

17 β -HSD8: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 8

17 β -HSD9: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 9

17 β -HSD10: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 10

17 β -HSD11: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 11

17 β -HSD12: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 12

17 β -HSD13: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 13

17 β -HSD14: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 14

17 β -HSD15: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 15

3 α -HSD3: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

4-diona: 4-androstendiona

4-diona[¹⁴C]: 4-androstendiona marcada isotópicamente con carbono 14

5 α R: 5 α -reductasa

5 α R1: 5 α -reductasa tipo 1

5 α R2: 5 α -reductasa tipo 2

Å: Angstrom

a_nH: Descriptor de número de átomos de hidrógeno presentes

ADME-Tox: Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicología

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Al(O*i*Pr)₃: isopropóxido de aluminio

ALM: *Activity Landscape Analysis* (Análisis del Panorama de Actividad)

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionización química a presión atmosférica)

APH: Aceptor de puentes de hidrógeno

APT: *Attached Proton Test* (Adjunto de protones de prueba)

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATR: *Attenuated Total Reflection* (Reflección total atenuada)

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2* (Célula B, linfoma 2)

CaP: Cáncer de Próstata
CDCl₃: Cloroformo deuterado
CI₅₀: Concentración inhibitoria 50
cLogP: Coeficiente de partición octanol/agua calculado
CoMFA: *Comparative Molecular Field Analysis* (Análisis Comparativo de Campos Moleculares)
COSY: *Correlation Spectroscopy* (Espectroscopia de Correlación)
CRPC: *Castrate Resistant Prostate Cancer* (Cáncer de recurrente/resistente a la castración)
CTL: grupo control
CYP17: Enzima citocromo P450 17A1
CYP19: Enzima citocromo P450 19 o también conocida como Aromatasa
CYP24A1: Enzima citocromo 450 24A1
CYP3A: Enzima citocromo 450 3A.
DAST: trifluoruro de dietilaminoazufre
DCM: diclorometano
DEAD: Diethyl azodicarboxylate (azodicarboxilato de dietilo)
DFS: *Double Focus Sector* (Sector de doble enfoque)
DFT: *Density Functional Theory* (Teoría de Funcionales de la Densidad)
DHEA: Deshidroepiandrosterona
DHT: 5 α -dihidrotestosterona o comúnmente conocida como dihidrotestosterona
DHT[³H]: Dihidrotestosterona marcada isotópicamente con tritio
DIPEA: *N,N*-diisopropietilamina
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPH: Donador de puentes de hidrógeno
DTT: Ditiotreitól
E_{rsol}: Descriptor de energía libre de solvatación
E_{tor}: Descriptor de potencial de energía de torsión
E1: Estrona
E2: Estradiol
ECFP: *Extended-Connectivity Fingerprints* (Huellas Dactilares de Conectividad Extendida)
EGF: *Epidermal Growth Factor* (Factor de crecimiento epidérmico)
ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
EM: espectrometría de masas
FAB: *Fast Atom Bombardment* (Bombardeo de átomos acelerados)
FDA: *Food and Drug Administration* (Administración de Fármacos y Medicamentos)
FIDE: Finasterida.
HEK-293: Línea celular primaria de riñón
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (Correlación heteronuclear de enlaces múltiples)

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna

HPLC: *High performance liquid chromatography* (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia)

HPLC-MS: *High performance liquid chromatography-Mass spectrometry* (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectroscopia de masas)

HSD17B3: gen que codifica para la enzima 17 β -HSD3

HSD3B2: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ -5-4 isomerasa tipo II

HSP: *Heat Shock Proteins* (Proteínas de choque térmico)

HSQC: *Heteronuclear Simple Quantum Correlation* (Correlación heteronuclear de simple cuanto)

Hz: Hertz

IE: Impacto electrónico

IGF: *Insulin-like Growth Factor* (Factor de crecimiento similar a insulina)

IR: Infrarrojo

J: Constante de acoplamiento (expresada en Hertz)

KGF: *Keratinocyte growth factor* (Factor de crecimiento de queratinocitos)

LAPC-4: Línea celular de carcinoma de prostático de humano el cual es andrógeno-sensible

LNCaP: Línea celular de adenocarcinoma prostático de humano andrógeno-sensible

LNCaP[17 β -HSD3]: Línea celular de carcinoma de prostático de humano el cual es andrógeno-sensible y además está transfectada con el gen *HSD17B3* para la sobreexpresión de la enzima 17 β -HSD3

m/z: relación masa/carga

M: Molar

M⁺: ion molecular

mARN: ARN mensajero

MeOH: Metanol

mM: milimolar

MOE: Molecular Operating Environment

MR: *Molar Refractivity* (Refractividad molar)

NAD⁺: Nicotin adenin dinucleótido (forma oxidada)

NADH: Nicotin adenin dinucleótido (forma reducida)

NADP⁺: Fosfato de Nicotin adenin dinucleótido (forma oxidada)

NADPH: Fosfato de Nicotin adenin dinucleótido (forma reducida)

nM: Nanomolar

NOESY: *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser)

p/v: relación peso/volumen

PADPR: Fosfoadenosin difosforibosa

PBMC: Células polimorfonucleares de sangre de rata

PBS: *Phosphate Buffer Solution* (Solución buffer de fosfatos)

PC3: Línea celular de cáncer de próstata metastásico el cual es andrógeno-insensible

PCA: *Principal Component Analysis* (Análisis de componentes principales)

PhCH₃: Tolueno

PPh₃: Trifenilfosfina

ppm: partes por millón

PSA: Antígeno Prostático Específico

APTS: Ácido *p*-toluensulfónico

QSAR: *Quantitative Structure-Activity Relationship* (Relación Cuantitativa Estructura-Actividad)

RA: Receptor de andrógenos

RMN ¹³C: Resonancia Magnética Nuclear para el átomo de carbono

RMN ¹⁹F: Resonancia Magnética para el átomo de flúor

RMN ¹H: Resonancia Magnética Nuclear para el átomo de hidrógeno

RMN 2D: Resonancia Magnética bidimensional

RPMI: Medio *Roswell Park Memorial Institute*

SOMFA: *Self-organizing molecular field analysis* (Análisis auto-organizado del campo molecular)

SRB: Sulforodamina B

SRD5A1: Gen 5 α -reductasa tipo 1

SRD5A2: Gen 5 α -reductasa tipo 2

STUI: Síntomas del tracto urinario inferior

T: Testosterona

T[¹⁴C]: Testosterona marcada isotópicamente con carbono 14

T[³H]: Testosterona marcada isotópicamente con tritio

Tc: coeficiente de Tanimoto

TEA: *N,N'*-trietilamina

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

THF: Tetrahidrofurano

TPSA: *Topological Surface Area* (Área Polar Superficial Topológica)

UPLC-ESI-MS: Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplado a espectrometría de masas de ionización por electroespray

UV: Ultravioleta

v/v: relación volumen/volumen

δ : Desplazamiento químico

δ_C : Desplazamiento químico de carbono

δ_H : Desplazamiento químico de hidrógeno

μM : micromolar

ν_{max} : longitud de onda máxima

σ : Sigma de Hammet

1. INTRODUCCIÓN

La Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) es una enfermedad que involucra el crecimiento anormal de células del estroma y el epitelio prostático, lo que conlleva a la compresión del canal uretral interrumpiendo el flujo normal de la orina, dando lugar a la presencia de ciertos síntomas como la *nocturia* (sensación de micción durante el sueño), *dísuria* (dolor durante la micción), *hematuria* (presencia de sangre en la orina por ruptura de venas en la superficie de la próstata) e insuficiencia renal.

La HPB es la neoplasia benigna más frecuente en el hombre. En estudios de autopsia la frecuencia a los 40 años de edad es de un 25%, llegando a 100% a los 80 años. Esto no significa que todos los que tienen la neoplasia microscópica desarrollen la enfermedad clínica. Los síntomas se presentan en 10% a los 40 años de edad y en 40% de los hombres a los 70 años. La HPB es una causa significativa de deterioro en la calidad de vida de los hombres mayores y además tiene asociada morbilidades significativas¹.

Según datos del INEGI en México, 55% de la población con HPB es mayor de 64 años y 30% tiene entre 55 y 64 años, lo que equivale, en nuestra población, a 8% del total, con una esperanza de vida de 70 años.² Esta enfermedad no sólo se limita a causar los síntomas antes mencionados, sino que también puede incurrir en una enfermedad con mayor morbilidad como el cáncer de próstata (CaP).³

El CaP al igual que la HPB, es una de las neoplasias más frecuentes en el hombre. La Organización Mundial de la salud (OMS) prevé que la cifra de nuevos casos de cáncer alcance los 10 millones anuales a partir del 2015; también considera que la cifra anual de muertes por cáncer en todo el mundo se duplicará de seis millones en el 2000 a 12 millones en el 2020. En nuestro país, la tasa de mortalidad observada por cáncer de próstata ha aumentado de 7.7 a 9 muertes por cada 100,000 hombres entre el 2000 y el 2005.^{2,4} Ambos padecimientos se ven favorecidos por un aumento de andrógenos, en especial de la testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT) que son los principales metabolitos de las enzimas 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 β -HSD3) y la 5 α -reductasa (5 α R), respectivamente.^{5,6} Tanto en la HPB como en el CaP se ha podido demostrar un aumento localizado de estas dos enzimas y existe también la evidencia de un catabolismo reducido de la DHT.

Una de las estrategias para el tratamiento de la HPB es la terapia hormonal. Con el fin de disminuir los niveles de DHT producidos por la próstata, inhibidores de la 5 α -reductasa como la finasterida y la dutasterida son utilizados hoy en día para reducir el tamaño de la próstata y con ello prevenir futuras lesiones malignas en este órgano.⁷ Sin embargo, cuando el CaP está presente la estrategia cambia y no sólo suprime la producción de DHT, sino también de su precursor, la testosterona, y es en este punto cuando entran los inhibidores de la 17 β -HSD3.

El presente trabajo se divide en dos partes: la primera, se enfoca en la síntesis y evaluación biológica de derivados de 17 β -*N*-arilcabamoilandro-4-en-3-ona como antiproliferativos sobre líneas celulares cancerosas de próstata, LNCaP y PC3. También se presenta la actividad inhibitoria de estos derivados sobre las enzimas 5 α -reductasa tipo 1 y 2. La segunda parte del presente se desarrolló durante una estancia de investigación en el grupo de trabajo del Dr. Donald Poirier y está enfocada en la síntesis de derivados de la androsterona como inhibidores de la enzima 17 β -HSD3. Además de la preparación de estos compuestos, se presenta también la actividad androgénica en células LAPC4 (actividad no deseada) así como la estabilidad metabólica de los esteroides sintetizados.

2. Antecedentes

2. ANTECEDENTES

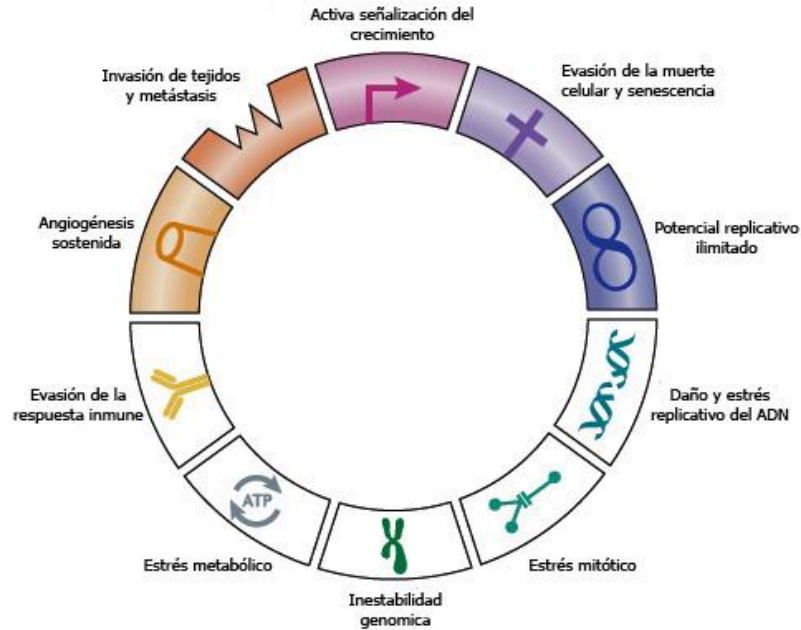
2.1 Generalidades sobre los tumores benignos y malignos

La promoción y restricción del crecimiento normal de una célula depende de un balance de señales finamente controlado, de tal modo que la proliferación y diferenciación ocurra de una manera ordenada y sólo cuando sea necesario. En las células tumorales existen cambios y modificaciones ocasionados por factores internos y/o externos para su genoma, provocando una continua proliferación celular, pérdida de diferenciación y una disfunción en el proceso normal de la muerte celular. Los tumores pueden ser divididos en dos grupos principales, de carácter benigno o maligno (conocido como cáncer). Los tumores benignos rara vez son mortales; estos crecen dentro de una cápsula bien definida que limita su tamaño y mantienen las características de la célula de origen y, por lo tanto, generalmente están bien diferenciados. Los tumores malignos invaden los tejidos circundantes y se extienden a diferentes áreas del cuerpo para generar nuevos crecimientos o metástasis. Además, existen diferentes clones dentro del tumor con diferentes capacidades para crear metástasis, una propiedad que está determinada genéticamente y que, a menudo, es el proceso que causa la muerte del hospedero.⁸ Las causas que originan el cáncer se pueden deber a factores genéticos (predisposición genética), carcinógenos químicos, radiaciones ionizantes, e infecciones bacterianas y virales.⁹

El inicio y el desarrollo del tumor (tumorigénesis) es un proceso de varios pasos; con cada paso se ven reflejados cambios que promueven la transformación progresiva de células sanas en tumorales. Diversos estudios han demostrado que los genes de células tumorales están frecuentemente modificados en sitios diferentes, que van desde mutaciones puntuales, hasta translocaciones cromosómicas. Hoy se sabe que el cáncer es un fenómeno que se lleva a cabo en dos tiempos, mismos que a su vez abarcan tres etapas: iniciación, promoción y progresión.¹⁰

Basados en estas observaciones, se ha propuesto que el desarrollo tumoral ocurre a través de un proceso similar a la evolución Darwiniana, en el cual una secuencia de modificaciones genéticas, cada una proveyendo un tipo diferente de ventaja en el crecimiento, conducen al cambio progresivo de células sanas en tumorales.¹¹ Weinberg ha sugerido que el gran catálogo de genotipos de células tumorales pueden resultar en diez modificaciones esenciales en la fisiología celular que, colectivamente, inducen la malignidad (Esquema 1);¹²⁻¹⁴ éstas son: señalización activa del crecimiento; evasión de la muerte celular; potencial replicativo ilimitado; daño y estrés replicativo del ADN; estrés mitótico; inestabilidad genómica; estrés metabólico; evasión de la respuesta inmune; angiogénesis sostenida y finalmente, invasión de tejidos y metástasis.

2. Antecedentes



Esquema 1. Cambios característicos en la fisiología de una célula cancerosa.

2.2 Esteroides y hormonas esteroideas

Los esteroides son derivados del colesterol, de naturaleza lipídica, que se caracterizan por tener en su estructura el núcleo de ciclopenta/*a*/perhidrofenantreno¹⁵ (Figura 1). Están ampliamente distribuidos en los organismos eucariontes, tanto en el reino animal como en el vegetal. Las características funcionales de las moléculas esteroideas están determinadas por la conformación de sus cuatro anillos (A, B, C, D) y la orientación relativa de los grupos funcionales en el espacio.

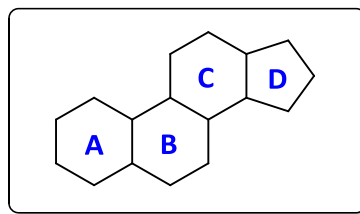


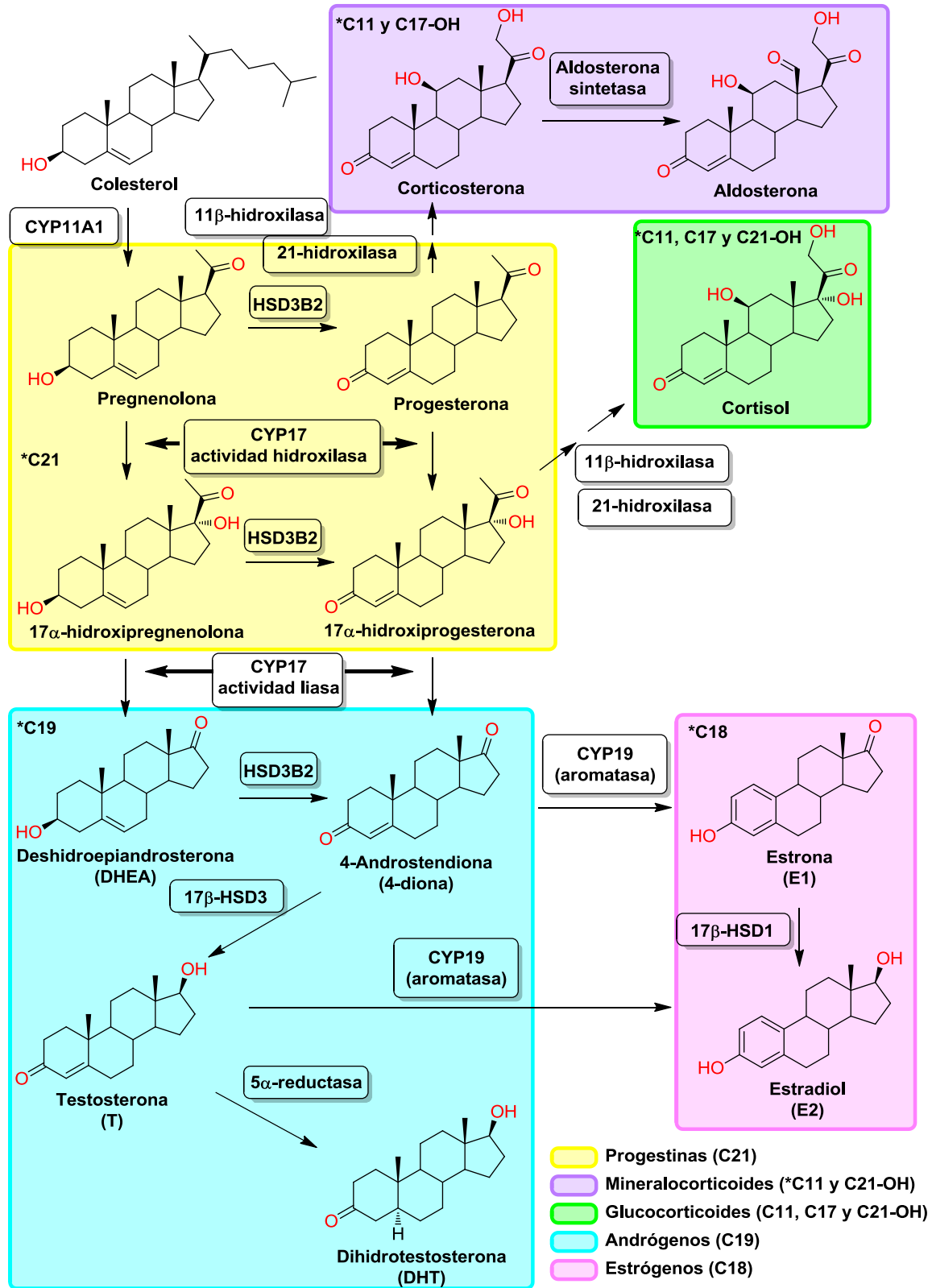
Figura 1. Núcleo de ciclopenta/*a*/fenantreno

Dentro de los esteroides se encuentran las hormonas esteroideas, que son moléculas sintetizadas en el organismo a partir del colesterol (Esquema 2), las cuales se clasifican de acuerdo a su función biológica en: *glucocorticoides*, que son esenciales para la adaptación al estrés; *mineralocorticoides*, que regulan el equilibrio normal de sodio y potasio en el organismo; *progestinas*, cuya función principal es el

2. Antecedentes

mantenimiento del embarazo y, finalmente, las hormonas sexuales como los *estrógenos* y *andrógenos* que definen las características sexuales secundarias femeninas y masculinas, respectivamente. Los efectos fisiológicos varían de un compuesto a otro, su función va desde vitaminas hasta hormonas sexuales.¹⁶

2. Antecedentes



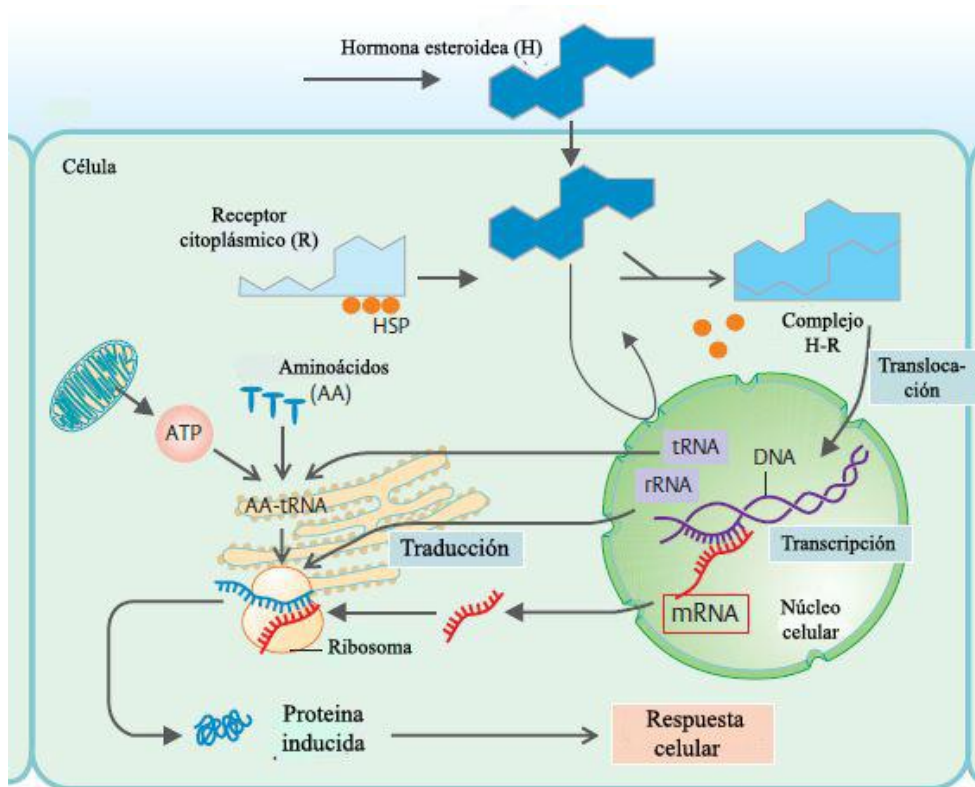
Esquema 2. Ruta metab3lica de la biosintesis de esteroides^{16,17}

2. Antecedentes

2.2.1 Mecanismo de acción de una hormona esteroidea

La secuencia de eventos para la transcripción de genes por una hormona esteroidea es la siguiente¹⁸ (Esquema 3):

- 1) Unión de una hormona esteroidea a su receptor.
- 2) Formación de un homodímero que induce un cambio conformacional en el receptor y disociación de las HSP (Heat Shock Proteins, por sus siglas en inglés).
- 3) Transporte al núcleo (translocación)
- 4) Unión a un elemento de respuesta.
- 5) Reclutamiento de co-activadores o co-represores.
- 6) Activación de factores de transcripción que tienen como consecuencia la síntesis de una molécula de mRNA y su correspondiente proteína la cual activa una respuesta biológica.



Esquema 3. Mecanismo de acción de una hormona esteroidea (Adaptado de la referencia 19)

2.3 Hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer de próstata (CaP)

La próstata de un adulto (Figura 2), es una glándula compacta que forma parte del aparato genital y urinario masculino. Ésta se encuentra situada inmediatamente debajo de la vejiga, siendo atravesada por el

2. Antecedentes

conducto urinario llamado uretra. Su principal función está relacionada con la producción del fluido seminal. La próstata puede ser origen de dos enfermedades relacionadas al crecimiento celular anormal: hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer de próstata (CaP).²⁰

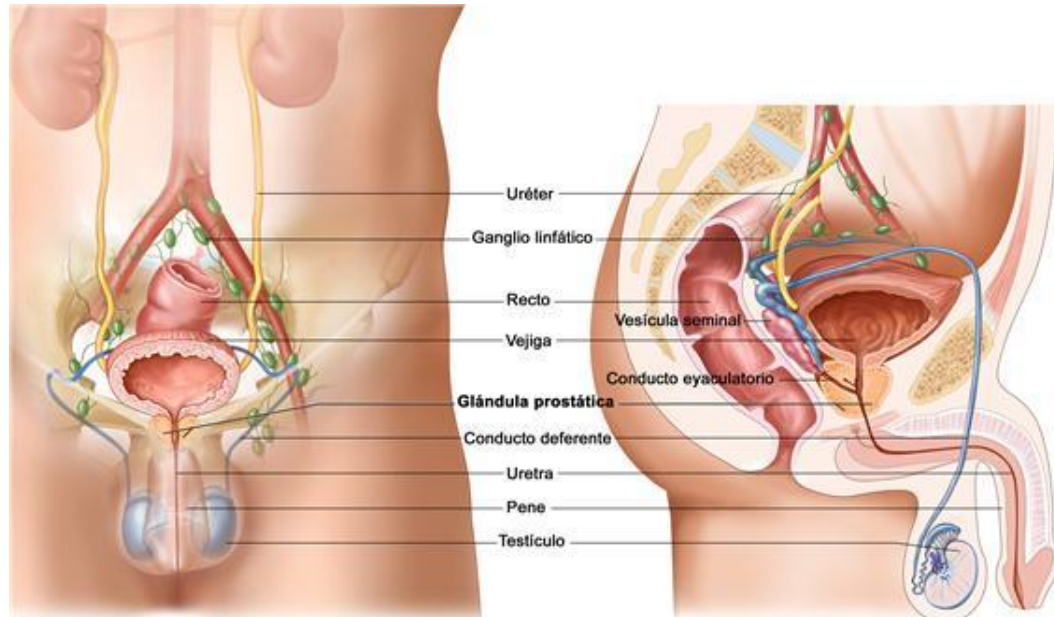


Figura 2. Localización de la glándula prostática humana.²¹

La hiperplasia prostática benigna o adenoma de próstata es una de las enfermedades benignas más comunes en el hombre y puede derivar en una hipertrofia benigna de la próstata, en una obstrucción benigna de la próstata y/o en síntomas del tracto urinario inferior (STUI).

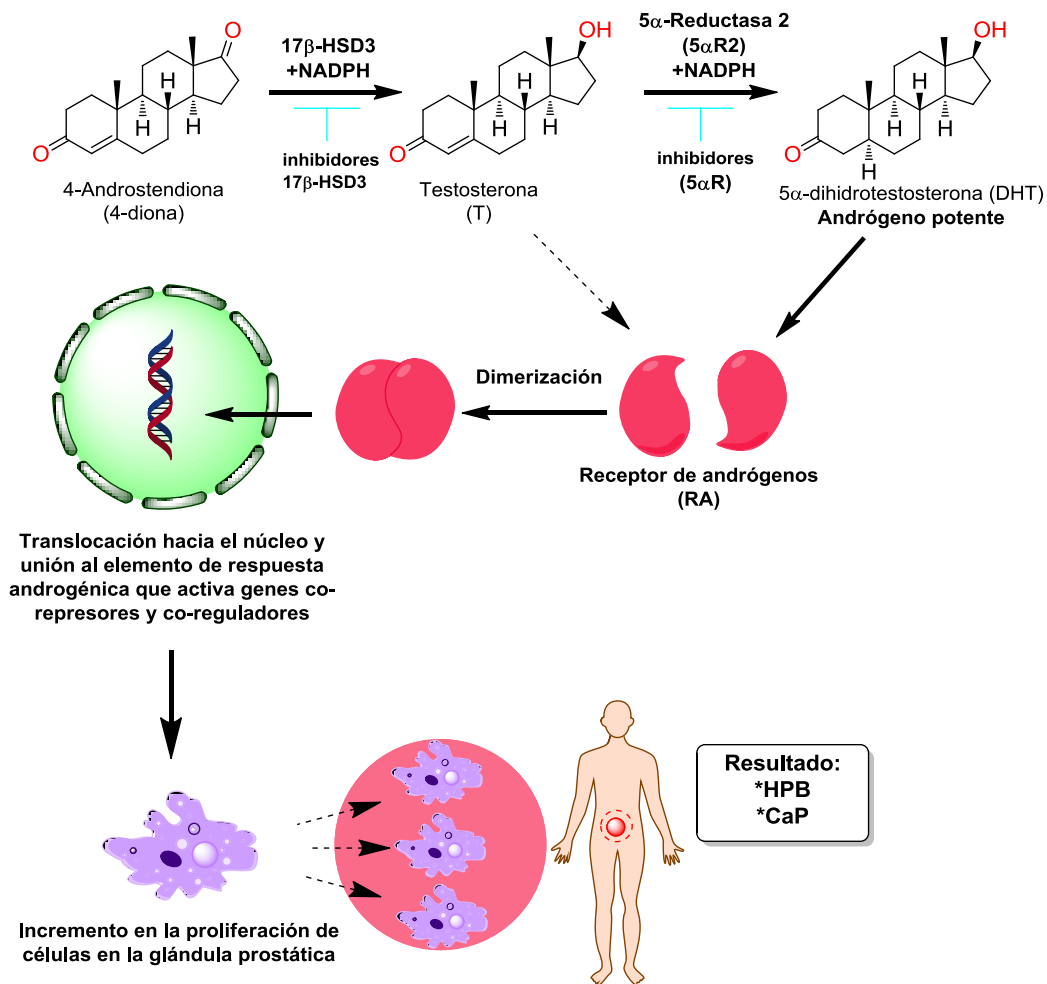
Los andrógenos son hormonas esteroidales que estimulan y controlan las características primarias y secundarias masculinas. Ejercen su acción al unirse a un receptor nuclear llamado receptor de andrógenos (RA). El principal andrógeno es la testosterona (T) y su metabolito reducido, la 5 α -dihidrotestosterona (DHT), que es de 3 a 10 veces más potente que la testosterona debido a que se disocia más lentamente del receptor de andrógenos.²² Existen dos isoformas del RA reportados, RA-A y RA-B. El receptor de andrógenos-B es la isoforma que predomina en la próstata, algunas mutaciones en este receptor están relacionadas a lesiones malignas.

Este receptor está íntimamente relacionado con la HPB y el CaP, ya que la interacción de T y DHT con el RA y la subsecuente formación del complejo T/RA o DHT/RA, que a su vez interacciona con el núcleo, causa la transcripción de varios genes, resultando en la producción de varias proteínas como el Antígeno Prostático Específico (PSA, por sus siglas en inglés) y proteínas reguladoras importantes para el

2. Antecedentes

crecimiento y función celular. La 4-diona es metabolizada a T por la acción de la enzima 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 β -HSD3) en los testículos;⁶ mientras que la DHT es sintetizada en la próstata a partir de la testosterona circulante por la acción de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 (5 α R2). Esta enzima se localiza principalmente en las células del estroma prostático. La DHT estimula factores de crecimiento que conducen a la proliferación celular en la próstata; éstos incluyen al factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), al factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF, por sus siglas en inglés), y al factor de crecimiento similar a insulina (IGF). La actividad del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) que modula la apoptosis también se ve afectado por la DHT (Esquema 4).

23,24



Esquema 4. Mecanismo de acción del andrógeno DHT: la testosterona proveniente de los testículos entra a la célula y es convertida a DHT por la enzima 5 α -reductasa que, posteriormente, se une al RA provocando un cambio conformacional; el complejo se une a elementos de respuesta en el ADN, que inducen la transcripción de proteínas que favorecen la proliferación de células prostáticas.

2. Antecedentes

Mientras que en la HPB se desarrollan signos y síntomas claros, en el cáncer de próstata (CaP) no se presentan síntomas hasta que ya existe un avance considerable de la lesión maligna y puede confundirse con la HPB. Aunque la mayoría de los tipos de cáncer de próstata crecen lentamente, existen algunos que suelen ser muy agresivos y tienen la capacidad de hacer metástasis desde la próstata hacia otras partes del organismo, particularmente en los huesos y nódulos linfáticos. Una de las formas más eficaces de detectar ésta enfermedad es la cuantificación del PSA. El CaP es clasificado como un adenocarcinoma o un cáncer glandular cuando las células que normalmente secretan fluido seminal mutan a células malignas. La región periférica de la próstata es donde este adenocarcinoma es más común.²⁵

La mayoría de los tipos de CaP expresan altos niveles de receptores de andrógenos (RA) y su crecimiento, al igual que la HPB, depende de la testosterona producida por los testículos y la DHT. Una de las características en el metabolismo de estas células malignas es también una baja producción de la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD3) que es la responsable del catabolismo de la DHT,²⁶ lo que conlleva al aumento en las concentraciones de éste metabolito. Algo importante que también se ha observado es un aumento de la enzima 5 α -reductasa tipo 1, mientras que la enzima tipo 2 se encuentra en los mismos niveles que una próstata sana.

Para eliminar este padecimiento, es común recurrir a la remoción de los andrógenos producidos por los testículos (castración quirúrgica o química). Desgraciadamente, el paciente puede recaer en la enfermedad y generar tumores malignos dando como resultado un nuevo padecimiento denominado cáncer de próstata recurrente/resistente a la castración (CRPC, por sus siglas en inglés), en el cual estas células cancerosas, además de tener la capacidad de reactivar sus receptores de andrógenos, también pueden producir testosterona y DHT a partir del colesterol y pequeñas cantidades de andrógenos producidas por las glándulas adrenales.²⁷ Adicionalmente, el receptor de andrógenos tiende a presentar mutaciones que conllevan a la resistencia hacia diferentes antagonistas. En este sentido, está reportado que el AR de la línea celular LNCaP (cáncer de próstata) posee una mutación puntual en el residuo 877, el cual es un residuo de tirosina que es sustituido por uno de alanina. Esta simple mutación incrementa la afinidad por otros esteroides diferentes a los andrógenos, lo que promueve la proliferación de estas células en una forma más agresiva.²⁸

Una de las estrategias para el tratamiento de la HPB y el CaP es la terapia hormonal, que se describe a continuación.

2.4 Terapia hormonal: fármacos con actividad antiandrogénica

La mayoría de los tumores prostáticos son dependientes de andrógenos y, por esta razón, el tratamiento hormonal para el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna está basado en la

2. Antecedentes

modulación de los niveles de testosterona. Esto se puede lograr al administrar un antagonista hormonal para bloquear la acción de la testosterona y DHT, o suprimir la producción de estos andrógenos a través del bloqueo de la enzima responsable de su síntesis. Como se mencionó anteriormente, los factores que contribuyen en la proliferación celular de la HPB y el CaP son principalmente la sobreproducción de DHT y la sobreexpresión del receptor de andrógenos en el caso del cáncer de próstata, por lo cual los tratamientos más exitosos para estos padecimientos son los siguientes:²⁹

- Antagonistas del receptor de andrógenos.
- Inhibidores de la enzima CYP17-A1.
- Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.
- Inhibidores de la enzima 17 β -HSD3.

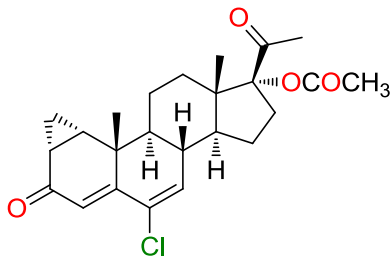
2.4.1 Antagonistas del receptor de andrógenos

Los antagonistas de andrógenos se unen al receptor y compiten con los esteroides naturales, pero éstos no producen el cambio conformacional correcto en el receptor que es esencial para obtener los cambios normales en la expresión de genes.³⁰ Estos también pueden ser útiles para el tratamiento del síndrome de ovario poliquístico, seborrea, alopecia androgénica y pubertad precoz.³¹ Existen agentes que contienen el esqueleto esteroidal y que compiten con la DHT por el receptor de andrógenos, entre este tipo de compuestos se encuentran el acetato de ciproterona, Win 49596 y, recientemente, se han reportado algunos derivados de androstano con un grupo cianopirano en el anillo D, los cuales han tenido una potencia hasta diez veces mayor que la bicalutamida.³² También existen antagonistas del receptor de andrógenos que no poseen el esqueleto esteroidal, los fármacos de este tipo más conocidos son la flutamida, enzalutamida y, la ya mencionada, bicalutamida (Figura 3).

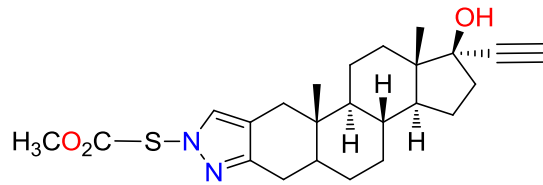
Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, existe resistencia hacia este tipo de antagonistas; esto se debe a mutaciones continuas del AR que incluso, convierten a fármacos como la flutamida en agonistas.^{29,33}

2. Antecedentes

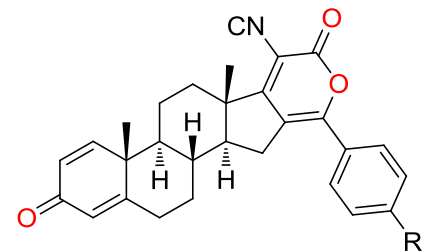
Esteroidales



Acetato de Ciproterona

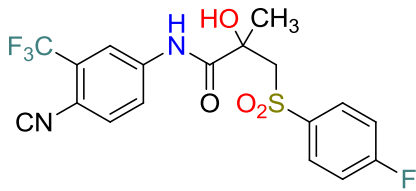


Win 49596

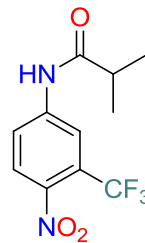


Derivados de cianopirano,
R= F, CH₃

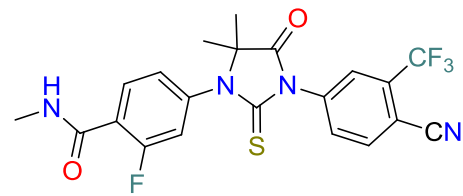
No esteroidales



Bicalutamida



Flutamida



Enzalutamida

Figura 3. Estructuras de algunos antagonistas esteroidales y no esteroidales del receptor de andrógenos.

2.4.2 Inhibidores del CYP17

Desde la década de los 60's se ha descrito al complejo P450 (CYP) como una familia de enzimas localizadas predominantemente en el hígado que metabolizan fármacos y otros xenobióticos. Sin embargo, también se conoce que las enzimas CYP están involucradas en funciones celulares tales como el metabolismo de eicosanoides, la biosíntesis de colesterol y ácidos biliares y la síntesis y metabolismo de esteroides y de aminas biogénicas. Aún en estos tiempos existen algunas enzimas CYP cuya función se desconoce. Mutaciones en los genes *CYP* son responsables de errores congénitos en el metabolismo, los cuales contribuyen a severas enfermedades clínicas.³⁴

El citocromo P450-17A1 (también conocido como CYP17A1 y P450c17) es una monooxigenasa que se encuentra en el retículo endoplásmico en la glándula adrenal, testículos, placenta y ovarios; contiene 508 aminoácidos con un grupo prostético hemo en sus sitio activo. Esta enzima es importante en la producción de esteroides androgénicos y estrogénicos. Su acción dual de 17 α -hidroxilasa cataliza la producción de precursores de cortisol (glucocorticoides) mientras que su actividad de C-17, C-20-liasa permite la producción de precursores de esteroides sexuales. Específicamente, esta enzima actúa sobre la pregnenolona y progesterona al agregar un grupo hidroxilo en el carbono 17 del anillo D del esteroide (actividad de hidroxilasa), o actúa sobre la 17-hidroxipregnenolona y 17-hidroxiprogesterona para romper el grupo acetilo en el carbono 17 del anillo D (la actividad liasa). La modulación de actividad 17-alfa-

2. Antecedentes

hidroxilasa o C-17, C-20-liasa esta modulada por el citocromo b₅ (b₅) que determina cuál ruta metabólica debe seguir el sustrato en términos de formación de glucocorticoides u hormonas sexuales. CYP17A1 es una diana importante para el tratamiento de cáncer de próstata y mama que proliferan en respuesta a la producción de andrógenos y estrógenos, respectivamente.^{35,36}

En los últimos 50 años, se ha previsto la importancia de la inhibición del CYP17A1 debido al paso catalítico, que es crítico en la biosíntesis de todos los andrógenos, y su consecuente aplicación en el tratamiento de enfermedades dependientes de andrógenos como el cáncer de próstata. Generalmente, los inhibidores del CYP17A1 se han clasificado estructuralmente como esteroidales y no esteroidales. Los inhibidores esteroidales son similares a los sustratos naturales pregnenolona y progesterona. Sin embargo, estos tienen modificaciones en el anillo D, específicamente en el carbono C-17. Dentro de los inhibidores esteroidales se pueden clasificar a los inhibidores competitivos tipo 1 y tipo 2, que se distinguen en el modo de unión al sitio activo de la enzima. Los inhibidores tipo 1 desplazan el agua e interactúan con el hierro del grupo hemo permitiendo que este átomo exista en un estado pentacoordinado, esto induce un desplazamiento en el máximo de absorción del espectro UV a aproximadamente 420-390nm. Los inhibidores competitivos tipo 2 interactúan con el átomo de hierro en el grupo hemo sin desplazar el agua teniendo este átomo un estado hexacoordinado. Además, también interactúan con los aminoácidos cercanos a este grupo prostético teniendo desplazamiento en el máximo de absorción en el espectro de UV a aproximadamente 430-421 nm.

El primer inhibidor del CYP17 fue el ketoconazol (que aún es usado en el tratamiento de cáncer prostático resistente a la castración, CRPC). Sin embargo, el uso de éste fármaco ha sido limitado debido a su inespecificidad, ya que inhibe a otras enzimas de la familia del citocromo P450 como el CYP3A y el CYP24A1. Esto genera hepatotoxicidad, toxicidad gastrointestinal e insuficiencia renal.³⁷

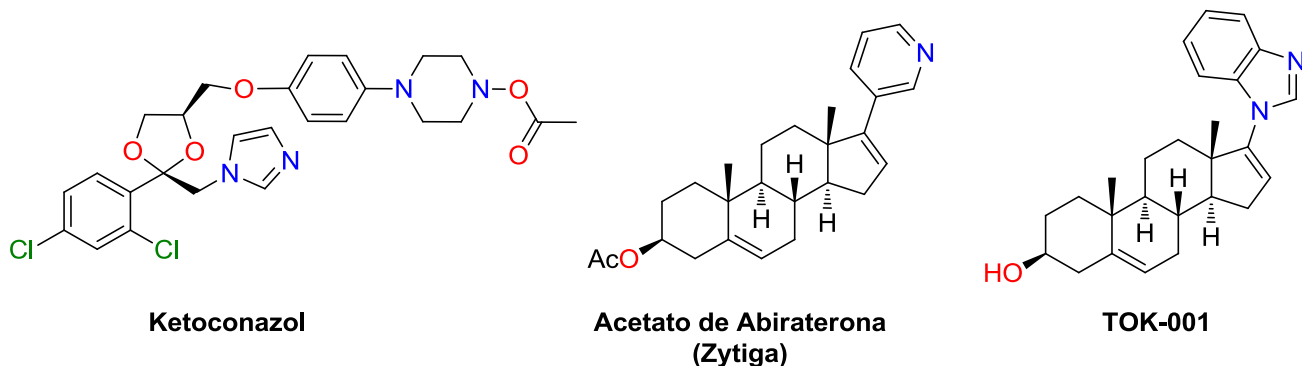


Figura 4. Inhibidores del CYP17.

La abiraterona (Figura 4) es un fármaco recientemente aprobado por la FDA y es, tal vez, uno de los antiandrógenos más exitosos en la actualidad, ya que, a diferencia del ketoconazol, éste si es selectivo a la

2. Antecedentes

enzima CYP17. Este fármaco disminuye los niveles de estradiol, deshidroepiandrosterona y androstendiona. Debido a su pobre biodisponibilidad, la abiraterona se comercializa como el profármaco acetilado en el carbono C-3 (acetato de Abiraterona o Zytiga[®]) que es rápidamente desacetilado *in vivo* a su metabolito activo.¹⁷

Recientemente se elucidó, por cristalografía de rayos X, la interacción de la abiraterona y del TOK-001 (o Galaterona) con el CYP17 (Figura 5) en la que se observó la interacción de uno de los nitrógenos del heterociclo (nitrógeno del grupo piridina para la abiraterona y grupo bencimidazol para el TOK-001) con el hierro del grupo hemo formando así, un enlace covalente coordinado (distancia 2.2 Å) y también la formación de un puente de hidrógeno del hidroxilo en C-3 con la asparagina 202 (N202) de la hélice F (distancia 2.6 Å para la abiraterona y 2.4 Å para TOK-001).³⁶

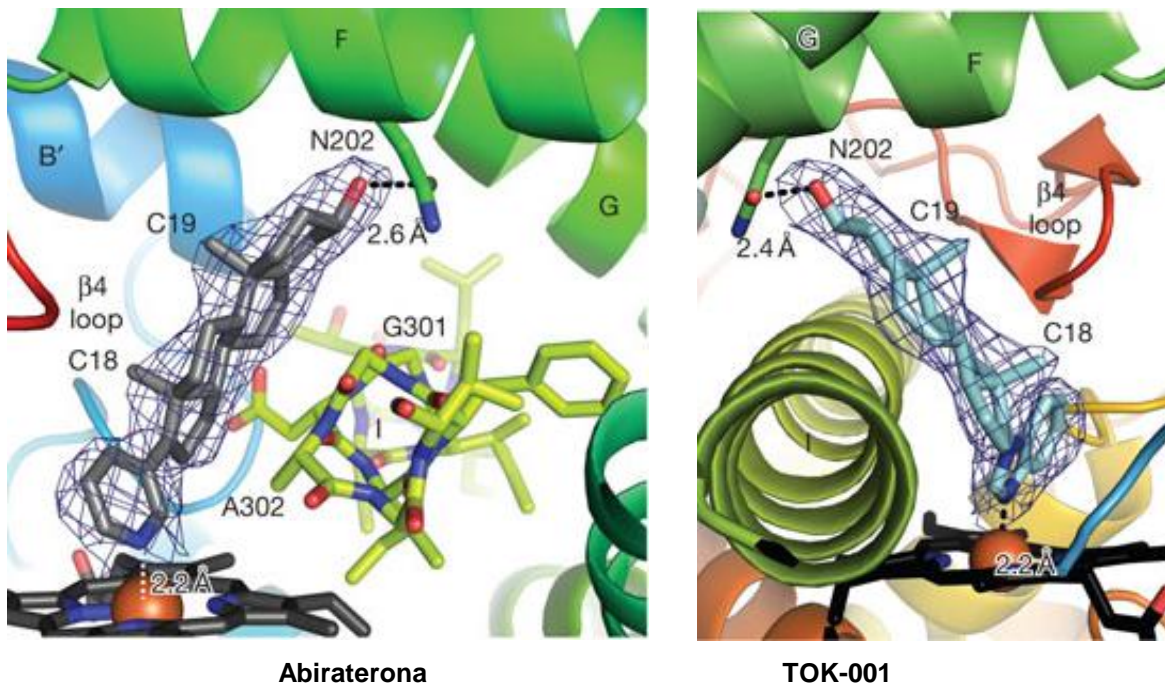


Figura 5. Interacción de la Abiraterona y el TOK-001 con la enzima CYP17.

2.4.3 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa (5 α R)

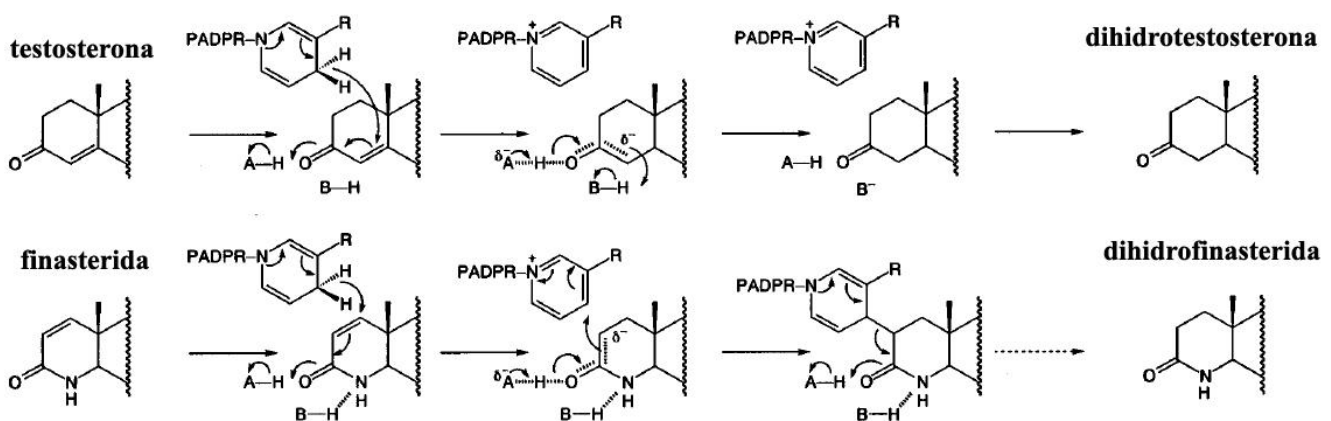
La enzima 5 α -reductasa cataliza la reducción estereoselectiva de la testosterona a la dihidrotestosterona (DHT) utilizando el cofactor NADPH. Existen dos isoformas de esta enzima, la isoforma 1 es codificada por el gen *SRD5A1* y se encuentra, predominantemente, en piel e hígado. Ésta es activa a un pH alcalino, mientras que la isoforma 2 es codificada por el gen *SRD5A2* y se encuentra, predominantemente, en la próstata, vesículas seminales, epidídimo y, en menor medida, en el hígado.³⁸

2. Antecedentes

La actividad androgénica en la próstata es debida a la DHT. Alrededor del 95% de la testosterona es convertida al andrógeno más potente, DHT, por la isoforma 2 de la enzima 5α -reductasa ($5\alpha R2$). Por lo tanto, el bloqueo de esta enzima facilita la inhibición de la acción de la testosterona en el tejido urogenital sin bloquear la acción de andrógenos en el sistema periférico.

En la actualidad, el uso principal de los inhibidores de la $5\alpha R$ es para el tratamiento de la alopecia (inhibidores de la isoenzima 1) y de la hiperplasia prostática benigna (inhibidores de la isoforma 2) además de ser de gran importancia como agentes quimiopreventivos.⁷

La finasterida (Proscar[®]) fue uno de los primeros inhibidores de esta enzima que llegó al mercado y posteriormente llegó la dutasterida (Avodart[®]), que no es selectivo por las dos isoformas. El mecanismo de acción propuesto se ilustra en la Esquema 5. La finasterida actúa como un inhibidor suicida ya que en el último paso, a diferencia de la testosterona, ya no se lleva a cabo la transferencia de protón de un residuo de la enzima (letra B) al carbanión, lo que promueve la formación de un aducto entre el NADPH y el anillo lactámico.³⁸



Esquema 5. Mecanismo de inhibición de la enzima 5α -reductasa por la finasterida. (PADPR = fosfoadenosin difosforibosa. Adaptado de la referencia 38)

También se ha estudiado el farmacóforo y la Relación Estructura Actividad (SAR, por sus siglas en inglés) para determinar los requerimientos necesarios para la inhibición de la enzima $5\alpha R2$, los cuales se ilustran en la Figura 6.

2. Antecedentes

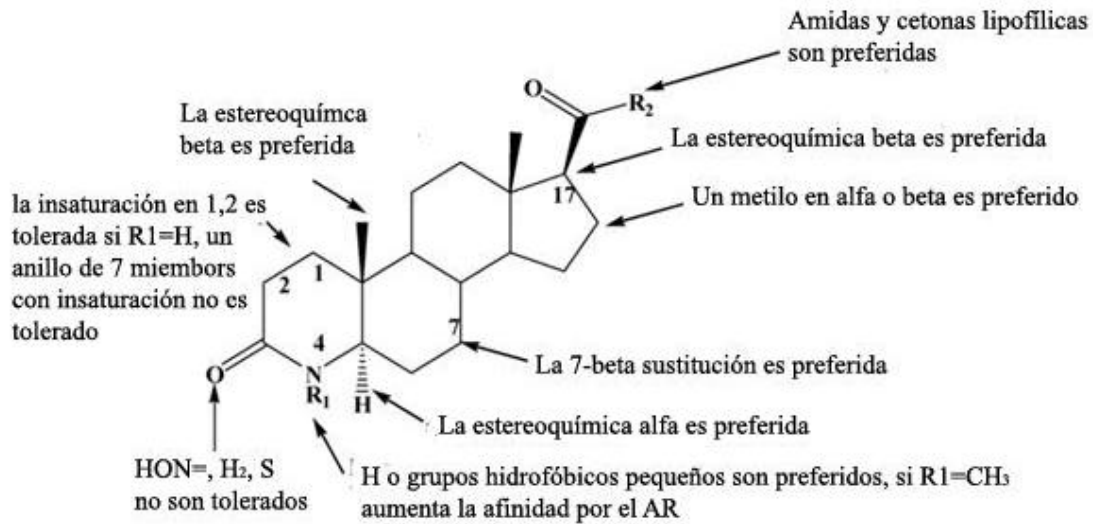


Figura 6. SAR para los derivados azaesteroidales.⁵

En estudios previos, también se ha demostrado la influencia de diferentes amidas en el carbono C-20 de algunos derivados azaesteroidales, observándose que sustituyentes voluminosos aumentan, considerablemente, la selectividad hacia la $5\alpha R2$ (Tabla 1) lo que ha promovido la obtención de algunos derivados más potentes que los fármacos finasterida, dutasterida y episterida.³⁹

Tabla 1: Inhibición de la enzima 5α -reductasa por la finasterida, dutasterida, episterida y derivados azaesteroidales con diferentes amidas en la posición C-20

Compuesto	Sustituyentes	CI_{50} (nM)	
		$5\alpha R1$	$5\alpha R2$
Finasterida	-	52	<0.1
Dutasterida	-	2.4	0.5
Episterida	-	>1000	0.6
I	$R_1 = C_6H_5$; $R_2 = H$	20	0.2
II	$R_1 = C_6H_5$; $R_2 = CH_3$	350	24.6
III	$R_1 = 2-CF_3C_6H_4$; $R_2 = H$	25.6	<0.1
IV	$R_1 = C_6H_5$; $R_2 = C_6H_5$	>1000	25.2
V	$R_1, R_2 = 1$ -indolinil	120.2	0.4
VI	$R_1 = 3-C_6H_5-C_6H_4$; $R_2 = H$	14.0	<0.1
VII	$R_1 = 1$ -Naftil; $R_2 = H$	8.1	0.2

2. Antecedentes

2.4.3.1 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 desarrollados en el grupo del Dr. Eugene Bratoeff

Durante los últimos 18 años, el grupo de trabajo del Dr. Eugene Bratoeff ha reportado una amplia gama de derivados esteroidales, de los cuales, algunos han mostrado mayor potencia que la finasterida sobre la 5 α R2.⁴⁰⁻⁵⁴ Debido a la falta de la estructura tridimensional de ambas isoformas de la enzima 5 α R, durante todos estos años se ha recurrido a la modificación estructural sistemática de diferentes esteroides, los cuales, en su mayoría, están constituidos por el esqueleto de pregnano, aunque también existen algunos de ellos que tienen el esqueleto de D-homoandrostando.

Sin embargo, en el año 2010, Saurabh Aggarwal *et. al.*⁵⁵ reportaron un trabajo en el que utilizó un set de 30 moléculas desarrolladas en el grupo del Dr. Bratoeff para llevar a cabo un estudio SOMFA (*Self-organizing molecular field analysis*, por sus siglas en inglés), la cual es una técnica QSAR-3D (3D *Quantitative Structure-Activity Relationship*, por sus siglas en inglés). A diferencia de un estudio CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*, por sus siglas en inglés), SOMFA se basa en el estudio del campo estérico y electrostático de una serie de compuestos para relacionarlo con la actividad biológica, con la ventaja de que se puede llevar a cabo el alineamiento, tanto de las moléculas de entrenamiento como de las de predicción, para refinar un modelo.⁵⁶

En el estudio realizado por Aggarwal se encontró que la presencia de grupos voluminosos en las posiciones C-3, C-16 y C-17 del esqueleto esteroideal incrementaban la inhibición de la enzima 5 α R2, mientras que la presencia de este tipo de sustituyentes en la posiciones C-4 no era favorable para dicha actividad. Por otro lado, la inserción de grupos electropositivos alrededor de las posiciones C-3 y C-4 incrementaba la potencia de este tipo de compuestos (Figura 7).

2. Antecedentes

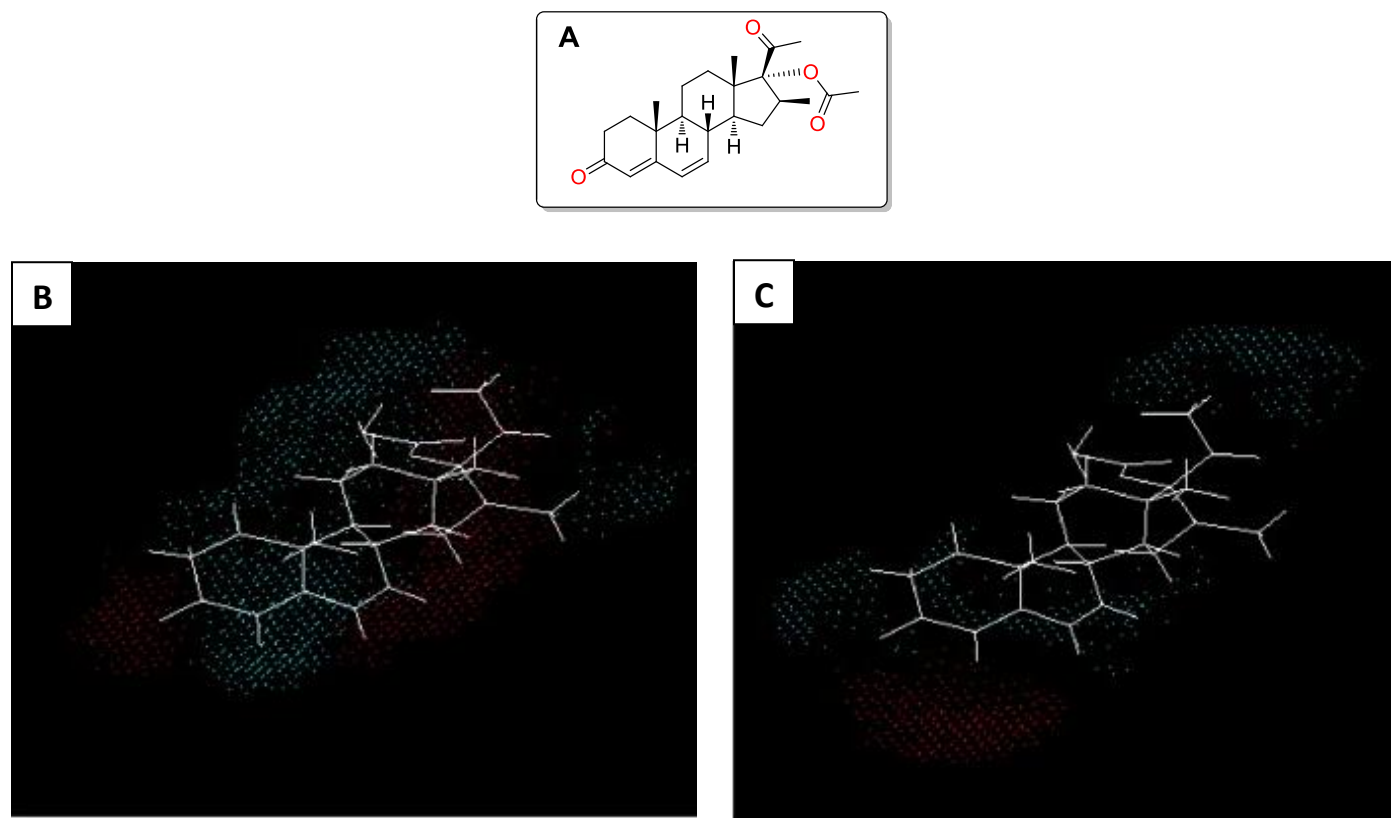


Figura 7. Estudio SOMFA para los derivados sintetizados en el grupo del Dr. Bratoeff: (A) Estructura del compuesto que fue utilizado como templete para el alineamiento; (B) Mapa de puntos para el compuesto utilizado como templete en el que las regiones rojas y azules indican que la presencia de grupos voluminosos favorece o desfavorece, respectivamente, la actividad inhibitoria sobre la enzima 5 α R2; (C) Mapa de puntos para el compuesto utilizado como templete en el que las regiones rojas y azules indican que la presencia de grupos electropositivos o electronegativos favorece o desfavorece, respectivamente, la actividad inhibitoria sobre la enzima 5 α R2.⁵¹

Recientemente, José L. Medina-Franco *et. al.*⁵⁷ reportaron un nuevo estudio basado en la estructura del ligando; en él, se realizó un análisis quimioinformático del panorama de actividad de 53 compuestos desarrollados en nuestro grupo de trabajo, lo cuales son inhibidores de la enzima 5 α R2. En resumen, en este trabajo se utilizó el concepto de “Modelado del panorama de actividad” (*Activity Landscape Analysis*, ALM, por sus siglas en inglés), el cual se enfoca en la identificación de compuestos con una estructura muy similar, pero diferentes potencias (conocidos como *activity cliffs*).⁵⁸ ALM es parte de un concepto denominado “Modelado de panoramas de propiedad” usado en química en donde “actividad” (típicamente referido como actividad biológica) es un caso específico de “propiedad”. En este contexto, ALM no necesariamente asume que todos los compuestos tienen exactamente el mismo mecanismo de acción.⁵⁹ En este sentido, esta metodología, a diferencia del estudio SOMFA mencionado anteriormente, tiene la

2. Antecedentes

ventaja de que no es necesario tener la estructura tridimensional de los ligandos, así como la generación del alineamiento de todos los compuestos y que, además, éstos tengan que ser congéneres.⁶⁰

Para el grupo de 53 moléculas analizadas se realizó una representación del espacio químico (Figura 8) llevando a cabo un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) de la matriz de similitud de los compuestos estudiados. Esta matriz se calculó utilizando los descriptores topológicos *Extended-Connectivity Fingerprints* (ECFPs, por sus siglas en inglés),⁶¹ mientras que la similitud estructural, con base a los resultados de la matriz, se calculó por medio del coeficiente de Tanimoto (Tc).

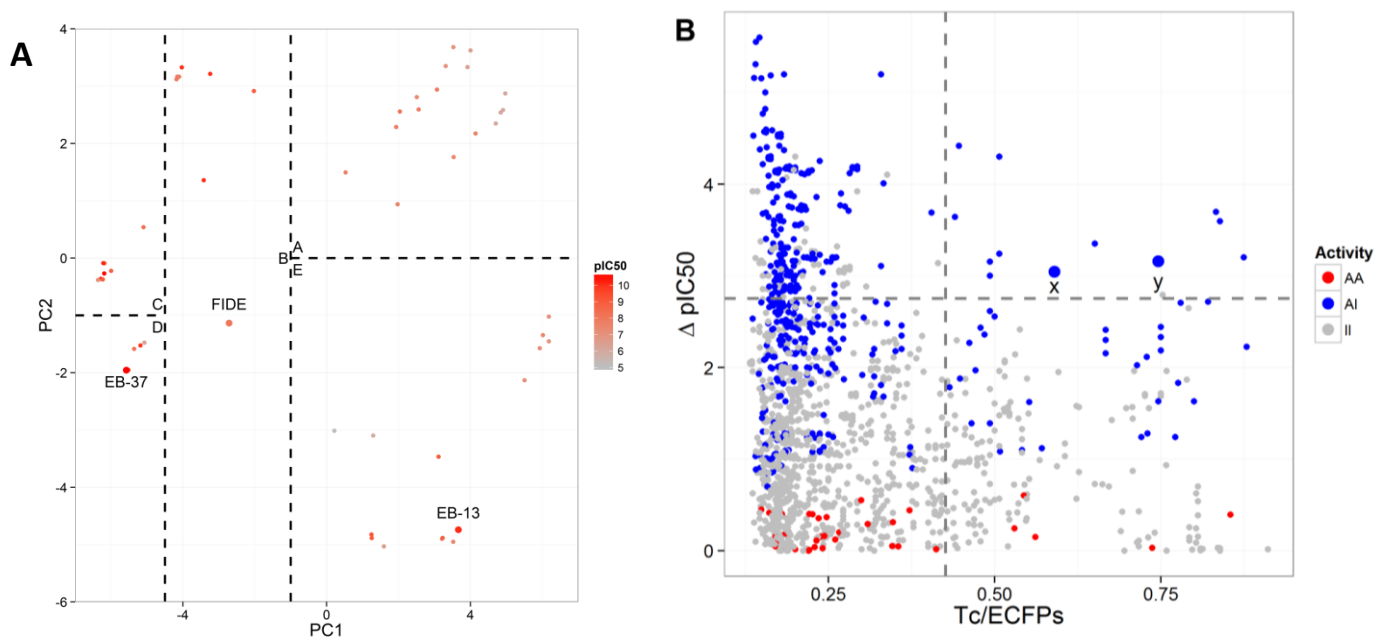


Figura 8. (A) Representación visual del espacio químico para el grupo de las 53 moléculas evaluadas. El PCA muestra la posición relativa de la finasterida (FIDE); (B) Mapa SAS (Structure-activity similarity), cada punto (1431 en total) representa la comparación de un par de moléculas; en este mapa se compara la diferencia de potencia de cada par en relación con su similitud estructural. Los pares de compuestos están categorizados de acuerdo a su actividad, en donde “AA” representa un punto en donde ambas moléculas son activas (su $pIC_{50} \geq 8.0$); “AI” representa una molécula activa y otra inactiva, mientras que “II” representa a dos moléculas inactivas.

Los resultados de este estudio arrojaron algunos aspectos importantes (Figura 9), entre los que destacan la presencia de una cetona dentro del anillo A, la cual es esencial para la actividad biológica. Otro aspecto importante es la cantidad de instauraciones dentro del esqueleto esteroidal, es decir, la presencia de una dienona o trienona, siendo ésta última la que tiene un impacto negativo sobre la actividad biológica. Otra observación importante, es que, tanto la presencia de la cetona como el número de instauraciones tienen mayor peso que la presencia o ausencia de un grupo voluminoso (éster o carbamato) sobre la posición C-17.

2. Antecedentes

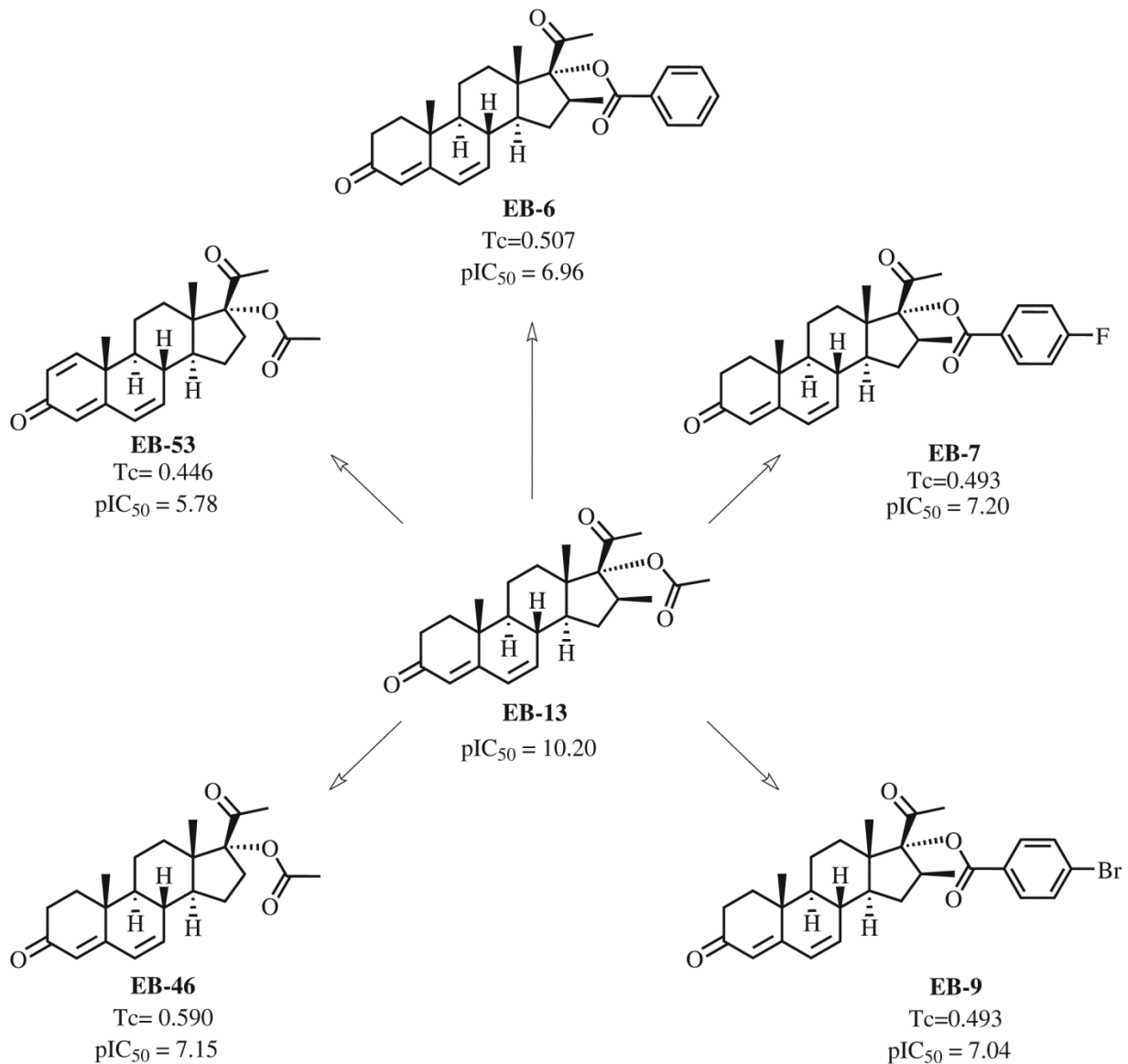


Figura 9. Relación Estructura-Actividad del compuesto EB-13, el cual es generador de *activity cliffs*.

2.4.4 Enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (17β -HSD3)

Las 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (17β -HSD's, por sus siglas en inglés) son una subfamilia de quince óxido-reductasas que utilizan NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$ o $NAPDH$ como cofactor para llevar a cabo su función (Tabla 2).⁶²⁻⁶⁹ Las 17β -HSD's son responsables de la reducción del grupo carbonilo en la posición 17 o la oxidación del grupo 17β -OH en diferentes esteroides manteniendo así las concentraciones adecuadas de cada hormona esteroideal para su respectivo receptor.⁷⁰ Aunque puede parecer que estas macromoléculas son capaces de realizar tanto la reducción y oxidación de sus sustratos dependiendo del cofactor presente, se ha establecido que las 17β -HSD's prefieren realizar sólo un tipo de reacción.

2. Antecedentes

Tabla 2. Características generales de las isoformas de 17 β -HSD's

Enzima	Localización celular	Localización cromosómica	Cofactor	Función
17 β -HSD1	Citosol	17q11-q21	NADPH	Estrona \rightarrow Estradiol
17 β -HSD2	Retículo endoplásmico	16q24.1-2	NADP ⁺	Estradiol \rightarrow Estrona
17 β -HSD3	Retículo endoplásmico	9q22	NADPH	4-diona \rightarrow Testosterona ^a
17 β -HSD4	Peroxisoma	5q2.3	NAD ⁺	Multifunción
17 β -HSD5	Citosol	10p14-15	NADPH	4-diona \rightarrow Testosterona
17 β -HSD6	Membranal	12q13.3	NAD ⁺	Androstendiol \rightarrow DHT
17 β -HSD7	Membranal	10p11.2	NADPH	Estrona \rightarrow Estradiol
17 β -HSD8	Mitocondria	6p21.3	NAD ⁺	Estradiol \rightarrow Estrona
17 β -HSD9	ND ^b	ND ^b	NAD ⁺	Multifunción
17 β -HSD10	Mitocondria	Xp11.2	NAD ⁺	Multifunción
17 β -HSD11	Retículo endoplásmico	4q22.1	ND ^b	ND ^b
17 β -HSD12	Retículo endoplásmico	11p11.2	NADPH	Multifunción
17 β -HSD13	Citosol	4q22.1	ND ^b	ND ^b
17 β -HSD14	Citosol	19q13.33	NAD ⁺	Estradiol \rightarrow Estrona
17 β -HSD15 ^c	ND ^b	ND ^b	NADPH	4-diona \rightarrow DHT

^a 17 β -HSD3 es la enzima que realiza la mayor transformación de 4-diona \rightarrow Testosterona.

^b ND = No determinado.

^c No se ha caracterizado completamente el papel de esta enzima en la esteroidogénesis.

Actualmente, existe un gran interés por este tipo de enzimas ya que se ha identificado que su sobreexpresión está directamente relacionada a diferentes padecimientos. Por ejemplo: la enzima 17 β -HSD1, que es la encargada de catalizar la reducción de Estrona (E1) al estrógeno más potente Estradiol (E2), se encuentra sobreexpresada en tumores de glándulas mamarias. Por otro lado, la 17 β -HSD10, que se expresa principalmente en el tejido cerebral, es una enzima multifuncional que además de participar en desactivación de E2 a E1, mediante la oxidación del grupo 17 β -OH, también lleva a cabo la oxidación de algunos ácidos grasos y participa en la formación de agregados de proteína β -amiloide favoreciendo así la aparición y la progresión de la enfermedad de Alzheimer.⁷¹

Finalmente, la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 β -HSD3) es una macromolécula que se expresa en testículos y células cancerosas de próstata. Ésta realiza la transformación de 4-androstendiona (4-diona) a uno de los andrógenos más potentes, la testosterona

2. Antecedentes

(Figura 10), por medio de la reducción estereoselectiva de la cetona en C-17. La testosterona sintetizada juega un papel esencial en el crecimiento y proliferación de células prostáticas malignas.⁶ Un dato que cabe resaltar es que, en tumores cancerosos de próstata, la expresión de la enzima 17 β -HSD3 es 31 veces mayor a lo normal.⁷² Por tanto, la 17 β -HSD3 es una diana farmacológica atractiva para el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento del cáncer de próstata.

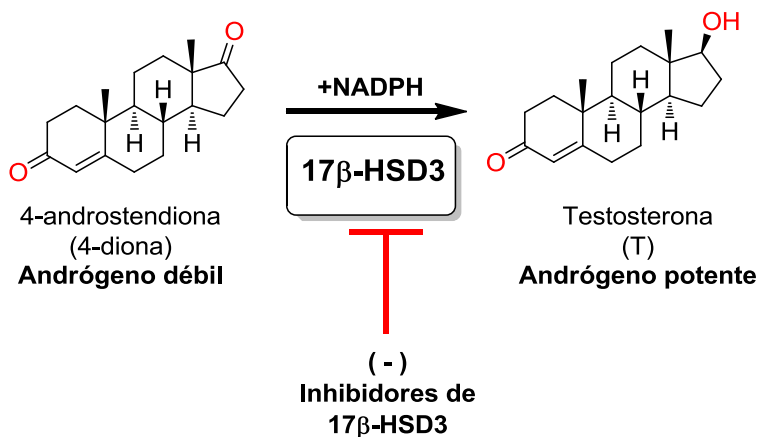


Figura 10. Conversión de la 4-diona a T por la enzima 17 β -HSD3

2.4.4.1 Inhibidores de la enzima 17 β -HSD3

Hasta la fecha, existe una gama de inhibidores esteroidales y no esteroidales de la enzima 17 β -HSD3 (Figura 11). Algunos ejemplos representativos de inhibidores no-esteroidales son algunos derivados del ácido antranílico⁷³ (compuesto XVIII), oxazolidin-2-tioxo-5-onas⁷⁴ (compuesto XIX) y algunas cumarinas⁷⁵ (compuesto XX). Por otro lado, el desarrollo de compuestos de origen esteroidal dirigidos a esta diana es más extenso. En este sentido, el grupo de trabajo del Prof. Donald Poirier fue uno de los pioneros en este ramo y ha reportado hasta la fecha una cantidad considerable de este tipo de inhibidores, los cuales están compuestos exclusivamente por el esqueleto de 3 α -hidroxiandrosta-17-ona (comúnmente conocido como androsterona o ADT). Inicialmente, el compuesto BTN2 fue de los primeros reportados y presentó actividad anti-17 β -HSD3 con una CI_{50} =57 nM.⁷⁶ Posteriormente, en el mismo grupo, se sintetizaron por química combinatoria nuevos esteroides. La evaluación biológica de éstos frente a la enzima de 17 β -HSD3 permitió asentar que, la presencia en posición C-3 de una cadena lateral voluminosa y de carácter lipofílico (como en el caso del compuesto C-7-3) es crucial para la actividad inhibitoria.⁷⁷ Estos estudios sirvieron como base para la preparación de una nueva generación de esteroides, de los cuales se

2. Antecedentes

identificó al derivado RM-532-105 como uno de los más potentes de su clase. En la siguiente sección se profundizará, más a detalle, acerca de este inhibidor.

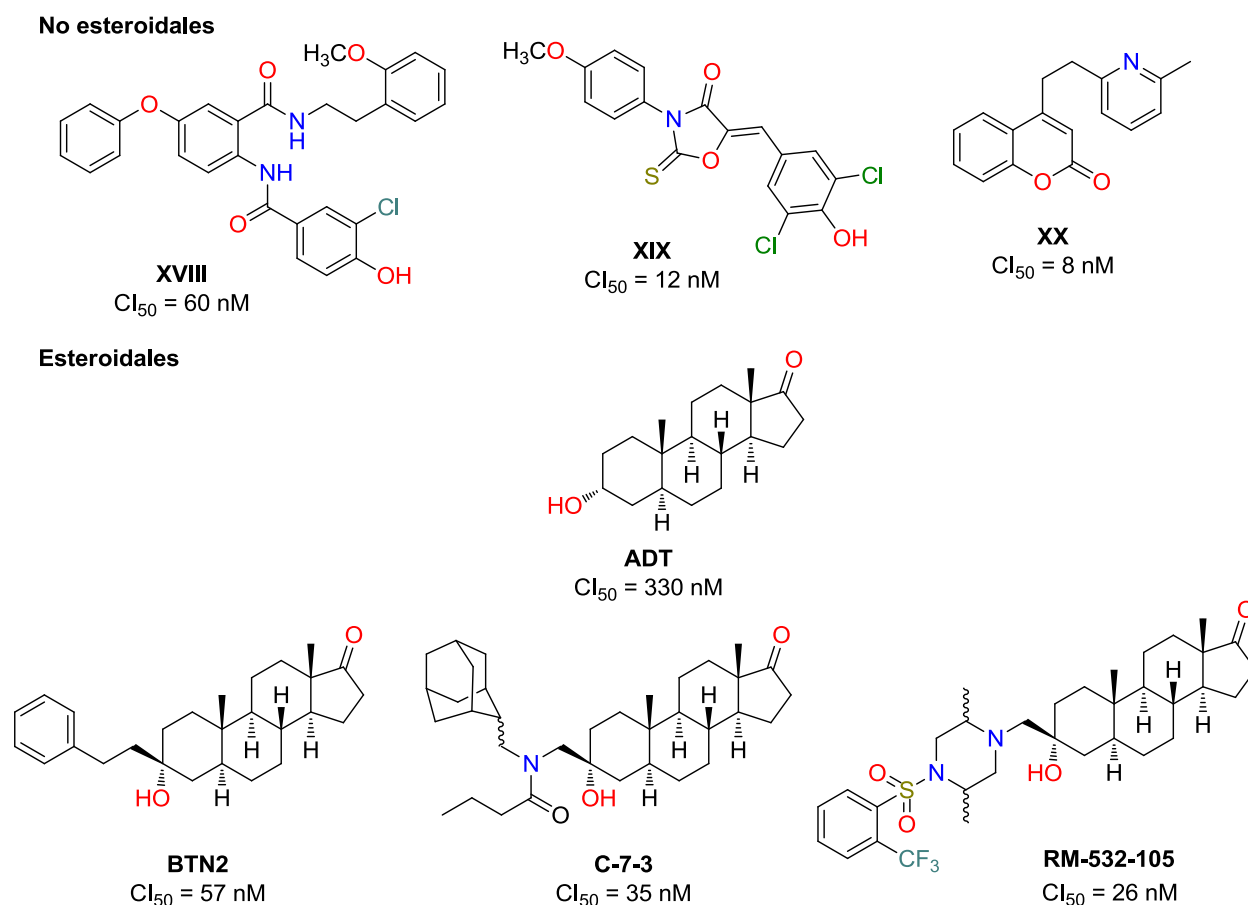


Figura 11. Inhibidores no esteroidales y esteroidales de la enzima 17β -HSD3.

2.4.4.2 Compuesto RM-532-105 como inhibidor potente de la enzima 17β -HSD3

En 2011, se reportó la síntesis de diferentes derivados de androsterona por el grupo de investigación del Prof. Donald Poirier.⁷⁸ En este estudio, se presentaron compuestos diversos, los cuales contenían una piperazina o 2,5-dimetilpiperazina unida directamente al metileno que se encontraba en la posición C-3 del esqueleto esteroide. A este anillo heterocíclico se incorporaron diferentes grupos entre los que se encontraban, principalmente, anillos alifáticos y aromáticos unidos al nitrógeno de la piperazina con un espaciador metileno o sulfona. De la serie de compuestos evaluada sobre la enzima 17β -HSD3, el compuesto con la clave interna *RM-532-105* fue el que demostró la mayor potencia al disminuir la actividad catalítica de esta enzima con una $Cl_{50} = 26 \text{ nM}$ en un modelo en el que se utilizaron células HEK-293 (células sanas de riñón que sobreexpresan 17β -HSD3). También, se elucidó su actividad en un homogenizado de testículos de rata con una $Cl_{50} = 13 \pm 2 \text{ nM}$.⁷⁹ Adicionalmente, se descubrió que este

2. Antecedentes

compuesto era capaz de disminuir la transformación de 4-diona a testosterona con una $CI_{50} = 85$ nM en células LNCaP[17 β -HSD3] que corresponden a células cancerosas de próstata transfectadas con el gen *HSD17B3* y que por tanto, son un modelo muy aproximado a un tumor maligno de la glándula prostática en el que se sobreexpresa la enzima 17 β -HSD3 (Figura 12).

Por otra parte, este derivado no mostró un efecto androgénico, ya que no indujo la proliferación de células Shonogi y LAPC-4 que se caracterizan por ser andrógeno-sensibles, es decir, que la presencia de cualquier compuesto agonista del receptor de andrógenos promueve su crecimiento y división celular.⁸⁰ Sin embargo, al evaluar RM-532-105 en modelo de rata para determinar su eficacia, se observó que a una dosis de 10 mg/Kg no tenía ningún efecto en la disminución de los niveles plasmáticos y testiculares de testosterona, por lo que se incrementó la dosis hasta 50 mg/Kg en donde el decremento de los niveles plasmáticos de T y DHT disminuyeron en un 31% y 45%, respectivamente, después de dos horas de administrarse el compuesto por vía subcutánea. No obstante, los niveles de ambos andrógenos volvieron a la normalidad siete horas después de la administración, lo que indicaba una baja duración del efecto de RM-532-105. Como se discutirá más adelante, en el Capítulo 5.5.2, la baja eficacia de este derivado se debe a que es fácilmente metabolizado a un compuesto inactivo.

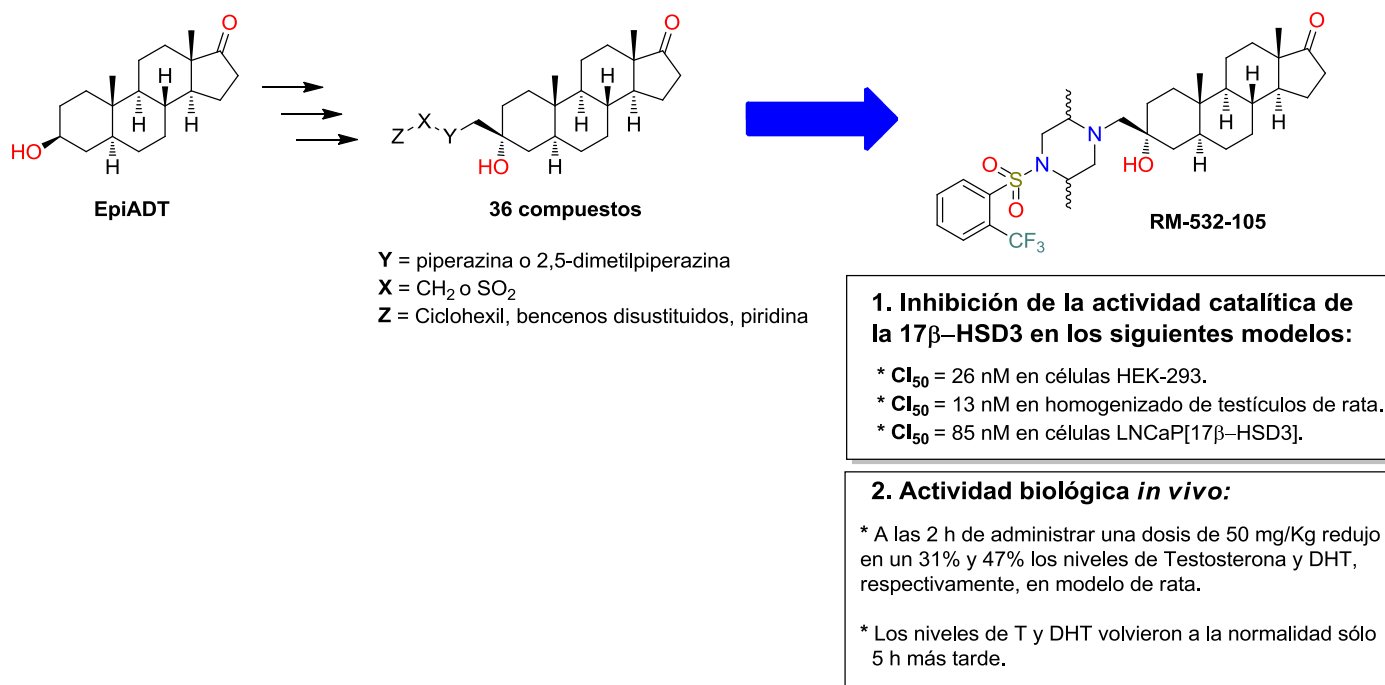


Figura 12. RM-532-105 como compuesto líder

2. Antecedentes

2.5 La modificación estructural en el diseño de nuevos fármacos

Una vez que se dispone de un compuesto prototipo, uno de los aspectos en la Química Farmacéutica que adquiere relevancia es el diseño de fármacos que permitan la exploración sistémica de dicho compuesto cabeza de serie. Dicho conjunto de pautas, son la base de la llamada “modificación estructural” que, aun siendo un método en gran parte empírico, presenta una serie de ventajas que lo han hecho popular. La primera de ellas es la probabilidad de mejorar las propiedades farmacológicas del prototipo. Por otra parte, es posible obtener compuestos más simples que mantengan o mejoren la actividad del prototipo y para los que puedan emplearse rutas sintéticas comunes, o aproximaciones combinatorias de las mismas con el consiguiente ahorro de tiempo y de dinero. Por otra parte, el empleo de la misma en la evaluación farmacológica o bioquímica para toda la serie de compuestos presenta también un gran interés, tanto económico como científico ya que permite una mejor comparación de las actividades y posibilita el establecimiento de las Relaciones Estructura-Actividad más fiables.⁸¹

2.5.1 Concepto de bioisosterismo y su aplicación en el desarrollo y optimización de moléculas activas

El concepto de isosterismo fue introducido en 1919 por I. Langmuir que estaba interesado por las relaciones fisicoquímicas de las moléculas isósteras, las cuales él definió como: *“Co-moléculas que tienen el mismo número y arreglo de electrones. Estas co-moléculas entonces deben tener el mismo número de átomos. La diferencia esencial entre los isósteros está confinada a la carga de los núcleos de los átomos constituyentes”*.

En 1932, Erlenmeyer publicó una serie de estudios detallados acerca del concepto de isosterismo y, particularmente, a la aplicación a sistemas biológicos. Erlenmeyer propuso su propia definición como: *“elementos, moléculas o iones en los cuales las capas electrónicas externas pueden ser consideradas como idénticas”*.

En 1951, Friedman introdujo el término bioisosterismo para describir el fenómeno observado entre las sustancias estructuralmente relacionadas y lo definió como los compuestos que se ajustan a las definiciones de isosterismo y que, además, ejercen una actividad biológica similar.

Más tarde, Thornber propuso una ampliación a este término, definiéndolo como subunidades o grupos o moléculas que poseen propiedades fisicoquímicas y efectos biológicos similares.

En 1970, Alfred Burger clasificó y subdividió los bioisósteros en dos grandes categorías: clásicos (Tabla 3) y no-clásicos (Tabla 4). Los bioisósteros clásicos son los átomos, sustituyentes o grupos

2. Antecedentes

funcionales de la misma valencia, y las equivalencias entre anillos (Figura 13); mientras que los bioisómeros no-clásicos no se ajustan a las definiciones de la primera clase.

Tabla 3. Ejemplos de átomos y grupos de átomos bioisómeros clásicos

Monovalentes	Divalentes	Trivalentes	Tetravalentes
-OH, -NH ₂ , -CH ₃ , -OR	-CH ₂ -	=CH-	=C=
-F -Cl, -Br, -I, -SH, -PH ₂	-O-	=N-	=Si=
-Si ₃ , -SR	-S-	=P-	=N+=

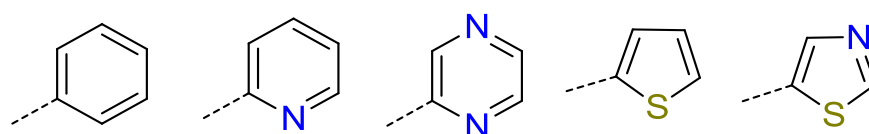


Figura 13. Equivalencias entre anillos

Tabla 4. Ejemplos de átomos y grupos de átomos de bioisómeros no-clásicos

-CO-	-COOH	-SO ₂ NH ₂	-H	-CONH-	-COOR-	-CONH ₂	C ₄ H ₄ S
-CO ₂ -	-SO ₃ H	PO(OH)NH ₂	-F	-NHCO-	-ROCO	CSNH ₂	-C ₅ H ₄ N
-SO ₂ -	-SO ₂ NHR SO ₂ NH ₂						-C ₆ H ₅
-SO ₂ NR-							C ₄ H ₄ NH

El reemplazo bioisostérico tiene diferentes finalidades, las cuales se enlistan a continuación:

1. Incrementar la selectividad de un compuesto activo al sustituir un átomo o un grupo de átomos.
2. Mejorar la solubilidad de un compuesto.
3. Mejorar su perfil ADME-Tox.
4. Propiedad intelectual: ya que al realizar esta estrategia, hay una alta probabilidad de generar una nueva entidad química con una actividad biológica similar a la de la molécula patentada.

Algunos ejemplos en los que se ha aplicado exitosamente esta estrategia es en el desarrollo de sulfonamidas antibacterianas. Otro ejemplo es la procaína y la procainamida, en donde la segunda es más estable a la degradación metabólica y por tanto su efecto como anestésico es más duradero gracias a la sustitución de la función éster por una amida (Figura 14).⁸²

2. Antecedentes

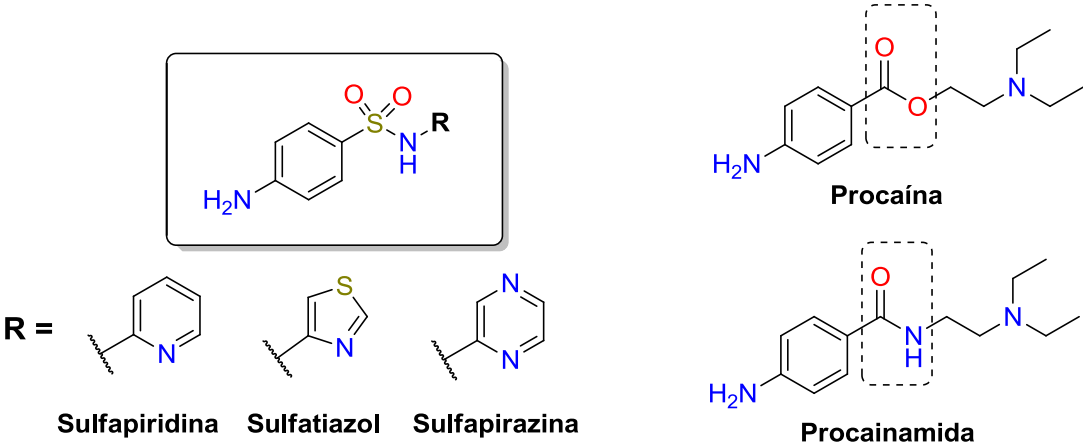


Figura 14. Algunos ejemplos en los que se aplica el reemplazo bioisostérico.

3. Planteamiento de la hipótesis

3. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

Hasta la fecha, el cáncer de próstata es uno de los problemas de salud más comunes en México.. Aunque existen tratamientos disponibles, muchos de ellos presentan efectos adversos, por ejemplo, la finasterida (inhibidor de la $5\alpha R2$) no es útil para el tratamiento del cáncer de próstata; de hecho, su uso puede incrementar el riesgo de promover un cáncer prostático más agresivo, ya que este fármaco tiene la desventaja de que, alternativamente, a la inhibición de $5\alpha R2$, puede promover la expresión de factores de transcripción en células cancerosas de próstata que son andrógeno-insensibles.⁸³ Por otro lado, los antagonistas del receptor de andrógenos, aunque tienen una gran eficacia, suelen presentar resistencia por parte de tumores malignos de próstata avanzados; incluso, como se había mencionado previamente en la sección 2.4.1, este tipo de fármacos pueden fungir como agonistas cuando interactúan con el receptor de andrógenos mutado en ciertos tipos de cáncer de próstata. Finalmente, los inhibidores de la enzima CYP17 como la abiraterona, la cual disminuye significativamente los niveles plasmáticos de andrógenos, suele incrementar los niveles de mineralocorticoides lo que resulta en efectos secundarios graves como hipertensión arterial y retención de líquidos en el cuerpo.⁸⁴

Debido a este tipo de efectos secundarios, es necesario generar antiandrógenos que presenten mayor selectividad, preferentemente en las últimas etapas de la esteroidogénesis, hacia la inhibición de macromoléculas que estén involucradas en la síntesis de los andrógenos T y DHT; con la finalidad de detener la proliferación de células prostáticas malignas andrógeno-sensibles. De hecho, una molécula que, además de inhibir la producción de los andrógenos mencionados, sea también capaz de detener el crecimiento de células malignas más agresivas, las cuales son capaces de sobrevivir en ausencia de T y DHT, sería un plus para el tratamiento del cáncer de próstata. Por tanto, las enzimas 17β -HSD3 y $5\alpha R$ al estar directamente involucradas en la producción de T y DHT, respectivamente, son más atractivas. Adicionalmente, como se había mencionado, ambas enzimas se encuentran comúnmente sobreexpresadas en tumores cancerosos de próstata.

3.1 Inhibición de la enzima 5α -reductasa

Si bien es cierto que en nuestro grupo de trabajo se ha generado una considerable biblioteca de compuestos que inhiben a la enzima $5\alpha R$ tipo 1 y 2 y que, además, son capaces de disminuir el peso de próstata en modelos *in vivo*, por lo que son útiles para el tratamiento de la HPB; es poco lo que se ha investigado respecto al CaP, el cual, es un padecimiento más complejo y con mayor mortalidad en nuestro país. En este sentido, en el presente proyecto se propone la síntesis de nuevos derivados esteroidales con el esqueleto de androstano, específicamente androst-4-en-3-ona con diferentes amidas aromáticas

3. Planteamiento de la hipótesis

sustituidas en la posición C-17 (17β -*N*-arilcabamoilandro-4-en-3-onas). El razonamiento de esta propuesta se basa en que, de acuerdo a los estudios realizados por el análisis del panorama de actividad de los compuestos preparados en nuestro laboratorio, así como el estudio SOMFA realizado para las mismas moléculas, es necesaria la presencia de una cetona α,β -insaturada en la posición C-3 y grupos voluminosos en la posición C-17. Debido a que hasta el momento los grupos voluminosos unidos a derivados esteroidales reportados han sido, en su gran mayoría, ésteres, los cuales es bien sabido que son susceptibles a ser hidrolizados en el organismo con facilidad, en este proyecto se propone que estos grupos voluminosos sean amidas, las cuales son metabólicamente más estables que los ésteres; esto está pensado por supuesto a estudios posteriores en modelos *in vivo*.

Adicionalmente, se propone la diversificación de estas amidas aromáticas, esto es:

1. Incorporar diferentes anilinas sustituidas en C-20 con diferente patrón de sustitución para la formación de las amidas en C-17 del esteroide.
2. Estudiar el efecto de homologación al utilizar bencilaminas en vez de anilinas.
3. Utilizar algunos equivalentes anulares o isómeros del benceno como lo son la piridina y el tiazol. En este sentido, incorporar 2-aminopiridina y 2-aminotiazol a la posición C-20.
4. Finalmente, incorporar la indolina la cual, en teoría, generaría un derivado con menor libertad conformacional que los derivados propuestos en los puntos anteriores.

Las modificaciones antes mencionadas, tienen la intención de observar y determinar los requerimientos necesarios para la inhibición de las enzimas 5α R tipo 1 y 2, así como la actividad antiproliferativa en células cancerosas de próstata, ya que, en principio, los cambios expuestos modificarían las propiedades fisicoquímicas de cada molécula y, por tanto, su interacción con sus dianas biológicas.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, en conjunto con los estudios realizados sobre los azaesteroides, descritos en la sección 2.4.3, se espera que los nuevos derivados propuestos, los cuales contendrán en su estructura una cetona α,β -insaturada en C-3 y amidas en C-17 con grupos tanto voluminosos como electronegativos, presenten una mayor actividad sobre la isoforma 2 de la 5α R (5α R2). Con ello, se observará una disminución en el peso de la próstata en modelos *in vivo*, ya que esta isoforma se expresa en mayor proporción en próstata sana y se sobreexpresa en padecimientos como la HPB. Por otro lado, se espera que los derivados con amidas, menos voluminosos, en la misma posición sean menos potentes hacia la isoforma 2 y presenten una mayor inhibición de la actividad catalítica de la isoforma 1 (5α R1). Por tanto, estos esteroides tendrán una mayor actividad antiproliferativa en la línea celular LNCaP

3. Planteamiento de la hipótesis

(línea celular de cáncer de próstata andrógeno-sensible) ya que estas células sobreexpresan la $5\alpha R1$ en vez de $5\alpha R2$ (Figura 15).

Inhibición de la enzima $5\alpha R1$ y $5\alpha R2$

17β -*N*-arilcarbamoilandro-4-en-3-onas

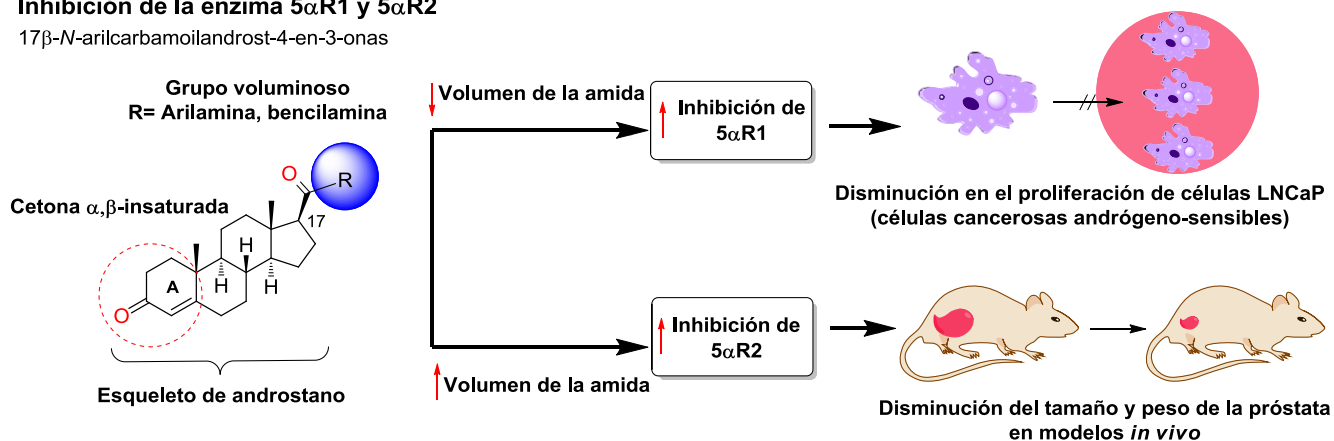


Figura 15. Estrategia para la generación de inhibidores de las dos isoformas de la enzima 5α -reductasa.

3.2 Inhibición de la enzima 17β -HSD3

Como se mencionó anteriormente, en la sección 2.4.4.2, el derivado de androstano RM-532-105 ha demostrado ser uno de los inhibidores más potentes para la enzima 17β -HSD3. Sin embargo, este compuesto es fácilmente metabolizado lo que disminuye su eficacia en modelos *in vivo*. En este sentido, uno de los metabolitos principales encontrados para este compuesto fue el producto de la hidroxilación en el carbono C-16. Por tanto, es necesario llevar a cabo diferentes modificaciones sistemáticas sobre este compuesto con la finalidad de incrementar su estabilidad metabólica, ya sea para evitar su reconocimiento por parte de las enzimas responsables de metabolizar a este derivado o por medio de la incorporación directa de diferentes grupos en el carbono C-16 para “bloquear” dicha posición. Estas modificaciones se dividen en dos puntos (Figura 16):

1. *Modificar la conformación espacial de los anillos A y D del compuesto líder RM-532-105:* esto se logra a través de la epimerización del hidrógeno en posición C-5 (5α -H) o el metilo unido a C-13 (13β -CH₃). Aunque esta estrategia no es muy común en la modificación de prototipos, se sabe que la estereoquímica juega un papel esencial en la farmacocinética; esto se debe a que las enzimas que participan en los procesos de metabólicos en el organismo son altamente estereoespecíficas, es decir, que “reconocen” la estereoquímica de un sustrato y sólo catalizan la reacción sobre éste si la estereoquímica es la correcta.⁸⁵ Por tanto, se esperaría que las modificaciones en la estereoquímica del esqueleto esteroidal disminuyeran el reconocimiento por parte de las enzimas que llevan a cabo la hidroxilación en C-16 de RM-532-105.

3. Planteamiento de la hipótesis

2. *Modificación sobre el carbono C-16 o C-17:* debido a que se observó en el ensayo de estabilidad metabólica que el principal metabolito correspondía a la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición C-16 del compuesto RM-532-105. Se propone entonces añadir diferentes grupos en C-16 o sustituir la cetona en C-17; esto con la finalidad de disminuir la reactividad de la posición C-16 y/o bloquearla. Por lo tanto, se espera que estas modificaciones incrementen, significativamente, la estabilidad metabólica de los nuevos análogos de RM-532-105; aunque, al igual que el punto anterior, existe el riesgo de disminuir la afinidad de estos nuevos compuestos por la 17 β -HSD3, con lo cual, la actividad inhibitoria sobre esta enzima se vería mermada.

Inhibición de 17 β -HSD3

Modificación sistemática del compuesto líder RM-532-105)

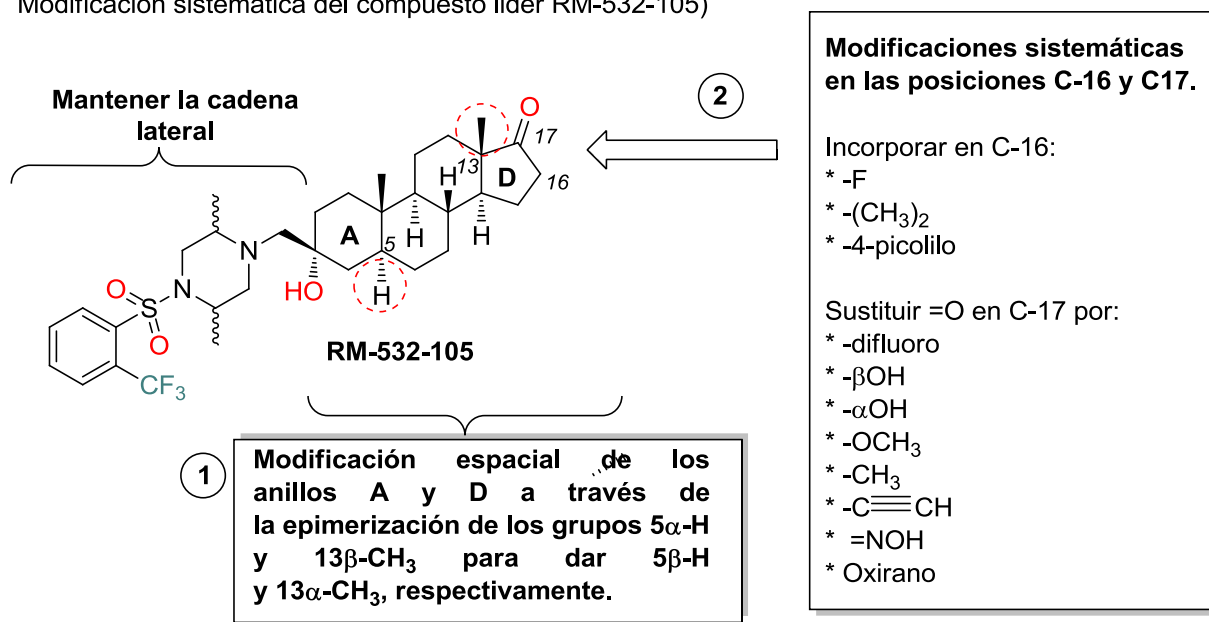


Figura 16. Estrategias para generar nuevos derivados de RM-532-105 con mayor estabilidad metabólica.

4. Objetivos

4. OBJETIVOS

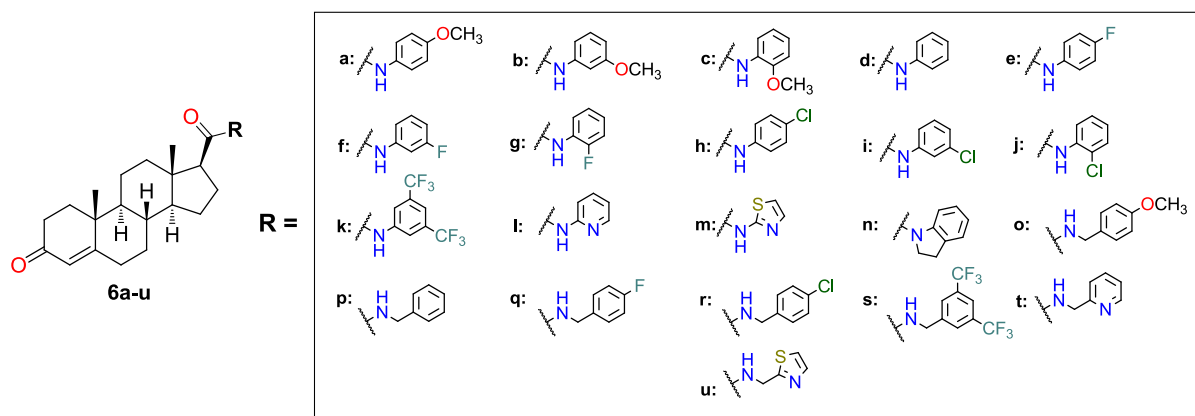
4.1 Objetivos generales

1. Sintetizar derivados de 17β -*N*-arilcarbamoilandrost-4-en-3-ona y determinar la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre las enzimas 5α R1 y 5α R2, así como su actividad antiproliferativa en células cancerosas de próstata y, finalmente, la actividad antiandrogénica *in vivo*.
2. Sintetizar derivados de androstano, específicamente, análogos del compuesto líder RM-532-105 y determinar la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre la enzima 17β -HSD3; la actividad androgénica indirecta a través de células LAPC-4 y, finalmente, la estabilidad metabólica de los derivados más prometedores.

4.2 Objetivos particulares

1. Sintetizar los siguientes derivados:

Tabla 5: 17β -*N*-arilcarbamoilandrost-4-en-3-onas



Compuesto	Nombre
6a	17β - <i>N</i> -(4-metoxifenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6b	17β - <i>N</i> -(3-metoxifenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6c	17β - <i>N</i> -(2-metoxifenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6d	17β - <i>N</i> -fenilcarbamoilandrost-5-en-3-ona
6e	17β - <i>N</i> -(4-fluorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6f	17β - <i>N</i> -(3-fluorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6g	17β - <i>N</i> -(2-fluorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6h	17β - <i>N</i> -(4-clorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona

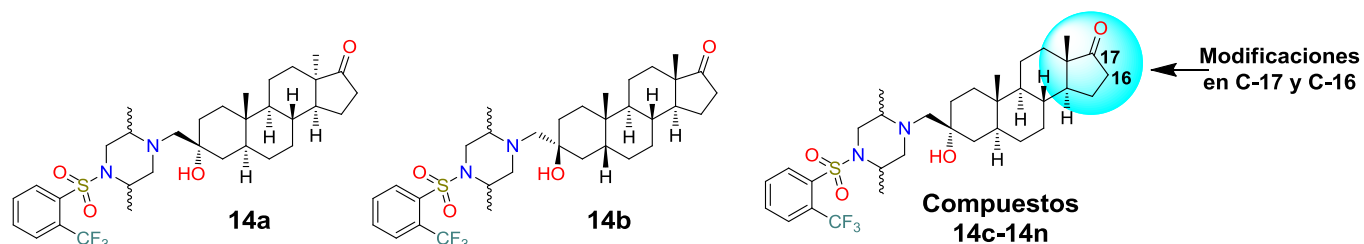
4. Objetivos

6i	17β- <i>N</i> -(3-clorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6j	17β- <i>N</i> -(2-clorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6k	17β- <i>N</i> -[3,5-bis(trifluorometil)fenilcarbamoil]androst-4-en-3-ona
6l	17β- <i>N</i> -(2-piridinilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6m	17β- <i>N</i> -(1,3-tiazol-2-ilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6n	17β-(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -indol-1-il)carbonilandrost-4-en-3-ona
6o	17β- <i>N</i> -(4-metoxibencilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6p	17β- <i>N</i> -bencilcarbamoilandrost-4-en-3-ona
6q	17β- <i>N</i> -(4-fluorobencilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6r	17β- <i>N</i> -(4-clorobencilcarbamoil)androst-4-en-3-ona
6s	17β- <i>N</i> -[3,5-bis(trifluorometil)bencilcarbamoil]androst-4-en-3-ona
6t	17β- <i>N</i> -[(2-piridinilmetil)carbamoil]androst-4-en-3-ona
6u	17β- <i>N</i> -[(1,3-tiazol-2-il)metilcarbamoil]androst-4-en-3-ona

2. Llevar a cabo la evaluación biológica de los compuestos mencionados en la Tabla 4 sobre las enzimas 5αR1 y 5αR2. Evaluar la actividad antiproliferativa de estos esteroides en líneas cancerosas de próstata LNCaP (andrógeno-sensible) y PC3 (andrógeno-insensible); así como líneas celulares primarias (células sanas). Finalmente, determinar la disminución del peso de la próstata en hámsteres gonadectomizados, por parte de los compuestos más prometedores resultantes de las pruebas anteriores, esto con la finalidad de evaluar la actividad antiandrogénica *in vivo*.













3. Sintetizar los siguientes compuestos:

Tabla 6: Análogos del compuesto líder RM-532-105



Compuesto	Estructura	Nombre
14a	-	(3α,5α,13α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxiandrostán-17-ona
14b	-	(3β,5β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxiandrostán-17-ona

4. Objetivos

14c		(3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-17,17-difluoroandrostan-3-ol
14d		(3 α ,5 α ,17 β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]androstan-3,17-diol
14e		(3 α ,5 α ,17 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]androstan-3,17-diol
14f		(3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-17-metoxiandrostan-3-ol
14g		(3 α ,5 α ,17 β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-17-metilandrostan-3,17-diol
14h		(3 α ,5 α ,17 β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-17-etilandrostan-3,17-diol
14i		(3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxiandrostan-17-oxima
14j		(3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxi-17-(2'-espirooxiranil)androstan
14k		(3 α ,5 α ,16 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3,17-dihidroxiandrostan-17-ona
14l		(3 α ,5 α ,16 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-16-fluoro-3-hidroxiandrostan-17-ona
14m		(3 α ,5 α)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-16,16-dimetil-3-hidroxiandrostan-17-ona
14n		(3 α ,5 α ,16 β)-3-[(<i>trans</i> -2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-16-(piridin-4-metil)-3-hidroxiandrostan-17-ona

4. Llevar a cabo la evaluación biológica de los compuestos mencionados en la Tabla 5 sobre la enzima 17 β -HSD3. También, evaluar estos análogos de RM-532-105 sobre la línea celular de cáncer de próstata LAPC-4 (andrógeno-sensible), para detectar una posible actividad proliferativa y, por tanto, indeseable por parte de estos compuestos. Finalmente, determinar la estabilidad metabólica de estos nuevos esteroides sobre microsomas hepáticos de humano.

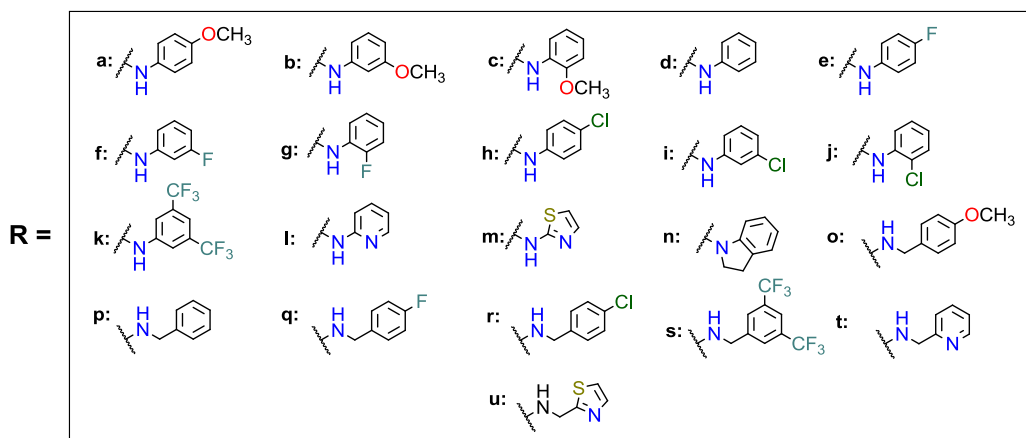
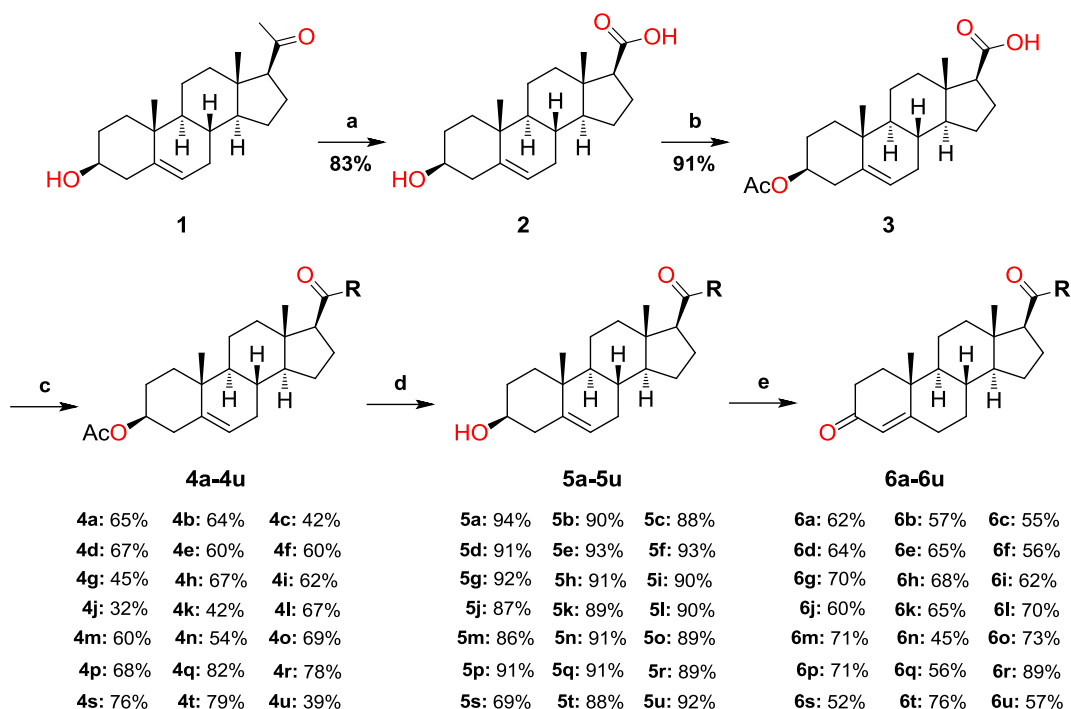
5. Análisis de resultados

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Derivados de 17β-*N*-arilcarbamoilandro-4-en-3-ona

5.1.1 Parte Química

Las 17β-*N*-arilcarbamoilandro-4-en-3-onas fueron preparadas a partir de la 3β-hidroxi-pregnen-20-ona (1). En el Esquema 6, se ilustra la ruta sintética realizada para la obtención de los compuestos finales **6a-6u**.



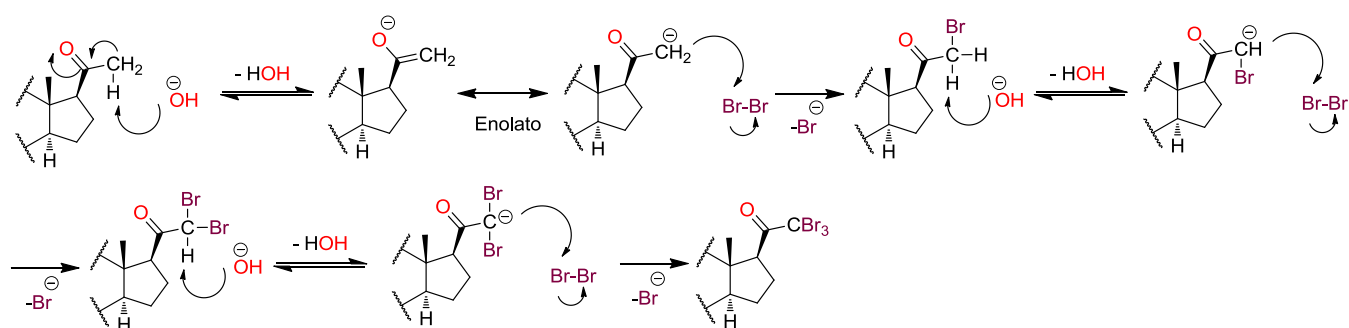
Esquema 6. Ruta sintética para la obtención de los derivados de 17β-*N*-arilcarbamoilandro-4-en-3-ona. Reactivos y condiciones: (a) NaOH, Br₂, Dioxano, <10°C, 9 h; (b) Anhídrido acético, piridina, t.a, 8 h; (c) 1. SOCl₂, DCM, t.a, 2 h; 2. Arilamina (indolina para **4n**), TEA, CH₂Cl₂, 1 h; (d) KOH 10% en MeOH, t.a. 50 min; (e) Al(O*i*Pr)₃, 1-metil-4-piperidona, tolueno, reflujo 7 h.

5. Análisis de resultados

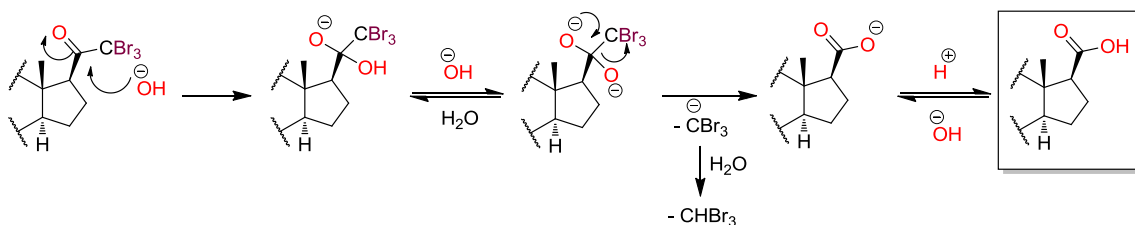
La preparación del ácido 3 β -hidroxiandrost-5-en-17 β -oico (**2**) se realizó de acuerdo a la metodología reportada por J. Staunton y E. J. Eisenbraun,⁸⁶ en la cual se lleva a cabo la reacción de Lieben (o comúnmente conocida como la reacción de haloformo) usando 3 β -hidroxipregnen-20-ona (**1**), bromo e hidróxido de sodio. Este intermediario se obtuvo con un rendimiento del 83 %.

El mecanismo de reacción para este derivado se ilustra en el Esquema 7.⁸⁷ En él se observa que el metilo de la posición C-21 sufre una halogenación secuencial. La tribromometilcetona formada es después hidrolizada por el exceso de hidróxido de sodio presente en el medio de reacción, formando así el grupo carboxilo en C-17 y liberando bromoformo como subproducto.

Halogenación secuencial del grupo metilo



Hidrólisis de la bromometilcetona



Esquema 7. Mecanismo de reacción para la obtención del ácido 3 β -hidroxiandrost-4-en-17 β -oico (**2**).

La obtención satisfactoria del grupo carboxilo en C-17 β se comprobó mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) al observar la banda característica de este grupo en una ν_{\max} = 3396 y 3219 cm^{-1} , mientras que en la espectroscopía de Resonancia Magnética de Hidrógeno (RMN ^1H) se pudo apreciar la desaparición de la señal correspondiente al metilo de la posición C-21 a δ_{H} = 2.11 ppm, siendo remplazada por una señal simple ancha en δ_{H} = 11.5 ppm que corresponde al protón ácido del grupo carboxilo.

El intermediario **2** se hizo reaccionar con anhídrido acético y piridina para obtener el derivado acetilado en C-3 (compuesto **3**) con un rendimiento del 91%. La presencia del grupo acetato en C-3 se pudo corroborar fácilmente mediante la espectroscopía de infrarrojo al detectar nuevas bandas a 1792 y 1246.52 cm^{-1} que corresponden a tensiones de tipo C=O y C-O, respectivamente, del grupo éster. También, se observó la desaparición de la banda a 3396 cm^{-1} que pertenece a la tensión O-H del alcohol

5. Análisis de resultados

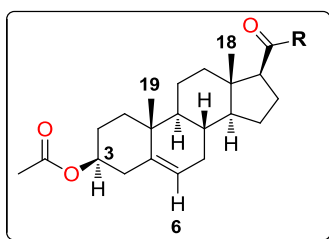
en C-3 del compuesto **2**. En cuanto a la espectroscopia de RMN ^1H , una señal que integra para tres hidrógenos a $\delta_{\text{H}}= 2.11$ ppm junto al desplazamiento del protón unido al carbono C-3 desde $\delta_{\text{H}}= 3.27$ ppm hasta $\delta_{\text{H}}= 4.60$ ppm confirman la presencia del grupo en cuestión.

Para la generación del cloruro del ácido en la posición C-17 β , se hizo reaccionar el intermediario **3** con cloruro de tionilo y después con las arilaminas o bencilaminas apropiadas en presencia de trietilamina (TEA), con lo que se obtuvieron los compuestos **4a-4u** en rendimientos moderados (32% a 82%). En la espectroscopia de infrarrojo, se pudo apreciar la desaparición de la banda correspondiente al estiramiento O-H del grupo carboxilo; en su lugar, se observó la aparición de una banda delgada a aproximadamente 3400 cm^{-1} .

Como se muestra en las **Tablas 7, 8, 9, 10, 11 y 12**, en la espectroscopia de RMN ^1H se observan diversas señales que confirman la presencia de las amidas aromáticas. En general, se identificaron nuevas señales entre $\delta_{\text{H}}= 6.5$ a 8.5 ppm que corresponden a los protones unidos a los diferentes anillos aromáticos. También, para los derivados de **4a-4m** se observó la presencia de una señal simple ancha que va de $\delta_{\text{H}}= 6.9$ a 8.1 ppm, mientras que para el derivado de tiazol (**4m**) se encuentra a $\delta_{\text{H}}= 10.89$ ppm. Este tipo de señal intercambia con D_2O y se asignó al protón de la amida ($-\text{CONH}-$). De manera similar, para los derivados de bencilamina (**4o-4r**), 2-picolina (**4s**), 3,5-Bis(trifluorometil)bencilamina (**4t**) y 2-(aminometil)tiazol (**4u**) se encontraron señales entre $\delta_{\text{H}} = 6.9$ y 8.3 ppm que fueron asignadas a los protones unidos a los sistemas aromáticos, así como una señal triple ancha que aparece entre $\delta_{\text{H}}= 6.9$ y 8.3 ppm. Esta última, al igual que los derivados mencionados anteriormente, intercambia con D_2O y también se asignó al protón de la amida ($-\text{CONH}-$). Adicionalmente, en estos compuestos, se identificó una señal óctuple de un sistema AB entre $\delta_{\text{H}}= 5.5$ y 5.8 ppm que pertenece a los hidrógenos diastereotópicos del grupo metileno unido a la amida en la posición C-17 ($-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{Ar}$). La amplitud de esta señal incrementa proporcionalmente a la electronegatividad del sustituyente unido al anillo aromático.

5. Análisis de resultados

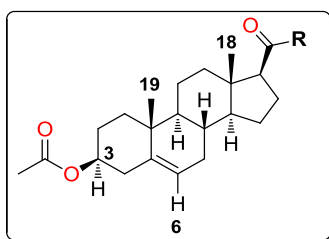
Tabla 7: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los intermediarios *para* sustituidos, **4a**, **4e** y **4h**; así como **4d** en RMN ^1H



	4d	4a	4e	4h
Protón				
R =				
18-CH₃	0.77 (s, 3H)	0.76 (s, 3H)	0.77 (s, 3H)	0.75 (s, 3H)
19-CH₃	1.02 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)	1.03 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)
3α-H	4.57-4.66 (m, 1H)	4.58-4.64 (m, 1H)	4.57-4.65 (m, 1H)	4.57-4.65 (m, 1H)
H-6	5.38 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H)	5.38 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H)	5.38 (d, $J = 5.0$ Hz)	5.38 (d, $J = 4.6$ Hz)
H-2' y H-6'	7.52 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H)	7.41 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H)	7.47 (dd, $J = 9.1, 4.8$ Hz, 2H)	7.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)
H-3' y H-5'	7.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H)	6.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H)	6.99 (ddd, $J = 10.4, 6.3, 2.9$ Hz, 2H)	7.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)
3β-COOCH₃	2.03 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)
-CONH-	7.16 (sa, 1H)	6.96 (sa, 1H)	7.05 (sa, 1H)	7.21 (sa, 1H)
otros	7.08 (t, $J = 7.42$, 1H, <i>H-4</i>)	3.78 (s, 3H, Ar-OCH ₃)	-	-

5. Análisis de resultados

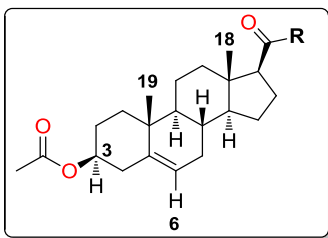
Tabla 8: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los intermediarios *meta* sustituidos, **4b**, **4f**, **4k**, **4i**, en RMN ^1H



	4k	4b	4f	4i
Protón				
R =				
18-CH₃	0.78 (s, 3H)	0.76 (s, 3H)	0.75 (s, 3H)	0.75 (s, 3H)
19-CH₃	1.04 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)
3α-H	4.62-4.70 (m, 1H)	4.59-4.66 (m, 1H)	4.56-4.62 (m, 1H)	4.58-4.67 (m, 1H)
H-6	5.38 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	5.38 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	5.37 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	5.37 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)
H-2'	8.12 (s)	7.36 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H)	7.51 (dt, $J = 11.0, 2.2$ Hz, 1H)	7.66 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H)
H-4'	7.56 (s, 1H)	6.63 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H)	6.78 (tdd, $J = 8.2, 2.5, 1.1$ Hz, 1H)	7.04 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H)
H-5'	-	7.18 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H)	7.13 - 7.27 (m, 2H)	7.20 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H)
H-6'	8.12 (s)	6.95 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H)		7.40 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H)
3β-COOCH₃	2.05 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)	2.04 (s, 3H)
-CONH-	8.01 (sa, 1H)	7.27 (sa, 1H)	7.37 (sa, 1H)	7.46 (sa, 1H)
otros	-	3.80 (s, 3H, Ar-OCH ₃)	-	-

5. Análisis de resultados

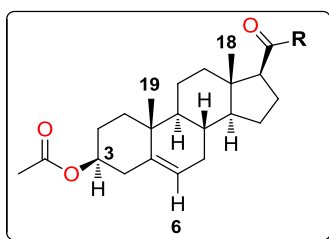
Tabla 9: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los intermediarios *orto* sustituidos, **4c**, **4g**, **4j**, en RMN ^1H



	4c	4g	4j
Protón			
18-CH₃	0.76 (s, 3H)	0.75 (s, 3H)	0.75 (s, 3H)
19-CH₃	1.02 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)
3α-H	4.56-4.65 (m, 1H)	4.56-4.62 (m, 1H)	4.55-4.63 (m, 1H)
H-6	5.38 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H)	5.37 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H)	5.37 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H)
H-3'	6.87 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H)		7.34 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H)
H-4'	7.02 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H)		6.99 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H)
H-5'	6.95 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H)	7.00 - 7.18 (m, 3H)	7.22 (td, $J = 7.4, 1.4$ Hz, 1H)
H-6'	8.40 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H)	8.33 (dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, 1H)	8.42 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H)
3β-COOCH₃	2.03 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)	2.02 (s, 3H)
-CONH-	7.68 (sa, 1H)	7.24 (sa, 1H)	7.56 (sa, 1H)
Otros	3.79 (s, 3H, Ar-OCH ₃)	-	-

5. Análisis de resultados

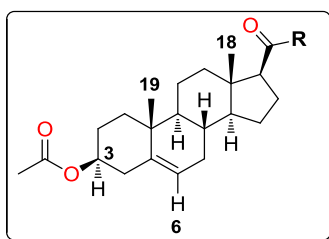
Tabla 10: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los intermediarios sustituidos con heterociclos, **4l**, **4m** y **4n**, en RMN ^1H



	4l	4m	4n
Protón			
R =			
18-CH₃	0.74 (s, 3H)	0.74 (s, 3H)	0.86 (s, 3H)
19-CH₃	1.00 (s, 3H)	1.00 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)
3α-H	4.54-4.64 (m, 1H)	4.55-4.63 (m, 1H)	4.55-4.63 (m, 1H)
H-6	5.36 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	5.36 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	5.38 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)
H-2'	-	-	4.15 (dq, $J = 18.2, 9.3$ Hz, 2H)
H-3'	8.29 – 8.18 (m). Translape con H-6'		3.14 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H);
H-4'	7.68 (ddd, $J = 8.5, 5.0, 1.7$ Hz, 1H)	7.44 (d, $J = 3.62$ Hz, 1H)	6.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H)
H-5'	7.01 (ddd, $J = 7.3, 4.6, 1.3$ Hz, 1H,	6.98 (d, $J = 3.62$ Hz, 1H)	7.18 (m, 2H)
H-6'	8.29 – 8.18 (m). Translape con H-3'		
H-7'			8.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H)
3β-COOCH₃	2.02 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)
-CONH-	8.13 (sa, 1H)	10.89 (sa, 1H)	-

5. Análisis de resultados

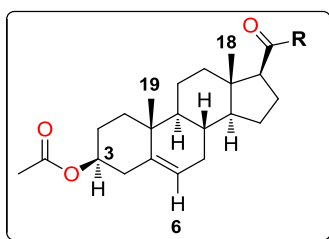
Tabla 11: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los intermediarios de bencilamina, **4o-4r**, en RMN ^1H



	4p	4o	4q	4r
Protón				
R =				
18-CH₃	0.72 (s, 3H)	0.70 (s, 3H)	0.69 (s, 3H)	0.69 (s, 3H)
19-CH₃	1.02 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)
H-3	4.46-4.60 (m, 1H)	4.46-4.60 (m, 1H)	4.51-4.68 (m, 1H)	4.53-4.63 (m, 1H)
H-6	5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)	5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)	5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)	5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)
CONH-CH₂-Ar	4.46 (octeto AB, $J = 25.2$, 14.6, 5.5 Hz, 2H)	4.37 (octeto AB, $J = 29.5$, 14.5, 5.6 Hz, 2H)	4.41 (octeto AB, $J = 33.1$, 14.6, 5.5 Hz, 2H)	4.40 (octeto AB, $J = 36.1$, 14.9, 5.9 Hz, 2H)
H-2' y H-6'	7.26-7.36 (m, 5H) Translape con H-4'	7.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)	7.25 (dd, $J = 7.3, 4.5$ Hz, 2H)	7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H)
H-3' y H-5'		6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)	7.00 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H)	7.25 (d, $J = 8.3$, 2H)
3β-COOCH₃	2.03 (s, 3H)	2.01 (s, 3H)	2.01 (s, 3H)	2.01 (s, 3H)
-CONH-	5.58 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H)	5.63 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H)	5.78 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H)	5.78 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H)
otros		3.78 (s, 3H, Ar-OCH ₃)	-	-

5. Análisis de resultados

Tabla 12: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los intermediarios **4s-4u** en RMN ^1H



	4s	4t	4u
Protón			
R =			
18-CH₃	0.69 (s, 3H)	0.62 (s, 3H)	0.69 (s, 3H)
19-CH₃	1.02 (s, 3H)	0.95 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)
3α-H	4.46-4.60 (m)	4.46-4.60 (m)	4.51-4.68 (m, 1H)
	translape con -CONH-CH ₂ - Ar	translape con -CONH- CH ₂ -Ar	
H-6	5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)	5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)	5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)
-CONH-CH₂-Ar	4.46-4.60 (m) translape con H-3	4.46-4.60 (m) translape con H-3	4.41 (octeto AB, $J = 33.1, 14.6, 5.5$ Hz, 2H)
H-2'	7.74 (sa) translape con H-4' y H-6'	-	
H-3'	-	7.26 (dd, $J = 7.8$ Hz, 1H)	
H-4'	7.74 (sa) translape con H-2' y H-6'	7.62 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H)	
H-5'	-	7.15 (dd, $J = 7.5, 5.0$ Hz, 1H)	
H-6'	7.74 (sa) translape con H-2' y H-4'	8.47 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H)	
3β-COOCH₃	1.98 (s, 3H)	1.97 (s, 3H)	2.01 (s, 3H)
-CONH-	6.25 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H)	6.74 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H)	

5. Análisis de resultados

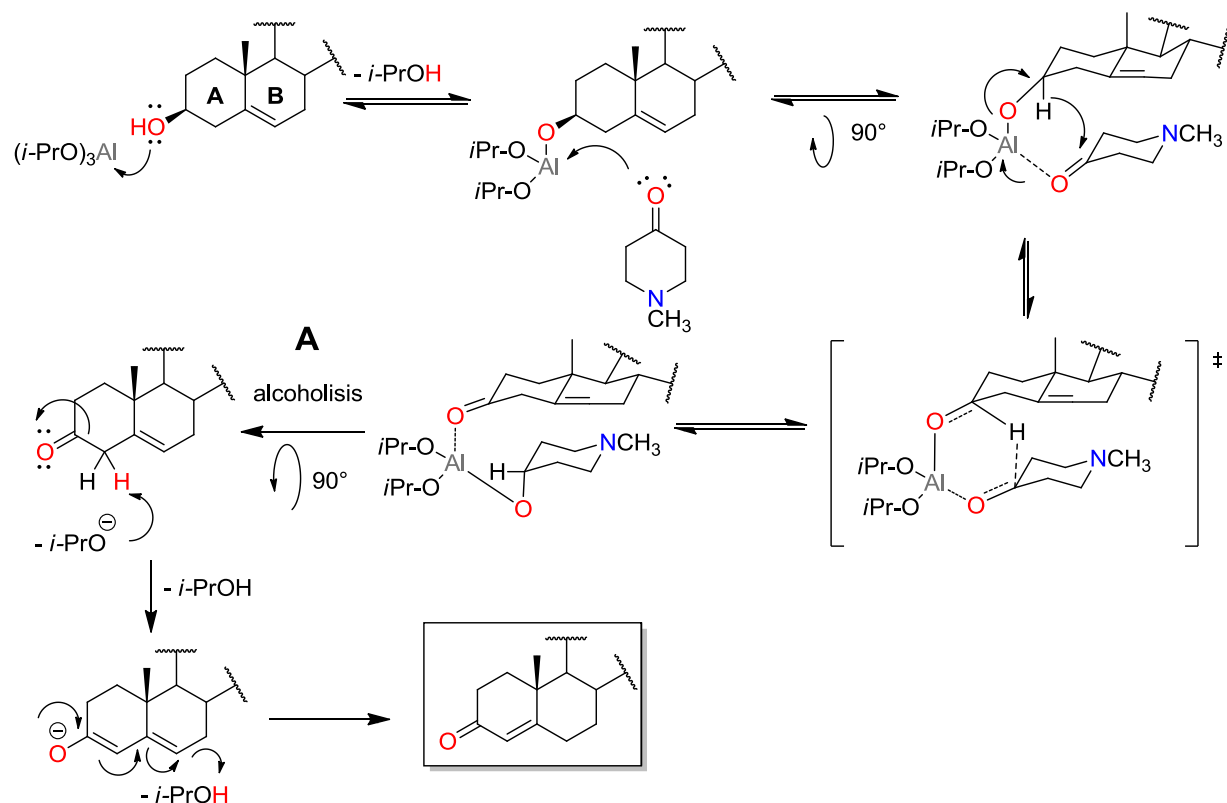
Una vez aislados los intermediarios **4a-4u**, el éster en estos compuestos fue hidrolizado al alcohol correspondiente para obtener los intermediarios **5a-5u**. Esta reacción se logró al tratar los esteroides **4a-4u** con una solución metanólica de hidróxido de potasio al 10% p/v. Los rendimientos para esta reacción, en general, fueron buenos (69% a 94%).

Respecto a la caracterización estructural de estos derivados, específicamente en la espectroscopia de IR, todos ellos presentaron la pérdida de la banda ubicada a 1730 cm^{-1} , la cual pertenece al estiramiento C=O del grupo éster; en su lugar, en todos estos compuestos, se encuentra una banda ancha con un número de onda de aproximadamente 3300 cm^{-1} que pertenece al grupo O-H. Por otro lado, en la espectroscopía de RMN ^1H , los únicos cambios observables fueron, por supuesto, la pérdida del metilo del grupo acetato ubicado a 1.97 ppm, pero también el desplazamiento a campo alto de la señal del protón unido directamente al carbono C-3 ($3\alpha\text{-H}$), el cual tenía un $\delta_{\text{H}} = 4.46\text{-}4.60\text{ ppm}$ para los intermediarios **4a-4u** y se desplazó hasta $\delta = 3.49\text{-}3.57\text{ ppm}$ en los compuestos **5a-5u**.

Finalmente, la oxidación del carbinol en C-3 fue llevada a cabo mediante la reacción de Oppenauer; utilizando para ello isopropóxido de aluminio y *N*-metil-4-piperidona en reflujo de tolueno, con lo cual se obtuvieron los productos finales **6a-6u** en rendimientos que fueron desde el 52% al 89%.

El mecanismo de reacción se muestra en la Esquema 8,^{87,88} en donde, tanto el hidroxilo en C-3 del esteroide como el carbonilo de la 1-metil-4-piperidona se unen al átomo de aluminio del isopropóxido de aluminio. Una vez que el alcohol queda unido como alcóxido y el carbonilo se coordina al metal, se da la transferencia del ion hidruro desde el carbinol. La transferencia de este átomo ocurre vía un estado de transición de seis miembros. En este punto, el producto puede dejar la esfera de coordinación del aluminio por medio de la alcoholisis. La isomerización de la doble ligadura en C-5 puede darse a través de la abstracción del protón ácido en C-4 por parte del anión isopropóxido para que, posteriormente, el alcóxido formado, incorpore su par electrónico al dieno, el cual puede tomar el protón del isopropanol para generar la doble ligadura en C-4.

5. Análisis de resultados

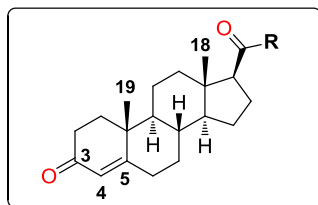


Esquema 8. Mecanismo correspondiente a la reacción de Oppenauer.

En la espectroscopía de IR, para estos compuestos finales, se observó la pérdida de la banda ubicada a 3300 cm^{-1} del grupo O-H, proveniente de los intermediarios **5a-5u**; apareciendo, entonces, una nueva banda con un $\nu_{\text{max}} = 1675\text{ cm}^{-1}$, la cual fue asignada a la cetona α,β -insaturada formada. En cuanto a la espectroscopía de RMN ^1H , las **Tablas 13, 14, 15, 16, 17 y 18** ilustran los desplazamientos químicos, así como las constantes de acoplamiento encontradas para los compuestos finales. En todos estos derivados se observó la pérdida de las señales asignadas a los protones unidos a las posiciones C-3 y C-6. En su lugar, se identificó una nueva señal simple a 5.74 ppm que integra para un solo protón. Ésta se asignó al hidrógeno vinílico de la posición 4 (H-4).

5. Análisis de resultados

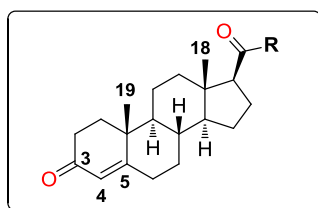
Tabla 13: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los compuestos finales *para* sustituidos, **6a**, **6e** y **6h**; así como **6d** en RMN ^1H



	6d	6a	6e	6h
Protón				
18-CH₃	0.81 (s, 3H)	0.90 (s, 3H)	0.81 (s, 3H)	0.79 (s, 3H)
19-CH₃	1.19 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)
H-4	5.74 (s, 1H)	5.74 (s, 1H)	5.75 (s, 1H)	5.74 (s, 1H)
H-2' y H-6'	7.53 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H)	7.42 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H)	7.49 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H)	7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)
H-3' y H-5'	7.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H)	6.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H)	7.00 (ddd, $J = 10.4, 6.3, 2.9$ Hz, 2H)	7.27 (m, 3H)
-CONH-	7.20 (sa, 1H)	7.10 (sa, 1H)	7.12 (sa, 1H)	
otros	7.09 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, <i>H-4</i>)	3.78 (s, 3H, Ar-OCH ₃)	-	-

5. Análisis de resultados

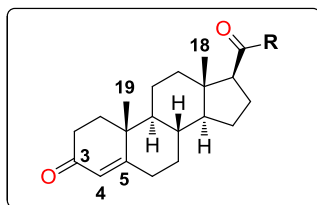
Tabla 14: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los compuestos finales *meta* sustituidos, **6k**, **6b**, **6f**, y **6i**, en RMN ^1H



	6k	6b	6f	6i
Protón				
18-CH₃	0.78 (s, 3H)	0.78 (s, 3H)	0.79 (s, 3H)	0.79 (s, 3H)
19-CH₃	1.18 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)
H-4	5.74 (s, 1H)	5.74 (s, 1H)	5.74 (s, 1H)	5.74 (s, 1H)
H-2'	8.12 (s)	7.36 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H)	7.51 (dt, $J = 11.0, 2.2$ Hz, 1H)	7.71 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H)
H-4'	7.56 (s, 1H)	6.64 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H)	6.76 (tdd, $J = 8.2, 2.5, 1.1$ Hz, 1H)	7.04 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H)
H-5'	-	7.18 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H)	7.13 - 7.27 (m, 2H)	7.20 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H)
H-6'	8.12 (s)	6.95 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H)		7.40 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H)
-CONH-	8.01 (sa, 1H)	7.27 (sa, 1H)	7.67 (sa, 1H)	7.55 (sa, 1H)
otros	-	3.88 (s, 3H, Ar-OCH ₃)	-	-

5. Análisis de resultados

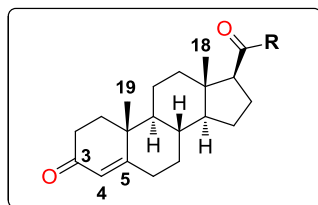
Tabla 15: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los compuestos finales *orto* sustituidos, **6c**, **6g**, **6j**, en RMN ^1H



	6c	6g	6j
Protón			
R =			
18-CH₃	0.78 (s, 3H)	0.78 (s, 3H)	0.81 (s, 3H)
19-CH₃	1.19 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)
H-4	5.74 (s, 1H)	5.73 (s, 1H)	5.74 (s, 1H)
H-3'	6.87 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H)		7.34 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H)
H-4'	7.02 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H)		7.02 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H)
H-5'	6.95 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H)	7.00 - 7.18 (m, 3H)	7.26 (td, $J = 7.4, 1.4$ Hz, 1H)
H-6'	8.40 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H)	8.30 (dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, 1H)	8.43 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H)
-CONH-	7.68 (sa, 1H)	7.23 (sa, 1H)	7.55 (sa, 1H)
otros	3.88 (s, 3H, Ar-OCH ₃)	-	-

5. Análisis de resultados

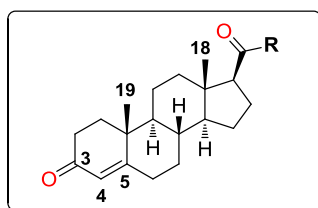
Tabla 16: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los compuestos finales sustituidos con heterociclos, **6l**, **6m** y **6n**, en RMN ^1H



	6l	6m	6n
Protón			
R =			
18-CH₃	0.80 (s, 3H)	0.78 (s, 3H)	0.85 (s, 3H)
19-CH₃	1.19 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)
H-4	5.74 (s, 1H)	5.74 (s, 1H)	5.73 (s, 1H)
H-2'	-	-	4.15 (dc, $J = 18.2, 9.3$ Hz, 2H)
H-3'	8.22 – 8.18 (m) Translape con H-6'	-	3.14 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H);
H-4'	7.68 (ddd, $J = 8.5, 5.0, 1.7$ Hz, 1H)	7.44 (d, $J = 3.62$ Hz, 1H)	6.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H)
H-5'	7.04 (ddd, $J = 7.4, 5.0, 1.0$ Hz, 1H)	6.98 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H)	7.18 (m, 2H)
H-6'	8.22 – 8.18 (m) Translape con H-3'	-	-
H-7'	-	-	8.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H)
-CONH-	8.11 (sa, 1H)	10.06 (sa, 1H)	-

5. Análisis de resultados

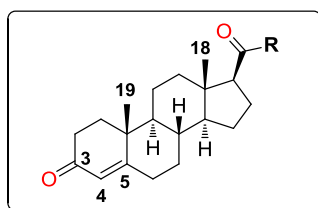
Tabla 17: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los compuestos finales **6o-6r** en RMN ^1H



	6p	6o	6q	6r
Protón				
18-CH₃	0.79 (s, 3H)	0.73 (s, 3H)	0.74 (s, 3H)	0.73 (s, 3H)
19-CH₃	1.21 (s, 3H)	1.16 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)	1.17 (s, 3H)
H-4	5.76 (m, 2H)	5.70 (s, 1H)	5.71 (s, 1H)	5.70 (s, 1H)
	Translape con <u>-CONH-</u>			
-CONH-CH₂-Ar	4.46 (octeto AB, $J = 25.2$, 14.6, 5.5 Hz, 2H)	4.37 (octeto AB, $J = 30.4$, 14.5, 5.6 Hz, 2H)	4.41 (octeto AB, $J = 33.2$, 14.7, 5.8 Hz, 2H)	4.41 (octeto AB, $J = 40.6$, 14.8, 5.8 Hz, 2H)
H-2' y H-6'	7.26-7.36 (m, 5H) Translape con H-4'	7.19 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)	7.26 (ddd, $J = 8.8, 3.7, 1.1$ Hz, 2H)	7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)
H-3' y H-5'		6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)	7.01 (ddd, $J = 9.6, 5.8, 2.5$ Hz, 2H)	7.25 (d, $J = 8.3$, 2H)
-CONH-	5.76 (m, 2H) Translape con H-4	5.66 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H)	5.79 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H)	5.83 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H)
otros	-	3.78 (s, 3H, Ar-OCH ₃)	-	-

5. Análisis de resultados

Tabla 18: Desplazamiento químico δ (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de las señales más representativas para los intermediarios **6s-6u** en RMN ^1H

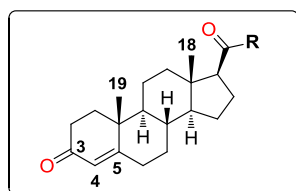


	6s	6t	6u
Protón			
R =			
18-CH₃	0.73 (s, 3H)	0.74 (s, 3H)	0.73 (s, 3H)
19-CH₃	1.18 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)	1.17 (s, 3H)
H-4	5.70 (s, 1H)	5.71 (s, 1H)	5.73 (s, 1H)
CONH-CH₂-Ar	4.57 (octeto AB, $J = 86.3, 15.5,$ 6.1 Hz, 2H)	4.55 (sexteto AB, $J = 5.0, 4.9\text{Hz},$ 2H)	4.76 (octeto AB, $J = 58.9, 16.1, 5.9$ Hz, 2H)
H-2'	7.75 (sa, 3H) translape con H-4' y H-6'	-	-
H-3'	-	7.26 (dd, $J = 7.8\text{ Hz}, 1\text{H}$)	-
H-4'	7.75 (sa, 3H) translape con H-2' y H-6'	7.62 (td, $J = 7.7, 1.8\text{ Hz}, 1\text{H}$)	7.68 (d, $J = 3.1\text{ Hz}, 1\text{H}$)
H-5'	-	7.15 (dd, $J = 7.5, 5.0\text{ Hz}, 1\text{H}$)	7.27 (d, $J = 3.1\text{ Hz}, 1\text{H}$)
H-6'	7.75 (sa, 3H) translape con H-2' y H-4'	8.47 (d, $J = 4.9\text{ Hz}, 1\text{H}$)	-
-CONH-	6.25 (t, $J = 5.3\text{ Hz}, 1\text{H}$)	6.74 (t, $J = 5.3\text{ Hz}, 1\text{H}$)	6.28 (t, $J = 5.5\text{ Hz}, 1\text{H}$)

5. Análisis de resultados

Los compuestos finales también fueron caracterizados por resonancia magnética de carbono (RMN ^{13}C), en la cual, se identificaron las señales características de los metilos angulares 18- CH_3 y 19- CH_3 a aproximadamente 13.3 y 17.3 ppm, respectivamente; mientras que los carbonos de las posiciones C-4 y C-5 se ubicaron entre 121.7 y 170.8 ppm, respectivamente. La presencia de los grupos carbonilo de la amida y la enona se confirmaron al observarse las señales correspondientes en 171.2 y 199.7 ppm, respectivamente. Para los derivados **6o-6u**, el grupo metileno $\text{CONH-CH}_2\text{-Ar}$ se asignó a una señal que se desplaza entre 41 y 43 ppm. Por último, para todos los compuestos, se observaron diferentes señales entre 110 y 162 ppm, las cuales fueron asignadas a los diferentes carbonos aromáticos (Tablas 19 y 20).

Tabla 19: Desplazamiento químico δ (ppm) de las señales más representativas para los compuestos finales **6a-6g** en RMN ^{13}C

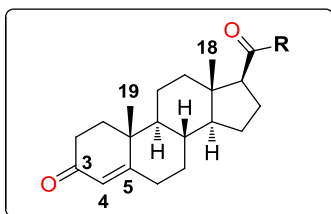


	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g
Protón							
18-CH_3	13.32	13.44	13.35	13.46	13.49	13.48	13.37
19-CH_3	17.33	17.46	17.51	17.45	17.52	17.42	17.49
C-4	121.76	124.03	123.42	124.19	124.12	123.99	124.04
C-1'	131.22	139.49	127.94	138.22	134.18 ^a	139.93 ^g	126.53 ⁿ
C-2'	123.86	105.46	147.70	119.95	121.8 ^b	107.38 ^h	152.40 ^o
C-3'	114.06	160.28	109.90	129.10	115.7 ^c	163.09 ⁱ	114.81 ^p
C-4'	156.22	110.14	124.04	124.07	159.4 ^d	110.69 ^k	124.18 ^q
C-5'	114.06	129.71	119.76	129.10	115.7 ^e	130.05 ^l	121.88
C-6'	123.86	111.88	121.24	119.95	121.8 ^f	115.08 ^m	124.70 ^r
C-5	170.82	171.36	170.90	171.08	171.03	171.40	171.17
-CONH-	171.27	171.19	171.18	171.21	171.11	171.88	171.23
C-3	199.68	199.84	199.64	199.70	199.67	200.11	199.76
Otros	53.8	55.4	53.9	-	-	-	-
	(OCH_3)	(OCH_3)	(OCH_3)				

^a $J_{\text{C-F}} = 2.6$ Hz; ^b $J_{\text{C-F}} = 7.8$ Hz; ^c $J_{\text{C-F}} = 22.4$ Hz; ^d $J_{\text{C-F}} = 243$ Hz; ^e $J_{\text{C-F}} = 22.4$ Hz; ^f $J_{\text{C-F}} = 7.8$ Hz; ^g $J_{\text{C-F}} = 11.0$ Hz; ^h $J_{\text{C-F}} = 26.5$ Hz; ⁱ $J_{\text{C-F}} = 244.4$ Hz; ^k $J_{\text{C-F}} = 21.3$ Hz; ^l $J_{\text{C-F}} = 9.4$ Hz; ^m $J_{\text{C-F}} = 21.3$ Hz; ⁿ $J_{\text{C-F}} = 10.2$ Hz; ^o $J_{\text{C-F}} = 242.2$ Hz; ^p $J_{\text{C-F}} = 19.3$ Hz; ^q $J_{\text{C-F}} = 7.7$ Hz; ^r $J_{\text{C-F}} = 3.6$ Hz;

5. Análisis de resultados

Tabla 20: Desplazamiento químico δ (ppm) de las señales más representativas para los compuestos finales **6o-6u** en RMN ^{13}C



	6o	6p	6q	6r	6s	6t	6u
Protón							
18-CH₃	13.39	13.40	13.41	13.42	13.26	13.32	13.37
19-CH₃	17.46	17.46	17.46	17.46	17.31	17.48	17.50
CONH-CH₂-Ar	43.15	43.72	42.95	42.97	42.59	43.88	41.04
C-4	123.96	123.96	123.97	123.98	123.86	123.97	124.03
C-1'	130.36	138.80	134.73 ^a	137.51	141.12	-	-
C-2'	129.29	127.96	129.62 ^b	129.31	127.72 ^f	156.78	167.72
C-3'	114.12	128.77	115.58 ^c	128.86	131.81 ^g	122.40	-
C-4'	159.02	127.52	162.17 ^d	133.23	121.18 ^h	136.83	142.39
C-5'	114.12	128.77	115.58 ^c	128.86	131.81 ^g	122.31	119.61
C-6'	129.29	127.96	129.62 ^b	129.31	127.72 ^f	149.09	-
C-5	171.18	171.20	171.20	171.19	171.30	171.26	171.10
-CONH-	172.40	172.52	172.58	172.62	172.97	172.76	172.78
C-3	199.57	199.60	199.63	199.61	199.73	199.61	199.56
Otros	55.38	-	-	-	123.26 ⁱ	-	-
	(OCH ₃)				(CF ₃)		

^a J_{C-F} = 3.3 Hz; ^b J_{C-F} = 8.1 Hz; ^c J_{C-F} = 21.4 Hz; ^d J_{C-F} = 245.5 Hz; ^e J_{C-F} = 22.4 Hz; ^f J_{C-F} = 2.6 Hz; ^g J_{C-F} = 33.3 Hz; ^h J_{C-F} = 3.8 Hz; ⁱ J_{C-F} = 272.9 Hz.

5. Análisis de resultados

Por último, fue posible la obtención de un cristal del compuesto final **6n**, el cual fue ideal para su caracterización por cristalografía de Rayos-X de monocristal. Esta técnica permitió la elucidación, así como la corroboración de la estructura de dicho compuesto (Figura 17).

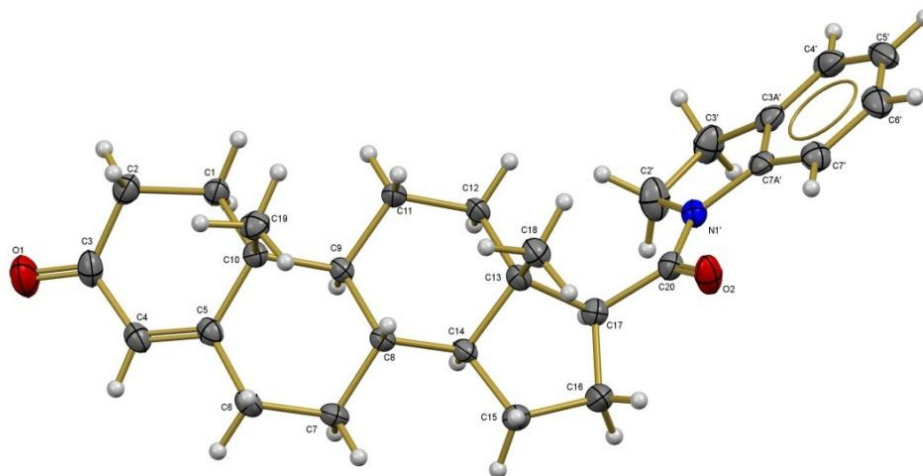
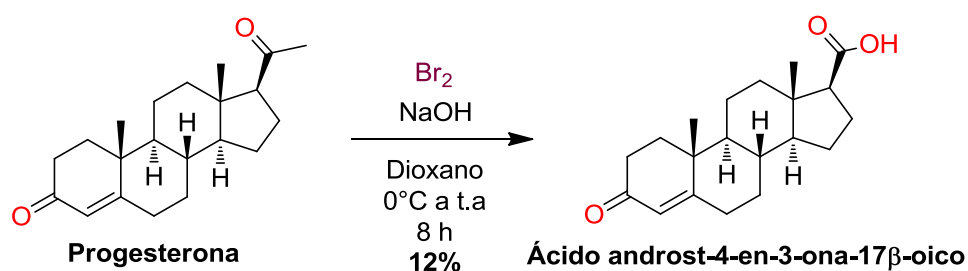


Figura 17. Estructura cristalina de 17β-(2,3-dihidro-1H-indol-1-il)carbonilandrosto-4-en-3-ona (**6n**)

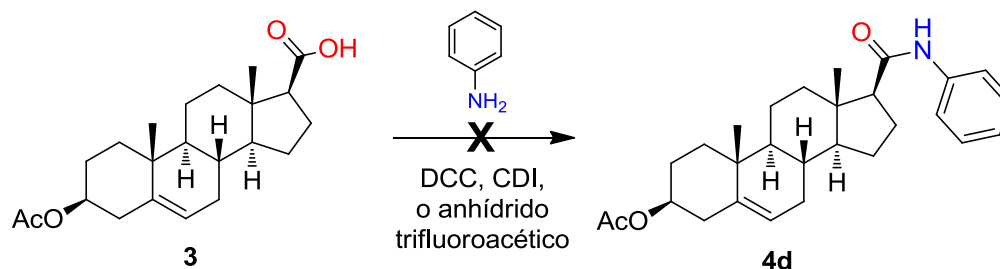
Cabe resaltar que durante el transcurso de este proyecto se realizaron diferentes ensayos con la finalidad de reducir los pasos de reacción o incrementar el rendimiento (Esquemas 9 y 10). El primero de estos intentos fue la obtención del ácido androsto-4-en-3-ona-17β-oico a partir de la progesterona por medio de la reacción de bromoformo. Desafortunadamente, después de hacer reaccionar este esteroide con bromo e hidróxido de sodio se obtuvo una mezcla compleja de productos, en donde el compuesto deseado se aisló con mucha dificultad por cromatografía en una columna con un rendimiento del 12%. No se realizó la separación y caracterización de los otros compuestos. Sin embargo, es posible que éstos hayan sido el resultado de bromaciones sucesivas en las posiciones 2 y/o 5, ya que éstas corresponden a posiciones de un carbono alfa al carbonilo y alílico, respectivamente.



Esquema 9. Reacción de bromoformo sobre la progesterona

5. Análisis de resultados

Otra vía por la que procuró incrementar el rendimiento, fue en el paso para la síntesis de las amidas aromáticas (**4a-4u**) a partir del compuesto **3**. En este sentido, se exploró el uso de diferentes agentes acoplantes como la *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y el 1,1-carbonildiimidazol (CDI). Adicionalmente, el compuesto **3** se trató con anhídrido trifluoroacético para formar el anhídrido mixto, el cual, en teoría formaría la amida en presencia de anilina. Sin embargo, en ninguno de estos ensayos se observó un avance de reacción significativo, por lo que se optó por seguir usando el SOCl_2 para generar el cloruro del ácido en la posición C-17.



Esquema 10. Ensayos con de diferentes agentes acoplantes para la formación de la amida aromática en C-17

5. Análisis de resultados

5.1.2 Parte biológica: 17 β -N-arilcabamoilandrost-4-en-3-onas

5.1.2.1 Relación Estructura-Actividad de los derivados de 17 β -N-arilcabamoilandrost-4-en-3-ona sobre las enzimas 5 α R1 y 5 α R2

Este ensayo consistió en determinar la capacidad, de los compuestos preparados, para inhibir la actividad catalítica de las enzimas 5 α R1 y 5 α R2 y con ello, disminuir la cantidad de DHT sintetizada a partir de la testosterona. Como se observa en la Tabla 21, la finasterida, que es el fármaco de referencia, presentó una CI_{50} = 8.5 nM sobre 5 α R2. Para los nuevos derivados, en una primera aproximación, se determinó el papel de la 4-enona y/o de la amida aromática en posición C-17; por lo que se evaluaron el ácido androst-4-en-17 β -oico, el intermediario **4d** y el compuesto final **6d** sobre 5 α R1 y 5 α R2. Como se observa en la Figura 18, sólo el ácido androst-4-en-17 β -oico y el compuesto **6d** mostraron actividad sobre la 5 α R2; ambos compuestos contienen la 4-enona en su estructura por lo que la presencia de este grupo es esencial para la actividad anti-5 α R2. Asimismo, al comparar el ácido androst-4-en-17 β -oico con el compuesto **6d** se observa claramente que el intercambio de la amida aromática por el ácido carboxílico en la posición C-17 disminuye la potencia sobre la enzima 5 α R2.

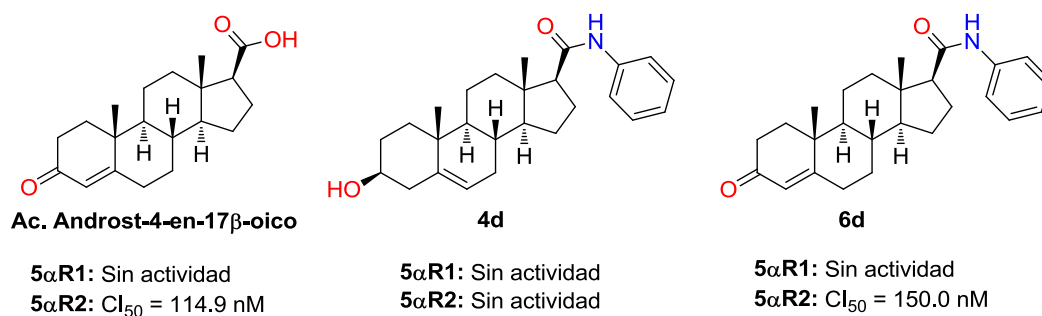


Figura 18: Importancia de la enona en C-3 y el grupo fenilo en C-17 para la actividad inhibitoria sobre 5 α R1 y 5 α R2

Posteriormente, y con la intención de observar si la diversificación de amidas en C-17 tenían un impacto significativo sobre la actividad catalítica de las enzimas 5 α R1 y 5 α R2, se continuó con la evaluación de los compuestos finales restantes (**6a-6u**). Adicionalmente, y con la finalidad de encontrar una relación entre algún parámetro fisicoquímico y/o estructural con la actividad biológica, se calcularon mediante el método de Funcionales de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés) B3LYP 6-31G* los descriptores: número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno (APH y DPH, respectivamente), momento dipolar, volumen molecular, coeficiente de partición ($cLogP$) y el número de confórmeros para cada molécula. Adicionalmente, se calcularon otros 333 descriptores tipo MOE; mientras que los descriptores σ de Hammett y la refractividad molar (MR) se obtuvieron de la literatura.⁸⁹ Desafortunadamente, no se encontró correlación lineal alguna entre estos parámetros y la actividad sobre las enzimas 5 α R1 y 5 α R2.

5. Análisis de resultados

Como se ilustra en la misma Tabla 21, los nuevos esteroides tienen una mayor selectividad hacia $5\alpha R2$. Estos resultados son congruentes con lo observado previamente para los azaesteroides reportados en la literatura, en donde, la incorporación de sustituyentes voluminosos en la posición C-17 incrementaban la selectividad hacia la segunda isoforma de la $5\alpha R$. En este sentido, la serie **6o-6u**, la cual presenta un mayor volumen molecular y libertad conformacional, tiene una potencia todavía menor sobre la enzima $5\alpha R1$ que los homólogos inferiores **6a**, **6d**, **6e**, **6h**, **6k**, **6l** y **6m**. Asimismo, el patrón de sustitución sobre el anillo aromático es de gran relevancia para incrementar la potencia sobre $5\alpha R1$, ya que los compuestos **6b** y **6f** fueron los derivados más potentes de la serie de anilina; ambos son análogos *meta* sustituidos que contienen un grupo metoxilo y flúor, respectivamente. De igual manera, los análogos **6l** y **6m**, que corresponden a los esteroides que poseen los heterociclos piridina y tiazol, respectivamente, tuvieron una potencia considerable aunque menor a los compuestos mencionados anteriormente. Con estas observaciones, es probable que los grupos metoxilo y flúor, así como los nitrógenos sp^2 en los anillos de piridina y tiazol estén funcionando como aceptores de puentes de hidrógeno en el sitio receptor de la $5\alpha R$ tipo 1.

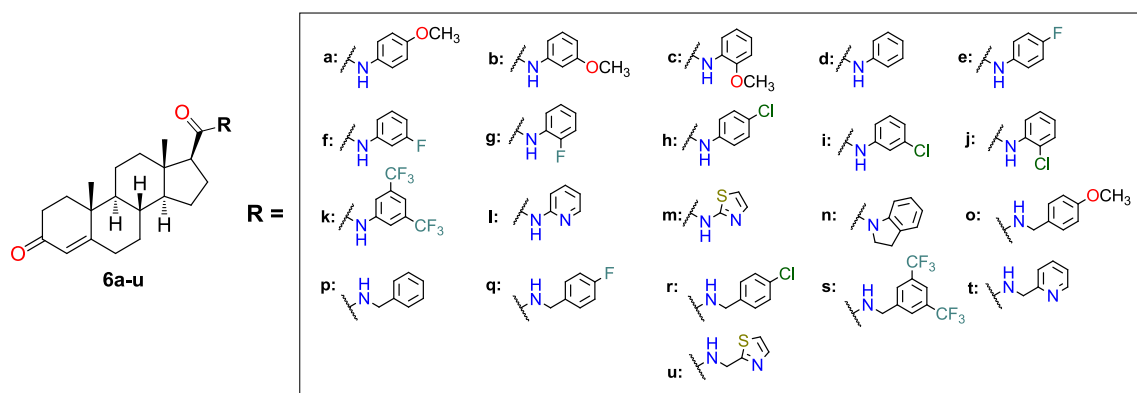
Por otro lado, el sustituyente incorporado en C-20 para formar la amida en C-17 también modula, en gran medida, la actividad sobre la $5\alpha R2$. Inicialmente, cuando se comparan los resultados obtenidos por los derivados de anilina *para* sustituidos (**6a**, **6d**, **6e**, **6h**, **6k**) con sus respectivos homólogos superiores (**6o**, **6p**, **6q**, **6r**) se observa que los últimos poseen una menor potencia (excepto **6p**). Por tanto, la incorporación de un espaciador, como lo es el grupo metileno, entre el nitrógeno de la amida y el anillo aromático parece resultar en un factor negativo para inhibir a la $5\alpha R2$. Sin embargo, esta suposición no se cumple cuando este anillo aromático pertenece al benceno sin sustituir o a un heterociclo, ya que los compuestos **6l** y **6m** son menos potentes que **6t** y **6u**. A esta observación también se unen los compuestos **6k** y **6s**, que son los análogos sustituidos con 3,5-bis-trifluorometilanilina.

Al comparar la actividad de todos los compuestos sobre la $5\alpha R2$, es evidente que los derivados de anilina *para* sustituidos son los más potentes. En este sentido, los análogos **6e** y **6h** presentaron una potencia 50 veces mayor a la finasterida, que es el fármaco de referencia, mientras que los derivados de bencilamina **6p** y **6q** mostraron una potencia equiparable a la de este azaesteroide. De estos resultados sólo se puede inferir que los sustituyentes electronegativos (y preferentemente poco voluminosos, es decir, con un valor de MR bajo) unidos al anillo aromático disminuyen la actividad catalítica de la enzima $5\alpha R$ tipo 2. Esto se puede deber a un aumento en interacciones tipo *pi*-stacking y/o fuerzas dipolo-dipolo en el sitio receptor. Cuando se compara el derivado **6d** con **6n** se observa que la potencia del segundo es aproximadamente 5 veces mayor; por lo que se infiere que el “anclaje” de este grupo, es decir, aumentar la rigidez de la amida en C-17, probablemente mejora la actividad anti- $5\alpha R2$. Asimismo, cuando se realiza el

5. Análisis de resultados

reemplazo bioisostérico del anillo bencenoide en **6d** por un sistema heterocíclico, como lo son la piridina (compuesto **6l**) y el tiazol (compuesto **6m**), la actividad se retiene en ambos compuestos, siendo el derivado de piridina el de mayor potencia.

Tabla 21: Actividad inhibitoria de los compuestos **6a-6u** sobre las enzimas 5 α -Reductasa tipo 1 y 2



Compuesto	Descriptores							CI ₅₀ (nM)		
	APH	DPH	Momento dipolar (debye)	σ	cLogP	Volumen molecular (Å ³)	MR	Número de conformeros	5 α R1	5 α R2
6a	3	1	3.05	-0.27	4.35	452.46	7.87	24	>100000	5.0
6b	3	1	1.78	0.12	4.39	452.45	7.87	24	1680	137.3
6c	3	1	3.74	-	4.35	456.11	7.87	24	11800	40.9
6d	2	1	1.86	-	4.40	425.00	1.03	6	>100000	150.0
6e	2	1	0.86	0.06	4.55	429.71	0.92	6	4730	0.112
6f	2	1	1.62	0.34	4.59	429.56	0.92	12	353	13.5
6g	2	1	2.52	-	4.55	429.66	0.92	12	>100000	114.5
6h	2	1	0.90	0.23	4.99	438.41	6.03	6	4670	0.167
6i	2	1	1.90	0.37	5.03	438.42	6.03	12	48440	504.9
6j	2	1	2.93	-	4.99	438.22	6.03	12	3990	22.6
6k	2	1	2.43	0.43	6.38	489.13	5.02	6	>100000	116
6l	3	1	3.14	-	3.57	419.12	-	12	>100000	59.2
6m	3	1	3.62	-	3.38	406.88	-	12	1350	154
6n	2	0	2.96	-	4.50	451.05	-	6	2030	32.2
6o	3	1	3.40	-0.27	4.49	471.75	7.87	36	>100000	23.6
6p	2	1	3.30	-	4.53	444.22	1.03	18	>100000	8.45
6q	2	1	3.11	0.06	4.68	448.43	0.92	18	11990	8.05
6r	2	1	3.36	0.23	5.12	457.30	6.03	18	75000	20.3
6s	2	1	3.85	0.43	6.51	508.41	5.02	18	79230	35.3
6t	3	1	5.43	-	3.26	438.34	-	36	>100000	54.2
6u	3	1	5.12	-	3.18	423.18	-	36	62970	21.1
Finasterida	2	2	5.07	-	3.32	388.23	-	6	ND	8.5

5. Análisis de resultados

5.1.2.2 Actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer de próstata y células sanas

5.1.2.2.1 Actividad antiproliferativa sobre la línea celular de cáncer de próstata LNCaP (andrógeno-sensible) y células polimorfonucleares de sangre de rata (PBMC)

En un inicio, se realizó la evaluación biológica de los esteroides mostrados en la Tabla 1, ya que estos fueron los que, cronológicamente, se prepararon primero. La actividad antiproliferativa de estos derivados se llevó a cabo en células LNCaP, las cuales expresan receptor de andrógenos (RA⁺) y, por tanto, su proliferación se ve incrementada en presencia de los andrógenos T y DHT. Por otra parte, los compuestos preparados también fueron evaluados sobre células polimorfonucleares de sangre de rata (PBMC), las cuales representan un modelo de células sanas. Los fármacos comerciales finasterida, flutamida y ketoconazol, que son utilizados comúnmente para el tratamiento de cáncer de próstata, se emplearon en estos ensayos como controles positivos.

La búsqueda de las moléculas con mayor potencial antiproliferativo sobre las células cancerosas de próstata LNCaP y PBMC, se determinó a una concentración de 50 μM para todos los compuestos y fármacos de referencia. Esto con la finalidad de observar el porcentaje de inhibición del crecimiento (expresado como % de inhibición). Mientras que en las células PBMC se realizó un solo ensayo, en línea celular LNCaP se realizaron tres ensayos diferentes:

1. Los compuestos y los fármacos de referencia se evaluaron sobre las células cancerosas a una concentración de 50 μM en ausencia de cualquier andrógeno en el medio de cultivo.
2. Los compuestos y los fármacos de referencia se evaluaron sobre las células cancerosas a una concentración de 50 μM en presencia de testosterona a una concentración de 0.1 μM en el medio de cultivo.
3. Los compuestos y los fármacos de referencia se evaluaron sobre las células cancerosas a una concentración de 50 μM en presencia de DHT a una concentración de 0.1 μM en el medio de cultivo.

En estos ensayos, el efecto antiproliferativo basal en el medio libre de andrógenos se fijó a 0%, los andrógenos testosterona y DHT incrementaron la proliferación de las células en estudio en un 72.1 y 75.3%, respectivamente; es decir, que utilizando la Ecuación 1 de la Sección 7.2.1.1, el efecto antiproliferativo sería entonces del -72.1 y -75.3% para ambos esteroides.

Por otro lado, el fármaco de referencia flutamida inhibió el crecimiento de las células LNCaP estimuladas con T y DHT con un % Inhibición del 29.6 y 25.1%, respectivamente, mientras que en el medio libre de andrógenos, este fármaco no presentó actividad. Estos resultados se pueden deber a que la

5. Análisis de resultados

flutamida antagonizó el efecto de los andrógenos evaluados por medio de la interacción en el receptor de andrógenos de esta línea celular.⁹⁰

El efecto de la finasterida sobre las células LNCaP se hace notar cuando éstas fueron tratadas con testosterona y en ausencia de andrógenos pero no en presencia de DHT. La actividad de la finasterida en células que no fueron tratadas con algún andrógeno se puede deber a que este azaesteroide presenta un mecanismo de acción alternativo, en el cual induce la apoptosis de esta línea celular por medio de la interacción con proteínas Bcl-2 y algunas caspasas. Respecto a la baja actividad de la finasterida en células cancerosas tratadas con testosterona y DHT, se puede inferir que este fármaco induce la inhibición del crecimiento en células LNCaP a través de la interacción con la enzima 5 α R1 después de 9 días de tratamiento con testosterona, en lugar de las 48 horas realizadas en el ensayo presente.

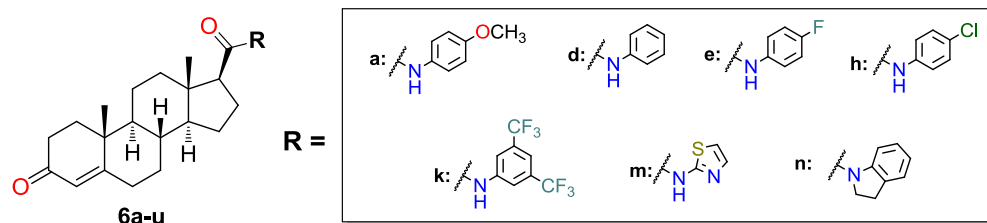
Respecto a los compuestos finales, éstos mostraron actividad antiproliferativa en las células LNCaP en presencia o en ausencia de la estimulación de andrógenos. Sin embargo, esta actividad es más potente cuando las células fueron tratadas con testosterona, ya que los porcentajes de inhibición son, en general, mayores. Por otro lado, al analizar en detalle la estructura de los compuestos evaluados y su actividad, se observó que los derivados de anilina con el patrón de sustitución *para* en el anillo aromático son menos efectivos para reducir el crecimiento de las células cancerosas de próstata (menor porcentaje de inhibición).

Aunque, en general, la actividad antiproliferativa es mayor cuando los compuestos son evaluados contra las células LNCaP tratadas con testosterona; cabe señalar que no existe relación alguna entre esta actividad y la observada para la enzima 5 α R1 (Tabla 21), ya que se esperaría que los derivados **6d** y **6k** no presentaran actividad antiproliferativa en este estudio, ya que ambos no presentaron actividad inhibitoria significativa sobre la enzima 5 α R1. Sin embargo, los dos compuestos poseen una actividad importante sobre las células LNCaP.

Tanto **6k** como **6m** fueron los que demostraron la mayor actividad antiproliferativa, ya sea en la presencia o ausencia de andrógenos. Es posible que la actividad de estos compuestos se deba a que poseen una alta lipófila (para el caso del compuesto **6k**) y un alto valor de la superficie polar superficial (TPSA, por sus siglas en inglés) como en el caso del compuesto **6m**. Ambas propiedades moleculares son conocidas por tener una relación con la permeabilidad hacia membranas celulares.⁹¹ Cabe destacar también, que estos dos compuestos presentaron una potencia superior a los fármacos de referencia finasterida, flutamida y ketoconazol.

5. Análisis de resultados

Tabla 22: Porcentaje de inhibición del crecimiento de los compuestos **6a**, **6d**, **6f**, **6h**, **6k** y **6n**; así como los fármacos de referencia flutamida, finasterida y ketoconazol a concentración de 50 μ M sobre células LNCaP y PBMC



Compuesto	Descriptores				% de inhibición del crecimiento a 50 μ M en células LNCaP (media \pm D.E)			% de inhibición del crecimiento a 50 μ M en células PBMC (media \pm D.E)
	cLogP	TPSA	HBA	HBD	Sin andrógenos	T [0.1 μ M]	DHT [0.1 μ M]	
6a	4.35	55.40	3	1	48.7 \pm 4.3	38.6 \pm 13.9	29.7 \pm 7.1	7.9 \pm 0.8
6d	4.40	46.17	2	1	40.9 \pm 2.3	66.2 \pm 6.3	59.4 \pm 17.7	8.7 \pm 2.6
6f	4.55	46.17	2	1	29.1 \pm 0.7	44.3 \pm 0.3	29.0 \pm 3.0	4.1 \pm 2.5
6h	4.99	46.17	2	1	-6.1 \pm 0.4	1.6 \pm 7.6	13.4 \pm 10.4	0
6k	6.38	46.17	2	1	100.0\pm3.2	100\pm18.8	100\pm8.6	9.1 \pm 1.0
6m	3.38	59.06	3	1	100\pm2.9	100\pm9.9	100\pm4.2	16.8 \pm 2.4
6n	4.50	37.38	2	0	69.1 \pm 4.0	49.9 \pm 1.0	52.6 \pm 0.9	0
Flutamida	-	-	-	-	-3.4 \pm 0.8	29.6 \pm 1.0	25.11 \pm 1.3	0
Finasterida	-	-	-	-	34.6 \pm 5.6	21.1 \pm 0.9	0	3.7 \pm 1.6
Ketoconazol	-	-	-	-	82.7 \pm 0.9	76.0 \pm 5.5	68.2 \pm 6.1	ND ^a

^a ND = No determinado

Posteriormente, se determinó la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento del 50% (CI_{50}) de las células LNCaP. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla 23, en donde se observa que el derivado **6k** es mejor inhibidor en células LNCaP (CI_{50} = 12.8 μ M), mientras que **6m** presentó una CI_{50} = 16.0 μ M. Ambos esteroides son más potentes que el ketoconazol en esta línea celular (CI_{50} = 12.8 μ M).

5. Análisis de resultados

Tabla 23: Concentración de los compuestos **6k**, **6m** y ketoconazol, la cual inhibe el crecimiento del 50% (CI₅₀) de las células LNCaP en un medio libre de andrógenos

Compuesto	LNCaP CI₅₀ (μM) (media±D.E)
6k	12.8 ± 0.7
6m	16.0 ± 1.8
Ketoconazol	25.0 ± 5.7

Por último, se determinó la actividad citotóxica de los mismos compuestos sobre las células PBMC, las cuales representan un modelo de células sanas. Así pues, todos los compuestos sintetizados exhibieron una baja citotoxicidad a la concentración evaluada.

5.1.2.2 Actividad antiproliferativa de los compuestos finales 6a-6u sobre la línea celular de cáncer de próstata PC3 (andrógeno-insensible) y células gingivales de humano

Al observar que los nuevos derivados esteroidales, presentados anteriormente, tenían un efecto importante en la inhibición de las células LNCaP en ausencia de andrógenos se decidió entonces, evaluar todos los compuestos sobre células PC3. Esta línea representa a células cancerosas de próstata que no expresan AR. Por tanto, su crecimiento es insensible a la presencia de andrógenos, por lo que éstas representan un modelo de cáncer de próstata más agresivo y avanzado, también conocido como Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CRPC, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, todos los esteroides sintetizados se evaluaron en células gingivales, las cuales representan un modelo de células sanas y sirvieron, en este estudio, para determinar la selectividad de las nuevas moléculas. Asimismo, los resultados de los compuestos evaluados se compararon con la actividad antiproliferativa del etopósido y ketoconazol. Estos dos fármacos son utilizados en el tratamiento del CRPC. Todos los compuestos y fármacos de referencia fueron evaluados a una concentración de 50 μM.

Los resultados de este ensayo se ilustran en la Tabla 24, en donde se puede observar que los nuevos derivados sintetizados son más selectivos hacia la línea celular PC3 (mayores % de inhibición) que por las células gingivales. Por otro lado, los fármacos de referencia ketoconazol y etopósido presentaron una actividad antiproliferativa del 82.7% y 42.7%, respectivamente. En cuanto a los derivados esteroidales, es evidente que la presencia del anillo aromático en estos compuestos, así como su homologación y el patrón de sustitución tienen un impacto significativo sobre la actividad biológica observada. En este

5. Análisis de resultados

sentido, la presencia de un metileno entre el carbonilo en posición C-17 y la amina aromática parece tener un efecto negativo para la actividad antiproliferativa, ya que si se comparan a los derivados **6a**, **6d**, **6e**, **6h**, **6k**, **6l** y **6m** con sus homólogos superiores, **6o**, **6p**, **6q**, **6r**, **6s**, **6t** y **6u**, se puede observar que los valores de porcentajes de inhibición son menores en el segundo grupo. De hecho, si se compara la actividad inhibitoria de los compuestos más potentes de toda la serie, es decir, los esteroides **6k** y **6m** (porcentaje de inhibición= 100% para ambos) con **6s** y **6u** (% de inhibición= 51.6 y 51.3%, respectivamente), es claro que la potencia se ve mermada drásticamente.

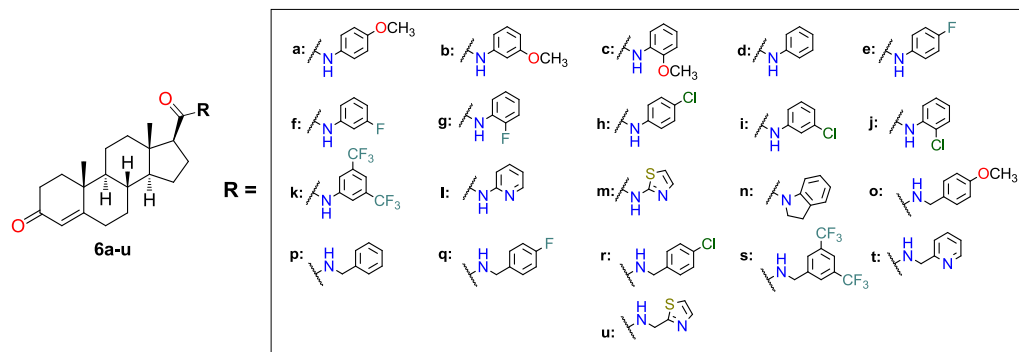
Por otra parte, el patrón de sustitución sobre el anillo aromático es esencial para la actividad antiproliferativa sobre la línea PC3. Cuando se realiza una comparación de los derivados de anilina **6a-6k**, se puede apreciar que en los compuestos que contienen el grupo metoxilo (**6a**, **6b** y **6c**), el patrón de sustitución que mejora la potencia es en posición *orto*; mientras que en los seis análogos halogenados (**6e-6j**) el patrón de sustitución que favorece dicha actividad es en posición *meta*. En este sentido, el derivado **6k**, que cuenta con dos grupos trifluorometilo en posición *meta*, es uno de los más potentes de toda la serie de compuestos sintetizados. Por tanto, la presencia grupos electronegativos en esta posición parece ser importante para la actividad antiproliferativa sobre las células PC3.

Respecto al cambio bioisostérico del anillo bencenoide por los anillos heterocíclicos de piridina y tiazol (compuestos **6l** y **6m**, respectivamente) es claro que esta estrategia fue favorable, ya que ambos análogos poseen una potencia mayor a la del compuesto **6d**. Es posible que, al igual que en la línea celular LNCaP mencionada en la sección anterior, el nitrógeno del anillo heterocíclico esté jugando un papel importante en la interacción con el sitio de unión a un receptor. Esta interacción podría estar mediada por puentes de hidrógeno con uno o varios residuos.

Finalmente, la restricción de la conformación del compuesto **6d** para dar el derivado **6n** es ligeramente favorable (% de inhibición = 59.9% *versus* 65.5%). Con este resultado y los observados en los derivados **6o-6u**, es posible que un menor grado de libertad del anillo aromático en C-17 tenga un impacto positivo para la inhibición de la proliferación de las células PC3.

5. Análisis de resultados

Tabla 24: Porcentaje de inhibición del crecimiento de los compuestos **6a-6u** y los fármacos de referencia ketoconazol y etopósido a una concentración de 50 μ M sobre células PC3 y gingivales



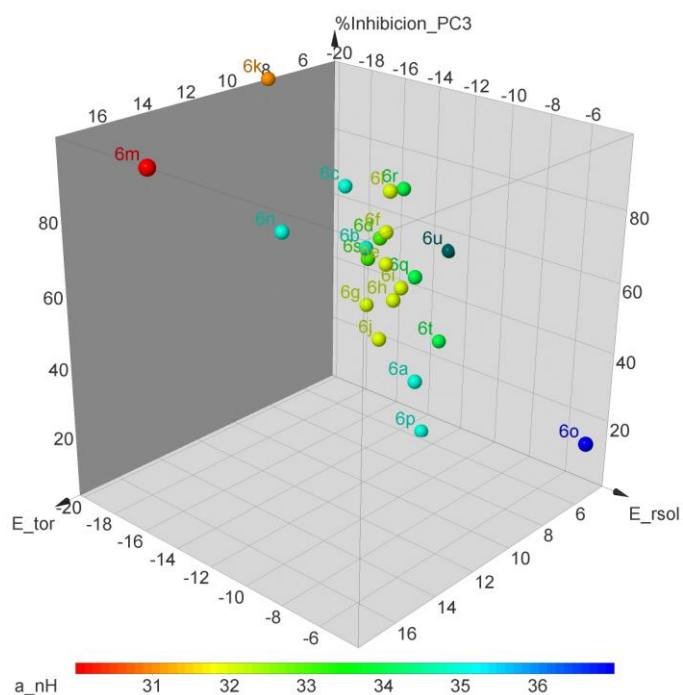
Compuesto	Descriptores			% de inhibición del crecimiento a 50 μ M (media \pm D.E)	
	a_nH	E_rsol	E_tor	Células PC3	Células gingivales
6a	35	-12.471841	6.7215357	20.7 \pm 2.5	7.62 \pm 1.4
6b	35	-15.620435	6.6547518	55.5 \pm 3.0	24.6 \pm 1.2
6c	35	-16.414505	7.1228681	73.4 \pm 1.3	24.35 \pm 3.2
6d	33	-14.761915	6.680203	59.9 \pm 3.7	17.37 \pm 1.7
6e	32	-14.362585	6.704587	52.9 \pm 4.1	5.17 \pm 1.4
6f	32	-14.442842	6.6517787	62.1 \pm 1.9	17.37 \pm 1.7
6g	32	-15.458299	6.7195001	38.7 \pm 1.5	28.74 \pm 1.5
6h	32	-13.892885	6.6980414	42.9 \pm 5.6	0.0
6i	32	-13.489203	6.6684165	47.3 \pm 1.9	9.36 \pm 1.6
6j	32	-14.469841	6.9178858	30.3 \pm 1.9	19.95 \pm 2.16
6k	31	-20.29487	7.8759151	100.0	29.30 \pm 4.5
6l	32	-14.361082	6.5418634	73.9 \pm 2.7	18.88 \pm 2.6
6m	30	-14.841991	17.793282	100.0	24.06 \pm 4.8
6n	35	-16.814072	10.171718	65.5 \pm 2.3	8.64 \pm 2.0
6o	37	-4.0268826	5.5951948	17.0 \pm 1.2	9.32 \pm 0.9
6p	35	-13.151432	5.5103669	0.0	9.32 \pm 0.9
6q	34	-13.862782	5.4627357	47.2 \pm 1.2	0.0
6r	34	-14.713428	5.4255457	71.9 \pm 0.9	26.2 \pm 1.0
6s	33	-15.742661	6.4066691	51.6 \pm 1.1	23.5 \pm 2.4
6t	34	-12.703914	5.0902476	28.6 \pm 2.8	5.53 \pm 1.7
6u	32	-13.128382	4.2370262	53.7 \pm 2.4	4.67 \pm 1.5
Ketoconazol	-	-	-	82.7 \pm 0.9	4.7 \pm 2.4
Etopósido	-	-	-	42.7 \pm 0.8	ND ^a

^aNo determinado

Al realizar un análisis más profundo y utilizando los descriptores moleculares para cada compuesto, se encontró que existían tres propiedades fisicoquímicas que correlacionaban con la actividad antiproliferativa de los compuestos evaluados (Tabla 24). Estos descriptores son: la diferencia de la energía libre de solvatación (E_rsol), el potencial de energía de torsión (E_tor) y el número de átomos de

5. Análisis de resultados

hidrógeno presentes (a_{nH}). Como se ilustra en la Gráfica 1, un valor de E_{rsol} menor a -14 junto con un valor de E_{tor} mayor a 7 favorece la actividad antiproliferativa sobre esta línea celular. Asimismo, el número de átomos de hidrogeno es un parámetro negativo. Por tanto, los compuestos **6k** y **6m** son los que cumplen con estos tres requisitos, ya que el derivado **6k** tiene un valor de $E_{rsol} = -20.29487$, $E_{tor} = 7.8759151$ y $a_{nH} = 31$; mientras que **6m** tiene valores de $E_{rsol} = -14.841991$, $E_{tor} = 17.793282$ y $a_{nH} = 30$. De estos valores se infiere que los compuestos que son capaces de liberarse con mayor facilidad de su capa de solvatación, así como de tener una más estructura rígida, pueden entonces interactuar con una diana (o dianas) farmacológica(s) asociada(s) a la proliferación de las células PC3.



Gráfica 1: Gráfico 3D en donde se relaciona el % de inhibición del crecimiento en células PC3 con los descriptores E_{rsol} , E_{tor} y a_{nH}

Por último, se determinó la CI_{50} sobre la línea celular PC3 para el ketonconazol y los compuestos más potentes, **6k** y **6m** (Tabla 25). Contrario a los resultados observados sobre la línea celular LNCaP, en este caso se pudo apreciar que **6m** fue el más potente, con un valor de $CI_{50} = 6.6 \mu M$; mientras que **6k** y el ketonocazol presentaron una $CI_{50} = 14.2$ y $11.7 \mu M$, respectivamente.

5. Análisis de resultados

Tabla 25: Concentración de los compuestos **6k**, **6m** y ketoconazol, la cual inhibe el crecimiento del 50% (CI₅₀) de las células PC3

Compuesto	PC3 CI ₅₀ (μM) (media±D.E)
6k	14.2 ± 1.6
6m	6.6 ± 0.7
Ketoconazol	11.7 ± 0.6

La actividad biológica presentada por **6k** y **6m** sobre las líneas celulares andrógeno sensibles e insensibles (LNCaP y PC3, respectivamente) hace suponer que el mecanismo de acción de ambos esteroides es independiente a la inhibición de alguna macromolécula relacionada con la estereoidogénesis. Aunque es necesario llevar a cabo más estudios para corroborar esta observación.

Debido a que **6k** y **6m** presentaron una potencia mayor a los fármacos de referencia, así como una baja actividad antiproliferativa en células sanas, ambos esteroides son entonces candidatos para estudios posteriores en el tratamiento de tumores cancerosos de próstata.

5.1.2.3 Actividad antiandrogénica *in vivo* en hámsteres gonadectomizados

Los compuestos **6a**, **6e** y **6h** que fueron los que mostraron mayor actividad inhibitoria sobre la enzima 5 α R2, fueron elegidos para determinar su actividad antiandrogénica en hámsteres castrados. Éste es un modelo de la HPB ya que, en él, sólo, se mide el crecimiento generalizado de la próstata y no el crecimiento de células malignas como ocurre en el cáncer de próstata. A pesar de que los compuestos **6k** y **6m** no tuvieron actividad significativa sobre la enzima 5 α R2, fueron elegidos debido a su actividad antiproliferativa; esto con el fin de observar si, en estudios *in vivo*, estos dos derivados son capaces de disminuir el tamaño de la próstata por posible mecanismo andrógeno-independiente, como el mostrado en las líneas celulares cancerosas de próstata.

En este ensayo de disminución del tamaño de la próstata, se utilizaron hámsteres machos de la cepa *Syrian Golden* (entre 150-200 g), los cuales se dividieron en 8 grupos de 3 animales por experimento. Estos fueron gonadectomizados 30 días previos al experimento y diariamente, por 6 días, se les administró por vía subcutánea:

- Grupo 1: 200 μ L de aceite de sésamo (vehículo).
- Grupo 2: 200 μ g de testosterona en 200 μ L de aceite de sésamo
- Grupo 3: 200 μ g de Finasterida más 200 μ g de testosterona en 200 μ L de aceite de sésamo.
- Grupos 4, 5, 6, 7 y 8: 200 μ g de testosterona más 200 μ g de los esteroides **6a**, **6e**, **6h**, **6k** y **6m**.

5. Análisis de resultados

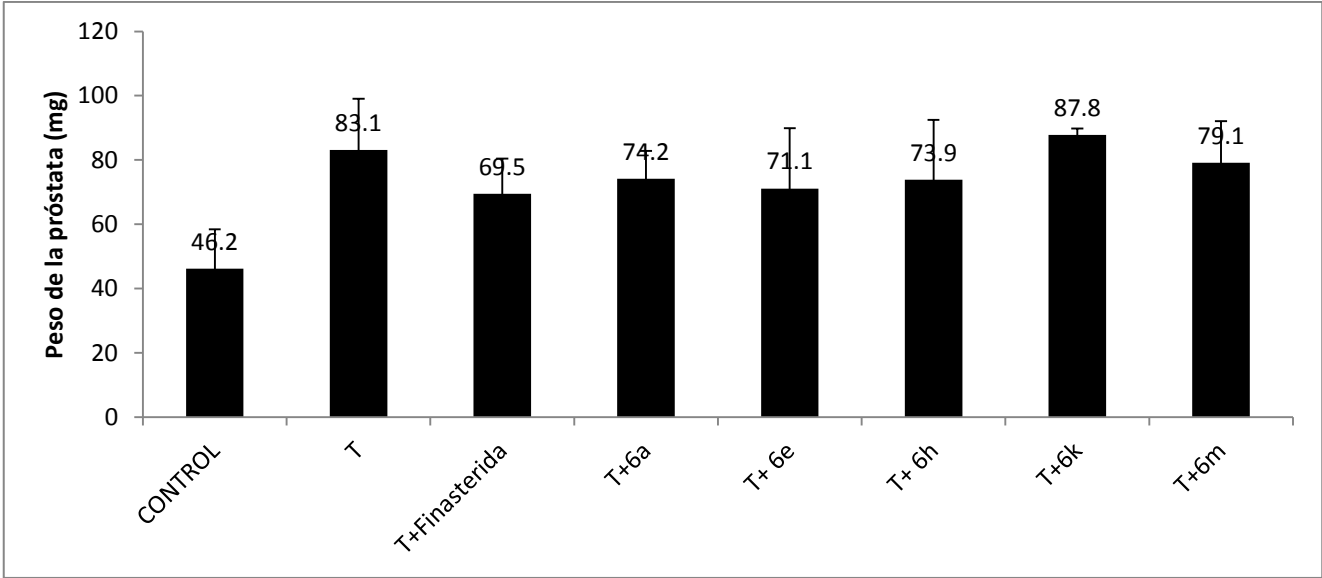
Los resultados de este experimento se ilustran en la Gráfica 2, en donde se puede observar que la próstata tiene un peso promedio de 46.2 mg en el grupo control, el cual pertenece a los hámsteres gonadectomizados que fueron tratados sólo con el vehículo; mientras que en el grupo que se administró testosterona, se observa un claro aumento en el peso, dando un valor promedio de 83.1 mg. Por otro lado, cuando se administró finasterida y testosterona se observa una disminución del peso de este órgano hasta 69.5 mg, lo que indica que este fármaco está impidiendo la transformación de este andrógeno a DHT por medio de la inhibición de la enzima $5\alpha R2$. la cual se expresa principalmente en este tejido.

Respecto a los compuestos sintetizados, éstos presentaron, en su mayoría, una disminución del peso de la próstata con respecto al grupo que sólo fue tratado con testosterona. En este sentido, los derivados **6a**, **6e**, **6h** y **6m** fueron los que disminuyeron el peso de éste con valores de 74.2, 71.1, 73.9 y 79.1 mg, respectivamente; mientras que el compuesto **6k**, incrementó el peso hasta 87.8 mg, que es un valor mayor al obtenido por el grupo que fue tratado con testosterona, lo que indica que, *in vivo*, **6k** se comporta como un andrógeno; por tanto, este es un caso de una actividad biológica indeseable desde el enfoque presentado en este trabajo.

Por otro lado, existe una relación entre la actividad biológica observada en este estudio y la actividad inhibitoria sobre la enzima $5\alpha R2$, ya que los derivados halogenados **6e** y **6h** tuvieron una CI_{50} de 0.112 y 0.167 μM , respectivamente, sobre esta diana farmacológica; mientras que **6a** presentó una CI_{50} = 5.0 μM . Los tres compuestos mencionados, mostraron, en este caso, una disminución del peso de la próstata con valores de 71.1, 73.9 y 74.2 mg, respectivamente, lo que posiciona al derivado fluorado (**6e**) como el antiandrógeno más potente. No obstante, esta actividad es todavía ligeramente menor a la de la finasterida.

En último lugar se encuentra el derivado de tiazol **6m**, el cual disminuyó ligeramente el peso de la próstata si se le compara con el grupo control que fue tratado con testosterona, lo que reafirma el hecho de que **6m** actúa en las células cancerosas de próstata por un mecanismo que no está asociado con la esteroidogénesis. Asimismo, estos datos indican que **6m** no es útil para el tratamiento de HPB, pero posiblemente lo sea para el tratamiento del CaP.

5. Análisis de resultados



Gráfica 2: Disminución del peso de la próstata de hámsteres gonadectomizados por parte de los compuestos **6a**, **6e**, **6h**, **6k**, **6m** y la finasterida

5. Análisis de resultados

5.2 Análogos del compuesto líder RM-532-105 como inhibidores de la enzima 17 β -HSD3

5.2.1 Parte Química

Otra parte del presente proyecto se centró en la síntesis de diferentes análogos del compuesto RM-532-105 el cual, como se mencionó en la sección 2.4.4.1, es un inhibidor de la enzima 17 β -HSD3. Desafortunadamente, este derivado sufre un amplio metabolismo provocando una disminución de su eficacia en pruebas *in vivo*. Por tal motivo, fue pertinente realizar modificaciones en su estructura con la finalidad de incrementar su resistencia al metabolismo. Las estrategias que se llevaron a cabo fueron, inicialmente, la modificación de la estereoquímica en el esqueleto esteroideal. Esto debido a que las enzimas y diferentes proteínas involucradas en el metabolismo de Fase 1 son susceptibles a cambios en la conformación espacial de los sustratos sobre los que actúan.

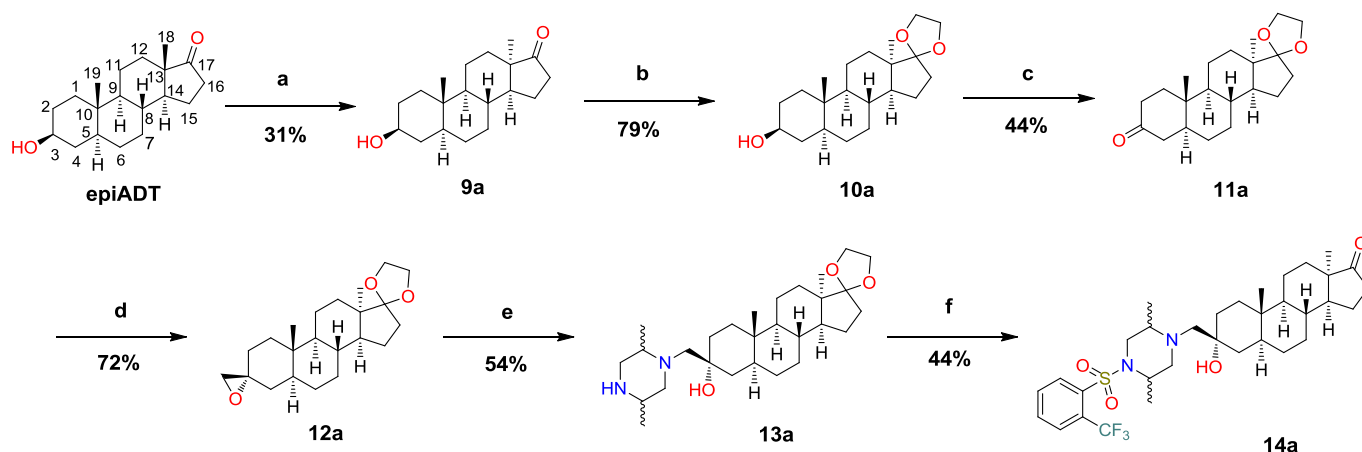
Considerando lo anterior, se llevó a cabo la preparación de los compuestos **14a** y **14b** (Esquemas 11 y 12). En el primero, se generó la inversión del metilo unido al carbono C-13 para pasar de la cara β a la cara α , lo que modifica la conformación del anillo D; mientras que para el segundo derivado, se partió de la 5 β -epiandrosterona (5 β -epiADT o compuesto **9b**) con la cual, la conformación del anillo A es significativamente diferente a la del compuesto RM-532-105.

Para la síntesis del compuesto **14a** se utilizó epiandrosterona (epiADT) como material de partida. La primera reacción en llevarse a cabo fue la epimerización del metilo unido a C-13. Para ello se utilizó la metodología reportada por Yaremenko y Khvat.⁹² Aunque el mecanismo por el cual se da esta reacción no está bien establecido, se ha propuesto que la *o*-fenilendiamina se adiciona a la cetona en C-17 y posteriormente promueve la apertura vía radicalaria del enlace entre los carbonos C-17 y C-13, lo que conlleva a la isomerización del metilo unido a este último, de la conformación axial (13 β -CH₃) a la ecuatorial (13 α -CH₃) con el concomitante cierre del anillo de cinco miembros. Durante esta epimerización se llevó a cabo también la acetilación del grupo hidroxilo en C-3 como reacción secundaria. Por lo tanto, fue necesario hidrolizar el grupo acetato del producto crudo en presencia de hidróxido de potasio para obtener el intermediario **9a**, el cual, cabe mencionar, presenta una ligera menor polaridad que la epiADT. En la espectroscopia de RMN ¹H, la señal correspondiente al metilo unido a C-13 (o 18-CH₃) tiene un desplazamiento significativo a campo bajo desde δ = 0.86 ppm, para la epiADT, hasta δ = 0.95 ppm para el compuesto sintetizado.

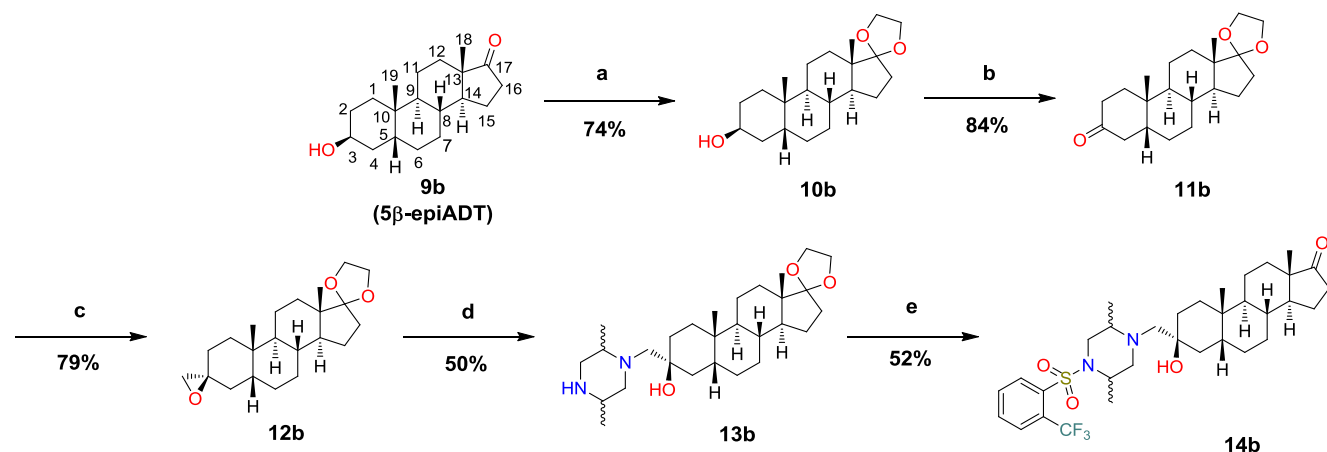
Partiendo del intermediario **9a**, las reacciones que se llevaron a cabo para obtener los compuestos finales **14a** y **14b** son iguales (Esquemas 11 y 12). En este sentido, los intermediarios **9a** (13 α -epiADT) y **9b** (5 β -epiADT) se hicieron reaccionar con etilenglicol en presencia de cantidades catalíticas de ácido *p*-toluensulfónico (APTS) a reflujo de tolueno para proteger el grupo carbonilo en la posición C-17,

5. Análisis de resultados

generando así los intermediarios **10a** y **10b** en rendimientos aceptables (79% y 74%, respectivamente). Una señal múltiple ubicada a $\delta_{\text{H}} = 3.88$ ppm en el espectro de RMN ^1H , para ambos compuestos, fue indicativo de que la reacción se realizó exitosamente, ya que esta señal corresponde al grupo etilo del cetal en C-17 (-OCH₂CH₂O-).



Esquema 11: Síntesis del compuesto **14a**. Reactivos y condiciones: (a) 1) *o*-fenilendiamina, AcOH, reflujo, 6 h; 2) KOH (10% en MeOH), t.a. 1h; (b) Etilenglicol, APTS, PhCH₃, reflujo, Dean-Stark, 12 h; (c) Dess-Martin periodinano, DCM, t.a, 1 h; (d) (CH₃)₃SO⁺I⁻, NaH, DMSO, THF, t.a, 5 h; (e) *trans*-2,5-dimetilpiperazina, EtOH, 70 °C, 12 h; (f) 1) Cloruro de 2-(trifluorometil)bencensulfonilo, TEA, DCM, r.t, 4 h; 2) HCl 36% v/v, acetona, 0°C, 30 min.



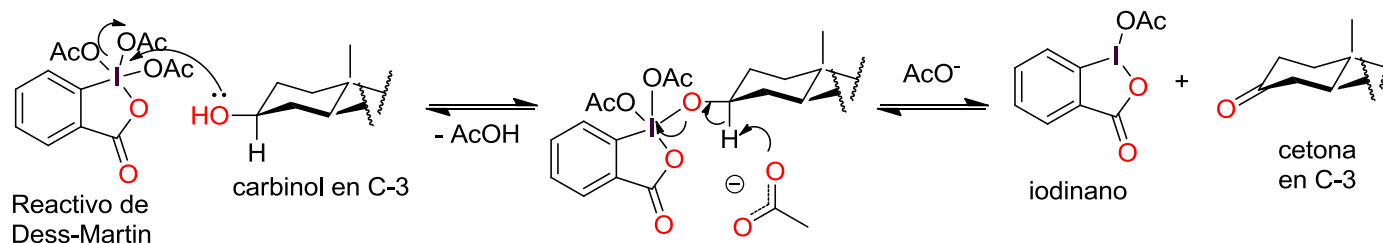
Esquema 12: Síntesis del compuesto **14b**. Reactivos y condiciones: (a) Etilenglicol, APTS, PhCH₃, reflujo, Dean-Stark, 12 h; (b) Dess-Martin periodinano, DCM, t.a, 1 h; (c) (CH₃)₃SO⁺I⁻, NaH, DMSO, THF, t.a, 5 h; (d) *trans*-2,5-dimetilpiperazina, EtOH, 70 °C, 12 h; (e) 1) Cloruro de 2-(trifluorometil)bencensulfonilo, TEA, DCM, r.t, 4 h; 2) HCl 36% v/v, acetona, 0°C, 30 min.

Una vez preparados los intermediarios **10a** y **10b**, éstos se hicieron reaccionar con el reactivo de Dess-Martin (DMP) para oxidar el carbinol en la posición C-3 a la cetona correspondiente, obteniendo los compuestos **11a** y **11b**. El mecanismo de reacción de esta oxidación se ilustra en el Esquema 13,⁸⁷ en el cual se observa la adición del alcohol al yodo pentacoordinado del DMP (o periodinano) para dar el

5. Análisis de resultados

diacetoxialcoxiperiodinano. Posteriormente, el protón α del alcohol es removido por la base (el ion acetato) para liberar la cetona en C-3 junto con una molécula de iodinano.

Oxidación de Dess-Martin

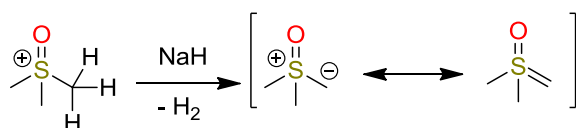


Esquema 13. Mecanismo de reacción de la oxidación de Dess-Martin.

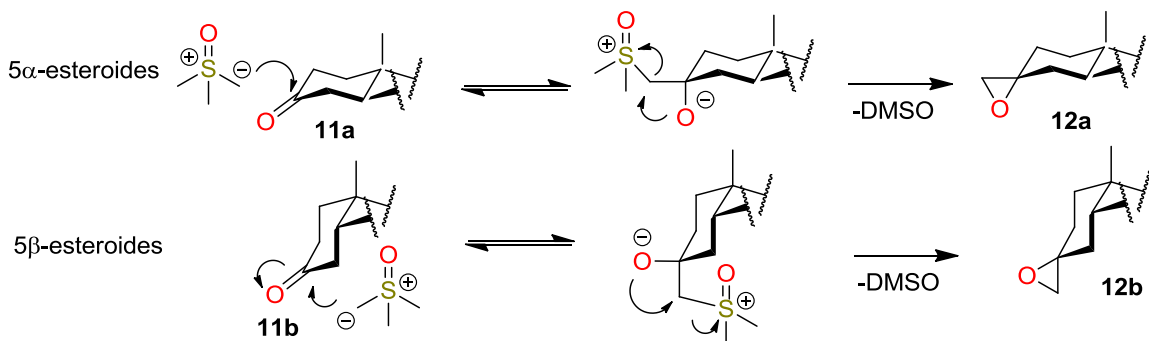
En la espectroscopía de RMN ^1H , para ambos derivados, se pudo apreciar la desaparición de la señal múltiple en $\delta_{\text{H}} = 3.6$ ppm, que corresponde al protón $3\alpha\text{-H}$, lo que indica la presencia de la cetona en esta posición. Posteriormente, se realizó la epoxidación de Corey-Chaykovsky⁹³ (Esquema 14) sobre los intermediarios **11a** y **11b** para generar los intermediarios **12a** y **12b**. Para ello, fue necesaria la formación *in situ* del metiluro de dimetilsulfoxonio. Esto se logró al hacer reaccionar ioduro de trimetilsulfoxonio con hidruro de sodio. Una vez finalizada la evolución de gas en el seno de reacción (por desprendimiento de H_2), se agregaron los esteroides mencionados. En este punto, se da la adición nucleofílica reversible del iluro al carbonilo en C-3. En este ataque, se forma un intermediario que evita la interacción 1,3-diaxial entre el grupo metilendimetilsulfoxonio y las posiciones C-1 y C-5 del esteroide, lo que conlleva a la formación de los epóxidos **12a** y **12b**. En los dos intermediarios se observó la aparición de una nueva señal simple con un $\delta_{\text{H}} = 2.60$ ppm que integra para dos protones. Esta señal corresponde al grupo metileno del oxirano formado.

5. Análisis de resultados

Formación *in situ* del metiluro de dimetilsulfoxonio



Adición del nucleofílica del iluro y formación del oxirano



Esquema 14. Mecanismo de reacción de la epoxidación de Corey-Chaykovsky.

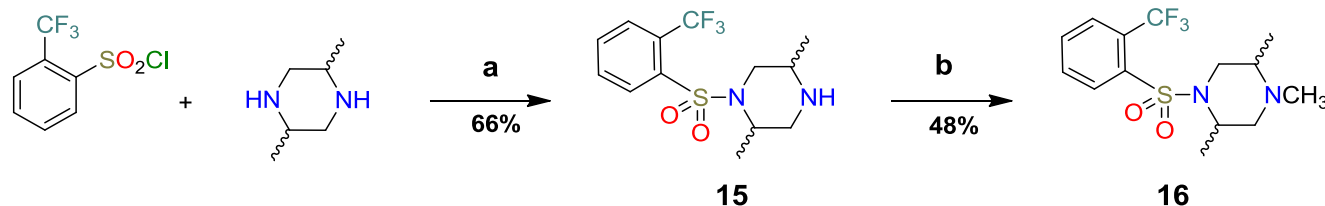
Para llevar a cabo la apertura del oxirano por medio de una adición nucleofílica bimolecular (S_N2), estos dos intermediarios se hicieron reaccionar con *trans*-2,5-dimetilpiperazina para obtener los derivados **13a** y **13b** en rendimientos moderados. En ambos se observó la desaparición de la señal con $\delta_H = 2.60$ ppm, mencionada anteriormente. En su lugar, se observó la presencia de los protones correspondientes a los grupos metilo unidos al anillo heterocíclico entre $\delta_H = 0.98 - 1.01$ ppm; adicionalmente, se encontraron nuevas señales entre $\delta_H = 2.60 - 2.61$ ppm que se asignaron a los metinos (CH_3CH) de las posiciones 2 y 5 del anillo de piperazina.

A continuación, tanto el compuesto **13a** como **13b** se hicieron reaccionar con cloruro de 2-(trifluorometil)bencensulfonilo en condiciones básicas. Finalmente, las sulfonamidas formadas se trataron con ácido clorhídrico en acetona, para desproteger el cetal en C-17 dando así, los compuestos finales **14a** y **14b** con rendimientos globales del 1.8% y 13%, respectivamente. En la espectroscopia de RMN ¹H se observó la desaparición del etileno del cetal en C-17 así como la presencia de la arilsulfonamida debido a la aparición de nuevas señales entre $\delta_H = 7.68$ y 8.17 ppm que corresponden a los protones del sistema aromático. Adicionalmente, se encontró un desplazamiento generalizado a campo bajo por parte de los protones del anillo de piperazina, así como los protones de los metilos unidos a ésta. Otra característica importante fue que en estos compuestos, se identificó con mayor facilidad, la señal que corresponde al metileno que se localiza entre la posición C-3 y el anillo de piperazina. Esta señal se desdobra como dos señales dobles entre $\delta_H = 2.12$ y 2.30 ppm con una constante de acoplamiento de aproximadamente 14 Hz.

5. Análisis de resultados

Por otra parte, en la espectroscopia de RMN ^{13}C , para ambos compuestos finales, se pudo observar, en primera instancia, la presencia de una señal en $\delta_{\text{C}} = 221.4$ ppm que corresponde al carbono de la cetona en C-17, la cual confirma la desprotección satisfactoria del cetal. Otras señales entre $\delta_{\text{C}} = 127.5$ y 139.3 ppm se asignaron a los carbonos unidos al anillo aromático de la sulfonamida. También, se observó una señal cuádruple en $\delta_{\text{C}} = 122.6$ ppm con una constante de acoplamiento de 274.4 Hz que corresponde al grupo trifluorometilo unido al carbono con la asignación C-28. En las tablas 26, 27, 28 y 29 se elucidan, con más detalle, todas las señales y sus respectivas asignaciones para todos los compuestos finales (**14a-14n**). La elucidación estructural completa de los compuestos finales se realizó mediante el uso de diferentes experimentos de RMN 2D, tales como COSY, NOESY, HSQC y HMBC. Un ejemplo de la asignación mediante estas técnicas, para el compuesto **14b**, se encuentra detallado en el artículo del ANEXO 2.

Con fines comparativos, se realizó la síntesis del compuesto **16**, el cual corresponde a la cadena lateral unida a la posición C-3 en todos los compuestos finales. Para su preparación (Esquema 15), se hizo reaccionar cloruro de 2-(trifluorometil)bencensulfonilo con 2,5-*trans*-dimetilpiperazina en exceso. El producto obtenido (intermediario **15**) se trató con yoduro de metilo y *N,N*-diisopropietilamina (DIPEA) para obtener el compuesto **16** como producto final con un rendimiento global del 31%.

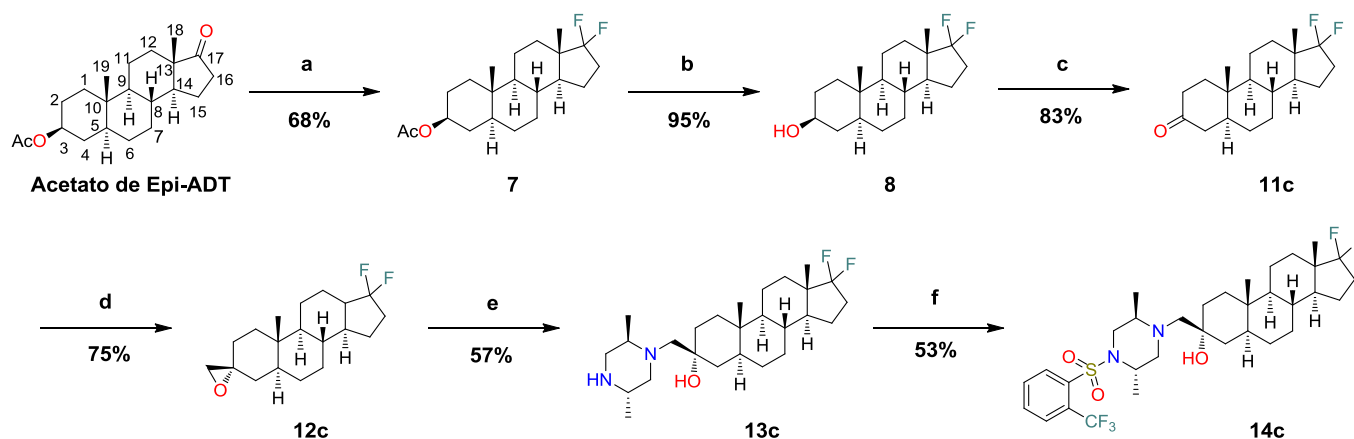


Esquema 15. Síntesis del compuesto **16**. Reactivos y condiciones: a) DCM, 0°C , 1 h; b) CH_3I , DIPEA, 0°C , 3 h.

Otra estrategia realizada para generar nuevos análogos del compuesto RM-532-105, como inhibidores de la enzima 17β -HSD3 y con mejor estabilidad metabólica, fue la modificación de las posiciones C-16 y C-17. La principal razón, en un inicio, fue que se sospechaba que la hidroxilación en la posición C-16 (compuesto **14k**) y/o la reducción de la cetona en C-17 (compuesto **14d**) eran los principales metabolitos generados al incubar el compuesto RM-532-105 en presencia de microsomas hepáticos de humano. Cabe mencionar que esta hipótesis fue confirmada en estudios realizados al mismo tiempo que se sintetizaron todos estos análogos, por lo que en ese momento se pensó que era importante bloquear ambas posiciones del esqueleto esteroidal, además de preparar los compuestos **14k** y **14d** en cantidades suficientes para determinar su actividad biológica *in vitro*. Por tanto, se realizó inicialmente, la síntesis del compuesto **14c** (Esquema 16), el cual es un derivado difluorado en la posición C-17 de **RM-532-105**. Para

5. Análisis de resultados

su síntesis, fue necesario partir del acetato de epi-ADT, el cual se hizo reaccionar con trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST) para obtener el intermediario **7**.

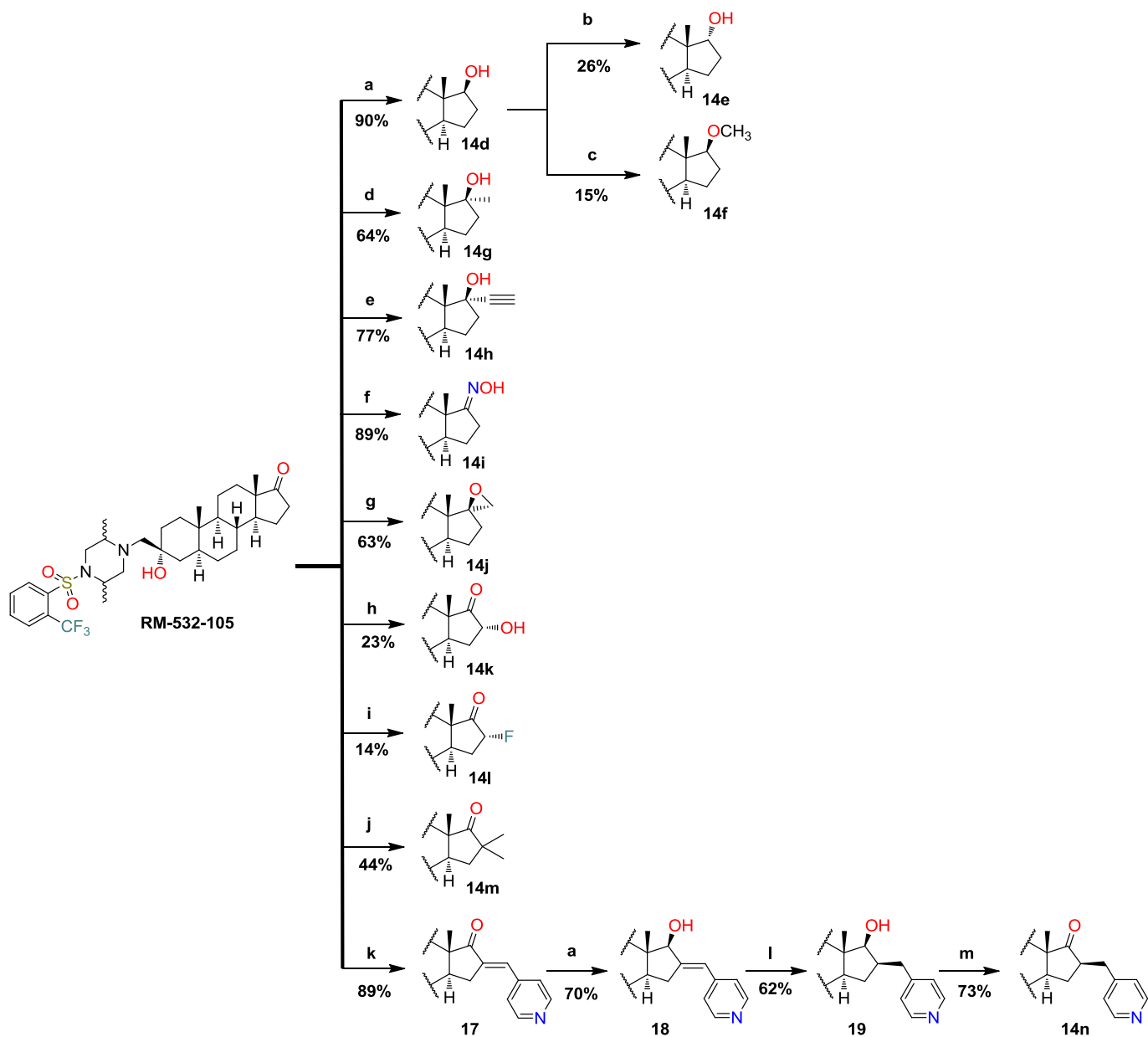


Esquema 16: Síntesis del compuesto **14c**. Reactivos y condiciones: (a) DAST, 80°C, 12 h; (b) KOH 10% en metanol, t.a, 1h; (c) Dess-Martin periodinano, DCM, t.a, 1 h; (d) $(\text{CH}_3)_3\text{SO}^+\text{I}^-$, NaH, DMSO, THF, t.a, 5 h; (e) *trans*-2,5-dimetilpiperazina, EtOH, 70 °C, 12 h; (f) Cloruro de 2-(trifluorometil)bencensulfonilo, TEA, DCM, r.t, 4 h.

Para corroborar la existencia de los dos átomos de flúor en la posición C-17 se analizaron los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C de este compuesto. En el primero, se observó un desdoblamiento de la señal correspondiente al metilo 18- CH_3 que indica el acoplamiento a larga distancia entre los protones unidos a este grupo con los átomos de flúor en C-17 (constante de acoplamiento $J_{\text{H-F}} = 1.9$ Hz). En el espectro de RMN ^{13}C se pudo apreciar la desaparición de la señal correspondiente al carbono carbonílico y, en su lugar, aparecieron dos señales dobles con un $\delta_{\text{C}} = 132.5$ ppm y una constante de acoplamiento de 250 Hz para cada una. Una vez obtenido el compuesto **7**, se procedió a hidrolizar el grupo acetato de este intermediario utilizando una solución metanólica de hidróxido de potasio al 10 % p/v para dar el compuesto **8**. A partir de este último se llevaron a cabo las mismas reacciones (excepto la desprotección del cetal) que para los derivados **14a** y **14b**. El rendimiento global para la síntesis de **14c** fue del 12%.

Por otra parte, los análogos **14d-14n** (Esquema 17) se sintetizaron a partir del compuesto **RM-532-105**. La primera reacción sobre este compuesto fue la reducción del grupo carbonilo en C-17 mediante el uso de borohidruro de sodio para obtener el compuesto final **14d**. Para este derivado se observó una señal triple con un $\delta_{\text{H}} = 3.62$ ppm y una constante de acoplamiento de 10.2 Hz en la espectroscopia de RMN ^1H , así como una señal negativa con un $\delta_{\text{C}} = 81.9$ ppm en la espectroscopia de RMN ^{13}C ; ambas señales corresponden al protón del carbinol en la posición C-17 y que junto con la desaparición de la señal en $\delta_{\text{C}} = 221.4$ ppm de la cetona en esta misma posición confirman la reducción de este grupo.

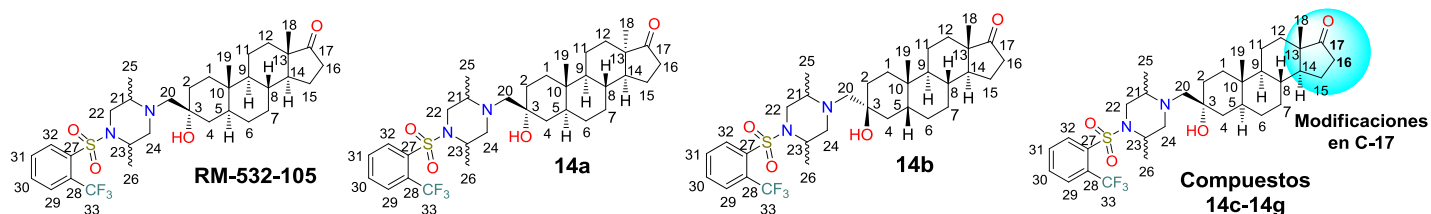
5. Análisis de resultados



Esquema 17: Síntesis de los compuestos **14d-14n**. Reactivos y condiciones: (a) NaBH_4 , MeOH, 0°C , 1 h; (b) 1) ácido *p*-nitrobenzoico, PPh_3 , DEAD, PhCH_3 , 80°C , 4h; 2) KOH en metanol (10% m/v), t.a., 3.5 h; (c) NaH, CH_3I , DMF, rt 12 h; (d) CH_3MgBr , PhCH_3 , reflujo, 4h después rt 12 h; (e) 1) Trimetilsililacetileno, MeLi, THF/dietileter (1:1), 0°C , t.a.; 2) 5% K_2CO_3 en MeOH, t.a. 1 h; (f) clorhidrato de hidroxilamina, acetato de sodio, EtOH, 60°C , 1h; (g) $(\text{CH}_3)_3\text{SiI}$, NaH, DMSO, THF, t.a., 4.5 h; (h) 1) CuBr_2 , MeOH, 65°C , 12 h; 2) NaOH 1M, DMF, DCM, 3 h, t.a.; (i) SelectfluorTM, H_2SO_4 conc., EtOH, 60°C , 72 h; (j) NaH, CH_3I , THF, 70°C , 12 h; (k) 4-piridincarboxaldehído, KOH (10% m/v), EtOH, reflujo, 30 min; (l) H_2 , 10% Pd/C, MeOH, t.a., 36 h; (m) Dess-Martin periodinano, DCM, rt, 1h.

5. Análisis de resultados

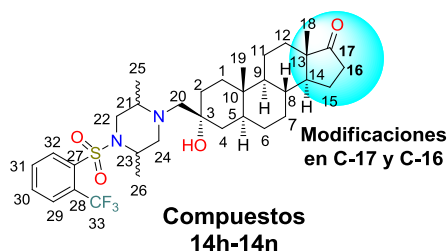
Tabla 26: Desplazamiento químico δ (ppm) de las señales características para los compuestos **14a-14g** y **RM-532-105** en RMN ^1H



	RM-532-105	14a	14b	14c	14d	14e	14f	14g
Protón	-	-	-					
18-CH₃	0.85	0.96	0.85	0.85	0.71	0.64	0.72	0.83
				(d, $J_{H,F} = 1.9$ Hz)				
19-CH₃	0.75	0.56	0.98	0.74	0.73	0.73	0.71	0.73
25-CH₃	0.89	0.88	0.88	0.87	0.94	0.94	0.87	0.87
26-CH₃	1.19	1.19	1.18	1.19	1.18	1.18	1.18	1.18
16α-H	-	2.17	2.04	1.99	1.45	1.67	1.41	1.13
16β-H	2.32	2.31	2.44	1.99	2.01	2.13	1.97	1.72
20-CH₂	2.15 y 2.33	2.15 y 2.32	2.12 y 2.30	2.12 y 2.30	2.13 y 2.32	2.13 y 2.32	2.12 y 2.30	2.13 y 2.32
21-CH	2.82	2.89	2.89	2.89	2.87	2.87	2.89	2.87
22-CH₂	3.35 y 3.52	3.35 y 3.49	3.35 y 3.49	3.35 y 3.49	3.32 y 3.49	3.32 y 3.49	3.32 y 3.49	3.32 y 3.49
23-CH	4.05	4.05	4.05	4.05	4.05	4.05	4.05	4.05
24-CH₂	2.33 y 3.09	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	3.08 y 3.49	2.33 y 3.08
H-29	7.87	7.87	7.87	7.87	7.87	7.87	7.87	7.87
H-30 y H-31	7.68	7.68	7.68	7.68	7.68	7.68	7.68	7.68
H-32	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17
otros	-	-	-	-	3.62 (17 α -H)	3.71 (17 β -H)	3.20 (17 α -H)	1.20 (17 α -CH ₃)

5. Análisis de resultados

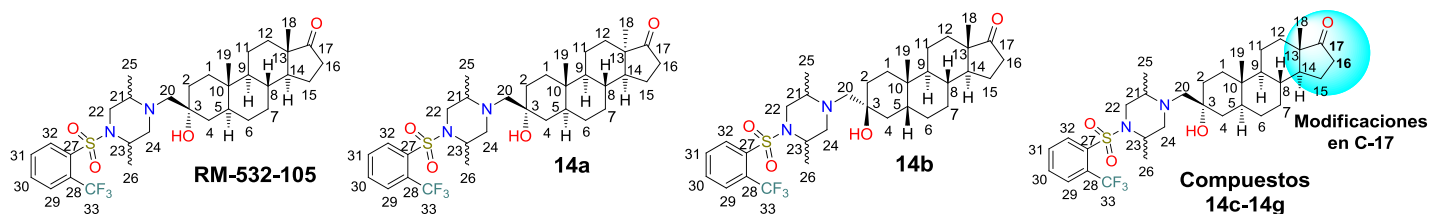
Tabla 27: Desplazamiento químico δ (ppm) de las señales características para los compuestos **14h-14n** en RMN ^1H



	14h	14i	14j	14k	14l	14m	14n
Protón							
18-CH₃	0.82	0.87	0.86	0.93	0.89	0.86	0.67
19-CH₃	0.73	0.73	0.73	0.74	0.74	0.74	0.72
25-CH₃	0.87	0.87	0.87	0.87	0.87	0.87	0.87
26-CH₃	1.18	1.17	1.19	1.18	1.18	1.18	1.18
16α-H	1.94	2.46	1.77	-	-	-	2.45
16β-H	2.26	2.46	1.96	4.35	5.08	-	-
20-CH₂	2.13 y 2.32	2.13 y 2.32	2.14 y 2.32	2.14 y 2.32	2.12 y 2.30	2.12 y 2.30	2.12 y 2.30
21-CH	2.87	2.87	2.87	2.87	2.87	2.87	2.89
22-CH₂	3.32 y 3.49	3.32 y 3.49	3.35 y 3.49	3.35 y 3.49	3.35 y 3.49	3.35 y 3.49	3.35 y 3.39
23-CH	4.05	4.05	4.05	4.05	4.05	4.05	4.05
24-CH₂	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08	2.33 y 3.08
H-29	7.87	7.87	7.87	7.87	7.87	7.87	7.87
H-30 y H-31	7.68	7.68	7.68	7.68	7.68	7.68	7.68
H-32	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17
otros	2.56	8.41	2.59 y 2.89	2.44	-	1.01	2.61 y 3.16
	(17 α -C \equiv CH)	(=NOH)	(Oxirano-CH ₂)	(16 α -OH)		(16 α -CH ₃)	(33-CH ₂)
						1.16	7.09
						(16 β -CH ₃)	(H-35 y H-38)
							8.48
							(H-36 y H-37)

5. Análisis de resultados

Tabla 28: Desplazamiento químico δ (ppm) y asignación de todas las señales para los compuestos **14a-14g** y **RM-532-105** en RMN ^{13}C

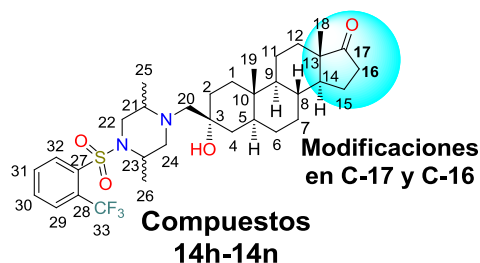


Carbón	RM-532-105 ^a	14a	14b	14c	14d	14e	14f	14g
	-	-	-					
25-CH ₃	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
C-18	15.2	25.8	13.8	13.4	11.2	17.1	11.2	13.9
C-19	13.7	10.9	23.5	11.2	11.9	11.9	8.6	11.0
26-CH ₃	15.7	15.7	15.7	15.7	15.6	15.6	15.7	15.6
C-11	20.2		20.3	19.9	20.5	20.4	20.6	20.5
C-15	21.7		21.8	22.2 ^e	23.3	24.6	23.2	23.3
C-6	28.4		26.4	28.3	28.5	28.6	28.6	26.2
C-16	35.9	33.8	35.9	32.8 ^f	30.5	32.3	27.6	38.9
C-7	30.7		25.7	28.5	31.5	32.3	32.7	31.6
C-2	32.4	32.3	34.4	31.0	32.5	35.5	32.5	32.4
C-1	33.7	33.6	31.6	33.8	33.8	33.9	33.8	33.8
C-10	39.3	35.9	34.9	35.8	35.5	35.8	35.8	35.8
C-8	35.8	37.8	35.2	35.4	35.8	35.7	35.3	35.4
C-12	32.4	32.3	31.7	28.9 ^g	36.7	31.5	38.0	31.6
C-4	39.4	39.4	36.9	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4
C-5	39.5	40.5	38.0	40.9	40.7	40.6	40.7	40.8
C-13	47.8	50.1	47.9	45.3 ^h	42.9	45.3	42.9	45.5
22-CH ₂	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0
23-CH	52.3	49.5	49.5	49.5	49.5	49.5	49.5	49.5
C-14	52.4	50.8	51.5	49.4 ⁱ	50.9	48.7	51.4	50.6
24-CH ₂	52.3	52.4	52.3	49.5	52.4	52.4	52.3	52.4
C-9	-	51.4	40.0	54.3	54.2	53.9	54.2	54.1
21-CH	54.7	54.7	54.6	54.7	54.7	54.7	54.2	54.7
20-CH ₂	65.7	65.7	65.7	65.7	65.8	65.8	65.8	65.8
C-3	70.9	70.3	71.4	70.3	71.0	71.0	70.9	71.0
CF ₃ ^b	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6
C-28 ^c	127.5	127.5	127.5	127.5	127.5	127.5	127.5	127.5
C-29 ^d	128.5	128.5	128.5	128.5	128.5	128.5	128.5	128.5
C-32	131.9	131.9	131.9	131.9	131.9	131.9	131.9	131.9
C-31	132.2	132.2	132.1	132.1	132.1	132.1	132.1	132.1
C-30	132.5	132.5	132.5	132.5	132.5	132.5	132.5	132.5
C-27	139.3	139.3	139.3	139.3	139.3	139.3	139.3	139.3
C-17	221.4	221.4	221.4	132.6 ^k	81.9	80.0	90.8	81.7
Otros	-	-	-	-	-	-	57.8 (OCH ₃)	25.8 (17 α -CH ₃)

^aTomados de la referencia 78; ^b $J_{\text{C-F}} = 274.4$ Hz; ^c $J_{\text{C-F}} = 43.8$ Hz; ^d $J_{\text{C-F}} = 6.4$ Hz; ^e $J_{\text{C-F}} = 6.7$ Hz; ^f $J_{\text{C-F}} = 45.7$ Hz; ^g $J_{\text{C-F}} = 5.3$ Hz; ^h $J_{\text{C-F}} = 20.1$ Hz; ⁱ $J_{\text{C-F}} = 4.7$ Hz; ^k $J_{\text{C-F}} = 259.2$ y 251.1 Hz.

5. Análisis de resultados

Tabla 29: Desplazamiento químico δ (ppm) y asignación de todas las señales para los compuestos **14h-14n** en RMN ^{13}C

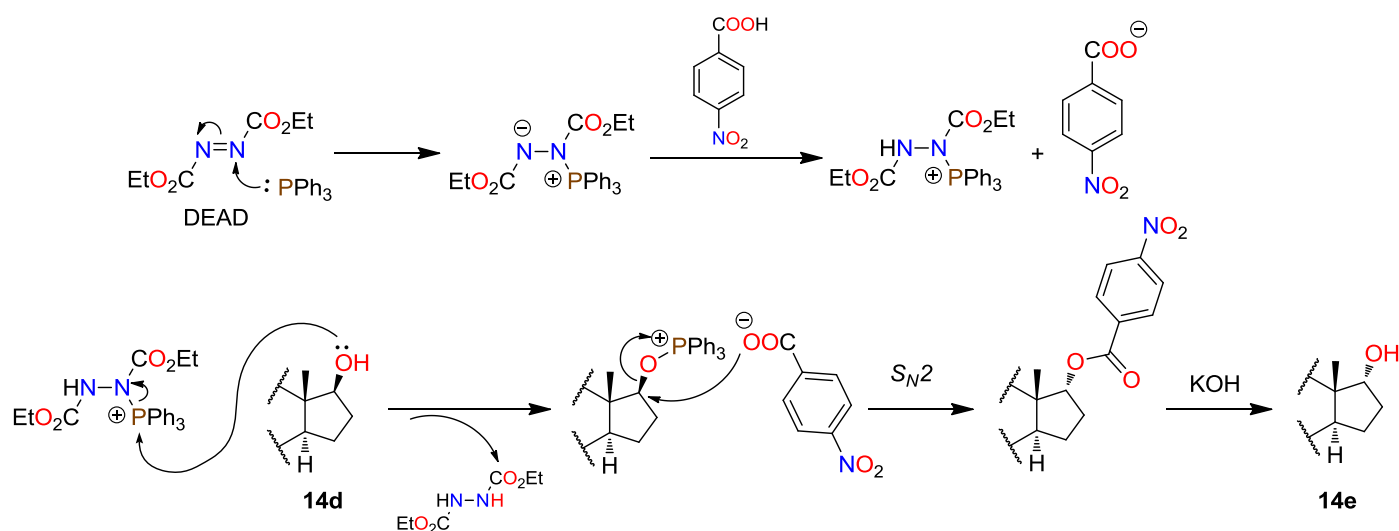


Carbón	14h	14i	14j	14k	14l	14m	14n
25-CH ₃	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
C-18	11.2	17.1	14.4	14.0	14.2	14.4	13.7
C-19	12.8	11.2	11.2	11.2	11.1	11.2	11.1
26-CH ₃	15.7	15.6	15.7	15.6	15.6	15.7	15.6
C-11	20.6	20.4	20.3	20.0	19.7	20.1	20.1
C-15	23.1	23.1	23.5	30.5	28.2 ^d	32.4	28.1
C-6	28.5	28.5	28.6	-	26.5	28.3	28.2
C-16	38.9	24.6	29.0	71.3	90.2 ^e	45.1	50.1
C-7	31.4	31.4	31.4	30.2	31.2	30.9	30.9
C-2	33.2	32.5	32.5	31.8	32.4	32.5	32.4
C-1	33.8	33.6	33.8	33.7	33.6	33.7	33.7
C-10	35.8	35.9	35.6	35.9	35.9	35.9	35.9
C-8	36.1	34.9	35.8	34.9	34.8	34.6	34.4
C-12	32.7	34.0	33.9	31.2	30.4	37.9	31.8
C-4	39.4	39.5	39.4	39.4	39.3	39.3	39.3
C-5	40.6	40.5	40.7	40.6	40.6	40.7	40.6
C-13	46.8	43.9	40.1	47.6	47.8	48.9	48.2
22-CH ₂	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0
23-CH	49.6	49.5	49.5	49.5	49.5	49.5	49.5
C-14	50.4	53.8	52.8	48.2	48.3	48.1	49.8
24-CH ₂	52.4	52.4	52.4	52.4	52.4	52.4	52.3
C-9	53.7	54.2	54.3	54.0	53.9	54.4	54.9
21-CH	54.7	54.7	54.7	54.7	54.7	54.7	54.7
20-CH ₂	65.8	65.7	65.7	65.7	65.7	65.7	65.7
C-3	71.0	71.0	70.9	71.0	70.9	70.9	70.9
CF ₃ ^a	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6
C-28 ^b	127.5	127.5	127.5	127.5	127.5	127.5	127.5
C-29 ^c	128.5	128.5	128.5	128.5	128.5	128.5	128.5
C-32	131.9	131.9	131.9	131.9	131.9	131.9	131.9
C-31	132.1	132.1	132.1	132.1	132.1	132.1	132.1
C-30	132.5	132.5	132.5	132.5	132.5	132.5	132.5
C-27	139.3	139.3	139.3	139.3	139.3	139.3	139.3
C-17	79.9	171.2	70.6	220.0	213.4	225.6	221.4
Otros	73.8	-	53.7	-	-	25.9	36.9 (33-CH ₂)
	(17 α -C \equiv CH)		(oxirano-CH ₂)			(16-CH ₃)	124.3 (C-35 y C-38)
	87.6					27.3	148.9 (C-34)
	(17 α -C \equiv CH)					(16-CH ₃)	149.7 (C-36 y C-37)

^a $J_{\text{C-F}} = 274.4$ Hz; ^b $J_{\text{C-F}} = 43.8$ Hz; ^c $J_{\text{C-F}} = 6.4$ Hz; ^d $J_{\text{C-F}} = 12.1$ Hz; ^e $J_{\text{C-F}} = 186.7$ Hz.

5. Análisis de resultados

El compuesto final **14d** también sirvió de intermediario para preparar los esteroides **14e** y **14f**. Mediante la reacción de Mitsunobu⁸⁷ (Esquema 18), se logró la inversión del hidroxilo en C-17 (**14e**); mientras que para la formación del metoxilo se llevó a cabo una reacción entre **14d** y yoduro de metilo. Para el compuesto **14e**, se hizo reaccionar el precursor **14d** con ácido *p*-nitrobenzoico, trifetilfosfina y azodicarboxilato de dietilo (DEAD, por sus siglas en inglés) en tolueno a 80°C. El primer paso de esta reacción es la adición irreversible de la trifetilfosfina al DEAD para formar el aducto zwitterionico, el cual, abstrae el protón del ácido *p*-nitrobenzoico. El siguiente paso es el ataque del alcohol en C-17 del esteroide hacia el grupo trifetilfosfonio del aducto mencionado anteriormente, activándolo como grupo saliente. Posteriormente, el carboxilato del *p*-nitrobenzoato lleva a cabo la sustitución nucleofílica bimolecular sobre el carbono C-17 por la cara alfa del esteroide. El éster nitrobenzoico obtenido, es hidrolizado inmediatamente al alcohol correspondiente (17 α -OH) en condiciones básicas.



Esquema 18. Mecanismo de reacción de Mitsunobu para la inversión del alcohol en C-17

La inversión del alcohol se confirmó con la ayuda de la espectroscopía de RMN ¹H, ya que se encontró una señal doble ubicada a $\delta_{\text{H}} = 3.71$ ppm con una $J = 5.9$ Hz que se asignó al protón 17 β -H que claramente difiere, tanto en desplazamiento químico como en la constante de acoplamiento del protón 17 α -H de su precursor (**14d**). Adicionalmente, en el experimento NOESY (Figura 19), el protón 17 β -H presenta una interacción, a través del espacio, con los protones del metilo 18-CH₃, lo que es indicativo de que este átomo se encuentra orientado hacia la cara beta del esteroide, mientras que el grupo hidroxilo está orientado hacia la cara alfa confirmando así, la epimerización del alcohol en C-17.

5. Análisis de resultados

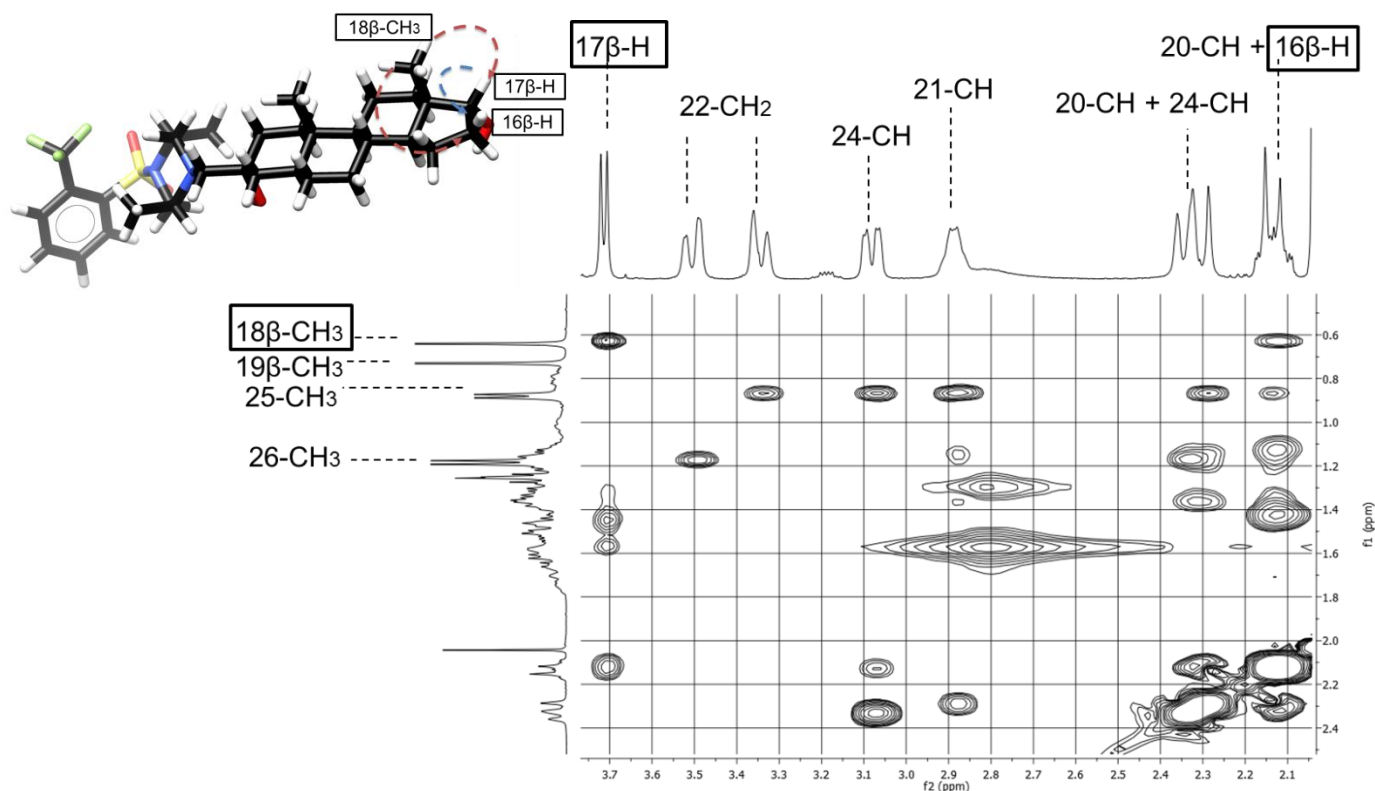


Figura 19. Espectro parcial del compuesto **14e** correspondiente al experimento NOESY

Para la síntesis del análogo **14f**, fue necesario generar el alcóxido en C-17, sobre el compuesto **14d**, y después hacer reaccionar este anión con yoduro de metilo. La presencia del grupo metoxilo se corroboró al observar una señal simple que integra para tres hidrógenos y que tiene un desplazamiento químico de $\delta_{\text{H}} = 3.31$ ppm en la espectroscopia de RMN ^1H , así como una nueva señal en la espectroscopia de RMN ^{13}C con un desplazamiento químico de $\delta_{\text{C}} = 57.81$ ppm, señales que corresponden a los hidrógenos unidos a este grupo (metoxilo) así como el carbono unido al átomo de oxígeno, respectivamente.

La reacción de **RM-532-105** con bromuro de metilmagnesio dio el derivado metilado en C-17 (**14g**). El grupo metilo adicionado en esta posición ($17\alpha\text{-CH}_3$) se identificó en la espectroscopia de RMN ^1H como una señal simple que integra para tres hidrógenos y que está ubicada en $\delta_{\text{H}} = 1.20$ ppm, mientras que en la espectroscopia de RMN ^{13}C se identificó la señal para este grupo con un desplazamiento químico de $\delta_{\text{C}} = 25.8$ ppm. Adicionalmente, el desplazamiento a campo alto del grupo metilo $18\beta\text{-CH}_3$ y la ausencia de la señal correspondiente a la cetona en C-17 indican la presencia del alcohol en esta posición. Finalmente, en el espectro del experimento NOESY no se encontró ninguna interacción, a través del espacio, entre los metilos $17\alpha\text{-CH}_3$ y 18-CH_3 , lo que indica que la adición del metilo en esta reacción se llevó a cabo, predominantemente, por la cara alfa del esteroide.

5. Análisis de resultados

Otra sustitución llevada a cabo en la posición C-17 del compuesto **RM-532-105** fue la etinilación. Para ello, se hizo reaccionar este derivado con trimetilsililacetileno. El compuesto crudo obtenido de esta reacción se trató con carbonato de potasio para remover el grupo trimetilsililo y obtener así el esteroide **14h**. Al igual que en los análogos mencionados anteriormente, fue notoria la ausencia de la señal correspondiente al grupo carbonilo en la posición C-17 en la espectroscopia de RMN ^{13}C y que junto a un claro desplazamiento a campo alto por parte del metilo 18- CH_3 en RMN ^1H y ^{13}C , sugieren la presencia del grupo hidroxilo en esta posición. Además, la presencia de una nueva señal simple que integra para un hidrógeno con un $\delta_{\text{H}} = 2.56$ ppm, encontrada en el espectro de RMN ^1H , aunado a la presencia de dos nuevas señales en la espectroscopia de RMN ^{13}C con desplazamientos químicos de 73.8 y 87.6 ppm, respectivamente, confirman la presencia del grupo etino en C-17 ($17\alpha\text{-C}\equiv\text{CH}$). De igual forma que el compuesto **14g**, en el experimento NOESY no existe interacción alguna entre el metilo 18- CH_3 y el nuevo sustituyente. Lo que indica que la etinilación, al igual que la metilación, se llevó a cabo por la cara alfa del esqueleto esteroideal.

Por otra parte, el tratamiento de **RM-532-105** con clorhidrato de hidroxilamina y acetato de sodio en etanol a 65°C generó la oxíma en C-17 (compuesto **14i**). La presencia de este grupo se confirmó al encontrar una señal simple ancha con un desplazamiento químico de 8.41 ppm en la espectroscopia de RMN ^1H y que fue asignada al protón ácido de la oxíma ($=\text{NOH}$); mientras que en la espectroscopia de RMN ^{13}C se observó un desplazamiento a campo alto que corresponde al carbono C-17, pasando de 221.4 ppm en el compuesto **RM-532-105** hasta 171.2 ppm en el derivado **14i**.

El análogo **14j** fue preparado mediante la epoxidación de Corey-Chaykovsky sobre la cetona en la posición C-17 del compuesto **RM-532-105**. El metileno del anillo de oxirano generado aparece como dos señales dobles con un $\delta_{\text{H}} = 2.59$ y 2.89 ppm y una constante de acoplamiento de 5.1 Hz para cada una; mientras que el carbono correspondiente a este grupo se ubica en 53.7 ppm, en el espectro de RMN ^{13}C . Por otra parte, la señal del carbono de la cetona en C-17 desaparece, dando lugar a una nueva señal con un $\delta_{\text{C}} = 70.6$ ppm. En el experimento NOESY no existe interacción, a través del espacio, entre los hidrógenos del metileno del anillo de oxirano y los hidrógenos correspondientes al metilo 18- CH_3 , lo que sugiere que la adición del metileno hacia la cetona en el carbono C-17 fue llevada a cabo por la cara alfa del esteroide.

Los derivados **14k-14n** preparados, son también análogos del compuesto **RM-532-105**. A diferencia de los compuestos mencionados anteriormente, éstos contienen diferentes modificaciones en la posición C-16. El compuesto **14k**, que posee un grupo hidroxilo en esta posición, fue preparado en dos pasos: el primero fue la bromación en C-16 con bromuro de cobre II. El crudo de reacción resultante se trató con hidróxido de sodio. El producto mayoritario de esta reacción se purificó por medio de HPLC. En la

5. Análisis de resultados

espectroscopia de RMN ^1H se observó, inicialmente, la aparición de una nueva señal simple ancha con un desplazamiento químico de 2.44 ppm y que fue asignada al grupo hidroxilo (16-OH). La desaparición de una señal múltiple a $\delta_{\text{H}} = 2.50$ ppm, que es característica del protón $16\beta\text{-H}$, en el producto sintetizado se ubicó como una señal doble con un $\delta_{\text{H}} = 4.35$ ppm y una $J = 6.6$ Hz. Para determinar la orientación de este protón se utilizó el espectro del experimento NOESY para este compuesto (Figura 20); en él se observó una clara interacción, a través del espacio, entre el protón $16\beta\text{-H}$ y los protones del metilo 18-CH_3 . Esto confirma la orientación hacia la cara beta de este átomo y por tanto, indica que el grupo hidroxilo en C-16 se encuentra orientado hacia la cara alfa del esteroide ($16\alpha\text{-OH}$).

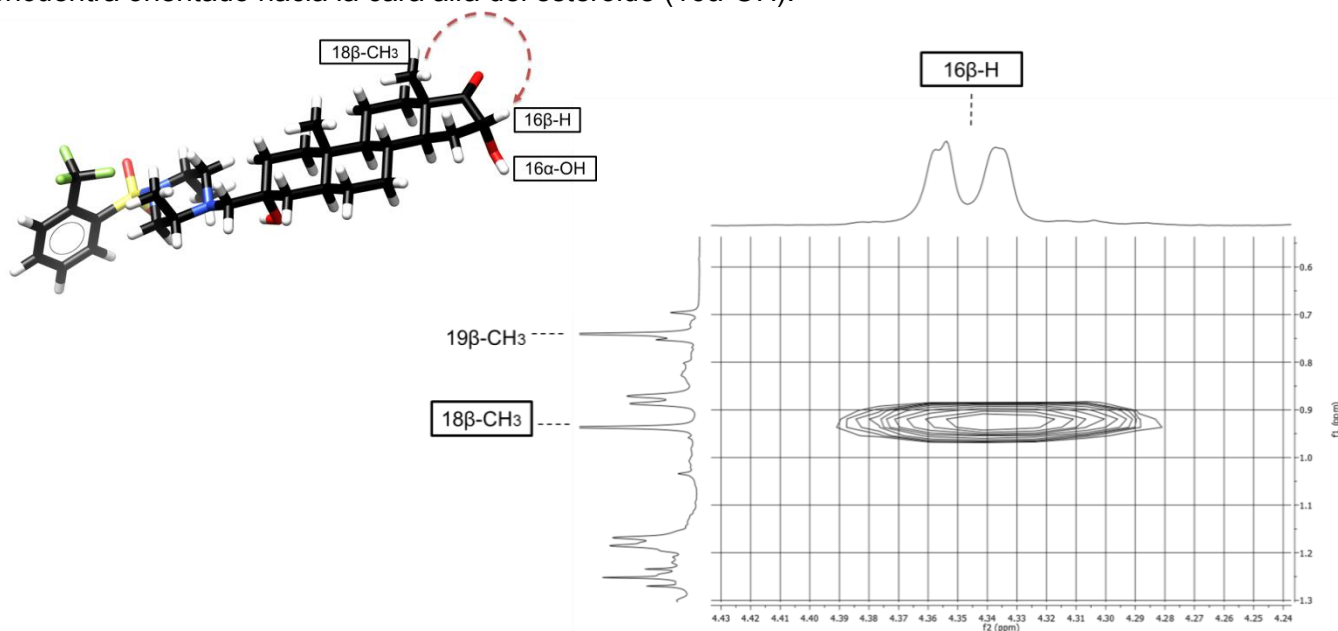
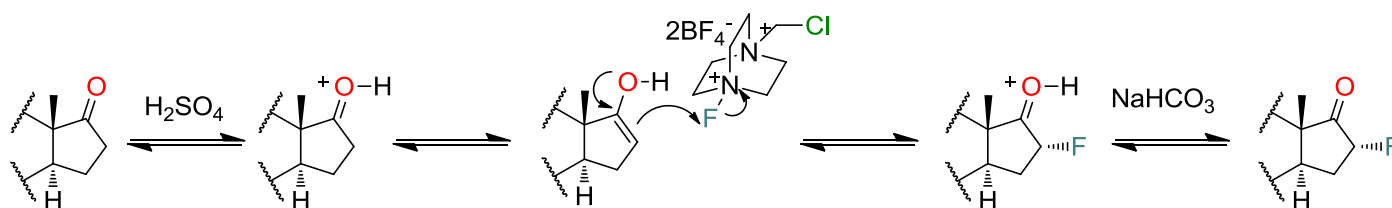


Figura 20: Espectro parcial del compuesto **14k** correspondiente al experimento NOESY

La adición electrofílica del átomo de flúor en la posición C-16 de **RM-532-105** (Esquema 29), se llevó a cabo al tratar este compuesto con SelectfluorTM para dar así el análogo **14I**. Esta reacción está catalizada por ácido sulfúrico para la formación del enol.⁹⁴ El rendimiento obtenido fue del 14%.



Esquema 29. Mecanismo de reacción de fluoración en la posición C-17

5. Análisis de resultados

La presencia del átomo de flúor en la posición en cuestión se observó en la espectroscopia de RMN ^1H , en donde, de forma similar al derivado **14k**, la señal correspondiente al protón $16\beta\text{-H}$ se desplaza a campo bajo hasta $\delta_{\text{H}} = 5.08$ ppm y además se desdobra como dos señales dobles con una constante de acoplamiento de 50.7 y 17.4 Hz. La primer constante es característica del acoplamiento geminal hidrógeno-flúor, mientras que la segunda constante corresponde al acoplamiento hidrógeno-hidrógeno. Asimismo, en la espectroscopia de RMN ^{13}C se observó un claro desplazamiento, a campo bajo, de la señal que corresponde a C-16, la cual, se encuentra a 35.9 ppm en el compuesto de partida (**RM-532-105**), mientras que en el análogo sintetizado se ubicó a 90.2 ppm. Adicionalmente, esta señal presenta una constante de acoplamiento de 186.7 Hz, lo cual es un claro indicativo de la presencia del átomo en cuestión en la posición C-16 del esqueleto esteroide. En cuanto a la orientación en el espacio de este elemento, ésta fue confirmada al analizar el espectro del experimento NOESY (Figura 21). Al igual que en el análogo **14k**, se observó también una clara interacción en el espacio entre el protón $16\beta\text{-H}$ y la señal correspondiente al metilo 18-CH_3 , por tanto, la orientación del átomo de flúor en la posición C-17 es por la cara alfa del esteroide.

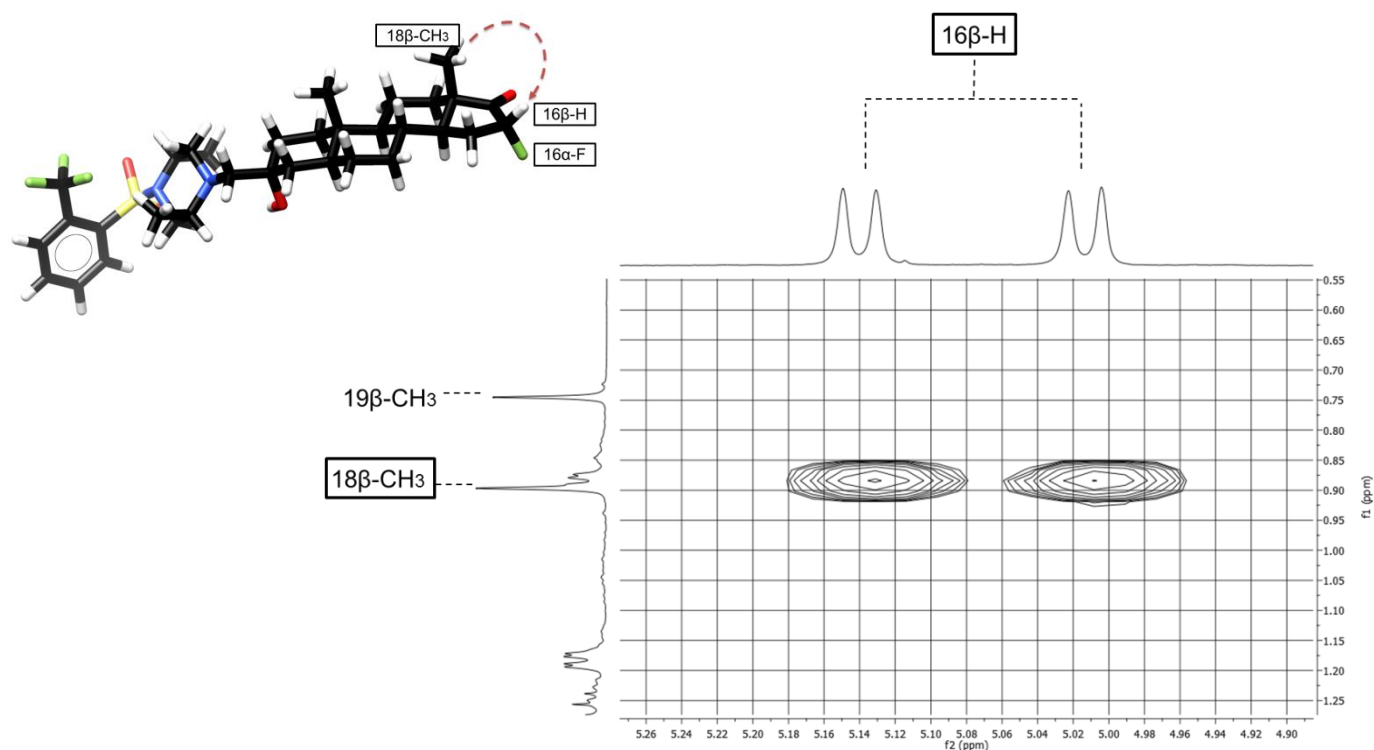


Figura 21. Espectro parcial del compuesto **14l** correspondiente al experimento NOESY

El análogo **14m**, el cual posee dos grupos metilo unidos a la posición C-16, fue sintetizado al generar, en primera instancia, el anión en esta posición con hidruro de sodio y después dar tratamiento con yoduro de metilo. Los metilos geminales fueron identificados claramente en la espectroscopia de RMN

5. Análisis de resultados

^1H como dos señales simples con desplazamientos químicos de 1.01 y 1.16 ppm; mientras que en la espectroscopia de RMN ^{13}C las señales de estos dos grupos se ubicaron a 25.9 y 27.3 ppm.

Finalmente, para la síntesis del compuesto **14n** (el cual contiene la 4-metilenpiridina o 4-picolina en la posición C-16), fue necesario realizar tres pasos de reacción a partir del esteroide **RM-532-105**. La primera reacción consistió en llevar a cabo una la condensación aldólica con 4-piridincarboxaldehído en presencia de hidróxido de potasio para dar el intermediario **15**. La presencia del anillo heterocíclico de piridina fue identificada claramente en el espectro de RMN ^1H como dos señales dobles con un $\delta_{\text{H}} = 7.35$ y 8.46 ppm, ambas con constantes de acoplamiento de 6.0 Hz. La primera señal se asignó a los hidrógenos unidos a las posiciones 3 y 5 del anillo de piridina, mientras que la segunda corresponde a las posiciones 2 y 6. Por otro lado, en el mismo espectro, se encontró una señal doble ubicada a 7.30 ppm que integra para un solo hidrógeno y que fue asignada al protón vinílico del alqueno formado.

En este punto, hubiera sido convenientemente realizar la hidrogenación catalítica para obtener directamente el compuesto **14n**. Sin embargo, de acuerdo a estudios previos⁹⁵ y experiencia generada en el laboratorio, se sabe que esta reacción promovería la formación de la mezcla de estereoisómeros (16 α / β -(4-metilenpiridina)). Por esta razón, fue necesario reducir el carbonilo en C-17 para **17** al carbinol correspondiente (17 β -OH, compuesto **18**), con la finalidad de que durante la hidrogenación catalítica en el paso posterior, la adición del hidruro se lleve a cabo por la cara α del esteroide. Lo que conlleva a la formación preferencial de la 16 β -(4-metilenpiridina) sobre 16 α -(4-metilenpiridina).

En el espectro de RMN ^1H para el intermediario **18**, se observó un claro desplazamiento del protón vinílico, mencionado anteriormente, desde $\delta_{\text{H}} = 7.30$ ppm, en el precursor **17**, hasta $\delta_{\text{H}} = 6.45$ ppm, en el compuesto **18**. Asimismo, se pudo apreciar el desplazamiento químico hacia campo alto por parte de los protones de las posiciones 3 y 5 del anillo de piridina hasta 7.21 ppm; así como de las posiciones 2 y 6 con un nuevo desplazamiento químico de 8.49 ppm.

Una vez obtenido el intermediario **18**, se llevó a cabo una reducción catalítica con Pd/C sobre el alqueno en la posición C-16 de este esteroide para la obtención del intermediario **19**. En el espectro de RMN ^1H para este compuesto, se pudo apreciar la desaparición del protón vinílico, ubicado a $\delta_{\text{H}} = 7.30$ ppm, así como el desplazamiento hacia campo alto por parte de los hidrógenos del anillo de piridina.

Por último, se realizó la oxidación del carbinol en C-17. Para ello, el intermediario **19** se hizo reaccionar con el reactivo de Dess-Martin, para generar la cetona en C-17, y así obtener el esteroide **14n** como producto final. Con ayuda de los diferentes experimentos de RMN en 2D se pudo encontrar y asignar la señal correspondiente al metileno de la 4-metilenpiridina unida al carbono C-16. Los protones diastereotópicos de esta señal aparecen como dos señales dobles de dobles: una de ellas tiene un

5. Análisis de resultados

desplazamiento químico de 2.61 ppm con una $J= 13.7$ y 9.9 Hz; mientras que la otra señal se ubica a 3.16 ppm con una $J= 13.7$ y 4.1 Hz. El carbono que sostiene ambos protones se identificó en la RMN ^{13}C con un $\delta_{\text{C}}= 36.9$ ppm. La presencia de la cetona en C-17 se confirmó debido a la señal con un desplazamiento químico de 221.4 ppm. Utilizando esta misma espectroscopia, se identificaron a los 5 carbonos del anillo de piridina. Éstos presentaron un desplazamiento químico de 124.3 ppm para los carbonos de las posiciones 3 y 5; 148.6 ppm para el carbono de la posición 4 y, finalmente, 149.7 ppm para los carbonos simétricos 2 y 6. Respecto a la orientación en el espacio del sustituyente en C-16, el experimento NOESY (Figura 22) reveló interacciones entre los protones del metileno unido a C-16 y el metilo $18\beta\text{-CH}_3$; así como interacciones entre ese mismo metilo y la señal correspondiente a los protones de las posiciones 2 y 6 del anillo de piridina (H-35 y H-38), por lo que se infiere que la 4-metilenpiridina está unida por la cara beta del esteroide **14n**. El rendimiento global para la síntesis de este derivado a partir del compuesto RM-532-105 fue del 28%.

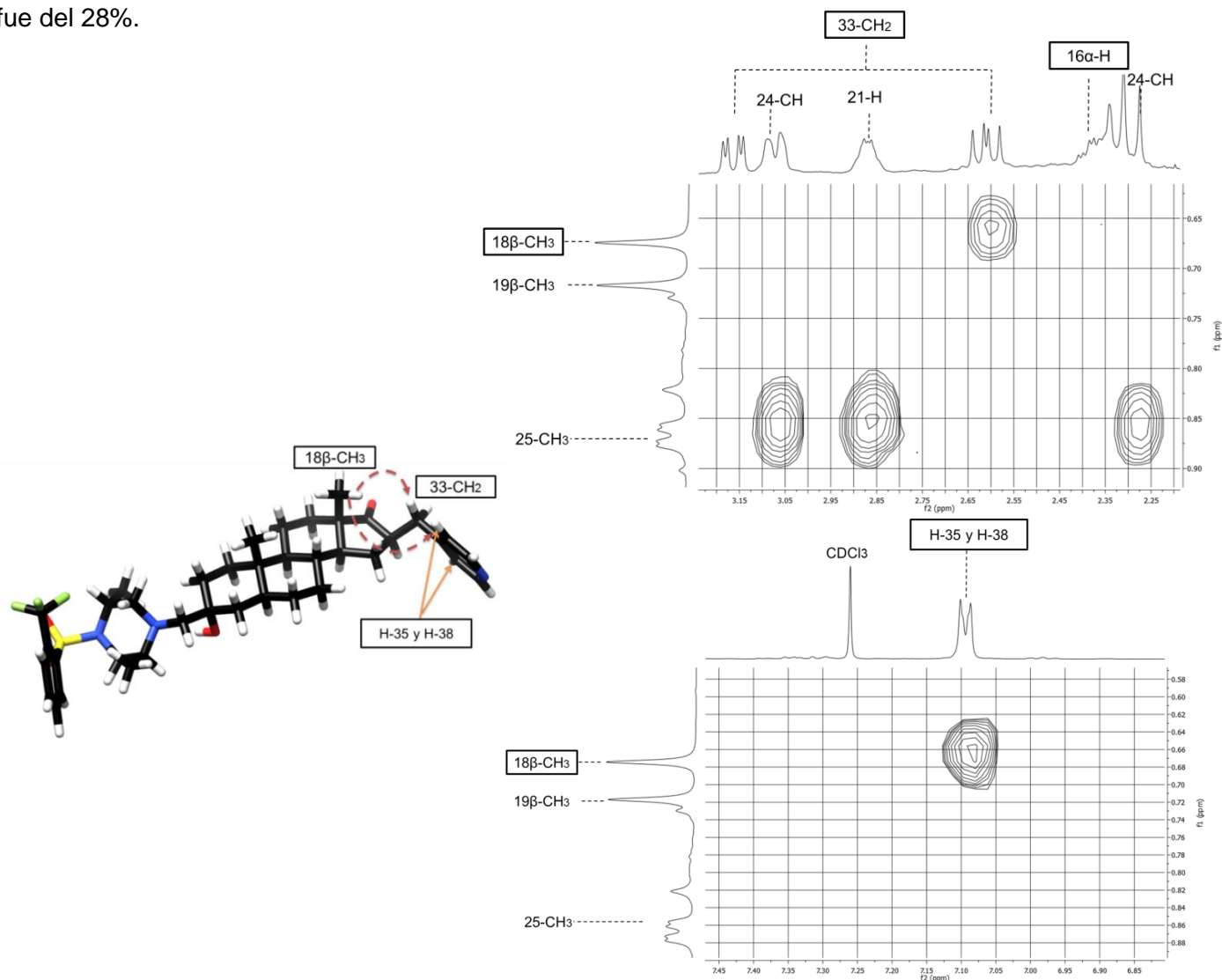


Figura 22: Espectro parcial del compuesto **14l** correspondiente al experimento NOESY

5. Análisis de resultados

5.2.2 Parte biológica

5.2.2.1 Inhibición de la actividad catalítica de la enzima 17 β -HSD3

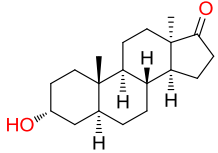
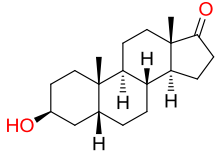
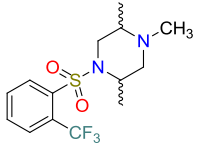
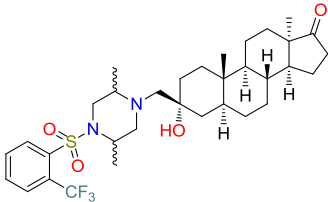
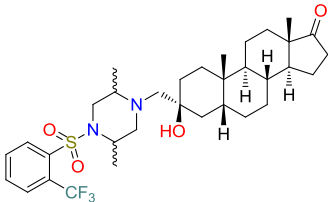
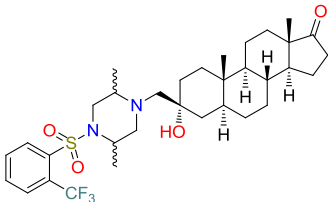
La siguiente etapa de este proyecto, fue evaluar la capacidad de los compuestos sintetizados para inhibir la actividad catalítica de la enzima 17 β -HSD3. En este ensayo, se midió la cantidad de testosterona marcada (T[¹⁴C]), producida a partir de la 4-androstendiona marcada (4-diona[¹⁴C]), en presencia de los derivados preparados.

Inicialmente, se evaluó el efecto de las modificaciones en la estereoquímica sobre el compuesto RM-532-105. Sin embargo, también se estudió el efecto por separado de los esteroides **13 α ,5 α -epiADT** y **5 β -epiADT**, los cuales, representan el esqueleto de los compuestos finales **14a** y **14b**, respectivamente; así como el compuesto **16**, que es el grupo que emula la cadena lateral en la posición C-3 de estos compuestos finales. Como se ilustra en la Tabla 30, los esteroides **13 α ,5 α -epiADT** y **5 β -epiADT** no poseen actividad inhibitoria al igual que el compuesto **16**. Por lo tanto, es evidente que la actividad anti-17 β -HSD3 depende de la unión de ambas entidades químicas.

Por otro lado, al comparar la actividad inhibitoria de los análogos **14a** y **14b** con **RM-532-105**, se observó que el derivado **14a** (CI₅₀= 1.09 μ M) es aproximadamente diez veces menos potente que el compuesto líder; mientras que el derivado **14b** (CI₅₀ = 0.11 μ M) es equipotente a éste. Basado en estos resultados, es claro que la inversión de la orientación del metilo 18-CH₃ y por tanto, el cambio en la conformación del anillo D en el espacio, por parte del esteroide **14a**, tiene un gran impacto en la actividad biológica; mientras que el cambio de la conformación, en el espacio, del anillo A, por parte del esteroide **14b**, no es significativa. Una posible explicación a este efecto se puede deber a que la cetona, en la posición C-17, puede llevar a cabo interacciones clave en el sitio receptor de la enzima, tales como puentes de hidrógeno. Por lo tanto, cuando se modifica la conformación del anillo D este tipo de interacciones son menos eficientes, lo que se ve reflejado en una baja actividad inhibitoria.

5. Análisis de resultados

Tabla 30: Influencia de los cambios en la estereoquímica del compuesto líder **RM-532-105** sobre la actividad inhibitoria de la enzima 17 β -HSD3

Compuesto	Estructura	17 β -HSD3 CI_{50} (μ M)
<i>Primer ensayo: tiempo de incubación = 1.5 h</i>		
13 α ,5 α -epiADT		>5
5 β -epiADT		>5
16		>5
14a		1.09
14b		0.15
RM-532-105		0.11

La Tabla 31 ilustra los resultados de la inhibición de la enzima 17 β -HSD3 por parte de los análogos del compuesto RM-532-105 con diferentes modificaciones sobre las posiciones C-17 y C-16. Los resultados obtenidos de este ensayo revelan que pequeños cambios sobre el anillo D del compuesto líder tienen un gran impacto sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el cambio de la cetona en C-17 por dos átomos de flúor (compuesto **14c**) en esta posición abole la actividad, mientras que la reducción de este

5. Análisis de resultados

grupo al alcohol correspondiente con orientación beta (compuesto **14d**) disminuye aproximadamente tres veces la potencia de este análogo en comparación con el compuesto líder. Es importante mencionar que el compuesto **14d** y **14k** fueron identificados como los principales metabolitos del esteroide RM-532-105 en previos estudios. Mientras **14d** posee un tercio de la potencia del compuesto líder, el análogo **14k** carece de actividad inhibitoria sobre la enzima en estudio. Por tanto, estos resultados explican de manera lógica del porqué en estudios *in vivo* el compuesto **RM-532-10** tuvo una baja eficacia.

Por otro lado, el efecto de la inversión del hidroxilo en C-17 de la cara beta a la cara alfa del esteroide fue negativo (compuesto **14e**), lo que resulta interesante, ya que este derivado es el epímero del compuesto **14d**, el cual, si posee actividad inhibitoria. La O-metilación de este último (compuesto **14f**) lo vuelve inactivo a las concentraciones evaluadas.

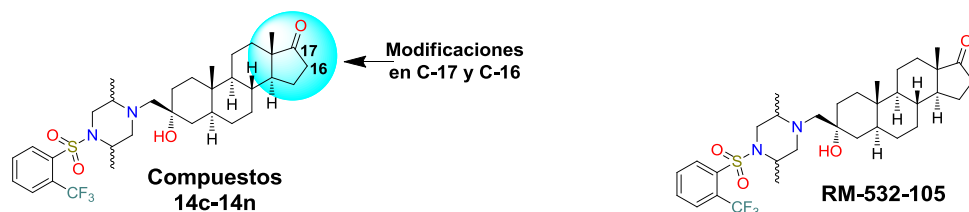
Otro dato interesante de este estudio fue que tanto la metilación como la etilación en la posición C-17 (compuestos **14g** y **14h**, respectivamente) resultó en la perdida de la actividad biológica. De igual forma, la epoxidación de la cetona en esta posición (compuesto **14j**) resultó también en un nulo efecto inhibitorio, mientras que el remplazo bioisotérico de la cetona por la oxima redujo casi cuatro veces la potencia del compuesto **14i** en comparación con **RM-532-105**. Al parecer, la actividad inhibitoria sobre la enzima 17 β -HSD3 es sensible a cualquier cambio estructural que involucre la presencia de sustituyentes en la posición C-17 con orientación hacia la cara alfa del compuesto **RM-532-105**.

Respecto a las diferentes modificaciones realizadas en la posición C-16 del compuesto líder, como ya se había mencionado anteriormente, el análogo hidroxilado en esta posición resultó inactivo (compuesto **14k**). Sin embargo, el reemplazo bioisotérico del grupo hidroxilo por el átomo de flúor (compuesto **14l**) resultó en un compuesto que si inhibe a la enzima en estudio a las concentraciones analizadas (**14l**: $CI_{50} = 0.20 \mu M$). Por otro lado, el derivado dimetilado **14m** resultó inactivo; mientras que el análogo con la 4-metilenpiridina unida a C-16 por la cara beta (**14n**), fue el más potente de toda la serie de compuestos sintetizados. La potencia de este compuesto es sólo dos veces menor a la del compuesto líder.

Con los datos expuestos anteriormente, es evidente que los cambios en la posición C-16 son más tolerables que los realizados sobre el carbono C-17. También es claro que la cetona en ésta posición tiene un papel importante en la unión con la enzima 17 β -HSD3 ya que cualquier cambio disminuye sensiblemente la actividad inhibitoria. En cuanto a las modificaciones en el carbono C-16, al parecer sólo grupos pequeños incorporados por la cara alfa del esteroide son tolerados; mientras que la sustitución por la cara beta parece ser menos sensible a estos cambios. Sin embargo, es necesario ampliar la biblioteca de compuestos para corroborar dichas observaciones.

5. Análisis de resultados

Tabla 31. Actividad inhibitoria de los compuestos **14c-14n** sobre la enzima 17β -HSD3: influencia de las modificaciones en las posiciones C-16 y C-17 del compuesto **RM-532-105**



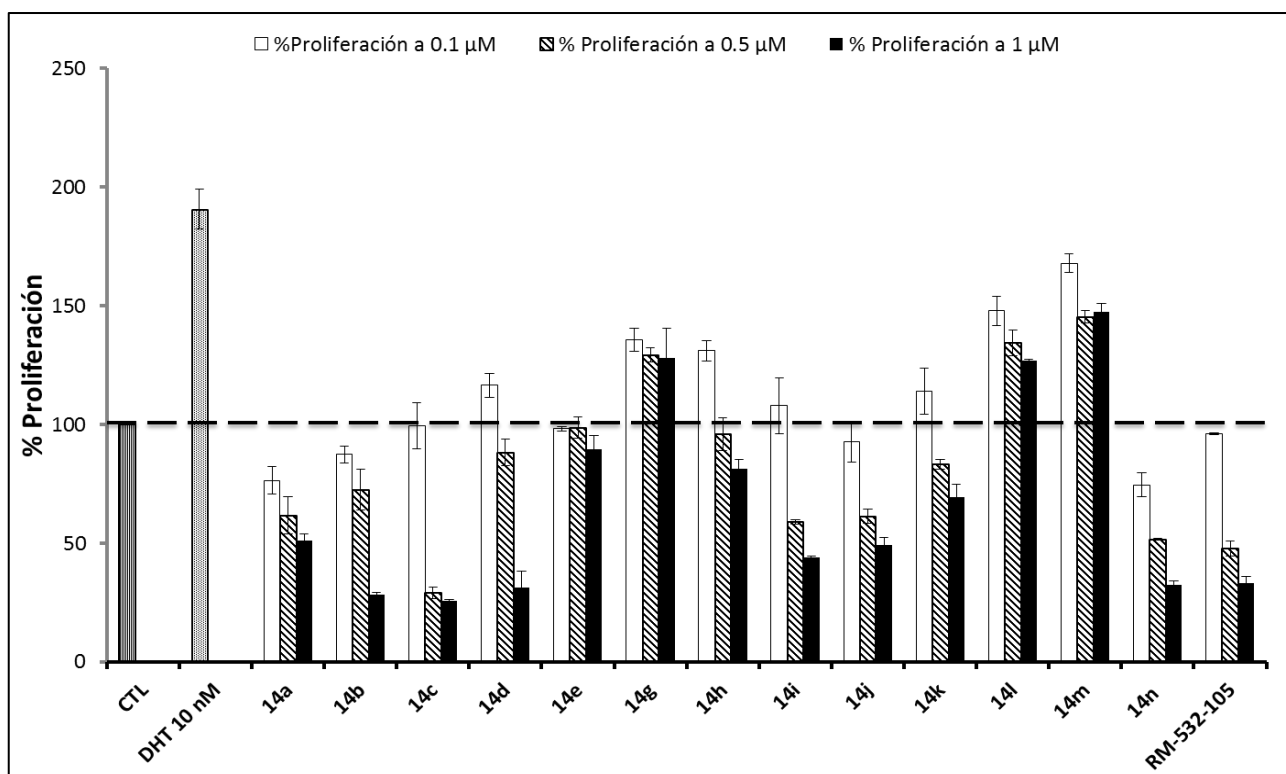
Compuesto	Estructura	17β -HSD3 CI_{50} (μ M)
<i>Segundo ensayo: tiempo de incubación = 1 h</i>		
14c		>5
14d		0.19
14e		>5
14f		>5
14g		>5
14h		>5
14i		0.22
14j		>5
14k		>5
14l		0.20
14m		>5
14n		0.13
RM-532-105	-	0.06

5. Análisis de resultados

5.2.2.2 Efecto proliferativo de los análogos de RM-532-105 en la línea celular LAPC-4

La siguiente fase de este proyecto, fue evaluar la actividad androgénica de los compuestos, previamente evaluados sobre la enzima 17 β -HSD3 (excepto el compuesto **14f**). El modelo utilizado en este estudio fue la actividad proliferativa de los nuevos esteroides sobre la línea celular LAPC-4, la cual, pertenece a una línea de cáncer prostático andrógeno sensible, lo que significa que el crecimiento y la división de estas células se incrementa en presencia de andrógenos, tales como la DHT. En este sentido, si alguno de los análogos sintetizados incrementa la proliferación de las células LAPC-4 queda entonces descartado de estudios posteriores, ya que la actividad androgénica resulta ser un efecto indeseable en el contexto del desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento del cáncer de próstata.

La Gráfica 3 ilustra el porcentaje de proliferación por parte de la DHT y los análogos del compuesto **RM-532-105**. El grupo control (CTL) se ajustó al 100% y corresponde a las células que no fueron tratadas con alguno de los esteroides. Por otra parte, el control positivo corresponde a las células LAPC-4 que recibieron tratamiento con DHT a una concentración de 10 nM. Finalmente, los compuestos sintetizados, así como **RM-532-105** fueron evaluados a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 μ M.



Gráfica 3: Efecto proliferativo (androgénico) de los derivados RM-532-105 sobre la línea celular LAPC-4. La dihidrotestosterona (DHT) fue utilizada como control positivo

5. Análisis de resultados

Como se observa en la gráfica mencionada, el tratamiento de las células cancerosas con DHT incrementa de 100% a 190% la proliferación de las mismas. Por el contrario, el compuesto **RM-532-105** no presentó un incremento en la proliferación a una concentración de 0.1 μM . Sin embargo, éste exhibe un perfil citotóxico a concentraciones mayores, ya que el porcentaje de proliferación es menor al del grupo CTL. En cuanto a los nuevos compuestos, varios de ellos presentaron un porcentaje mayor al 100% a una concentración de 0.1 μM . En este sentido, los análogos **14d**, **14g**, **14h**, **14k**, **14l**, y **14m**, que contienen los grupos $17\beta\text{-OH}$; $17\beta\text{-OH}$ y $17\alpha\text{-CH}_3$; $17\beta\text{-OH}$ y $17\alpha\text{-C}\equiv\text{CH}$; $16\alpha\text{-OH}$; $16\alpha\text{-F}$ y $16\text{-(CH}_3)_2$, respectivamente, son los que tienen un perfil androgénico. En este punto, es importante resaltar que los compuestos **14d** y **14k**, además de ser los principales metabolitos de **RM-532-105** (con baja actividad anti- $17\beta\text{-HSD3}$), también poseen una característica indeseable que es la de tener un perfil androgénico.

En cuanto a los compuestos que no exhiben un incremento en la proliferación de las células LAPC-4, a una concentración de 0.1 μM , se encuentran **14a**, **14b**, **14c**, **14e**, **14i**, **14j** y **14n**, los cuales representan a los derivados $18\alpha\text{-CH}_3$, $5\beta\text{-H}$; 17-difluoro, $17\alpha\text{-OH}$, 17-oxima, 17-epoxido y $16\beta\text{-picolilo}$, respectivamente. Como se puede observar, la inversión de la configuración, en el espacio, del metilo 18-CH_3 en el compuesto **14a**, así como el anillo A en el compuesto **14b**, no tienen un impacto significativo en la androgenicidad cuando se les compara con el compuesto **RM-532-105**. No obstante, ambos derivados poseen un perfil citotóxico en donde **14a** es el que presentó este efecto en una forma más pronunciada. Aunque **14c**, **14e** y **14j** tampoco exhibieron un perfil androgénico, hay que recordar que estos tres derivados no poseen actividad inhibitoria contra la enzima $17\beta\text{-HSD3}$. Sin embargo, el reemplazo bioisostérico de la cetona por la oxima (compuesto **14i**), además de retener la actividad anti- $17\beta\text{-HSD3}$, también mantiene un perfil que no es androgénico cuando se compara con **RM-532-105**. De manera interesante, el compuesto **14n**, el cual mostró la mejor potencia contra $17\beta\text{-HSD3}$, resultó tener también, nulo efecto proliferativo sobre las células LAPC-4. Por el contrario, este análogo exhibió un efecto citotóxico sobre esta línea celular, lo que representa una ventaja importante para el tratamiento del cáncer de próstata.

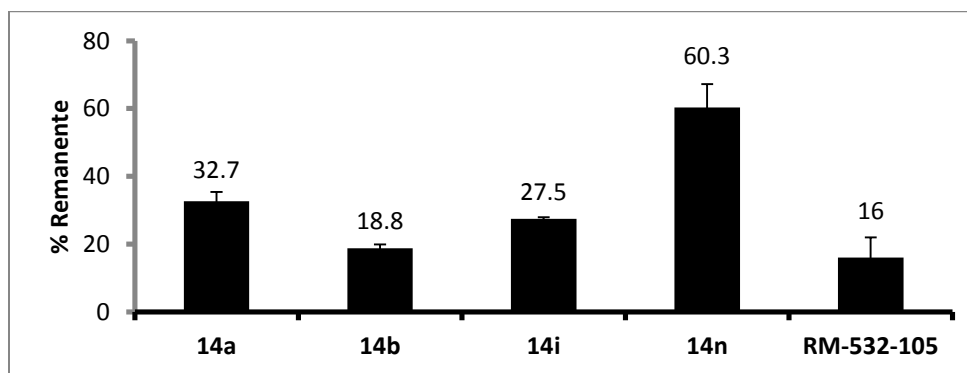
De este estudio, se puede resumir que todas las modificaciones en la posición C-17 que conlleven a la formación del grupo hidroxilo por la cara beta ($17\beta\text{-OH}$) promueven la proliferación de las células cancerosas LAPC-4. También, es evidente que la presencia de grupos lipofílicos en C-16, como en el caso de los compuestos **14l** y **14m**, los cuales poseen un átomo de flúor y un grupo dimetilo, respectivamente, en esta posición amplían, de manera significativa, el potencial proliferativo en estas células. De hecho, ambos compuestos son los que presentaron el mayor perfil androgénico incrementando la proliferación de las células LAPC-4 en aproximadamente 50% y 70%, respectivamente.

5. Análisis de resultados

5.2.2.3 Estabilidad metabólica de los análogos de RM-532-105

El último ensayo biológico realizado durante este proyecto fue la determinación de la estabilidad metabólica de los análogos de **RM-532-105**. Este ensayo consiste en someter a los compuestos en condiciones que simulan el proceso metabólico en el hígado, específicamente el metabolismo de Fase 1. Para ello, los nuevos derivados, así como el compuesto RM-532-105, se incubaron a una concentración de 10 μM en presencia de microsomas de hígado de humano y después se analizó la cantidad remanente de cada compuesto (expresada como %Remanente) mediante HPLC-MS.

Como se ilustra en la Gráfica 4, el porcentaje remanente del compuesto RM-532-105 es del 16%, es decir, este esteroide sufre un amplio metabolismo. Todos los demás compuestos presentaron una estabilidad metabólica mayor. En este sentido, el cambio en la estereoquímica de los compuestos **14a** y **14b** tuvo un impacto significativo, ya que la inversión del metilo 18- CH_3 desde la cara beta a la cara alfa incrementó al doble la estabilidad metabólica del epímero **14a** (32.7%) cuando éste se compara con **RM-532-105** (16%); no así la inversión del protón 5 α -H, ya que el compuesto **14b** sólo presentó un 18.8% de remanente. Por otro lado, el reemplazo bioisostérico de la oxima por la cetona en C-17 (compuesto **14i**), incrementó casi al doble la estabilidad de este análogo. Finalmente, el esteroide **14n** fue el que presentó la mejor estabilidad metabólica con un 60.3% de remanente. Al parecer, la inserción de la 4-picolina en C-16 es útil para bloquear la incorporación del grupo hidroxilo, en esta posición, por parte de la gran variedad de enzimas presentes en los microsomas de hígado de humano.



Gráfica 4: Estabilidad metabólica de los análogos de RM-532-105. Los resultados son expresados como el % del compuesto remanente evaluado tratado con una preparación de microsomas de hígado de humano

Con los resultados de los tres ensayos, es claro que, aunque **RM-532-105** tenga una potencia dos veces mayor a **14n**, sobre la enzima 17 β -HSD3, este último posee un mejor perfil androgénico y citotóxico sobre las células LAPC-4, así como un mejor perfil metabólico. Lo que hace al análogo **14n** un nuevo compuesto líder que es considerado, actualmente, para ser evaluado en estudios *in vivo*.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

- Se logró la síntesis de 21 nuevos derivados de 17 β -*N*-arilcarbamoilandro-4-en-3-ona a partir de la 3 β -hidroxipregnenolona. Estos compuestos fueron preparados en cinco pasos de reacción con rendimientos globales de entre el 52% y 13%.
- Los nuevos derivados de 17 β -*N*-arilcarbamoilandro-4-en-3-ona fueron evaluados en diferentes ensayos biológicos, *in vitro* e *in vivo*. En el primer ensayo se determinó la actividad inhibitoria de estos derivados sobre las enzimas 5 α R1 y 5 α R2, en donde se observó que este tipo de moléculas presentan selectividad hacia la segunda isoforma de esta enzima. En este sentido, los compuestos **6e** y **6h** fueron 75 y 50 veces más potentes, respectivamente, que el fármaco de referencia finasterida.
- Por otro lado, se evaluó la actividad antiproliferativa de estos compuestos en diferentes líneas celulares cancerosas y sanas. De los resultados obtenidos, se observó que los compuestos **6k** y **6m** son capaces de reducir la actividad proliferativa de células cancerosas de próstata en mayor medida que los fármacos finasterida, flutamida y ketoconazol. Esta actividad no parece estar relacionada con una ruta metabólica relacionada a la estereoidogénesis, ya que ambos compuestos actúan de forma similar en células andrógeno-sensibles e insensibles. Adicionalmente, ambos esteroides no tuvieron un impacto significativo en la proliferación de células sanas, lo que los hace candidatos interesantes para estudios posteriores.
- Respecto a la actividad biológica *in vivo*, sólo el compuesto **6e** presentó una disminución del peso de la próstata de hámster similar al fármaco de referencia finasterida.
- En cuanto a la síntesis de análogos del compuesto líder RM-532-105, se logró la preparación de 13 compuestos, teniendo éstos diferentes modificaciones en las posiciones C-16 y C-17, principalmente. También se llevó a cabo la síntesis de dos epímeros de este esteroide mediante la modificación de las posiciones C-13 y C-5.
- Los compuestos resultantes de las modificaciones sistemáticas sobre RM-532-105 fueron evaluados en tres ensayos biológicos diferentes: inhibición de la enzima 17 β -HSD3, actividad androgénica sobre células LAPC-4 y estabilidad metabólica en hepatocitos de humano. Los resultados de estos experimentos mostraron que las modificaciones en el anillo A del esqueleto esteroidal son más toleradas que sobre el anillo D para la actividad anti-17 β -HSD3, en especial, las modificaciones en C-17 son las tienen un mayor impacto negativo. Sin embargo, los cambios estructurales sobre el anillo D incrementan la estabilidad metabólica. En este sentido, el compuesto **14n**, el cual posee un grupo 4-picolilo en C-16, mostró una potencia dos veces menor a RM-532-105 contra la enzima 17 β -HSD3; sin embargo, este mostró una estabilidad seis veces mayor. Asimismo, este esteroide presentó una actividad citotóxica en la línea celular cancerosa LAPC-4.

7. Procedimiento experimental

7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.1 Parte Química: derivados de 17 β -N-arilcabamoilandrost-4-en-3ona

7.1.1 Reactivos y equipo

Todas las materias primas utilizadas se obtuvieron, comercialmente, en grado reactivo y se utilizaron sin purificación adicional.

La evaporación de los disolventes se realizó en un evaporador rotatorio marca BÜCHI modelo R-205. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johnes y no están corregidos. Para la cromatografía en columna se empleó, como fase estacionaria, gel de sílice 60 (Aldrich®) o Florisil 200 (Aldrich®). Los análisis cromatográficos se realizaron siguiendo las técnicas convencionales: utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice marca Aldrich con 0.2 mm de espesor. Para la visualización de las placas se empleó una lámpara de luz UV y/o una solución de cloruro de cobalto al 2% en H₂SO₄ 2N.

Los espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C y RMN ¹⁹F se realizaron en un aparato Varian VxR-300S (400 MHz) y Varian 300S (75 MHz), respectivamente. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado (CDCl₃). Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se expresan como: s= simple, d= señal doble, dd= señal doble de doble, ddd= señal doble de doble de doble, sa= señal simple ancha, m= señal múltiple.

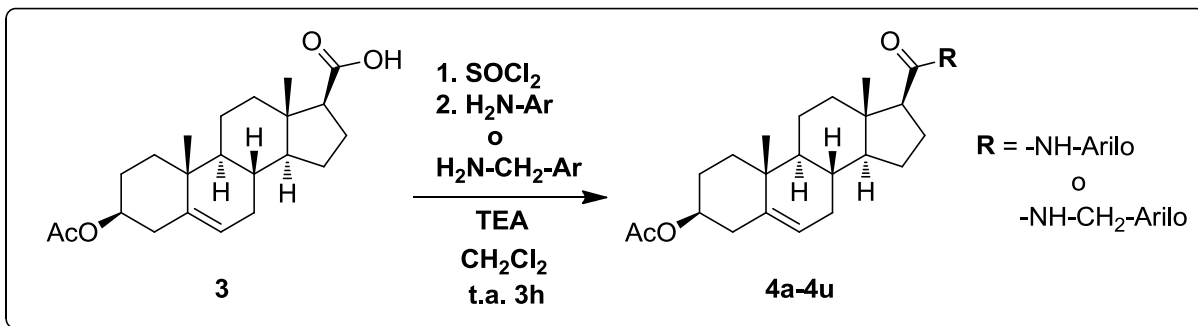
Los espectros de IR se determinaron mediante un equipo Perkin Elmer Spectrum 400, FT-IR/FT-FIR, utilizando la técnica de Reflectancia por ATR. Las unidades se reportan en cm⁻¹.

Los espectros de masas se determinaron, dependiendo del caso, por la técnica de ionización por Impacto Electrónico (IE) en el espectrómetro de masas Termo-Electron modelo DFS (Double Focus Sector, pos sus siglas en inglés) utilizando alcohol 3-nitrobencílico como matriz interna. La introducción de la muestra fue mediante sonda directa a una temperatura menor a 50°C, detectando los iones positivos. Para algunas muestras, se utilizó la técnica de ionización por Electrospray en un aparato UPLC-ESI-MS marca Waters, modelo Acquity UPLC-H Class system. En este caso, todas las muestras fueron analizadas a una concentración de 0.5 mg/mL, en donde se inyectaron 3 μ L. El ión molecular se indica como M⁺ y la nomenclatura como *m/z*= masa/carga.

7. Procedimiento experimental

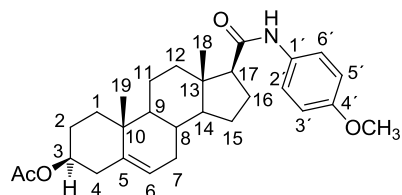
7.1.2 Descripción de la síntesis

7.1.2.1 Metodología general para la síntesis de los derivados 4a-4u



En un matraz de fondo redondo de 20 mL, se disolvieron 200 mg (0.6 mmol) del compuesto **3** en 10 mL de diclorometano y se le agregaron 0.2 mL de cloruro de tionilo recién destilado. Esta mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente por dos horas. Después, el disolvente y el exceso de cloruro de tionilo fueron retirados del medio de reacción utilizando destilación a presión reducida. El sólido beige formado fue disuelto, de nuevo, en 10 mL de diclorometano y a éste se le agregaron 0.4 mL de trietilamina. A esta mezcla de reacción se le acondicionó un baño de hielo y con agitación magnética, se adicionaron, lentamente, 0.9 mmol de la arilamina correspondiente disuelta en 5 mL de diclorometano. Terminada la adición, la reacción se mantuvo a temperatura ambiente por una hora más. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida quedando un residuo oleoso al cual se le agregaron 15 mL de hexano caliente. El precipitado formado se filtró por succión y el sólido se recristalizó por par de disolventes utilizando diclorometano-metanol.

7.1.2.1.1 3 β -acetiloxi-17 β -N-(4-metoxifenilcarbamoil)androst-5-eno (4a)



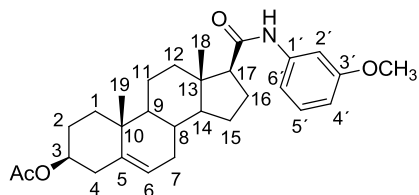
Rendimiento: 65%; **Punto de fusión:** 218-221 °C

IR (Espectro 1, ATR, cm^{-1}): 3415 (N-H); 2964, 2940, 2904, 2854 (C-H alifático); 1731 (-O-C=O); 1615 (-C=C-), 1648 (-CONH-); 1513 (-CONH-segunda banda), 1247 (C-O).

RMN ¹H (Espectro 2, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.76 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 3.78 (s, 3H, Ar- OCH_3); 4.58-4.64 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-6); 6.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 6.96 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.41 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.1.2 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(3-metoxifenilcarbamoil)androst-5-eno (4b)



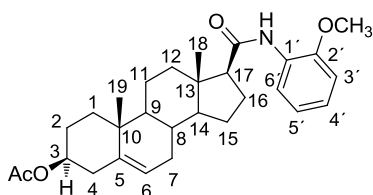
Rendimiento: 64%; **Punto de fusión:** 93-95 °C

IR (Espectro 3, ATR, cm^{-1}): 3422 (N-H); 2964, 2940, 2903, 2871, 2852, 2832 (C-H alifático); 1731 (-O-C=O); 1608, 1595 (-C=C-), 1682 (-CONH-); 1527 (-CONH- segunda banda), 1248, 1035 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 4, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.76 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 3.88 (s, 3H, Ar- OCH_3); 4.56-4.65 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-6); 6.87 (dd, $J = 8.9, 1.6$ Hz, 1H, H-4'); 6.90-7.05 (m, 2H, H-5' y H-6'); 7.68 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.39 (dd, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-2').

7.1.2.1.3 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(2-metoxifenilcarbamoil)androst-5-eno (4c)

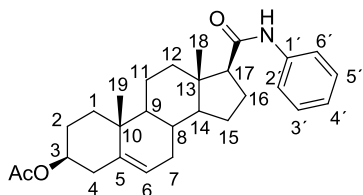
Rendimiento: 42%; **Punto de fusión:** 132-135 °C



IR (Espectro 5, ATR, cm^{-1}): 3429 (N-H); 3038 (=C-H); 2966, 2948, 2882, 2847 (C-H alifático); 1723 (-O-C=O); 1649 (-CONH-); 1600 (-C=C-), 1518 (-CONH- segunda banda), 1247, 1030 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 6, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.76 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 3.79 (s, 3H, Ar- OCH_3); 4.57-4.65 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (1H, d, $J = 5.02$ Hz, H-6); 6.63 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H, H-3'); 6.95 (ddd, $J = 8.0, 1.9, 0.8$ Hz, 1H, H-5'); 7.18 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4'); 7.22 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.36 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-6').

7.1.2.1.4 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-fenilcarbamoilandrost-5-eno (4d)



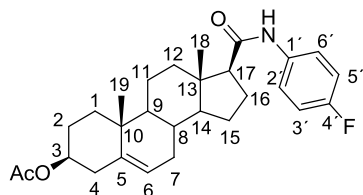
Rendimiento: 67%; **Punto de fusión:** 231-233 °C

IR (Espectro 7, ATR, cm^{-1}): 3333 (N-H); 3037 (=C-H); 2938, 2905, 2871, 2851 (C-H alifático); 1730 (-O-C=O); 1668 (-CONH-); 1498 (-CONH- segunda banda), 1240 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 8, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.77 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 4.57-4.66 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (1H, d, $J = 5.02$ Hz, H-6); 7.08 (t, $J = 7.42$, 1H, H-4'), 7.16 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.30 (t, $J = 7.06$, 2H, H-3' y H-5'); 7.52 (d, $J = 7.58$, 2H, H-2' y H-6').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.1.5 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(4-fluorofenilcarbamoil)androst-5-eno (4e)

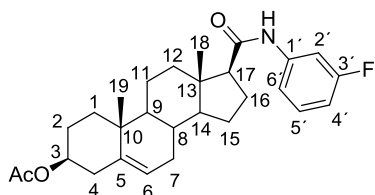


Rendimiento: 60%; **Punto de fusión:** 230-233 °C

IR (Espectro 9, ATR, cm^{-1}): 3398 (N-H); 3039 (=C-H); 2941, 2909, 2874, 2854, 2826 (C-H alifático); 1728 (-O-C=O); 1681 (-CONH-); 1507 (-CONH- segunda banda); 1251 (C-O); 832 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 10, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.77 (s, 3H, 18- CH_3); 1.03 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 4.57-4.65 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (d, $J = 5.05$ Hz, H-6); 6.99 (ddd, $J = 10.4, 6.3, 2.9$ Hz, 1H, H-3' y H-5'); 7.05 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.47 (dd, $J = 9.1, 4.8$ Hz, 1H, H-2' y H-6').

7.1.2.1.6 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(3-fluorofenilcarbamoil)androst-5-eno (4f)

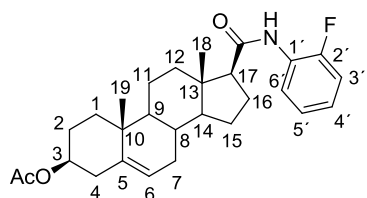


Rendimiento: 60%; **Punto de fusión:** 204-205 °C

IR (Espectro 11, ATR, cm^{-1}): 3440 (N-H); 3142, 3037 (=C-H); 2971, 2940, 2903, 2881, 2851 (C-H alifático); 1726 (-O-C=O); 1607 (-CONH-); 1547 (-CONH- segunda banda); 1248 (C-O); 1026 (C-H alqueno); 1015 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 12, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.75 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 4.56-4.62 (m, 1H, 3 α -H); 5.37 (d, $J = 5.05$ Hz, H-6); 6.77 (tdd, $J = 8.2, 2.5, 1.1$ Hz, 1H, H-4'); 7.28 – 7.09 (m, 2H, H-5' y H-6'); 7.37 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.51 (dt, $J = 11.0, 2.2$ Hz, 1H, H-2').

7.1.2.1.7 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(2-fluorofenilcarbamoil)androst-5-eno (4g)



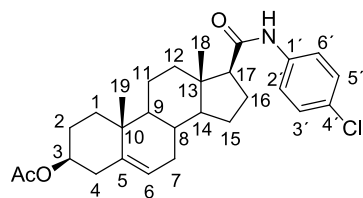
Rendimiento: 45%; **Punto de fusión:** 210-212 °C

IR (Espectro 13, ATR, cm^{-1}): 3354 (N-H); 3038 (=C-H); 2969, 2939, 2903, 2855, 2826 (C-H alifático); 1730 (-O-C=O); 1691 (-CONH-); 1520 (-CONH- segunda banda); 1248 (C-O); 1026 (C-H alqueno); 1015 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 14, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.75 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 4.58-4.62 (m, 1H, 3 α -H); 5.37 (d, $J = 5.05$ Hz, H-6); 7.16 – 6.93 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'); 7.24 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.33 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.1.8 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(4-clorofenilcarbamoil)androst-5-eno (4h)

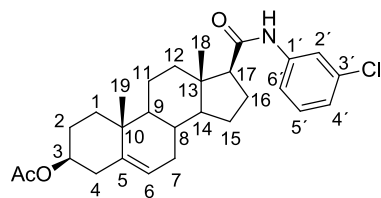


Rendimiento: 67%; **Punto de fusión:** 263-265 °C

IR (Espectro 15, ATR, cm^{-1}): 3395 (N-H); 3028 (=C-H); 2946, 2927, 2910, 2853 (C-H alifático); 1724 (-O-C=O); 1685 (-CONH-); 1510 (-CONH- segunda banda); 1253 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 16, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.75 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 4.57-4.65 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (d, $J = 5.38$ Hz, H-6); 7.21 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

7.1.2.1.9 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(3-clorofenilcarbamoil)androst-5-eno (4i)

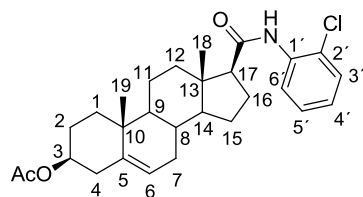


Rendimiento: 67%; **Punto de fusión:** 213-215 °C

IR (Espectro 17, ATR, cm^{-1}): 3317 (N-H); 3030 (=C-H); 2941, 2902, 2850 (C-H alifático); 1727 (-O-C=O); 1690 (-CONH-); 1593 (-CONH- segunda banda); 1247 (C-O); 1028 (C-H alqueno).

RMN ^1H (Espectro 18, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.75 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.04 (s, 3H, COOCH_3); 4.56-4.67 (m, 1H, 3 α -H); 5.37 (d, $J = 5.38$ Hz, H-6); 7.04 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H, H-4'); 7.20 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'); 7.39 (ddd, $J = 8.2, 2.0, 0.9$ Hz, 1H, H-6'); 7.46 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.66 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2').

7.1.2.1.10 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(2-clorofenilcarbamoil)androst-5-eno (4j)



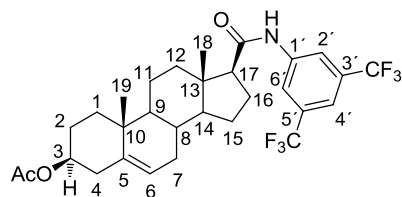
Rendimiento: 32%; **Punto de fusión:** 220-225 °C

IR (Espectro 19, ATR, cm^{-1}): 3317 (N-H); 3030 (=C-H); 2941, 2902, 2850 (C-H alifático); 1727 (-O-C=O); 1690 (-CONH-); 1593 (-CONH- segunda banda); 1247 (C-O); 1028 (C-H alqueno).

RMN ^1H (Espectro 20, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.76 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.50-3.57 (m, 1H, 3 α -H); 5.37 (d, $J = 5.0$ Hz, H-6); 7.02 (td, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H, H-4'); 7.27 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'); 7.36 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, H-6'); 7.57 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.44 (dd, $J = 8.3, 1.3$ Hz, 1H, H-2').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.1.11 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-[3,5-bis(trifluorometil)fenilcarbamoil]androst-5-eno (4k)

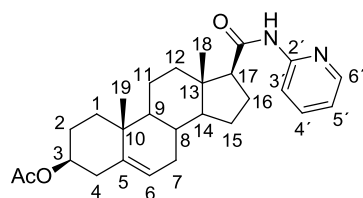


Rendimiento: 42%; **Punto de fusión:** 123-125 °C

IR (Espectro 21, ATR, cm^{-1}): 3347 (N-H); 3112 (=C-H); 2943, 2905, 2851 (C-H alifático); 1732 (-O-C=O); 1710 (-CONH-); 1541 (-CONH- segunda banda); 1276 (C-O); 1167 (C-H alqueno); 1129 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 22, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (s, 3H, 18- CH_3); 1.04 (s, 3H, 19- CH_3); 2.05 (s, 3H, COOCH_3); 4.62-4.70 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (d, $J = 5.38$ Hz, H-6); 7.56 (s, 1H, H4'); 8.01 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.12 (s, 2H, H2' y H6').

7.1.2.1.12 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(2-piridinilcarbamoil)androst-5-eno (4l)

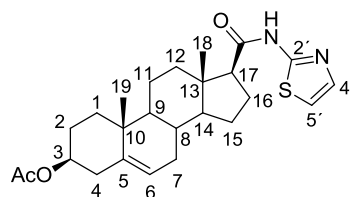


Rendimiento: 67%; **Punto de fusión:** 182-184 °C

IR (Espectro 23, ATR, cm^{-1}): 3347 (N-H); 3112 (=C-H); 2905, 2902, 2851 (C-H alifático); 1732 (-O-C=O); 1710 (-CONH-); 1380 (-CONH- segunda banda); 1276 (C-O); 1129 (C-H alqueno).

RMN ^1H (Espectro 24, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.74 (s, 3H, 18- CH_3); 1.00 (s, 3H, 19- CH_3); 2.02 (s, 3H, COOCH_3); 4.54-4.64 (m, 1H, 3 α -H); 5.36 (d, $J = 5.38$ Hz, H-6); 7.01 (ddd, $J = 7.3, 4.6, 1.3$ Hz, 1H, H-5'); 7.68 (ddd, $J = 8.5, 5.0, 1.7$ Hz, 1H, H-4'); 8.13 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.29 – 8.18 (m, H-3' y H-6', 2H).

7.1.2.1.13 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(1,3-tiazol-2-ilcarbamoil)androst-5-eno (4m)



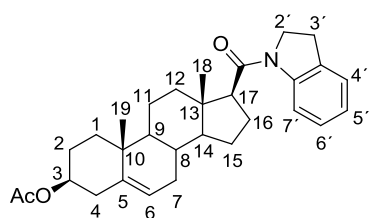
Rendimiento: 60%; **Punto de fusión:** 152-154 °C

IR (Espectro 25, ATR, cm^{-1}): 3251 (N-H); 3157 (=C-H); 2941, 2905, 2850 (C-H alifático); 1731 (-O-C=O); 1682 (-CONH-); 1557 (-CONH- segunda banda); 1245 (C-O); 1029 (C-H alqueno).

RMN ^1H (Espectro 26, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.73 (s, 3H, 18- CH_3); 1.00 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 4.55-4.63 (m, 1H, 3 α -H); 5.37 (d, $J = 5.38$ Hz, 1-H, H-6); 6.98 (d, $J = 3.62$ Hz, 1H, H-5'); 7.44 (d, $J = 3.62$ Hz, 1H, H-4'); 10.89 (sa, 1H, CONH-Ar).

7. Procedimiento experimental

7.1.2.1.14 3 β -acetiloxi-17 β -(2,3-dihidro-1*H*-indol-1-il)carbonilandro-5-eno (4n)

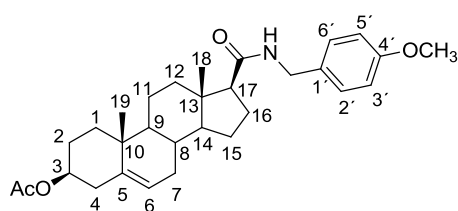


Rendimiento: 54%; **Punto de fusión:** 158-160 °C.

IR (Espectro 27, ATR, cm^{-1}): 3041 (=C-H); 2941, 2907, 2869, 2850, 2819 (C-H alcano); 1732 (-O-C=O); 1646 (-CONH-); 1249 (C-O); 1032 (C-H alqueno).

RMN ^1H (Espectro 28, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 3.14 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH_2 , H-3'); 4.15 (dq, $J = 18.2, 9.3$ Hz, 2H, CH_2 , H-2'); 4.55-4.63 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (d, $J = 5.38$ Hz, H-6); 6.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-4'); 7.18 (m, 2H, H-5' y H-6'); 8.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7').

7.1.2.1.15 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(4-metoxibencilcarbamoil)andro-5-eno (4o)

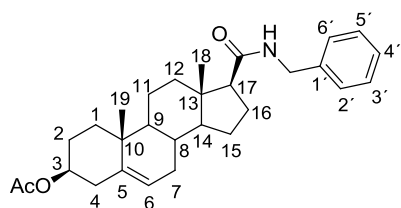


Rendimiento: 69%; **Punto de fusión:** 94-95 °C

IR (Espectro 29, ATR, cm^{-1}): 3333 (N-H); 3029 (=C-H); 2962, 2903, 2939, 2881, 2872, 2852 (C-H alifático); 1731 (-O-C=O); 1615 (-C=C-), 1648 (-CONH-); 1513 (-CONH- segunda banda), 1247 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 30, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.70 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 2.01 (s, 3H, COOCH_3); 3.78 (s, 3H, Ar- OCH_3); 4.37 (ddd, $J = 29.5, 14.5, 5.6$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 4.46-4.60 (m, 1H, 3 α -H); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.63 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

7.1.2.1.16 3 β -acetiloxi-17 β -*N*-(bencilcarbamoil)andro-5-eno (4p)



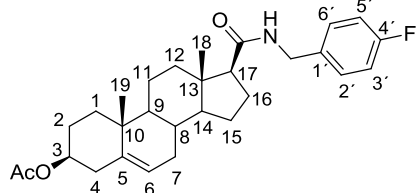
Rendimiento: 68%; **Punto de fusión:** 162-165 °C

IR (Espectro 31, ATR, cm^{-1}): 3262 (N-H); 3029, 3086 (=C-H); 2968, 2946, 2908, 2887, 2869, 2827 (C-H alifático); 1732 (-O-C=O); 1662 (-C=C-), 1638 (-CONH-); 1557 (-CONH- segunda banda), 1247 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 32, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.72 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 2.03 (s, 3H, COOCH_3); 4.46 (Octeto AB, $J = 25.2, 14.6, 5.5$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 4.46-4.60 (m, 1H, 3 α -H); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.58 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, -CONH-); 7.26-7.36 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5' y H-6').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.1.17 3 β -acetiloxi-17 β -N-(4-fluorobencilcarbamoil)androst-5-eno (4q)

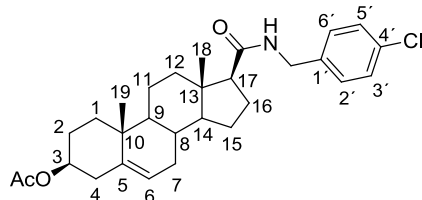


Rendimiento: 82%; **Punto de fusión:** 193-195 °C

IR (Espectro 33, ATR, cm^{-1}): 3381 (N-H); 3047 (=C-H); 2963, 2939, 2904, 2851, 2830 (C-H alifático); 1730 (-O-C=O); 1665 (-C=C-), 1644 (-CONH-); 1511 (-CONH- segunda banda), 1248 (C-O); 1035 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 34, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.69 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 2.01 (s, 3H, COOCH_3); 4.41 (ddd, $J = 33.1, 14.6, 5.5$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 4.51-4.68 (m, 1H, 3 α -H); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.78 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 7.00 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.25 (dd, $J = 7.3, 4.5$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

7.1.2.1.18 3 β -acetiloxi-17 β -N-(4-clorobencilcarbamoil)androst-5-eno (4r)

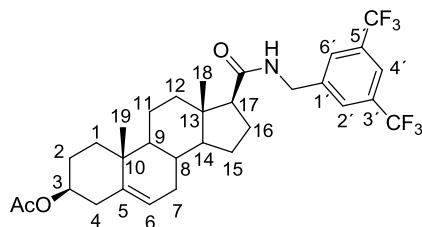


Rendimiento: 78%; **Punto de fusión:** 220-222 °C

IR (Espectro 35, ATR, cm^{-1}): 3392 (N-H); 3033 (=C-H); 2968, 2940, 2856, 2849 (C-H alifático); 1722 (-O-C=O); 1633 (-CONH-); 1521 (-CONH- segunda banda), 1253 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 36, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.69 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 2.01 (s, 3H, COOCH_3); 4.40 (ddd, $J = 36.1, 14.9, 5.9$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 4.53-4.63 (m, 1H, 3 α -H); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.78 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-2' y H-6'); 7.25 (d, $J = 8.3, 2\text{H}$, H-3' y H-5').

7.1.2.1.19 3 β -acetiloxi-17 β -N-[3,5-bis(trifluorometil)bencilcarbamoil]androst-5-eno (4s)



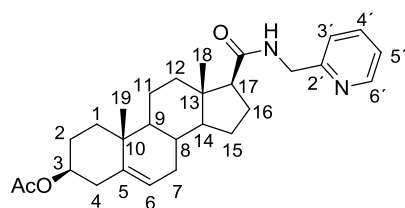
Rendimiento: 76%; **Punto de fusión:** 99-103 °C

IR (Espectro 37, ATR, cm^{-1}): 3388, 3287 (N-H); 3072 (=C-H); 2965, 2939, 2907, 2888, 2855, 2828 (C-H alifático); 1730 (-O-C=O); 1650 (-CONH-); 1518 (-CONH- segunda banda); 1274 (C-O); 1038 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 38, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.69 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 1.98 (s, 3H, COOCH_3); 4.43-4.70 (m, 3H, CONH- CH_2 -Ar, 3 α -H); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 6.25 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 7.74 (s, 3H, H-2', H-4' y H-6').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.1.20 3 β -acetiloxi-17 β -N-[(2-piridinilmetil)carbamoil]androst-5-eno (4t)

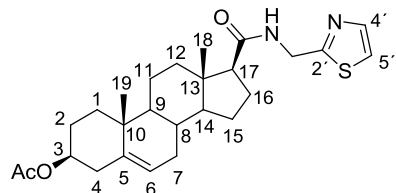


Rendimiento: 79%; **Punto de fusión:** 182-184 °C

IR (Espectro 39, ATR, cm^{-1}): 3363 (N-H); 3059 (=C-H); 2963, 2939, 2905, 2852, 2829 (C-H alifático); 1730 (-O-C=O); 1650 (-CONH-); 1517 (-CONH-segunda banda), 1247 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 40, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.62 (s, 3H, 18- CH_3); 0.95 (s, 3H, 19- CH_3); 1.97 (s, 3H, COOCH_3); 4.53-4.56 (m, 3H, CONH- CH_2 -Ar, 3 α -H); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 6.74 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 7.15 (dd, $J = 7.5, 5.0$ Hz, 1H, H-5'); 7.26 (dd, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3'); 7.62 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H, H-4'); 8.47 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-6').

7.1.2.1.21 3 β -acetiloxi-17 β -N-[(1,3-tiazol-2-il)metilcarbamoil]androst-5-eno (4u)

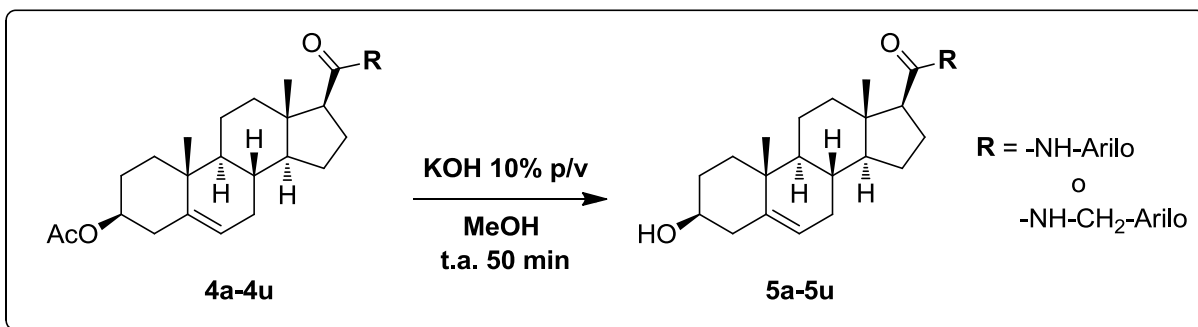


Rendimiento: 39%; **Punto de fusión:** 89-91 °C

IR (Espectro 41, ATR, cm^{-1}): 3330 (N-H); 3082, 3038 (=C-H); 2939, 2903, 2852 (C-H alifático); 1730 (-O-C=O); 1651 (-CONH-); 1514 (-CONH-segunda banda), 1247 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 42, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.71 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 2.02 (s, 3H, COOCH_3); 4.58-4.69 (m, 1H, 3 α -H); 4.78 (ddd, $J = 40.2, 16.1, 5.8$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.35 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-6); 6.18 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, -CONH-); 7.69 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-5'), 7.70 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-4').

7.1.2.2 Metodología general para la síntesis de los derivados 5a-5u

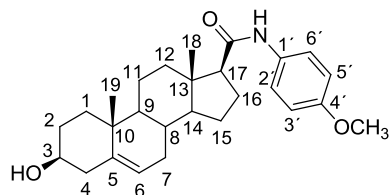


En un matraz de fondo redondo de 20 mL, se pesaron 0.3 mmol de los derivados **4a-u**, los cuales, se suspendieron en 10 mL de metanol. Después, se agregó, a esta suspensión, 1 mL de solución metanólica de hidróxido de potasio al 10 % p/v. Esta mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación

7. Procedimiento experimental

magnética a temperatura ambiente por 50 minutos y terminado este tiempo se depositó en 100 mL de hielo. El precipitado formado se filtró por succión y se recristalizó de metanol.

7.1.2.2.1 3 β -hidroxi-17 β -N-(4-metoxifenilcarbamoil)androst-5-eno (5a)

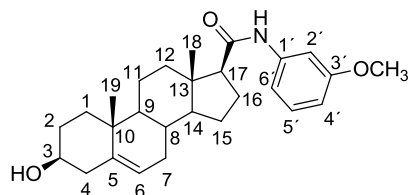


Rendimiento: 94%; **Punto de fusión:** 145-148 °C

IR (Espectro 43, ATR, cm^{-1}): 3414 (N-H); 3300 (O-H); 2967, 2935, 2902, 2852 (C-H alifático); 1669 (-CONH-); 1513 (-CONH- segunda banda), 1252 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 44, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.77 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.50-3.68 (m, 1H, 3 α -H); 3.78 (s, 3H, Ar- OCH_3); 5.38 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-6); 6.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 6.91 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

7.1.2.2.2 3 β -hidroxi-17 β -N-(3-metoxifenilcarbamoil)androst-5-eno (5b)

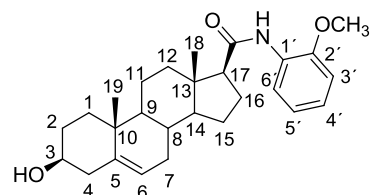


Rendimiento: 90%; **Punto de fusión:** 142-145 °C

IR (Espectro 45, ATR, cm^{-1}): 3318 (N-H); 3029 ($=\text{C-H}$); 2933, 2902, 2871, 2851 (C-H alifático); 1664 (-CONH-); 1599 (-CONH- segunda banda); 1536 (-C=C-); 1211 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 46, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.77 (s, 3H, 18- CH_3), 1.01 (s, 3H, 19- CH_3), 3.48-3.58 (m, 1H, 3 α -H), 3.81 (s, 3H, Ar- OCH_3), 5.37 (dd, 1H, $J = 4.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.65 (ddd, 1H, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, H-4'), 6.92 (ddd, 1H, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, H-6'), 6.96 (sa, 1H, CONH-Ar), 7.20 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 7.36 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-2').

7.1.2.2.3 3 β -hidroxi-17 β -N-(3-metoxifenilcarbamoil)androst-5-eno (5c)



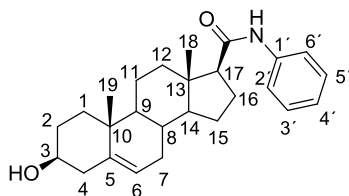
Rendimiento: 88%; **Punto de fusión:** 192-195 °C

IR (Espectro 47, ATR, cm^{-1}): 3439 (N-H); 3225 (O-H); 3071 ($=\text{C-H}$); 2964, 2934, 2863, 2829 (C-H alifático); 1666 (-CONH-); 1599 (-C=C-); 1528 (-CONH- segunda banda); 1248 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 48, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.75 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.48-3.58 (m, 1H, 3 α -H); 3.88 (s, 3H, Ar- OCH_3); 5.36 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-6); 6.87 (dd, $J = 8.9, 1.6$ Hz, 1H, H-4'); 6.90-7.05 (m, 2H, H-5' y H-6'); 7.68 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.39 (dd, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-2').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.2.4 3β-hidroxi-17β-*N*-fenilcarbamoilandro-5-eno (5d)

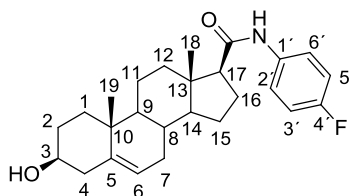


Rendimiento: 91%; **Punto de fusión:** 224-226 °C

IR (Espectro 49, ATR, cm^{-1}): 3413 (N-H); 3308 (O-H); 3052 (=C-H); 2968, 2938, 2904, 2893, 2858, 2827 (C-H); 1682 (-CONH-); 1519 (-CONH- segunda banda), 1057 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 50, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.77 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.53 (m, 1H, 3 α -H); 5.36 (1H, d, $J = 5.02$ Hz, H-6); 7.02 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.08 (t, $J = 7.42$, 1H, H-4'), 7.31 (t, $J = 7.06$, 2H, H-3' y H-5'); 7.50 (d, $J = 7.58$, 2H, H-2' y H-6').

7.1.2.2.5 3β-hidroxi-17β-*N*-(4-fluorofenilcarbamoil)andro-5-eno (5e)

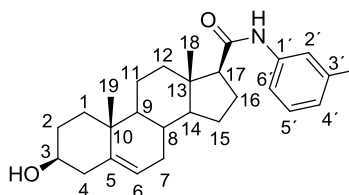


Rendimiento: 93%; **Punto de fusión:** 236-239 °C

IR (Espectro 51, ATR, cm^{-1}): 3415 (N-H); 3299 (O-H); 2968, 2938, 2902, 2858, 2827 (C-H alifático); 1678 (-CONH-); 1510 (-CONH- segunda banda); 1216 (C-O); 837 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 52, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.77 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.51-3.56 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (d, $J = 5.2$ Hz, H-6); 6.97 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.01 (ddd, $J = 10.4, 6.3, 2.9$ Hz, 1H, H-3' y H-5'); 7.46 (dd, $J = 9.1, 4.8$ Hz, 1H, H-2' y H-6').

7.1.2.2.6 3β-hidroxi-17β-*N*-(3-fluorofenilcarbamoil)andro-5-eno (5f)



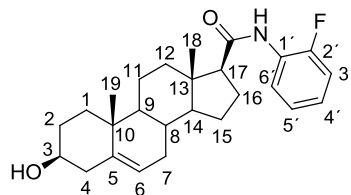
Rendimiento: 91%; **Punto de fusión:** 178-181 °C

IR (Espectro 53, ATR, cm^{-1}): 3422 (N-H); 3311 (O-H); 3038 (=C-H); 2970, 2938, 2903, 2857, 2827 (C-H alifático); 1647 (-CONH-); 1664 (-C=C-); 1522 (-CONH- segunda banda); 1056 (C-H alqueno); 1027 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 54, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.76 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.49-3.57 (m, 1H, 3 α -H); 5.35 (d, $J = 5.05$ Hz, H-6); 6.77 (tdd, $J = 8.2, 2.5, 1.1$ Hz, 1H, H-4'); 7.28 – 7.09 (m, 2H, H-5' y H-6'); 7.07 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.51 (dt, $J = 11.0, 2.2$ Hz, 1H, H-2').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.2.7 3β-hidroxi-17β-N-(2-fluorofenilcarbamoil)androst-5-eno (5g)

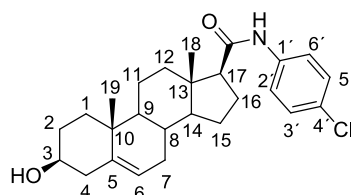


Rendimiento: 91%; **Punto de fusión:** 178-181 °C

IR (Espectro 55, ATR, cm^{-1}): 3436 (N-H); 3386 (O-H); 3038 (=C-H); 2967, 2937, 2859, 2827 (C-H alifático); 1682 (-CONH-); 1520 (-CONH- segunda banda); 1256 (C-O); 1054 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 56, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 3.54 (m, 1H, 3 α -H); 5.37 (d, $J = 5.05$ Hz, H-6); 7.05 – 6.93 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'); 7.22 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.34 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-6').

7.1.2.2.8 3β-hidroxi-17β-N-(4-clorofenilcarbamoil)androst-5-eno (5h)

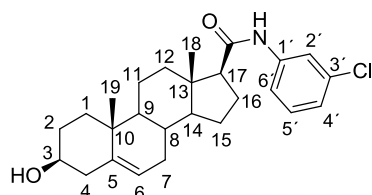


Rendimiento: 91%; **Punto de fusión:** 214-216 °C

IR (Espectro 57, ATR, cm^{-1}): 3411 (N-H); 3031 (=C-H); 2963, 2937, 2901, 2850 (C-H alifático); 1728 (-CONH-); 1684 (-CONH- segunda banda); 1230 (C-O), 830 (C-Cl).

RMN ^1H (Espectro 58, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.52 (m, 1H, 3 α -H); 5.36 (d, $J = 4.6$ Hz, H-6); 6.99 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

7.1.2.2.9 3β-hidroxi-17β-N-(3-clorofenilcarbamoil)androst-5-eno (5i)



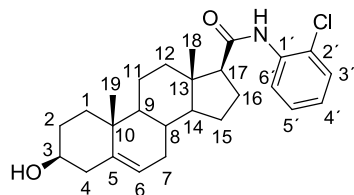
Rendimiento: 91%; **Punto de fusión:** 185-187 °C

IR (Espectro 59, ATR, cm^{-1}): 3416(N-H); 3316 (O-H); 3124 (=C-H); 2933, 2901, 2851 (C-H alifático); 1668 (-CONH-); 1592 (-CONH- segunda banda).

RMN ^1H (Espectro 60, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.75 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 3.46-3.52 (m, 1H, 3 α -H); 5.37 (d, $J = 5.38$ Hz, H-6); 7.04 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H, H-4'); 7.20 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'); 7.39 (ddd, $J = 8.2, 2.0, 0.9$ Hz, 1H, H-6'); 7.46 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.66 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.2.10 3β-hidroxi-17β-*N*-(2-clorofenilcarbamoil)androst-5-eno (5j)

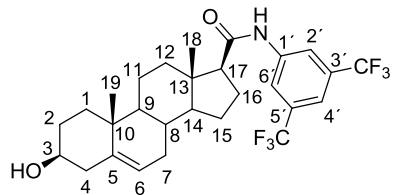


Rendimiento: 87%; **Punto de fusión:** 198-200 °C

IR (Espectro 61, ATR, cm^{-1}): 3426 (N-H); 3228 (O-H); 2965, 2990, 2934, 2862, 2808 (C-H alifático); 1673 (-CONH-); 1592 (C=C); 1525 (-CONH- segunda banda); 1307 (C-O); 1055 (C-H alqueno); 1033 (C-Cl).

RMN ^1H (Espectro 62, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.76 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.50-3.57 (m, 1H, 3 α -H); 5.37 (d, $J = 5.0$ Hz, H6); 7.02 (td, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H, H-4'); 7.27 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'); 7.36 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, H6'); 7.57 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.44 (dd, $J = 8.3, 1.3$ Hz, 1H, H-2').

7.1.2.2.11 3β-hidroxi-17β-*N*-[3,5-bis(trifluorometil)fenilcarbamoil]androst-5-eno (5k)

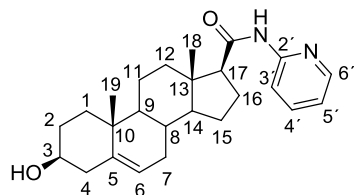


Rendimiento: 89%; **Punto de fusión:** 138-141 °C

IR (Espectro 63, ATR, cm^{-1}): 3317 (N-H); 3105 (O-H); 3112 (=C-H); 2941, 2856 (C-H alifático); 1660 (-CONH-); 1622 (-CONH- segunda banda); 1275.20 (C-O); 1129 (C-H alqueno); 1129.37 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 64, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 3.50-3.68 (m, 1H, 3 α -H); 5.38 (d, $J = 5.38$ Hz, H-6); 7.27 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.58 (s, 1H, H-4'); 8.04 (s, 2H, H-2' y H-6').

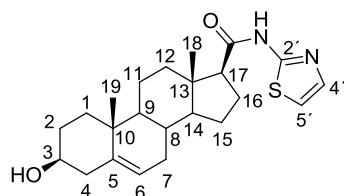
7.1.2.2.12 3β-hidroxi-17β-*N*-(2-piridinilcarbamoil)androst-5-eno (5l)



Rendimiento: 90%; **Punto de fusión:** 115-119 °C

IR (Espectro 65, ATR, cm^{-1}): 3420 (O-H); 3356 (-NH-); 3071, 3029 (=C-H); 2934, 2900, 2850 (C-H alifático); 1693 (-CONH); 1576 (C=C); 1511 (-CONH- segunda banda); 1299 (C-O); 1043 (C-H alqueno).

7.1.2.2.13 3β-hidroxi-17β-*N*-(1,3-tiazol-2-ilcarbamoil)androst-5-eno (5m)



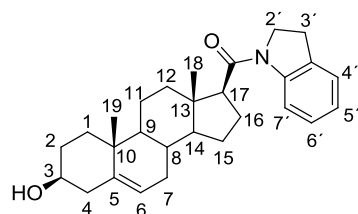
Rendimiento: 86%; **Punto de fusión:** 203-205 °C

IR (Espectro 67, ATR, cm^{-1}): 3364 (N-H); 3251 (O-H); 3073, 3028 (=C-H); 2931, 2904 (C-H alifático); 1682 (-CONH-); 1543 (-CONH- segunda banda); 1268 (C-O); 1167 (C-H alqueno).

7. Procedimiento experimental

RMN ^1H (Espectro 68, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.73 (s, 3H, 18- CH_3); 1.00 (s, 3H, 19- CH_3); 3.51 (m, 1H, 3 α -H); 5.33 (d, $J = 4.98$ Hz, 1-H, H-6); 6.97 (d, $J = 3.62$ Hz, 1H, H-5'); 7.44 (d, $J = 3.62$ Hz, 1H, H-4'); 11.16 (sa, 1H, CONHAr).

7.1.2.2.14 3 β -hidroxi-17 β -(2,3-dihidro-1*H*-indol-1-il)carbonilandrost-5-eno (5n)

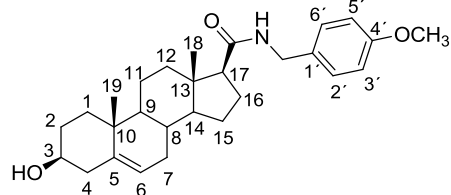


Rendimiento: 91%; **Punto de fusión:** 161-163 °C

IR (Espectro 69, ATR, cm^{-1}): 3483 (O-H); 3041 (=C-H); 2974, 2947, 2921, 2878, 2851, 2822 (C-H alcano); 1632 (-CONR); 1260 (C-O); 1061 (C-H alqueno).

RMN ^1H (Espectro 70, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.14 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH_2 , H-3'); 3.48-3.54 (m, 1H, 3 α -H); 4.15 (dq, $J = 18.2, 9.3$ Hz, 2H, CH_2 , H-2'); 5.36 (d, $J = 5.38$ Hz, 1H, H-6); 6.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-4'); 7.18 (m, 2H, H-5' y H-6'); 8.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7').

7.1.2.2.15 3 β -hidroxi-17 β -*N*-(4-metoxibencilcarbamoi)androst-5-eno (5o)

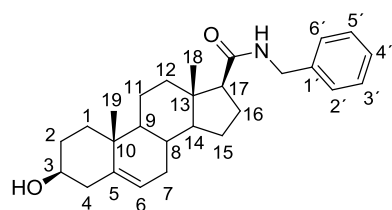


Rendimiento: 89%; **Punto de fusión:** 118-120 °C

IR (Espectro 71, ATR, cm^{-1}): 3514 (O-H), 3314 (N-H); 3060, 3027 (=C-H); 2933, 2900, 2845 (C-H alifático); 1647 (-CONH-); 1512 (-CONH- segunda banda), 1241 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 72, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.70 (s, 3H, 18- CH_3); 0.99 (s, 3H, 19- CH_3); 3.46-3.53 (m, 1H, 3 α -H); 3.78 (s, 3H, Ar- OCH_3); 4.37 (ddd, $J = 30.4, 14.5, 5.6$ Hz, 2H, $\text{CONH-CH}_2\text{-Ar}$); 5.32 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.81 (sa, 1H, -CONH-); 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

7.1.2.2.16 3 β -hidroxi-17 β -*N*-(bencilcarbamoi)androst-5-eno (5p)



Rendimiento: 91%; **Punto de fusión:** 244-247 °C

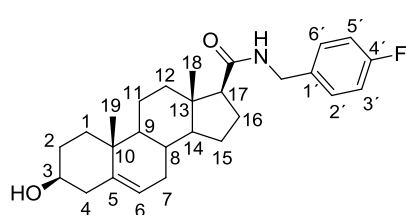
IR (Espectro 73, ATR, cm^{-1}): 3425 (O-H); 3334 (N-H); 3021 (=C-H); 2948, 2924, 2848, 2853 (C-H alifático); 1671 (-CONH-); 1572 (-CONH- segunda banda); 1267 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 74, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.74 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 3.47-3.58 (m, 1H, 3 α -H); 4.47 (ddd, $J_1 = 26.7, 14.6, 5.5$ Hz, 2H, $\text{CONH-CH}_2\text{-Ar}$); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.54 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 7.28-7.36 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5' y H-6').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.2.17 3β-hidroxi-17β-N-(4-fluorobencilcarbamoil)androst-5-eno (5q)

Rendimiento: 91%; Punto de fusión: 110-112 °C

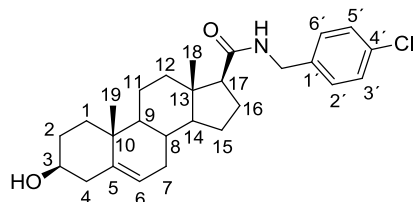


IR (Espectro 75, ATR, cm^{-1}): 3450 (O-H); 3340 (N-H); 3072 (=C-H); 2936, 2899, 2850 (C-H alifático); 1730 (-O-C=O); 1667 (-CONH-); 1639 (-C=C-); 1510 (-CONH- segunda banda); 1220 (C-O); 1043 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 76, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.68 (s, 3H, 18- CH_3); 0.99 (s, 3H, 19- CH_3); 3.44-3.53 (m, 1H, 3 α -H); 4.41 (ddd, $J = 33.2, 14.7, 5.8$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.32 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.67 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 6.98 (ddd, $J = 9.6, 5.8, 2.5$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.24 (ddd, $J = 8.8, 3.7, 1.1$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

7.1.2.2.18 3β-hidroxi-17β-N-(4-clorobencilcarbamoil)androst-5-eno (5r)

Rendimiento: 91%; Punto de fusión: 95-98 °C

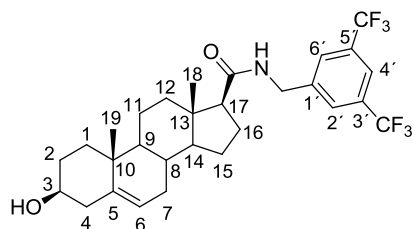


IR (Espectro 77, ATR, cm^{-1}): 3677 (O-H); 3301 (N-H); 3049 (=C-H); 2966, 2939, 2896, 2844 (C-H alifático); 1652 (-CONH-); 1540 (-CONH- segunda banda), 1246 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 78, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.70 (s, 3H, 18- CH_3); 1.00 (s, 3H, 19- CH_3); 3.49-3.54 (m, 1H, 3 α -H); 4.40-4.41 (ddd, $J = 36.1, 14.8, 5.8$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.78 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2' y H6'); 7.25 (d, $J = 8.3$, 2H, H3' y H5').

7.1.2.2.19 3β-hidroxi-17β-N-[3,5-bis(trifluorometil)bencilcarbamoil]androst-5-eno (5s)

Rendimiento: 69%; Punto de fusión: 110-113 °C

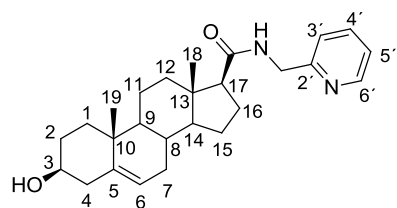


IR (Espectro 79, ATR, cm^{-1}): 3317 (-CONH-); 3069 (=C-H); 2937, 2904, 2852, (C-H alifático); 1652 (-CONH-); 1526 (-CONH- segunda banda); 1276 (C-O); 1170, 1130.62 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 80, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.69 (s, 3H, 18- CH_3); 1.02 (s, 3H, 19- CH_3); 3.46-3.56 (m, 3H, 3 α -H); 4.57 (ddd, $J = 55.4, 15.6, 6.1$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.34 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 5.89 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, -CONH-); 7.74 (s, 2H, H-2', H-6'); 7.77 (s, 1H, H-4').

7. Procedimiento experimental

7.1.2.2.20 3 β -hidroxi-17 β -N-[(2-piridinilmetil)carbamoil]androst-5-eno (5t)

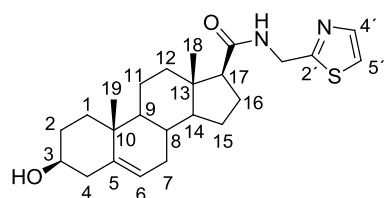


Rendimiento: 88%; **Punto de fusión:** 240-243 °C

IR (Espectro 81, ATR, cm^{-1}): 3640 (O-H); 3363 (N-H); 3059 (=C-H); 2963, 2939, 2905, 2852, 2829 (C-H alifático); 1650 (-CONH-); 1517 (-CONH- segunda banda), 1247 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 82, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.72 (s, 3H, 18- CH_3); 1.03 (s, 3H, 19- CH_3); 3.51-3.61 (m, 3H, 3 α -H); 4.60 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.36 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6); 6.68 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, -CONH-); 7.23 (dd, $J = 6.8, 5.5$ Hz, 1H, H-5'); 7.32 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-3'); 7.69 (td, $J = 7.7, 1.1$ Hz, 1H, H-4'); 8.56 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-6').

7.1.2.2.21 3 β -hidroxi-17 β -N-[(1,3-tiazol-2-il)metilcarbamoil]androst-5-eno (5u)

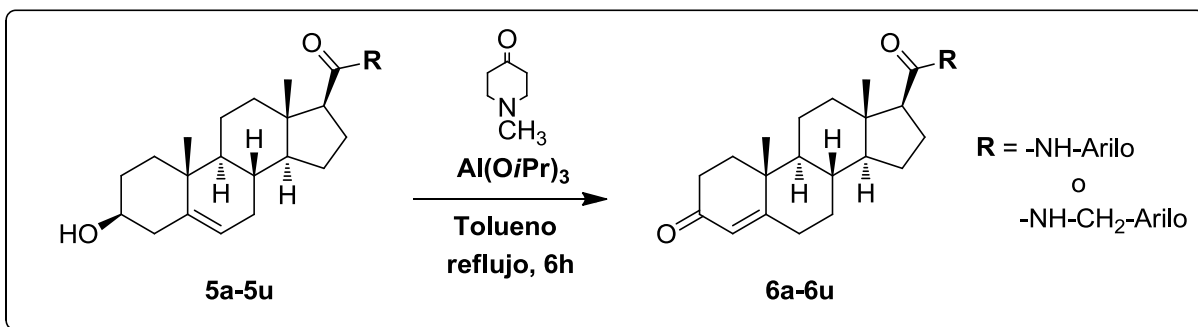


Rendimiento: 92%; **Punto de fusión:** 116-119 °C

IR (Espectro 83, ATR, cm^{-1}): 3628 (O-H); 3301 (N-H); 3077 (=C-H); 2962, 2934, 2895, 2846 (C-H alifático); 1664 (-CONH-); 1505 (-CONH- segunda banda), 1242 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 84, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.71 (s, 3H, 18- CH_3); 1.01 (s, 3H, 19- CH_3); 3.49-43.48 (m, 3H, 3 α -H); 4.78 (ddd, $J = 40.2, 16.1, 5.8$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.35 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-6); 6.23 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, -CONH-); 7.69 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-5'), 7.70 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-4').

7.1.2.3 Metodología general para la síntesis de los derivados 6a-6u

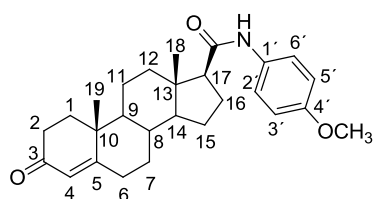


En un matraz de fondo redondo de 50 mL se disolvieron, por separado, 0.2 mmol de los esteroides **5a-u** en 30 mL de tolueno. A esta solución se adicionaron 0.6 mL (4.8 mmol) de *N*-metil-4-piperidona. Después, se acondicionó una trampa de Dean-Stark, al medio de reacción, y se removieron, bajo calentamiento, 10 mL de la mezcla azeotrópica tolueno-agua (el agua resultante proviene de la humedad

7. Procedimiento experimental

del tolueno). En este punto, se agregaron 122 mg (0.6 mmol) de isopropóxido de aluminio y se retiraron 5 mL de la mezcla azeotrópica tolueno-isopropanol. Posteriormente, la reacción se mantuvo a reflujo durante siete horas después de las cuales, el disolvente se eliminó con destilación a presión reducida. El residuo oleoso remanente se disolvió en 50 mL de acetato de etilo y se hicieron lavados con ácido clorhídrico al 20 % v/v (3 X 50 mL), solución saturada de bicarbonato de sodio (3 X 50 mL) y salmuera (3 X 50 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Finalmente, el compuesto se purificó por cromatografía en columna eluyendo por gradiente, con una mezcla de hexano-acetato de etilo.

7.1.2.3.1 17 β -*N*-(4-metoxifenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6a)



Rendimiento: 62%; **Punto de fusión:** 112-113 °C

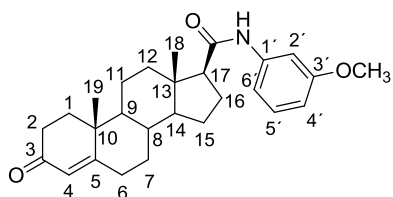
IR (Espectro 85, ATR, cm^{-1}): 3330 (N-H); 3128 (C=C-H); 2935, 2852 (C-H alifático); 1660 (C=O α,β -insaturada y -CONH-); 1515 (-CONH- segunda banda), 816 (C-H balanceo).

RMN ^1H (Espectro 86, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.90 (s, 3H, 18- CH_3); 1.19 (s, 3H, 19- CH_3); 3.78 (s, 3H, Ar- OCH_3); 5.74 (s, 1H, H-4); 6.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.10 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.42 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 87, 100 MHz, CDCl_3): δ 13.32 (C-18), 17.33 (C-19), 53.87 (Ar- OCH_3), 114.06 (C-3' y C-5'), 121.76 (C-4), 123.86 (C-2' y C-6'), 156.22 (C-4'), 131.22 (C-1'), 170.82 (C-5), 171.27 (-CONH-), 199.68 (C-3).

EM (Espectro 88, IE, m/z): 421 $[\text{M}]^+$.

7.1.2.3.2 17 β -*N*-(3-metoxifenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6b)



Rendimiento: 57%; **Punto de fusión:** 93-95 °C

IR (Espectro 89, ATR, cm^{-1}): 3329 (N-H); 3061 (C=C-H); 2937, 2853 (C-H); 1658 (C=O α,β -insaturada y -CONH-); 1537 (-CONH- segunda banda); 774 (C-H balanceo).

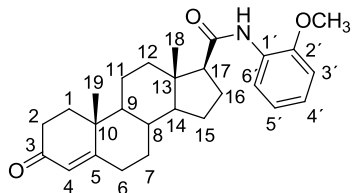
RMN ^1H (Espectro 90, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (s, 3H, 18- CH_3); 1.18 (s, 3H, 19- CH_3); 3.88 (s, 3H, Ar- OCH_3); 5.74 (s, 1H, H-4); 6.64 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H, H-4'), 6.95 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H, H-6'), 7.18 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5'), 7.27 (sa, 1H, CONH-Ar), 7.36 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2').

7. Procedimiento experimental

RMN ^{13}C (Espectro 91, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.44 (C-18), 17.46 (C-19), 55.42 (PhOCH_3), 105.46 (C-2'), 110.14 (C-4'), 111.88 (C-6'), 124.03 (C-4), 129.71 (C-5'), 139.49 (C-1'), 160.28 (C-3'), 171.19 (-CONH-), 171.36 (C-5), 199.84 (C-3).

EM (Espectro 92, ESI^+ -MS, m/z): 422.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

7.1.2.3.3 17 β -*N*-(2-metoxifenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6c)



Rendimiento: 55%; **Punto de fusión:** 189-190 °C

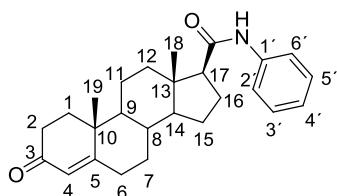
IR (Espectro 93, ATR, cm^{-1}): 3391 (N-H); 3061(=C-H); 2929, 2903, 2844, 2872 (C-H); 1688 (-CONH-); 1673 (C=O α,β -insaturada); 1601 (-C=C-); 1519 (-CONH- segunda banda); 1252, 1025.26 (C-O); 743 (C-H balanceo).

RMN ^1H (Espectro 94, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (s, 3H, 18- CH_3), 1.19 (s, 3H, 19- CH_3), 3.88 (s, 3H, ArOCH_3), 5.74 (s, 1H, H-4), 6.87 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, H-3'), 6.95 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H, H-5'), 7.02 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H, H-4'), 7.68 (sa, 1H, CONH-Ar), 8.40 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H, H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 95, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.35 (C-18), 17.51 (C-19), 53.89 (Ar-OCH_3), 109.90 (C-3'), 119.76 (C-5'), 121.24 (C-6'), 123.42 (C-4), 124.04 (C-4'), 127.94 (C-1'), 147.70 (C-2'), 170.90 (C-5), 171.18 (-CONH-), 199.64 (C-3).

EM (Espectro 96, ESI^+ -MS, m/z): 422.27 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.1.2.3.4 17 β -*N*-fenilcarbamoilandrost-5-en-3-ona (6d)



Rendimiento: 64%; **Punto de fusión:** 203-205 °C

IR (Espectro 97, ATR, cm^{-1}): 3418 (N-H); 3031 (=C-H); 2943, 2926, 2910, 2847 (C-H); 1678 (C=O α,β -insaturada y -CONH-); 1517 (-CONH- segunda banda).

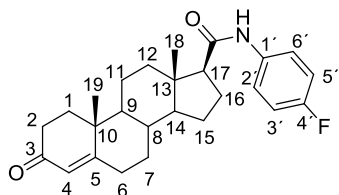
RMN ^1H (Espectro 98, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.81 (s, 3H, 18- CH_3); 1.19 (s, 3H, 19- CH_3); 5.74 (s, 1H, H-4); 7.09 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-4'), 7.20 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.53 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 99, 100 MHz. CDCl_3) δ : 13.46 (C-18), 17.50 (C-19), 119.95 (C-2' and C-6'), 124.07 (C-4'), 124.19 (C-4), 129.10 (C-3' y C-5'), 138.22 (C-1'), 171.08 (C-5), 171.21 (-CONH-), 199.70 (C-3).

EM alta resolución (Espectro 100, FAB^+): calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_1\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 392.259; encontrado 392.2591.

7. Procedimiento experimental

7.1.2.3.5 17 β -*N*-(4-fluorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6e)



Rendimiento: 65%; **Punto de fusión:** 218-219 °C

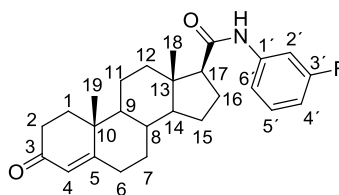
IR (Espectro 101, ATR, cm^{-1}): 3314 (N-H); 3062 (C=C-H); 2925, 2854 (C-H); 1660 (C=O α,β -insaturada y -CONH-); 1508 (-CONH- segunda banda); 1210 (C-O); 830 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 102, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.81 (s, 3H, 18- CH_3), 1.20 (s, 3H, 19- CH_3), 5.75 (s, 1H, H-4), 7.00 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-3' y H-5'), 7.12 (s, 1H, CONH-Ar), 7.49 (dd, $J = 8.8, 4.8$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 103, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.49 (C-18), 17.52 (C-19), 115.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 22.4$ Hz, C-3' y C-5'), 121.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 7.8$ Hz, C-2' y C-6'), 124.12 (C-4), 134.18 (d, $J_{\text{C-F}} = 2.6$ Hz, C-1'), 159.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 243$ Hz, C-4'), 171.03 (C-5), 171.11 (-CONH-), 199.67 (C-3).

EM (Espectro 104, IE, m/z): 409 $[\text{M}]^+$.

7.1.2.3.6 17 β -*N*-(3-fluorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6f)



Rendimiento: 56%; **Punto de fusión:** 225-226 °C

IR (Espectro 105, ATR, cm^{-1}): 3523, 3436 (N-H); 3136 (=C-H); 2941, 2907, 2853 (C-H); 1660 (C=O α,β -insaturada y -CONH-); 1607 (-C=C-); 1540 (-CONH- segunda banda); 867 (C-F), 779 (C-H balanceo).

RMN ^1H (Espectro 106, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.79 (s, 3H, 18- CH_3); 1.19 (s, 3H, 19- CH_3); 5.74 (s, 1H, H-4); 6.76 (tdd, $J = 8.2, 2.5, 1.1$ Hz, 1H, H-4'); 7.13-7.27 (m, 2H, H-5' y H-6'); 7.51 (dt, $J = 11.0, 2.2$ Hz, 1H, H-2'), 7.67 (sa, 1H, -CONH-).

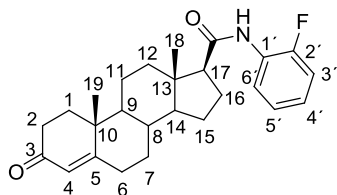
RMN ^{13}C (Espectro 107, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.48 (C-18), 17.42 (C-19), 107.38 (d, $J_{\text{C-F}} = 26.5$ Hz, C-2'), 110.69 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.3$ Hz, C-4'), 115.08 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.3$ Hz, C-6'), 123.99 (C-4), 130.05 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.4$ Hz, C-5'), 139.93 (d, $J_{\text{C-F}} = 11.0$ Hz, C-1'), 163.09 (d, $J_{\text{C-F}} = 244.4$ Hz, C-3'), 171.40 (C-5), 171.88 (-CONH-), 200.11 (C-3).

RMN ^{19}F (Espectro 108, CDCl_3): δ -111.59 (F-C3').

EM (Espectro 109, ESI $^+$ -MS, m/z): 410.26 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7. Procedimiento experimental

7.1.2.3.7 17 β -*N*-(2-fluorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6g)



Rendimiento: 70%; **Punto de fusión:** 119-121 °C

IR (Espectro 110, ATR, cm^{-1}): 3447 (N-H); 3022 (=C-H); 2945, 2888, 2885 (C-H alifático); 1674 (C=O α,β -insaturada y -CONH-); 1615 (-C=C-); 1521 (-CONH- segunda banda); 770 (C-F).

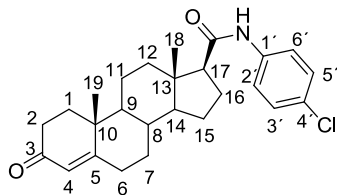
RMN ^1H (Espectro 111, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (s, 3H, 18- CH_3); 1.18 (s, 3H, 19- CH_3); 5.73 (s, 1H, H4); 6.98 – 7.14 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'); 7.23 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.30 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 112, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.37 (C-18), 17.49 (C-19), 114.81 (d, $J_{\text{C-F}} = 19.3$ Hz, C-3'), 121.88 (C-5'), 124.04 (C-4), 124.18 (d, $J_{\text{C-F}} = 7.7$ Hz, C-4'), 124.70 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.6$ Hz, C-6'), 126.53 (d, $J_{\text{C-F}} = 10.2$ Hz, C-1'), 152.40 (d, $J_{\text{C-F}} = 242.2$ Hz, C-2'), 171.17 (C-5), 171.23 (-CONH-), 199.76 (C-3).

RMN ^{19}F (Espectro 113, CDCl_3): δ -131.47 (F-C2').

EM (Espectro 114, ESI⁺-MS, m/z): 410.28 [M+H]⁺.

7.1.2.3.8 17 β -*N*-(4-clorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6h)



Rendimiento: 68%; **Punto de fusión:** 234-237 °C

IR (Espectro 115, ATR, cm^{-1}): 3419.31 (N-H); 3058.49 (=C-H); 2937.75, 2851.21 (C-H); 1658.51 (C=O α,β -insaturada y -CONH-); 1511.11 (-CONH- segunda banda); 828.29 (C-Cl).

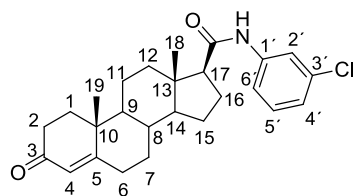
RMN ^1H (Espectro 116, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.79 (s, 3H, 18- CH_3); 1.20 (s, 3H, 19- CH_3); 5.75 (s, 1H, H4); 6.99 (sa, 1H, CONH-Ar); 7.27 (m, 2H, H-3', H-5' y CONH-Ar); 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 117, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.48 (C-18), 17.49 (C-19), 121.16 (C-2' y C-6'), 121.19 (C-4'), 124.09 (C-4), 129.08 (C-3' y C-5'), 136.82 (C-1'), 171.16 (C-5), 171.26 (-CONH-), 199.81 (C-3).

EM alta resolución (Espectro 118, FAB⁺): calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{Cl}_1\text{N}_1\text{O}_2$ [M+H]⁺ 426.2200; encontrado 426.2195.

7. Procedimiento experimental

7.1.2.3.9 17 β -*N*-(3-clorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6i)



Rendimiento: 62%; **Punto de fusión:** 139-141 °C

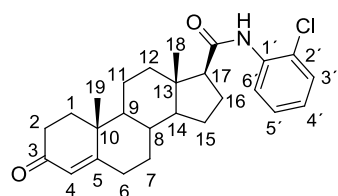
IR (Espectro 119, ATR, cm^{-1}): 3333 (N-H); 3075 (=C-H); 2941, 2886, 2852 (C-H); 1687 (-CONH-); 1645 (C=O α,β -insaturada); 1592 (-CONH- segunda banda); 870 (C-Cl) .

RMN ^1H (Espectro 120, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.79 (s, 3H, 18- CH_3), 1.19 (s, 3H, 19- CH_3), 0.75 (s, 3H, 18- CH_3), 1.02 (s, 3H, 19- CH_3), 5.73 (s, 1H, H-4), 7.05 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H, H-4'), 7.21 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'), 7.41 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H, H-6'), 7.55 (sa, 1H, CONH-Ar), 7.71 (t, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-2').

RMN ^{13}C (Espectro 121, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.48 (C-18), 17.44 (C-19), 117.84 (C-6'), 120.01 (C-2'), 124.02 (C-4'), 124.09 (C-4), 130.02 (C-5'), 134.68 (C-3'), 139.50 (C-1'), 171.37 (C-5), 171.57 (-CONH-), 200.04 (C-3).

EM (Espectro 122, ESI⁺-MS, m/z): 426.2 [M+H]⁺.

7.1.2.3.10 17 β -*N*-(2-clorofenilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6j)



Rendimiento: 60%; **Punto de fusión:** 209-212 °C

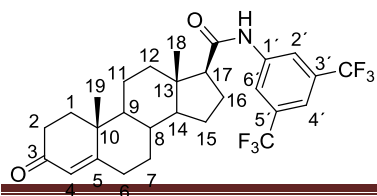
IR (Espectro 123, ATR, cm^{-1}): 3426 (N-H); 3228 (-OH); 2965, 2990, 2934, 2862, 2808 (C-H alifático); 1673 (-CONH-); 1592 (C=C); 1525 (-CONH- segunda banda); 1307 (C-O); 1055 (C-H alqueno); 1033 (C-Cl).

RMN ^1H (Espectro 124, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.79 (s, 3H, 18- CH_3); 1.19 (s, 3H, 19- CH_3); 5.73 (s, 1H, H-4); 7.02 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H, H-4'), 7.26 (td, $J = 7.4, 1.4$ Hz, 1H, H-5'), 7.36 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.55 (sa, 1H, CONH-Ar), 8.43 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, H-3').

RMN ^{13}C (Espectro 125, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.38 (C-18), 17.52 (C-19), 121.43 (C-6'), 124.10 (C-4), 124.41 (C-4'), 127.91 (C-5'), 129.03 (C-2'), 134.91 (C-1'), 170.99 (-CONH-), 171.09 (C-5), 199.58 (C-3).

EM (Espectro 126, ESI⁺-MS, m/z): 426.2 [MH]⁺.

7.1.2.3.11 17 β -*N*-[3,5-bis(trifluorometil)fenilcarbamoil]androst-4-en-3-ona (6k)



Rendimiento: 65%; **Punto de fusión:** 214-216 °C

7. Procedimiento experimental

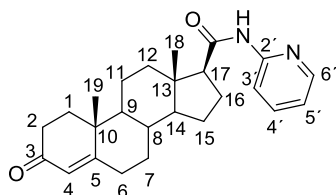
IR (Espectro 127, ATR, cm^{-1}): 3316 (N-H); 3105 (=C-H); 2941 (C-H alifático); 1660 (-CONH-); 1622 (-CONH- segunda banda); 1129 (C-F).

RMN ^1H (Espectro 128, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.82 (s, 3H, 18- CH_3); 1.22 (s, 3H, 19- CH_3); 5.77 (s, 1H, H4); 7.58 (s, 1H, H4'); 8.00 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.16 (s, 2H, H2' y H6').

RMN ^{13}C (Espectro 129, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.56 (C-18), 17.44 (C-19), 117.4 (c, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz, C-4'), 119.5, (d, $J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz, C-2' y C-6'), 124.1 (C-4), 126.0 (q, $J_{\text{C-F}} = 272$ Hz, CF_3), 132.4 (q, $J_{\text{C-F}} = 33.4$ Hz, C-3' y C-5'), 139.9 (C-1'), 171.7 (C-5), 171.8 (-CONH-), 200.3 (C-3).

EM (Espectro 130, ESI-MS para baja resolución y FAB^+ para alta resolución): calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_1\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 528.2337; encontrado 528.2332.

7.1.2.3.12 17 β -N-(2-piridinilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6l)



Rendimiento: 62%; **Punto de fusión:** 199-201 °C

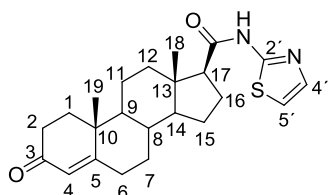
IR (Espectro 131, ATR, cm^{-1}): 3525 (N-H); 3021 (=C-H); 2947, 2924, 2853, 2884 (C-H); 1671 (-CONH- y C=O α,β -insaturada); 1572 (C=C); 1505 (-CONH- segunda banda); 791 (C-H balanceo).

RMN ^1H (Espectro 132, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.80 (s, 3H, 18- CH_3); 1.19 (s, 3H, 19- CH_3); 5.74 (s, 1H, H-4); 7.04 (ddd, $J = 7.4, 5.0, 1.0$ Hz, 1H, H-5'); 7.72 (ddd, $J = 8.5, 5.0, 1.7$ Hz, 1H, H-4'); 8.11 (sa, 1H, CONH-Ar); 8.29 - 8.18 (m, 2H, H-3' y H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 129, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.56 (C-18), 17.44 (C-19), 114.06 (C-3'), 119.77 (C-5'), 124.11 (C-4), 139.54 (C-4'), 147.82 (C-6'), 151.49 (C-2'), 170.91 (C-5), 171.55 (-CONH-), 199.52 (C-3).

EM (Espectro 134, ESI⁺-MS, m/z): 393.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.1.2.3.13 17 β -N-(1,3-tiazol-2-ilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6m)



Rendimiento: 71%; **Punto de fusión:** 209-211 °C

IR (Espectro 135, ATR, cm^{-1}): 3554.01 (N-H); 3061.26 (=C-H); 2980.86, 2964.30, 2933.84, 2923.75, 2884.66, 2854.89, 2869.73 (C-H); 1681.87 (C=O α,β -insaturada); 1666.39 (-CONH-); 1548.64 (-CONH- segunda banda); 1272.92 (C-O); 732.30 (C-H balanceo).

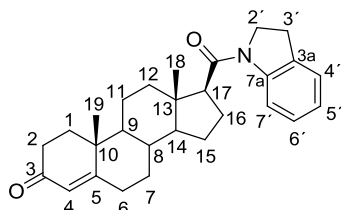
RMN ^1H (Espectro 136, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (s, 3H, 18- CH_3); 1.18 (s, 3H, 19- CH_3); 5.74 (s, 1H, H-4); 6.98 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-5'); 7.44 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-4'); 10.06 (sa, 1H, CONH-Ar).

7. Procedimiento experimental

RMN ^{13}C (Espectro 137, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.61 (C-18), 17.53 (C-19), 113.74 (C-5'), 124.17 (C-4), 136.95 (C-4'), 158.92 (C-2'), 170.78 (C-5), 170.86 (-CONH-), 199.53 (C-3).

EM (Espectro 138, IE, m/z): 398 $[\text{M}]^+$.

7.1.2.3.14 17β -(2,3-dihidro-1*H*-indol-1-il)carbonilandrosto-4-en-3-ona (6n)



Rendimiento: 45%; **Punto de fusión:** 234-235 °C

IR (Espectro 139, ATR, cm^{-1}): 3026 (=C-H); 2940, 2907, 2856, 2840 (C-H alcano); 1666 (-CONR-); 764 (C-H balanceo).

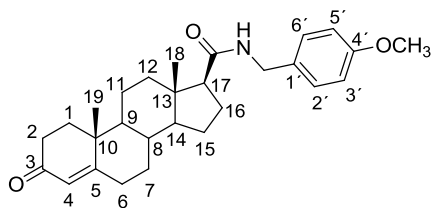
RMN ^1H (Espectro 140, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.89 (s, 3H, 18- CH_3); 1.18 (s, 3H, 19- CH_3); 3.14 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH_2 , H-3'); 4.15 (dc, $J = 18.2, 9.3$ Hz, 2H, CH_2 , H-2'); 5.73 (s, 1H, H-4), 6.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-4'); 7.18 (m, 2H, H-5' y H-6'); 8.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7').

RMN ^{13}C (Espectro 141, 100 MHz. CDCl_3): δ 14.13 (C-18), 17.49 (C-19), 28.25 (C-2'), 48.73 (C-3'), 117.64 (C-7'), 123.62 (C-4'), 124.00 (C-4), 124.57 (C-5'), 127.53 (C-6'), 131.51 (C-3a), 143.55 (C-7a), 171.19 (C-5), 172.24 (-CONH-), 199.63 (C-3).

EM alta resolución (Espectro 142, FAB^+): calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_1\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 418.2746; encontrado 418.2745.

Información sobre la cristalografía de Rayos X: páginas 230 y 231

7.1.2.3.15 17β -*N*-(4-metoxibencilcarbamoil)androsto-4-en-3-ona (6o)



Rendimiento: 73%; **Punto de fusión:** 212-214 °C

IR (Espectro 143, ATR, cm^{-1}): 3337 (N-H); 3052, 3026 (=C-H); 2942, 2904, 2852 (C-H); 1679 (C=O α,β -insaturada); 1642 (-CONH-); 1535 (-CONH- segunda banda).

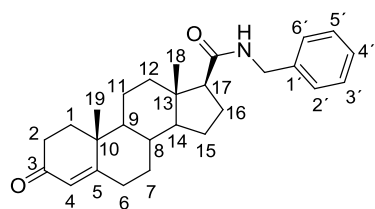
RMN ^1H (Espectro 144, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.73 (s, 3H, 18- CH_3); 1.16 (s, 3H, 19- CH_3); 3.78 (s, 3H, Ar- OCH_3); 4.37 (ddd, $J = 30.4, 14.5, 5.6$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.66 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, -CONH-); 5.70 (s, 1H, H-4); 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2' y H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 145, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.39 (C-18), 17.46 (C-19), 43.15 (CONH- CH_2 -Ar), 55.38 (Ar OCH_3), 114.12 (C-3' y C-5'), 123.96 (C-4), 129.29 (C-2' y C-6'), 130.36 (C-1'), 159.02 (C-4'), 171.18 (C-5), 172.40 (-CONH-), 199.57 (C-3).

7. Procedimiento experimental

EM (Espectro 146, ESI⁺-MS, *m/z*): 436.9 [M+H]⁺.

7.1.2.3.16 17β-*N*-(bencilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6p)



Rendimiento: 71%; **Punto de fusión:** 204-205 °C

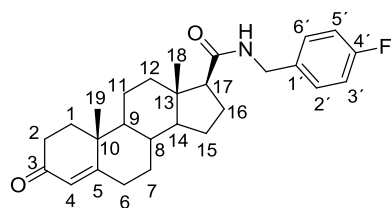
IR (Espectro 147, ATR, cm⁻¹): 3303 (N-H); 3083, 3057, 3029 (=C-H); 2937, 2891, 2860, 2839 (C-H); 1671 (C=O α,β-insaturada); 1629 (-CONH-); 1545 (-CONH- segunda banda); 721 (C-H segunda banda).

RMN ¹H (Espectro 148, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.79 (s, 3H, 18-CH₃); 1.21 (s, 3H, 19-CH₃); 4.49 (ddd, *J*₁ = 26.7, 14.6, 5.5 Hz, 2H, CONH-CH₂-Ar); 5.76 (m, 2H, H₄ y -CONH-), 7.28-7.36 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5' y H-6').

RMN ¹³C (Espectro 149, 100 MHz. CDCl₃): δ 13.40 (C-18), 17.46 (C-19), 43.72 (CONH-CH₂-Ar), 123.96 (C-4), 127.52 (C-4'), 127.96 (C-2' y C-6'), 128.77 (C-3' y C-5'), 138.80 (C-1'), 171.20 (C-5), 172.52 (-CONH-), 199.60 (C-3).

EM (Espectro 150, ESI⁺-MS, *m/z*): 406.9 [M+H]⁺.

7.1.2.3.17 17β-*N*-(4-fluorobencilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6q)



Rendimiento: 56%; **Punto de fusión:** 196-198 °C

IR (Espectro 151, ATR, cm⁻¹): (N-H); 3067 (=C-H); 2936, 2888, 2855 (C-H); 1673 (C=O α,β-insaturada); 1628 (-CONH-); 1548 (-CONH- segunda banda).

RMN ¹H (Espectro 152, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.74 (s, 3H, 18-CH₃); 1.18 (s, 3H, 19-CH₃); 4.42 (ddd, *J* = 33.2, 14.7, 5.8 Hz, 2H, CONH-CH₂-Ar); 5.71 (s, 1H, H-4); 5.79 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, -CONH-); 7.01 (ddd, *J* = 9.6, 5.8, 2.5 Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7.26 (ddd, *J* = 8.8, 3.7, 1.1 Hz, 2H, H-2' y H-6').

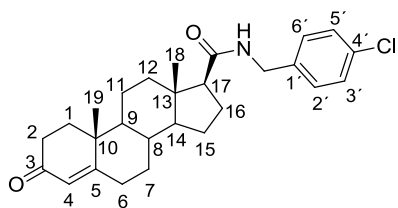
RMN ¹³C (Espectro 153, 100 MHz. CDCl₃): δ 13.41 (C-18), 17.46 (C-19), 42.95 (CONH-CH₂-Ar), 115.58 (d, *J*_{C-F} = 21.4 Hz, C-3' y C-5'), 123.97 (C-4), 129.62 (d, *J*_{C-F} = 8.1 Hz, C-2' y C-6'), 134.73 (d, *J*_{C-F} = 3.3 Hz, C-1'), 162.17 (d, *J*_{C-F} = 245.5 Hz, C-4'), 171.20 (C-5), 172.58 (-CONH-), 199.63 (C-3).

RMN ¹⁹F (Espectro 154, CDCl₃): δ -115.09 (F-C4').

EM (Espectro 155, ESI⁺-MS, *m/z*): 424.9 [M+H]⁺.

7. Procedimiento experimental

7.1.2.3.18 17 β -*N*-(4-clorobencilcarbamoil)androst-4-en-3-ona (6r)



Rendimiento: 89%; **Punto de fusión:** 176-177 °C

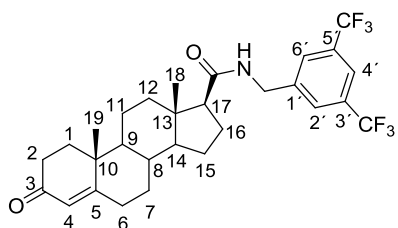
IR (Espectro 156, ATR, cm^{-1}): 3329 (N-H); 3055 (=C-H); 2974, 2941, 2912, 2886, 2854, 2871 (C-H); 1663 (C=O α,β -insaturada); 1641 (-CONH-); 1538 (-CONH- segunda banda).

RMN ^1H (Espectro 157, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.73 (s, 3H, 18- CH_3); 1.17 (s, 3H, 19- CH_3); 4.41 (ddd, $J = 40.6, 14.8, 5.8$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.70 (d, 1H, H-4); 5.83 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, -CONH-); 7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2' y H-6'); 7.25 (d, $J = 8.3$, 2H, H-3' y H-5').

RMN ^{13}C (Espectro 158, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.42 (C-18), 17.46 (C-19), 42.97 (CONH- CH_2 -Ar), 123.98 (C-4), 128.86 (C-3' y C-5'), 129.31 (C-2' y C-6'), 133.23 (C-4'), 137.51 (C-1'), 171.19 (C-5), 172.62 (-CONH-), 199.61 (C-3).

EM (Espectro 159, ESI $^+$ -MS, m/z): 440.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 442.7 $[\text{M}+2+\text{H}]^+$.

7.1.2.3.19 17 β -*N*-[3,5-bis(trifluorometil)bencilcarbamoil]androst-4-en-3-ona (6s)



Rendimiento: 57%; **Punto de fusión:** 80-82 °C

IR (Espectro 160, ATR, cm^{-1}): 3313 (N-H); 3059 (=C-H); 2940, 2855 (C-H); 1653 (C=O α,β -insaturada); 1621 (-CONH-); 1526 (-CONH- segunda banda); 1126 (C-F); 705 (C-H balanceo).

RMN ^1H (Espectro 161, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.73 (s, 3H, 18- CH_3); 1.18 (s, 3H, 19- CH_3); 4.57 (ddd, $J = 86.3, 15.5, 6.1$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.70 (s, 1H, H-4); 6.25 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, -CONH-); 7.75 (sa, 3H, H-2', H-6' y H-4').

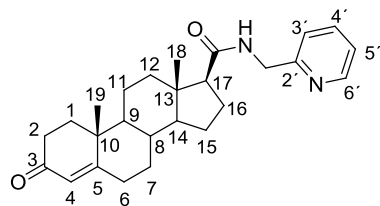
RMN ^{13}C (Espectro 162, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.26 (C-18), 17.31 (C-19), 42.59 (CONH- CH_2 -Ar), 121.18 (q, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz, C-4'), 123.26 (c, $J_{\text{C-F}} = 272.9$ Hz, CF_3), 123.86 (C-4), 127.72 (d, $J_{\text{C-F}} = 2.6$ Hz, C-2' y C-6'), 131.81 (c, $J_{\text{C-F}} = 33.3$ Hz, C-3' y C-5'), 141.12 (C-1'), 171.30 (C-5), 172.97 (-CONH-), 199.73 (C-3).

RMN ^{19}F (Espectro 163, CDCl_3): δ -62.87 (CF_3).

EM (Espectro 164, ESI $^+$ -MS, m/z): 542.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7. Procedimiento experimental

7.1.2.3.20 3 β -hidroxi-17 β -N-[(2-piridinilmetil)carbamoil]androst-4-en-3-ona (6t)



Rendimiento: 75%; **Punto de fusión:** 195-196 °C

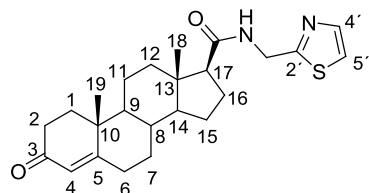
IR (Espectro 165, ATR, cm^{-1}): 3640, 3363 (N-H); 3059 (=C-H); 2963, 2939, 2905, 2852, 2829 (C-H alifático); 1650 (-CONH-); 1517 (-CONH- segunda banda), 1247 (C-O).

RMN ^1H (Espectro 166, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.71 (s, 3H, 18- CH_3); 1.18 (s, 3H, 19- CH_3); 4.55 (sexteto AB, $J = 5.1, 4.9$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.71 (s, 1H, H-4); 6.64 (sa, -CONH-); 7.18 (ddd, $J = 7.4, 5.0, 0.5$ Hz, 1H, H-5'); 7.25 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-3'); 7.64 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H, H-4'); 8.51 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6').

RMN ^{13}C (Espectro 167, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.32 (C-18), 17.48 (C-19), 43.88 (CONH- CH_2 -Ar), 122.31 (C-5'), 122.40 (C-3'), 123.97 (C-4), 136.83 (C-4'), 149.09 (C-6'), 156.78 (C-2'), 171.26 (C-5), 172.76 (-CONH-), 199.61 (C-3).

EM (Espectro 168, ESI⁺-MS, m/z): 407.9 [M+H]⁺.

7.1.2.3.21 17 β -N-[(1,3-tiazol-2-il)metilcarbamoil]androst-4-en-3-ona (6u)



Rendimiento: 57%; **Punto de fusión:** 195-197 °C

IR (Espectro 169, ATR, cm^{-1}): 3314 (N-H); 3060, 3082, 3060 (=C-H); 2968, 2942, 2925, 2910 (C-H); 1675 (C=O α,β -insaturada); 1648 (-CONH-); 1537 (-CONH- segunda banda), 724 (C-H balanceo).

RMN ^1H (Espectro 170, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.75 (s, 3H, 18- CH_3); 1.17 (s, 3H, 19- CH_3); 4.78 (ddd, $J = 58.9, 16.1, 5.9$ Hz, 2H, CONH- CH_2 -Ar); 5.73 (s, 1H, H-4); 6.28 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, -CONH-); 7.69 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-5'); 7.70 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-4').

RMN ^{13}C (Espectro 171, 100 MHz. CDCl_3): δ 13.37 (C-18), 17.50 (C-19), 41.04 (CONH- CH_2 -Ar), 119.61 (C-5'), 124.03 (C-4), 142.39 (C-4'), 167.72 (C-2'), 171.10 (C-5), 172.78 (-CONH-), 199.56 (C-3).

EM (Espectro 172, ESI⁺-MS, m/z): 413.9 [M+H]⁺.

7.2 Parte biológica: derivados de 17 β -N-arilcarbamoilandrost-4-en-3-ona (6a-6u)

7.2.1 Ensayo *in vitro*: actividad antiproliferativa en células cancerosas y sanas

La actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos **6a-6u** sobre las líneas celulares cancerosas LNCaP (adenocarcinoma prostático de humano, andrógeno-sensible), PC-3 (carcinoma prostático de

7. Procedimiento experimental

células pequeñas, andrógeno-insensible), así como células sanas PBMC (células polimorfonucleares de sangre de rata) y células gingivales, se llevaron a cabo por la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan en la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM. Para todos los casos, la actividad antiproliferativa se midió por medio del método de Sulforrodamina B (SRB). Los fármacos de referencia, finasterida, flutamida, ketoconazol y etopósido fueron adquiridos de la casa Sigma-Aldrich.

7.2.1.1 Determinación de la actividad antiproliferativa en células LNCaP

Las células andrógeno-sensibles de cáncer de próstata de humano, fueron adquiridas de ATCC (American Type Culture Collection) y mantenidas en un medio de cultivo RPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 4.5 g/L de D-glucosa, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 1 mM de piruvato de sodio, 1% (p/v) de penicilina/estreptomina y 10% (v/v) de suero fetal bovino. Las células LNCaP se hicieron crecer, de manera regular, a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Después de determinar la confluencia, estas células fueron agregadas en una microplaca de 96 pozos a una densidad de 3 X 10⁴ células/mL. Antes de agregar los compuestos, las células se cultivaron por 72 horas en un medio de cultivo RPMI, el cual contiene L-glutamina y 1 mM de piruvato de sodio, pero no contiene rojo de fenol y está libre de cualquier hormona esteroideal (Gibco Invitrogen Co). Después, las células LNCaP fueron tratadas con cada compuesto a una concentración de 50 µM en presencia o ausencia de los andrógenos T y DHT (promueven la proliferación de estas células) a una concentración de 0.1 µM. Los fármacos finasterida, flutamida y ketoconazol se usaron a las mismas concentraciones. Un grupo de células control fueron tratadas únicamente con DMSO (vehículo).

Posteriormente, se realizó la incubación por 48 h. En este punto, la microplaca se lavó con agua y se secó al aire libre. Las células fueron fijadas con ácido tricloroacético y teñidas con una solución 0.4% (p/v) de SRB. El exceso de SRB se removió, mediante lavados, con una solución acuosa de ácido acético al 1% (v/v). Las microplacas se secaron y el colorante adherido se solubilizó con la adición de 100 µL de base Tris. Finalmente, la microplaca se agitó en una incubadora para placas durante 5 min con la finalidad de homogenizar el contenido en cada pozo y se llevaron a cabo lecturas a una longitud de onda de 515 nm, en un lector ELISA (Bio-Tex Instruments). El porcentaje de crecimiento celular se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del crecimiento celular (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{absorbancia de la muestra})}{(\text{absorbancia del vehículo})} \right] \times 100$$

Ecuación 1. Determinación de la inhibición del crecimiento celular por el método SRB.

7. Procedimiento experimental

7.2.1.2 Determinación de la actividad antiproliferativa en células PC3

Las células andrógeno-insensibles de cáncer de próstata de humano se cultivaron en un medio RPMI-1640, enriquecido con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de Penicilina G, 100 µg/mL de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales. Estas células se incubaron a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Posteriormente, se tomaron 100 µL de células para tener 10,000 en cada pozo y se incubaron por 24 h. Se preparó una solución stock en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada compuesto a evaluar, así como de los fármacos ketoconazol y etoposido; dicha solución se adicionó a cada pozo de la línea celular en 100 µL de medio de cultivo, quedando una solución final de cada compuesto a una concentración de 50 µM. Posteriormente, las células se incubaron por 48 horas a una temperatura de 37°C con una atmosfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Por otro lado, se preparó un blanco que consistió de un pozo que contenía únicamente medio de cultivo.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se procedió a la fijación de las células *in situ* por medio de la adición de 50 µL de ácido tricloroacético frío al 50% (p/v) y se incubaron por 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y se hicieron cinco lavados con agua ionizada para después dejar secar por 24 horas. Posteriormente, se realizó el teñido adicionando 100 µL de SRB (0.4% p/v en ácido acético) a cada pozo, se mantuvo en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se hicieron lavados con ácido acético al 1% para después dejar secar por 24 h. Las células fijadas se re-suspendieron utilizando 10 mM de buffer Tris y se agitaron por 5 minutos. Finalmente, se llevaron a cabo lecturas a una longitud de onda de 515 nm utilizando un lector ELISA (Bio-Tex Instruments). El porcentaje de crecimiento celular se calculó de acuerdo a la Ecuación 1.

7.2.1.3 Determinación de la actividad antiproliferativa en células sanas (células PBMC y gingivales)

7.2.1.3.1 Células PBMC

Para la extracción de las células polimorfonucleares de sangre de rata (PBMC, por sus siglas en inglés) se utilizaron ratas Wistar de entre 250-300 g de peso, las cuales se anestesiaron, intraperitonealmente, con pentobarbital sódico. Una vez anestesiadas, con una jeringa cargada de 1 mL de heparina se hizo una punción cardiaca para tomar 9 mL de sangre y se agitó para evitar coagulación de la misma. Posteriormente, 3 mL de esta sangre se depositaron lentamente dentro de un tubo Falcon, el cual se llenó con 3 mL de solución Ficoll-Hypaque. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente, empezando a 500 rpm e incrementando la velocidad hasta 2,000 rpm por un periodo de 20 min. La fracción de células mononucleares se recolectó usando una pipeta estéril y depositándolas en tubos Falcon, a los cuales se les agregó solución PBS para centrifugar, nuevamente, a 2,500 rpm por un periodo de 20 min. El

7. Procedimiento experimental

sobrenadante fue decantado y el pellet se suspendió en una solución PBS para centrifugar una vez más con la finalidad de remover cualquier remanente. El pellet de células se suspendió en un medio RPMI 1640 y la viabilidad celular se determinó por medio del método de azul de tripano. La densidad celular de células PBMC se ajustó a 1×10^6 células/mL.

De la suspensión de células PBMC, 100 μ L de una alícuota fue depositada en cada pozo de una microplaca de 96 pozos. Las células fueron incubadas por 1 h. Después, fueron tratadas con 100 μ L de cada compuesto a una concentración de 50 μ M. Un grupo de células control fueron tratadas únicamente con DMSO (vehículo). Posteriormente, se realizó la incubación por 48 h. En este punto, la microplaca se lavó con agua y se secó al aire libre. Las células fueron fijadas con una solución acuosa de ácido tricloroacético frío al 50 % (v/v). Se realizó una incubación a 4°C por 1 h para después realizar lavados con una solución acuosa de ácido acético al 1% (v/v). Las células fijadas se tiñeron con una solución 0.4% (p/v) de SRB. El exceso de SRB se removió mediante lavados con una solución acuosa de ácido acético al 1 % (v/v). Las microplacas se secaron y el colorante adherido se solubilizó con la adición de 100 μ L de base Tris. Finalmente, la microplaca se agitó en una incubadora para placas por 5 min con la finalidad de homogenizar el contenido en cada pozo. Finalmente, se llevaron a cabo lecturas a una longitud de onda de 515 nm en un lector ELISA (Bio-Tex Instruments). El porcentaje de crecimiento celular se calculó de acuerdo a la Ecuación 1.

7.2.2 Ensayo *in vitro*: actividad inhibitoria de los derivados de 17 β -N-arilcarbamoilandrosta-4-en-3-ona sobre las enzimas 5 α -reductasa 1 y 2

7.2.2.1 General

Estos ensayos se llevaron a cabo por el grupo de investigación de la Dra. Marisa Cabeza Salinas en el laboratorio de hormonas del Departamento de Sistemas Biológicos en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X). Todos los ensayos en los que se utilizaron animales fueron aprobados por el comité de uso y cuidado de animales de la misma universidad; mientras que el uso del tejido prostático de humano fue aprobado por el comité de ética del Hospital General de la Ciudad de México. La enzima 5 α -reductasa tipo 1 (5 α R1) fue aislada del hígado de ratón; mientras que la enzima 5 α -reductasa tipo 2 (5 α R2) fue aislada de la próstata sana de un paciente de 57 años, el cual murió debido a un infarto del miocardio.

7. Procedimiento experimental

7.2.2.2 Aislamiento de la enzima 5 α R1

Dos hígados de rata de entre 15-30 g de peso fueron triturados usando un buffer A en un molino de tejidos IKA A11. El tejido se homogenizó y la suspensión fue centrifugada a 10,000 g durante 30 min a 0°C, en una centrífuga Beckman L70K, obteniéndose un pellet. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de nylon y se centrifugó de nuevo a 10,000 g por 60 min. El pellet microsomal se suspendió en cinco volúmenes de buffer A. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 10,000 g por 30 min y el pellet fue resuspendido con el buffer A para dar una concentración final de 20 mg de proteína/mL. Esta suspensión microsomal se mantuvo a -80°C.

7.2.2.3 Aislamiento de la enzima 5 α R2

La glándula prostática de humano fue homogenizada en un equipo Ultra-Turrax IKA T18. Los homogenizados se centrifugaron a 1,500 g por 60 minutos en un rotor SW60 Ti. Los pellets se resuspendieron en buffer A y se almacenaron a -70°C. Por el método de Bradford, se determinó que esta suspensión tiene una concentración final de proteína de 5 mg/mL.

7.2.2.4 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) sobre las enzimas 5 α R1 y 5 α R2

Los compuestos sintetizados se disolvieron en metanol y se realizaron diluciones sucesivas que fueron desde 10⁻⁴ hasta 10⁻¹¹ M. Adicionalmente, a los tubos que contenían los derivados esteroidales, se añadió T[³H] a una concentración final de 2 nM; mientras que los tubos control sólo incluían a la T[³H] a la misma concentración. Los tubos se colocaron en un baño de agua en atmósfera de nitrógeno con la finalidad de evaporar totalmente el disolvente; enseguida, se añadieron 720 μ L de buffer de fosfatos 40 mM (pH= 6.5) y 80 μ L de la fracción microsomal a una concentración de 360 μ g/mL de proteína. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de DTT (1mM) y 100 μ L de NADPH (2 mM) con los que se dio inicio la reacción. En este punto, los tubos se incubaron a 37°C por una hora. Finalizado este tiempo, se agregó 1 mL de diclorometano para detener la reacción. La fase orgánica se extrajo y se hicieron otros tres lavados para obtener los esteroides T[³H] y DHT[³H]. Las fases orgánicas combinadas se evaporaron en un baño de agua. El sólido formado se suspendió con 0.5 mL de metanol y se hicieron aplicaciones en una placa de cromatografía en capa delgada. Adicionalmente, se aplicaron estándares de T y DHT para identificar la DHT[³H] formada. La cromatoplaque se eluyó tres veces en un sistema CHCl₃/Acetona (9:1).

La visualización e identificación de las manchas y los estándares se realizó en un aparato de luz UV ($\lambda = 254$ nm) y, posteriormente, se revelaron con una solución de ácido fosfomolibdico en metanol al 8%

7. Procedimiento experimental

(p/v). Se marcó y cortó la zona correspondiente a la DHT[³H]. Después, estos cortes se colocaron en viales a los que posteriormente se adicionaron 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold (Packard) y finalmente, se determinó la radioactividad producida por el andrógeno marcado en el analizador de centelleo marca Bioscanner AR2000 (Bioscan, Washington D.C., E.U). La actividad enzimática se calculó con base a los controles. Cada experimento se realizó por duplicado.

7.2.3 Ensayo *in vivo*: actividad antiandrogénica de los derivados de 17β-N-arilcarbamoilandro-4-en-3-ona en próstata de hámsteres gonadectomizados

Se determinó el efecto antiandrogénico de los compuestos **6a**, **6e**, **6h**, **6k** y **6m** sobre el peso de la próstata de hámsteres gonadectomizados de la cepa *Syrian Golden* (entre 150-200 g de peso). Los hámsteres se dividieron en 8 grupos de 3 animales por experimento. Estos fueron gonadectomizados 30 días previos al experimento y, diariamente por 6 días, se les administró por vía subcutánea:

- Grupo 1: 200 µL de aceite de sésamo (vehículo).
- Grupo 2: 200 µg de testosterona en 200 µL de aceite de sésamo
- Grupo 3: 200 µg de Finasterida más 200 µg de testosterona en 200 µL de aceite de sésamo.
- Grupos 4, 5, 6, 7 y 8: 200 µg de testosterona más 200 µg de los esteroides **6a**, **6e**, **6h**, **6k** y **6m**.

Después del tratamiento, los hámsteres se sacrificaron en una cámara de CO₂ y, posteriormente, se realizó la disección de las próstatas para ser pesadas.

7. Procedimiento experimental

7.3 Parte Química: derivados del compuesto líder RM-532-105 (14a-14n)

La síntesis de los derivados **14a-14n** se realizó durante una estancia de investigación en el *Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL)*, Québec, Canadá, bajo la asesoría del Dr. Donald Poirier.

Los compuestos fueron preparados con reactivos de la casa Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canadá). Los disolventes comunes usados fueron obtenidos de la casa Fisher Scientific (Montreal, QC, Canadá), mientras que los disolventes anhidros, como el tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM), dimetilsulfóxido (DMSO) y tolueno, fueron obtenidos también de la casa Sigma-Aldrich. La cromatografía en capa delgada así como la cromatografía en columna fueron realizadas en sílica gel de 0.20 mm. Para la primera, se utilizaron placas Silice Gel 60 F254 mientras que para la segunda se utilizó sílica gel R10030B de poro de 230-400 Å. La síntesis del compuesto **RM-532-105** se preparó de acuerdo a la metodología reportada en la referencia 78.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron obtenidos a 400 MHz para ^1H y 100.6 MHz para ^{13}C en un aparato Bruker Avance 400 digital (Billerica, MA, E.U). Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y están referidos al disolvente, que fue cloroformo deuterado (CDCl_3 , 7.26 ppm para ^1H y 77.0 ppm para ^{13}C). Las señales en RMN ^1H están reportadas como señal simple (s), doble (d), triple (t), cuádruple (q), múltiple (m) y simple ancha (sa).

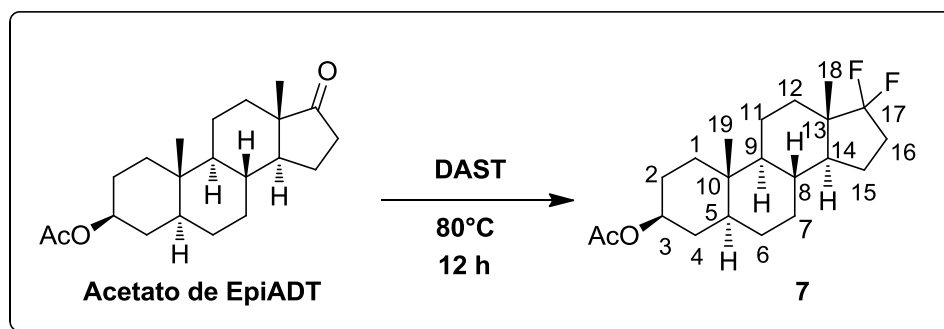
Los espectros de masas de baja resolución se obtuvieron sólo para los compuestos finales. Éstos se realizaron en un espectrómetro Shimadzu LCMS-2020 mediante la técnica de ionización química a presión atmosférica (APCI, por sus siglas en inglés). Por otro lado, los espectros de masas de alta resolución para los compuestos **14a** y **14b**, fueron provistos por el Dr. Pierre Audet del Departamento de Química de la *Université Laval*.

La pureza de los compuestos finales se determinó por HPLC en un aparato Shimadzu Prominence (Kyoto, Japón) usando un detector fotodiodo SPD-M20A. Para la fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa C18 (250 mm X 4.5 mm, 5 μm), mientras que para la fase móvil se utilizó un gradiente de metanol/agua (80:20). El detector UV se ajustó a una longitud de onda de 190 nm.

7. Procedimiento experimental

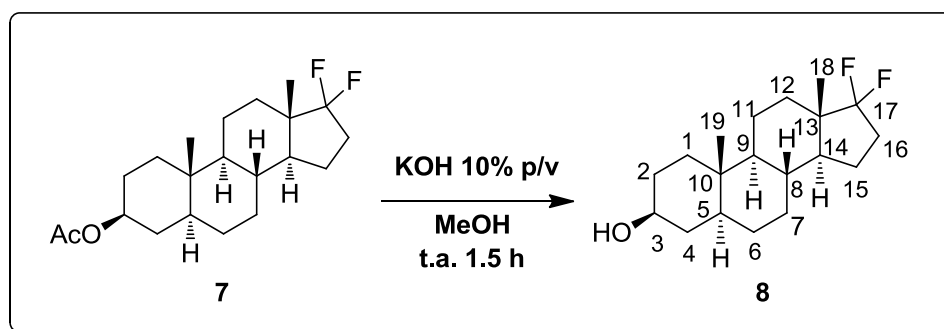
7.3.1 Descripción de la síntesis

7.3.1.1 Síntesis de (3β)-acetiloxi-17,17-difluoro(7)



En un vial de polietileno de 10 mL provisto con tapa, se pesaron 150 mg (0.52 mmol) de acetato de epiandrosterona (epiADT) y se adicionaron 0.5 mL de trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST). El vial se cerró herméticamente y la reacción se mantuvo a 80°C con agitación constante por toda la noche. La solución color negro resultante, se diluyó con acetato de etilo (5 mL) y se le adicionó sílica gel con el fin de detener la reacción. La solución se filtró sobre celita, el filtrado se fraccionó y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo oleoso obtenido se purificó por cromatografía de columna por gradiente, con una mezcla de hexano-acetato de etilo, obteniéndose un sólido amorfo ligeramente amarillo. **Rendimiento:** 68%. **RMN ¹H** (Espectro 173, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.83 (s, 3H, 19β-CH₃), 0.85 (d, $J_{H,F} = 2.0$ Hz, 3H, 18β-CH₃), 0.87-1.85 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.16 (m, 16-CH₂), 2.01 (s, 3β-COCH₃), 4.63-4.61 (m, 3α-H). **RMN ¹³C** (Espectro 174, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 11.2 (C-19), 13.4 (C-18), 73.5 (C-3), 132.5 (dd, $J_{C-F} = 259.2, 251.1$ Hz, C-17), 170.6 (3β-COOAc),

7.3.1.2 Síntesis de (3β)-hidroxi-17,17-difluoroandrostano (8)



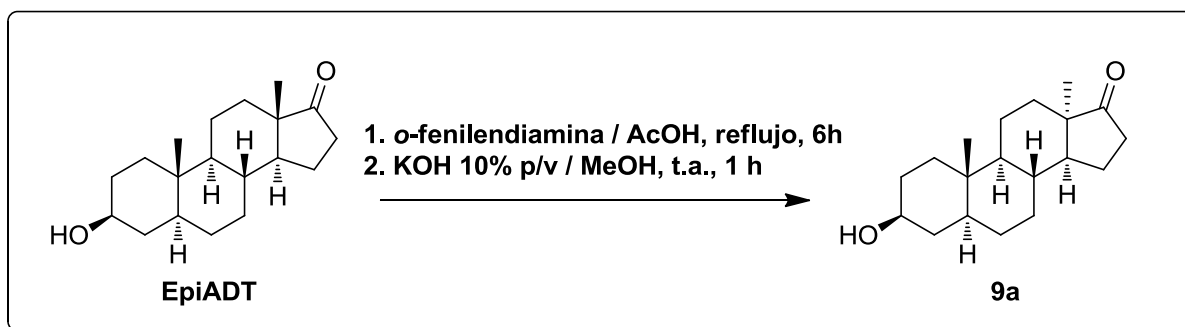
En un matraz de fondo redondo de 10 mL se pesaron 110 mg (0.31 mmol) del compuesto 7, el cual se disolvió con 4 mL de metanol y 3 mL de una solución metanólica de hidróxido de potasio (10% p/v). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante a temperatura ambiente por 1.5 h, después de las

7. Procedimiento experimental

cuales se depositó en una mezcla agua-hielo (50 mL). El precipitado formado se filtró al vacío y se lavó con agua destilada. El sólido blanco obtenido cuenta con la suficiente pureza para la siguiente reacción.

Rendimiento: 95%. **RMN ^1H** (Espectro 175, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.81 (s, 3H, $19\beta\text{-CH}_3$), 0.86 (d, $J_{\text{H,F}} = 2.0$ Hz, 3H, $18\beta\text{-CH}_3$), 0.87-1.85 (m, CH y CH_2 sin asignar), 2.16 (m, 16-CH_2), 3.59 (m, $3\alpha\text{-H}$).

7.3.1.3 Síntesis de (3β)-hidroxi- 13α -androsta-17-ona (9a)

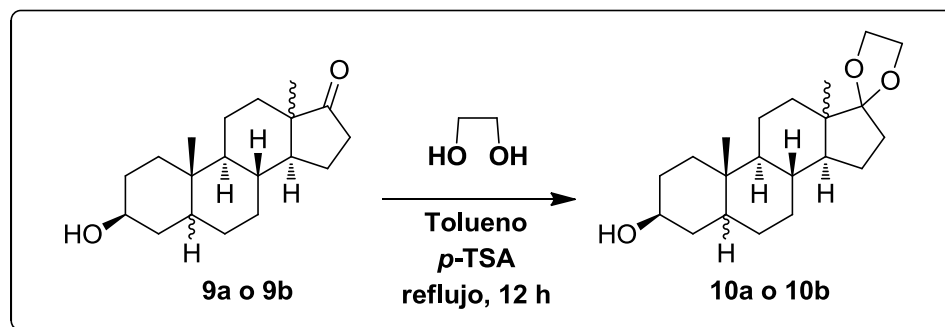


En un matraz de fondo redondo de 50 mL se pesaron 500 mg de epiandrosterona (epiADT, 0.58 mmol) y 225 mg de *o*-fenilendiamina (2.08 mmol) y se disolvieron en 10 mL de ácido acético glacial. Esta solución se llevó a 130°C por 6 h. En este punto, la mezcla de reacción se depositó, lentamente, en una mezcla agua-hielo-sal (100 mL) y se dejó reposar hasta la aparición de un sólido amarillo claro, el cual, se filtró por succión y se lavó con agua helada. Una vez seco el filtrado, éste se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo.

El sólido obtenido, que corresponde al derivado acetilado en posición $\text{C}3\beta$, se pesó en un matraz de 25 mL y se disolvió en 3 mL de metanol. A esta solución se agregaron 2 mL de solución metanólica de KOH (10% p/v) y se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, la mezcla de reacción se depositó en 50 mL de agua-hielo. El precipitado formado se filtró al vacío y se le hicieron lavados con agua destilada. El sólido blanco resultante cuenta con la pureza suficiente para ser utilizado en la siguiente reacción. Los datos espectroscópicos del Espectro 176 (Página 249) de este compuesto coinciden con los reportados en la referencia 90.

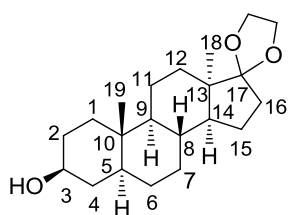
7. Procedimiento experimental

7.3.1.4 Metodología general para la protección del grupo carbonilo en posición C-17



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se pesó el esteroide **9a** (100 mg, 0.34 mmol) o la 3 β -hidroxi-5 β -androsterona (**9b**, 150 mg, 0.52 mmol); así como etilenglicol (10.0 eq.) y ácido *p*-toluensulfónico (0.1 eq.). Los reactivos se disolvieron en 5 mL de tolueno anhidro y se adaptó una trampa de Dean-Stark. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética a reflujo por 12 h. Posteriormente, la solución obtenida se depositó en una mezcla hielo-agua (100 mL). El residuo se extrajo con acetato de etilo (3 X 20 mL) y se dieron lavados con una solución al 20% (p/v) de acetato de sodio (3 X 20 mL) y salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Finalmente, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna eluyendo con una mezcla hexano-acetato de etilo.

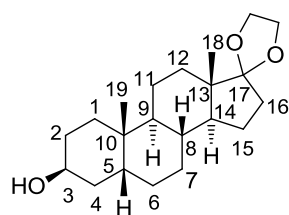
7.3.1.4.1 (3 β ,5 α ,13 α)-androstan-17,17-(etilendioxi)-3-ol (**10a**).



Rendimiento: 79%

RMN ¹H (Espectro 177, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.74 (s, 19 β -CH₃), 0.94 (s, 18 α -CH₃), 0.60 (m, CH y CH₂ sin asignar), 3.59 (m, 3 α -H), 3.88 (m, OCH₂CH₂O).

7.3.1.4.2 (3 β ,5 β)-androstane-17,17-(etilendioxi)-3-ol (**10b**).

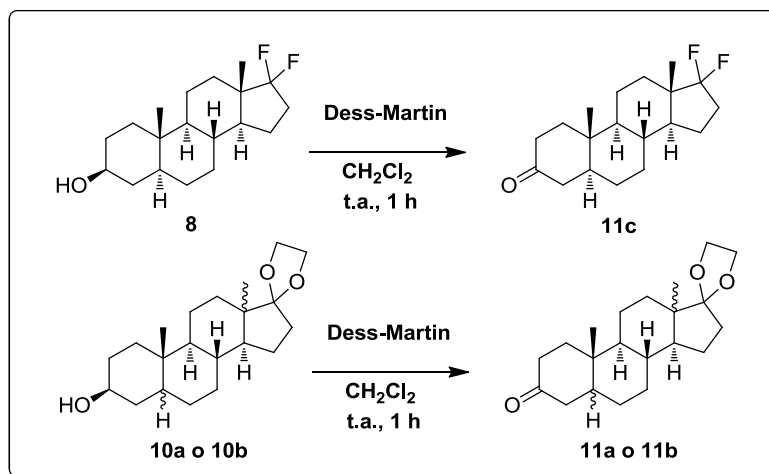


Rendimiento: 74%

RMN ¹H (Espectro 178, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.83 (s, 19 β -CH₃), 0.96 (s, 18 β -CH₃), 1.00-1.99 (m, CH y CH₂, sin asignar), 3.88 (m, OCH₂CH₂O), 4.09 (m, 3 α -H).

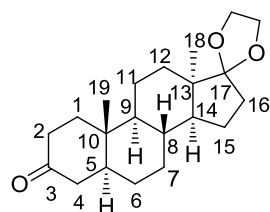
7. Procedimiento experimental

7.3.1.5 Metodología general para la oxidación del grupo carbinol en la posición C3β para la obtención de los intermediarios 11a-11c



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se pesó, por separado, el compuesto **10a** (90 mg, 0.27 mmol), el compuesto **10b** (130 mg, 0.39 mmol) y el esteroide **8** y se disolvió en diclorometano (5 mL). Posteriormente, se agregó, a esta solución, el reactivo de Dess Martin periodinano (en una relación molar igual a 1.3). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 1 h. La suspensión blanca obtenida se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo (20 mL) y se dieron lavados sucesivos con solución saturada de bicarbonato de sodio (4 X 20 mL) y salmuera. La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por columna eluyendo por gradiente de hexano-acetato de etilo.

7.3.1.5.1 (5α,13α)-androstan-17,17-(etilendioxi)-3-ona (**11a**).



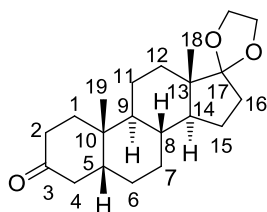
Rendimiento: 44%

RMN ¹H (Espectro 179, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.94 (s, 19β-CH₃), 0.95 (s, 18α-CH₃), 0.65-2.20 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.40 (m, 4-CH), 3.89 (m, OCH₂CH₂O).

7. Procedimiento experimental

7.3.1.5.2 5 β -androstan-17,17-(etilendioxi)-3-ona (11b).

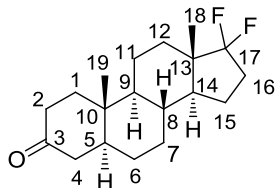
Rendimiento: 84%



RMN ^1H (Espectro 180, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.87 (s, 19 β - CH_3), 1.02 (s, 18 β - CH_3), 1.05-2.19 (m, CH y CH_2 sin asignar), 2.68 (t, $J = 14.6, 5.3$ Hz, 4-CH), 3.91 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

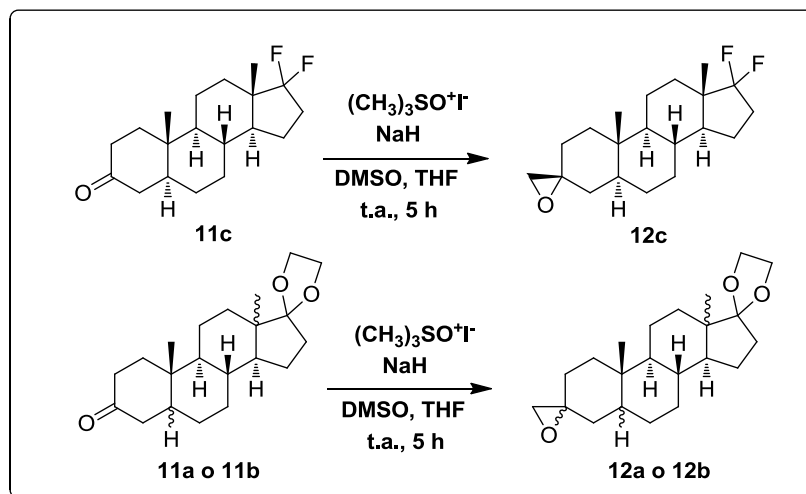
7.3.1.5.3 17,17-difluoroandrostan-3-ona (11c).

Rendimiento: 83%



RMN ^1H (Espectro 181, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.80 (m, CH sin asignar), 0.95 (m, CH sin asignar), 1.30-1.75 (m, CH y CH_2), 0.89 (d, $J_{\text{H,F}} = 2.0$ Hz, 3H, 18 β - CH_3), 1.02 (s, 3H, 19 β - CH_3), 2.00-2.43 (m, CH y CH_2 , sin asignar).

7.3.1.6 Metodología general para epoxidación de la cetona en C-3 mediante la reacción de Corey-Chaykovsky para la obtención de los intermediarios 12a-12c

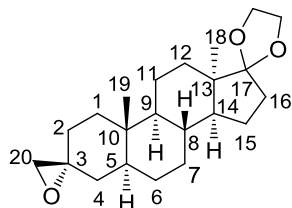


En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se disolvieron 2.0 equivalentes de yoduro de trimetilsulfoxonio en 3 mL de DMSO seco en una atmosfera de argón. A esta solución se agregaron, cuidadosamente con agitación magnética, 2.0 equivalentes de hidruro de sodio observándose el desprendimiento de gas. La solución se mantuvo en agitación magnética constante por una hora. En este punto, se adicionó el esteroide **11a** (40 mg, 0.12 mmol), el compuesto **11b** (100 mg, 0.30 mmol) o el esteroide **11c** (80 mg, 0.26 mmol) (según corresponda) disuelto en THF anhidro (1 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente por 5 h. Posteriormente, la solución ligeramente amarilla se depositó en hielo-sal (100 mL). El precipitado formado se filtró por succión y se

7. Procedimiento experimental

lavó con agua. Finalmente, se realizó la purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de hexano-acetato de etilo.

7.3.1.6.1 (5 α ,13 α ,3*R*)-2'*H*-diespiro[1,3-dioxolan-2,17'-androstano-3',2''-oxirano] (12a)

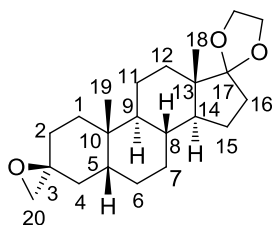


Rendimiento: 72%;

RMN ¹H (Espectro 182, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.77 (s, 19 β -CH₃), 0.95 (s, 18 α -CH₃), 0.79-2.08 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.61 (s, 20-CH₂), 3.88 (m, OCH₂CH₂O).

7.3.1.6.2 (5 β ,3*S*)-2'*H*-diespiro[1,3-dioxolan-2,17'-androstano-3',2''-oxirano] (12b).

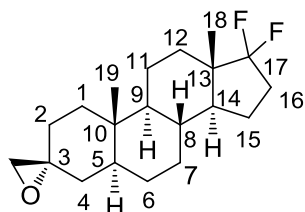
Rendimiento: 79%



RMN ¹H (Espectro 183, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (s, 19 β -CH₃), 0.99 (s, 18 α -CH₃), 1.03-2.01 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.62 (s, 20-CH₂), 3.88 (m, OCH₂CH₂O).

7.3.1.6.3 (5 α ,3*R*)-17,17-difluoro-espiro[androstano-3,2'-oxirano] (12c).

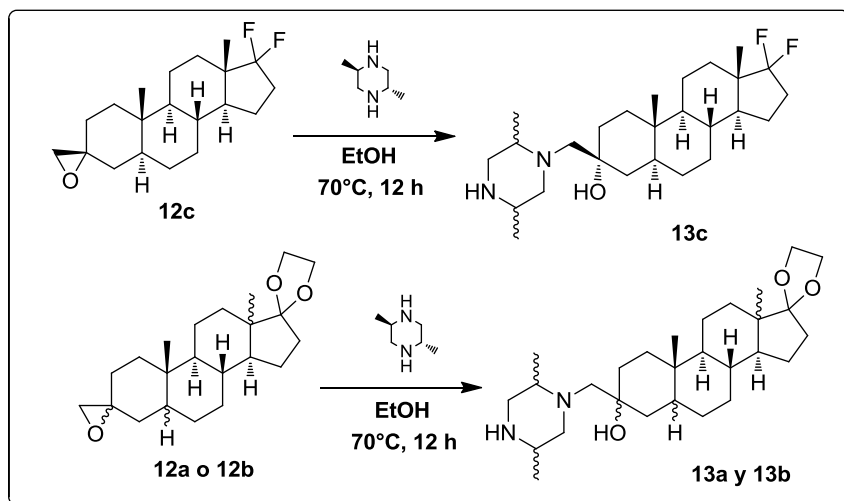
Rendimiento: 75%



RMN ¹H (Espectro 184, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (s, 3H, 19 β -CH₃), 0.87 (d, $J_{H,F}$ = 2.0 Hz, 18 β -CH₃), 0.90-1.73 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.00-2.24 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.62 (s, 20-CH₂).

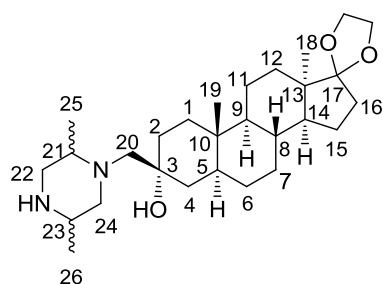
7. Procedimiento experimental

7.3.1.7 Metodología general para la apertura del oxirano en C-3 con *trans*-2,5-dimetilpiperazina para la preparación de los intermediarios 13a-13c



En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se pesó, por separado, el compuesto **12a** (28 mg, 0.08 mmol), **12b** (80 mg, 0.23 mmol) o el intermediario **12c** (40 mg, 0.12 mmol) y se disolvió en 5 mL de etanol anhidro. Posteriormente, se agregaron 5 equivalentes de *trans*-2,5-dimetilpiperazina. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante a 70°C por 12 horas. Después, la solución se depositó en una mezcla agua-hielo (50 mL). El precipitado formado se filtró al vacío y se dieron lavados con agua. Finalmente, el sólido se purificó por cromatografía en columna eluyendo, por gradiente con una mezcla diclorometano-metanol-TEA (96:2:2).

7.3.1.7.1 (3 α ,5 α ,13 α)-3-[[*trans*-2,5-dimetilpiperazin-1-il]metil]-17,17-(etilendioxi)-androstan-3-ol (**13a**).



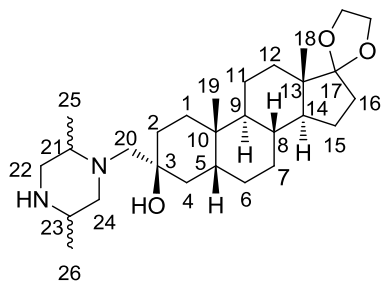
Rendimiento: 54%

RMN ¹H (Espectro 185, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.67 (s, 19 β -CH₃), 0.94 (s, 18 α -CH₃), 0.98-1.01 (m, 2 x CH₃CH), 1.10-2.01 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.29-2.31 (m, 1H), 2.51-2.62 (m, 2 x CH₃CH), 2.82-2.87 (m, 1H), 2.88-2.93 (m, 1H), 3.88 (m, OCH₂CH₂O).

7. Procedimiento experimental

7.3.1.7.2 (3 β ,5 β)-3-[[*trans*-2,5-dimetilpiperazin-1-il]metil]-17,17-(etilendioxi)androstan-3-ol (13b).

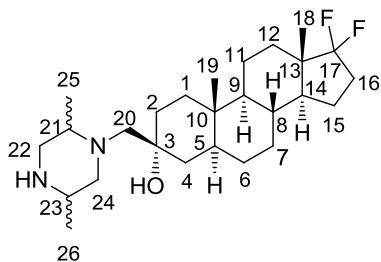
Rendimiento: 50%;



RMN ^1H (Espectro 186, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (s, 19 β - CH_3), 0.96 (s, 18 α - CH_3), 0.98-1.01 (m, 2 x CH_3CH) 1.02-2.10 (m, CH y CH_2 sin asignar), 2.30 (m, 1H), 2.51-2.56 (m, 2 x CH_3CH), 2.72 (m, 1H) 2.82-2.87 (m, 2H), 3.84-3.96 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

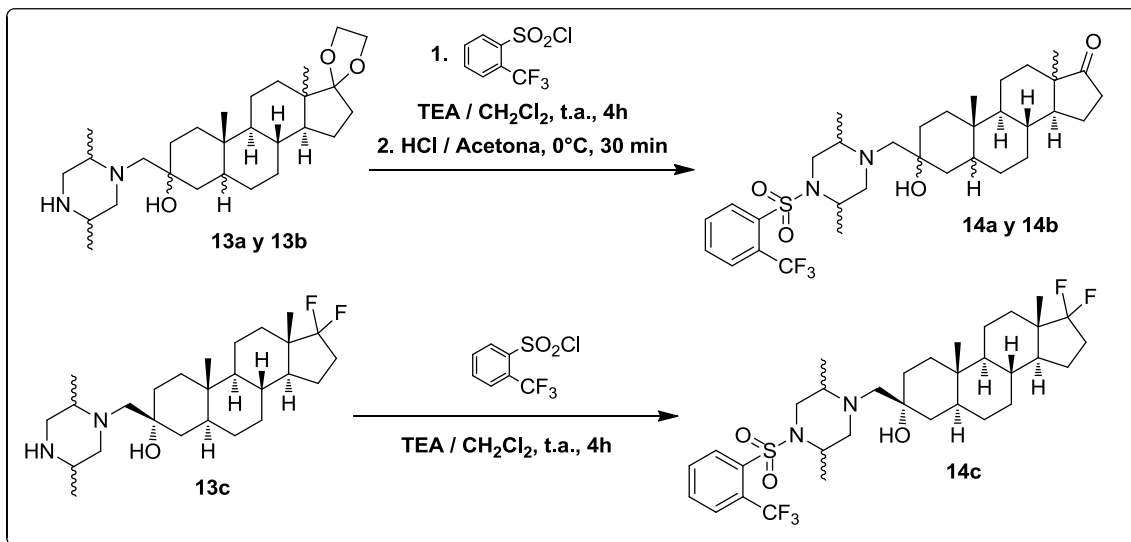
7.3.1.7.3 (3 α ,5 α)-3-[[*trans*-2,5-dimetilpiperazin-1-il]metil]-17,17-difluoroandrostan-3-ol (13c).

Rendimiento: 57%



RMN ^1H (Espectro 187, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.75 (s, 19- CH_3), 0.85 (d, $J_{\text{H,F}}$ = 2.0 Hz, 18 β - CH_3), 0.98-1.01 (m, 2 x CH_3CH), 2.04-2.2 (m, 4H), 2.31 (m, 1H), 2.56 (t, J = 11.4 Hz, 1H), 2.58 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 2.84 (m, 1H), 2.85 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 3.2 (sa, 1H).

7.3.1.8 Síntesis de las sulfonamidas 14a-14c como productos finales



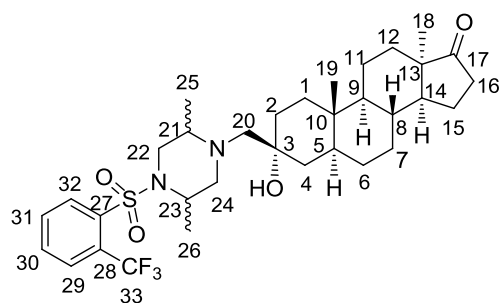
Los intermediarios **13a** (20 mg, 0.04 mmol), **13b** (44 mg, 0.09 mmol) o **13c** (30 mg, 0.07 mmol) se disolvieron en 3 mL de diclorometano. Posteriormente, se agregaron 4.0 equivalentes de TEA y 2.0 equivalentes de cloruro de 2-(trifluorometil)bencensulfonilo. La reacción se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente por 4 horas. Para el compuesto **13c**, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo se purificó, directamente, por cromatografía abierta en gel de sílice eluyendo por

7. Procedimiento experimental

gradiente de hexano-acetato de etilo; mientras que para los intermediarios **13a** y **13b**, se evaporó el disolvente del medio de reacción y se re-disolvió en acetona (5 mL). A esta solución se agregaron 0.1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se mantuvo con agitación magnética en un baño de hielo por 30 minutos. Después, se concentró a presión reducida y se extrajo con 20 mL de acetato de etilo. Se hicieron lavados con salmuera y la fase orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó. Finalmente, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna, eluyendo por gradiente, con una mezcla de hexano-acetato de etilo.

7.3.1.8.1 (3 α ,5 α ,13 α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxiandrostan-17-ona (**14a**).

Rendimiento: 44% (2 pasos)



RMN ¹H (Espectro 188, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.56 (s, 19 β -CH₃), 0.60-0.75 (m, 7-CH and 9 α -H), 0.85-0.90 (m, 8 β -H), 0.88 (2d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.96 (s, 18 α -CH₃), 1.19 (d, J = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.15-1.45 (m, 1-CH, 2-CH, 15-CH, 6-CH, 12-CH), 1.45-1.70 (m, 1-CH, 7-CH y 14 α -H) 1.80 (m, 1H), 1.95-2.05 (m, 2H). 2.10-2.23

(m, 12-CH, 16-CH y 20-CH), 2.32 (m, 16-CH, 20-CH y 24-CH), 2.80 (sa, OH), 2.89 (m, 21-CH), 3.08 (d, J = 10.2 Hz, 24-CH), 3.35 (m, 22-CH), 3.49 (dd, J = 12.9, 2.9 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-CH), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32).

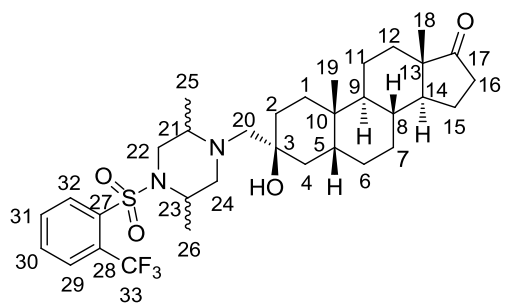
RMN ¹³C (Espectro 189, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 10.9 (C-19), 15.7 (26-CH₃), 25.2 (C-18), 28.6, 29.7, 32.2 (C-12), 32.3 (C-2), 33.6 (C-1), 33.8 (C-16), 35.9 (C-10), 37.8 (C-8), 39.4 (C-4), 40.1 (C-5), 46.0 (22-CH₂), 49.5 (23-CH), 50.1 (C-13), 50.8 (C-14), 51.4 (C-9), 52.4 (24-CH₂), 54.7 (21-CH), 65.7 (20-CH₂), 70.9 (C-3), 122.6 (q, J_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 127.5 (q, J_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, $J_{C-C-C-F}$ = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139.3 (C-27), 221.4 (C-17).

EM alta resolución (Espectro 190, FAB+, m/z): 626.3313 [M+H]⁺.

Pureza: 95.5% (Cromatograma 1, tiempo de retención = 17.6 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7. Procedimiento experimental

7.3.1.8.2 (3 β ,5 β)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxiandrostan-17-ona (14b).



Rendimiento: 52% (dos pasos)

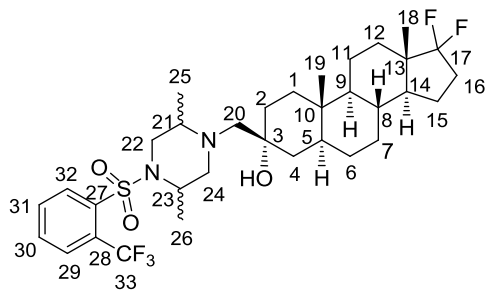
RMN ¹H (Espectro 191, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (s, 18 β -CH₃), 0.88 (d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.98 (s, 19 β -CH₃), 1.05-1.15 (m, 4 β -CH, 7-CH), 1.18 (d, J = 6.7 Hz, 26-CH₃), 1.20-1.37 (m, 2-CH₂, 6 α -CH, 9 α -H, 11 α -CH, 14 α -H), 1.40-1.64 (m, 1-CH, 7-CH, 8 β -H, 11 β -CH, 12-CH y 15 β -H), 1.72-1.80 (5 β -H, 12 β -H), 1.88-1.95 (m, 6 β -CH y 15 α -CH), 2.04 (m, 16 α -H), 2.12 (d, J = 13.9 Hz, 20-CH), 2.30 (d, J = 14.1 Hz, 20-CH), 2.38 (m, 24-CH), 2.44 (dd, J = 19.1, 8.7 Hz, 16 β -H), 2.80 (sa, OH), 2.89 (m, 21-CH), 3.08 (dd, J = 12.0, 3.7 Hz, 24-CH), 3.35 (m, 22-CH), 3.49 (dd, J = 12.9, 2.8 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-CH), 7.68 (m, H-30 and H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32).

RMN ¹³C (Espectro 192, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 13.8 (C-18), 15.7 (26-CH₃), 20.3 (C-11), 21.8 (C-15), 23.5 (C-19), 25.2 (C-7), 26.4 (C-6), 34.4 (C-2), 31.6 (C-1), 31.7 (C-12), 34.9 (C-10), 35.2 (C-8), 35.9 (C-16), 36.9 (C-4), 38.0 (C-5), 40.0 (C-9), 46.0 (C-22), 47.9 (C-13), 49.5 (C-23), 51.5 (C-14), 52.3 (C-24), 54.6 (C-21), 65.7 (C-20), 71.4 (C-3), 122.6 (q, J_{C-F} = 274.2 Hz, CF₃), 127.5 (q, J_{C-C-F} = 33.1 Hz, C-28), 128.5 (q, J_{C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139.3 (C-27), 221.4 (C-17).

EM alta resolución (Espectro 193, FAB+, m/z): 626.3278 [M+H]⁺.

Pureza: 99.6% (Cromatograma 2, tiempo de retención = 16.8 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.8.3 (3 α ,5 α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-17,17-difluoroandrostan-3-ol (14c)



Rendimiento: 53%

RMN ¹H (Espectro 194, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.74 (s, 19 β -CH₃), 0.85 (d, $J_{H,F}$ = 1.9 Hz, 18 β -CH₃), 0.87 (d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.80-0.98 (m, 7-CH y 9 α -H), 1.19 (d, J = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.09-1.44 (m, 1-CH, 2-CH₂, 4-CH₂, 6-CH₂, 8 β -H, 14 α -H, 15-CH), 1.53-1.79 (m, 1-CH, 5 α -H, 7-CH, 11-CH, 12-CH₂, 15-CH),

7. Procedimiento experimental

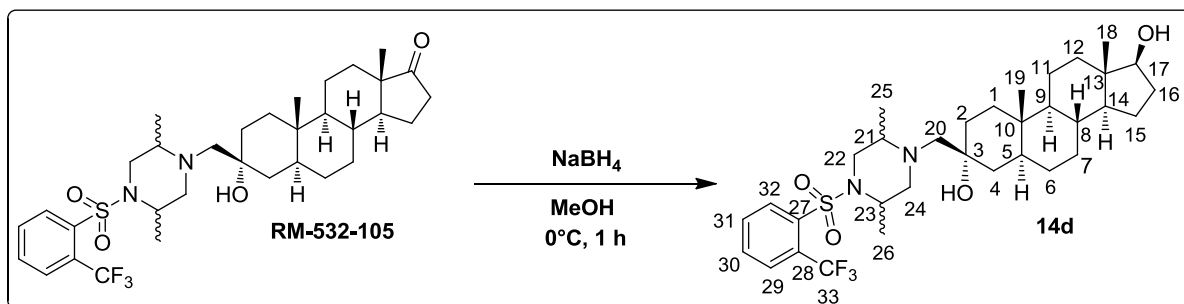
1.99-2.22 (m, 16-CH₂ y 20-CH), 2.30 (m, 20-CH y 24-CH), 2.81 (m, 3 α -OH), 2.89 (m, 21-H), 3.08 (d, J = 10.2 Hz, 24-CH), 3.35 (m, 22-CH), 3.49 (dd, J = 12.9, 2.9 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 1H, 23-H), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32).

RMN ¹³C (Espectro 195, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 11.2 (C-19), 13.4 (C-18), 15.7 (26-CH₃), 19.9 (C-11), 22.2 (d, J_{C-C-F} = 6.7 Hz, C-15), 28.3 (C-6), 28.5 (C-7), 28.9 (d, J_{C-C-F} = 5.3 Hz, C-12), 31.0 (C-2), 32.8 (q, J_{C-C-F} = 45.7 Hz, C-16), 33.8 (C-1), 35.4 (C-8), 35.8 (C-10), 39.4 (C-4), 40.9 (C-5), 45.3 (t, J_{C-C-F} = 20.1 Hz, C-13), 46.0 (22-CH₂), 49.5 (23-CH), 49.4 (t, J_{C-C-F} = 4.7 Hz, C-14), 49.5 (24-CH₂), 54.3 (C-9), 54.7 (21-CH), 65.7 (C-20), 70.9 (C-3), 122.6 (q, J_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 127.5 (q, J_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, J_{C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 132.6 (dd, J_{C-F} = 259.2, 251.1 Hz, C-17), 139.3 (C-27).

EM baja resolución (Espectro 196, APCI+, m/z): 648.50 [M+2H]⁺.

Pureza: 92.5% (Cromatograma 3, tiempo de retención = 21.5 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.9 Síntesis de (3 α ,5 α ,17 β)-3-[[*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazin-1-il]metil]androstan-3,17-diol (14d)

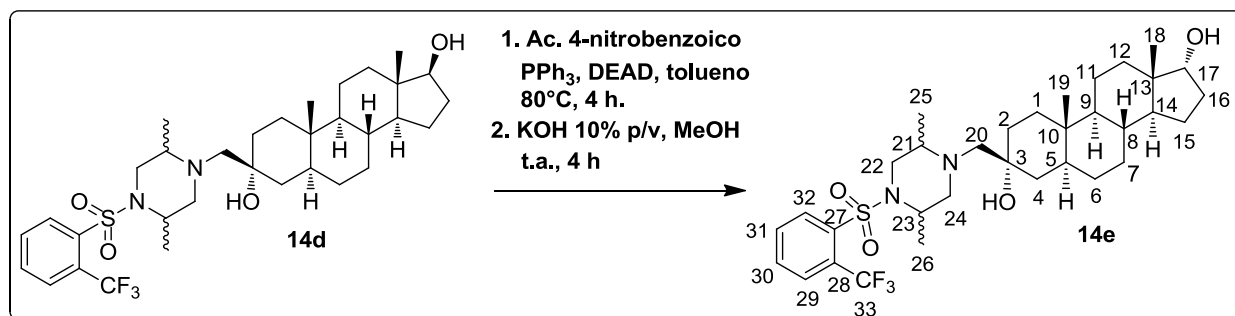


En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se agregaron 100 mg (0.16 mmol) del compuesto RM-532-105 y se disolvieron en 5 mL de metanol anhidro. Posteriormente, la solución se enfrió en un baño de hielo-sal hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 0°C. En este punto, se añadieron 24 mg (0.64 mmol) de borohidruro de sodio y se mantuvo con agitación magnética constante por una hora a la misma temperatura. Después, el disolvente se removió por destilación a presión reducida. El sólido resultante se extrajo con 20 mL de acetato de etilo y se hicieron lavados con salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se separó por filtración y se concentró a presión reducida. El compuesto crudo se purificó por cromatografía en columna eluyendo por gradiente de hexano-acetato de etilo. **Rendimiento:** 90%. **RMN ¹H** (Espectro 197, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.71 (s, 18-CH₃), 0.73 (s, 19-CH₃), 0.77 (m, 9 α -H), 0.94 (d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.96 (m, 7-CH), 1.03 (m, 12-CH), 1.11-1.30 (m, 4-CH₂,

7. Procedimiento experimental

6-CH₂, 11-CH, 14 α -H, 15-CH), 1.18 (d, $J = 5.4$ Hz, 26-CH₃), 1.32-1.45 (m, 1-CH, 2-CH₂, 8 β -H, 16 α -H), 1.48-1.65 (m, 1-CH, 5 α -H, 7-CH, 11-CH, 15-CH), 1.78 (d, $J = 3.1$ Hz, 12-CH), 2.01 (m, 16 β -H), 2.13 (d, $J = 13.9$ Hz, 20-CH), 2.32 (m, 20-CH y 24-CH), 2.81 (br, 3 α -OH), 2.87 (m, 21-H), 3.07 (d, $J = 10.2$ Hz, 24-CH), 3.32 (d, $J = 12.8$ Hz, 22-CH), 3.49 (d, $J = 10.9$ Hz, 22-CH), 3.62 (t, $J = 10.2$ Hz, 17 α -H), 4.05 (m, 23-H), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ¹³C** (Espectro 198, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 11.1 (C-19), 11.2 (C-18), 15.6 (26-CH₃), 20.5 (C-11), 23.3 (C-15), 28.5 (C-6), 30.5 (C-16), 31.5 (C-7), 32.5 (C-2), 33.8 (C-1), 35.5 (C-10), 35.8 (C-8), 36.7 (C-12), 39.4 (C-4), 40.7 (C-5), 42.9 (C-13), 46.0 (22-CH₂), 49.5 (23-CH), 50.9 (C-14), 52.4 (24-CH₂), 54.2 (C-9), 54.7 (21-CH), 65.8 (20-CH₂), 71.0 (C-3), 81.9 (C-17), 122.6 (q, $J_{C-F} = 274.4$ Hz, CF₃), 127.5 (q, $J_{C-C-F} = 43.8$ Hz, C-28), 128.5 (q, $J_{C-C-F} = 6.4$ Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139.3 (C-27). **EM baja resolución** (Espectro 199, APCI+, m/z): 627.40 [M+H]⁺. **Pureza**: 99.8% (Cromatograma 4, tiempo de retención = 18.6 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.10 Síntesis de (3 α ,5 α ,17 α)-3-[[*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazin-1-il]metil]androstano-3,17-diol (14e)

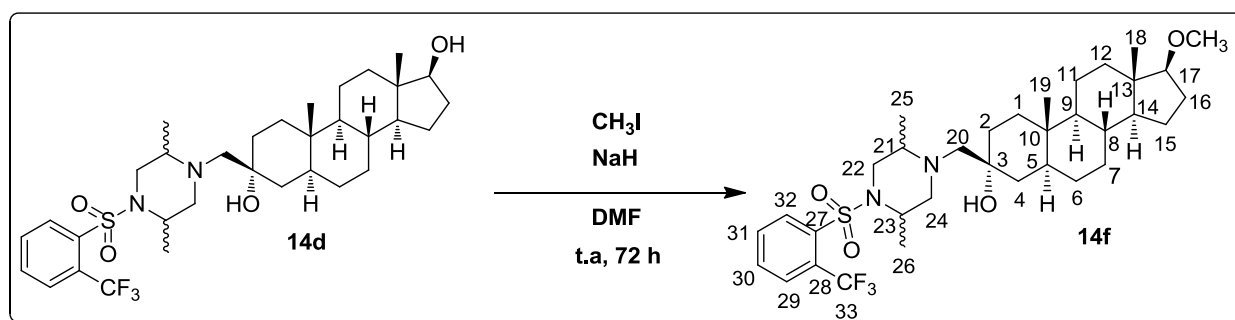


En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se agregaron 50 mg (0.19 mmol) de trifetilfosfina y 24 mg (0.20 mmol) de ácido 4-nitrobenzoico. Posteriormente, se adicionaron 3 mL de tolueno anhidro. Esta mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y, bajo agitación constante, se agregaron lentamente 36 μ L de ácido dicarboxilato de dietilo (DEAD, 0.19 mmol). Esta solución se mantuvo con agitación constante por 30 min. En este punto, se agregaron 35 mg (0.056 mmol) del compuesto **14d** disueltos en 3 mL de tolueno. A la mezcla de reacción se adaptó un sistema de reflujo y se calentó a 80°C con agitación constante por 4 h. Pasado este tiempo, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y el exceso de disolvente se retiró por destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio. El residuo oleoso resultante se purificó directamente por cromatografía en columna eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo. El sólido obtenido, que corresponde al ester del ácido nitrobenzoico, se depositó en un matraz de fondo redondo de 10 mL y se adicionaron 7 mL de una solución metanólica de hidróxido de potasio al 10% p/v. La reacción se mantuvo con agitación constante a temperatura ambiente por 4

7. Procedimiento experimental

horas. Terminado este tiempo, el disolvente se removió del medio de reacción a presión reducida, en un evaporador rotatorio. El sólido resultante se extrajo con acetato de etilo (20 mL) y se hicieron lavados con salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y finalmente se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. El compuesto crudo se purificó por cromatografía en columna eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo. **Rendimiento:** 26%. **RMN ¹H** (Espectro 200, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.64 (s, 18β-CH₃), 0.73 (s, 19β-CH₃), 0.81 (m, 9α-H), 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 25-CH₃), 1.01 (m, 7-CH), 1.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.11-1.75 (m, 1-CH₂, 2-CH₂, 4-CH₂, 5α-H, 6-CH₂, 7-CH, 8β-H, 11-CH₂, 12-CH₂, 14α-H, 15-CH₂, 16-CH), 2.13 (m, 16-CH y 20-CH), 2.32 (m, 20-CH y 24-CH), 2.81 (sa, 3α-OH), 2.87 (m, 21-H), 3.07 (d, *J* = 10.2 Hz, 24-CH), 3.32 (d, *J* = 12.8 Hz, 22-CH), 3.49 (d, *J* = 10.9 Hz, 22-CH), 3.71 (d, *J* = 5.9 Hz, 17β-H), 4.05 (m, 23-H), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ¹³C** (Espectro 201, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 11.2 (C-19), 15.6 (26-CH₃), 17.1 (C-18), 20.4 (C-11), 24.6 (C-15), 28.6 (C-6), 31.5 (C-12), 32.3 (C-16 y C-7), 32.5 (C-2), 33.9 (C-1), 35.7 (C-8), 35.8 (C-10), 39.4 (C-4), 40.6 (C-5), 45.3 (C-13), 46.0 (22-CH₂), 48.7 (C-14), 49.5 (23-CH), 52.4 (24-CH₂), 53.9 (C-9), 54.7 (21-CH), 65.8 (20-CH₂), 71.0 (C-3), 80.0 (C-17), 122.6 (q, *J*_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 127.5 (q, *J*_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, *J*_{C-C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139 (C-27). **EM baja resolución** (Espectro 202, APCI+, *m/z*): 627.45 [M+H]⁺. **Pureza:** 92.3% (Cromatograma 5, tiempo de retención = 20.2 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocratica, columna Luna C18).

7.3.1.11 Síntesis de (3α,5α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazin-1-il)metil]-17-metoxiandrostan-3-ol (14f)



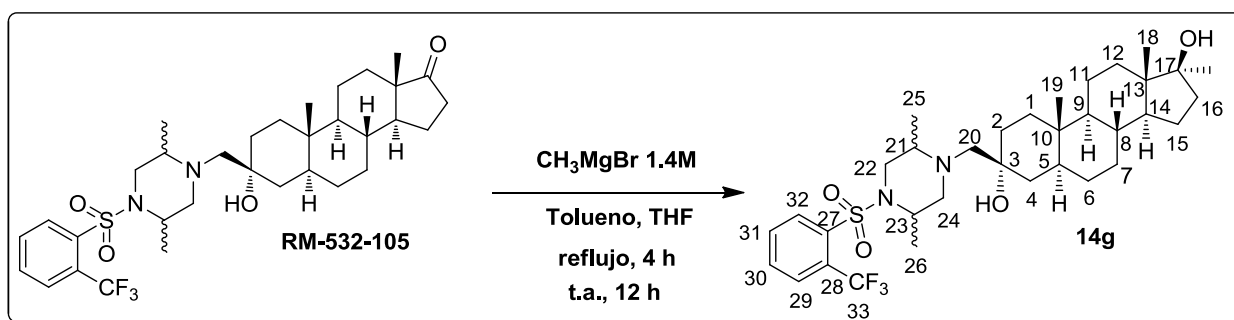
En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se agregaron 20 mg (0.03 mmol) del compuesto **14d** y se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro. Bajo atmósfera de argón, a esta solución se le agregaron 4.5 mg (0.19 mmol) de hidruro de sodio en aceite al 60% p/v y se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de este tiempo, se agregaron 24 μL (0.38 mmol) de yoduro de metilo y la reacción se mantuvo con agitación constante a temperatura ambiente por 72 horas más. Posteriormente, se agregaron 10 mL de agua destilada y se llevó a cabo la extracción del compuesto con diclorometano (20 mL), al cual se le realizaron lavados sucesivos con salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se secó

7. Procedimiento experimental

con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido resultante se purificó por columna de gel de sílice, eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo

Rendimiento: 15%. **RMN ^1H** (Espectro 203, 400 MHz, CDCl_3): δ 0.71 (s, 19- CH_3), 0.72 (s, 18- CH_3), 0.75 (m, 9 β -H), 0.89-0.95 (m, 14 α -H y 7-CH), 0.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 25- CH_3), 1.18 (d, $J = 5.4$ Hz, 26- CH_3), 1.10-1.64 (m, 1- CH_2 , 2- CH_2 , 4- CH_2 , 7-CH, 8-CH, 12-CH, 15- CH_2 , 16-CH), 1.85 (m, 12-CH), 1.95 (m, 16-CH), 2.12 (d, $J = 13.9$ Hz, 20-CH), 2.30 (m, 20-CH, 24-CH), 2.80 (sa, 3 α -OH), 2.89 (m, 21-H), 3.08 (d, $J = 10.2$ Hz, 24-CH), 3.20 (t, $J = 8.2$ Hz, 17 α -H), 3.31 (m, 22-CH y OCH_3), 3.49 (dd, $J = 12.9, 2.9$ Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-H), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ^{13}C** (Espectro 204, 100.6 MHz, CDCl_3): δ 8.6 (25- CH_3), 8.6 (C-19), 11.2 (C-18), 15.7 (26- CH_3), 20.6 (C-11), 23.2 (C-15), 27.6 (C-16), 28.6 (C-6), 32.4 (C-7), 32.5 (C-2), 33.8 (C-1), 35.3 (C-8), 35.8 (C-10), 38.0 (C-12), 39.4 (C-4), 40.7 (C-5), 42.9 (C-13), 46.0 (22- CH_2), 49.5 (23-CH), 51.2 (C-14), 52.3 (24- CH_2), 54.2 (9-CH), 54.2 (21-CH), 57.8 (- OCH_3), 65.8 (20- CH_2), 70.9 (C-3), 90.8 (C-17), 122.6 (q, $J_{\text{C-F}} = 274.4$ Hz, CF_3), 127.5 (q, $J_{\text{C-C-F}} = 43.8$ Hz, C28), 128.5 (q, $J_{\text{C-C-F}} = 6.4$ Hz, C29), 131.9 (C-31), 132.1 (C-30), 132.5 (C-29), 139.3 (C-27). **EM baja resolución** (Espectro 205, APCI+, m/z): 642.10 $[\text{M}+2\text{H}]^+$. **Pureza:** 95.7% (Cromatograma 6, tiempo de retención = 21.9 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.12 Síntesis de (3 α ,5 α ,17 β)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-{[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil}piperazin-1-il)metil]-17-metilandrostan-3,17-diol (14g)



De acuerdo a la metodología descrita por J. Gauthier *et. al.*⁹⁶, en un matraz de fondo redondo de 25 mL se disolvieron, bajo agitación magnética, 30 mg (0.05 mmol) del compuesto **RM-532-105** en 5 mL de tolueno anhidro. Bajo atmosfera de argón, se adicionaron 0.4 mL (0.56 mmol) de una solución de bromuro de metilmagnesio 1.4 M en tolueno/THF (75:25). Esta mezcla de reacción se llevó a reflujo por 4 horas y, posteriormente, se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente por 12 horas más. Pasado este tiempo se depositó, lentamente, en 20 mL de una solución de sulfato de amonio 2.6 M, previamente enfriada en un baño de hielo. Posteriormente, se llevó a cabo una extracción con diclorometano (20 mL) y se hicieron lavados con salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido obtenido se purificó por columna en

7. Procedimiento experimental

columna, eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo. **Rendimiento:** 64%. **RMN ¹H** (Espectro 206, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.73 (s, 19-CH₃), 0.83 (s, 18-CH₃), 0.74 (m, 9α-H), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.84 (m, 7-CH), 1.03 (m, 12-CH), 1.11-1.27 (m, 4-CH₂, 6-CH₂, 11-CH, 12-CH, 14α-H, 15-CH, 16α-H), 1.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.20 (s, 17α-CH₃), 1.37 (m, 1-CH, 2-CH₂, 8β-H), 1.48-1.78 (m, 1-CH, 5α-H, 7-CH, 11-CH, 15-CH, 16β-H), 2.13 (d, *J* = 13.9 Hz, 20-CH), 2.32 (m, 20-CH y 24-CH), 2.81 (sa, 3α-OH), 2.87 (m, 21-H), 3.07 (d, *J* = 10.2 Hz, 24-CH), 3.32 (d, *J* = 12.8 Hz, 22-CH), 3.49 (d, *J* = 10.9 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-H), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ¹³C** (Espectro 207, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 11.0 (C-19), 13.9 (C-18), 15.6 (26-CH₃), 20.5 (C-11), 23.3 (C-15), 25.8 (17α-CH₃), 26.2 (C-6), 31.6 (C12 y C7), 32.4 (C-2), 33.8 (C-1), 35.8 (C-10), 35.4 (C-8), 38.9 (C-16), 39.4 (C-4), 40.8 (C-5), 45.5 (C-13), 46.0 (22-CH₂), 49.5 (23-CH), 50.6 (C-14), 52.4 (24-CH₂), 54.1 (C-9), 54.7 (21-CH), 65.8 (20-CH₂), 71.0 (C-3), 81.7 (C-17), 122.6 (q, *J*_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 127.5 (q, *J*_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, *J*_{C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139 (C-27). **EM baja resolución** (Espectro 208, APCI+, *m/z*): 641.45 [M+H]⁺. **Pureza:** 87.2% (Cromatograma 7, tiempo de retención = 27.2 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.13 Síntesis de (3α,5α,17β)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazin-1-il)metil]-17-etinilandrostan-3,17-diol (14h)

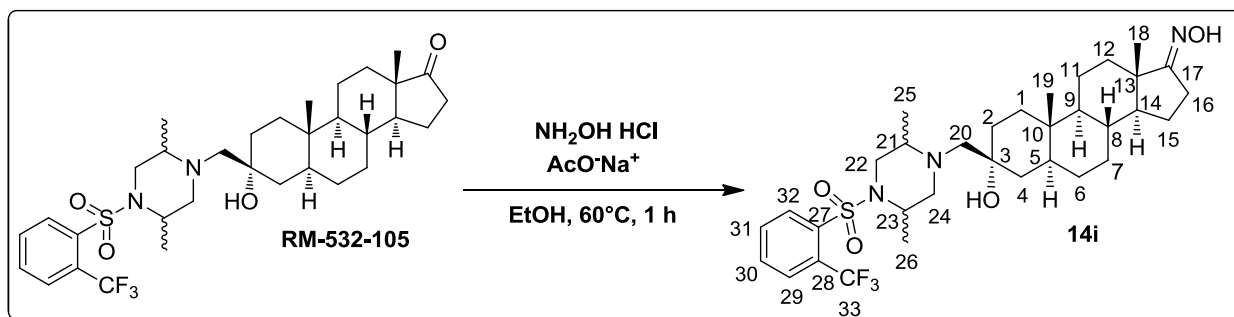


En un matraz de fondo de 25 mL, provisto de agitador magnético y bajo atmosfera de argón en un baño de hielo-sal, se agregaron 3 mL de éter etílico, 61 μL (0.42 mmol) de trimetilsililacetileno y 0.2 mL (0.33 mmol) de una solución 1.6 M de metillitio en éter etílico. Después, esta solución se agitó por 1 hora a temperatura ambiente y, posteriormente, se volvió a enfriar en un baño de hielo-sal para agregar, lentamente, 26 mg (0.04 mmol) del compuesto **RM-532-105** disuelto en 3 mL de THF anhidro. Esta mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética constante a temperatura ambiente por 12 horas más. Terminada la reacción, ésta se depositó en 30 mL de agua-hielo y se realizó una extracción con acetato de etilo. Se hicieron lavados a la fase orgánica con salmuera. Posteriormente, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. Para la remoción del grupo protector, el compuesto crudo obtenido se disolvió en una solución metanólica de carbonato de potasio al

7. Procedimiento experimental

5% p/v y se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. A continuación, la mezcla de reacción se depositó en 30 mL de agua-hielo y se llevó a cabo una extracción con diclorometano (20 mL) para después realizar lavados con salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo. **Rendimiento:** 77% (dos pasos). **RMN ¹H** (Espectro 209, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.73 (s, 19-CH₃), 0.82 (s, 18-CH₃), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.71-0.95 (m, 7-CH y 9α-H), 1.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.11-1.75 (m, 1-CH₂, 2-CH₂, 4-CH₂, 5α-H, 6-CH₂, 7-CH, 8β-H, 11-CH₂, 12-CH₂, 14α-H, 15-CH₂), 1.94 (m, 16-CH y 17β-OH), 2.13 (d, *J* = 13.9 Hz, 20-CH), 2.22-2.35 (m, 16-CH, 20-CH, 24-CH), 2.56 (s, 17α-C≡CH), 2.78 (sa, 3α-OH), 2.87 (m, 21-H), 3.07 (d, *J* = 10.2 Hz, 24-CH), 3.32 (d, *J* = 12.8 Hz, 22-CH), 3.49 (d, *J* = 10.9 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-H), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ¹³C** (Espectro 210, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 11.2 (C-18), 12.8 (C-19), 15.7 (26-CH₃), 20.6 (C-11), 23.1 (C-15), 28.5 (C-6), 31.4 (C-7), 32.7 (C-12), 33.2 (C-2), 33.8 (C-1), 35.8 (C-10), 36.1 (C-8), 38.9 (C-16), 39.4 (C-4), 40.6 (C-5), 46.0 (22-CH₂), 46.8 (C-13), 49.6 (23-CH), 50.4 (C-14), 52.4 (24-CH₂), 53.7 (C-9), 54.7 (21-CH), 65.8 (20-CH₂), 71.0 (C-3), 73.8 (17α-C≡CH), 79.9 (C-17), 87.6 (17α-C≡CH), 122.6 (q, *J*_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 127.5 (q, *J*_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, *J*_{C-C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139.3 (C-27). **EM baja resolución** (Espectro 211, APCI+, *m/z*): 651.45 [M+H]⁺. **Pureza:** 98.8% (Cromatograma 8, tiempo de retención = 18.2 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.14 Síntesis de (3α,5α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxiandrostan-17-oxima (14i)

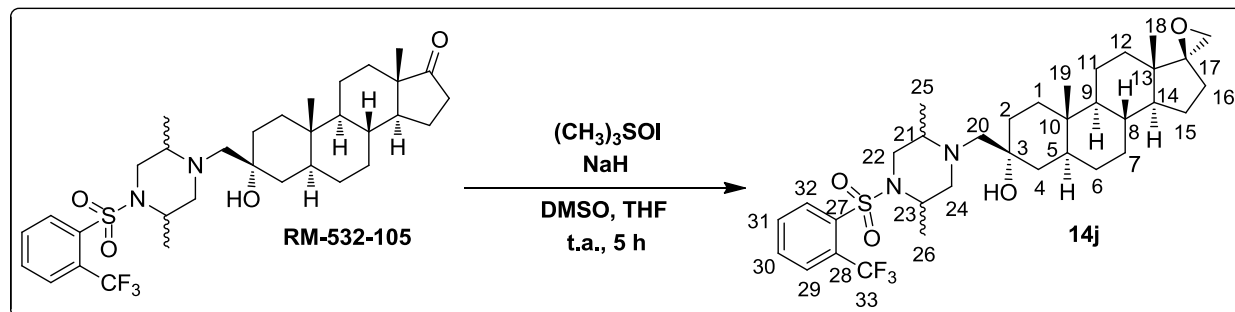


En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se agregaron 60 mg (0.1 mmol) del compuesto **RM-532-105** y se disolvieron en etanol anhidro. Posteriormente, se adicionaron 12 mg (0.17 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y 18 mg (0.22 mmol) de acetato de sodio. Inmediatamente, a la mezcla de reacción, se adaptó un sistema de reflujo y se mantuvo en agitación constante a 60 °C por una hora. Después de este tiempo se eliminó el exceso de disolvente a presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido obtenido se extrajo con diclorometano (20 mL) y se realizaron lavados con salmuera. La fase orgánica se secó con

7. Procedimiento experimental

sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo. **Rendimiento:** 89%. **RMN ¹H** (Espectro 212, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.73 (s, 19β-CH₃), 0.87 (m, 18β-CH₃ y 25-CH₃), 0.83 (m, 9α-H), 1.03 (m, 7-CH), 1.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 26-CH₃), 1.12-1.87 (m, 1-CH₂, 2-CH₂, 4-CH₂, 5α-H, 6-CH₂, 7-CH, 8β-H, 11-CH₂, 12-CH₂, 14α-H, 15-CH₂), 2.13 (d, *J* = 13.9 Hz, 20-CH), 2.22-2.35 (m, 20-CH, 24-CH), 2.46 (m, 16-CH₂), 2.87 (m, 21-H), 2.94 (sa, 3α-OH), 3.07 (d, *J* = 10.2 Hz, 24-CH), 3.32 (d, *J* = 12.8 Hz, 22-CH), 3.49 (d, *J* = 10.9 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-H), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32), 8.41 (sa, =NOH). **RMN ¹³C** (Espectro 213, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 11.2 (C-19), 15.6 (26-CH₃), 17.1 (C-18), 20.4 (C-11), 23.1 (C-15), 24.9 (C-16), 28.5 (C-6), 31.4 (C-7), 32.5 (C-2), 33.6 (C-1), 34.0 (C-12), 34.9 (C-8), 35.9 (C-10), 39.5 (C-4), 40.5 (C-5), 43.9 (C-13), 46.0 (22-CH₂), 49.5 (23-CH), 52.4 (24-CH₂), 53.8 (C-14), 54.2 (C-9), 54.7 (21-CH), 65.7 (20-CH₂), 71.0 (C-3), 122.6 (q, *J*_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 127.5 (q, *J*_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, *J*_{C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139.3 (C-27), 171.2 (C-17). **EM baja resolución** (Espectro 214, APCI+, *m/z*: 640.40 [M+H]⁺. **Pureza:** 99.8% (Cromatograma 9, tiempo de retención = 18.2 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.15 Síntesis de (3α,5α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3-hidroxi-17-(2'-spirooxirani)androstano (14j)

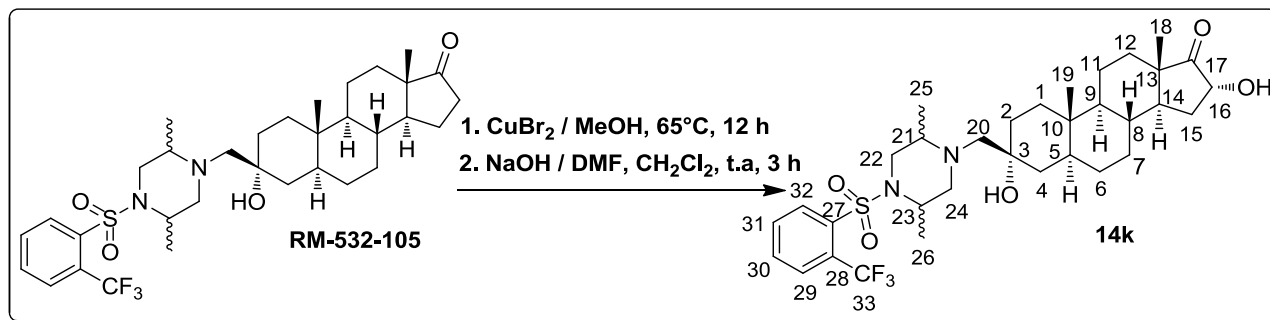


En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se disolvieron 39 mg (0.06 mmol) de yoduro de trimetilsulfoxonio en 3 mL de DMSO seco bajo atmosfera de argón. A esta solución, se agregaron cuidadosamente, con agitación magnética, 6.5 mg (0.06 mmol) de hidruro de sodio observándose la formación de gas. La solución se mantuvo en agitación magnética constante por una hora. En este punto, se adicionó el compuesto **RM-532-105** (30 mg, 0.05 mmol) disuelto en THF anhidro (1 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente por 5 h. Posteriormente, la solución, ligeramente amarilla, se depositó en 100 mL de hielo-sal. El precipitado formado se filtró por succión y se lavó con agua. Finalmente, se realizó la purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de hexano-acetato de etilo. **Rendimiento:** 63%. **RMN ¹H** (Espectro 215, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.73 (s, 19β-CH₃), 0.86 (s, 18β-CH₃), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.80-1.15 (m, 7-CH,

7. Procedimiento experimental

9 α -H, 12-CH), 1.19 (d, $J = 5.4$ Hz, 26-CH₃), 1.17-1.43 (m, 1-CH₂, 2-CH₂, 4-CH₂, 6-CH₂, 11-CH, 14 α -H, 15-CH), 1.50-1.81 (m, 5 α -H, 7-CH, 8 β -H, 11-CH, 12-CH, 15-CH, 16 α -H), 1.96 (m, 16 β -H), 2.14 (d, $J = 14.5$ Hz, 20-CH), 2.30 (m, 20-CH y 24-CH), 2.59 (d, $J = 5.1$ Hz, oxirano-CH), 2.89 (m, 21-H y oxirano-CH), 3.08 (d, $J = 10.2$ Hz, 24-CH), 3.35 (m, 22-CH), 3.49 (dd, $J = 12.9, 2.9$ Hz, 22-CH), 4.05 (m, 1H, 23-CH), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ¹³C** (Espectro 216, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 11.2 (C-19), 14.4 (C-18), 15.7 (26-CH₃), 20.3 (C-11), 23.5 (C-15), 28.6 (C-6), 29.0 (C-16), 31.4 (C-7), 32.5 (C-2), 33.8 (C-1), 33.9 (C-12), 35.6 (C-10), 35.8 (C-8), 39.4 (C-4), 40.1 (C-13), 40.7 (C-5), 46.0 (C-22), 49.5 (C-23), 52.4 (C-24), 52.8 (C-14), 53.7 (oxirano-CH₂), 54.3 (C-9), 54.7 (C-21), 65.7 (C-20), 70.6 (C-17), 70.9 (C-3), 122.6 (q, $J_{C-F} = 274.4$ Hz, CF₃), 127.5 (q, $J_{C-C-F} = 43.8$ Hz, C-28), 128.5 (q, $J_{C-C-F} = 6.4$ Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139.3 (C-27). **EM baja resolución** (Espectro 217, APCI+, m/z): 639.45 [M+H]⁺. **Pureza**: 93.5% (Cromatograma 10, tiempo de retención = 20.7 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.16 Síntesis de (3 α ,5 α ,16 α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-3,17-dihidroxiandrostan-17-ona (14k)

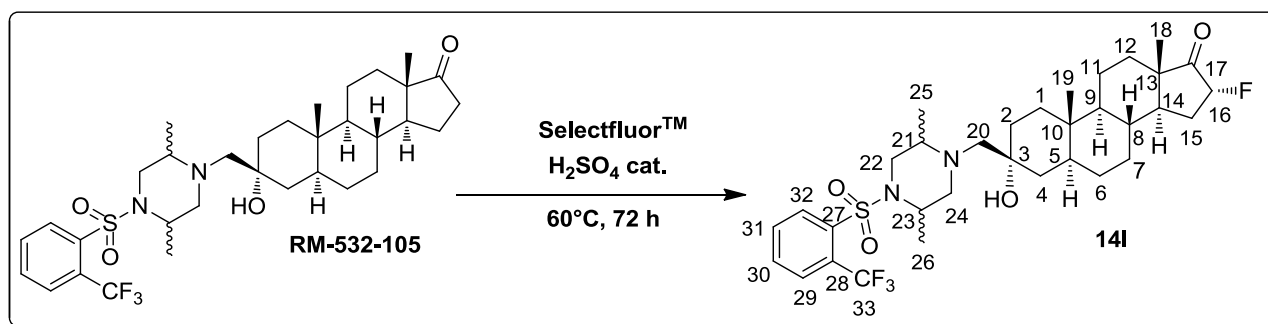


En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se pesaron 100 mg (0.16 mmol) de **RM-532-105** y se disolvieron en 5 mL de metanol. Después, se adicionaron 107 mg (0.48 mmol) de CuBr₂ y se adaptó un sistema de reflujo. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética a 65°C por 12 horas. A continuación, se evaporó, a presión reducida, el exceso de metanol y, bajo agitación magnética constante, se añadió al residuo oleoso 10 mL de diclorometano y 10 mL de cloruro de amonio 2.6 M, con la finalidad de disolver las sales de cobre. Después de 3 horas, se separó la fase orgánica, se le hicieron lavados con salmuera (3 X 10 mL) y se secó con sulfato de sodio anhidro para finalmente concentrar a presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido obtenido se disolvió en una mezcla de DMF (2 mL), diclorometano (0.5 mL) y 0.6 mL de una solución de hidróxido de sodio 1 M. Esta mezcla se agitó, a temperatura ambiente, por 3 horas después de las cuales se concentró a presión reducida. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo, obteniendo un sólido blanco amorfo. **Rendimiento**: 23% (dos pasos). **RMN ¹H** (Espectro 218, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.72

7. Procedimiento experimental

(m, 9 α -H), 0.74 (s, 19 β -CH₃), 0.82 (m, 7-CH), 0.87 (d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.93 (s, 18 β -CH₃), 1.18 (d, J = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.14-1.39 (m, 1-CH, 2-CH₂, 4-CH₂) 1.50-1.77 (m, 1-CH, 5 α -H, 7-CH, 8 β -H, 12-CH, 15-CH, 14 α -H), 1.94 (m, 12-CH, 15-CH), 2.12 (d, J = 13.9 Hz, 20-CH), 2.30 (m, 20-CH y 24-CH), 2.44 (sa, 16 α -OH), 2.75 (sa, 3 α -OH), 2.89 (m, 21-H), 3.08 (d, J = 10.2 Hz, 24-CH), 3.35 (m, 22-CH), 3.49 (d, J = 12.8 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-H), 4.35 (d, J = 6.6 Hz, 16 β -H), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ¹³C** (Espectro 219, 100.6 MHz, CDCl₃): δ ~8.6 (25-CH₃), ~11.2 (C-19), ~14.0 (C-18), 15.6 (26-CH₃), 20.0 (C-11), 30.2 (C-7), 30.5 (C-15), 31.3 (C-12), 31.8 (C-2), 33.7 (C-1), 34.9 (C-8), 35.9 (C-10), 39.4 (C-4), 40.6 (C-5), 46.0 (22-CH₂), 47.6 (C-13), 48.2 (C-14), 49.5 (23-CH), 52.4 (24-CH₂), 54.0 (C-9), 54.7 (21-CH), 65.7 (20-CH₂), 71.0 (C-3), 71.3 (C-16), 122.6 (q, J_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 127.5 (q, J_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, J_{C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139 (C-27), ~220 (C-17). **EM baja resolución** (Espectro 220, APCI+, m/z): 642.05 [M+2H]⁺. **Pureza**: 99.9% (Cromatograma 11, tiempo de retención = 16.7 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.17 Síntesis de (3 α ,5 α ,16 α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil]piperazin-1-il)metil]-16-fluoro-3-hidroxiandrostan-17-ona (14I)

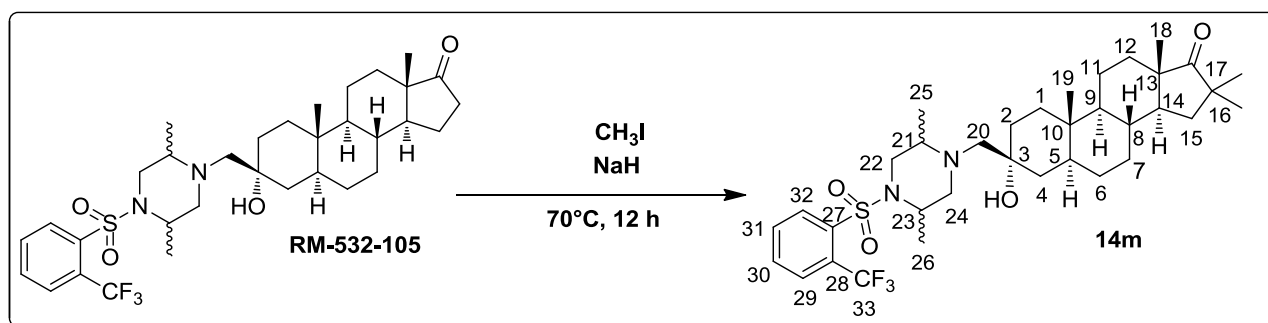


En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se agregaron 200 mg (0.32 mmol) del compuesto **RM-532-105** y 320 mg (0.90 mmol) de Selectfluor™ y se suspendieron en metanol anhidro. Bajo atmósfera de argón, se adicionaron 10 μ L de ácido sulfúrico 6M y esta mezcla se mantuvo con agitación magnética a 60°C por 72 horas. Después de este tiempo, la suspensión blanca se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido obtenido se extrajo con acetato de etilo (20 mL) y se hicieron lavados con salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se separó y seco con sulfato de sodio anhidro para posteriormente ser concentrado a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo, obteniéndose un sólido amorfo ligeramente amarillo. **Rendimiento**: 14%. **RMN ¹H** (Espectro 221, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.74 (s, 19 β -CH₃), 0.87 (d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.89 (s, 18 β -CH₃), 1.10 (m, 7-CH), 1.19 (d, J = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.13-1.40 (m, 1-CH, 2-CH₂, 6-CH₂, 11-CH, 12-CH), 1.49-1.73 (m, 1-CH, 5 α -H, 8 β -H, 11-CH, 14 α -H), 1.79-1.99 (m, 7-CH, 12-CH, 15-CH), 2.12 (d, J = 13.9 Hz, 20-CH), 2.30 (m, 20-CH y 24-CH), 2.81 (sa, 3 α -OH), 2.89 (m, 21-H), 3.08 (d, J = 10.2 Hz, 24-CH), 3.35

7. Procedimiento experimental

(m, 22-CH), 3.49 (dd, $J = 12.9, 2.9$ Hz, 22-CH), 4.05 (m, 1H, 23-H), 5.08 (dd, $J_{H,F} = 50.7, J_{H,H} = 7.4$ Hz, 16 β -H), 7.68 (m, H-30 and H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ^{13}C** (Espectro 222, 100.6 MHz, CDCl_3): δ 8.6 (25- CH_3), 11.1 (C-19), 14.2 (C-18), 15.6 (26- CH_3), 19.7 (C-11), 26.5 (C-6), 28.2 (d, $J_{C-F} = 12.1$ Hz, C-15), 30.4 (C-12), 31.2 (C-7), 32.4 (C-2), 33.6 (C-1), 34.8 (C-8), 35.9 (C-10), 39.3 (C-4), 40.6 (C-5), 46.0 (C-22), 47.8 (C-13), 48.3 (C-14), 49.5 (C-23), 52.4 (C-24), 53.9 (C-9), 54.7 (C-21), 65.7 (C-20), 70.9 (C-3), 90.2 (d, $J_{C-F} = 186.7$ Hz, C-16), 122.6 (q, $J_{C-F} = 274.4$ Hz, CF_3), 127.5 (q, $J_{C-C-F} = 43.8$ Hz, C-28), 128.5 (q, $J_{C-C-F} = 6.4$ Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139.3 (C-27), ~ 213.4 (C-17). **EM baja resolución** (Espectro 223, APCI+, m/z): 645.00 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **Pureza**: 93.2% (Cromatograma 12, tiempo de retención = 26.9 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.18 Síntesis de (3 α ,5 α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-{[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil}piperazin-1-il)metil]-16,16-dimetil-3-hidroxiandrostan-17-ona (14m)

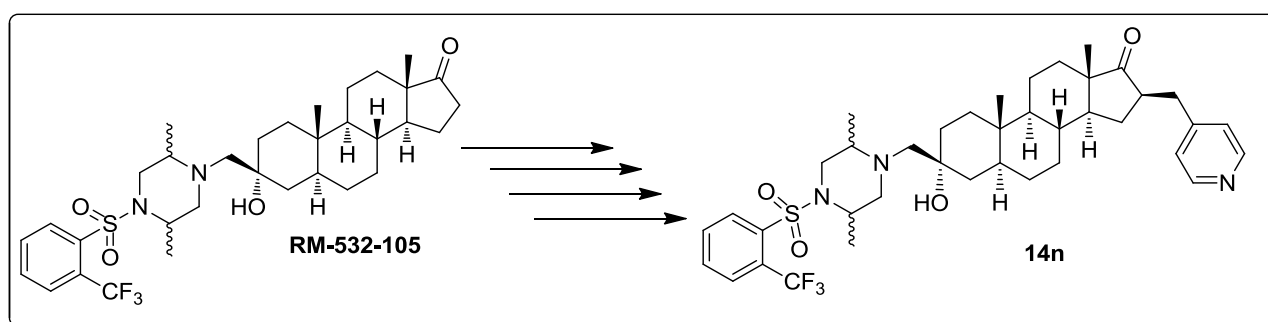


En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se disolvieron 50 mg (0.08 mmol) del compuesto **RM-532-105** en 5 mL de DMF y se añadieron 0.32 mmol de hidruro de sodio al 60% p/v en aceite. La solución se agitó a temperatura ambiente por una hora antes de agregar 32 μL (0.4 mmol) de yoduro de metilo. Posteriormente, se adaptó un sistema de reflujo y la mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética a 70°C por 12 horas. Pasado este tiempo, el disolvente se evaporó a presión reducida y el sólido remanente se extrajo con diclorometano (20 mL) al cual se hicieron lavados con salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se separó y secó con sulfato de sodio anhidro. Finalmente, se concentró a presión reducida y el sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo, obteniéndose un sólido amorfo blanco. **Rendimiento**: 44 %. **RMN ^1H** (Espectro 224, 400 MHz, DCl_3): δ 0.74 (s, 19 β - CH_3), 0.80 (m, 9 α -H), 0.86 (s, 19 β - CH_3), 0.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 25- CH_3), 0.99 (7-CH), 1.01 (s, 16 α - CH_3), 1.16 (s, 16 β - CH_3), 1.18 (d, $J = 6.8$ Hz, 25- CH_3), 1.13-1.38 (m, 1-CH, 2- CH_2 , 4- CH_2 , 6- CH_2 , 14 α -H), 1.44-1.65 (m, 1-CH, 5 α -H, 8 β -H, 12-CH, 15-CH), 1.71-1.80 (m, 7-CH, 12-CH, 15-CH), 2.12 (dd, $J_1 = 13.9$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz, 20-CH), 2.35 (m, 20-CH y 24-CH), 2.80 (sa, 3 α -OH), 2.89 (m, 21-H), 3.08 (dd, $J = 12.0, 3.8$ Hz, 24-CH), 3.35 (d, $J = 10.6$ Hz, 22-CH), 3.49 (dd, $J = 12.9, 2.9$ Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-H),), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ^{13}C** (Espectro 225, 100.6 MHz, CDCl_3): δ

7. Procedimiento experimental

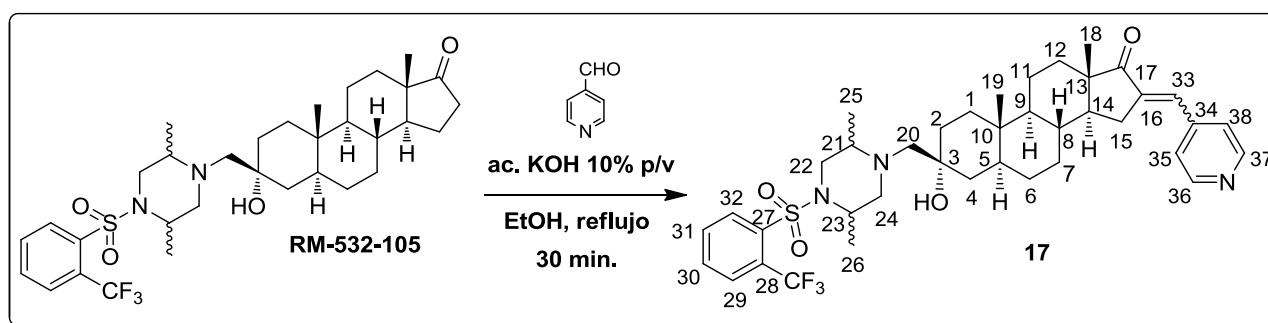
8.6 (25-CH₃), 11.2 (C-19), 14.4 (C-18), 15.7 (26-CH₃), 20.1 (C-11), 25.9 (16-CH₃), 27.3 (16-CH₃), 28.3 (C-6), 30.9 (C-7), 32.4 (C-15), 32.5 (C-2), 33.7 (C-1), 34.6 (C-8), 35.9 (C-10), 37.9 (C-12), 39.3 (C-4), 40.7 (C-5), 45.1 (C-16), 46.0 (C-22), 48.1 (C-14), 48.9 (C-13), 49.5 (C-23), 52.4 (C-24), 54.4 (C-9), 54.7 (C-21), 65.7 (20-CH₂), 70.9 (C-3), 122.6 (q, J_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 127.5 (q, J_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, J_{C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139 (C-27), 225.6 (C-17). **EM baja resolución** (Espectro 226, APCI+, m/z): 655.05 [M+H]⁺. **Pureza:** 91.3% (Cromatograma 13, tiempo de retención = 20.4 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.19 Síntesis de (3 α ,5 α ,16 β)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-{[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil}piperazin-1-il)metil]-16-(piridin-4-metil)-3-hidroxiandrostan-17-ona (14n) a partir del compuesto RM-532-105



La síntesis del compuesto **14n** requirió de cuatro pasos de reacción a partir del compuesto **RM-532-105**. La preparación a partir de este último se describe a continuación.

7.3.1.19.1 Síntesis de (3 α ,5 α)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-{[2-(trifluorometil)fenil]sulfonil}piperazin-1-il)metil]-16-(piridin-4-metilenil)-3-hidroxiandrostan-17-ona (17)

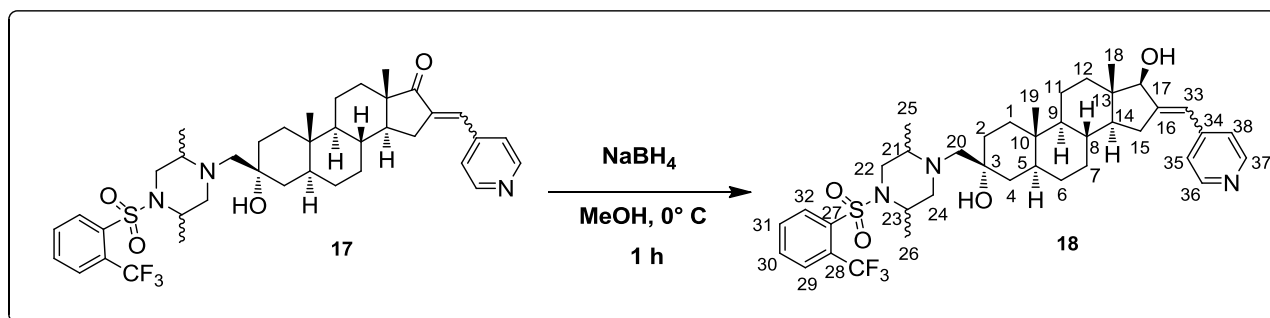


En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se disolvieron 100 mg (0.16 mmol) del compuesto **RM-532-105** en 10 mL de etanol. A esta solución se agregaron 33 μ L (0.35 mmol) de 4-piridincarboxaldehído y 2 mL de una solución acuosa de KOH al 10 % p/v. Esta mezcla se reflujo por 30 minutos, terminado este tiempo, la reacción se depositó en 50 mL de hielo-sal. El precipitado formado se colectó por filtración al vacío y se hicieron lavados con agua helada. Finalmente, el sólido se purificó por cromatografía en

7. Procedimiento experimental

columna, eluyendo por gradiente de hexano/acetato de etilo, obteniéndose un sólido amorfo ligeramente amarillo. **Rendimiento:** 89%. **RMN ¹H** (Espectro 227, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.78 (s, 19β-CH₃), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.98 (s, 18β-CH₃), 1.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 26-CH₃), 2.12 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 2.29-2.45 (m, 2H), 2.87 (m, 2H), 3.10 (dd, *J* = 13.7, 4.1 Hz, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.49 (dd, *J* = 12.9, 2.9 Hz, 1H), 4.05 (m, 1H), 7.30 (d, *J* = 6.0 Hz, H-33), 7.35 (d, *J* = 5.9 Hz, H-35 y H-38), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32), 8.46 (d, *J* = 5.9 Hz, H-36 y H-37).

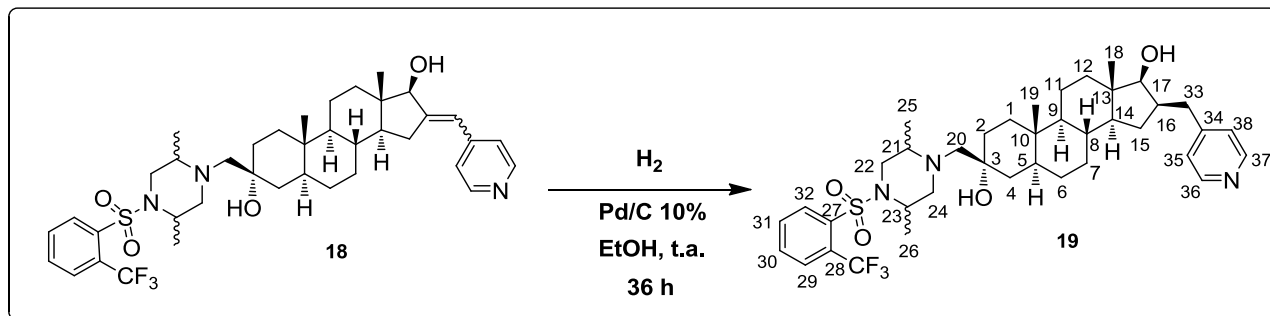
7.3.1.19.2 Síntesis de (3α,5α,17β)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazin-1-il)metil]-16-(piridin-4-metilenil)androstan-3,17-diol (18)



En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se agregaron 100 mg (0.14 mmol) del compuesto **17** y se disolvieron en 5 mL de metanol anhidro. Posteriormente, la solución se enfrió en un baño de hielo-sal hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 0°C. En este punto, se añadió a la mezcla de reacción 20 mg (0.56 mmol) de borohidruro de sodio y se mantuvo con agitación magnética constante por una hora a la misma temperatura. Después, el disolvente se removió por destilación a presión reducida. El sólido resultante se extrajo con 20 mL de acetato de etilo y se hicieron lavados con salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y posteriormente se concentró a presión reducida. El compuesto crudo se purificó por cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de hexano-acetato de etilo. **Rendimiento:** 70%. **RMN ¹H** (Espectro 228, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.67 (s, 18β-CH₃), 0.78 (s, 19β-CH₃), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 25-CH₃), 1.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 26-CH₃), 0.99-1.99 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.12 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 2.29-2.45 (m, 2H), 2.66 (dd, *J* = 17.2, 6.9 Hz, 1H), 2.87 (m, 3H), 3.10 (dd, *J* = 13.7, 4.1 Hz, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.49 (dd, *J* = 12.9, 2.9 Hz, 1H), 4.05 (m, 2H), 6.45 (d, *J* = 2.0 Hz, H-33), 7.21 (d, *J* = 6.0 Hz, H-35 y H-38), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32), 8.49 (d, *J* = 6.0 Hz, H-36 y H-37).

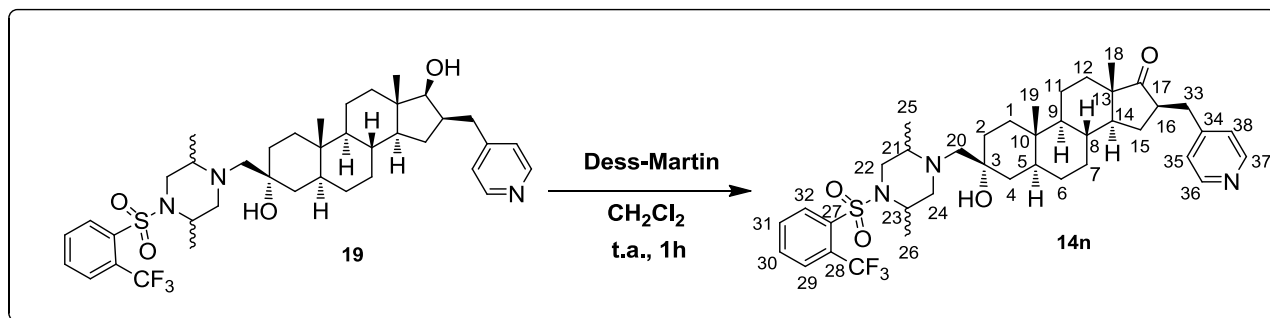
7. Procedimiento experimental

7.3.1.19.3 Síntesis de (3 α ,5 α ,16 β ,17 β)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazin-1-il)metil]-16-(piridin-4-metil)androstan-3,17-diol (19)



En un matraz de fondo redondo de 25 mL provisto con agitador magnético, se disolvieron 65 mg del compuesto **18** en 15 mL de etanol anhidro y, bajo atmosfera de argón, se adicionaron 25 mg de paladio sobre carbono al 10%. Posteriormente, al matraz se adaptó un globo con hidrógeno y se saturó la atmosfera con el mismo. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente por 36 horas, después de las cuales se filtró sobre celita. El filtrado se concentró a presión reducida. Finalmente, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna, eluyendo con acetato de etilo. **Rendimiento:** 62%. **RMN ¹H** (Espectro 229, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.72 (s, 18 β -CH₃), 0.80 (s, 19 β -CH₃), 0.87 (d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 1.18 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 0.99-1.99 (m, CH y CH₂ sin asignar), 2.12 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 2.80-2.39 (m, 4H), 2.87 (m, 3H), 3.08 (m, 2H), 3.35 (m, 1H), 3.49 (dd, J = 12.9, 2.9 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 9.5 Hz, 17 α -H), 4.05 (m, 2H), 7.17 (d, J = 6.1 Hz, H-35 y H-38), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32), 8.49 (d, J = 6.0 Hz, H-36 y H-37).

7.3.1.19.4 Síntesis de (3 α ,5 α ,16 β)-3-[(*trans*-2,5-dimetil-4-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazin-1-il)metil]-16-(piridin-4-metil)-3-hidroxiandrostan-17-ona (14n)

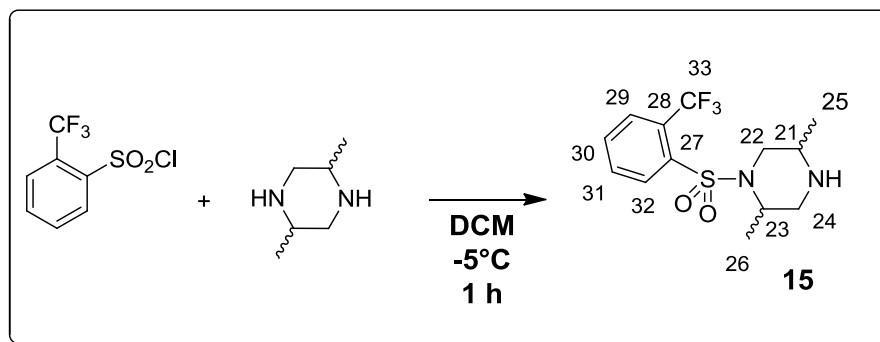


En un matraz de fondo redondo de 25 mL se pesó el compuesto **19** (30 mg, 0.04 mmol) y se disolvió en diclorometano (5 mL). Posteriormente, se agregaron, a esta solución, 25 mg (0.06 mmol) del reactivo de Dess Martin periodinano. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 1 h. La suspensión blanca obtenida, se concentró a presión reducida, el residuo

7. Procedimiento experimental

se extrajo con acetato de etilo (20 mL) y se dieron lavados sucesivos con solución saturada de bicarbonato de sodio (4 X 20 mL) y salmuera (3 X 20 mL). La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna, utilizando sólo acetato de etilo como fase móvil. **Rendimiento:** 73%. **RMN ¹H** (Espectro 230, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.67 (s, 18β-CH₃), 0.72 (s, 19β-CH₃), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.71-0.95 (m, 7-CH y 9α-H), 1.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.12-1.40 (m, 1-CH, 2-CH₂, 11-CH, 12-CH, 14α-H, 15-CH), 1.51 (m, 1-CH, 5α-H, 8β-H), 1.64 (m, 11-CH, 7-CH), 1.82 (m, 12-CH), 1.95 (15-CH), 2.12 (d, *J* = 13.9 Hz, 20-CH), 2.30 (m, 20-CH, 24-CH), 2.45 (dd, *J* = 19.1, 8.7 Hz, 16α-H), 2.61 (dd, *J* = 13.7, 9.9 Hz, 33-CH), 2.89 (m, 21-H), 3.08 (d, *J* = 10.2 Hz, 24-CH), 3.16 (dd, *J* = 13.7, 4.1 Hz, 33-CH), 3.35 (m, 22-CH), 3.49 (dd, *J* = 12.9, 2.9 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-H), 7.09 (d, *J* = 5.9 Hz, H-35 y H-38), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32), 8.48 (d, *J* = 5.9 Hz, H-36 y H-37). **RMN ¹³C** (Espectro 231, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 8.6 (25-CH₃), 11.1 (C-19), 13.7 (C-18), 15.6 (26-CH₃), 20.1 (C-11), 28.1 (C-15), 28.2 (-C6), 30.9 (C-7), 31.8 (C-12), 32.4 (C-2), 33.7 (C-1), 34.4 (C-8), 35.9 (C-10), 36.9 (33-CH₂), 39.3 (C-4), 40.6 (C-5), 46.0 (C-22), 48.2 (C-13), 49.5 (C-23), 49.8 (C-14), 50.1 (C-16), 52.3 (C-24), 54.3 (C-9), 54.7 (C-21), 65.7 (C-20), 70.9 (C-3), 122.6 (q, *J*_{C-F} = 274.4 Hz, CF₃), 124.3 (C-35 y C-38), 127.5 (q, *J*_{C-C-F} = 43.8 Hz, C-28), 128.5 (q, *J*_{C-C-C-F} = 6.4 Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-31), 132.5 (C-30), 139.3 (C-27), 148.9 (C-34), 149.7 (C-36 y C-37), 221.4 (C-17). **EM baja resolución** (Espectro 232, APCI+, *m/z*): 716.45 [M+H]⁺. **Pureza:** 86.2% (Cromatograma 14, tiempo de retención = 18.4 min, 70:30 MeOH:H₂O-isocrática, columna Luna C18).

7.3.1.20 Síntesis del *trans*-2,5-dimetil-1-[[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl]piperazina

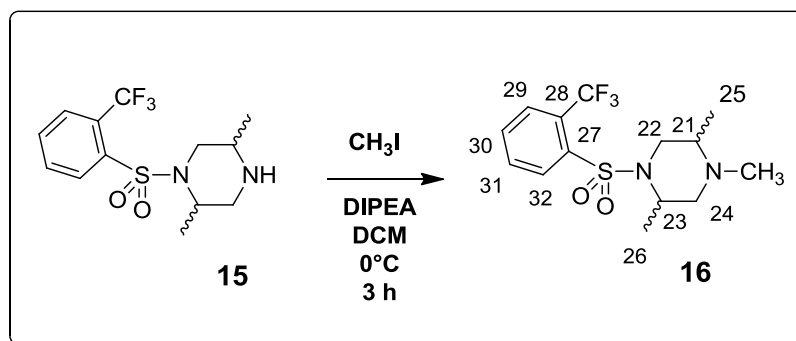


En un matraz de fondo redondo de 50 mL se pesaron 3.0 g (26.3 mmol) de *trans*-2,5-dimetilpiperazina y se disolvieron en 20 mL de diclorometano. La solución se enfrió en un baño de hielo-sal a aproximadamente -5°C. En este punto y con agitación magnética se adicionaron lentamente 2.1 mL (13.6 mmol) de cloruro de 2-(trifluorometil)bencensulfonyl. Después de la adición, la reacción se agitó por una hora más a temperatura ambiente. La solución amarilla resultante se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de DCM/MeOH/TEA (desde 98:1:1 a 90:8:2). **Rendimiento:** 66%. **RMN ¹H** (Espectro 233, 400 MHz, CDCl₃): δ 1.06 (d, *J* = 6.6

7. Procedimiento experimental

Hz, 25-CH₃), 1.07 (d, $J = 6.7$ Hz, 26-CH₃), 1.51 (sa, 1H), 2.58 (dd, $J = 12.7, 5.6$ Hz, 1H of 24-CH₂), 2.96 (dd, $J = 12.7, 5.5$ Hz, 1H of 24-CH₂), 3.04 (m, 21-CH), 3.11 (dd, $J = 12.7, 3.6$ Hz, 1H of 22-CH₂), 3.63-3.68 (m, 1H de 22-CH₂ y 23-CH), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **EM baja resolución** (Espectro 234, APCI+, m/z): 323.10 [M+H]⁺.

7.3.1.21 Síntesis del (*trans*-2,5)-1,2,5-trimetil-1-{[2-(trifluorometil)fenil]sulfonyl}piperazina



En un matraz de fondo redondo de 10 mL se pesaron 150 mg (0.46 mmol) del compuesto **15** y se disolvieron en 5 mL de diclorometano. Esta solución se enfrió en un baño de hielo-sal a aproximadamente 0°C. Posteriormente con agitación magnética se agregaron 0.1 mL de diisopropilamina y 84 μ L (1.3 mmol) de yoduro de metilo. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura por tres horas más y después el exeso de disolvente se evaporó a presión reducida con un evaporador rotatorio. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna, eluyendo por gradiente de DCM/MeOH/TEA (desde 99:0.5:0.5 a 92:7:1). **Rendimiento:** 48%. **RMN ¹H** (Espectro 234, 400 MHz, CDCl₃): δ 0.87 (d, $J = 2.6$ Hz, 25-CH₃), 1.11 (d, $J = 2.6$ Hz, 26-CH₃), 2.17 (dd, $J = 12.7, 5.6$ Hz, 1H de 24-CH₂), 2.25 (s, N-CH₃), 2.66 (m, 21-CH), 2.72 (dd, $J = 12.7, 5.6$ Hz, 1H of 24-CH₂), 3.15 (dd, $J = 12.7, 3.6$ Hz, 1H de 22-CH₂), 3.59 (dd, $J = 12.8, 3.1$ Hz, 1H de 22-CH₂), 3.88 (m, 23-CH), 7.68 (m, H-30 y H-31), 7.87 (m, H-29), 8.17 (m, H-32). **RMN ¹³C** (Espectro 235, 100.6 MHz, CDCl₃): δ 9.3 (25-CH₃), 16.3 (26-CH₃), 42.5 (N-CH₃), 48.4 (C-22), 50.9 (C-23), 54.6 (C-21), 55.1 (C-24), 122.6 (q, $J_{C-F} = 274.4$ Hz, C-F₃), 126.7 (q, $J_{C-C-F} = 43.8$ Hz, C-28), 128.5 (q, $J_{C-C-C-F} = 6.4$ Hz, C-29), 131.9 (C-32), 132.1 (C-29), 132.5 (C-30), 140.1 (C-27). **EM alta resolución** (Espectro 236, FAB+, m/z): 337.1189 [M+H]⁺; **Pureza:** 99.9% (Cromatograma 15, tiempo de retención = 18.6 min, 40:60 MeOH/H₂O-isocratica con 0.1% de ácido fórmico, columna Luna C18).

7. Procedimiento experimental

7.4 Parte biológica: derivados del compuesto líder RM-532-105 (14a-14n)

7.4.1 Inhibición de la enzima 17 β -HSD3 en células LNCaP transfectadas

Las células LNCaP transfectadas con el gen *HSD17B3* (LNCaP[17 β -HSD3]) fueron donadas por IPSEN INNOVATION (Francia). Estas células fueron mantenidas a 37°C bajo una atmosfera del 5% de CO₂. Posteriormente, se hicieron crecer en un medio RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 4.5 g/L de D-Glucosa, 10 mM Hepes, 1mM de piruvato de sodio y 250 μ g/mL de higromicina. Para los ensayos enzimáticos, el medio tuvo la misma composición, a excepción de la higromicina. Las células LNCaP[17 β -HSD3] fueron cultivadas en una microplaca de 24 pozos a 10,000 células por cada pozo. Después de 2 días de incubación, se agregaron, al medio, 15 nM de [¹⁴C]-4-androsten-3,17-diona y 10 μ L de la solución de cada inhibidor disuelta en DMSO. La concentración final de DMSO en cada pozo fue ajustada a 0.05%. Después de 1 h de incubación, el medio de cultivo fue removido; en este punto, los esteroides marcados ([¹⁴C]-4-androstene-3,17-diona y [¹⁴C] Testosterona) se extrajeron con éter dietílico. Después de evaporar la fase orgánica hasta sequedad con un flujo de nitrógeno, el residuo se disolvió en diclorometano y se plaqueó en una cromatoplaque de sílica gel 60 F254 (EMD Chemicals Inc. Gibbstown, NJ, EU). Esta cromatoplaque se eluyó en un medio tolueno/acetona (4:1). Los esteroides [¹⁴C]-4-androstene-3,17-diona y [¹⁴C] Testosterona se identificaron por comparación con esteroides de referencia y se cuantificaron por medio de un aparato de autorradiografía STORM 80 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EU). Finalmente, los porcentajes de transformación fueron calculados de acuerdo a la cantidad de [¹⁴C] Testosterona producida.

7.4.2 Actividad proliferativa sobre células LAPC-4 (AR⁺)

Las células andrógeno-sensibles de cáncer de próstata fueron donadas por el grupo del Dr. Robert E. Reiter de la Universidad de California (Los Angeles, CA, EU). Estas células fueron mantenidas a 37°C bajo una atmosfera del 5% de CO₂ en un medio IMDM (Medio Dulbecco modificado) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, 1% (v/v) de L-glutamina y 1% de insulina. Para determinar el efecto de los nuevos compuestos sobre la proliferación celular, las células LAPC-4 fueron suspendidas con un medio suplementado con suero fetal bovino tratado con 5% de dextran adsorbido en carbón activado, en lugar de sólo suero fetal bovino al 10% (v/v), con la finalidad de remover cualquier hormona del medio. En una microplaca de 96 pozos (Becton-Dickinson Company, Lincoln Park, NJ, EU), se agregaron 5,000 células contenidas en el medio de cultivo y éstas se pre-incubaron por 24 h a 37°C bajo una atmosfera del 5% de CO₂. Los compuestos a evaluar y la DHT se disolvieron en DMSO para preparar una solución stock 0.01 M y, a partir de ésta, se hicieron diluciones sucesivas usando el medio de cultivo. Posteriormente, se añadieron a los pozos correspondientes y se incubaron por tres días. Los pozos

7. Procedimiento experimental

control se trataron sólo con DMSO. Se utilizó el método MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazolonio)) para cuantificar el crecimiento celular, usando el kit, para estos fines, con la marca CellTritter 96® (Promega, Nepean, ON, Canada) y siguiendo las instrucciones del marbete. La actividad proliferativa (y por tanto androgénica) fue expresada con base en la diferencia entre la proliferación (en %) causado por un compuesto y la proliferación basal fijada al 100%.

7.4.3 Ensayo para la determinación de la estabilidad metabólica

Para cada ensayo se utilizaron 40µg de microsomas de hígado de humano de la casa *Corning* (Melrose, MA, EU) en presencia o ausencia de NADPH; así como 10 µM de cada compuesto (sustrato) en un volumen final de 100 µL de buffer Tris suplementado con 10 mM de MgCl₂. Cada ensayo fue finalizado al agregar 100 µL de metanol y posteriormente se centrifugó a 13,0000 g por 10 min para obtener un pellet de proteínas. El sobrenadante de los dos ensayos, para cada compuesto, se filtró y una muestra de 100 µL fue analizada por HPLC-MS en un equipo Shimadzu LCMS-2020 APCL con una columna Alltima HP C18 (250 mm X 4.6 mm, 5 µm), utilizando como fase móvil metanol/agua (70:30, 50:50, 30:70, o 20:80 dependiendo de la polaridad del compuesto) y finalmente metanol. La longitud de onda del detector UV fue ajustada a 190 nm. El compuesto remanente (expresado en %) se calculó al dividir el área bajo la curva del sustrato de los dos ensayos realizados en presencia de NADPH por el de ausencia de NADPH, y multiplicado por 100. Los valores reportados representan el promedio de 4 experimentos independientes.

7.5 Modelado molecular

El modelado molecular se realizó en una computadora Laptop TOSHIBA modelo A505 con un procesador Intel® Core™ i3 de 2.3 GHz y 4 GB de memoria RAM. Se utilizó el programa *Spartan 10*®.⁹⁷ Mediante un análisis conformacional, la geometría de las moléculas **6a-6u** y algunos derivados de RM-532-105 (mostrados en las Figuras 19, 20 y 21) fue optimizada por el campo de fuerza Merck (MMFF94), eligiendo el confórmero de mínima energía. Una vez obtenido este confórmero, se llevó a cabo la optimización estructural mediante el método semiempírico PM6 y después, por el método de teoría de funcionales de la densidad DFT/B3LYP 6-31G*. A partir de la estructura obtenida, se calcularon los descriptores QSAR para los derivados **6a-6u**. La estructura de todos estos compuestos fue enviada al servidor online del *CBDD-Group: Computational Biology and Drug Design Group*⁹⁸ para el cálculo de los descriptores MOE. El análisis de correlación se determinó mediante la matriz de correlación de cada descriptor con la actividad biológica. Para estos fines se utilizó el programa *DataWarrior*⁹⁹. Adicionalmente, este programa sirvió para la generación de la Gráfica 1. Por otra parte, las imágenes de las moléculas mostradas en las figuras 19, 20 y 21 fueron generadas con el programa *UCSF Chimera X*.¹⁰⁰

REFERENCIAS

1. Programa de actualización continua para urología- Hiperplasia Prostática Obstructiva; página web consultada el 7 de Marzo del 2016 en: <http://www.drscope.com/pac/urologia/index.htm>
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) página web consultada el 12 de Mayo del 2017 en www.inegi.org.mx/
3. H. A. Guess, *Epid. Rev.* **2001**, 23, 152–158.
4. Organización Mundial de la Salud (OMS), pagina web consultada el 7 de Marzo del 2016 en: <http://www.who.int/es/>
5. D. J. Tindall, R. S. Rittmaster, *J. Urol.* **2008**, 179, 1235–42.
6. V. Luu-The, Y. Zhang, D. Poirier, F. Labrie, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 55, 581–587.
7. S. Aggarwal, S. Thareja, A. Verma, T.R. Bhardwaj, M. Kumar, *Steroids*, **2010**, 75:2, 109–153.
8. F. Mc Donald, J. Ford, A.G. Casson, *Molecular Biology of Cancer*, Ed. Garland Science/BilOS Scientific Publishers, 2da edición, (UK), **2005**, páginas 1 y 2.
9. G. Thurston David, *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, editorial CRC Press, (U.S.A.), **2007**.
10. H. C. Pilot, *Cancer*, **1993**, 7, 2962-2970.
11. J. Luo, N. L. Solimini, S.J. Elledge, *Cell*, **2009**, 136, 823-827.
12. S. Negrini, V.G. Gorgulis, T. D. Halazonetis, *Nat. Rev. / Mol. Cell Biol.* **2010**, 11, 220–228.
13. D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell*, **2000**, 100, 57–70.
14. N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, *Trends Mol. Med.* **2010**, 16, 107-117.
15. G. P. Moss, *Pure App. Chem.* **1989**, 61, 1783-1822.
16. W. L. Miller, R. J. Auchus, *Endocr. Rev.* **2011**, 32, 81–151.
17. T. S. Vasaitis, R. D. Brunoe, V. C. Njar, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, 12, 23–31.
18. C. Avendaño y J. C. Menéndez, *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, editorial Elsevier, primera edición, (UK), **2008**, páginas 54 y 55.
19. Mechanism of Action of Steroid Hormones: Animation, pagina web consultada el día 30 de abril del 2015 en: <http://tube.medchrome.com/2011/10/mechanism-of-action-of-steroid-hormones.html>
20. G. T. Barry, L. E. Hofkamp, *Differentiation*, **2011**, 82, 173–183.
21. Instituto Nacional del Cáncer, pagina web consulta el día 15 de Mayo del 2015 en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/prostata/>
22. E. Bratoeff, E. Ramírez, E. Murillo, G. Flores and M. Cabeza, *Curr. Med. Chem.* **1999**, 6, 1107–1123.
23. Asociación Europea de Urología, pagina web consultada el 11 de Mayo del 2012 en: <http://www.uroweb.org>
24. T. M. Nicholson, W. A. Ricke, *Differentiation*, **2011**, 82, 184–199.
25. Neoplasm, University of Virginia School Medicine, pagina web consultada el 15 de mayo del 2014 en: <http://www.webcitation.org/5yHQ19Rrp>
26. T. L. Rizner, H. K. Lin, D. M. Peehl, S. Steckelbroeck, D. R. Bauman, T. M. Penning, *Endocrinology*, **2003**, 144, 2922–2932.
27. C. Changmeng, S. P. Balk, *Endoc-Relat. Cancer*, **2011**, 18, 175–186.
28. M. E. Tan, J. Li, H. E. Xu, K. Melcher, E.-L. Yong, *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, 36, 1–21.

Referencias

29. A. B. Stewart, B. A. Lwaleed, D. A Douglas and B. R. Birch, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, **2005**, 5, 603–612.
30. A. Eichholz, R. Ferraldeschi, G. Attard, J.S. de Bono, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, 5, 68-75.
31. M.A. Ericson, L.E. Sundler, Westgren, *U. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1975**, 73, 39.
32. A. Saleh, B. El-Rahman, *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59, 1363-1368.
33. S. Lo, I. King, A. Alléra, D. Klingmüller, *Toxicol. Vitro.* **2007**, 21, 502–508.
34. D. Nebert W., T.P. Dalton, *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, 6, 947–960.
35. E. L. Boulpaep, W. F. Boron, *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. Ed. Elsevier Saunders. (EUA), **2005**, página 1180.
36. N. M DeVore, E. E. Scott, *Nature*, **2012**, 482, 116 -119.
37. S.E. Barrie, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1989**, 33, 1191-1195.
38. H. G. Bull, M. Garcia-Calvo, S. Andersson, W. F. Baginsky, H. K. Chan, D. E. Ellsworth, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 2359–2365.
39. R. K. Bakshi, G. H. Rasmusson, G .F. Patel, R. T. Mosley, B. Chang, K. Ellsworth, G. S Harris, R. L. Tolman, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 3189–3192.
40. M. Cabeza, I. Heuze, E. Bratoeff, E. Murillo, E. Ramirez, A. Lira. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 1081–1084.
41. E. Bratoeff, E. Ramírez, E. Flores, N. Valencia, M. Sánchez, I. Heuze, M. Cabeza, *Chem. Pharm. Bul.*, **2003**, 51, 1132–1136.
42. E. Ramírez, M. Cabeza, E. Bratoeff, I. Heuze, V. Pérez, D. Valdez, M. Ochoa, N. Teran, G. Jimenez, T. Ramírez, *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 1515–1518.
43. M. Cabeza, E. Flores, I. Heuze, M. Sánchez, E. Bratoeff, E. Ramírez, V.A. Francolugo, *Chem. Pharm. Bul.*, **2004**, 52, 535–539.
44. E. Bratoeff, T. Sainz, M. Cabeza, I. Heuze, S. Recillas, V. Pérez, C. Rodríguez, T. Segura, J. Gonzáles, E. Ramírez, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, 107, 48–56.
45. E. Bratoeff, M. Cabeza, V. Pérez-Ornelas, S. Recillas, I. Heuze, *J. Steroid Biochem. Mol. Bio.*, **2008**, 111, 275–281.
46. M. Cabeza, E. Bratoeff, G. Gómez, I. Heuze, A. Rojas, M. Ochoa, MA. Palomino, C. Revilla, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 111, 232–239.
47. V. Pérez-Ornelas, M. Cabeza, E. Bratoeff, I. Heuze, M. Sánchez, E. Ramírez, E. Naranjo-Rodríguez, *Steroids*, **2005**, 70, 217–224.
48. M. Cabeza, A. Zambrano, I. Heuze, E. Carrizales, A. Palacios, T. Segura, N. Valencia, E. Bratoeff, *Steroids*, **2009**, 74, 793–802.
49. E. Bratoeff, A. Zambrano, I. Heuze, A. Palacios, E. Ramírez, M. Cabeza, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, 25, 306–311.
50. E. Bratoeff, P. García, I. Heuze, J. Soriano, A. Mejía, AM Labastida, N. Valencia, M. Cabeza, *Steroids*, **2010**, 75, 499–505.
51. M. Garrido, E. Bratoeff, D. Bonilla, J. Soriano, Y. Heuze, M. Cabeza, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **2011**, 127, 367–373.

Referencias

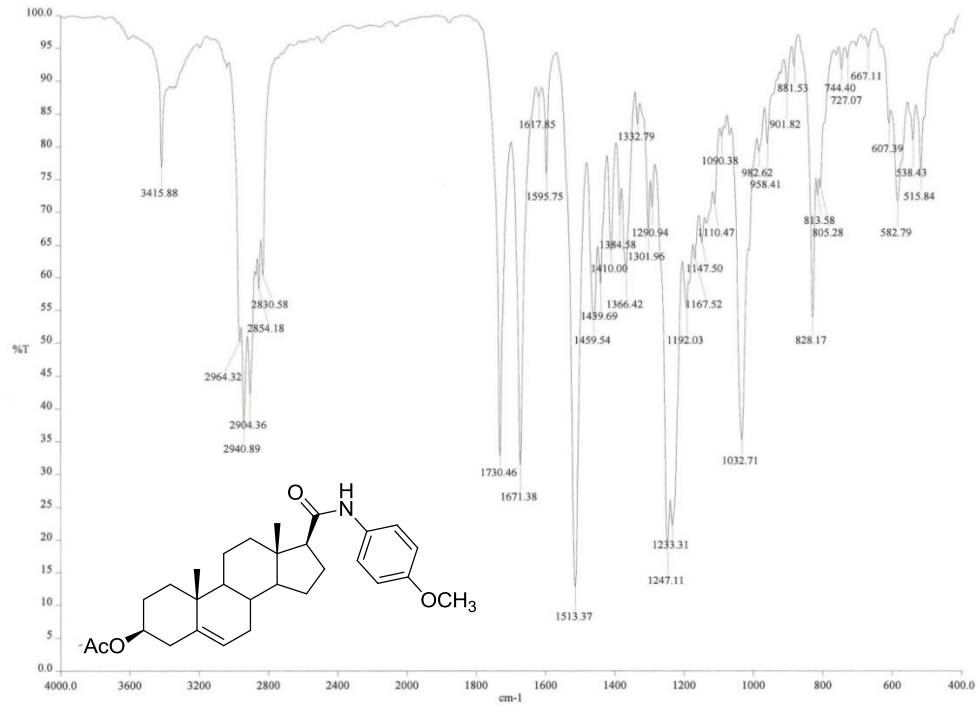
52. Y. Arellano, E. Bratoeff, M. Garrido, J. Soriano, Y. Heuze, M. Cabeza, *Steroids*, **2011**, *76*, 1241–1246.
53. E. Bratoeff, T. Segura, S. Recillas, E. Carrizales, A. Palacios, I. Heuze, M. Cabeza, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24*, 655–662.
54. M. Cabeza, E. Bratoeff, I. Heuze, A. Rojas, N. Terán, M. Ochoa, M. Teresa Ramírez-Apan, E. Ramírez, V. Pérez, I. Gracia, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2006**, *21*, 371–378.
55. S. Aggarwal, S. Thareja, T. R. Bhardwaj, M. Kumar, *Steroids* **2010**, *75*, 411–8.
56. D. D. Robinson, P. J. Winn, P. D. Lyne, W. G. Richards, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 573–583.
57. J. J. Naveja, F. Cortés-Benítez, E. Bratoeff, J. L. Medina-Franco, *Mol. Divers.* **2016**, *20*, 771–780.
58. J. Pérez-Villanueva, R. Santos, A. Hernández-Campos, M.A. Giulianotti, R. Castillo, J. L. Medina-Franco, *Med. Chem. Commun.* **2011**, *2*, 44–49.
59. Y. Rojas-Aguirre, J. L. Medina-Franco, *Mol. Divers.* **2014**, *18*, 599–610.
60. K. Z. Myint, X-Q. Xie, *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 3846.
61. D. Roger, M. Hahn, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 742–754.
62. V. Luu-The, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *76*, 143–151.
63. H. Peltoketo, V. Luu-The, J. Simard, J. Adamski, *J. Mol. Endocrinol.* **1999**, *23*, 1–11.
64. D. Poirier, *Expert Opin. Ther. Patents*, **2010**, *20*, 1123-1145.
65. A. Krazeisena, R. Breitling, K. Imai, S. Fritz, G. Möller, J. Adamski, *FEBS Lett.* **1999**, *460*, 373-379.
66. S-Y. Yang, X-Y He, H. Schulz, *Trends Endocrinol. Metab.* **2005**, *16*, 167-175.
67. Z. Chai, P. Brereton, T. Suzuki, H. Sasano, *Endocrinol.* **2003**, *144*, 2084–2091.
68. P. Lukacik, B. Kelle, G. Bunkoczi, K.L. Kavanagh, W. H. Lee, Adamski, *J. Biochem J.* **2007**, *402*, 419-427.
69. Y-S. Zhu, J. Imperato-McGinley, *Horm. Brain Behav.* **2009**, *5*, 2787-2824.
70. J. M. Day, H. J. Tutill, A. Purohit, M. J. Reed, *Endocr. Relat. Cancer*, **2008**, *15*, 665–92.
71. M. K. Froemming, S. Dalibor, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14518–14522.
72. E. Koh, T. Noda, J. Kanaya, M. Namiki, *The Prostate*, **2002**, *53*, 154-159.
73. T. E. Spires, B. E. Fink, E. K. Kick, D. You, C. a Rizzo, I. Takenaka, R. M. Lawrence, Z. Ruan, M. E. Salvati, G. D. Vite, *Prostate*, **2005**, *65*, 159–70.
74. K. Harada, H. Kubo, J. Abe, M. Haneta, A. Conception, S. Inoue, S. Okada, K. Nishioka, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3242–3254.
75. K. Harada, H. Kubo, Y. Tomigahara, K. Nishioka, J. Takahashi, M. Momose, S. Inoue, A. Kojima, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 272–275.
76. B. Atrice Tcheâ Dam Ngatcha, V. Luu-The, D. Poirier, *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2000**, *10*, 2533-2536.
77. R. Maltais, V. Luu-The, D. Poirier, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 640–653.
78. R. Maltais, M.-A. Fournier, D. Poirier, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4652–68.
79. J. Roy, M. Fournier, R. Maltais, L. C. Kenmogne, D. Poirier, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *141*, 44–51.
80. G. B. Djigoué, L. C. Kenmogne, J. Roy, R. Maltais, D. Poirier, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5433–51.
81. A. Delgado. *Introducción a la Química Terapéutica*, editorial Díaz Santos, 2da edición, España, **2004**, página 119.

Referencias

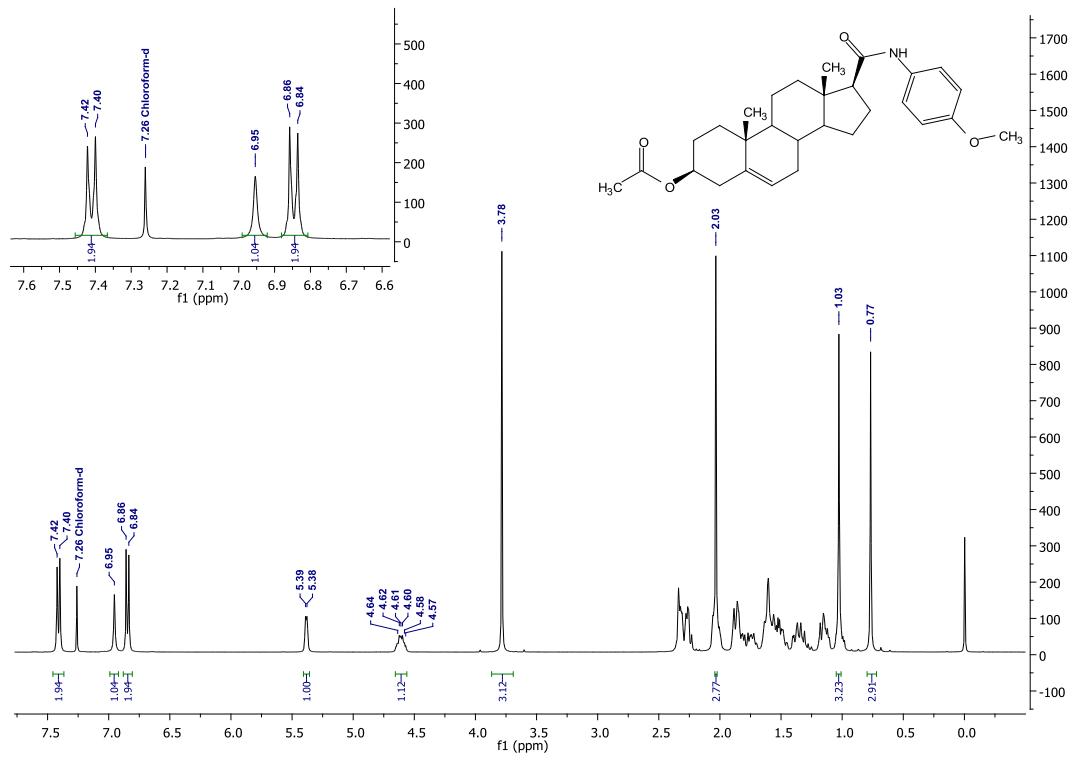
82. C. G. Wermuth, *The practice of Medicinal Chemistry*, editorial Elsevier, 3era edición, USA, **2008**, páginas 290-304.
83. D. K. Yun, J. Lee, Y. S. Keum, *Biomol. Ther.* **2013**, *21*, 49–53.
84. G. Attard, A. H. M. Reid, R. J. Auchus, B. A. Hughes, A. M. Cassidy, E. Thompson, N. B. Oommen, E. Folkerd, M. Dowsett, W. Arlt, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 507–516.
85. H. Renault, J.-E. Bassard, B. Rn Hamberger, D. Le Werck-Reichhart, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2014**, *19*, 27–34.
86. J. Staunton, E. J. Eisenbraun, *Org. Synth.* **1962**, *42*, 4.
87. L. Kurti, B. Czako, *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*. Ed. Elsevier Academic Press, (EUA), **2005**.
88. C. Djerassi, *Org. React.* **1951**, *6*, 207-272.
89. C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Kim, D. Xikaitani, E. J. Lien, *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1207–1216.
90. B. J. Long, D. N. Grigoryev, I. P. Nnane, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6630-6640.
91. P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *J. Med. Chem.* **2000**, *37*, 3714-3717.
92. F. G Yaremenko, A.V. Khvat. *Mendeleev Commun.* **1994**, *4*, 187-188.
93. E. J. Corey, M. Chaykovsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1353.
94. J. Liu, J. Chan, C. M. Bryant, P. A. Duspara, E. E. Lee, D. Powell, H. Yang, Z. Liu, C. Walpole, E. Roberts, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2971–2975.
95. R. Maltais, D. Ayan, A. Trottier, *J. Med. Chem.* **2013**, *57*, 204–222.
96. J. Gauthier, D. Poirier, C. Ayotte, *Steroids*, **2012**, *77*, 635–643.
97. Wavefunction Inc. <http://www.wavefun.com>
98. CBDD-Group: Computational Biology and Drug Design Group <http://www.scbdd.com>
99. Openmolecules. <http://www.openmolecules.org/datawarrior/>
100. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. E. F Pettersen, T.D. Goddard, C. C Huang, G. S Couch, D. M Greenblatt, E. C Meng, T. E Ferrin. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605-12.

ANEXO 1: ESPECTROS

ANEXO 1: Espectros

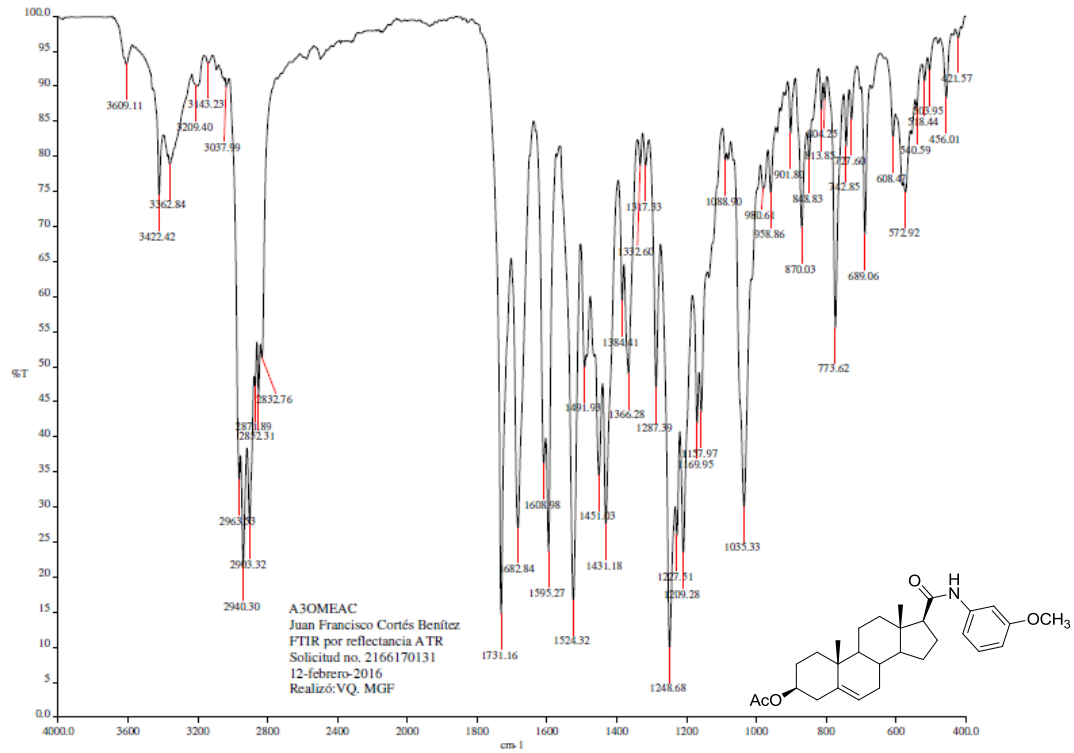


Espectro 1: IR del compuesto 4a

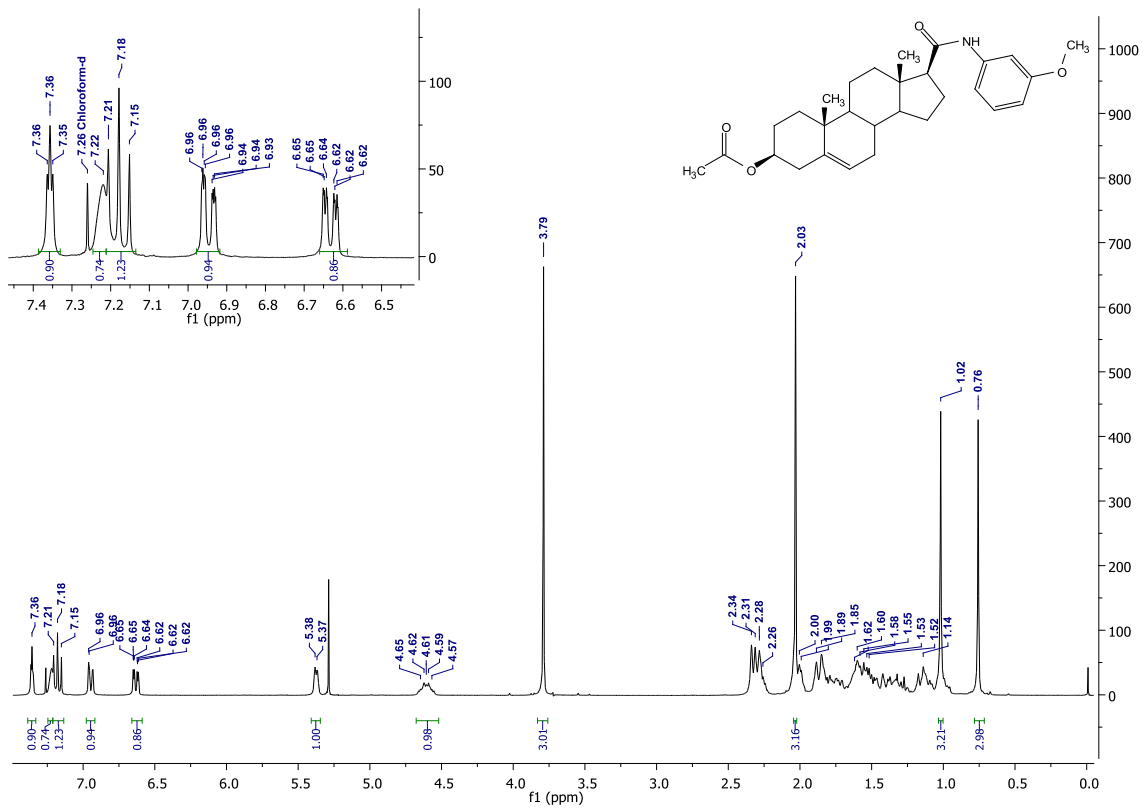


Espectro 2: RMN ^1H del compuesto 4a

ANEXO 1: Espectros

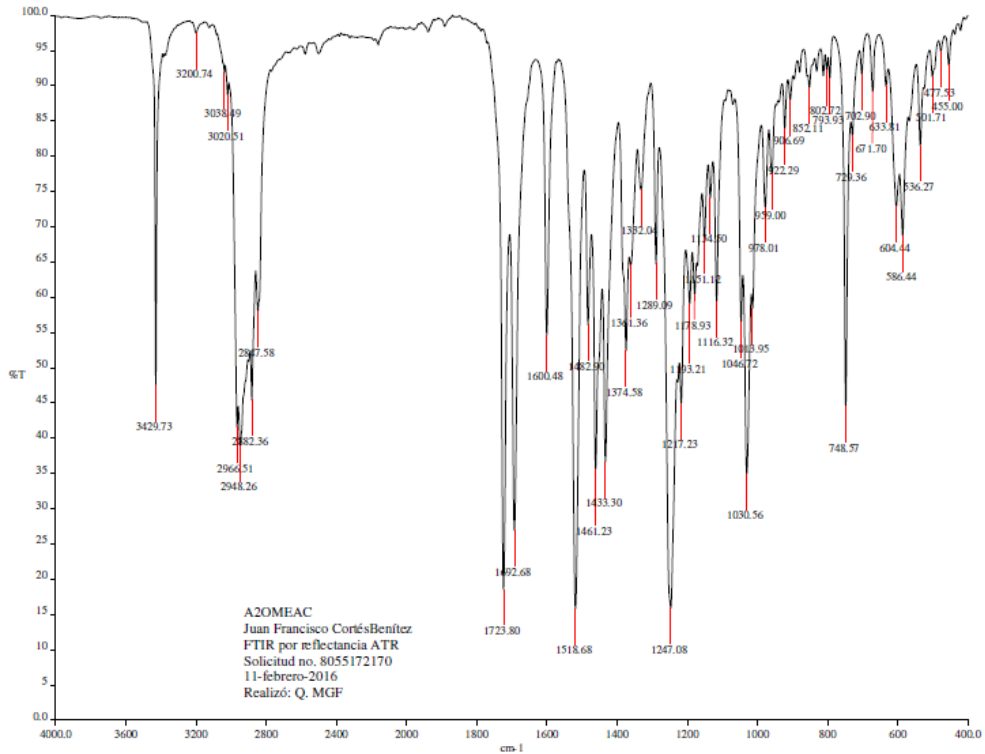


Espectro 3: IR del compuesto 4b

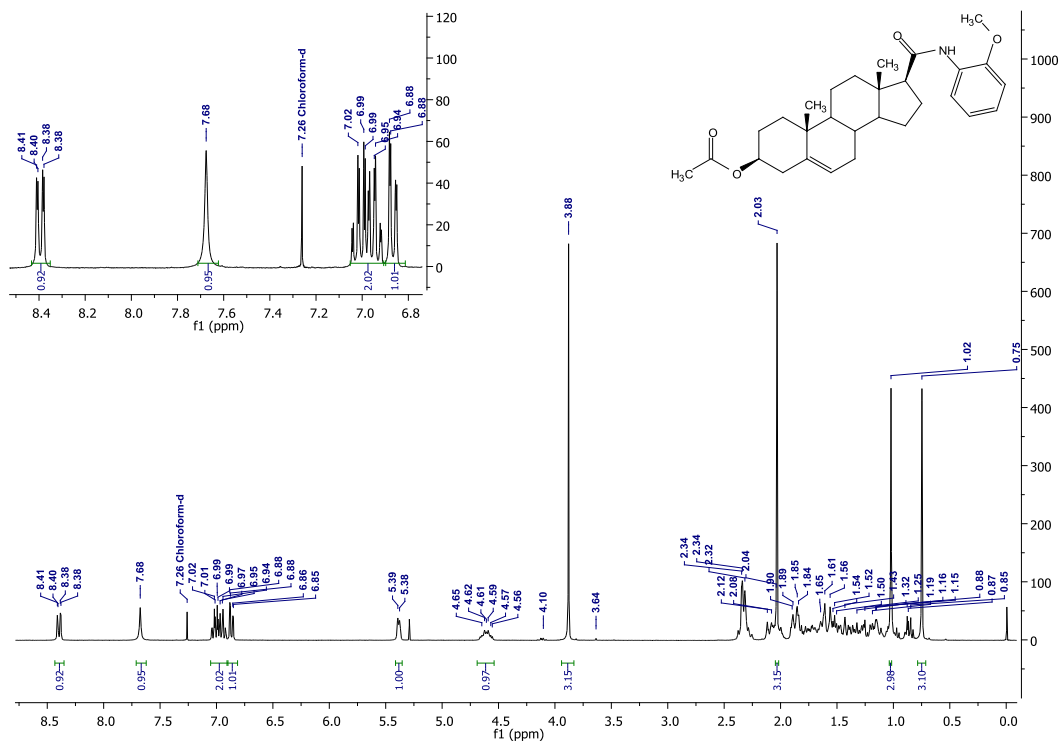


Espectro 4: RMN ¹H del compuesto 4b

ANEXO 1: Espectros

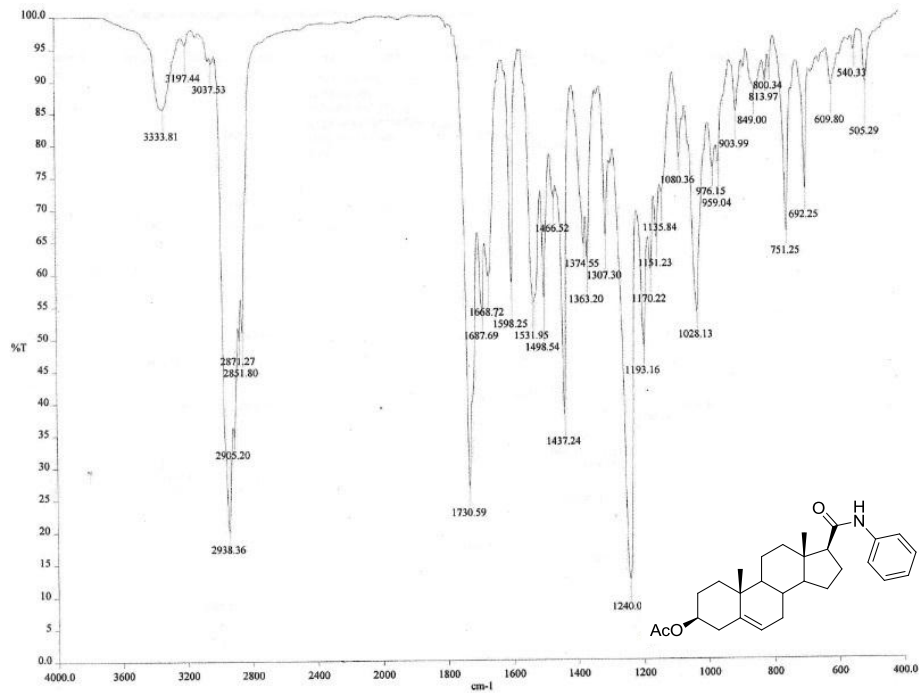


Espectro 5: IR del compuesto 4c

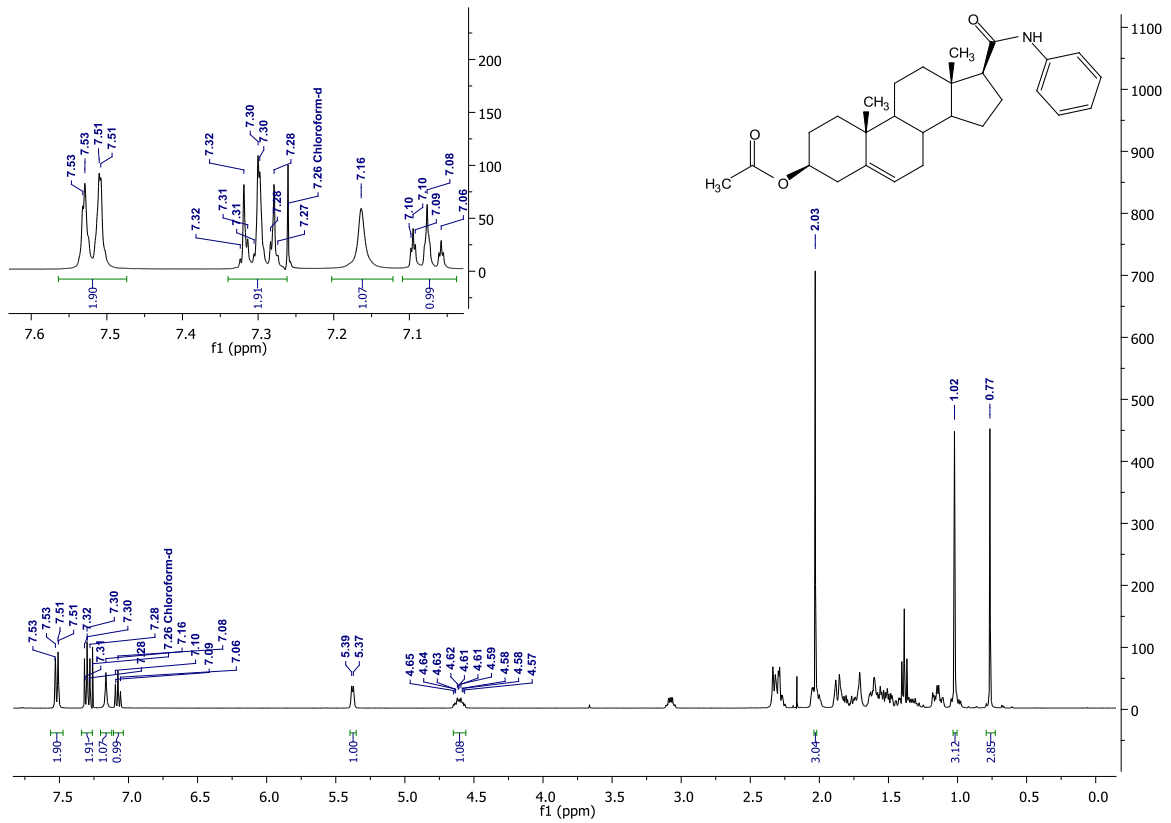


Espectro 6: RMN ¹H del compuesto 4c

ANEXO 1: Espectros

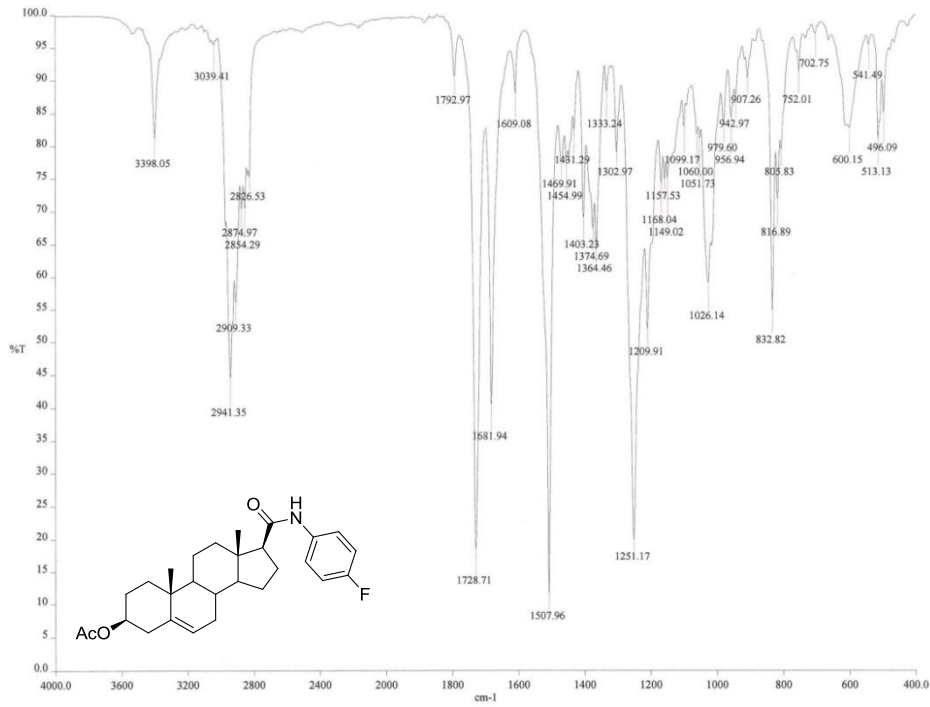


Espectro 7: IR del compuesto 4d

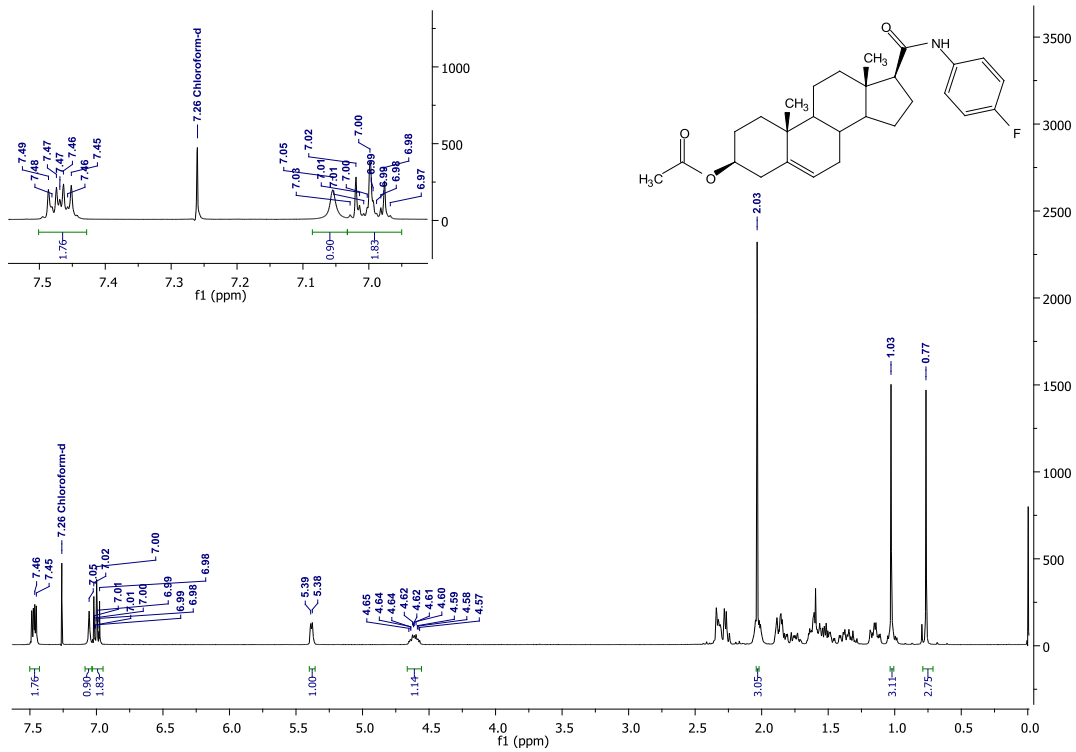


Espectro 8: RMN ¹H del compuesto 4c

ANEXO 1: Espectros

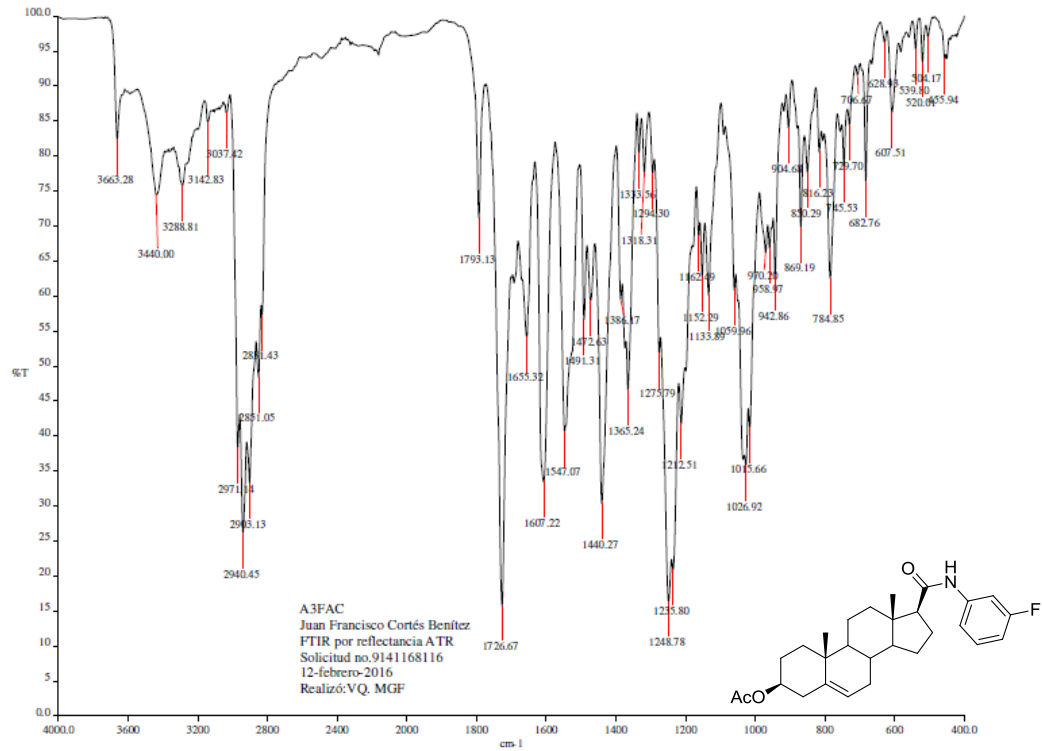


Espectro 9: IR del compuesto 4e

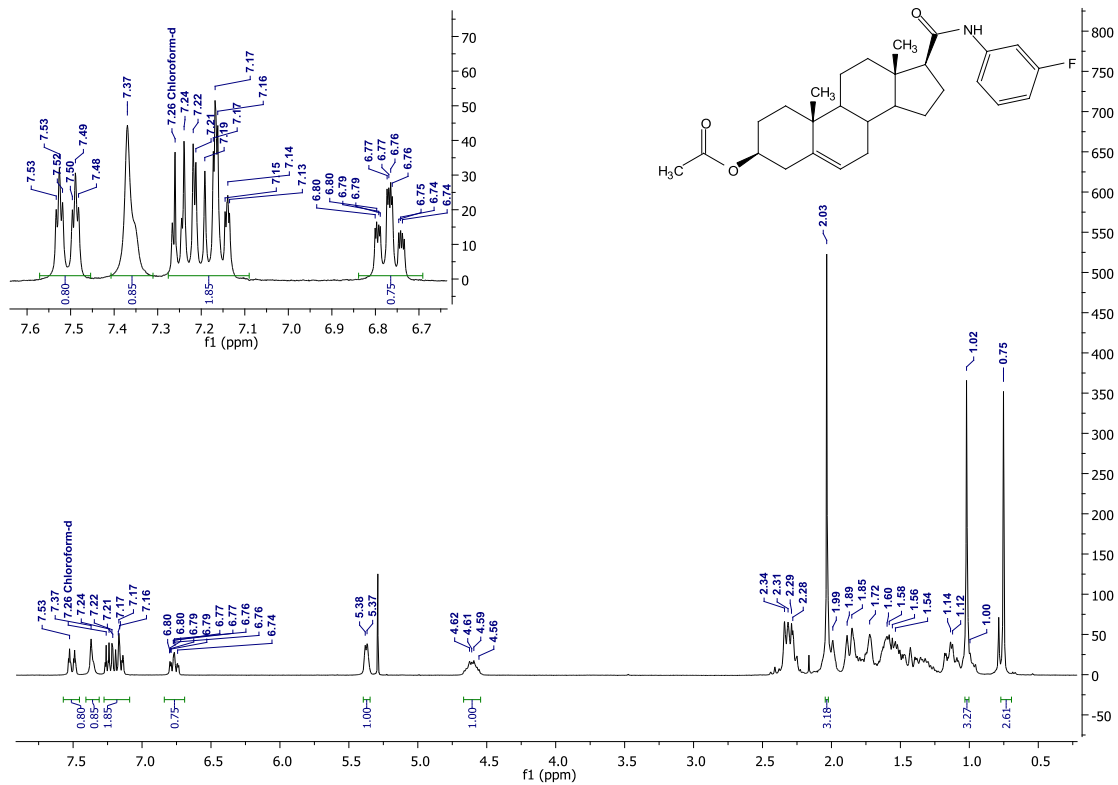


Espectro 10: RMN ¹H del compuesto 4e

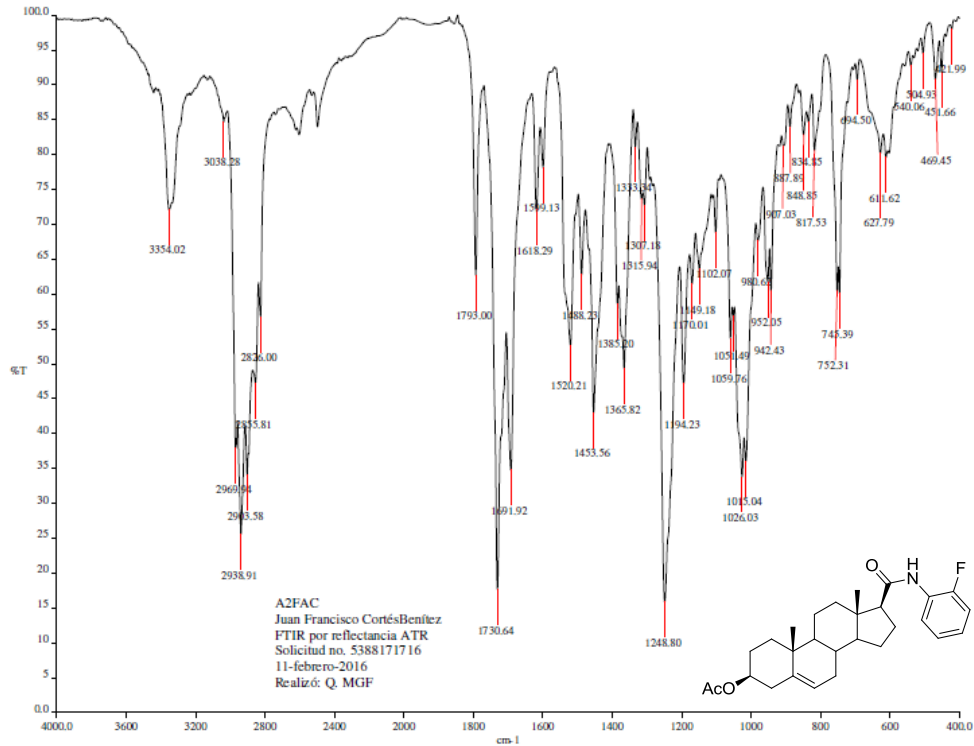
ANEXO 1: Espectros



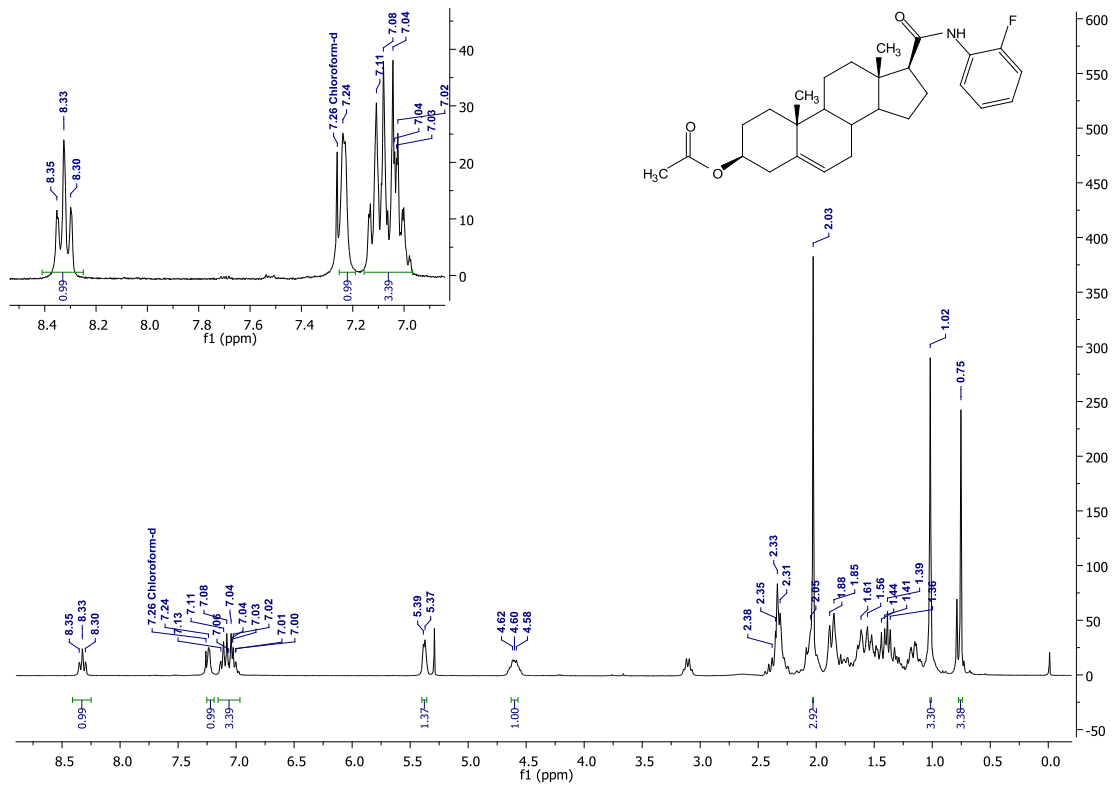
Espectro 11: IR del compuesto 4f



ANEXO 1: Espectros

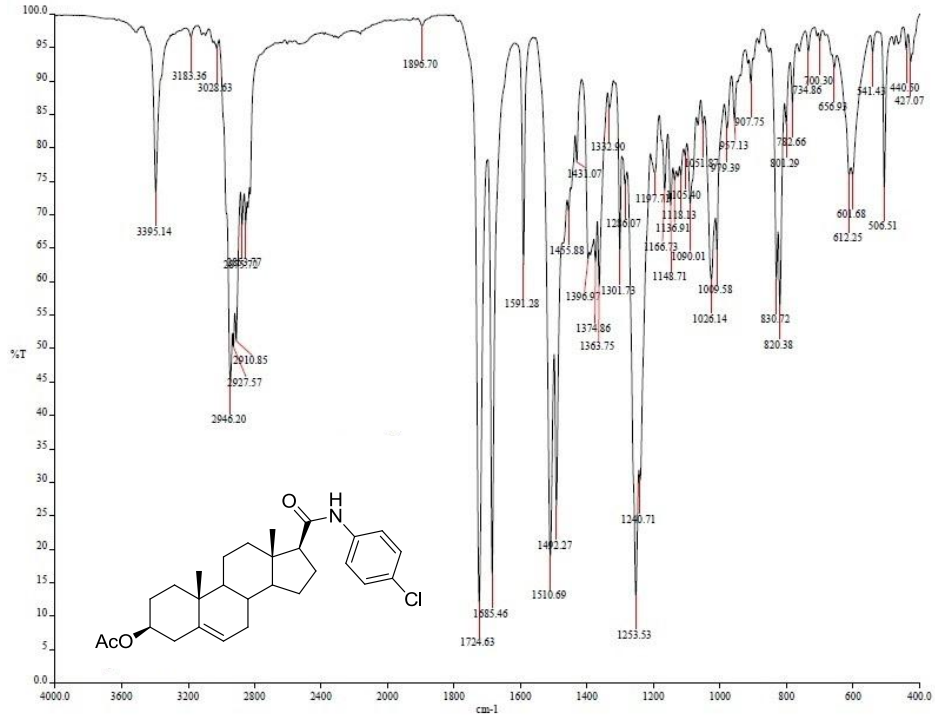


Espectro 13: IR del compuesto 4g

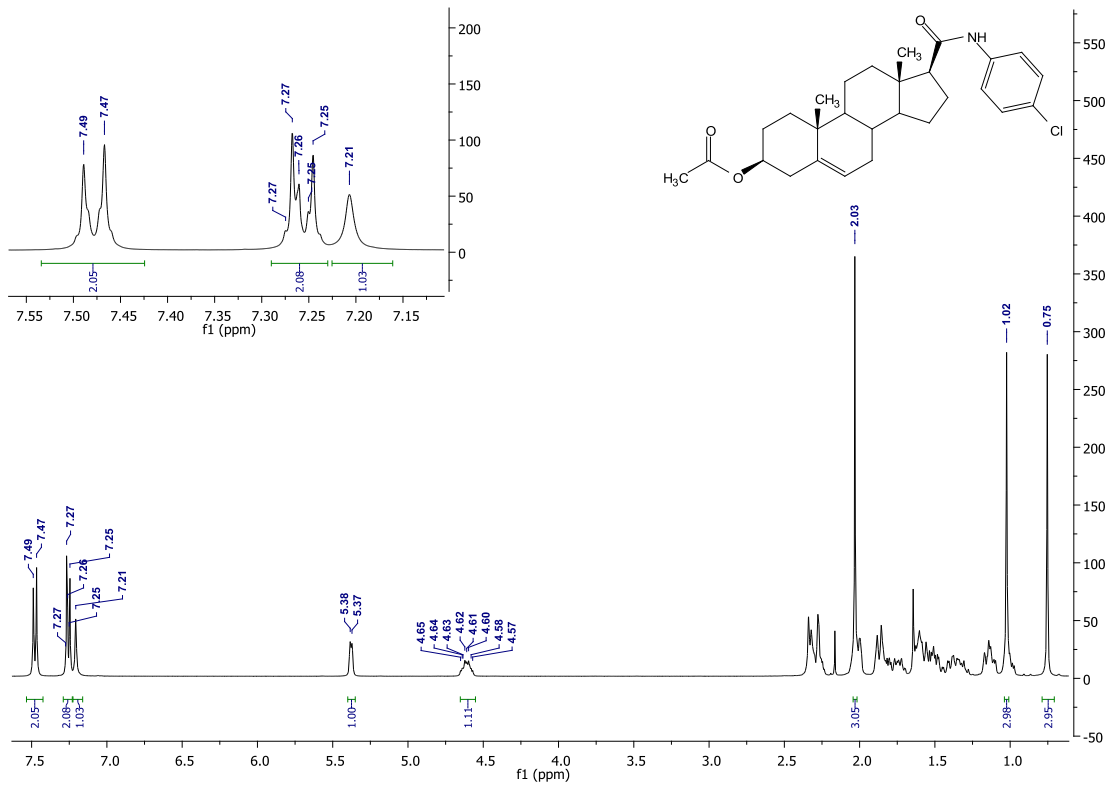


Espectro 14: RMN ¹H del compuesto 4g

ANEXO 1: Espectros

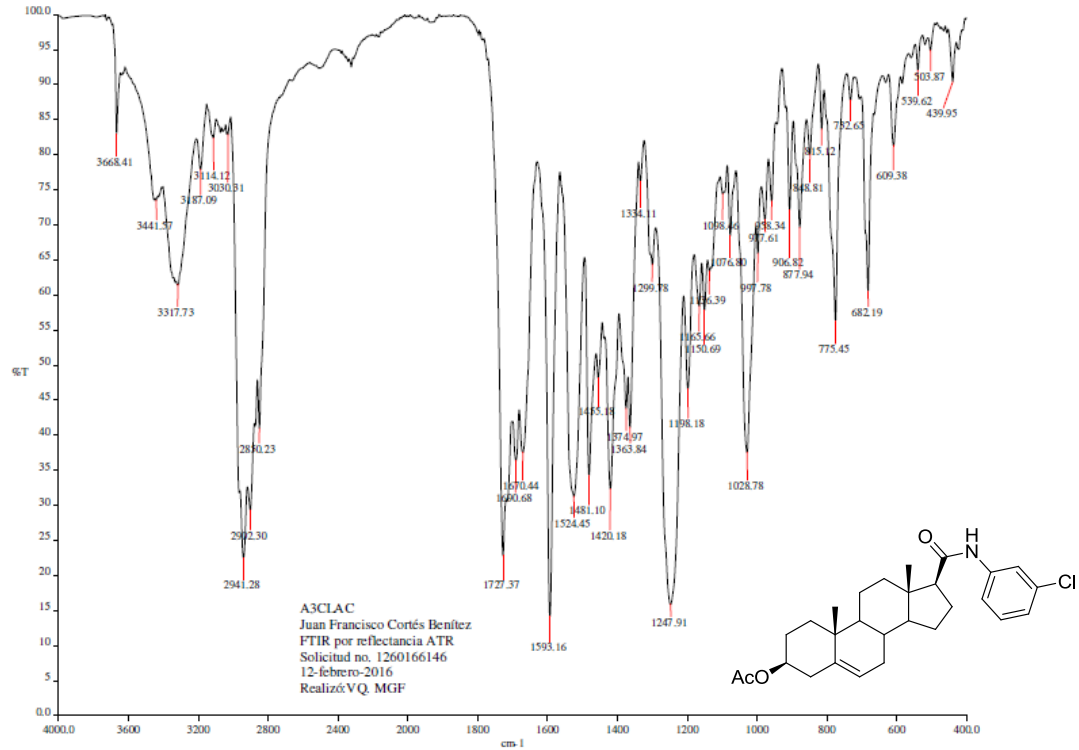


Espectro 15: IR del compuesto 4h

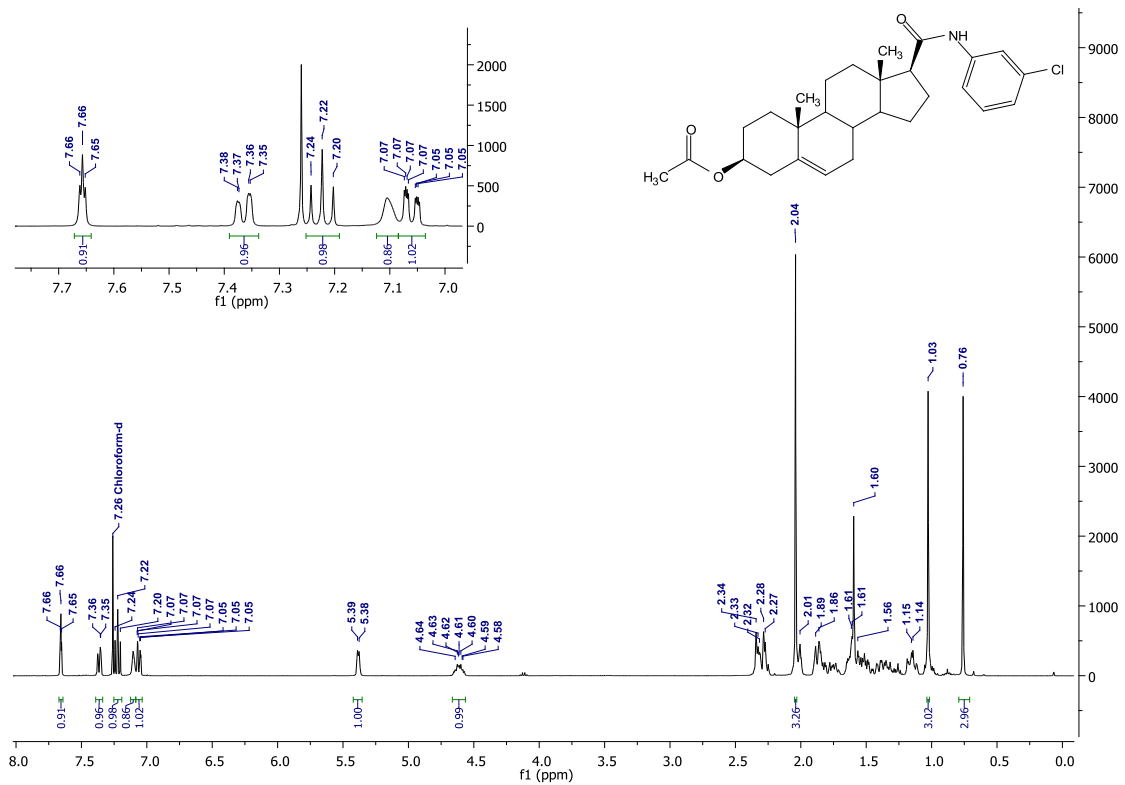


Espectro 16: RMN ¹H del compuesto 4h

ANEXO 1: Espectros

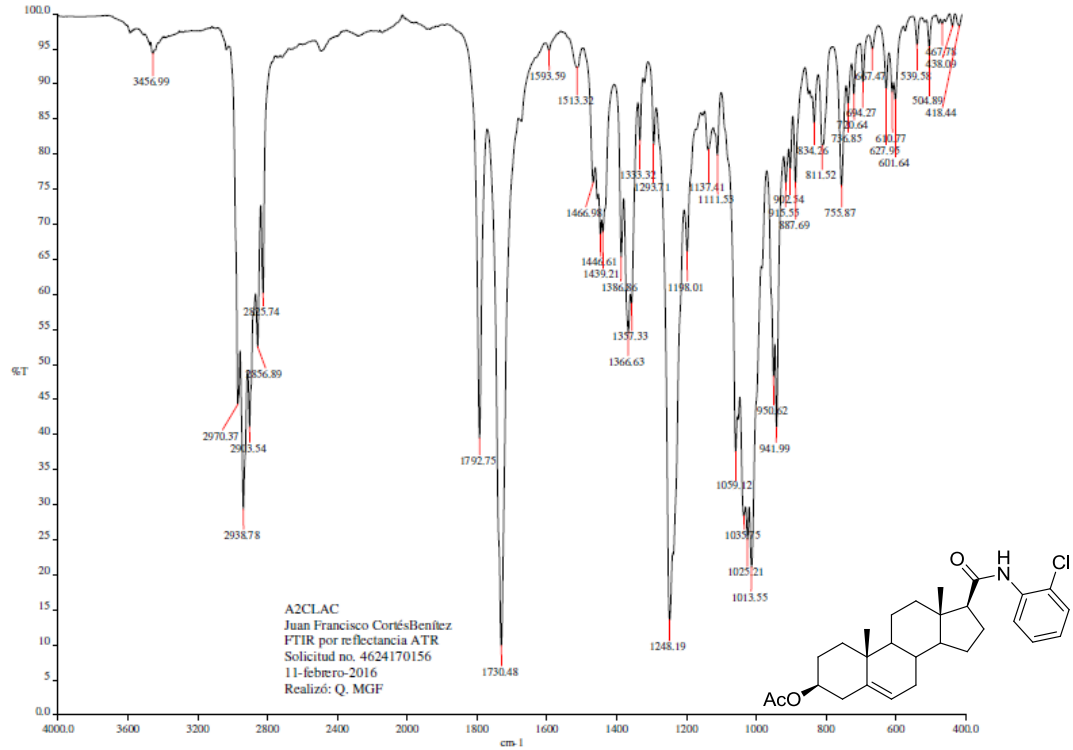


Espectro 17: IR del compuesto 4i

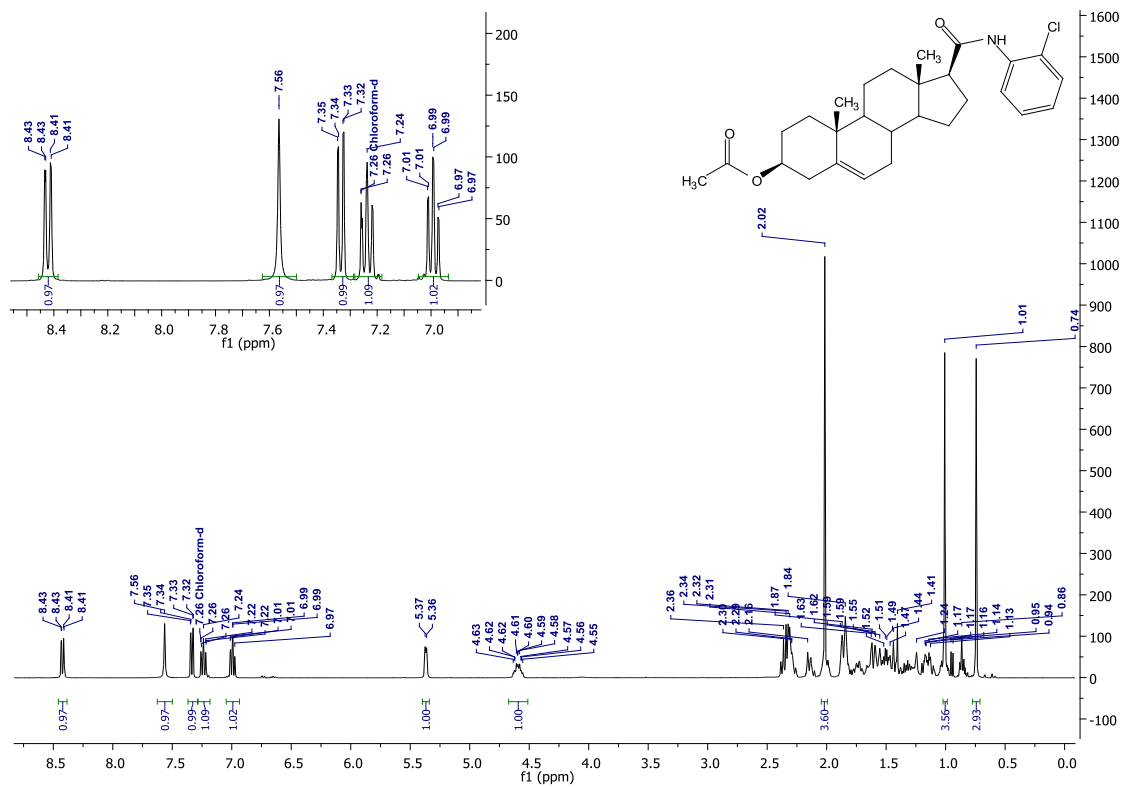


Espectro 18: RMN ¹H del compuesto 4i

ANEXO 1: Espectros

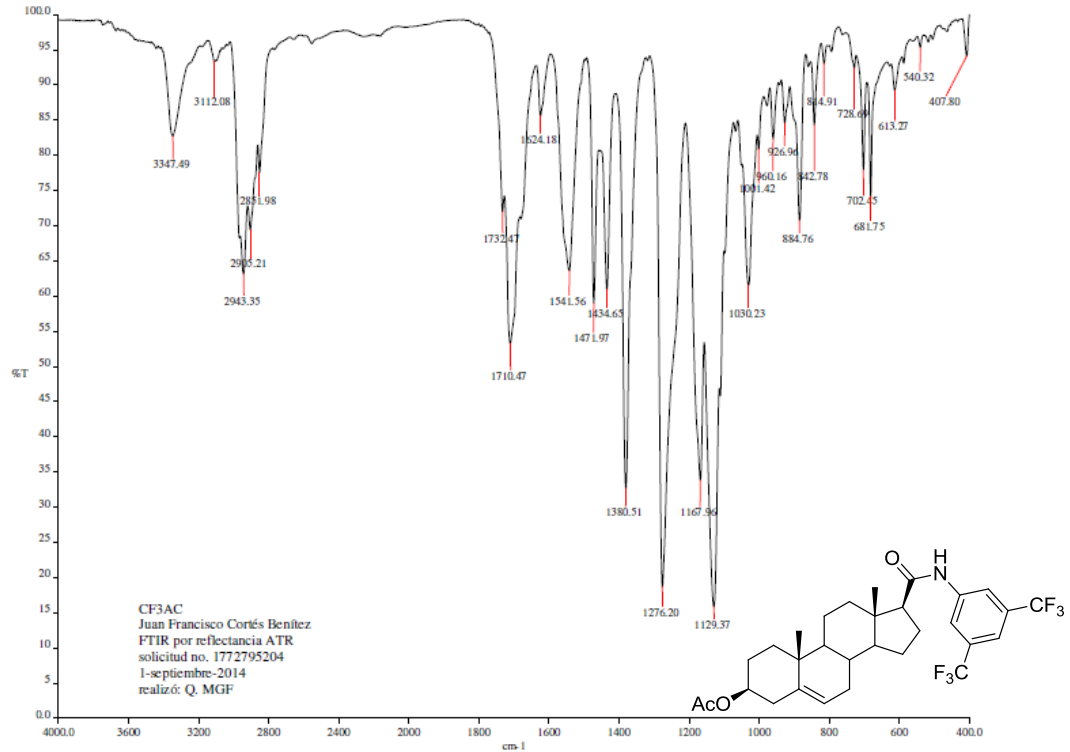


Espectro 19: IR del compuesto 4j

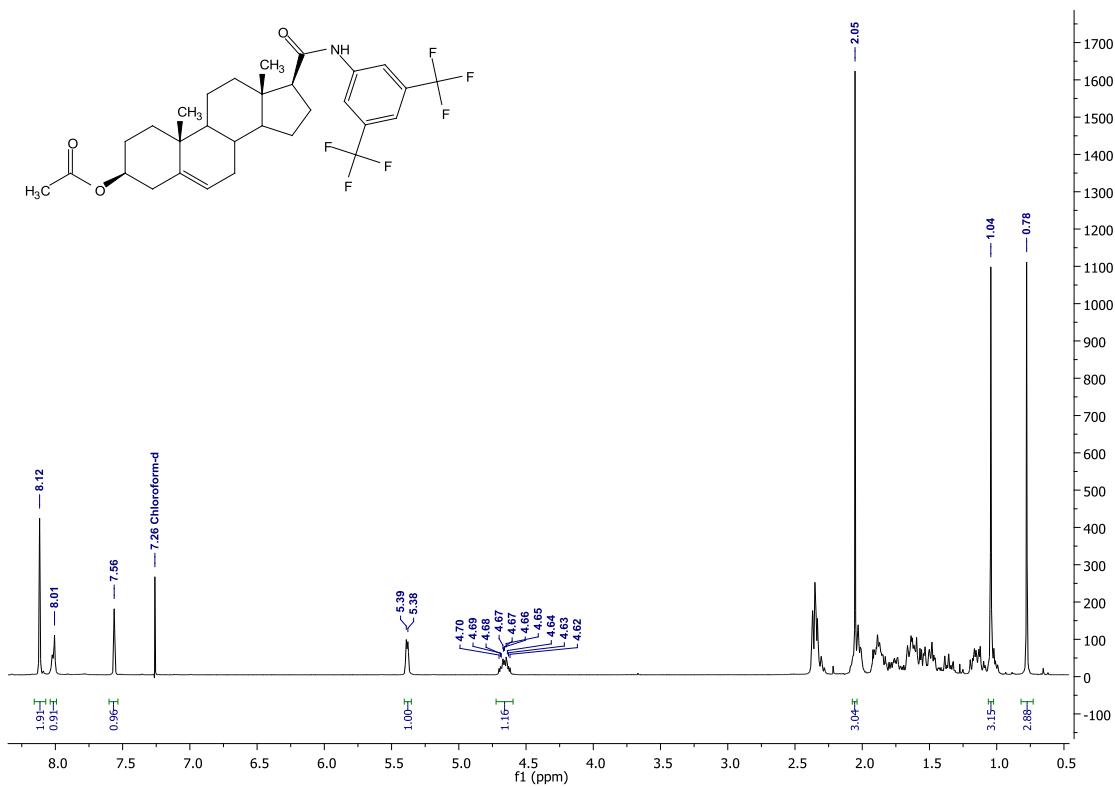


Espectro 20: RMN ¹H del compuesto 4j

ANEXO 1: Espectros

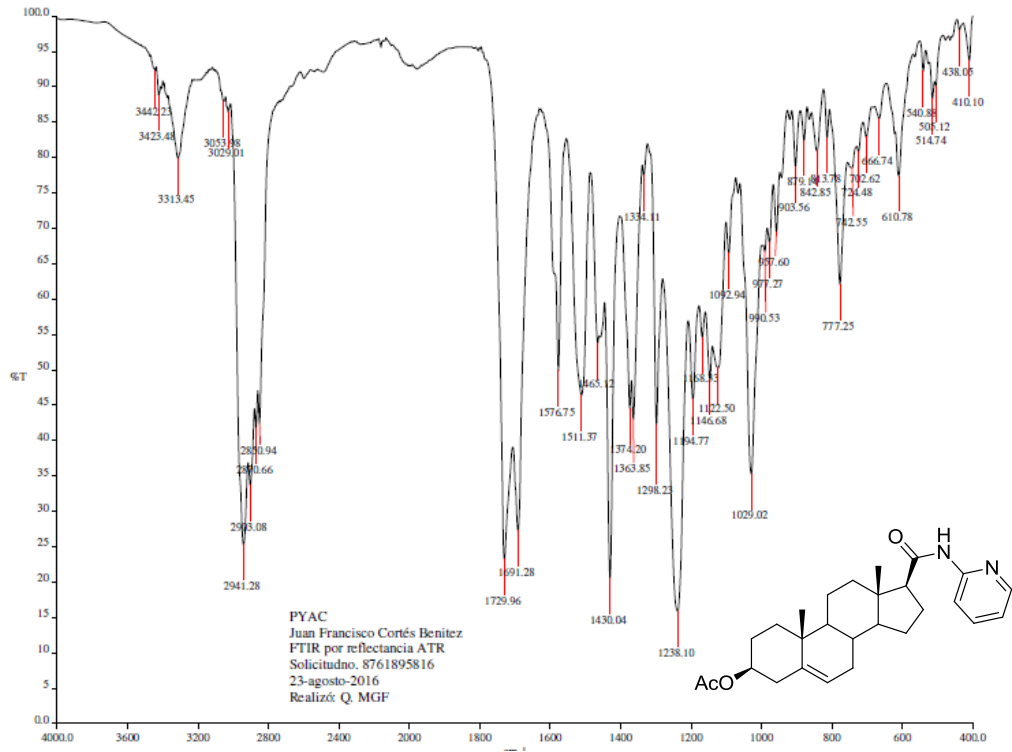


Espectro 21: IR del compuesto 4k

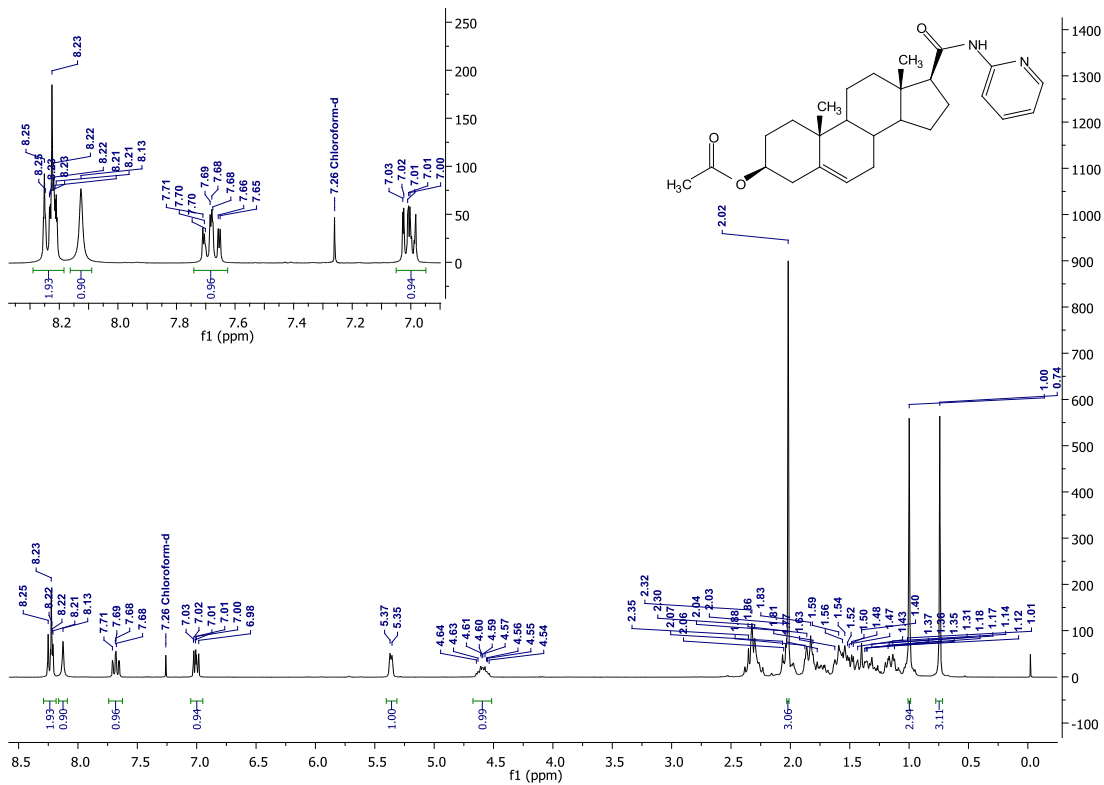


Espectro 22: RMN ¹H del compuesto 4k

ANEXO 1: Espectros

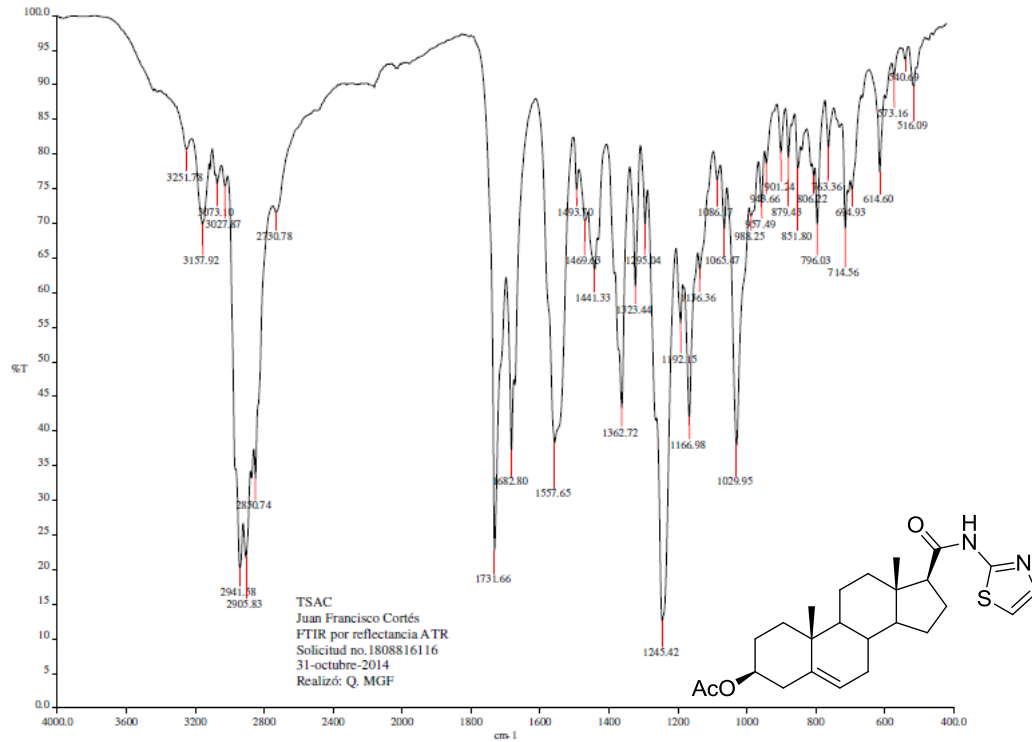


Espectro 23: IR del compuesto 41

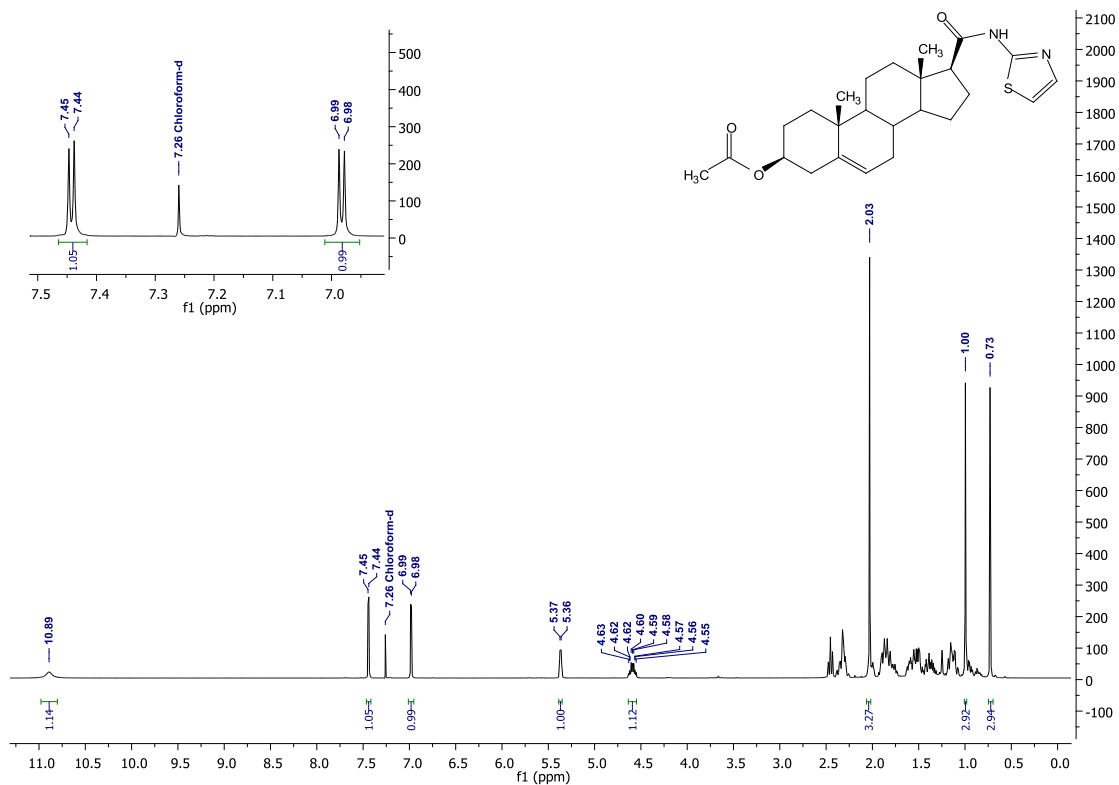


Espectro 24: RMN ¹H del compuesto 41

ANEXO 1: Espectros

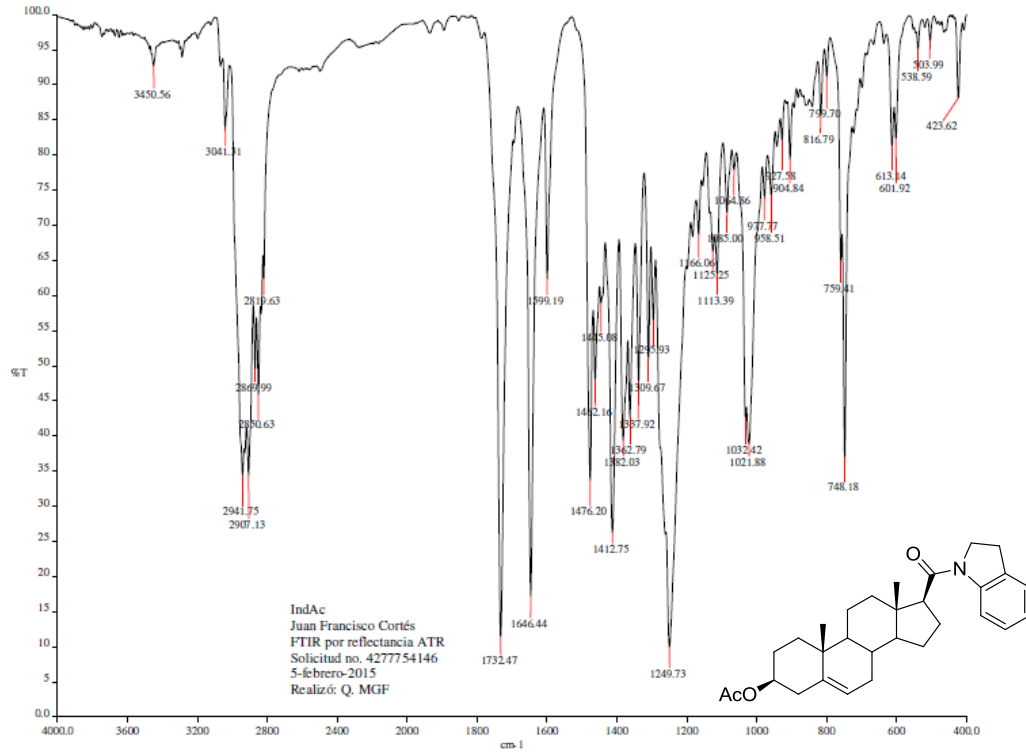


Espectro 25: IR del compuesto 4m

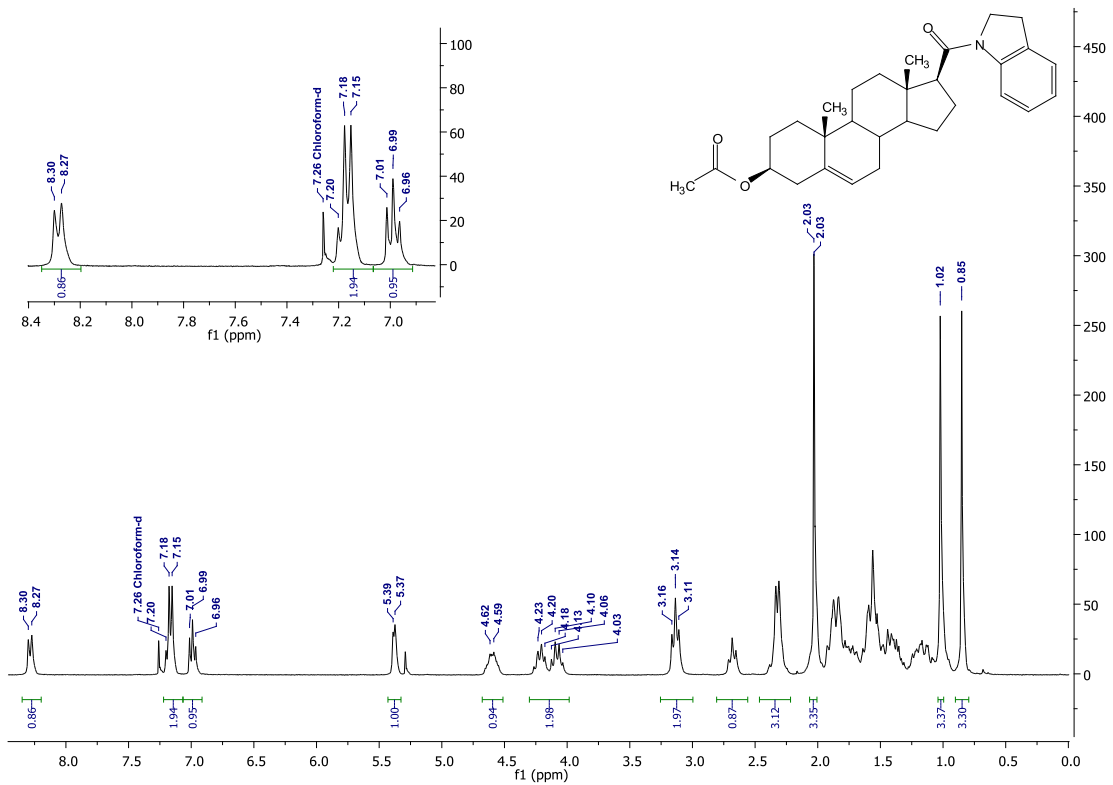


Espectro 26: RMN ¹H del compuesto 4m

ANEXO 1: Espectros

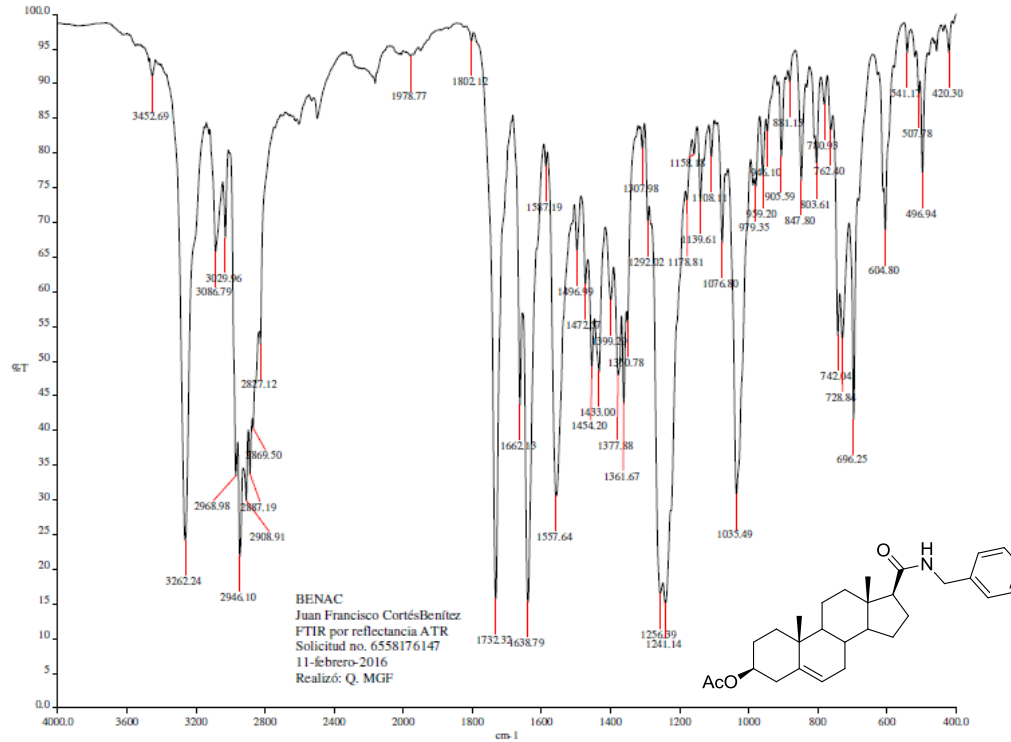


Espectro 27: IR del compuesto 4n

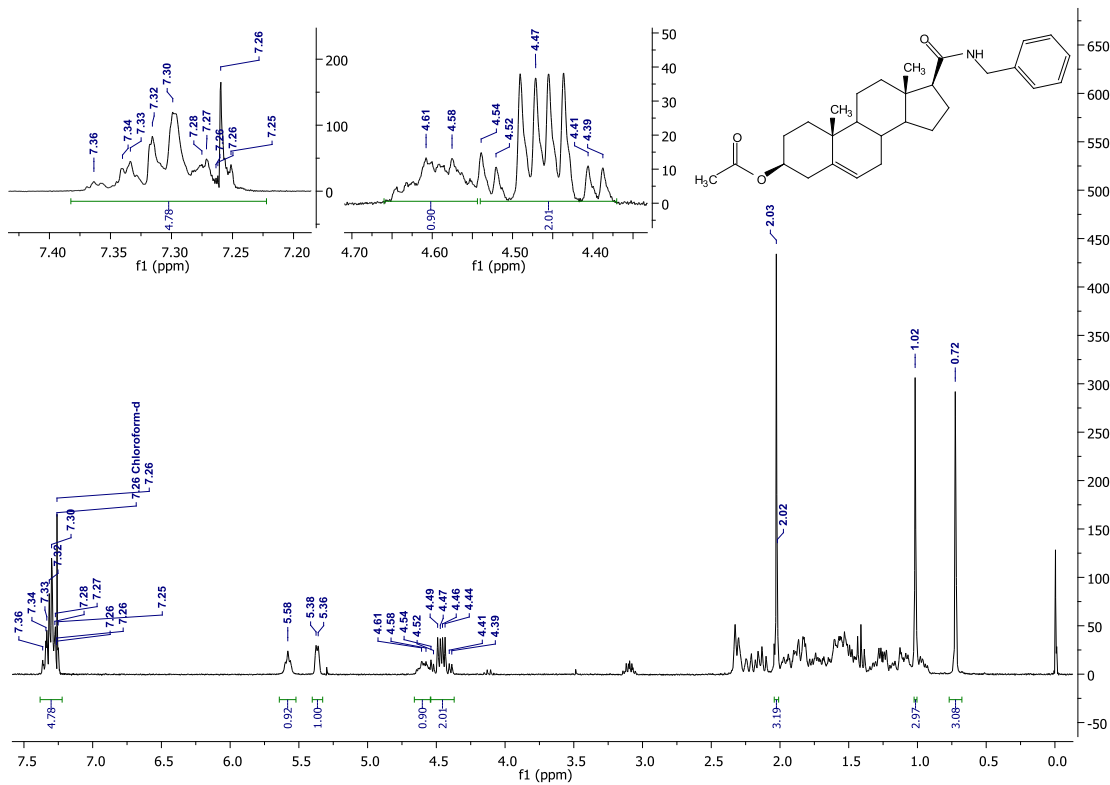


Espectro 28: RMN ¹H del compuesto 4n

ANEXO 1: Espectros

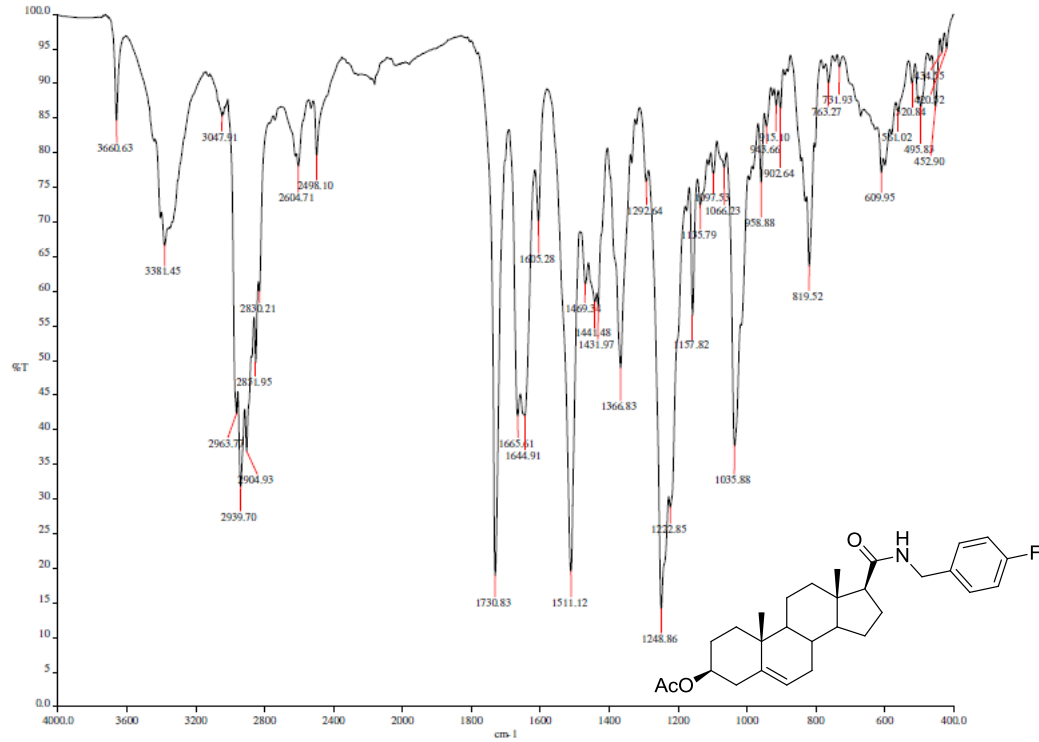


Espectro 31: IR del compuesto 4p

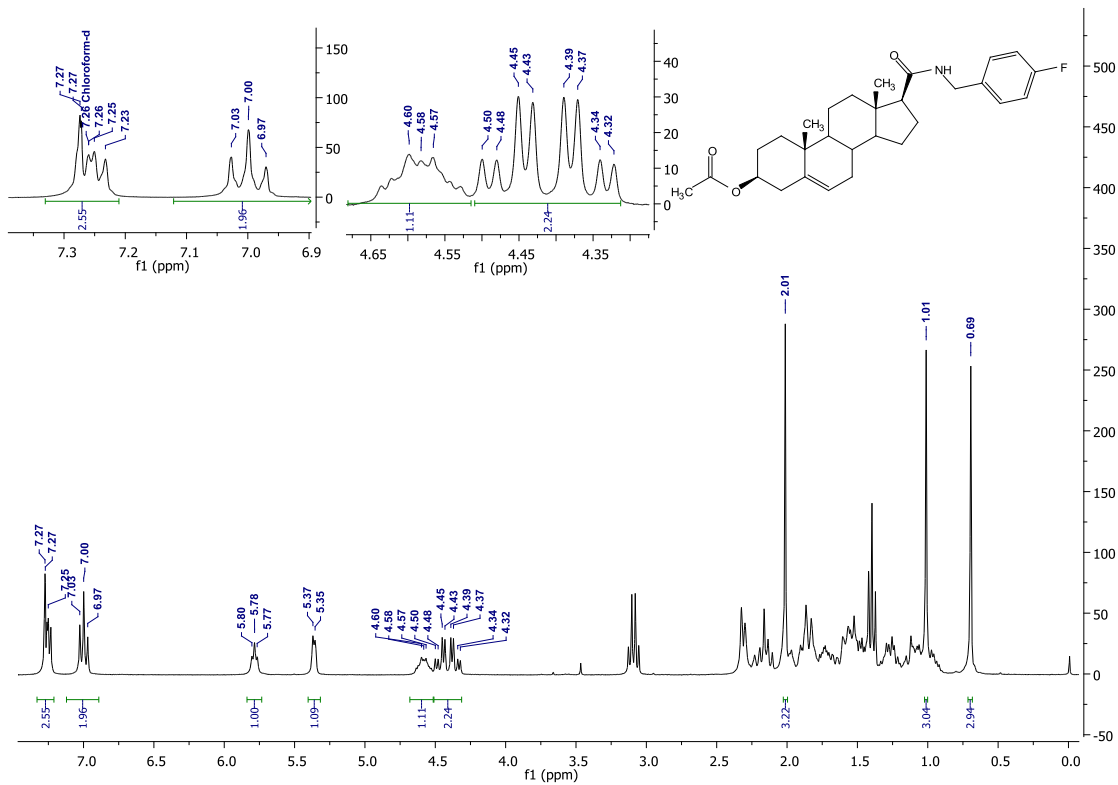


Espectro 32: RMN ¹H del compuesto 4p

ANEXO 1: Espectros

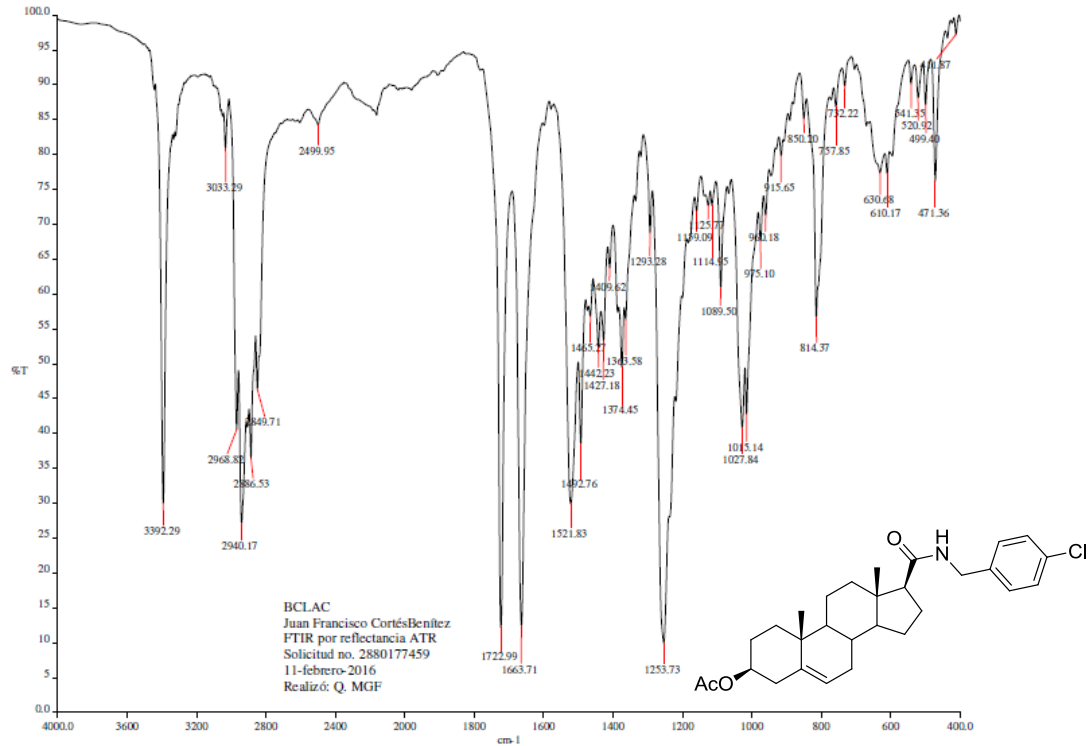


Espectro 33: IR del compuesto 4q

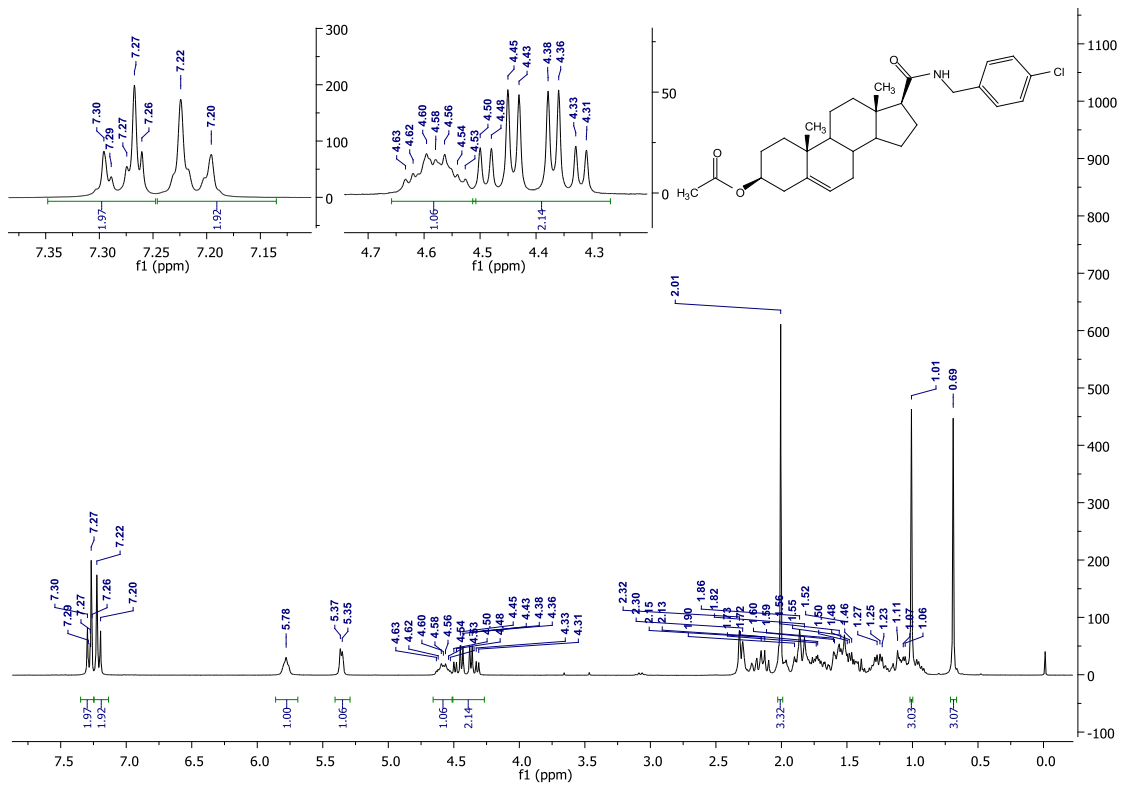


Espectro 34: RMN ¹H del compuesto 4q

ANEXO 1: Espectros

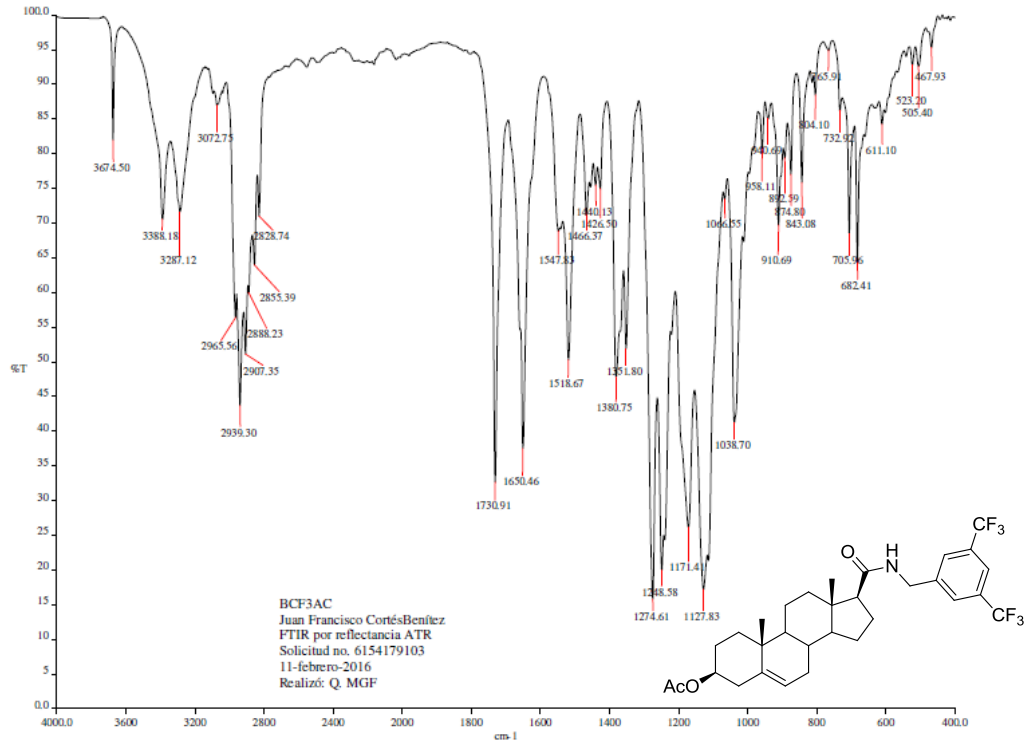


Espectro 35: IR del compuesto 4r

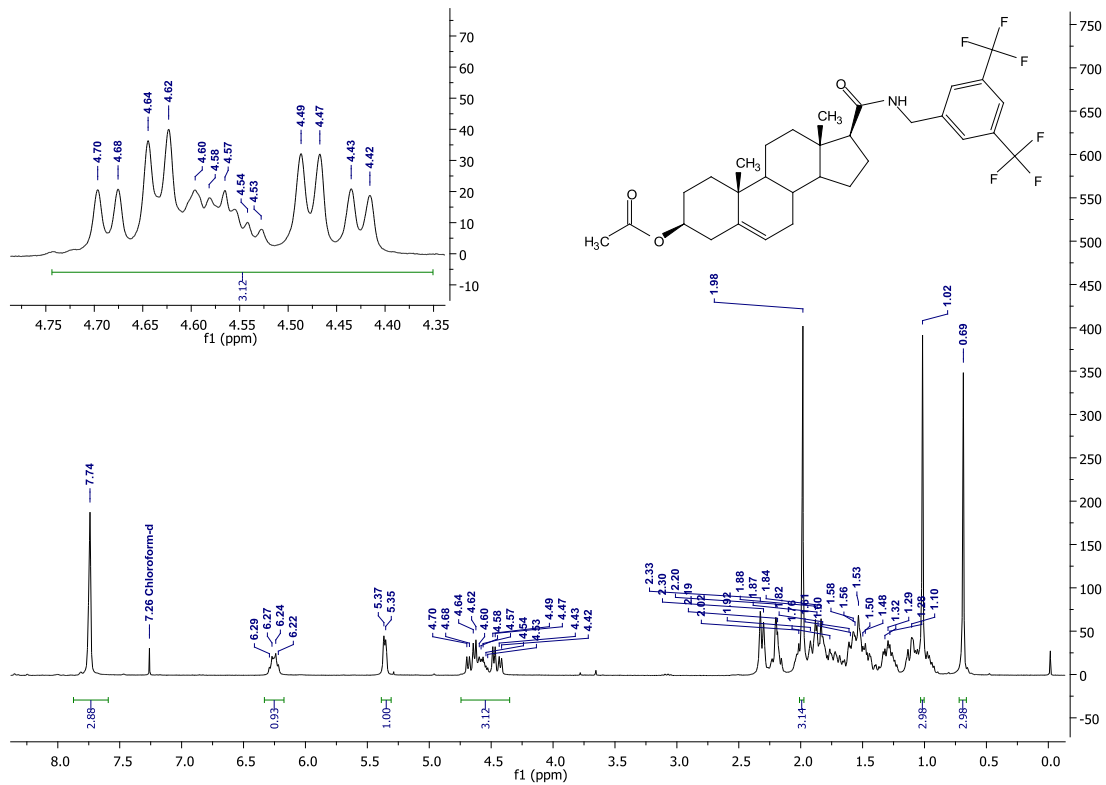


Espectro 36: RMN ¹H del compuesto 4r

ANEXO 1: Espectros

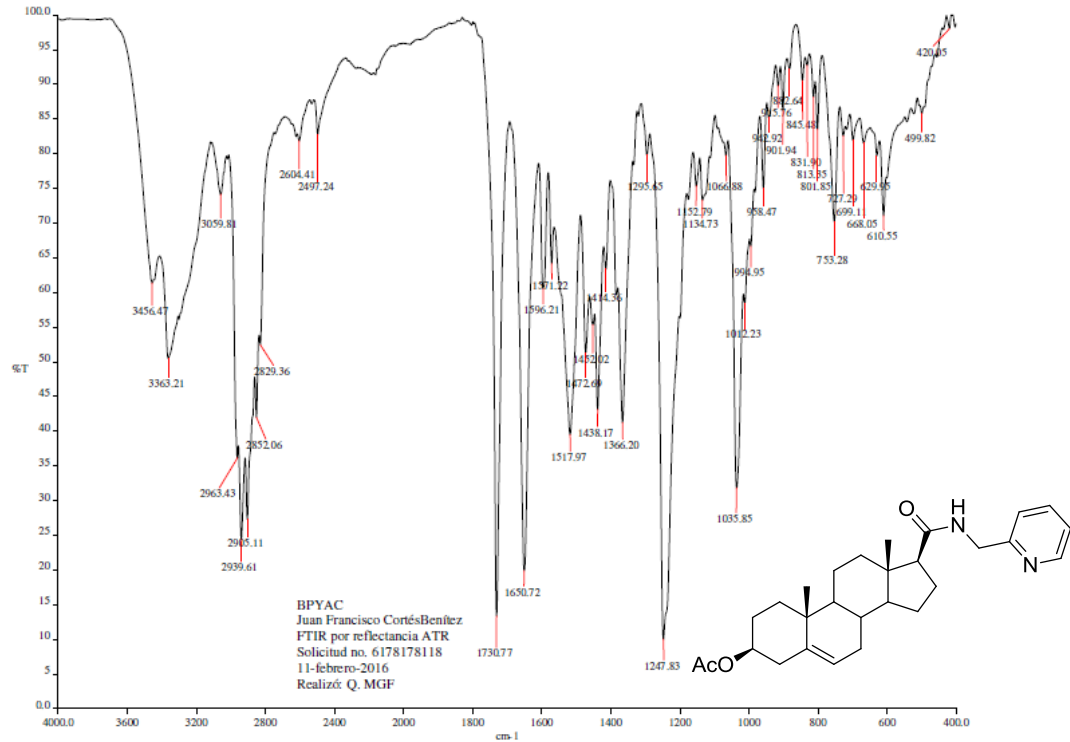


Espectro 37: IR del compuesto 4s

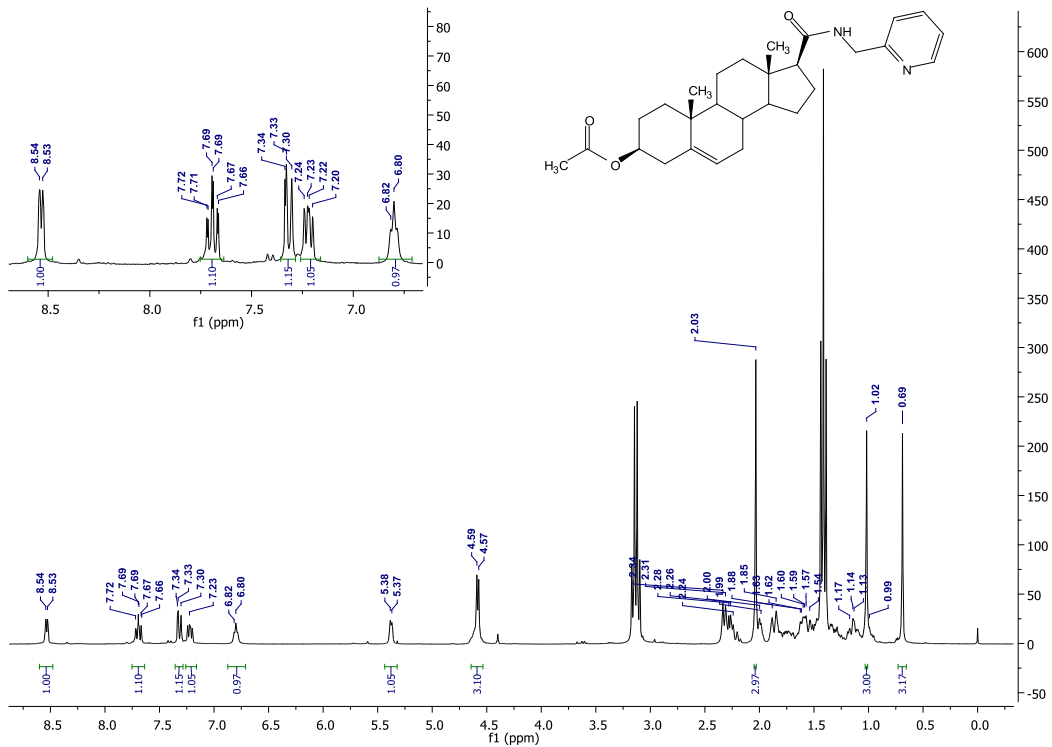


Espectro 38: RMN ¹H del compuesto 4s

ANEXO 1: Espectros

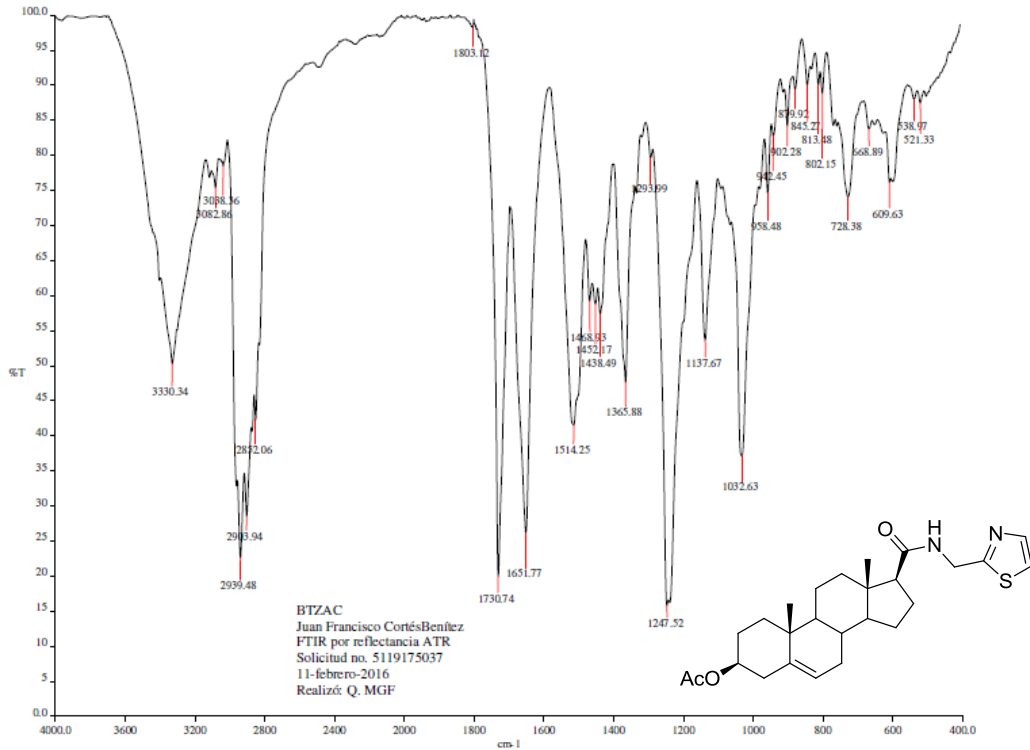


Espectro 39: IR del compuesto 4t

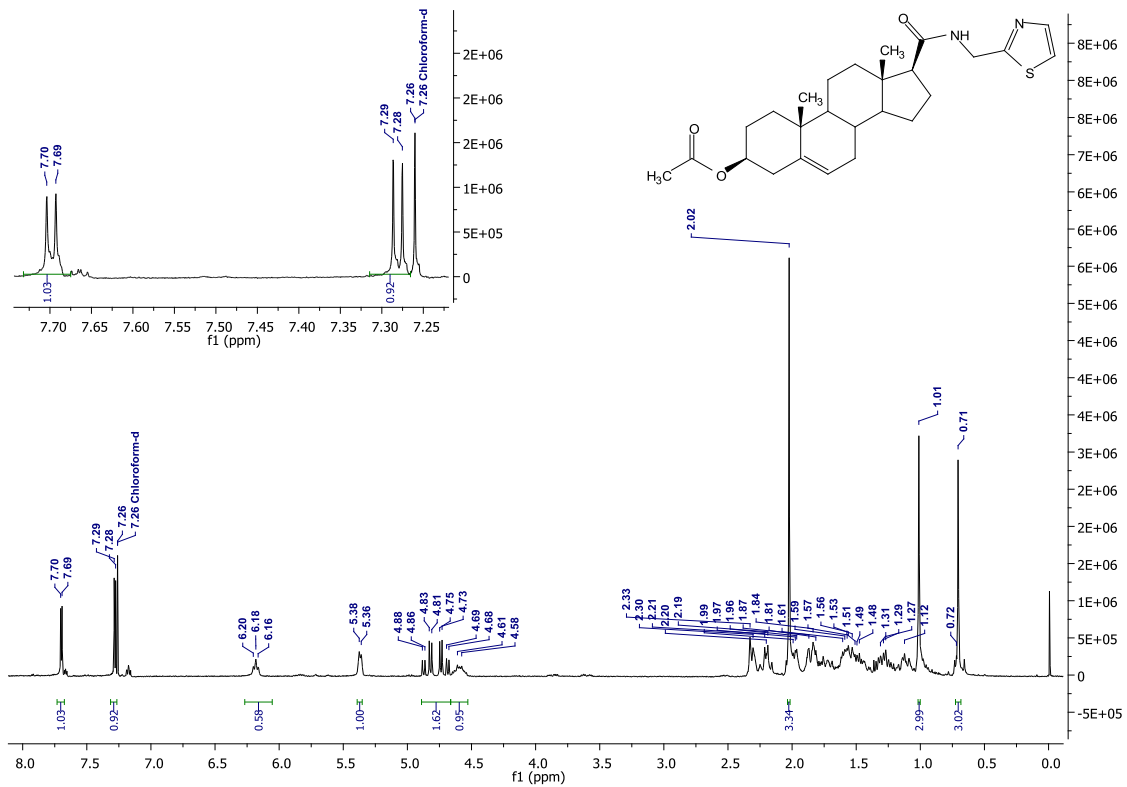


Espectro 40: RMN ¹H del compuesto 4t

ANEXO 1: Espectros

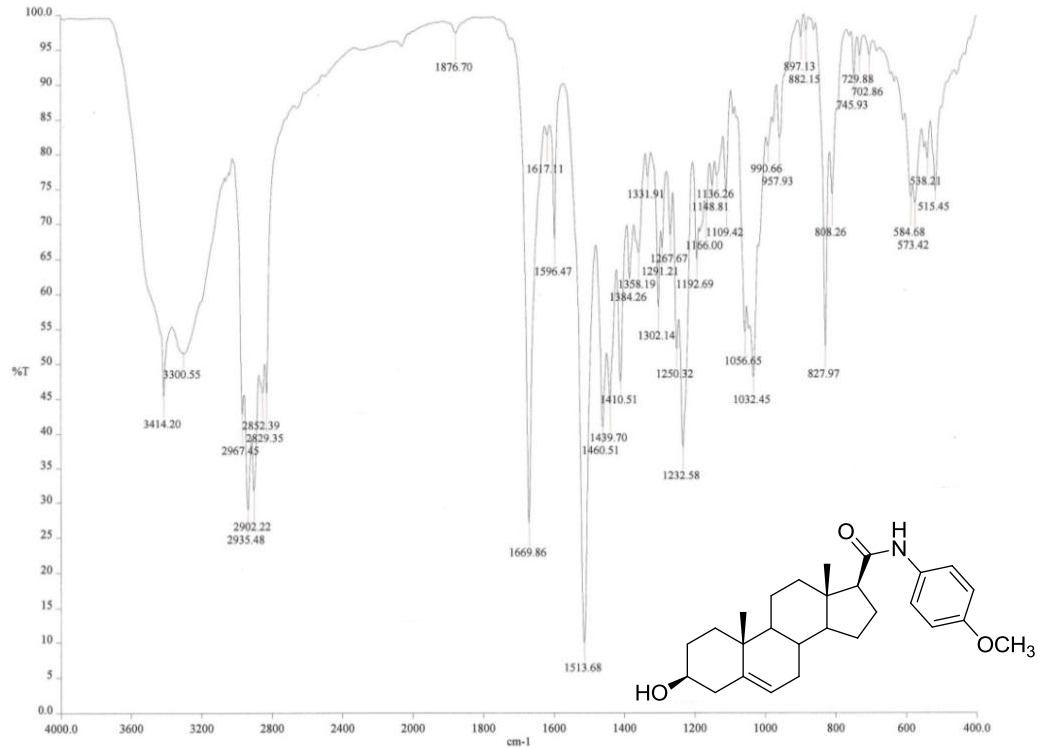


Espectro 41: IR del compuesto 4u

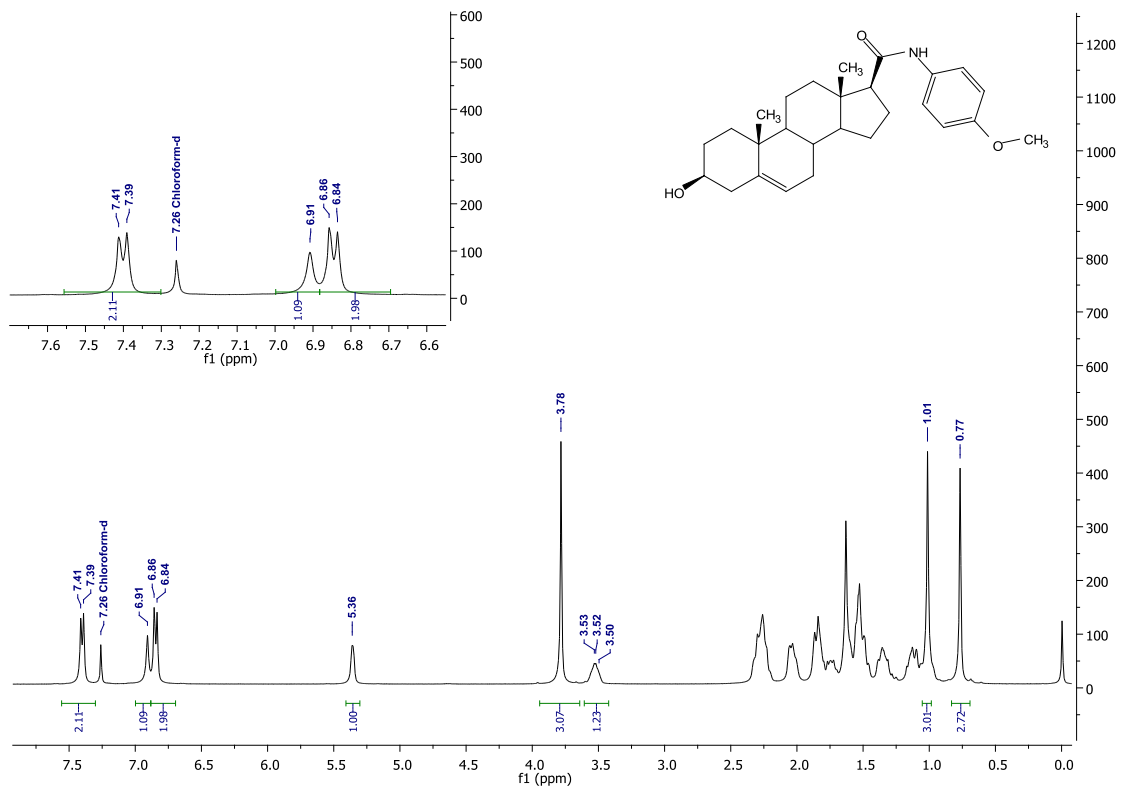


Espectro 42: RMN ¹H del compuesto 4u

ANEXO 1: Espectros

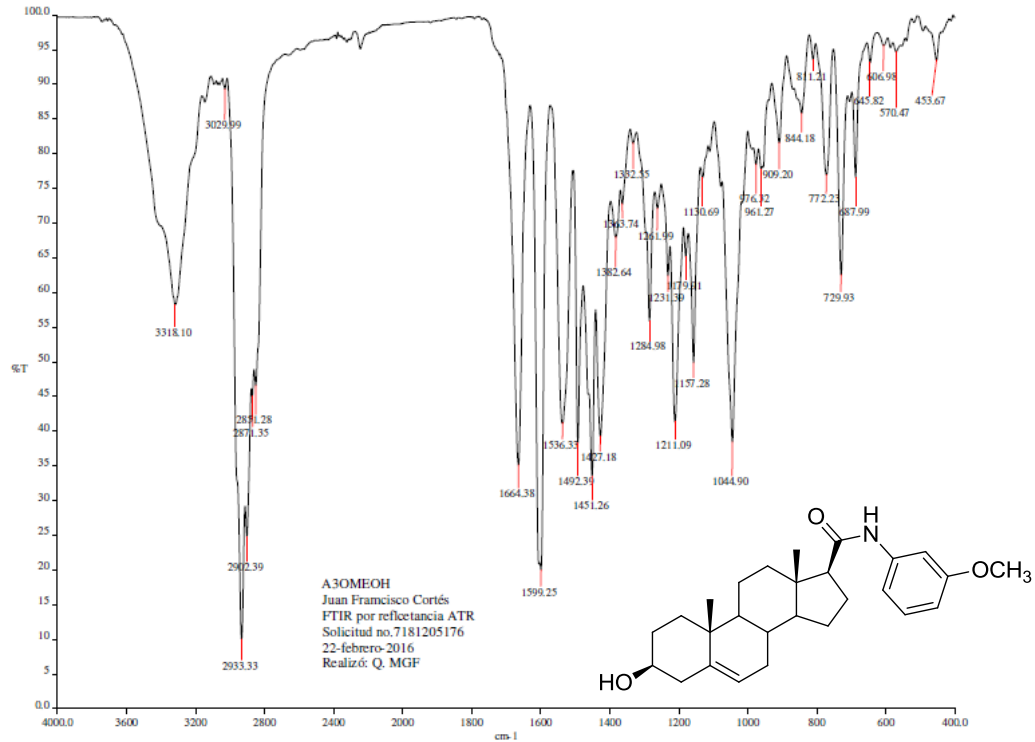


Espectro 43: IR del compuesto 5a

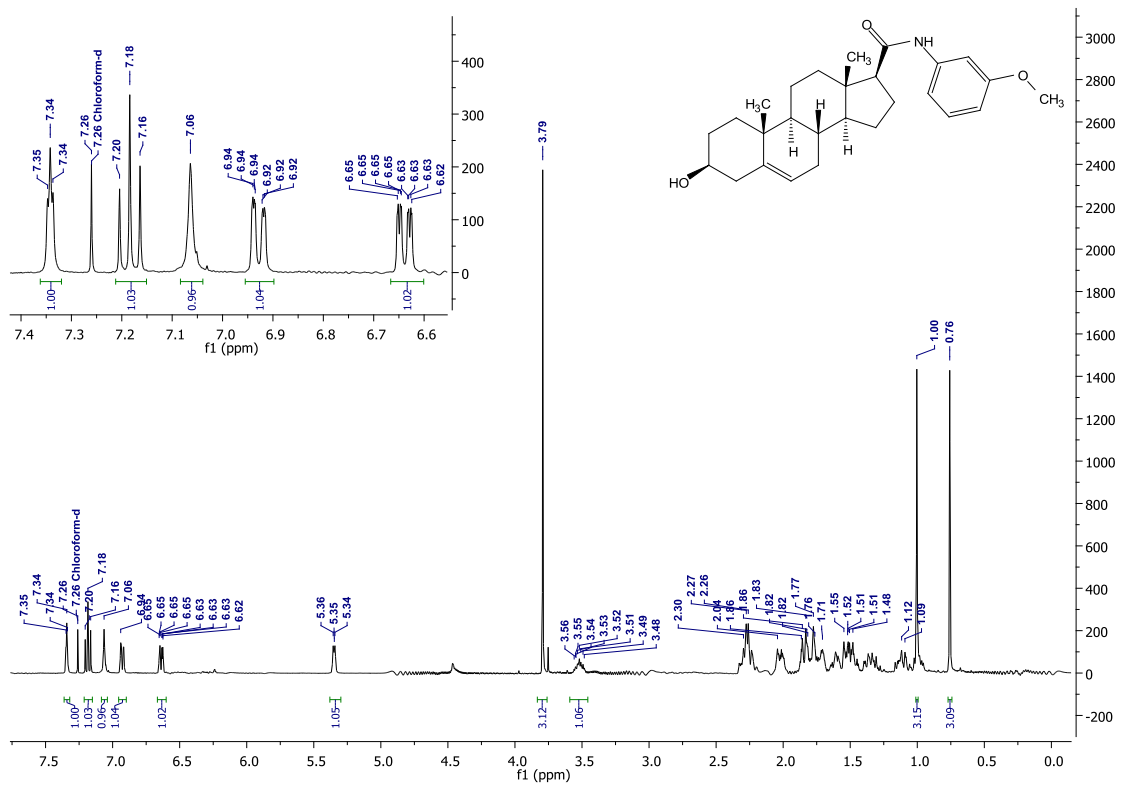


Espectro 44: RMN ¹H del compuesto 5a

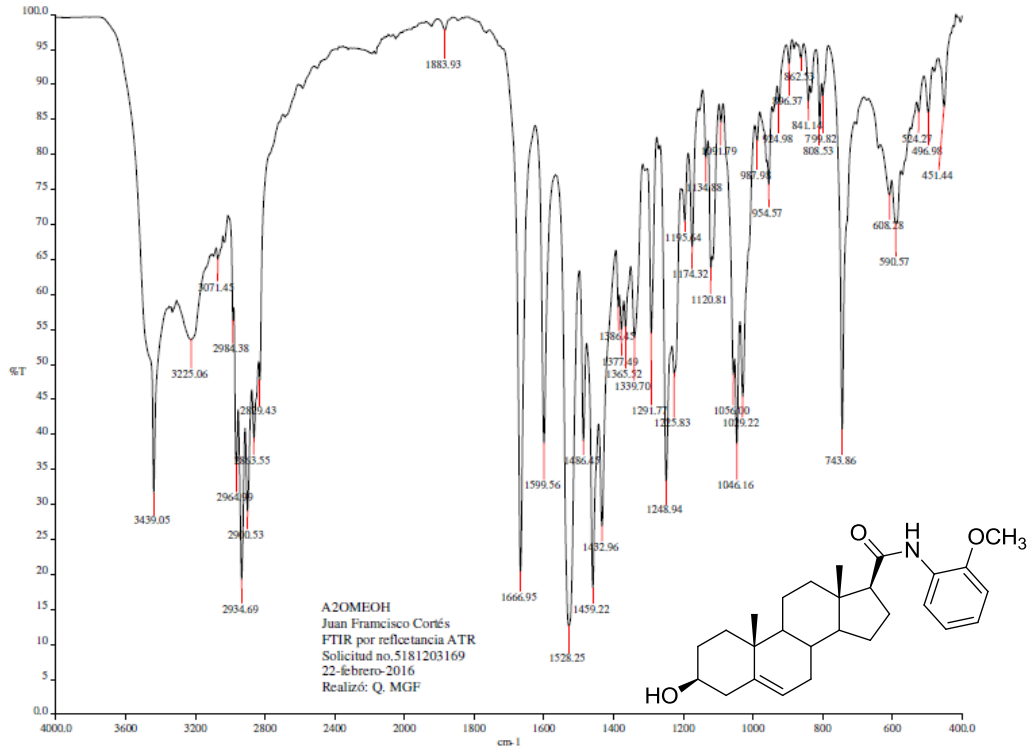
ANEXO 1: Espectros



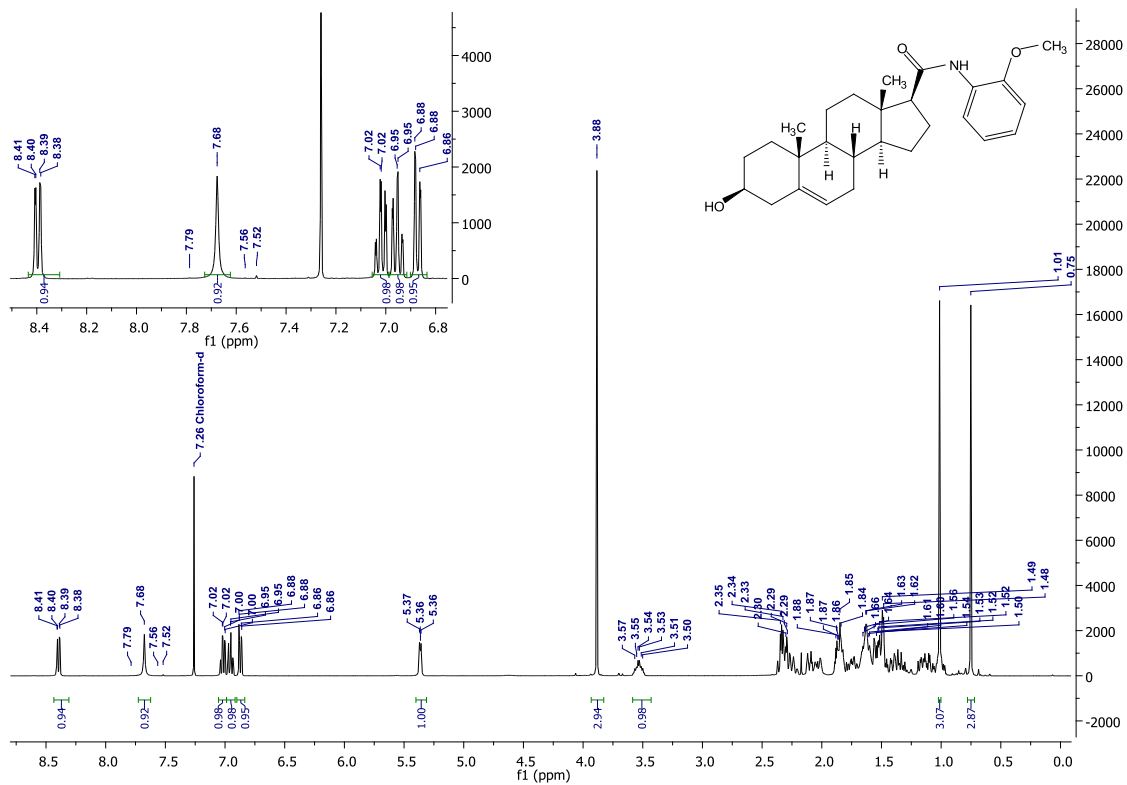
Espectro 45: IR del compuesto 5b



ANEXO 1: Espectros

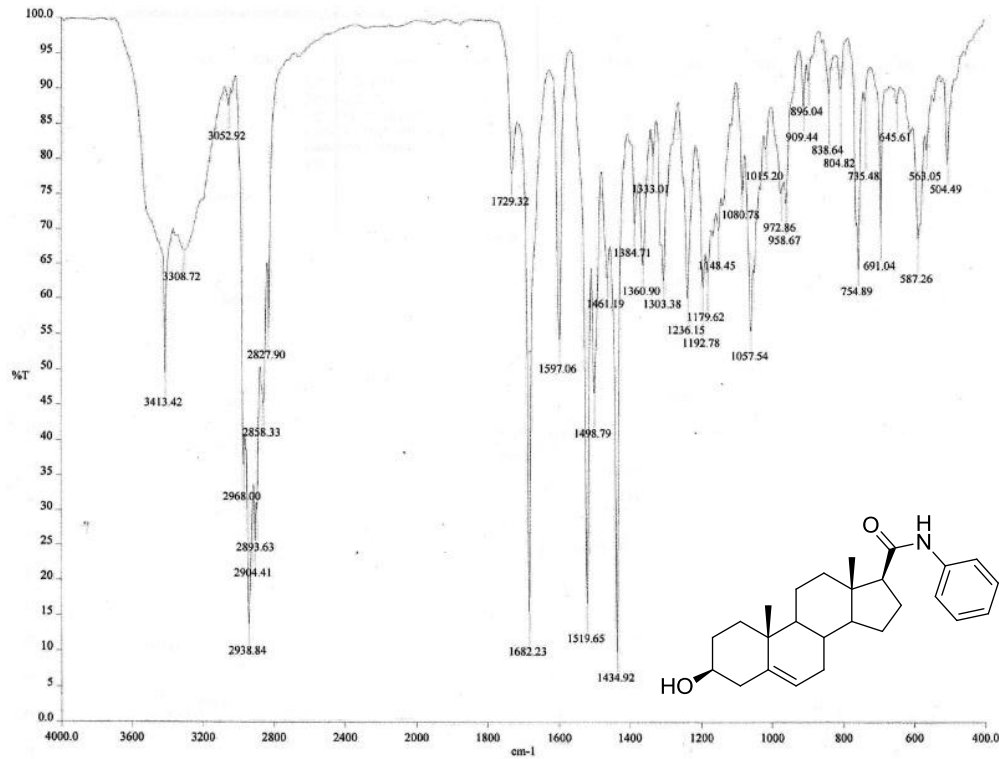


Espectro 47: IR del compuesto 5c

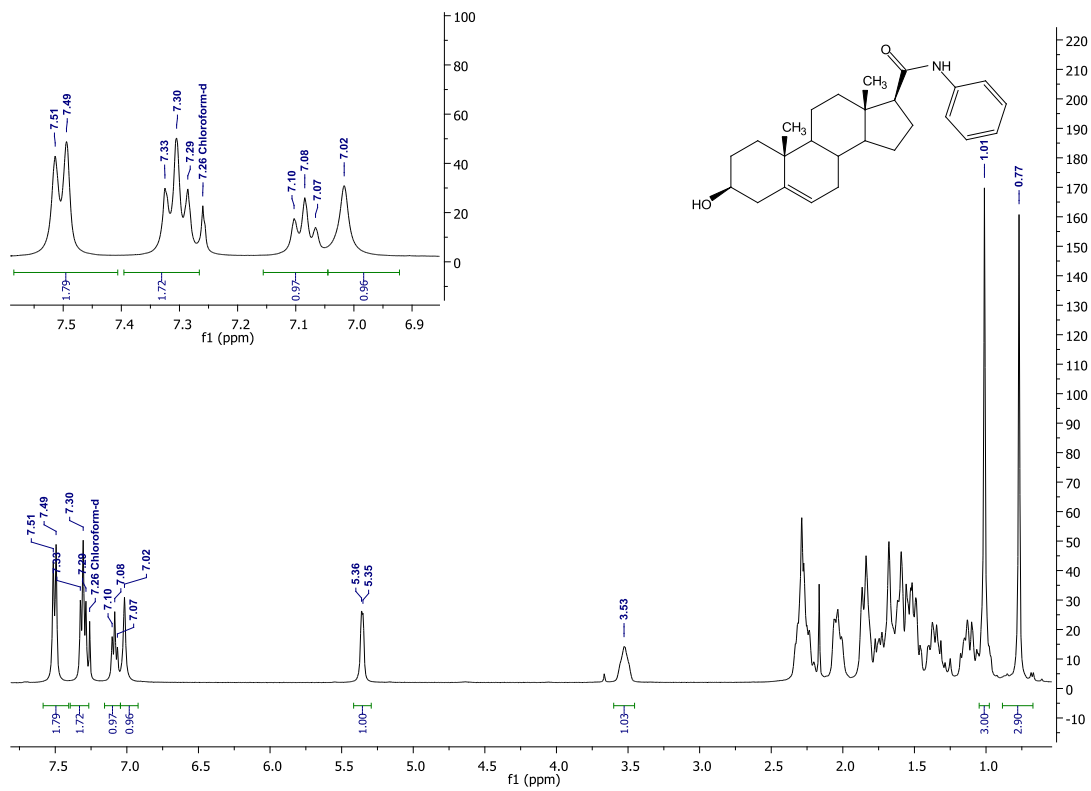


Espectro 48: RMN ¹H del compuesto 5c

ANEXO 1: Espectros

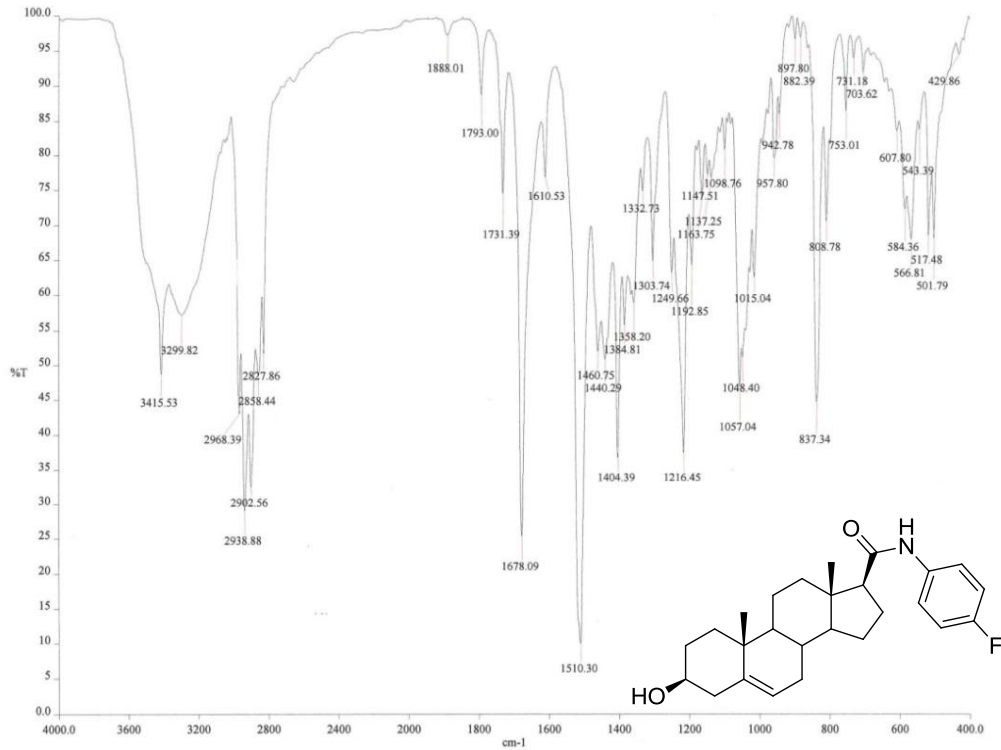


Espectro 49: IR del compuesto 5d

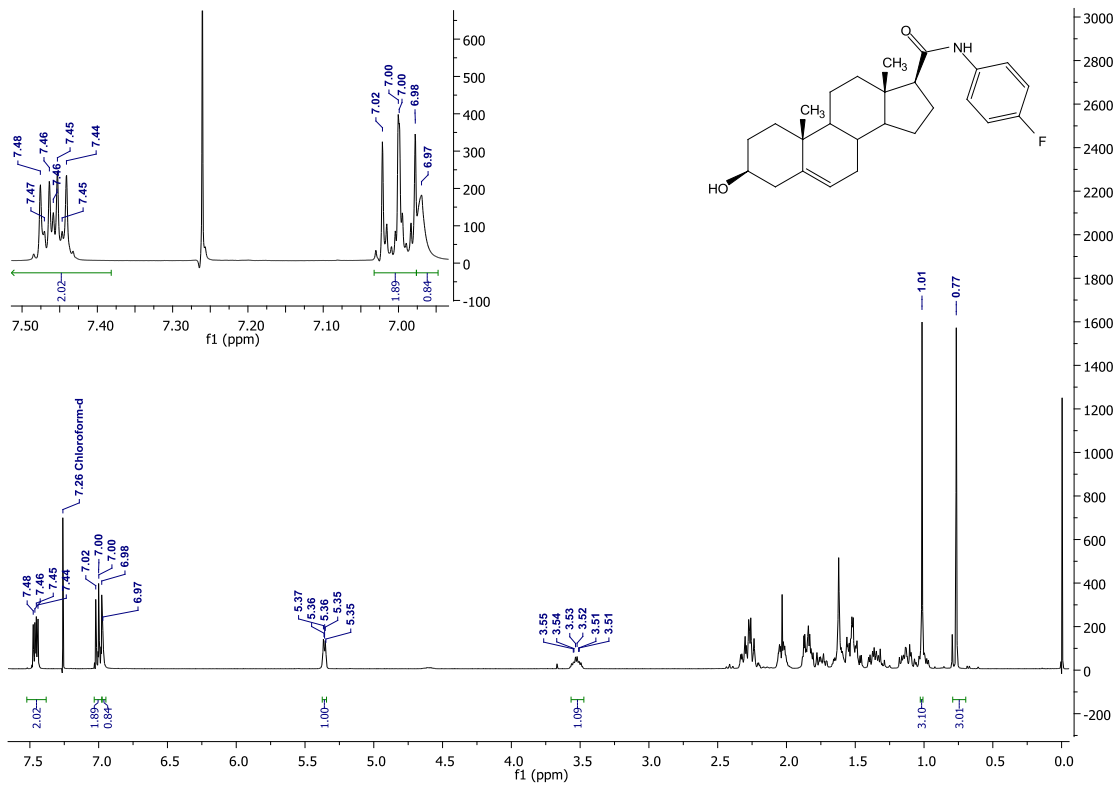


Espectro 50: RMN ^1H del compuesto 5d

ANEXO 1: Espectros

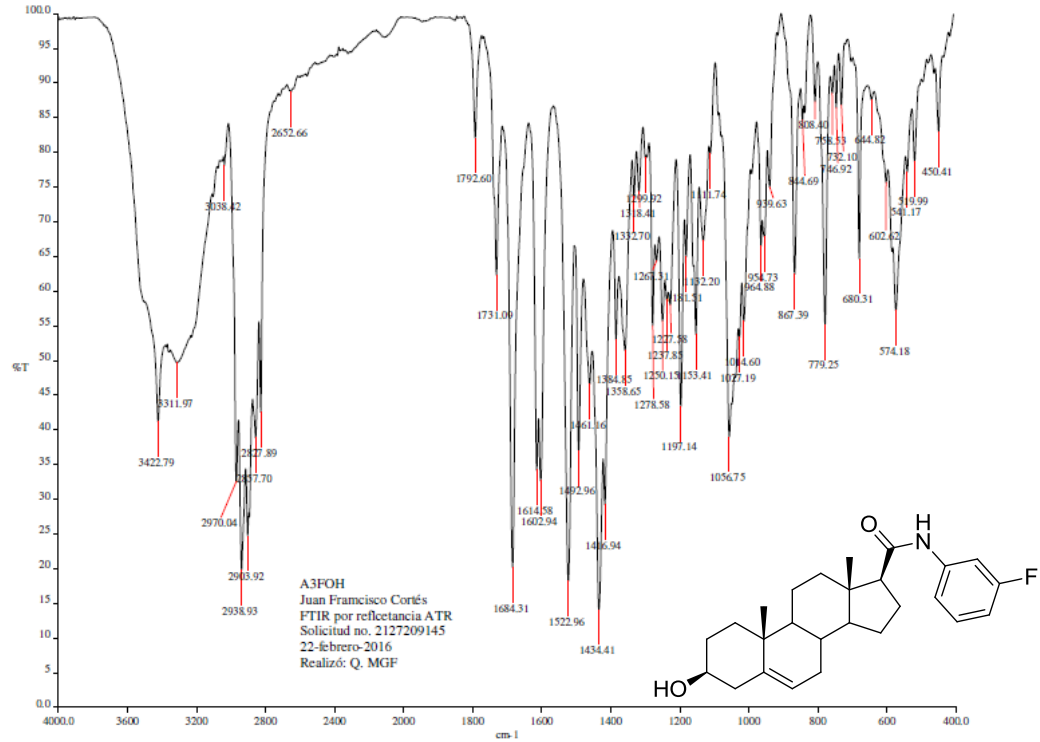


Espectro 51: IR del compuesto 5e

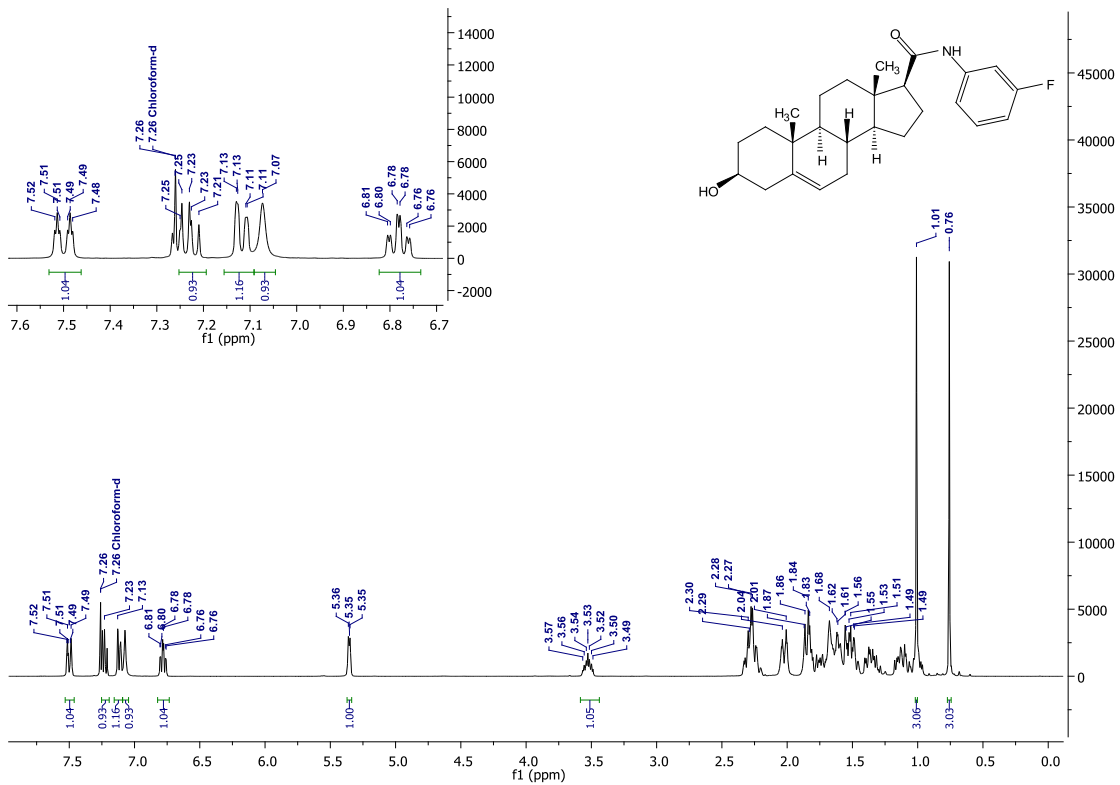


Espectro 52: RMN ¹H del compuesto 5e

ANEXO 1: Espectros

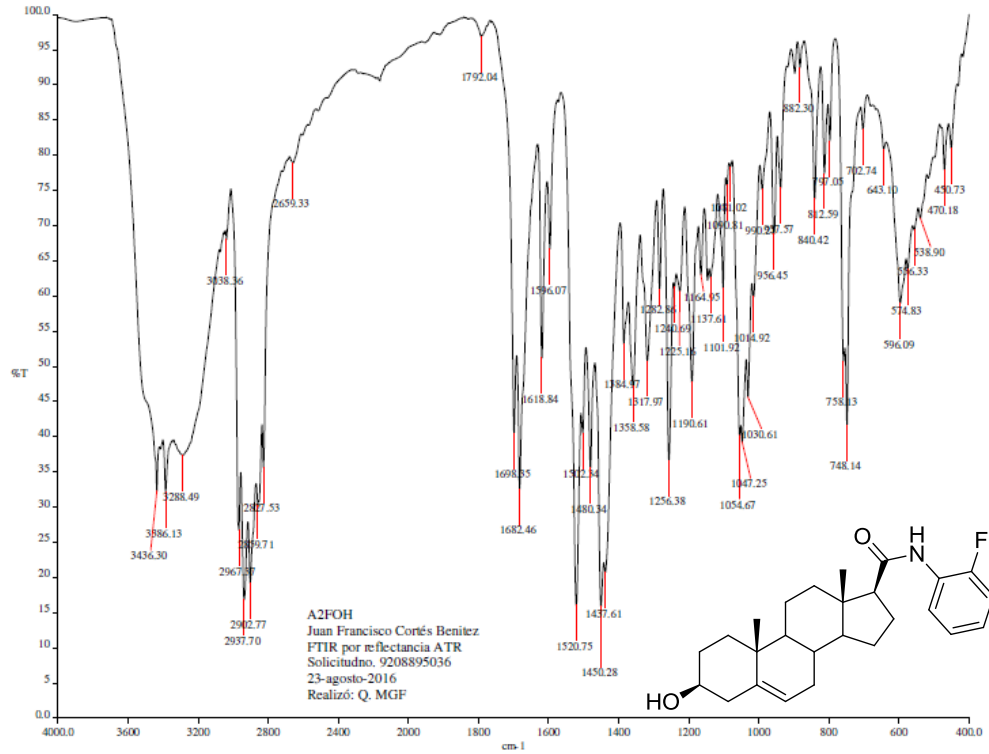


Espectro 53: IR del compuesto 5f

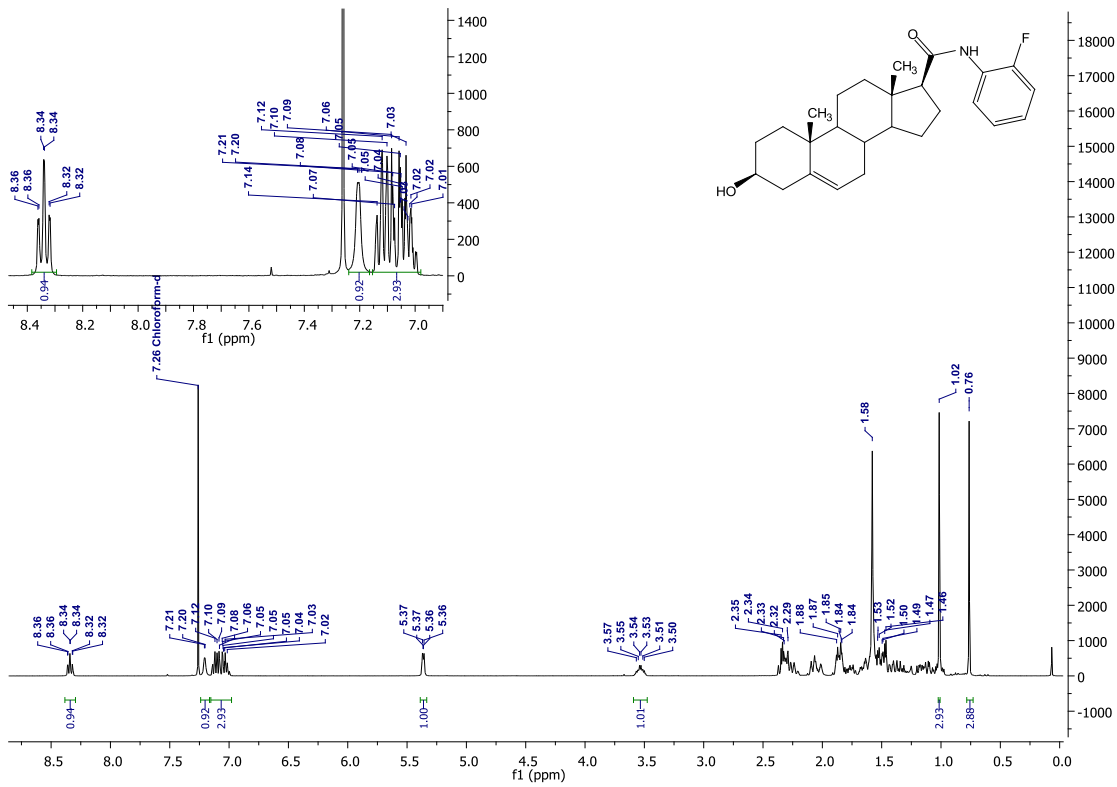


Espectro 54: RMN ¹H del compuesto 5f

ANEXO 1: Espectros

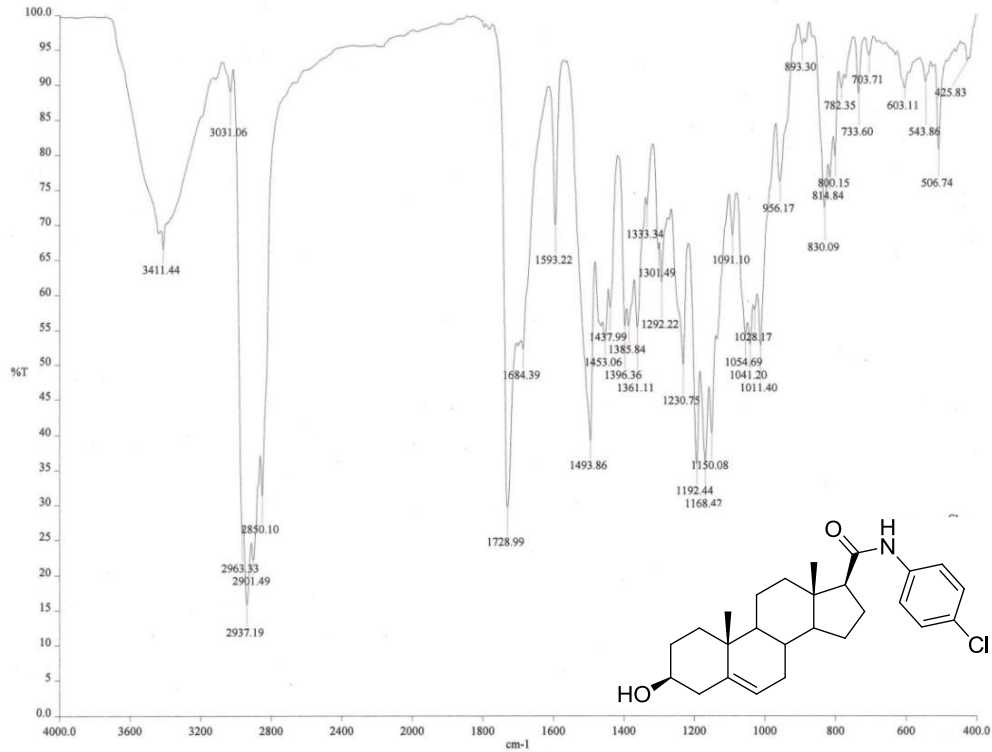


Espectro 55: IR del compuesto 5g

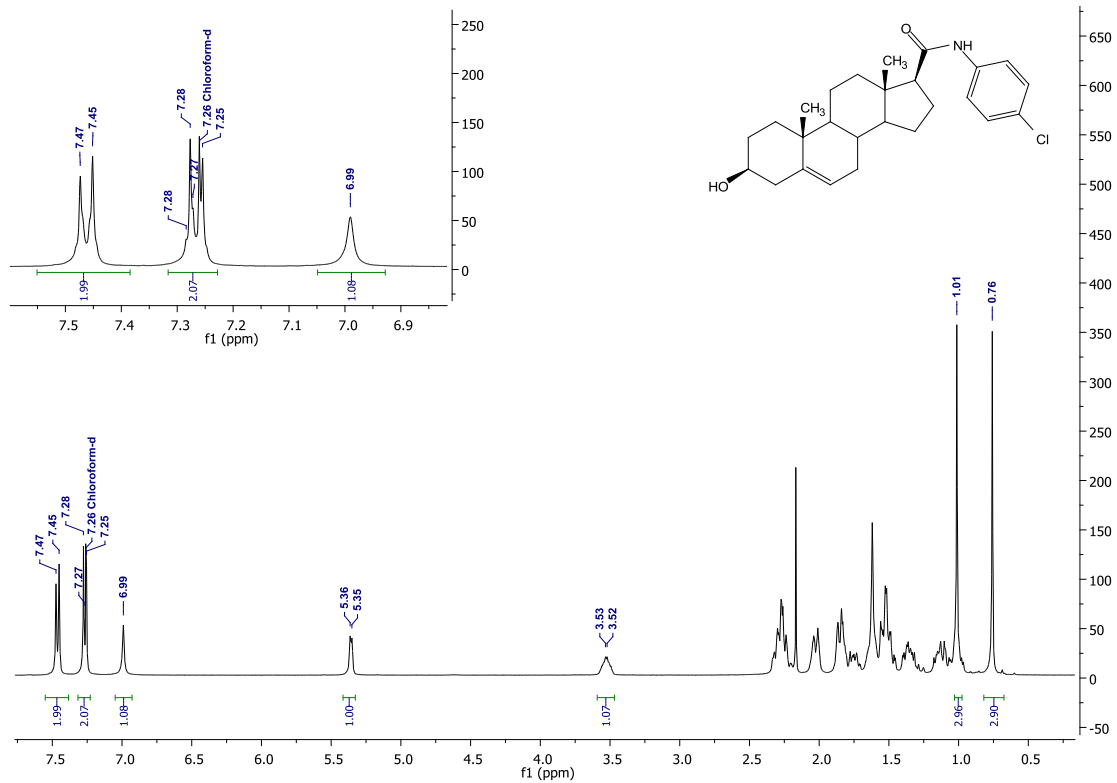


Espectro 56: RMN ¹H del compuesto 5g

ANEXO 1: Espectros

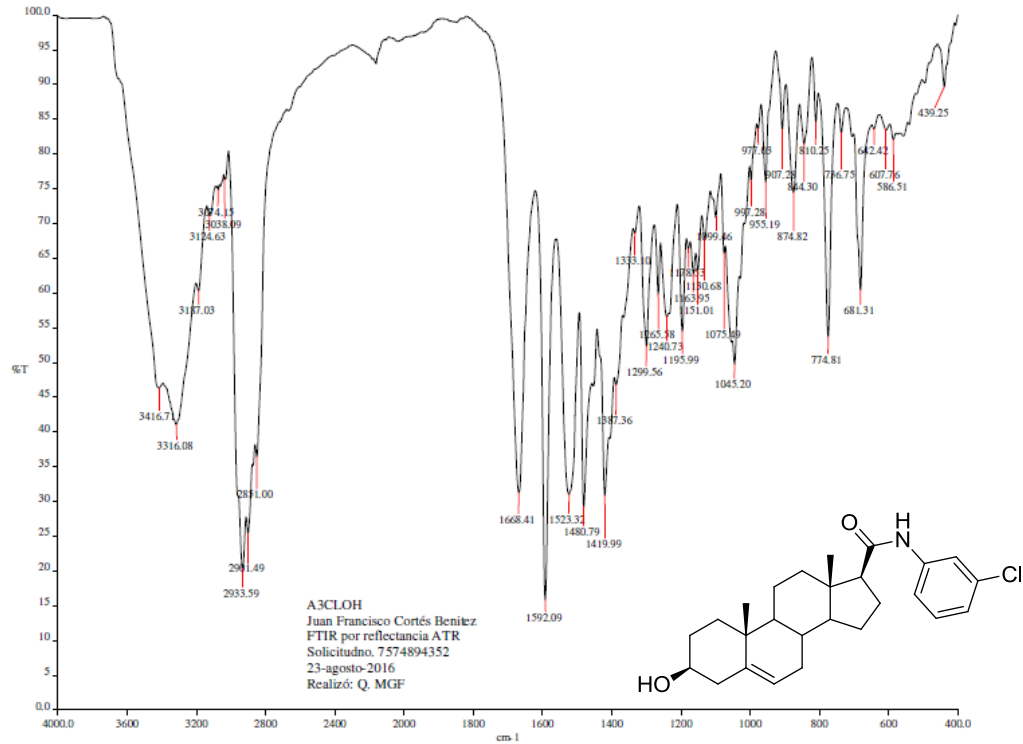


Espectro 57: IR del compuesto 5h

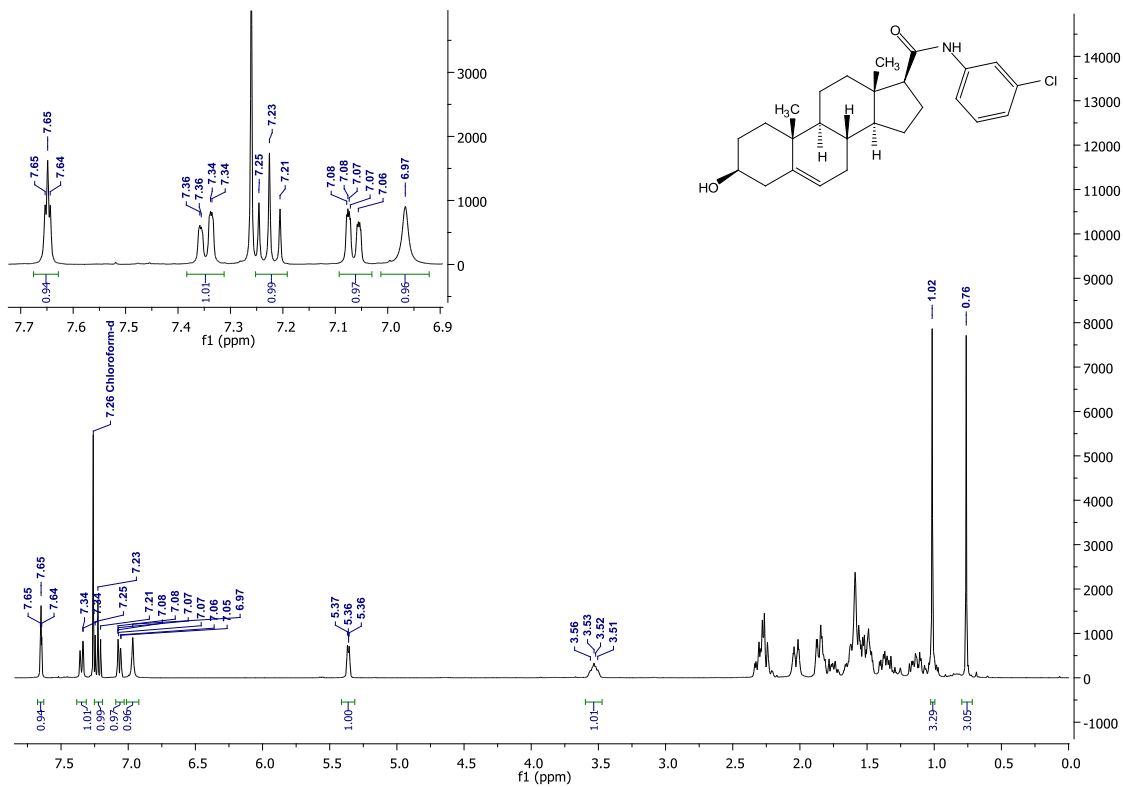


Espectro 58: RMN ¹H del compuesto 5h

ANEXO 1: Espectros

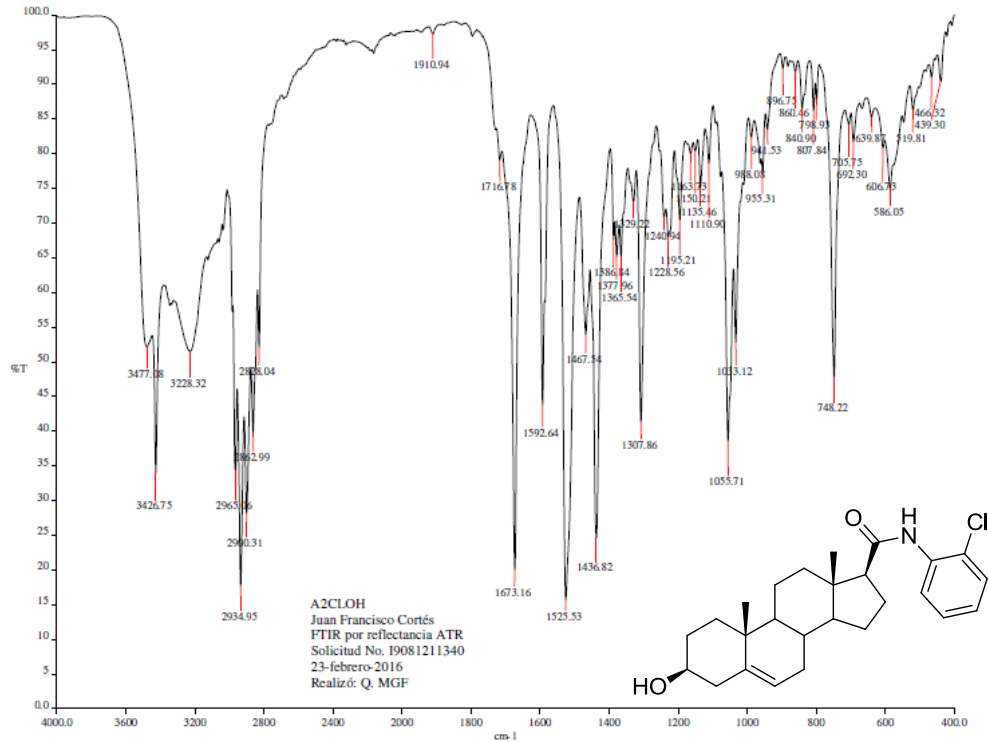


Espectro 59: IR del compuesto 5i

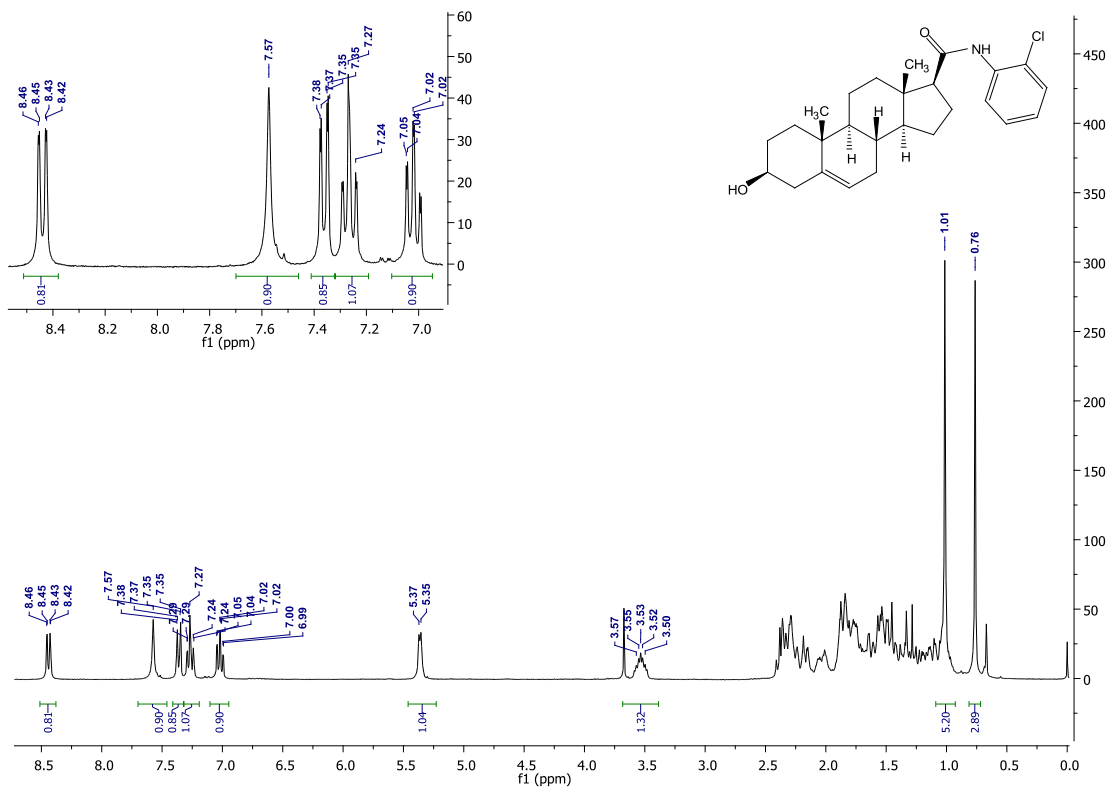


Espectro 60: RMN ¹H del compuesto 5i

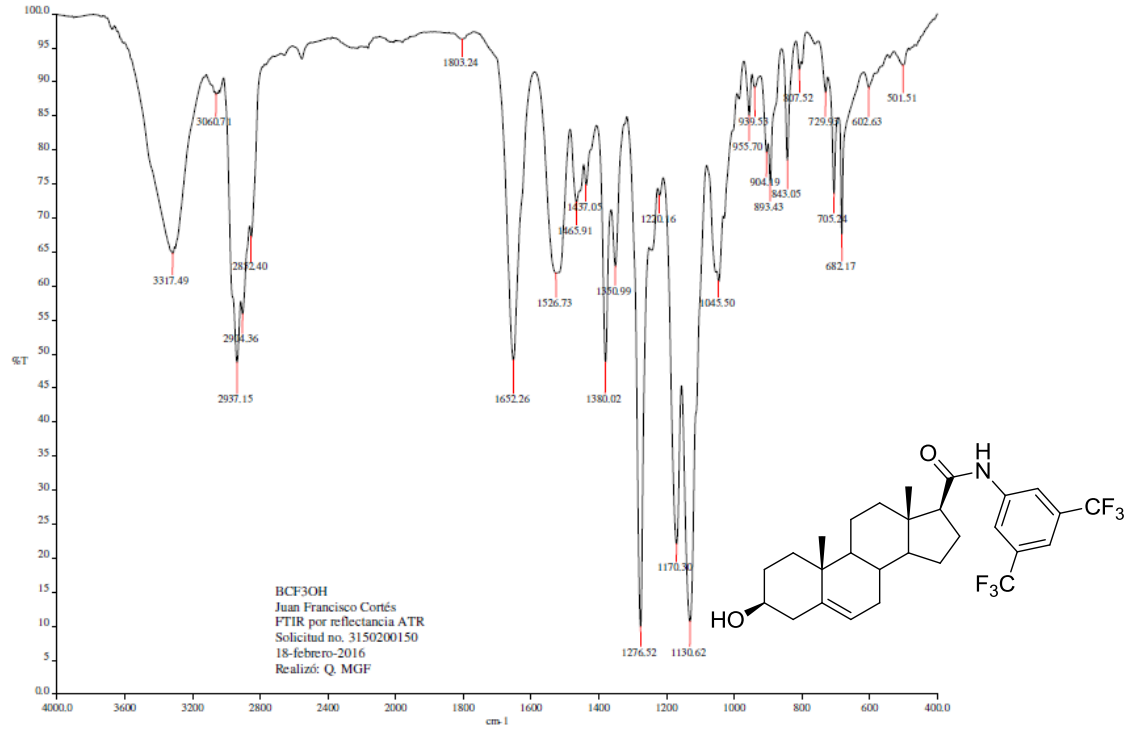
ANEXO 1: Espectros



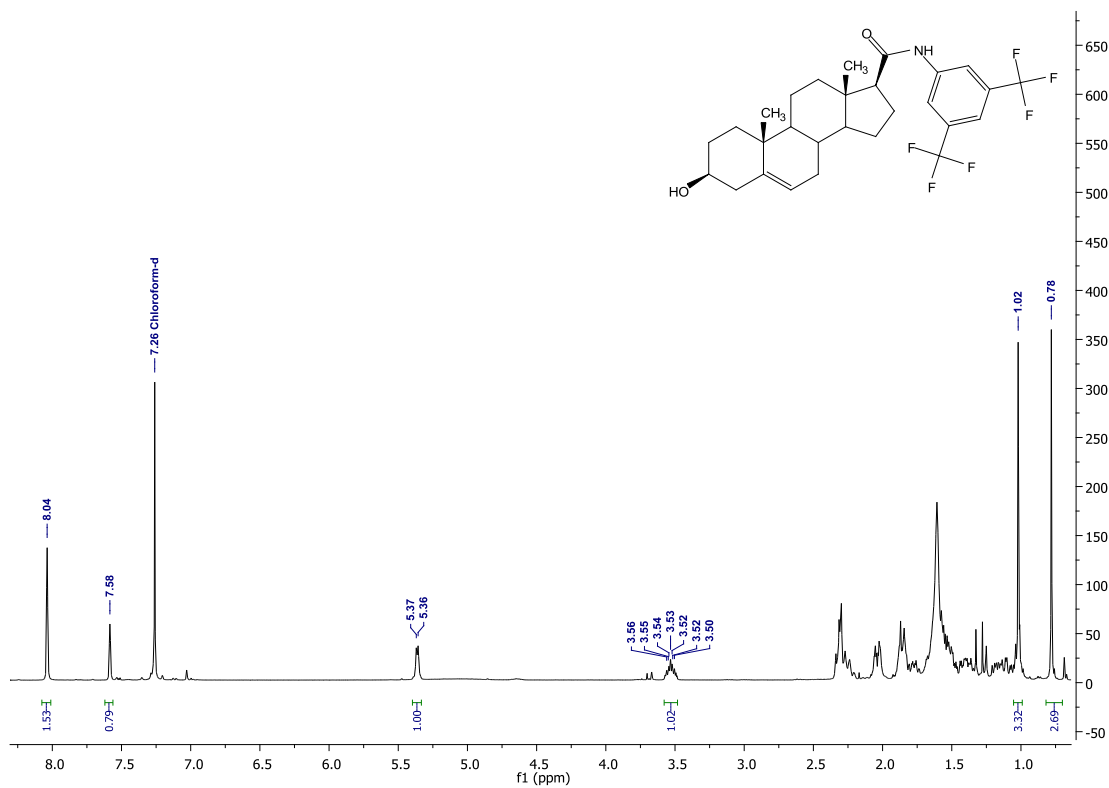
Espectro 61: IR del compuesto 5j



ANEXO 1: Espectros

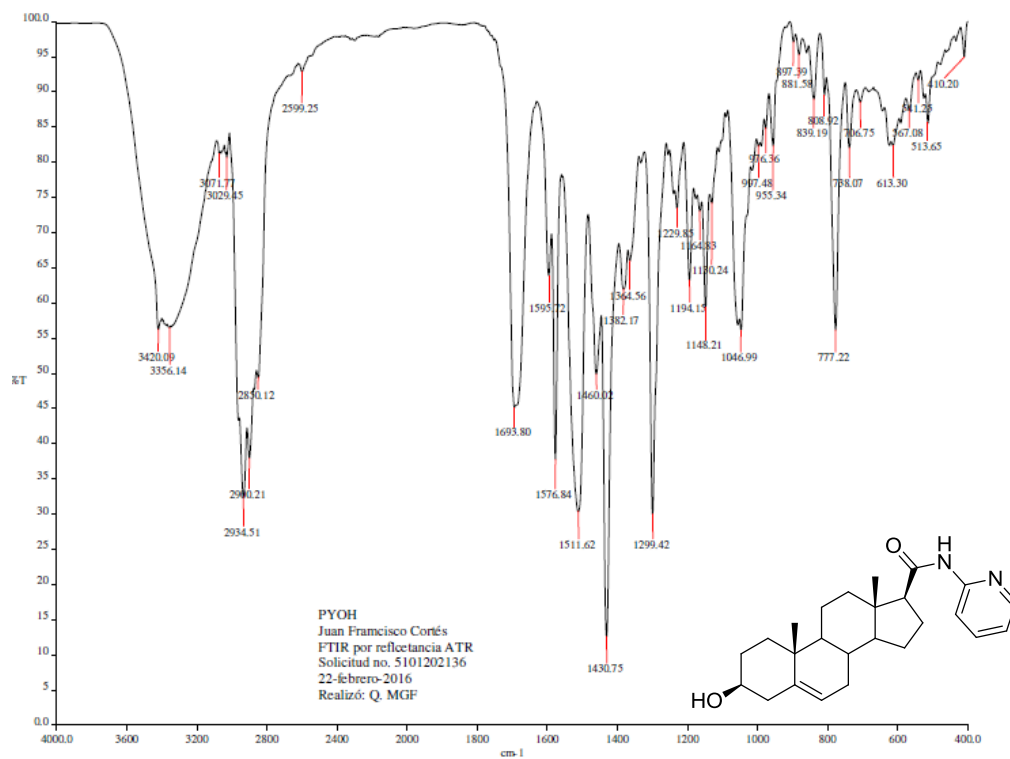


Espectro 63: IR del compuesto 5k



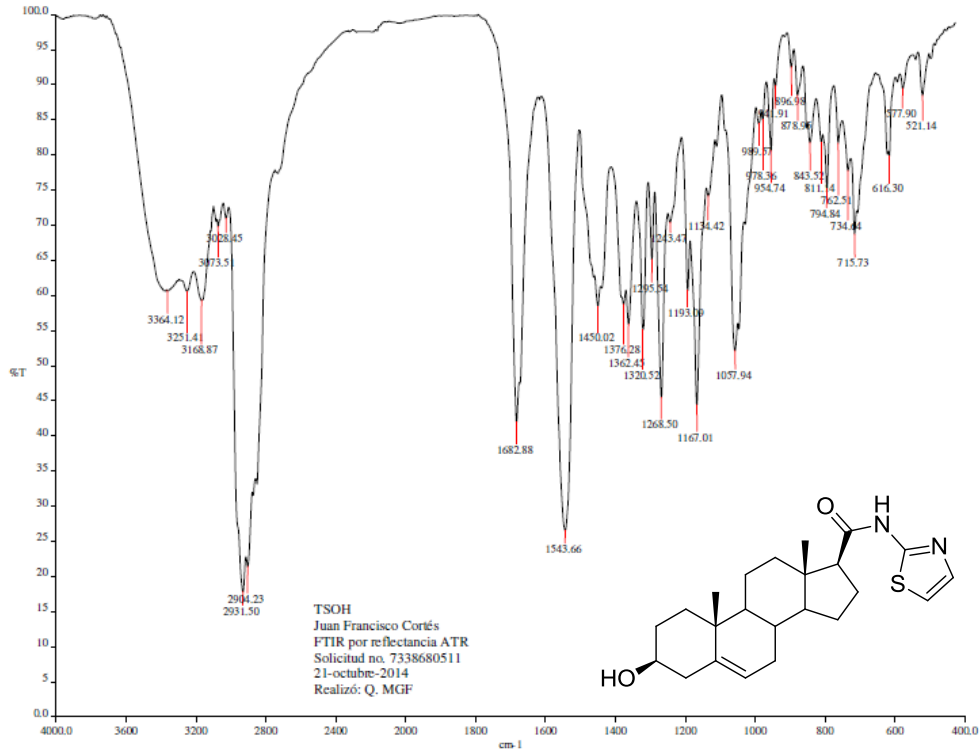
Espectro 64: RMN ¹H del compuesto 5j

ANEXO 1: Espectros

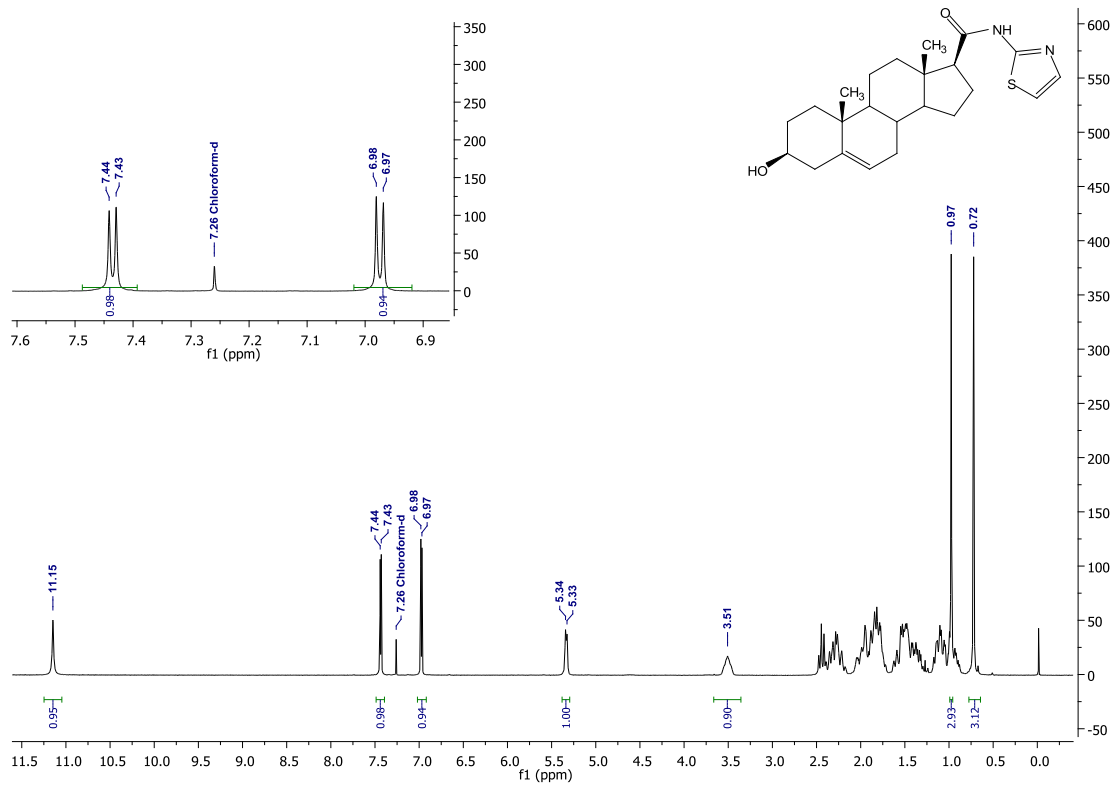


Espectro 65: IR del compuesto 51

ANEXO 1: Espectros

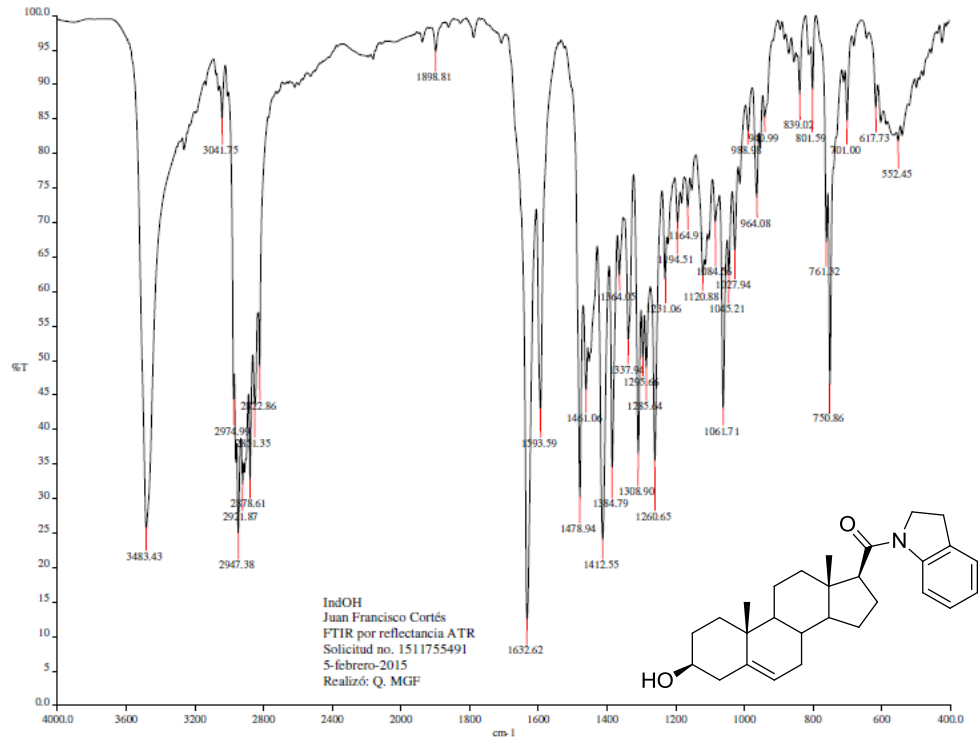


Espectro 67: IR del compuesto 5m

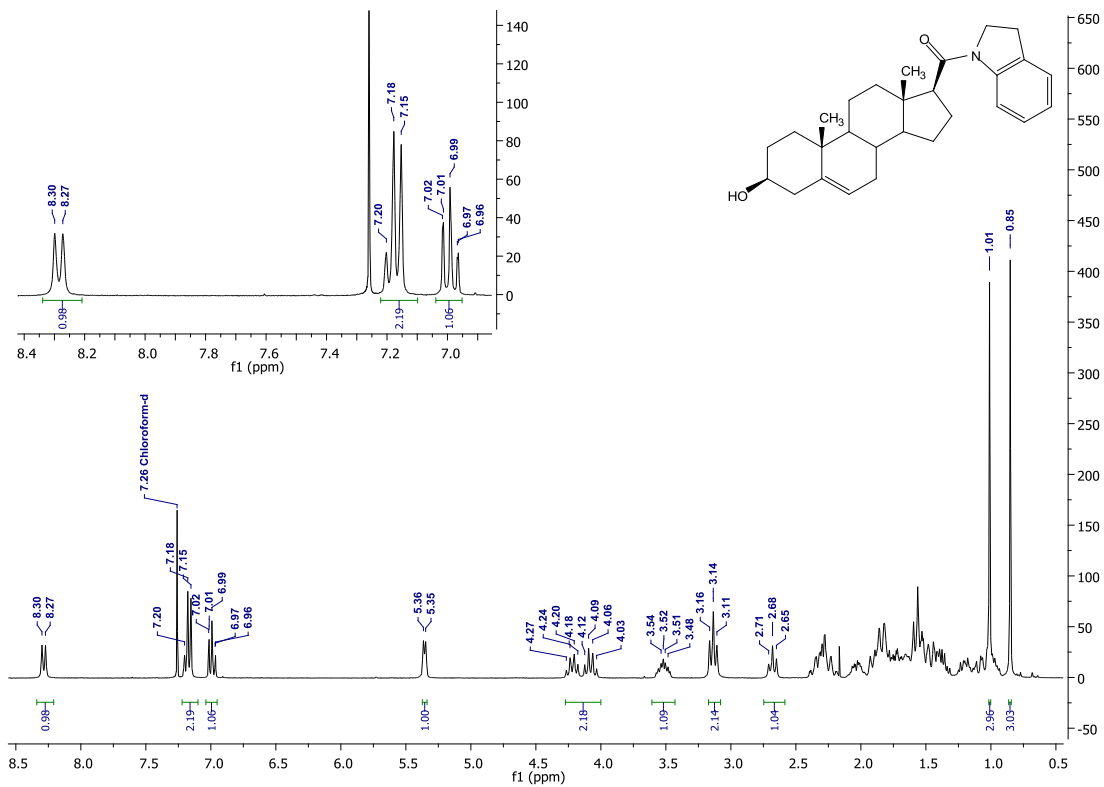


Espectro 68: RMN ¹H del compuesto 5m

ANEXO 1: Espectros

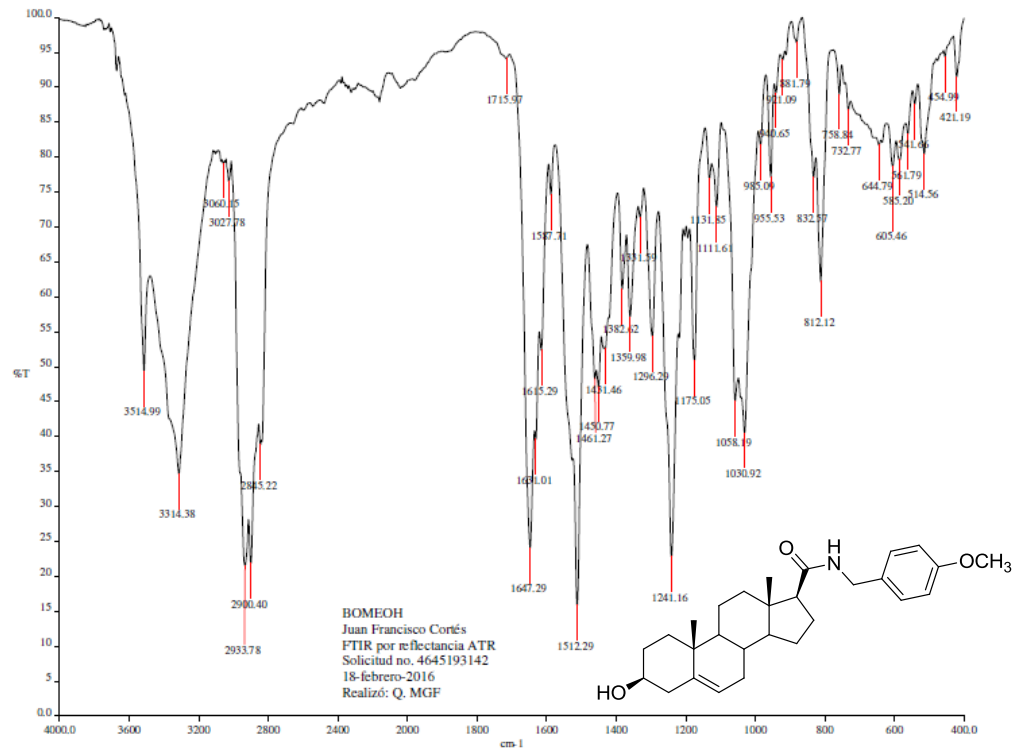


Espectro 69: IR del compuesto 5n

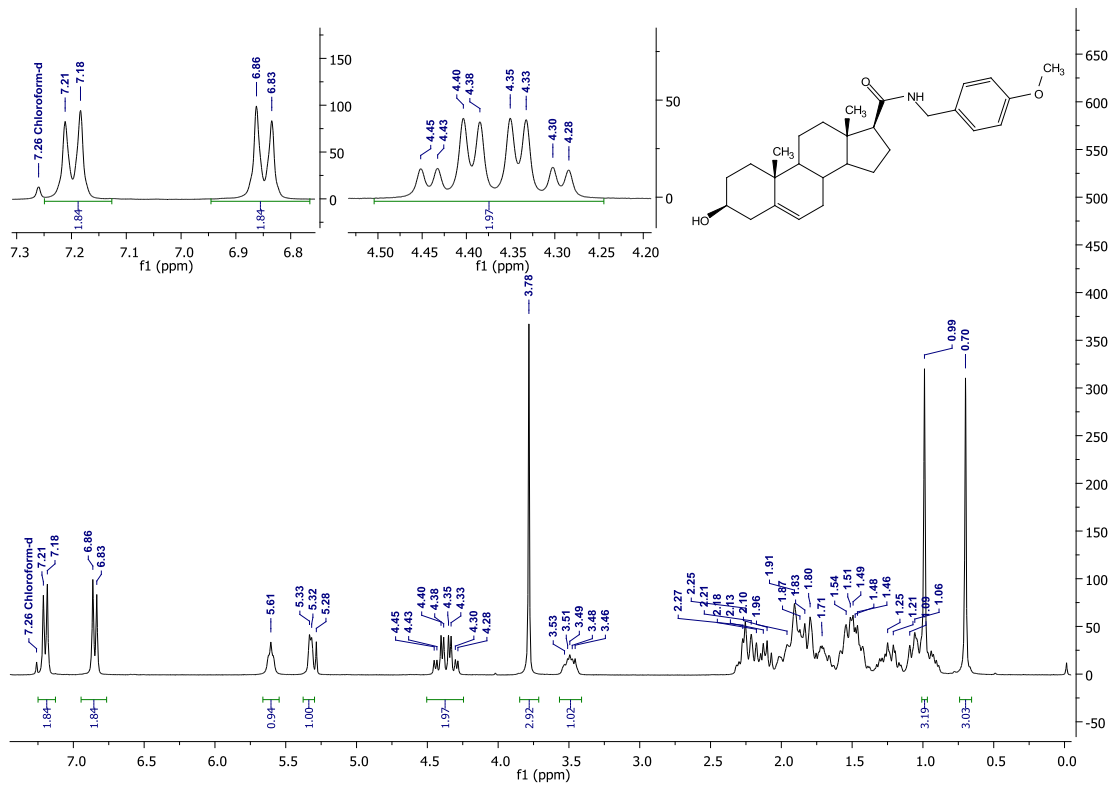


Espectro 70: RMN ¹H del compuesto 5n

ANEXO 1: Espectros

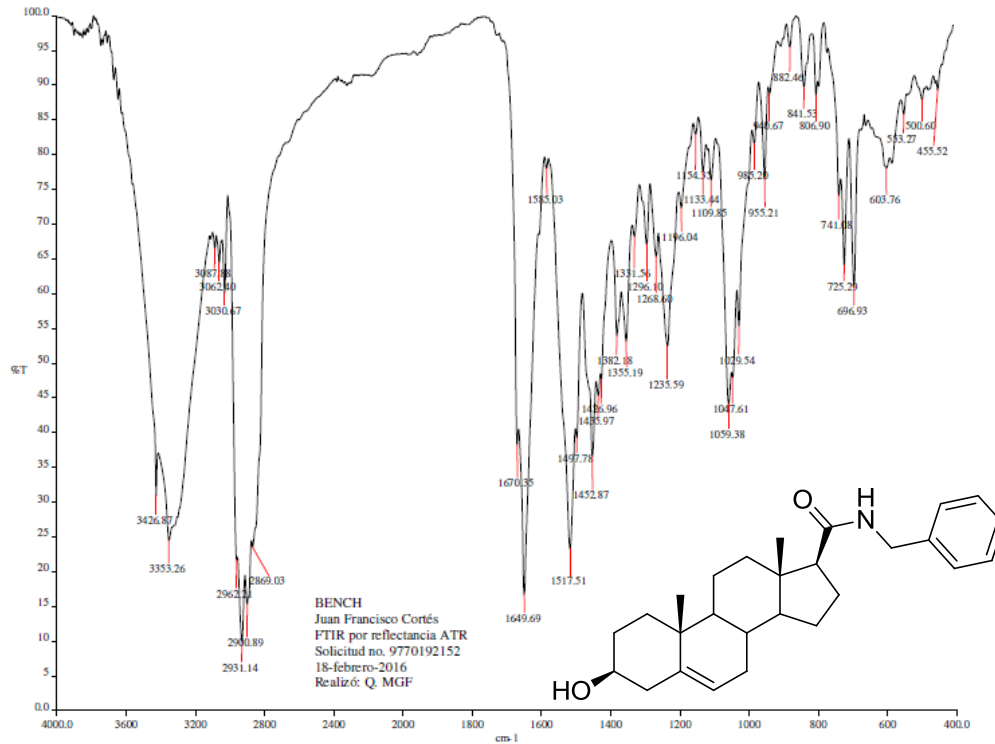


Espectro 71: IR del compuesto 50

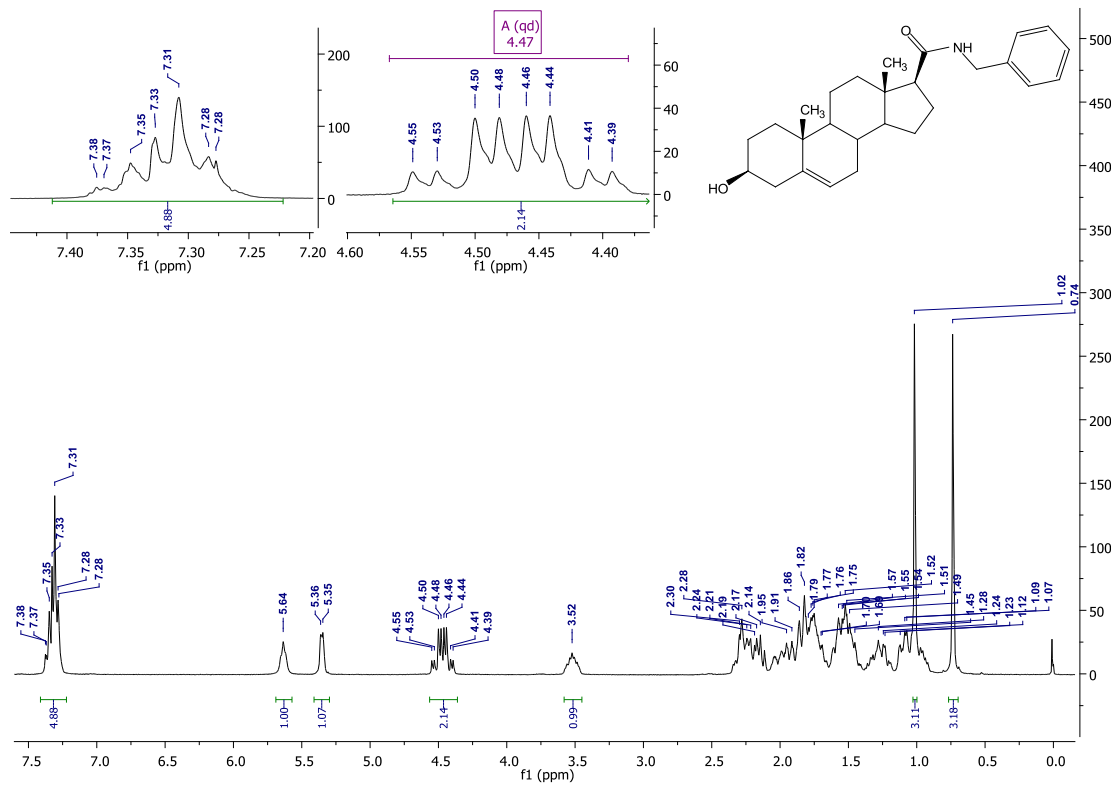


Espectro 72: RMN ¹H del compuesto 50

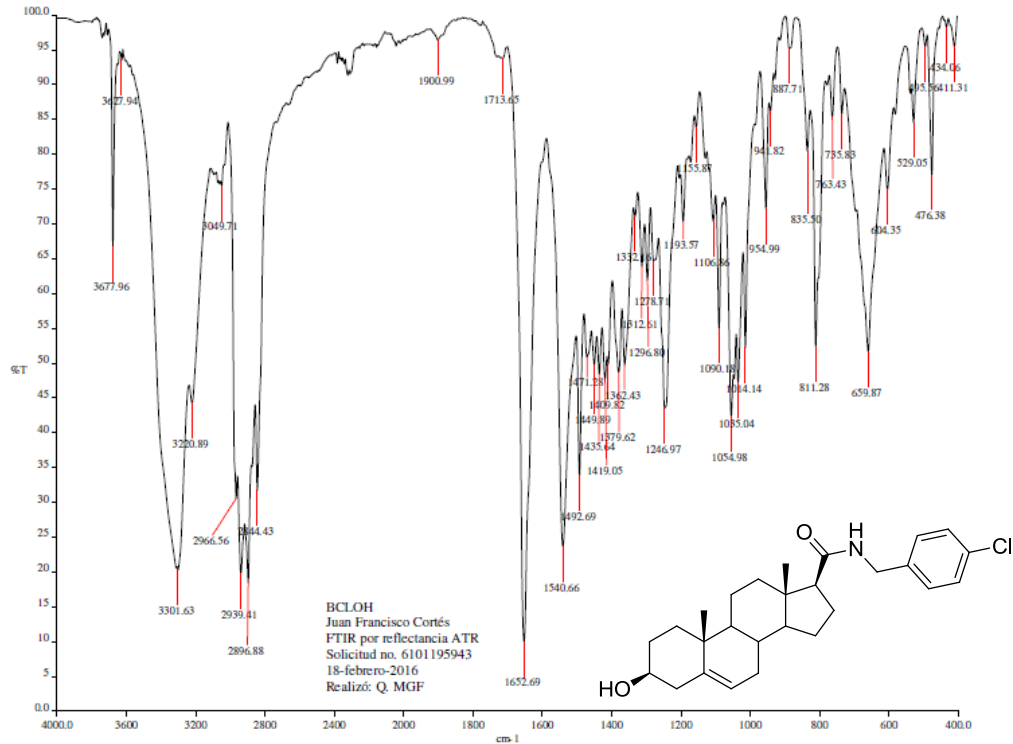
ANEXO 1: Espectros



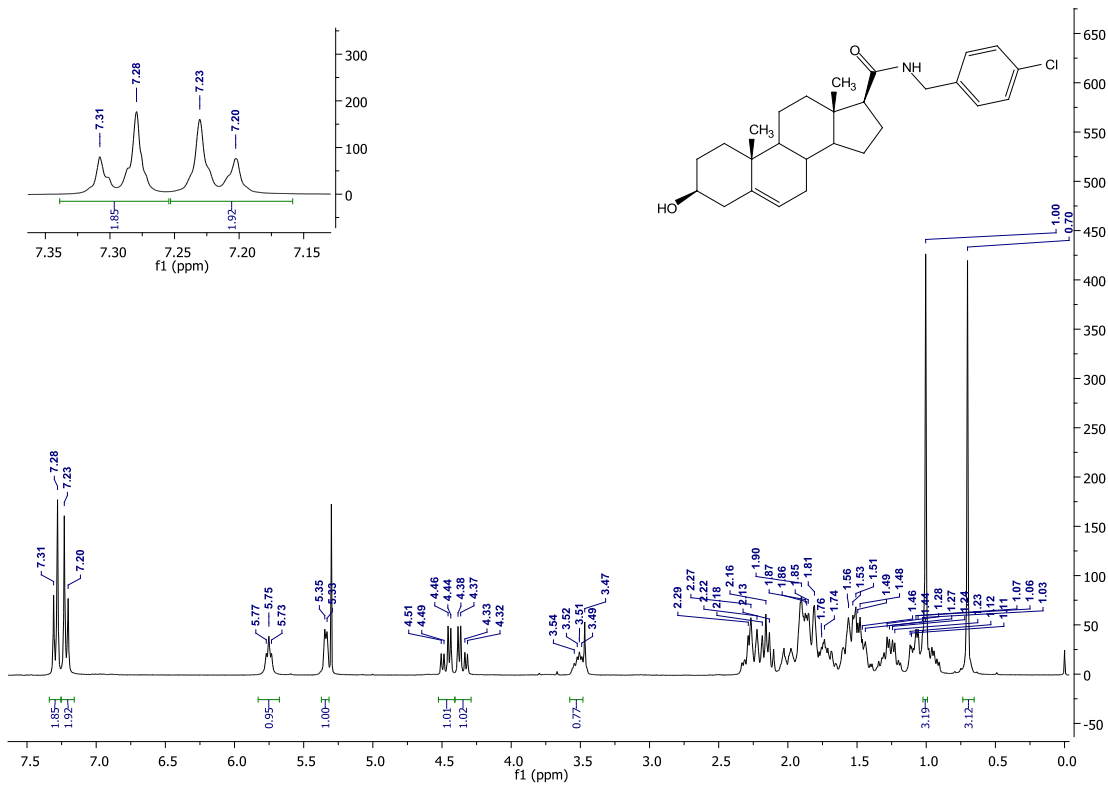
Espectro 73: IR del compuesto 5p



ANEXO 1: Espectros

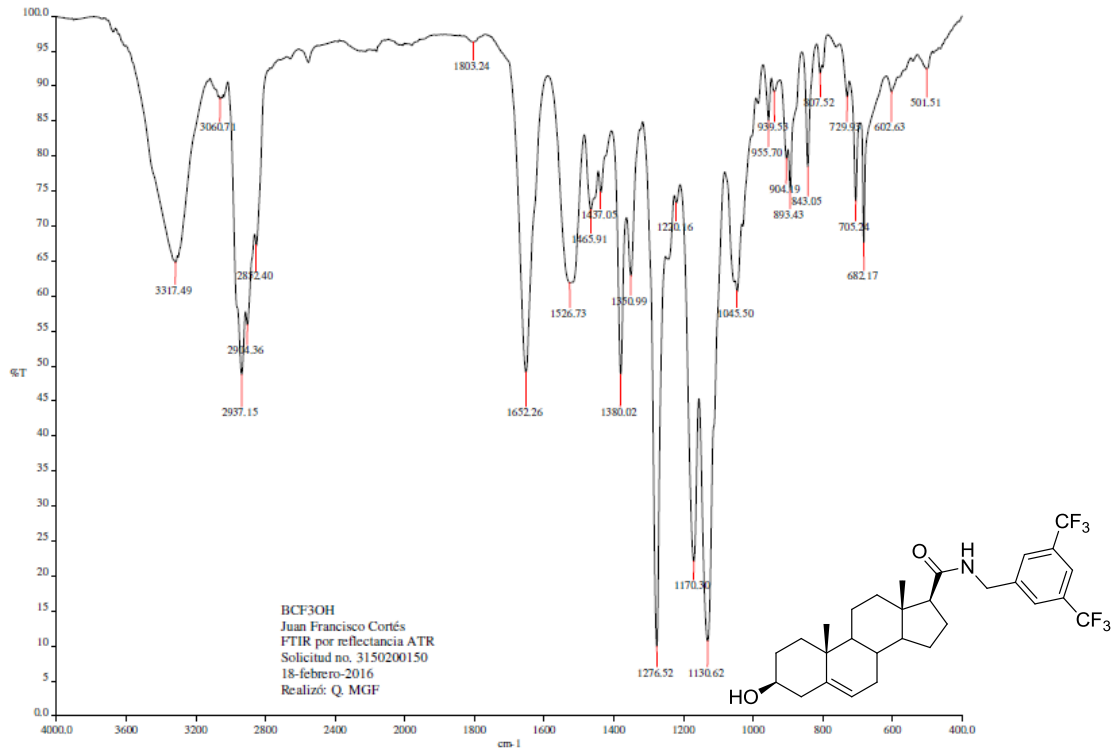


Espectro 77: IR del compuesto 5r

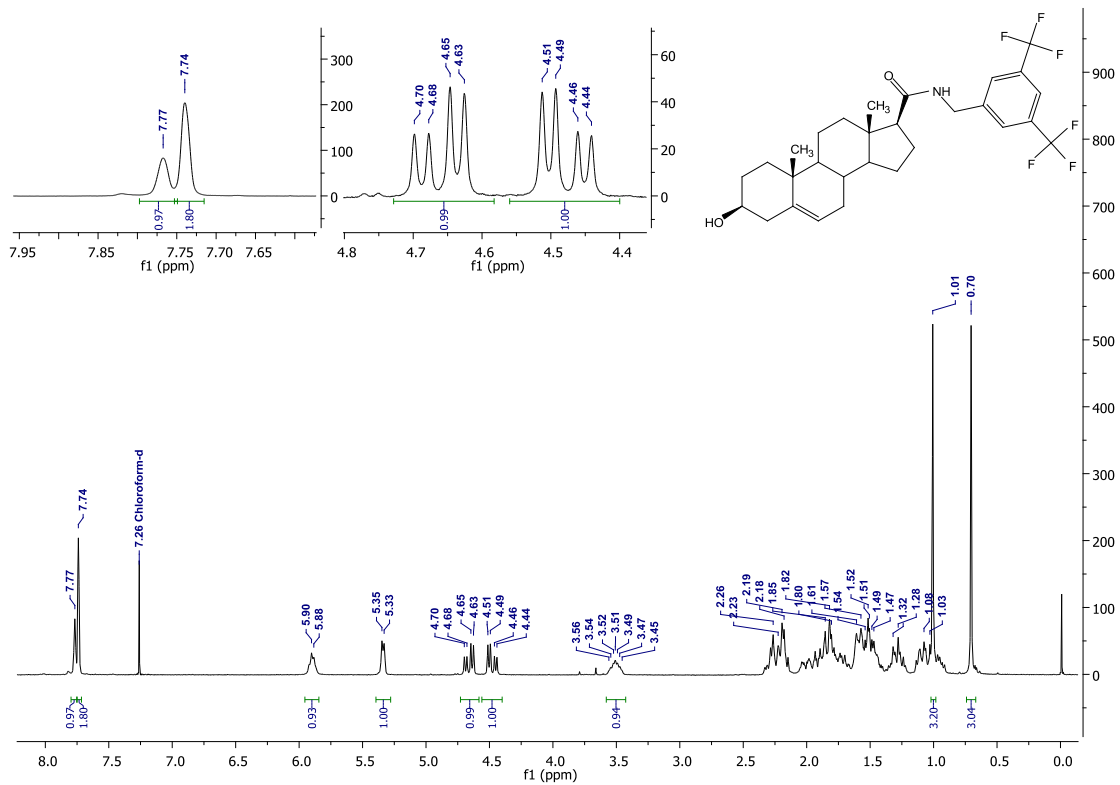


Espectro 78: RMN ¹H del compuesto 5r

ANEXO 1: Espectros

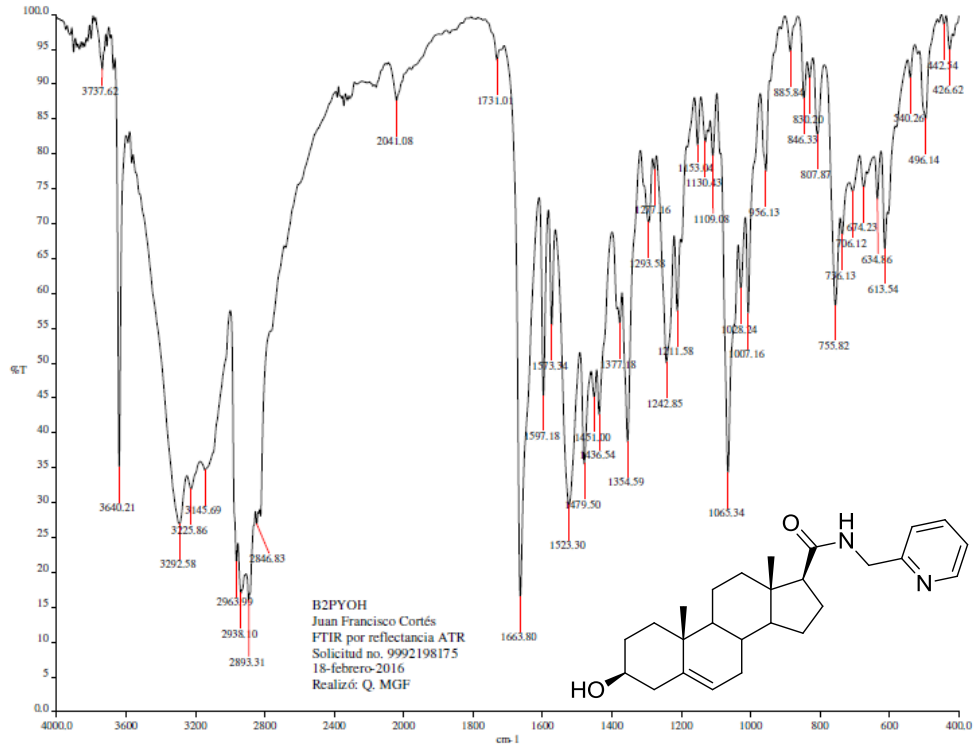


Espectro 79: IR del compuesto 5s

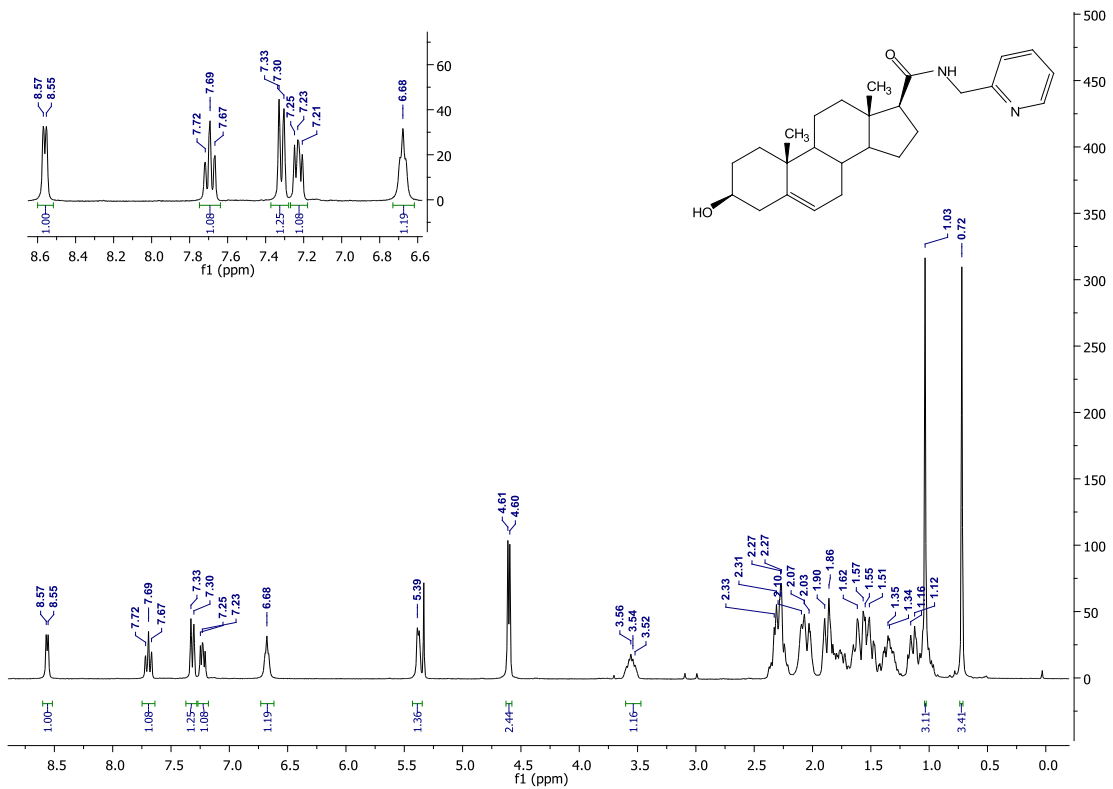


Espectro 80: RMN ¹H del compuesto 5s

ANEXO 1: Espectros

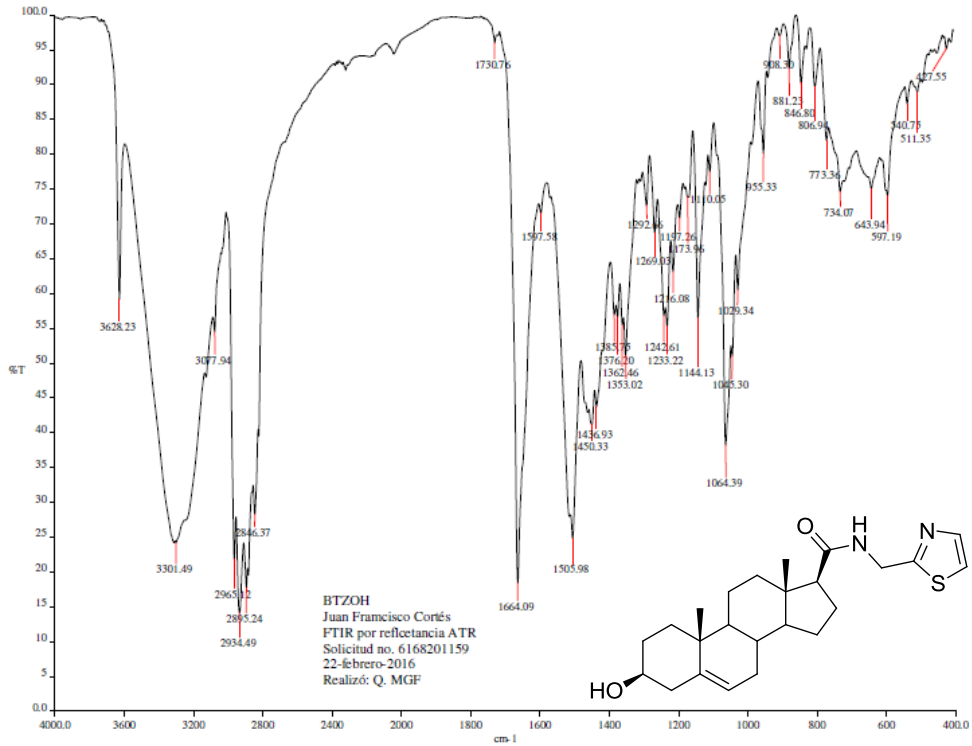


Espectro 81: IR del compuesto 5t

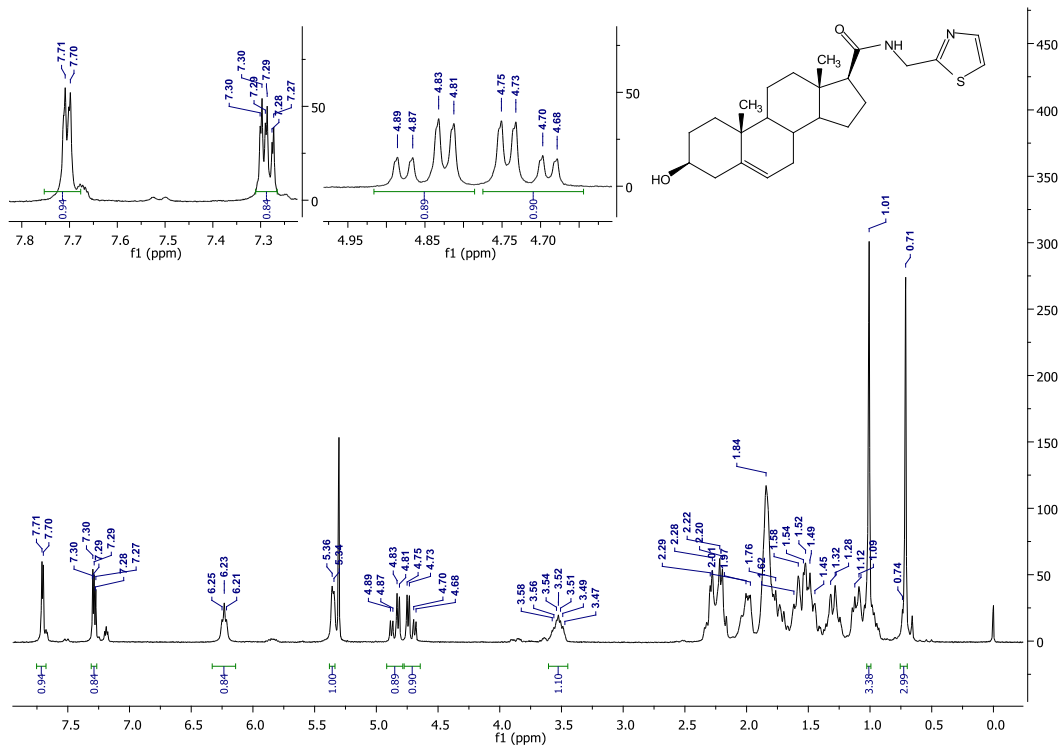


Espectro 82: RMN ¹H del compuesto 5t

ANEXO 1: Espectros

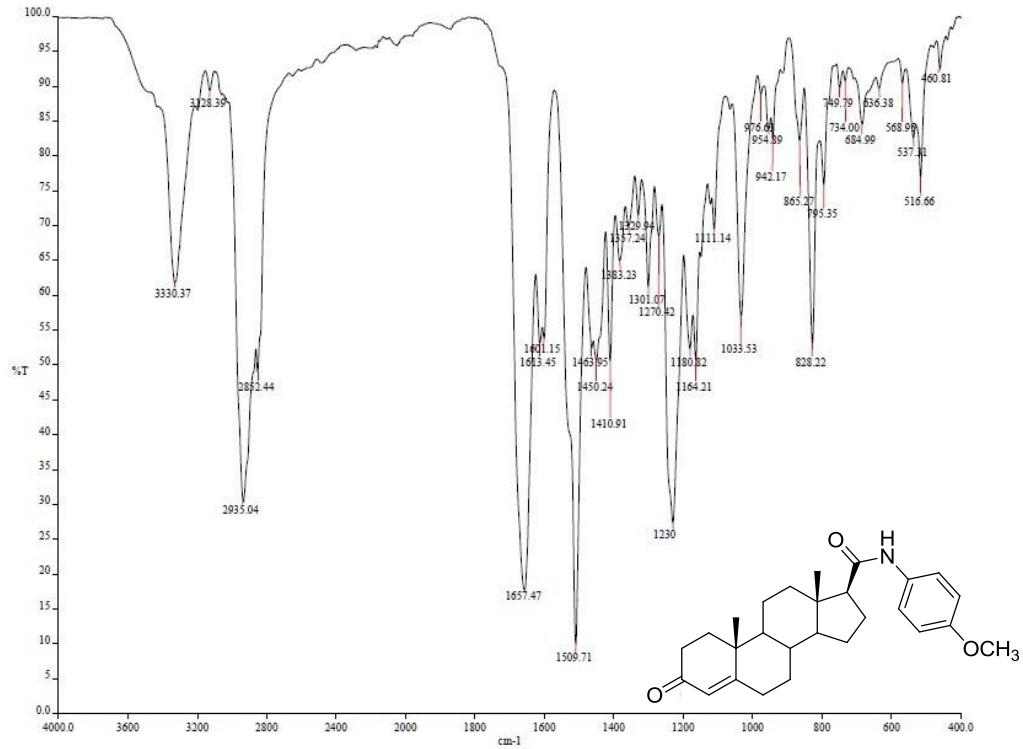


Espectro 83: IR del compuesto 5u

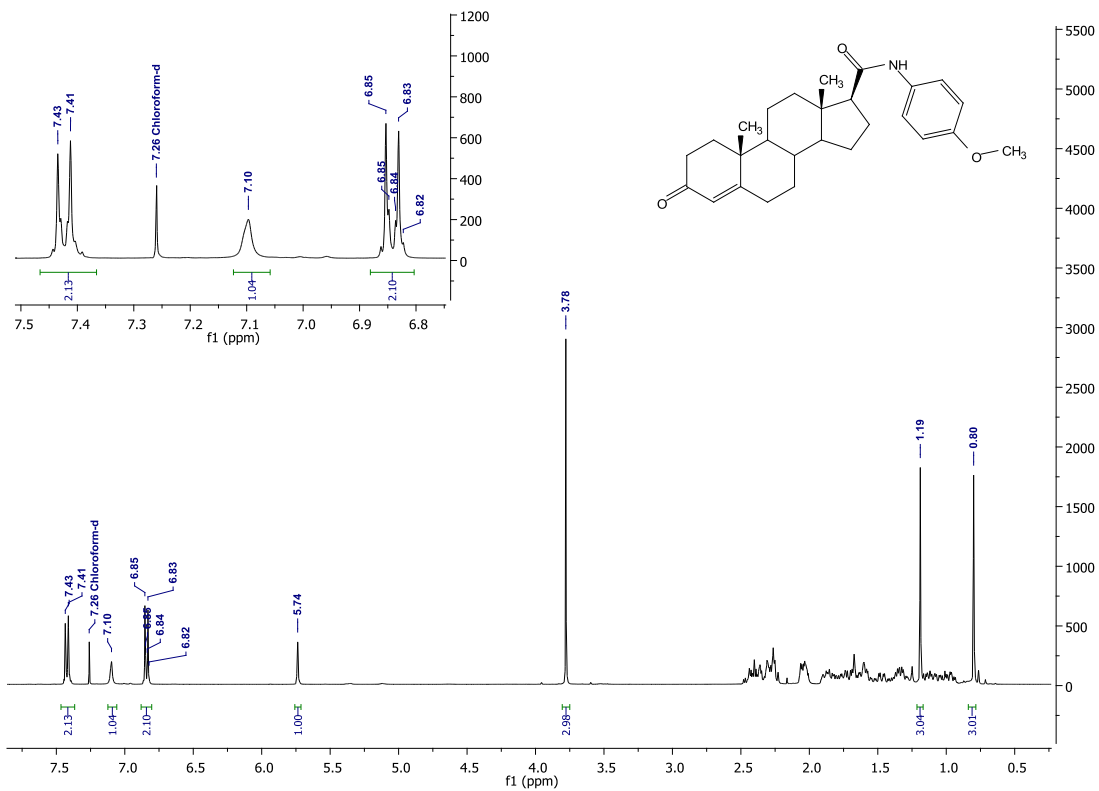


Espectro 84: RMN ¹H del compuesto 5u

ANEXO 1: Espectros

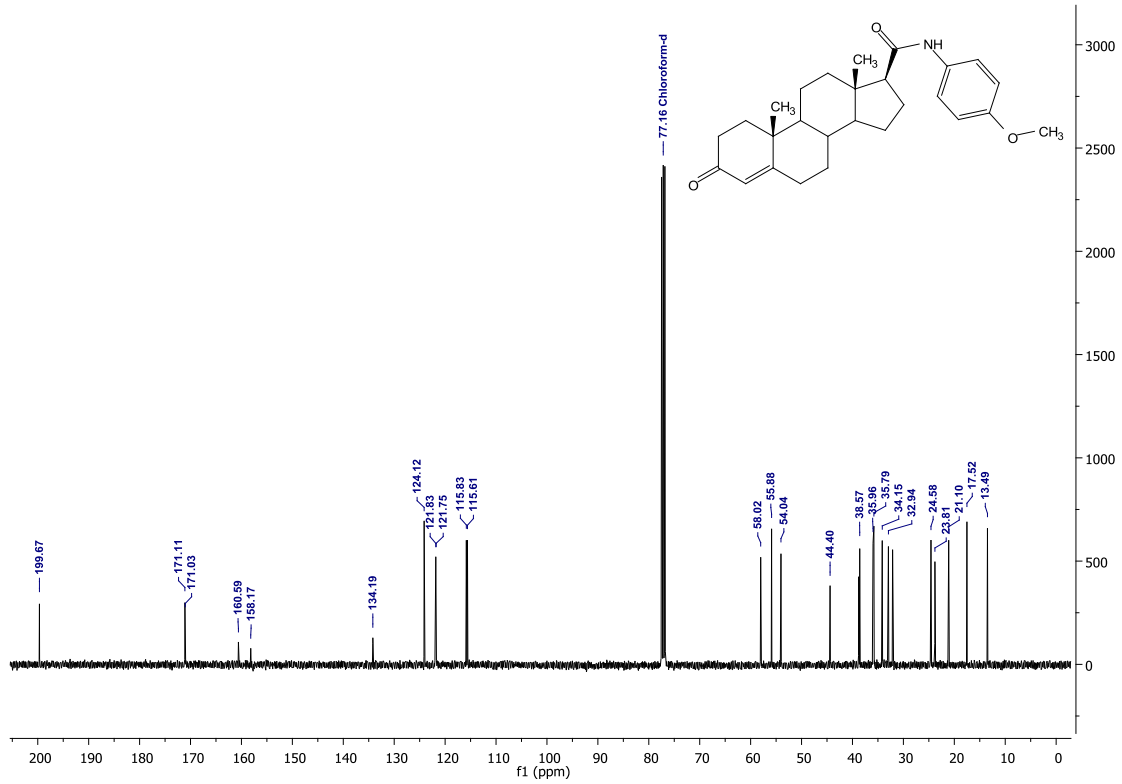


Espectro 85: IR del compuesto 6a

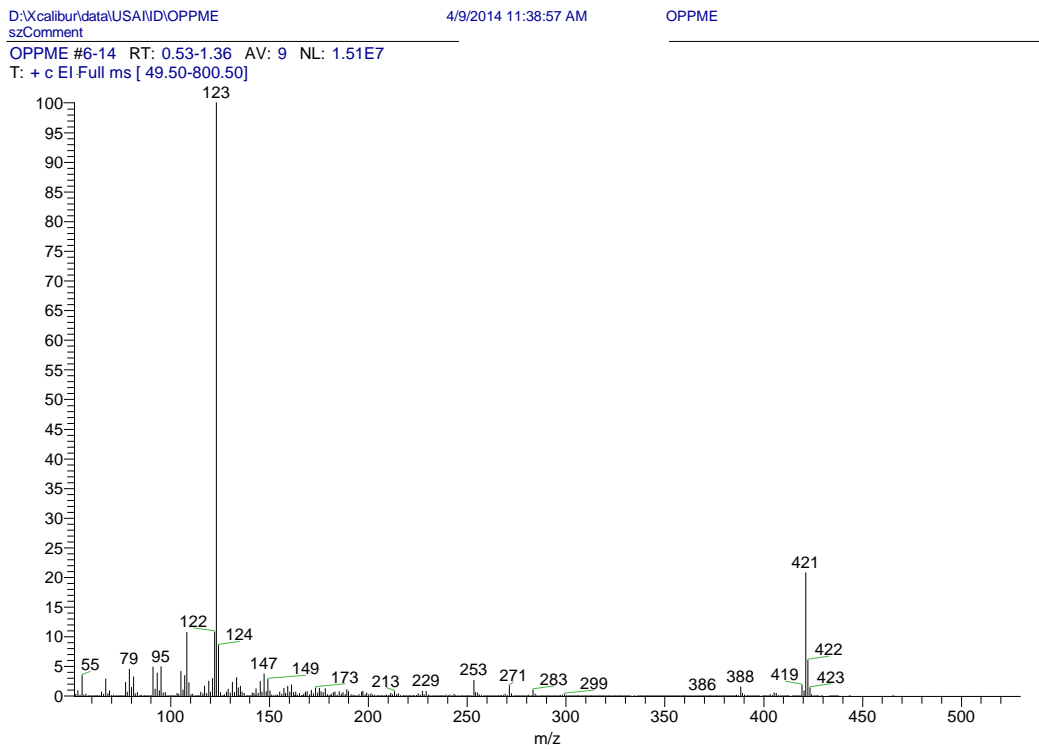


Espectro 86: RMN ¹H del compuesto 6a

ANEXO 1: Espectros

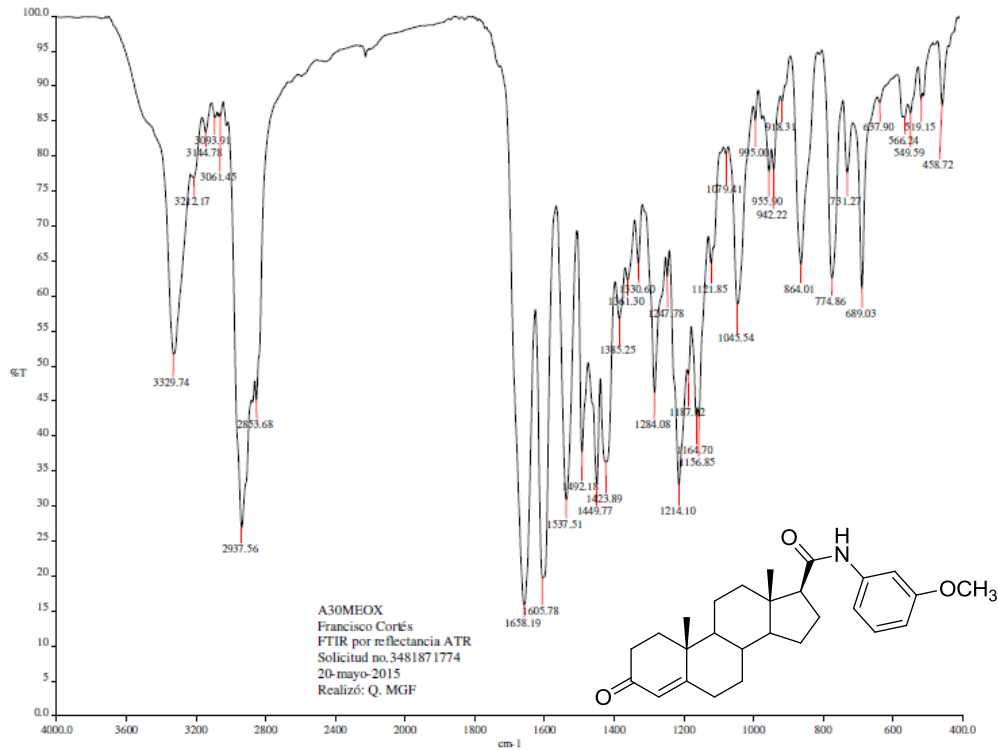


Espectro 87: RMN ¹³C del compuesto 6a

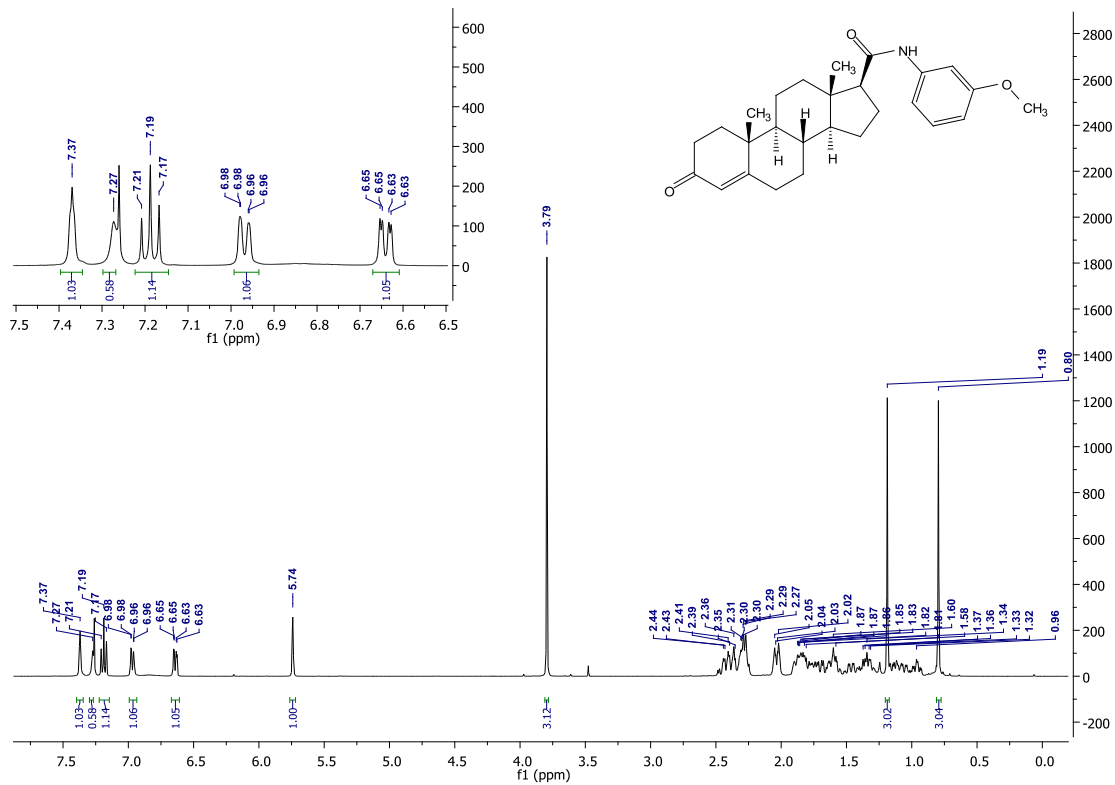


Espectro 88: Espectrometría de masas (IE) del compuesto 6a

ANEXO 1: Espectros

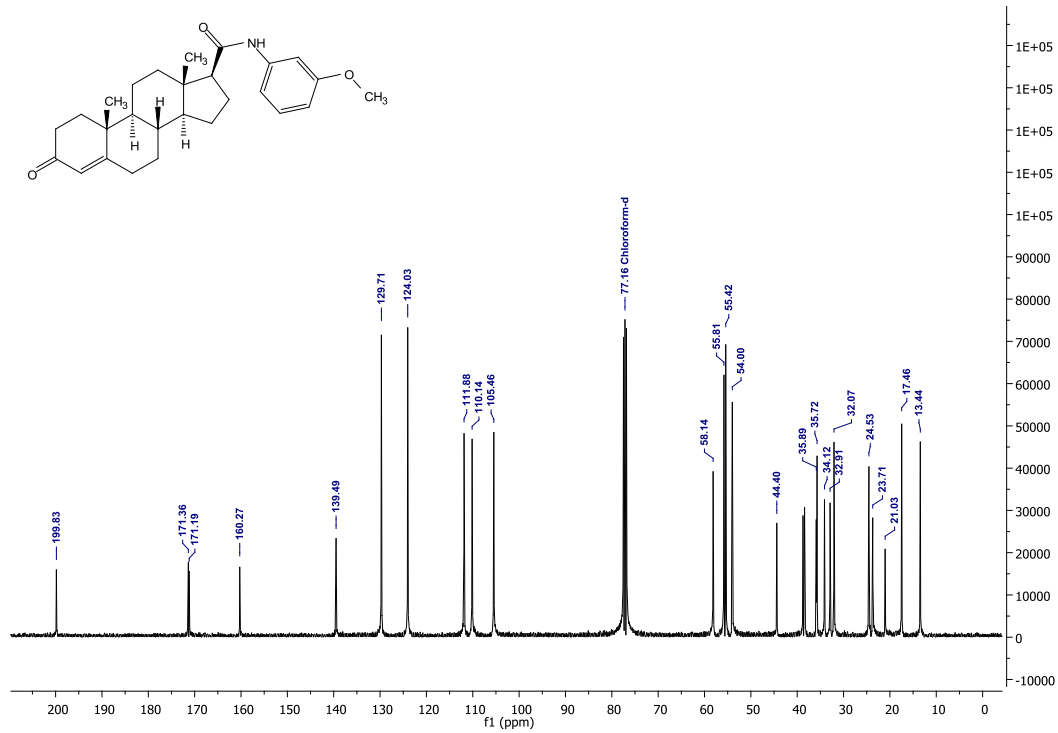


Espectro 89: IR del compuesto 6b



Espectro 90: RMN ¹H del compuesto 6b

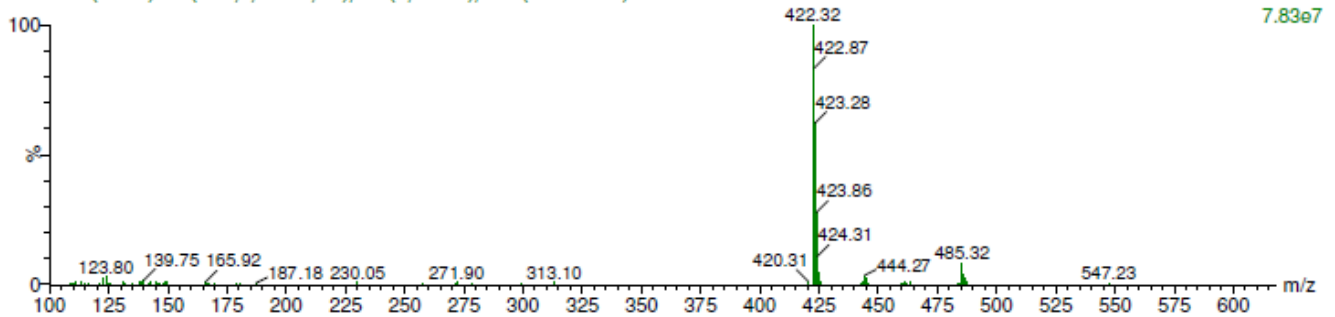
ANEXO 1: Espectros



Espectro 91: RMN ^{13}C del compuesto 6b

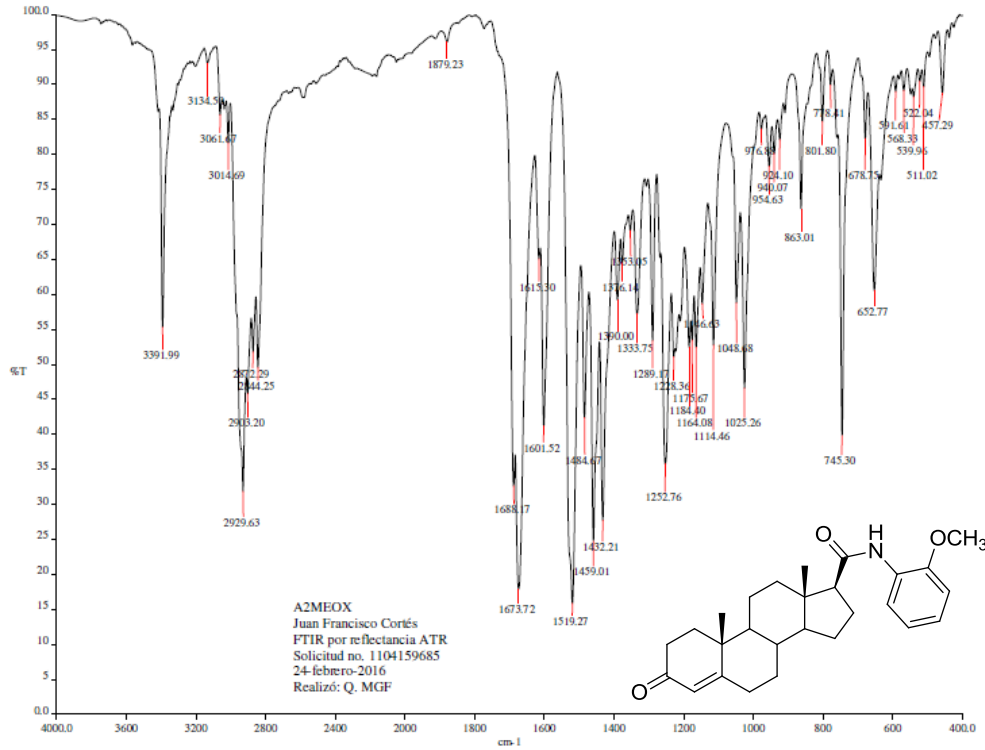
20160927-9 1433 (7.020) Cn (Cen,4, 80.00, Ht); Sb (2,40.00); Cm (1423:1434)

1: Scan ES+
7.83e7

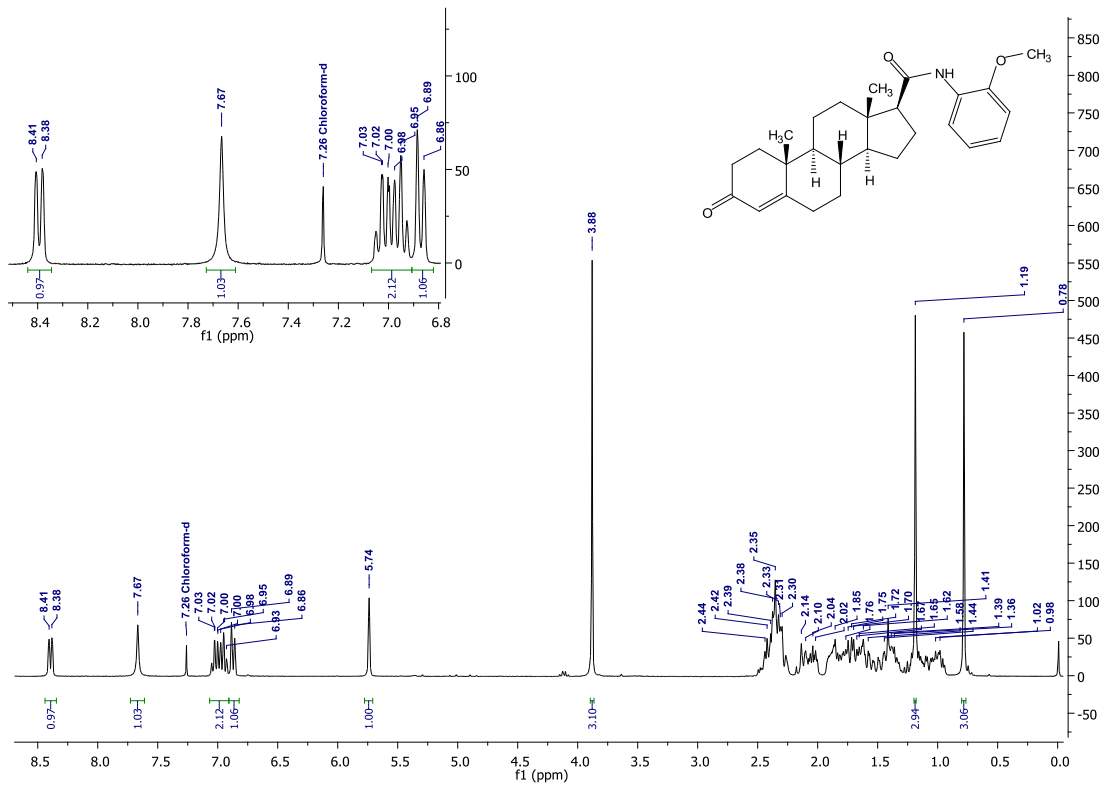


Espectro 92: espectro de masas (método ESI $^{+}$ -MS) del compuesto 6b

ANEXO 1: Espectros

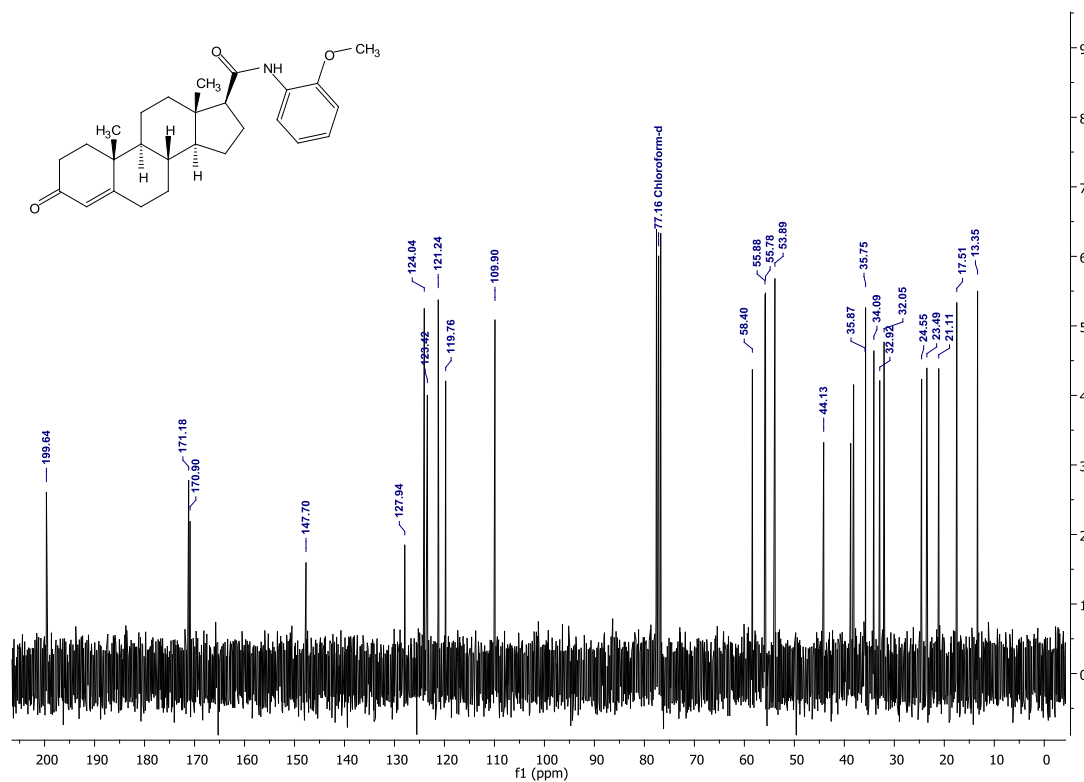


Espectro 93: IR del compuesto 6c



Espectro 94: RMN ¹H del compuesto 6c

ANEXO 1: Espectros

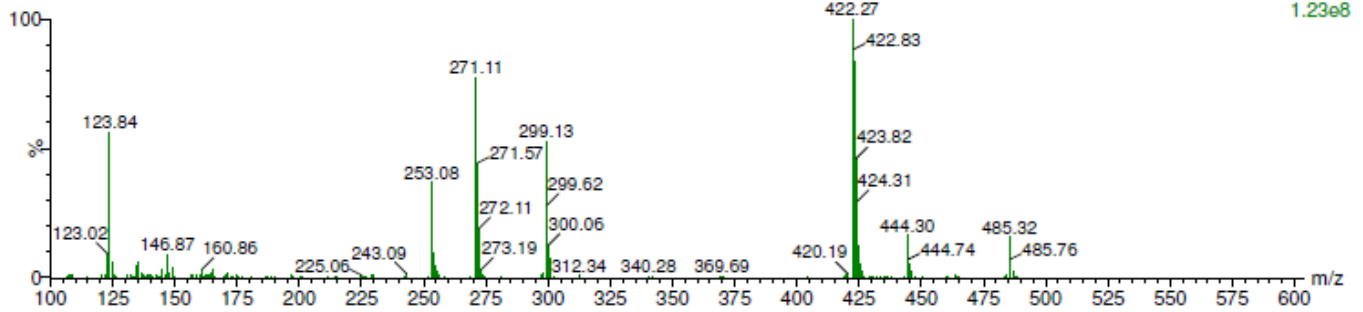


Espectro 95: RMN ^{13}C del compuesto 6c

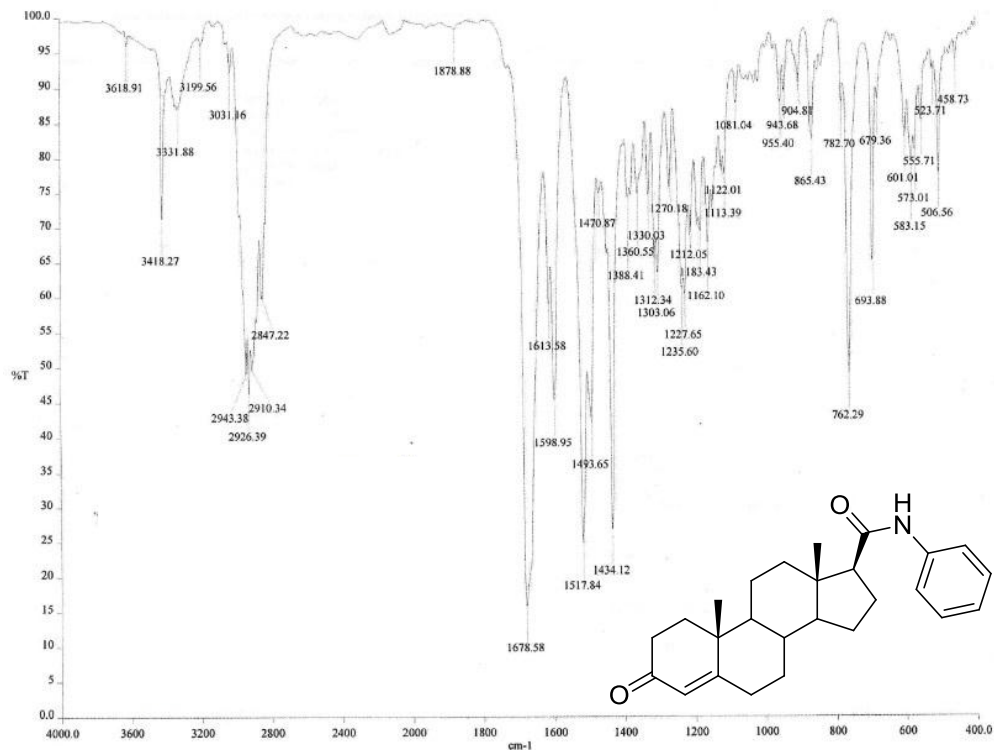
ANEXO 1: Espectros

20160927-6 1537 (7.530) Cn (Cen,4, 80.00, Ht); Sb (2,40.00); Cm (1530:1538)

1: Scan ES+
1.23e8

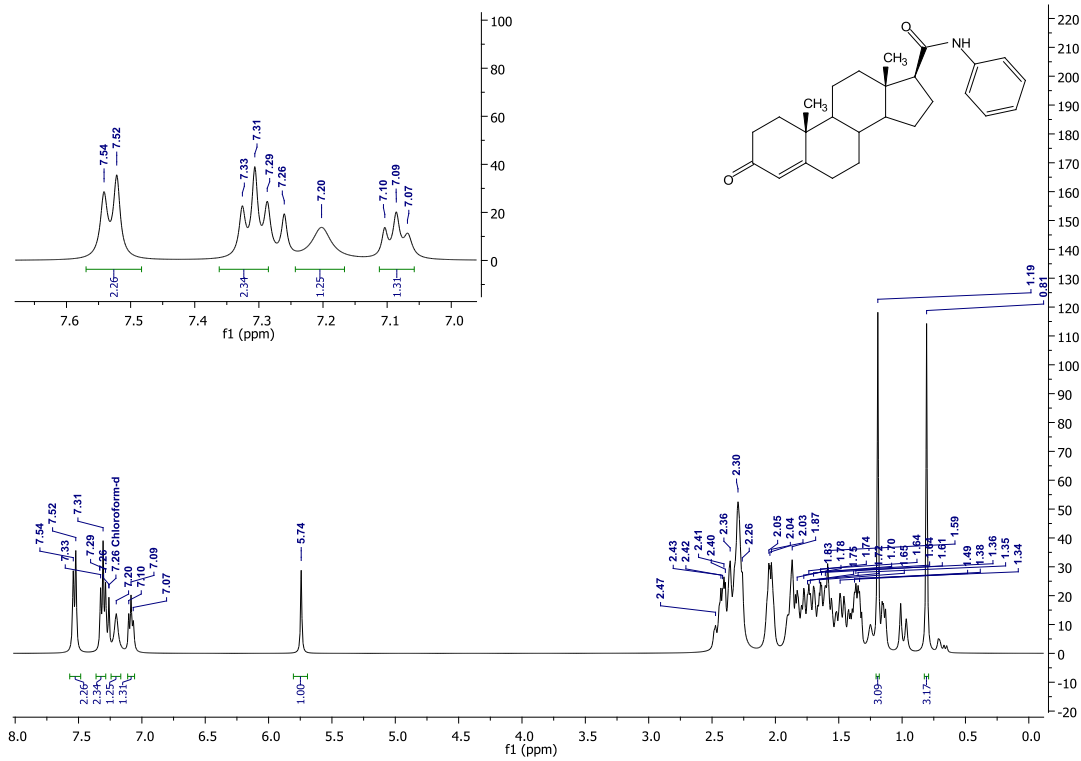


Espectro 96: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6c

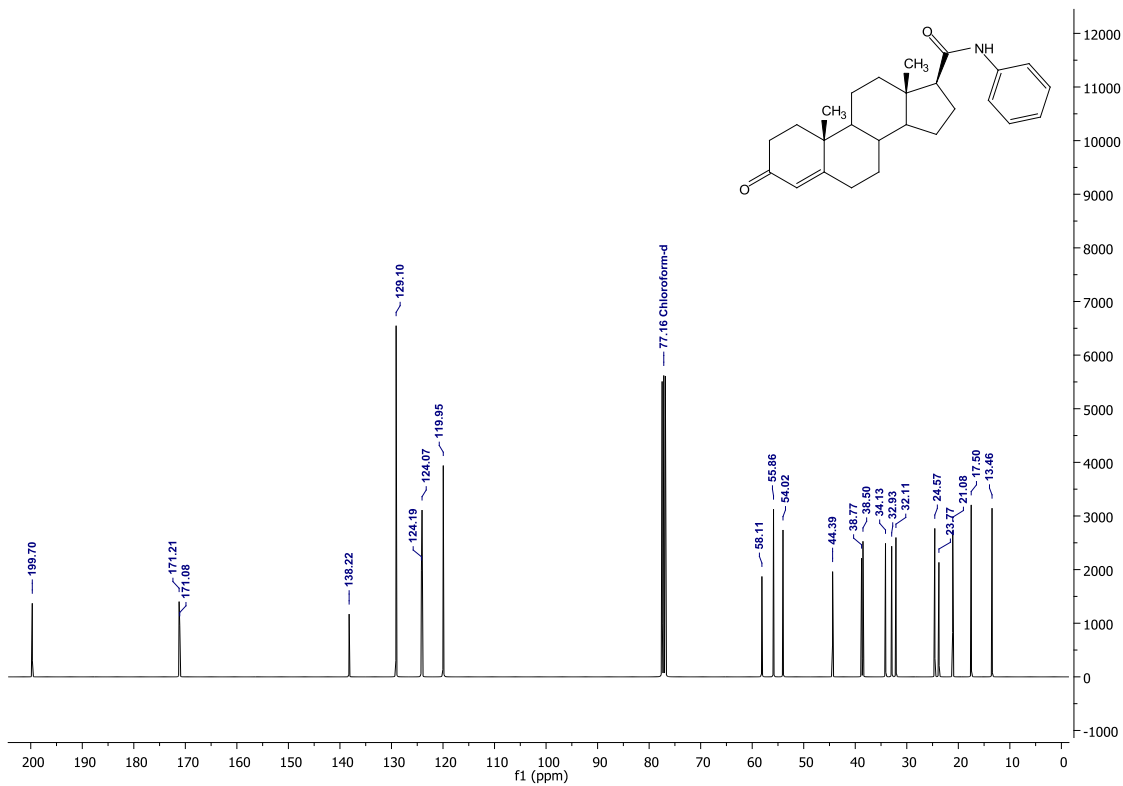


Espectro 97: IR del compuesto 6d

ANEXO 1: Espectros



Espectro 98: RMN ^1H del compuesto 6d



Espectro 99: RMN ^{13}C del compuesto 6d

ANEXO 1: Espectros

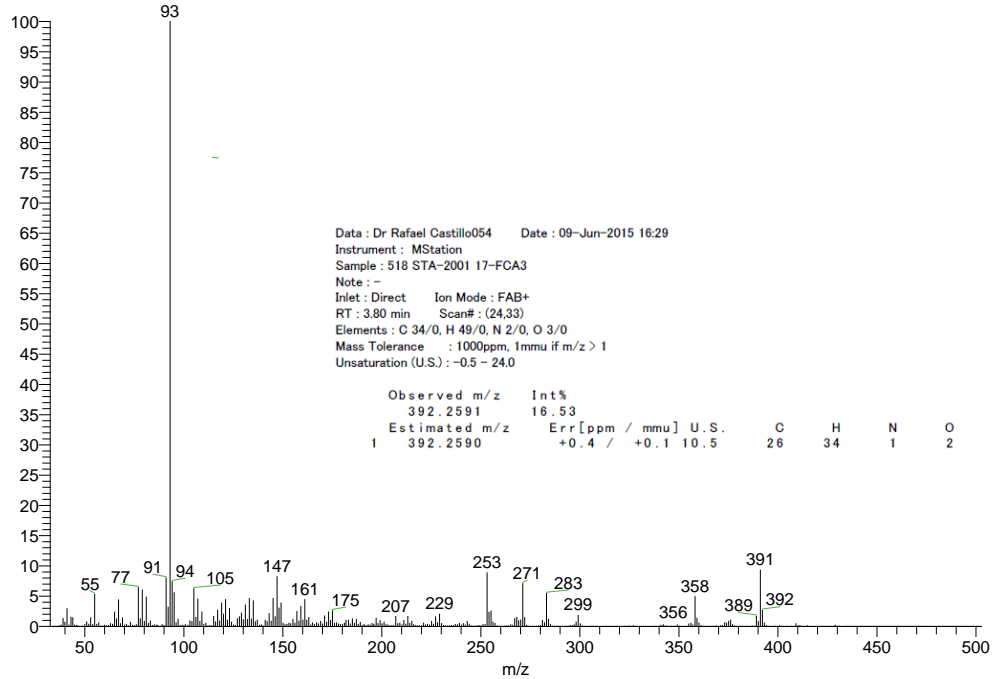
D:\xcalibur\data\USA\IND\ANOX_1_1

5/29/2014 12:18:05 PM

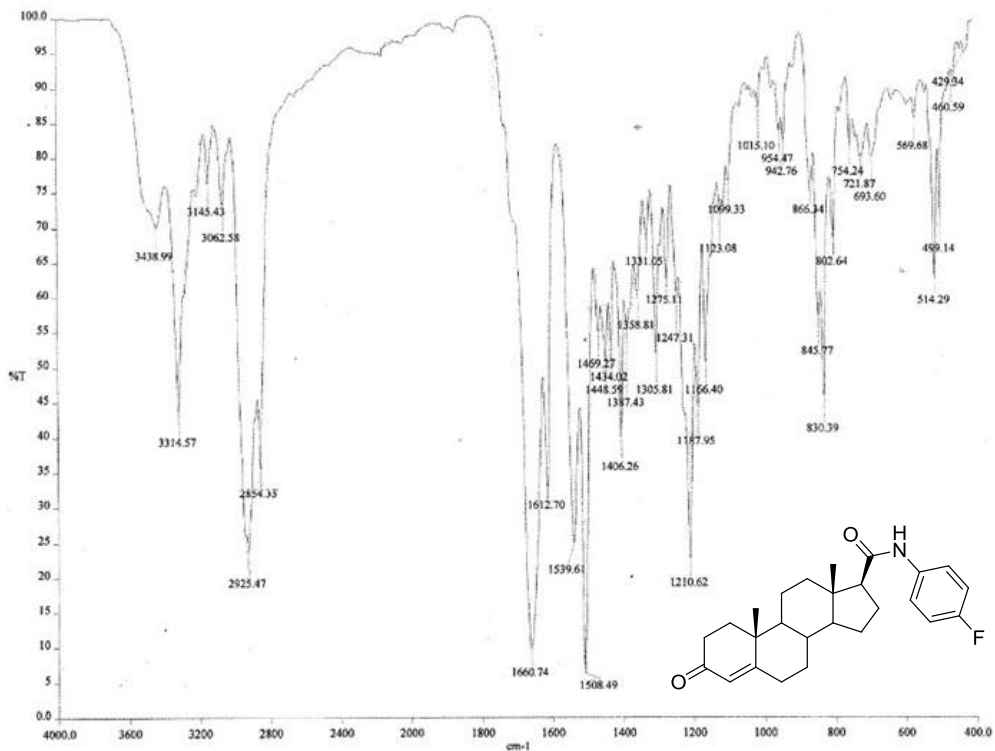
szComment

ANOX_1_1 #10-13 RT: 0.99-1.31 AV: 4 NL: 5.91E7

T: + c EI Full ms [32.50-600.50]

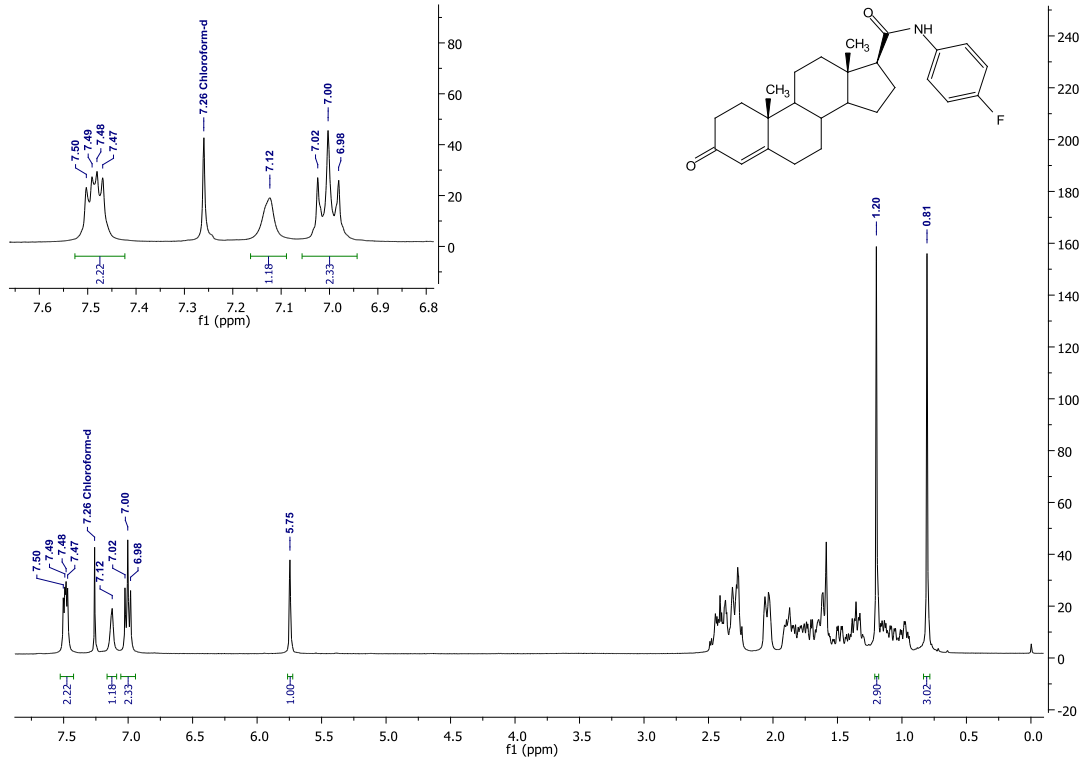


Espectro 100: Espectrometría de masas (IE) del compuesto 6d

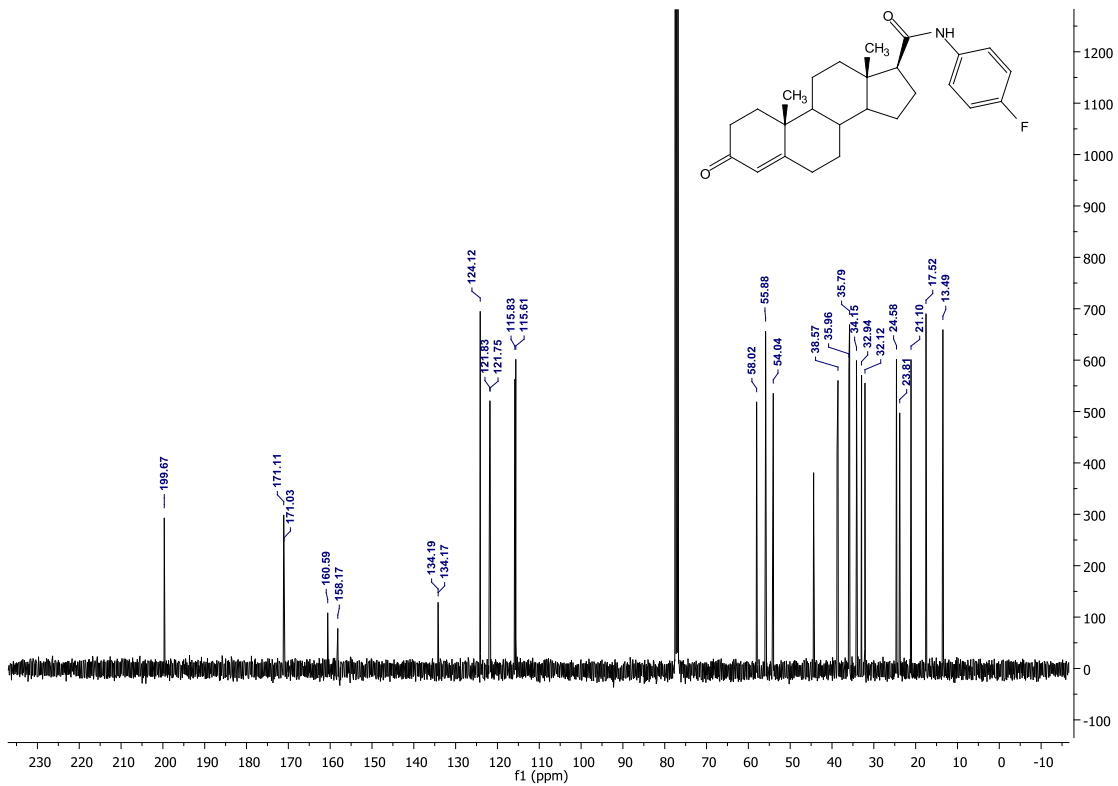


Espectro 101: IR del compuesto 6e

ANEXO 1: Espectros



Espectro 102: RMN ¹H del compuesto 6e

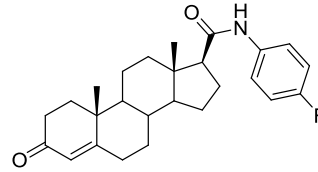
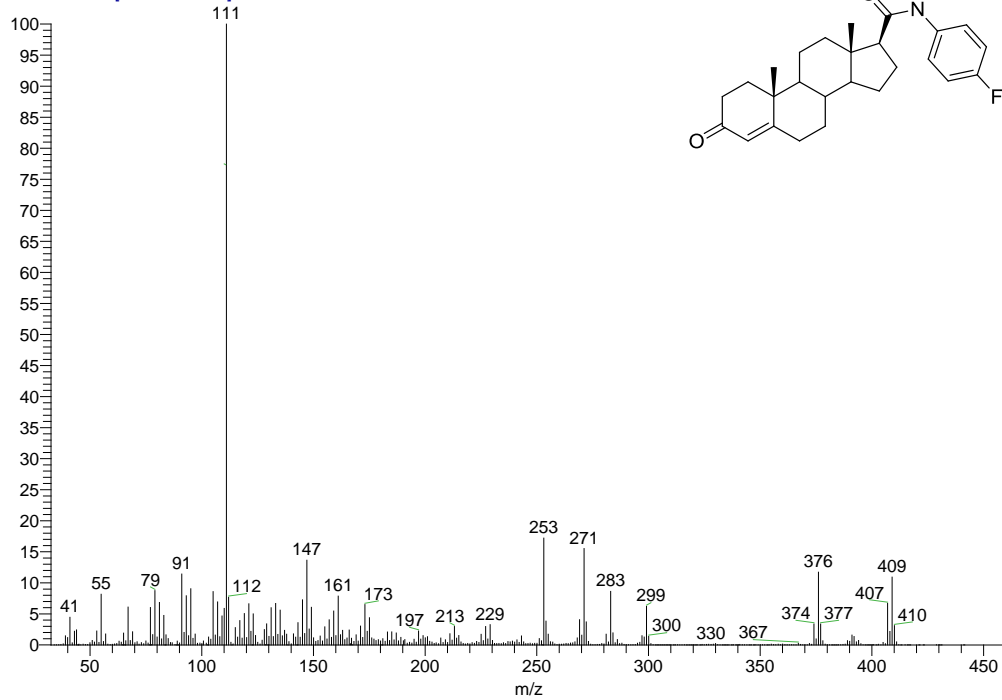


Espectro 103: RMN ¹³C del compuesto 6e

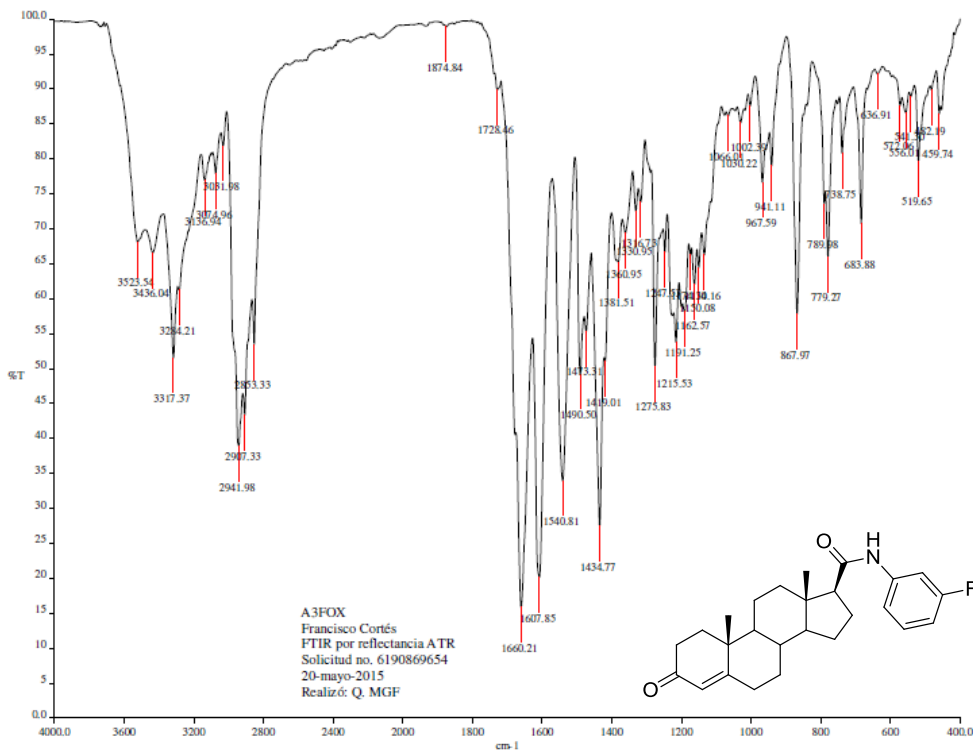
ANEXO 1: Espectros

D:\Xcalibur\data\USA\ND\OPPF_1_1
szComment
OPPF_1_1 #2-5 RT: 0.11-0.44 AV: 4 NL: 7.94E6
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]

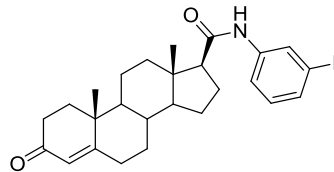
6/19/2014 9:55:27 AM



Espectro 104: Espectrometría de masas (IE) del compuesto 6e

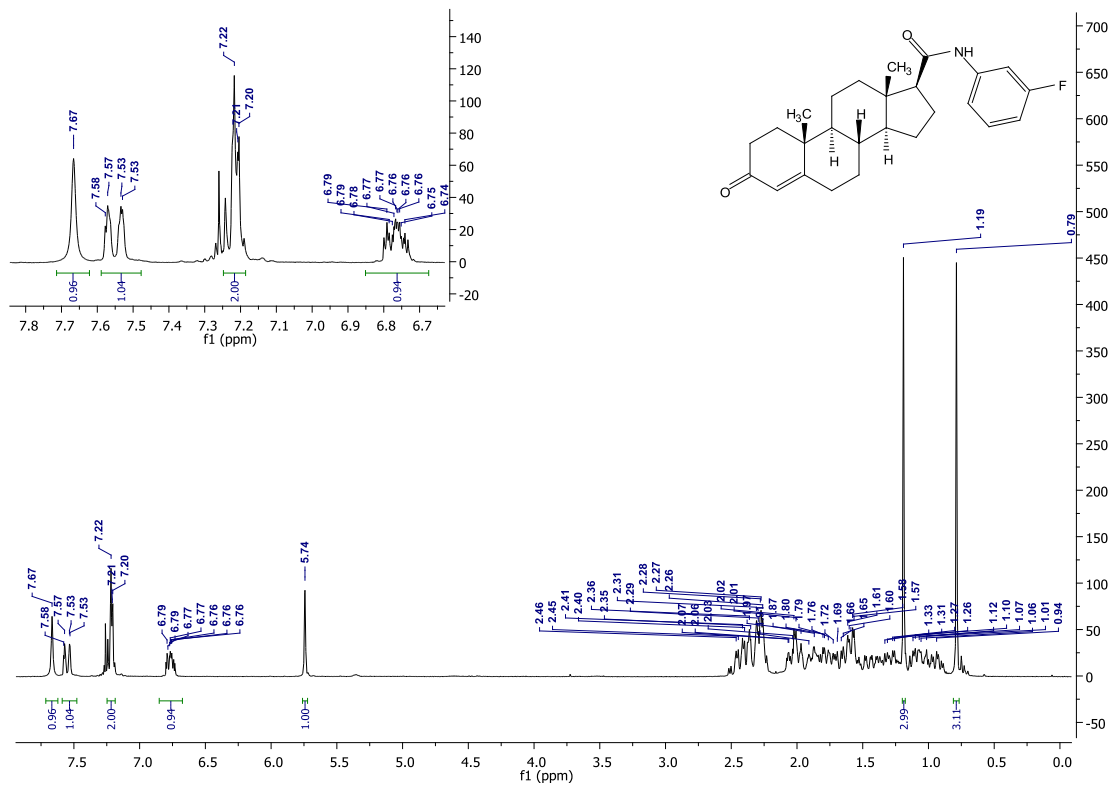


A3FOX
Francisco Cortés
FTIR por reflectancia ATR
Solicitud no. 6190869654
20-mayo-2015
Realizó: Q. MGF

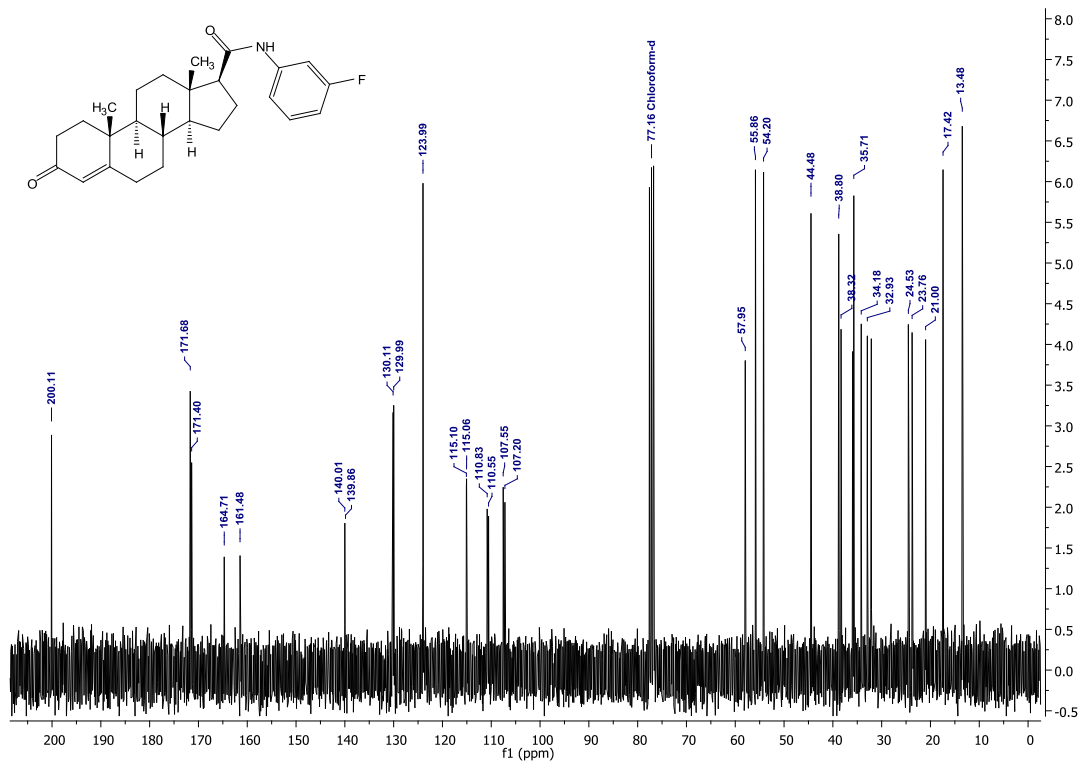


Espectro 105: IR del compuesto 6f

ANEXO 1: Espectros

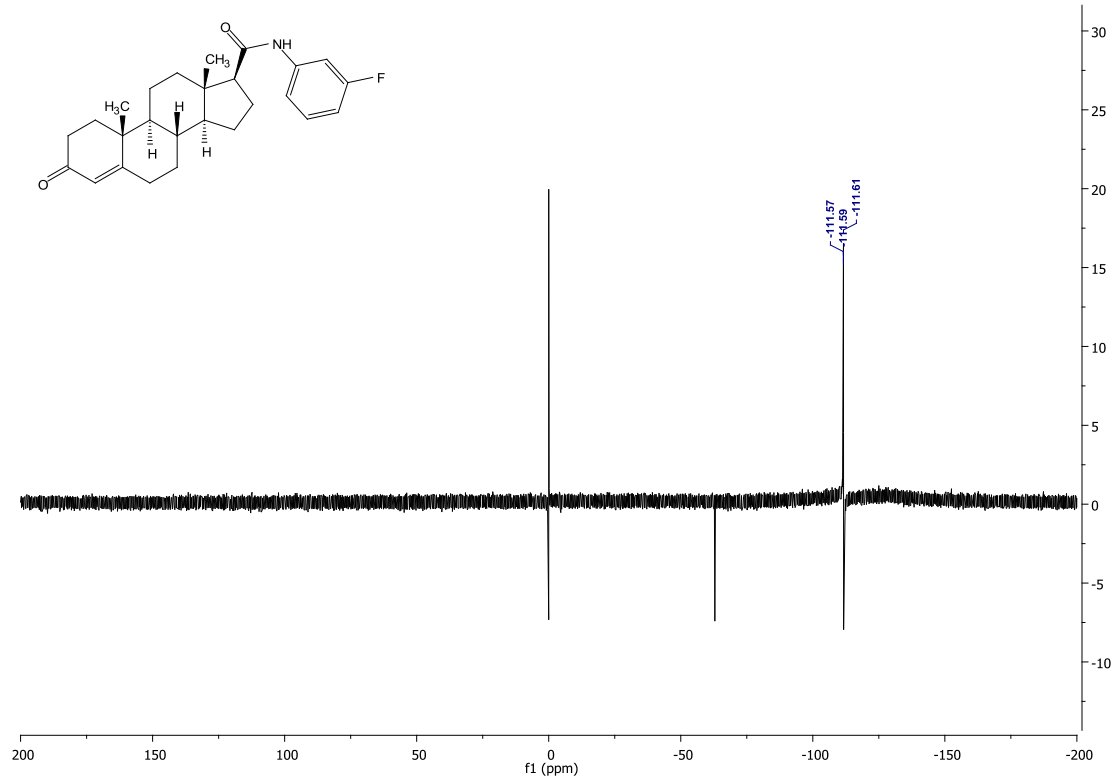


Espectro 106: RMN ¹H del compuesto 6f

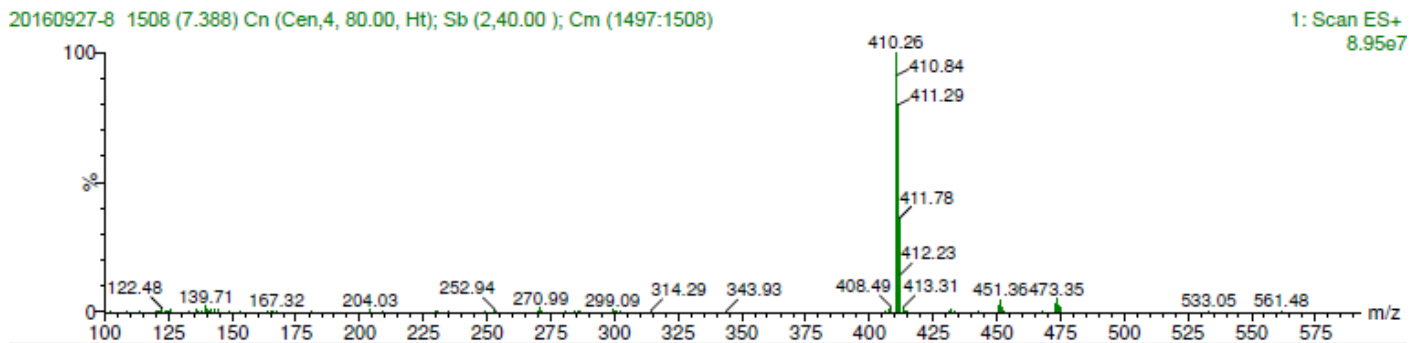


Espectro 107: RMN ¹³C del compuesto 6f

ANEXO 1: Espectros

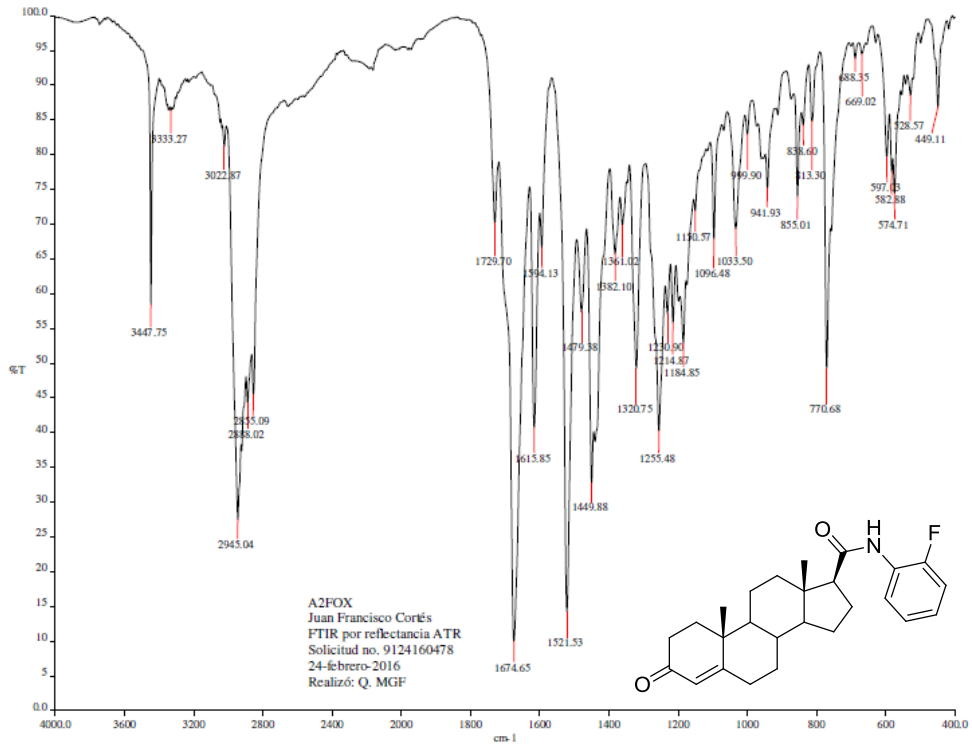


Espectro 108: RMN ¹⁹F del compuesto 6f

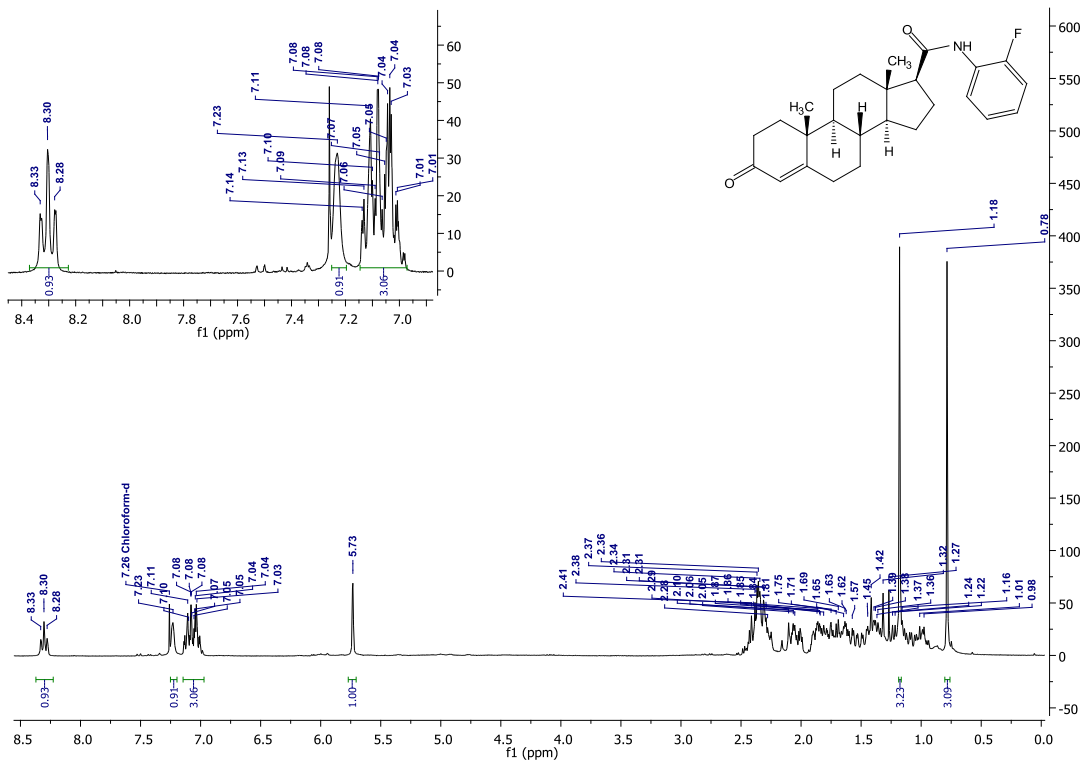


Espectro 109: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6f

ANEXO 1: Espectros

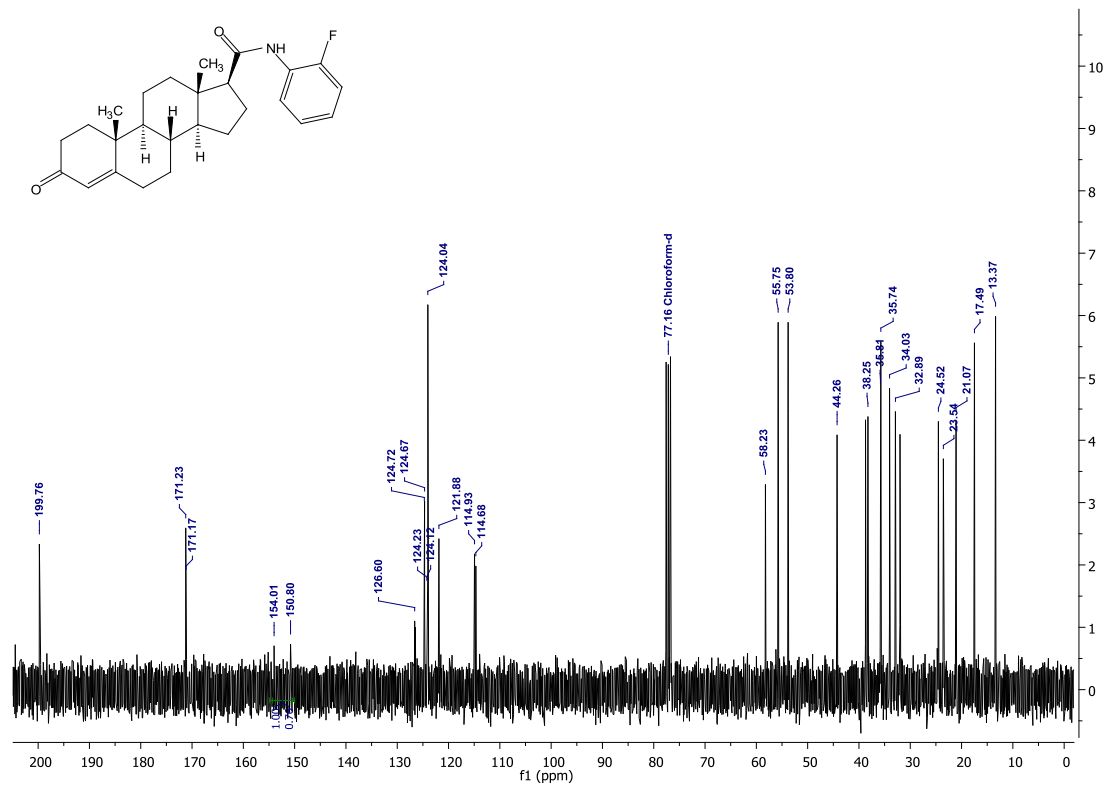


Espectro 110: IR del compuesto 6g

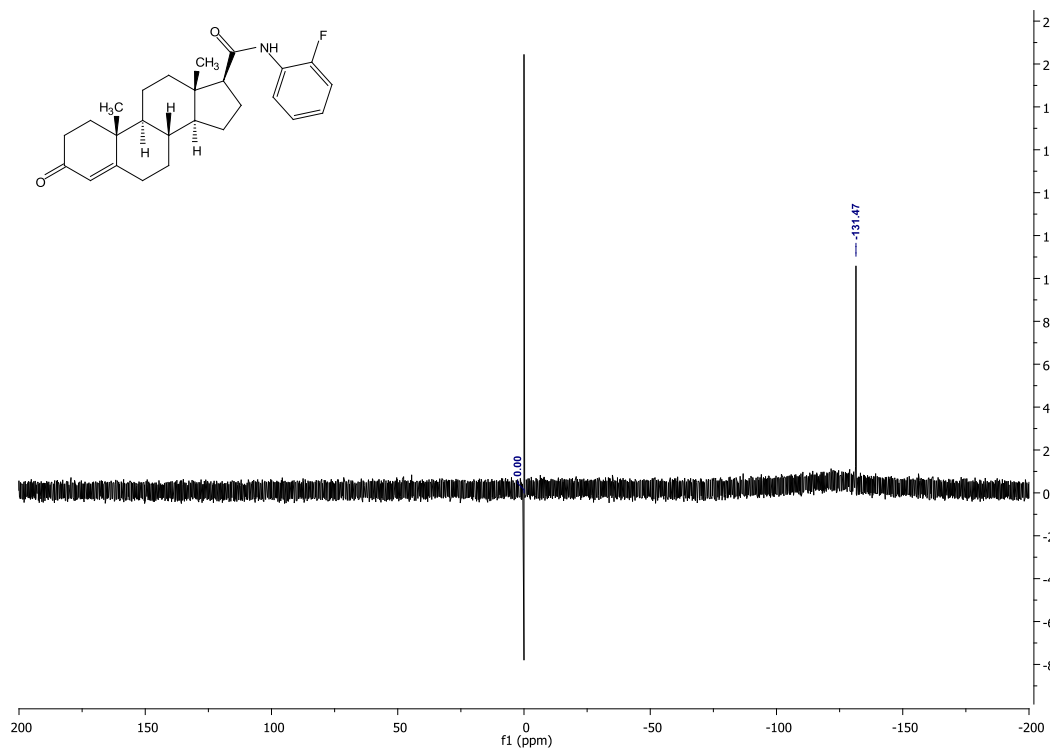


Espectro 111: RMN ¹H del compuesto 6g

ANEXO 1: Espectros



Espectro 112: RMN ¹³C del compuesto 6g

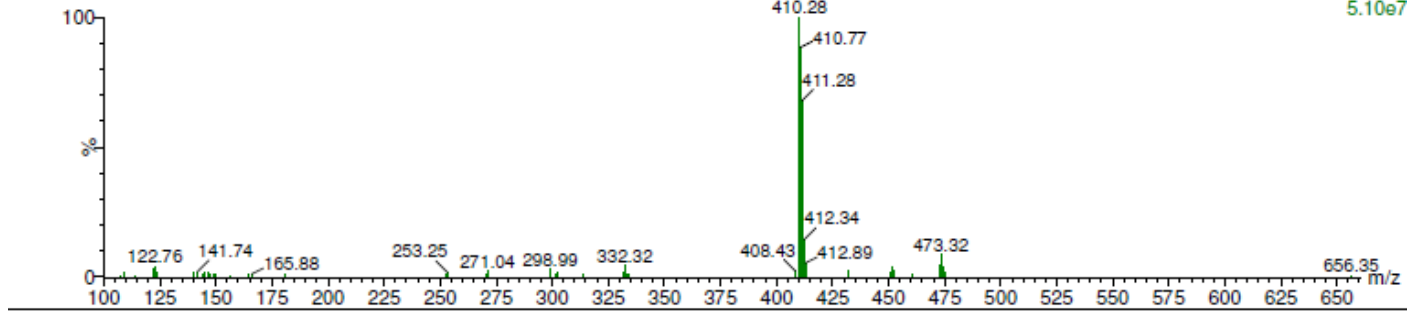


Espectro 113: RMN ¹⁹F del compuesto 6g

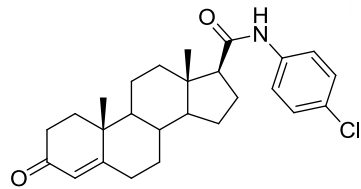
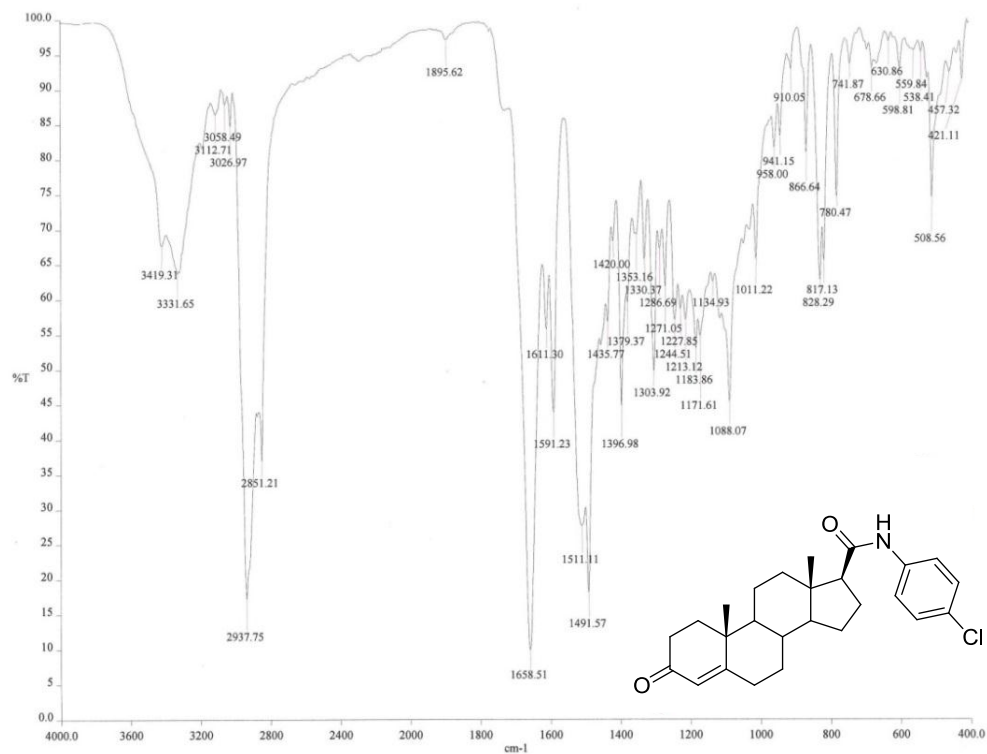
ANEXO 1: Espectros

20160927-5 1465 (7.177) Cn (Cen,4, 80.00, Ht); Sb (2,40.00); Cm (1455:1465)

1: Scan ES+
5.10e7

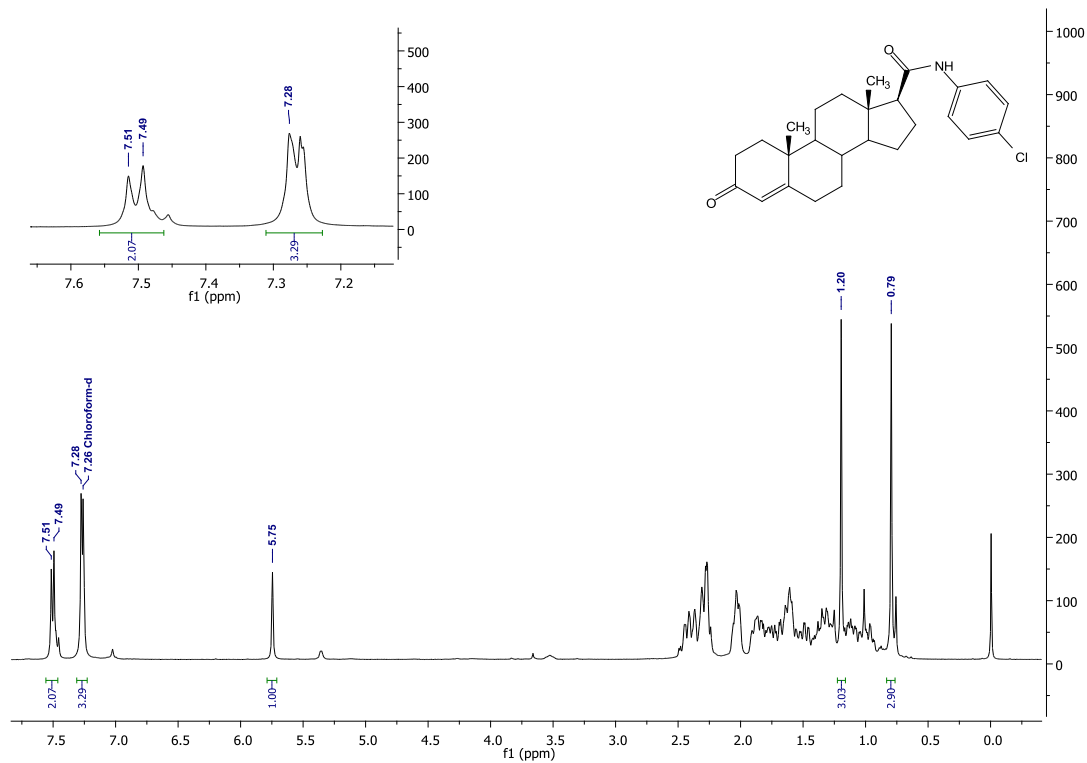


Espectro 114: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6g

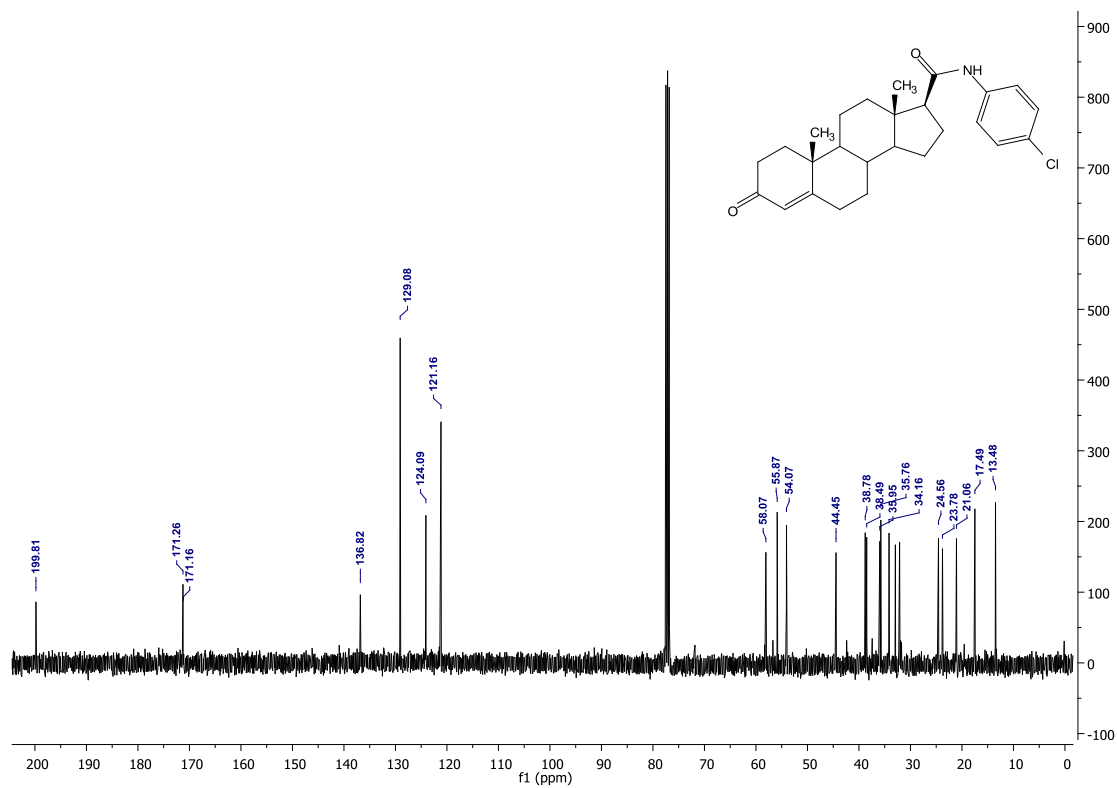


Espectro 115: IR del compuesto 6h

ANEXO 1: Espectros



Espectro 116: RMN ¹H del compuesto 6h



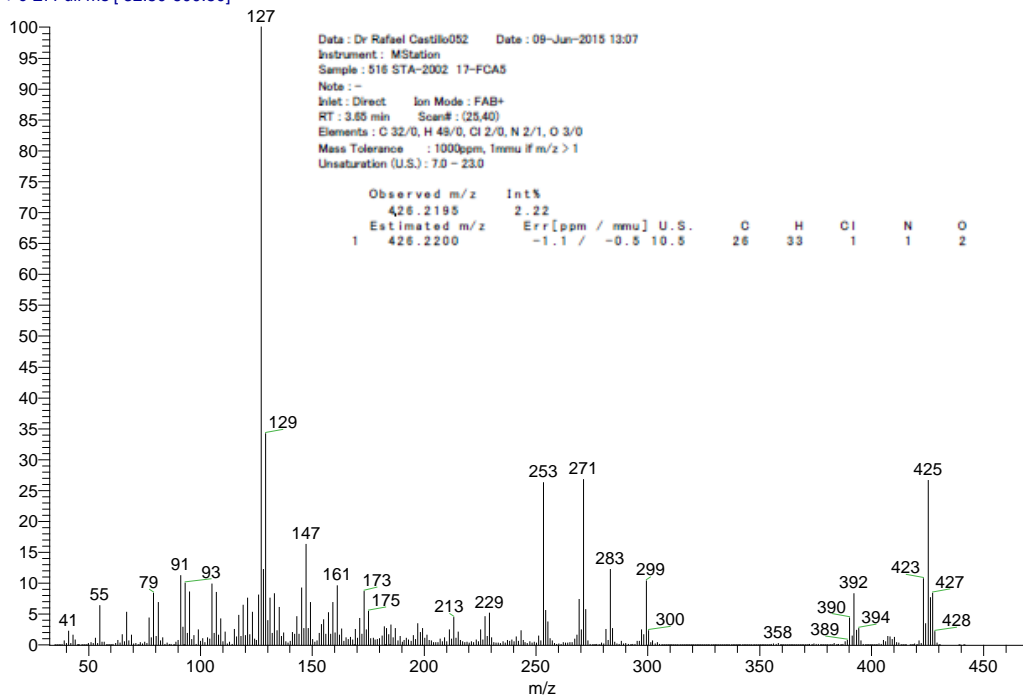
Espectro 117: RMN ¹³C del compuesto 6h

ANEXO 1: Espectros

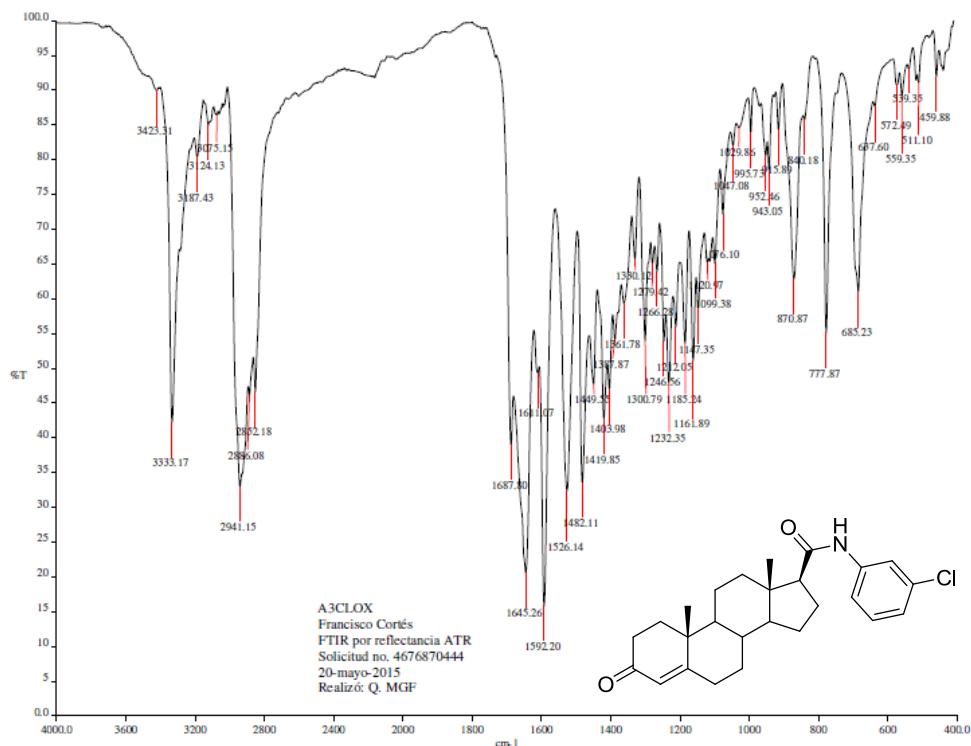
D:\xcalibur\data\USAND\OPPCL_1_1
szComment

4/29/2014 9:36:32 AM

OPPCL_1_1 #27-34 RT: 1.15-1.91 AV: 8 NL: 3.21E6
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]

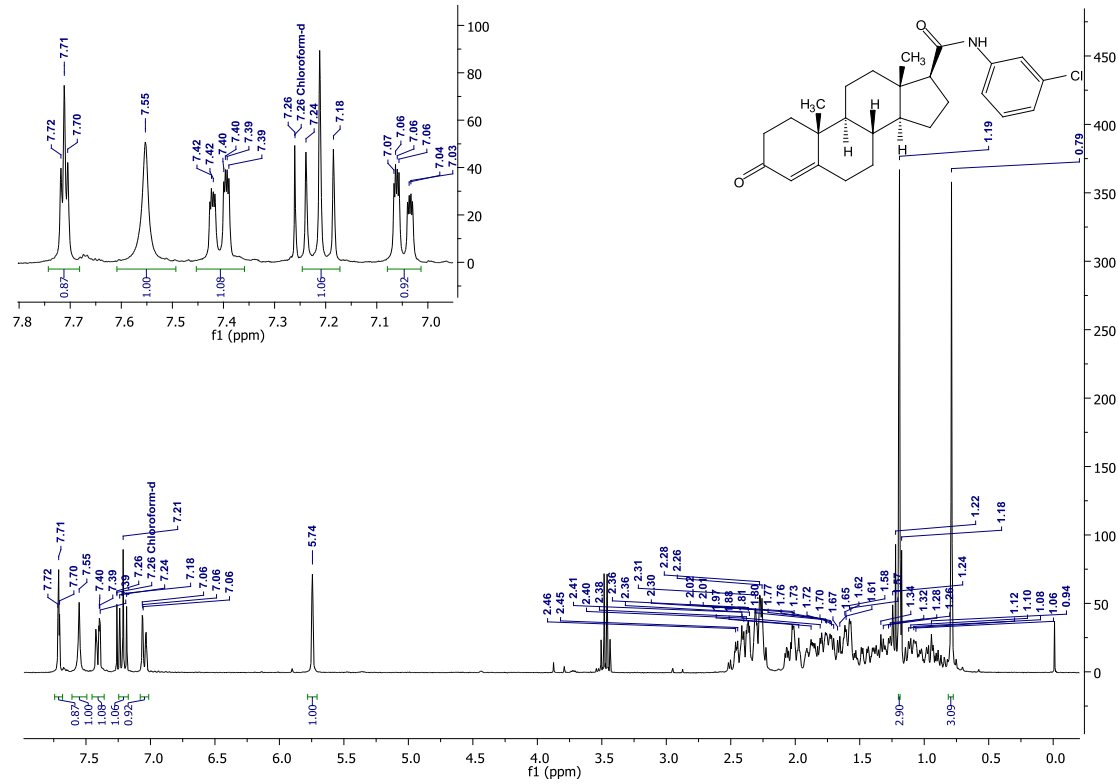


Espectro 118: Espectrometría de masas de baja resolución (método IE) y alta resolución (método FAB⁺) del compuesto 6h

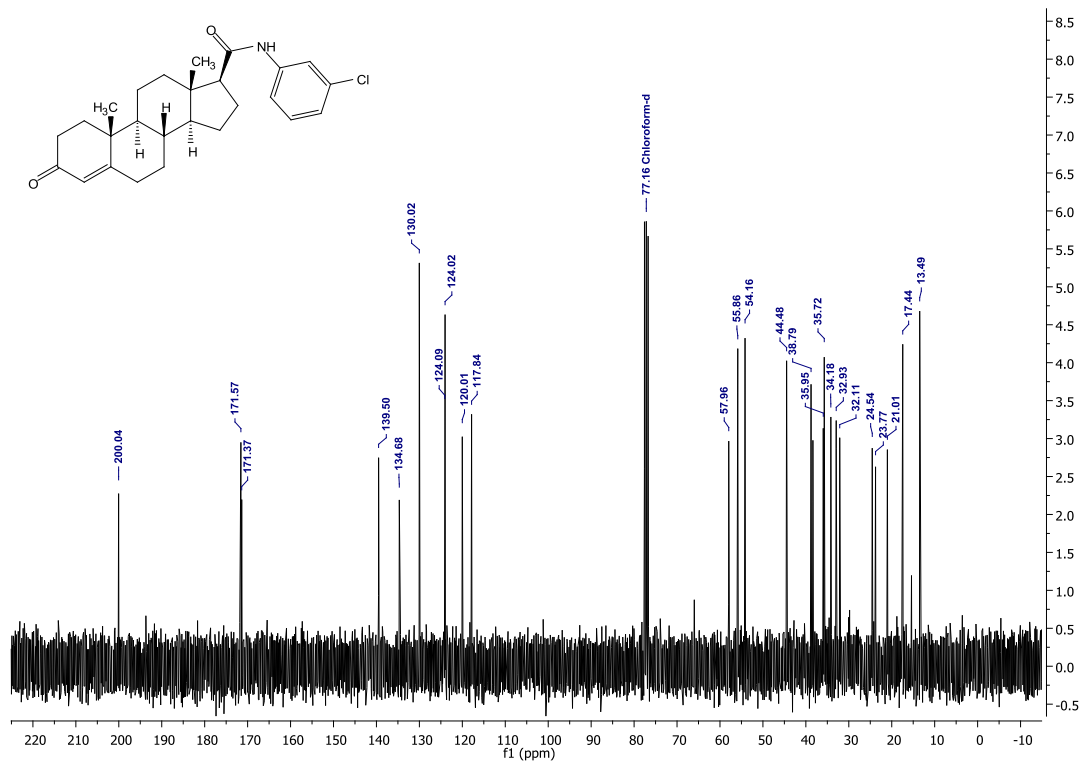


Espectro 119: IR del compuesto 6i

ANEXO 1: Espectros



Espectro 120: RMN ¹H del compuesto 6i

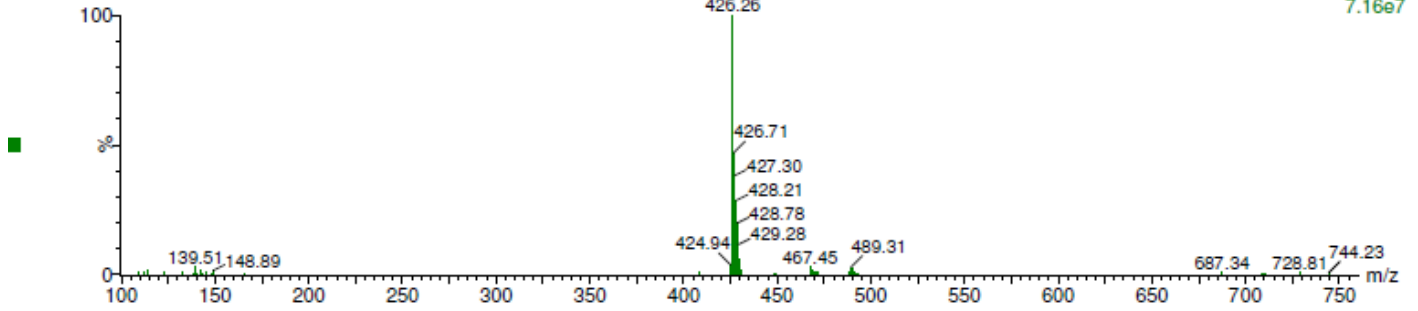


Espectro 121: RMN ¹³C del compuesto 6i

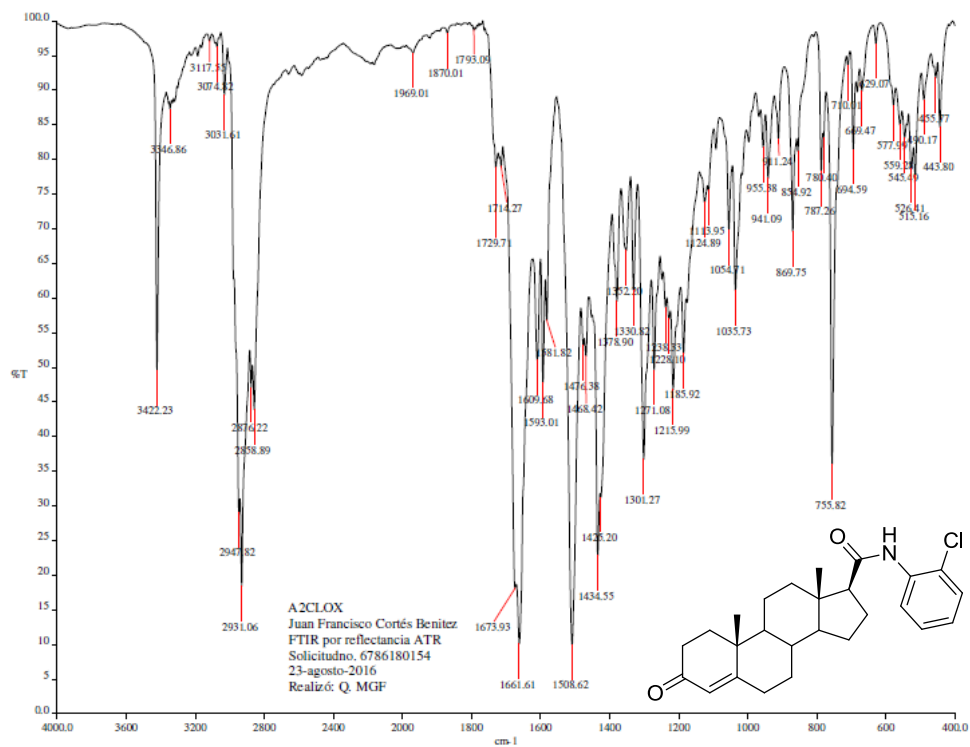
ANEXO 1: Espectros

20160927-10 1600 (7.838) Cn (Cen,4, 80.00, Ht); Sb (2,40.00); Cm (1595:1600)

1: Scan ES+
7.16e7

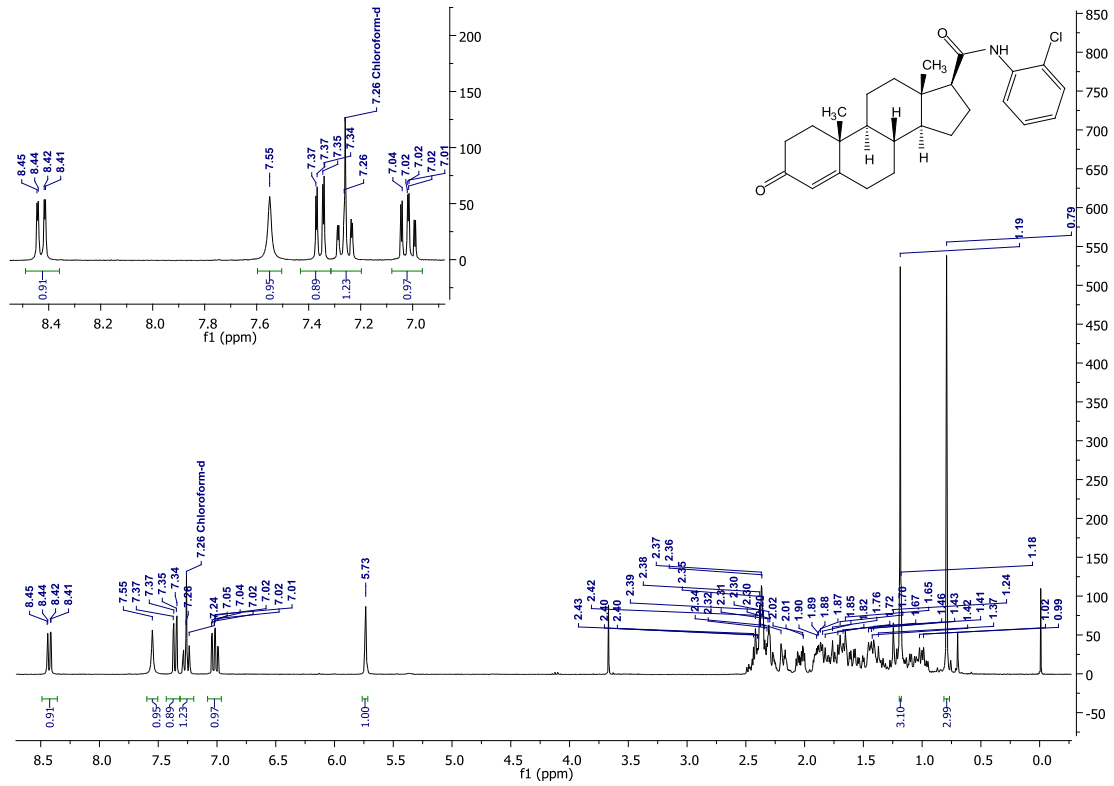


Espectro 122: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6i

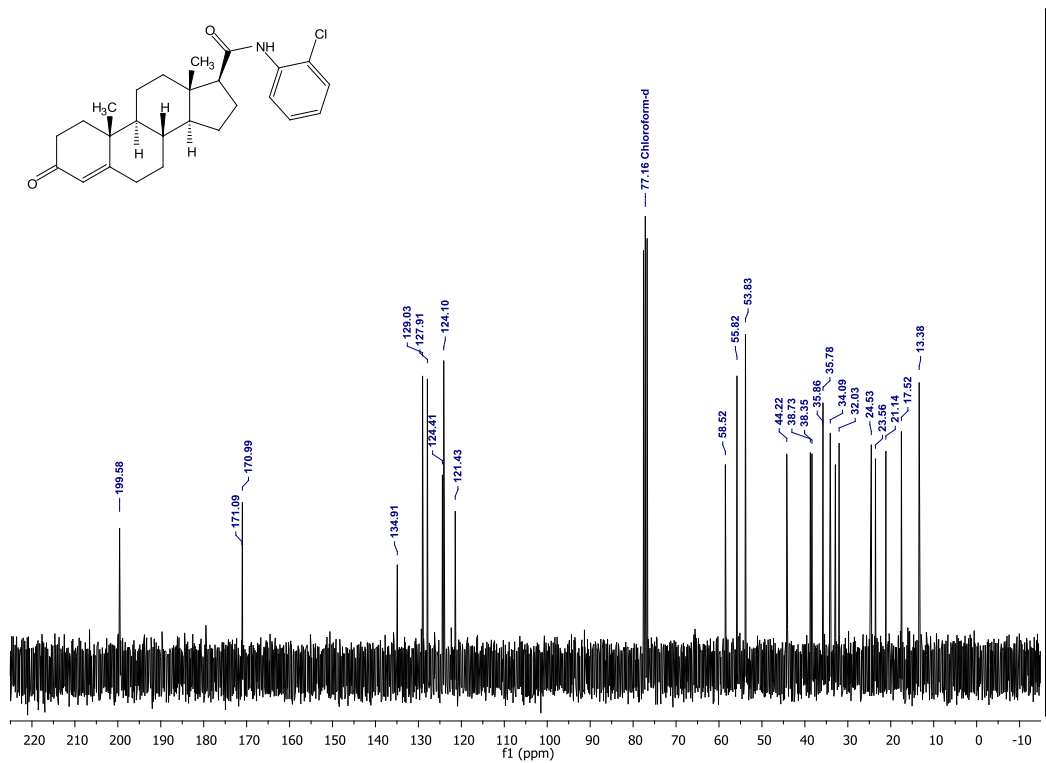


Espectro 123: IR del compuesto 6j

ANEXO 1: Espectros



Espectro 124: RMN ¹H del compuesto 6j

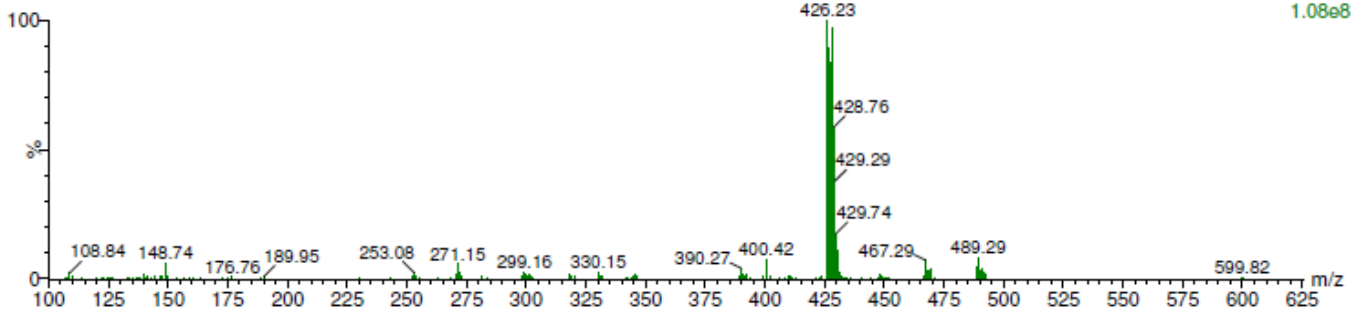


Espectro 125: RMN ¹³C del compuesto 6j

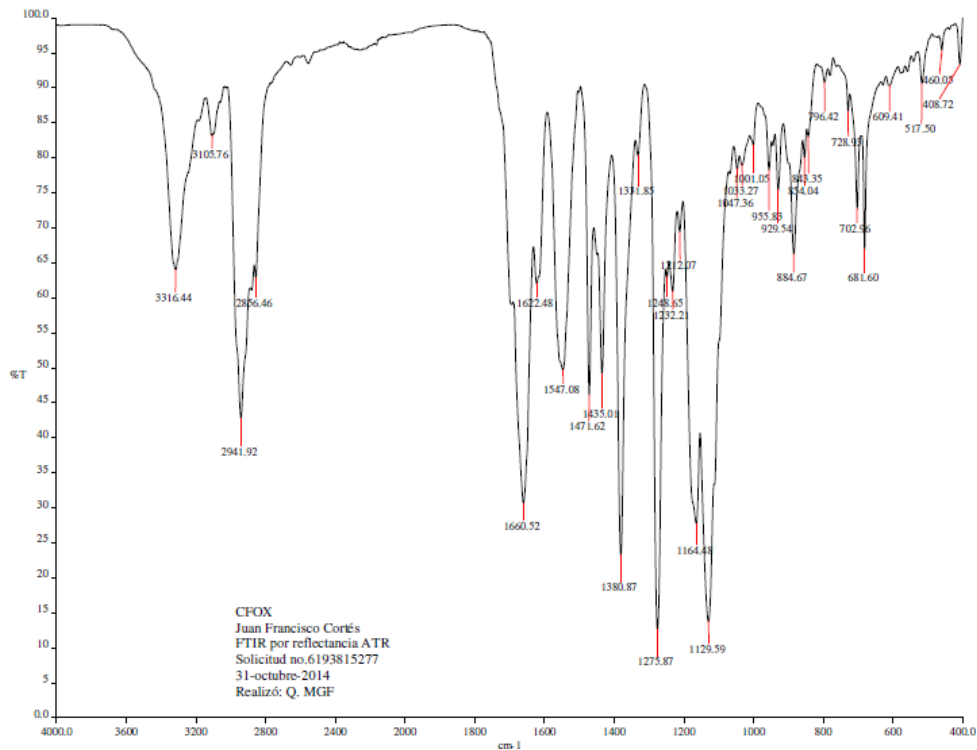
ANEXO 1: Espectros

20160927-7 1606 (7.868) Cn (Cen,4, 80.00, Ht); Sb (2,40.00); Cm (1599:1610)

1: Scan ES+
1.08e8

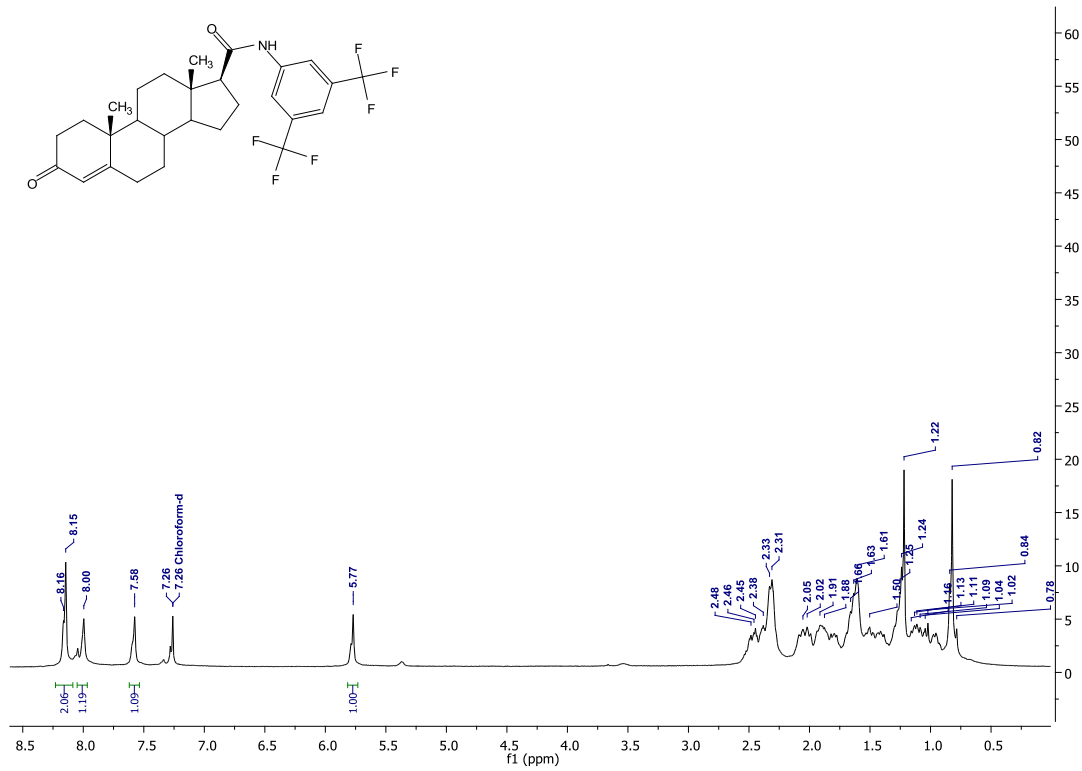


Espectro 126: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6j

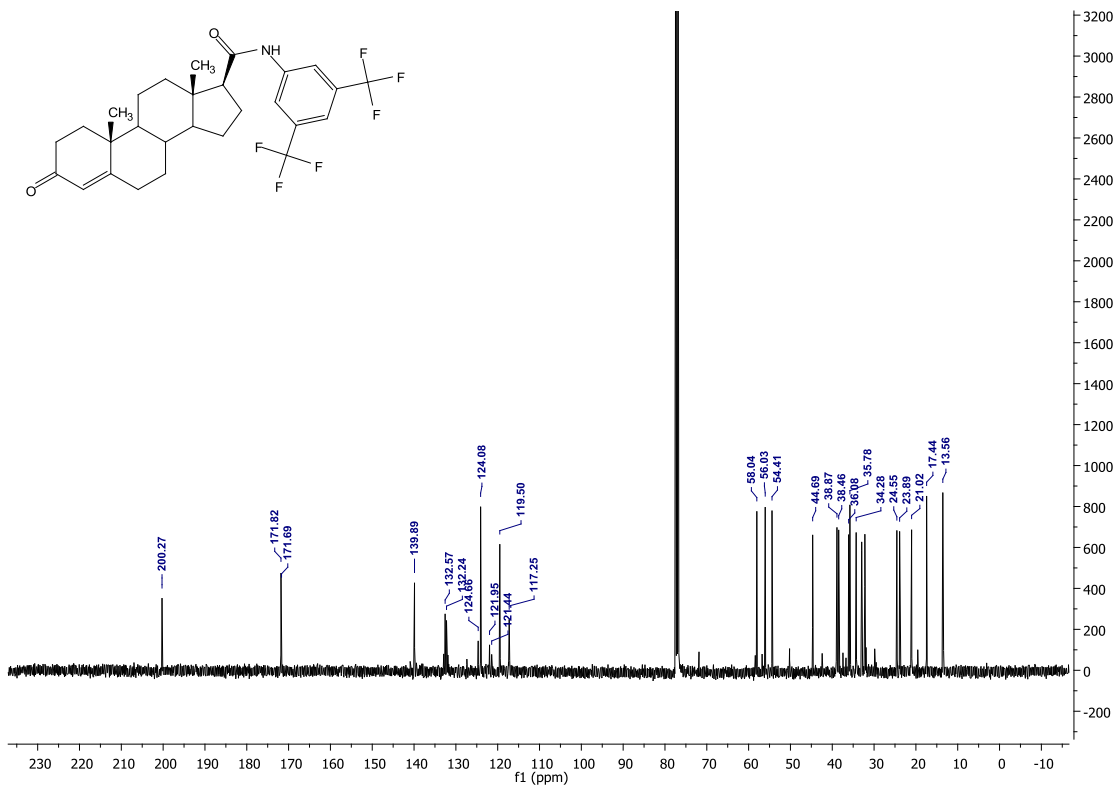


Espectro 127: IR del compuesto 6k

ANEXO 1: Espectros

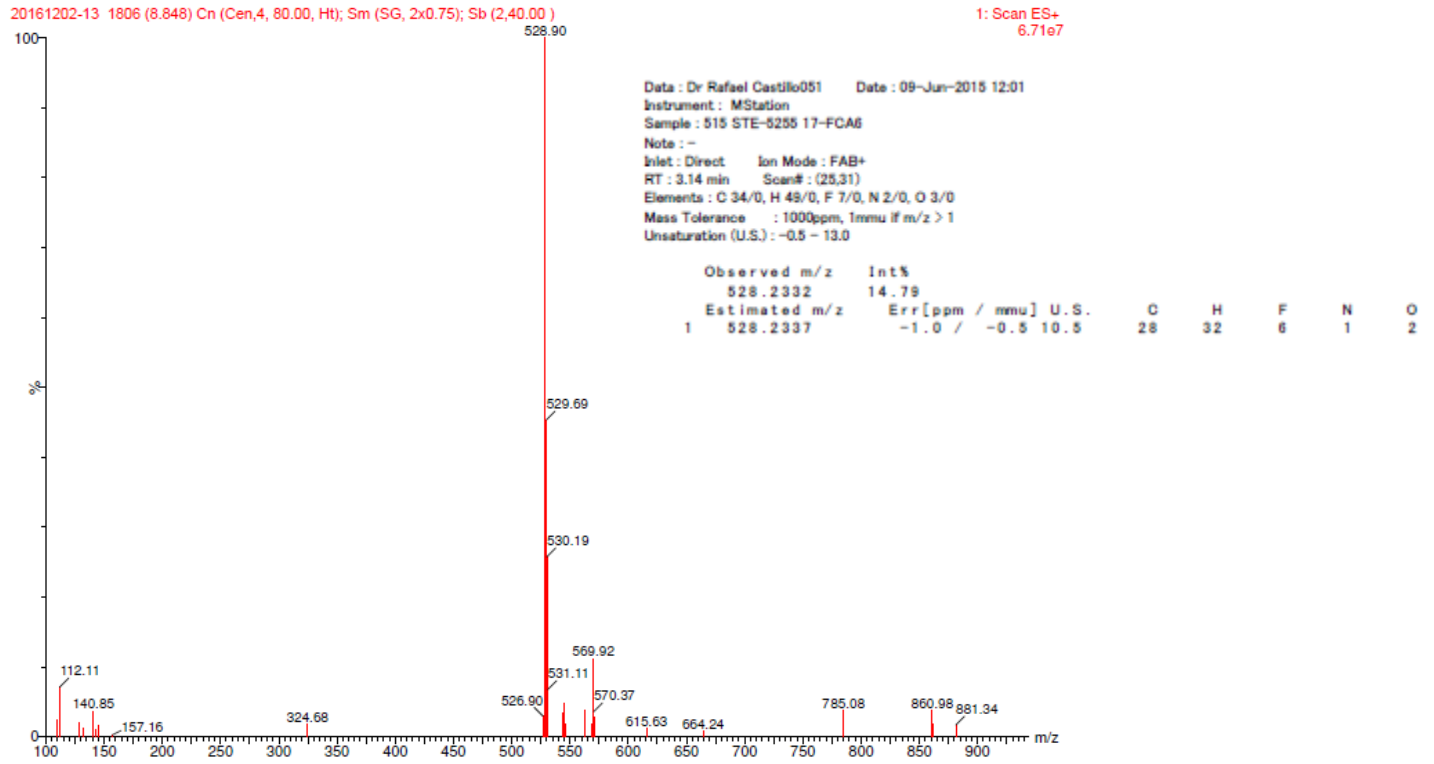


Espectro 128: RMN ¹H del compuesto 6k

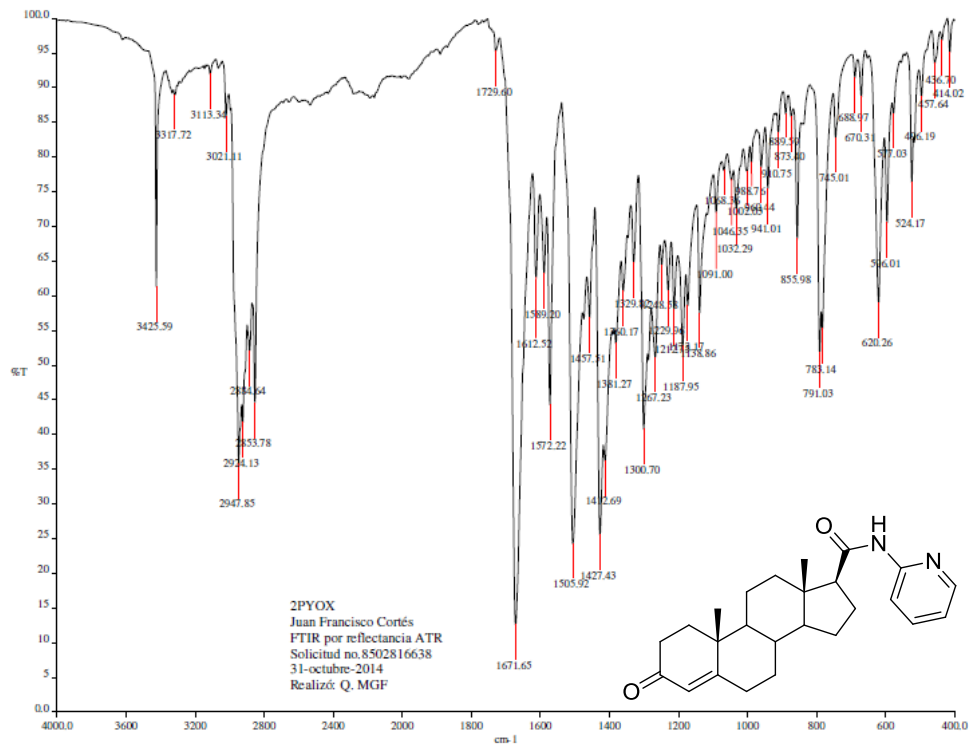


Espectro 129: RMN ¹³C del compuesto 6k

ANEXO 1: Espectros

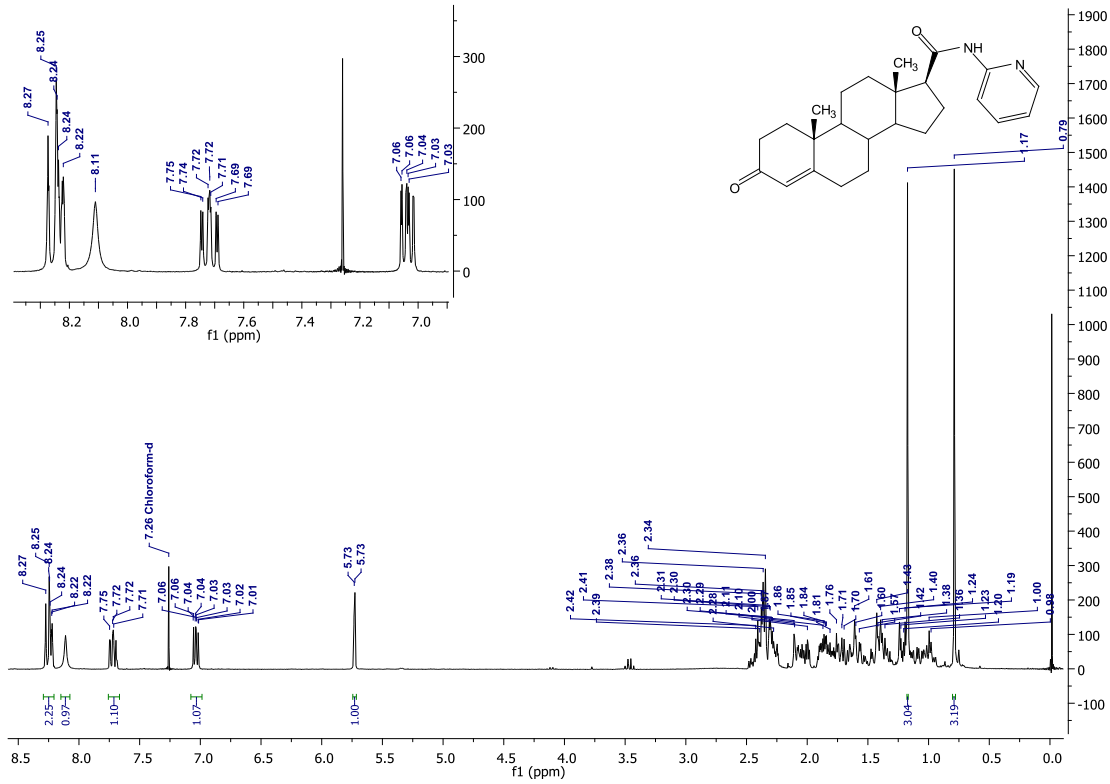


Espectro 130: espectro de masas de baja resolución (método ESI⁺-MS) y alta resolución (método FAB⁺) del compuesto 6k

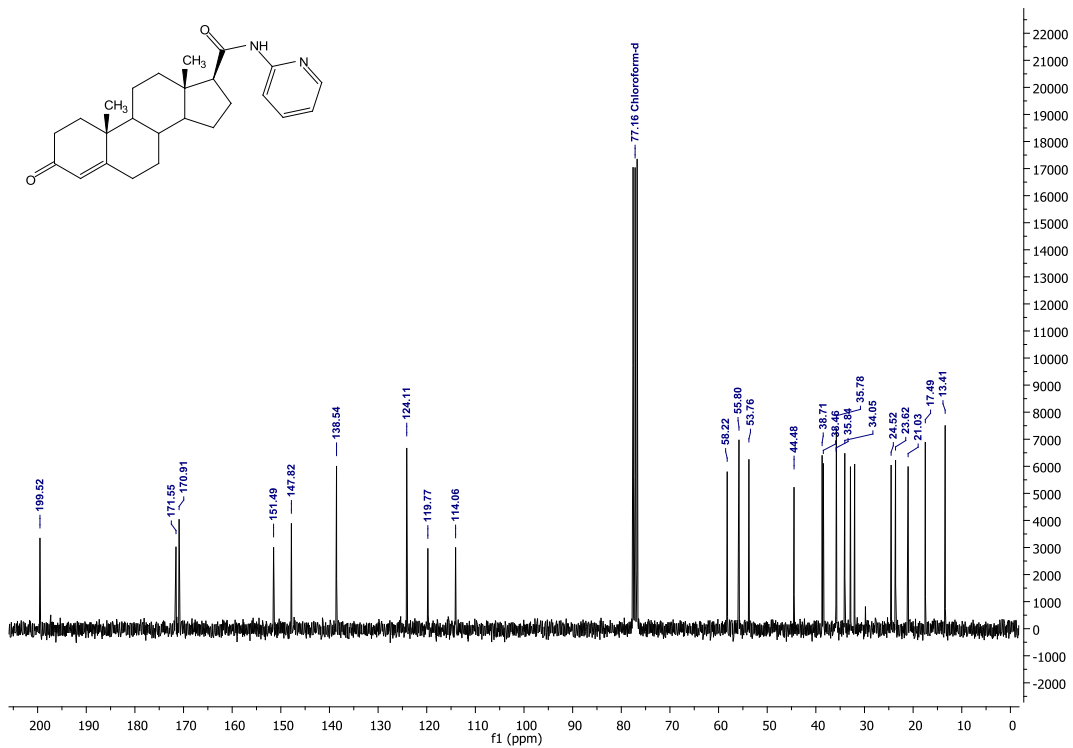


Espectro 131: IR del compuesto 6l

ANEXO 1: Espectros

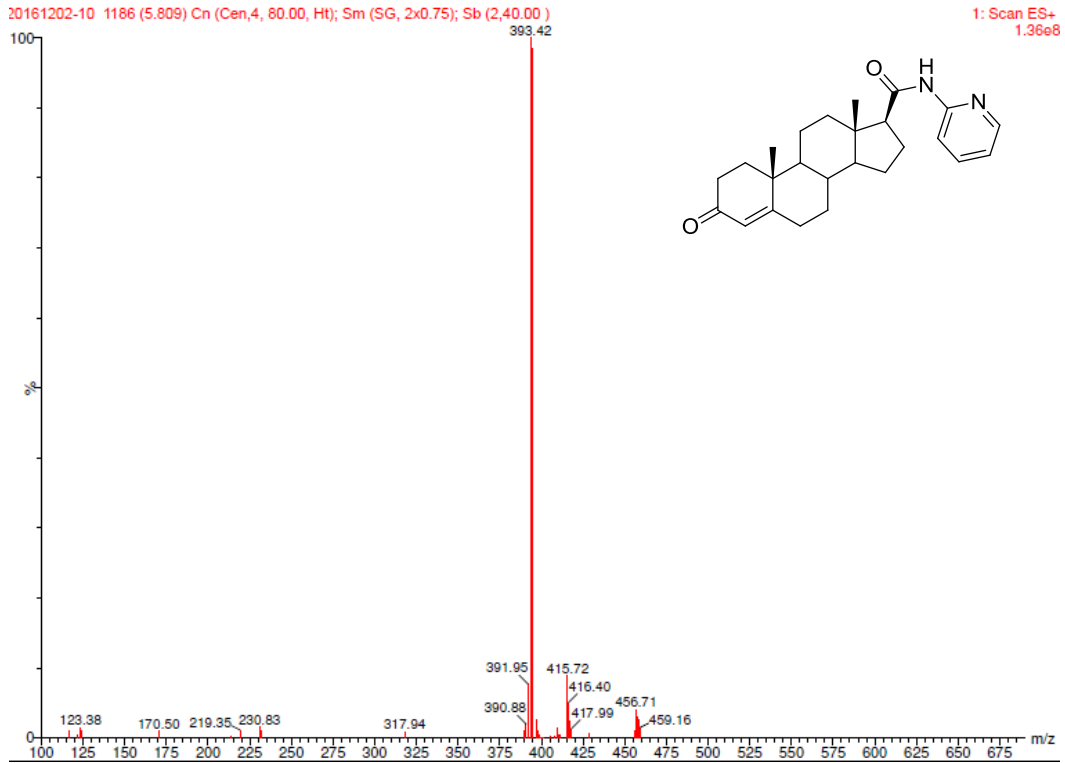


Espectro 132: RMN ¹H del compuesto 6l

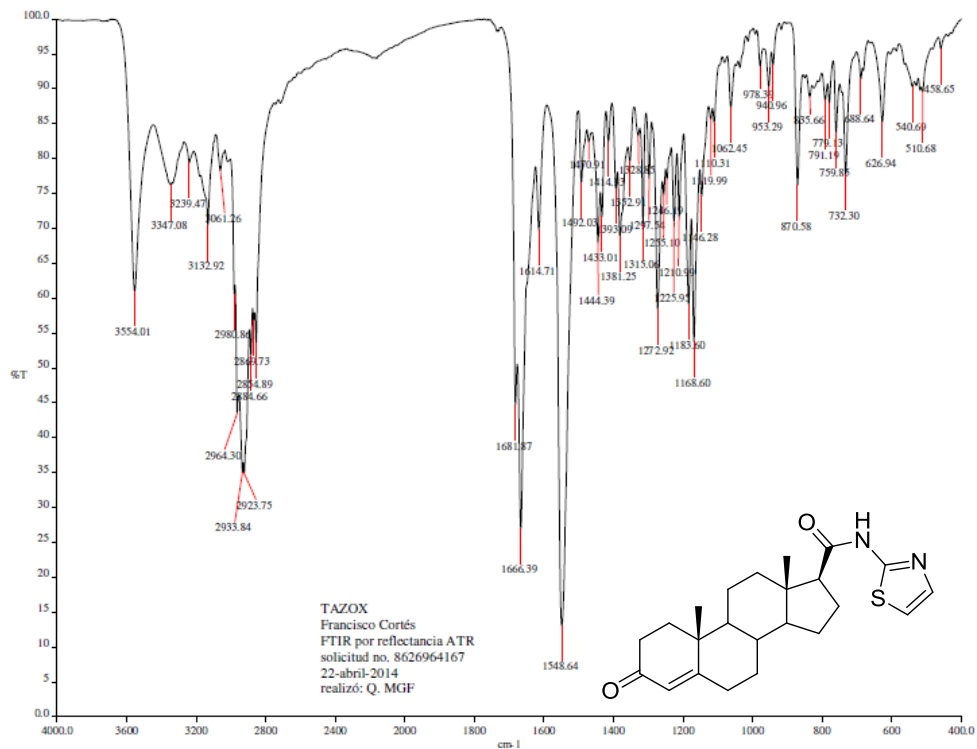


Espectro 133: RMN ¹³C del compuesto 6l

ANEXO 1: Espectros

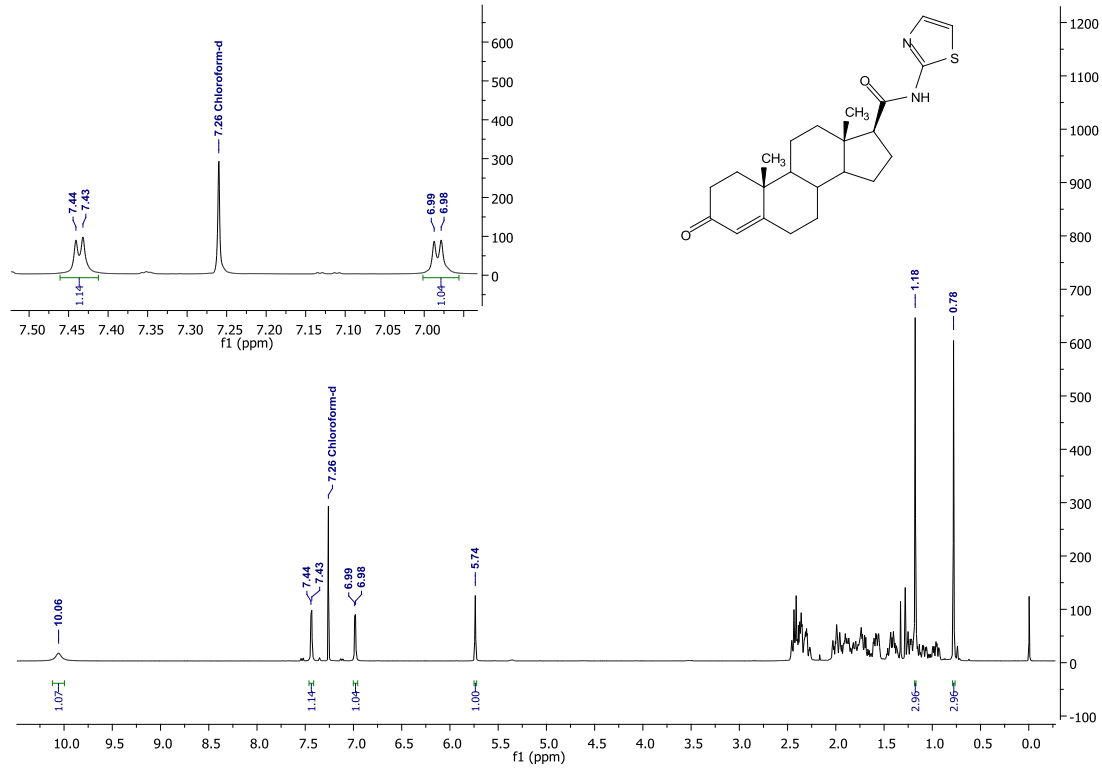


Espectro 134: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6l

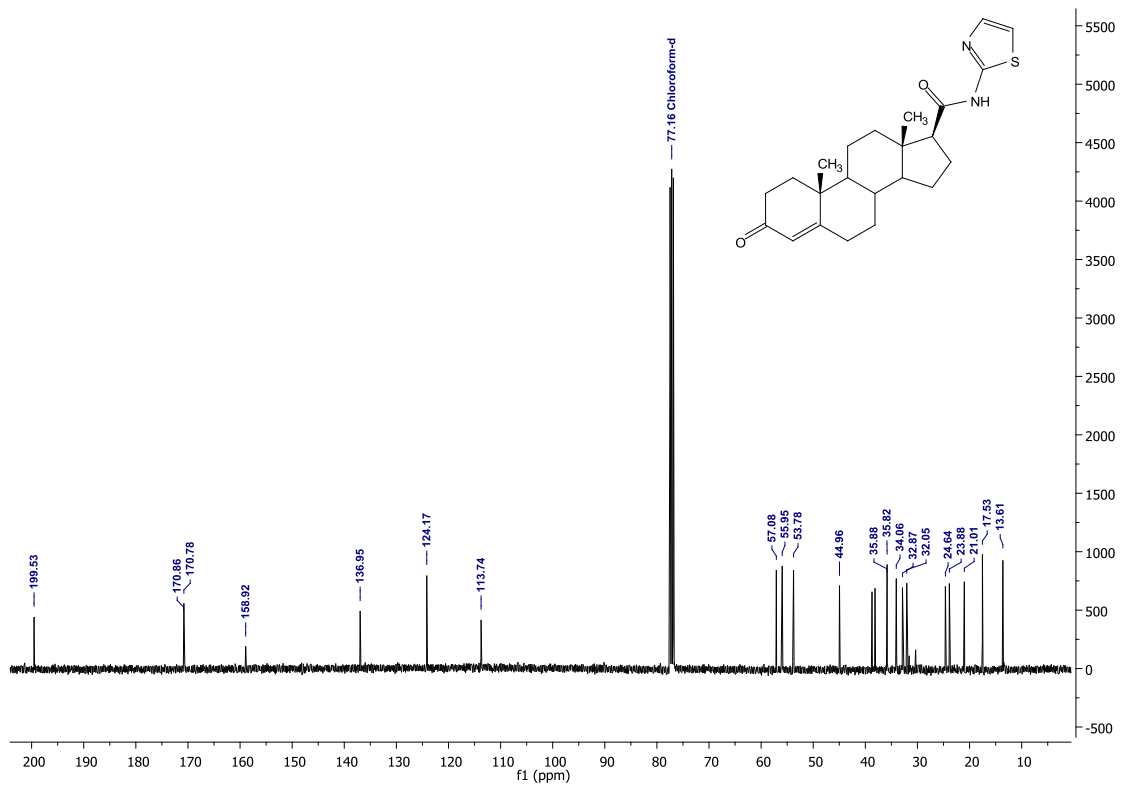


Espectro 135: IR del compuesto 6m

ANEXO 1: Espectros



Espectro 136: RMN ¹H del compuesto 6m



Espectro 137: RMN ¹³C del compuesto 6m

ANEXO 1: Espectros

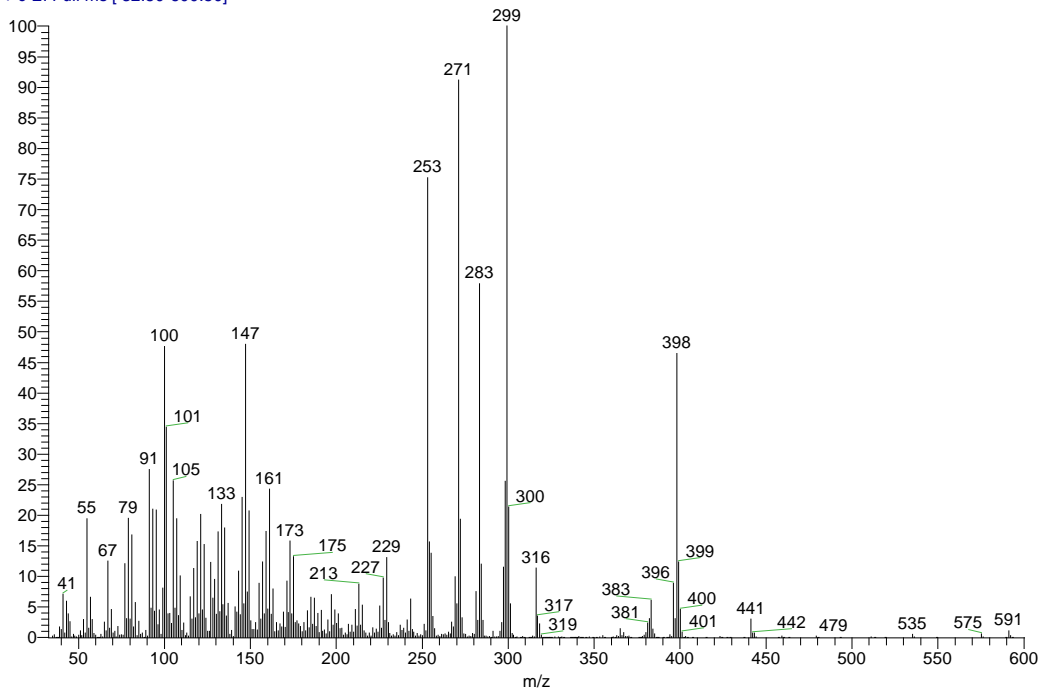
D:\Xcalibur\data\USA\IND\TAZOX__1_1

4/29/2014 1:40:42 PM

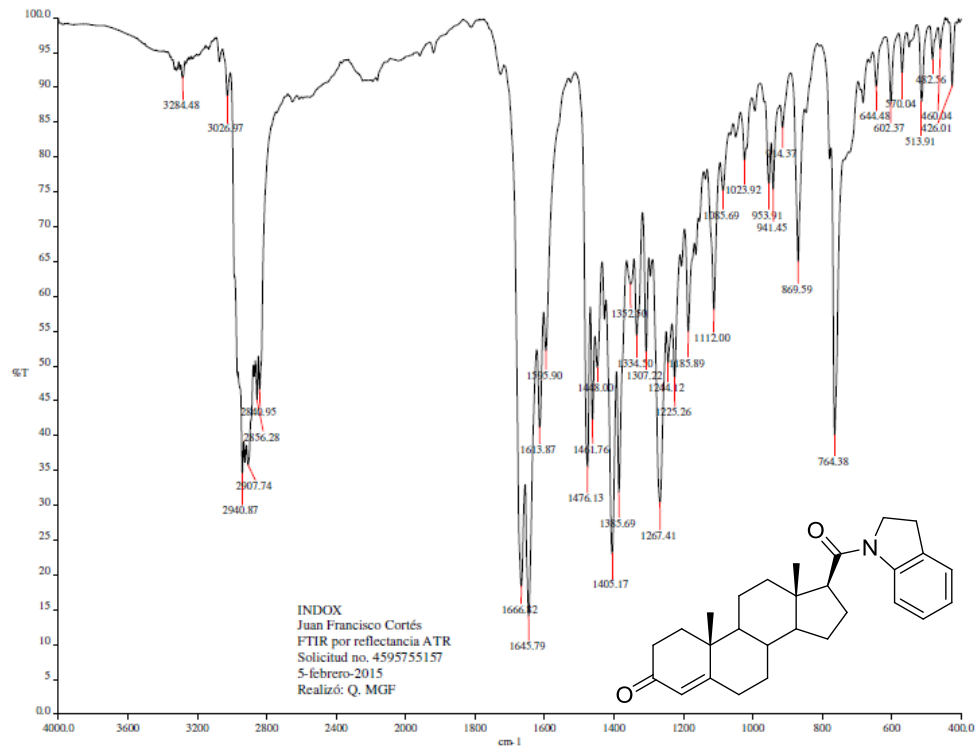
szComment

TAZOX__1_1 #9-16 RT: 0.88-1.64 AV: 8 NL: 5.38E5

T: + c EI Full ms [32.50-600.50]

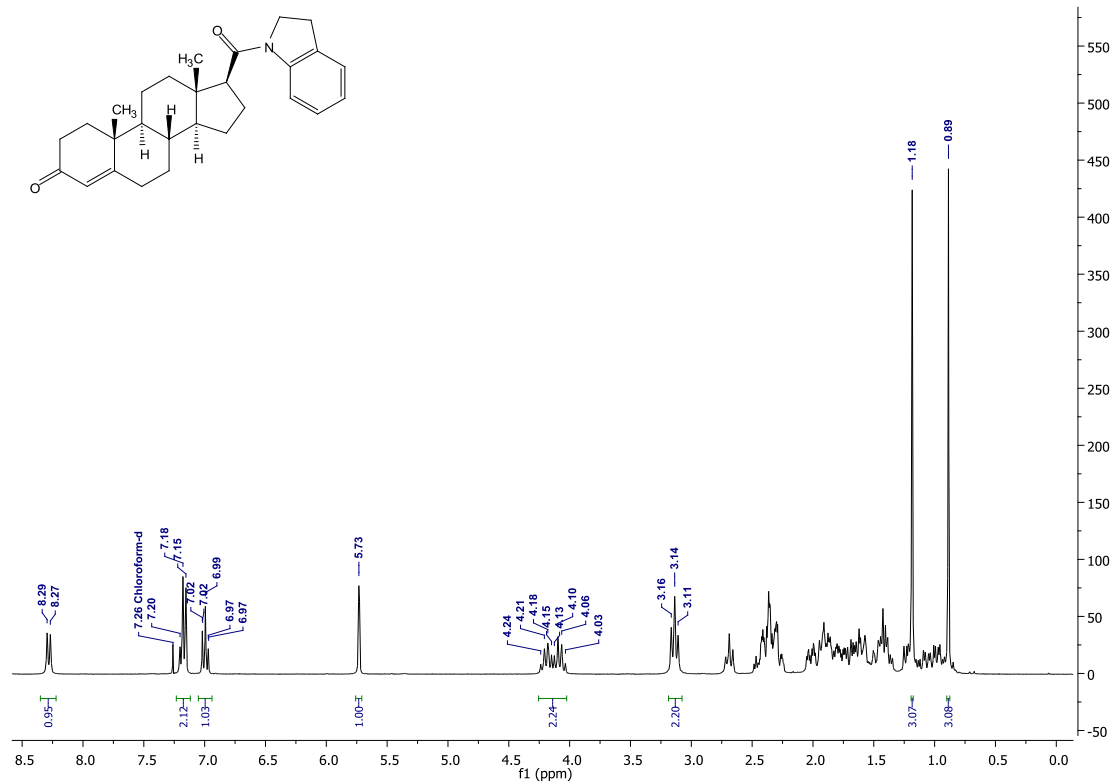


Espectro 138: Espectrometría de masas (método IE) del compuesto 6m

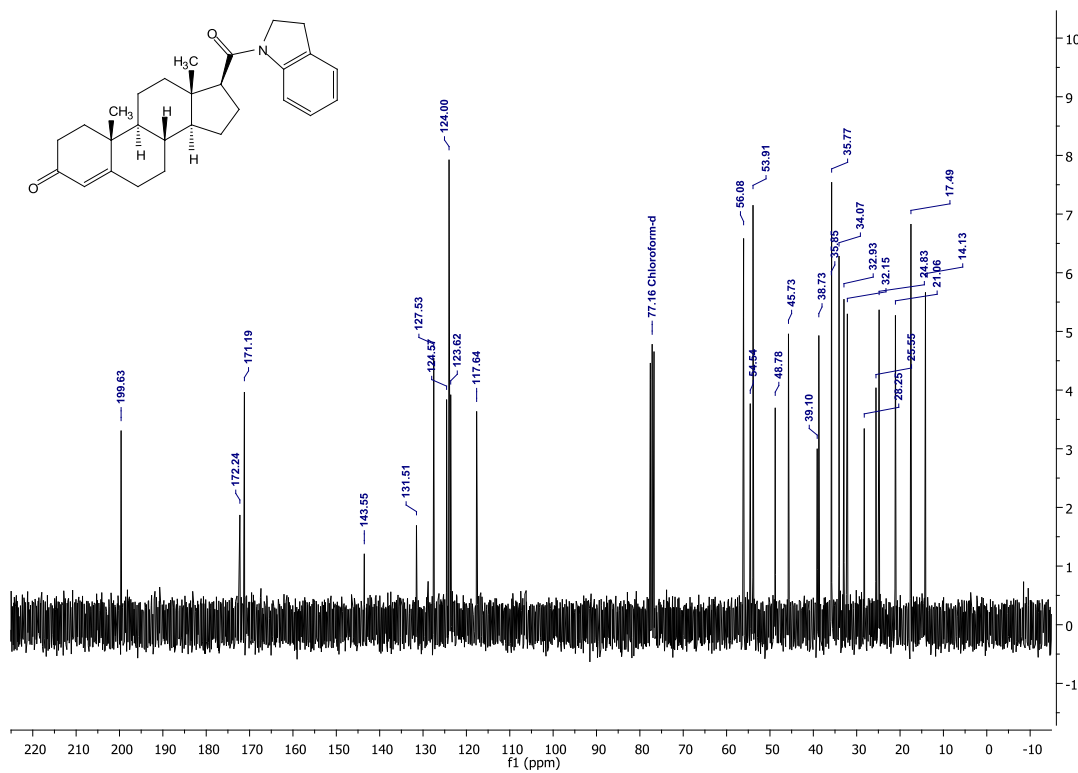


Espectro 139: IR del compuesto 6n

ANEXO 1: Espectros

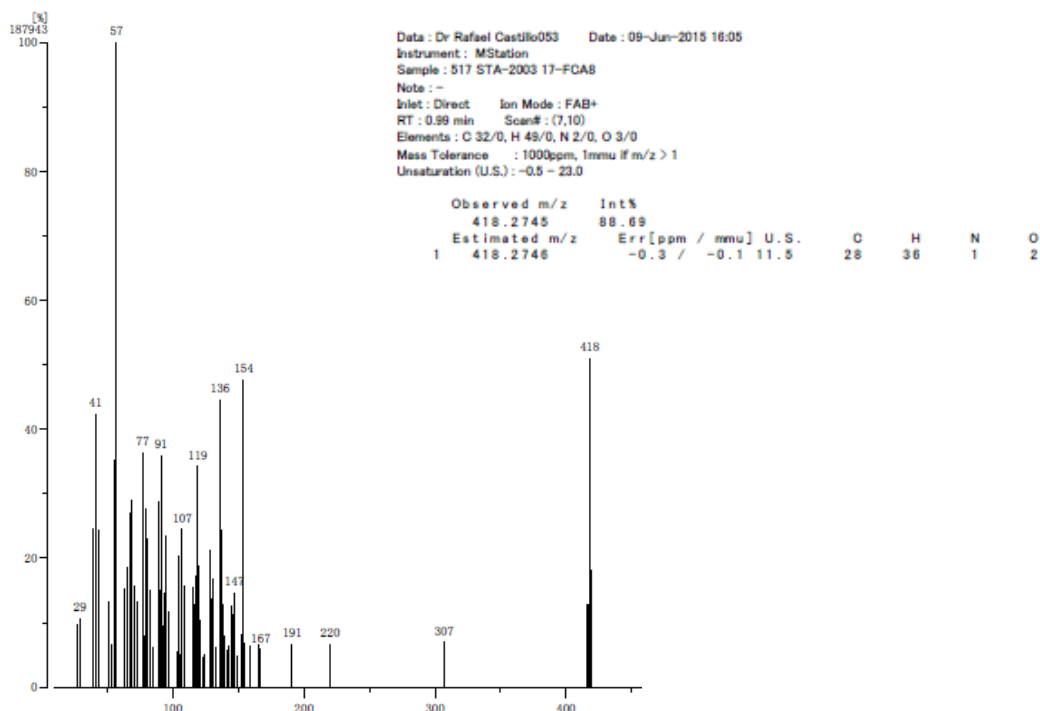


Espectro 140: RMN ¹H del compuesto 6n



Espectro 141: RMN ¹³C del compuesto 6n

ANEXO 1: Espectros



Espectro 142: Espectrometría de masas de baja y alta resolución (método FAB⁺) del compuesto 6n

Datos de la cristalografía de rayos X del compuesto 6n

Bond precision: C-C = 0.0041 Å Wavelength=1.54184
 Cell: a=6.8302(2) b=16.8227(5) c=9.8426(4)
 alpha=90 beta=94.710(3) gamma=90
 Temperature: 130 K

	Calculated	Reported
Volume	1127.12(7)	1127.12(7)
Space group	P 21	P 21
Hall group	P 2yb	P 2yb
Moiety formula	C28 H35 N O2	?
Sum formula	C28 H35 N O2	C28 H35 N O2
Mr	417.57	417.57
Dx, g cm ⁻³	1.230	1.230
Z	2	2
Mu (mm ⁻¹)	0.589	0.589
F000	452.0	452.0
F000'	453.21	
h,k,lmax	8,20,12	8,20,11
Nref	4543 [2354]	2930
Tmin,Tmax	0.741,0.939	0.761,0.939
Tmin'	0.672	

Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.761 Tmax=0.939 AbsCorr = ANALYTICAL
 Data completeness= 1.24/0.64 Theta(max)= 73.400
 R(reflections)= 0.0390(2732) wR2(reflections)= 0.1083(2930)
 S = 1.076 Npar= 282

ANEXO 1: Espectros

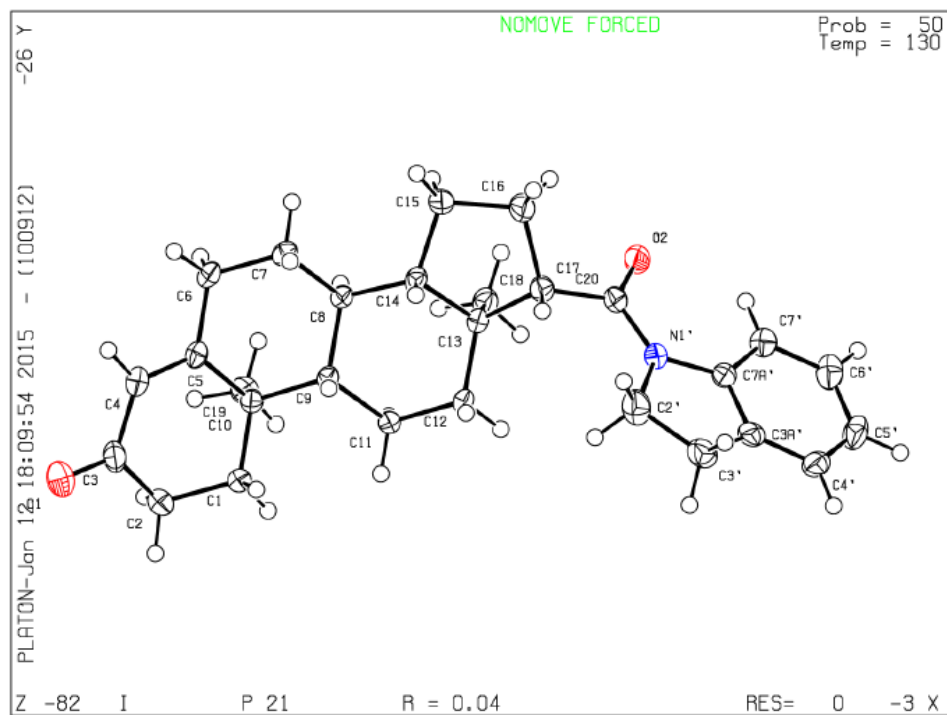
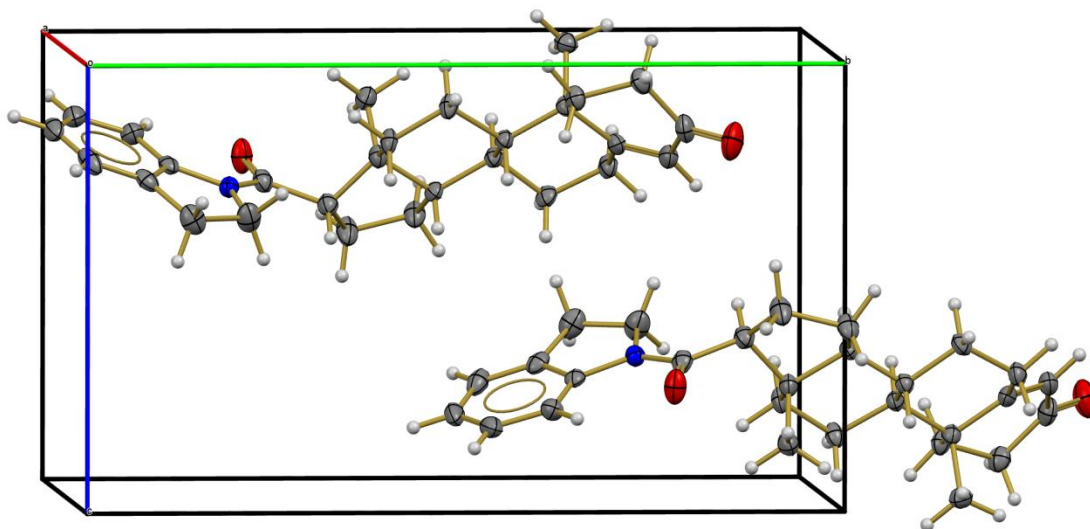
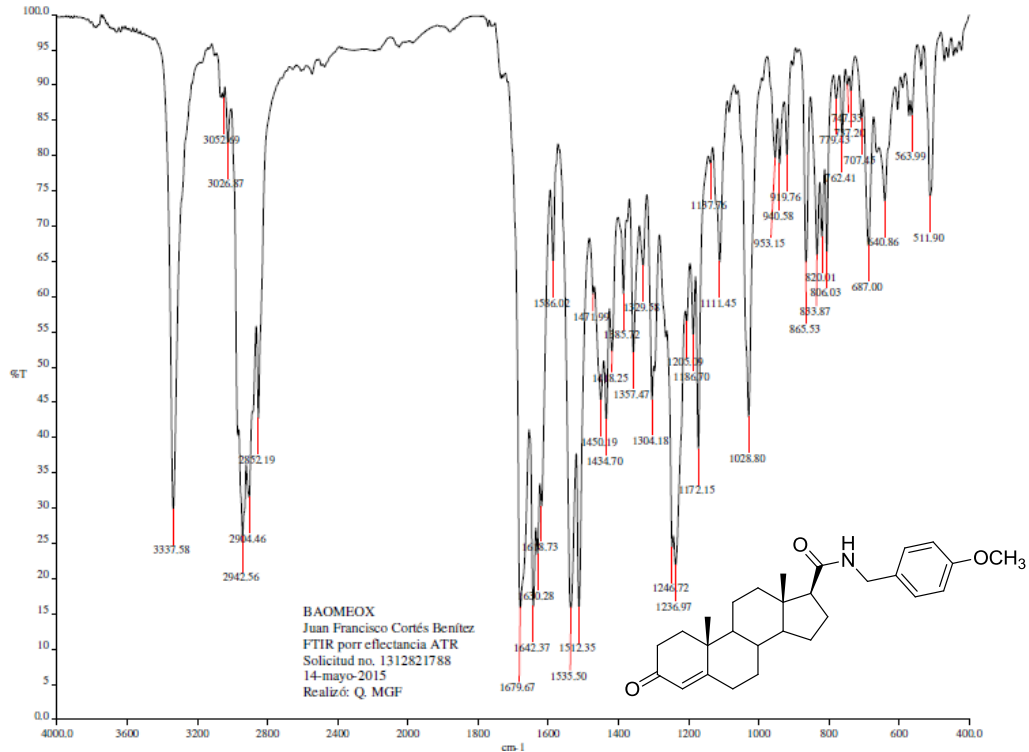


Diagrama ORTEP del compuesto 6n

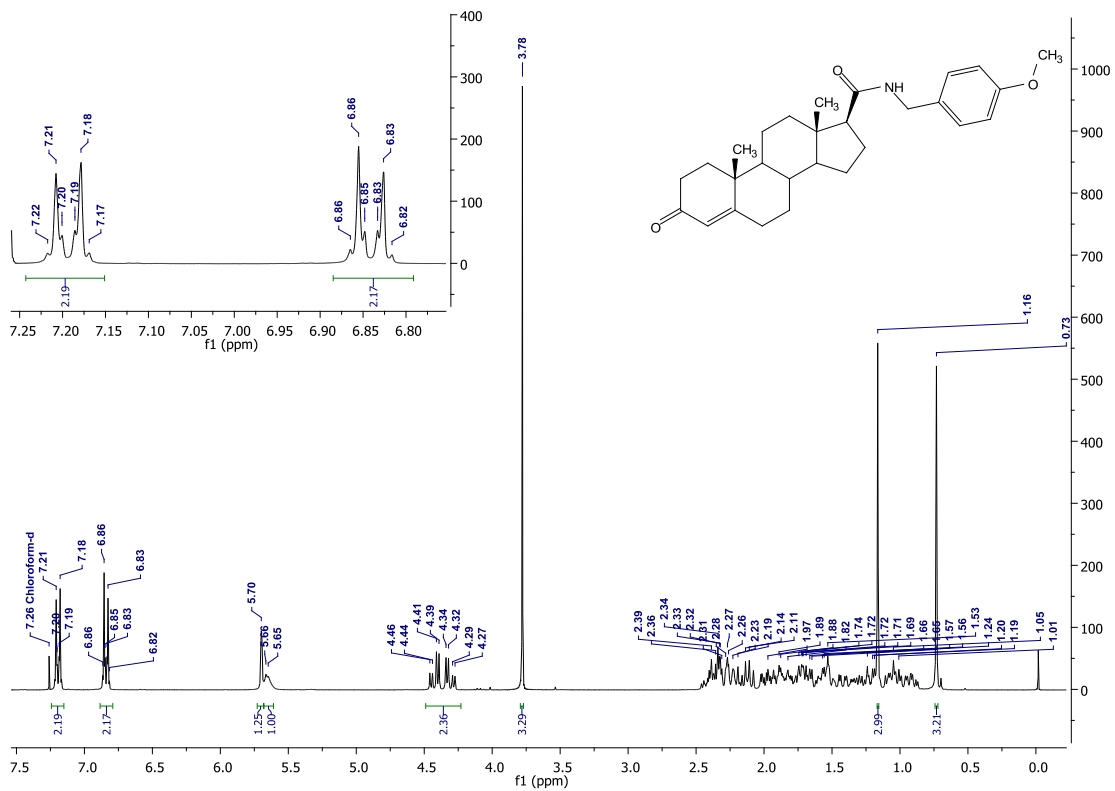


Celda cristalina del compuesto 6n

ANEXO 1: Espectros

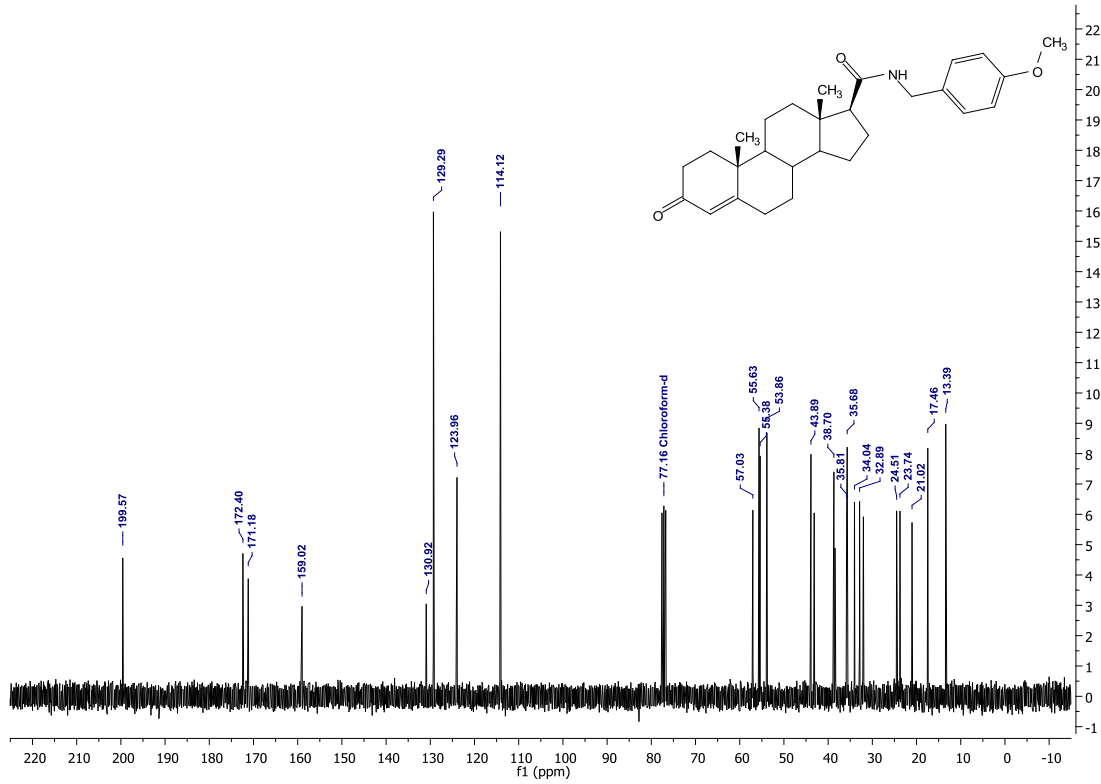


Espectro 143: IR del compuesto 60

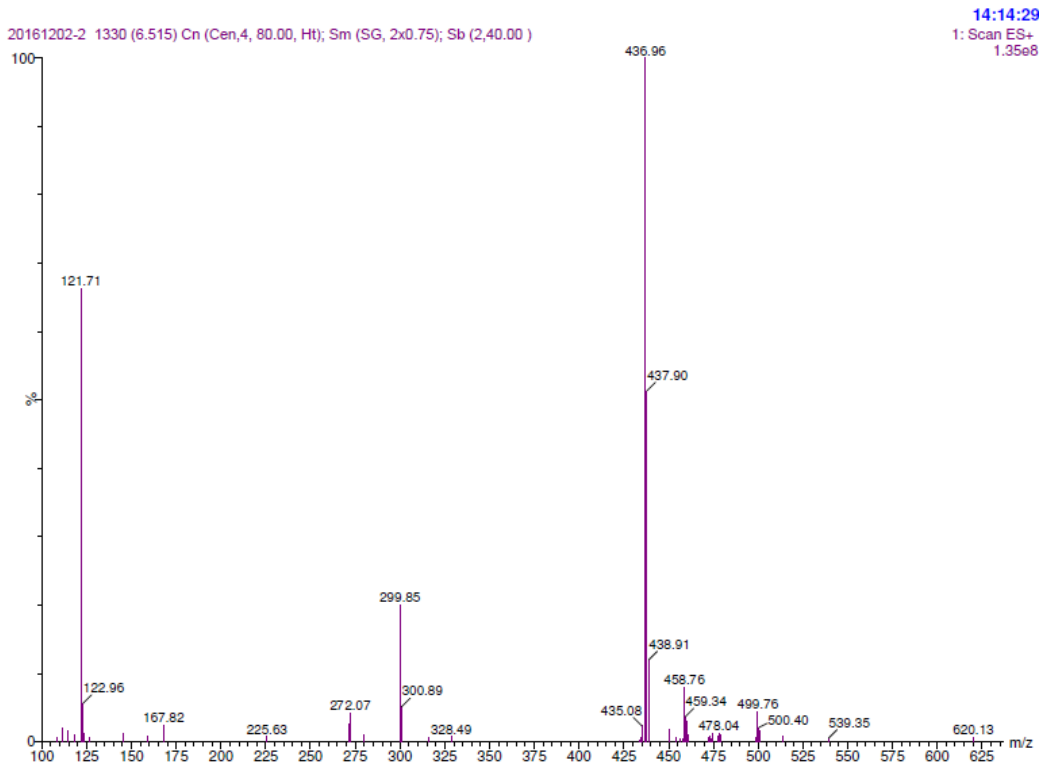


Espectro 144: RMN ¹H del compuesto 60

ANEXO 1: Espectros

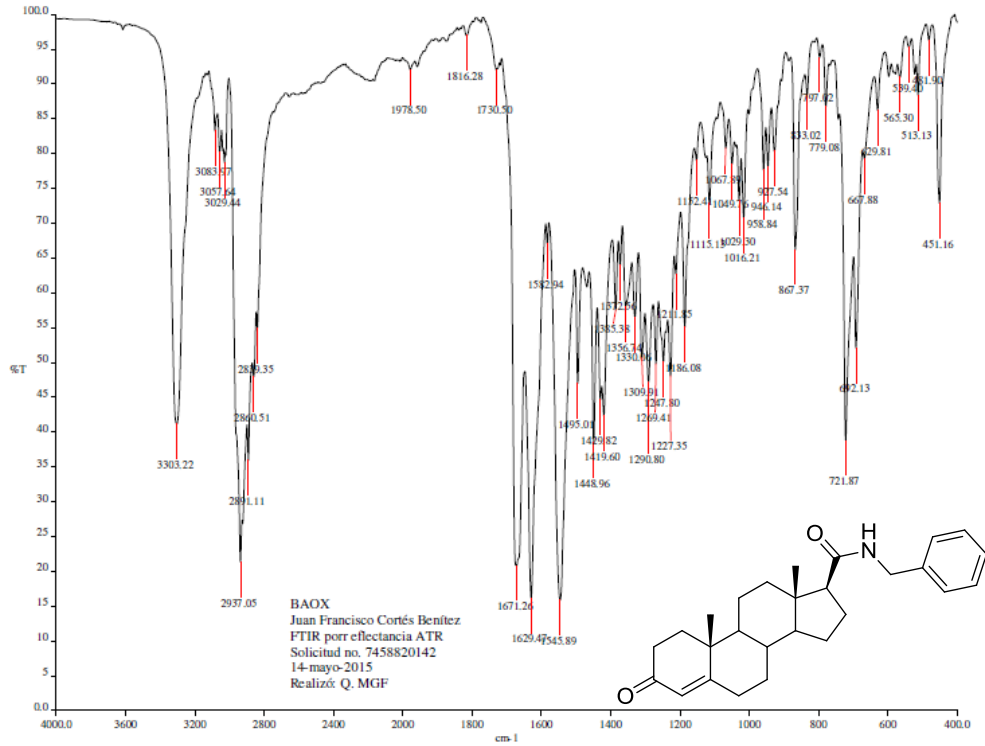


Espectro 145: RMN ^{13}C del compuesto 60

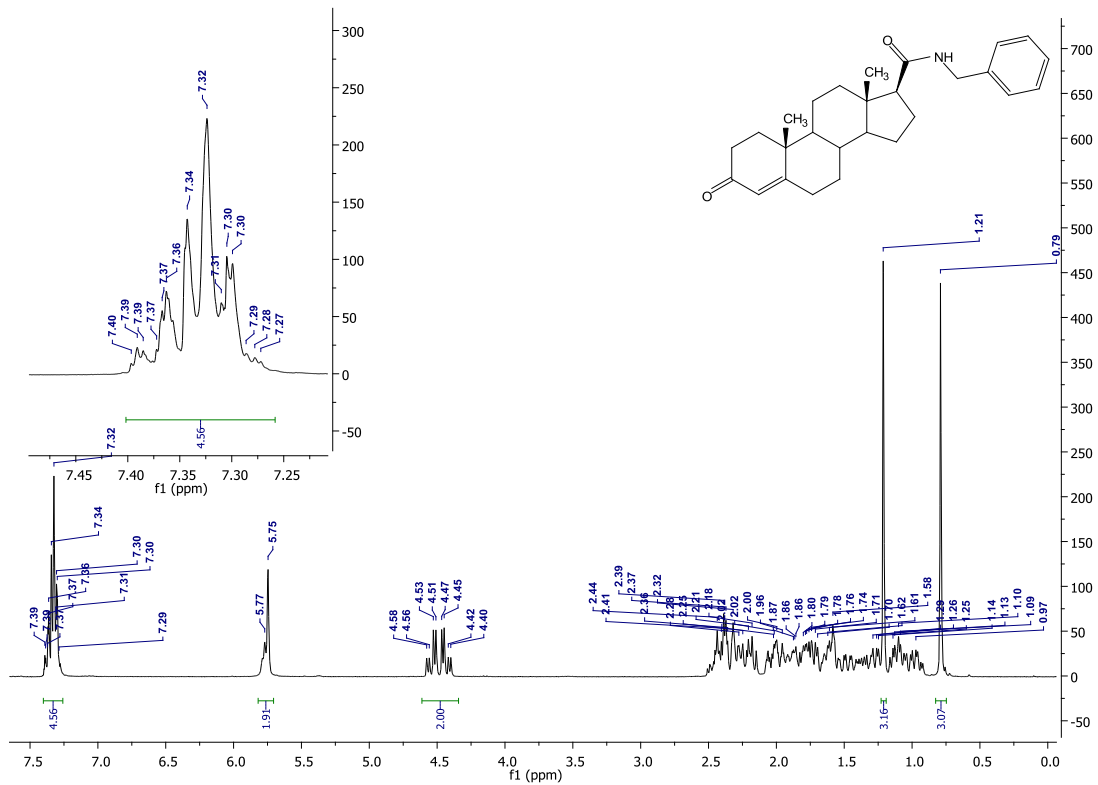


Espectro 146: espectro de masas (método ESI $^{+}$ -MS) del compuesto 60

ANEXO 1: Espectros

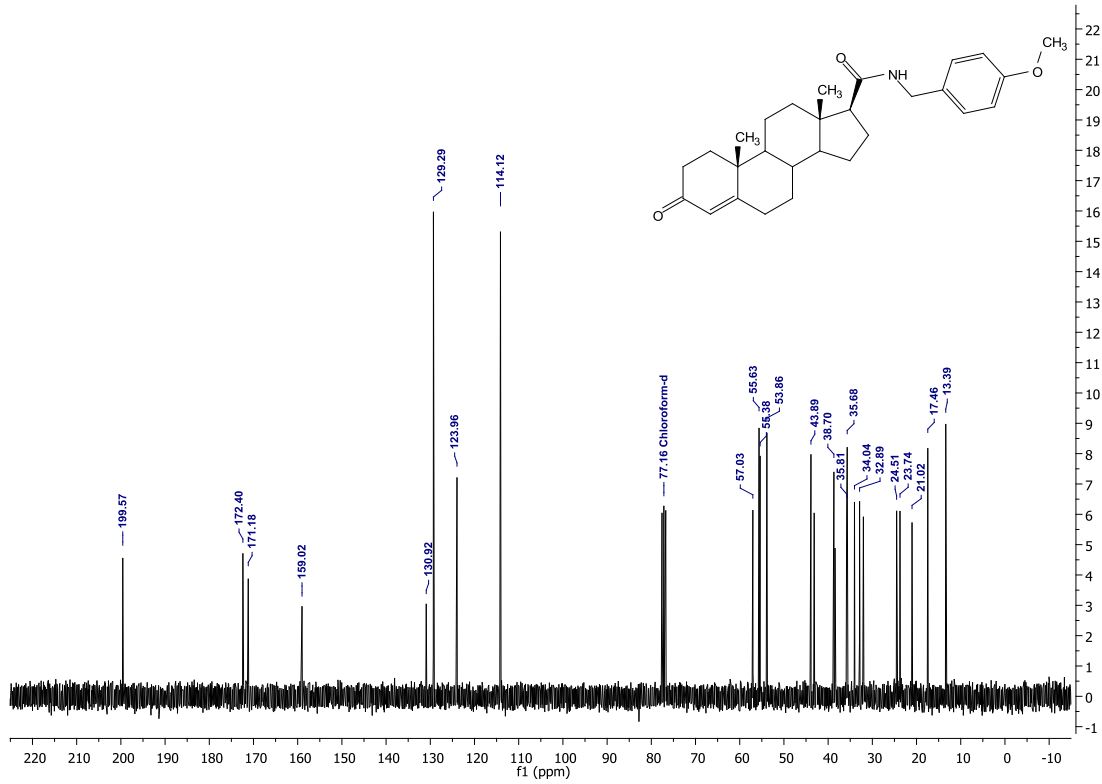


Espectro 147: IR del compuesto 6p

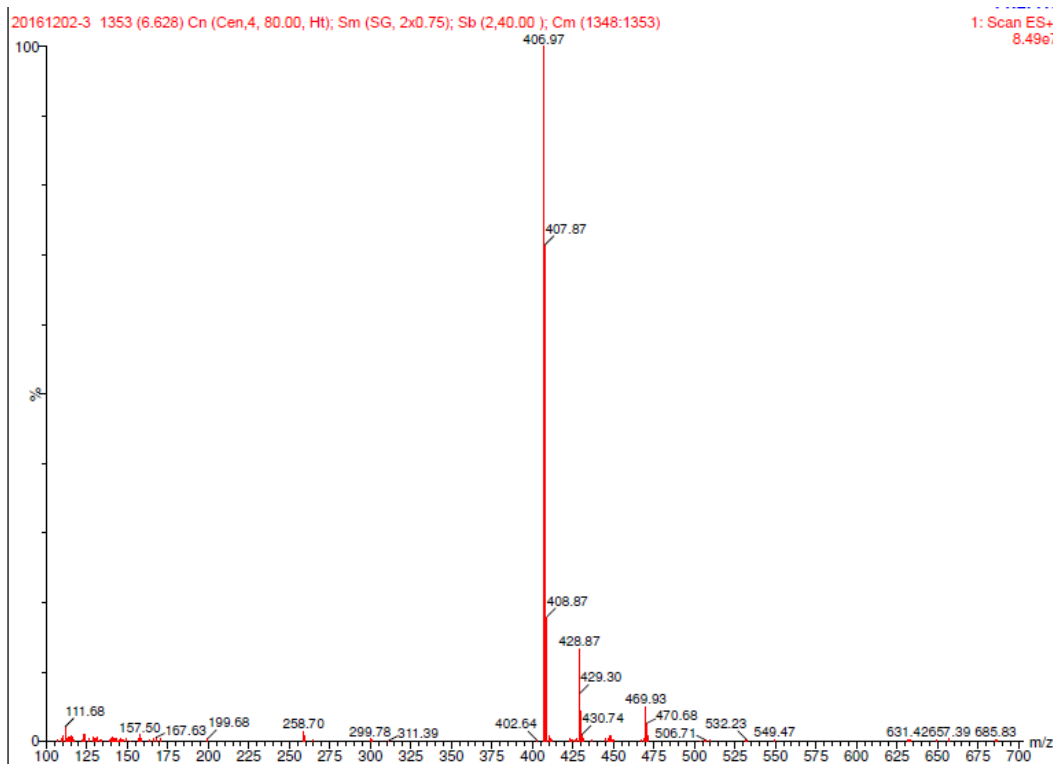


Espectro 148: RMN ¹³C del compuesto 6p

ANEXO 1: Espectros

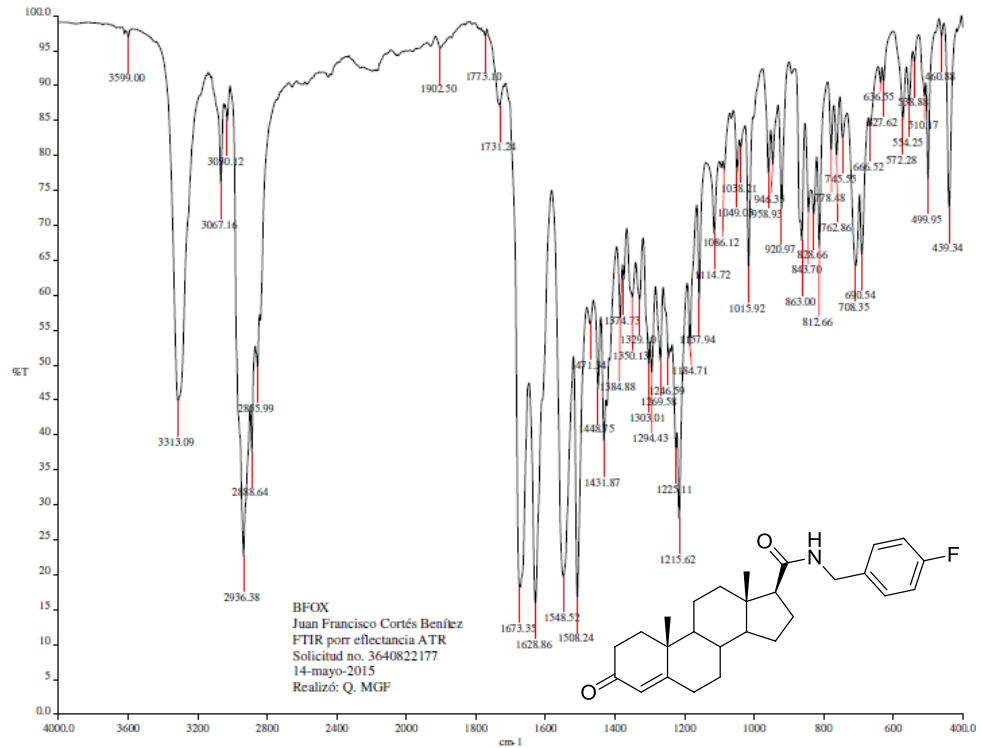


Espectro 149: RMN ^{13}C del compuesto 6p

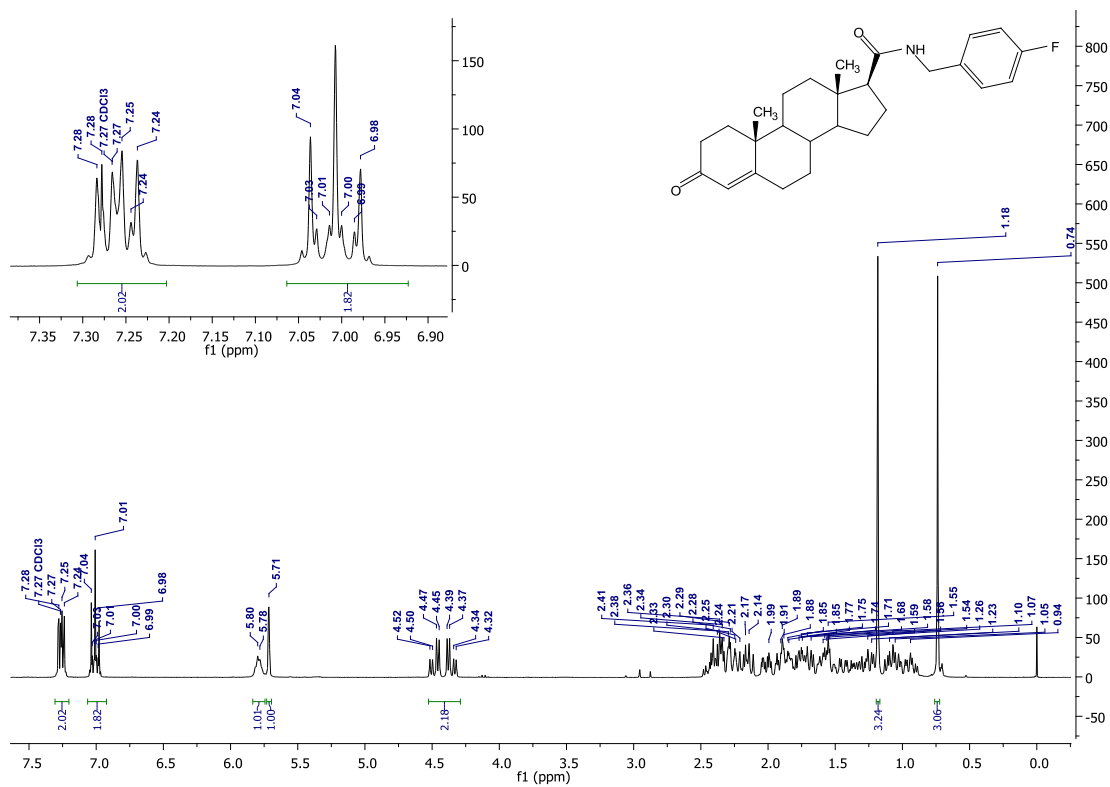


Espectro 150: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6p

ANEXO 1: Espectros

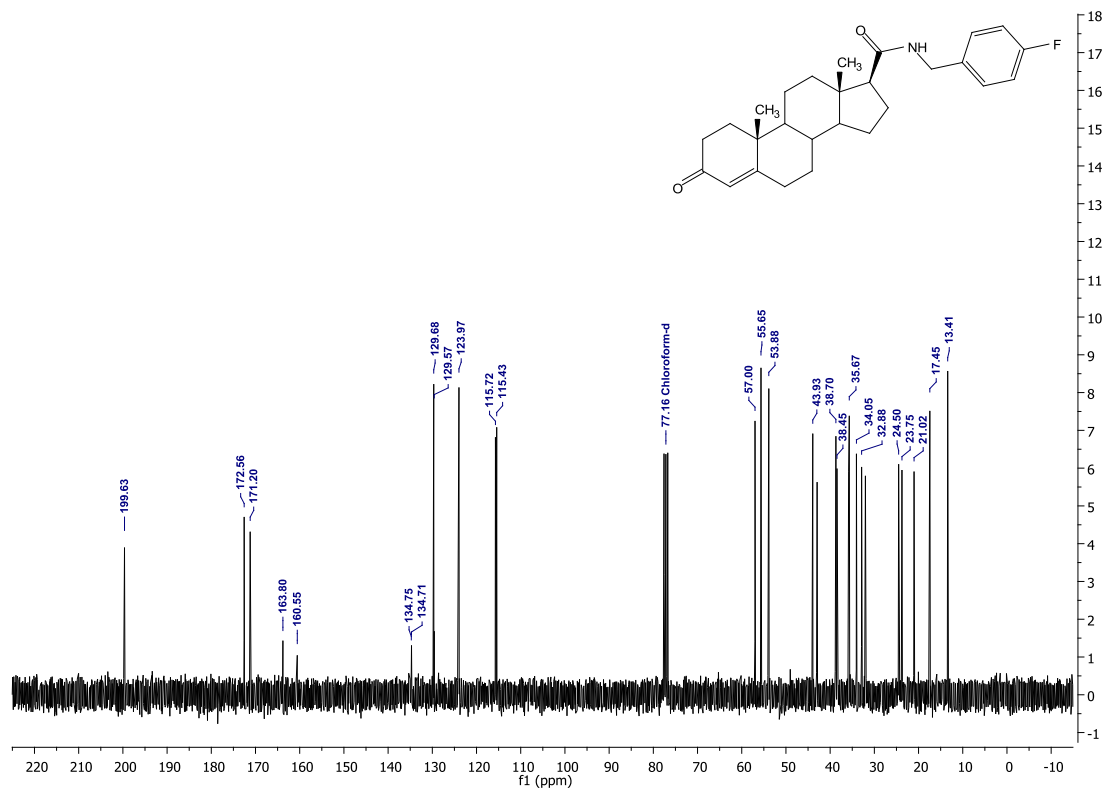


Espectro 151: IR del compuesto 6q

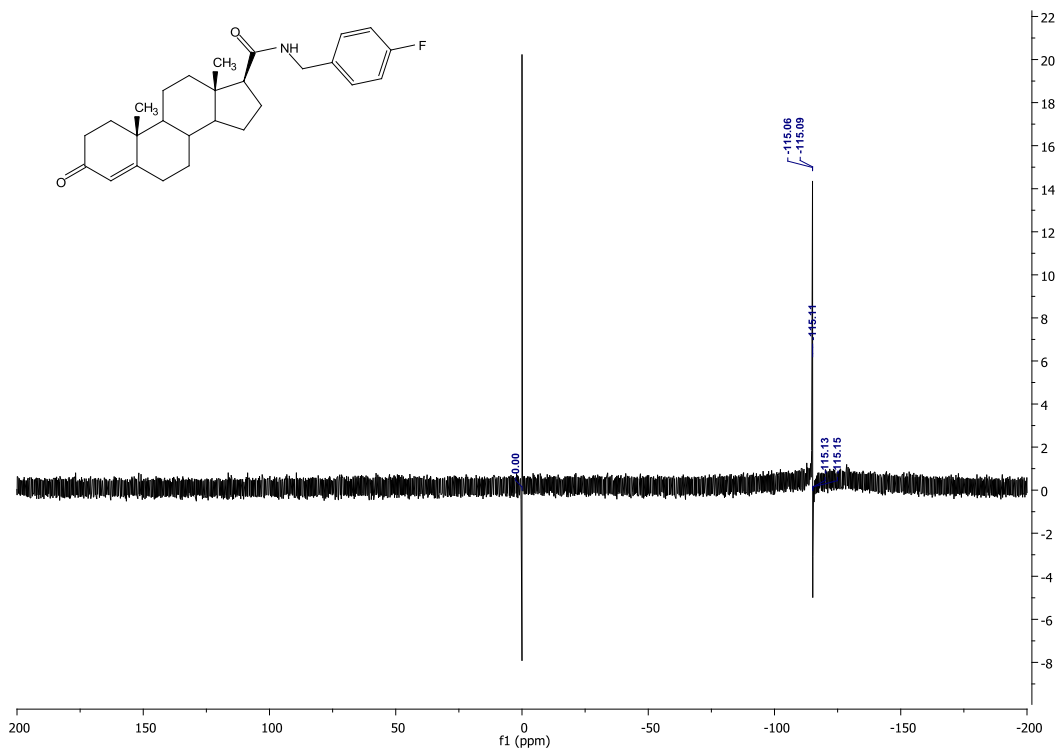


Espectro 152: RMN ¹H del compuesto 6q

ANEXO 1: Espectros

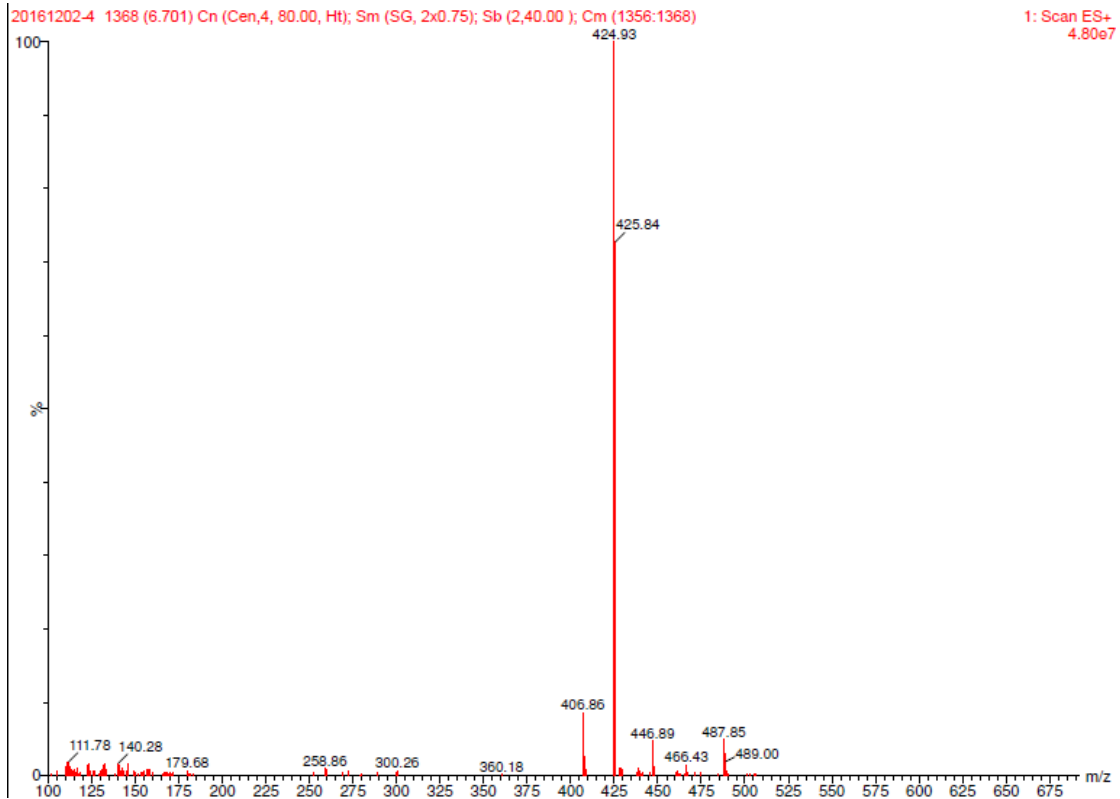


Espectro 153: RMN ¹³C del compuesto 6q

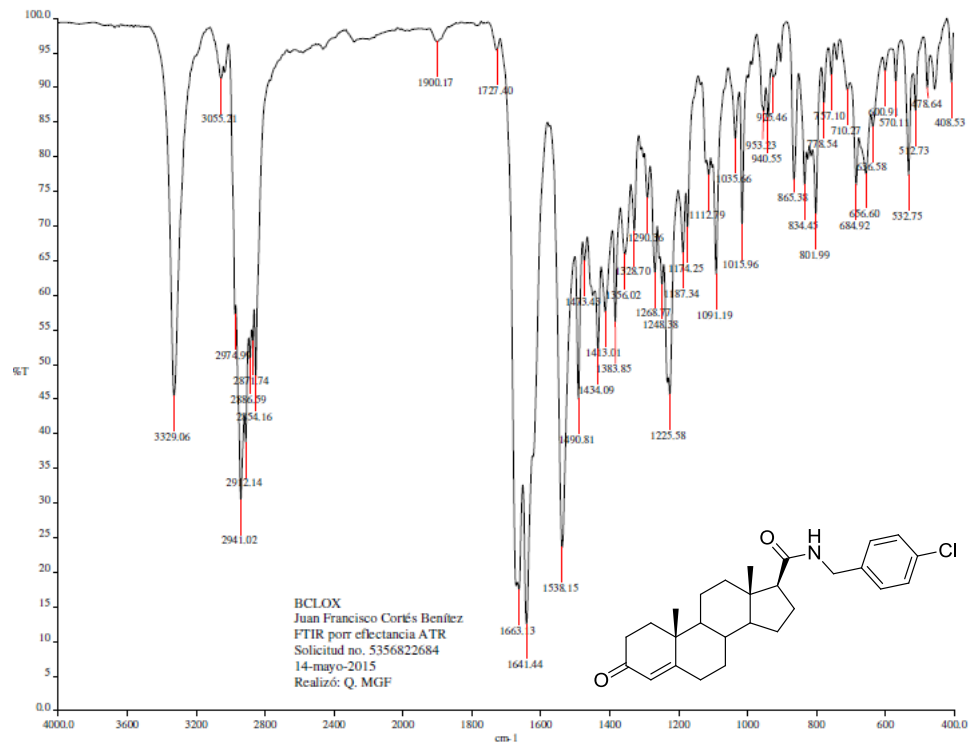


Espectro 154: RMN ¹⁹F del compuesto 6q

ANEXO 1: Espectros

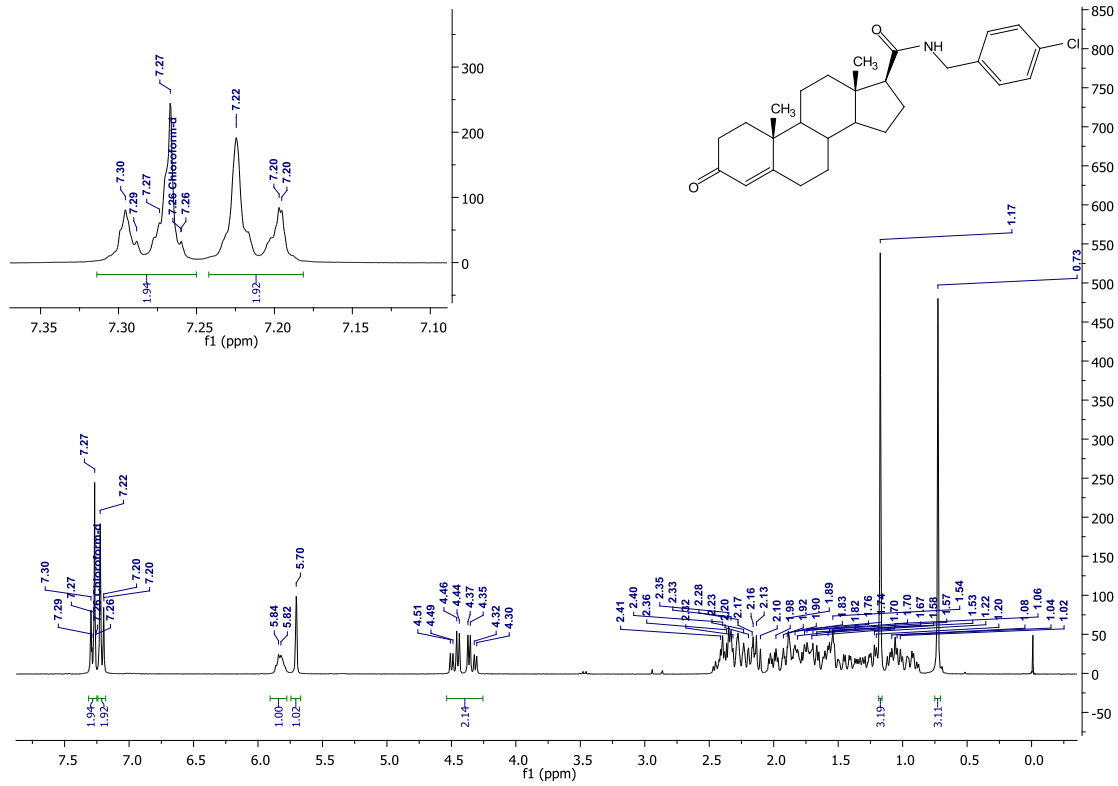


Espectro 155: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6q

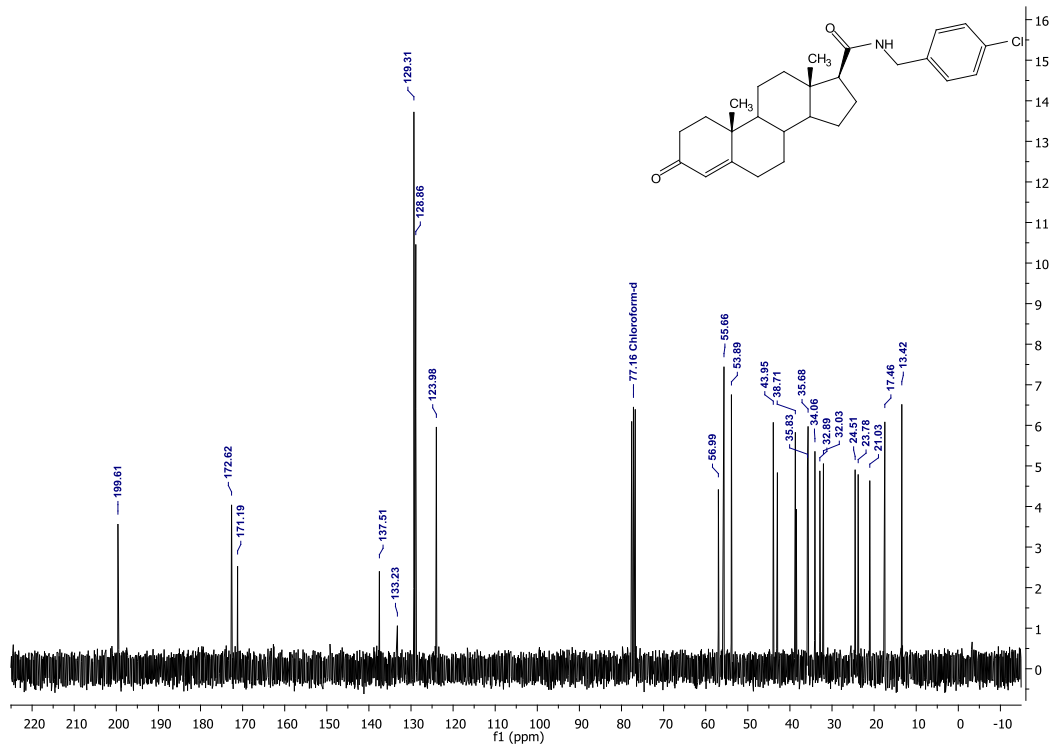


Espectro 156: IR del compuesto 6r

ANEXO 1: Espectros

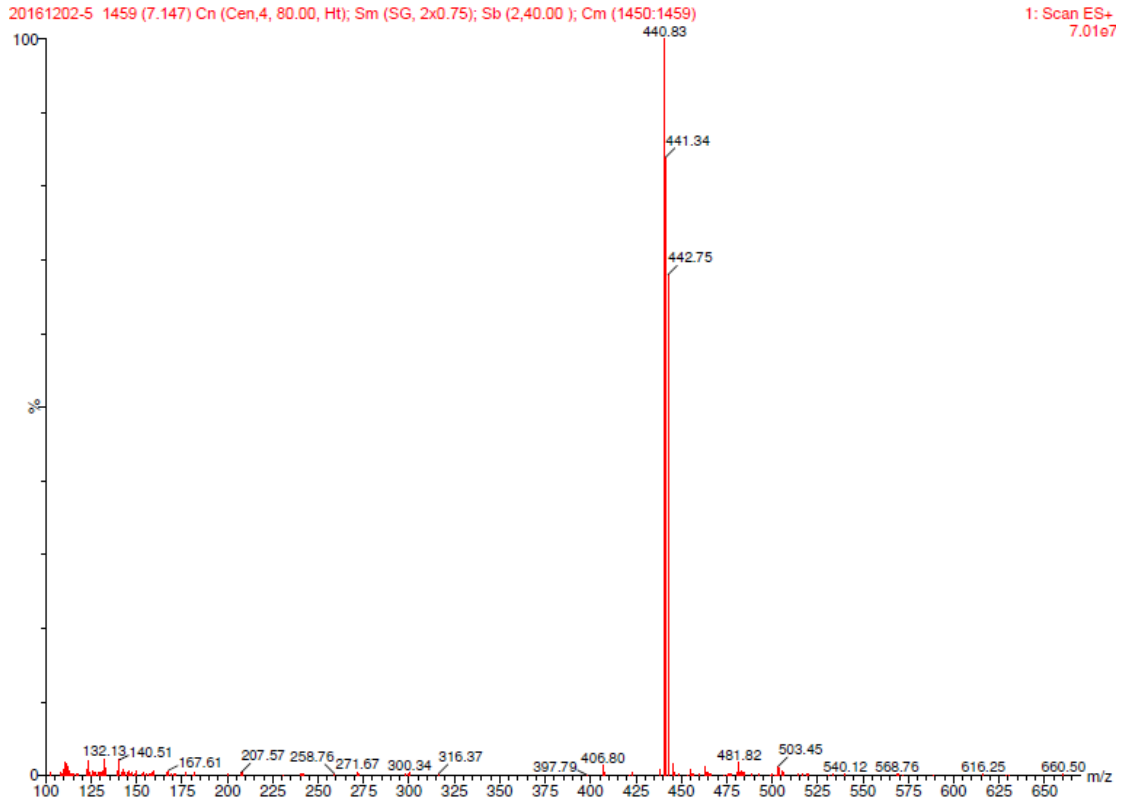


Espectro 157: RMN ¹H del compuesto 6r

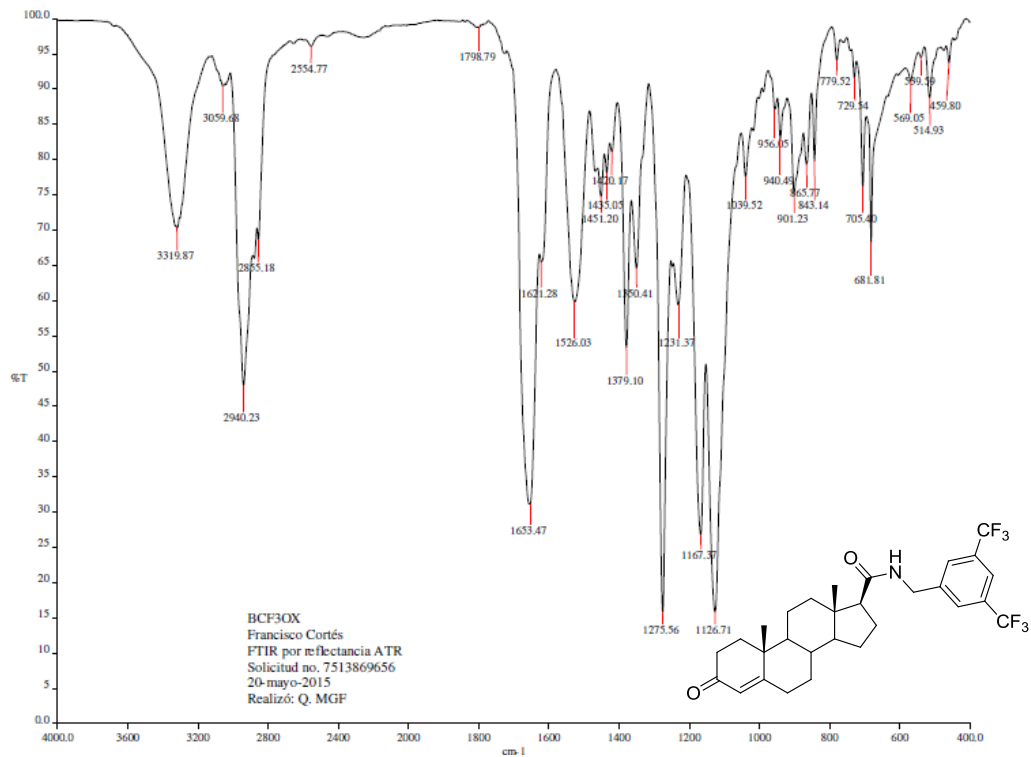


Espectro 158: RMN ¹³C del compuesto 6r

ANEXO 1: Espectros

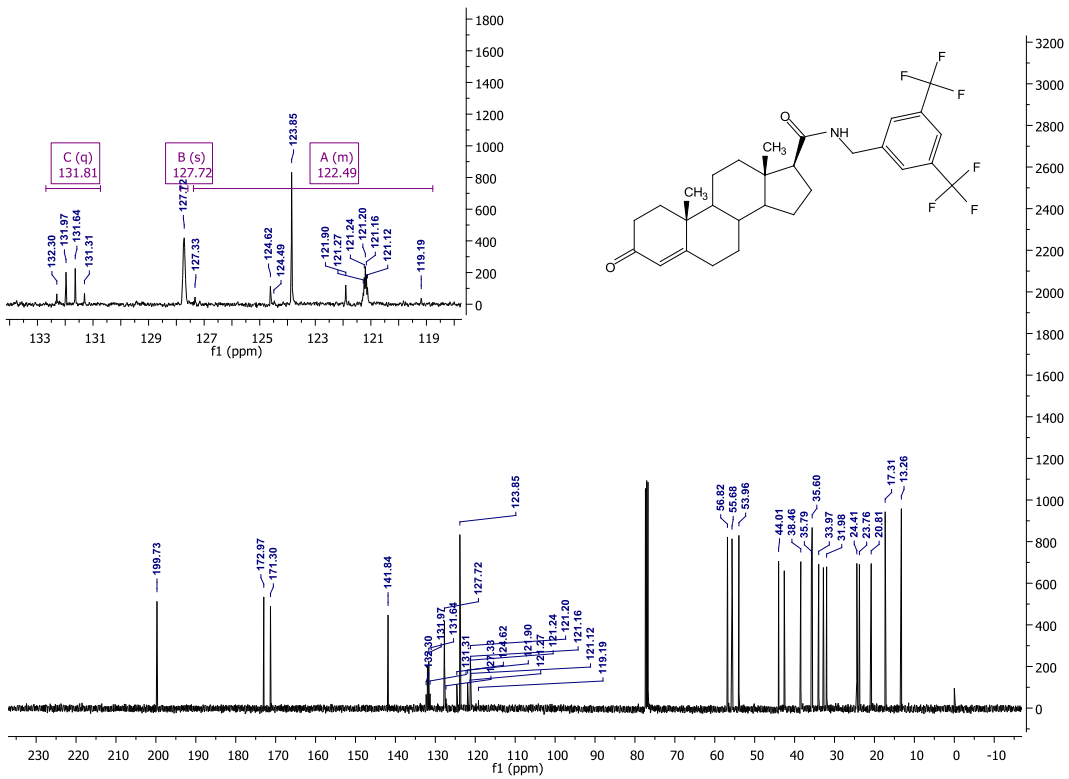
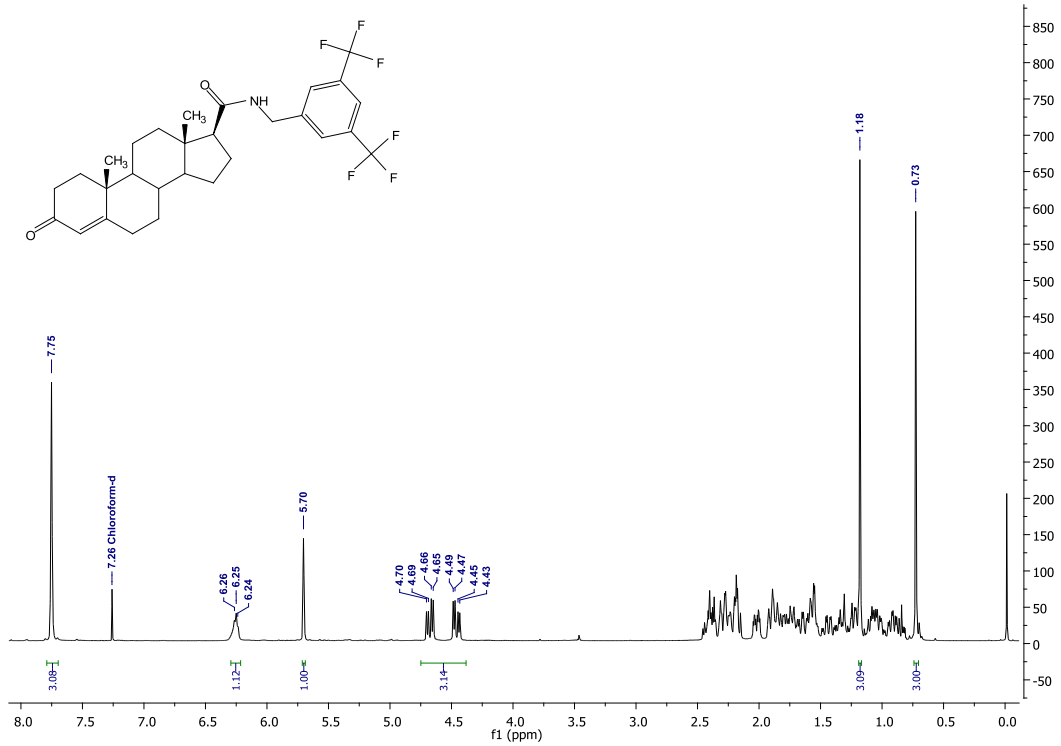


Espectro 159: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6r

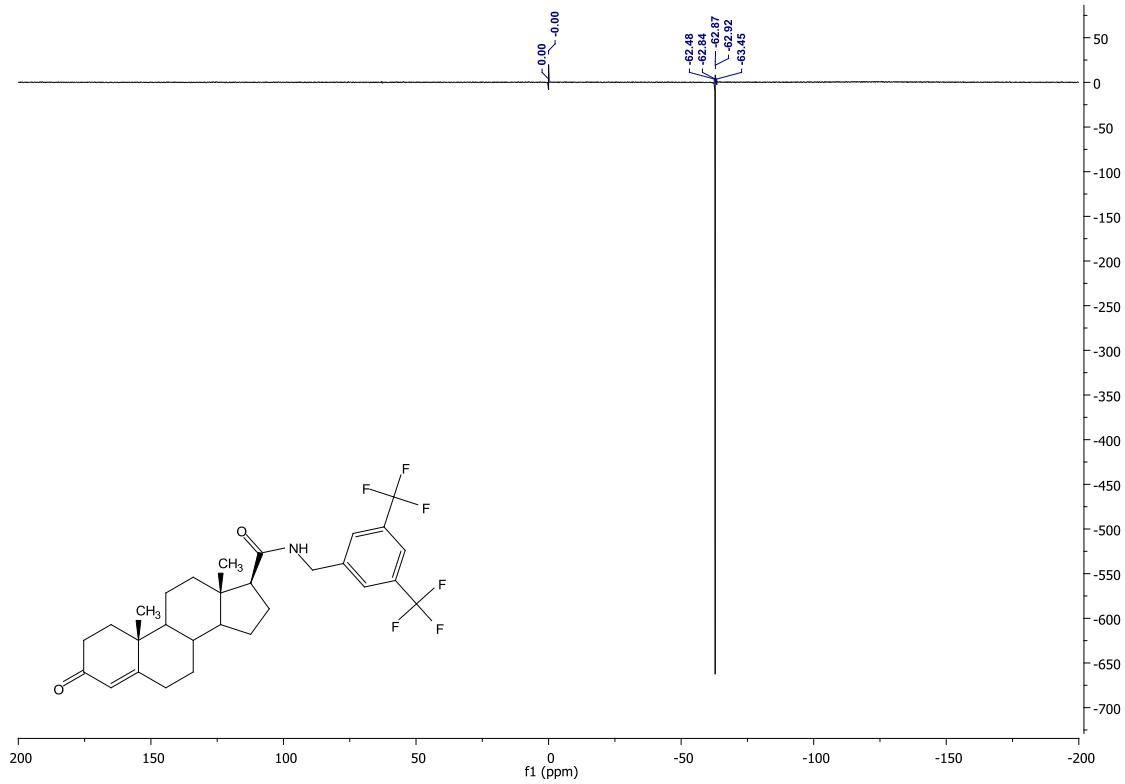


Espectro 160: IR del compuesto 6s

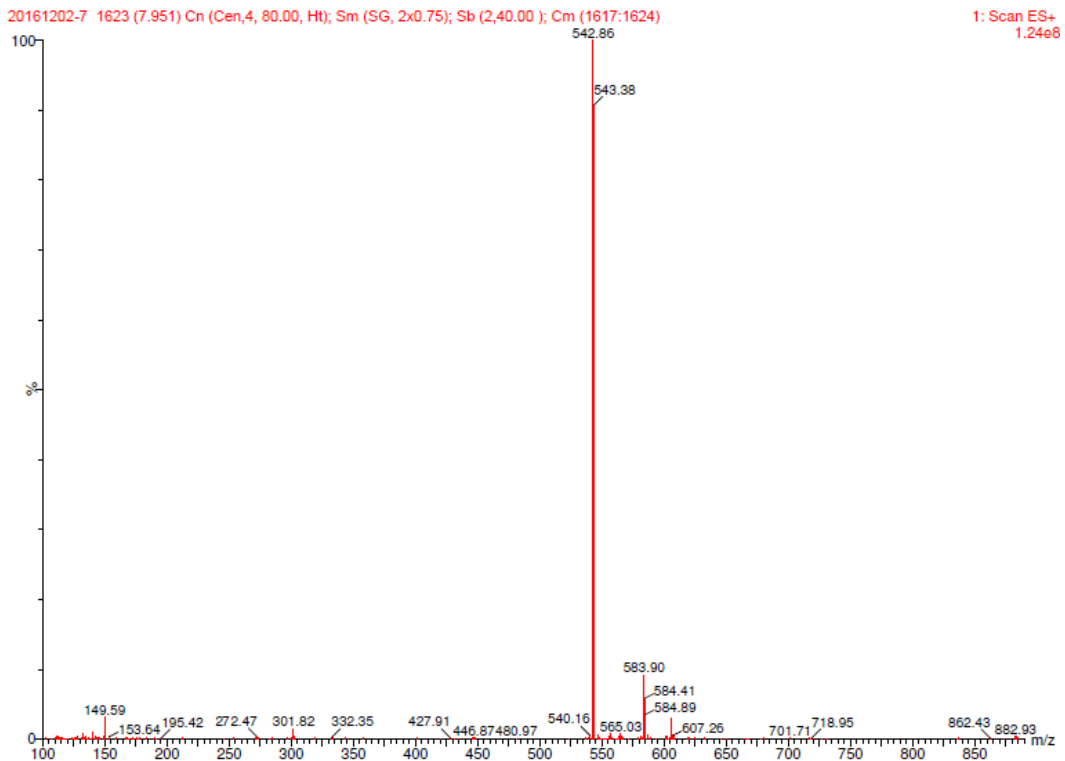
ANEXO 1: Espectros



ANEXO 1: Espectros

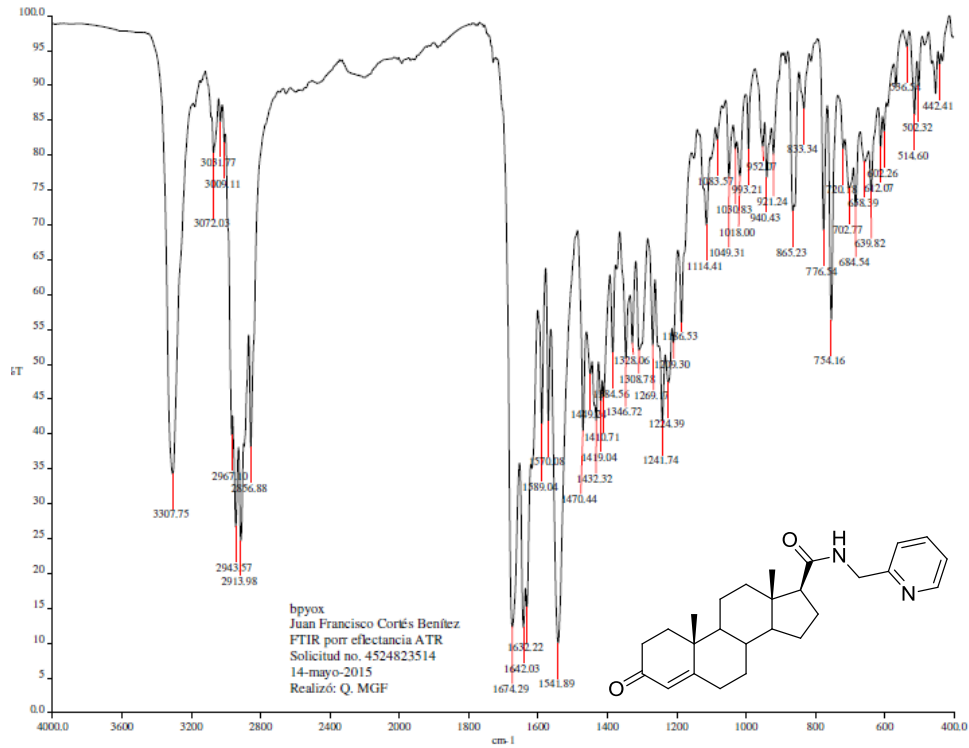


Espectro 163: RMN ^{19}F del compuesto 6s

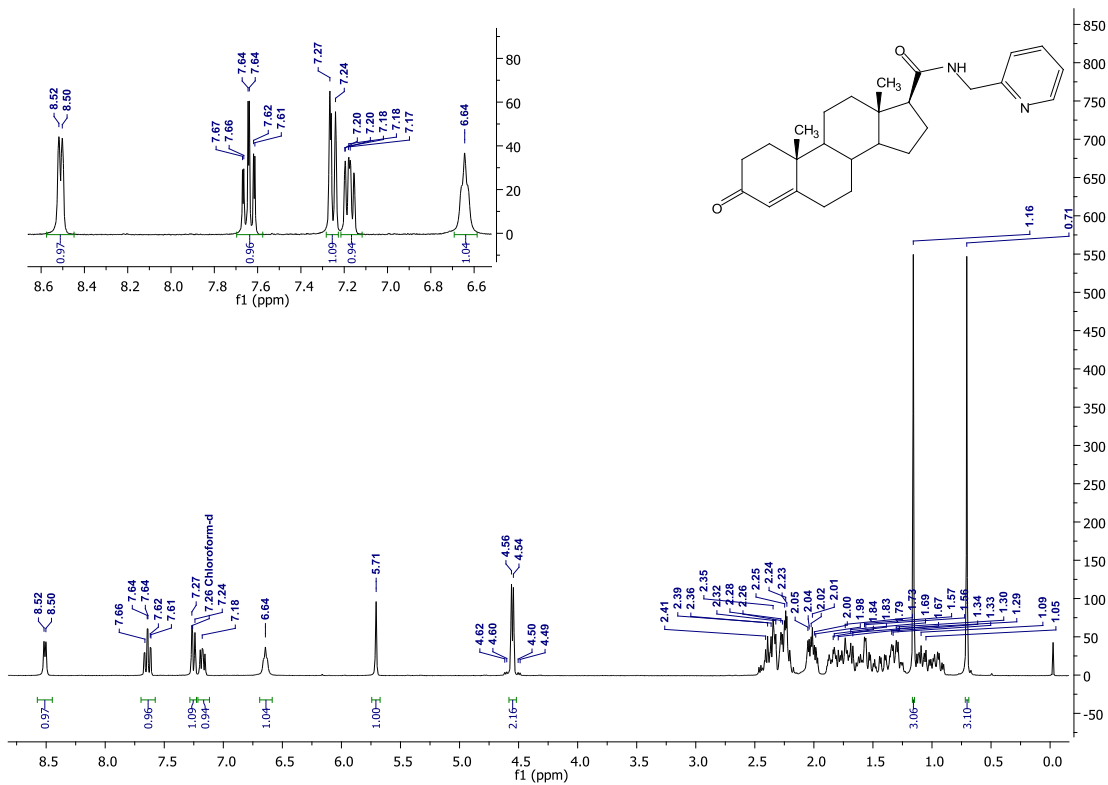


Espectro 164: espectro de masas (método ESI $^{+}$ -MS) del compuesto 6s

ANEXO 1: Espectros

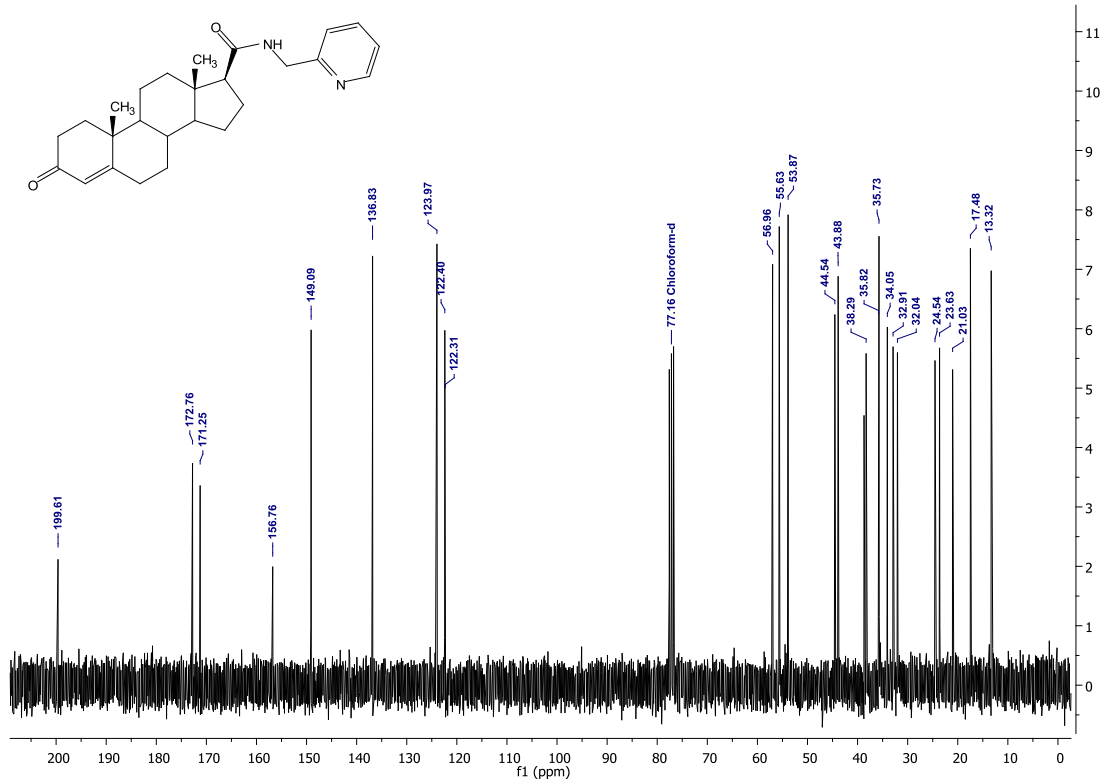


Espectro 165: IR del compuesto 6t

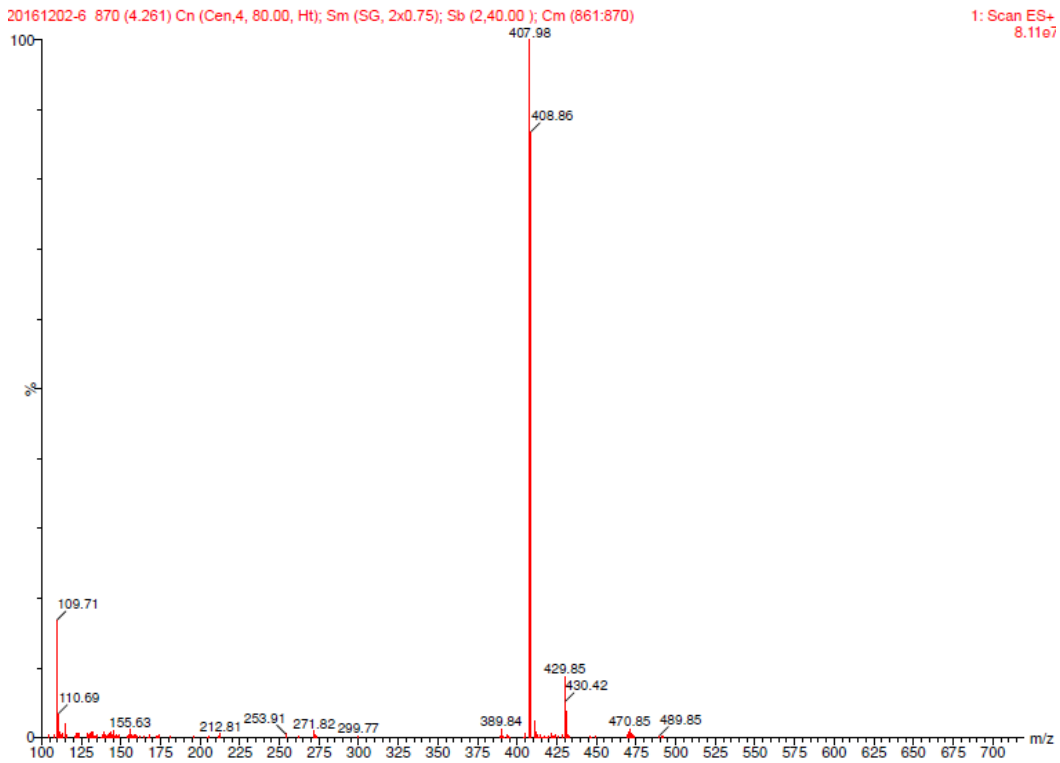


Espectro 166: RMN ¹H del compuesto 6t

ANEXO 1: Espectros

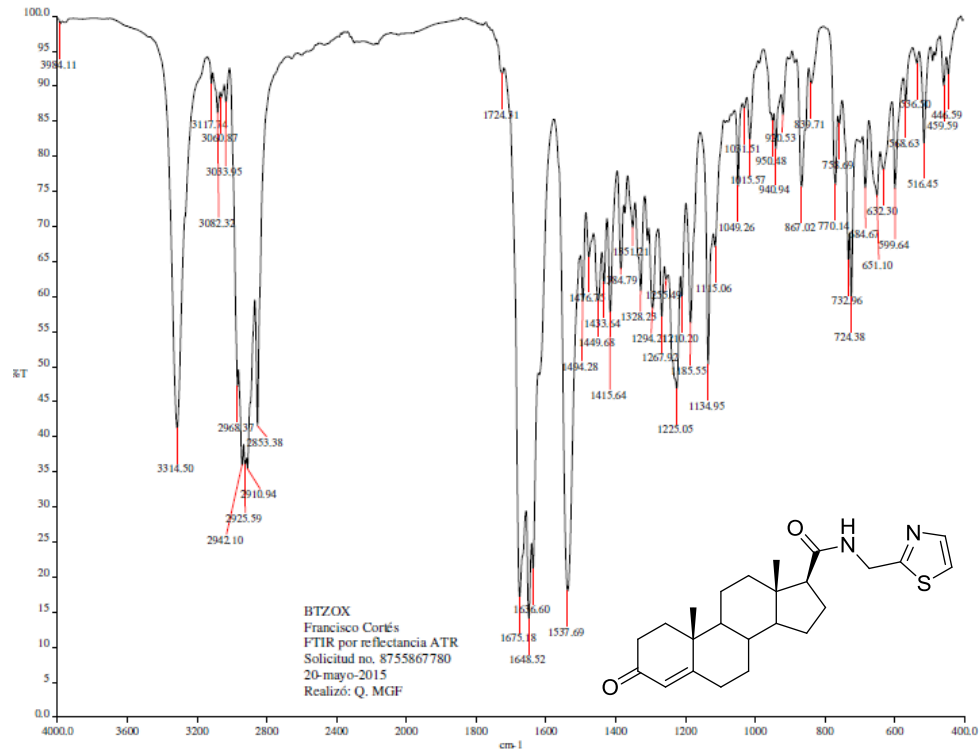


Espectro 167: RMN ¹³C del compuesto 6t

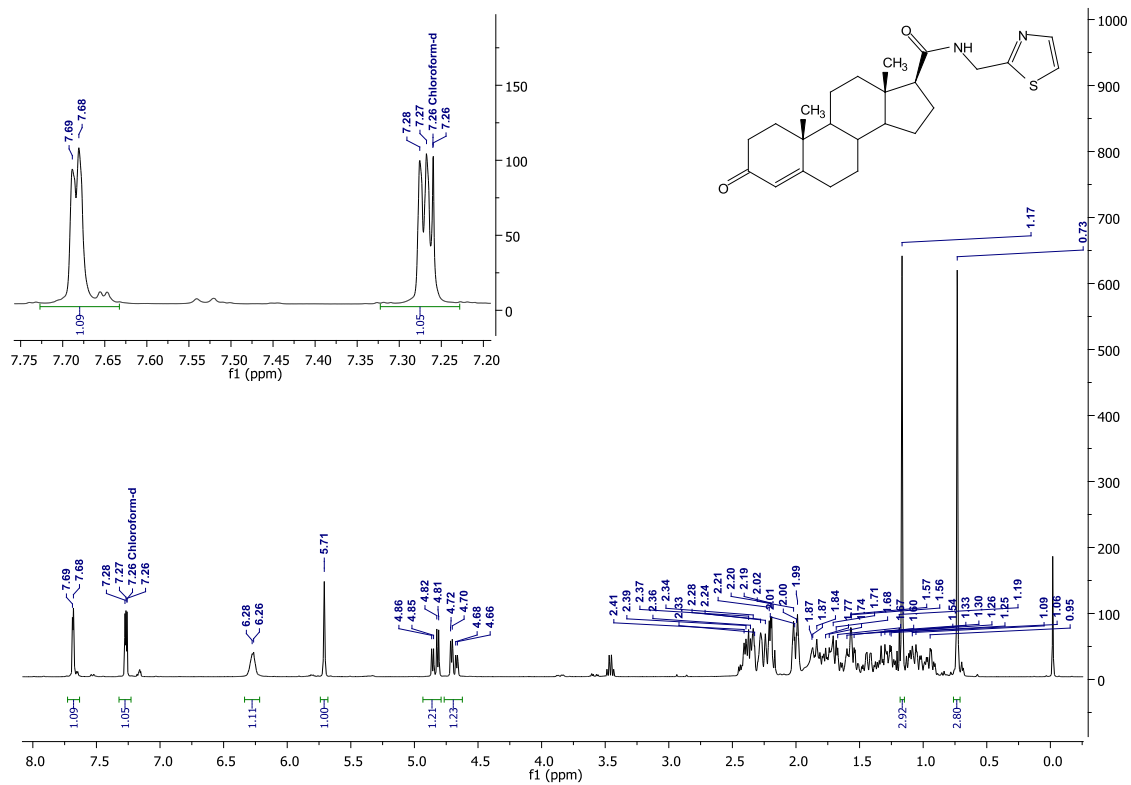


Espectro 168: espectro de masas (método ESI⁺-MS) del compuesto 6t

ANEXO 1: Espectros

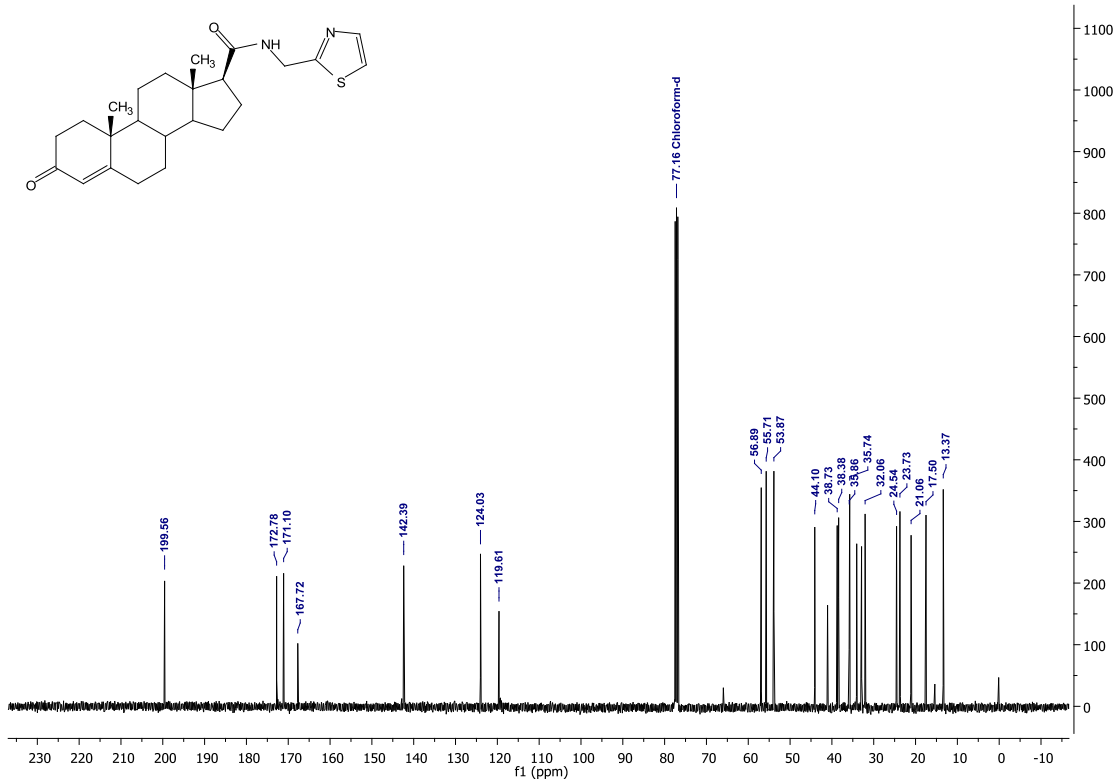


Espectro 169: IR del compuesto 6u

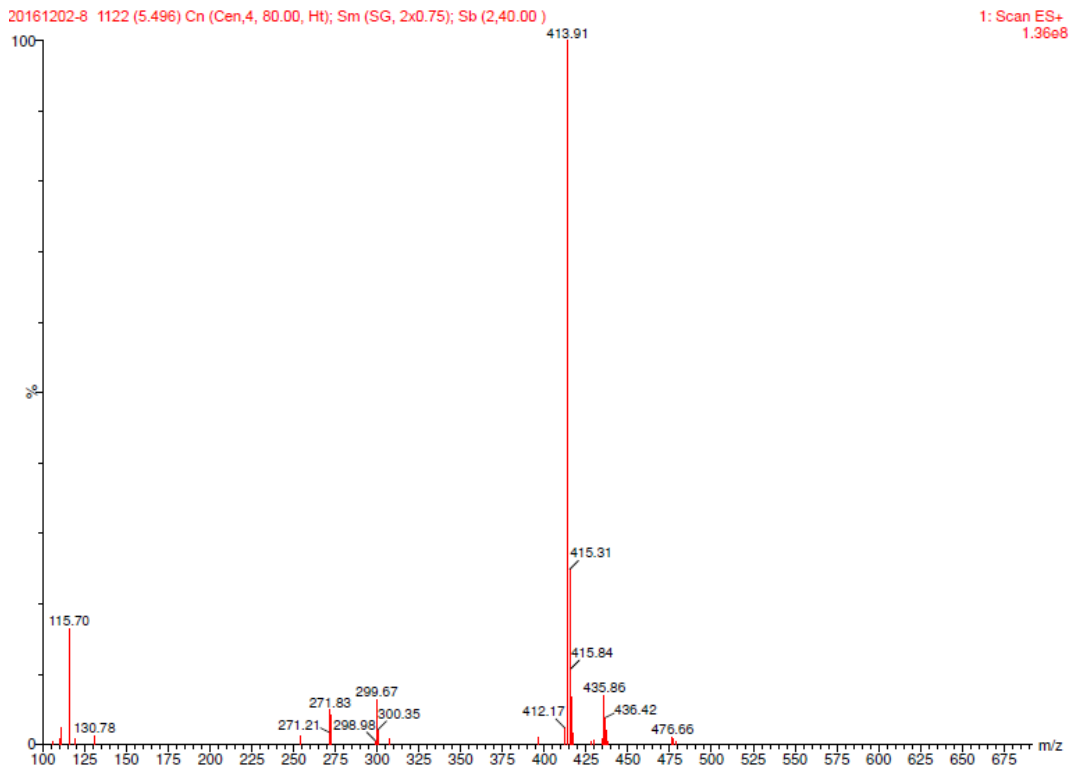


Espectro 170: RMN ¹H del compuesto 6u

ANEXO 1: Espectros



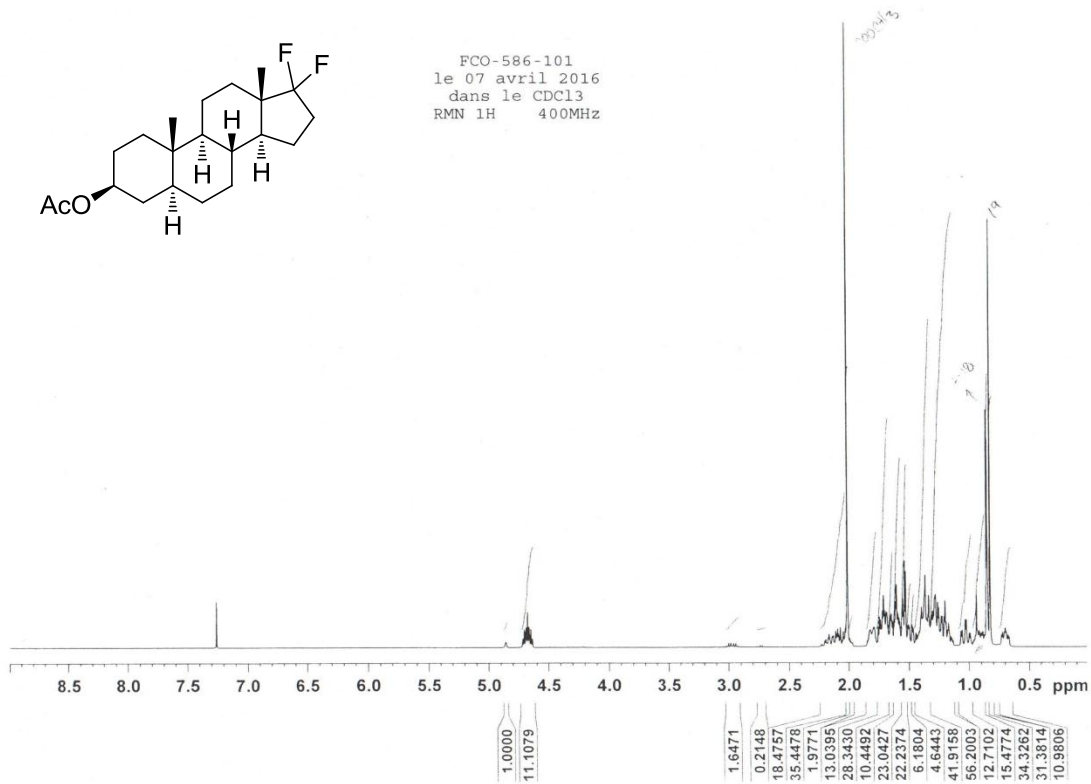
Espectro 171: RMN ^{13}C del compuesto 6u



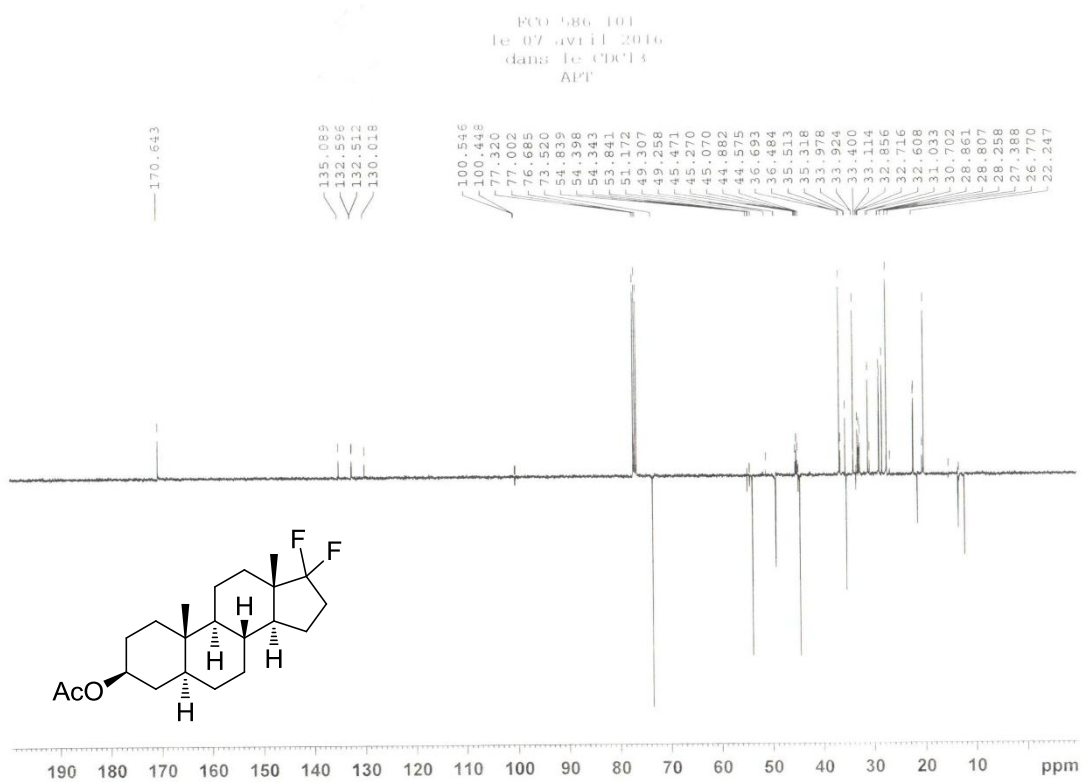
Espectro 172: espectro de masas (método ESI $^{+}$ -MS) del compuesto 6u

Espectros y cromatogramas de los compuestos 14a-14n realizados durante la estancia de investigación en el *Centre Hospitalier de l'Université Laval* (CHUL)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

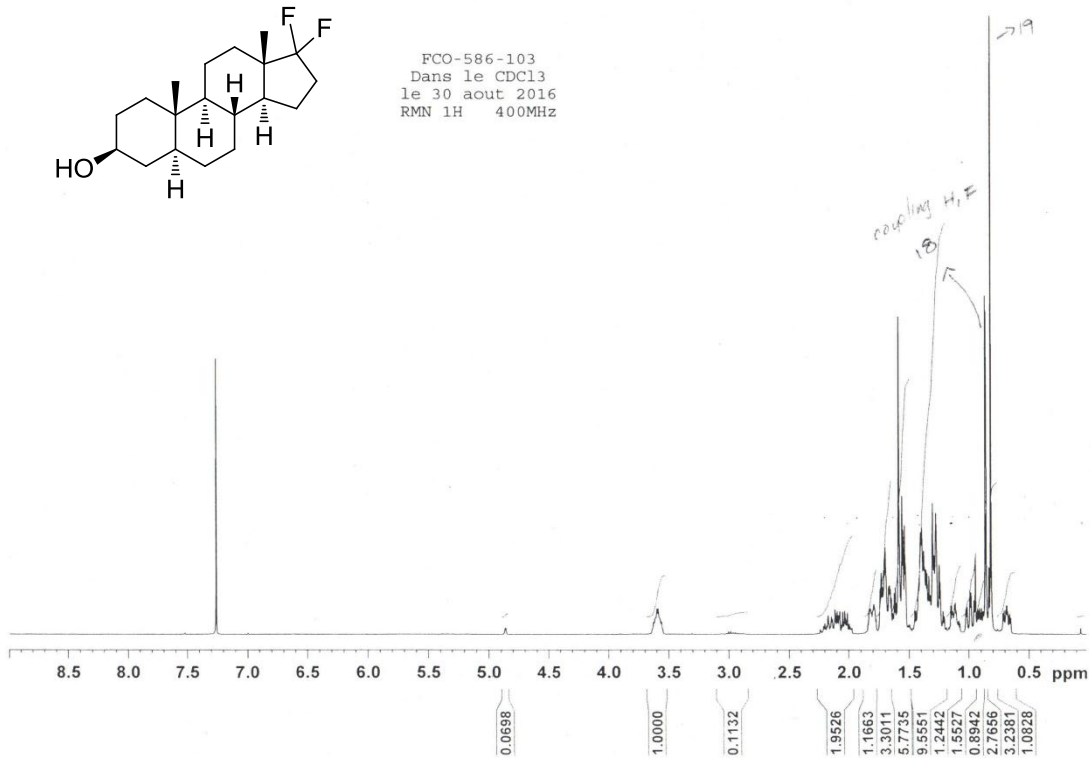


Espectro 173: RMN ¹H del compuesto 7

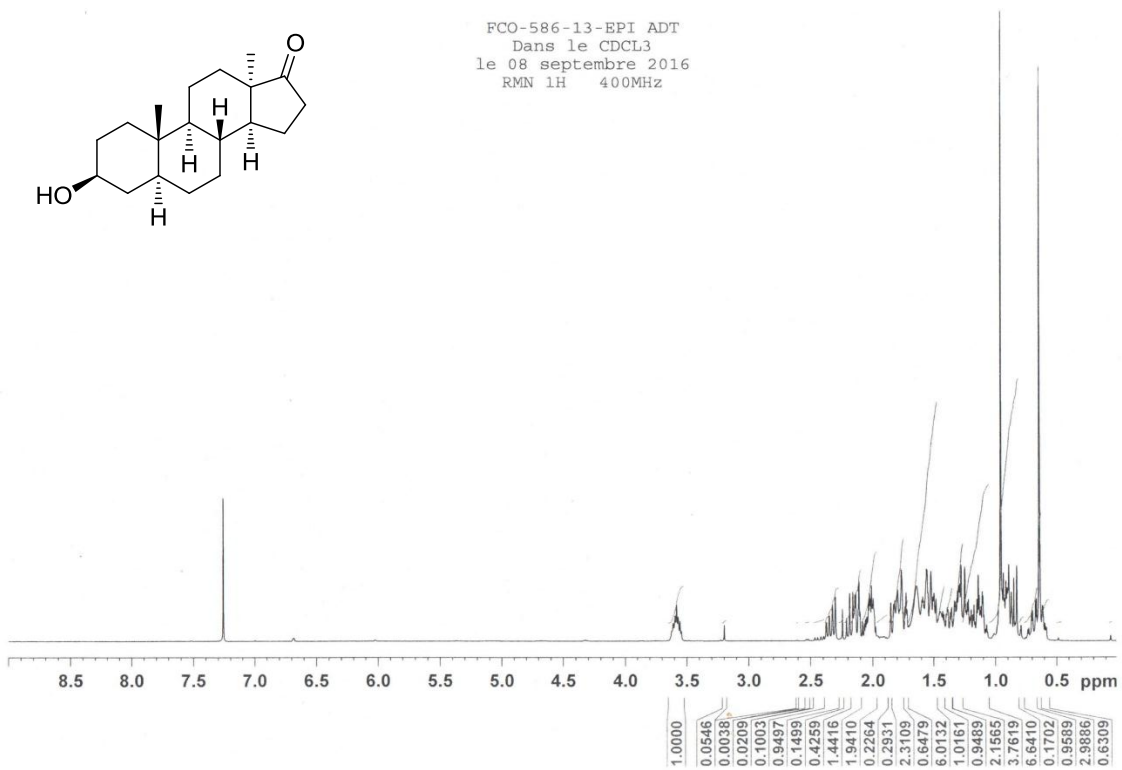


Espectro 174: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 7

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

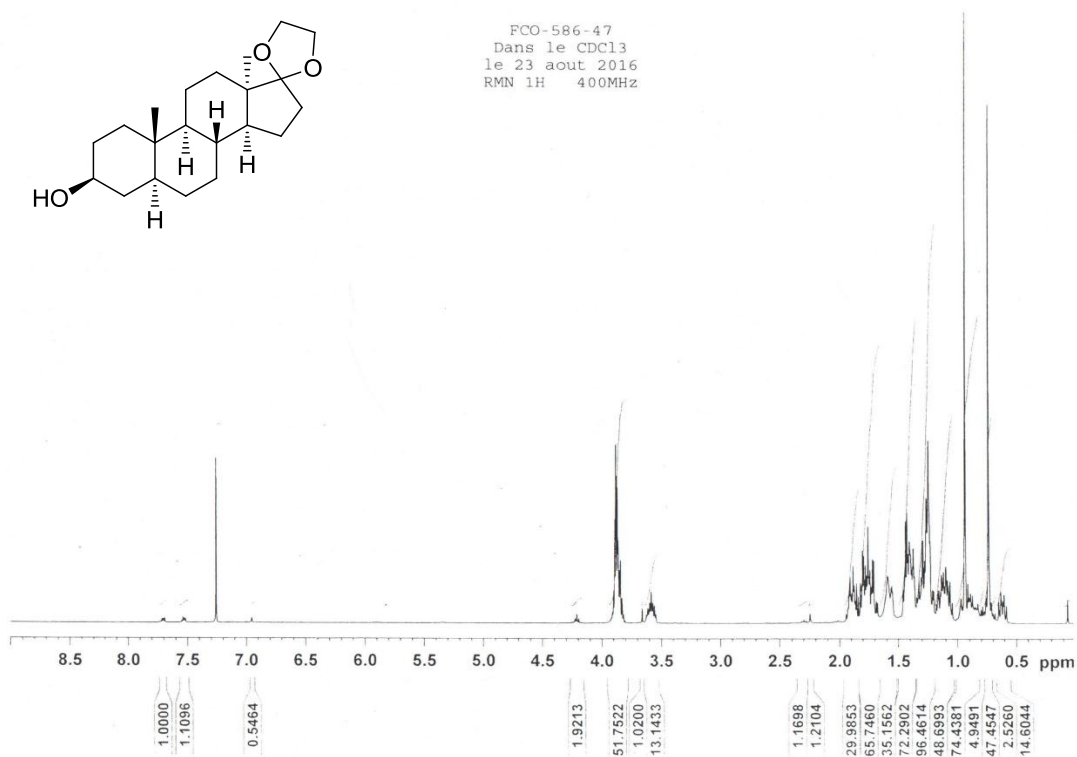


Espectro 175: RMN ¹H del compuesto 8

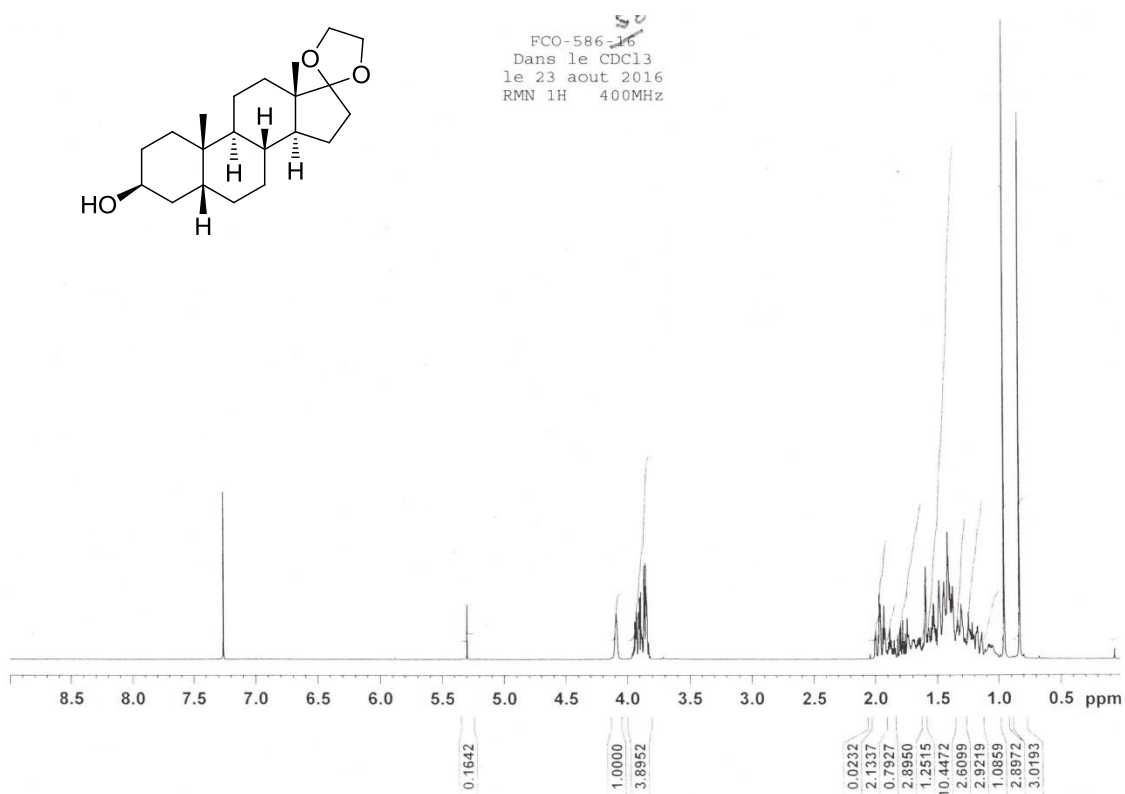


Espectro 176: RMN ¹H del compuesto 9a

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

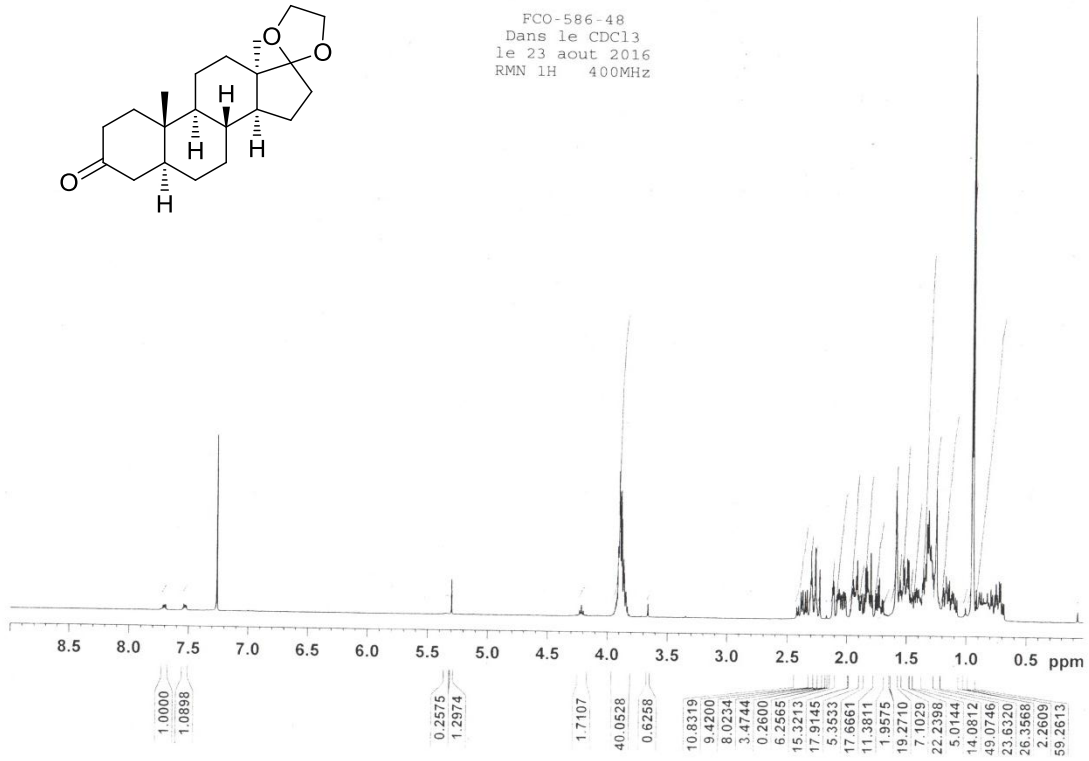


Espectro 177: RMN ¹H del compuesto 10a

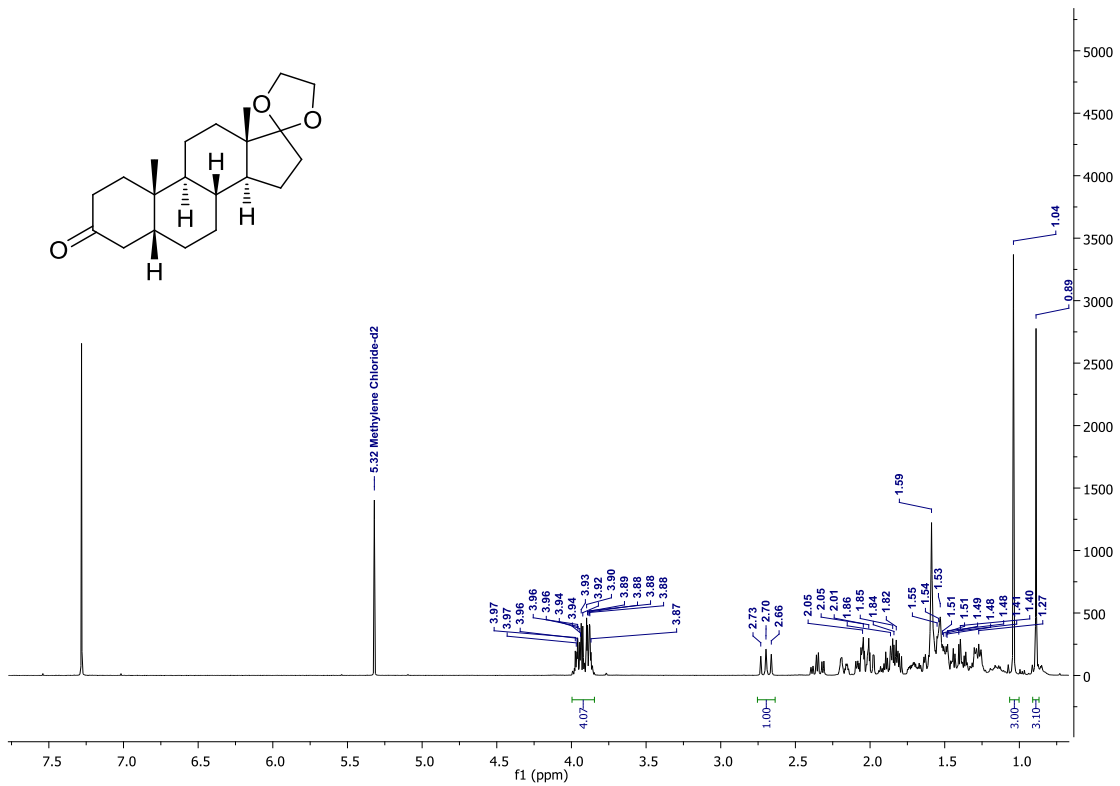


Espectro 178: RMN ¹H del compuesto 10b

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

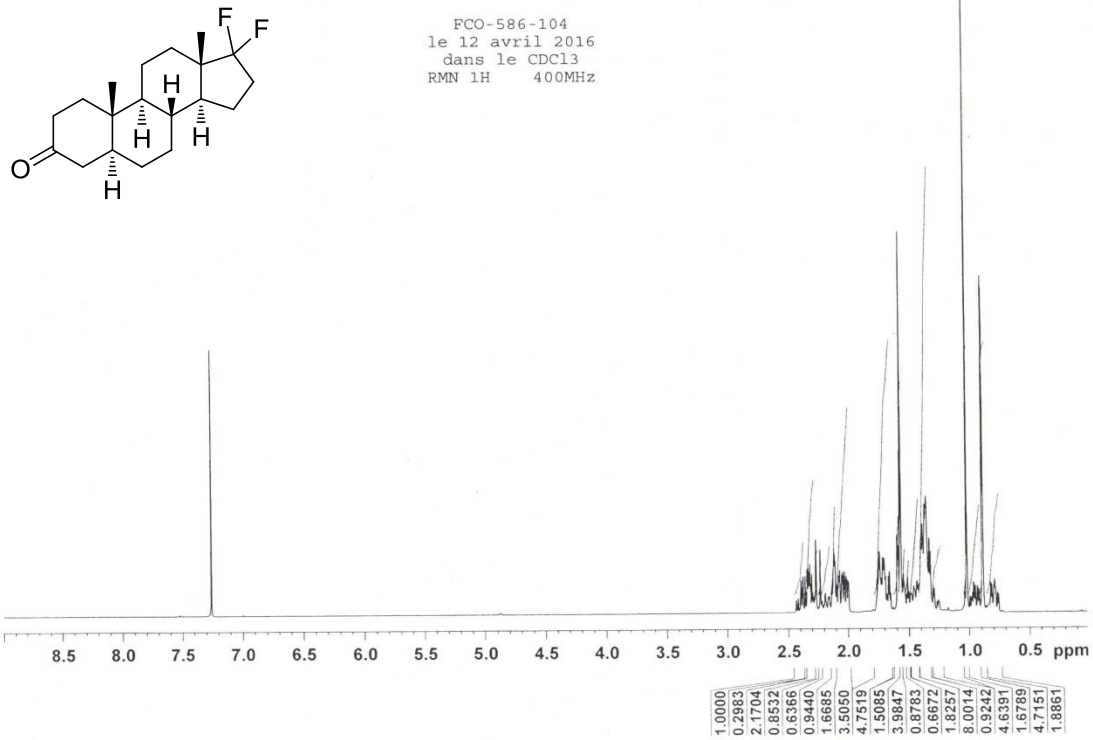


Espectro 179: RMN ¹H del compuesto 11a

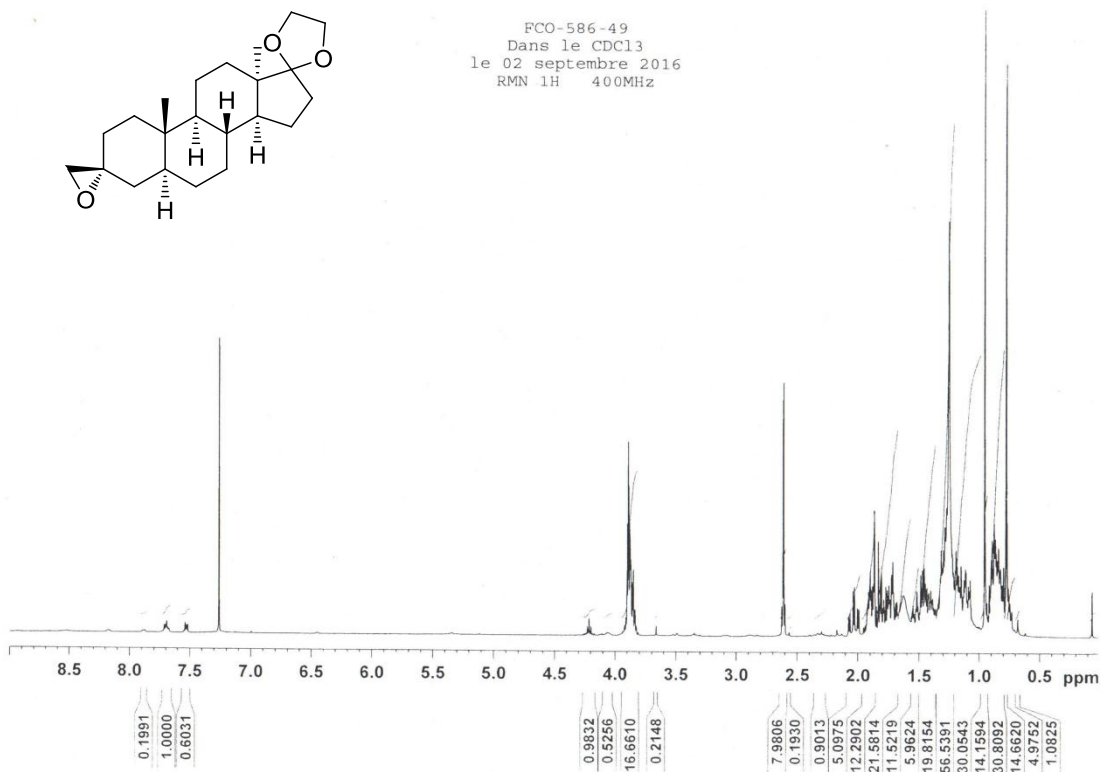


Espectro 180: RMN ¹H del compuesto 11b

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

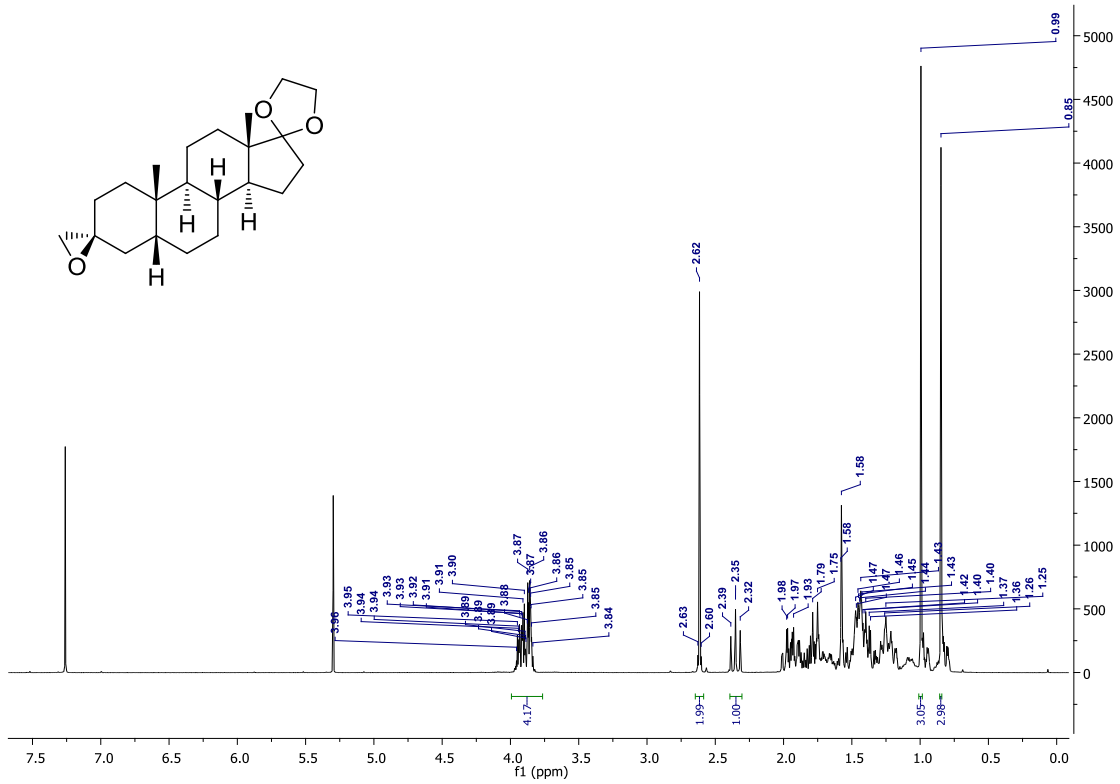


Espectro 181: RMN ^1H del compuesto 11c

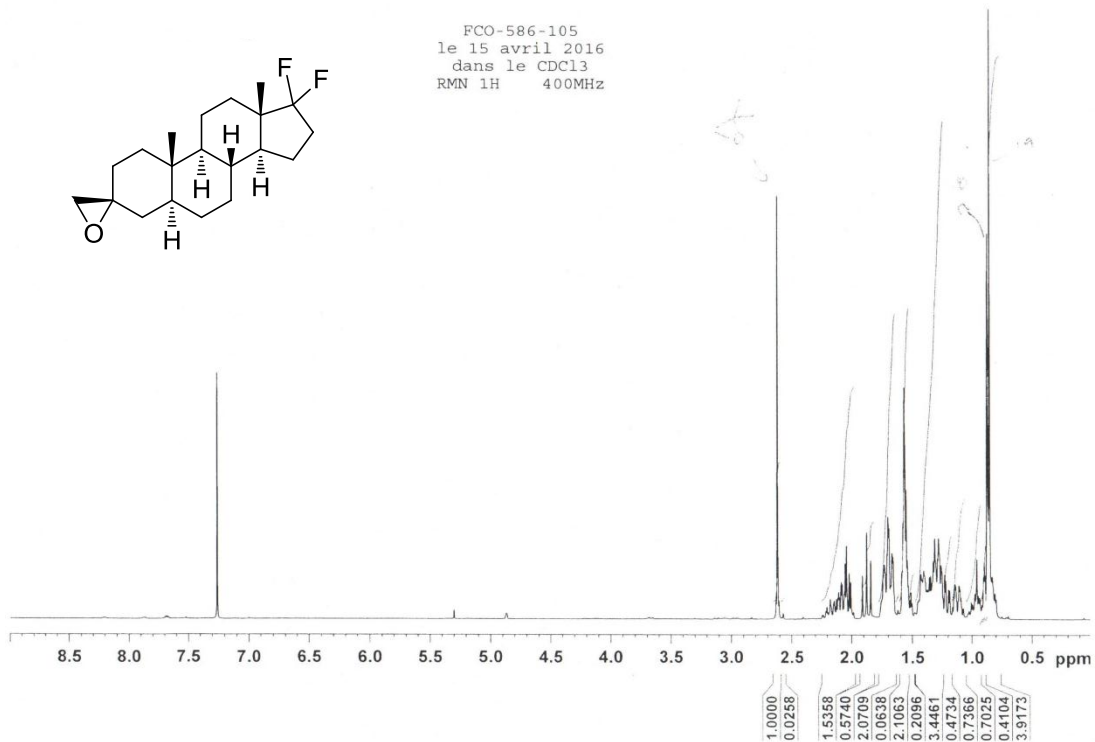


Espectro 182: RMN ^1H del compuesto 12a

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

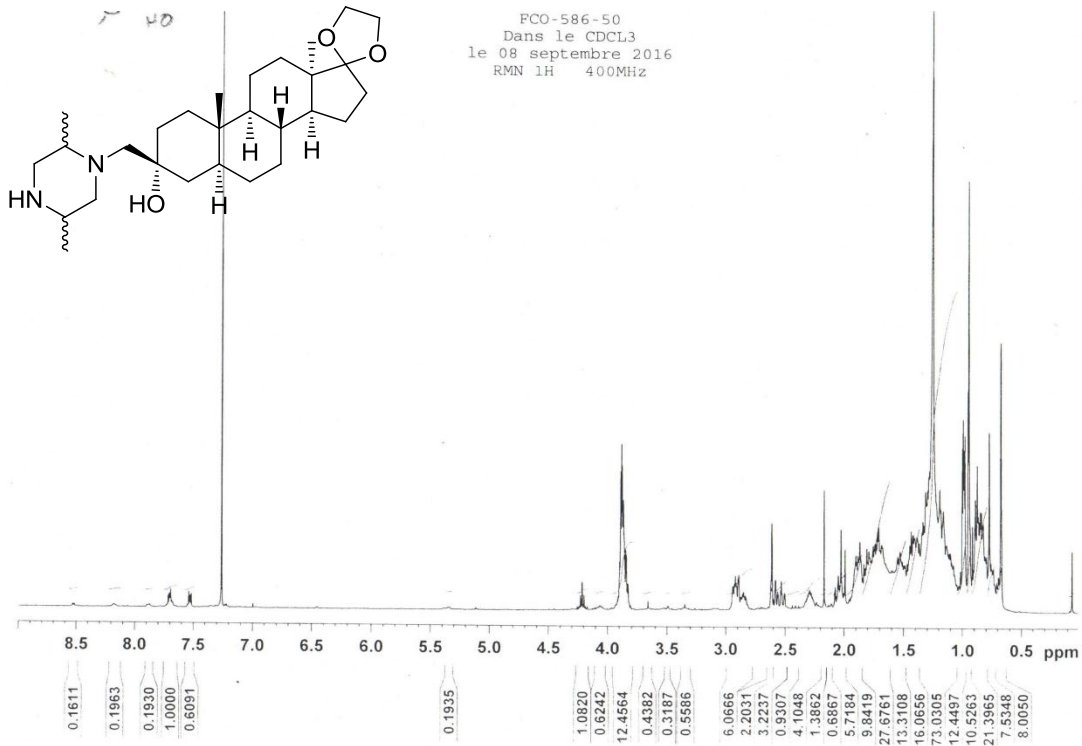


Espectro 183: RMN ^1H del compuesto 12b

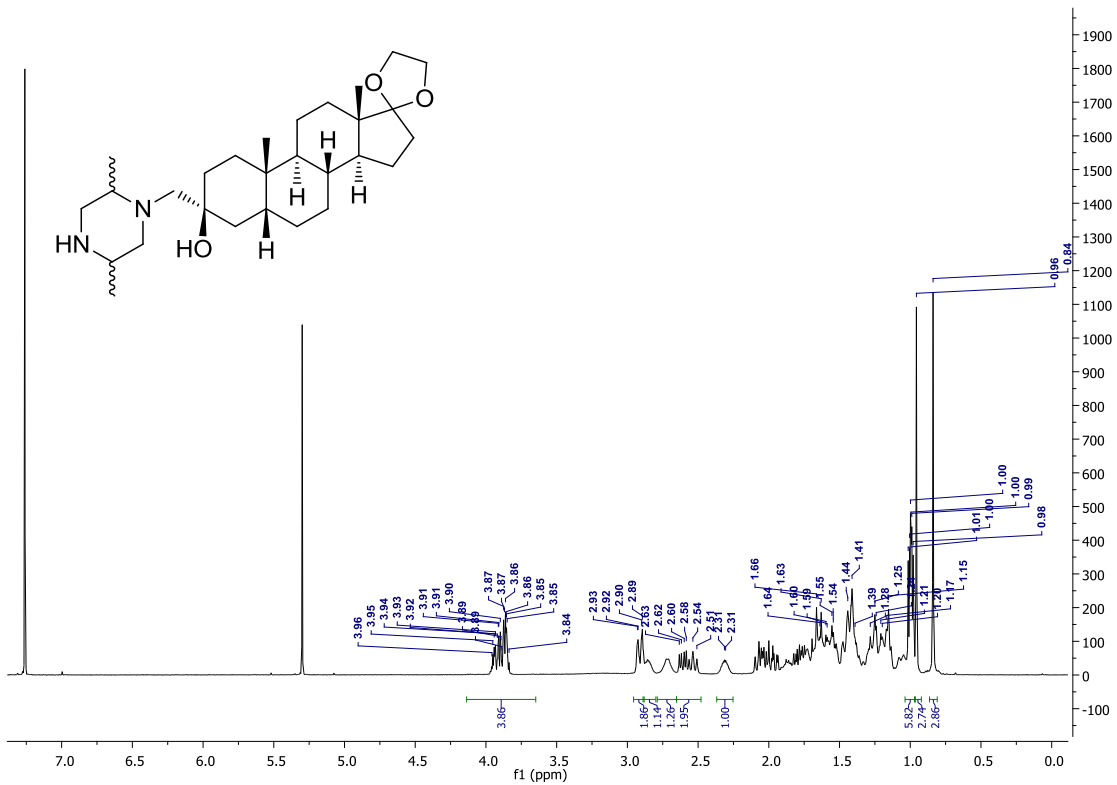


Espectro 184: RMN ^1H del compuesto 12c

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

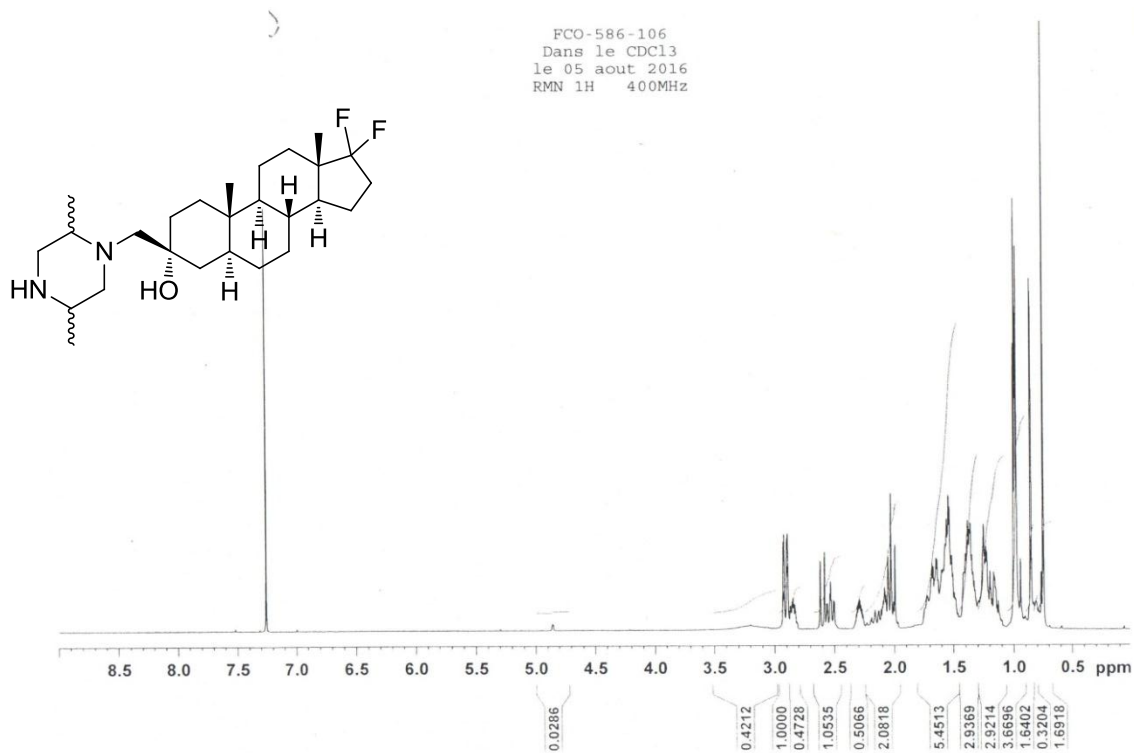


Espectro 185: RMN ^1H del compuesto 13a

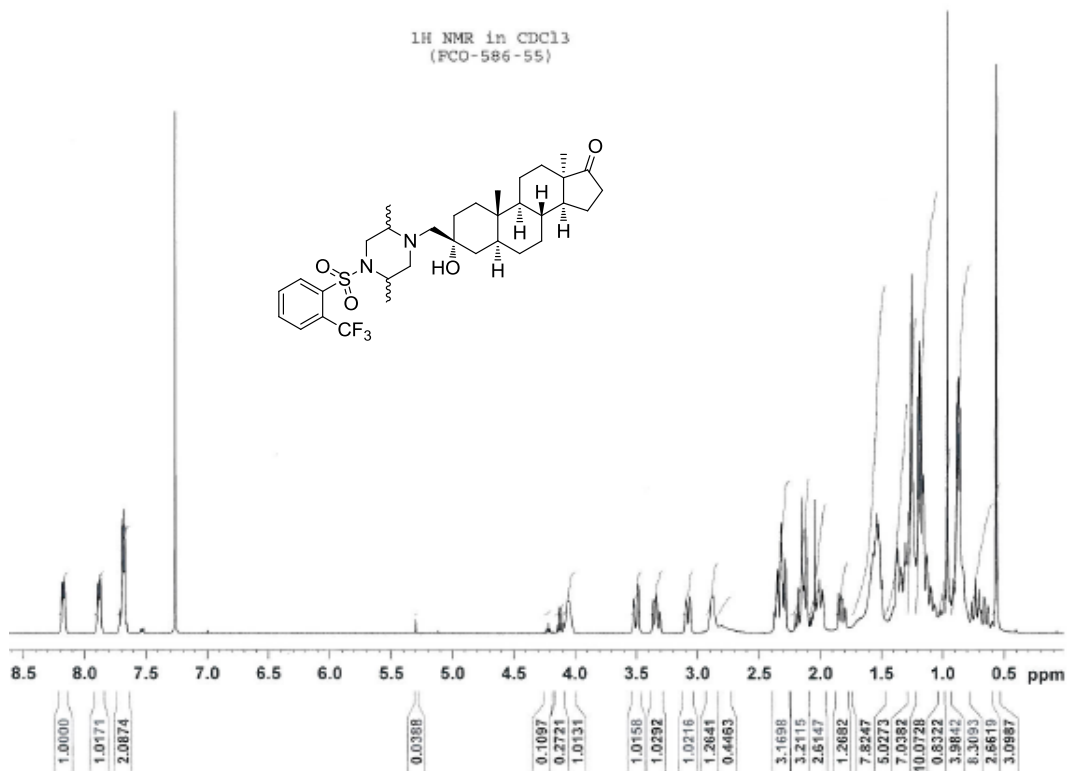


Espectro 186: RMN ^1H del compuesto 13b

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

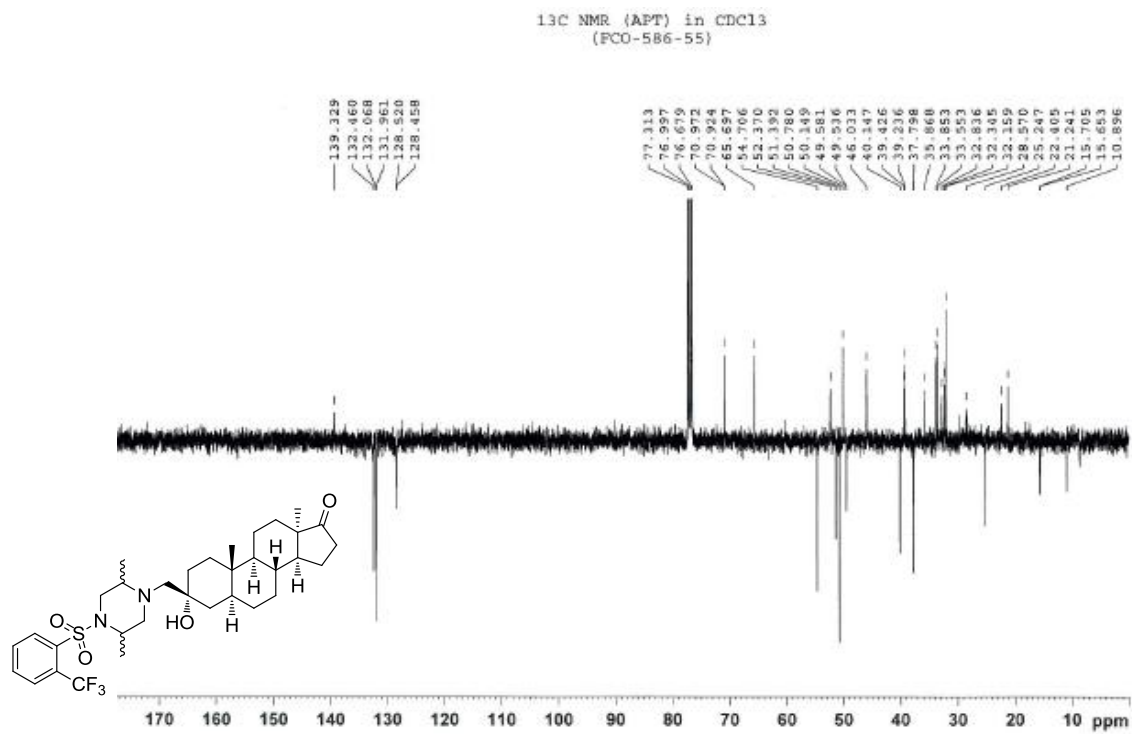


Espectro 187: RMN ¹H del compuesto 13c



Espectro 188: RMN ¹H del compuesto 14a

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



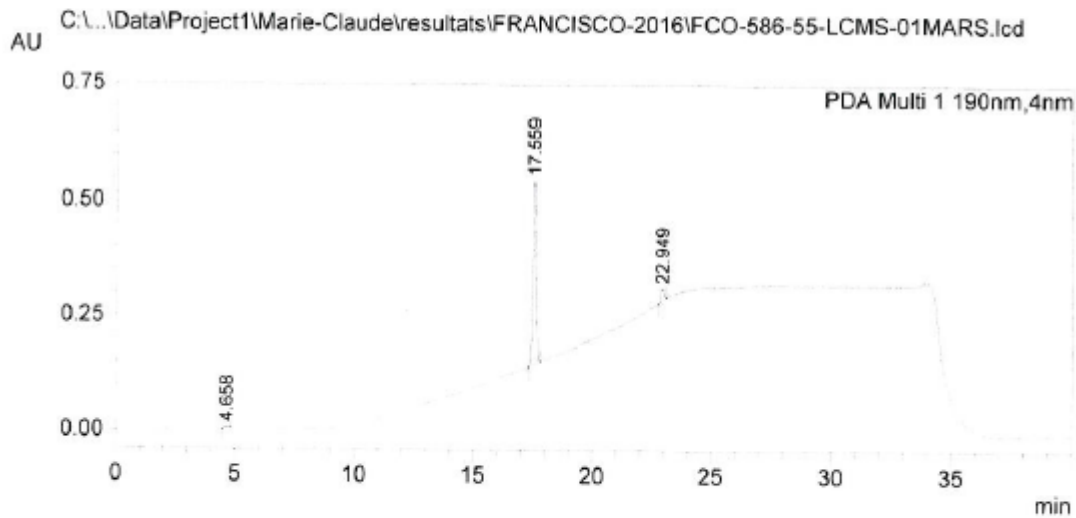
Espectro 189: RMN ^{13}C (experimento APT) del compuesto 14a

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-55-LCMS-01MARS.lcd
Acquired by : System Administrator
Sample Name : FCO-586-55-LCMS-01MARS
Sample ID : FCO-586-55-LCMS-01MARS
Tray# : 1
Vial# : 21
Injection Volume : 5
Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-55-LC
Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 (r
Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
Month-Day Acquired : 3/1/2016
Month-Day Processed : 3/1/2016
Comment : APCI+ SUR C18
 : MEQH:H2O 70:30

<Chromatogram>



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	4.658	7577	0.174
2	17.559	4152389	95.465
3	22.949	189698	4.361
Total		4349664	100.000

PDA Ch1 190nm

Cromatograma 1: Compuesto 14a

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Qualitative Compound Report

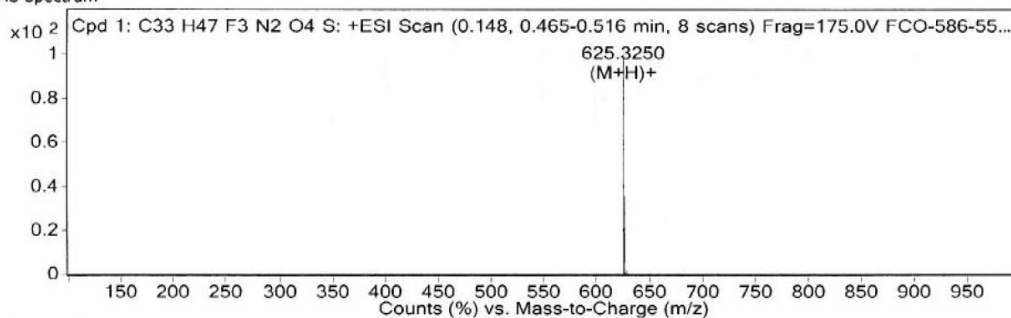
Data File	FCO-586-55.d	Sample Name	FCO-586-55
Sample Type	Sample	Position	Vial 15
Instrument Name	Instrument 1	User Name	Pierre Audet
Acq Method	Direct_Injection_ESI.m	IRM Calibration Status	Success
DA Method	MFC.m	Comment	

Compound Table

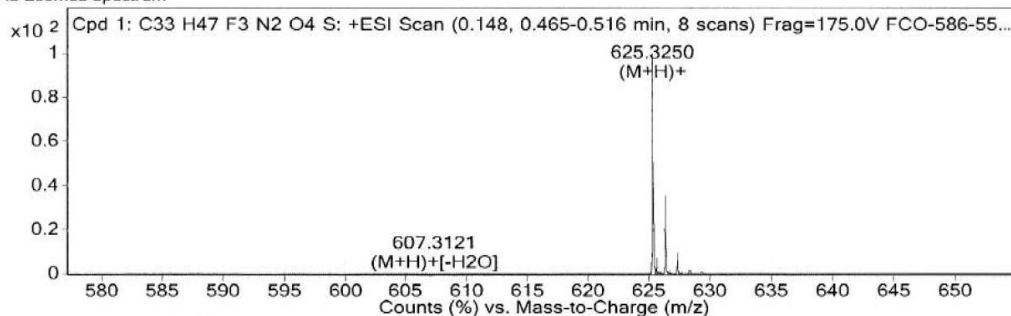
Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)
Cpd 1: C33 H47 F3 N2 O4 S	0.244	624.3177	341772	C33 H47 F3 N2 O4 S	624.3209	-4.99

Compound Label	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C33 H47 F3 N2 O4 S	0.244	Find By Formula	624.3177

MS Spectrum



MS Zoomed Spectrum

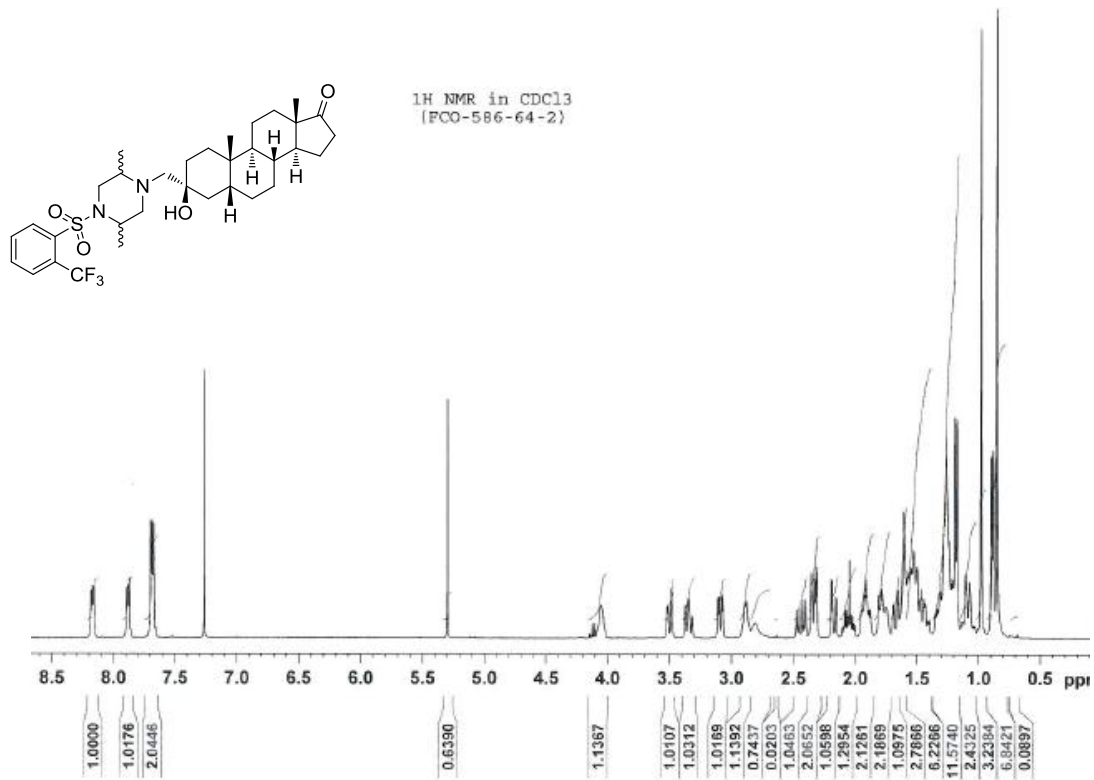


MS Spectrum Peak List

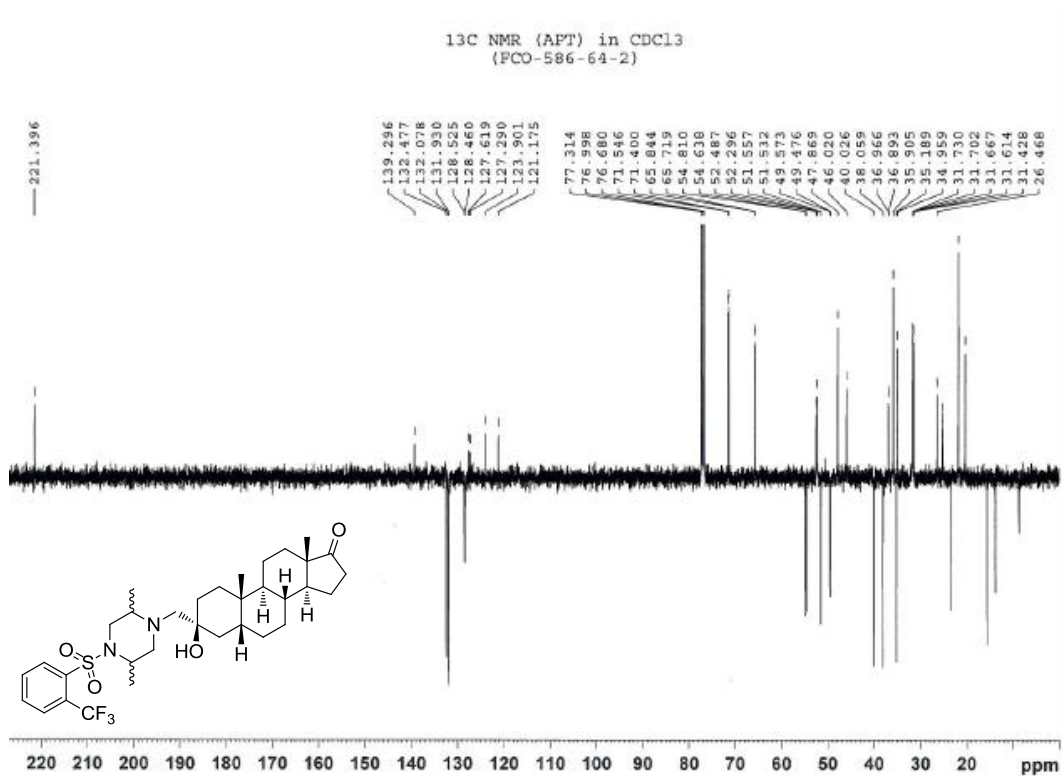
m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Formula	Ion
607.3121	607.3176	-8.93	1	73	C33 H46 F3 N2 O3 S	(M+H)+[-H2O]
625.325	625.3281	-4.98		341772	C33 H48 F3 N2 O4 S	(M+H)+
625.639				24993		
625.7849				1316		
625.9517				1609		
626.3281	626.3313	-5.16		121314	C33 H48 F3 N2 O4 S	(M+H)+
626.6419				5805		
627.3274	627.3305	-5.06		32780	C33 H48 F3 N2 O4 S	(M+H)+

54

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



Espectro 191: RMN ¹H del compuesto 14b

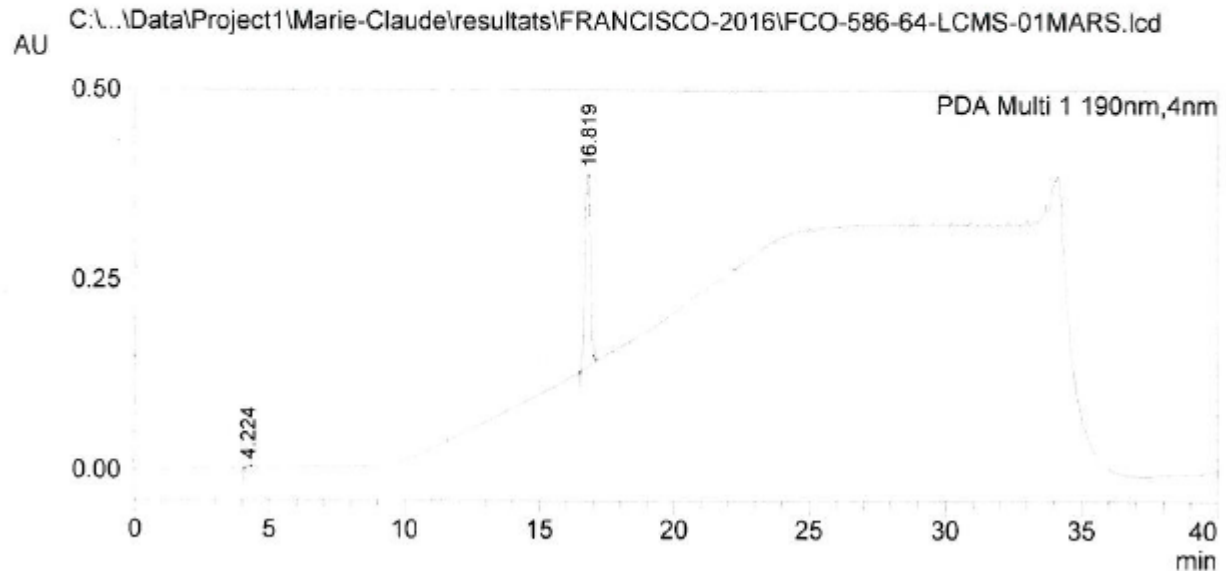


Espectro 192: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14b

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-64-LCMS-01MARS.lcd
Acquired by : System Administrator
Sample Name : FCO-586-64-LCMS-01MARS
Sample ID : FCO-586-64-LCMS-01MARS
Tray# : 1
Vial# : 17
Injection Volume : 5
Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-64-LCMS-01MARS.lcd
Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 (METHODE-2016) (METHODE-2016).l
Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
Month-Day Acquired : 3/1/2016
Month-Day Processed : 3/1/2016
Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	4.224	14414	0.385
2	16.819	3728020	99.615
Total		3742434	100.000

Cromatograma 2: Compuesto 14b

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Qualitative Compound Report

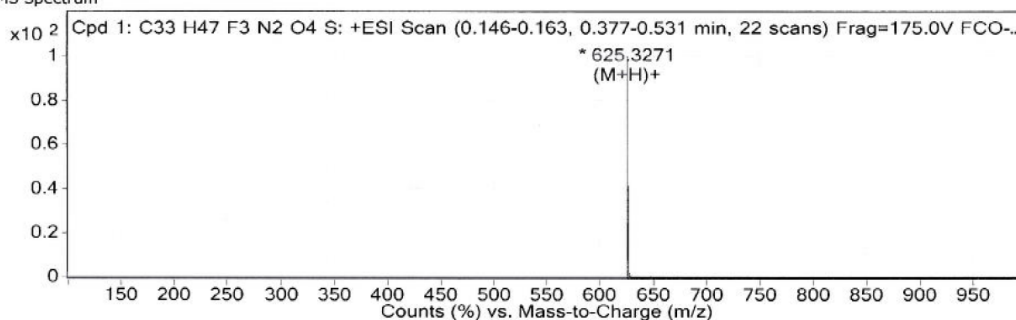
Data File	FCO-586-64.d	Sample Name	FCO-586-64
Sample Type	Sample	Position	Vial 16
Instrument Name	Instrument 1	User Name	Pierre Audet
Acq Method	Direct_Injection_ESI.m	IRM Calibration Status	Success
DA Method	MFC.m	Comment	

Compound Table

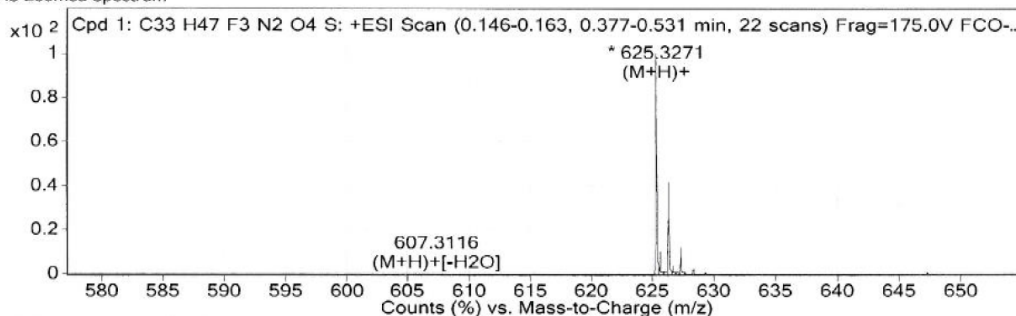
Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)
Cpd 1: C33 H47 F3 N2 O4 S	0.24	624.3196	705009	C33 H47 F3 N2 O4 S	624.3209	-1.99

Compound Label	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C33 H47 F3 N2 O4 S	0.24	Find By Formula	624.3196

MS Spectrum



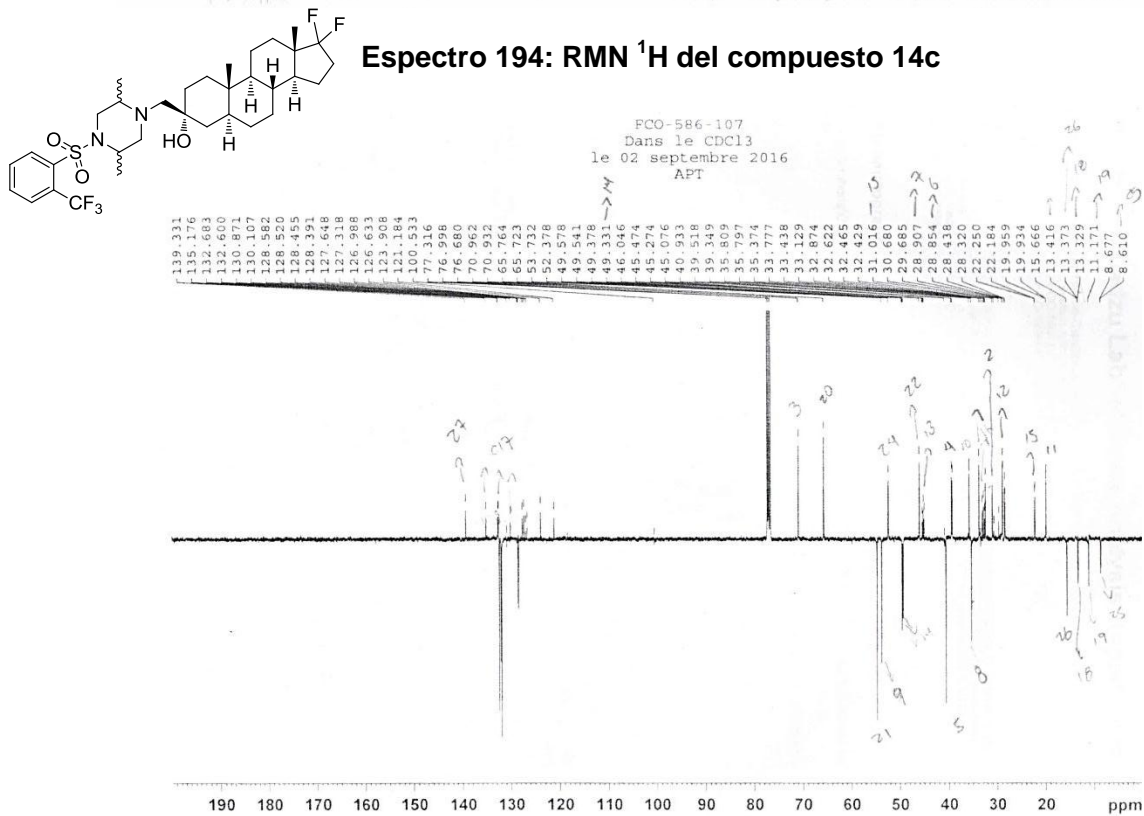
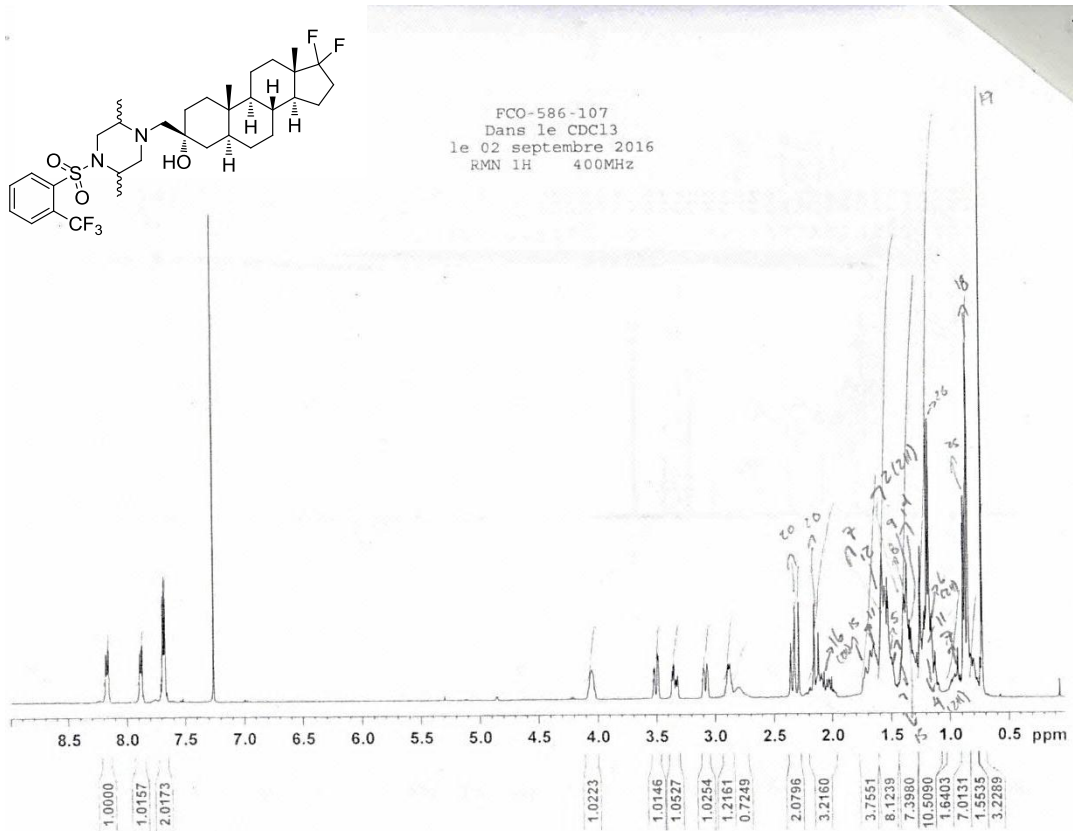
MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Formula	Ion
607.3116	607.3176	-9.87	1	110	C33 H46 F3 N2 O3 S	(M+H)+[-H2O]
625.3271	625.3281	-1.72		705301	C33 H48 F3 N2 O4 S	(M+H)+
625.6385				73924		
625.8088				5360		
625.9524				8195		
626.3278	626.3313	-5.58		293392	C33 H48 F3 N2 O4 S	(M+H)+
626.6415				24973		
627.3266	627.3305	-6.32		84679	C33 H48 F3 N2 O4 S	(M+H)+

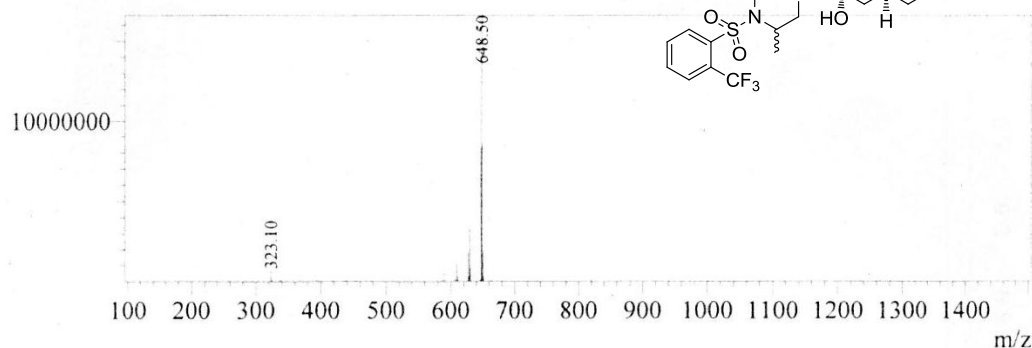
ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



Espectro 195: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14c

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:4 R.Time:21.618(Scan#:1298)
 MassPeaks:863
 Spectrum Mode:Averaged 21.600-21.633(1297-1299)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



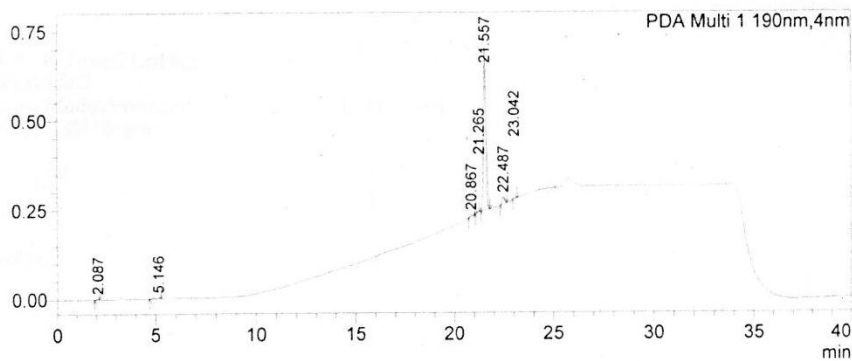
Espectro 196: Espectrometría de masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14c

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-107-LCMS-03MAI.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-107-LCMS-03MAI
 Sample ID : FCO-586-107-LCMS-03MAI
 Tray# : 1
 Vial# : 35
 Injection Volume : 5
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-107-1
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 ()
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 5/3/2016
 Month-Day Processed : 5/3/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-107-LCMS-03MAI.lcd
 AU

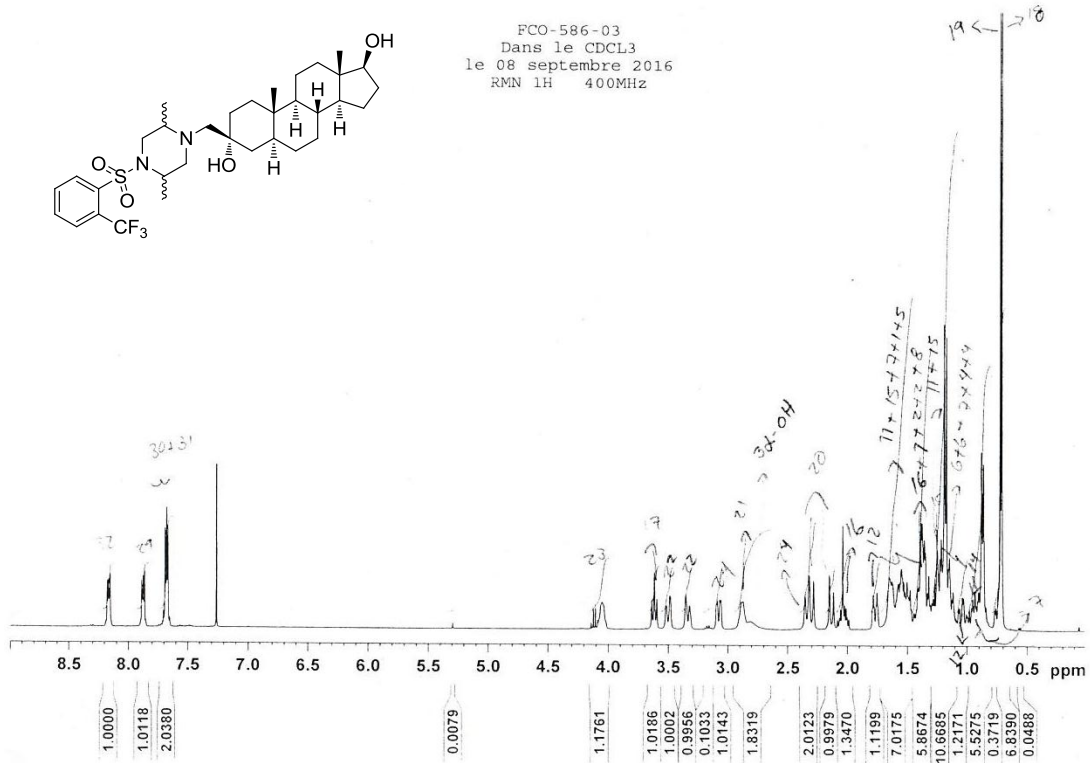


Peak Table

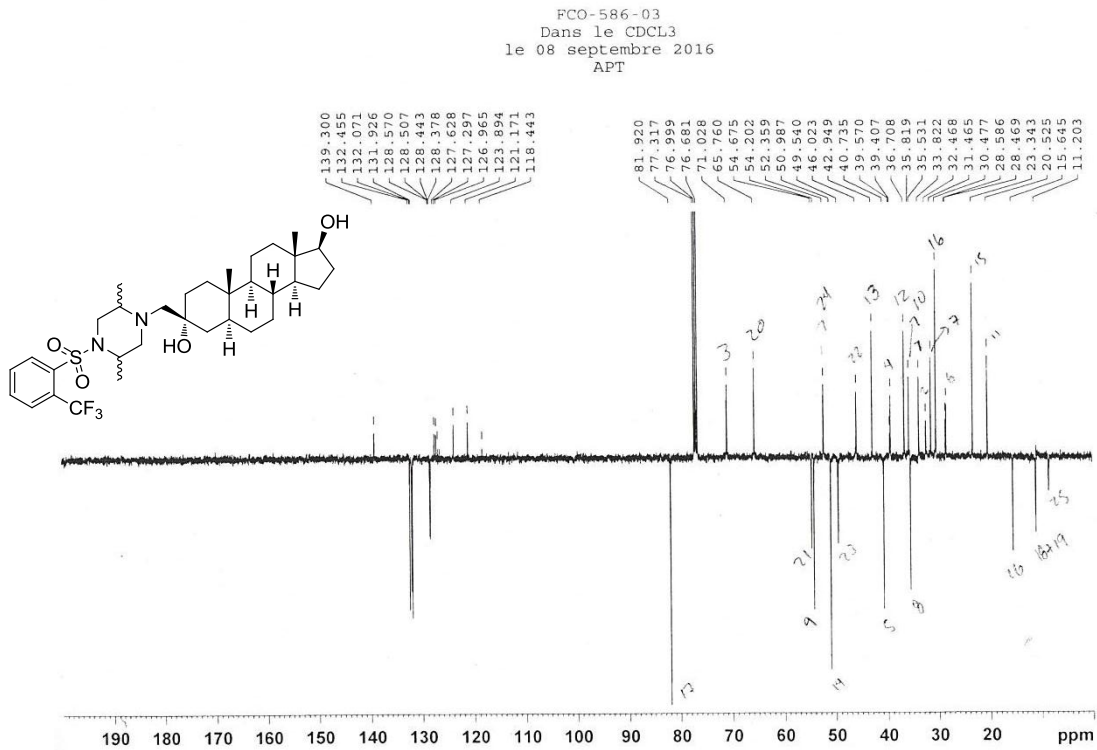
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	2.087	12579	0.305
2	5.146	22449	0.544
3	20.867	56561	1.370
4	21.265	24861	0.602
5	21.557	3820854	92.538
6	22.487	160553	3.888
7	23.042	31080	0.753
Total		4128937	100.000

Cromatograma 3: Compuesto 14c

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



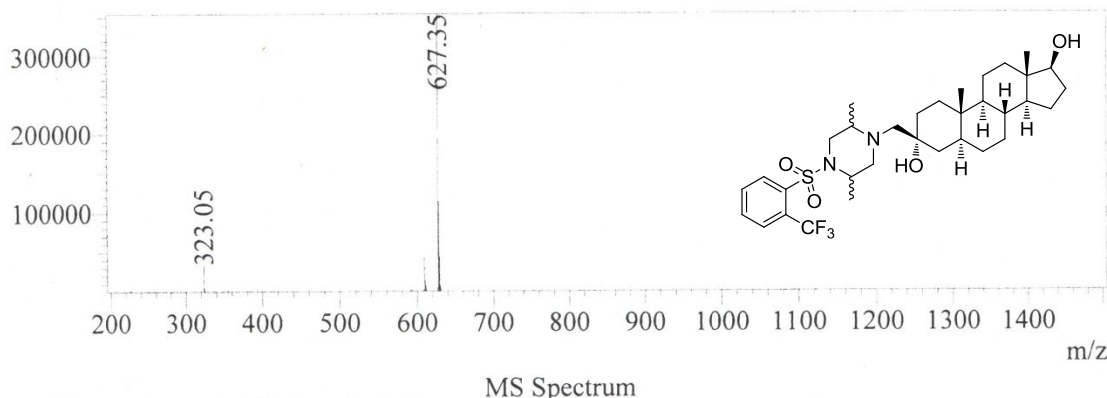
Espectro 197: RMN ¹H del compuesto 14d



Espectro 198: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14d

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:1 R.Time:17.142(Scan#:1030)
 MassPeaks:686
 Spectrum Mode:Averaged 17.133-17.167(1029-1031)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

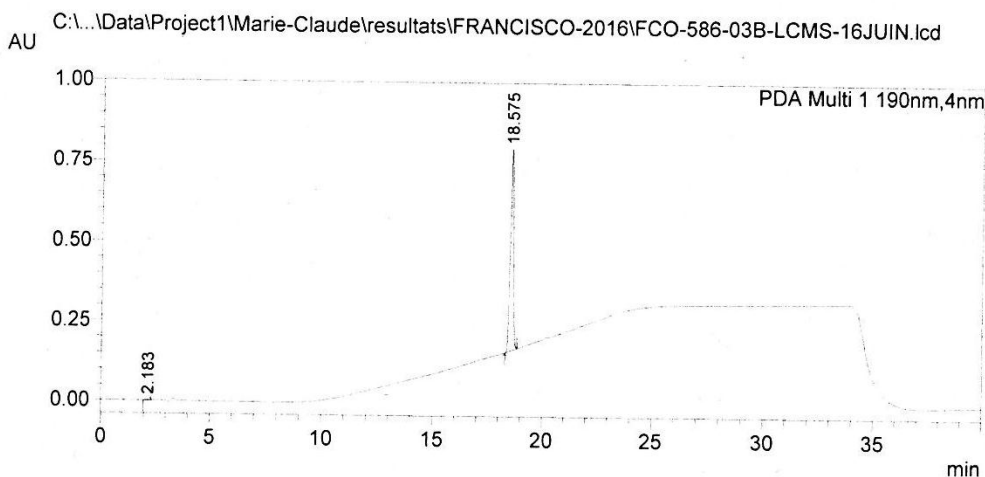


Espectro 199: Espectrometría de masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14d

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-03B-LCMS-16JUIIN.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-03B-LCMS-16JUIIN
 Sample ID : FCO-586-03B-LCMS-16JUIIN
 Tray# : 1
 Vial# : 70
 Injection Volume : 6
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-03B-I
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 ()
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 6/16/2016
 Month-Day Processed : 6/16/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>

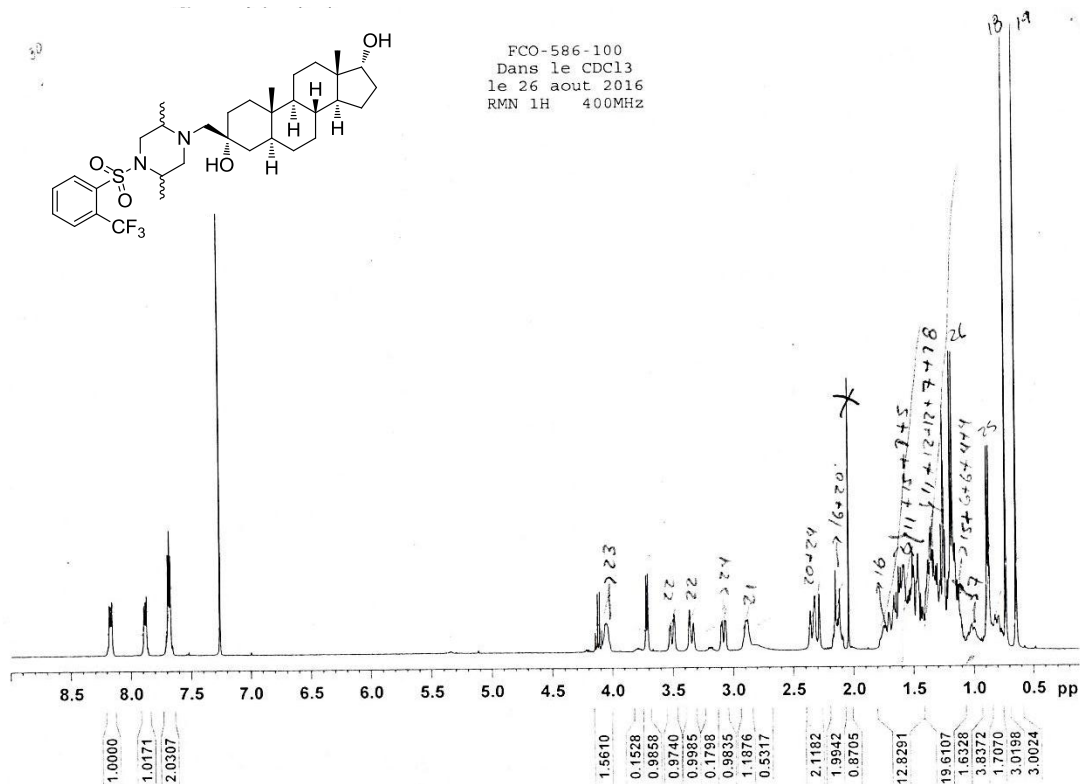


PDA Ch1 190nm

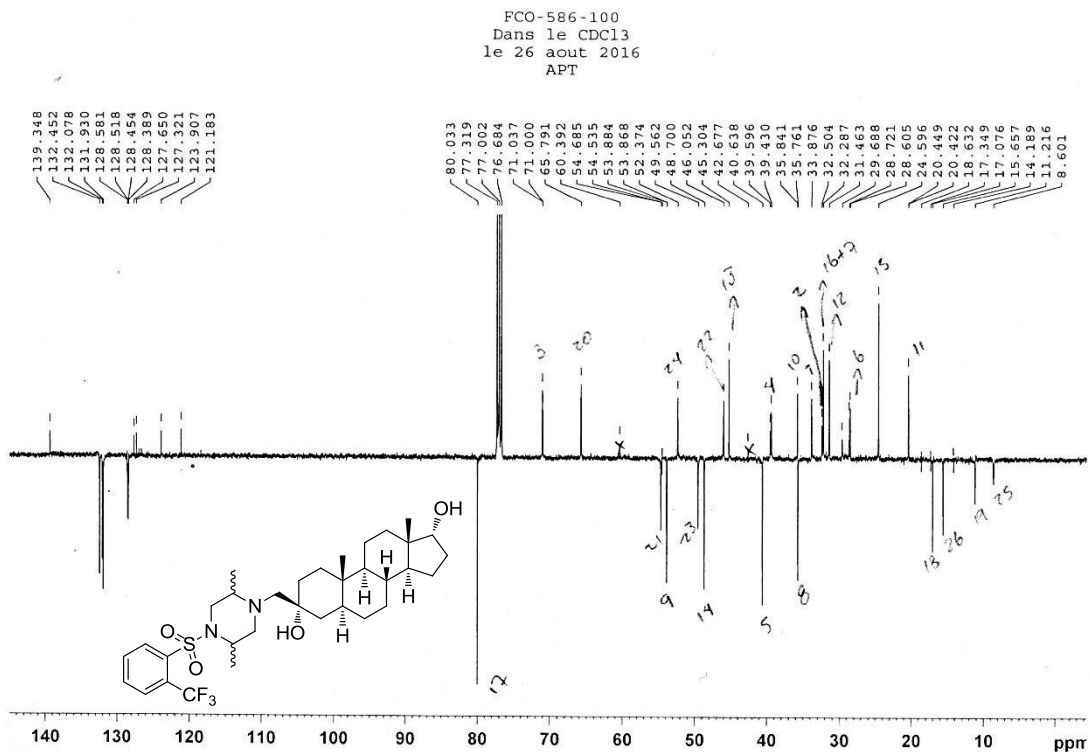
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	2.183	11808	0.188
2	18.575	6276295	99.812
Total		6288103	100.000

Cromatograma 4: Compuesto 14d

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



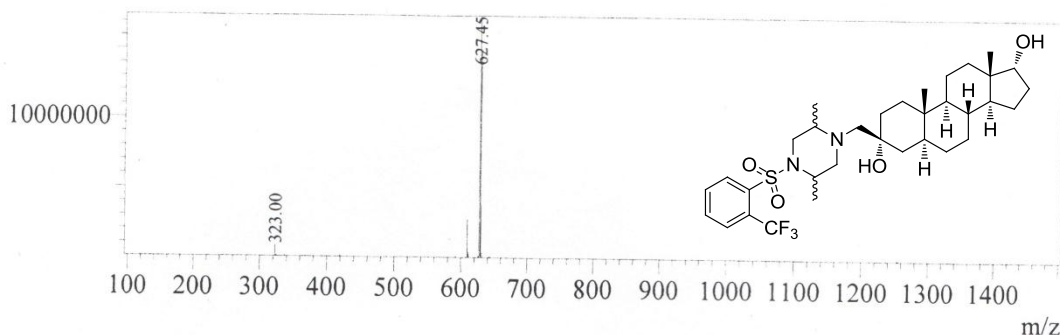
Espectro 200: RMN ¹H del compuesto 14e



Espectro 201: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14e

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:3 R.Time:20.253(Scan#:1216)
 Mass Spectrum
 MassPeaks:901
 Spectrum Mode:Averaged 20.233-20.267(1215-1217)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

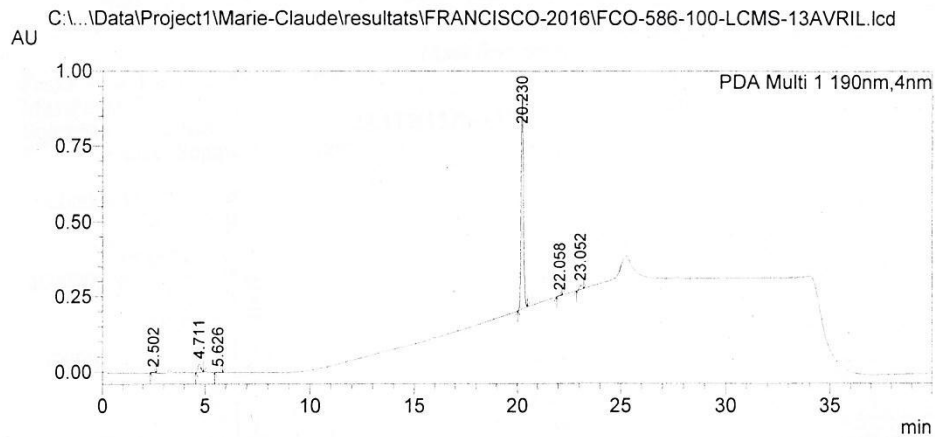


Espectro 202: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14e

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-100-LCMS-13AVRIL.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-100-LCMS-13AVRIL
 Sample ID : FCO-586-100-LCMS-13AVRIL
 Tray# : 1
 Vial# : 17
 Injection Volume : 7
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-100-1
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 ()
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 4/13/2016
 Month-Day Processed : 4/13/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>

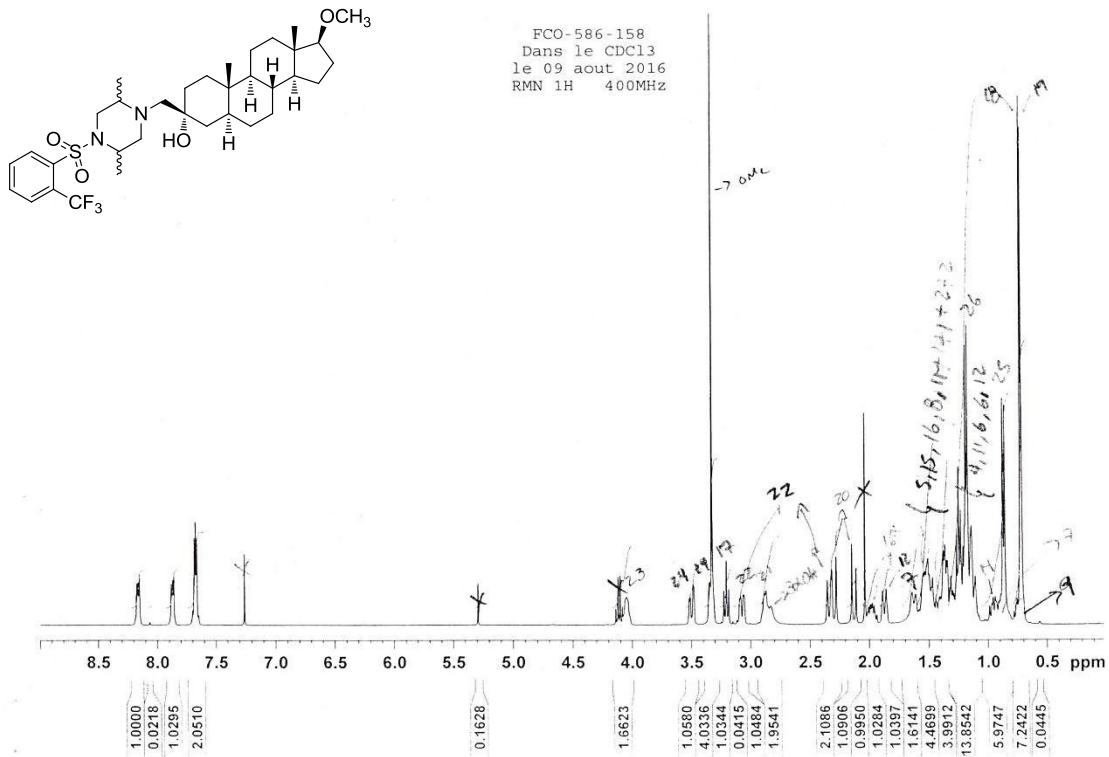


Peak Table

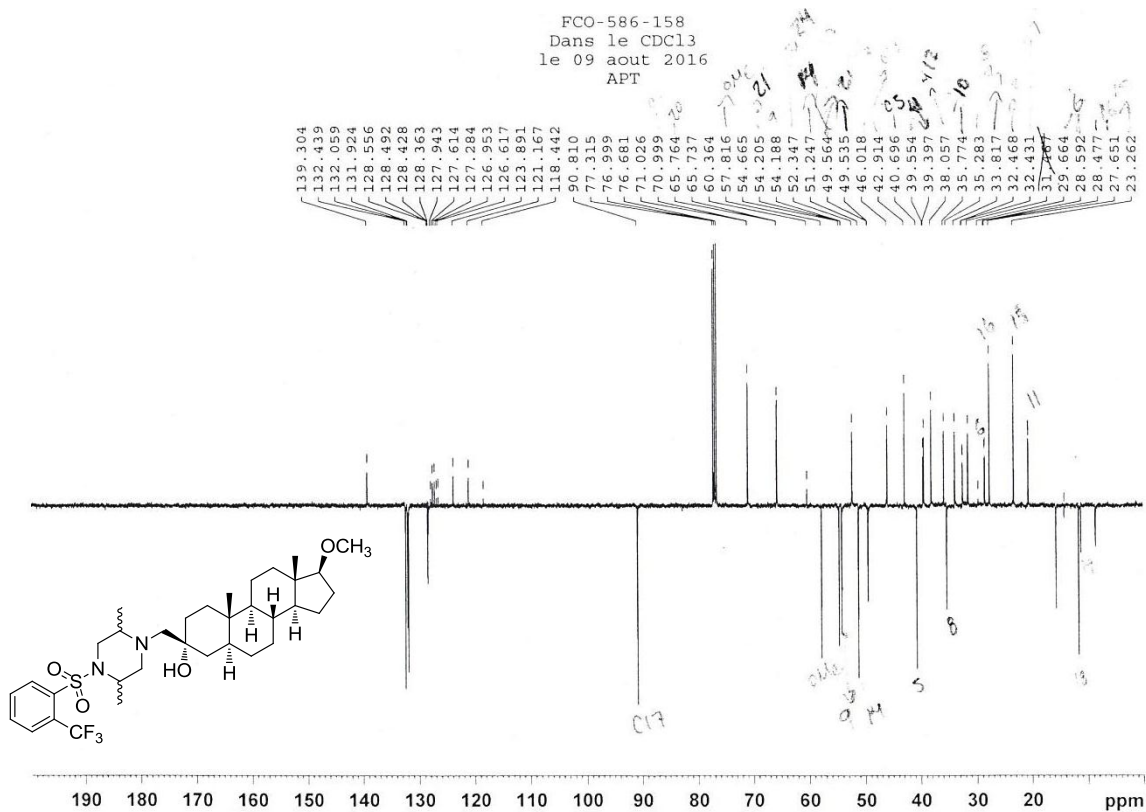
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	2.502	29222	0.484
2	4.711	267454	4.429
3	5.626	27849	0.461
4	20.230	5573097	92.293
5	22.058	28780	0.477
6	23.052	112070	1.856
Total		6038473	100.000

Cromatograma 5: Compuesto 14e

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



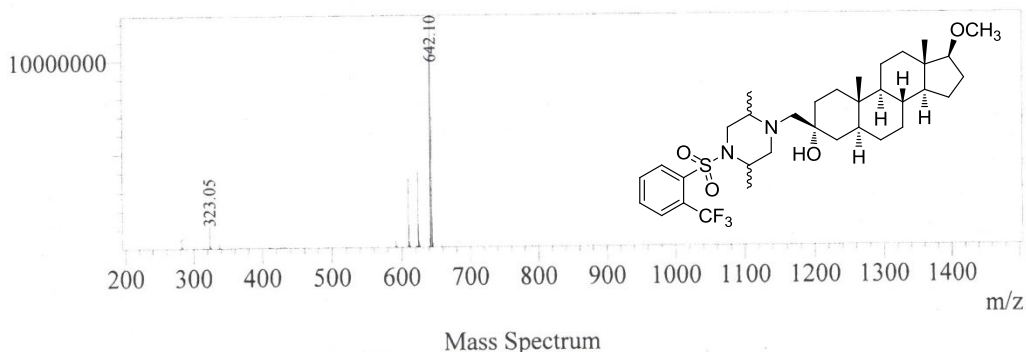
Espectro 203: RMN ¹H del compuesto 14f



Espectro 204: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14f

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Mass Spectrum
 Peak#:3 R.Time:21.972(Scan#:1319)
 MassPeaks:828
 Spectrum Mode:Averaged 21.950-21.983(1318-1320)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

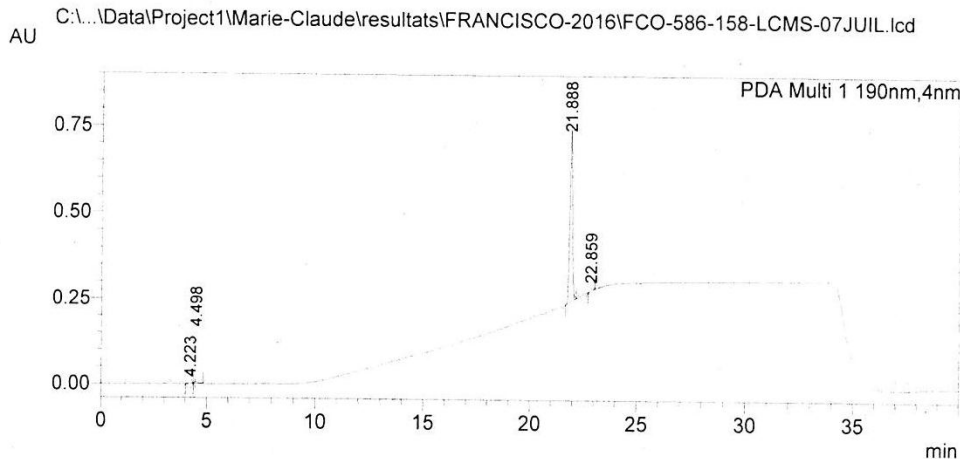


Espectro 205: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI*) del compuesto 14f

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-158-LCMS-07JUIL.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-158-LCMS-07JUIL
 Sample ID : FCO-586-158-LCMS-07JUIL
 Tray# : 1
 Vial# : 62
 Injection Volume : 6
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-158-l
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 (
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 7/7/2016
 Month-Day Processed : 7/7/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>



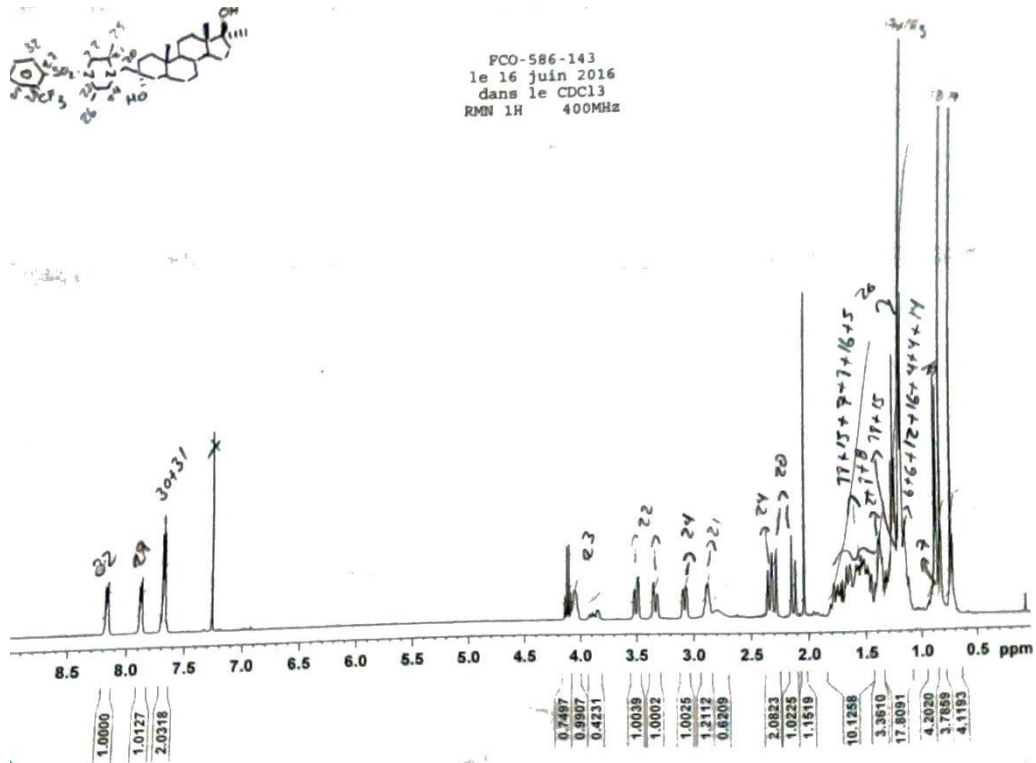
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	4.223	52372	1.225
2	4.498	64421	1.507
3	21.888	4091978	95.728
4	22.859	65820	1.540
Total		4274592	100.000

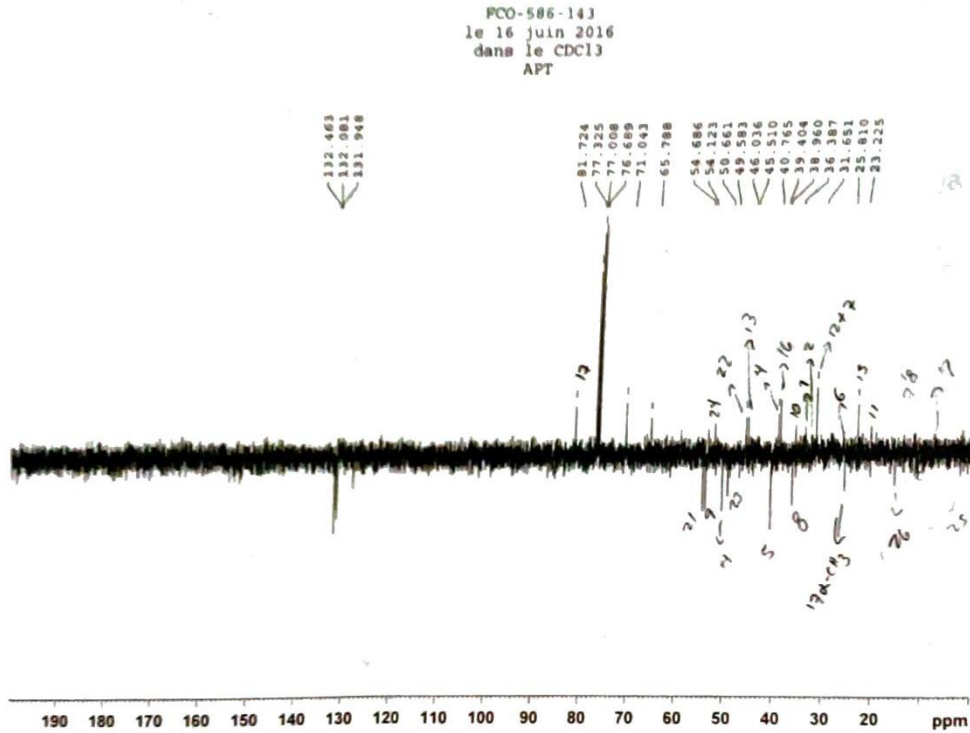
PDA Ch1 190nm

Cromatograma 6: Compuesto 14f

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

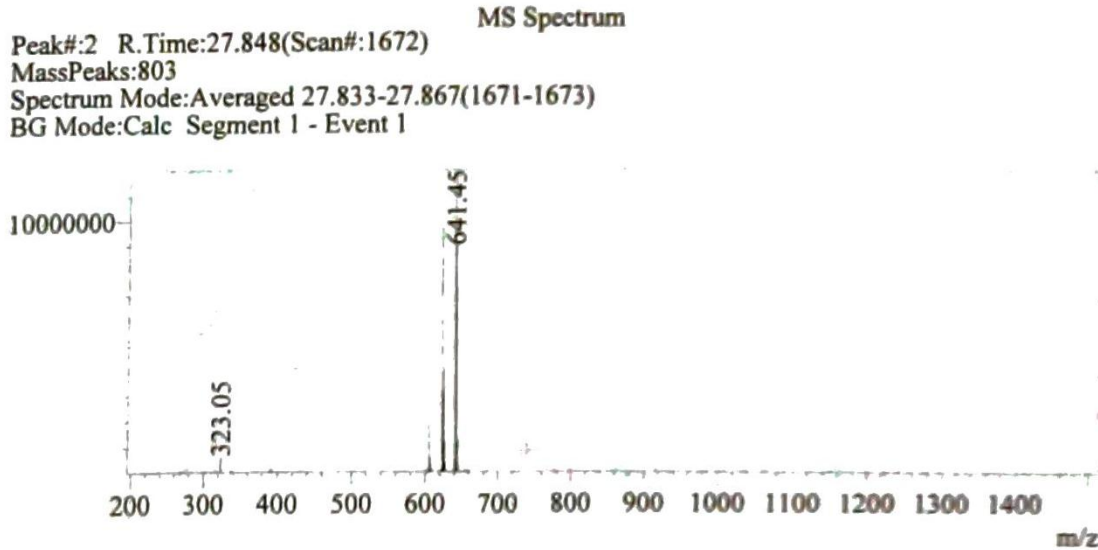


Espectro 206: RMN ¹H del compuesto 14g



Espectro 207: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14g

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



Espectro 208: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14g



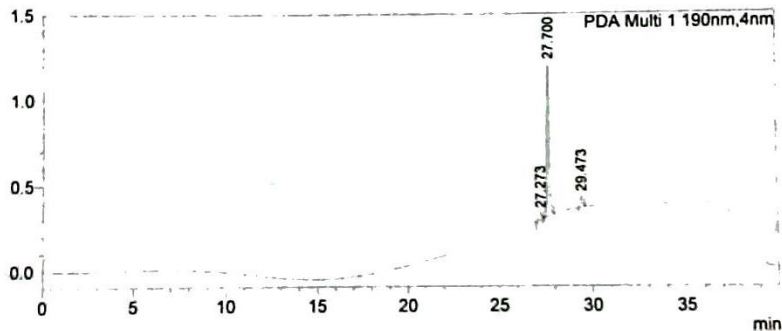
==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

```

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-143-LCMS-9JUIN.lcd
Acquired by      : System Administrator
Sample Name     : FCO-586-143-LCMS-9JUIN
Sample ID      : FCO-586-143-LCMS-9JUIN
Tray#          : 1
Vial#         : 50
Injection Volume : 6
Data File      : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-143-1
Method File    : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 (
Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
Month-Day Acquired : 6/9/2016
Month-Day Processed : 6/9/2016
Comment        : APCI+ SUR C18
                : MEQH:H2O 70:30
    
```

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-143-LCMS-9JUIN.lcd
 AU

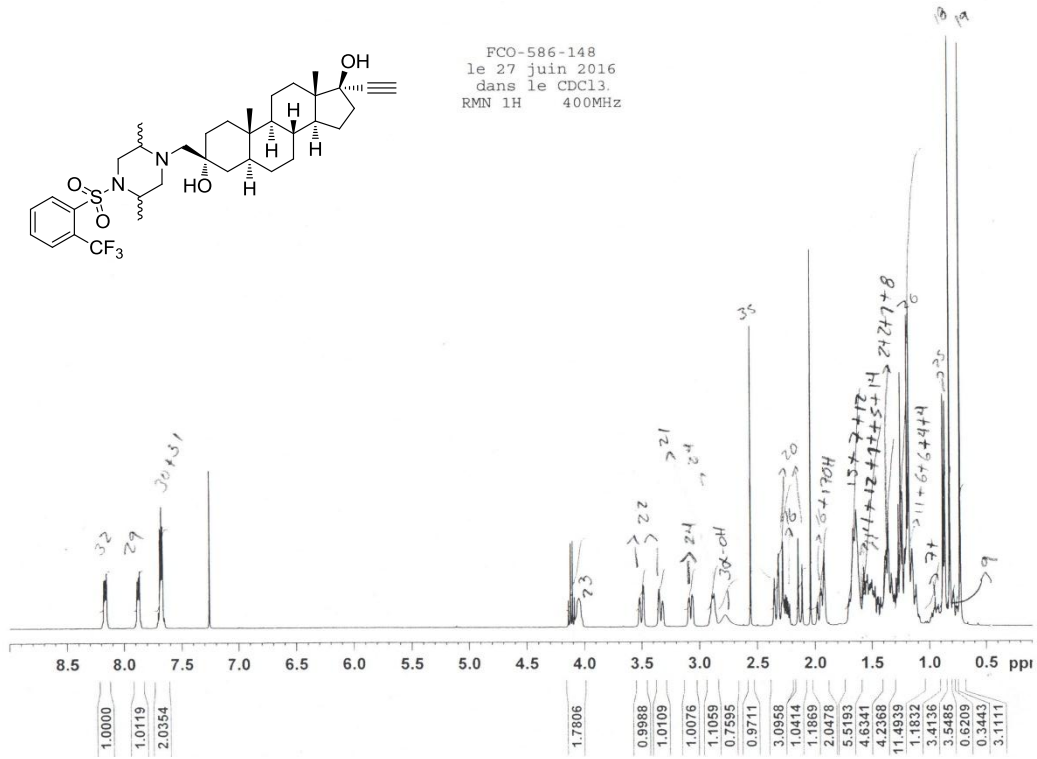


Peak Table

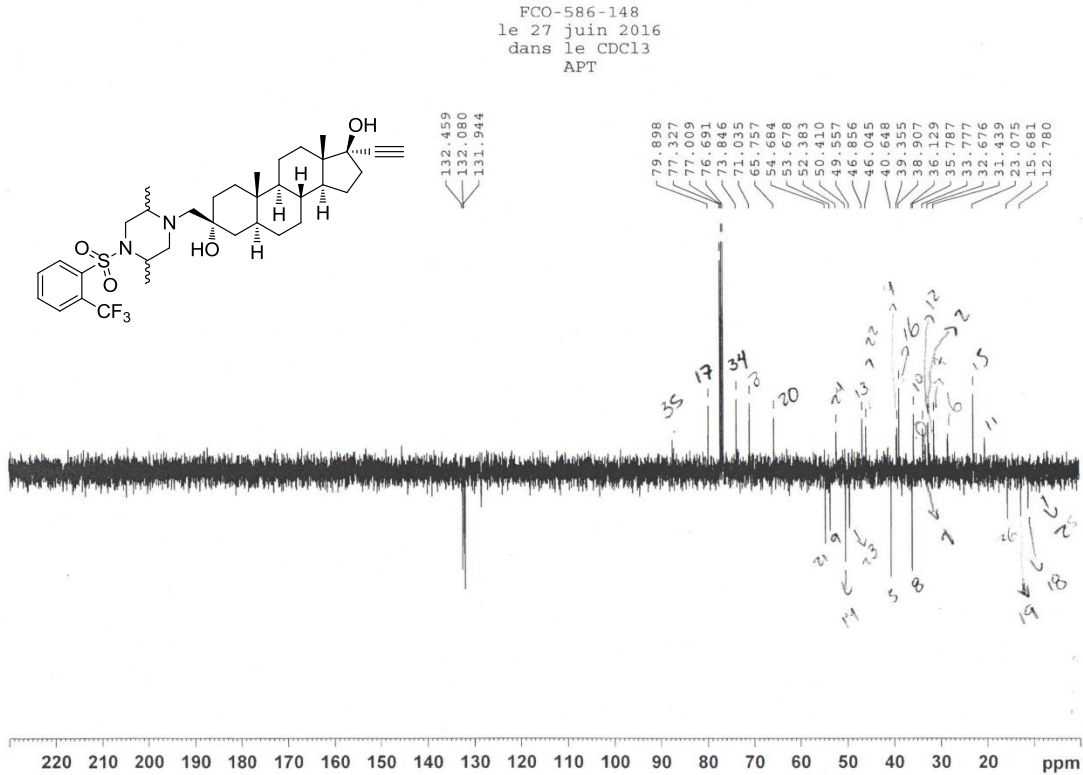
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	27.273	462074	5.860
2	27.700	6881298	87.267
3	29.473	541995	6.873
Total		7885366	100.000

Cromatograma 7: Compuesto 14g

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



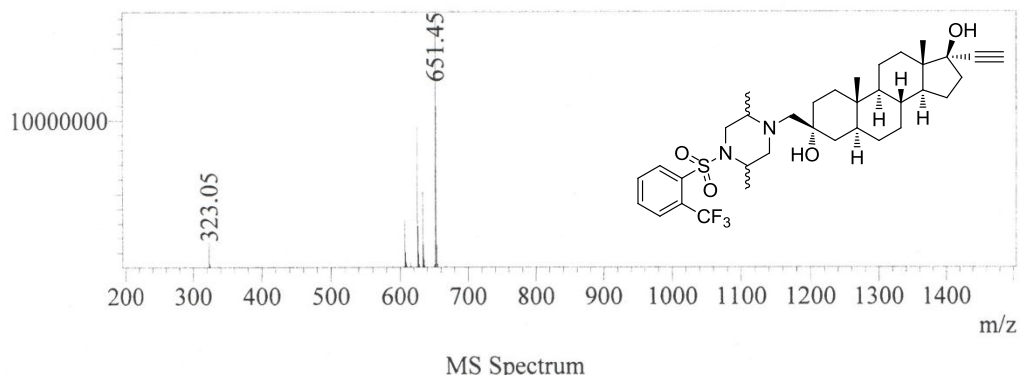
Espectro 209: RMN ¹H del compuesto 14h



Espectro 210: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14h

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:1 R.Time:18.255(Scan#:1096)
MassPeaks:915
Spectrum Mode:Averaged 18.233-18.267(1095-1097)
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

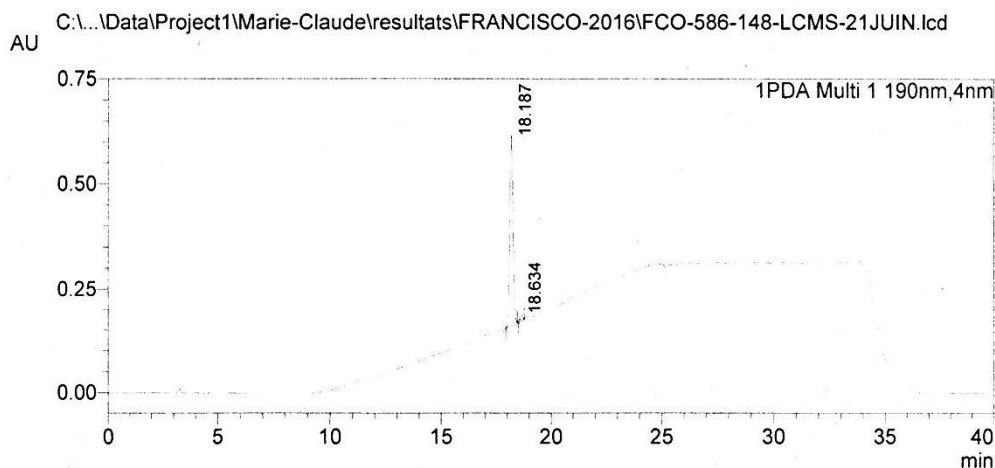


Espectro 211: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14h

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-148-LCMS-21JUIIN.lcd
Acquired by : System Administrator
Sample Name : FCO-586-148-LCMS-21JUIIN
Sample ID : FCO-586-148-LCMS-21JUIIN
Tray# : 1
Vial# : 93
Injection Volume : 6
Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-148-1
Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 ()
Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
Month-Day Acquired : 6/21/2016
Month-Day Processed : 6/21/2016
Comment : APCI+ SUR C18
 : MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>

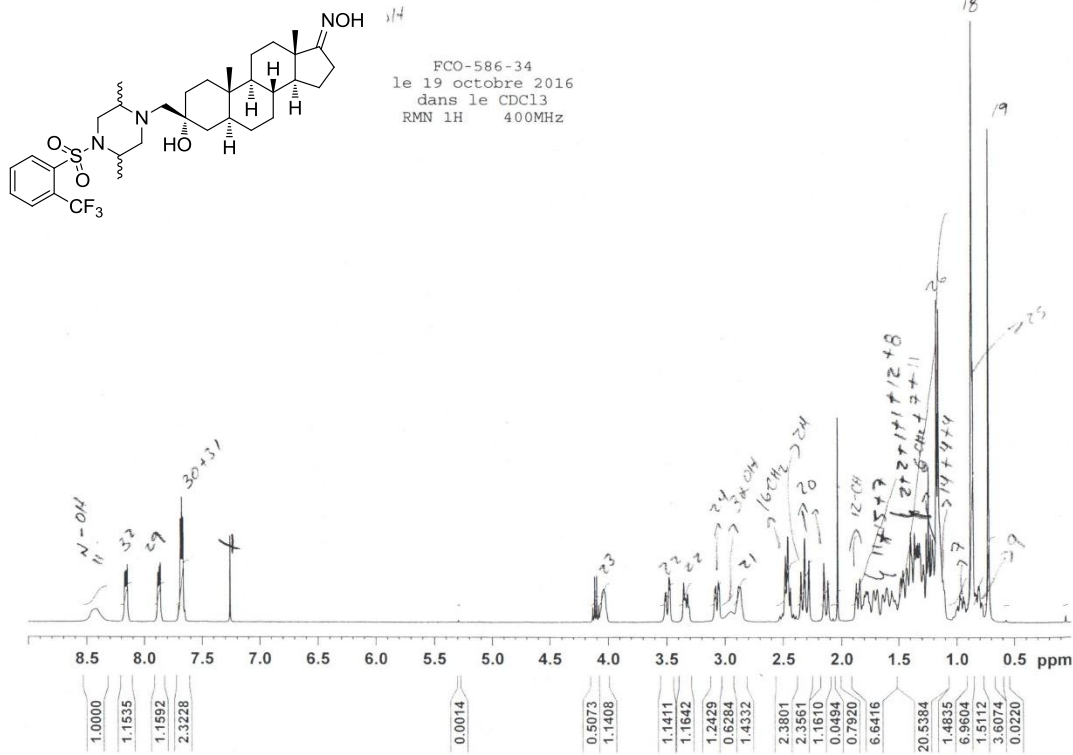


Peak Table

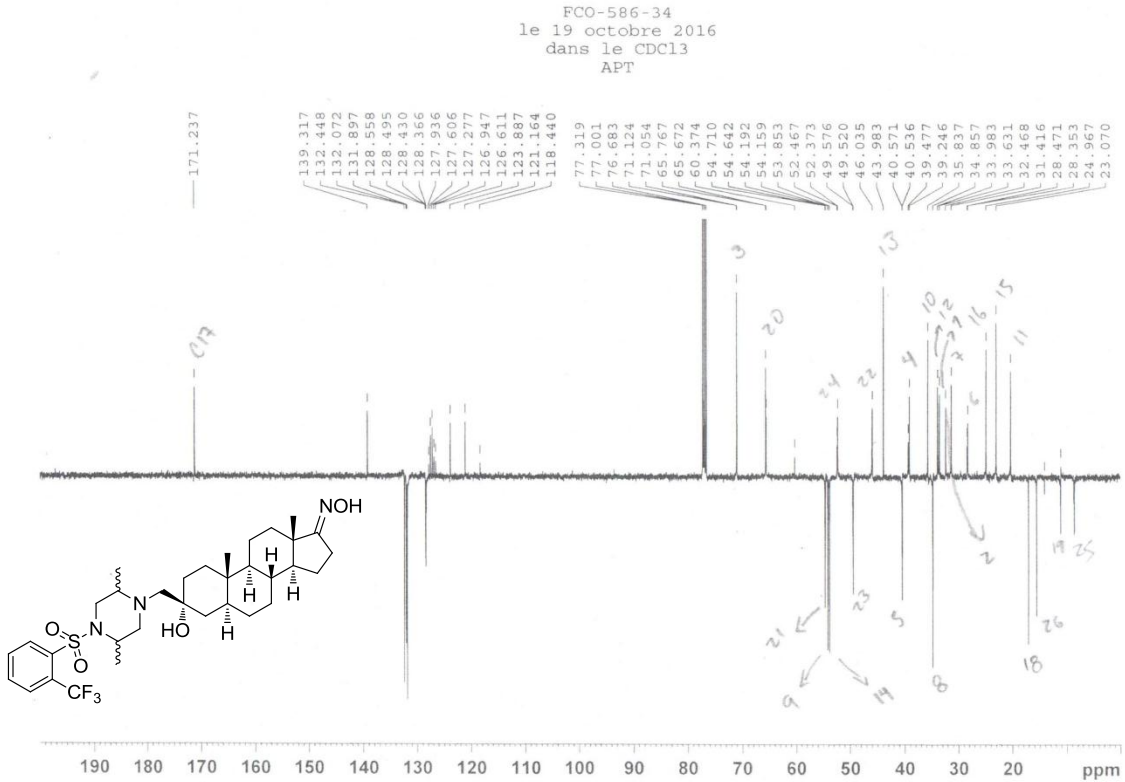
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	18.187	4543985	98.858
2	18.634	52473	1.142
Total		4596458	100.000

Cromatograma 8: Compuesto 14h (columna Luna C18)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



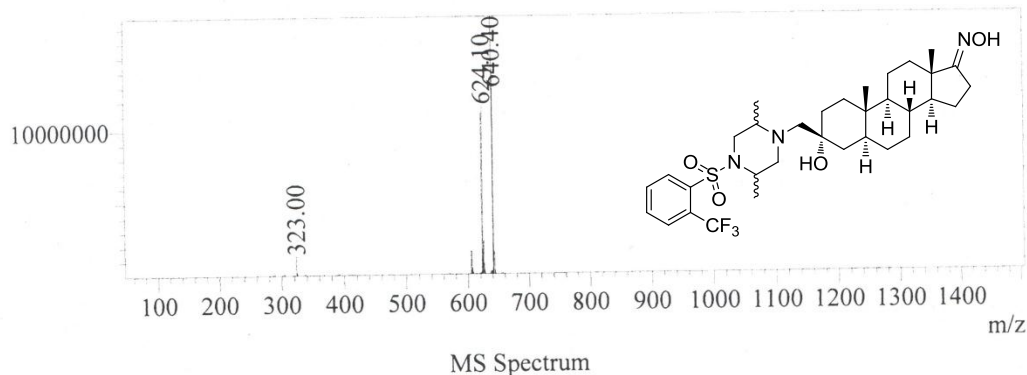
Espectro 212: RMN ¹H del compuesto 14i



Espectro 213: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14i

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:1 R.Time:18.331(Scan#:1101)
 MassPeaks:1085
 Spectrum Mode:Averaged 18.317-18.350(1100-1102)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

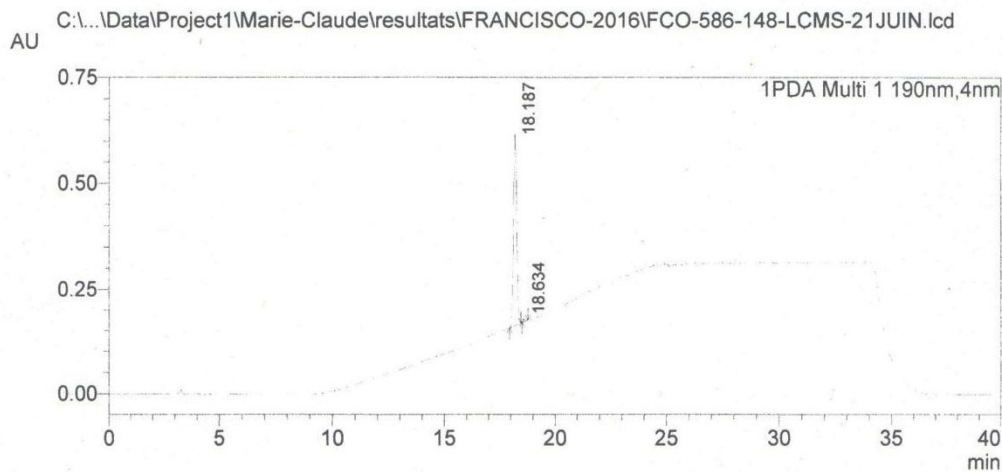


Espectro 214: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14i

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-148-LCMS-21JUIIN.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-148-LCMS-21JUIIN
 Sample ID : FCO-586-148-LCMS-21JUIIN
 Tray# : 1
 Vial# : 93
 Injection Volume : 6
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-148-L
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 (r
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 6/21/2016
 Month-Day Processed : 6/21/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

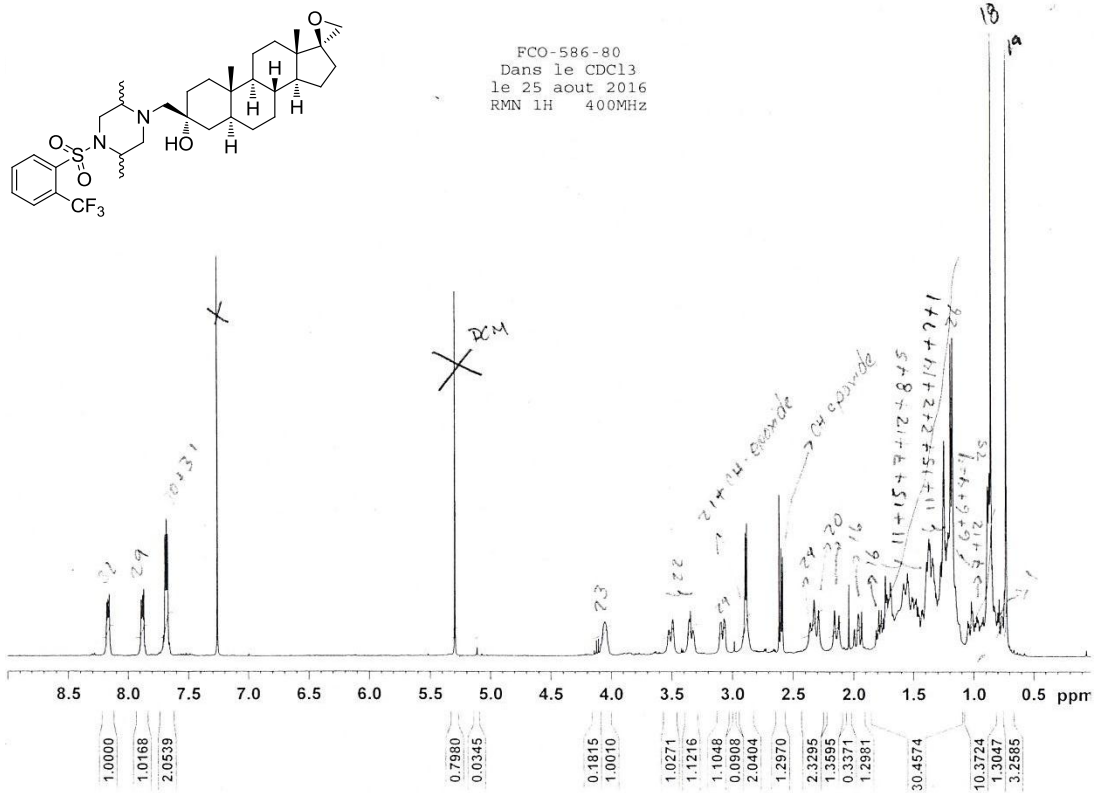
<Chromatogram>



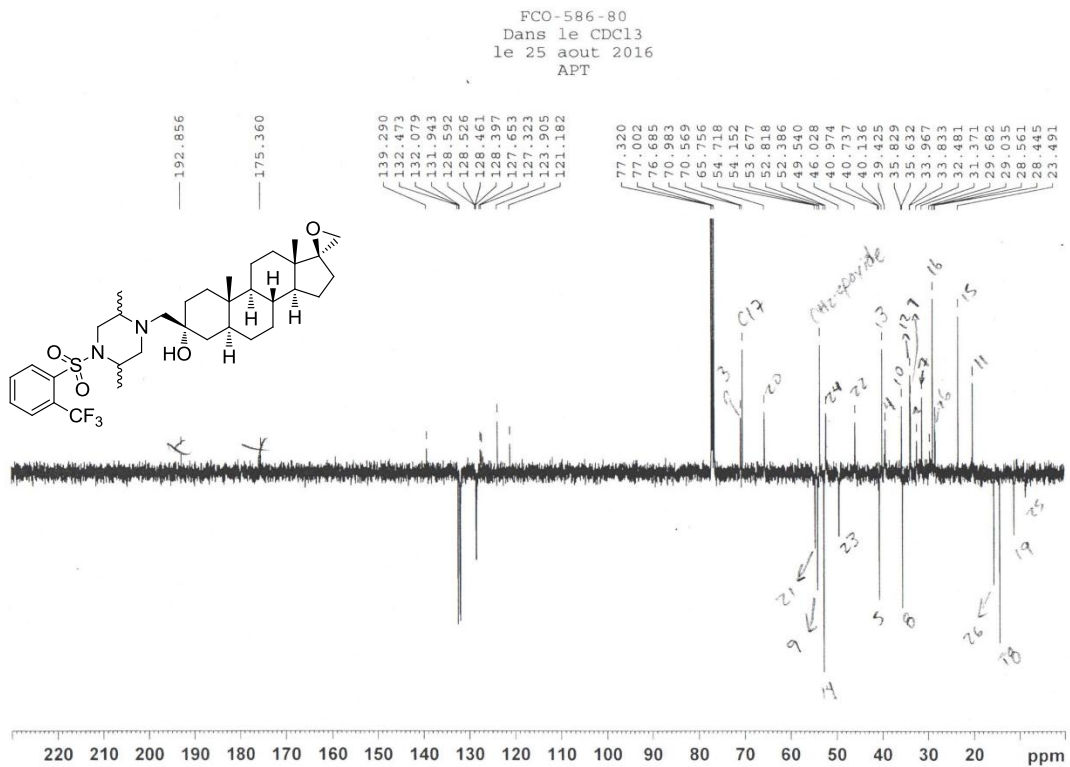
PDA Ch1 190nm			
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	18.187	4543985	98.858
2	18.634	52473	1.142
Total		4596458	100.000

Cromatograma 9: Compuesto 14i (columna Luna C18)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



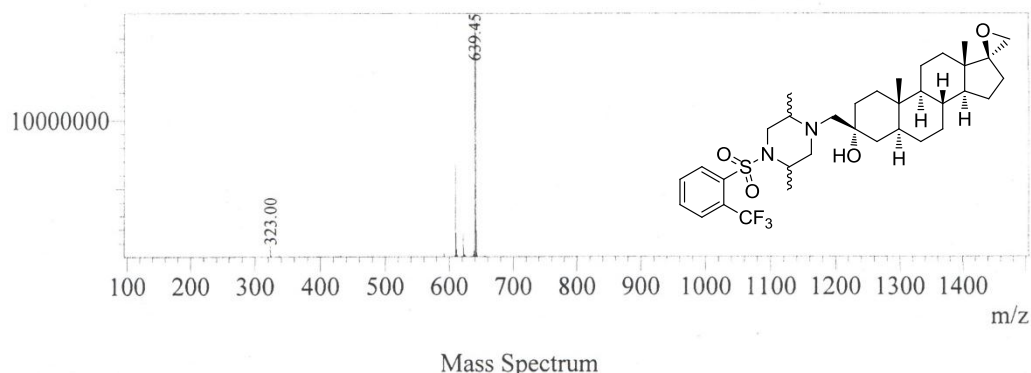
Espectro 215: RMN ¹H del compuesto 14j



Espectro 216: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14j

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:6 R.Time:20.806(Scan#:1249)
 MassPeaks:859
 Spectrum Mode:Averaged 20.783-20.817(1248-1250)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



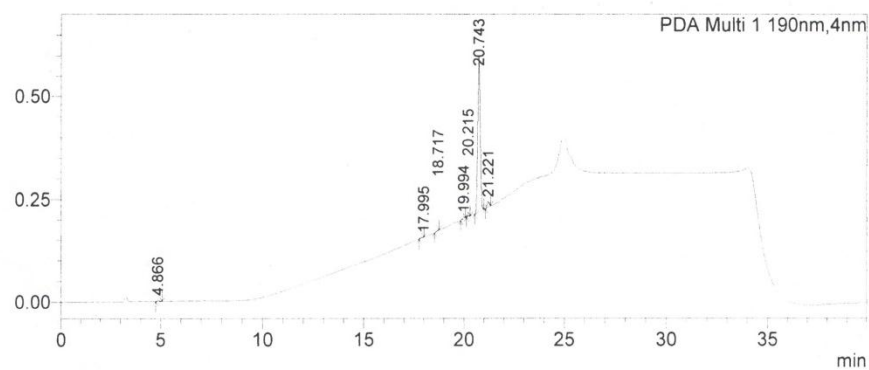
Espectro 217: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14j

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-80-2-LCMS-13AVRIL.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-80-2-LCMS-13AVRIL
 Sample ID : FCO-586-80-2-LCMS-13AVRIL
 Tray# : 1
 Vial# : 16
 Injection Volume : 7
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-80-2-
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 (
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 4/13/2016
 Month-Day Processed : 4/13/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>

C:\...Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-80-2-LCMS-13AVRIL.lcd
 AU

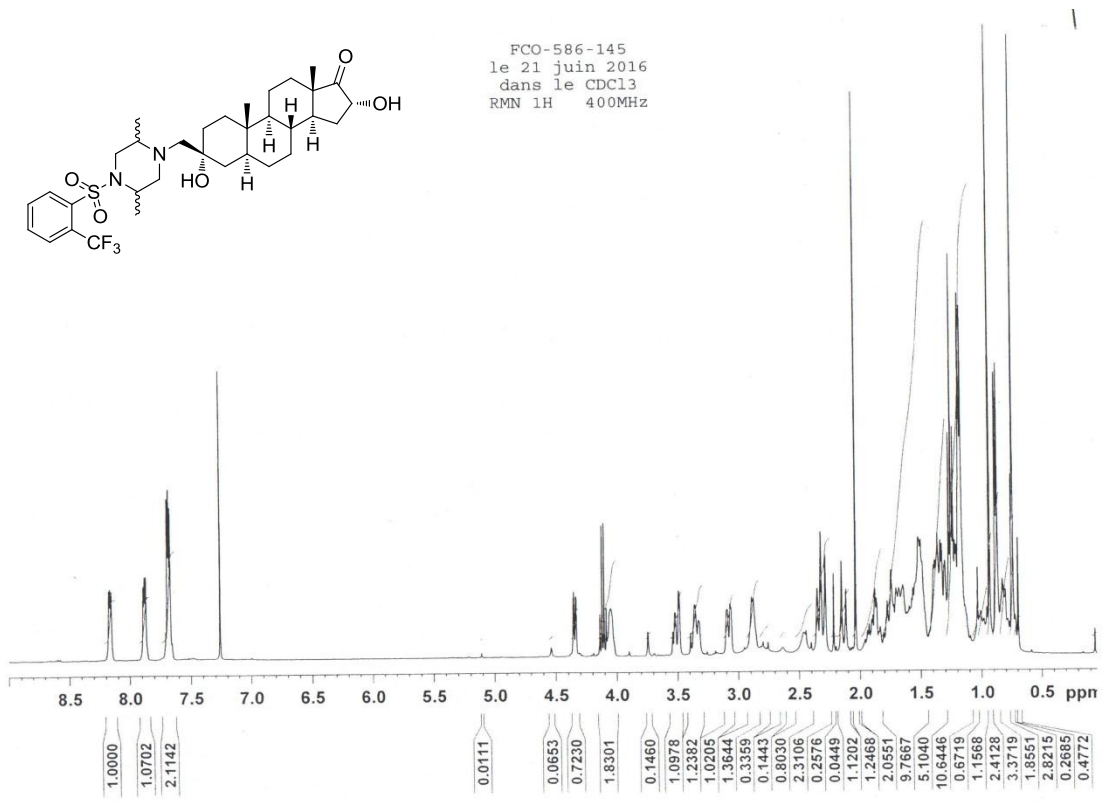


Peak Table

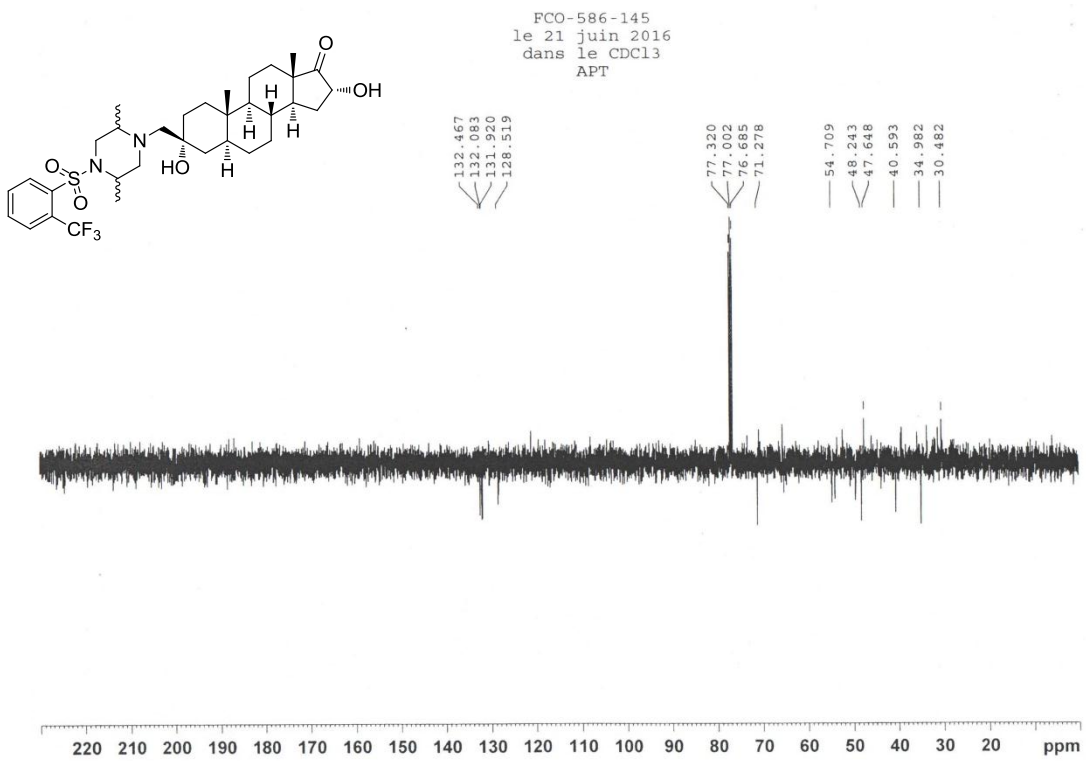
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	4.866	25589	0.731
2	17.995	20050	0.572
3	18.717	19856	0.567
4	19.994	41949	1.198
5	20.215	17917	0.511
6	20.743	3276399	93.535
7	21.221	101106	2.886
Total		3502866	100.000

Cromatograma 10: Compuesto 14j (columna Luna C18)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



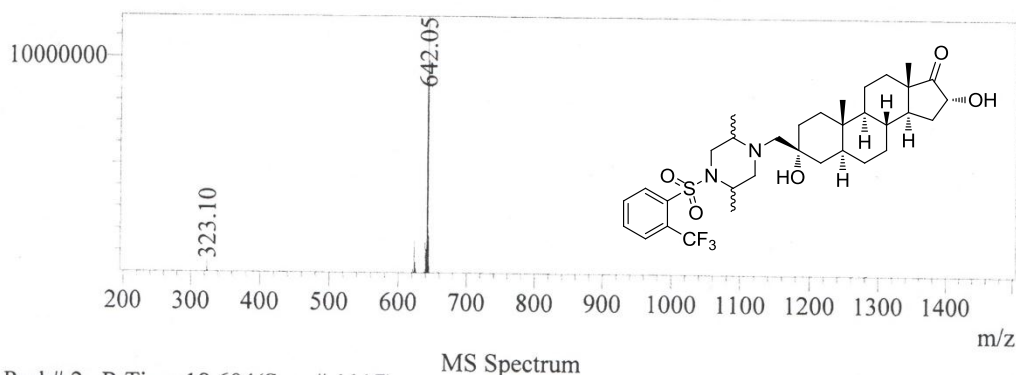
Espectro 218: RMN ¹H del compuesto 14k



Espectro 219: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14k

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:1 R.Time:16.834(Scan#:1011)
 MassPeaks:862
 Spectrum Mode:Averaged 16.817-16.850(1010-1012)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

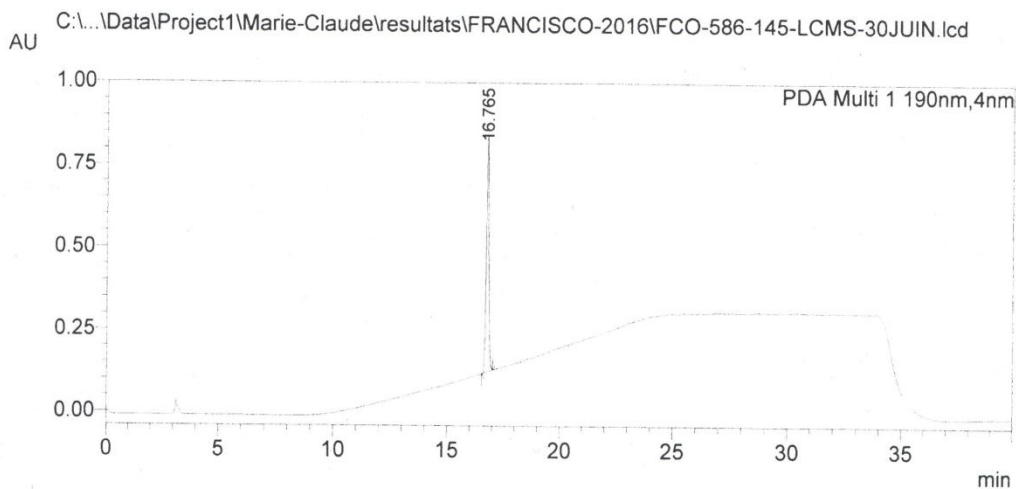


Espectro 220: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14k

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-145-LCMS-30JUIN.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-145-LCMS-30JUIN
 Sample ID : FCO-586-145-LCMS-30JUIN
 Tray# : 1
 Vial# : 76
 Injection Volume : 6
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-145-l
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 ()
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 6/30/2016
 Month-Day Processed : 6/30/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>

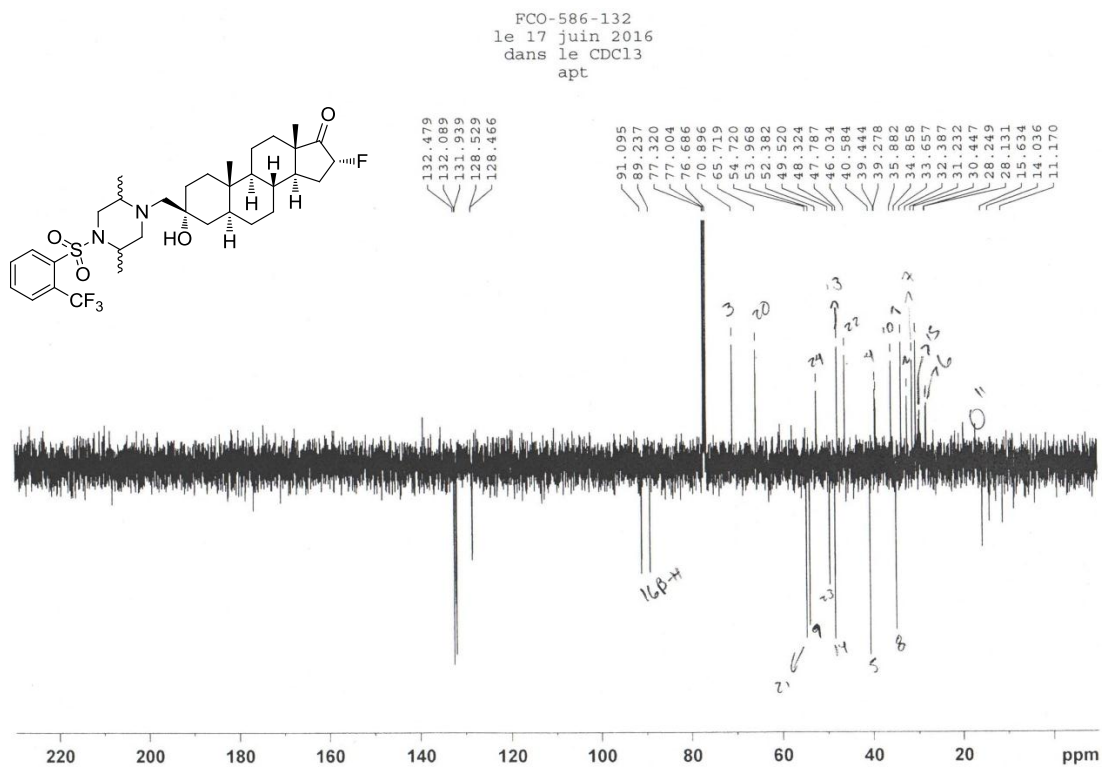
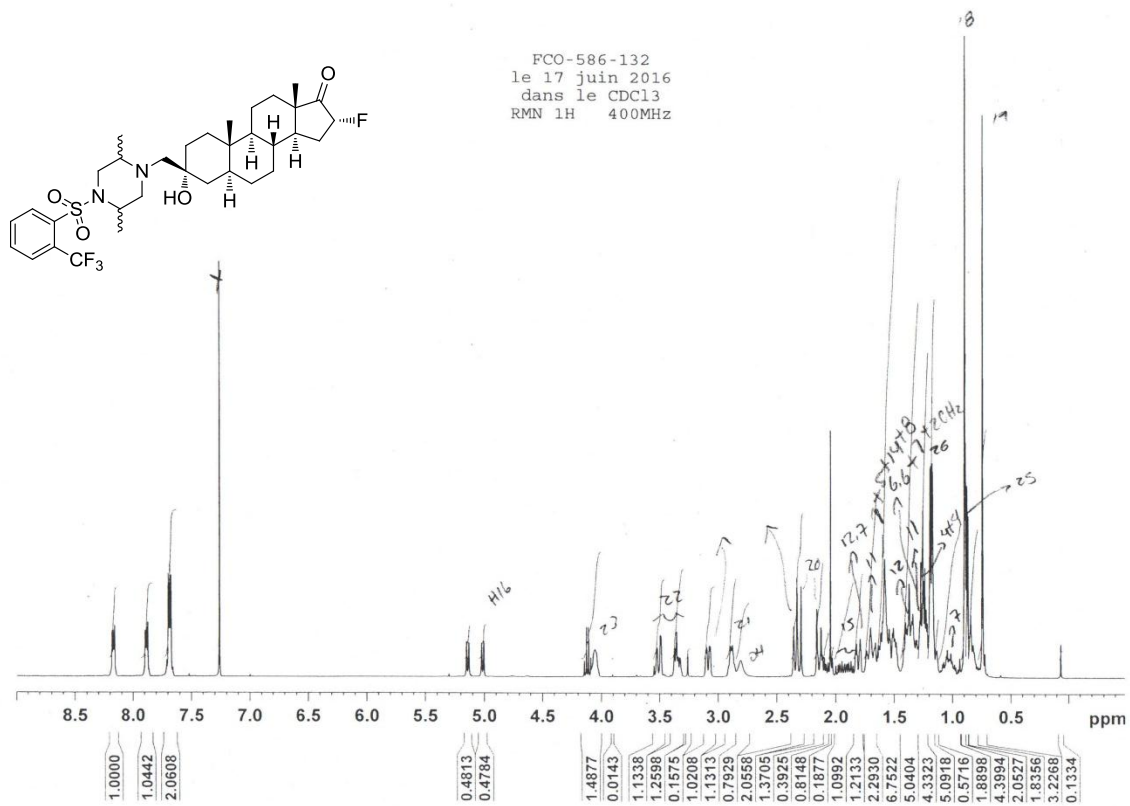


PDA Ch1 190nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	16.765	5547522	100.000
Total		5547522	100.000

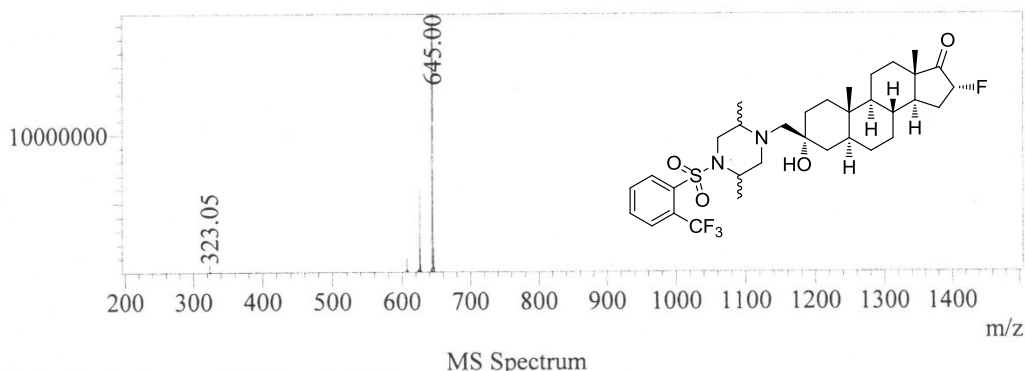
Cromatograma 11: Compuesto 14k (columna Luna C18)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:1 R.Time:27.047(Scan#:1624)
MassPeaks:828
Spectrum Mode:Averaged 27.033-27.067(1623-1625)
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

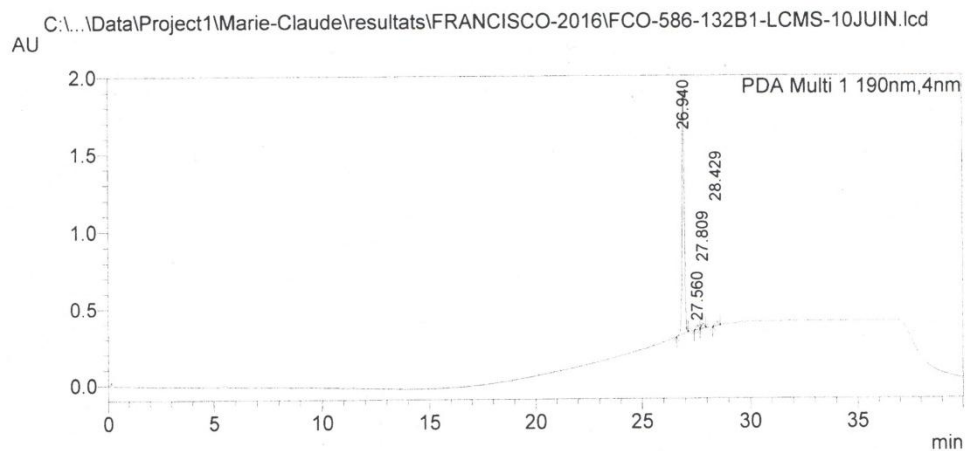


Espectro 223: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14I

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-132B1-LCMS-10JUN.lcd
Acquired by : System Administrator
Sample Name : FCO-586-132B1-LCMS-10JUN
Sample ID : FCO-586-132B1-LCMS-10JUN
Tray# : 1
Vial# : 61
Injection Volume : 6
Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-132B
Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS_Jennybatch70-30 ()
Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
Month-Day Acquired : 6/10/2016
Month-Day Processed : 6/10/2016
Comment : APCI+ SUR C18
 : MEQH:H2O 70:30

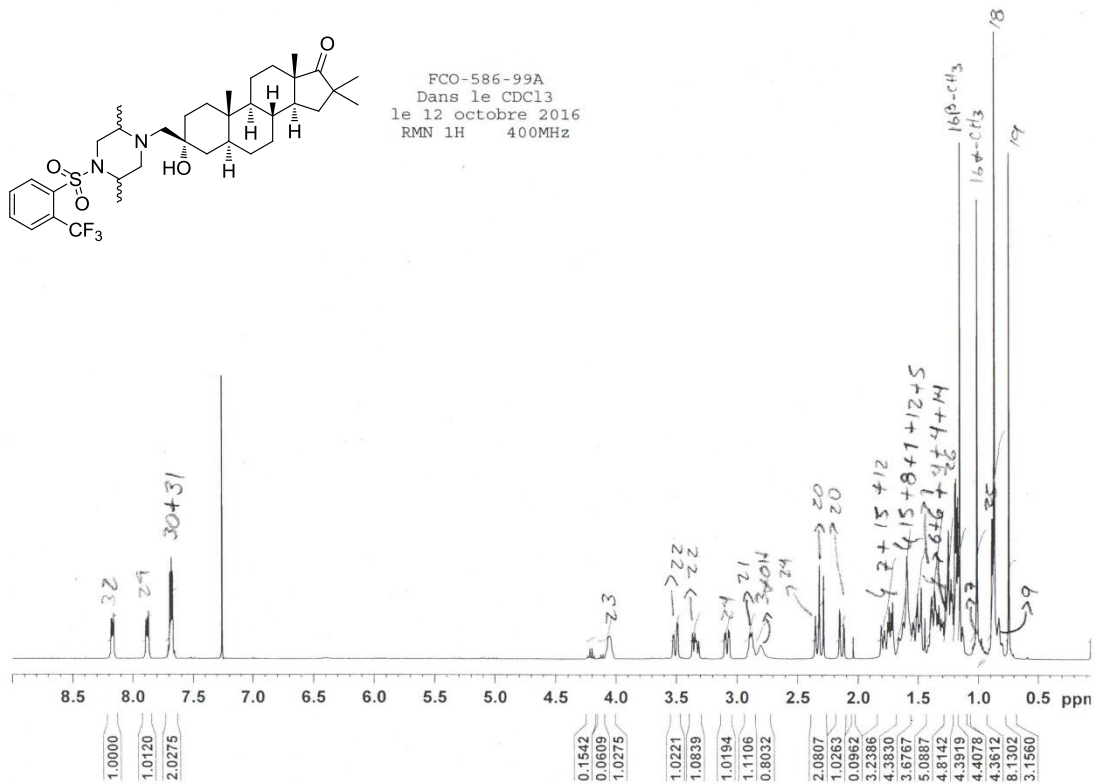
<Chromatogram>



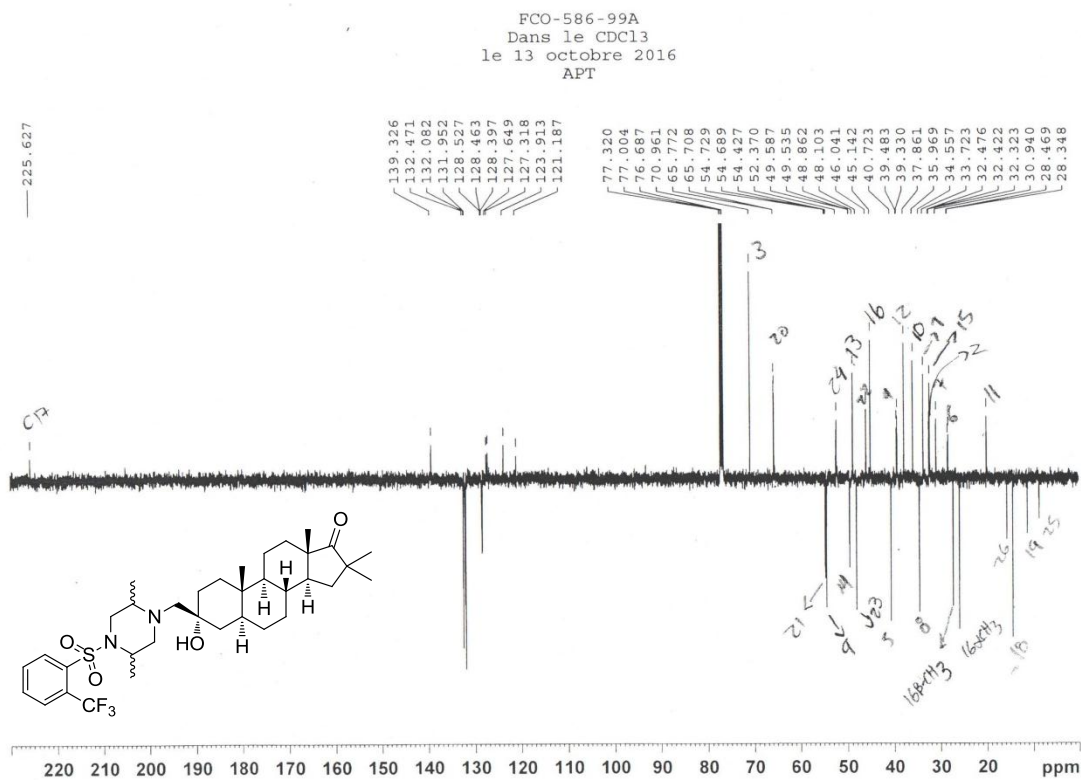
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	26.940	11105209	93.169
2	27.560	216015	1.812
3	27.809	303541	2.547
4	28.429	294687	2.472
Total		11919453	100.000

Cromatograma 12: Compuesto 14I (columna Luna C18)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



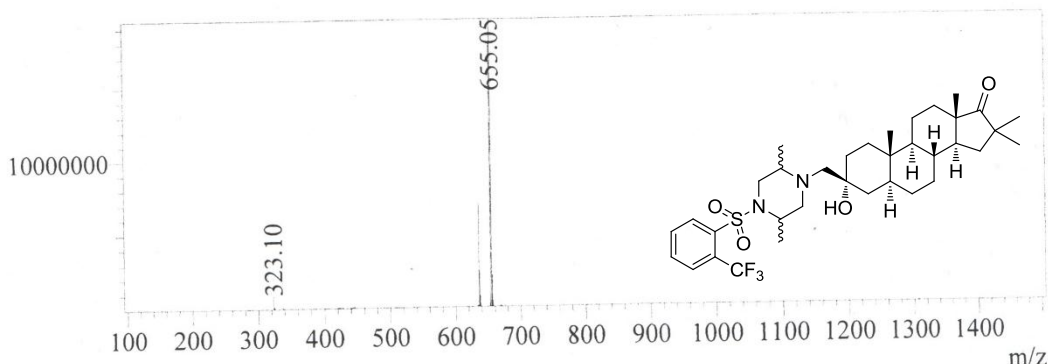
Espectro 224: RMN ¹H del compuesto 14m



Espectro 225: RMN ¹³C (experimento APT) del compuesto 14m

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:2 R.Time:20.428(Scan#:1227)
 MassPeaks:879
 Spectrum Mode:Averaged 20.417-20.450(1226-1228)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

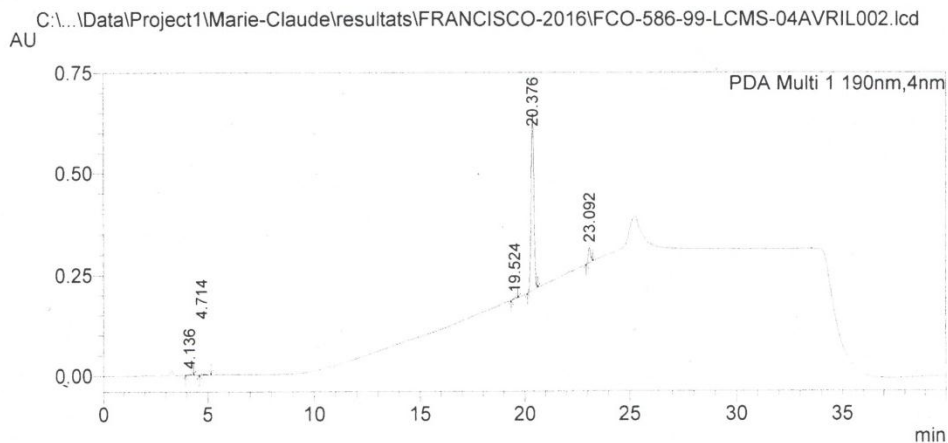


Espectro 226: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14m

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-99-LCMS-04AVRIL002.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-99-LCMS-04AVRIL
 Sample ID : FCO-586-99-LCMS-04AVRIL002
 Tray# : 1
 Vial# : 21
 Injection Volume : 7
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-99-L
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 (
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 4/5/2016
 Month-Day Processed : 4/5/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>

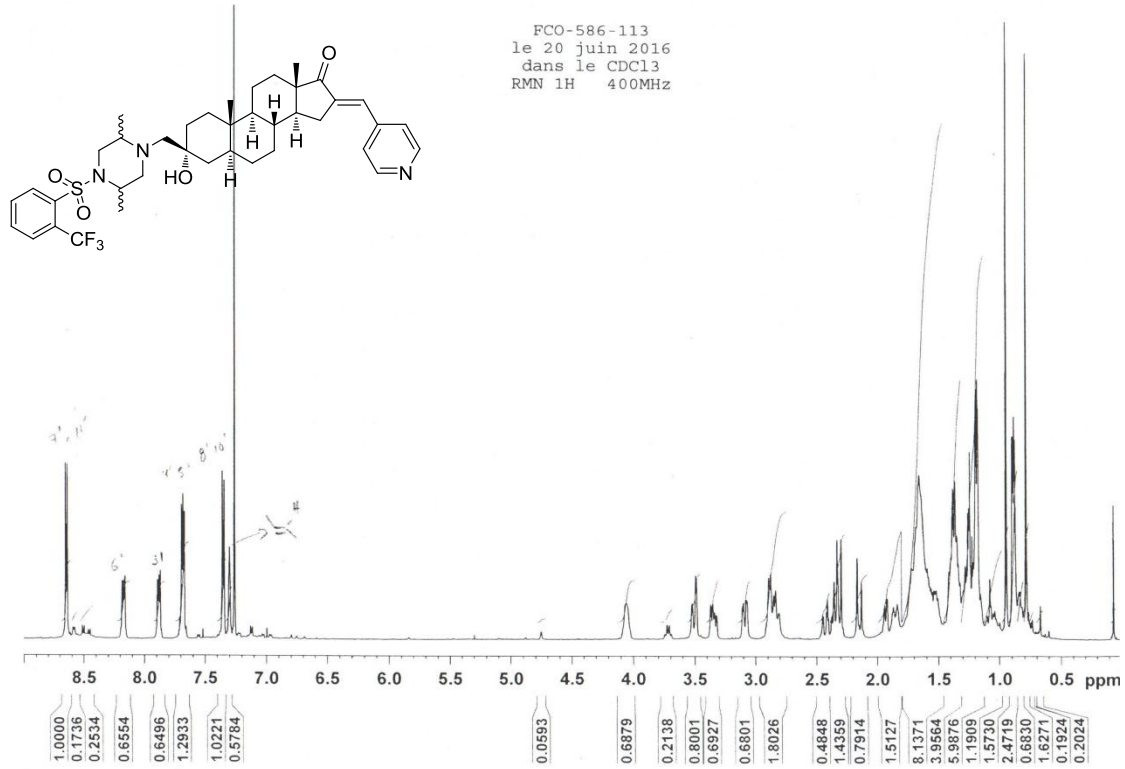


Peak Table

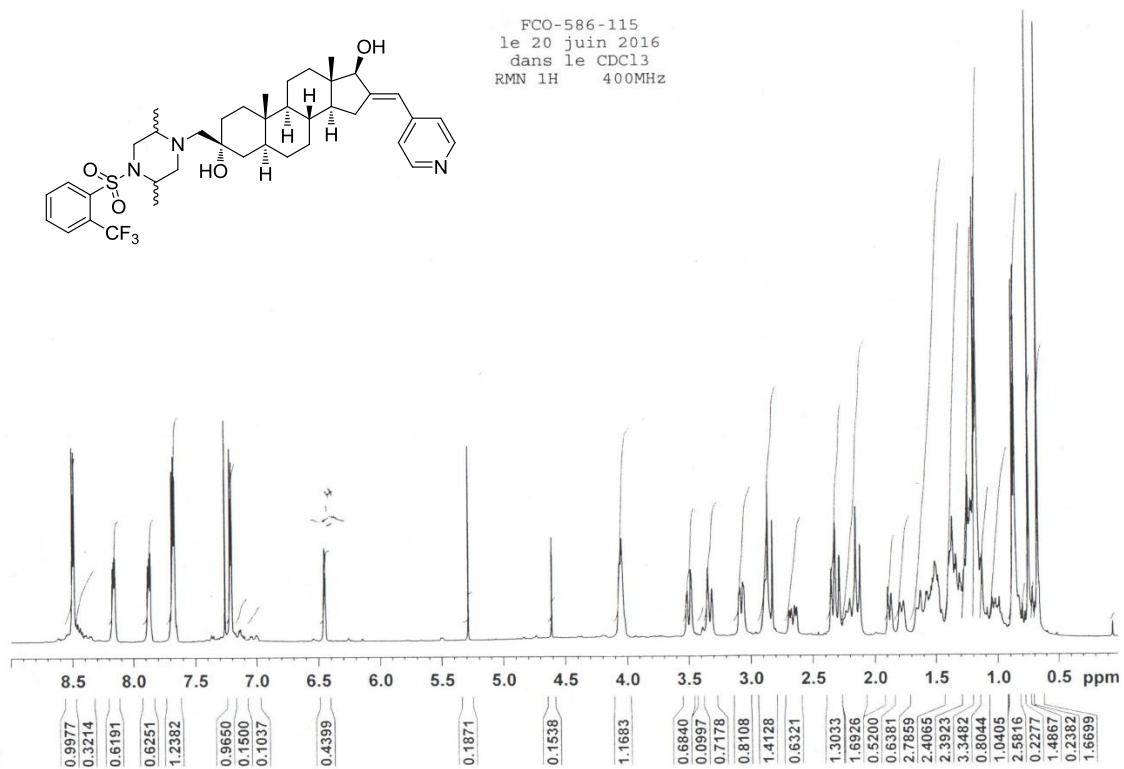
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	4.136	28848	0.645
2	4.714	47325	1.058
3	19.524	38981	0.872
4	20.376	4080809	91.268
5	23.092	275254	6.156
Total		4471216	100.000

Cromatograma 13: Compuesto 14m (columna Luna C18)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

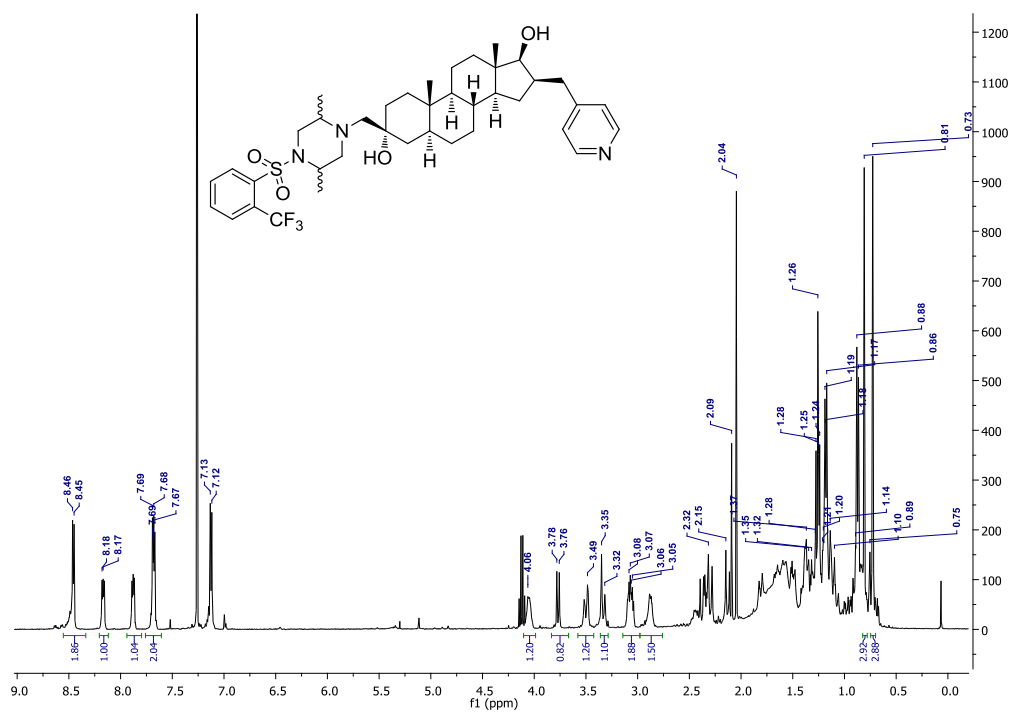


Espectro 227: RMN ¹H del compuesto



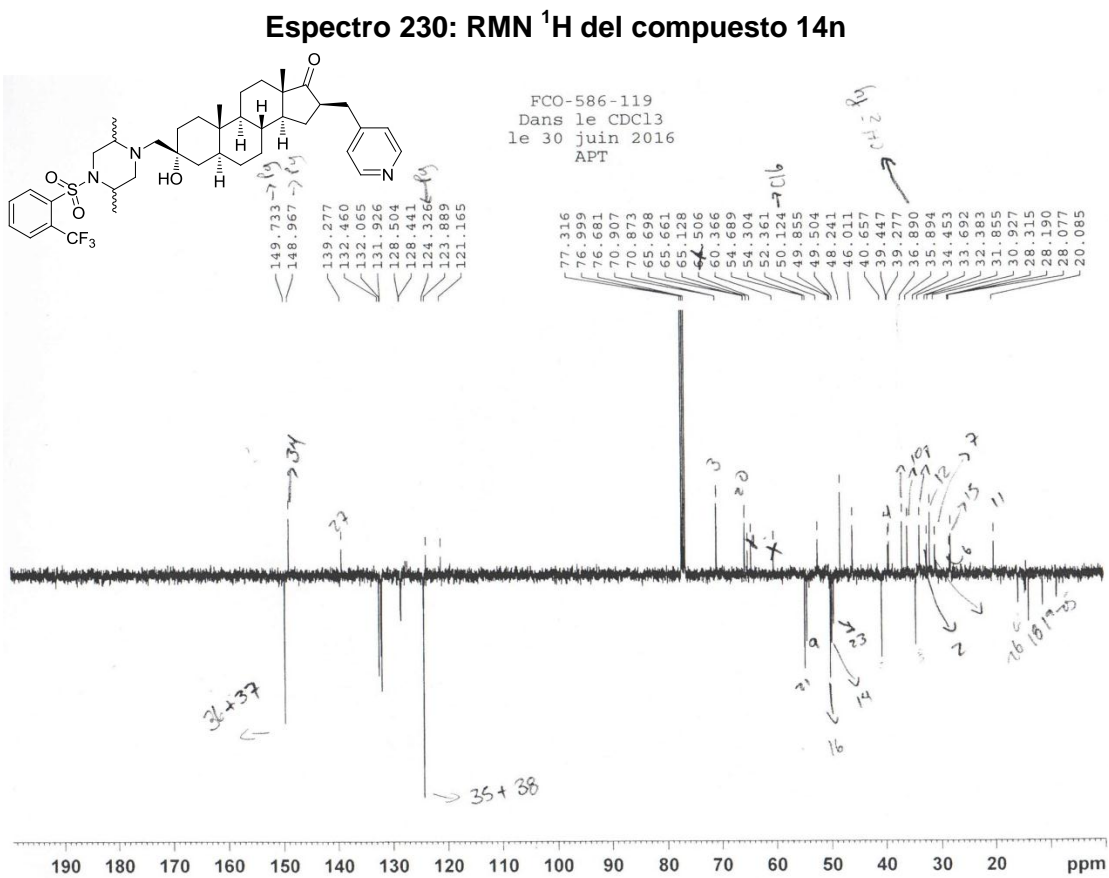
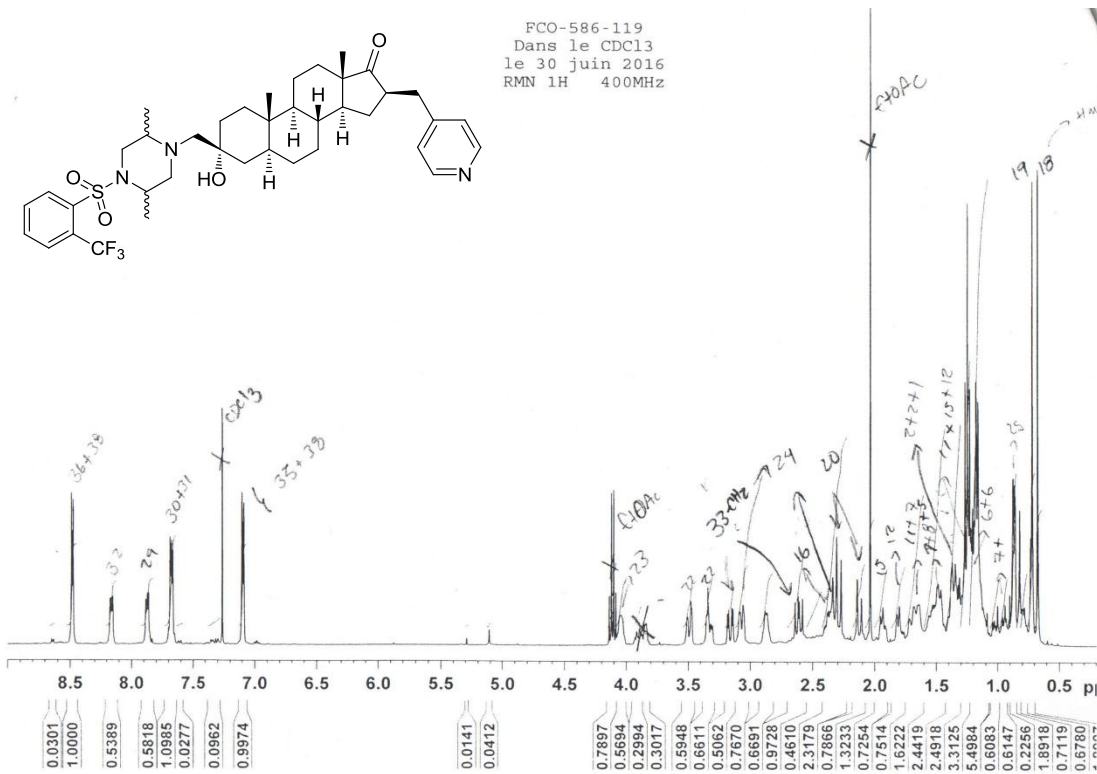
Espectro 228: RMN ¹H del compuesto 14m

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



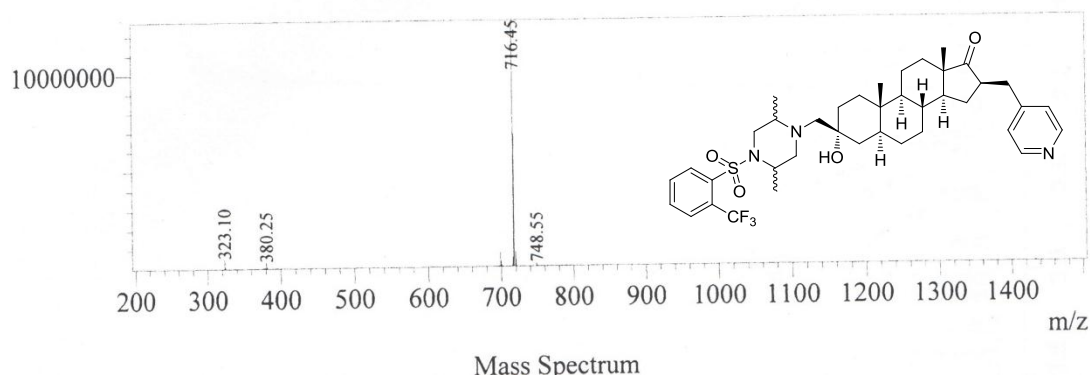
Espectro 229: RMN ¹H del compuesto 14m

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Peak#:3 R.Time:18.530(Scan#:1113)
 MassPeaks:788
 Spectrum Mode:Averaged 18.517-18.550(1112-1114)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

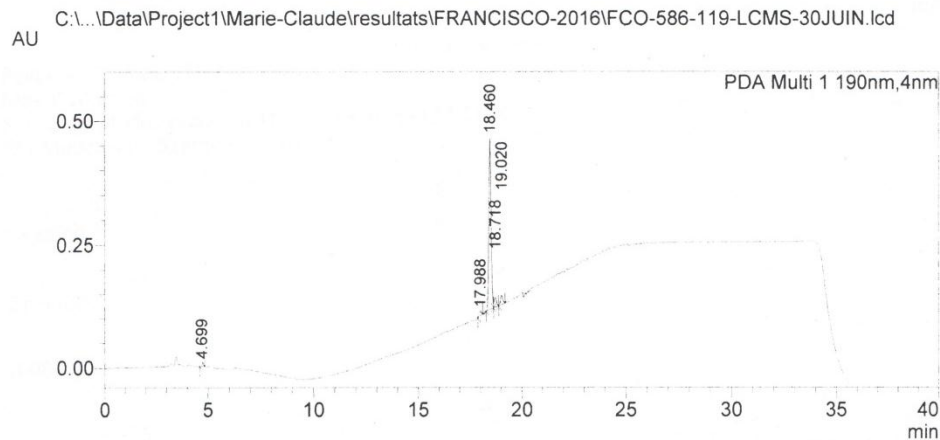


Espectro 232: Espectrometría masas de baja resolución (método APCI⁺) del compuesto 14m

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-119-LCMS-30JUIIN.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : FCO-586-119-LCMS-30JUIIN
 Sample ID : FCO-586-119-LCMS-30JUIIN
 Tray# : 1
 Vial# : 76
 Injection Volume : 6
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-119-1
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS Jennybatch70-30 ()
 Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
 Month-Day Acquired : 6/30/2016
 Month-Day Processed : 6/30/2016
 Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 70:30

<Chromatogram>

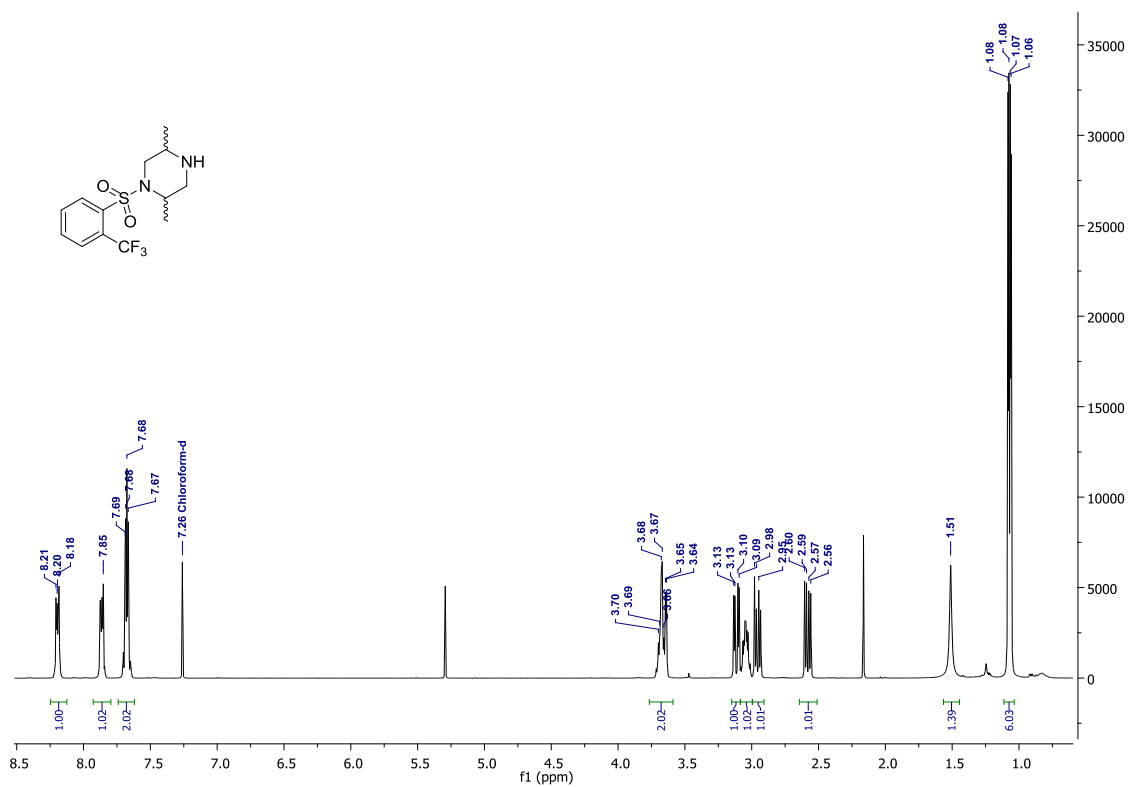


Peak Table

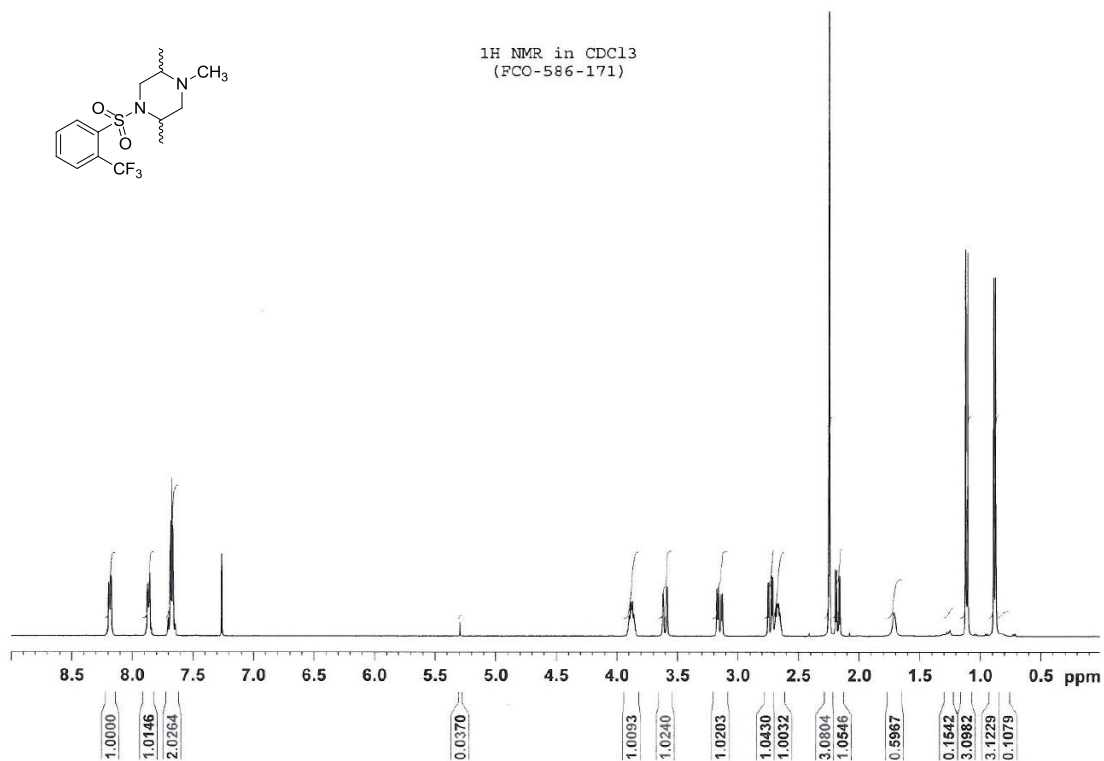
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	4.699	37031	1.221
2	17.988	62546	2.062
3	18.460	2614119	86.190
4	18.718	158610	5.230
5	19.020	160678	5.298
Total		3032983	100.000

Cromatograma 14: Compuesto 14n (columna Luna C18)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

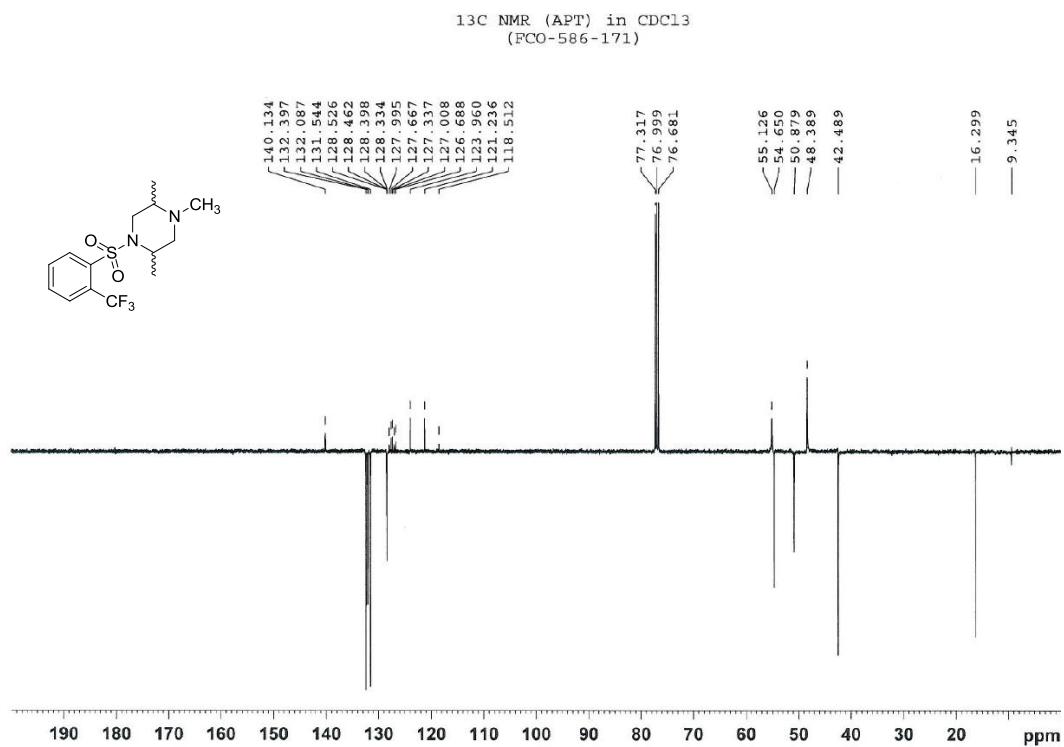


Espectro 233: RMN ¹H del compuesto 15



Espectro 234: RMN ¹H del compuesto 16

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas



Espectro 235: RMN ^{13}C (experimento APT) del compuesto 16

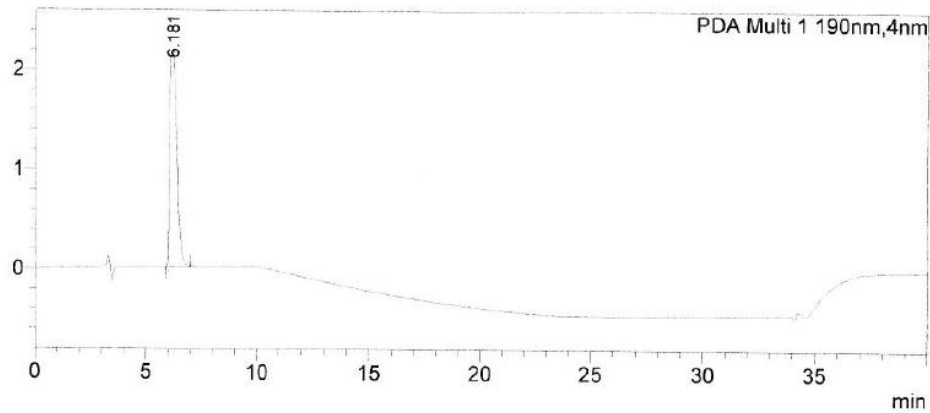
ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-171-01SEPT.lcd
Acquired by : System Administrator
Sample Name : FCO-586-171-01SEPT
Sample ID : FCO-586-171-01SEPT
Tray# : 1
Via# : 51
Injection Volume : 5
Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-171-01SEPT.lcd
Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\METHODE-2016\LC-MS 40-60 (ACIDE-40 n
Report Format File : C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\RAPPORT-2016\LCMS-STD.lsr
Month-Day Acquired : 9/1/2016
Month-Day Processed : 9/1/2016
Comment : APCI+ SUR C18
 MEOH:H2O 40:60
 0,1% ACIDE FORMIQUE DANS L'EAU

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Project1\Marie-Claude\resultats\FRANCISCO-2016\FCO-586-171-01SEPT.lcd
AU



Peak Table

PDA Ch1 190nm			
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	6.181	48185293	100.000
Total		48185293	100.000

Cromatograma 15: Compuesto 16 (columna Luna C18)

ANEXO 1: Espectros y cromatogramas

Qualitative Compound Report

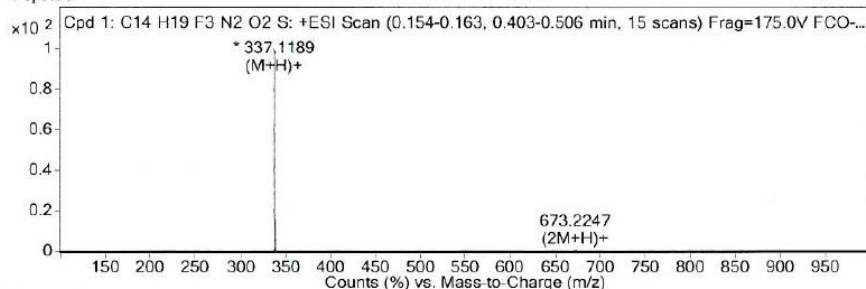
Data File	FCO-586-171.d	Sample Name	FCO-586-171
Sample Type	Sample	Position	Vial 24
Instrument Name	Instrument 1	User Name	Pierre Audet
Acq Method	Direct_Injection_ESI.m	IRM Calibration Status	Success
DA Method	MFC.m	Comment	

Compound Table

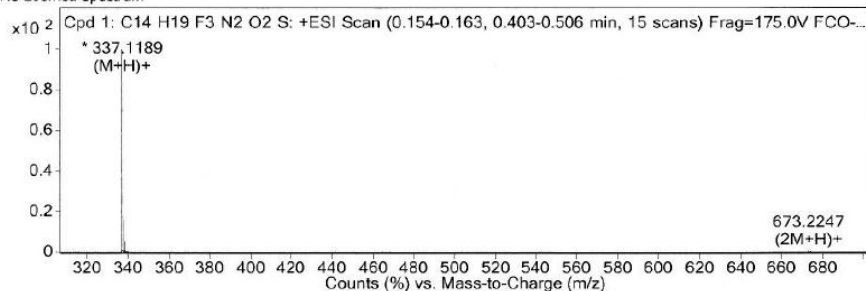
Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)
Cpd 1: C14 H19 F3 N2 O2 S	0.289	336.1116	649231	C14 H19 F3 N2 O2 S	336.1119	-1.08

Compound Label	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C14 H19 F3 N2 O2 S	0.289	Find By Formula	336.1116

MS Spectrum



MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Formula	Ion
337.1189	337.1192	-1.04	1	649855	C14 H20 F3 N2 O2 S	(M+H)+
337.1189				649855		
337.3482				69642		
337.4768				4234		
337.5781				6630		
338.1197	338.1222	-7.38		112259	C14 H20 F3 N2 O2 S	(M+H)+
338.3469				6589		
339.1153	339.1177	-7.22		36244	C14 H20 F3 N2 O2 S	(M+H)+

Espectro 236: Espectrometría de masas de alta resolución (método FAB⁺) del compuesto 16

ANEXO 2: PUBLICACIONES



Research paper

Synthesis of 17β -*N*-arylcarbamoyleandrost-4-ene-3-one derivatives and their anti-proliferative effect on human androgen-sensitive LNCaP cell line



Francisco Cortés-Benítez ^a, Marisa Cabeza ^{b,*}, María Teresa Ramírez-Apan ^c,
Berenice Alvarez-Manrique ^a, Eugene Bratoeff ^{a,†}

^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 04510, Mexico

^b Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D. F., 04960, Mexico

^c Unidad de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2015

Received in revised form

23 May 2016

Accepted 26 May 2016

Available online 1 June 2016

Keywords:

Androst-4-ene-3-one derivatives

LNCaP cells

PC3 cells

Rat peripheral blood mononuclear cells

(PBMC)

Prostate cancer

Sulforhodamine B assay

ABSTRACT

In this study, we report the synthesis and anti-proliferative effect of a set of eight androst-4-ene-3-one derivatives with different arylcarbamoyle groups at C-17. The novel compounds were prepared from commercially available 3β -hydroxy-5-pregnen-20-one and evaluated against the androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma LNCaP cell line. The cancerous cells were exposed to 50 μ M of each compound and the proliferating agent testosterone (T) or dihydrotestosterone (DHT). The most potent compounds from this assay were further tested against the androgen-insensitive PC3 cell line. We also demonstrate the activity of these compounds on rat peripheral blood mononuclear cells for comparison.

Both 17β -*N*-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenylcarbamoyle]androst-4-ene-3-one (**6f**) and 17β -*N*-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyle)androst-4-ene-3-one (**6g**) exhibited a higher growth inhibitory effect than commercially available drugs finasteride, flutamide and ketoconazole on LNCaP cells in the presence and absence of androgens. In addition, **6f** and **6g** demonstrated high potency on PC3 cells suggesting an androgen-independent anti-proliferative effect. Moreover, the novel compounds showed a small effect on rat mononuclear cells, an indication of low toxicity.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is one of the most frequent malignant tumors in the world and is the second leading cause of death in men [1]. The androgen receptor (AR) signaling pathway plays a central role in PCa development and progression [2] and the initial growth of prostate carcinomas are dependent of two principal

androgens: testosterone (T) and its metabolite, 5α -dihydrotestosterone (DHT, Fig. 1) which is the most potent natural androgen [3,4]. In healthy and cancerous prostate cells, T is transformed to DHT by the activity of the 5α -reductase (5α R) enzyme [5]. Once DHT is formed, it binds to the AR promoting its activation. The active form of AR undergoes dimerization, phosphorylation, and translocation to the nucleus, and then binds to the androgen response element which activates the transcription of certain genes that include transcription co-regulators and the transcriptional machinery [6].

Since steroids have an important role as physiological regulators of cell growth and survival, the inhibition of the androgenic pathway has been widely explored for the treatment and prevention of PCa [7]. Currently, there are several examples of synthetic steroidal compounds that inhibit the mechanism of action of natural hormones [8–11]. Thus, these compounds have exhibited a remarkable anti-proliferative effect on wild-type as well as transfected prostate cancer LNCaP cells [12–16], which is a widely used and well established cell line model to study PCa [17]. In previous

Abbreviations: 5α R, 5α -reductase enzyme; AR, androgen receptor; BPH, benign prostatic hyperplasia; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHT, 5α -dihydrotestosterone; LNCaP, androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cell line; PC3, androgen-insensitive human prostate adenocarcinoma cell line; PBMC, rat peripheral blood mononuclear cells; PCa, prostate cancer; T, testosterone.

* Corresponding author. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, México, D. F., 04960, Mexico.

E-mail addresses: franciscoqfb@comunidad.unam.mx (F. Cortés-Benítez), marisa@correo.xoc.uam.mx (M. Cabeza), mtrapan@unam.mx (M.T. Ramírez-Apan), alvarez.m.berenice@gmail.com (B. Alvarez-Manrique).

† Deceased.

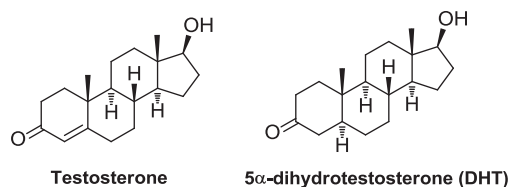


Fig. 1. The principal androgens: testosterone and 5 α -dihydrotestosterone (DHT).

studies, patents and patent applications such as CN 102532236 [18] and WO2003029268 A1 [19] discloses the strong activity of several androstene 17 β -carboxamides as androgen receptor modulators and anti-5 α R compounds for treating androgen-dependent diseases. Afterwards, C.Amaral et al. [20] synthesized androstene 17 β -carboxamides with lipophilic amides at the C-17 position as 5 α R inhibitors. These steroidal compounds decreased the cell viability of LNCaP cells stimulated with T or DHT. Interestingly, their study suggests an additional mechanism related to the cytotoxic effect aside from the anti-5 α R activity. On the other hand, our research group has demonstrated that the presence of different substituted aromatic esters and carbamate moieties attached to the C-17 of progesterone can modulate their anti-proliferative activity in a panel of different cancer cell lines [21].

On the basis of the facts described in these references and in order to obtain the steroidal structure required for anti-proliferative effect on prostate cancer cells and also to see whether this effect is exerted by an androgen-dependent or androgen-independent effect, we describe herein the synthesis of eight new androst-4-en-3-one derivatives (**6a-h**) containing different aromatic amides at C-17 β (Fig. 2) and their anti-proliferative effect on LNCaP (androgen-sensitive) cells. The most potent compounds were further selected and evaluated on PC3 (androgen-insensitive) cells which do not express AR and their proliferation is independent of androgen [22].

In view of the therapeutic importance of the substituent at C-17 β , we proposed steroidal compounds with various substituted 17 β -N-phenylcarbamoyl groups: steroidal derivatives **6a** and **6b**

have electron donating groups (*p*-OCH₃, *p*-CH₃), **6c** has an unsubstituted phenyl ring, **6d-f** have electronegative groups (*p*-F, *p*-Cl and bis-3,5-CF₃), and derivatives **6g** and **6h** contain 2-aminothiazole and indoline at C-20, respectively.

The newly designed steroidal compounds (**6a-h** in Fig. 2) were tested at a concentration of 50 μ M for their ability to inhibit the growth of LNCaP cells. In order to observe the potency of the synthesized compounds, even in the presence of proliferating agents, these cells were stimulated with T or DHT as well. In addition, considering that the efficacy of a drug candidate in a short lapse of time is important, we decided to study the growth inhibitory effect of all compounds at 48 h. Flutamide, finasteride and ketoconazole were utilized as reference controls. Flutamide is a non-steroidal compound used as an antiandrogen drug in the treatment of prostate cancer [23] by blocking the AR and competing with T and DHT [24]. In previous studies, flutamide has demonstrated an anti-proliferative effect on different prostate cancer cell lines *in vitro* [25]. The second, finasteride, is a 5 α R inhibitor mainly used in BPH [26]. However, it has demonstrated inhibitory effects on LNCaP cells through inhibition of the 5 α R enzyme type 1 [27]. The third, ketoconazole is an anti-fungal agent extensively used as a treatment in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC) patients [8]. This drug has been demonstrated to inhibit the CYP17 enzyme which is involved in the steroid biosynthesis pathway of important androgens such as DHEA and androstenedione [28]. Interestingly, ketoconazole has not only shown a direct anti-proliferative activity on LNCaP cells, but also on the androgen-insensitive PC3 cell line [29].

Due to the toxicity of a drug candidate being equally as important as its inhibition potential, anti-proliferative assays were also carried out in rat peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as a cytotoxicity model in this study [30].

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The synthetic route for steroidal derivatives **6a-h** is shown in Scheme 1. Briefly, 3 β -hydroxy-5-pregnen-20-one **1** was reacted

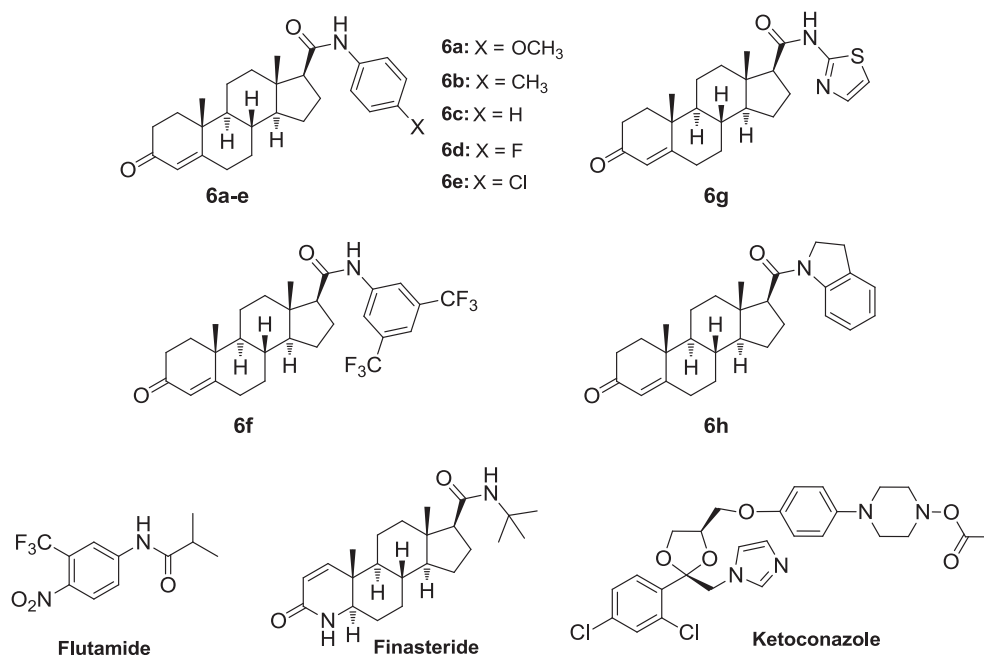
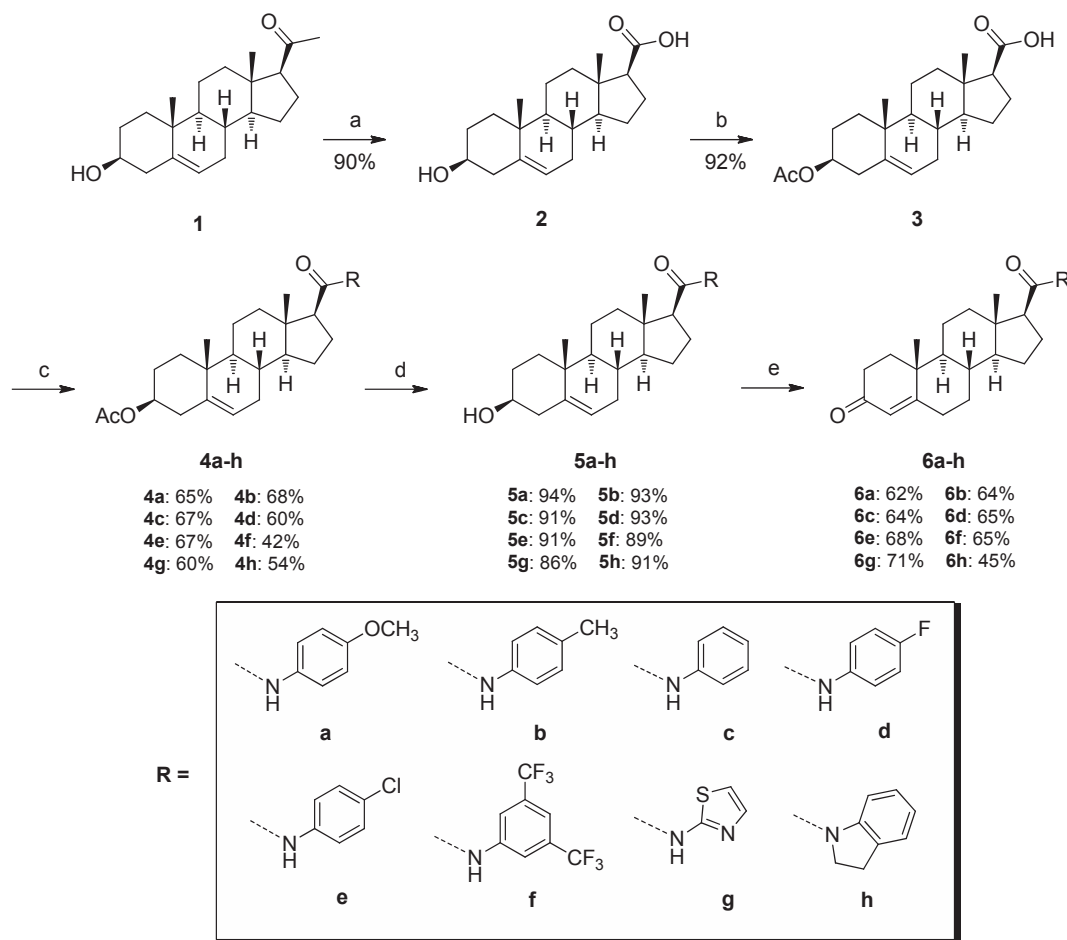


Fig. 2. 17 β -N-arylcarbamoylandrost-4-en-3-one derivatives **6a-h**, flutamide, finasteride and ketoconazole.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) NaOH, Br₂, Dioxane, <math>< 10^{\circ}\text{C}</math>, 9 h; (b) Acetic anhydride, pyridine, r.t., 8 h; (c) 1. SOCl₂, CH₂Cl₂, r.t., 2 h; 2. Arylamine (indoline for **4h**), TEA, CH₂Cl₂, 1 h; (d) KOH 10% in MeOH, r.t., 50 min; (e) Al(*i*-OPr)₃, 1-methyl-4-piperidone, toluene, reflux 7 h.

with bromine and sodium hydroxide to form the carboxylic acid derivative **2** (yield of 90%). The acetylation of the hydroxyl group at C-3 with acetic anhydride and pyridine then afforded compound **3** (yield of 92%). The acyl chloride at C-17 was generated using thionyl chloride and was reacted immediately with the respective arylamine (or indoline for compound **4h**) in the presence of triethylamine in CH₂Cl₂ to afford derivatives **4a-h** in acceptable yields (42–68%). The hydrolysis of the acetate group at C-3 was produced by a methanolic solution of potassium hydroxide to obtain the steroids **5a-h** in high yields (86–94%). The resulting secondary alcohol at C-3 was oxidized to the α,β -unsaturated ketone by Oppenauer oxidation using aluminum isopropoxide and 1-methyl-4-piperidone in refluxing toluene. The desired products **6a-h** were isolated in moderate yields (45–71%).

The structure of all obtained 17 β -*N*-arylcarbamoylandrost-4-en-3-one derivatives (**6a-h**) was determined on the basis of their spectral data (IR, ¹H NMR and ¹³C NMR). In the ¹H NMR spectra, there are representative signals in the aromatic region from 6.5 to 8.0 ppm. The two doublets ($J = 8-9$ Hz) characteristic of a *para* substituted pattern are presented by compounds **6a**, **6b**, and **6e**, whereas a triplet and two doublets at 7.0 and 7.5 ppm with $J = 8.8$ and 4.8 Hz, respectively, for **6d** were found, these signals corresponding to J_{H-H} and J_{H-F} coupling constants. The mono, 1,2 disubstituted and 1,3,4 tri-substituted pattern was observed for **6c**, **6h**, and **6f**, respectively. Two double signals ($J = 3.5$ Hz) for the thiazole ring were also situated downfield for **6g** at δ 7.0 and 7.4 ppm. On the other hand, the broad signal (NH) for the

compounds **6a-f** is present at about δ 7.1–7.6 ppm; the same signal was shifted to δ 10.0 ppm by the thiazole ring in compound **6g**.

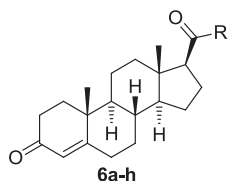
When Oppenauer oxidation was carried out, the absorption of the 3 β -OH (~ 3400 cm⁻¹) group in the IR spectra of the **5a-h** series was missing. The broad multiplet for H-3 and doublet for H-6 around δ 3.5 and 5.6 ppm, respectively in ¹H NMR, along with the singlet for C-3 in ¹³C NMR at about 74 ppm were all absent as well. Instead, a new absorption at 1660 cm⁻¹ in the IR spectra, a new H-4 singlet at δ 5.7 ppm in ¹H NMR, as well as new signals for C-3, C-4 and C-5 in ¹³C NMR at about δ 199, 127 and 171 ppm, respectively, all appeared for compounds **6a-h** indicating the formation of the α,β -unsaturated ketone at C-3.

2.2. Anti-proliferative effect on prostate cancer cells

The activity of the synthesized compounds **6a-h**, flutamide, finasteride and ketoconazole were first tested against LNCaP cells stimulated by 0.1 μ M of T or DHT (Table 1). In this assay, the basal anti-proliferative effect (androgen-free media) was set to 0%, the androgens testosterone and DHT (at 0.1 μ M) exhibiting a proliferative effect of 72.1% and 75.3%, respectively (anti-proliferative effect of -72.1% and -75.3%, respectively using the equation described in section 3.3.1).

At a concentration of 50 μ M, the antiandrogen flutamide inhibited the androgen-induced growth by T and DHT with a percentage of 29.6% and 25.1%, respectively. The inhibitory effect of flutamide on androgen-stimulated LNCaP cells can be explained

Table 1
Percentage growth inhibitory effect of steroidal derivatives **6a-h**, as well as flutamide, finasteride and ketoconazole at 50 μ M on LNCaP and PBMC cells.



Compound	R	Molecular properties				LNCaP % cell growth inhibition at 50 μ M (Mean \pm S.D.)			Rat PBMC % cell growth inhibition at 50 μ M (Mean \pm S.D.)	
		LogP calc ^a	TPSA calc ^a	nON	nOHNH	Androgen-free media	T [0.1 μ M]	DHT [0.1 μ M]		
6a		5.12	55.40	4	1	48.7 \pm 4.3	38.6 \pm 13.9	29.7 \pm 7.1	7.9 \pm 0.8	
6b		5.51	46.17	3	1	25.6 \pm 2.6	43.3 \pm 0.6	27.5 \pm 8.6	13.0 \pm 1.5	
6c		5.06	46.17	3	1	40.9 \pm 2.3	66.2 \pm 6.3	59.4 \pm 17.7	8.7 \pm 2.6	
6d		5.23	46.17	3	1	29.1 \pm 0.7	44.3 \pm 0.3	29.0 \pm 3.0	4.1 \pm 2.5	
6e		5.74	46.17	3	1	-6.1 \pm 0.4	1.6 \pm 7.6	13.4 \pm 10.4	NA	
6f		6.78	46.17	3	1	100.0 \pm 3.2	100 \pm 18.8	100 \pm 8.6	9.1 \pm 1.0	
6g		4.12	59.06	4	1	100 \pm 2.9	100 \pm 9.9	100 \pm 4.2	16.8 \pm 2.4	
6h		5.30	37.38	3	0	69.1 \pm 4.0	49.9 \pm 1.0	52.6 \pm 0.9	NA	
Flutamide	—	—	—	—	—	-3.4 \pm 0.8	29.6 \pm 1.0	25.11 \pm 1.3	NA	
Finasteride	—	—	—	—	—	34.6 \pm 5.6	21.1 \pm 0.9	NA	3.7 \pm 1.6	
Ketoconazole	—	—	—	—	—	82.7 \pm 0.9	76.0 \pm 5.5	68.2 \pm 6.1	ND	

*NA = Null activity.

**ND = Not determined.

Bold numbers mean that had the highest effect antiproliferative.

^a The molecular properties of all compounds were calculated by Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/>). miLog P, molinspiration predicted LogP; TPSA, Topological Surface Area; nON, no. of hydrogen bond acceptors and nOHNH, no. of hydrogen bond donors.

due to flutamide's competitive binding to AR with T and DHT [31].

On the other hand, finasteride inhibited the cell growth of LNCaP cells that were not androgen-stimulated (34.6%). This activity could be associated with its known alternative effect to induce apoptosis via proteins of the Bcl-2 and caspase family [32]. Additionally, the low anti-proliferative effect of finasteride on T-stimulated LNCaP cells as well as the lack of effectiveness on DHT-stimulated cells, could be explained by the fact that this steroid displays its inhibitory effect on these cells by blocking 5 α R activity after 9 days of treatment with T [31] instead of the 48 h covered by our method.

In contrast, ketoconazole shows the highest activity of the three marketed drugs, with values of 82.7%, 76.0% and 68.2% on non-stimulated, T and DHT-stimulated LNCaP cells, respectively; its inhibitory effect is also clearly better in the absence of androgens.

This activity could be explained due to the fact that ketoconazole is capable of decreasing DNA synthesis and inducing cell cycle arrest in prostate cancer cells [29].

Interesting SAR observations emerged from the arylcarbamoyl compounds (**6a-h**). The first general observation that can be made about these steroids is that they are able to decrease LNCaP cell viability when these cells were androgen-stimulated or not, suggesting that they induce their anti-proliferative effect by a mechanism not related to the androgen-signaling pathways. However, when **6b-d** were evaluated against androgen-stimulated and non-stimulated LNCaP cells, we observed that their anti-proliferative effect was slightly higher on T-stimulated cells, whereas **6a** and **6h** acted better on non-stimulated cells (48.7 and 69.1%, respectively). Thus, it cannot be discarded that compounds **6b-d** may be acting as anti-5 α R. This hypothesis is supported by studies carried

out by C. Amaral, who found that the most potent 5 α R inhibitors exerted significant growth inhibitory effect on T-treated LNCaP cells after 48 h [20].

In addition to the T-stimulated LNCaP assay for the **6a-e** derivatives, we found that the *para*-substituted compounds **6a**, **6b** and **6d** having *p*-OCH₃, *p*-CH₃ and *p*-F, respectively, are almost equally potent (38.6, 43.3 and 44.3%, respectively), whereas the *p*-Cl compound (**6e**) exhibited the least activity. Interestingly, compound **6c**, with an unsubstituted phenyl ring, produced the highest anti-proliferative effect of this series (66.2%). Furthermore, **6c** was as potent as its rigid indoline analog counterpart (**6h**) in the same assay. Therefore, these results suggest that the presence of substituents attached to the *para*-site of the phenylcabamoyl group has a negative impact on the anti-proliferative activity on T-treated LNCaP cells.

The most surprising aspect of the data is the complete inhibition of the stimulatory growth effect of T and DHT by derivatives **6f** and **6g**. These compounds also displayed the strongest anti-proliferative effect (100%) in androgen-free media. Considering these the best compounds that exhibited the greatest effect in the three assays, we proceeded to determine their concentration at which the growth of 50% of LNCaP cells in absence of T or DHT was inhibited. Moreover, we tested **6f** and **6g** on the androgen-insensitive PC3 cell line in order to detect whether the anti-proliferative activity is exerted by an androgen-independent effect; ketoconazole was used for comparison in both cell lines (Table 2). First, we observed that compound **6f** is a better cell growth inhibitor than **6g** (GI₅₀ = 12.8 ± 0.7 μM and 16.0 ± 1.8 μM, respectively) on the LNCaP cell line, and both compounds are more potent than ketoconazole (GI₅₀ = 25.0 ± 5.7 μM). Secondly, **6g** exhibited the best anti-proliferative effect on PC3 cells (GI₅₀ = 6.6 ± 0.7 μM) as compared to **6f** (GI₅₀ = 14.2 ± 1.6 μM) and ketoconazole (GI₅₀ = 11.7 ± 0.6 μM). These results suggest that **6f** and **6g** are able to decrease cell proliferation of prostate cancer cells by an androgen independent manner. Interestingly, this effect was greater on the PC3 cell line which is widely used as a model of castration resistant prostate cancer [22].

The activity displayed by these steroids may be explained by the fact that **6f**, with two trifluoromethyl groups conferring a greater lipophilic character (Log*P* = 6.78) to the molecule, has a greater ability to cross the membrane of the cell. In contrast, **6g** has a sp² nitrogen on the thiazole ring which facilitates the formation of hydrogen bonds (nON = 4) with different residues of amino acids in the target-proteins; this interaction promotes the stability of this molecule as compared to the rest of the synthesized steroids. Moreover, this compound has the highest topological surface area (TPSA = 59.06). Briefly, TPSA is based on the summation of tabulated surface contributions of polar fragments in a molecule. This parameter has been shown to correlate well with passive molecular transport through the biological membranes [33]. Thus, we consider that the increase in the Log *P* as well as TPSA values has a positive impact on the anti-proliferative effect for this series.

2.3. Cytotoxicity effect on PBMC cells

To investigate whether the synthesized compounds may be

acting as cytotoxic agents on healthy cells, PBMC cells were treated with the same tested compounds for LNCaP cells (Table 1). The commercially available drugs finasteride and flutamide showed 3.69% of cell growth inhibition and no effect, respectively. For the novel synthetic steroidal derivatives, **6g** exhibited the strongest effect in this assay (16.8%). Compounds **6a-d** and **6f** demonstrated low inhibitory anti-proliferative effects, whereas **6e** and **6h** were ineffective against these cells. Therefore, the very slight anti-proliferative activity on rat PBMC, suggests that these compounds show low toxicity on healthy cells.

3. Experimental protocols

3.1. General

Reagents and solvents purchased were laboratory grade or higher. Melting points were determined on a Fisher-Johns melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 200s spectrometer. Low resolution mass spectra (LRMS) were obtained with a HP5985-B spectrometer and the high resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a JEOL JMS-AX505 HA mass spectrometer operated in positive mode. ¹H NMR and ¹³C NMR were recorded at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C using Varian Gemini 200 and VRX-300 spectrometers, respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me₄Si ($\delta = 0$) in CDCl₃ (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet). The reactions were monitored by TLC on Kieselgel-G (Merck Si 254 F) layers (0.25 mm thick); Flash chromatography was performed using Merck silica gel 60, 40–63 μm.

3.2. Synthesis

For the synthesis of the steroidal compounds **6a-h** (Scheme 1), the commercially available 3 β -hydroxy-5-pregnen-20-one **1** was used. Compounds **2** and **3** were prepared by the procedure described in Ref. [34]. The synthesis of **6a-h** derivatives is briefly described below.

3.2.1. General method for the synthesis of 3 β -acetoxy-17 β -N-(arylcabamoyl)androst-5-ene derivatives (4a-h)

0.5 g (1.5 mmol) of 3 β -acetoxyandrost-5-ene-17 β -carboxylic acid (**3**) was dissolved in 20 mL of methylene chloride, 0.5 mL of previously distilled thionyl chloride was added dropwise with constant stirring and the mixture was stirred at room temperature for 2 h, the solvent and the excess of thionyl chloride was distilled off. The acid chloride was dissolved again with 10 mL of methylene chloride and cooled in an ice bath. 0.5 mL of triethylamine and 1.2 mmol of the desired arylamine were then slowly added. The resulting yellow solution was stirred at room temperature for 1.5 h, the solvent was then distilled and 30 mL of hot hexane was added to the oily residue. The resulting precipitate was filtered and recrystallized from methylene chloride-methanol.

3.2.1.1. 3 β -acetoxy-17 β -N-(4-methoxyphenylcabamoyl)androst-5-ene (**4a**). Yield: 65%, mp 218–221 °C, IR (FT-IR) cm⁻¹: 3415, 2904, 2964, 2830, 2854, 1730, 1671, 1513. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, COOCH₃), 3.8 (3H, s, PhOCH₃), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, *J*₁ = 4 Hz and *J*₂ = 2 Hz, H-6), 6.8 (2H, d, *J* = 8.9, H-3' and H-5' aromatic), 6.9 (1H, sb, PhNH), 7.4 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-2' and H-6' aromatic). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 13.3 (C-18), 19.5 (C-19), 58.0 (PhOCH₃), 74.0 (C-3), 114.2 (C-3' and C-5', aromatic), 121.9 (C-2 and C-6', aromatic), 122.5 (C-6), 131.4 (C-1', aromatic), 139.8 (C-5), 156.4 (C-4', aromatic), 170.7 (carbonyl ester), 171.1 (carbonyl amide). LRMS: 465 [M]⁺

Table 2

Concentration of compounds which inhibits growth of 50% (GI₅₀) of LNCaP and PC3 cells in free steroid media by steroids **6f**, **6g** and ketoconazole.

Compound	LNCaP GI ₅₀ (μM) (Mean ± S.D.)	PC3 GI ₅₀ (μM) (Mean ± S.D.)
6f	12.8 ± 0.7	14.2 ± 1.6
6g	16.0 ± 1.8	6.6 ± 0.7
Ketoconazole	25.0 ± 5.7	11.7 ± 0.6

3.2.1.2. β -acetoxy-17 β -N-(4-methylphenylcarbamoyl)androst-5-ene (4b). Yield: 68%, mp 211–215 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3417, 2967, 2942, 2908, 2894, 2870, 2856, 2828, 1729, 1681, 1512, 1248. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, COOCH_3), 2.3 (3H, s, PhCH_3), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.1 (3H, m, PhNH , H-2' and H-6' aromatic), 7.4 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3' and H-5' aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.4 (C-19), 21.9 (PhCH_3), 74.0 (C-3), 120.0 (C-2' and C-6', aromatic), 122.4 (C-6), 129.6 (C-3 and C-5', aromatic), 135.7 (C-1', aromatic), 133.7 (C-4', aromatic), 139.8 (C-5), 170.7 (carbonyl ester), 171.1 (carbonyl amide). LRMS: 449 $[\text{M}]^+$

3.2.1.3. β -acetoxy-17 β -N-(phenylcarbamoyl)androst-5-ene (4c). Yield: 67%, mp. 231–233 °C. IR (FT-IR) cm^{-1} : 3333, 2938, 2905, 2871, 2851, 1730, 1687, 1498, 1240. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, COOCH_3), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.1 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4', aromatic), 7.2 (1H, sb, PhNH), 7.3 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-3' and H-5', aromatic), 7.5 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-2' and H-6', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.4 (C-19), 74.0 (C-3), 119.9 (C-2' and C-6', aromatic), 122.4 (C-6), 124.1 (C-4'), 129.1 (C-3 and C-5', aromatic), 138.4 (C-1', aromatic), 139.8 (C-5), 170.8 (carbonyl ester), 171.3 (carbonyl amide). LRMS: 435 $[\text{M}]^+$

3.2.1.4. β -acetoxy-17 β -N-(4-fluorophenylcarbamoyl)androst-5-ene (4d). Yield: 60%, mp 230–233 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3398, 3039, 2941, 2909, 2874, 2854, 2826, 1728, 1681, 1507, 832. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, COOCH_3), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.0 (2H, ddd, $J_{\text{H-F}} = 2.9, 6.3$ and 10.4 Hz, H-2' and H-6', aromatic), 7.1 (1H, sb, PhNH), 7.5 (2H, dd, $J_{\text{H-F}} = 4.8$ and 9.0 Hz, H-2' and H-6', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.5 (C-19), 74.0 (C-3), 115.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 22.4$ Hz, C-3' and C-5', aromatic), 121.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 7.8$ Hz, C-2' and C-6', aromatic), 122.4 (C-6), 134.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 2.9$ Hz, C-1', aromatic), 139.8 (C-5), 159.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 243$ Hz, C-4', aromatic), 170.8 (carbonyl ester), 171.3 (carbonyl amide). LRMS: 453 $[\text{M}]^+$

3.2.1.5. β -acetoxy-17 β -N-(4-chlorophenylcarbamoyl)androst-5-ene (4e). Yield: 67%, mp 263–265 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3395, 3028, 2946, 2946, 2927, 2910, 2875, 2853, 1724, 1685, 1510, 1253. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, COOCH_3), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.2 (1H, sb, PhNH), 7.3 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6', aromatic), 7.5 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' and H-5', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.4 (C-19), 74.0 (C-3), 121.2 (C-2' and C-6', aromatic), 122.4 (C-6), 129.0 (C-3 and C-5', aromatic), 136.8 (C-1', aromatic), 139.8 (C-5), 170.8 (carbonyl ester), 171.4 (carbonyl amide). MS: 470 $[\text{M}]^+$

3.2.1.6. β -acetoxy-17 β -N-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenylcarbamoyl]androst-5-ene (4f). Yield: 42%, mp 123–125 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3347, 3112, 2943, 2905, 2851, 1732, 1710, 1380, 1276, 1129. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, COOCH_3), 4.7 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.6 (1H, s, H-4', aromatic), 8.0 (1H, sb, PhNH), 8.1 (2H, s, H-2' and H-6', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 74.3 (C-3), 117.4 (q, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz, C-1'), 119.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz, C-2' and C-6', aromatic), 122.4 (C-6), 126.0 (q, $J_{\text{C-F}} = 272$ Hz, CF_3), 132.3 (q, $J_{\text{C-F}} = 33.4$ Hz, C-3 and C-5', aromatic), 139.9 (C-4'), 140.0 (C-5), 171.4 (carbonyl ester), 172.1 (carbonyl amide). LRMS: 571 $[\text{M}]^+$

3.2.1.7. β -acetoxy-17 β -N-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)androst-5-ene (4g). Yield: 60%, mp 152–154 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3251, 3157, 2941, 2905, 2850, 2730, 1731, 1682, 1557, 1247, 1029. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.7 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, COOCH_3), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.0 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-

5', thiazole), 7.4 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4', thiazole), 10.9 (1H, sb, thiazole-NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 74.0 (C-3), 113.6 (C-5', thiazole), 122.3 (C-6), 136.7 (C-4', thiazole), 139.9 (C-5), 159.5 (C-2', thiazole), 170.7 (carbonyl ester), 171.3 (carbonyl amide). LRMS: 442 $[\text{M}]^+$

3.2.1.8. β -acetoxy-17 β -(2,3-dihydro-1H-indol-1-ylcarbonyl)androst-5-ene (4h). Yield: 54%, mp 158–160, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3041, 2941, 2907, 2870, 2850, 2819, 1732, 1646, 1249, 748. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.0 (3H, s, COOCH_3), 3.1 (2H, t, $J = 8.4$ Hz, CH_2 , indoline), 4.1 (2H, dq, $J_1 = 9.1$ Hz, $J_2 = 18.6$ Hz, CH_2 , indoline), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.0 (1H, m, H-7', indoline), 7.2 (2H, m, H-5' and H-6', indoline), 8.3 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-4', indoline). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.0 (C-18), 19.4 (C-19), 28.3 (CH_2 , indoline), 48.8 (CH_2 , indoline), 71.8 (C-3), 117.6 (C-7', indoline), 122.5 (C-6), 123.5 (C-4', indoline), 124.6 (C-5', indoline), 127.5 (C-6', indoline), 131.5 (C-3a, indoline), 139.8 (C-5), 143.6 (C-7a, indoline), 170.7 (carbonyl ester), 172.5 (carbonyl amide). LRMS: 461 $[\text{M}]^+$

3.2.2. General method for the synthesis of β -hydroxy-17 β -N-(arylcarbamoyl)androst-5-ene derivatives (5a-h)

0.8 mmol of the corresponding β -acetoxy-17 β -N-phenylcarbamoylandrost-5-ene derivative (**4a-h**) was suspended in 15 mL of methanol and 2 mL of a 10% methanolic solution of potassium hydroxide was added, this mixture was stirred at room temperature for 50 min and then poured into 50 mL of cold water. The white solid formed was collected by vacuum filtration and recrystallized from methanol-water.

3.2.2.1. β -hydroxy-17 β -N-(4-methoxyphenylcarbamoyl)androst-5-ene (5a). Yield: 94%, mp 145–148 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3414, 3300, 2967, 2935, 2902, 2852, 2829, 1669, 1513, 1109. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 3.5 (1H, m, H-3), 3.8 (3H, s, PhOCH_3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.8 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3' and H-5' aromatic), 6.9 (1H, sb, PhNH), 7.4 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6' aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.5 (C-19), 58.1 (PhOCH_3), 71.9 (C-3), 114.3 (C-3' and C-5', aromatic), 121.5 (C-6), 121.9 (C-2' and C-6', aromatic), 131.3 (C-1', aromatic), 140.9 (C-5), 156.4 (C-4', aromatic), 171.1 (carbonyl amide). LRMS: 423 $[\text{M}]^+$

3.2.2.2. β -hydroxy-17 β -N-(4-methylphenylcarbamoyl)androst-5-ene (5b). Yield: 93%, mp 145–148 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3414, 3300, 2969, 2968, 2904, 2859, 2869, 2827, 1679, 1511. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 2.3 (3H, s, PhCH_3), 3.5 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 6.9 (1H, sb, PhNH), 7.1 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2' and H-6' aromatic), 7.4 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3' and H-5' aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.4 (C-19), 21.2 (PhCH_3), 71.9 (C-3), 120.1 (C-2' and C-6', aromatic), 121.5 (C-6), 129.6 (C-3 and C-5', aromatic), 133.8 (C-4', aromatic), 135.6 (C-1', aromatic), 140.9 (C-5), 171.1 (carbonyl amide). LRMS: 407 $[\text{M}]^+$

3.2.2.3. β -hydroxy-17 β -N-(phenylcarbamoyl)androst-5-ene (5c). Yield: 91% mp 224–226 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3413, 3308, 3052, 2968, 2938, 2904, 2893, 2858, 2827, 1682, 1519. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (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), 7.0 (1H, sb, PhNH), 7.1 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4', aromatic), 7.3 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-3' and H-5', aromatic), 7.5 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-2' and H-6', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.5 (C-19), 71.8 (C-3), 119.9 (C-2' and C-6', aromatic), 121.5 (C-6), 124.2 (C-4'), 129.1 (C-3 and C-5', aromatic), 138.1 (C-1', aromatic), 140.9 (C-5), 171.3 (carbonyl amide). LRMS: 393 $[\text{M}]^+$

3.2.2.4. *3 β -hydroxy-17 β -N-(4-fluorophenylcarbamoyl)androst-5-ene (5d)*. Yield: 93%, mp 236–239 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3415, 3299, 2968, 2938, 2902, 2858, 2827, 1678, 1510, 1098, 837. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (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), 6.9 (3H, m, PhNH, H-2' and H-6'), 7.5 (2H, dd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, H-3' and H-5', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.6 (C-19), 71.8 (C-3), 115.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 22.4$ Hz, C-3' and C-5', aromatic), 121.5 (C-6), 121.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 7.8$ Hz, C-2 and C-6', aromatic), 134.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 2.9$ Hz, C-1', aromatic), 140.9 (C-5), 159.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 243$ Hz, C-4', aromatic), 171.3 (carbonyl amide). LRMS: 411 $[\text{M}]^+$

3.2.2.5. *3 β -hydroxy-17 β -N-(4-chlorophenylcarbamoyl)androst-5-ene (5e)*. Yield: 91%, mp 214–216 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3411, 2963, 2937, 2901, 2850, 1684, 1493, 1091, 830. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (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), 7.0 (1H, sb, PhNH), 7.3 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6', aromatic), 7.5 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' and H-5', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.3 (C-18), 19.6 (C-19), 71.9 (C-3), 121.2 (C-2' and C-6', aromatic), 121.5 (C-6), 129.1 (C-3 and C-5', aromatic), 136.7 (C-1', aromatic), 140.9 (C-5), 171.3 (carbonyl amide). LRMS: 427 $[\text{M}]^+$ 15% RA, 429 $[\text{M}+2]^+$ 5% RA.

3.2.2.6. *3 β -hydroxy-17 β -N-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenylcarbamoyl]androst-5-ene (5f)*. Yield: 89%, mp 138–141 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3317, 3105, 2941, 2856, 1660, 1622, 1380, 1275, 1129. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (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), 7.2 (1H, sb, PhNH), 7.6 (1H, s, H-4', aromatic), 8.0 (2H, s, H-2' and H-6', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.4 (C-18), 19.6 (C-19), 71.9 (C-3), 117.4 (q, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz, C-1'), 119.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz, C-2' and C-6', aromatic), 122.4 (C-6), 126.0 (q, $J_{\text{C-F}} = 272$ Hz, CF_3), 132.3 (q, $J_{\text{C-F}} = 33.4$ Hz, C-3 and C-5', aromatic), 139.5 (C-4'), 140.9 (C-5), 171.9 (carbonyl amide). LRMS: 529 $[\text{M}]^+$

3.2.2.7. *3 β -hydroxy-17 β -N-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)androst-5-ene (5g)*. Yield: 86%, mp 203–205 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3364, 3251, 3168, 3128, 3073, 2904, 2931, 1682, 1643, 1057, 715. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.7 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 3.5 (1H, m, H-3), 5.3 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.0 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-5', thiazole), 7.4 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4', thiazole), 11.2 (1H, sb, thiazole-NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 74.0 (C-3), 113.6 (C-5', thiazole), 122.3 (C-6), 136.7 (C-4', thiazole), 139.9 (C-5), 159.5 (C-2', thiazole), 172.5 (carbonyl amide). LRMS: 400 $[\text{M}]^+$.

3.2.2.8. *3 β -hydroxy-17 β -(2,3-dihydro-1H-indol-1-ylcarbonyl)androst-5-ene (5h)*. Yield: 91%, mp 161–163, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3483, 3041, 2975, 2947, 2921, 2878, 2851, 2822, 1632, 1593, 1249, 751. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 3.1 (2H, t, $J = 8.4$ Hz, CH_2 , indoline), 3.5 (1H, m, H-3), 4.1 (2H, dq, $J_1 = 9.1$ Hz, $J_2 = 18.6$ Hz, CH_2 , indoline), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.0 (1H, m, H-7', indoline), 7.2 (2H, m, H-5' and H-6', indoline), 8.3 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-4', indoline). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.1 (C-18), 19.5 (C-19), 28.3 (CH_2 , indoline), 48.8 (CH_2 , indoline), 71.8 (C-3), 117.7 (C-7', indoline), 121.5 (C-6), 123.6 (C-4', indoline), 124.6 (C-5', indoline), 127.5 (C-6', indoline), 131.5 (C-3a, indoline), 140.1 (C-5), 143.6 (C-7a, indoline), 172.5 (carbonyl amide). LRMS: 419 $[\text{M}]^+$.

3.2.3. General method for the synthesis of 17 β -N-(arylcarbamoyl)androst-4-ene-3-one derivatives (6a-h)

A solution of 0.5 mmol of the corresponding 3 β -hydroxy-17 β -N-(phenylcarbamoyl)androst-5-ene derivative (**5a-h**) in 30 mL of toluene and 2 mL of 1-methyl-4-piperidone was refluxed under a Dean-Stark trap until approximately 5 mL of distillate had been collected. To the solution was added 0.6 mmol of aluminum

isopropoxide and 5 mL more of distillate collected. The mixture was refluxed for 6 h, cooled, and the excess of toluene was distilled, the gummy residue was diluted with 30 mL of ethyl acetate, washed with four 30 mL portions of 1 M hydrochloric acid and 30 mL of brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . The desired product was purified by silica column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (7:3).

3.2.3.1. *17 β -N-(4-methoxyphenylcarbamoyl)androst-4-ene-3-one (6a)*. Yield: 62%, mp 112–113 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3330, 2935, 2852, 1657, 1410, 1230, 828. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 3.8 (3H, s, PhOCH_3), 5.7 (1H, s, H-4), 6.8 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3' and H-5' aromatic), 7.1 (1H, sb, PhNH), 7.4 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2' and H-6' aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 17.5 (C-19), 57.8 (PhOCH_3), 71.9 (C-3), 114.2 (C-3' and C-5', aromatic), 121.9 (C-2 and C-6', aromatic), 124.0 (C-4), 131.4 (C-1', aromatic), 156.4 (C-4', aromatic), 171.0 (C-5), 171.4 (carbonyl amide), 199.8 (C-3). HRMS (FAB^+): calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_3$ 422.5717 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 422.5721.

3.2.3.2. *17 β -N-(4-methylphenylcarbamoyl)androst-4-ene-3-one (6b)*. Yield: 64%, mp 208–209 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3331, 3114, 3024, 2937, 2877, 2849, 1660, 1515, 816. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 2.3 (3H, s, PhCH_3), 5.7 (1H, s, H-4), 7.1 (1H, sb, PhNH), 7.1 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2' and H-6' aromatic), 7.4 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-3' and H-5' aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 17.5 (C-19), 20.3 (PhCH_3), 120.0 (C-2' and C-6', aromatic), 124.1 (C-4), 129.6 (C-3 and C-5', aromatic), 133.8 (C-4', aromatic), 135.6 (C-1', aromatic), 171.1 (C-5), 171.2 (carbonyl amide). HRMS (FAB^+): calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 406.5723, found 406.5728.

3.2.3.3. *17 β -N-(phenylcarbamoyl)androst-4-ene-3-one (6c)*. Yield: 64%, mp 203–205 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3331, 3031, 2943, 2926, 2910, 2847, 1715, 1678, 1517.84. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 5.7 (1H, s, H-4), 7.1 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4', aromatic), 7.2 (1H, sb, PhNH), 7.3 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3' and H-5', aromatic), 7.5 (2H, t, $J = 7.9$ Hz, H-2' and H-6', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 17.5 (C-19), 119.9 (C-2' and C-6', aromatic), 124.1 (C-4'), 124.2 (C-4), 129.1 (C-3 and C-5', aromatic), 138.2 (C-1', aromatic), 171.1 (C-5), 171.2 (carbonyl amide), 199.7 (C-3). HRMS (FAB^+): calc. for $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 392.2590, found 392.2591.

3.2.3.4. *17 β -N-(4-fluorophenylcarbamoyl)androst-4-ene-3-one (6d)*. Yield: 65%, mp 218–219 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3314, 3145, 3062, 2925, 2854, 1660, 1539, 1508, 1210, 830. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 5.8 (1H, s, H-4), 7.0 (2H, t, $J = 8.6$ Hz, H-3' and H-5', aromatic), 7.1 (1H, sb, PhNH), 7.5 (2H, dd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, H-2' and H-6', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 17.5 (C-19), 115.7 (d, $J = 22.4$ Hz, C-3' and C-5', aromatic), 121.8 (d, $J = 7.8$ Hz, C-2 and C-6', aromatic), 124.1 (C-4), 134.2 (C-1', aromatic), 159.4 (d, $J = 243$ Hz, C-4', aromatic), 171.0 (C-5), 171.1 (carbonyl amide), 199.7 (C-3). HRMS (FAB^+): calc. for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{FNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 410.5361, found 410.5681.

3.2.3.5. *17 β -N-(4-chlorophenylcarbamoyl)androst-4-ene-3-one (6e)*. Yield: 68%, mp 234–237 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3331, 3026, 1680, 1658, 1715, 1491, 828, 817. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 5.7 (1H, s, H-4), 7.3 (3H, m, PhNH, H-2' and H-6', aromatic), 7.5 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3' and H-5', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 17.5 (C-19), 121.2 (C-2' and C-6', aromatic), 124.2 (C-4), 129.1 (C-3 and C-5', aromatic), 136.8 (C-1', aromatic), 171.2 (C-5), 171.3 (carbonyl amide), 199.8 (C-3). HRMS (FAB^+): calc. for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{ClNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 426.2200, found 426.2195.

3.2.3.6. *17 β -N-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenylcarbamoyl]androst-4-ene-3-one (6f)*. Yield: 65%, mp 214–216 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3316,

3105, 2941, 2856, 1660, 1642, 1380, 1275, 1129. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 5.8 (1H, s, H-4), 7.6 (1H, sb, PhNH), 7.6 (1H, s, H-4', aromatic), 8.2 (2H, s, H-2' and H-6', aromatic). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.6 (C-18), 17.4 (C-19), 117.4 (q, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz, C-1'), 119.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz, C-2' and C-6', aromatic), 124.1 (C-4), 126.0 (q, $J_{\text{C-F}} = 272$ Hz, CF_3), 132.4 (q, $J_{\text{C-F}} = 33.4$ Hz, C-3 and C-5', aromatic), 139.9 (C-1'), 171.7 (C-5), 171.8 (carbonyl amide), 200.3 (C-3). HRMS (FAB^+): calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 528.2337, found 528.2332.

3.2.3.7. 17 β -N-(1,3-thiazol-2-ylcarbonyl)androst-4-ene-3-one (6g). Yield: 71%, mp 209–211 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3229, 3132, 3061, 2980, 2964, 2933, 2923, 2884, 2869, 2854, 1681, 1666, 1584, 870. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 5.7 (1H, s, H-4), 7.0 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-5', thiazole), 7.4 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-4', thiazole), 10.1 (1H, sb, thiazole-NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.5 (C-18), 17.5 (C-19), 113.7 (C-5', thiazole), 124.2 (C-4), 136.9 (C-4', thiazole), 158.9 (C-2', thiazole), 170.8 (C-5), 170.9 (carbonyl amide), 199.6 (C-3). HRMS (FAB^+): calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 399.5615, found 399.5619.

3.2.3.8. 17 β -(2,3-dihydro-1H-indol-1-ylcarbonyl)androst-4-en-3-one (6h). Yield: 45%, mp 234–235 °C, IR (FT-IR) cm^{-1} : 3026, 2940, 2907, 2856, 2840, 1666, 1645, 1595, 764. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.2 (3H, s, H-19), 3.1 (2H, t, $J = 8.4$ Hz, CH_2 , indoline), 4.1 (2H, dq, $J_1 = 9.1$ Hz, $J_2 = 18.6$ Hz, CH_2 , indoline), 5.7 (1H, s, H-4), 7.0 (1H, m, H-7', indoline), 7.2 (2H, m, H-5' and H-6', indoline), 8.3 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-4', indoline). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.1 (C-18), 17.4 (C-19), 28.2 (CH_2 , indoline), 48.7 (CH_2 , indoline), 117.6 (C-7', indoline), 123.6 (C-4', indoline), 124.0 (C-4), 124.6 (C-5', indoline), 127.5 (C-6', indoline), 131.5 (C-3a, indoline), 143.6 (C-7a, indoline), 171.2 (C-5), 172.2 (carbonyl amide), 199.6 (C-3). HRMS (FAB^+): calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 418.2746, found 418.2745.

3.3. Anti-proliferative assay

The steroidal compounds were screened *in vitro* against the LNCaP cell line and rat peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The best compounds that resulted from this assay were evaluated against PC3 cells using the method previously described by our group [21]. The anti-proliferative activity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in a microculture assay to measure cell growth [35].

Flutamide, finasteride and ketoconazole used in this assay were purchased from Sigma-Aldrich.

3.3.1. Determination of the anti-proliferative effect on LNCaP cells

The androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma LNCaP cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in RPMI 1640 medium (ATCC modification) with 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 4.5 g/L D-glucose, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 1 mM sodium pyruvate, 1% penicillin-Streptomycin (ATCC) and 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). The LNCaP cells were regularly grown at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. After confluency, LNCaP cells were cultured in 96-well plates at a cellular density of 3×10^4 cells/mL in order to avoid the interference of the steroids present in FBS and the oestrogenic effect of phenol red [36]. Before the addition of compounds, cells were cultured for 72 h in a steroid-free RPMI medium containing L-glutamine, without phenol red (Gibco Invitrogen Co), 1 mmol/L sodium pyruvate and 5% fetal bovine serum. After that time, LNCaP cells were treated with 50 μM of each compound without any proliferation inducing agent or with 0.1 μM of T or DHT for 48 h. On the other hand, cells incubated with T or DHT plus 0.05% of DMSO (carrier) were used as control. Finasteride, flutamide and ketoconazole were used as reference drugs. The plates were washed with tap H_2O , and air-dried. The trichloroacetic-acid-fixed cells were

stained by the addition of 0.4% SRB. Free SRB solution was later 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 unbuffered tris base (100 μL). The plates were placed on a microtiter plate shaker incubator for 5 min, and the absorption was determined at 515 nm using an ELISA plate reader (Bio-Tex Instruments). Percentage cell growth inhibition was calculated according to the following expression:

$$\text{Cell growth inhibition (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{sample absorption})}{(\text{vehicle absorption})} \right] \times 100$$

3.3.2. Determination of the cytotoxic effect on rat peripheral blood mononuclear cells

This procedure was carried out adapting the procedure used by Ref. [37]. Briefly, male Wistar rats of 250–300 g were used and anesthetized intraperitoneally with sodium pentobarbital. When they were fully anesthetized, a 10 mL syringe was loaded with 1 mL of heparin, introduced, and 9 mL of blood was removed by cardiac puncture and mixed gently to prevent clot formation. 3 mL of fresh heparinized blood was slowly placed into 15 mL conical centrifuge tubes, which were filled previously with 3 mL Ficoll-Hypaque solution.

The tubes were centrifuged in a swing-out rotor at room temperature, starting with a spin speed of 500 rpm and increased up to 2000 rpm for 20 min.

The mononuclear fraction was collected using a sterile pipet and placed in conical tubes, PBS was added and samples were centrifuged at 2500 rpm for 5 min. The supernatant was decanted and the pellet was suspended in PBS and centrifuged again to remove any remnants. The cell pellet was suspended in RPMI 1640 media and cell viability was determined using the trypan blue method. PBMC density was adjusted to 1×10^6 cells/mL.

From this PBMC suspension, 100 μL aliquots were deposited in 96-well plates and incubated for 1 h. The test compounds were added at 50 μM in a volume of 100 μL . The cells were incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, cells were fixed to the plastic substratum 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 H_2O , 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 unbuffered tris base (100 μL). The plates were placed on a microtiter plate shaker incubator for 5 min, and the absorption was determined at 515 nm using an ELISA plate reader (Bio-Tex Instruments). Percentage cell growth inhibition was calculated as described in section 3.3.1.

4. Conclusions

A series of novel 17 β -N-arylcarbonylandrost-4-en-3-one derivatives were synthesized and evaluated against LNCaP cells stimulated with testosterone and DHT. The most potent compounds were selected and also assessed on the androgen-insensitive PC3 cell line and all the steroidal compounds were evaluated on PBMC cells.

The eight novel steroids synthesized (**6a-h**) displayed anti-proliferative effects on LNCaP cells. However, the *p*-substitution in the 17 β -arylcarbonyl moiety was found to have a negative impact on the anti-proliferative effect on T-stimulated cells. In this study, we also identified the compounds 17 β -N-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenylcarbonyl]androst-4-en-3-one (**6f**)

and 17 β -N-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)androst-4-ene-3-one (**6g**) as those showing the strongest growth inhibitory effects on stimulated and non-stimulated LNCaP cells, these compounds compared to finasteride, flutamide and ketoconazole. Furthermore, **6f** and **6g** were able to decrease the proliferation of PC3 cells to an even greater extent than LNCaP cells. Thus, these steroidal derivatives are potential candidates for further investigation in castration-resistant prostate cancer treatment. These compounds also exhibited low cytotoxicity against non-cancerous PBMC cells, further highlighting their potential as anticancer-prostate drugs.

Further research can explore the pharmacological targets of these new steroids in order to determine the main cause of their anti-proliferative effects on LNCaP and PC3 cells. We look forward to expanding the library of these compounds with the purpose of elucidating quantitative structural relationships associated with their growth inhibition effects on cancerous prostate cells.

Acknowledgements

The authors thank Dirección General Asuntos del Personal Académico-UNAM (DGAPA) for funding granted through the project IN211312 (UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the financial support granted to project CB 2011/165049. Francisco Cortés-Benítez also acknowledges CONACYT for the fellowship awarded (number 255249).

We also thank Manuel Jimenez and Adela Rodriguez for their support in carrying out the High Resolution Mass Spectra analysis. Additionally, we thank Rafael Castillo and J.L. Medina-Franco for their comments and Anuar Flores-Gahona for the English proof of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.059>.

References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2015. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 14.05.15.
- [2] Y. Zhou, E.C. Bolton, J.O. Jones, Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis, *J. Mol. Endocrinol.* 54 (2015) R15–R29, <http://dx.doi.org/10.1530/JME-14-0203>.
- [3] U. Motohida, T. Kenji, S. Chung, S. Honma, A. Okuyama, Y. Nakamura, H. Nakagawa, Novel 5 α -steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer, *Cancer Sci.* 99 (1) (2008) 81–86.
- [4] T. Saartok, E. Dahlberg, J.A. Gustafsson, Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin, *Endocrinology* 114 (6) (1984) 2100–2106, <http://dx.doi.org/10.1210/endo-114-6-2100>.
- [5] S. Aggarwal, S. Thareja, A. Verma, T.R. Bhardwaj, M. Kumar, An overview on 5 α -reductase inhibitors, *Steroids* 75 (2010) 109–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2009.10.005>.
- [6] W. Gao, C.E. Bohl, J.T. Dalton, Chemistry and structural biology of androgen receptor, *Chem. Rev.* 105 (2005) 3352–3370, <http://dx.doi.org/10.1021/cr020456u>.
- [7] D.J. Tindall, R.S. Rittmaster, The rationale for inhibiting 5 α -reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer, *J. Urol.* 179 (2008) 1235–1242, <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2007.11.033>.
- [8] T.S. Vasaitis, R.D. Bruno, V.C.O. Njar, CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 125 (2011) 23–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.005>.
- [9] J.A.R. Salvador, R.M.A. Pinto, S.M. Silvestre, Steroidal 5 α -reductase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 199–222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.04.006>.
- [10] D. Poirier, Recent patents on new steroid agents targeting the steroidogenesis for endocrine cancer treatments, *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* (2015) 15–23.
- [11] E. Bratoeff, M. Cabeza, E. Ramirez, Y. Heuze, E. Flores, Recent advances in the chemistry and pharmacological activity of new steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005), <http://dx.doi.org/10.2174/0929867053507306>.
- [12] D.N. Grigoryev, B.J. Long, I.P. Nnane, V.C. Njar, Y. Liu, A.M. Brodie, Effects of new 17 α -hydroxylase/C(17,20)-lyase inhibitors on LNCaP prostate cancer cell growth in vitro and in vivo, *Br. J. Cancer* 81 (1999) 622–630, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6690739>.
- [13] T. Vasaitis, A. Belosay, A. Schayowitz, A. Khandelwal, P. Chopra, L.K. Gediya, et al., Androgen receptor inactivation contributes to antitumor efficacy of 17 α -hydroxylase/17,20-lyase inhibitor 3 β -hydroxy-17 α -(1H-benzimidazole-1-yl)androst-5,16-diene in prostate cancer, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 2348–2357, <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0230>.
- [14] P. Purushottamachar, A.M. Godbole, L.K. Gediya, M.S. Martin, T.S. Vasaitis, S. Ramalingam, et al., Systematic structure modifications of multitarget prostate cancer drug candidate galeterone to produce novel androgen receptor down-regulating agents as an approach to treatment of advanced prostate cancer, *J. Med. Chem.* 56 (12) (2013) 4880–4898, <http://dx.doi.org/10.1021/jm400048v>.
- [15] J. Veldscholte, C. Ris-Stalpers, G.G.J.M. Kuiper, G. Jenster, C. Berrevoets, E. Claassen, et al., A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 534–540, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80067-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80067-1).
- [16] G.B. Djigoué, L.C. Kenmogne, J. Roy, R. Maltais, D. Poirier, Design, chemical synthesis and biological evaluation of 3-spiromorpholinone/3-spirocarbamate androstereone derivatives as inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 5433–5451, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.049>.
- [17] J.S. Horoszewicz, S.S. Leong, E. Kawinski, J.P. Karr, H. Rosenthal, T.M. Chu, et al., LNCaP model of human prostatic carcinoma LNCaP model of human prostatic carcinoma, *Cancer Res.* (1983) 1809–1818.
- [18] Xiang Hua, et al., Faming Zhuanli Shenqing, Steroid 5 α -reductase Inhibitors, Preparation Methods and Medical Applications, 2012. CN 102532236 A 20120704.
- [19] J. Wang, M.E. Duggan, D.B. Whitman, Androstane 17 β -carboxamides as androgen receptor modulators, *PCT Int. Appl.* (2003). WO 2003029268 A1 20030410.
- [20] C. Amaral, C. Varela, G. Correia-da-Silva, E. Tavares da Silva, R. a Carvalho, S.C.P. Costa, et al., New steroidal 17 β -carboxy derivatives present anti-5 α -reductase activity and anti-proliferative effects in a human androgen-responsive prostate cancer cell line, *Biochimie* 95 (2013) 2097–2106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.023>.
- [21] A. Chávez-Riveros, M. Garrido, M.T. Ramírez Apan, A. Zambrano, M. Díaz, E. Bratoeff, Synthesis and cytotoxic effect on cancer cell lines and macrophages of novel progesterone derivatives having an ester or a carbamate function at C-3 and C-17, *Eur. J. Med. Chem.* 82 (2014) 498–505, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.008>.
- [22] S. Tai, Y. Sun, J.M. Squires, H. Zhang, W.K. Oh, C.Z. Liang, et al., PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma, *Prostate* 71 (2011) 1668–1679, <http://dx.doi.org/10.1002/pros.21383>.
- [23] Y. Nakai, N. Tanaka, S. Anai, M. Miyake, Y. Tatsumi, K. Fujimoto, A randomized control trial comparing the efficacy of antiandrogen monotherapy: flutamide vs. Bicalutamide, *Horm. Cancer* (2015) 161–167, <http://dx.doi.org/10.1007/s12672-015-0226-1>.
- [24] M. Taplin, G.J. Bubley, Y. Ko, E.J. Small, M. Upton, B. Rajeshkumar, et al., Advances in brief selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist, *Cancer Res.* 59 (1999) 2511–2515.
- [25] Q. Shi, K. Wada, E. Ohkoshi, L. Lin, R. Huang, S.L. Morris-Natschke, et al., Antitumor agents 290. Design, synthesis, and biological evaluation of new LNCaP and PC-3 cytotoxic curcumin analogs conjugated with anti-androgens, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 4020–4031, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.011>.
- [26] F. Azzouni, A. Godoy, Y. Li, J. Mohler, The 5 α -reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases, *Adv. Urol.* 2012 (2012) ID 530121, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/530121>.
- [27] M.C. Byrns, R. Mindnich, L. Duan, T.M. Penning, Overexpression of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) in LNCaP cells diverts androgen metabolism towards testosterone resulting in resistance to the 5 α -reductase inhibitor finasteride, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 130 (2012) 7–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.12.012>.
- [28] W. Kim, C.J. Ryan, Androgen receptor directed therapies in castration-resistant metastatic prostate cancer, *Curr. Treat. Options Oncol.* 13 (2012) 189–200, <http://dx.doi.org/10.1007/s11864-012-0188-2>.
- [29] M.V. Blagosklonny, S.C. Dixon, W.D. Figg, Efficacy of microtubule-active drugs followed by ketoconazole in human metastatic prostate cancer cell lines, *J. Urol.* 163 (2000) 1022–1026, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688042>.
- [30] J.M. Galván-Hidalgo, E. Gómez, T. Ramírez-Apan, A. Nieto-Camacho, S. Hernández-Ortega, Synthesis and cytotoxic activity of dibutyltin complexes derived from pyridoxamine and salicylaldehydes, *Med. Chem. Res.* 24 (2015) 3621–3631, <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-015-1407-8>.
- [31] B.J. Long, D.N. Grigoryev, I.P. Nnane, Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors on hormone-dependent prostate Cancer, *Cancer Res.* 60 (2000) 6630–6640.

- [32] J.M. Golbano, P. López-Aparicio, M.N. Recio, M. a Pérez-Albarsanz, Finasteride induces apoptosis via Bcl-2, Bcl-xL, Bax and caspase-3 proteins in LNCaP human prostate cancer cell line, *Int. J. Oncol.* 32 (2008) 919–924, <http://dx.doi.org/10.3892/ijco.32.4.919>.
- [33] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3714–3717, <http://dx.doi.org/10.1021/jm000942e>.
- [34] J. Staunton, E.J. Eisenbraun, 3 β -acetoxyetienic acid, *Org. Synth.* 42 (1962) 4, <http://dx.doi.org/10.15227/orgsyn.042.0004>.
- [35] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, et al., Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (1991) 757–766, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>.
- [36] M. Greiner, R. Zimmermann, Real-time analysis of LNCaP cell growth in different media, *Biochemica 1* (2010) 14–15.
- [37] I.J. Fuss, M.E. Kanof, P.D. Smith, H. Zola, Isolation of whole mononuclear Cells from peripheral blood and cord blood, *Curr. Protoc. Immunol.* (2009) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im0701s85>.



Impact of androstane A- and D-ring inversion on 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitory activity, androgenic effect and metabolic stability



Francisco Cortés-Benítez^{a,c}, Jenny Roy^{a,b}, René Maltais^{a,b}, Donald Poirier^{a,b,*}

^a Laboratory of Medicinal Chemistry, Endocrinology and Nephrology Unit, CHU de Québec – Research Center, Québec, Québec, Canada

^b Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, Québec, Canada

^c Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2016

Revised 31 January 2017

Accepted 6 February 2017

Available online 9 February 2017

Keywords:

Steroid

Androsterone derivatives

Hydroxysteroid dehydrogenase

LNCaP cells

LAPC-4 cells

Prostate cancer

ABSTRACT

17β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17β -HSD3) is a major player in human endocrinology, being one of the most important enzymes involved in testosterone production. To capitalize on the discovery of RM-532-105, a steroidal 17β -HSD3 inhibitor, we explored the effect of its backbone configuration on inhibitory activity, androgenic profile, and metabolic stability. Two modifications that greatly alter the natural shape of steroids, i.e. inversion of the methyl on carbon 13 (13α -CH₃ instead of 13β -CH₃) and inversion of the hydrogen on carbon 5 (5β -H instead of 5α -H), were tested after the syntheses in 6 steps of 2 isomeric forms ($5\alpha/13\alpha$ -RM-532-105 (**6a**) and $5\beta/13\beta$ -RM-532-105 (**6b**), respectively) of the 17β -HSD3 inhibitor RM-532-105 ($5\alpha/13\beta$ -configurations). For compound **6b**, a *cis/trans* junction of the A/B rings did not significantly alter the inhibitory activity on 17β -HSD3 ($IC_{50} = 0.15 \mu M$) as well as the liver microsomal stability (16.6% of **6b** remaining after 1 h incubation) compared to RM-532-105 ($IC_{50} = 0.11 \mu M$ and 14.1% remaining). In contrast, a *trans/cis* junction of C/D rings reduced the inhibitory activity on 17β -HSD3 ($IC_{50} = 1.09 \mu M$) but increased the metabolic stability with 29.4% of compound **6a** remaining after incubation. The structural modifications represented by compounds **6a** and **6b** did not change the non-androgenicity profile of an androsterone derivative such as RM-532-105, but slightly increased its cytotoxic activity.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer in men, the fourth most common cancer in both sexes combined, and its incidence is highest in developed areas such as North America, Australia, as well as Western and Northern Europe.¹ For instance, in the United States, 180,890 new cases and 26,120 deaths were estimated in 2016.² Thus, PCa is a major disease, and there are currently several therapies to improve health or help to prolong life expectancy. Hormonal therapy is one of the first choices to treat PCa.³ Unfortunately, this cancer often evolves toward a castration-resistant form.⁴ Therefore, hormonal therapy must be improved by discovering new selective and potent drug candidates to take the relay to these first-line therapies.

The initial growth of prostate carcinomas depends on testosterone (T) and its most androgenic metabolite 5α -dihydrotestosterone (5α -DHT), which both stimulate the growth of hormone-dependent prostate cancer tumors through interaction with the androgen receptor (AR).^{5,6} Therefore, suppressing T and 5α -DHT action in prostate cancer cells through the inhibition of the key enzymes involved in their synthesis is an approach to decrease the progression of PCa. In this context, 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17β -HSD3) is a key steroidogenic macromolecule involved in the synthesis of androgens (Fig. 1).^{7–10} This enzyme is well-known to catalyze the reduction of 4-androstene-3,17-dione (4-dione) to potent androgen T using NADPH as cofactor,¹¹ but it could be also involved in the reduction of other steroids (5α -androstane-3,17-dione, androsterone (ADT) and dehydroepiandrosterone), thus contributing to alternative pathways for the synthesis of 5α -DHT.^{12–15} Although 17β -HSD3 is expressed almost exclusively in testis,¹⁶ there have been some reports of its up-regulation in prostate tumors. For example, Pfeiffer et al. have reported that in clinical Castrate-Resistant Prostate

* Corresponding author at: Laboratory of Medicinal Chemistry, CHU de Québec – Research Center (CHUL, T4-42), 2705 Laurier Boulevard, Québec, Québec G1V 4G2, Canada.

E-mail address: donald.poirier@crchul.ulaval.ca (D. Poirier).

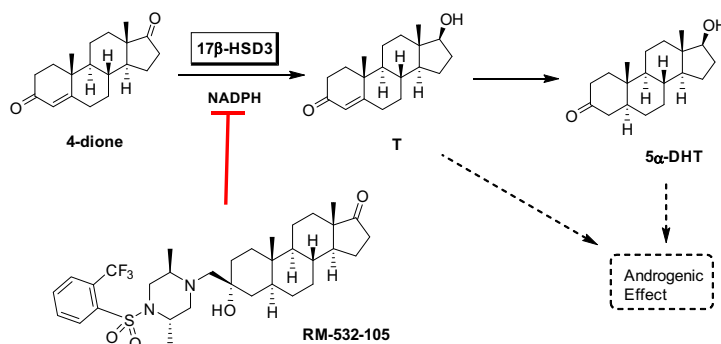


Fig. 1. Contribution of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17 β -HSD3) to the biosynthesis of the androgens testosterone (T) and 5 α -dihydrotestosterone (5 α -DHT) from 4-androstene-3,17-dione (4-dione). RM-532-105 is a 3 β -androsterone derivative that inhibits the steroidogenic enzyme 17 β -HSD3.

Cancer (CRPC) samples, the expression of 17 β -HSD3 was significantly increased, even in long-term hormone depletion.¹⁷ Thus, 17 β -HSD3 is an interesting target for hormonal therapy, and its inhibition should be an effective strategy for the treatment of androgen-dependent PCa.

In previous studies,^{18–20} our research group reported the synthesis and pharmacological activity of RM-532-105, which is a 3 β -substituted-ADT derivative (Fig. 1). This steroid was identified as a potent 17 β -HSD3 inhibitor on transfected HEK-293[17 β -HSD3] as well as in LNCaP[17 β -HSD3] cells.^{18,21} Moreover, RM-532-105 has been shown to decrease the level of T and 5 α -DHT in plasma at 2 h in rats, after subcutaneous injection.²⁰

However, it is also known that spatial modifications of the steroidal backbone, such as inversion of the A-ring or D-ring (Fig. 2), exert a substantial effect on its biological properties.^{22–26} For example, changing the 18-methyl (CH₃) group of estradiol (E2) from the β -face to α -face modifies the D-ring shape,²² and this 13 α -E2 (or 18-*epi*-E2) was reported to bind significantly less to the estrogen receptor alpha (ER α) than E2 with a relative binding affinity (RBA) of 1.2 and 100%, respectively.²³ Moreover, this unnatural steroid did not exert a significant proliferative effect on estrogen-sensitive MCF-7 cells (ER⁺) as well as on estrogenic activity in mice.^{23,24} Similarly, the *cis-trans* A/B fused rings of 5 β -DHT (or etiocholan-17 β -ol-3-one) exhibit 173-fold less RBA to AR than the *trans-trans* conformation of 5 α -DHT.²⁶

Based on the facts reported above, we were interested to test 2 major modifications of the androstane backbone of RM-532-105 (13 α -CH₃ vs 13 β -CH₃ and 5 β -H vs 5 α -H). Because 17 β -HSD3 is a membrane enzyme, its crystal structure has not yet been resolved and molecular modelling studies have been limited to homology model constructions.^{27–29} Therefore, a classical structure-activity relationship (SAR) study remains an efficient strategy to explore the tolerance of an enzyme for structural modification of an inhibitor backbone. Herein, we describe the chemical synthesis and characterization of compounds **6a** (13 α -CH₃) and **6b** (5 β -H). We also address the impact of C13 and C5 stereochemistries on 17 β -HSD3 inhibitory activity, androgenic effect and metabolic stability.

2. Material and methods

2.1. Chemical synthesis

2.1.1. General information

Compounds **1a** and **1c** were prepared by the procedure described in Ref. 30 whereas compound **1b** was purchased from Steraloids (Wilton, NH, USA). The reagents for chemical synthesis were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON, Canada). The usual solvents were obtained from Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada) and were used as received. Anhydrous tetrahydrofuran (THF), dichloromethane (DCM), dimethyl sulfoxide (DMSO) and toluene were obtained from Sigma-Aldrich. Thin-layer chromatography (TLC) and flash-column chromatography were performed on 0.20-mm Silica Gel 60 F254 plates and with Silicycle R10030B 230–400 mesh silica gel (Québec, QC, Canada). Infrared spectra (IR) were recorded with a Horizon MB 3000 ABB FTIR spectrometer (Quebec, QC, Canada), and only the characteristic bands are reported in cm⁻¹. Samples were prepared as KBr pellets. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at 400 MHz for ¹H and 100.6 MHz for ¹³C with a Bruker Avance 400 digital spectrometer (Billerica, MA, USA). The chemical shifts (δ) are expressed in ppm and referenced to chloroform (7.26 ppm, ¹H and 77.0 ppm, ¹³C). ¹H NMR signals were reported as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet) and broad (br). Low-resolution mass spectra (LRMS) were recorded on a Shimadzu Prominence apparatus (Kyoto, Japan) equipped with a Shimadzu LCMS-2020 mass spectrometer and an APCI (atmospheric pressure chemical ionization) probe. High-resolution mass spectra (HRMS) were provided by Pierre Audet at the Laval University Chemistry Department (Quebec, QC, Canada). High-performance liquid chromatography (HPLC) purity of final compounds was determined with a Shimadzu Prominence apparatus (Kyoto, Japan) using a Shimadzu SPD-M20A photodiode array detector, an Alltima HP C18 analytical reversed-phase column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) and a solvent gradient of MeOH:water

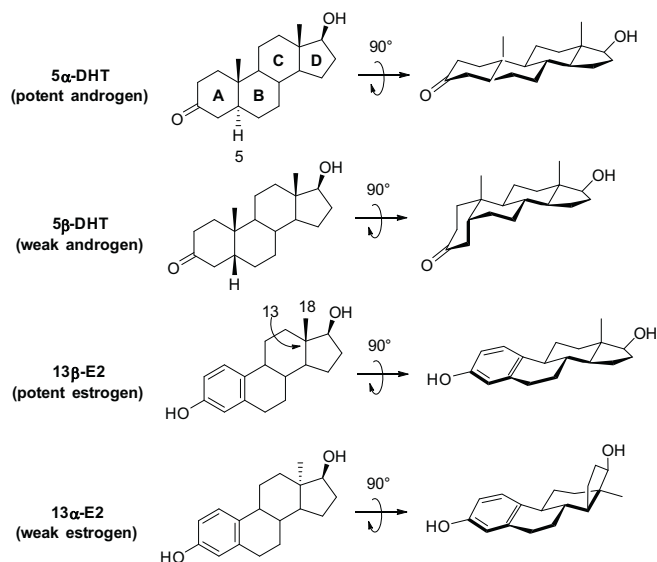


Fig. 2. Conformational representations of 5 α -DHT (potent androgen), 5 β -DHT (weak androgen), 13 β -E2 (potent estrogen) and 13 α -E2 (weak estrogen).

to MeOH (100%). For compound **8**, however, formic acid (0.1%) was added to water. The wavelength of UV detector was fixed at 190 nm. The names of new compounds were obtained mainly using ACD/Labs (Chemist's version) software (Toronto, ON, Canada). The numbering reported in Fig. 3 was used for the assignment of ^1H and ^{13}C NMR signals.

2.1.2. Synthesis of **2a** and **2b**

To a solution of (3 β ,5 α ,13 α)-3-hydroxyandrostane-17-one (**1a**, 100 mg, 0.34 mmol) or (3 β ,5 β)-3-hydroxyandrostane-17-one (**1b**, 150 mg, 0.52 mmol) in anhydrous toluene (5 mL) was added ethylene glycol (10.0 eq) and *p*-toluenesulfonic acid (0.1 eq). The reaction was refluxed under a Dean-Stark trap for 12 h. The solution was poured into cold water (100 mL) and extracted with EtOAc (3 \times 20 mL). The organic phase was washed with a 20% solution of sodium acetate (3 \times 20 mL) and brine (2 \times 20 mL), dried with Na_2SO_4 and filtered. The resulting solution was evaporated and purified by flash chromatography column using hexanes/EtOAc (95:5 to 80:20) to give **2a** (90 mg, 79%) or **2b** (130 mg, 74%), respectively.

2.1.2.1. (3 β ,5 α ,13 α)-17-(1,3-Dioxolan-2-yl)-3-hydroxyandrostane (2a). IR (KBr) ν_{max} : 3348 (OH), 2924, 2854 (CH, aliphatic). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.62 (m, 1H), 0.74 (s, 19- CH_3), 0.94 (s, 18- CH_3), 0.60–1.95 (m, unassigned CH and CH_2), 3.59 (m, 3 α -H), 3.88 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$). LRMS for $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 335.25.

2.1.2.2. (3 β ,5 β)-17-(1,3-Dioxolan-2-yl)-3-hydroxyandrostane (2b). IR (KBr) ν_{max} : 3286 (OH), 2932 (CH, aliphatic). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.83 (s, 19- CH_3), 0.96 (s, 18- CH_3), 1.00–1.99 (m, unassigned CH and CH_2), 3.88 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.09 (m, 3 α -H). LRMS for $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 335.15.

2.1.3. Synthesis of 3-keto derivatives **3a** and **3b**

To a solution of compound **2a** (90 mg, 0.27 mmol) or **2b** (130 mg, 0.39 mmol) in DCM (5 mL) was added Dess–Martin periodinane (1.3 eq). The reaction was stirred at room temperature for 1 h and the resulting white suspension was evaporated. The residue was diluted with EtOAc (20 mL) and washed with a saturated solution of sodium bicarbonate (3 \times 20 mL) and brine (2 \times 20 mL). The organic phase was dried with Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography column, using hexanes/EtOAc (95:5 to 80:20) to give **3a** (40 mg, 44%) or **3b** (110 mg, 84%), respectively.

2.1.3.1. (5 α ,13 α)-17-(1,3-Dioxolan-2-yl)-androstane-3-one (3a). IR (KBr) ν_{max} : 2924, 2870 (CH, aliphatic), 1705 ($\text{C}=\text{O}$). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.94 (s, 19- CH_3), 0.95 (s, 18- CH_3), 0.65–2.42 (m, unassigned CH and CH_2), 3.89 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$). LRMS for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 333.15.

2.1.3.2. (5 β)-17-(1,3-Dioxolan-2-yl)-androstane-3-one (3b). IR (KBr) ν_{max} : 2932, 2862 (CH, aliphatic), 1713 ($\text{C}=\text{O}$). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.87 (s, 19- CH_3), 1.02 (s, 18- CH_3), 1.05–2.19 (m, unassigned CH and CH_2), 2.33 (td, $J_1 = 14.6$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, 2-CH), 2.68

(t, $J = 14.6$ Hz, 4-CH), 3.91 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$). LRMS for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 333.25.

2.1.4. Synthesis of the oxirane derivatives **4a** and **4b**

To a solution of trimethylsulfoxonium iodide (2.0 eq), in dry DMSO (3 mL) was carefully added sodium hydride 60% in oil (2.0 eq). The solution was stirred at room temperature under argon atmosphere for 1 h before adding **3a** (40 mg, 0.12 mmol) or **3b** (100 mg, 0.30 mmol) dissolved in THF (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h, poured in ice/water (100 mL) and extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine and dried with Na_2SO_4 . The resulting solution was filtered, evaporated and the crude product purified by flash chromatography column using hexanes/EtOAc (85:15) to give **4a** (30 mg, 72%) or **4b** (82 mg, 79%), respectively.

2.1.4.1. (5 α ,13 α)-17-(1,3-Dioxolan-2-yl)-(3R)-oxiran-2-yl-androstane (4a). IR (KBr) ν_{max} : 2939, 2862 (CH, aliphatic). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.77 (s, 19- CH_3), 0.95 (s, 18- CH_3), 0.75–2.08 (m, unassigned CH and CH_2), 2.61 (s, 20- CH_2), 3.88 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$). LRMS for $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 347.20.

2.1.4.2. (5 β)-17-(1,3-Dioxolan-2-yl)-(3S)-oxiran-2-yl-androstane (4b). IR (KBr) ν_{max} : 2932, 2862 (CH, aliphatic). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.85 (s, 19- CH_3), 0.99 (s, 18- CH_3), 1.03–2.01 (m, unassigned CH and CH_2), 2.32 (t, $J = 13.8$ Hz, 4-CH), 2.62 (s, 20- CH_2), 3.88 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$). LRMS for $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 347.25.

2.1.5. Synthesis of intermediates **5a** and **5b**

To a solution of **4a** (28 mg, 0.08 mmol) or **4b** (80 mg, 0.23 mmol) in anhydrous ethanol (4 mL) was added *trans*-2,5-dimethylpiperazine (5.0 eq). The solution was stirred 12 h at 70 $^\circ\text{C}$. The resulting solution was poured in ice/water (50 mL). The white precipitate was separated by vacuum filtration, and the solid was purified by flash chromatography column using DCM/MeOH/TEA (96:2:2) to give **5a** (20 mg, 54%) or **5b** (52 mg, 50%), respectively.

2.1.5.1. (3 α ,5 α ,13 α)-17-(1,3-Dioxolan-2-yl)-3-[(*trans*-2,5-dimethylpiperazin-1-yl)methyl]-3-hydroxyandrostane (5a). IR (KBr) ν_{max} : 3425 (NH and OH), 2939 (CH, aliphatic). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.67 (s, 19- CH_3), 0.94 (s, 18- CH_3), 0.98–1.01 (m, 2 \times CH_3CH), 1.10–2.08 (m, unassigned CH and CH_2), 2.30 (m, 1H), 2.51–2.62 (m, 1H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.88–2.93 (m, 1H), 3.88 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$). LRMS for $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 461.30.

2.1.5.2. (3 β ,5 β)-17-(1,3-Dioxolan-2-yl)-3-[(*trans*-2,5-dimethylpiperazin-1-yl)methyl]-3-hydroxyandrostane (5b). IR (KBr) ν_{max} : 3433, 3317 (NH and OH), 2932, 2862 (CH, aliphatic). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.84 (s, 19- CH_3), 0.96 (s, 18- CH_3), 0.98–1.01 (m, 2 \times CH_3CH), 1.02–2.10 (m, unassigned CH and CH_2), 2.30 (m, 1H), 2.51–2.56 (m, 2 \times CH_3CH), 2.72 (m, 1H), 2.82–2.87 (m, 2H), 3.84–3.96 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$). LRMS for $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 461.45.

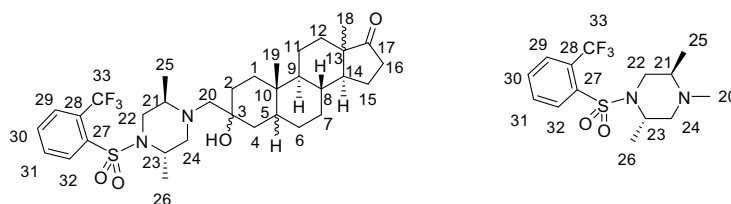


Fig. 3. Carbon numbering used for the assignment of ^1H NMR and ^{13}C NMR signals.

2.1.6. Synthesis of sulfonamides **6a** and **6b**

To a solution of **5a** (20 mg, 0.04 mmol) or **5b** (44 mg, 0.09 mmol) in anhydrous DCM (3 mL) was added triethylamine (4.0 eq) and 2-(trifluoromethyl)benzenesulfonyl chloride (2.0 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h, then evaporated, and the remaining oily residue was diluted with acetone (5 mL) and concentrated hydrochloric acid (0.1 mL). The reaction mixture was next stirred into an ice bath for 30 min. The resulting solution was evaporated and diluted with EtOAc (50 mL), washed with water and dried with Na₂SO₄. After filtration and evaporation, the residue was purified by flash chromatography column using hexanes/EtOAc (90:10 to 60:40) to give **6a** (11 mg, 44% for 2 steps) or **6b** (29 mg, 52% for 2 steps), respectively.

2.1.6.1. (3 α ,5 α ,13 α)-3-[(trans-2,5-Dimethyl-4-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]sulfonyl]piperazin-1-yl)methyl]-3-hydroxyandrostane-17-one (6a**).** IR (KBr) ν_{max} : 3448 (OH), 2924, 2854 (CH, aliphatic), 1736 (C=O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.56 (s, 19 β -CH₃), 0.60–0.75 (m, 7-CH and 9 α -H), 0.85–0.90 (m, 8 β -H), 0.86 and 0.88 (2d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.96 (s, 18 α -CH₃), 1.16 and 1.19 (2d, J = 5.4 Hz, 26-CH₃), 1.15–1.45 (m, 1-CH, 2-CH, 15-CH, 6-CH and 12-CH), 1.45–1.70 (m, 1-CH, 7-CH and 14 α -CH), 1.80 (m, 1H), 1.95–2.05 (m, 2H), 2.10–2.23 (m, 12-CH, 16-CH and 20-CH), 2.32 (m, 16-CH, 20-CH and 24-CH), 2.80 (br, OH), 2.89 (m, 21-CH), 3.08 (br d, J = 10.2 Hz, 24-CH), 3.35 (m, 22-CH), 3.49 (dd, J_1 = 12.9 Hz, J_2 = 2.9 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-CH), 7.68 (m, 30-CH and 31-CH), 7.87 (m, 29-CH), 8.17 (m, 32-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ : 8.6 (C25), 10.9 (C19), 15.7 (C26), 21.2 (C11), 22.4 (C15), 25.2 (C18), 28.6 (C6), 29.7 (C7), 32.2 (C12), 32.3 (C2), 33.6 (C1), 33.8 (C16), 35.9 (C10), 37.8 (C8), 39.4 (C4), 40.1 (C5), 46.0 (C22), 49.5 (C23), 50.1 (C13), 50.8 (C14), 51.4 (C9), 52.4 (C24), 54.7 (C21), 65.7 (C20), 70.9 (C3), 122.6 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 274.4 Hz, C33), 127.5 (q, $J_{\text{C-C-F}}$ = 43.8 Hz, C28), 128.5 (q, $J_{\text{C-C-C-F}}$ = 6.4 Hz, C29), 131.9 (C32), 132.1 (C31), 132.5 (C30), 139.3 (C27), 221.4 (C17). HRMS for C₃₃H₄₈F₃N₂O₄S [M+H]⁺: 625.3281 (calculated), 625.3271 (found). HPLC purity of 95.5% (retention time = 17.6 min, 70:30 MeOH/H₂O-isocratic, Luna C18 column).

2.1.6.2. (3 β ,5 β)-3-[(trans-2,5-Dimethyl-4-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]sulfonyl]piperazin-1-yl)methyl]-3-hydroxyandrostane-17-one (6b**).** IR (KBr) ν_{max} : 3502 (OH), 2932, 2862 (CH, aliphatic), 1736 (C=O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.85 (s, 18 β -CH₃), 0.88 and 0.89 (2d, J = 6.5 Hz, 25-CH₃), 0.98 (s, 19 β -CH₃), 1.05–1.15 (m, 4 β -CH and 7-CH), 1.17 and 1.18 (2d, J = 6.7 Hz, 26-CH₃), 1.20–1.37 (m, 2-CH₂, 6 α -CH, 9 α -H, 11 α -CH and 14 α -H), 1.40–1.64 (m, 1-CH, 7-CH, 8 β -CH, 11 β -CH, 12-CH and 15 β -CH), 1.72–1.80 (5 β -H and 12 β -CH), 1.88–1.95 (m, 6 β -CH and 15 α -CH), 2.04 (m, 16 α -CH), 2.12 (d, J = 13.9 Hz, 20-CH), 2.30 (d, J = 14.1 Hz, 20-CH), 2.38 (m, 24-CH), 2.44 (dd, J_1 = 19.1 Hz, J_2 = 8.7 Hz, 16 β -CH), 2.80 (br, OH), 2.89 (m, 21-CH), 3.08 (dd, J_1 = 12.0 Hz, J_2 = 3.7 Hz, 24-CH), 3.35 (m, 22-CH), 3.49 (dd, J_1 = 12.9, J_2 = 2.8 Hz, 22-CH), 4.05 (m, 23-CH), 7.68 (m, 30-CH and 31-CH), 7.87 (m, 29-CH), 8.17 (m, 32-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ : 8.6 (C25), 13.8 (C18), 15.7 (C26), 20.3 (C11), 21.8 (C15), 23.5 (C19), 25.2 (C7), 26.4 (C6), 34.4 (C2), 31.6 (C1), 31.7 (C12), 34.9 (C10), 35.2 (C8), 35.9 (C16), 36.9 (C4), 38.0 (C5), 40.0 (C9), 46.0 (C22), 47.9 (C13), 49.5 (C23), 51.5 (C14), 52.3 (C24), 54.6 (C21), 65.7 (C20), 71.4 (C3), 122.6 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 274.2 Hz, C33), 127.5 (q, $J_{\text{C-C-F}}$ = 33.1 Hz, C28), 128.5 (q, $J_{\text{C-C-C-F}}$ = 6.4 Hz, C29), 131.9 (C32), 132.1 (C31), 132.5 (C30), 221.4 (C17). HRMS for C₃₃H₄₈F₃N₂O₄S [M+H]⁺: 625.3281 (calculated), 625.3250 (found). HPLC purity of 99.6% (retention time = 16.8 min, 70:30 MeOH/H₂O-isocratic, Luna C18 column).

2.1.7. Synthesis of trans-2,5-dimethyl-1-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]sulfonyl]piperazine (**7**)

A solution of trans-2,5-dimethylpiperazine (3.0 g, 26.3 mmol) in DCM (20 mL) was cooled to -5 °C in an ice-salt bath. The stirrer was started, and 2-(trifluoromethyl)benzenesulfonyl chloride (2.1 mL, 13.6 mmol) was slowly added to the solution. After the addition, the reaction was stirred for 1 h at room temperature. The resulting solution was evaporated and purified by flash chromatography column using DCM/MeOH/TEA (from 98:1:1 to 90:8:2) to give 2.9 g (66%) of compound **7** as a yellow solid. IR (KBr) ν_{max} : 3348 (NH), 3086 (CH, aromatic), 2970, 2932, 2878 (CH, aliphatic). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.06 (d, J = 6.6 Hz, 25-CH₃), 1.07 (d, J = 6.7 Hz, 26-CH₃), 1.51 (br, 1H), 2.58 (dd, J_1 = 12.7 Hz, J_2 = 5.6 Hz, 1H of 24-CH₂), 2.96 (dd, J_1 = 12.7 Hz, J_2 = 5.5 Hz, 1H of 24-CH₂), 3.04 (m, 21-CH), 3.11 (dd, J_1 = 12.7 Hz, J_2 = 3.6 Hz, 1H of 22-CH₂), 3.63–3.68 (m, 1H of 22-CH₂ and 23-CH), 7.68 (m, 30-CH and 31-CH), 7.87 (m, 29-CH), 8.17 (m, 32-CH). LRMS for C₁₃H₁₈F₃N₂O₂S [M+H]⁺: 323.10.

2.1.8. Synthesis of (trans-2,5)-1,2,5-trimethyl-1-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]sulfonyl]piperazine (**8**)

To a solution of compound **7** (150 mg, 0.46 mmol) in DCM and cooled into an ice bath was added diisopropylamine (0.1 mL). To this solution was added methyl iodide (84 μ L, 1.3 mmol) and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h and then evaporated. The crude product was purified by chromatography column using DCM/MeOH/TEA (from 99:0.5:0.5 to 92:7:1) to give 75 mg (48%) of **8** as a white solid. IR (KBr) ν_{max} : 3086 (CH, aromatic), 2978, 2932, 2854 (CH, aliphatic), 1165 (CF₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.87 (d, J = 2.6 Hz, 25-CH₃), 1.11 (d, J = 2.6 Hz, 26-CH₃), 2.17 (dd, J_1 = 12.7 Hz, J_2 = 5.6 Hz, 1H of 24-CH₂), 2.25 (s, 3H, N-CH₃), 2.66 (m, 21-CH), 2.72 (dd, J_1 = 12.7 Hz, J_2 = 5.6 Hz, 1H of 24-CH₂), 3.15 (dd, J_1 = 12.7 Hz, J_2 = 3.6 Hz, 1H of 22-CH₂), 3.59 (dd, J_1 = 12.8 Hz, J_2 = 3.1 Hz, 1H of 22-CH₂), 3.88 (m, 23-CH), 7.68 (m, 30-CH and 31-CH), 7.87 (m, 29-CH), 8.17 (m, 32-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ : 9.3 (C25), 16.3 (C26), 42.5 (C20), 48.4 (C22), 50.9 (C23), 54.6 (C21), 55.1 (C24), 122.6 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 274.4 Hz, C33), 126.7 (q, $J_{\text{C-C-F}}$ = 43.8 Hz, C28), 128.5 (q, $J_{\text{C-C-C-F}}$ = 6.4 Hz, C29), 131.9 (C32), 132.1 (C29), 132.5 (C30), 140.1 (C27). HRMS for C₁₄H₂₀F₃N₂O₂S [M+H]⁺: 337.1192 (calculated), 337.1189 (found). HPLC purity of 99.9% (retention time = 18.6 min, 40:60 MeOH/H₂O-isocratic with 0.1% of formic acid, Luna C18 column).

2.2. Inhibition of 17 β -HSD3 (intact LNCaP cells overexpressing 17 β -HSD3)

LNCaP transfected cells (LNCaP[17 β -HSD3]) kindly provided by IPSEN INNOVATION (France) were maintained at 37 °C under 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented (v/v) with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, 4.5 g/L D-glucose, 10 mM Hepes, 1 mM sodium pyruvate and 250 μ g/mL hygromycin. For enzymatic assays, the protocol medium had the same composition, but hygromycin, used to maintain the clone selection, was not included. LNCaP[17 β -HSD3] cells were plated in a 24-well culture at 10,000 cells per well, in protocol medium. After 2 days of incubation, 15 nM of [¹⁴C]-4-androstene-3,17-dione and 10 μ L of a solution of inhibitor dissolved in DMSO and culture medium were added. The final DMSO concentration in each well was adjusted to 0.05%. After 1 h of incubation, the culture medium was removed from wells and steroids (4-androstene-3,17-dione and testosterone) were extracted with diethyl ether. After evaporating the organic phase to dryness with nitrogen stream, residue was dissolved in DCM, dropped on silica gel 60 F254 thin layer chromatography plates (EMD Chemicals Inc, Gibbstown, NJ, USA), and eluted with a mixture of toluene/acetone (4:1).

[¹⁴C]-4-androstene-3,17-dione and [¹⁴C]-testosterone were identified by comparison with reference steroids and quantified using the Storm 860 System (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Percentages of transformation and inhibition were then calculated.

2.3. Proliferative activities on LAPC-4 (AR⁺) cells

Androgen-sensitive human prostate cancer LAPC-4 cells were kindly provided by Robert E. Reiter from the University of California (Los Angeles, CA, USA). Cells were grown at 37 °C under 5% CO₂ humidified atmosphere in IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) supplemented (v/v) with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% insulin and 1% penicillin/streptomycin. To determine the effect of novel compounds on cell proliferation, LAPC-4 cells were suspended with the medium supplemented with 5% dextran-coated charcoal treated FBS rather than 10% FBS, to remove the remaining hormones. Triplicate cultures of 5,000 cells in a total of 100 μL medium in 96-well microtiter plates (Becton-Dickinson Company, Lincoln Park, NJ, USA) were pre-incubated for 24 h at 37 °C under 5% CO₂ humidified atmosphere. Tested compounds were dissolved in DMSO to prepare the stock solution of 10⁻² M. The compounds were then diluted at several concentrations with culture medium, added to corresponding wells, and incubated for 3 days. Control wells were treated with vehicle DMSO. MTS method was used for the quantification of cell growth, using CellTiter 96[®] Aqueous Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Nepean, ON, Canada) and following the manufacturer's instructions. The proliferative (androgenic) activity was expressed as difference between the cell proliferation (in %) caused by a given compound and the basal cell proliferation fixed at 100%.

2.4. Metabolic stability assays

Assays were performed for 1 h at 37 °C, with or without 10 mM NADPH, in the presence of 40 μg of human liver microsomes from Corning (Melrose, MA, USA) and 10 μM of substrate in a final 100 μL volume of 50 mM Tris buffer supplemented with 10 mM MgCl₂. Assays were ended by adding 100 μL of MeOH, centrifuged at 13,000g for 10 min to obtain a pellet of proteins. The supernatant of 2 assays were pooled, filtered and 100 μL submitted to HPLC-MS analysis (Shimadzu LCMS-2020 APCI, Altima HP C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, MeOH:water gradient). The solvent gradient started with a mixture of MeOH:water (70:30, 50:50, 30:70 or 20:80 according to the compound) and finished with MeOH (100%). The wavelength of the UV detector was selected at 190 nm. Remaining compound (expressed in %) was calculated by dividing the area under the curve of the substrate for the assays with NADPH by the one without NADPH, and multiplied by 100. Values represent the average of 4 independent experiments.

3. Results and discussion

3.1. Chemistry

The chemical synthesis of the first RM-532-105 isomer, compound **6a**, is disclosed in Scheme 1. This compound, with an 18-methyl (CH₃) group in α-steroid face (18-*epi* or 13α-RM-532-105, **6a**) was prepared from **1a**, which was previously obtained from commercially available epiandrosterone. Thus, the epimerization of the 13β-CH₃ group of epiandrosterone to give the 13α-isomer **1a** (13α-CH₃) was carried out following the method described by Yaremenko and Khvat,³⁰ which uses 1,2-phenylenediamine in boiling acetic acid. Treatment of **1a** with ethylene glycol and *p*-toluenesulfonic (*p*-TSA) acid in refluxing toluene yielded the protected

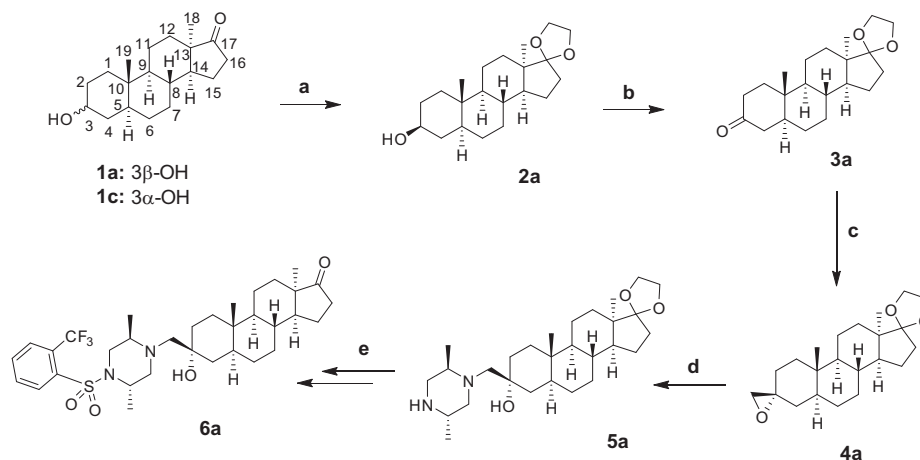
C17 ketone as dioxolane **2a**. The secondary alcohol at C3 was oxidized in mild conditions by using Dess-Martin periodinane to give **3a**. This steroidal ketone was efficiently reacted under the Corey-Chaykovsky epoxidation conditions,³¹ using trimethylsulfoxonium iodide and sodium hydride, to obtain **4a**. Under these conditions, it is known that a 5α-H-androstane-3-ketone gives an oxirane with the *R*-configuration as the major compound.^{18,32–36} The treatment of **4a** with *trans*-2,5-dimethylpiperazine in refluxing ethanol opened the oxirane group and provided the tertiary alcohol **5a** with the *R*-configuration at C3, which cannot be modified during the last two steps of the synthesis. Finally, the free NH of **5a** was submitted to a reaction with 2-(trifluoromethyl)benzenesulfonyl chloride and triethylamine (TEA) and the dioxolane protecting group was subsequently removed in acidic conditions to yield the desired product **6a** in an overall yield of 6% (6 steps from **1a**).

The chemical synthesis of the RM-532-105 isomer with the *cis-trans* conformation to the A/B fused rings (5β-RM-532-105, **6b**) is disclosed in Scheme 2. Starting from 5β-*epi*-androsterone (**1b**), the synthetic pathway uses the same sequence of reactions reported for **6a**: 1) protection of C17 ketone as dioxolane **2b**, 2) oxidation of the secondary alcohol at C3 to the ketone **3b**, 3) epoxidation to obtain the oxirane **4b**, 4) opening of the oxirane to provide **5b**, 5) formation of the sulfonamide and 6) hydrolysis of the dioxolane protecting group to yield the desired compound **6b** in an overall yield of 12% (6 steps from **1b**). The only difference between the sequences of reactions providing **6a** and **6b** (Schemes 1 and 2) is the configuration of the oxirane generated at C3. In fact, contrary to the 3*R*-oxirane obtained from the 5α-androstan-3-one (compound **3a**), a 3*S*-oxirane was obtained from the 5β-androstan-3-one (compound **3b**). Aher et al.³⁷ unambiguously confirmed by X-ray analysis the *S*-oxirane configuration generated from a 5β-steroidal 3-ketone. Consequently, the configuration at C3 is expected to be *S* for the tertiary alcohol **4b**. Since the last two steps toward **6b** cannot modify the stereochemistry at C3, **5b** and **6b** will be of 3*S*-configuration. The C-3 stereochemistry of **6b** will be however addressed in an upcoming section.

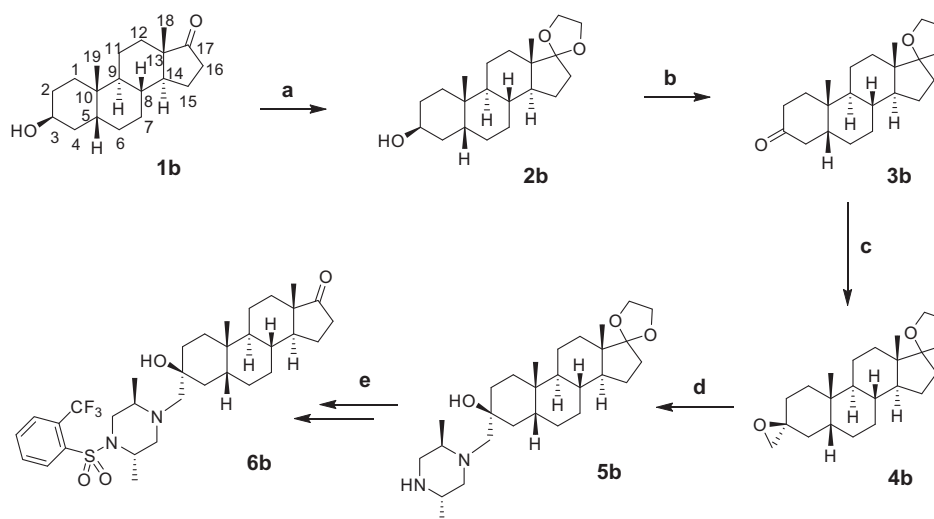
Compound **8**, which represents the side chain introduced at position 3 of the steroid scaffold of **6a** and **6b**, was prepared for the purposes of comparison (Scheme 3). Briefly, an excess of *trans*-2,5-dimethylpiperazine was treated with 2-(trifluoromethyl)benzenesulfonyl chloride to give **7**, and the free NH was next reacted with methyl iodide to yield the desired compound **8** in a moderate 34% yield for 2 steps.

The structures of final compounds **6a**, **6b** and **8** were confirmed based on their spectral data (IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and MS) and their purity, determined by HPLC and found to be >95%. Additionally, 2D-NMR experiments (COSY, NOESY, HSQC and HMBC) were carried out to obtain a full assignment for H and C atoms, and to find evidence for the conformational geometry (13α-CH₃ and 5β-H) of the 2 steroid C3-derivatives (see supporting information). For compound **6a**, the chemical shift data of 13α-CH₃ group is in agreement with previous studies for 13α-ADT.³⁰ Compared to RM-532-105, this methyl group has shifted downfield from 0.85 ppm (13β-CH₃) to 0.96 ppm (13α-CH₃) in the ¹H NMR spectra and from 13.8 (13β-CH₃) to 25.2 ppm (13α-CH₃) in the ¹³C NMR spectra. The chemical shift for C3, the new steroidogenic center, is also the same (70.9 ppm) suggesting the same *R*-configuration for **6a** and RM-532-105, as expected.

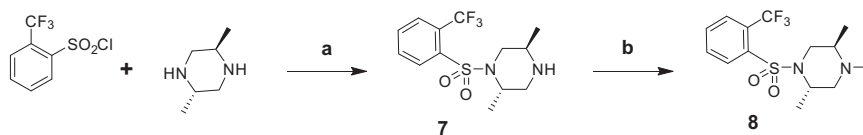
For compound **6b**, the configuration of the asymmetric C3 carbon was expected to be *S* per the work of Aher et al.³⁷ but it was addressed and confirmed by NMR analyses. Using the HMBC experiment, we first identified the methyl producing a correlation with the carbonyl-17 (18-CH₃) and the methyl producing no correlation (19-CH₃). The 4 correlations observed with 19-CH₃, in combination with ¹³C NMR data found in literature for 5β-steroids,³⁸ allowed the identification of the following carbons: 1-CH₂, 10-C, 9-CH



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) Ethylene glycol, *p*-TSA, toluene, reflux, 12 h; (b) Dess-Martin reagent, DCM, rt, 1 h; (c) (CH₃)₃SOI, NaH, DMSO, THF, rt, 5 h; (d) *trans*-2,5-dimethylpiperazine, ethanol, 70 °C, 12 h; (e) *i.* 2-(trifluoromethyl)benzenesulfonyl chloride, TEA, DCM, rt, 4 h, *ii.* HCl 36%, acetone, 0 °C, 30 min.



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) Ethylene glycol, *p*-TSA, toluene, reflux, 12 h; (b) Dess-Martin reagent, DCM, rt, 1 h; (c) (CH₃)₃SOI, NaH, DMSO, THF, rt, 5 h; (d) *trans*-2,5-dimethylpiperazine, ethanol, 70 °C, 12 h; (e) *i.* 2-(trifluoromethyl)benzenesulfonyl chloride, TEA, DCM, rt, 4 h, *ii.* HCl 36%, acetone, 0 °C, 30 min.



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) DCM, rt, 1 h; (b) CH₃I, DIPA, DCM, 0 °C, 3 h.

and 5-CH. Using the HSQC experiment, the 5-C signal observed at 38.0 ppm was linked to the 5 β -H at 1.75 ppm. The 5 β -H displays also a NOE correlation with 19-CH₃ (10 β -CH₃) but not with the 20-CH₂ located at C3 (Fig. 4A). However, both 4 α -H and 4 β -H produced NOE correlations with 20-CH₂, which is only possible with the *S* configuration at C3 (3 β -OH/3 α -CH₂) instead of the *R* configuration (Fig. 4B). The C3-chemical shift (71.5 ppm) for **6b** (3*S* and 5 β -H) is also slightly different than the values (both 70.9 ppm) obtained for **6a** and RM-532-105 (both 3*R* and 5 α -H).

3.2. Biological activity

3.2.1. 17 β -HSD3 inhibitory activity

The inhibition of 17 β -HSD3 activity was determined using intact LNCaP cells overexpressing 17 β -HSD3, by measuring the

amount of labeled T formed from natural labeled 4-dione, and then calculating the percentage of inhibition (Fig. 5). The first general observation from this screening study is that the steroid backbone alone (compounds **1c** and **1b**), as well as the side chain alone (compound **8**), did not contribute to the inhibitory activity. However, the combination of these 2 structural elements on the same molecule (compounds **6a** and **6b**) significantly reduced the catalytic activity of the enzyme. Both the 13 α -CH₃-derivative **6a** (Fig. 5A) and 5 β -H-derivative **6b** (Fig. 5B) inhibited the enzyme at the 3 concentrations tested (0.1, 0.5 and 1 μ M). Thus, the presence of the side chain attached to the C3 position of the steroid backbone is crucial to the inhibition of 17 β -HSD3 activity.

The IC₅₀ values were obtained for the newly designed compounds **6a** and **6b**, as well as for the reference RM-532-105 (Fig. 6). All compounds showed a dose-dependent inhibition of 17 β -HSD3 activity

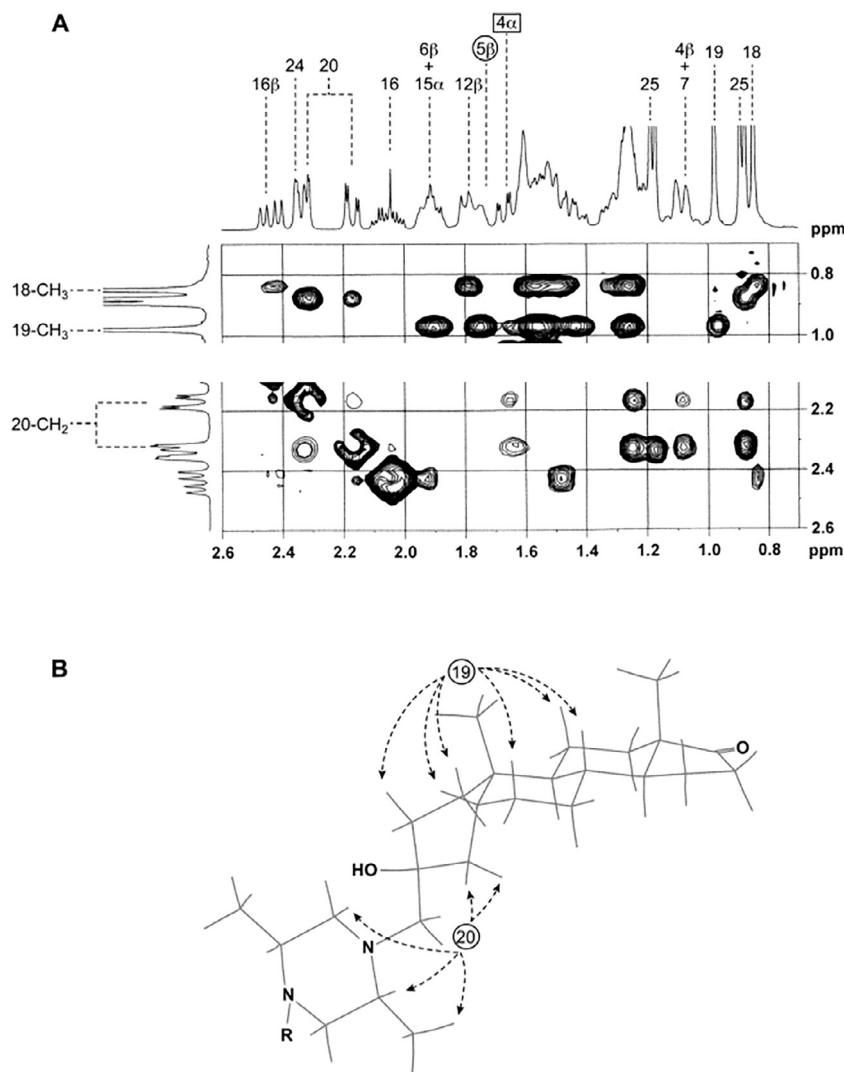


Fig. 4. Partial NOESY spectra (A) and 3D-representation (B) of compound **6b**.

that afforded IC_{50} values of 1.09, 0.15 and 0.11 μM for **6a**, **6b** and RM-532-105, respectively. Therefore, **6a** ($5\alpha/13\alpha$ -RM-532-105) is 10-fold less potent than the inhibitor used as reference (RM-532-105, with a 5α -H and 13β - CH_3), but interestingly **6b** ($5\beta/13\beta$ -RM-532-105) is as almost as potent as the lead inhibitor. Based on these findings, changing the shape of D ring greatly decreases 17β -HSD3 inhibitory activity, whereas the A-ring inversion (*cis-trans* instead of *trans-trans* conformation) combined to the inversion of the OH at C3 did not exhibit a substantial impact on the inhibitory effect. A possible explanation for this might be that the ketone at C17 is a key function interacting with a hydrogen bond donor from an amino acid residue in the binding pocket of 17β -HSD3. Thus, changing the shape of D-ring disrupts this interaction resulting in a lower inhibitory potency. On the other hand, the 2 modifications in A-ring may be tolerated because this change does not affect the interactions performed by the side chain at C3. In fact, this moiety has a high degree of conformational flexibility that can favor interactions in the binding cavity of 17β -HSD3, especially in the hydrophobic pocket, which seems able to accommodate large substituents and greatly contributed to the inhibitory potency of 3β -substituted-ADT derivatives.^{39–41}

3.2.2. Proliferative effect on LAPC-4 cells (AR^+)

An inhibitor of androgen biosynthesis should be devoid of androgenic activity for use in prostate cancer therapy. To investigate whether the synthesized compounds display an androgenic profile, we assessed compounds **6a** and **6b** on the androgen-sensitive prostate cancer LAPC-4 (AR^+) cells and measured the proliferative (androgenic) activity which was expressed as the difference between the cell proliferation (in %) caused by a given compound and the basal cell proliferation fixed at 100% (Fig. 7). The natural androgen DHT and the inhibitor RM-532-105 were also tested as reference compounds. At 10 nM, the potent androgen DHT increased the cell proliferation to 190%, thus clearly demonstrating the androgen-dependence of LAPC-4 cells, which express the wild-type androgen receptor.⁴² With percentages of cell growth lower than 100% (96, 48 and 33% at 0.1, 0.5 and 1 μM , respectively), RM-532-105 did not show an androgenic effect. As expected, the isomers of RM-532-105 displayed no androgenic activity with cell growth values of 76.3, 61.6 and 51.0% for **6a** and 87.2, 72.3 and 28.2% for **6b** at 0.1, 0.5 and 1 μM , respectively. In fact, these 3 compounds reduced cell proliferation when compared to the control, which suggests a potential cytotoxic activity at least at the 2 higher

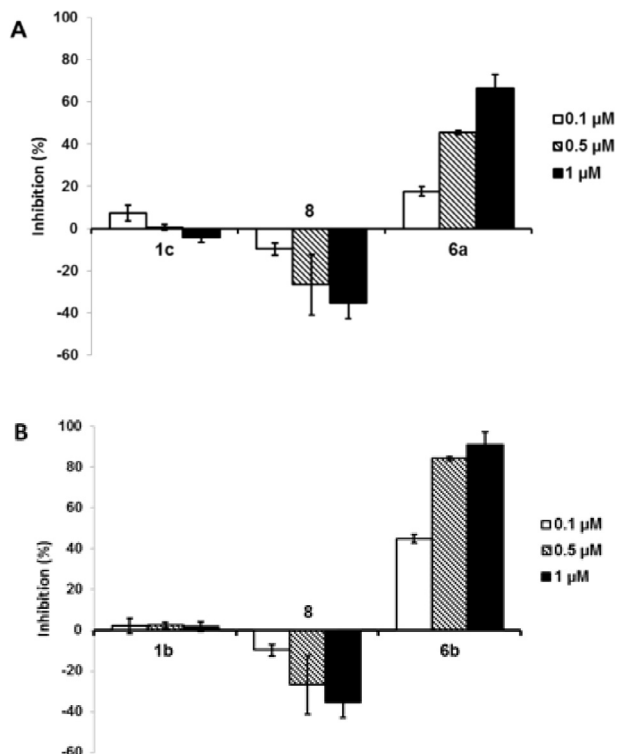


Fig. 5. Impact of steroid scaffold (steroids **1c** and **1b**), 3β-side chain (compound **8**) and both structural elements (steroid derivatives **6a** and **6b**) on 17β-HSD3 inhibitory activity (transformation of 4-dione to T in LNCaP cells overexpressing 17β-HSD3). (A) Modification at the C/D ring junction (13α-CH₃) and (B) modification at the A/B ring junction (5β-H).

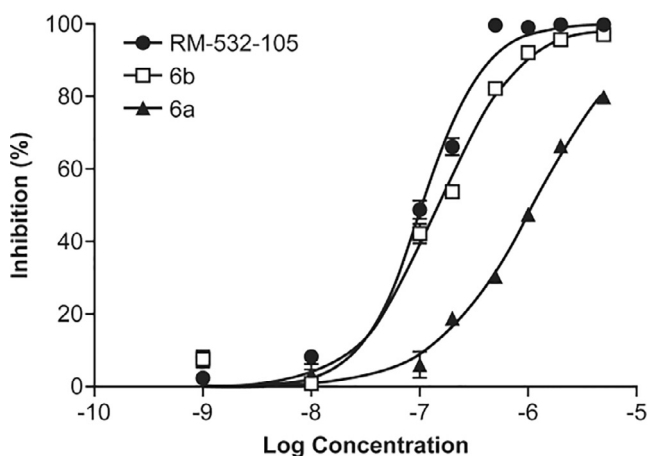


Fig. 6. Inhibition of 17β-HSD3 activity by several concentrations of **6a** (5α/13α-RM-532-105, IC₅₀ = 1.09 μM), **6b** (5β/13β-RM-532-105, IC₅₀ = 0.15 μM) and 5α/13β-RM-532-105 (IC₅₀ = 0.11 μM).

concentrations. Compound **6b**, the 5β-isomer of RM-532-105, is however less cytotoxic than the other 2 compounds.

3.2.3. Metabolic stability

Another criterion for discriminating different potential drug candidates is to evaluate their metabolic stability. Compounds **6a** and **6b** were thus treated for 1 h by a microsomal preparation of human liver in the presence of NADPH as cofactor to measure the impact of the modifications at C5 and C13. In this assay, a compound is transformed by phase-I reactions (oxidation, reduction,

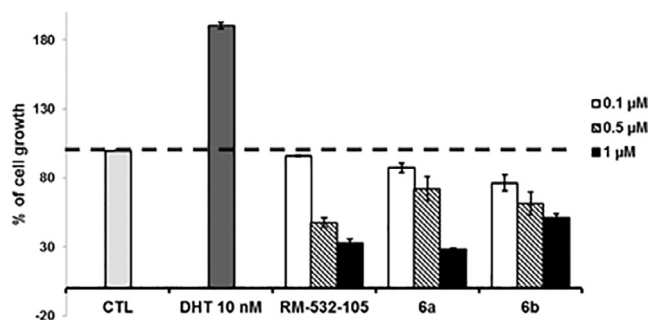


Fig. 7. Androgenic profile for **6a** (5α/13α-RM-532-105), **6b** (5β/13β-RM-532-105) and 5α/13β-RM-532-105 on androgen-sensitive LAPC-4 cells.

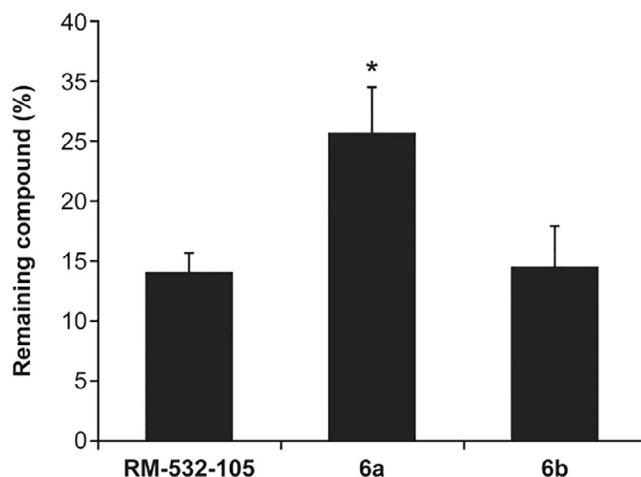


Fig. 8. Metabolic stability of **6a** (5α/13α-RM-532-105), **6b** (5β/13β-RM-532-105) and 5α/13β-RM-532-105. The results are expressed as the % of the remaining quantity of the tested compound treated with a microsomal preparation of human liver. The data represent the average of 4 experiments ± SD. *p* < 0.05.

hydrolysis) instead of phase-II reactions (glucuronidation, sulfation, acetylation), and the remaining compound is measured at the end of the incubation time, and expressed in %. As observed in Fig. 8, the inversion at C5 (compound **6b**) did not influence metabolic stability. However, with only a tertiary alcohol, the A-ring of RM-532-105, **6a** and **6b** is not favorable to phase-I reactions. Interestingly, compound **6a** is more stable than RM-532-105 and **6b**. This result suggests a less important metabolism on D-ring positions 16 and 17 for **6a** (13α-CH₃) than for **6b** and RM-532-105 (both 13β-CH₃). In fact, the reduction of the C17-carbonyl into alcohol and the hydroxylation at position 16 are 2 reactions involved in the formation of known metabolites of steroidal ketones.⁴³ Thus, the production of D-ring metabolites by the enzymes of the cytochrome P450 family found in the liver is probably reduced by the steric hindrance involved in the inversion of 18-CH₃.

4. Conclusion

Two isomers of 17β-HSD3 inhibitor RM-532-105 (compounds **6a** and **6b**) were prepared and characterized to assess the impact of two structural modifications of the steroid scaffold on biological activities. The biological assessments on LNCaP cells overexpressing 17β-HSD3 and androgen-sensitive prostate cancer LAPC-4 cells allowed the identification of **6b** (5β-H; *cis-trans* A/B fused rings) as a 17β-HSD3 inhibitor without androgenic activity and a weak cytotoxic activity. The 17β-HSD3 inhibitory activity of compound **6a**

(13 α -CH₃; *trans-cis* C/D fused rings) was however reduced, but its androgenic profile was not affected. Compared to RM-532-105 (5 α -H/13 β -CH₃), the liver microsomal stability of **6b** (5 β -H) was not affected, whereas that of **6a** (13 α -CH₃) was improved. This finding has important implications for developing new generations of more potent 17 β -HSD3 inhibitors. Moreover, these results justify the exploration of other structural modifications on the A-ring, since this change seems to be well-tolerated by the 17 β -HSD3 enzyme.

Acknowledgments

This work was supported by Prostate Cancer Canada. Francisco Cortés-Benítez would like to thank the National Autonomous University of Mexico and the National Council for Sciences and Technology (CONACyT), Mexico, for the awarded fellowship. The authors would like to thank Dr. Robert E. Reiter (University of California, CA, USA) for providing LAPC-4 cells and IPSEN INNOVATION (France) for providing LNCAP[17 β -HSD3] cells. Our thanks also to Dr. Martin Perreault for the metabolic stability data, to Ms. Marie-Claude Trottier for NMR and HPLC data as well as Ms. Micheline Harvey for the careful reading of this manuscript.

A. Supplementary material

HPLC chromatogram, HRMS data, IR spectra, ¹H NMR, ¹³C (APT), HSQC, HMBC, COSY and NOESY spectra for compounds **6a**, **6b** and **8**. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.008>.

References

- <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp>.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *CA Cancer J Clin*. 2016;66:7–30.
- <https://www.cancer.gov/types/prostate>.
- Gaya JM, Ahallal Y, Sanchez-Salas R, et al. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013;13:819–827.
- Zhou Y, Bolton EC, Jones JO. *J Mol Endocrinol*. 2015;54:R15–R29.
- Saartok T, Dahlberg E, Gustafsson JA. *Endocrinology*. 1984;114:2100–2106.
- Lindqvist A, Hughes I, Andersson S. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:921–923.
- Mohler ML, Narayanan R, He Y, Miller DD, Dalton JT. *Recent Patents Endocr Metab Immun Drug Discov*. 2007;1:103–118.
- Poirier D. *Drug Devel Res*. 2008;69:304–318.
- Poirier D. *Expert Opin Ther Patents*. 2010;20:1123–1145.
- Laplante Y, Poirier D. *Steroids*. 2008;73:266–271.
- Mohler JL, Titus MA, Wilson EM. *Clin Cancer Res*. 2011;17:5844–5849.
- Sharifi N, Auchus RJ. *Steroids*. 2012;77:719–726.
- Ishizaki F, Nishiyama T, Kawasaki T, et al. *Sci Rep*. 2013;3:1528.
- Mostaghel EA. *Transl Androl Urol*. 2013;2:212–227.
- Luu-The V, Zhang Y, Poirier D, Labrie F. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;55:581–587.
- Pfeiffer MJ, Smit FP, Sedelaar JP, Schalhen JA. *Mol Med*. 2011;17:657–664.
- Maltais R, Fournier MA, Poirier D. *Bioorg Med Chem*. 2011;19:4652–4668.
- Kenmogne LC, Maltais R, Poirier D. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26:2179–2183.
- Roy J, Fournier M, Maltais R, Kenmogne LC, Poirier D. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;141:44–51.
- Djigoué GB, Kenmogne LC, Roy J, Maltais R, Poirier D. *Bioorg Med Chem*. 2015;23:5433–5451.
- Schönecker B, Lange C, Kötteritzsch M, et al. *J Org Chem*. 2000;65:5487–5497.
- Ayan D, Roy J, Maltais R, Poirier D. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127:324–330.
- Maltais R, Trottier A, Perreault M, Thériault JF, Lin SX, Poirier D. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;161:24–35.
- Bacsa I, Jójárt R, Schneider G, et al. *Steroids*. 2015;104:230–236.
- Fang H. *Chem Res Toxicol*. 2003;16:1338–1358.
- Engeli RT, Rhouma BB, Sager CP, et al. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;155:147–154.
- Vicker N, Sharland CM, Heaton WB, et al. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;301:259–265.
- Fink BE, Gavai AV, Tokarski JS, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:1532–1536.
- Yaremenko FG, Khvat AV. *Mendeleev Commun*. 1994;4:187–188.
- Corey EJ, Chaykovsky M. *J Am Chem Soc*. 1965;87:1353–1364.
- Maltais R, Luu-The V, Poirier D. *J Med Chem*. 2002;45:640–653.
- Maltais R, Tremblay MR, Poirier D. *J Comb Chem*. 2000;2:604–614.
- Kashino S, Katz H, Glusker JP, Pollack RM, Bounds PL. *J Am Chem Soc*. 1987;109:6765–6771.
- Bevins CL, Bantia S, Pollack RM, Bounds PL, Kayser RH. *J Am Chem Soc*. 1984;106:4957–4962.
- Cook CE, Corley RC, Wall ME. *Steroids*. 1968;33:2789–2793.
- Aher NG, Pore VS, Mishra NN, Shukla PK, Gonnade RG. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19:5411–5414.
- Blunt JW, Stothers JB. *Org Magn Reson*. 1977;9:439–464.
- Djigoué GB, Simard M, Kenmogne LC, Poirier D. *Acta Cryst*. 2012;C68:0231–0234.
- Tchédam-Ngatcha B, Luu-The V, Labrie F, Poirier D. *J Med Chem*. 2005;48:5257–5268.
- Djigoué GB, Tchédam Ngatcha B, Poirier D. *Molecules*. 2013;18:914–933.
- Sobel RE, Sadar MD. *J Urol*. 2005;173:360–372.
- Martucci CP, Fishman J. *Pharmac Ther*. 1993;57:237–257.