Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Síntesis y actividad biológica de análogos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales

Dansey, María Virginia

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Dansey, María Virginia. (2012). Síntesis y actividad biológica de análogos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Dansey, María Virginia. "Síntesis y actividad biológica de análogos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

Síntesis y actividad biológica de análogos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales

Tesis Presentada Para Optar por el Título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Orgánica

Maria Virginia Dansey

Director de Tesis:
Dr. Gerardo Burton

Director Asistente:
Dr. Pablo Héctor Di Chenna

Consejero de estudios:
Dr. Gerardo Burton

Buenos Aires, 29 de marzo de 2012

SÍNTESIS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS DE ESTEROIDES NEUROACTIVOS Y HORMONAS ESTEROIDALES

En esta tesis se detallan los resultados obtenidos en la síntesis, actividad biológica y la relación estructura-actividad de nuevos análogos de esteroides bioactivos. Por un lado, se sintetizó un análogo no hidrolizable del 21-hemisuccinoiloxi-6,19-epoxiprogesterona (21HS-6,19OP), para lo cual se desarrolló una metodología one-pot sencilla de alquilación para la posición C-21 de 20-ceto pregnanos que consiste en la formación del sililenoléter, seguido de la condensación de Mukaiyama con un aldehído. El análogo obtenido resultó ser biológicamente inactivo a diferencia de su líder. Por otro lado, se diseñaron y sintetizaron cuatro A-homoanálogos del neuroesteroide allopregnanolona. A partir de progesterona comercial, se preparó un ciclopropilcarbinol que fue sometido a un reordenamiento catiónico catalizado por ácidos y promovido por microondas para dar un A-homo-3,5-pregnadieno. Este se epoxidó regioselectivamente con dioxiranos generados *in situ,* con un derivado de fructosa como catalizador y oxone® como oxidante para dar los análogos. Uno de ellos resultó tener una actividad *in vitro* sobre el receptor $GABA_A$ similar a la pregnanolona; los otros tres resultaron levemente activos demostrando que la libertad conformacional del anillo A de 7 miembros les permitiría a los análogos alcanzar conformaciones activas. A dos de los A-homoesteroides intermediarios de la síntesis, que por poseer una funcionalidad ceto en el anillo A son análogos de progesterona, se les ensayó la actividad sobre el receptor progestágeno (PR) y mineralocorticoide (MR), encontrando que estos actúan selectivamente sobre el primero, probablemente debido a un aumento en la hidrofobicidad del anillo A.

Palabras claves: neuroesteroide, A-homopregnano, receptor $GABA_A$, progestágeno, receptor de progesterona, glucocorticoide, receptor de glucocorticoides.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEUROACTIVE STEROIDS AND STEROIDAL HORMONES

This thesis describes the synthesis, biological activity and structure-activity relationships of seven novel bioactive steroid analogues. In the first part, a non hydrolyzable analogue of 21-hemisuccinoyloxy-6,19-epoxyprogesterone (21HS-6,19OP) was synthesized. To achieve this goal, a straightforward one-pot alkylation methodology at C-21 of 20-keto pregnanes was developed, consisting of silylenol ether formation followed by a Mukaiyama aldol reaction. In contrast with the lead compound, the resulting analogue was biologically inactive. In the second part, four A-homo neurosteroids analogues where designed and synthesized. Starting from commercially available progesterone, a ciclopropylcarbinol derivative was prepared, which was subjected to an acid catalyzed-microwave promoted cationic rearrangement to give an A-homo-3,5-pregnadiene. This diene was regioselectively epoxydized with a bulky dioxirane generated *in situ* from a fructose derivative and Oxone®. One of the analogues exhibited an *in vitro* activity on the $GABA_A$ receptor similar to pregnanolone; the other three analogues where only slightly active, proving that the conformational freedom provided by the seven membered A ring would allow the compounds to explore active conformations. Two A-homo synthetic intermediates with a ketone functionality on the A ring proved to be selective progesterone receptor (PR) agonists, lacking mineralo/antimineralocorticoid activity. The selectivity achieved might be due to the enhanced hydrofobicity of the expanded A ring.

Keywords: neurosteroid, A-homopregnane, $GABA_A$ receptor, progestagen, progesterone receptor, glucocorticoid, glucocorticoid receptor.

A mis directores, Gerardo y Pablo
A mis "directores adoptivos", Adriana y Lautaro

A mi familia
Willy y Maria, Uki y Vecky

A mis amigas y colegas
Flor, Vero, Vicky, Pau y Sol

A Lidia

Durante el transcurso de esta tesis he encontrado el apoyo de mucha gente; en su medida, todos han hecho su aporte para que esta sea una experiencia grata de trabajo y aprendizaje en una atmósfera de afecto y amistad. Me siento agradecida de haber tenido esta valiosa oportunidad.

En primer lugar deseo reconocer a mis directores. A Gerardo por haberme dado un lugar en su proyecto. Tengo un gran respeto y admiración por la pasión y la entrega con la que trabaja, y por su capacidad de ser una inagotable fuente de ideas brillantes. De Pablo podría elogiar su extraordinario talento como profesional hasta el hartazgo sin temor a exagerar: su vasto conocimiento, su rigor científico, su fuerte dedicación a la tarea, su pedagogía… Pero nada de eso se compara a sus sobresalientes virtudes humanas: su integridad, su humildad, su bondad y, por sobre todo, su infinita paciencia. Ha sido un honor y un gran placer para mí poder trabajar con ellos.

También quiero agradecer a mis directores "adoptivos". A Adri por su inmensa sabiduría y pragmatismo: sus consejos y su ayuda durante estos años han servido para catalizar y embellecer esta tesis. A Lautaro, que siendo tan joven, brillante y humilde, y además, tan buena onda, le ha dado a esta tesis nuevos horizontes y matices.

En segundo lugar, quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio. A Alberto y Fer, por su calidez humana, su inmensa sabiduría y por sus sugerencias de síntesis. A Vicky, Marito y Yossy por alegrar mis días con mate, charlas y música. A Jaz por soportame. A Edu, Vale, Eve y Gise por compatir momentos y a los alumnos que han pasado por el labo.

Asimismo deseo agradecer a Adalí por guiar mis primeros pasos en el mundo de la Química Biológica y a todos los chicos del LEGMA, que me han ayudado mucho en esa etapa.

Agradezco la solidaridad de los profesores y compañeros del Departamento de Química Orgánica por tantos reactivos e instrumental prestados, por el consejo y el apoyo recibido en estos años.

No me quiero olvidar del personal de UMYMFOR: a Mery por los microanálisis, las pastas frolas, las facturas y la calidez; a Ana por su amable colaboración; a Gabriel y a Jorge por los masas; y a José y Gernot por los RMNs. Igualmente, al personal no docente del departamento: Maripi y Nancy, que me dieron una mano invalorable en mis despioles burocráticos; Sergio, que estuvo siempre con una sonrisa, y Pereyra y Mabel. A todos, muchas gracias por su desinteresada colaboración.

En lo personal, quiero agradecer a mis amigos y colegas, Flor, Vero, Vicky, Pau, Sol y Gastón y a mi familia, que me han soportado durante los picos de estrés, han escuchado prácticas de seminarios; a Irene por su desinteresada tarea de edición y, junto con Flor, por haberme brindado asilo momentos de estrago. Muchas gracias por haberme acompañado con tanto afecto.

¡Chas gracias!

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Esteroides 3
1.2 Neuroesteroides 4
1.3 Hormonas esteroidales 9
1.4 Glucocorticoides 13
- Efectos fisiológicos 13
- Antiglucocorticoides 15
- Mecanismo de acción de los glucocorticoides 16
- Modelo disociado 17
- Glucorticoides disociados vs moduladores selectivos del GR 18
- Análogos rigidos de glucocorticoides 20

1.5 Progestágenos 22

CAPÍTULO 2. SÍNTESIS DE UN ANÁLOGO RÍGIDO DE GLUCOCORTICOIDES

2.1 Introducción 27
- Antecedentes 27
- Objetivos 30

2.2 Desarrollo de una metedología de alquilación de C-21 en 20-cetopregnanos 31
- Alquilación de enolatos 32
- Alquilación de sililenoléteres 34
- Reacción de Mukaiyama 36

2.3 Alquilación de C-21 de 6,19-epoxipregnenolona (**14**) 38
- Optimización de la reacción de Mukaiyama 40

2.4 Síntesis del análogo **5** 41
- Desoxigenación de la posición 22 42
- Desprotección y oxidación 44

2.5 Resumen 45

CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS FLEXIBLES DE ESTEROIDES NEUROACTIVOS Y HORMONAS

3.1 Introducción 49

3.2 Antecedentes 49

- A-homoesteroides heterocíclicos 49
- Síntesis de A-homoesteroides con diazoalcanos 50
- Síntesis de C-homo y D-homoesteroides por expansión de ciclopropanos 51
- Síntesis de A-homoesteroides por reordenamiento de un catión ciclopropilcarbinilo 53

3.3 Síntesis de A-homo análogos de neuroesteroides y hormonas esteroidales 55

- Análisis retrosintético 55
- Síntesis del precursor 56
- Optimización de la reacción de expansión 56
- Funcionalización del anillo A: epoxidación regioselectiva del doble enlace 3,4 58
- Síntesis de los análogos **1-4**, **6** y **7** 62

3.4 Aplicación de la reacción de reordenamiento catiónico para la obtención de B-homo-19-nor esteroides 68

- Antecedentes 68
- Reordenamiento catiónico de un 6,19-cicloesteroides 69

3.5 Resumen 71

CAPÍTULO 4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.1 Actividad biológica de análogos de neuroesteroides 75

4.1.1 Análogos de neuroesteroides **1**-**4** 75

4.2 Actividad biológica de análogos de hormonas esteroidales 78

4.2.1 Análogo de glucocorticoides **5** 78

4.2.2 A-Homo Análogos de Progesterona **6** y **7** 79

- Actividad biológica: ensayos de transactivación del gen reportero MMTV-Luc 79
- Actividad biológica: ensayos de expresión del gen bcl-x 81
- Análisis conformacional de los análogos y análisis del modo de unión al PR-LBD 81
- Discusión 85

4.4 Resumen 86

CAPÍTULO 5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Generalidades 89
5.2 Detalles experimentales 91
5.3 Actividad biológica 112

APÉNDICES.

A) Resumen de estructuras 115
B) Asignación del desplazamiento químico de ^{13}C de los compuestos sintetizados 117

RESUMEN

121

ABREVIATURAS

21HS-6,19OP	21-hemisuccinoiloxi-6,19-epoxiprogesterona
21OH-6,19OP	21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona
Ac_2O	anhídrido acético
AcOEt	acetato de etilo
AF-1	dominio de función de activación 1
AF-2	dominio de función de activación 2
AP-1	proteína activadora 1
AR	receptor de andrógenos
BHK	células de riñón de hamsters
CCD	cromatografía en capa delgada
CF	cromatografía flash
CI_{50}	concentración que produce la mitad de la supresión
Cos-1	células de riñón de monos
COSY	espectro de correlación homonuclear H-H
DAIB	diacetato de iodobenceno
DBD	dominio de unión al ADN
dex	dexametasona
DIAD	azodicarboxilato de diisopropilo
DMF	dimetilformamida
EM	espectroscopía de masa
EMAR	espectroscopía de masa de alta resolución
eq	equivalentes
ER	receptor de estrógenos
GABA	ácido γ-aminobutírico
GCs	glucocorticoides
GR	receptor de glucocorticoides
GRE	elemento de respuesta a glucocorticoides
HMBC	correlación cuántica multiple heteronuclear
HPA	eje hipotalámico-pituitario-adrenal
HRE	elemento de respuesta a hormonas
hs	horas
HSD	hidroxiesteroide deshidrogenasa

HSQC	correlación cuántica simple heteronuclear
ie	impacto electrónico
I_{max}	máxima supresión
IR	infrarrojo
J	constante de acomplamiento spin-spin
L929	fibroblastos de ratón
LBD	dominio de unión al ligando
LDA	Litio diisopropilamida
LBP	bolsillo de unión al ligando
LUC	luciferasa
m/z	relación masa/carga
M	molar
M^+	ion molecular
MCs	mineralocorticoides
MD	dinámica molecular
MeOH	metanol
MHz	megahertz
MMTV	promotor del virus de tumor mamario
MR	receptor de mineralocorticoides
Ms	mesilo
MW	microondas
NAS	esteroide neuroactivo
NFκB	factor nuclear kappa-B
NOESY	correlación homonuclear por efecto nuclear Overhauser
NR	receptor nuclear
ns	nanosegundos
NS	neuroesteroide
PCC	clorocromato de piridonio
pMMTV-Luc	plásmido que codifica para la enzima luciferasa bajo control del promotor del MMTV
phMR	plásmido que expresa el MR humano
phPR	plásmido que expresa la isoforma B del PR humano

ppm	parte por millón
PR	receptor de progesterona
Py	piridina
RMN ^{13}C	resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ^{1}H	resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMSD	desviación cuadrática media
RU486	mifrepristona
SNC	sistema nervioso central
SNuRM	modulador selectivo de receptores nucleares
SR	receptores de esteroides
Ta	temperatura ambiente
TAT	tirosina aminotransferasa
TBDMSC	cloruro de ter-butildimetilsililo
TBDMS	*t*-butildimetilsilil
TBPS	*t*-butil-biciclo[2,2,2]fosforotionato
THF	tetrahidrofurano
TIF2	factor intermediario de la transcripción 2
TMS	trimetilsilil
TNF	factor de necrosis tumoral
W	watts
$W_{1/2}$	ancho de la señal a media altura

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Esteroides

Los esteroides son una familia de compuestos orgánicos que contienen en su estructura base el esqueleto carbonado del gonano o ciclopentanoperhidrofenantreno. El gonano es el esteroide más sencillo y está compuesto de 17 átomos de carbono con un arreglo específico de cuatro cicloalcanos fusionados: tres ciclohexanos, denominados anillos A, B y C (figura 1.1) del esqueleto del fenantreno y un ciclopentano denominado anillo D.

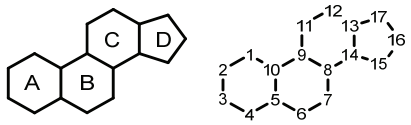


Figura 1.1: Estructura del gonano

Comúnmente, los esteroides tienen sustituyentes metilos sobre los carbonos 10 y 13 y una cadena lateral sobre el carbono 17 dando una gran variedad de posibles esqueletos carbonados. Según la Medical Subjet Headings, estos se pueden clasificar en función del número de átomos de carbono en *estranos* (18 carbonos), *androstanos* (19 carbonos), *pregnanos* (21 carbonos), *colanos* (24 carbonos) y c*olestanos* (27 carbonos), entre otros (figura 1.2).

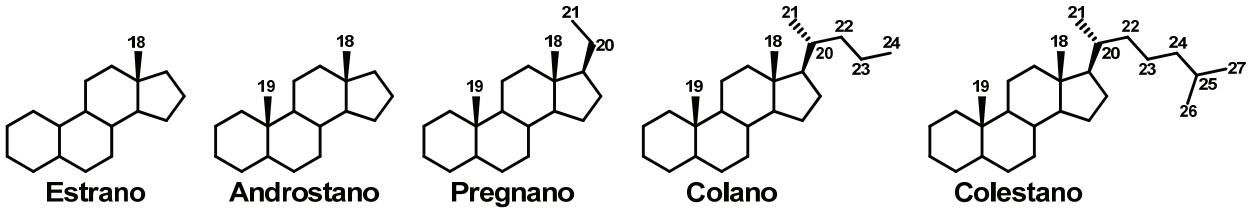


Figura 1.2: Clasificación de esqueletos esteroidales.

Cientos de esteroides diferentes se pueden encontrar en plantas, animales y hongos, cumpliendo funciones biológicas muy diversas. En plantas, los esteroides se biosintetizan a partir de cicloarteno, y en hongos y animales se sintetiza a partir de la ciclación de escualeno, para dar lanosterol y luego *colesterol* (figura 1.3).

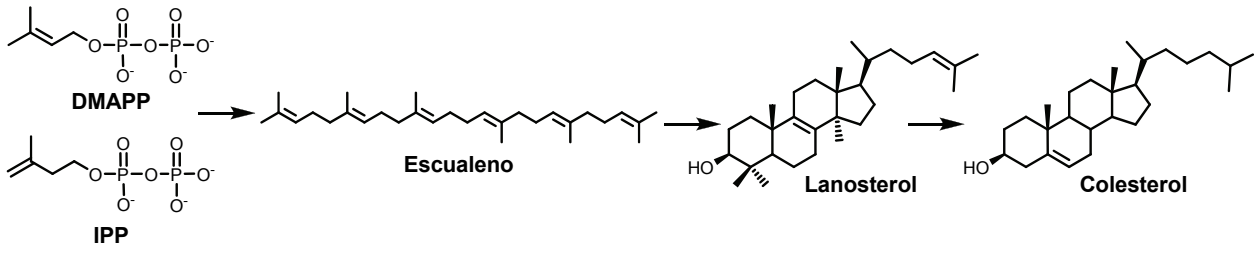


Figura 1.3: Biosíntesis de colesterol.

En vertebrados uno de los esteroides más frecuentes es el colesterol ya que forma parte de las membranas plasmáticas, otorgándoles la fluidez necesaria a temperaturas fisiológicas. A su vez, el colesterol es el precursor biosintético de hormonas esteroidales, neuroesteroides, vitamina D y sales biliares.

Según el modo por el cual ejercen su acción biológica, los esteroides se pueden clasificar en dos grandes grupos: los de *acción genómica*, y los de *acción no genómica*. Los esteroides de acción genómica son aquellos que mediante unión a receptores intracelulares específicos provocan una respuesta biológica mediada por trascripción genética. Este tipo de acción se caracteriza por tener un tiempo prolongado de respuesta, del orden de minutos u horas y su efecto puede persistir durante un tiempo largo, aun cuando ya haya desaparecido el esteroide de la célula blanco. Por ejemplo, dentro de los esteroides de acción genómica se encuentran las *hormonas esteroidales*.

Los esteroides de acción no genómica causan su efecto en tiempos cortos (del orden de milisegundos), ya que el mecanismo no involucra procesos de trascripción. Actúan interaccionando directamente con receptores de membrana generando una respuesta directa. En particular, los *neuroesteroides* son capaces de modular alostéricamente la respuesta de diversos receptores de neurotransmisores ejerciendo acciones tanto agonistas como antagonistas, dependiendo del receptor y del tipo de esteroide. Entre los receptores sobre los que actúan, cabe mencionar los receptores de GABA (ácido γ-aminobutírico, neurotransmisor inhibidor), glicina (neurotransmisor inhibidor) y ácido glutámico (neurotransmisor excitador) y los receptores nicotínicos. La importancia farmacológica que presentan estos esteroides se debe a la alta selectividad y potencia que presentan sobre el *receptor $GABA_A$*. El importante rol fisiológico y patológico que poseen puede ser explotado con beneficios terapéuticos mediante la búsqueda de análogos neuroactivos más selectivos y más potentes.

Esta tesis en particular, se avoca a la síntesis y estudio de análogos de hormonas esteroidales y de neuroesteroides moduladores del receptor $GABA_A$.

1.2 Neuroesteroides

El término "*neuroesteroide*" (NS) fue introducido por Baulieu en 1981 al referirse a una hormona esteroidal, el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), que se encontró que se sintetizaba en el cerebro. Hoy se denominan neuroesteroides todos los esteroides sintetizados en el cerebro. Por otro lado, el término "*esteroide neuroactivo*" (NAS) se aplica a esteroides que, independientemente de su origen son capaces de modificar la actividad neuronal. El efecto no genómico de estos esteroides involucra la modulación de la función de los canales iónicos activados por ligando, entre los cuales el receptor $GABA_A$ ha sido objeto de muchos estudios

debido a la importancia farmacológica que tiene la modulación de este receptor en varias patologías (trastornos de ansiedad, epilepsia, etc).

El receptor $GABA_A$ es un receptor de transmembrana multimérico, que consiste de 5 subunidades: dos subunidades α, dos subunidades β y una subunidad adicional, generalmente γ, aunque a veces puede ser δ, ε, π o θ dispuestas alrededor de un poro central (figura 1.4). El receptor se ubica en la membrana de las neuronas y generalmente se localiza en la sinapsis de modo post-sináptico. El GABA es el ligando endógeno que al unirse al receptor, causa un cambio conformacional que produce la apertura del canal, permitiendo la entrada de iones cloruro a la célula a favor del gradiente electroquímico. Esto revierte el potencial de membrana y estabiliza el potencial de reposo de la célula, dificultando que los neurotransmisores excitatorios puedan re-polarizar la célula y generar un potencial de acción. El efecto neto es típicamente inhibitorio, reduciendo la actividad neuronal. El receptor del $GABA_A$ también contiene diversos sitios en los que puede unir una gran variedad de ligandos además de GABA. El sitio de unión de benzodiazepinas está entre las subunidades α y γ, los barbitúricos, neuroesteroides y el etanol se unen en la región de transmembrana (figura 1.4).

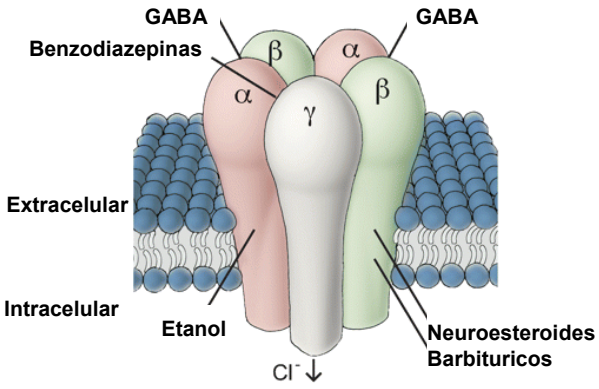


Figura 1.4: Esquema del receptor de $GABA_A$.

Los NS modulan las funciones del receptor de $GABA_A$ y cambios en sus niveles endógenos están asociados a procesos fisiológicos como depresión, estrés, envejecimiento y desarrollo neuronal. Los NAS han demostrado tener aplicación terapéutica como ansiolíticos, drogas anti-estrés, sedantes, hipnóticos, anticonvulsivos, anestésicos, así como para el tratamiento de migrañas y drogadependencia.

El tipo de interacción de los NAS con el receptor del $GABA_A$ se puede clasificar según su efecto en tres clases[1]: potenciación del GABA u otro activador, inhibición del GABA u otro activador o activación directa del canal. El efecto más común y más potente es el efecto de potenciación, incrementando la respuesta del GABA aun a bajas concentraciones. Ejemplos de

[1] Akk, G., Covey, D.F., Evers, A.S., Steinbach, J.H., Zorumski, C.F., Mennerick, S. *Pharmacol. Therapeut.*, **2007**, *116*, 35-57

moduladores positivos potentes endógeno, son los metabolitos reducidos de la progesterona, la allopregnanolona y la pregnanolona, y el metabolito reducido de la desoxicorticosterona (3α,21-dihidroxi-5α-pregnan-20-ona, THDOC). El sulfato de pregnenolona es un ejemplo de antagonista endógeno, con potencia moderada (figura 1.5).

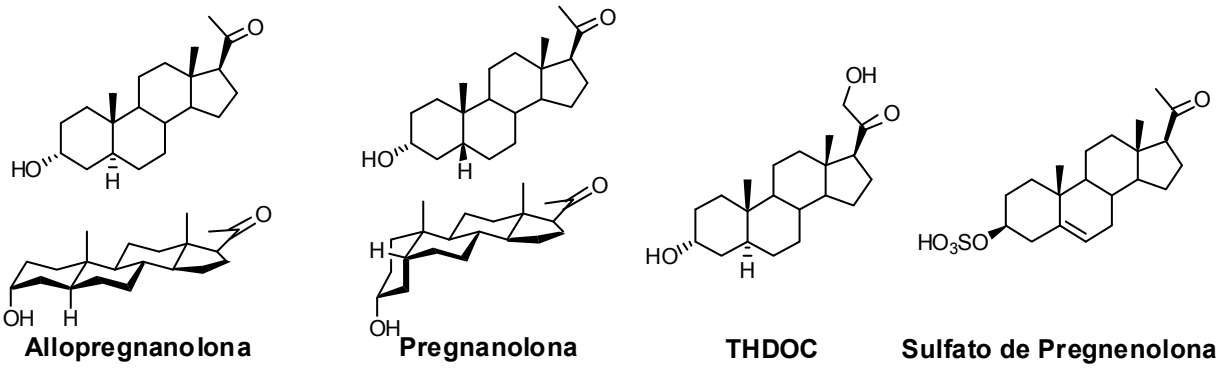


Figura 1.5: Neuroesteroides.

Se han sintetizado nuevos tipos de NAS con diversas variaciones sobre el núcleo esteroidal y a la luz de esos estudios se estableció el farmacóforo para los moduladores positivos del receptor del $GABA_A$. El mismo consiste en un esqueleto tipo pregnano o androstano reducido, con un hidroxilo en la posición 3 con estereoquímica α y un grupo carbonilo en la posición 20 con la cadena lateral en C-17 en posición β para pregnanos o un carbonilo en C-17 para androstanos. Si bien la allopregnanolona y la pregnanolona poseen los mismos grupos funcionales, la conformación global del esqueleto esteroidal difiere notablemente debido al tipo de fusión *trans* o *cis* de los anillos A y B. La allopregnanolona adquiere una conformación global plana, mientras que la pregnanolona tiene una conformación torsionada, con el anillo A orientado hacia la cara α del esteroide. A pesar de ello, ambos esteroides poseen un efecto anestésico similar en ratones y ratas por lo cual el receptor $GABA_A$ debe poseer la capacidad de acomodar tanto un esteroide de estructura plana como uno de estructura torsionada.

Se han realizado numerosos estudios de relación estructura-actividad de los NAS que incluyen diversos sustituyentes en los cuatro anillos del núcleo esteroidal, variaciones en las cadenas laterales, expansiones y contracciones de anillos y el agregado de anillos adicionales que han sido tema de algunos trabajos de revisión. Dentro de las modificaciones reportadas cabe destacar que la función 3α-hidroxi es esencial para la actividad y cualquier derivatización sobre el hidroxilo lleva a la pérdida total de actividad. Epímeros, derivados acilados u oxidados y oximas pierden la capacidad de potenciar al receptor $GABA_A$. La incorporación de un grupo 3β-sulfato invierte la actividad biológica, dando antagonistas del receptor $GABA_A$, y potenciando la excitabilidad neuronal. El tiempo de vida media de los NAS se puede aumentar agregando un

grupo alquilo en la posición 3β, evitando así la inactivación por oxidación *in vivo* de C-3. Los análogos con metilo y trifluorometilo resultaron tener una actividad similar a allopregnanolona (figura 1.6). Los Δ^4 y Δ^9 pregnanos retienen gran parte de la actividad y la reducción del grupo 20-ceto a alcohol conduce a agonistas parciales. Es posible conferir solubilidad en agua sin pérdida sustancial de actividad introduciendo grupos 11α-dimetilamino o 2β-morfolino: los sustituyentes en C-11 y C-2 son bien tolerados y los sustituyentes polares en C-6 reducen la actividad.[2,3] Por otra parte las posiciones 17, 20 y 21 aceptan una gran variedad de sustituyentes con buena actividad biológica, en particular, el D-homo análogo de allopregnanolona sintetizado por Di Chenna y *col.* es un potente anestésico con tiempos de inducción más cortos que el NS endógeno.[4]

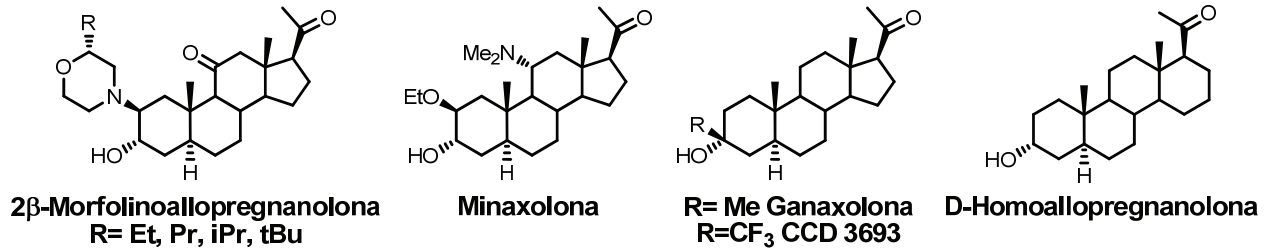
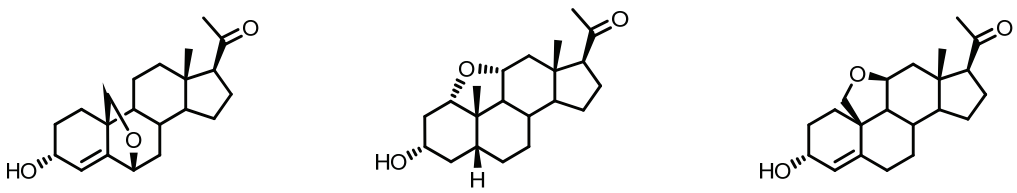


Figura 1.6: Análogos sintéticos de allopregnanolona.

Dado que el esqueleto esteroidal tiene una cierta flexibilidad, Burton y *col.* utilizaron una aproximación habitual en química medicinal que consiste en el agregado de puentes para obtener análogos con la forma de alloprenanolona o preganolona, pero conformacionalmente restringidos.[5,6] Se encontró que el análogo 6,19-epoxipregnenolona (figura 1.7) tiene una conformación global torsionada hacia la cara α del esteroide, similar a la de pregnanolona y resulta ser más potente que este último. De igual manera la 11α,1α-epoxi-5β-pregnanolona también tiene una estructura torsionada, y también es más potente. Por otro lado, la 11β,19-epoxipregnenolona tiene una conformación globalmente plana, similar a la de la allopregnanolona y una actividad similar a ésta.

[2] Veleiro, A.S., Burton, G., *Curr. Med. Chem.,* **2009**, *16*, 455-472
[3] Hamilton, N.M., *Curr. Top. Med. Chem.,* **2002**, *2*, 887-902
[4] Di Chenna, P.H., Ghini, A.A., Burton, G, *Molecules*, **2000**, *5*, 447-448
[5] Veleiro, A.S., Rosenstein, R.E., Jaliffa, C.O., Grilli, M.L., Speroni, F., Burton, G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 343-346
[6] Alvarez, L.D., Veleiro, A.S., Baggio, R.F., Garland, M.T., Edelsztein, V.C., Coirini, H., Burton, G., *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 3831-3838



6,19-epoxipregnenolona **11α,1α-epoxi-5β-pregnanolona** **11β,19-epoxipregnenolona**

Figura 1.7: Análogos rígidos de allopregnanolona y pregnanolona sintetizados por Burton y *col*

Por otro lado Covey y *col.* estudiaron la importancia de la rigidez impuesta por el esteroide a la función 3α-hidroxi en la actividad GABAérgica.[7,8,9] Para esto prepararon una serie de análogos no esteroidales de allopregnanolona y pregnanolona derivados de *trans-trans* benz[e]indenos sustituidos, como los que se muestran en la figura 1.8, que resultaron ser poderosos moduladores del receptor $GABA_A$. Estos análogos imitan parte del núcleo esteroidal pero el anillo A ha sido remplazado por una cadena abierta, del largo apropiado, dándole a la molécula una gran flexibilidad en la posición ocupada originalmente por el donor de puente de hidrógeno 3α-OH. De todos modos, la gran flexibilidad de estos análogos les permitiría imitar la función de tanto 3α como 3β hidroxi de los esteroides, siendo capaces de unirse tanto al sitio potenciador como al sitio inhibidor del receptor $GABA_A$. Estos estudios demostraron que la actividad GABAérgica no requiere que el hidroxilo en 3α se encuentre en una posición espacial rígida.

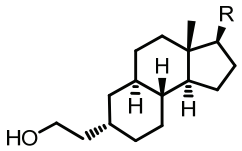


Figura 1.8: Análogos no esteroidales sintetizados por Covey y *col.* (R= CN, $COCH_3$).

Para explorar este efecto en mayor profundidad, se pensó que se le podría otorgar a la allopregnanolona una mayor libertad conformacional en el anillo A expandiéndolo a un anillo de 7 miembros (A-homoesteroides). Además, el átomo de carbono extra en el anillo, permitiría variaciones en la posición de la función oxigenada.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta tesis se sintetizaron A-homoanálogos de allopregnanolona (figura 1.9) con la función oxigenada en posición 3α (**2**), 3β (**1**) y 4α (**4**), así como el análogo reducido 3β-hidroxi-5α-H (**3**). En el capítulo 3 de esta tesis se presentan las

[7] Covey, D.F., Hu, Y., Bouley, M.G., Holland, K.D., Rodgers-Neame, N.T., Isenberg, K.E., Zorumski, C.F., *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 627-630.
[8] Han, M., Hu, Y., Zorumski, C.F., Covey, D.F., *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4548-4556
[9] Li, P., Covey, D.F., Steinbach, J.H., Akk, G., *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 2015-2016

estrategias utilizadas para la síntesis de dichos análogos, y en el capítulo 4 se informan los resultados de actividad *in vitro* y se analizan las relaciones estructura-actividad.

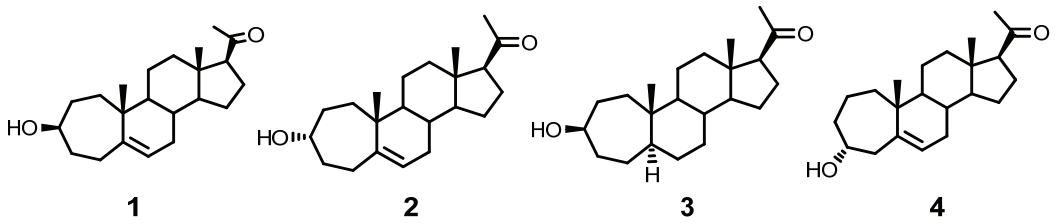


Figura 1.9: Análogos flexibles de allopregnanolona sintetizados en esta tesis.

1.3 Hormonas esteroidales

Las hormonas esteroidales son esteroides que actúan como mensajeros humorales y tienen como función el mantenimiento del equilibrio biológico en el organismo (homeostasis), la protección del organismo frente al estrés, el desarrollo y la diferenciación sexual, etc. Según el órgano que las produce, las hormonas esteroidales se pueden clasificar en hormonas sexuales (o gonadales) y adrenocorticoides. Las hormonas sexuales son producidas en ovarios y testículos y son responsables principalmente de la diferenciación sexual y la reproducción y se pueden dividir en 3 clases: *progestágenos*, *andrógenos* y *estrógenos*. Los adrenocorticoides son producidos por la corteza adrenal, se dividen en 2 tipos, *mineralocorticoides* y *glucocorticoides* y básicamente regulan el metabolismo.

Entre las hormonas esteroidales más importantes y características de cada grupo podemos citar el *cortisol*, (figura 1.10) el glucocorticoide más abundante en humanos. A grandes rasgos, sus funciones generales son el control del metabolismo de energía (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) y la respuesta al estrés; además tiene efectos sobre el sistema inmune, la función cerebral y el sistema cardiovascular. La *aldosterona* es el representante más sobresaliente de los mineralocorticoides y regula el balance de agua y electrolitos en el organismo. La *progesterona* es un progestágeno cuyas funciones principales son el desarrollo de caracteres sexuales secundarios en la mujer, y el mantenimiento del embarazo. La *testosterona* es la hormona sexual principal masculina del grupo de los andrógenos. En los hombres, la testosterona juega un papel clave en el desarrollo de los tejidos reproductivos masculinos como los testículos y próstata, así como también la promoción de las características sexuales secundarias. El *estradiol* es el estrógeno más potente y es necesario para el desarrollo de caracteres sexuales secundarios en la mujer, el metabolismo de calcio y el control del ciclo menstrual femenino.

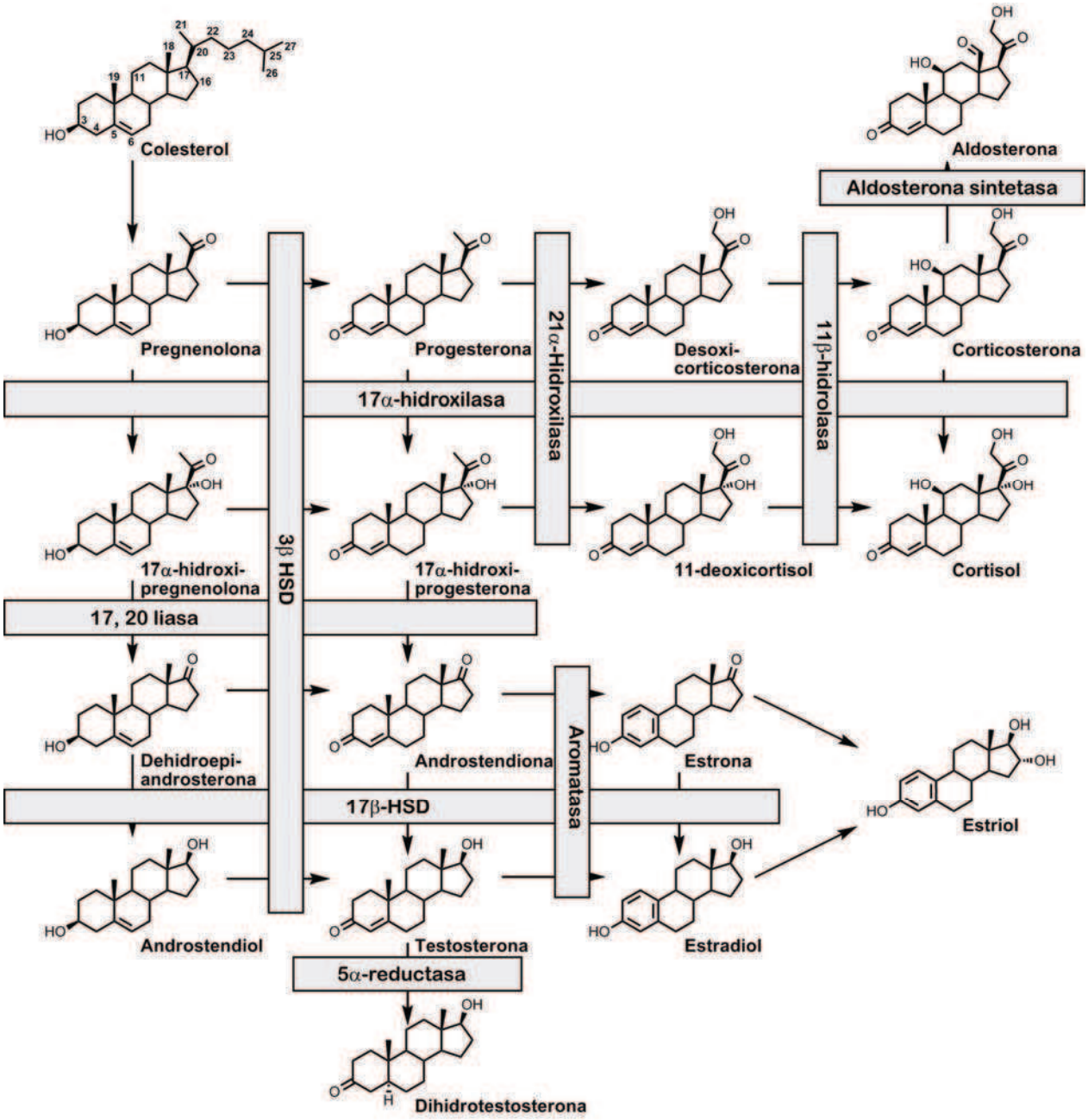


Figura 1.10: Biosíntesis de hormonas esteroidales.

Aunque se sabe que las hormonas esteroidales pueden actuar tanto a través de mecanismos genómicos como no genómicos, los primeros han sido mucho más estudiados y son los más comprendidos y los que se analizarán en este trabajo para el caso de los análogos de glucocorticoides y progestágenos. La acción genómica de las hormonas esteroidales se ejerce a través de su unión a los denominados receptores de esteroides (SR): receptor de andrógenos (AR), receptor de estrógenos (ER), receptor de progestágenos (PR), receptor de mineralocorticoides (MR) y receptor de glucocorticoides (GR). Todos estos receptores

pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (NR), proteínas solubles que se encuentran en la célula (generalmente en el núcleo) y que una vez que son activados por ligando, pueden actuar como factores de transcripción, regulando específicamente la expresión de ciertos genes.

Los SR son uno de los blancos farmacológicos moleculares más importantes para el desarrollo de drogas y existen en el mercado drogas tanto agonistas como antagonistas que regulan función de cada uno de estos receptores para el tratamiento de numerosas enfermedades (figura 1.11).

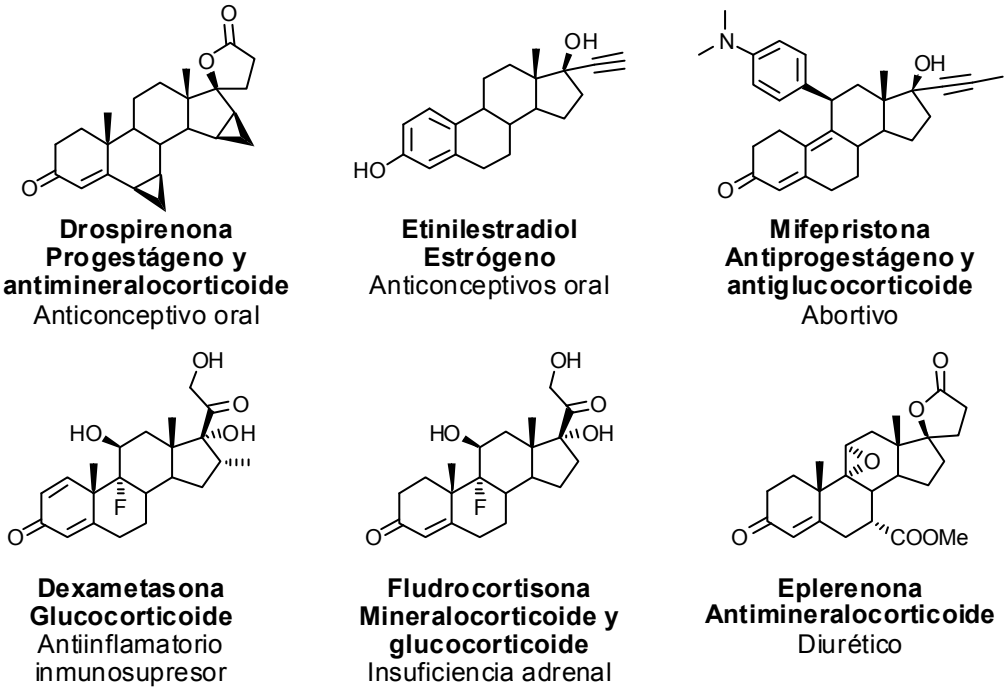


Figura 1.11: Drogas que actúan sobre SRs.

Debido al alto grado de similitud de secuencia existente entre los diferentes SRs (figura 1.12),[10] algunos ligandos poseen afinidad por más de uno de ellos, fenómeno conocido como interacción cruzada o promiscuidad. Por ejemplo, el cortisol puede unirse tanto al GR como al MR, y la progesterona, además de unirse al PR, presenta afinidad por el MR. Algunos de los efectos adversos del uso de glucocorticoides sintéticos se deben a que estos ligandos interaccionan también con el MR, afectando el balance electrolítico del organismo. Por otro lado, el uso clínico de la mifepristona como antiglucocorticoide está limitado por su fuerte actividad antiprogestágena. De la misma manera, los efectos secundarios indeseados típicos del uso de progestágenos (cambios de peso, retención de agua y sales) se deben a efectos típicos de mineralocorticoides. Así, a la hora de diseñar nuevos ligandos para el GR, resulta esencial disminuir al mínimo las interacciones cruzadas con los demás SR.

[10] Moore, T., Collins, J.L., Pearce, K.H., *ChemMedChem.* **2006**, *1*, 504-523

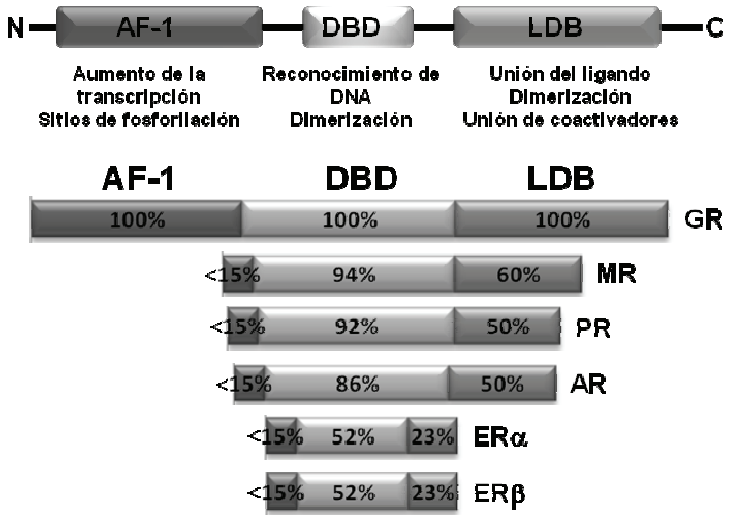


Figura 1.12: Similitud de secuencias de los SRs según dominios LDB (dominio de unión a ligando), DBD, (Dominio de unión a ADN), AF-1 (Dominio de función de activación).

Otra de las dificultades en el desarrollo de drogas que actúan a través de algún SR reside en que la actividad de un compuesto unido a un SR depende fuertemente del tipo de tejido celular. Algunos ligandos que actúan como agonistas de un SR en ciertos tejidos pueden actuar como antagonistas del mismo SR en otros (tabla 1.1). Por esa razón surge el interés de desarrollar ligandos afines por un único SR (específicos), que además presenten actividad tejido-selectivo, o una actividad diferencial con respecto al ligando natural (*moduladores*).

Receptor	Eficacia deseada del modulador	Actividad indeseada del modulador
ER	Reducción de sofocación en menopausia Prevención de osteoporosis post-menopausia	Estimulación del crecimiento de tejido de útero y mamas
GR	Antiinflamatorio Inmunosupresor	Redistribución de grasa y ganancia de peso Pérdida de masa ósea Diabetes Hipercalemia Depresión
MR	Reducción de hipertensión Protección ante insuficiencia cardíaca	-
PR	Reducción de endometriosis	Abortivos
AR	Prevención contra la atrofia muscular	Estimulación del crecimiento del tejido de próstata

Tabla 1.1: Ejemplos de perfiles terapéuticos para el diseño de moduladores de SRs tejido selectivos.

1.4 Glucocorticoides

Cortisol: su biosíntesis está regulada por el eje hipotalámico hipofisario adrenal (HPA) que, a través de las hormonas liberadora de corticotrofina (CRH) y la adrenocorticotrofina (ACTH), activa la biosíntesis de cortisol a partir del colesterol en la corteza adrenal frente a sucesos de estrés.

Efectos fisiológicos

El cortisol ejerce una gran variedad de efectos en diversos tejidos. Los efectos metabólicos principales están asociados a la activación de vías anabólicas a nivel hepático y catabólicas en otros tejidos: se activa la proteólisis en músculos y tejido conectivo y la lipólisis en tejido adiposo, aumenta la concentración de aminoácidos, ácidos grasos en sangre y su transporte al hígado para la síntesis de glucosa y glicógeno. A su vez se inhibe la síntesis de nuevas proteínas, se redistribuye la grasa corporal y aumenta el apetito.

El cortisol también tiene un fuerte control sobre el sistema inmune causando un efecto inmunosupresor y antiinflamatorio a través de diferentes vías. Por un lado suprime la reproducción de linfocitos disminuyendo la cantidad de linfocitos T y anticuerpos, disminuye la liberación de interleukina 1 por parte de los leucocitos, estabiliza las membranas de los lisosomas, previniendo la liberación de enzimas proinflamatorias y previene la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos entre otros.

Además, el cortisol tiene acción sobre el sistema circulatorio, aumentando el tono vascular periférico y la función del miocardio. Por otro lado afecta el metabolismo mineral: el exceso de cortisol disminuye la síntesis de la matriz proteica y el depósito de calcio en huesos, así como reduce la absorción intestinal de calcio y promueve su eliminación renal. Entre otras cosas, también estimula la secreción de ácido clorhídrico y pepsina al estómago y un exceso de glucocorticoides puede llegar a causar ulceras gástricas. El cortisol también tiene influencia sobre el SNC, modulando el comportamiento del individuo, la habilidad para reconocer estímulos sensoriales y la memoria.

Dada la cantidad de funciones biológicas que se encuentran finamente regulado por la acción de los glucocorticoides endógenos, pequeños cambios de actividad provocados por trastornos hormonales generalmente causan severos trastornos como el síndrome de Cushing o el síndrome de Addison (figura 1.13).

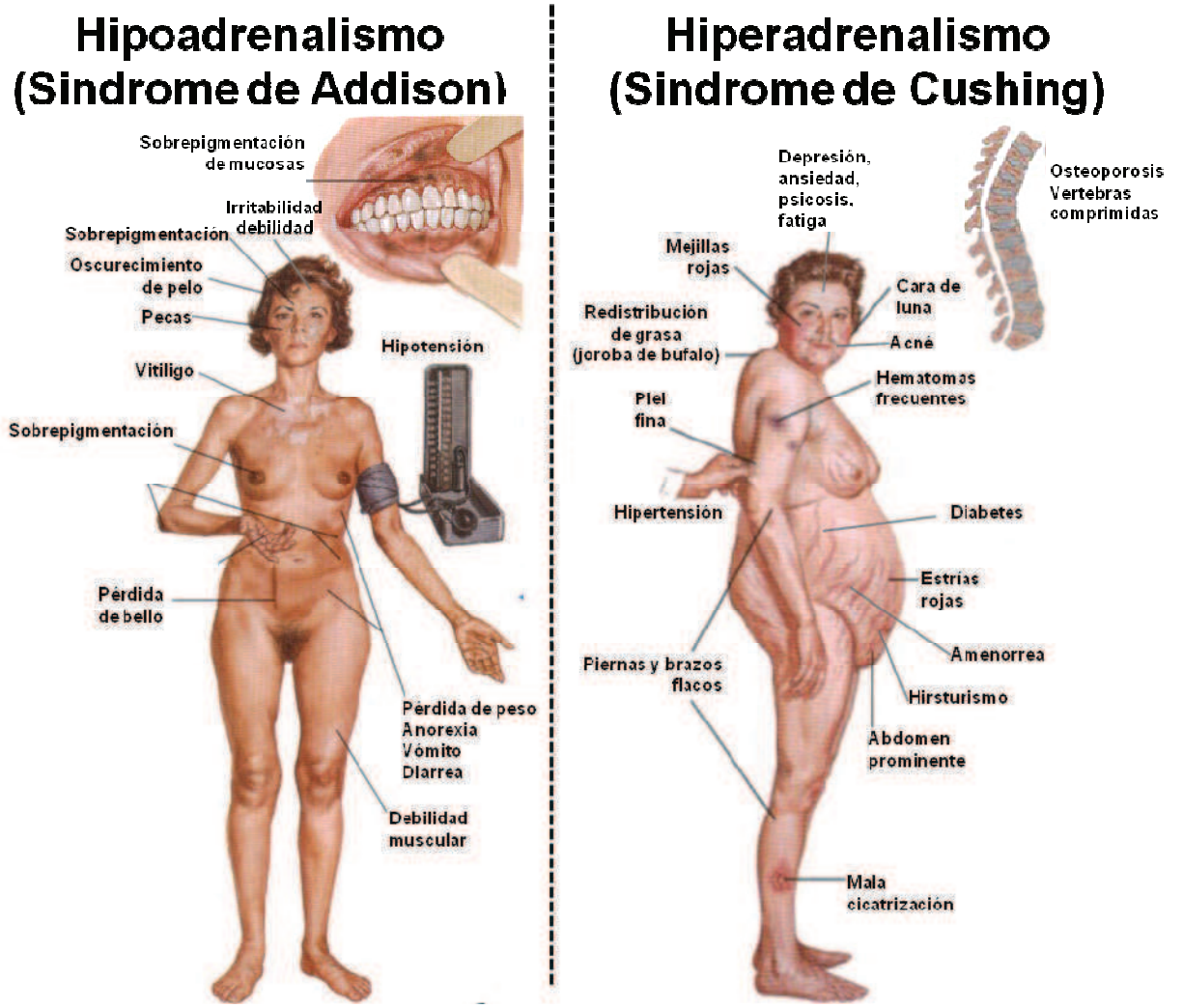


Figura 1.13: Sintomatología del hipo e hiper adrenalismo.[11]

La gran diversidad de efectos que ejercen los glucocorticoides en el organismo humano los hace un campo extremadamente valioso para la explotación farmacológica. Efectivamente, los glucocorticoides sintéticos son una de la clase de drogas más prescriptas en el mundo y su uso resulta indispensable en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, desórdenes inflamatorios y cáncer, entre otras. Pero el uso crónico de glucocorticoides sintéticos en dosis farmacológicas provoca efectos similares a los causados por el exceso de glucocorticoides endógenos (síndrome de Cushing, figura 1.13), dependiendo de la dosis y duración del tratamiento. A pesar de los esfuerzos realizados durante décadas de investigación y de la gran variedad de glucocorticoides accesibles en el mercado (figura 1.14), todavía no se ha logrado una droga carente de estos efectos indeseados.

[11] *Netter´s illustrated pharmacology*, Raffa, R.B., Rawls, S.N., Icon Learning System, New Jersey, **2005**

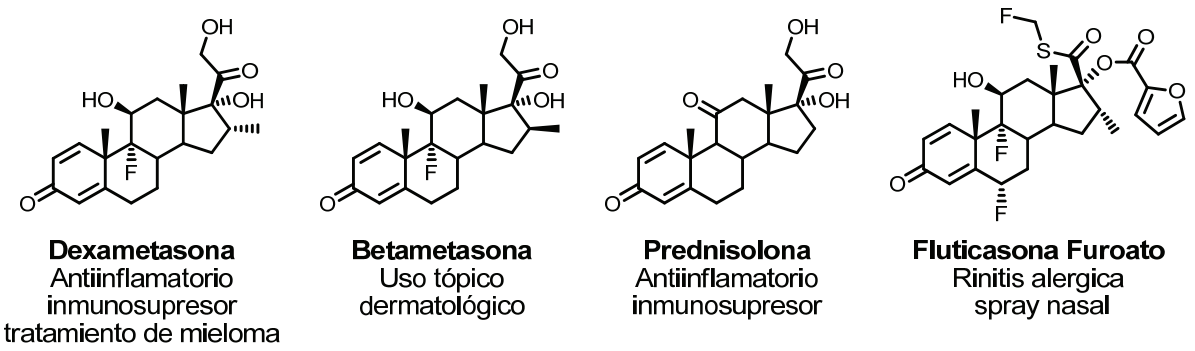


Figura 1.14: Glucocorticoides esteroidales sintéticos más utilizados.

El farmacóforo asociado a la actividad glucocorticoidea para ligandos esteroidales está conformado por la función Δ^4-3-ceto principalmente, mientras que un doble enlace adicional en posición 1,2 incrementa la actividad. En el anillo B, la presencia de un halógeno (comúnmente flúor, y en algunos casos cloro) en posiciones 6α y 9α aumentan la actividad. Si bien la presencia de halógenos aumenta la afinidad de unión hacia el GR, estos átomos además hacen al esteroide más resistente a los procesos metabólicos de degradación aumentando el tiempo de vida media de la droga en el organismo. Cabe resaltar además, que estas modificaciones también aumentan la afinidad del esteroide por el MR, con lo cual se incrementan los efectos adversos relacionados a este receptor. En el anillo C, el hidroxilo 11β es requerido para la actividad glucocorticoide. En el anillo D, existe un cierto grado de libertad en la sustitución en los C16 y C17. La introducción de un metilo en 16 (α o β) tiende aumentar la actividad glucocorticoidea y disminuir la actividad mineralocorticoidea. Se han sintetizado una gran cantidad de derivados sobre el 17-OH, mayormente ésteres, los cuales aumentan significativamente la actividad. Al igual que en posición 17, el 21-OH admite una gran variedad de derivados ésteres. Este modelo del farmacóforo de un glucocorticoide está basado únicamente en información obtenida con ligandos derivados del cortisol. También existen varios ligandos de estructura no esteroidal con propiedades glucocorticoides.

Antiglucocorticoides

Al igual que los glucocorticoides, los antagonistas del GR poseen un gran número de aplicaciones clínicas. Un antiglucocorticoide podría ser utilizado, en principio, para tratar aquellos trastornos causados, justamente, por un exceso de glucocorticoides ya sean endógenos o sintéticos. Síndrome de Cushing, hipertensión dependiente de glucocorticoides, inmunosupresión inducida por glucocorticoides, diabetes, depresión central, ansiedad y glaucoma son algunos de los usos potenciales de los antiglucocorticoides

El acetato de ciproterona es, además de un antiglucocorticoide débil, un antiandrógeno fuerte utilizado comúnmente en el tratamiento de cáncer de próstata (figura 1.15). Mifepristona

es un antiglucocorticoide fuerte, de afinidad por el GR similar a la de los glucocorticoides agonistas más potentes, que también posee un fuerte efecto antiprogestágeno, debido al cual mifepristona se utiliza como abortivo. Aunque se han sintetizado cientos de análogos de mifepristona en busca de separar la actividad antiglucocorticoide de la antiprogestágena, en la mayoría de los casos en que esto se logró, la actividad remanente fue la antiprogestágena. Muchos menos casos resultaron con actividad principal antiglucocorticoide, por ejemplo RU43044 es un antiglucocorticoide puro, con 1/6 de la actividad de la mifepristona pero sólo activo *in vitro* ya que se metaboliza rápidamente.[12]

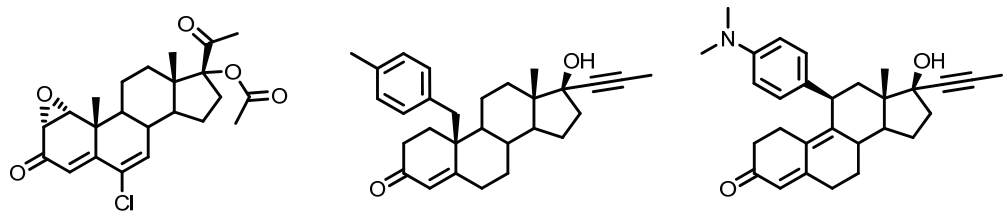


Figura 1.15: Antiglucocorticoides esteroidales sintéticos.

Mecanismo de acción de los glucocorticoides

Los glucocorticoides actúan a través de múltiples mecanismos. Por un lado, pueden dar respuestas del tipo no genómicas por asociación a receptores de glucocorticoides de membranas (mGR). Estos receptores están acoplados a proteína G y pueden intervenir en diversos canales de señalización según el tipo celular.[13] La respuesta genómica de los glucocorticoides es muy compleja y se ejerce a través del αGR que es una proteína soluble que reside en el citoplasma, formando un complejo con proteínas chaperonas. Al unirse el ligando al GR, esto genera un cambio conformacional en el receptor, que le permite liberarse de estas proteínas, y atravesar la envoltura nuclear. Desde allí, el GR regula la expresión positiva o negativamente de ciertos genes, ya sea de modo directo o indirecto. En el modo directo de acción, una vez en el núcleo, el receptor se une como homodímero a sitios GRE (elemento de respuesta de glucocorticoides) o sitios nGRE (GRE negativo) presentes en los promotores de los genes blanco a través del dominio de unión a ADN. Cuando el GR activado por ligando se une a un GRE, este recluta una gran variedad de co-activadores de la maquinaria de transcripción, promoviendo la transcripción del gen blanco, que luego se traduce a una proteína, que causará algún efecto (figura 1.16 a). Por

[12] Teutsch, G., Gaillard-Moguilewsky, M., Lemoine, G., Nique, F. y Philibert, D., *Biochem. Soc. Trans*, **1991**, *19*(4), 901-908
[13] Borski, R.J., *Trends. Endocrinol. Metab.*, **2000**, *11*, 427-437

otro lado si el GR activado por ligando se une a un nGRE, éste bloquea la transcripción del gen blanco (figura 1.16 b).

En cambio, en el modo indirecto, el complejo ligando-receptor no interactúa directamente con el ADN sino que interactúa como monómero con ciertos factores de transcripción. Así, el complejo GR-ligando inhibe la expresión de genes activados por otros factores de transcripción, como el NFκB y AP-1 (figura 1.16 c y d) y promueve la expresión de genes controlados por otros factores de transcripción, como por ejemplo STAT-5 (figura 1.16 e), entre otros. De este modo el GR activado por ligando es capaz de modular la respuesta de las distintas cascadas de señalización celular.[14]

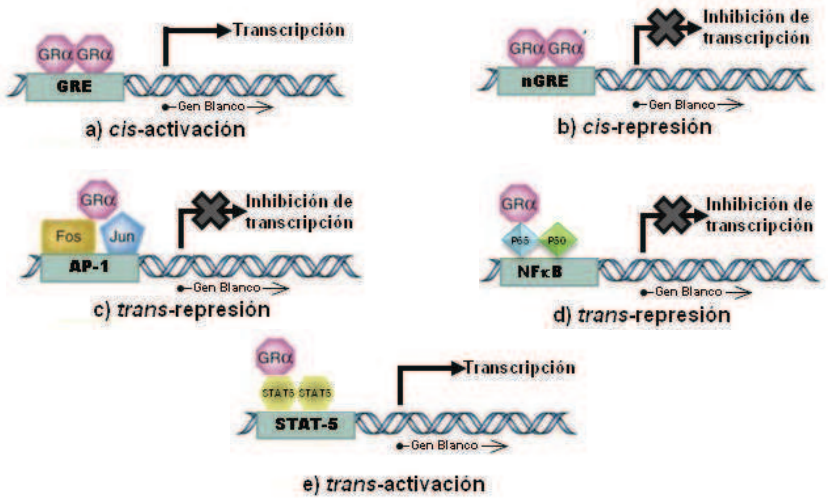


Figura 1.16: Mecanismos de acción de glucocorticoides.

Modelo disociado

Un modelo simplista muy utilizado para describir el mecanismo de acción de los glucocorticoides es el llamado *modelo disociado*. Este agrupa los mecanismos por los cuales el GR actúa en dos grandes modos de acción según si son directos o indirectos, a los que llama *transactivación* y *transrepresión* respectivamente. La transactivación engloba tanto los procesos de *cis*-activación y de *cis*-represión y la transrepresión agrupa los mecanismos de *trans*-represión y *trans*-activación. Si bien esta terminología puede resultar ambigua y confusa, ésta se debe a cuestiones históricas. El modelo disociado manifiesta que los genes regulados por el mecanismo de transactivación están asociados a los efectos metabólicos del uso de glucocorticoides (o sea los efectos adversos indeseables), y que los genes regulados por la transrepresión intervienen en los efectos antinflamatorios, o sea los efectos benéficos deseados. A partir de este modelo, surge el

[14] Necela, B.M., Cidlowski, J. A., *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **2004**, *1*, 239-246

concepto de glucocorticoide disociado como un glucocorticoide que sea capaz de hacer transreprimir pero no transactivar al GR, teóricamente manteniendo los efectos antiinflamatorios benéficos pero sin los efectos adversos, siendo, desde el punto de vista farmacológico, el glucocorticoide ideal.

Si bien este modelo es altamente reduccionista, resultó de enorme utilidad a quienes buscaban encontrar nuevos glucocorticoides disociados, ya que existen métodos relativamente sencillos para medir tanto la capacidad de transactivación (por ejemplo observando la expresión de genes reporteros manejados por promotores con sitios GRE), como la capacidad de transrepresión (por ejemplo, inhibición de la actividad de AP-1), de una gran cantidad de compuestos con elevada eficiencia. La aceptación del modelo disociado permitió, por lo tanto, emplear métodos de *high through-put screening* en busca de nuevos glucocorticoides con mejor índice terapéutico. Sin embargo, la asociación exclusiva de los efectos adversos a la transactivación y de los benéficos a la transrepresión es una simplificación extrema y equivocada de la acción del GR, porque incluso aceptando que la transactivación y transrepresión fueran los únicos mecanismos de acción del GR, existen tanto genes involucrados en respuestas benéficas regulados por transactivación como genes de respuestas adversas por transrepresión.

Glucocorticoides disociados vs. moduladores selectivos del GR

Si bien el mecanismo de transactivación controla principalmente la expresión de genes relacionados con el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas, azucares y calcio, que están relacionados con los efectos adversos de los glucocorticoides, también controla la expresión de algunos genes fundamentales en la respuesta antiinflamatoria y broncodilatadora (tabla 1.2).[15] Por otro lado la transrepresión regula la expresión de genes primordiales para la respuesta antiinflamatoria, pero también está involucrada en efectos no deseados como depresión, osteoporosis, atrofia de piel e insuficiencia adrenal.

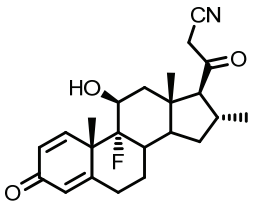
El descubrimiento de *ligandos disociados* de GR como el RU24858 (figura 1.17), también aporta evidencia contra el modelo disociado. A pesar de que estos ligandos cumplen los requisitos para ser nombrados como disociados en ensayos *in vitro*, es decir transreprimen pero no transactivan, *in vivo* no logran generar una respuesta antiinflamatoria completa. Además RU24858 demostró que reduce la cantidad de osteocalcina sérica y reduce el crecimiento óseo, es decir que no logra disociar completamente los efectos deseados de los adversos.

[15] Roumestan, C., Gougat, C., Jaffuel, D., Mathieu, M., *Rev. Med. Int.*, **2004**, *25*, 636-647

Efecto	Gen o proteína blanco	Mecanismo				
		Transactivación		Transrepresión		No genómico
		Cis-activación	*Cis*-represión	*Trans*-represión	*Trans*-activación	
Anti-inflamatorio	Eotoxina, IL-2,-5, -6, Colagenasa-3, ICAM-1			✓(AP-1)		
Anti-inflamatorio	Eotoxina, TNF-α, IL-1β, -2, -5, -6, 8, GM-GSF, ICAM-1			✓(NFκB)		
Anti-inflamatorio	Lipocortina-1, SLPI	✓				
Anti-inflamatorio	Anexina-1					✓
Bronco dilatación	Receptor β adrenérgico	✓?				
Apoptosis, proliferación y diferenciación	PIM-1, OSM, CIS, IL-2 Bcl-2	✓			✓(STAT5)	
Retardo de cicatrización	Mediadores pro-inflamatorios			✓(AP-1 y NFκB)		
Osteoporosis	OPG-L OPG Osteocalcina LH	✓	✓? ✓	✓? ✓(CREB)		
Glaucoma	TIGR	✓				
Depresión	Receptor de serotonina			✓(NFκB)		
Insuficiencia suprarrenal	CRH ACTH Anexina-1		✓?	✓(AP-1)		✓
Diabetes	TAT, AAT, G6-Pasa, PEPCK	✓				
Tensión arterial	Angiotensina Receptor de angiotensina	✓ ✓				
Retención de líquido	Canal de Na^+ Kinasa sgk	✓ ✓				
Atrofia de piel	Procolagenina			✓(Smad3)		
Atrofia muscular	Glutamina sintetasa Angiotensina Receptor de angiotensina	✓ ✓ ✓				

IL: Interleukina, TNF: factor de necrosis tumoral, NFκB: factor nuclear κB, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, ICAM: intercellular adhesion molecule, SLPI, serum leukosite preotease inhibitor, PIM-1: Proto-oncogen serina/treonin-protein kinase, OPG: osteoprotegerina, LH: hormona luteinizante, TIGR: Proteína controladora de la presión intraocular, CRH: corticoliberina, ACTH: adrenocorticotrofina, TAT: tirosina aminotransferasa, AAT: aspartato aminotransferasa, G6-Pasa: glucosa 6-fosfatasa, PEPCK: fosfofenolpiruvato carboxikinasa,

Tabla 1.2: Genes modulados por GR por diferentes mecanismos.



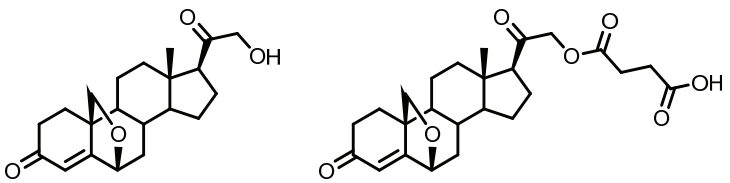
RU 24858

Figura 1.17: Glucocorticoide con actividad disociada *in vitro*.

En consecuencia, el concepto de glucocorticoide disociado debe ser abandonado y reemplazado por el de *modulador selectivo*. El concepto de modulador selectivo emergió con el descubrimiento del efecto del tamoxifeno en el ER. La actividad del tamoxifeno depende del tipo de tejido, en el útero posee efectos estrogénicos, mientras que en la mama es un antiestrogénico. Resulta entonces necesario el desarrollo de nuevos moduladores selectivos de la acción glucocorticoide, y caracterizar su perfil de actividad biológica de manera más amplia, mediante ensayos biológicos especialmente seleccionados.

Análogos rígidos de glucocorticoides

21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP (figura 1.18) son dos análogos rígidos de glucocorticoides sintetizados en nuestro grupo de investigación.[16,17] Al evaluar la actividad de 21OH-6,19OP sobre los receptores GR, MR y PR se encontró que este análogo rígido es un antagonista del GR, sin afinidad por el MR y el PR. La especificidad de 21OH-6,19OP lo hace un compuesto sumamente atractivo desde el punto de vista farmacológico, ya que aún no existe una droga de estas características en el mercado. Por otro lado, la introducción de un grupo hemisuccinato en la posición C-21 de 21OH-6,19OP conduce a un nuevo derivado, 21HS-6,19OP, también específico para el GR pero con una actividad diferente a la de su precursor (tabla 1.3).



21OH-6,19OP **21HS-6,19OP**

Figura 1.18: Glucocorticoide con actividad disociada *in vitro*.

[16] Vicent. G.P., Monteserín, M.C., Veleiro, A.S., Burton, G., Lantos, .C.P., Galigniana, M.D., *Mol. Pharmacol.*, **1997**, *52*, 749–753

[17] Álvarez, L.D., Martí, M.A., Veleiro, A.S., Misico, R.I., Estrín, D.A., Pecci, A., Burton, G., *ChemMedChem*, **2008**, *3,* 1869-1877

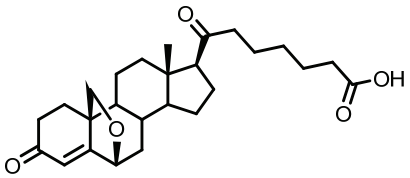
Ensayo	**Inducción MMTV-LUC**					**Inhibición κB-LUC**		**Apoptosis**			
Celulas	Cos-1		L929		BHK	BHK		Timocitos		L929	
	GC	*antiGC*	*GC*	*antiGC*	*GC*	*GC*	*antiGC*	*GC*	*antiGC*	*GC*	*antiGC*
Dexametasona	**+**	**nc**	**+**	**nc**	**+**	**+**	**nc**	**+**	**Nc**	**+**	**nc**
21OH-6,19OP	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**-**	**+**	**+**	**-**
21HS-6,19OP	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**	**+**	**++**	**+**	**-**
Mifepristona	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**-**	**+**	**nd**	**nd**

Tabla 1.3: Actividad de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP (nc= no corresponde, nd=no determinado).

El ensayo de inducción del gen reportero MMTV-Luc da indicio de la capacidad de *cis*-activación del ligando, observándose que la 21HS-6,19OP se comporta como glucocorticoide y que la 21OH-6,19OP se comporta como antiglucocorticoide siendo capaz de bloquear la actividad de dexametasona. Por lo tanto la introducción de un grupo hemisuccinato en la posición 21 del antagonista 21OH-6,19OP produce un nuevo análogo rígido con actividad agonista. El ensayo de inhibición de κB-Luc da idea de la capacidad de *trans*-represión observándose que ambos compuestos se comportan como agonistas. Los resultados obtenidos al evaluar la actividad apoptótica de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP demuestran que estos ligandos son moduladores selectivos del GR (SGRMs), ya que la actividad depende del tipo celular. 21OH-6,19OP se comporta como un agonista en los fibroblastos L929 y como antagonista en timocitos. 21HS-6,19OP posee también actividad agonista en fibroblastos L929, pero en los timocitos la actividad depende de la presencia de dexametasona. Cuando en el medio sólo hay 21HS-6,19OP, este compuesto se comporta como un agonista débil, pero en presencia de dexametasona se observa una fuerte actividad antagonista.

Desde el punto de vista farmacológico, el conjunto de los resultados obtenidos muestra que ambos análogos rígidos poseen potenciales aplicaciones como glucocorticoides. 21OH-6,19OP es un ligando que se comporta de forma similar a Mifepristona excepto que tiene la ventaja de ser específico del GR. 21HS-6,19OP es un ligando también específico del GR pero que actúa como agonista débil, excepto en el caso de la apoptosis de timocitos en presencia de dexametasona donde se comporta como un antagonista fuerte. Por lo tanto, la adición de 21HS-6,19OP al tratamiento con glucocorticoides agonistas como dexametasona podría resultar en una disminución del efecto inmunosupresor de estas drogas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que *in vivo* el grupo hemisuccinato de 21HS-6,19OP es inestable ya que puede hidrolizarse obteniéndose 21OH-6,19OP, es decir que debemos considerar a 21HS-6,19OP como un líder para desarrollar glucocorticoides con un nuevo perfil de actividad pero no como el candidato a droga. Teniendo en cuenta estos antecedentes en esta tesis se sintetizó el nuevo análogo no hidrolizable de 21HS-6,19OP **5** (figura 1.19). En el capítulo 2 se presentan las estrategias

utilizadas para la síntesis de dicho análogo, y en el capítulo 4 se describen los resultados de actividad *in vitro* y se analiza las relaciones estructura-actividad.



5

Figura 1.19: Análogo no hidrolizable de 21HS-6,19OP sintetizado en esta tesis.

1.5 Progestágenos

La progesterona es un miembro de la familia de las hormonas esteroidales que juega un rol muy importante en la regulación de la homeostasis en cerebro, sistema cardiovascular, hueso y sistema nervioso central; también en los tejidos del tracto reproductivo, desarrollo de glándulas mamarias y el establecimiento y mantención del embarazo. Por antagonismo con la actividad mitogénica de los estrógenos, la progesterona es requerida para la ruptura de los oocitos maduros del folículo ovárico y prepara al útero para la implantación reorganizando la proliferación del endometrio en un tejido diferenciado y desidualizado, listo para la crianza y alimentación del feto. Además, la progesterona ayuda a la mantención del embarazo inhibiendo las contracciones del miometrio uterino. En glándulas mamarias, la progesterona tiene un efecto mitogénico sobre los ductos epiteliales, induciendo la elongación y la ramificación de los mismos y, junto con la prolactina, inducen la maduración de las glándulas secretorias durante el embarazo. Por otro lado, la progesterona también suprime la lactancia hasta después del momento del parto, por inhibición de la expresión de las proteínas lácteas. Entonces, la progesterona puede estimular o inhibir la proliferación celular, así como inducir la diferenciación, según el tejido o contexto celular en el que actúe.[18]

La progesterona ejerce su efecto a través del receptor nuclear de progesterona (PR) que interactúa con correguladores transcripcionales para regular la expresión de los genes blanco. El PR humano se expresa en dos isoformas: PR-B (120 kDa) y PR-A (94 kDa). Si bien ambas isoformas son capaces de unir hormonas esteroidales y de interactuar con el ADN, tienen actividades transcripcionales diferentes: ambas isoformas interactúan con sets de coactivadores y correpresores distintos y tienen afinidad diferenciada frente a diferentes promotores de genes blanco, según el contexto celular. Además el PR-A activado por ligando es capaz de regular la expresión a través de vías no genómicas: interactuando con segundos mensajeros puede generar

[18] Wardell, S.E., Edwards, D.P., *Semi. Rep. Med.*, **2005**, *23*, 9-21

un *cross-talk* con vías de señalización del factor de crecimiento y es capaz de *trans*-reprimir otros SRs (GR, MR, AR y ER).[19]

Por su importante rol en el ciclo reproductivo femenino, el PR es un importante blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer, terapia homonal sustitutiva, enfermedades ginecológicas y anticoncepción. Los anticonceptivos a su vez son ampliamente utilizados para la protección contra embarazos no deseados, así como para mejorar síntomas como dismenorrea, hinchazón, síndrome premenstrual, anemia debida a menorragia, mastalgia, acné, protección contra ciertos tipos de cáncer y preservación de la masa ósea. Debido a la complejidad de efectos que ejerce la progesterona en el organismo, la exposición a análogos de progesterona exógenos está asociada a severos desbalances, incluso el aumento de probabilidad de cáncer de mama.[20]

El modelo de farmacóforo asociado a la actividad PR es muy simple y consiste en dos grupos polares, uno en posición 3 y otro en 17 del esqueleto androstano o 20 del pregnano, ambos separados por una distancia entre 10-12 Å con un cuerpo central apolar. Estudios de mutagénesis dirigida demostraron que cambios en los residuos de las inmediaciones de la función 20-ceto en el hPR no generan merma en la afinidad del receptor por agonistas ni antagonistas demostrando que la funcionalidad ceto en la cadena 17β no está fuertemente involucrada en el reconocimiento del ligando. Contrariamente mutaciones en las inmediaciones de la función 3-ceto conducen a una pérdida total de afinidad por los ligandos probando la importancia de esta interacción para la actividad.[21]

Además, por cristalografía de rayos X de los agonistas furoato de mometasona y noretindrona unidos al PR (figura 1.20), se demostró que el grupo polar en 17β de ambos compuestos no participa de interacciones fuertes. Por otro lado, la función 3-ceto de ambos agonistas se ancla al receptor de manera análoga, a través de una fuerte red de puentes de hidrógeno. También se observa que el receptor puede acomodar una gran variedad de sustituyentes voluminosos en posición 17α; esta modificación ocurre sin pérdida de actividad PR y mejora la biodisponibilidad de la droga.[22]

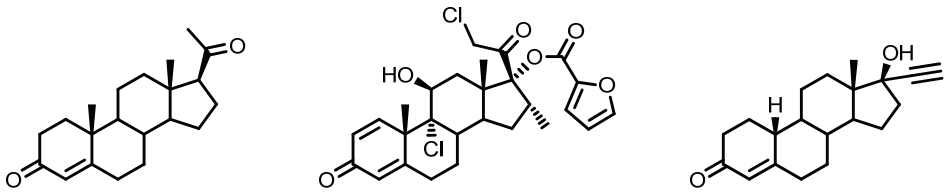


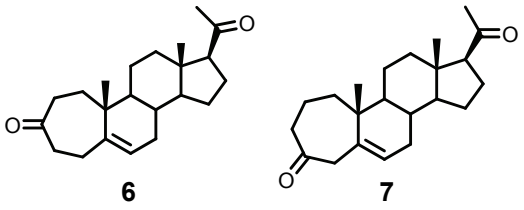
Figura 1.20: Agonistas del PR.

[19] Scarpin, K.M., Graham, J.D., Mote, P.A., Clarke, C.L., *NRS*, **2009**, *7*, 1-13
[20] Zurawin, R.K., Ayensu-Coker, L., *Clinic. Obstet. Gynecol.*, **2007**, *50*, 425–439
[21] Hillisch, A., von Langen, J., Menzenbach, B., Droescher, P., Kaufmann, G., Schneider, B., Elger, W., *Steroids*, **2003,** *68*, 869–878
[22] Madauss, K.P., Deng, S.J., Austin, R.J.H., Lambert, M.H., McLay, I-. Pritchard, J., Short, S.A., Stewart, E.L., Uings I.J., Williams, S.P., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3381-3387

Por otro lado, en el furoato de mometasona, la adición de grupos polares sobre el esqueleto esteroidal aumenta la afinidad de la droga por el GR, haciéndolo también un potente glucocorticoide. Los 19-nor progestágenos como la noretindrona (figura 1.2) presentan, a su vez, afinidad con el ER. Esta promiscuidad da lugar a efectos secundarios indeseados por parte de estas drogas.

Sin ir más lejos, la propia hormona natural, la progesterona, tiene actividad antiandrógena débil y antimineralocorticoidea fuerte.[23] La actividad antiandrogénica se debe al reemplazo del 17β-OH de la testosterona, ligando natural del AR, por un acetilo en la progesterona. El mayor volumen de la cadena lateral generaría choques estéricos con los residuos del LBP, estabilizando alguna conformación no productiva del receptor, generando así un antagonismo pasivo. La actividad antimineralocorticoidea se puede deber a que la progesterona carece de ciertas interacciones polares claves que se dan entre la aldosterona, ligando natural de MR, y el loop L11-12 y la hélice 12 del hMR. Así, la progesterona se une al receptor, pero interrumpe ciertos contactos ligando receptor necesarios para estabilizar al MR en una conformación activa.[24]

El entendimiento de las interacciones que se establecen entre el PR y sus ligandos es clave para diseñar nuevas drogas, más selectivas y más potentes. En el transcurso de esta tesis se sintetizaron los compuestos **6** y **7** (figura 1.21), intermediarios de la síntesis de los análogos de neuroesteroides **1**-**4**. Dado que los compuestos cumplen con los preceptos del farmacóforo para la actividad PR, se evaluó su actividad biológica sobre el PR y la selectividad respecto a los otros receptores. Esto permitió, junto con un análisis computacional, determinar el efecto de la flexibilidad y el aumento de la hidrofobicidad del anillo A expandido a la actividad sobre el PR y a la selectividad respecto de otros receptores. Los resultados de actividad biológica, y el análisis de relación estructura-actividad se describen en el capítulo 4.



6 **7**

Figura 1.21: A-homoanálogos de progesterona sintetizados.

[23] Fagart, J., Wurtz, J.M., Souque, A., Hellal-Levy, C., Moras, D., Rafestin-Oblin, M.E., *EMBO J*., **1998**, *17*, 3317–3325
[24] Hillisch, A., von Langen, J., Menzenbach, B., Droescher, P., Kaufmann, G., Schneider, B., Elger, W., *Steroids,* **2003**, *68*, 869–878

CAPÍTULO 2

SÍNTESIS DE UN ANÁLOGO RÍGIDO DE GLUCOCORTICOIDES

En este capítulo se describen las estrategias sintéticas empleadas para la obtención de un nuevo análogo rígido de glucocorticoides (compuesto **5**, Figura 1.19, página 22). Además, se presenta el desarrollo y optimización de una metodología de alquilación en la posición 21 de la cadena lateral.

2.1 Introducción

Antecedentes

En trabajos precedentes realizados en nuestro grupo de investigación se estudiaron las bases moleculares de acción de tres ligandos del GR: dexametasona, 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP (figura 2.1). En particular, se procuró explicar la actividad de estos ligandos esteroidales frente a la transactivación a través de simulación por Dinámica Molecular (DM).[1,2] Como se mencionó en el Capítulo 1, se denomina transactivación al mecanismo por el cual genes cuyos promotores poseen sitios GRE son transcriptos por el GR. La transactivación es un proceso sumamente complejo en el cual intervienen, además del GR, el ligando y una gran cantidad de proteínas citoplasmáticas y nucleares, las cuales modulan la acción del receptor interactuando con él tanto directa como indirectamente. En su forma más simplificada, la transactivación se puede representar como un mecanismo que involucra las etapas de unión del ligando al receptor, liberación de las chaperonas, translocación al núcleo, homodimerización GR-GR y unión al ADN, unión de coactivadores específicos y remodelación de la cromatina, ensamblaje de la maquinaria transcripcional y finalmente la transcripción del gen blanco. Cabe destacar sin embargo, que actualmente algunas de estas etapas y el orden en que ocurren se encuentran en revisión.[3]

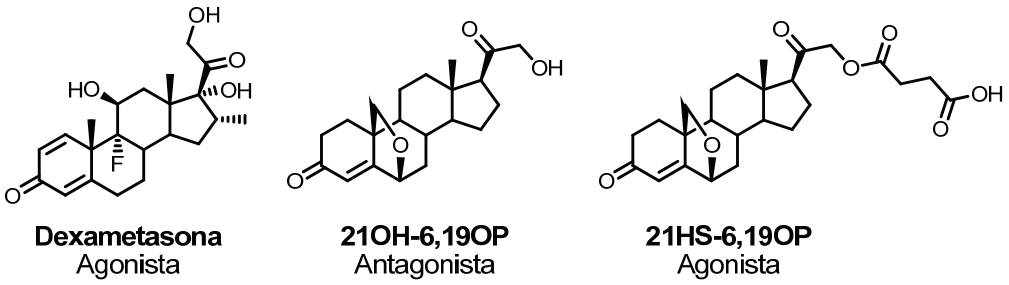


Figura 2.1: Estructura de dexametasona, 21OH,6-19OP y 21HS,6-19OP.

[1] Álvarez, L.D., Martí, M.A., Veleiro, A.S., Misico, R.I., Estrin, D.A., Pecci, A., Burton, G. *ChemMedChem*, **2008**, *3*, 1869-1877.
[2] Álvarez, L.D., Martí, M.A., Veleiro, A.S., Presman, D.M., Estrin, D.A., Pecci, A., Burton, G., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 1352-1360.
[3] Clark, A.R., Belvisi, M.G., **2011**, *Pharm. Ther.* (2011), doi:10.1016/j.pharmthera.2011.12.004.

El GR es una proteína modular organizada en tres dominios con estructura y función bien diferenciadas. El *Dominio de función de activadores* (AF-1) cumple la función de activación independiente de ligando, uniendo cofactores indispensables para la actividad transcripcional. El *Dominio de unión al ADN* (DBD) es un dominio altamente conservado dentro de los NRs y posee unas estructuras llamadas dedos de zinc que le permite la unión a secuencias específicas del ADN. Dado que el GR interactúa como dímero, el DBD contiene también una región responsable de la homodimerización. Por último el *Dominio de unión a ligando* (LBD) (figura 2.2), posee el bolsillo de unión a ligando (LBP), que es una cavidad que une específicamente los ligandos. Además, el LBD tiene dos regiones muy importantes para la actividad del receptor: la AF-2 que es un hueco hidrofóbico en la superficie de la proteína que funciona como plataforma para reclutar ciertos cofactores esenciales para la trascripción. Por otro lado el LBD tiene una región que también forma parte de la interfaz de dimerización.

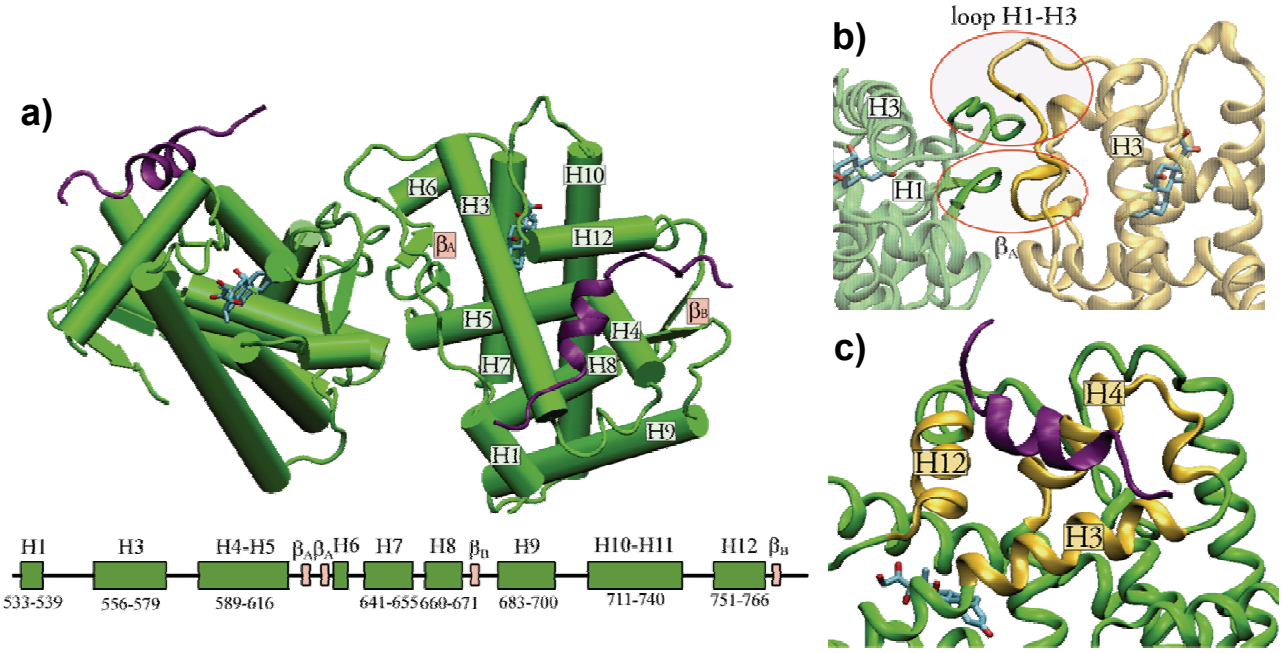


Figura 2.2: a) Arriba: estructura cristalina del dímero GR LBD (pdb:1M2Z) unido a dexametasona (en celeste) y al péptido coactivador TIF2 (en violeta). Abajo: esquema de la estructura secundaria del GR LBD. **b)** detalle de la interfaz de homodimerización del GR-LBD entre el loop H1-H3 y la lamina β_A de cada monómero. **c)** detalle de la AF-2 entre las hélices H3, H4 y H12.

Alvarez y *col.* estudiaron las bases moleculares de acción de los ligandos del GR mencionados arriba (figura 2.1) frente a la transactivación utilizando métodos computacionales. Para ello tomaron como estructura inicial la estructura cristalina pdb:1m2z (figura 2.2) y mediante dinámica molecular (MD) evaluaron el modo en que estos ligandos se unen al receptor

y el efecto que esta unión provoca en la proteína.[4,5] Los resultados permitieron concluir que el agonista dexametasona se une al LBP a través de una red compleja de puentes de hidrógeno. El grupo 3-ceto participa de uniones hidrógeno con Gln570, Arg611 y una molécula de agua. El 21-OH se une a los residuos Thr739, Gln642 y Asn564 y este último a su vez interactúa con el hidroxilo de C-11 (figura 2.3a). El antagonista 21OH-6,19OP se une en una orientación y posición similar, pero con una red de puentes de hidrógeno diferente (figura 2.3b). Debido a la falta de hidroxilos en C-11 y C-17 y debido a que el 21-OH adopta una conformación distinta, los residuos Thr739, Gln642 y Asn564 se ven desplazados de su posición con respecto a dexametasona.

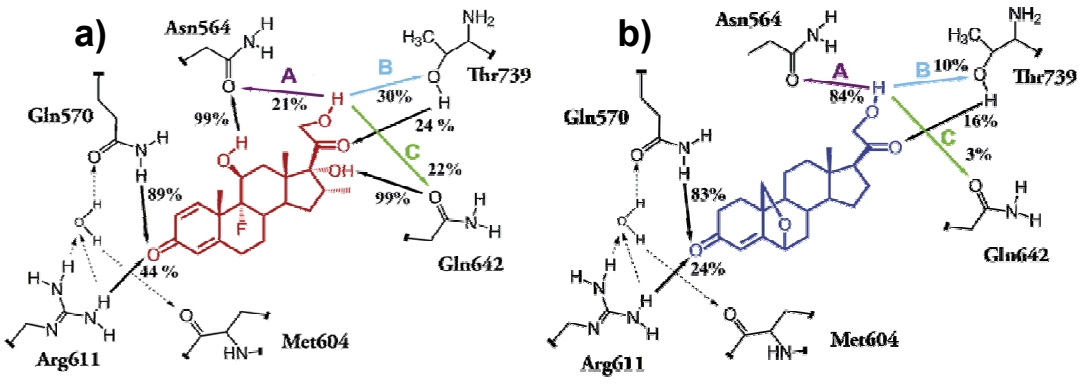


Figura 2.3: Modo de unión de **a)** dexametasona y **b)** 21OH-6,19OP por Alvarez y *col.*

Analizando el modo de unión del agonista 21HS-6,19OP se observa que el esqueleto esteroidal adopta una posición idéntica a la de 21OH-6,19OP y que el grupo hemisuccinato se puede acomodar en una pequeña cavidad del bolsillo. Además se observa que el grupo carboxilato del hemisuccinato forma un puente de hidrógeno estable con el hidroxilo del residuo fenólico de Tyr735 (figura 2.4a).

Comparando la movilidad y la estructura global de la proteína en los complejos GR-LBD-21OH-6,19OP, GR-LBD-21HS-6,19OP y GR-LBD-dexa, se observan cambios sustanciales en la estructura de dos regiones fundamentales del GR-LBD: en el loop H1-H3 de la segunda región de dimerización, y en la hélice H-12 del AF-2 (figura 2.5). Estos desplazamientos podrían ser responsables de la actividad diferencial que tienen ambos ligandos y son producto del modo diferencial de unión que presentan estos tres esteroides. En particular podrían estar asociados a la disposición espacial que adoptan los residuos Asn564, Tyr735, Thr739 y Gln642 en el LBP.

[4] Presman, D.M., Alvarez, L.D., Levi, V., Eduardo, S., Digman, M.A., Martí, M.A., Veleiro, A.S., Burton, G., Pecci, A. *PLoS ONE*, **2010**, 5(10) art. no. e13279.
[5] Veleiro, A.S., Alvarez, L.D., Eduardo, S.L., Burton, G. *ChemMedChem*, **2010**, *5*, 649-659

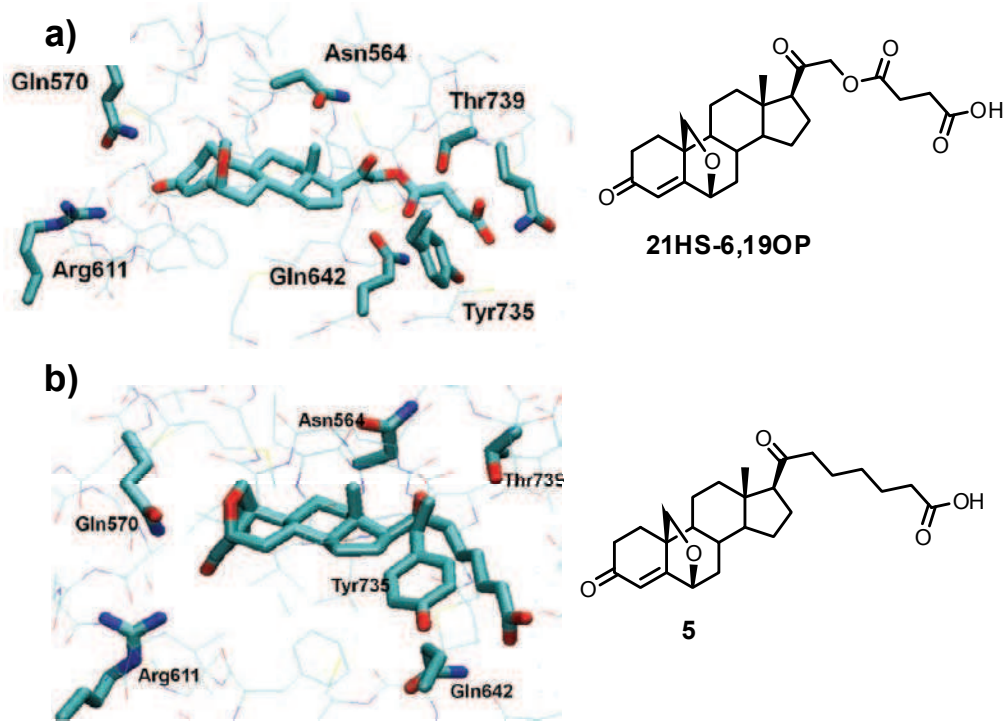


Figura 2.4: a) Modo de unión de 21HS-6,19OP por Alvarez y *col.* **b)** modo de unión del análogo **5** a partir de simulación por dinámica molecular

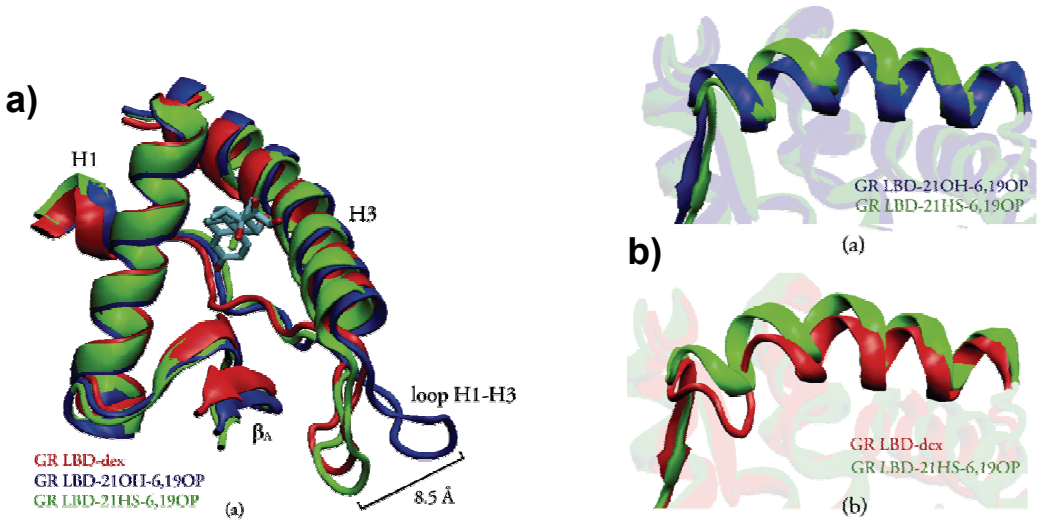


Figura 2.5: a) Superposición de la interfaz de dimerización de los complejos. **b**) superposición de la hélice H12 de los complejos del AF-2 por Alvarez y *col.*

Objetivos

En búsqueda de nuevos análogos no hidrolizables de 21HS-6,19OP que, como se mencionó anteriormente, es un modulador selectivo del GR, se realizó un estudio de dinámica molecular sobre el análogo **5**. Se encontró que este compuesto presentaría un modo de unión muy diferente que el de su compuesto líder. Si bien el esqueleto esteroidal se uniría de modo equivalente, la cadena lateral de **5** adoptaría una conformación curvada dentro de la cavidad y el carboxilato terminal no interaccionaría con la Tyr735, sino que daría un puente hidrógeno con la Gln642 (figura 2.4b, página 30).

Como parte del estudio de las bases moleculares de acción de los glucocorticoides, se propuso como objetivo la síntesis y estudio de la actividad glucocorticoide del análogo **5** con el fin de verificar las predicciones del modelo computacional contribuyendo a su validación.

2.2 Desarrollo de una metodología de alquilación de C-21 en 20-cetopregnanos

En nuestro grupo de investigación, se había desarrollado la síntesis del compuesto **14** como un análogo del neuroesteroide pregnanolona (Figura 2.6).[6] Este compuesto resultaba un precursor apropiado para la preparación de **5** (figura 2.7).

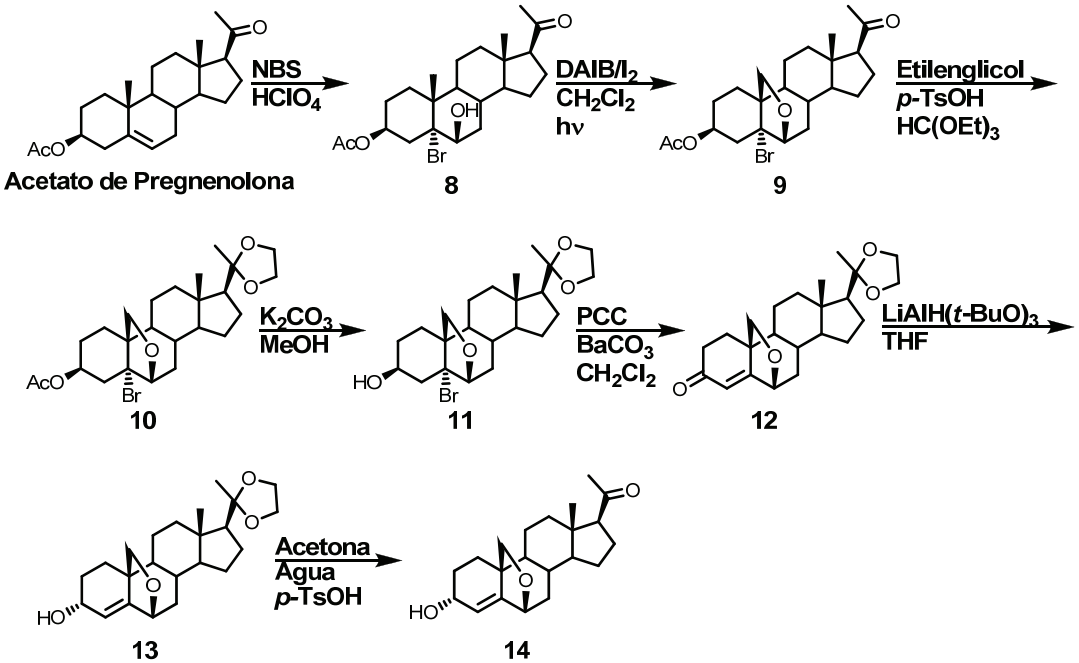


Figura 2.6: Síntesis del precursor **14** por Veleiro y *col.*

[6] Veleiro, A.S., Rosenstein, R.E., Jaliffa, C.O., Grilli, M.L., Speroni, F., Burton, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 343-346

La estrategia de síntesis elegida requería desarrollar una metodología de alquilación para la posición C-21 del compuesto **14** que fuera compatible con los grupos funcionales presentes en la molécula. La dificultad de este emprendimiento radicó en la baja reactividad que presenta dicha posición, y en la moderada labilidad del puente epoxi presente en la molécula. La elección de las condiciones de reacción resultó entonces, una situación de compromiso delicada.

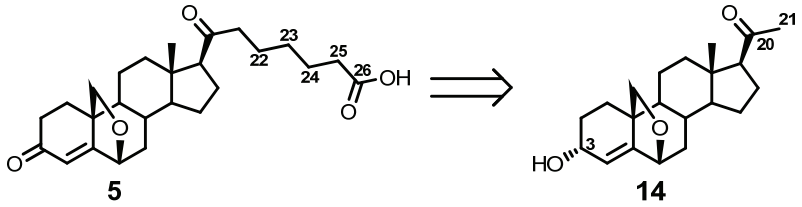


Figura 2.7: Objetivo sintético.

Existen pocos ejemplos de alquilaciones de la posición C-21 en bibliografía. Uno de los más recientes fue reportado por Meingassner y *col.*[7] para la síntesis de triterpenos y consiste en una reacción de Wittig entre el iluro derivado del 21-bromo esteroide con un aldehído (figura 2.8). Si bien esta metodología se informa con buenos rendimientos y en condiciones suaves, esta no es compatible con el sistema Δ^4 presente en el análogo **5**.

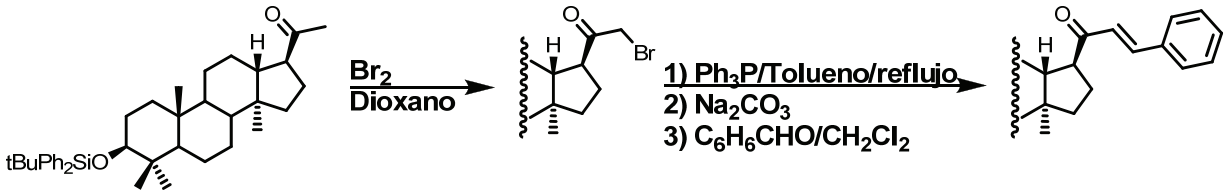


Figura 2.8: Alquilación de C-21 por reacción de Wittig, por Meingassner y *col.*

Alquilación de enolatos

La formación de enlaces carbono-carbono es la base para la construcción de estructuras en síntesis orgánica. Los procesos fundamentales de la formación de dichos enlaces involucran la reacción entre un carbono electrofílico y un carbono nucleofílico. Las reacciones de enolatos como nucleófilos, con un agente alquilante son eficientes y poderosas en la formación de enlaces carbono-carbono.

[7] Scholz, D., Baumann, K., Grassberger, M., Wolff-Winiski, B., Rihs, G., Walter, H., Meingassner, J. G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2004**, *14*, 2983–2986

Woods y *col.* informaron una metodología para la alquilación de C-21 de 17-metilpregnanos (figura 2.9) por reacción del enolato en C-21 con diferentes ioduros de alquilo.[8] En el trabajo se propone que el enolato en la posición C-21 se puede obtener por tratamiento con una base como LDA o tritillitio a temperatura ambiente. También informan que los rendimientos son dependientes de la naturaleza del esteroide de partida y que bajo estas condiciones un exceso de base conduce a la formación de productos di o tri-alquilados.

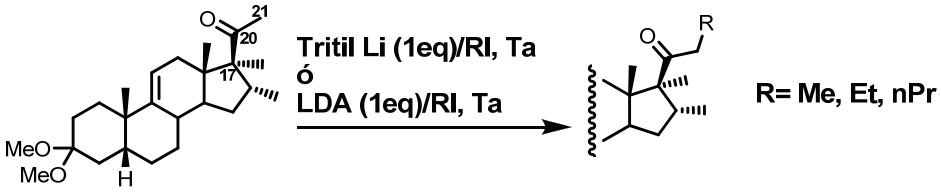
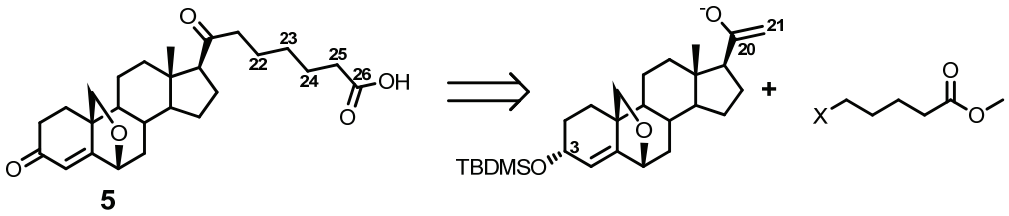


Figura 2.9: 21-Metilación de 17-metilpregnanos por Woods y *col.*

Como primera aproximación a la síntesis del análogo **5**, se propuso que éste se podría obtener de la reacción del enolato cinético del compuesto **14**, debidamente protegido en posición C-3, con el halogenuro de alquilo correspondiente (figura 2.10).



5

Figura 2.10: Metodología de alquilación propuesta.

A diferencia del precursor de Woods, **14** presenta un hidrógeno enolizable en posición 17α, por lo que las condiciones utilizadas por Woods podrían provocar la racemización de C-17. De todos modos, dada la buena reactividad informada, se optó inicialmente por realizar la misma reacción en condiciones típicas para la formación del enolato cinético deseado.

Para el desarrollo de la metodología de alquilación, se utilizaron como modelos el acetato de pregnenolona y el derivado sililado de pregnenolona **15**, de fácil preparación a partir de pregnenolona comercial (figura 2.11).[9]

[8] Cairns, J., Logan, R. T., McGarry, G., Roy, R. G., Stevenson, M., Woods, G., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1981**, 2306-2316

[9] Phillipou, G., Bigham, D.A., Seamark, R.F., *Steroids*, **1975**, *26*, 516-524

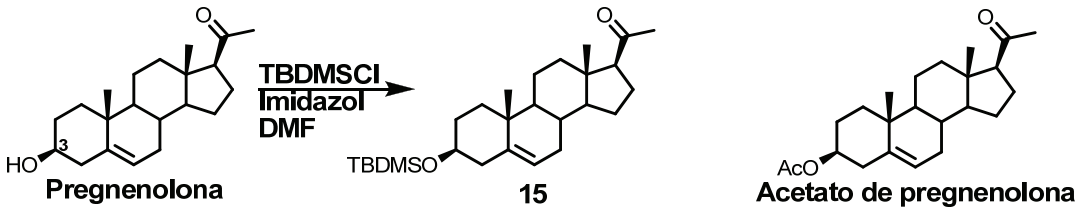


Figura 2.11: Esteroides modelo utilizados.

Los intentos de alquilación de **15** con LDA a -78ºC en THF y una variedad de halogenuros primarios (5-bromovalerato de metilo, 1-bromopropano, ioduro de metilo, 1-iodooctano) resultaron infructuosos. Los ensayos se realizaron con 1,1 a 5 equivalentes de base y 1,1 a 40 equivalentes de halogenuro. Tampoco se obtuvieron resultados positivos con el agregado de sales de plata. Cuando la reacción se probó sobre acetato de pregnenolona, se obtuvo un producto de mayor polaridad en ccd, con el peso molecular del producto deseado (EM 70eV). Si bien se había considerado que la menor acidez de los hidrógenos α del acetato comparados con los H-21 otorgaría a la reacción la regioselectividad requerida, el espectro de RMN ^{1}H mostró la incorporación del valerato exclusivamente en el acetato en posición 3. Además, la hidrólisis de producto obtenido rindió pregnenolona indicando que la reacción había ocurrido con la regioselectividad opuesta a la esperada dando el derivado **16** (figura 2.12). Este resultado indicaba por un lado que en estas condiciones la posición C-21 era mucho menos reactiva de lo esperado y por otro, que el procedimiento experimental utilizado era metodológicamente correcto.

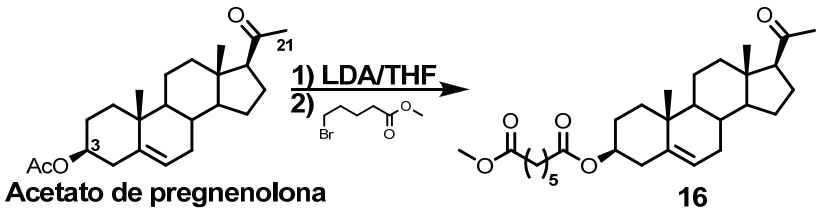


Figura 2.12: Intento de alquilación de C-21.

Alquilación de sililenoléteres

Teniendo en cuenta que a diferencia de los enolatos de litio los sililenoléteres son estables y en presencia de una gran variedad de catalizadores producen exclusivamente el producto de mono-C-alquilación, se decidió probar la alquilación de **15** usando esta metodología. Dado que la formación de un sililenoléter en posición 21 seguida por tratamiento con peroxiácidos es la metodología clásica para la obtención de derivados 21-hidroxilados, se procedió a atrapar el

enolato de **15**, como su trimetilsililéter derivado **17** (Figura 2.13). Si bien esta reacción no estaba descripta para el derivado **17**, se encuentran numerosos ejemplos descriptos en bibliografía.[10]

El enolato cinético se obtuvo por tratamiento de **15** con LDA en THF a -78ºC durante 20 minutos y se atrapó por agregado de clorotrimetilsilano y posterior calentamiento hasta temperatura ambiente. Esta reacción procedió con 100% de conversión y sin racemización de la posición 17 (determinado por RMN ^{1}H). El producto obtenido se caracterizó por RMN 1D y 2D. Comparando los espectros de RMN ^{1}H de **15** y **17**, no se observaron cambios en las señales correspondientes a los anillos A y B, poniéndose en evidencia la desaparición del singulete a 2,11 ppm correspondiente al metilo-21 de **15**. La presencia en el espectro de **17** de dos dobletes a 4,09 y 4,05 ppm con un J = 0,7 Hz (típico J geminal de alqueno terminal) asignados a los H-21, que correlacionaban en el espectro HSQC con un carbono a 89,60 ppm resultaron las señales diagnósticas correspondientes a la presencia del enoléter. Esto se complementaba con la correlación observada en el espectro HMBC entre los H-21 y C-20 que se encuentra desplazado a campos altos, resonando a 160,11 ppm.

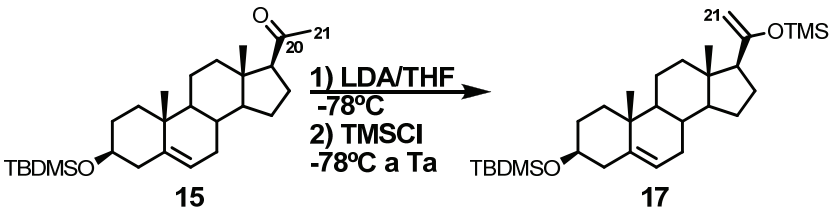


Figura 2.13: sililenoléter **17**.

En bibliografía se informa que la reacción de alquilación entre sililenoléteres y ioduros primarios es exitosamente catalizada por trifluoroacetato de plata (figura 2.14).[11] Siguiendo el protocolo de Boukouvalas y *col.* se ensayó sin éxito la alquilación de **17** con 1-iodooctano (1,1 eq), catalizado por esa sal de plata (1,1 eq) en diclorometano a temperatura ambiente.

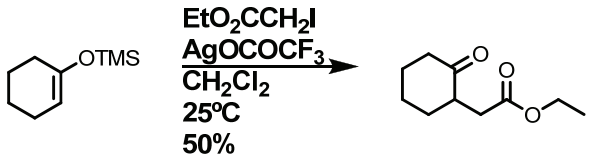


Figura 2.14: Alquilación de sililenoléteres por Boukouvalas y *col.*

[10] Kirk, D. N., Miller, B. W., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1980**, 2819-2829.
[11] Jefford, C.W., Sledeski, A.W., Lelandais, P., Boukouvalas, J., *Tetrahedron Lett.,* **1992**, *33*, 1855-1858.

Reacción de Mukaiyama

La condensación aldólica constituye uno de los procesos fundamentales para la construcción de enlaces carbono-carbono en síntesis orgánica. En particular, la reacción de Mukaiyama es una poderosa herramienta para la síntesis de productos complejos, dado que permite la formación de un enlace carbono-carbono en condiciones suaves, evitando productos de polialquilación. Con el sililenoléter en mano, se decidió intentar la alquilación de C-21 a través de una condensación aldólica de Mukaiyama (figura 2.15).

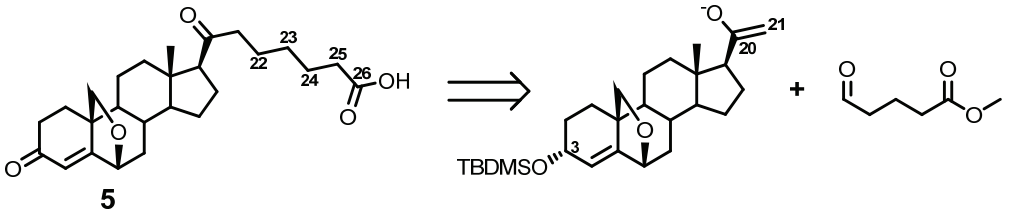


Figura 2.15: Metodología de alquilación propuesta.

En una primera etapa se ensayó la reacción de Mukaiyama entre el sililenoléter modelo **17** y propanal (como aldehído modelo) en condiciones clásicas, utilizando 1,1 equivalentes de $ZnCl_2$ o $TiCl_4$ como catalizadores en diclorometano a -78ºC. En esas condiciones se observó que el sililenoléter se hidrolizaba rápidamente sin obtenerse producto de alquilación. En cambio, al utilizar 1,1 equivalentes de trifluoruro de boro-eterato en iguales condiciones se obtuvo el producto de condensación deseado **18** al cabo de 30 minutos de reacción con un 30% de rendimiento, como una mezcla de epímeros en C-22 (figura 2.16), recuperándose parcialmente el esteroide de partida. La estructura del producto se corroboró por espectrometría de masa y RMN 1D y 2D.

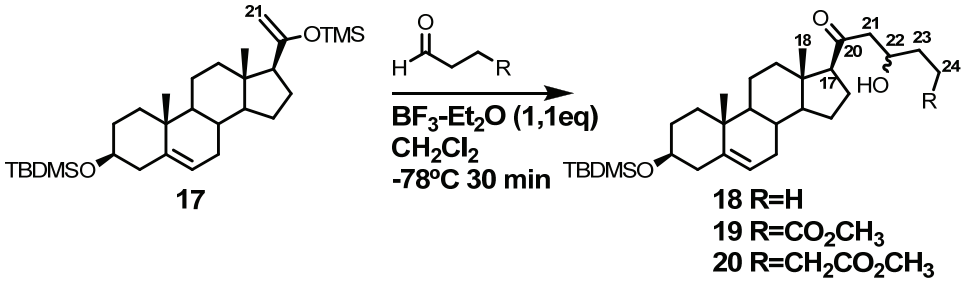


Figura 2.16: Reacción de Mukaiyama del sililenoléter de **15**.

El paso siguiente fue ensayar la reacción sobre el sililenoléter **17** con los oxoésteres **21** y **22** de cuatro y cinco átomos de carbono respectivamente, siendo el de cinco el adecuado para la síntesis del análogo **5** buscado. Estos oxoésteres se sintetizaron a partir de las lactonas

comerciales, de bajo costo, siguiendo una técnica sencilla descripta por Grayson y *col.* (figura 2.17).[12]

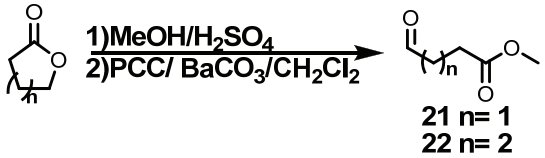


Figura 2.17: Síntesis de los oxoésteres según procedimiento de Grayson y *col.*

Al hacer reaccionar el sililenoléter **17** con los oxoésteres **21** y **22** en presencia de trifluoruro de boro-eterato en diclorometano a -78ºC se obtuvieron los productos **19** y **20** respectivamente (figura 2.16) con un 30% de rendimiento como una mezcla de epímeros en relación 7:3. El compuesto **20** presenta en su cadena lateral las funcionalidades 20-ceto y 26-carboxilo, al igual que el análogo **5** deseado. Ambos compuestos fueron caracterizados completamente. En el espectro de RMN ^{1}H de **20** no se observan grandes variaciones con respecto al esteroide de partida **15**: la orientación β de la cadena lateral en C-17 se evidencia por el desplazamiento químico del metilo angular (H-18) que resuena a 0,62 ppm y del H-17 que se observa como un triplete con J = 9,9 Hz a 2,47 ppm. El espectro mostró la presencia de una funcionalidad O-metilo a 3,66 ppm con correlación HMBC con el carbono del éster a 174,03 ppm. En el epímero mayoritario de **20** se observan los protones del metileno de C-21, que no son equivalentes debido a la presencia del carbono asimétrico en posición 22. Estos se ven como un doble doblete a 2,55 ppm (J = 17,8 Hz (geminal) y 2,6 Hz (vecinal)) y un multiplete a 2,48 ppm; ambos muestran correlación en el espectro HMBC con C-20 a 212,93 ppm. También se observa correlación en el espectro COSY con un multiplete a 4,04 ppm correspondiente al H-22. La presencia de la cadena lateral se evidencia por la correlación (espectro COSY) del H-22 con los H-23 (1,52 y 1,43 ppm), la de éstos con los H-24 (1,78 y 1,69 ppm) y de los H-24 con los H-25 (2,35 ppm). Estos últimos además correlacionan en el espectro HMBC con el C-26 del éster a 174,03 ppm. El compuesto **19** fue caracterizado de la misma forma.

Con el objetivo de mejorar el rendimiento de la reacción, se ensayaron los ácidos de Lewis $Ti(iPrO)_4$, $SnCl_4$, $AlCl_3$ y $ZnBr_2$, pero en todos los casos se observó la formación del producto de hidrólisis del sililenoléter, sin obtenerse el producto de condensación.

Cabe destacar que el esteroide **19** resulta interesante por ser un precursor para la síntesis de análogos de ligandos de los receptores nucleares LXR y DAF-12 (figura 2.18). El receptor nuclear LXR regula procesos involucrados en el catabolismo y excreción del colesterol en humanos, uno de los mayores determinantes de la mortalidad en ancianos. El LXR tiene amplia similitud con el DAF-12, receptor nuclear presente en el nematodo *C. elegans* que regula la

[12] Duffy, M.G., Grayson, D.H., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 1555-1563.

respuesta adoptada por este organismo frente a condiciones desfavorables, como sobrepoblación o falta de nutrientes, pudiendo el organismo entrar en un estado en el que evita el crecimiento y la reproducción. El desarrollo de nuevos ligandos de los receptores nucleares LXR y DAF-12 ayudaría al estudio de las bases moleculares de acción de los mismos, con el objetivo de lograr un conocimiento más amplio de los mecanismos involucrados en el proceso de envejecimiento.[13,14]

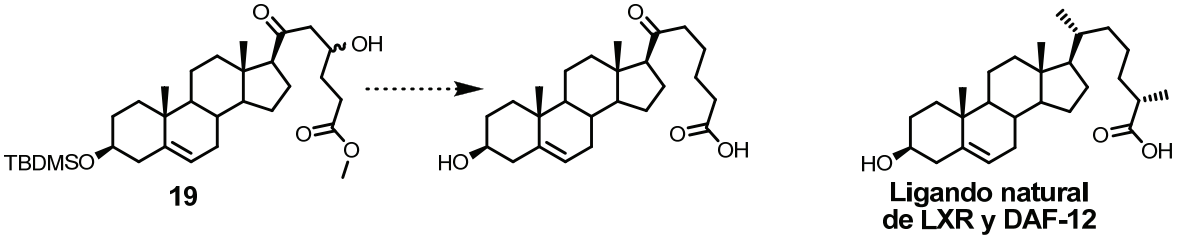


Figura 2.18: Síntesis de análogos de ligandos de los RNs LXR y DAF-12 a partir del esteroide **19**.

2.3 Alquilación en C-21 de 6,19-epoxipregnenolona (14)

Una vez encontradas las condiciones de la reacción de Mukaiyama sobre el esteroide modelo, el paso siguiente consistió en realizar la reacción aldólica de Mukaiyama sobre el esteroide **23**. Para ello se sintetizó el esteroide **14** siguiendo el procedimiento de la Figura 2.6 (página 31), y se protegió la función 3α-OH con *t*-butildimetilclorosilano e imidazol en DMF, con un rendimiento del 90% (figura 2.19). Luego se preparó el enolato cinético con LDA a -78ºC y se lo atrapó con clorotrimetilsilano en las condiciones utilizadas con **15**. El sililenoléter **24** se caracterizó por RMN 1D y 2D; comparando el espectro de RMN ^{1}H de **24** con el de **23**, no se observan cambios en las señales correspondientes al anillo A y al puente epóxido pero se observa la desaparición del singulete a 2,11 ppm correspondiente al metilo C-21 de **23**. La presencia del enoléter en C-21 de **24** se evidenció por los dos dobletes a 4,08 y 4,03 ppm con un J = 1,0 Hz (típico J geminal de alqueno terminal) que correlacionaban en el espectro HSQC con un carbono a 89,72 ppm (C-21). Los H-21 correlacionaban en el espectro HMBC con C-20 que se observó a 159,97 ppm. Además, el protón H-21a a 4,08 ppm correlacionaba en el espectro NOESY con los metilos del trimetilisililéter a 0,19 ppm, indicando que se encontrarían en *cis*. Por otro lado, el protón H_b-21 a 4,03 ppm correlacionaba en el espectro NOESY con el metilo angular (H-18) a 0,66 ppm, indicando una geometría *trans* al grupo trimetilsililo.

[13] Mooijaart, S.P., Kuningas, M., Westendorp, R.G., Houwing-Duistermaat, J.J., Slagboom, P.E., Rensen, P.C., van Heemst, D.J., Gerontol. A., *Biol. Sci. Med. Sci.* **2007**, *62*, 343-349.
[14] Martín, R, Entchev, E.V., Kurzchalia, T.V., Knolker, H., *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 739-750.

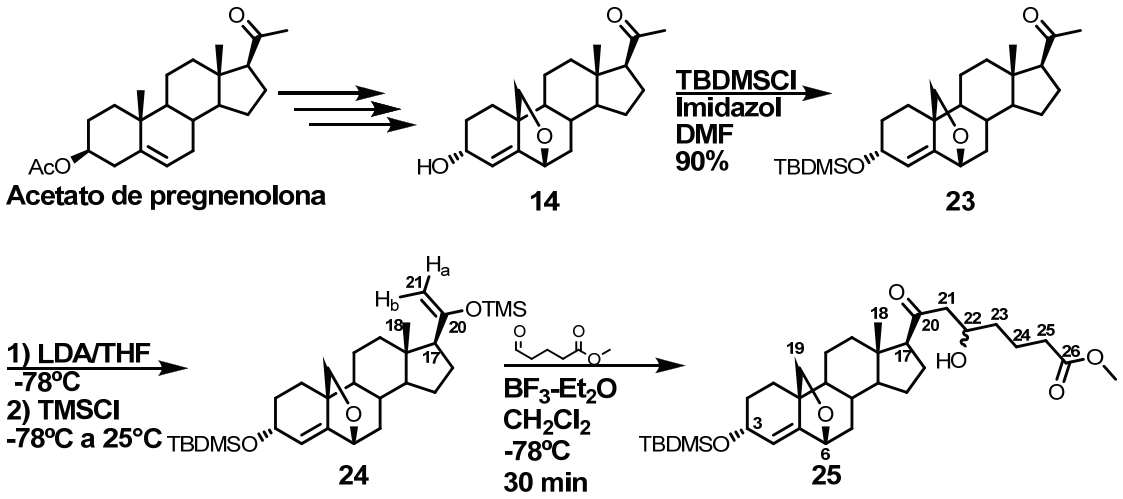


Figura 2.19: Alquilación de **14**.

El sililenoléter **24**, se condensó con el oxoéster **22** (2,5 equivalentes) en iguales condiciones que las utilizadas para **15** obteniendo el compuesto **25**. El producto de la condensación aldólica se obtuvo como una mezcla de epímeros en C-22 en relación 77:23, calculado por RMN ^{1}H, sin embargo, en el mejor de los casos el rendimiento fue de 30% recuperándose un 45% de la cetona de partida (figura 2.19). El producto fue caracterizado completamente por métodos espectroscópicos, el espectro de masa (ESI+) mostró los iones $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ a m/z 597,3591 y 575,3762 respectivamente (errores de 1,0 y 1,4 ppm). El espectro de RMN ^{1}H de **25** comparado con **23** no presenta diferencias importantes en cuanto a forma y multiplicidad de las señales del núcleo esteroidal: la orientación β de la cadena lateral de C-17 se evidencia por el metilo angular (H-18) que resuena a 0,67 ppm y el H-17 que se observa como un triplete con J = 9,0 Hz a 2,50 ppm. El puente epóxido se evidencia por las señales de los H-19 a 4,02 y 3,28 ppm como dos dobletes con J = 7,8 Hz (geminal) y la señal del H-6 como un doblete con J = 4,7 Hz a 4,41 ppm acoplado con el H-7β.

En el epímero mayoritario de **25** los protones del metileno de posición 21 se observaron como un doble doblete a 2,55 ppm ($J_{geminal}$ = 17,8 Hz y $J_{vecinal}$ = 2,6 Hz) y un multiplete a 2,45 ppm que correlacionaban en el espectro HMBC con el carbonilo de C-20 a 212,77 ppm. La presencia de la cadena lateral se evidenció por las correlaciones en el espectro COSY de los H-21 con un multiplete a 4,04 ppm correspondiente al H-22 y las correlaciones subsiguientes de H-22 con H-23 (1,53 y 1,43 ppm), H-23 con H-24 (1,78 y 1,69 ppm) y estos con los H-25 (2,34 ppm). Los H-25 además correlacionaban en el espectro HMBC con el carbonilo del éster (C-26) a 174,03 ppm y éste con los hidrógenos de un O-metilo a 3,66 ppm.

Optimización de la reacción de Mukaiyama

Si bien se logró obtener el compuesto deseado **25**, el rendimiento de la reacción no era bueno y la reproducibilidad era baja por lo cual se procedió a optimizar el procedimiento. Recordemos que el protocolo original para la formación del sililenoléter consistía en disolver el esteroide en THF, enfriar a -78ºC, y agregar una solución de LDA dejando reaccionar por 20 minutos.[15] Luego se agregaba el clorotrimetilsilano, se dejaba llegar a temperatura ambiente y la reacción se cortaba con el agregado de trietilamina 1% en THF. La fase orgánica de lavaba con solución saturada de bicarbonato de sodio, se secaba y evaporaba. El protocolo típico para la reacción aldólica consistía en disolver el sililenoléter en diclorometano, enfriar a -78ºC, agregar el aldehído y el ácido de Lewis. Luego de 30 minutos, la reacción se volcaba sobre solución de bicarbonato de sodio y se extraía.[16]

Respecto a la formación del sililenoléter **24**, se advirtió que éste se hidrolizaba con mucha facilidad. Esto se puso en evidencia haciendo un espectro de RMN ^{1}H de la reacción antes y después del tratamiento de aislamiento. Se tomó una pequeña alícuota de la reacción, se colocó en un tubo de RMN provisto de un septum y se evaporó el THF aplicando vacío. Luego se agregó cloroformo deuterado y se realizó un RMN ^{1}H observándose que la reacción ocurrió con conversión total, sin embargo, luego del aislamiento el espectro RMN ^{1}H mostró que el sililenoléter se había hidrolizado parcialmente. Se realizó el mismo ensayo pero omitiendo el agregado de TEA 1% en THF, con iguales resultados.

Se buscó entonces optimizar el proceso de aislamiento evitando el agregado de agua para prevenir la hidrólisis del producto. Se observó que en el tubo de RMN de la alícuota de reacción tomada antes del aislamiento había ocurrido la precipitación masiva de un sólido blanco, correspondiente a las sales generadas en el medio de reacción insolubles en cloroformo, y que el espectro era muy limpio, sin señales de diisopropilamina, ni de clorotrimetilsilano y subproductos relacionados. Se decidió entonces aprovechar la precipitación selectiva de los subproductos de reacción por agregado de algún solvente poco polar. Dado que la reacción aldólica se lleva a cabo en diclorometano, primero se ensayó la precipitación con ese solvente.

Se procedió entonces a preparar el sililenoléter modelo **17** y como aislamiento alternativo se evaporó el THF con una corriente de nitrógeno, se indujo la precipitación de los subproductos por agregado de cloruro de metileno y se los separó por filtración, corroborando por RMN ^{1}H que el sililenoléter **17** no se hubiera hidrolizado. Sin embargo cuando llevó a cabo la condensación aldólica con la solución obtenida, se produjo la hidrólisis total de **17**. Esto indicaba que la filtración de la solución en diclorometano no era suficiente para quitar las interferencias del medio.

[15] Kirk, D. N., Miller, B. W., *J. C. S. Perkin 1*, **1980**, 2819-2829
[16] Mukaiyama, T., Banno, K., Narasaka, K., *JACS*, **1974**, 7503-7509

Se repitió el procedimiento anterior, pero induciendo la precipitación con cloroformo. La solución procedente de la filtración se dividió en dos partes: a la primera se le evaporó el cloroformo, se re-disolvió el enoléter en diclorometano y previo control por RMN ^{1}H, se llevó a cabo la condensación aldólica obteniéndose el producto deseado con 47% de rendimiento. Sobre la segunda mitad, previo control por RMN ^{1}H, se realizó la condensación aldólica en cloroformo obteniéndose iguales resultados que con diclorometano. Por ende se adoptó la precipitación por cloroformo, seguido de la condensación aldólica en este mismo solvente como protocolo.

Una vez ajustadas las condiciones de reacción con el esteroide modelo **15**, el protocolo se aplicó al esteroide **23** obteniendo en el mejor de los casos un 55% del producto deseado **25** y recuperando un 15% de esteroide de partida. En cuanto a la condensación aldólica, se comprobó que tiempos más largos de reacción no mejoraban la conversión y se observó que el sililenoéter reaccionaba parcialmente y el resto se hidrolizaba rápidamente. Ensayos variando la cantidad de aldehído, mostraron los mejores resultados con 2,5 equivalentes.

El procedimiento "one-pot" desarrollado para la reacción de Mukaiyama tiene la ventaja de acortar considerablemente los tiempos de trabajo además de mejorar el rendimiento y el grado de conversión; su excelente reproducibilidad permitió escalar la reacción hasta 800 mg sin merma del rendimiento.

2.4 Síntesis del análogo 5

Para obtener el análogo **5** a partir del compuesto **25** solo restaba remover el hidroxilo en C-22, desproteger el hidroxilo en C-3 y el carboxilo en C-26, y oxidar la posición C-3. Si bien **25** se obtenía de la reacción de condensación de Mukaiyama como una mezcla de epímeros en C-22, dado que el hidroxilo en esa posición se debe eliminar se trabajó con la mezcla (figura 2.20).

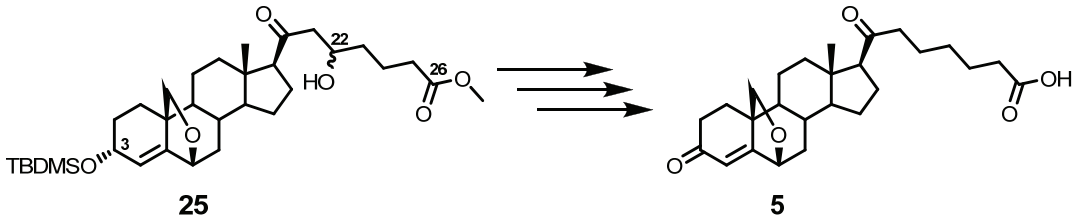


Figura 2.20: Síntesis del análogo **5** a partir de **25**.

Desoxigenación en posición 22

Para la desoxigenación de C-22 primero se intentó una desoxigenación radicalaria de Barton-McCombie (figura 2.21).[17] El primer paso de la reacción consiste en la formación de un xantato a partir del alcohol. Luego un radical de trialquilestaño abstrae el grupo xantato, obteniéndose un radical alquilo y el xantato de trialquilestaño. El radical alquilo formado abstrae a su vez un átomo de hidrógeno de una molécula nueva de hidruro de trialquilestaño, formando el producto deseado y un nuevo radical de trialquilestaño disponible para la propagación. Alternativamente puede utilizarse difenilsilano en vez del hidruro de estaño, lo cual facilita el aislamiento y purificación de los productos.[18]

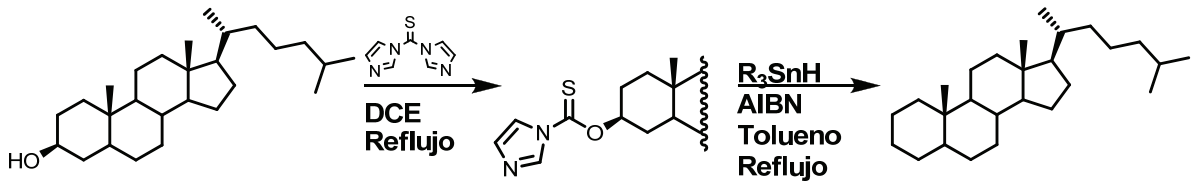


Figura 2.21: Reacción de Barton-McCombie por Wang y *col.*

Cuando se hizo reaccionar el compuesto **25** con tiocarbonilimidazol en dicloroetano a reflujo, se obtuvo una mezcla de productos. En el espectro RMN ^{1}H de la mezcla se observó la formación del xantato en baja proporción, y mayormente el producto de β-eliminación favorecido por conjugarse con el carbonilo de C-20. Luego de la reacción radicalaria con peróxido de lauroilo como iniciador y difenilsilano se obtuvo el producto desoxigenado con muy bajo rendimiento. Por esta razón se descartó esta metodología.

Como procedimiento alternativo se eligió una secuencia de deshidratación-hidrogenación. Primero se ensayó la deshidratación con yodo-trifenilfosfina (figura 2.22), un reactivo informado como suave, compatible con gran número de grupos funcionales y con buenos rendimientos para alcoholes secundarios y terciarios.[19] Cuando se intentó esta reacción sobre el compuesto **25** se obtuvo una mezcla de productos, principalmente derivados de la apertura del puente epoxi según se evidenció por RMN ^{1}H.

[17] Clive, D.L. J., Wang, J., *J. Org. Chem.,* **2002***, 67*, 1192-1198.

[18] Barton, D.H.R.; Jang, D.O.; Jaszberenyi, J.Cs. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 7193-7214.
Lopez, R.M.; Hays, D.S.; Fu, G.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119,* 6949-6950

[19] Alvarez-Manzaneda, E.J., Chahboun, R., Cabrera Torres, E., Alvarez, E., Alvarez-Manzaneda, R., Haidour, A., Ramos, J., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 4453-4455

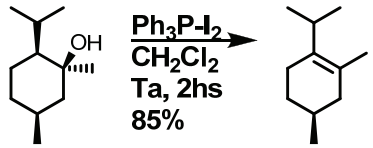


Figura 2.22: Deshidratación por reactivo de yodo-trifenilfosfina por Ramos y *col.*

Dado que la deshidratación del hidroxilo en C-22 de **25** debería estar favorecida por la conjugación con el carbonilo de C-20 y la libertad conformacional de la cadena, se ensayó la eliminación en condiciones próticas. Se probó ácido clorhídrico/THF bajo reflujo, y por calentamiento con microondas en tubo cerrado (50ºC, 300 W, 250 psi, 15 min). También se intentó con ácido *p*-toluensulfónico en benceno, pero en todos los casos sólo se obtuvo el producto de desprotección en C-3 y C-26 sin deshidratación.

Por último se ensayó la clásica reacción de triflación, con anhídrido tríflico en piridina a 0ºC durante una hora, obteniéndose el 22-triflato (figura 2.23) que se trató *in situ* con un exceso de DBU, produciéndose la eliminación "one-pot" con un 63% de rendimiento después de recuperarse un 23% de **25** sin reaccionar. También se probó la vía alternativa por formación del mesilato en C-22, encontrándose mejores resultados en la triflación. El producto **26** obtenido presentó en su espectro de masa (ESI+) el ion $[M+Na]^+$ a m/z 579,3349 (error de 1,9 ppm). En el espectro de masa a 70eV se observó un fragmento intenso a m/z 155 que podría corresponderse con el fragmento de fórmula $C_8H_{11}O_3^+$, posiblemente de la cadena lateral. El compuesto también se caracterizó por RMN 1D y 2D. El espectro de RMN ^1H mostró tres protones olefínicos, dos de ellos a 6,77 y 6,15 ppm correspondientes a H-21 y H-22 respectivamente y el restante correspondiente a H-4. La señal del H-21 se observó como un doble triplete con J = 15,6 Hz (*trans*) con H-22 y J = 1,5 con H-23. H-22 se observó como un doble triplete con J = 15,6 Hz con H-21 y J = 6,9 Hz con H-23. Además, la señal de H-17 estaba más desprotegida que en **25**, a 2,71 ppm. El espectro de RMN ^{13}C mostró cuatro carbonos de doble enlace dos de ellos a 144,71 y 131,30 ppm correspondientes a C-22 y C-21, además C-20 se encuentra más protegido que en **25**, a 200,19 ppm, por la conjugación con el doble enlace.

La hidrogenación regioselectiva del doble enlace en C-21 se realizó en acetato de etilo con un 20% p/p de paladio 10% sobre carbono a 1 atmósfera de presión de hidrógeno por 45 minutos. Debido al alto impedimento estérico que presenta el doble enlace en C-4, éste no se reduce a tiempos cortos y baja presión de hidrógeno. El producto **27** obtenido mostró en su espectro de masa (ESI+) el ion $[M+Na]^+$ a m/z 581,3649 (error de 2,7 ppm). En el espectro de masa a 70eV se observó un pico intenso a m/z 157 que podría corresponderse con el fragmento de fórmula $C_8H_{13}O_3^+$, posiblemente de la cadena lateral. El compuesto también se caracterizó por RMN 1D y 2D. Comparando los espectros de RMN ^1H de **27** y **26**, no se observan cambios en las señales correspondientes al núcleo esteroidal y se observa la desaparición de las señales

correspondientes al doble enlace en C-21 de **26**. Además la señal de H-17 se encuentra más protegida a 2,48 ppm. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron solo dos carbonos de doble enlace correspondientes a C-4 y C-5, y el desplazamiento de C-20 a campos bajos (211,26 ppm) por la pérdida conjugación del doble enlace.

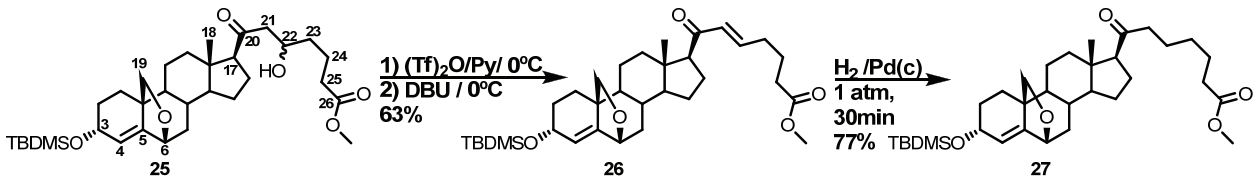


Figura 2.23: Deshidratación e hidrogenación de **25.**

Desprotección y oxidación

Con el compuesto **27** en mano, solo restaba la hidrólisis del éster en C-26, la desprotección del éter de TBDMS en C-3 y su oxidación. Knölker y *col.* informan que la desprotección de la cadena lateral puede realizarse en medio básico acuoso (figura 2.24).[20] Dado que el sistema Δ^4, 3-ceto no es compatible con medios básicos fuertes, se debía desproteger el éster antes de realizar la oxidación.

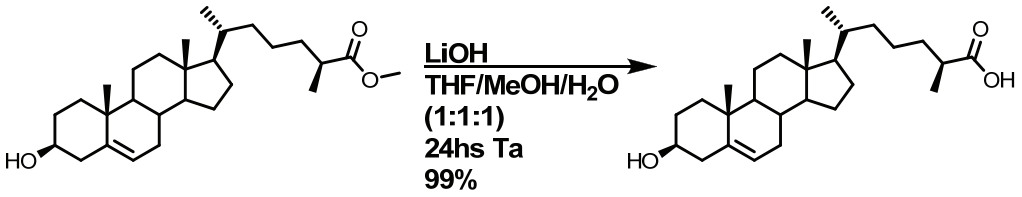


Figura 2.24: Desprotección en cadena lateral por Knölker y *col.*

Dado que el *t*-butildimetilsililéter en C-3 se hidroliza en medio ácido, **27** se trató con ácido clorhídrico en THF. Al cabo de 2 horas se observó por ccd la desaparición del material de partida y la formación de dos productos de menor polaridad, el mayor polar correspondiente al compuesto desprotegido en C-3 y metilado en C-26 y uno muy polar con forma de mancha alargada típica de ácidos carboxílicos correspondiente al producto totalmente desprotegido. Entonces se llevó la reacción a pH 14 con hidróxido de sodio al 50% y al cabo de 2 horas se completó la hidrólisis de éster. De esta manera se realizaron ambas desprotecciones en un solo paso, con un 65% de rendimiento (figura 2.25). Comparando el espectro de RMN ^1H de **28** con el de **27** se observó la desaparición de las señales correspondientes a los grupos protectores, pero no se observaron grandes diferencias en cuanto a forma y multiplicidad de las señales del núcleo

[20] Martin, R., Entchev, E.V., Däbritz, F., Kurzchalia, T.V., Knölker, H., *Eur. J. Org. Chem.,* **2009**, 3703-3714.

esteroidal. El espectro de masa (ESI+) mostró el ion [M+Na] a m/z 453,2613 (error 0,4 ppm). El espectro IR de **28** mostró una señal ancha entre 3700 y 2500 cm^{-1} característica del grupo carboxilo y dos picos de carbonilo a 1732 y 1699 cm^{-1} correspondientes a los carbonilos en posiciones 20 y 26 respectivamente.

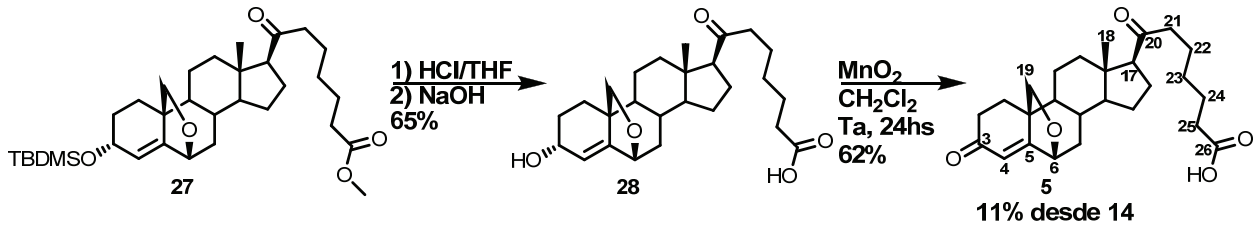


Figura 2.25: Desprotección y oxidación de **27**

El último paso era la oxidación del hidroxilo en C-3. Como ésta es una posición alílica, se decidió usar dióxido de manganeso como oxidante en vez de sales de cromo (figura 2.26). La reacción transcurrió de manera muy suave y limpia en 24 hs y se obtuvo el producto deseado **5**, con un 11% de rendimiento a partir de **14**, en 6 pasos de reacción. El espectro de masa (ESI+) de **5** mostró el ion [M+Na] a m/z 451,2450 (error 1,2 ppm) y el espectro infrarrojo mostró una señal ancha entre 3800 y 2500 cm^{-1} característica del grupo carboxilo y tres señales de carbonilo a 1735, 1699 y 1671 cm^{-1}. El espectro de RMN ^{13}C mostró 3 señales de carbonilo a 210,93, 198,85 y 178,25 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20, C-3 y C-26 respectivamente y dos carbonos de doble enlace a 171,82 y 114,99 ppm correspondientes a C-5 y C-4. En el espectro de RMN ^{1}H se observó un singulete a 5,82 ppm correspondiente al protón vinílico de C-4. La orientación β de la cadena lateral de C-17 se evidenció por la señal del metilo angular (H-18) a 0,69 ppm y del H-17 (triplete, J = 9,1 Hz) a 2,50 ppm. El puente epóxido se evidenció por las señales de C-19 a 4,20 y 3,51 ppm como dos dobletes con J = 8,2 Hz (geminal) y la señal del H-6 como un doblete a 4,70 ppm con J = 5,2 Hz (acoplado con H-7β). La estructura se confirmó a partir de las correlaciones de los espectros COSY, HSQC y HMBC.

2.5 Resumen

En resumen, se sintetizó el esteroide **5** análogo no hidrolizable del 21HS,6-19OP, a partir del esteroide **14** con un rendimiento del 11%, aplicando una reacción de Mukaiyama y se desarrolló una técnica "one-pot" para dicha reacción. Los estudios de actividad biológica de este análogo se presentan en el capítulo 4.

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS DE ANÁLOGOS FLEXIBLES DE ESTEROIDES NEUROACTIVOS Y HORMONAS

3.1 Introducción

En este capítulo se describen las estrategias sintéticas empleadas para la obtención de nuevos A-homoesteroides análogos de allopregnanolona (compuestos **1**-**4**, figura 3.1) y de progesterona (compuestos **6** y **7**, figura 3.2). Además se incluye un estudio de la reacción de reordenamiento catiónico de ciclopropanos, paso clave para la obtención de los homoesteroides. Los resultados de actividad biológica de estos compuestos y el análisis de la relación estructura actividad se presentan en el Capítulo 4

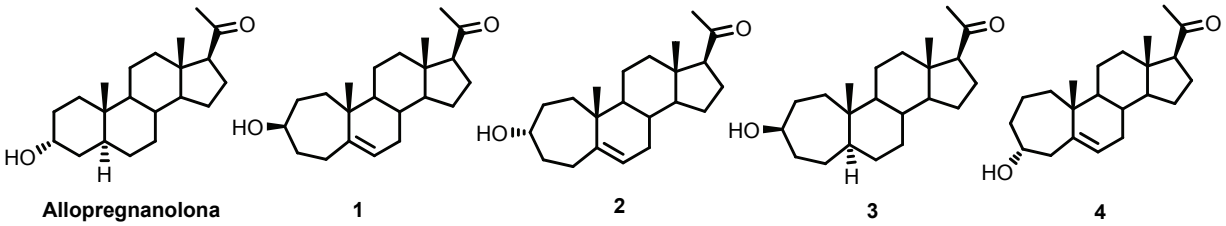


Figura 3.1: Estructuras del neuroesteroide natural allopregnanolona y de los análogos flexibles **1**-**4** sintetizados en esta tesis.

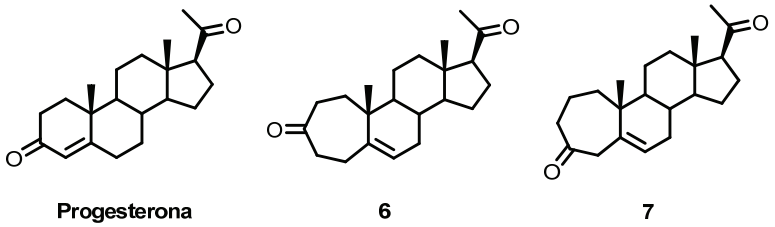


Figura 3.2: Estructuras del progestágeno natural progesterona y de los A-homo análogos **6** y **7** sintetizados en esta tesis.

3.2 Antecedentes

A-homoesteroides heterocíclicos

Los A-homoesteroides constituyen un grupo de compuestos poco estudiado desde el punto de vista de su actividad, existen escasos ejemplos de A-homoesteroides bioactivos en bibliografía y en su gran mayoría se trata de esteroides heterocíclicos. Uno de los ejemplos más destacados son los A-homo-aza-androstanos, con un anillo A ε-lactámico, que han resultado ser excelentes plataformas para la unión de mostazas nitrogenadas, con baja toxicidad (figura 3.3).[1] Algunos de estos compuestos han alcanzado etapas preclínicas para el tratamiento de carcinoma de pulmón. Otro ejemplo interesante de A-homosteroides heterocíclicos es un A-homo-tio-

[1] Athanassiou, A.E., *J. B.U.ON.*, **2004**, *9*, 275-282

andrógeno desarrollado por Wolff con una actividad *in vitro* similar a la de testosterona (figura 3.3).[2]

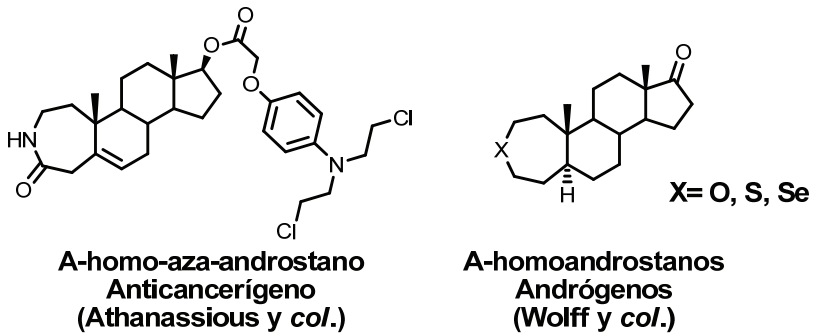


Figura 3.3: A-homoesteroides heterocíclicos con actividad biológica

Síntesis de A-homoesteroides con diazoalcanos

Solo se encuentran dos síntesis de A-homoesteroides descriptas en bibliografía, y ambas utilizan diazoalcanos para la homologación de cetonas. La reacción entre ciclohexanona y un diazoalcano se muestra en la figura 3.4, ésta consiste en el ataque nucleofílico del diazoalcano catalizado por un ácido de Lewis para dar un intermediario tetraédrico, que sufre luego un reordenamiento tipo pinacólico desplazando nitrógeno. [3] La desventaja de esta reacción es la falta de regiocontrol y la obtención de productos de múltiple homologación.

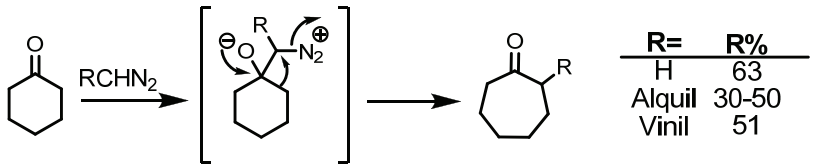


Figura 3.4: Homologación de ciclohexanona con diazoalcanos.

Por reacción de colestanona con un gran exceso de diazometano, Schut obtuvo una mezcla de A-homocolestanonas y A-bishomocolestanonas (figura 3.5) siendo ésta la primer síntesis de A-homoesteroides.[4]

[2] Zanati, G., Wolff, M.E., *J.Med. Chem.*, **1972**, *15*, 368-369
[3] Kantorowski, E.J., Kurth, M.J., *Tetrahedron,* **2000**, *56*, 4317-4353
[4] Nelson, N.A., Schut, R.N., *J.Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 6486-6490

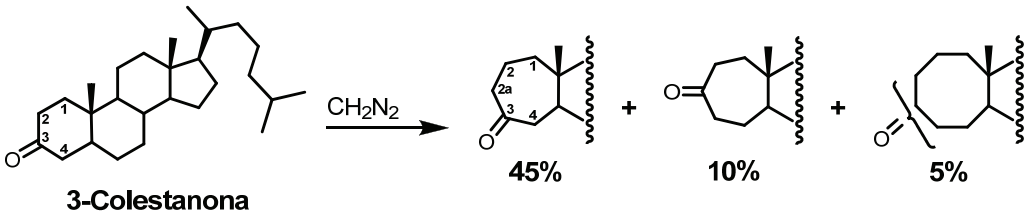


Figura 3.5: Primera síntesis de A-homoesteroides por Schut y *col.*

En 1983, Warnhoff describió un procedimiento para la homologación regioselectiva de la 3-colestanona (figura 3.6).[5] Habiendo observado que en la reacción de homologación de 2-bromocolestanona con diazoacetato de etilo la expansión del anillo ocurría preferencialmente con migración del alquilo no halogenado en una relación 98:2, utilizó una secuencia de tres reacciones, homologación, deshalogenación y descarbetoxilación, obteniendo la A-homo-3-colestanona con un rendimiento de 68%.

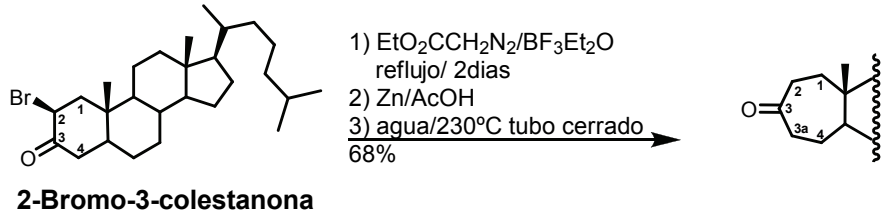


Figura 3.6: Síntesis regioselectiva de A-homoesteroides por Warnhoff y *col.*

Ninguno de estos trabajos ha trascendido, dado que prácticamente no han sido citados posteriormente, desconociéndose la actividad biológica de estos compuestos así como el alcance de esta metodología sintética.

Síntesis de C-homo y D-homoesteroides por expansión de ciclopropanos

Una de las metodologías más utilizadas para expansión de anillos es el reordenamiento de ciclopropanos fusionados. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se han preparado dos D-homo análogos de neuroesteroides: D-homo-allopregnanolona y un 18-nor-D-homopregnano (3α-hidroxi-17(13→18)*abeo*-17α,5α-*H*-pregn-12-eno-11,20-diona).[6] Para la síntesis de dichos compuestos se desarrollaron sendas estrategias de expansión basadas en la homólisis o la heterólisis respectivamente de ciclopropanos fusionados. La síntesis de la D-homo-allopregnanolona fue descripta por Di Chenna y *col*, mediante un reordenamiento de una

[5] Dave, V., Warnhoff, E.W., *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 2590-2598
[6] Di Chenna, P., Ghini, A.A., Burton, G., *Molecules*, **2000**, *5*, 447-448

ciclopropilcetona mediado por hidruros de alquilmercurio(II) (Figura 3.7).[7] La reducción con borohidruro de sodio del intermediario organomercúrico provoca la ruptura homolítica del enlace C-Hg, generando un radical oxicarbinilo que reordena liberando la tensión del anillo y dando el D-homopregnano.

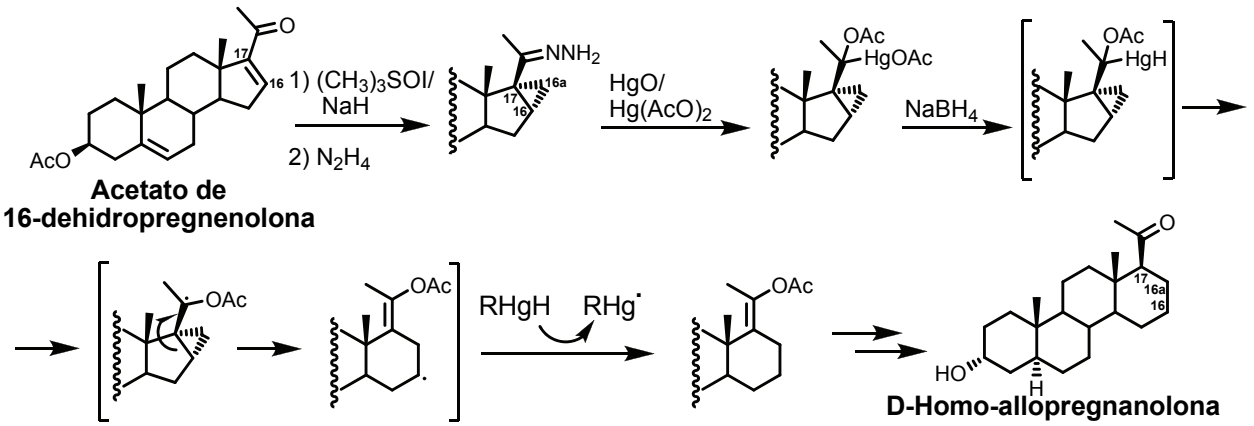


Figura 3.7: Síntesis de D-homo-allopregnanolona por Di Chenna y *col.*

En el caso del 18-nor-D-homo análogo de allopregnanolona, la expansión se logró mediante un reordenamiento aniónico del enolato de una ciclopropildicetona (figura 3.8).[6]

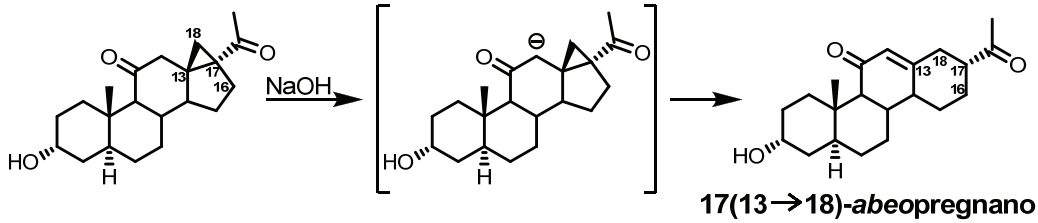


Figura 3.8: Síntesis de18-nor-D-homo análogo de allopregnanolona por Di Chenna y *col.*

Esta misma metodología también fue utilizada por Ferrara y Burton para la síntesis de 18-nor-C-homopregnanos (figura 3.9).[8]

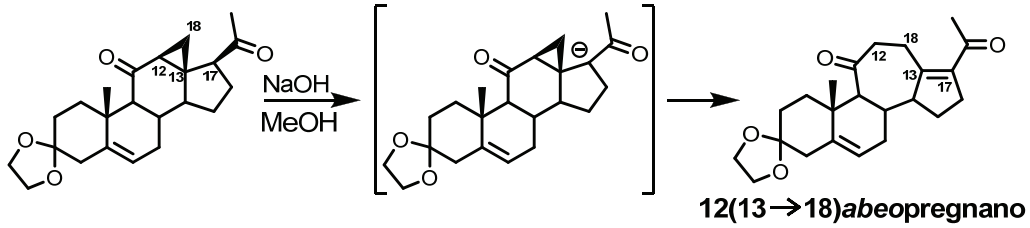


Figura 3.9: Síntesis de un 18-nor-C-homopregnano por Ferrara y Burton.

[7] Di Chenna, P., Ferrara, A., Ghini, A.A., Burton, G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 227–231
[8] Ferrara, A., Burton, G., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 929-932

Síntesis de A-homopregnanos por reordenamiento de un catión ciclopropilcarbinilo

De manera similar a los casos anteriores, el reordenamiento catiónico de ciclopropanos fusionados al núcleo esteroidal puede dar lugar a anillos expandidos. Utilizando esta aproximación, en nuestro grupo de investigación se obtuvo el A-homopregnadieno **30** a partir del ciclopropilalcohol **29** por medio de una reacción de mesilación-eliminación *in situ* (figura 3.10).[9,10] En este caso, el mesilato de **29** se descompone espontáneamente para formar el catión ciclopropilcarbinilo que se reordena con ruptura del enlace 4,5 para dar el carbocatión terciario, más estable sobre el carbono 5. La eliminación del hidrógeno β en posición 6 da lugar a la formación del A-homopregnadieno con un 50% de rendimiento. Como producto minoritario de la reacción se obtiene el vinilciclopropano **31**, que resulta de la eliminación del hidrógeno en posición 2 sin reordenamiento. Contrariamente a lo esperado, no se obtiene el dieno conjugado dado que la eliminación del H-6 está favorecida debido a que se encuentra perpendicular al plano del carbocatión, obteniéndose el producto cinético, en vez del termodinámico (figura 3.10 b).

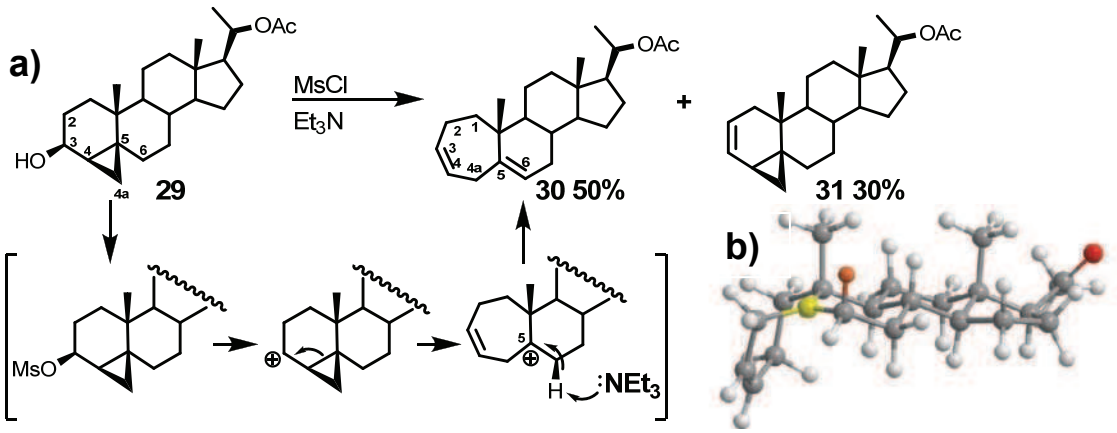


Figura 3.10: a) Reordenamiento catiónico del ciclopropilalcohol **29** por DiChenna y *col.* b) confórmero de mínima energía (cálculos AM1) del carbocatión en C-5.

En literatura se encuentran ejemplos de reordenamientos catiónicos de ciclopropilcarbinoles catalizados tanto por ácidos próticos como por ácidos de Lewis en condiciones suaves de reacción. Por ejemplo, un paso clave en la síntesis estereoselectiva de pseudoguaianolidos de Marshall utiliza el reordenamiento de un catión ciclopropilcarbinilo obtenido por tratamiento del ciclopropilalcohol con ácido perclórico, para lograr la expansión del anillo de 6 miembros (figura 3.11).[11] En ese caso, el carbocatión homoalílico formado es inmediatamente atrapado por el grupo carboxilo dando lugar a la lactona con un 80% de rendimiento.

[9] Di Chenna P.H. Tesis Doctoral, **2002**, UBA, FCEN
[10] Di Chenna, P.H., Dansey, M.V., Ghini, A.A., y Burton, G., *Arkivoc*, **2005**, (xii) 154-162
[11] Marshall, J.A., Ellison, R.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 4312-4313

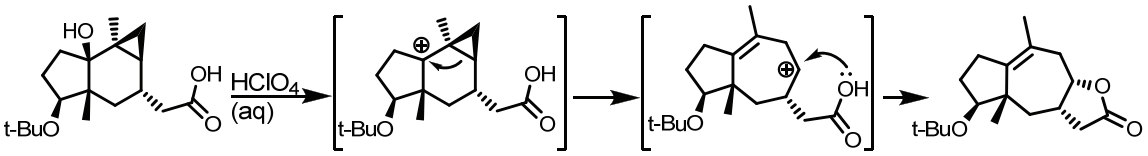


Figura 3.11: Reordenamiento catiónico de un ciclopropil alcohol catalizado por ácidos próticos en la síntesis de pseudoguaianólidos por Marshall y *col.*

El reordenamiento de ciclopropilcarbinoles catalizado por ácidos de Lewis fue estudiado por Hardouin y *col*,[12] quienes encontraron que se puede inducir la formación del catión ciclopropilcarbinilo con eterato de trifloruro de boro (figura 3.12) en condiciones suaves.

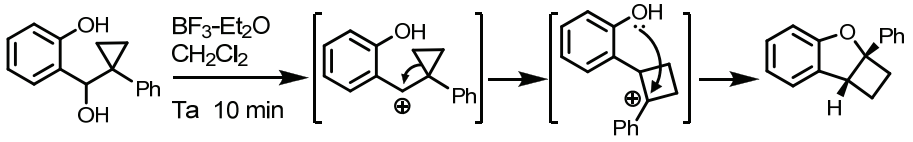


Figura 3.12: Reordenamiento catiónico de un ciclopropilalcohol catalizado por un ácido de Lewis.

En trabajos previos realizados en el grupo de investigación, se estudió la expansión del ciclopropilalcohol **29** para dar el A-homopregnadieno **30** en diferentes condiciones de reacción y en presencia de ácidos de Brønsted y de eterato de trifloruro de boro, encontrando que este último producía un 63% de rendimiento del producto deseado, en condiciones suaves de reacción (1 equivalente de ácido a 0ºC durante 30 minutos) no detectándose el vinilciclopropano **31**.[10] En bibliografía hay muchos antecedentes de reordenamientos de vinilciclopropanos[13,14,15] y vinilciclobutanos[16] promovidos por una variedad de ácidos de Lewis como eterato de trifloruro de boro, sales como $AlCl_3$ y triflatos de estaño, yterbio, escandio y cobre y complejos de níquel y paladio. En esos trabajos se demuestra que los vinilciclopropanos pueden dar complejos π-alílicos con ácidos de Lewis, desencadenando un reordenamiento de tipo catiónico del ciclo de 3 miembros. Esto fue verificado en el caso del vinilciclopropano **31**, que daba lugar a **30** en presencia de eterato de trifluoruro de boro y explicaría los mejores resultados obtenidos en el reordenamiento del ciclopropilalcohol **29** con este ácido de Lewis (figura 3.13).[17]

[12] Hardouin, C., Taran, F., Doris, E., *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 4450-4452
[13] Hiroi K., Arinaga Y., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 153-156
[14] Yovel, J., Felezentein, A., Sarel, S., *Tetrahedron*, **1978**, *34*, 993-996
[15] Shi, M., Chen, Y., Bo Xu, B., Tang, J., *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 8019-8024
[16] Lovchik M.A., Pinhas A.R., *J. Organomet. Chem.,* **2002**, *656*, 299-303
[17] Di Chenna, P.H., Dansey, M.V., Burton, G., resultados no publicados

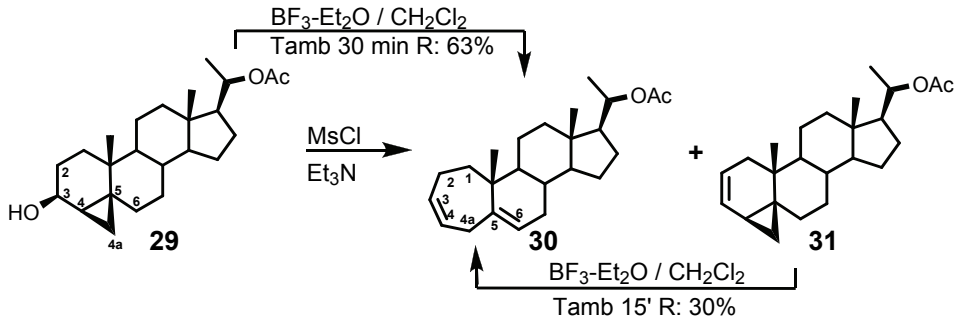


Figura 3.13: Reordenamientos catiónicos del ciclopropilalcohol **29** y del vinilciclopropano **31** por Di Chenna y *col.*

3.3 Síntesis de A-homo análogos de neuroesteroides y hormonas esteroidales

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación para la reacción de reordenamiento catiónico del ciclopropilalcohol **29**, en este trabajo de tesis se optimizó la reacción de expansión de anillo y se desarrollaron diversas estrategias sintéticas para la funcionalización regioselectiva del anillo A y la obtención de los análogos **1**-**4**, **6** y **7** (figuras 3.1 y 3.2, página 49).

Análisis retrosintético

El análisis retrosintético indicaba que para la obtención de los A-homo esteroides funcionalizados en las posiciones 3 y 4 del anillo A debía lograrse la funcionalización regioselectiva del doble enlace 3,4 de **30**, siendo un epóxido un grupo funcional adecuado (figura 3.14). La secuencia de síntesis contaba entonces con dos pasos clave: el reordenamiento catiónico del ciclopropilalcohol **29**, para dar el A-homopregnano **30**, y la epoxidación regioselectiva del doble enlace en 3 frente al de 5 para la obtención del epóxido **34** que luego podría abrirse en forma reductiva para dar los derivados monosustituidos en el anillo A**.**

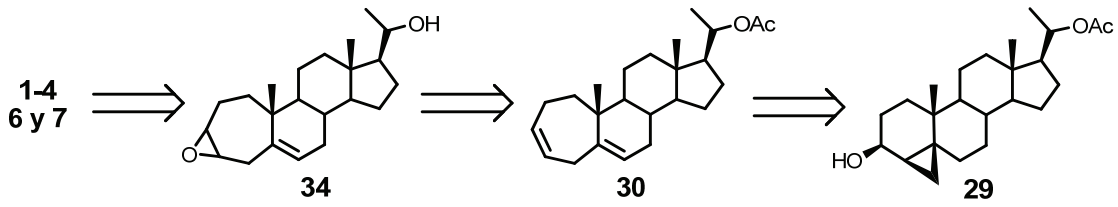


Figura 3.14: Análisis retrosintético.

Teniendo en cuenta la estructura curvada que adopta el A-homoesteroide **30** (ver figura 3.10b), era de esperar que la reacción de epoxidación rindiera mayoritariamente el epóxido β, lo cual definiría la orientación de los grupos funcionales en los productos de apertura.

Síntesis del precursor

El precursor **29**, se preparó a partir de progesterona comercial, siguiendo la ruta ya desarrollada en nuestro grupo de investigación (figura 3.15).[10] La progesterona se redujo con hidruro de aluminio y litio, se peracetiló y seguidamente se desprotegió regioselectivamente el hidroxilo alílico en posición 3β. Por último se realizó una ciclopropanación de Simmons–Smith para obtener el ciclopropilalcohol **29** con un 52% de rendimiento a partir de progesterona.

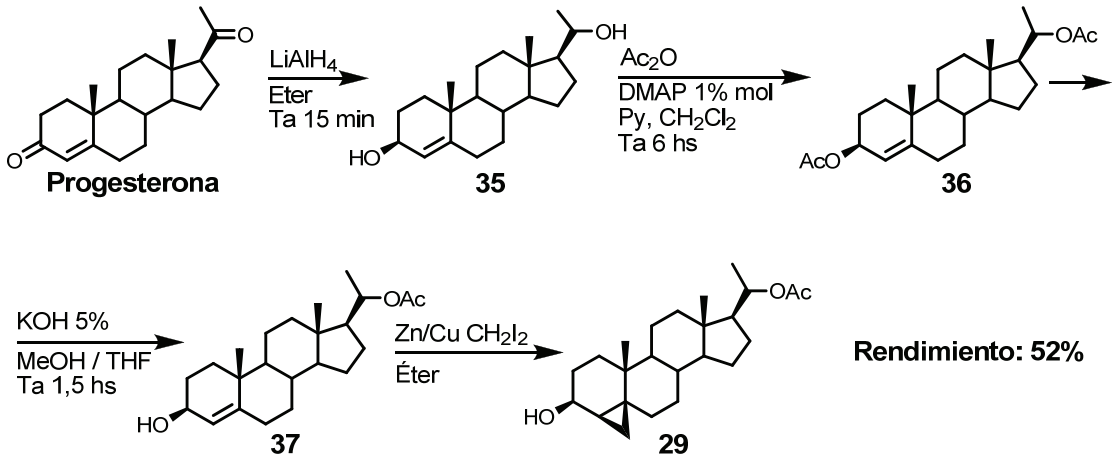


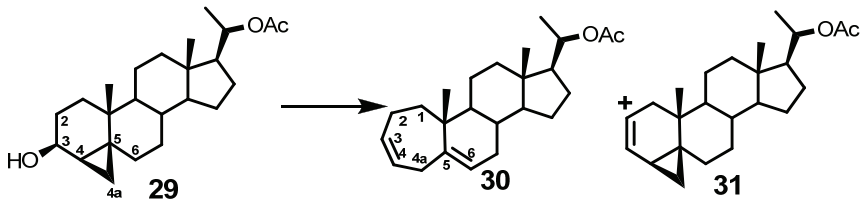
Figura 3.15: Síntesis del ciclopropilalcohol **29**.

Optimización de la reacción de expansión.

Siendo la reacción de expansión del anillo A uno de los pasos clave de la síntesis, el rendimiento moderado descripto para la reacción de **29** con eterato de trifloruro de boro en diclorometano (63%) resultaba demasiado pobre. Los intentos por mejorar esta reacción llevaron en las mejores condiciones (1,1 equivalentes de eterato de trifluoruro de boro, 15 min a 0°C) a un rendimiento de 70% de **30** (tabla 3.1, entrada 1). Por tal motivo se decidió realizar un estudio exhaustivo de la reacción, en primer lugar se ensayó la reacción de expansión con un ácido de Brønsted (ácido *p*-toluensulfónico en acetona a temperatura ambiente durante 1 hora), obteniéndose resultados similares a los observados con cloruro de mesilo (tabla 3.1, entrada 2). Se ensayaron entonces dos ácidos de Lewis, uno más débil que el eterato de trifloruro de boro (bromuro de zinc) y otro más fuerte (tricloruro de aluminio) utilizando THF como solvente. En ambos casos la reacción fue muy lenta a temperatura ambiente y condujo a una mezcla compleja

de productos (entradas 3 y 6). Cuando la reacción se llevó a cabo bajo reflujo, al cabo de 2 hs se observó un resultado similar (entradas 4 y 7).

Es conocido que el uso de un reactor de microondas comparado con el calentamiento convencional, acelera la mayoría de las reacciones en química orgánica, por sobrecalentamiento general del solvente y por la generación de puntos calientes. Pero el aspecto más interesante de la síntesis asistida por microondas es la baja incidencia de reacciones secundarias debido a que los productos están expuestos poco tiempo a altas temperaturas. Por esa razón se decidió ensayar el reordenamiento catiónico del ciclopropilalcohol **29** con ambos ácidos de Lewis, promovido por radiación de microondas (entradas 5 y 8). En ambos casos se obtuvo el A-homoesteroide **30** con buenos rendimientos, de manera rápida y limpia. Las mejores condiciones fueron con bromuro de zinc a 120ºC e irradiando a 300 W durante 10 minutos (entrada 5). Por último al irradiar una solución del esteroide en THF en ausencia de ácidos de Lewis en el reactor de microondas no se observó reacción, corroborando que no se trata de un reordenamiento térmico (entrada 9).



Entrada	Reactivo	Condiciones	R % de **30**
1	$BF_3{\cdot}Et_2O$ / CH_2Cl_2	0ºC, 15 min	70
2	pTSOH / acetona	Ta 1hs	55% de **30** 20% de **31**[a]
3	$ZnBr_2$ / THF	Ta 28 hs	mezcla compleja
4	$ZnBr_2$ / THF	Reflujo 2hs	mezcla compleja
5	$ZnBr_2$ / THF	MW 120ºC, P_{max}100 psi, 300 W, 10´	87
6	$AlCl_3$ / THF	Ta 3.5hs	mezcla compleja
7	$AlCl_3$ / THF	Reflujo 2hs	mezcla compleja
8	$AlCl_3$ / THF	MW 65ºC, P_{max}100 psi, 300 W, 10´	80
9	THF	MW 100ºC, P_{max}100 psi, 300 W, 10´	NR

Tabla 3.1: Optimización de la reacción de reordenamiento del ciclopropilalcohol **29** ([a] relación calculada por RMN ^{1}H; NR: no reacciona).

Funcionalización de anillo A: epoxidación regioselectiva del doble enlace 3,4

Con el objetivo de funcionalizar el anillo A del A-homopregnadieno **30** para la síntesis de análogos de hormonas y neuroesteroides, fue necesario realizar una epoxidación selectiva del doble enlace 3,4 frente al 5,6. Desde el punto de vista electrónico, la reacción de epoxidación es más favorable sobre el doble enlace 5,6 más sustituido, pero por otro lado ese doble enlace está estéricamente más impedido que el 3,4, debido a la presencia del metilo 19 que bloquea parcialmente la cara β y a la curvatura del anillo A que bloquea la cara α.

Epoxidación por peroxiácidos

La reacción de epoxidación en condiciones clásicas con ácido *m*-cloroperbenzoico (mCPBA) del A-homopregnadieno **30** (0,9 equivalente, -20ºC, 1h) dio una mezcla de 3 productos de mayor polaridad por ccd, que luego de su separación y análisis por RMN ^{1}H fueron identificados como el producto diepoxidado **38** y los dos productos de monoepoxidación **39** y **40** como mezclas de isómeros α y β (figura 3.16). Este resultado indicó que este tipo de agente epoxidante tenía la regioselectividad inversa y que además para lograr la selectividad buscada, resultaba esencial utilizar un agente de epoxidación voluminoso que favoreciera el ataque sobre el doble enlace más expuesto en el anillo A.

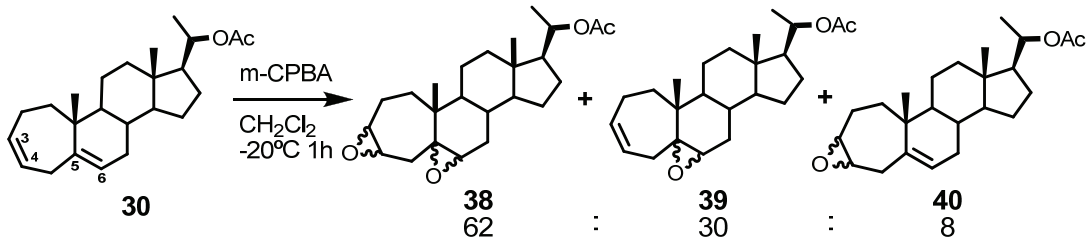


Figura 3.16: Epoxidación del A-homopregnadieno **30**.

Epoxidación de Jacobsen

En busca de un agente epoxidante más voluminoso que pudiera diferenciar entre las olefinas en posiciones 3 y 5 se ensayó el método de epoxidación de Jacobsen.[18] Este es un método para la epoxidación asimétrica de olefinas, que involucra como catalizador complejos quirales de Salen (N,N´-bis(salicilideneamino)etano) manganeso (II) y que utiliza lavandina comercial (hipoclorito de sodio) como oxidante estequiométrico (el ciclo catalítico se describe en la figura 3.17). El gran tamaño de estos complejos sugería que se podría lograr una mejor regioselectividad por el doble enlace 3,4 estéricamente menos impedido, además este método se describe como sencillo, de muy alta selectividad (ee cercanos al 90%), y de altos rendimientos (mayores al 70%) (figura 3.18).

[18] Zhang, W., Jacobsen, E., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 2296-2297

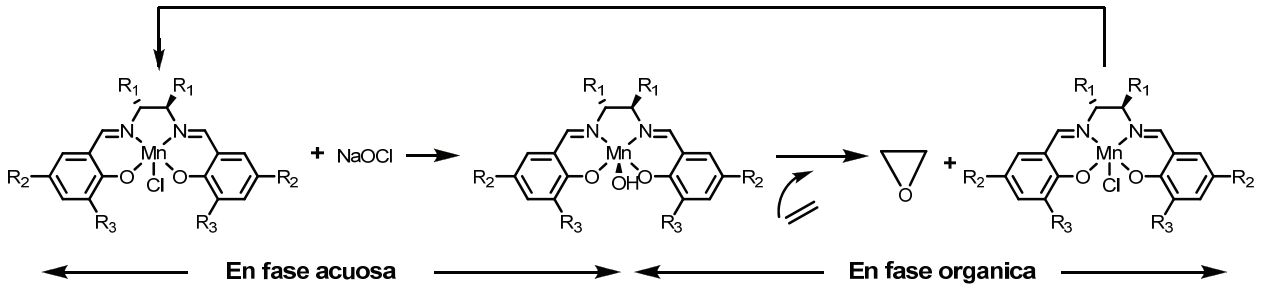


Figura 3.17: Mecanismo de la epoxidación de Jacobsen.

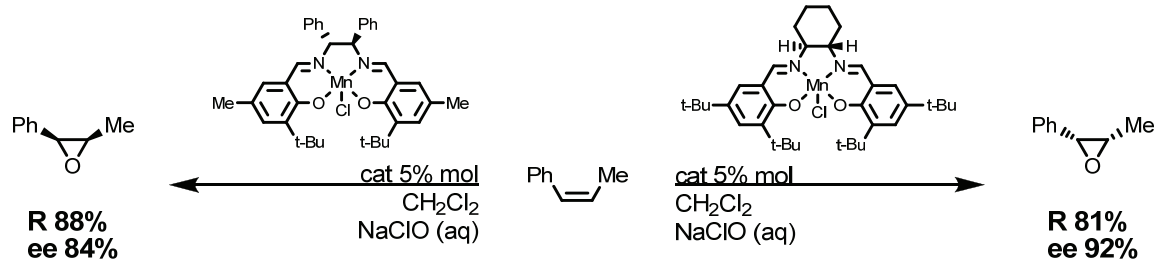


Figura 3.18: Ejemplos de la epoxidación de Jacobsen.

En nuestro caso contábamos en el laboratorio con los ligandos Salen y Salofen, que si bien no poseían sustituyentes quirales, son muy voluminosos lo cual hacía suponer que podría lograrse la regioselectividad buscada. Los complejos [Salofen Mn(III)]Cl y [Salen Mn(III)Cl] se obtuvieron siguiendo el protocolo de Jacobsen y *col.*[19] y se comprobó la correcta reactividad de ambos complejos sobre β-pineno (figura 3.19) obteniéndose el producto epoxidado que se identificó por RMN ^{1}H, por la aparición de dos dobletes a 2,60 y 2,77 ppm (J = 5,5 Hz).

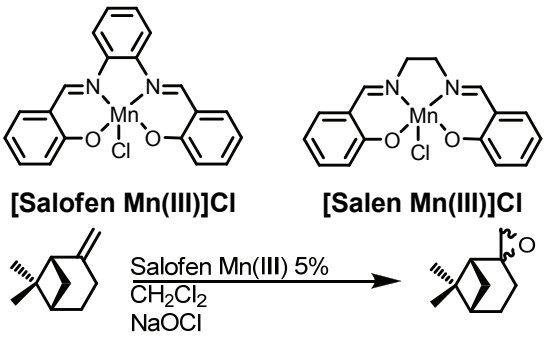


Figura 3.19: Catalizadores preparados, y reacción sobre β pineno.

Cuando se ensayó la epoxidación sobre el A-homopregnadieno **30** en las mismas condiciones (lavandina, diclorometano y 5% de catalizador), tanto con el complejo de Salen como de Salofen se observó por CCD la aparición de 8 a 10 productos de mayor polaridad y

[19] Jacobsen, E., Zhang, W., Muci, A. R., Ecker, J. R., Li D., *J. Org. Chem.,* **1991**, *113*, 7063-7064

desaparición del material de partida. Éste resultado podría indicar que al alto potencial de oxidación de estos complejos y la presencia de hipoclorito de sodio, probablemente, sean suficientes para oxidar la posición 4a dialílica, dando lugar a una variedad de subproductos de oxidación.

Epoxidación catalizada por dioxiranos

Otro método poderoso de epoxidación asimétrica de olefinas consiste en la oxidación a través de dioxiranos generados *in situ* por reacción entre peroxomonosufato de potasio y cetonas quirales. La posibilidad de utilizar cetonas voluminosas sugería que se podía obtener la regioselectividad deseada entre las olefinas en posiciones 3 y 5. Yian Shi y *col.*[20] describieron el uso de la cetona **41** como catalizador, de fácil obtención a partir de fructosa (figura 3.20), y el uso de Oxone® ($2{\cdot}KHSO_5$-$KHSO_4$-K_2SO_4) como fuente de peroxomonosufato para la reacción de epoxidación de una gran variedad de olefinas. Este método se describe como sencillo, de excelente enantioselectividad (ee mayor al 95%), y de muy buenos rendimientos (mayores al 90%). Un ejemplo de la aplicación de la metodología de Yian Shi es la epoxidación de *trans*-β-estireno con **41** y Oxone® en una mezcla de acetonitrilo/dimetoxietano/agua a temperatura ambiente por 30 minutos que rinde el epóxido (*R*,*R*) con 94% de rendimiento y un exceso enantiomérico de 96% (figura 3.21). Por otro lado, al tratar el *trans*-β-estireno en iguales condiciones pero utilizando el enantiómero de **41** como catalizador (derivado de la L-fructosa), se obtiene el epóxido enantiomérico con igual éxito. En la figura 3.22 se muestra el ciclo catalítico propuesto por Yian Shi y *col.* La alta carga de catalizador utilizada (30% mol) se debe a la lenta degradación de la cetona **41** a través de una oxidación de Baeyer-Villiger.

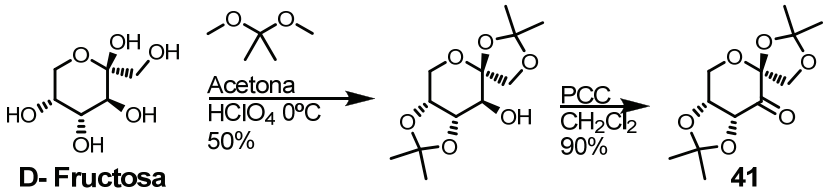


Figura 3.20: Síntesis de la cetona **41**.

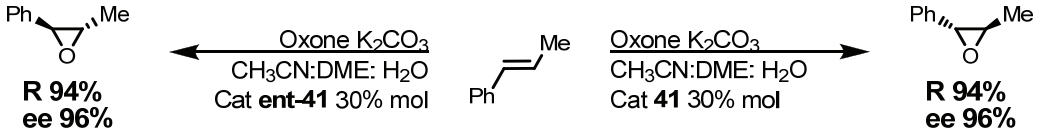


Figura 3.21: Ejemplo de epoxidación catalizada por **41**.

[20] Wang Z.X., Young T., Frohn M., Zhang J.R., Shi Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 11224-11235

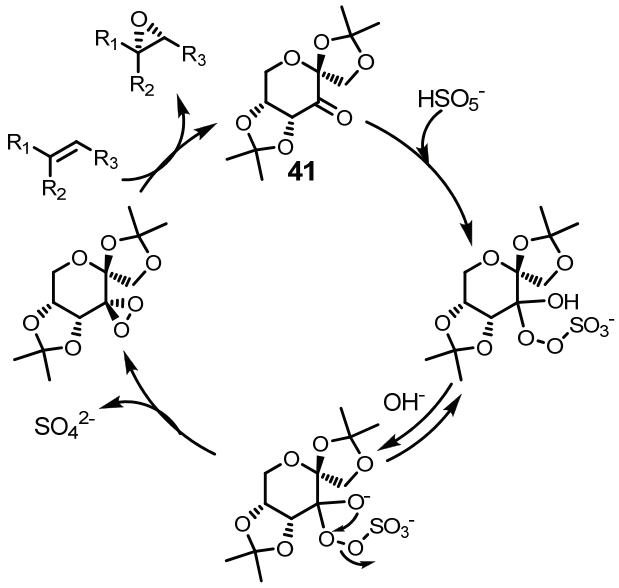


Figura 3.22: Ciclo catalítico para la epoxidación catalizada por dioxiranos.

La posibilidad de utilizar la cetona voluminosa **41**, sugería que se podría obtener la selectividad deseada. Para ello se sintetizó el catalizador **41** a partir de D-fructosa, en una secuencia de cetalización-oxidación, siguiendo el protocolo descripto en bibliografía.[20] Cuando se ensayó la epoxidación sobre el A-homoesteroide **30** no se observó reacción, probablemente debido a la baja solubilidad del esteroide en la mezcla de solventes acetonitrilo/DME/agua. Para mejorar la solubilidad del esteroide y facilitar la posterior epoxidación se removió el acetato en C-20 con hidruro de aluminio y litio, obteniéndose el alcohol **42** (figura 3.23) y se repitió la reacción utilizando 0,3 equivalentes del catalizador **41**, 10 equivalentes de Oxone®, y 0,04 equivalentes de acetato de tetrabutilamonio como agente de transferencia de fase. Se observó que al cabo de 30 minutos se empezaba a formar producto de diepoxidación (detectado por ccd por la aparición de una mancha de mayor polaridad y caracterizado por RMN ^{1}H) por lo cual se decidió detener la reacción transcurrido ese tiempo. De esta forma se logró obtener el producto de epoxidación en C-3 deseado, **34**, con un 56% de rendimiento, luego de recuperarse un 40% de **42** sin reaccionar. Cabe destacar que en la purificación, también se recupera parcialmente el catalizador. El espectro de RMN ^{1}H de **34** mostró la desaparición del multiplete a 5,61 ppm correspondiente a los protones de H-3 y H-4 del dieno y la aparición de dos nuevos multipletes a 3,14 y 2,96 ppm correspondientes a H-4 y H-3 del epóxido. No se observó variación en la señal de H-6 confirmando que este doble enlace no había sufrido modificación. La configuración β del epóxido se confirmó analizando los espectros de RMN y el modelado molecular de los productos de la apertura reductiva del epóxido, que se describen más adelante. Como ya se

mencionó, esta configuración era la esperada teniendo en cuenta la disposición curvada hacia la cara α del anillo A (ver figura 3.10b).

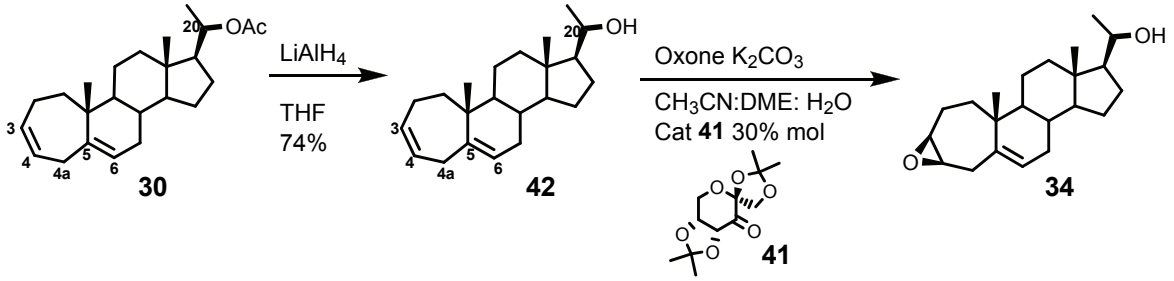


Figura 3.23: Obtención del epóxido **34**.

Síntesis de los análogos 1-4, 6 y 7

El epóxido **34** se redujo con hidruro de aluminio y litio en THF, obteniéndose una mezcla de 3β-hidroxi (**32**) y 4β-hidroxi (**33**) A-homopregnenos en proporción 9:2 con un 63% y 14% de rendimiento respectivamente, que pudieron ser separados por cromatografía flash con hexano/acetato de etilo 85:15 (figura 3.24).

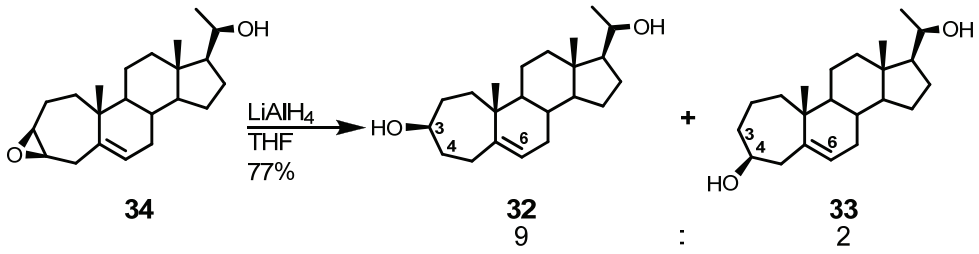


Figura 3.24: Apertura reductiva del epóxido **34**.

En el espectro de RMN ^{1}H del diol **33**, el H-4 presentó un desplazamiento químico de 3,54 ppm, como un triplete de tripletes con constantes de acoplamiento de 10,2 y 5,0 Hz, indicando una orientación pseudo-axial de este hidrógeno (figura 3.25c). Además, en el espectro NOESY se observó una correlación entre H-4 y H-6. El modelado molecular de todos los posibles confórmeros del anillo de 7 miembros de **33** y de su isómero 4α-hidroxi, mostró que esto es sólo posible en el confórmero de menor energía del 4β-hidroxiesteroide (figura 3.25a y b). La orientación β del hidroxilo de **33** confirmó la configuración β del epóxido **34**, y por lo tanto la configuración β del hidroxilo en C-3 de **32**. El espectro de RMN ^{1}H de **32** presentó un multiplete no resuelto a 4,05 ppm ($W_{1/2}$ = 10,8 Hz), que correspondía al H-3, típico de un hidrógeno en posición pseudo-ecuatorial (figura 3.25d).

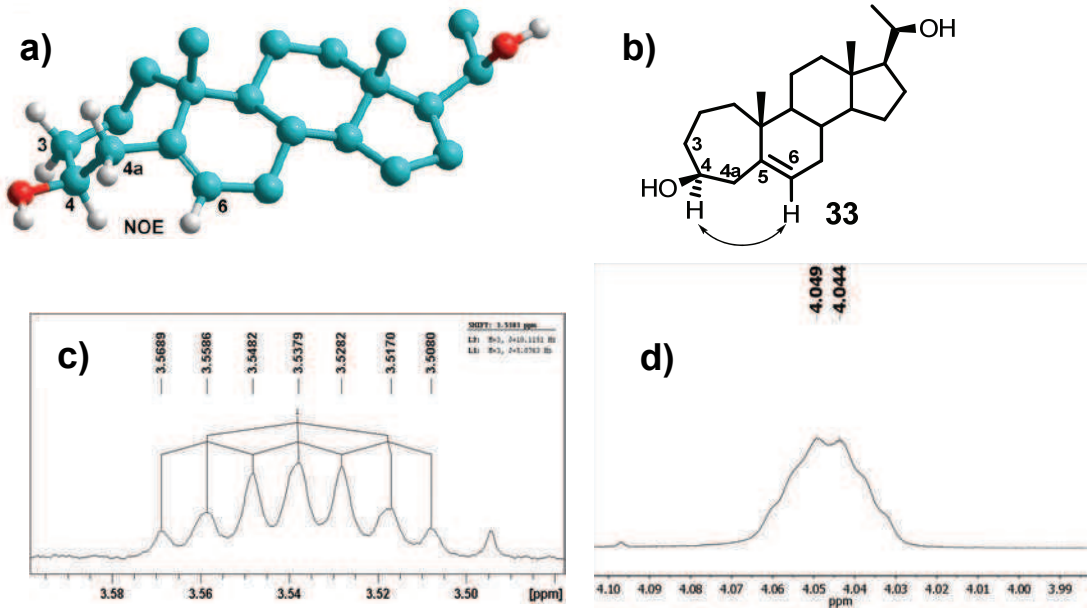


Figura 3.25: a) Confórmero más estable del 4β-hidroxi-A-homopregneno **33** (HF/6-31G(d,p)), obsérvese la orientación pseudoaxial del H-4; b) correlación observada en el espectro NOESY de **33**; c) señal de RMN ^{1}H 500 MHz del H-4 de **33** d) señal de RMN ^{1}H 500 MHz del H-3 del 3β-hidroxi-A-homopregneno **32**.

La conversión del diol **32** en el correspondiente análogo de allopregnanolona **2**, requería la oxidación del carbonilo en C-20 y la inversión de la posición 3 de modo de obtener el derivado 3α-hidroxi. En una primera aproximación se intentó una secuencia de oxidación-reducción (figura 3.26) para lo cual el diol **32** se oxidó con PCC en diclorometano a la dicetona **6** análoga de progesterona que se obtuvo con un rendimiento total de 7,8% a partir de la progesterona comercial.

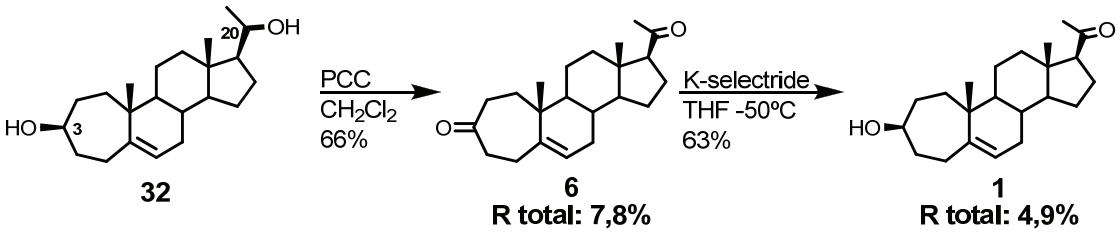


Figura 3.26: Síntesis de los análogos **6** y **1**.

La dicetona **6** se redujo regioselectivamente en posición 3 con K-selectride, con la esperanza que el hidruro voluminoso se adicionara por la cara β del esteroide menos impedida (debido al alto impedimento estérico que presenta la posición 20 y al gran volumen del reductor, la reducción con K-selectride ocurre regioselectivamente en el anillo A). Sin embargo, luego de la reducción con K-selectride en THF a -50ºC se obtuvo el alcohol **1** que mostró tener idénticos

desplazamientos de ^{1}H y ^{13}C para las señales de los átomos del anillo A que **32**. Este resultado indicaba sin lugar a duda que se había obtenido nuevamente la configuración β del hidroxilo en C-3. En particular, H-3 se presenta como un multiplete no resuelto a 4,05 ppm ($W_{1/2}$ = 10,6 Hz) (figura 3.27c), típico de un protón pseudo-ecuatorial, indicando una orientación pseudo-axial del hidroxilo. En el espectro NOESY se observaba una fuerte correlación entre el 4aβ-H (2,28 ppm), el 1β-H (1,79 ppm) y los 19-H (0,92 ppm) y entre el 4aα-H (1,90 ppm) y 6-H (5,41 ppm) (figura 3.27b). Estos NOEs observados son consistentes con el confórmero de menor energía de **1** obtenido por modelado molecular (figura 3.27a,b). El análogo de pregnenolona **1** se obtuvo con un rendimiento total de síntesis de 4,9% a partir de progesterona comercial en 9 pasos de reacción.

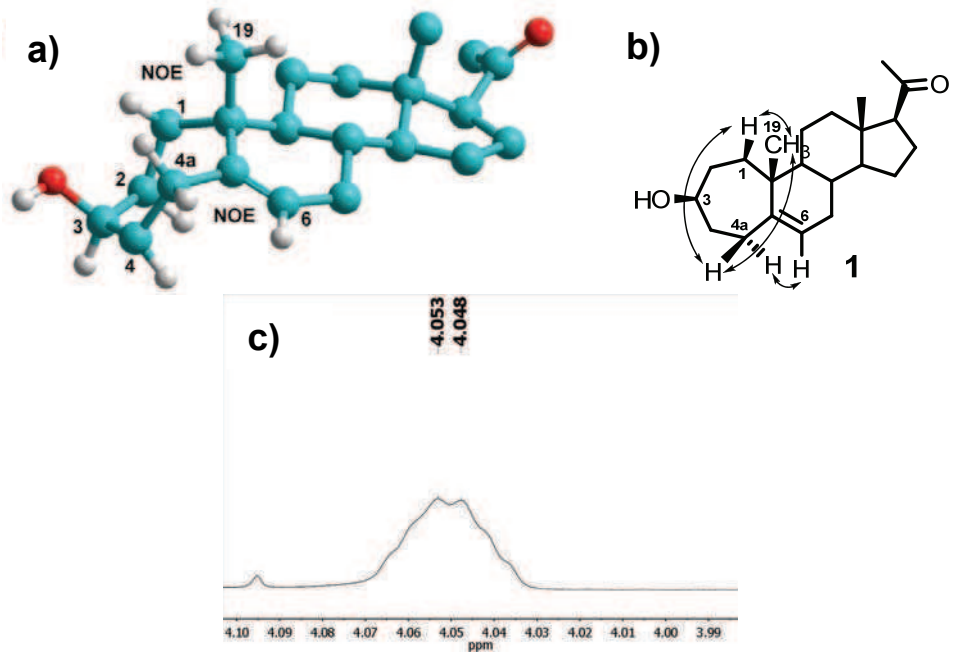


Figura 3.27: a) Confórmero más estable del 3β-hidroxi-20-ceto-A-homopregneno **1** (HF/6-31G(d,p)), obsérvese la orientación pseudo ecuatorial del H-3; b) correlaciones observadas en el espectro NOESY de **1**; c) señal de RMN ^{1}H 500 MHz del H-3 de **1**.

La conversión del diol **32** en el 3α-hidroxi-A-homopregneno se logró por inversión de la configuración del alcohol en C-3 con una reacción de Mitsunobu (figura 3.28).[21] Para ello se trató a **32** con DIAD, trifenilfosfina y ácido fórmico para obtener el 3α-formiloxi pregnano **43** con un 71% de rendimiento (debido al alto impedimento estérico que presenta la posición 20 la reacción ocurre regioselectivamente en el hidroxilo de C-3). El espectro de RMN ^{1}H mostró la presencia

[21] Bose, A.K., Lal, B., Hoffman, W.A., Manhas, M.S., *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *18*, 1619-1622

del formiato como un singulete a 7,99 ppm y se evidenció un corrimiento de la señal de H-3 a 4,80 ppm. La oxidación con PCC dio el 20-ceto derivado **44** con un 60% de rendimiento que se desformiló por tratamiento con ácido clorhidrico en metanol dando el análogo **2** con un 40% de rendimiento desde **32** y un rendimiento del 5% a partir de progesterona comercial. La inversión de la configuración del C-3 se puso en evidencia en la señal de RMN ^{1}H de H-3 (figura 3.29) que se muestra como un triple doble doblete, con constantes de acoplamiento grandes, de tipo axial-axial con H-2α y H-4α (J=10,5 Hz) y una constante de acoplamiento más pequeña, de tipo axial-ecuatorial con H-2β y H-4aβ (J=3,7 y 5,5 Hz). En contraposición su epímero **1** presenta un multiplete no resuelto a 4,05 ppm ($W_{1/2}$ = 10,6 Hz), típico de un protón pseudo-ecuatorial (figura 3.27c). El espectro NOESY de **2** mostró una fuerte correlación de H-3 con H-1β, H-2β, H-4β y H-4aβ, (δ 1,18, 1,64, 2,19, 1,99 ppm respectivamente). Por último el H-1β mostró NOE con H-19, confirmando la orientación α del hidroxilo en C-3. Así se obtuvo el análogo de allopregnanolona **2**, con un rendimiento total de síntesis de 4,7% a partir de progesterona comercial en 10 pasos de reacción

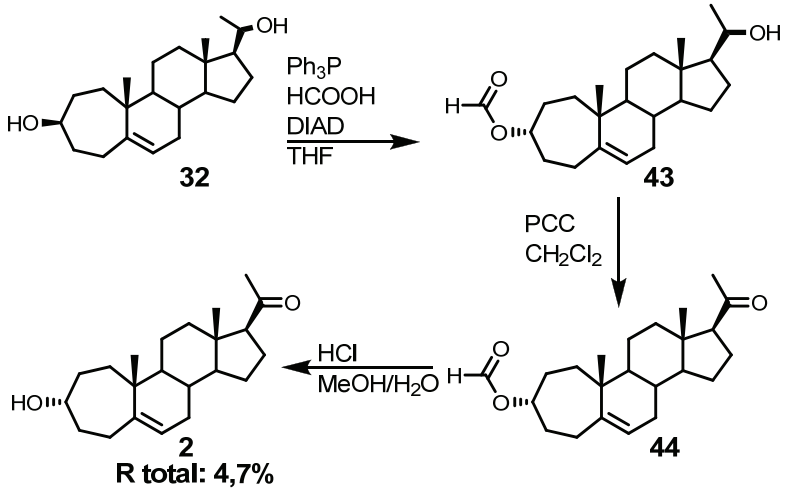


Figura 3.28: Síntesis del análogo **2** a partir de **32**.

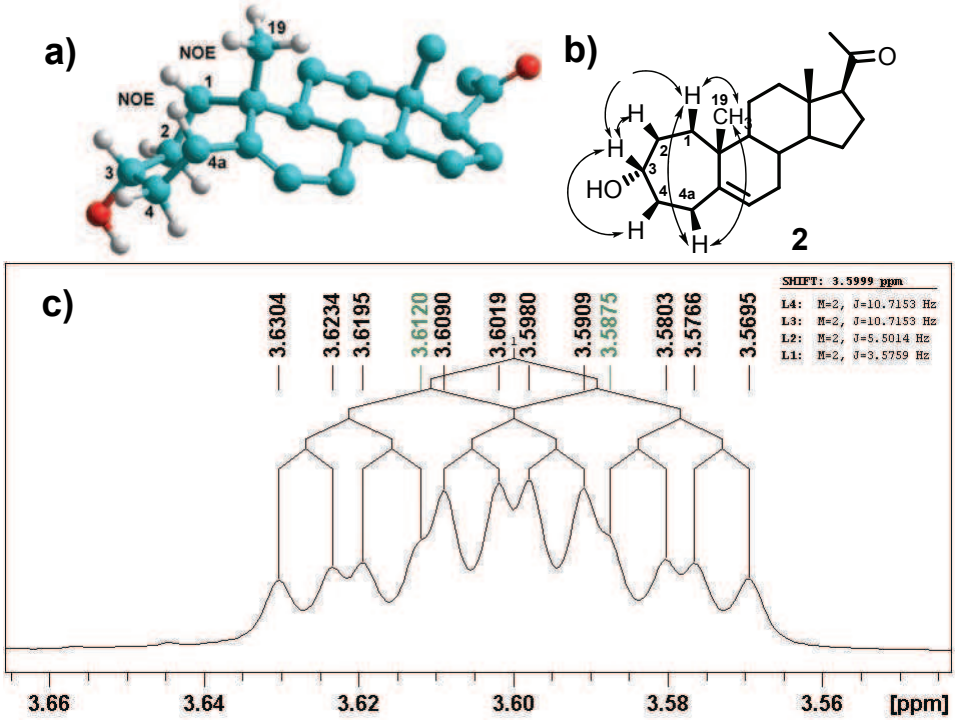


Figura 3.29: a) Confórmero más estable del 3α-hidroxi-20-ceto-A homopregneno **2** (HF/6-31G(d,p)), obsérvese la orientación pseudoaxial del H-3; b) correlaciones observadas en el espectro NOESY de **2**; c) señal de RMN ^{1}H 500 MHz del H-3 de **2**.

En un primer intento por obtener el análogo **4**, se ensayó la reacción de Mitsunobu sobre el diol **33** pero no se observó reacción. Esto muy probablemente se debería a que la reacción de Mitsunobu es útil para transformar hidroxilos axiales en sus epímeros ecuatoriales, pero no al revés. Se aplicó entonces la secuencia de oxidación-reducción sobre el diol **33**; la oxidación con PCC condujo a la dicetona **7** análoga de progesterona y la reducción regioselectiva con K-Selectride ocurrió por la cara β de la molécula dando el 4α-hidroxi análogo **4** como único producto (figura 3.30). La inversión de la configuración del C-4 se puso en evidencia en el cambio de desplazamiento del H-4 que resuena como un multiplete no resuelto a δ 3,94 ppm ($W_{1/2}$ = 17,3 Hz) (figura 3.31c), indicando que se trata de un hidrógeno pseudoecuatorial, en contraposición con la señal de H-4 del epímero 4β-hidroxi (**33**) que resuena a 3,54 ppm, como un triplete de tripletes con constantes de acoplamiento de 10,2 y 5,0 Hz típico de orientación pseudo-axial (figura 3.25c). El espectro NOESY de **4** no mostró ninguna correlación para el H-4 pero si mostró una fuerte correlación entre las señales a δ 1,05, 2,46 y 0,94 ppm que se corresponden con los H-1β, H-4aβ y H-19, indicando que H-1β y H-4aβ tendrían una orientación axial (figura 3.31a y b). Estos dos últimos protones presentaron una correlación NOE con H-3β (δ 1,36 ppm) confirmando que la posición 3β en C-3 es axial y en consecuencia la orientación pseudo-axial α del hidroxilo en C-4. Así se obtuvo el análogo de allopregnanolona

4, con un rendimiento total de síntesis de 1,4% a partir de progesterona comercial en 9 pasos de reacción.

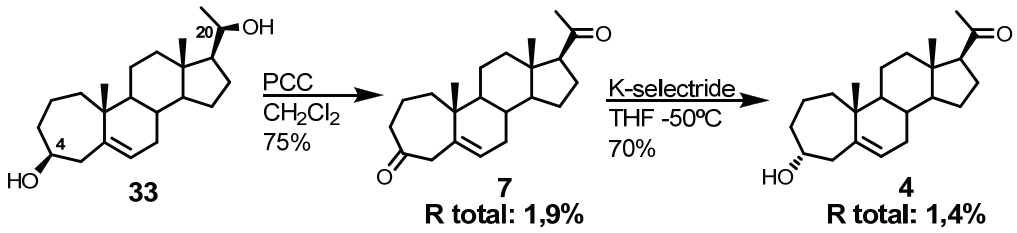


Figura 3.30: Síntesis del análogo **4** a partir de **33**

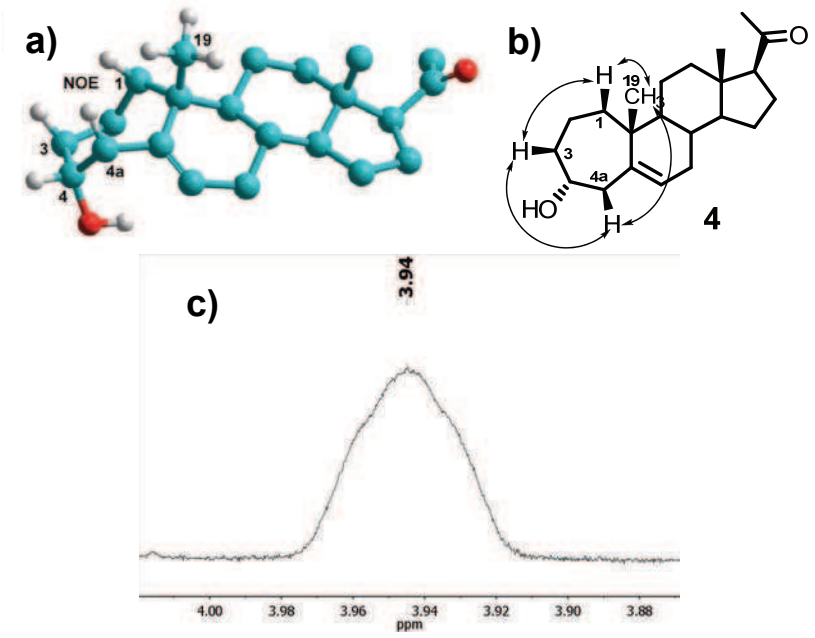


Figura 3.31: a) Confórmero más estable del 4α-hidroxi-A-homopregneno **4** (HF/6-31G(d,p)), obsérvese la orientación pesudoecuatorial del H-4; b) correlaciones observadas en el espectro NOESY de **4**; c) señal de RMN ^{1}H 500 MHz del H-4 de **4**.

Por hidrogenación catalítica de **1** se obtuvo el 5α-pregnano reducido **3** con buena estereoselectividad (5α/5β 9:1, determinado por RMN ^{1}H del producto crudo de reacción) (figura 3.32). La estereoquímica de la posición 5 se infirió por el espectro de RMN ^{13}C. Dado que C-19 resuena a δ 13,8 ppm, eso es un indicativo de la fusión A/B *trans* para el isómero 5α. En contraposición, el C-19 del producto minoritario 5β resuena a δ 21,5 ppm. Además, el espectro NOESY mostró correlación de H-5 (δ 0,73 ppm) con los hidrógenos en posición 1α (δ 1,10), 7α (δ 0,88) y 9α (δ1,07) y no se observó correlación entre H-5 y H-19, confirmando la orientación α del hidrógeno en C-5. La estéreoselectividad de la hidrogenación se debería al impedimento

estérico que provoca el metilo 19 sobre el doble enlace 5,6 obstaculizando el acercamiento del catalizador por la cara β del esteroide. Así se obtuvo el análogo de allopregnanolona **3**, con un rendimiento total de síntesis de 3,9% a partir de progesterona comercial en 10 pasos de reacción.

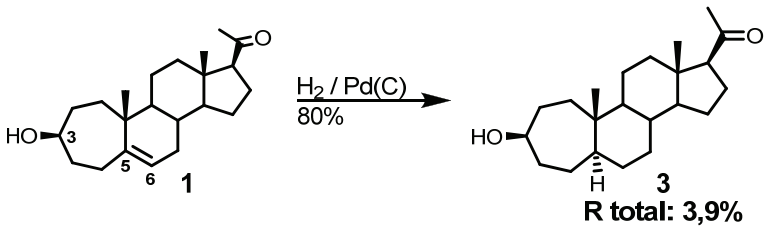


Figura 3.32: Síntesis del análogo **3** a partir de **1**.

3.4 Aplicación de la reacción de reordenamiento catiónico para la obtención de B-homo-19-nor esteroides

Debido a su importancia biológica y diversidad estructural, los B-homoesteroides desempeñan un papel importante en la química de productos naturales. En los últimos años, algunos esteroides con una organización inusual de los anillos A y B como el isociclocitrinol y la cortistatina A (figura 3.33), han cobrado importancia no sólo por la prometedora actividad biológica de estos compuestos, sino también por el desafío sintético que representa la construcción de tales esqueletos.

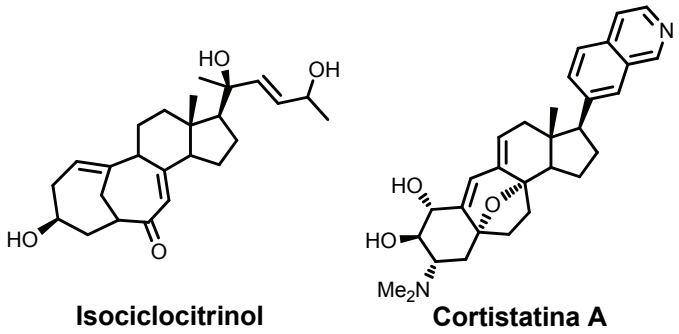


Figura 3.33: ejemplos de B-homo-19-noresteroides bioactivos.

Antecedentes

Al igual que con los A-homoesteroides, tampoco se han descripto muchas síntesis de B-homoesteroides. En un trabajo reciente Schmalz informó la obtención de B-homo-19-nor esteroides a través del reordenamiento catiónico de 5,19-ciclo-6-oxoesteroides catalizado por

ácidos de Lewis y anhídrido acético (figura 3.34).[22] El mecanismo propuesto para la reacción se inicia con la O-acetilación de la ciclopropilcetona para dar el intermediario catiónico I, que reordena *vía* un intermediario tipo biciclobutonio II dando lugar al carbocatión ciclopropilcarbinilo III. La fragmentación posterior daría el carbocatión oxo-estabilizado IV que pierde un protón dando el B-homoenolacetato.

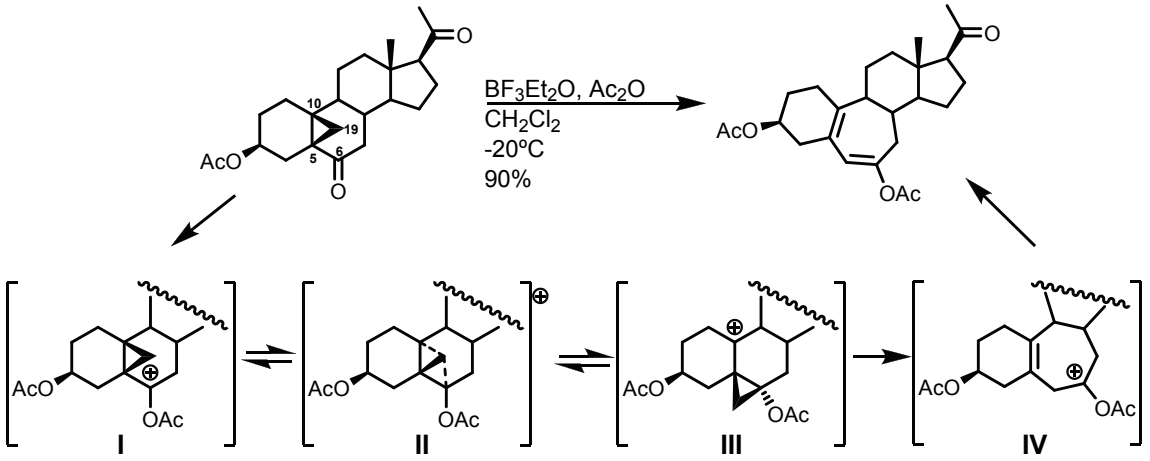


Figura 3.34: Síntesis de B-homo-19-noresteroides por Schmalz y *col.*

Reordenamiento catiónico de un 6,19-cicloesteroide

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados arriba, se intentó aplicar la metodología de reordenamiento descripta en la sección 3.3, para la formación de B-homo esteroides. Se estudió la reacción de reordenamiento catiónico sobre el compuesto **46** (figura 3.35) obtenido por reducción de 6,19-cicloprogesterona (**45**) sintetizada previamente en nuestro grupo de investigación.[23] En bibliografía está descripto que los vinilciclobutanos (ver arriba), también reordenan en condiciones ácidas, se propuso como objetivo, estudiar la reacción de reordenamiento catiónico sobre el compuesto **46** (figura 3.34), producto de la reducción de la dicetona **45**.

[22] Kranz, D.P., Meier zu Greffen, A., El Sheikh, S., Neudörfl, J.M., Schmalz, H.G., *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 2860–2866
[23] Di Chenna, P.H., Veleiro, A.S., Sonego, J.M., Ceballos, N.R., Garland, M.T., Baggio, R., Burton, G., *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2453–2457

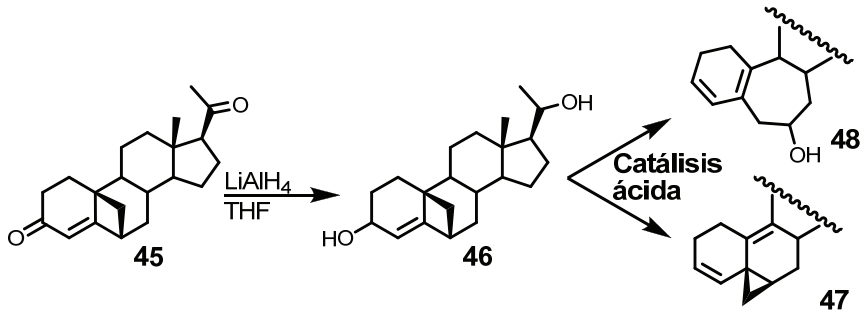


Figura 3.35 estudio del reordenamiento catiónico de **46** para la obtención de B- homopregnenos.

Se ensayó la reacción en las condiciones descriptas en la tabla 3.2 observando que solamente en condiciones próticas con ácido *p*-toluensulfónico se obtenía el B-homopregnadieno **48** como producto minoritario y con rendimiento bajo (entrada 1). Otros ácidos próticos como ácido clorhídrico y varios ácidos de Lewis daban el ciclopropano **47** (entradas 3 a 9). Por otro lado cuando el ciclopropano **47** se trató con ácido *p*-toluensulfónico en acetona (iguales condiciones que la entrada 1) no se observó reacción.

Entrada	Reactivo	Condiciones	Productos	R %
1	pTSOH/acetona	Ta 1,5 hs	**48** **47**	19 40
2	HCl/iPrOH	Ta 3hs	**47**	90
3	AcOH	Reflujo	desc	-
4	$BF_3{\cdot}Et_2O/CH_2Cl_2$	-50ºC, 10 min	**47**	53
5	$BF_3{\cdot}Et_2O/CH_2Cl_2$	Ta, 10 min	desc	-
6	$BF_3{\cdot}$MeOH/MeOH	Ta, 24 hs	NR	-
7	$BF_3{\cdot}$MeOH/MeOH	MW 120ºC, P_{max} 100 psi, 300 W, 10	**47**	36
8	THF	MW 100ºC, P_{max} 100 psi, 300 W, 10´	NR	-
9	$ZnBr_2$/THF	MW 120ºC, P_{max} 100 psi, 300 W, 10´	**47**	32
10	$AlCl_3$/THF	MW 80ºC, P_{max} 100 psi, 300 W, 5´	**47**	23

Tabla 3.2: Condiciones ensayadas para el reordenamiento catiónico de **46** (desc: descomposición; NR: no reacciona)

Cuando la reacción se llevó a cabo en las condiciones de la entrada 4 (tabla 3.2) en presencia de tiofenol se obtuvo el 6-feniltioéter **49** con un 14% de rendimiento (figura 3.36); la

estructura de este producto fue confirmada por RMN 1D y 2D. La formación de **49** indicaría la existencia del catión ciclopropilcarbinilo intermediario **I** lo cual permite proponer el mecanismo de la figura 3.37. Así el carbocatión **I** podría reordenar *vía* un intermediario tipo biciclobutonio análogo al propuesto por Schmaltz y *col.* para dar el carbocatión terciario **II** que puede seguir dos caminos, eliminar el hidrógeno axial de C-9 para dar el producto de β-eliminación **47** (control cinético), o expandir el anillo con ruptura del enlace 5,6 para dar el carbocatión secundario en C-6, **III** que puede ser atrapado por trazas de agua, para dar el producto termodinámico **48**. A diferencia del mecanismo de la figura 3.34, al no contar con el grupo acetato en C-6 el carbocatión secundario **III** no sería lo suficientemente estable como para guiar la reacción hacia la expansión.

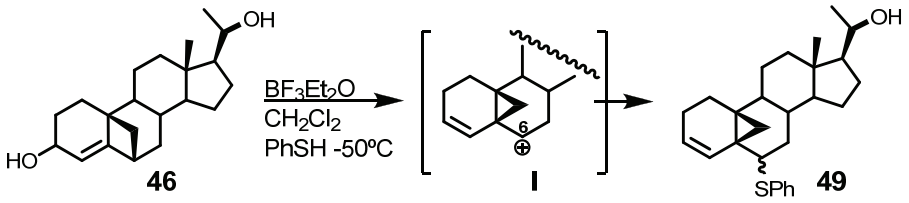


Figura 3.36: reordenamiento catiónico de **46**, carbocatión intermediario atrapado.

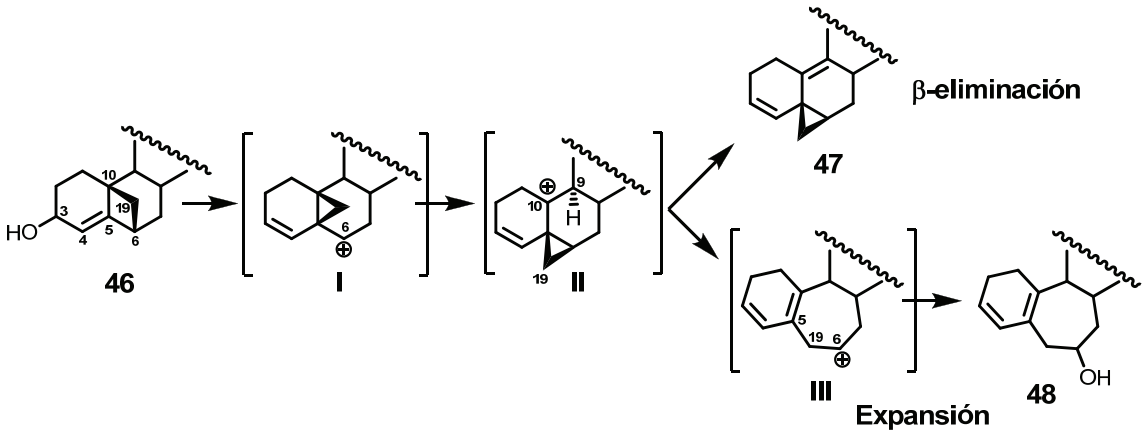


Figura 3.37 Mecanismo propuesto para el reordenamiento catiónico de **46**

3.5 Resumen

En resumen, se sintetizaron 4 análogos de neuroesteroides y dos análogos de progesterona aplicando una reacción de expansión de anillo catalizada por ácidos de Lewis promovida por microondas y una epoxidación regioselectiva catalizada por dioxiranos. La actividad biológica de estos 6 análogos se presenta en el capítulo 4.

CAPÍTULO 4

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En este capítulo se describe la actividad biológica de los compuestos sintetizados y se analizan las relaciones estructura-actividad.

4.1 Actividad Biológica de Análogos Neuroesteroides

4.1.1 Análogos de Neuroesteroides 1-4

Los análogos flexibles del neuroesteroide allopregnanolona, **1**-**4** (figura 4.1) fueron diseñados a partir de un estudio realizado por Covey y *col.* quienes sintetizaron y estudiaron la actividad de una serie de análogos no esteroidales de neuroesteroides derivados de *trans-trans* benz[e]indenos sobre el receptor $GABA_A$.[1] Los autores demostraron que la actividad GABAérgica no requiere de la rigidez impuesta por el núcleo esteroidal sobre la función 3α-hidroxi, en la que el grupo hidroxilo tiene una orientación fija hacia la cara alfa de la molécula.[2,3] La gran flexibilidad conformacional de los análogos derivados de benz[e]indenos les permitiría imitar tanto la función 3α como 3β-hidroxi de los esteroides, siendo capaces de unirse tanto al sitio potenciador como al sitio inhibidor del receptor $GABA_A$. Con el fin de explorar este efecto en mayor profundidad, se prepararon los A-homoanálogos **1**-**4** (Figura 4.1), cuya síntesis se detalló en el capítulo 3 de esta tesis. Como ya se mencionó anteriormente, a diferencia de un anillo A de seis miembros, el anillo A expandido de siete miembros presente en éstos análogos otorga mayor libertad conformacional aunque más restringida que en el caso de los derivados de benz[e]indenos mencionados.

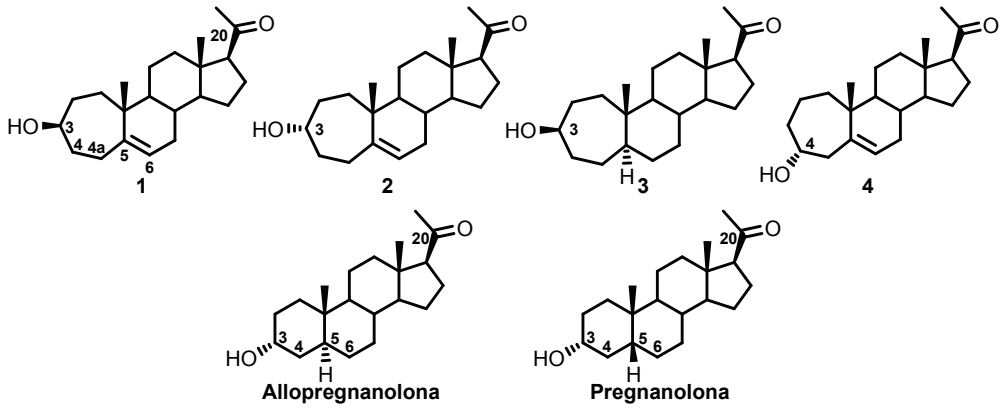


Figura 4.1: Análogos flexibles **1**-**4** sintetizados en esta tesis y esteroides neuroactivos naturales.

[1] Covey, D.F., Hu, Y., Bouley, M.G., Holland, K.D., Rodgers-Neame, N.T., Isenberg, K.E., Zorumski, C.F., *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 627-630.
[2] Han, M., Hu, Y., Zorumski, C. F., Covey, D.F., *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4548-4556
[3] Li, P., Covey, D.F., Steinbach, J.H., Akk, G., *Mol. Pharmacol.*, **2006**, *69*, 2015-2016

La relación estructura-actividad entre esteroides neuroactivos (NAS) y el sitio de unión de neuroesteroides del receptor de $GABA_A$ se encuentra estudiada en la bibliografía mediante diversos ensayos biológicos: pruebas de binding, electrofisiológicas y de comportamiento han sido ampliamente utilizadas, aunque no de modo sistemático, de manera que es difícil comparar los resultados obtenidos a través de las diferentes metodologías. El ensayo de unión de [^{35}S]-*t*-butil-biciclo[2,2,2]fosforotionato (TBPS) en membranas de sinaptosomas de cerebelo de rata es uno de los ensayos más utilizados. El TBPS es un convulsivo que se une al sitio de unión de la picrotoxina en el receptor del $GABA_A$ y se sabe que los neuroesteroides desplazan alostéricamente al TBPS de su sitio de unión, de modo que este ensayo *in vitro* refleja el estado funcional del receptor y sirve para la caracterización de la interacción alostérica de los distintos sitios del receptor.[4,5]

La actividad de los A-homo análogos sintetizados fue determinada por el grupo de investigación del Dr. Alexander Kasal, del Instituto de Química Orgánica y Bioquímica de la Academia de Ciencias de la República Checa como parte de un proyecto de colaboración internacional CONICET-CSAV. En los ensayos realizados se determinó la actividad de los análogos sintéticos **1**-**4** midiendo su efecto inhibitorio sobre la unión de [^{35}S]TBPS al receptor $GABA_A$ con allopregnanolona como control positivo.

Como se muestra en la tabla 4.1, los compuestos **2** y **4**, que poseen el hidroxilo en el anillo A con orientación α, presentaron una CI_{50} en el rango micromolar siendo considerablemente menos activos que los esteroides naturales. Cálculos *ab initio* demostraron que, si bien estos A-homoesteroides adoptan una conformación global curvada similar a la de pregnanolona, los intentos de superponer las estructuras de **2** y **4** con este neuroesteroide sólo dieron encajes pobres.

Por otro lado el compuesto **1**, que posee el hidroxilo en C-3 con orientación β, presentó una CI_{50} similar a la de allopregnanolona y pregnanolona, aunque con una inhibición máxima menor. Si bien el confórmero de mínima energía de **1** posee el hidroxilo de C-3 con orientación opuesta a allopregnanolona y pregnanolona, existen otros dos confórmeros que difieren en sólo 3,3 kcal/mol. Uno de estos confórmeros tiene un ajuste excelente sobre la estructura de la pregnanolona con las funciones 3-hidroxi y la cadena lateral de C-17 ocupando posiciones muy similares en el espacio para ambos compuestos (figura 4.2).

[4] Veleiro, A.S., Burton, G., *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16*, 455-472
[5] Im, W.B., Blakeman, D.P., *Mol. Pharmacol.*, **1991**, *39*, 394-398

Entrada	Compuesto	I_{max} (%)	CI_{50}(nM)
1	**1**	50±10	100±50
2	**2**	80±20	1200±600
3	**3**	50±20	1000±20
4	**4**	50±10	800±20
5	Pregnanolona[6]		71
6	Allopregnanolona[7]	80±5	80±20

Tabla 4.1: Inhibición de la unión de [^{35}S]TBPS en membranas de sinaptosomas de cerebelo de rata por los análogos **1-4**. I_{max}: máxima supresión de unión. CI_{50}: concentración de esteroide que produce la mitad de la supresión máxima.

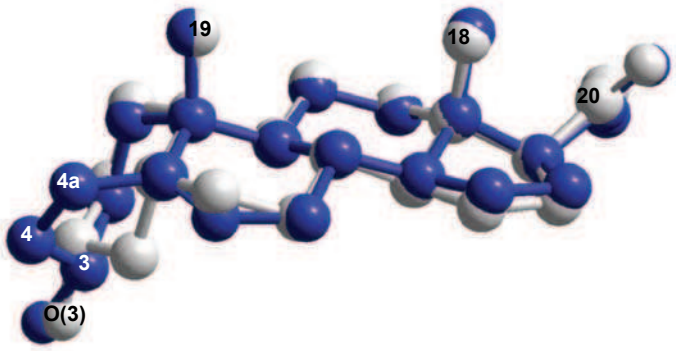


Figura 4.2: Superposición de **1** (azul) y pregnanolona (blanco) por cálculos HF/6-31G(d,p). La superposición corresponde al mejor ajuste de los carbonos 20, 16, 13, 11, 10, 8 y el oxígeno de C-3 (error RMS 0,22 Å). Distancia O(3)-C(20) para pregnanolona 9,61 Å y para **1** 9,93 Å.

Por otro lado, la reducción del doble enlace en C-5 del análogo **1** condujo a una marcada disminución de la actividad de aproximadamente un orden de magnitud (Tabla 4.1, entrada 3). Cálculos *ab initio* mostraron que la presencia de un carbono sp^3 en la posición C-5 reduce la flexibilidad del anillo A impidiendo que el compuesto **3** adopte una conformación similar a la de **1**. En conclusión, la movilidad conformacional del anillo de 7 miembros combinada con la flexibilidad de la unión de los anillos A/B que aporta el doble enlace en C-5 permitiría con una pequeña penalidad energética, que el compuesto **1** con una funcionalidad 3β-hidroxi, adopte una conformación en el sitio activo del receptor $GABA_A$ que imita a la de la pregnanolona alcanzando una actividad comparable al neuroesteroide natural.

[6] Covey, D. F., Nathan, D., Kalkbrenner, M., Nilsson, K.R., Hu, Y., Zorumski, C.F., et al. *J. Pharmacol.Exp. Ther.,* **2000**, *293*, 1009-1116

[7] Slavíková, B., Kasal, A., Chodounská, Z., Krištofoková, Z., *Coll. Czech Chem. Commun.* **2002**, *67*, 30-46

4.2 Actividad Biológica de Análogos de Hormonas Esteroidales

4.2.1 Análogo de Glucocorticoides 5

Figura 4.3: Análogo no hidrolizable del 21HS-6,19OP (**5**) sintetizado en esta tesis y compuestos relacionados.

El compuesto **5** se eligió como una primer aproximación a un análogo no hidrolizable de 21HS-6,19OP, un modulador selectivo del GR derivado del antiglucocorticoide selectivo 21OH-6,19OP ambos sintetizados previamente en nuestro grupo de investigación (figura 4.3).[8,9] Como ya se mencionó (capítulo 1), si bien ambos compuestos son selectivos para el GR, 21OH-6,19OP es un antagonista mientras que su derivado 21-hemisuccinato (21HS-6,19OP) posee una actividad agonista moderada y antagonista fuerte tejido dependiente. Sin embargo, la unión éster fácilmente hidrolizable *in vivo* de 21HS-6,19OP requiere su modificación sintética para una potencial aplicación. La síntesis de **5** fue descrita en el capítulo 2, a continuación se presentan los resultados de actividad biológica.

Como primera aproximación a la actividad biológica del análogo **5**, se evaluó la capacidad de transactivación sobre el GR y su efecto sobre dexametasona *in vitro*. Para ello, se utilizaron células BHK, que expresan el GR endógeno. Estas se cotransfectaron con el gen reportero pMMTV-Luc (plásmido que codifica para la enzima luciferasa bajo control del promotor del Virus de Tumor Mamario de Ratón (MMTV), promotor que contiene varias unidades de elementos de respuestas a hormonas (HRE)) y un plásmido control (LacZ). En los ensayos se utilizó dexametasona como control positivo y mifepristona como control positivo del antagonismo. A diferencia de su líder, en los ensayos se observó que el análogo **5** no presentaba actividad agonista ni antagonista cuando se lo administró a una concentración de 10^{-5} M.

La carencia de actividad de **5** estaría indicando una baja afinidad del compuesto por el GR. Como se mencionó en el capítulo 2 (pag 30) los estudios de dinámica molecular del

[8] Vicent. G. P., Monteserín, M. C., Veleiro, A. S., Burton, G., Lantos, .C. P., Galigniana, M. D., *Mol. Pharmacol.*, **1997**, *52*, 749–753

[9] Álvarez, L.D., Martí, M.A., Veleiro, A.S., Misico, R.I., Estrin, D.A., Pecci, A., Burton, G, *Chem.Med.Chem.*, **2008**, 1869-1877

complejo GR-LBD-**5** mostraban que el reemplazo del grupo carboxilato de éster por dos metilenos daba lugar a un cambio conformacional de la cadena lateral (ver figura 2.4b, página 30). Ese cambio conformacional que podría estar favorecido por el aumento de lipofilicidad de la cadena lateral sería el causante de la pérdida de actividad.

4.2.2 A-Homo Análogos de Progesterona 6 y 7

Actividad biológica: ensayos de transactivación del gen reportero MMTV-Luc

Los análogos **6** y **7** fueron obtenidos como intermediarios en la síntesis de los A-homo análogos de neuroesteroides **1**-**4** y su síntesis fue descrita en el capítulo 3 de esta tesis. La similitud estructural que presentaban **6** y **7** con progesterona (figura 4.4) nos llevó a evaluar cómo afectaba la flexibilidad del anillo A la actividad sobre el PR y a la selectividad respecto de otros receptores. En particular la interacción cruzada de progesterona con el MR y el GR podría estar involucrada en diferentes desordenes metabólicos, por ejemplo durante el embarazo, por lo cual resultaba de interés la obtención de análogos de progesterona selectivos por el PR. Con este objetivo se midió la actividad transcripcional de los análogos **6** y **7** sobre los receptores PR y MR.

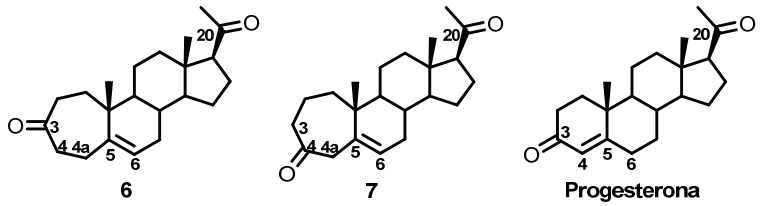


Figura 4.4: Estructura de progesterona y de los análogos flexibles **6** y **7** sintetizados en esta tesis.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de transactivación de **6** y **7** sobre el PR. Para ello se cotransfectaron células Cos-1 con el gen reportero pMMTV-Luc, phPR que expresa la isoforma B del PR humano y un plásmido control de transfección. La figura 4.5 muestra que ambos A-homo análogos presentan actividad progestágena cuando son administrados a concentraciones de 10^{-5} y 10^{-6} M. Además, los resultados indicaron que el compuesto **7** era más activo que **6** a una concentración de 10^{-5} M.

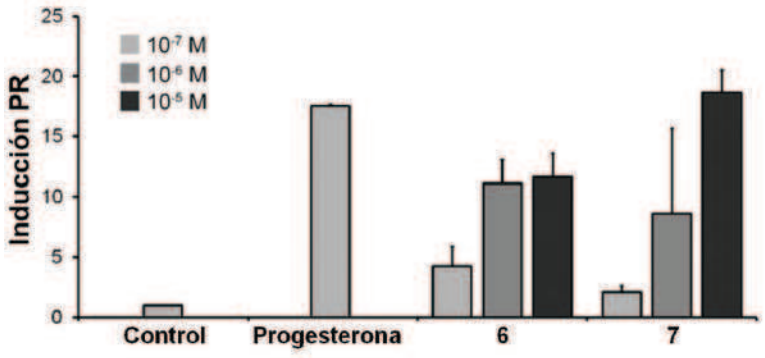


Figura 4.5: La actividad de transactivación en PR de **6** y **7** se evaluó sobre células Cos-1 cotransfectadas con 1 μg de ph-PR, 3 μg del gen reportero pMMTV-Luc y 1 μg de pCMV-LacZ. Las células se incubaron por 24 horas. Luego de normalización por actividad de β-galactosidasa, los valores se expresan como inducción con respecto al control (células no tratadas). El desvío se calculó en base a tres experimentos independientes.

La actividad de transactivación de los A-homoesteroides **6** y **7** sobre el MR se determinó de igual manera que para el PR, pero utilizando el plásmido phMR que expresa el MR humano. Los resultados se muestran en la figura 4.6 y se observa que, a diferencia de la progesterona, los análogos no presentan actividad mineralocorticoidea ni antimineralocorticoidea apreciable. Estos ensayos demuestran que la introducción de un átomo de carbono adicional en el anillo A combinado con el doble enlace en C-5 produce compuestos capaces de actuar selectivamente sobre el PR.

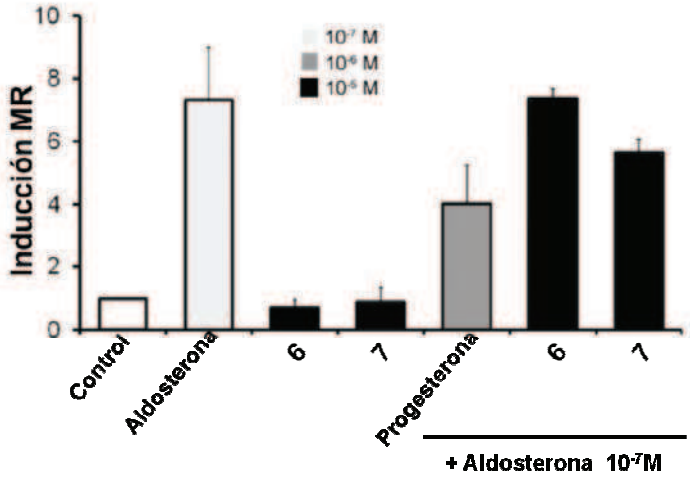


Figura 4.6: La actividad de transactivación en MR de **6** y **7** a 10^{-5} M y su efecto sobre la actividad de la aldosterona se evaluó sobre células Cos-1 cotransfectadas con 1 μg de ph-MR, 3 μg del gen reportero pMMTV-Luc y 1 μg de pCMV-LacZ. Las células se incubaron por 24 horas. Luego de normalización por actividad de β-galactosidasa, los valores se expresan como inducción con respecto al control (células no tratadas). Se utilizó progesterona 10^{-6} M como control positivo del ensayo de antagonismo de aldosterona. El desvío se calculó en base a tres experimentos independientes.

Actividad biológica: ensayos de expresión del gen bcl-x

Para una caracterización más profunda de los compuestos **6** y **7**, la Lic. Paola Bertucci del Laboratorio de Expresión Génica en Mama y Apoptosis (IFIBYNE, CONICET-UBA) evaluó los niveles de transcripción de las isoformas del gen bcl-x en células epiteliales de cáncer de mama T47D. El gen bcl-x sufre splicing alternativo para producir dos proteínas con actividades opuestas: bcl-xL, con actividad antiapoptótica, y bcl-xS, con actividad proapoptótica. Bcl-xL se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama y su sobreexpresión es dependiente de progesterona y glucocorticoides. La figura 4.7 muestra que, a una concentración de 10^{-6} M, ambos análogos sintéticos presentaron una inducción de la expresión de la isoforma bcl-xL similar a la que genera progesterona 10^{-7} M. En resumen, los dos análogos presentan actividad progestágena apreciable siendo el compuesto **7** más activo que **6** en concordancia con los resultados de transactivación.

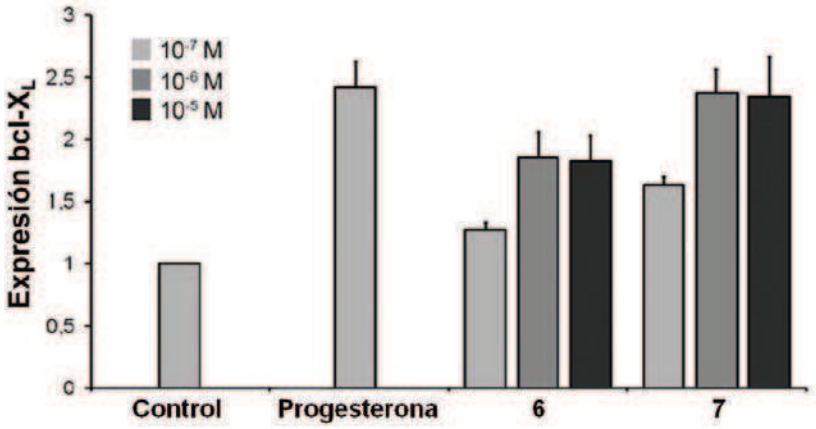


Figura 4.7: La expresión de bcl-xL se evaluó en células T47D incubadas durante 6 horas. El ARN se extrajo y se cuantificó por qPCR. Los valores se expresan como inducción con respecto al control (células no tratadas). El desvío se calculó en base a tres experimentos independientes.

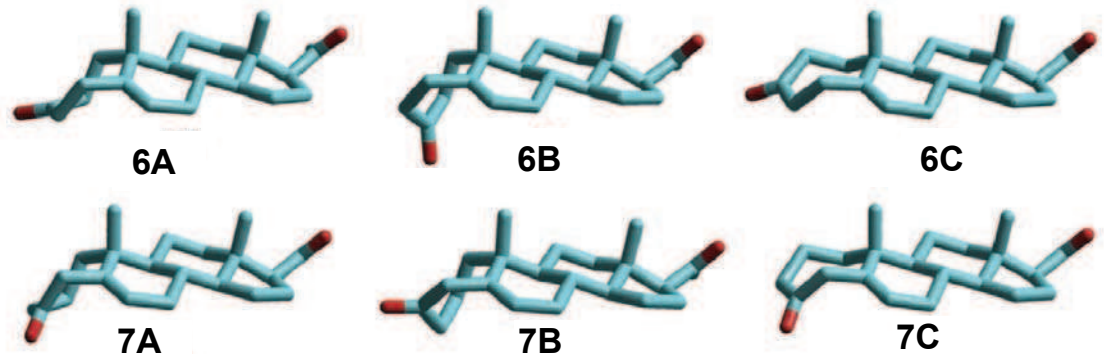
Análisis conformacional de los análogos y análisis del modo de unión al PR-LBD

Con el fin de establecer una relación de estructura-actividad, el Dr. Lautaro Alvarez realizó un estudio conformacional de los análogos y analizó el modo de unión de éstos al PR por métodos computacionales.

En los A-homo análogos **6** y **7**, la alta libertad conformacional que otorga el anillo A de 7 miembros, combinada con la alta flexibilidad de la unión A/B que produce el doble enlace en C-5, les permite explorar diversas conformaciones. Las estructuras de los A-homo análogos fueron minimizadas utilizando el método semiempiríco AM1 partiendo de diferentes geometrías iniciales. Para ambos compuestos se encontró que sólo existen cinco mínimos diferentes que

fueron optimizados por el método HF6-31G** para obtener las correspondientes estructuras y sus energías. Para ambos compuestos se observaron dos grupos muy distintos de confórmeros: tres de baja energía, dentro de los 1,5 kcal/mol del más estable (confórmeros A, B y C, figura 4.8), y dos de alta energía, con más de 5,5 kcal/mol de diferencia. Los confórmeros de alta energía presentan una desestabilización debida a la interacción estérica desfavorable que produce una conformación torsionada hacia la cara β entre el anillo A y el metilo 19; por esa razón, fueron descartados. Dentro de los confórmeros más estables del compuesto **6**, 6A y 6B sólo difieren en la orientación del carbonilo en el anillo A: lo mismo ocurre con los confórmeros más estables de **7** (7A y 7C).

Los complejos PR-LBD-ligando fueron construidos *in silico* a partir de la estructura cristalina del complejo PR-LBD-progesterona (pdb:1a28). Luego fueron inmersos en una caja de agua TIP3P, equilibrados y simulados por MD (Amber) durante 10 ns. Durante el equilibrado, los confórmeros 6B y 7A evolucionan respectivamente a los confórmeros 6A y 7B, por lo tanto, estas trayectorias fueron descartadas.



Entrada	Confórmero	Ángulo de torsión[a]				ΔE_g [b] kcal/mol	ΔE_{aq} [c] kcal/mol
		T1	T2	T3	T3´		
1	**6A**	-173	-97	-57	-	0,00	0,00
2	**6B**	-171	-102	29	-	1,21	0,96
3	**6C**	-52	-104	42	-	1,29	1,05
4	**7A**	-159	-86	-	48	0,00	0,00
5	**7B**	-174	-107	-	-73	0,76	0,74
6	**7C**	-56	-103	-	23	1,62	1,46

Figura 4.8: Confórmeros más estables de **6** y **7**. [a]T1 (C19-C10-C1-C2) describe la orientación de C2, T2 (C6-C5-C4a-C4) describe la orientación de C4, T3 (C1-C2-C3-C4) y T3´(C2-C3-C4-C4a) describe la orientación del átomo de oxígeno de **6** y **7** respectivamente. [b] Energía en fase gaseosa relativa al confórmero 6A o 7A.[c] Energía en fase acuosa relativa al confórmero 6A o 7A.

La figura 4.9 muestra el modo de unión observado en cada caso; las gráficas a la derecha de cada estructura muestran la evolución temporal de la distancia entre el grupo ceto del anillo A del ligando y la Arg766 y la Gln725. La simulación por dinámica molecular mostró que, al igual que en la estructura de rayos X del complejo PR-LBD/progesterona, el grupo 3-ceto de progesterona interacciona con Arg766, Gln725 y una molécula de agua. En el caso del análogo **6** sólo el confórmero 6C (menos estable) presenta un modo de unión y una frecuencia en la red de puentes hidrógeno similar a progesterona. Por otro lado, en la dinámica molecular del confórmero 6A se observa la rotación de la cadena lateral de la Arg766, efecto que desencadena la pérdida de la interacción, la expansión de la cavidad y la entrada de múltiples moléculas de agua; el confórmero 6B evoluciona al 6A durante la simulación. En el caso del análogo **7**, el confórmero 7B se une de modo análogo a la progesterona con frecuencias de puente hidrógeno aún mayores que la hormona natural, mientras que 7C provoca la rotación de la Gln725 observándose un fenómeno similar al observado con 6A. El confórmero 7A evoluciona al 7B durante la simulación.

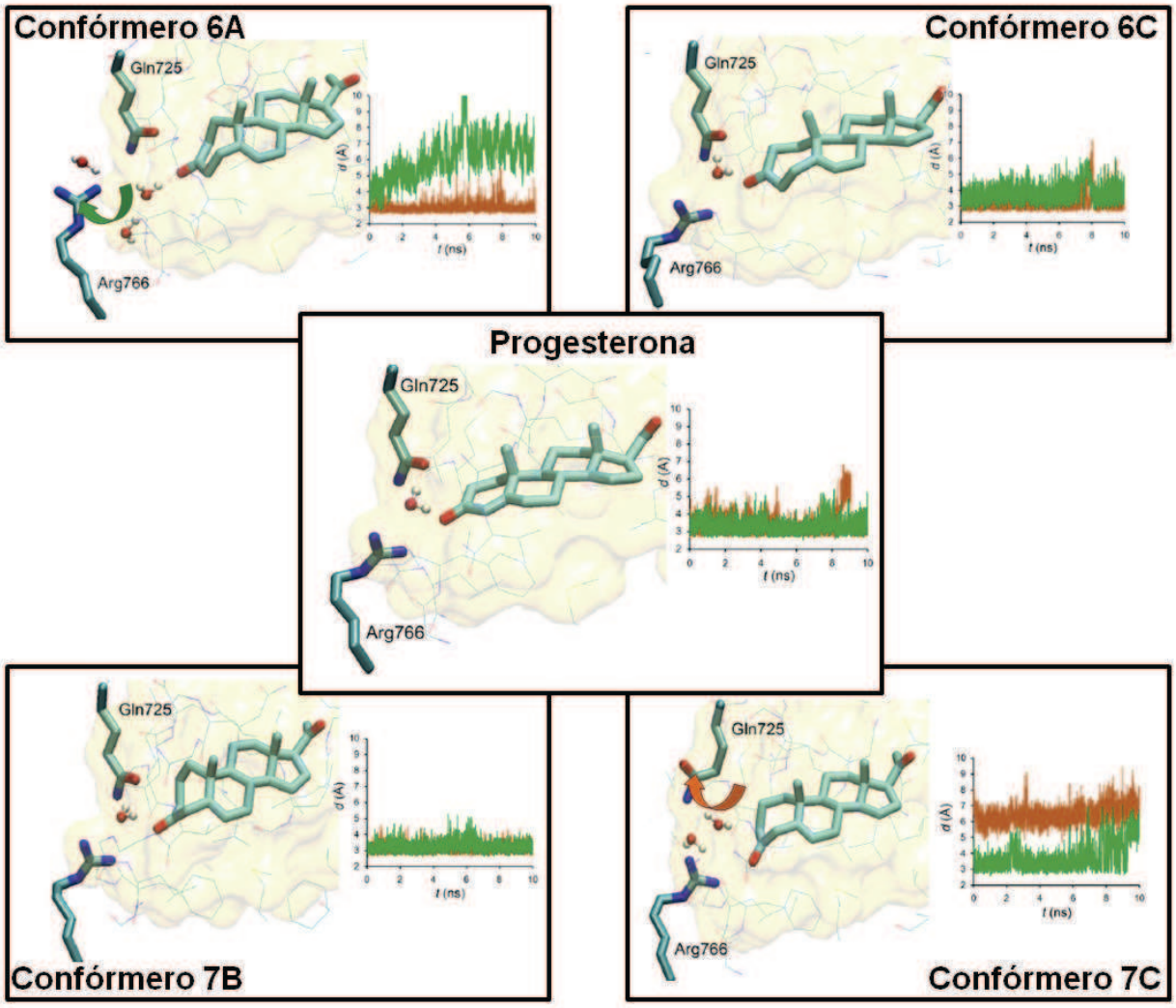


Figura 4.9: Representación del modo de unión de los confórmeros 6A y 6C, 7B y 67 y de progesterona durante la MD. Las gráficas muestran la evolución temporal de las distancias entre el C=O y el nitrógeno del guanidinio de la Arg766 (verde) y el nitrógeno de la amida de la Gln725 (naranja).

Entrada	Contribución Energética	Energía de interacción proteína ligando				
		P4	6C	7B	6A	7C
1	Electrostática	-23,3	-17,1	-16,8	-10,2	-10,4
2	Van der Waals	-50,4	-53,6	-54,7	-53,5	-50,9
3	MM (Ele + VdW)	-73,7	-70,8	-71,5	-63,7	-61,3
4	ΔG	-45,9	-46,9	-48,0	-45,6	-40,5

Tabla4.2: Contribuciones energéticas del los complejos PR-LBD con los confórmeros de **6** y **7** (Kcal/mol) P4: progesterona

Discusión

Los análogos **6** y **7**, que solamente difieren en la posición del carbonilo en el anillo A, demostraron ser agonistas selectivos del PR siendo **7** más activo que **6**. Mediante cálculos semiempíricos y *ab initio* se comprobó que existen al menos 5 confómeros de mínima energía para cada análogo y en concordancia con los datos de actividad biológica, métodos computacionales de simulación demostraron que ambos análogos tienen un confórmero capaz de ser reconocido por el PR. La mayor actividad de **7** sobre **6** podría deberse a que el complejo que forma 7B con el PR es más estable que el de 6C (tabla 4.2). Además, el compuesto **7** tiene dos confórmeros de baja energía (7A y 7B) capaces de converger a un modo de unión óptimo a través de una barrera energética baja, mientras que **6** tiene sólo uno (6C). Así, **7** tiene una población mayor de confórmeros capaces de ser reconocidos por el PR que **6**: esto podría explicar su mayor actividad.

Resulta interesante la fuerte interacción de los ligandos con la molécula de agua que se observa en las estructuras de los complejos de los ligandos con el PR. Un reemplazo isostérico que incorpore la molécula de agua al ligando reduciría la pérdida de entropía de unión manteniendo la interacción de puente de hidrógeno. En un proyecto futuro, esto podría contribuir al diseño de nuevos análogos de mayor afinidad.

Si bien no se estableció a nivel molecular la razón por la cual los análogos **7** y **6** son incapaces de activar el MR, esto puede obedecer al aumento de la hidrofobicidad del anillo A por el agregado de un átomo de carbono. La única diferencia que hay en los bolsillos de unión del PR y el MR en las inmediaciones del anillo A es un reemplazo de una metionina (no polar) en el PR por una serina (polar) en el MR. Por lo tanto, la mayor superficie hidrofóbica que presentan los A-homo análogos, comparada con la de progesterona, podría desestabilizar el complejo receptor-ligando impidiendo que estos se unan y explicando la selectividad de estos análogos por el PR.

Finalmente, la capacidad de transactivación de **6** y **7** sobre el GR se ensayó utilizando el gen reportero MMTV-Luc en células BHK que expresan el GR endógeno empleando dexametasona como control positivo y mifepristona como control positivo de ensayo de antagonismo de dexametasona. Resultados preliminares indicarían que los análogos también carecen de efecto sobre este receptor. Estos ensayos demuestran que es posible incrementar sensiblemente la especificidad de la progesterona por el PR mediante la introducción de un átomo de carbono adicional en el anillo A combinado con el doble enlace en C-5.

4.4 Resumen

Se estableció la actividad biológica y la relación estructura-actividad de los 7 análogos sintetizados en esta tesis. En cuanto a los análogos de esteroides neuroactivos el compuesto **1** resultó ser el más activo de la serie de A-homoanálogos de esteroides neuroactivos, con una actividad comparable a la del neuroesteroide natural pregnanolona. Por otro lado los ensayos de actividad de los análogos de hormonas mostraron que el compuesto **5**, análogo no hidrolizable del 21HS-6,19-OP resultó ser inactivo, mientras que los A-homo análogos de progesterona **6** y **7** resultaron ser agonistas selectivos del PR.

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Generalidades

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^{1}H) y de carbono (RMN ^{13}C) se realizaron en un espectrómetro Bruker AC-200 a 200,13 y 50,32 MHz, respectivamente, o en un espectrómetro Bruker Avance II 500 a 500,13 y 125,77 MHz respectivamente. En todos los casos se utilizó cloroformo deuterado como solvente, en tubos de 5 mm de diámetro. Los desplazamientos químicos para RMN ^{1}H se expresan en la escala δ, en partes por millón (ppm) respecto del tetrametilsilano utilizado como referencia interna (0,00 ppm). Las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hz. Las señales se indican en cada caso como singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), quinteto (q) y multiplete (m). Los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C se expresan en ppm utilizando como referencia el pico central correspondiente a la señal del cloroformo deuterado (77,0 ppm)

Las asignaciones completas de los espectros protónicos y de ^{13}C de los compuestos descriptos fueron realizadas utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales. La estrategia básica utilizada consistió en utilizar simultáneamente los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C y aquellos de correlación hetero y homonuclear a distancia de un enlace (COSY, HSQC-DEPT) o más (HMBC). Cuando fue necesario determinar o confirmar la orientación espacial de algún grupo presente en la molécula se recurrió al espectro NOESY.

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

Los espectros IR se adquirieron en un film delgado utilizando dicos de KBr en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet Magna 550.

El análisis elemental (CHN) fue realizado por la Lic. Maria de las Mercedes Rivero (UMYMFOR, CONICET-UBA) en un analizador Exeter CE 440. Las muestras para microanálisis fueron secadas a 60ºC en vacío durante dos horas con pentóxido de fósforo como agente desecante.

Los espectros de masa (EM) por introducción directa se realizaron en un espectrómetro Thermo DSQ II, ionizando con impacto electrónico a 70 eV. Los espectros de masa de alta resolución (EMAR) se realizaron en un espectrómetro Bruker micrOTOF-Q II con analizador TOF de alta resolución e ionización ESI en modo positivo (UMYMFOR CONICET-UBA).

Las cromatografías analíticas en capa delgada (CCD) se realizaron utilizando la técnica ascendente en soportes de aluminio (Sílicagel 60 F254, Merck). La detección se hizo por inmersión de las placas en una solución de ácido sulfúrico 20% en etanol o una solución de $Ce(SO_4)_2$ 0,1% p/v y $Mo_7O_{24}(NH_4)_6$ 5 % p/v en H_2SO_4 10% y posterior calentamiento a 120ºC o por detección al UV (254 nm).

Las cromatografías en capa delgada preparativas para muestras de hasta 25 mg se realizaron en cromatoplacas para CCD en soporte de aluminio (Sílicagel 60 F254, Merck).

Las cromatografías flash (CF) en columna se realizaron según Still y *col.* utilizando sílicagel (Sílicagel 60, malla 230-400 Merck o Florisil) y aplicando presión de nitrógeno para acelerar el paso del solvente de elución, el cual se indica en cada caso.[1]

Las cromatografías flash en columna seca (CFCS) se realizaron según Harwood y *col.* utilizando sílicagel (Silicagel 60 G, Merck) en embudos con placas filtrantes de vidrio sinterizado y haciendo vacío para acelerar el paso del solvente de elución, el cual se indica en cada caso.[2]

La reacción asistida por microondas fue realizada en un reactor CEM Discover en tubo cerrado con *power max* habilitado.

Purificación de Solventes y reactivos [3]

Todos los solventes utilizados en cromatografía y extracción (*n*-hexano, acetato de etilo, metanol, cloruro de metileno) se purificaron por destilación fraccionada y los solventes anhidros se destilaron en atmósfera de nitrógeno.

Diclorometano: se secó sobre pentóxido de fósforo durante 18 hs y se destiló recogiéndolo sobre tamices moleculares de 4 Å.

Cloroformo: se secó sobre pentóxido de fósforo durante 18 hs y se destiló recogiéndolo sobre tamices moleculares de 4 Å.

Tetrahidrofurano: se secó inicialmente sobre tamices moleculares de 4 Å durante 48 hs, se reflujó sobre cinta de sodio y benzofenona hasta color azul. Se destiló antes de usar.

Dimetilformamida: se secó sobre tamices moleculares de 4 Å.

Clorotrimetilsilano: se destiló sobre quinolina, bajo atmósfera de nitrógeno.

Eterato de trifluoruro de boro: se agregó una pequeña cantidad de éter etílico y se destiló sobre CaH_2 a presión reducida.

Diisopropilamina: se secó sobre hidróxido de sodio toda una noche. Luego se destiló sobre NaH bajo atmósfera de nitrógeno.

Piridina: se secó sobre hidróxido de sodio toda una noche.

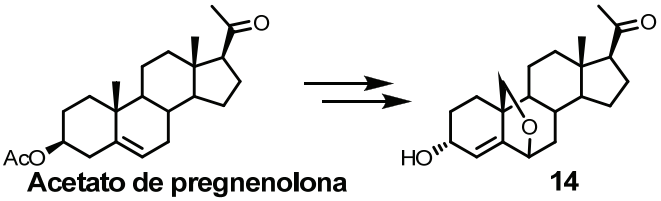
Propionaldehido: Se secó sobre $CaCl_2$ toda una noche, se realizó una destilación fraccionada sobre $CaCl_2$ fresco bajo atmósfera de nitrógeno. Se recogió sobre tamices moleculares 4 Å activados

LDA: En un balón de 10 ml purgado con argón se agregó diisopropilamina anhidra (346 µl, 2,45 mmol), se llevó a un baño a -78ºC, y se agregó *n*-butillitio (2,37 ml, 1,1 M, 2,60 mmol). Se agitó hasta la precipitación de un sólido blanco y luego se llevó a temperatura ambiente hasta la redisolución del mismo. El balón se volvió a llevar a -78ºC, se agregó THF anhidro (1,28 ml) y se agitó durante 15 minutos más. La solución de LDA se usó en el momento.

[1] Still, W.C., Khan y Mitra, A., *J.Org.Chem.*, **1978**, *43*, 2923-2927.
[2] Harwood, L.M., *Aldr.Chim.Acta*, **1985**, *18*, 25-27.
[3] Perrin, D. D., Armarego, W. L. F., "Purification of laboratory Chemicals" 3ra ed., Pargamon Press, 1988, Oxford.

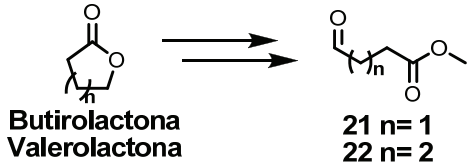
5.2 Detalles experimentales

3α-Hidroxi-6,19-epoxipregn-4-en-20-ona (14)



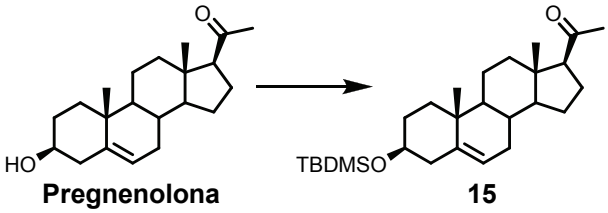
Se sintetizó a partir de acetato de pregnenolona según el procedimiento descripto por Veleiro y *col.* [4]

4-Oxobutirato de metilo (21) y 5-oxovalerato de metilo (22)



Se sintetizaron a partir de las lactonas correspondientes según el procedimiento descripto por Duffy y *col.*[5]

3β-*t*-butildimetilsililoxi-5-pregnen-20-ona (15)



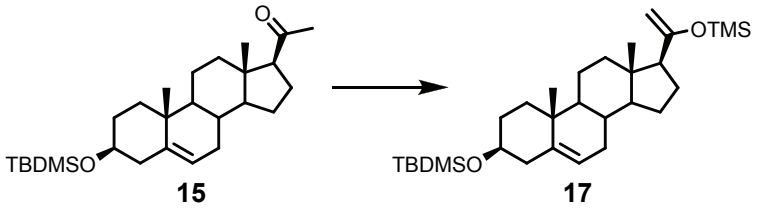
Se sintetizó a partir de pregnenolona (Steraloids Inc., USA) según el procedimiento descripto por Phillipou y *col.* [6]

[4] Veleiro, A. S., Rosenstein, R. E., Jalifa, C. O., Grilli, M. L., Speroni, F., Burton, G.; *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2003**, *13*, 343-346

[5] Duffy, M. G., Grayson, D.H., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 1555-156.

[6] Phillipou, G.; Bigham, D. A.; Seamark, R. F, *Steroids*, **1975**, 26 (4), 516-524

3β-*t*-Butildimetilsililoxi-20-trimetilsililoxi-5,20-pregnadieno (17)



Se disolvió el esteroide **15** (200 mg, 0,465 mmol) en THF anhidro (5,6 ml) y la solución se enfrió a -78ºC en atmósfera de Argón. Se agregó un solución de LDA (3,79 ml, 2,32 mmol) y se agitó 20 minutos a -78ºC. Luego se agregó clorotrimetilsilano (0,59 ml, 4,64 mmol) y se dejó llegar a temperatura ambiente por 20 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con una solución de trietilamina en THF al 1%, la fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ (ss), se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El sólido se secó en estufa de vacío y se utilizó rápidamente en el siguiente paso de reacción.

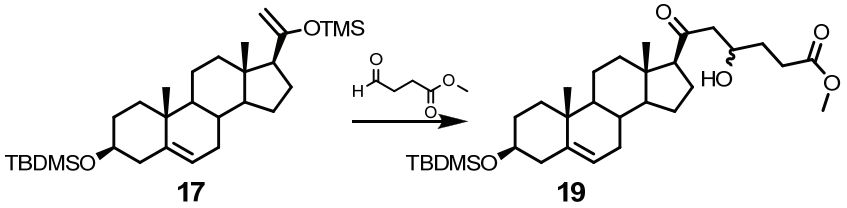
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,32 (1H, dt, *J*= 1,5 y 5,3, H-6), 4,09 (1H, d, *J*= 0,7, H-21a), 4,05 (1H, d, *J*= 0,7, H-21b), 3,48 (1H, m, H-3), 2,27 (1H, m, H-4β), 2,17 (1H, ddd, *J*= 13,2, 4,9 y 2,1, H-4α), 2,01 (1H, m, H-17), 1,99 (1H, m, H-7α), 1,97 (1H, m, H-12β), 1,81 (1H, dt, *J*= 13,2 y 3,5, H-1β), 1,72 (1H, m, H-2α), 1,69 (3H, m, H-16 y H-15β), 1,55 (1H, m, H-7β), 1,54 (1H, m, H-11α), 1,53 (1H, m, H-2β), 1,46 (1H, m, H-8), 1,44 (1H, m, H-11α), 1,19 (1H, m, H-15α), 1,14 (1H, m, H-12α), 1,04 (1H, m, H-1α), 1,03 (1H, m, H-14), 1,00 (3H, s H-19), 0,93 (1H, m, H-9), 0,89 (9H, s, 3-$(CH_3)_3$CSi), 0,62 (3H, s, H-18), 0,20 (9H, s, $((CH_3)_3$Si), 0,06 (6H, s, $(CH_3)_2$Si).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 160,11 (C-20), 141,68 (C-5), 121,06 (C-6), 89,60 (C-21), 72,63 (C-3), 56,29 (C-17), 56,18 (C-14), 50,42 (C-9), 43,01 (C-13), 42,83 (C-4), 38,62 (C-12), 37,42 (C-1), 36,67 (C-10), 32,15 (C-8), 32,10 (C-2), 31,90 (C-7), 25,94 (($\mathbf{C}H_3)_3$CSi), 24,56 (C-15), 24,35 (C-16), 21,10 (C-11), 19,47 (C-19), 18,28 ($(CH_3)_3\mathbf{C}$Si), 12,67 (C-18), 0,37 ($(CH_3)_3$Si), -4,58 ($\mathbf{C}H_3$CSi).

Reacción de Mukaiyama:

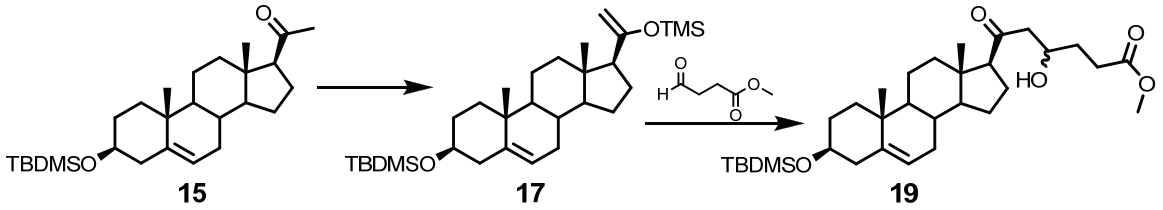
6-(3β-*t*-Butildimetilsililoxi-androst-5-en-17β-il)-6-oxo-4-hidroxihexanoato de metilo (19)

Método 1:



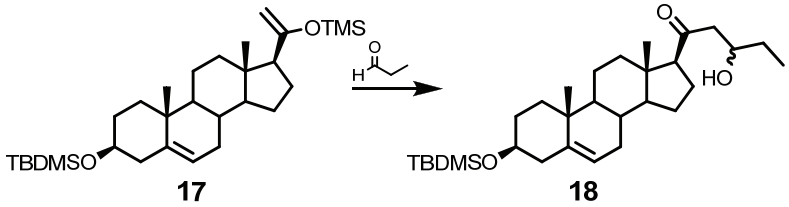
Una solución del sililenoleter **17** (400 mg, 0,298 mmol) en diclorometano seco (7,5 ml) se enfrió a -78ºC bajo atmósfera de Argón y se agregó el aldehído **21** (90 µl, 0,745 mmol) y eterato de trifluoruro de boro (45 µl, 0,329 mmol). Se agitó por 30 minutos a -78ºC, luego se agregó $NaHCO_3$ (ss) y se extrajo. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El producto crudo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 95:5) para dar el compuesto **19** (152 mg, 30%) como un sólido amorfo, recuperándose parcialmente la cetona **15**.

Método 2:



En un balón se colocó el esteroide **15** (800 mg, 1,9 mmol), se purgó con argón, se agregó THF anhidro (25ml), se enfrió a -78°C y se agregó una solución de LDA en THF (4,5 ml, 2 M, 9,0 mmol). La reacción se agitó durante 20 minutos, luego se agregó clorotrimetilsilano (0,94 µl, 7,5 mmol) y se dejó llegar a temperatura ambiente. Se evaporó el THF con una corriente de nitrógeno, se agregó cloroformo anhidro (40 ml) y la suspensión se filtró por succión a un balón de dos bocas, a través de un embudo de vidrio sinterizado. El filtrado se enfrió a -78°C, se agregó el aldehído **21** (4,6 mmol), el eterato de trifluoruro se boro (0,51 ml, 4,1 mmol) y se agitó por 30 minutos. La reacción se detuvo agregando $NaHCO_3$ (ss), se extrajo la fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El producto se purificó por CF (hexano-actetato de etilo 95:5) obteniéndose el compuesto **19** (620 mg, 61%) como un sólido blanco amorfo.

1-(3β-*t*-Butildimetilsililoxi-androst-5-en-17β-il)-3-hidroxi-1-pentanona (18)



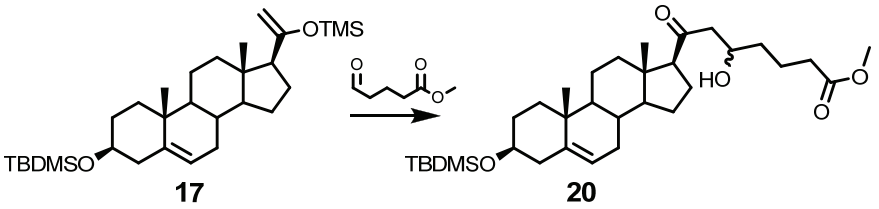
Se procedió como en la preparación de **19** (método 1), partiendo del sililenoléter **17** (30 mg, 0,059 mmol), propanal (5,7 µl, 0,66 mmol) y eterato de trifluoruro se boro (7.3 µl, 0,66 mmol). Luego de la purificación por CF (hexano-actetato de etilo 97:3) se obtuvo **18** (9 mg, 31%) recuperándose parcialmente la cetona **15** (6 mg)

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,31 (1H, d, *J*=5,3, H-6), 3,95 (1H, m, H-22), 3,48 (1H, tt, *J*=11,0 y 4,7, H-3), 2,57 (1H, dd, *J*=17,7 y 2,5, H-21a), 2,53 (1H, t, *J*=9,0, H-17), 2,45 (1H, dd, *J*=17,7 y 9,3, H-21b), 2,27 (1H, m, H-4β), 2,20 (1H, m, H-16β), 2,19 (1H, m, H-4α), 2,06 (1H, m, H-12β), 2,02 (1H, m, H-7α), 1,82 (1H, dt, *J*=13,3 y 3,5, H-1β), 1,73 (1H, m, H-2α), 1,69 (1H, m, H-15β), 1,67 (1H, m, H-16α), 1,61 (1H, m, H-11β), 1,56 (1H, m, H-7β), 1,53 (1H, m, H-23a), 1,48 (1H, m, H-8α), 1,46 (1H, m, H-11α), 1,45 (1H, m, H-23b), 1,42 (1H, m, H-12α), 1,25 (1H, m, H-15α), 1,15 (1H, m, H-14), 1,06 (1H, m, H-1α), 1,00 (3H, s, H-19), 0,98 (1H, m, H-9), 0,95 (3H, t, *J*=7,5, H-24), 0,89 (9H, s, $((CH_3)_3CSi)$), 0,63 (3H, s, H-18), 0,06 (6H, s, $((CH_3)_2Si)$).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 213,13 (C-20), 141,58 (C-5), 120,78 (C-6), 72,53 (C-3), 68,95 (C-22), 63,42 (C-17), 57,07 (C-14), 50,36 (C-21), 50,05 (C-9), 44,51 (C-13), 42,76 (C-4), 38,91 (C-12), 37,37 (C-1), 36,60 (C-10), 32,03 (C-8), 31,87 (C-2), 31,80 (C-7), 29,23(C-23), 25,93 (($\mathbf{C}H_3)_3CSi$),

24,50 (C-15), 22,67 (C-16), 21,05 (C-11), 19,41 (C-19), 18,26 ($(CH_3)_3$**C**Si), 13,27 (C-18), 9,88 (C-24), -4,59 ($(CH_3)_2$Si).

7-(3β-*t*-Butildimetilsililoxi-androst-5-en-17β-il)-7-oxo-5-hidroxiheptanoato de metilo (20)



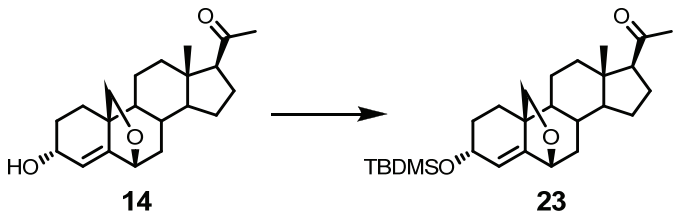
17 **20**

Se procedió como en la preparación de **19** (método 1), partiéndo del sililenoléter **17** (150 mg, 0,298 mmol), el aldehído **22** (90,0 µl, 0,75 mmol) y eterato de trifluoruro se boro (45 µl, 0,329 mmol). Luego de la purificación por CF (hexano-actetato de etilo 95:5) se obtuvo **20** (67 mg, 34%) recuperándose parcialmente la cetona **15**.

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,31 (1H, m, H-6), 4,04 (1H, m, H-22), 3,66 (3H, s, (CO_2CH_3)), 3,48 (1H, m, H-3), 3,28 (1H, sa, C-22(OH)), 2,55 (1H, dd, *J*= 17,8 y 2,6, H-21a), 2,47 (1H, t, *J*= 9,9, H-17), 2,48 (1H, m, H-21), 2,35 (2H, t, *J*= 7,3, H-25), 2,26 (1H, m, H-4β), 2,18 (1H, m, H-4α), 2,18 (1H, m, H-16β), 2,03 (1H, m, H-12β), 1,97 (1H, m, H-7α), 1,81 (1H, m, H-1β), 1,78 (1H, m, H-24a), 1,48 (1H, m, H-2α), 1,69 (1H, m, H-24b), 1,68 (2H, m, H-16α y H-15β), 1,62 (1H, m, H-11α), 1,54 (1H, m, H-7β), 1,53 (1H, m, H-2β), 1,52 (1H, m, H-23a), 1,48 (1H, m, H-8), 1,43 (1H, m, H-23b), 1,43 (1H, m, H-11β), 1,41 (1H, m, H-12α), 1,23 (1H, m, H-15α), 1,14 (1H, m, H-14), 1,05 (1H, m, H-1α), 0,99 (3H, s, H-19), 0,96 (1H, m, H-9), 0,88 (9H, s,$(CH_3)_3$CSi), 0,62 (3H, s, H-18), 0,05 (6H, s, $(CH_3)_2$Si).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 212,93 (C-20), 174,03 (C-26), 141,57 (C-5), 120,76 (C-6), 72,52 (C-3), 67,09 (C-22), 63,40 (C-17), 57,04 (C-14), 51,51 (CO_2**C**H_3), 50,70 (C-21), 50,02 (C-9), 44,51 (C-13), 42,75 (C-4), 38,90 (C-12), 37,36 (C-1), 36,58 (C-10), 35,56 (C-23), 33,75 (C-25), 32,01 (C-2), 31,85 (C-8), 31,78 (C-7), 25,92 ((**C**$H_3)_3$CSi), 24,48 (C-15), 22,64 (C-16), 21,02 (C-11), 20,89 (C-24), 19,40 (C-19), 18,24 (C-Si), 13,26 (C-18), -4,60 (**C**H_3CSi).

3α-*t*-Butildimetilsililoxi-6,19-epoxipregn-4-en-20-ona (23)



14 **23**

Sobre una solución del alcohol **14** (75 mg, 0,227 mmol) en DMF seca (1,8 ml) se agregó imidazol (47 mg, 0,681 mmol) y TBDMSCl (69 mg, 0,454 mmol), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 hs. Finalizada la reacción se diluyó con éter etílico y la fase orgánica se lavó 5

veces con NaCl (ss). La fase etérea se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. Se purificó por CF (hexano-acetato de etilo, 7:3) y se recristalizó de hexano obteniéndose el producto **23** (93 mg, 92%) como un sólido blanco amorfo.

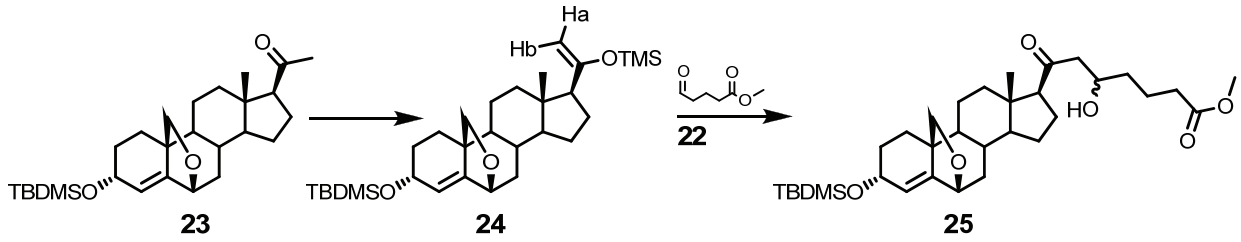
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,37 (1H, d, *J*=1,8, H-4), 4,41 (1H, d, *J*=4,8, H-6), 4,36 (1H, dc, *J*= 8,5, 5,6 y 2,3, H-3), 4,02 (1H, d, *J*=7,7, H-19), 3,28 (1H, d, *J*=7,7, H-19), 2,51 (1H, t, *J*=9,0, H-17), 2,17 (1H, m, H-16β), 2,11 (3H, s, H-21), 2,04 (1H, m, H-12β), 1,97 (1H, m, H-1α), 1,89 (1H, dt, *J*= 12,8 y 5,0 H-7β), 1,80 (1H, m, H-2β), 1,79 (1H, m, H-8), 1,64 (2H, m, H-11α y H-16α), 1,60 (1H, m, H-15β), 1,59 (1H, m, H-9), 1,58 (1H, m, H-2α), 1,45 (1H, m, H-12α), 1,32 (1H, m, H-14), 1,31 (1H, m, H-1β), 1,29 (1H, m, H-11β), 1,26 (1H, m, H-15α), 1,25 (1H, m, H-7α), 0,91 (9H, s, $(CH_3)_3CSi$), 0,67 (3H, s, H-18), 0,10 (3H, s, $(CH_3)_2Si$), 0,09 (3H, s, $(CH_3)_2Si$).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 209,42 (C-20), 147,75 (C-5), 117,01 (C-4), 77,06 (C-6), 75,53 (C-19), 68,53 (C-3), 63,48 (C-17), 55,14 (C-14), 49,50 (C-9), 44,76 (C-10), 44,25 (C-13), 39,24 (C-7), 38,76 (C-12), 34,39 (C-8), 31,42 (C-21), 29,18 (C-2), 25,97 (($\mathbf{C}H_3)_3CSi$), 25,35 (C-1), 23,89 (C-15), 22,94 (C-16), 22,85 (C-11), 18,36 (($CH_3)_3\mathbf{C}Si$), 13,68 (C-18), -4,48 (($\mathbf{C}H_3)_2Si$), -4,55 (($\mathbf{C}H_3)_2Si$).

EM (IE): m/z (%):444 (M+, 23), 387 (M-*t*Bu, 96), 295 (58), 43 (100);

Microanálisis: $C_{27}H_{44}O_3Si$: calculado C: 72,9%, H: 10,0% Encontrado C: 72,4%, H: 10,1%

7-(3α-*t*-Butildimetilsililoxi-6,19-epoxiandrost-4-en-17β-il)-7-oxo-5-hidroxiheptanoato de metilo(25)



Se procedió como en la preparación de **19** (método 2), partiendo de 102 mg de **23**. Se obtuvo **25** (70 mg, 54%) como un vidrio, recuperando parcialmente **23** (15 mg, 15%).

3α-*t*-Butildimetilsililoxi-20-trimetilsililoxi-6,19-epoxi-4,20-pregnadieno (24),

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,35 (1H, d, *J*=1,9, H-4), 4,40 (1H, d, *J*=4,8, H-6), 4,35 (1H, m, H-3), 4,08 (1H, d, *J*=1,0, H-21a), 4,03 (1H, d, *J*=1,0, H-21b), 4,03 (1H, d, *J*=7,5, H-19a), 3,27 (1H, d, *J*=7,5, H-19b), 2,00 (1H, t, *J*=9,5, H-17), 1,99 (1H, m, H-16β), 1,98 (1H, m, H-1α), 1,97 (1H, m, H-12β), 1,86 (1H, m, H-7β), 1,79 (1H, m, H-2β), 1,76 (1H, m, H-8), 1,68 (1H, m, H-16α), 1,61 (1H, m, H-12α), 1,56 (1H, m, H-2α), 1,56 (1H, m, H-15β), 1,55 (1H, m, H-11α), 1,55 (1H, m, H-9), 1,28 (1H, m, H-1β), 1,25 (1H, m, H-11β), 1,22 (1H, m, H-7α), 1,20 (1H, m, H-14), 1,20 (1H, m, H-15α), 0,90 (9H, s, (($CH_3)_3CSi$)), 0,66 (3H, s, H-18), 0,19 (9H, s, (($CH_3)_3Si$)), 0,09 (3H, s, (($CH_3)_2Si$)), 0,08 (3H, s, (($CH_3)_2Si$)).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 159,97 (C-20), 148,00 (C-5), 116,76 (C-4), 89,72 (C-21), 77,20 (C-6), 75,64 (C-19), 68,65 (C-3), 56,08 (C-17), 54,31 (C-14), 49,79 (C-9), 44,36 (C-10), 43,85 (C-13), 39,29 (C-7), 38,54 (C-12), 34,66 (C-8), 29,20 (C-2), 25,94 (($\mathbf{C}H_3)_3CSi$), 25,44 (C-1), 24,57 (C-16),

23,70 (C-15), 22,95 (C-11), 18,35 (($CH_3)_3$**C**Si), 13,10 (C-18), 0,15 (($CH_3)_3$Si), -4,47 (($CH_3)_2$Si), -4,55 (($CH_3)_2$Si).

7-(3α-*t*-Butildimetilsililoxi-6,19-oxido-androst-4-en-17β-il)-7-oxo-5-hidroxiheptanoato de metilo(25),

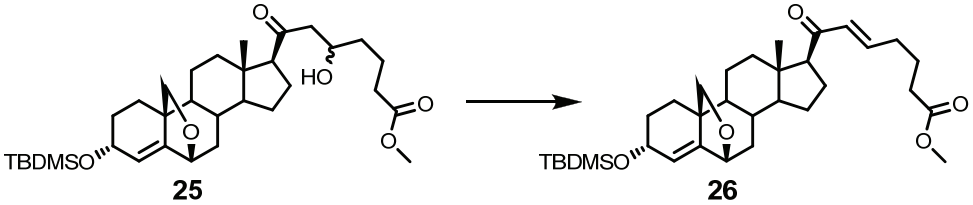
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,38 (1H, d, *J*= 1,5, H-4), 4,41 (1H, d, *J*= 4,7, H-6), 4,35 (1H, ddd, *J*= 8,5, 5,6 y 2,1, H-3), 4,04 (1H, m, H-22), 4,02 (1H, d, *J*= 7,8, H-19a), 3,66 (3H, s, CO_2CH_3), 3,28 (1H, d, *J*= 7,8, H-19b), 2,55 (1H, dd, *J*= 17,8 y 2.6, H-21a), 2,50 (1H, t, *J*=9,0, H-17), 2,45 (1H, m, H-21b), 2,34 (2H, t, *J*= 7,4, H-25), 2,15 (1H, m, H-16β), 2,04 (1H, m, H-12β), 1,97 (1H, m, H-1α), 1,89 (1H, m, H-7α), 1,79 (1H, m, H-2β), 1,78 (1H, m, H-24a), 1,78 (1H, m, H-8), 1,69 (1H, m, H-24b), 1,65 (2H, m, H-11α y H-16α), 1,61 (1H, m, H-15β), 1,57 (1H, m, H-9), 1,55 (1H, m, H-2α), 1,53 (1H, m, H-23a), 1,43 (1H, m, H-23b), 1,41 (1H, m, H-12α), 1,30 (1H, m, H-1β), 1,30 (1H, m, H-14), 1,27 (1H, m, H-11β), 1,26 (1H, m, H-15α), 1,24 (1H, m, H-7β), 0,91 (9H, s, (($CH_3)_3$CSi)), 0,67 (3H, s, H-18), 0,10 (3H, s, (($CH_3)_2$Si)), 0,09 (3H, s, (($CH_3)_2$Si)).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 212,77 (C-20), 174,03 (C-26), 147,70 (C-5), 117,06 (C-4), 77,02 (C-6), 75,51 (C-19), 68,50 (C-3), 67,04 (C-22), 63,15 (C-17), 55,24 (C-14), 51,52 (CO_2**C**H_3), 50,62 (C-21), 49,46 (C-9), 45,26 (C-13), 44,23 (C-10), 39,22 (C-7), 38,79 (C-12), 35,54 (C-23), 34,37 (C-8), 33,73 (C-25), 29,15 (C-2), 25,96 ((**C**$H_3)_3$CSi), 25,33 (C-1), 23,89 (C-15), 22,80 (C-11), 22,76 (C-16), 20,88 (C-24), 18,35 (($CH_3)_3$**C**Si), 13,74 (C-18), -4,49 (($CH_3)_2$Si), -4,56 (($CH_3)_2$Si).

EM (IE): m/z (%): 517 (M-*t*Bu, 22), 297 (30), 75 (100).

EMAR m/z: 597,3591 ($M+Na^+$, $C_{33}H_{54}O_6NaSi^+$ calculado 597,3582), 575,3762 ($M+H^+$, $C_{33}H_{55}O_6Si^+$ calculado 575,3757).

7-(3α-*t*-Butildimetilsililoxi-6,19-epoxiandrost-4-en-17β-il)-7-oxo-5-heptenoato de metilo (26)



Una solución del esteroide **25** (170 mg, 0,296 mmol) en diclorometano anhidro (1,2 ml) se colocó sobre un baño de hielo bajo atmósfera de Argón y se le agregó una solución de anhídrido tríflico (60 µl, 0,354 mmol) en piridina seca (1,4 ml). La mezcla de reacción se agitó hasta que se observó la desaparición del esteroide de partida por ccd (30 min). Se agregó DBU (97 µl, 0,647 mmol) y se dejó reaccionar por 2 hs más, luego se agregó diclorometano, se lavó con ácido clorhídrico 1 N y se separó la fase orgánica. Esta se secó con Na_2SO_4, se evaporó y el producto obtenido se purificó por CF (hexano:acetato de etilo, 95:5 y 9:1) obteniéndose el compuesto **26** (77,5 mg, 47%) como un vidrio.

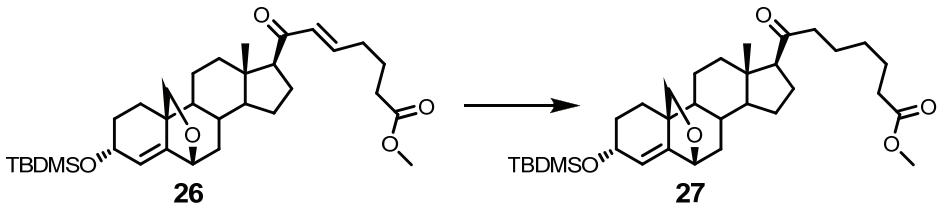
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 6,77 (1H, dt, *J*=15,6 y 6,9, H-22), 6,15 (1H, dt, *J*=15,6 y 1,5, H-21), 5,38 (1H, d, *J*=2,1, H-4), 4,41 (1H, d, *J*=4,8, H-6), 4,36 (1H, ddd, *J*=8,9, 5,9 y 2,5, H-3β), 4,02 (1H, d, *J*=7,7, H-19a), 3,68 (3H, s, CO_2CH_3), 3,28 (1H, d, *J*=7,7, H-19b), 2,71 (1H, t, *J*= 8,8, H-17), 2,34 (2H, t, *J*=7,4 H-25), 2,26 (1H, m, H-16), 2,24 (2H, m, H-23), 1,96 (1H, m, H-1α), 1,92 (1H, m, H-12β), 1,90 (1H, m, H-7β), 1,81 (2H, m, H-24), 1,80 (1H, m, H-2β), 1,78 (1H, m, H-8), 1,64 (1H, m, H-16), 1,62 (1H, m, H-11α), 1,61 (1H, m, H-15β), 1,59 (1H, m, H-9), 1,57 (1H, m, H-2α), 1,42 (1H, m, H-12α), 1,35 (1H, m, H-14), 1,30 (1H, m, H-1β), 1,27 (1H, m, H-15), 1,26 (1H, m, H-7α), 1,25 (1H, m, H-11β), 0,98 (3H, s, $((CH_3)_2Si)$), 0,92 (9H, s, $((CH_3)_3CSi)$), 0,64 (3H, s, H-18), 0,10 (3H, s, $((CH_3)_2Si)$), 0,09 (3H, s, $((CH_3)_2Si)$).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 200,19 (C-20), 173,55 (C-26), 147,80 (C-5), 144,71 (C-22), 131,30 (C-21), 116,97 (C-4), 77,08 (C-6), 75,54 (C-19), 68,53 (C-3), 61,07 (C-17), 55,39 (C-14), 51,60 (CO_2**C**H_3), 49,58 (C-9), 45,43 (C-13), 44,26 (C-10), 39,31 (C-7), 39,03 (C-12), 34,51 (C-8), 33,26 (C-25), 31,57 (C-23), 29,18 (C-2), 25,97 ((**C**$H_3)_3$CSi), 25,38 (C-1), 24,05 (C-15), 23,35 (C-24), 22,87 (C-11), 22,82 (C-16), 18,36 ($(CH_3)_3$**C**Si), 13,86 (C-18), -4,47 ($(CH_3)_2$Si), -4,54 ($(CH_3)_2$Si).

EM (IE): m/z (%): 499 (M-*t*Bu, 73), 155 ($C_8H_{11}O_3^+$, 83), 67 (96), 55 (100).

EMAR m/z: 579,3349 ($M+Na^+$, $C_{33}H_{52}O_5NaSi^+$ calculado 579,3376).

7-(3α-*t*-Butildimetilsililoxi-6,19-epoxiandrost-4-en-17β-il)-7-oxo-heptanoato de metilo (27)



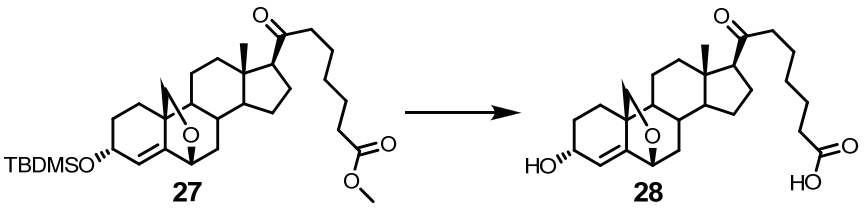
A una solución del esteroide **26** (65 mg, 0,117 mmol) en acetato de etilo (20 ml) se le agregó paladio sobre carbono al 10% (12,3 mg). La suspensión se hidrogenó por 45 minutos a 1 atmósfera y temperatura ambiente. Luego se filtró a través de una columna de silica gel y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 95:5) para dar el compuesto **27** (50 mg, 77%) como un vidrio.

IR (KBr): 2929, 2859, 1741, 1705, 1432, 1072, 830 y 780 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,38 (1H, d, *J*=2,0, H-4), 4,41 (1H, d, *J*=4,8, H-6), 4,36 (1H, ddd, *J*=2,2, 5,6 y 8,8, H-3), 4,02 (1H, d, *J*=7,8, H-19a), 3,66 (3H, s, (CO_2CH_3)), 3,28 (1H, d, *J*=7,8, H-19b), 2,48 (1H, t, *J*=9,0, H-17), 2,35 (2H, t, *J*=7,4, H-21), 2,31 (2H, t, *J*=7,5, H-25), 2,16 (1H, m, H-16β), 2,00 (1H, m, H-12β), 1,97 (1H, m, H-1α), 1,89 (1H, m, H-7β), 1,80 (1H, m, H-2β), 1,78 (1H, m, H-8), 1,65 (1H, m, H-11α), 1,63 (2H, m, H-24), 1,63 (1H, m, H-16α), 1,59 (1H, m, H-15α), 1,58 (1H, m, H-9), 1,57 (1H, m, H-2α), 1,57 (2H, m, H-22), 1,42 (1H, m, H-12α), 1,31 (1H, m, H-1β), 1,31 (2H, m, H-23), 1,29 (1H, m, H-11β), 1,28 (1H, m, H-14), 1,25 (1H, m, H-7α), 1,24 (1H, m, H-15β), 0,91 (9H, s, ($(CH_3)_3$CSi)), 0,65 (3H, s, 18), 0,10 (3H, s, H-($(CH_3)_2$Si)), 0,09 (3H, s, ($(CH_3)_2$Si)).

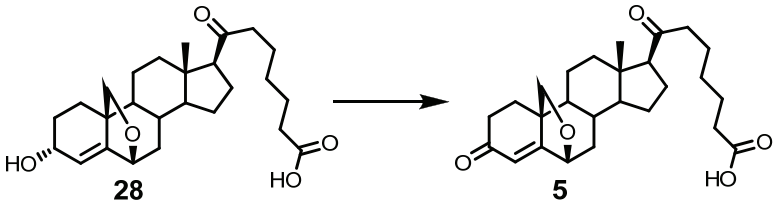
RMN ^{13}C (125,77 MHz): 211,26 (C-20), 174,12 (C-26), 147,76 (C-5), 117,00 (C-4), 77,07 (C-6), 75,53 (C-19), 68,53 (C-3), 62,70 (C-17), 55,19 (C-14), 51,48 (CO_2**C**H_3), 49,52 (C-9), 44,95 (C-13), 44,26 (C-10), 43,88 (C-21), 39,26 (C-7), 38,86 (C-12), 34,39 (C-8), 33,87 (C-25), 29,18 (C-2), 28,78 (C-23), 25,98 ((**C**H_3)$_3$CSi), 25,36 (C-1), 24,76 (C-24), 23,94 (C-15), 23,25 (C-22), 23,09 (C-16), 22,86 (C-11), 18,37 ((CH_3)$_3$**C**Si), 13,85 (C-18), -4,47 ((CH_3)$_2$Si), -4,54 ((CH_3)$_2$Si).
EM (IE): m/z (%): 501 (M-*t*Bu, 36), 157 ($C_8H_{13}O_3^+$, 38), 66 (85), 55 (100).
EMAR m/z: 581,3649 (M+Na$^+$, $C_{33}H_{54}O_5NaSi^+$ calculado 581,3633),

Ácido 7-(3α-hidroxi-6,19-epoxiandrost-4-en-17β-il)-7-oxo-heptanoico (28)



A una solución del esteroide **27** (50 mg, 0,089 mmol) en THF (1 ml) se le agregó ácido clorhídrico (6N, 500 µl). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se llevó a pH 14 con NaOH (50%) y se agitó por 1 hora más. La mezcla se acidificó con ácido clorhídrico (c) (pH 2) y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4, se evaporó el solvente y el producto se purificó por CF (hexano-acetato de etilo-ácido acético, 20:80:1) obteniéndose el compuesto **28** (25 mg, 65%) como un sólido blanco amorfo.
IR (KBr): 3403 (ancho), 2928, 1732, 1699, 1449, 1036 y 736 cm^{-1}.
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,48 (1H, d, *J*=2,4, H-4), 4,45 (1H, d, *J*=4,9, H-6), 4,39 (1H, ddd, *J*=8,4, 5,6 y 2,7, H-3), 4,04 (1H, d, *J*=7,8, H-19a), 3,31 (1H, d, *J*=7,9, H-19b), 2,49 (1H, t, *J*=9,0, H-17), 2,37 (2H, t, *J*=7,1, H-21), 2,36 (2H, t, *J*=7,4, H-25), 2,16 (1H, m, H-16β), 2,00 (1H, m, H-1α), 1,99 (1H, m, H-12β), 1,95 (1H, m, H-2β), 1,93 (1H, m, H-7β), 1,80 (1H, m, H-8), 1,66 (1H, m, H-11α), 1,65 (1H, m, H-15β), 1,65 (1H, m, H-16α), 1,64 (2H, m, H-24), 1,61 (2H, m, H-22), 1,56 (1H, m, H-2α), 1,52 (1H, m, H-9), 1,43 (1H, m, H-12α), 1,35 (1H, m, H-1β), 1,34 (2H, m, H-23), 1,32 (1H, m, H-11β), 1,28 (1H, m, H-14), 1,27 (1H, m, H-15α), 1,21 (1H, m, H-7α), 0,67 (3H, s, H-18).
RMN ^{13}C (125,77 MHz): 211,19 (C-20), 176,93 (C-26), 149,42 (C-5), 115,65 (C-4), 77,21 (C-6), 75,31 (C-19), 67,52 (C-3), 62,69 (C-17), 55,30 (C-14), 50,13 (C-9), 44,96 (C-13), 44,25 (C-10), 43,84 (C-21), 39,52 (C-7), 38,86 (C-12), 34,34 (C-8), 33,32 (C-25), 28,91 (C-2), 28,67 (C-23), 25,10 (C-1), 24,52 (C-24), 23,94 (C-15), 23,21 (C-22), 23,09 (C-16), 22,86 (C-11), 13,87 (C-18).
EM (IE): m/z (%): 222 (50), 81 (62), 69 (100).
EMAR m/z: 453,2613 (M+Na$^+$, $C_{26}H_{38}O_5Na^+$ calculado 453,2612).

Ácido 7-(3-oxo-6,19-epoxiandrost-4-en-17β-il)-7-oxo-heptanoico (5)



Sobre una solución del esteroide **28** (20 mg, 0,0456 mmol) en diclorometano (2 ml) se agregó dióxido de manganeso (145 mg, 1,65 mmol). Después de 24hs se filtró a través de un tapón de celite. El producto crudo se purificó por CD (hexano-acetato de etilo-ácido acético, 50:50:1) obteniéndose el compuesto **5** (12,5 mg, 62%) como un sólido blanco amorfo.

IR (KBr): 3042 (ancho), 2934, 2876, 1735, 1699, 1671, 1455, 1027 y 741 cm^{-1}.

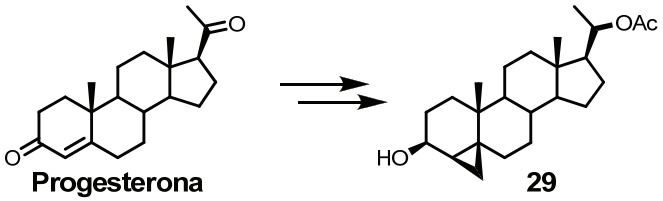
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,82 (1H, s, H-4), 4,70 (1H, d, *J*=5,2, H-6), 4,20 (1H, d, *J*=8,2, H-19a), 3,51 (1H, d, *J*=8,2, H-19b), 2,50 (1H, t, *J*=9,1, H-17), 2,39 (2H, m, H-21), 2,38 (2H, m, H-21), 2,35 (2H, t, *J*=7,4, H-25), 2,23 (1H, m, H-1α), 2,18 (1H, m, H-16β), 2,10 (1H, m, H-7β), 2,08 (1H, m, H-12β), 1,89 (1H, m, H-8), 1,84 (1H, m, H-1β), 1,69 (1H, m, H-16α), 1,67 (1H, m, H-11α), 1,65 (2H, m, H-24), 1,65 (1H, m, H-15β), 1,65 (1H, m, H-9), 1,60 (2H, m, H-22), 1,49 (1H, m, H-12α), 1,49 (1H, m, H-11β), 1,35 (2H, m, H-23), 1,31 (1H, m, H-14), 1,30 (1H, m, H-15α), 1,28 (1H, m, H-7α), 0,69 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 210,93 (C-20), 198,85 (C-3), 178,25 (C-26), 171,82 (C-5), 114,99 (C-4), 77,16 (C-6), 75,57 (C-19), 62,42 (C-17), 54,95 (C-14), 50,16 (C-9), 45,91 (C-10), 44,94 (C-13), 43,79 (C-21), 41,07 (C-1), 38,57 (C-12), 33,71 (C-8), 33,55 (C-25), 33,20 (C-2), 28,65 (C-23), 26,49 (C-7), 24,48 (C-24), 24,00 (C-15), 23,94 (C-11), 23,18 (C-16), 23,12 (C-22), 13,84 (C-18),

EM (IE): m/z (%): 428 (M^+, 41), 285 (M-$C_7H_{11}O_3^+$, 30), 143 ($C_7H_{11}O_3^+$, 55), 137 (99), 69 (99), 55 (100).

EMAR m/z: 451,2450 (M+Na^+, $C_{26}H_{36}O_5Na^+$ calculado 451,2455).

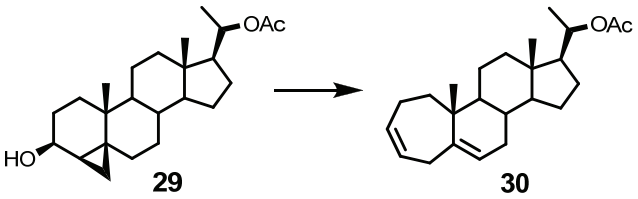
3β-Hidroxi-20β-acetiloxi-4β,5β-metilenpregnano (29)



Se sintetizó a partir de progesterona, según el procedimiento descripto por Di Chenna y *col.*[7]

[7] Di Chenna, P. H., Dansey, M. V., Ghini, A. A., y Burton, G., *Arkivoc*, **2005** (xii) 154-162

20β-Acetiloxi-A-homopregna-3,5-dieno (30)



Método A: a una solución del ciclopropilalcohol (**29**) (0.030 g, 0,08 mmol) en THF anhidro (3 ml) se le agregó $AlCl_3$ (0,063 g, 0,47 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 10 minutos en un reactor de microondas a 65°C y 300W. Luego la reacción se diluyó con $NaHCO_3$ (5%) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El producto crudo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 97,5:2,5) para dar el dieno **30** (0,023 g, 80%) como un sólido amorfo.

Método B: a una solución del ciclopropilalcohol (**29**) (0,030 g, 0,08 mmol) en THF anhidro (3 mL) se le agregó $ZnBr_2$ (0,120 g, 0,53 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 10 minutos en un reactor de microondas a 120°C y 300W. Luego la reacción se diluyó con $NaHCO_3$ (5%) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El producto crudo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 97,5:2,5) para dar el dieno **30** (0,025 g, 87%) como un sólido amorfo.

IR (KBr): 2935, 1732, 1460, 1375, 1244, 1072 y 1022 cm^{-1}.

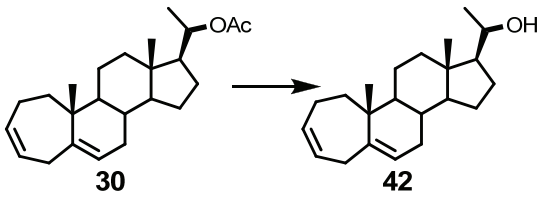
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,59 (2H, m, H-3 y H-4), 5,59 (2H, m, H-3 y H-4), 5,35 (1H, d, *J*= 4,0, H-6), 4,83 (1H, m, H-20), 3,03 (1H, br d, *J*= 15,3, H-4aβ), 2,47 (1H, dd, *J*= 7,3 y 15,3, H-4aα), 2,02 (3H, s, (CH_3CO_2)), 1,16 (3H, d, *J*= 6,2, H-21), 0,97 (3H, s, H-19), 0,64 (3H, s, H-18)..

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 170.44 (CH_3**C**O_2), 144,90 (C-5), 130,06 (C-3), 129,44 (C-4), 122,40 (C-6), 72,87 (C-20), 56,49 (C-14), 54,99 (C-17), 43,01 (C-9), 42,21 (C-13), 40,43 (C-10), 39,31 (C-12), 35,25 (C-1), 34,21 (C-4a), 31,82 (C-8), 31,44 (C-7), 25,51 (C-16), 24,22 (C-15), 24,03 (C-2), 22,89 (C-19), 21,51 (**C**H_3CO_2), 21,34 (C-11), 19,90 (C-21), 12,47 (C-18).

EM (IE): m/z 356 (M+, 12%), 341 (1%), 296 (M-AcOH, 7%), 281 (10%), 267 (4%), 189 (16%), 121 (22%), 105 (27%), 91 (32%), 43 (100%).

EMAR m/z: 356,2721 (M+H $C_{24}H_{37}O_2^+$ calculado 356,2715)

20β-Hidroxi-A-homopregna-3,5-dieno (42)



A una solución del acetato **30** (0,120 g, 0,337 mmol) en éter etílico anhidro (5 ml) se le agregó $LiAlH_4$ (0,038 g, 0,99 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó por 1 hora a temperatura ambiente, luego se agregó HCl (1N, 1 ml), se volcó sobre una solución saturada de

tartrato de sodio y potasio y y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El producto crudo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 97,5:2,5) para dar el alcohol **42** (0,078 g, 74%) como un sólido blanco cristalino.

Punto de fusión: 138-139°C (hexano-acetato de etilo)

IR (KBr): 3385, 2925, 2362, 1473, 1450, 1087 y 1020 cm^{-1}.

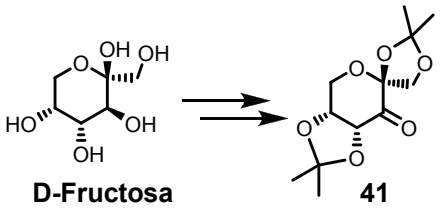
RMN ^{1}H (200 MHz): 5,61 (2H, m, H-3 y H-4), 5,37 (1H, d, *J*= 4,0, H-6), 3,74 (1H, m, H-20), 3,04 (1H, br d, *J*= 15,3, H-4aβ), 2,47 (1H, dd, *J*= 7,3 y 15,3, H-4aα), 1,15 (d, *J*= 6,1, H-21), 0,99 (3H, s, H-19), 0,79 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (50 MHz): 144,94 (C-5), 130,16 (C-3), 129,44 (C-4), 122,47 (C-6), 70,63 (C-20), 58,50 (C-14), 56,59 (C-17), 42,98 (C-9), 42,98 (C-13), 40,49 (C-10), 40,06 (C-12), 35,27 (C-1), 34,24 (C-4a), 31,83 (C-8), 31,50 (C-7), 25,73 (C-16), 24,48 (C-15), 24,06 (C-2), 23,62 (C-19), 22,93 (C-21), 21,33 (C-11), 12,49 (C-18).

EM (IE) m/z: 314 (M+, 28), 299 (5), 281 (5), 233 (7), 189 (24), 91 (52), 45 (100).

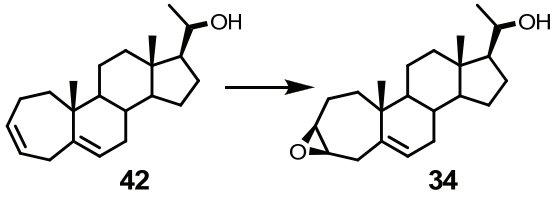
Microanálisis: $C_{22}H_{34}O$: calculado C: 84,0%, H: 10,9% Encontrado C: 83,9%, H: 11,2%

1,2:4,5-Di-O-isopropiliden-D-eritro-2,3-hexodiuro-2,6-piranosa (41).



Se sintetizó a partir de fructosa, según el procedimiento descripto por Wang y *col.*[8]

3β,4β-Epoxi-20β-hidroxi-A-homo-5-pregneno (34)



A una solución del dieno **42** (0,250 g, 0,795 mmol) en acetonitrilo-dimetoxietano (10,5 ml, 1:2 v/v) se le agregó sucesivamente la cetona **41** (0,065 g, 0,252 mmol), acetato de tetrabutilamonio (0,0046 g, 0,028 mmol) y Na_2EDTA (0,0013 g, 0,004 mmol). Luego se agregó simultáneamente y con agitación una solución de Oxone® (1,312 g, 2,1 mmol) en Na_2EDTA acuoso ($4x10^{-4}$M, 3,7 ml) y una solución de K_2CO_3 (0,987 g, 7,15 mmol) en agua (3,7 ml). A continuación se agregaron otros 3,7 ml de las soluciones mencionadas, utilizando una bomba jeringa (4 ml/h). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos más, y luego se volcó sobre HCl (1N, 7,15 ml) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó

[8] Wang Z.X., Young T., Frohn M., Zhang J.R., Shi Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119,* 11224-11235

el solvente. El producto crudo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 9:1) para dar en una primera fracción el dieno **42** (0,100 g, 40%) que quedó sin reaccionar seguido de una fracción del epóxido **34** (0,088 g, 35%) como un sólido blanco cristalino.

Punto de fusión: 179 – 181 °C (hexano-acetato de etilo)

IR (KBr): 3413, 2941, 2868, 1117, 972 y 881 cm^{-1}.

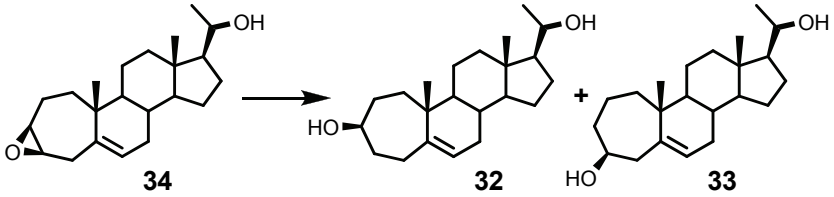
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,38 (1H, dd, *J*=4,2 y 1,2, H-6), 3,74 (1H, m, H-20), 3,14 (1H, m, H-4), 2,96 (1H, m, H-3), 2,48 (1H, dd, *J*=14,1 y 8,2, H-4aα), 2,36 (1H, br d, *J*= 14,1, H-4aβ), 2,08 (1H, dt, *J*= 12,5 y 3,4, H-12β), 2,00 (1H, m, H-7β), 1,95 (1H, m, H-2α), 1,85 (1H, m, H-2β), 1,67 (1H, m, H-16β), 1,65 (1H, m, H-15α), 1,57 (1H, m, H-7α), 1,56 (1H, m, H-8), 1,52 (1H, m, H-11α), 1,41 (1H, m, H-11β), 1,35 (3H, m, H-1 y H-17), 1,27 (1H, m, H-12α), 1,20 (1H, m, H- 16α), 1,15 (3H, d, *J*= 6,0, H-21), 1,14 (1H, m, H-15β), 1,14 (1H, m, H-9), 1,08 (1H, m, H-14), 0,87 (3H, s, H-19), 0,76 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 140,99 (C-5), 123,83 (C-6), 70,60 (C-20), 58,46 (C-17), 56,50 (C-14 y C-9), 55,58 (C-4), 55,25 (C-3), 42,24 (C-13), 40,26 (C-10), 39,96 (C-12), 32,57 (C-4a), 31,62 (C-8), 31,60 (C-7), 25,70 (C-1), 25,69 (C-16), 24,48 (C-15), 23,65 (C-21), 23,24 (C-19), 22,93 (C-2), 21,27 (C-11), 12,46 (C-18).

EM (IE): m/z 330 (M+, 3), 315 (2), 207 (5), 189 (11), 163 (9), 91 (18), 55 (24), 45 (100).

Microanálisis: $C_{22}H_{34}O_2$: calculado C: 79,9%, H: 10,4% Encontrado C: 79,6%, H: 10,7%

3β,20β-Dihidroxi-A-homo-5-pregneno (32) y 4β,20β-dihidroxi-A-homo-5-pregneno (33)



34 **32** **33**

A una solución del epóxido **34** (0,330 g, 1 mmol) en tetrahidrofurano seco (33,5 ml) se le agregó $LiAlH_4$ (0,015 g, 1,6 mmol) bajo atmósfera de argón. La reacción se agitó a temperatura ambiente por 20 minutos, luego se neutralizó con HCl 1N, se volcó sobre una solución saturada de tartrato de sodio y potasio y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El producto crudo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo) para dar los alcoholes **32** (0,212 g, 63%) y **33** (0,047 g, 14%).

Compuesto **32**:

IR (KBr): 2954, 1486, 1052 y 749 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,41 (1H, dd, *J*= 5,8 y 2,2, H-6), 4,05 (1H, bs,$W_{½}$ =10,8, H-3), 3,75 (1H, m, H-20), 2,30 (1H, m, H-4aβ), 2,09 (1H, dt, *J*= 12,6 y 3,4, H-12β), 2,02 (1H, dd, *J*= 12,1 y 5,2, H-7β), 1,93 (1H, m, H-4β), 1,92 (1H, m, H-4aα), 1,76 (1H, dd, *J*= 15,0 y 11,2, H-1β),1,69 (1H, m, H-16β),1,65 (1H, m, H-15α), 1,63 (1H, m, H-2β), 1,60 (1H, m, H-11α), 1,59 (1H, m, H-8), 1,58 (1H, m, H-7α), 1,53 (1H, m, H-1α), 1,50 (1H, m, H-12α), 1,49 (1H, m, H-4α), 1,46 (1H, m, H-2α), 1,45 (1H, m, H-11β), 1,35 (2H, m, H-17), 1,22 (1H, m, H-15β), 1,20 (1H, m, H-16α),

1,16 (1H, m, H-9), 1,15 (3H, d, *J*= 6,2, H-21), 1,08 (1H, m, H-14), 0,93 (3H, m, H-19), 0,79 (3H, m, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 146,92 (C-5), 122,57 (C-6), 70,62 (C-20), 67,98 (C-3), 58,52 (C-17), 56,68 (C-14), 44,14 (C-9), 42,32 (C-13), 40,28 (C-4), 40,14 (C-12), 40,05 (C-10), 31,81 (C-8), 31,56 (C-7), 29,52 (C-1), 26,90 (C-4a), 26,60 (C-2), 25,75 (C-16), 24,45 (C-15), 23,80 (C-19), 23,61 (C-21), 21,53 (C-11), 12,53 (C-18).

EMAR m/z: 333,2790 (M+H, $C_{22}H_{37}O_2^+$ calculado 333,2788).

Compuesto **33**:

Punto de fusión: 179-180 °C (hexano-acetato de etilo)

IR (KBr): 3263, 2927, 1269, 1098, 1038, 1019 y 808 cm^{-1}.

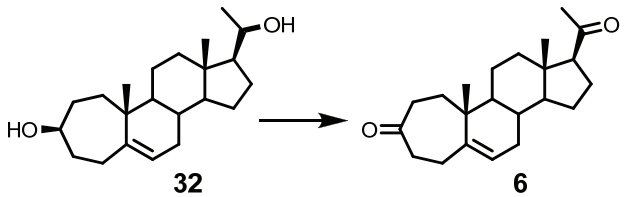
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,52 (1H, dd, *J*= 5,5 y 1,8, H-6), 3,74 (1H, dc, *J*= 9,8 y 6,1, H-20), 3,54 (1H, tt, *J*= 10,2 y 5,0, H-4), 2,24 (1H, dd, *J*= 13,0 y 5,0, H4aα), 2,20 (1H, br t, *J*= 12,4, H4aβ), 2,07 (2H, m, H-3α), 2,06 (1H, dt, *J*= 12,5 y 3,5, H-12β), 2,03 (1H, m, H-7β), 1,94 (1H, dd, *J*= 14,5 y 8,8, H-1α), 1,67 (1H, m, H-16b), 1,63 (1H, m, H-15α), 1,55 (2H, m, H-8 y H-7α), 1,54 (1H, m, H-11α), 1,43 (1H, m, H-2α), 1,41 (1H, m, H-11β), 1,33 (1H, br c, *J*= 9,8, H-17),1,25 (1H, m, H-12α), 1,21 (1H, m, H-3β), 1,17 (1H, m, H-16α), 1,16 (1H, m, H-1β), 1,14 (1H, m, H-15β), 1,14 (3H, d, *J*= 6,1, H-21), 1,08 (2H, m, H-9 y H-2β), 1,06 (1H, m, H-14), 0,91 (3H, s, H-19), 0,78 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 140,71 (C-5), 125,44 (C-6), 76,08 (C-4), 70,59 (C-20), 58,48 (C-17), 56,57 (C-14), 44,02 (C-9), 42,03 (C-13), 42,03 (C-4a), 40,40 (C-3), 40,08 (C-12), 39,99 (C-10), 35,87 (C-1), 31,60 (C-8), 31,50 (C-7), 25,72 (C-16), 24,42 (C-15), 23,68 (C-19), 23,60 (C-21), 21,36 (C-11), 18,83 (C-2), 12,50 (C-18).

EM (IE): m/z 332 (M^+, 29), 314 (24), 233 (65), 189 (100), 163 (51), 119 (69), 105 (74), 55(83), 45 (91).

EMAR m/z: 333,2784 (M+H, $C_{22}H_{37}O_2$, calculado 333,2788)

A-Homo-5-pregneno-3,20-diona (6)



32 **6**

Una solución del alcohol **32** (0,059 g, 0,18 mmol) en diclorometano seco (19 ml) se agregó a una suspensión de PCC (0,364 g, 1,65 mmol), $BaCO_3$ (0,101 g, 0,52 mmol) y tamices moleculares de 4 Å en diclorometamo seco (10 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente por 4 horas, luego se agregó celite (1 g), se evaporó el solvente a presión reducida y se eluyó a través de un tapón de sílica (hexano–acetato de etilo). El filtrado se evaporó y el residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 95:5) para dar la dicetona **6** (0,039 g, 66%) como un sólido blanco.

Punto de fusión: 166-167°C (hexano-acetato de etilo)

IR (KBr): 2934, 1703, 1354 y 1236 cm^{-1}.

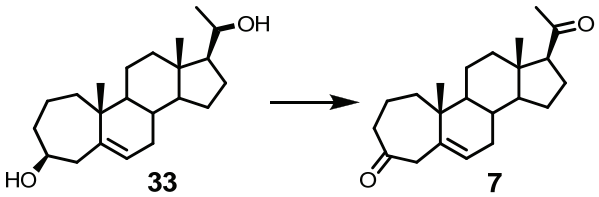
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,57 (1H, dd, *J*= 5,2 y 2,0, H-6), 2,63 (1H, dt, *J*= 14,7 y 4,7, H-4β), 2,56 (1H, t, *J*= 8,7, C-17), 2,45 (1H, m, H-4aβ), 2,36 (1H, m, H-4α), 2,32 (2H, m, H-2), 2,19 (1H, m, H-16β), 2,16 (1H, m, H-4aα), 2,13 (3H, s, H-21), 2,08 (1H, m, H-12β), 2,06 (1H, m, H-7β), 1,76 (2H, m, H-1), 1,70 (1H, m, H-15α), 1,69 (1H, m, H-16α), 1,63 (1H, m, H-11α), 1,61 (1H, m, H-7α), 1,58 (1H, m, H-8), 1,48 (1H, m, H-12α), 1,47 (1H, m, H-11β), 1,23 (1H, m, H-14), 1,22 (1H, m, H-9), 1,21 (1H, m, H-15β), 1,00 (3H, s, H-19), 0,65 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 213,12 (C-3), 209,42 (C-20), 142,66 (C-5), 125,17 (C-6), 63,58 (C-17), 57,05 (C-14), 44,62 (C-9), 44,06 (C-4), 43,89 (C-13), 38,89 (C-2 y C-10), 38,83 (C-12), 31,77 (C-8), 31,51 (C-21), 31,35 (C-7), 31,07 (C-1), 27,87 (C-4a), 24,35 (C-15), 22,86 (C-16), 22,01 (C-19), 21,48 (C-11), 13,28 (C-18).

EM (IE): m/z 328 (M^+, 55), 310 (23), 300 (30), 205 (35), 119 (32), 105 (35), 55 (39), 43 (100);

EMAR m/z: 329,2476 (M+H, $C_{22}H_{33}O_2^+$, calculado 329,2475).

A-homo-5-pregneno-4,20-diona (7)



Una solución del alcohol **33** (0,0086 g, 0,029 mmol) en diclorometano seco (3 ml) se agregó a una suspensión de PCC (0,054 g, 0,245 mmol), $BaCO_3$ (0,015 g, 0,077 mmol) y tamices moleculares de 4 Å (0,105 g)en diclorometano seco (1,5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente por 4 horas, luego se agregó celite (0,2 g), se evaporó el solvente a presión reducida y se eluyó a través de un tapón de sílica (hexano–acetato de etilo). El filtrado se evaporó y el residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 95:5) para dar la dicetona **7** (0,0064 g, 75%) como un sólido blanco.

Punto de fusión: 141-144°C (hexano-acetato de etilo)

IR (KBr): 2918, 1701, 1541, 1508, 1456 y 1356 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,57 (1H, dd, *J*= 5,5 y 2,1, H-6), 3,26 (1H, d, *J*= 14,4, H-4aα), 2,84 (1H, d, *J*= 14,4, H-4aβ), 2,62 (1H, m, H-3α), 2,55 (1H, t, *J*= 9,1, H-17), 2,22 (1H, m, H-3β), 2,19 (1H, m, H-16β), 2,13 (3H, s, H-21), 2,09 (1H, m, H-7β), 2,08 (1H, m, H-12β), 1,87 (1H, dd, *J*= 13,0 y 7,1, H-1α),1,68 (1H, m, H-16α),1,67 (1H, m, H-15α), 1,66 (1H, m, H-11α), 1,65 (1H, m, H-2α), 1,63 (1H, m, H-7α), 1,60 (1H, m, H-8), 1,57 (2H, m, H-2β y H-11β), 1,55 (1H, m, H-1β), 1,48 (1H, m, H-12α), 1,30 (1H, m, H-9), 1,25 (1H, m, H-15α), 1,23 (1H, m, H-14), 0,99 (3H, s, H-19), 0,65 (3H, s, H-18).

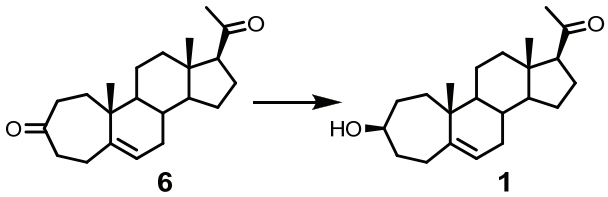
RMN ^{13}C (125,77 MHz): 210,72 (C-4), 209,46 (C-20), 137,17 (C-5), 127,08 (C-6), 63,60 (C-17), 57,10 (C-14), 48,61 (C-4a), 43,98 (C-9), 43,93 (C-13), 42,51 (C-3), 39,78 (C-10), 38,83 (C-12),

34,90 (C-1), 31,73 (C-8), 31,57 (C-7), 31,51 (C-21), 24,36 (C-15), 22,89 (C-16), 22,70 (C-19), 21,39 (C-11), 18,55 (C-2), 13,30 (C-18).

EM (IE): m/z 328 (M+,70), 205 (24), 187 (28), 105 (46), 85 (54), 55 (56), 43 (100).

EMAR m/z: 329,2475 (M+H, $C_{22}H_{33}O_2^+$, calculado 329,2475).

3β-Hidroxi-A-homo-5-pregnen-20-ona (1)



6 **1**

Una solución de la dicetona **6** (0,060 g, 0,183 mmol) en THF anhidro (5 ml) se enfrió a -50ºC y se le agregó una solución de K-Selectride (1 M, 0,22 ml), bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, luego se volcó sobre una solución acuosa de cloruro de amonio (5%) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 85:15) para dar como único producto el alcohol **1** (0,038 g, 63%) como un sólido blanco cristalino.

Punto de fusión: 151-153°C (hexano-acetato de etilo)

IR (KBr): 3329, 2934, 1710 y 1038 cm^{-1}.

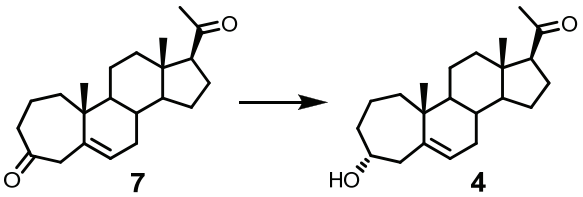
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,41 (1H, dd, *J*= 5,1 y 1,6, H-6), 4,05 (1H, br s, $W_{½}$=10,6, H-3), 2,53 (1H, t, *J*=9,0, H-17), 2,28 (1H, dt, *J*=3,1 y 13,7, H-4aβ), 2,19 (1H, m, H-16β), 2,13 (3H, s, H-21), 2,06 (1H, m, H-12β), 2,05 (1H, m, H-7β), 1,92 (1H, m, H-4β), 1,90 (1H, m, H-4aα), 1,79 (1H, dd, *J*=15,2 y 10,9, H-1β), 1,68 (2H, m, H-15α y H-11α), 1,67 (1H, m, H-16α), 1,63 (1H, m, H-2β), 1,57 (1H, m, H-7α), 1,56 (1H, m, H-8), 1,51 (1H, dd, *J*=15,2 y 8,3, H-1α), 1,48 (1H, m, H-4α), 1,46 (1H, m, H-12α), 1,44 (1H, m, H-11β), 1,43 (1H, m, H-2α), 1,23 (1H, m, H-15β), 1,20 (1H, m, H-14), 1,16 (1H, m, H-9), 0,92 (3H, s, H-19), 0,64 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 209,60 (C-20), 146,78 (C-5), 122,37 (C-6), 67,83 (C-3), 63,71 (C-17), 57,36 (C-14), 44,02 (C-13), 44,00 (C-9), 40,25 (C-4), 39,96 (C-10), 39,03 (C-12), 31,89 (C-8), 31,47 (C-21), 31,34 (C-7), 29,40 (C-1), 26,87 (C-4a), 26,58 (C-2), 24,33 (C-15), 23,71 (C-19), 22,84 (C-16), 21,64 (C-11), 13,82 (C-18).

EM (IE): m/z (%): 330 (M+, 23), 312 (15), 302 (14), 231 (46), 205 (22), 187 (25), 121 (36), 43 (100).

Microanálisis: $C_{22}H_{34}O_2$: calculado C: 79,9%, H: 10,4% Encontrado C: 79,9%, H: 10,4%.

4β-Hidroxi-A-homo-5-pregnen-20-ona (4)



Una solución de la dicetona **7** (0,007 g, 0,021 mmol) en THF anhidro (1 ml) se enfrió a -50ºC y se le agregó una solución de K-Selectride (1 M, 0,025 ml), bajo atmósfera de argón Se agitó durante 30 minutos, luego se volcó sobre una solución acuosa de cloruro de amonio (5%) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 85:15) para dar el alcohol **4** (0,005 g, 70%) como un sólido amorfo.

IR (KBr): 2928, 1705, 1541 y 1458 cm^{-1}.

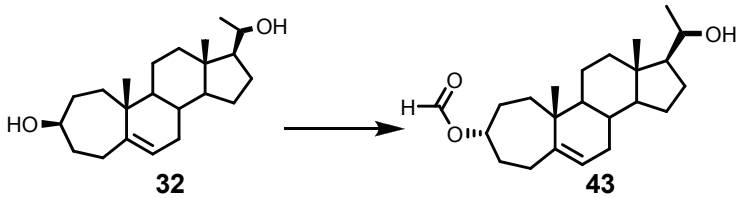
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,52 (1H, dd, *J*= 4,9 y 1,9, H-6), 3,94 (1H, br s,$W_{½}$=15,0, H-4), 2,54 (1H, t, *J*= 9,0, H-17), 2,46 (1H, br d, *J*= 13,6, H-4aβ), 2,22 (1H, dd, *J*= 13,6 y 1,0, H-4aα), 2,20 (1H, m, H-16β), 2,13 (3H, s, H-21), 2,11 (1H, dt, *J*= 16,8 y 4,7, H-7β), 2,06 (1H, dt, *J*= 12,0 y 3,1, H-12β), 1,98 (1H, dd, *J*= 14,4 y 8,9, H-1α), 1,87 (1H, br d, *J*= 14,3, H-3α), 1,70 (2H, m, H-15α y H-16α), 1,69 (2H, m, H-11α y H-7α),1,64 (1H, m, H-8), 1,48 (1H, dt, *J*= 2,9 y 12,0, H-12α), 1,41 (1H, m, H-11β), 1,36 (1H, m, H-3β), 1,33 (1H, m, H-2β), 1,25 (1H, m, H-15β), 1,23 (1H, m, H-14), 1,20 (1H, m, H-9), 1,12 (1H,m,H-2α), 1,05 (1H, dd, *J*= 14,4 y 10,0, H-1β), 0,94 (3H, s,H-19), 0,64 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 209,52 (C-20), 140,13 (C-5), 126,70 (C-6), 65,96 (C-4), 63,64 (C-17), 57,30 (C-14), 44,50 (C-10), 44,02 (C-13), 44,00 (C-9), 39,25 (C-3), 38,98 (C-12), 38,27 (C-4a), 36,68 (C-1), 31,84 (C-8), 31,52 (C-21), 30,93 (C-7), 24,31 (C-15), 24,01 (C-19), 22,89 (C-16), 21,57 (C-11), 17,05 (C-2), 13,37 (C-18).

EM (IE): m/z (%): 330 (M^+, 1), 312 (5), 149 (23), 105 (21), 85 (27), 55 (19), 43 (100).

Microanálisis: $C_{22}H_{34}O_2$: calculado C: 79,9%, H: 10,4% Encontrado C: 79,9%, H: 10,4%.

3α-Formiloxi-20β-hidroxi-A-homo-5-pregneno (43)



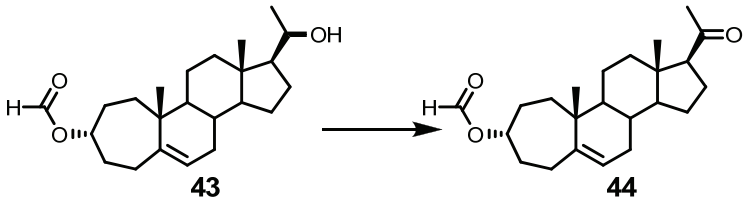
A una solución de azodicarboxilato de diisopropilo (0,027 g, 0,12 mmol) en THF (0,116 ml) se le agregó una solución del diol **32** (0,020 g, 0,060 mmol), trifenilfosfina (0,032 g, 0,12 mmol), y ácido fórmico (0,0048 ml, 0,12 mmol) en THF anhidro (0,75 ml). Se agitó durante 20 hs y luego se diluyó con diclorometano y se agregó sílica gel (0,100 g). El solvente se evaporó en un

evaporador rotatorio y el residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo, 95:5), para dar el formiato **43** (0,016 g, 71%), como un sólido amorfo.

RMN ^{1}H (200,13 MHz): 7,99 (1H, s, HCO_2), 5,49 (1H, dd, *J*= 4,8 y 1,6, H-6), 4,80 (1H, m, H-3), 3,72 (1H, m, H-20), 1,15 (3H, d, *J*= 6,2, H-21), 0,90 (3H, s, H-19), 0,80 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (50,32 MHz): 160,62 (HCO_2), 145,36 (C-5), 123,88 (C-6), 70,56 (C-20), 76,50 (C-3), 58,52 (C-17), 56,55 (C-14), 44,22 (C-9), 42,24 (C-13), 40,26 (C-10), 39,98 (C-12), 37,34 (C-4), 31,57 (C-8), 31,45 (C-7), 30,82 (C-1), 28,65 (C-2), 27,74 (C-4a), 25,70 (C-16), 24,39 (C-15), 23,61 (C-21), 23,31 (C-19), 21,41 (C-11), 12,49 (C-18).

3α-Formiloxi-A-homo-5-pregnen-20-ona (44)



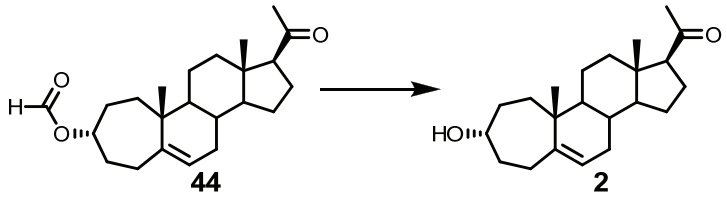
43 **44**

A una suspensión de PCC (0,036 g, 0,165 mmol), $BaCO_3$ (0,015 g, 0,080 mmol) y tamices moleculares de 4 Å (0,030 g) en diclorometamo seco (1 ml) se le agregó una solución del formiato **43** (0,015 g, 0,04 mmol) en diclorometano seco (1,5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente por 1 hora, luego se agregó celite (0,100 g), se evaporó el solvente a presión reducida y se eluyó a través de un tapón de sílica (hexano – acetato de etilo). El filtrado se evaporó y el residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 95:5) para dar la 20-cetona **44** (0,009 g, 60%) como un sólido amorfo.

RMN ^{1}H (200,13 MHz): 7,99 (1H, s, HCO_2), 5,49 (1H, dd, *J*= 5,5 y 2,0, H-6), 4,84 (1H, m, H-3), 2,12 (3H, s, H-21), 0,89 (3H, s, H-19), 0,63 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (50,32 MHz): 209,55 (C-20), 160,62 (HCO_2), 145,31 (C-5), 123,81 (C-6), 37,35 (C-4), 63,69 (C-17), 57,31 (C-14), 44,18 (C-9), 44,01 (C-13), 27,76 (C-4a), 76,60 (C-3), 39,00 (C-12), 40,26 (C-10), 31,74 (C-8), 31,34 (C-7), 30,89 (C-1), 28,65 (C-2), 22,89 (C-16), 24,37 (C-15), 31,55 (C-21), 23,31 (C-19), 21,61 (C-11), 13,38 (C-18).

3α-Hidroxi-A-homo-5-pregnen-20-ona (2)



44 **2**

A una solución de la cetona **44** (0,009 g, 0,02 mmol) en diclorometano (0,16 ml), metanol (0,53 ml) y agua (0,04 ml) se le agregó HCl concentrado (0,078 ml, 0,94 mmol). Se agitó durante una hora a temperatura ambiente, luego se neutralizó con $NaHCO_3$ (ss) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El residuo se

purificó por placa preparativa (hexano-acetato de etilo 7:3) para dar el alcohol **2** (0,008 g, 100%) como un sólido blanco.

Punto de fusión: 165-170°C (hexano-acetato de etilo).

IR (KBr): 3473, 2928, 1697 y 1043 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,47 (1H, dd, *J*= 5,0 y 2,0, H-6), 3,60 (1H, tdd, *J*= 10,5, 5,5 y 3,7, H-3), 2,54 (1H, t, *J*= 8,4, H-17), 2,19 (2H, m, H-16β y H-4β), 2,12 (3H, s, H-21), 2,05 (2H, m, H-12β y H-7β), 1,99 (2H, m, H-4aα y H-4aβ), 1,82 (1H, dd, *J*= 15,1 y 9,5, H-1α), 1,69 (1H, m, H-15α), 1,66 (2H, m, H-11α y H-16α), 1,64 (1H, m, H-2β), 1,59 (1H, m, H-7α), 1,55 (1H, m, H-8), 1,47 (1H, dt, *J*= 2,8 y 12,8, H-12α), 1,41 (1H, dc, *J*= 3,2 y 12,8, H-11β), 1,31 (1H, dt, *J*= 13,3 y 10,5, H-2α), 1,23 (1H, m, H-15β), 1,22 (1H, m, H-4α), 1,21 (1H, m, H-14), 1,18 (1H, dd, *J*= 15,1 y 10,5, H-1β), 1,17 (1H, m, H-9), 0,88 (3H, s, H-19), 0,63 (3H, s, H-18).

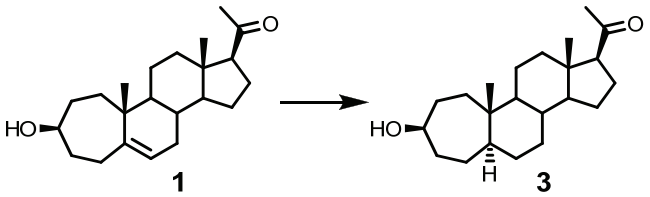
RMN ^{13}C (125,77 MHz): 209,58 (C-20), 145,86 (C-5), 123,29 (C-6), 74,87 (C-3), 63,68 (C-17), 57,31 (C-14), 44,18 (C-9), 44,00 (C-13), 41,39 (C-4), 40,37 (C-10), 39,00 (C-12), 32,46 (C-2), 31,74 (C-8), 31,51 (C-21), 31,34 (C-7), 31,05 (C-1), 27,97 (C-4a), 22,86 (C-16), 24,34 (C-15), 23,34 (C-19), 21,59 (C-11), 13,34 (C-18).

EM (IE): m/z (%): 330 (M+, 16), 312 (34), 284 (41), 231 (20), 187 (21), 91 (45), 79 (45), 43 (100).

EMAR m/z: 331,2633 (M+H, $C_{22}H_{35}O_2^+$ calculado 331,2632), 313,2528 (M+H-H_2O, $C_{22}H_{33}O_1^+$ calculado 313,2526).

Microanálisis: $C_{22}H_{34}O_2$: calculado C: 79,9%, H: 10,4% Encontrado C: 79,8%, H: 10,4%

3β-Hidroxi-A-homo-5αH-pregnan-20-ona (3)



1 3

A una solución del esteroide **1** (0,02 g, 0,061 mol) en acetato de etilo (5 ml) se le agrego paladio sobre carbono al 10% (0,060 g). La suspensión se hidrogenó por 22 horas a 60 psi y temperatura ambiente. Luego se filtró a través de una columna de sílica gel y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo obtenido resultó ser una mezcla 9:1 de los 5αH y 5βH esteroides (determinado por RMN ^{1}H) y se purificó por placa preparativa (hexano-acetato de etilo 8:2) para dar el homopregnano **3** (0,016 g, 80%) como un sólido blanco.

Punto de fusión: 148-150°C (hexano-acetato de etilo).

IR (KBr): 3421, 2926, 1695, 1541, 1458 y 1038 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 3,94 (1H, ddt, *J*= 8,8, 3,6 y 5,7, H-3), 2,51 (1H, t, *J*= 9,0, H-17), 2,14 (1H, m, H-16β), 2,11 (3H, s, H-21), 2,00 (1H, dt, *J*= 12,4 y 3,3, H-12β), 1,91 (1H, m, H-4α), 1,75 (1H, m, H-1β), 1,73 (1H, m, H-2α), 1,69 (2H, m, H-4aα y H-11α), 1,65 (1H, m, H-2β), 1,64 (1H, m, H-15α), 1,63 (2H, m, H-4β y H-7β), 1,61 (1H, m, H-16α), 1,40 (1H, dt, *J*= 3,8 y 12,4, H-12α),

1,29 (2H, m, H-6), 1,28 (1H, m, H-11β), 1,27 (1H, m, H-8), 1,17 (1H, m, H-15β), 1,12 (1H, m, H-14), 1,10 (1H, m, H-1α), 1,07 (1H, m, H-9), 1,06 (1H, m, H-4aβ), 0,88 (1H, m, H-7α), 0,79 (3H, s, H-19), 0,73 (1H, ddd, *J*= 12,2, 10,5 y 3,8, H-5), 0,59 (3H, s, H-18).

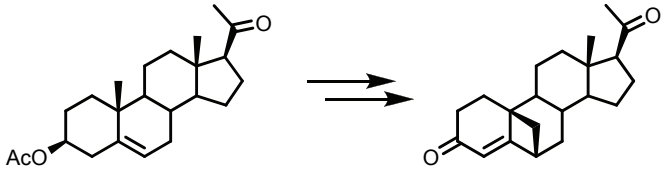
RMN ^{13}C (125,77 MHz): 209,50 (C-20), 71,46 (C-3), 63,87 (C-17), 56,96 (C-14), 53,52 (C-5), 48,44 (C-9), 44,06 (C-13), 39,30 (C-12), 38,72 (C-10), 36,94 (C-4), 36,31 (C-1), 35,27 (C-8), 32,31 (C-7), 31,53 (C-2), 31,47 (C-21), 31,27 (C-6), 26,61 (C-4a), 24,41 (C-15), 22,81 (C-16), 21,75 (C-11), 13,75 (C-19), 13,43 (C-18).

EM (IE): m/z (%): 332 (M+, 9), 314 (13), 43 (100);

EMAR m/z: 333,2784 (M+H, $C_{22}H_{37}O_2^+$ calculado 333,2788), 315,2677 (M+H-H_2O, $C_{22}H_{35}O_1^+$ calculado 315,2682)

Microanálisis: $C_{22}H_{36}O_2$: calculado C: 79,5%, H: 10,9% Encontrado C: 79,4%, H: 10,7%

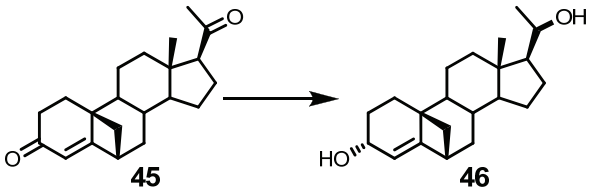
6,19-Ciclopregn-4-eno-3,20-diona (45)



Acetato de pregnenolona **45**

Se sintetizó a partir de acetato de pregnenolona, según el procedimiento descripto por Di Chenna y *col.*[9]

6,19-Ciclopregn-4-eno-3,20-diol (46)



45 **46**

A una solución del esteroide **45** (30 mg, 0,096 mmol) en diclorometano (0,5 ml) y metanol (0,5 ml) se le agregó borohidruro de sodio (7,22 mg, 0,191 mmol) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó agua, se concentró en evaporador rotatorio, se agregó diclorometano y se separó la fase orgánica. El residuo obtenido luego de evaporar el solvente se purifico por CF (hexano-acetato de etilo) para dar el producto **46** (21 mg, 69%).

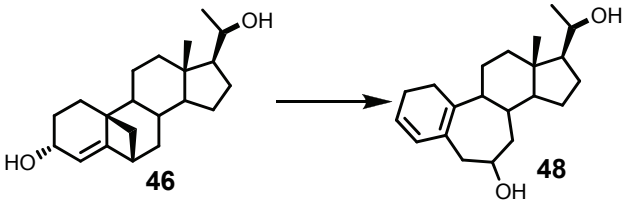
RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,08 (1H, d, *J*= 2,7, H-4), 4,30 (1H, m, H-3), 3,71 (1H, m, H-20), 2,95 (1H, t, *J*= 5,2, H-6), 2,26 (1H, d, *J*=8,6, H-19a), 2,11 (1H, m, H-12), 1,89 (1H, m, H-8), 1,88 (1H, m, H-1), 1,87 (1H, m, H-7), 1,25 (1H, m, H-14), 1,68 (1H, m, H-16), 1,68 (1H, m, H-9), 1,57 (1H, m, H-11), 1,55 (1H, m, H-15), 1,41 (1H, m, H-7), 1,35 (1H, m, H-12), 1,34 (1H, m, H-17),

[9] Di Chenna, P. H., Veleiro, A. S., Sonego, J. M., Ceballos, N. R., Garland, M. T., Baggio, R. F., Burton, G., *Org.Biomol.Chemy*, **2007**, *5*, 2453-2457

1,32 (1H, m, H-11), 1,31 (1H, m, H-1), 1,27 (1H, m, H-15), 1,25 (1H, m, H-14), 1,22 (1H, dd, *J*=8,6 y 5,5, H-19b), 1,16 (1H, m, H-16), 1,14 (3H, d, *J*=6,0, H-21), 0,81 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 156,59 (C-5), 107,68 (C-4), 70,35 (C-20), 68,49 (C-3),58,16 (C-17), 54,76 (C-14), 49,66 (C-9), 48,85 (C-10), 43,97 (C-13), 43,01 (C-6), 40,30 (C-12), 34,34 (C-8), 32,88 (C-7), 32,51 (C-19), 29,30 (C-1), 28,83 (C-2), 25,94 (C-16), 24,15 (C-11), 23,56 (C-15), 23,43 (C-21), 13,04 (C-18).

6,20β-Dihidroxi-6(5→19)*abeo*-3,5(10)-pregnadieno (48)



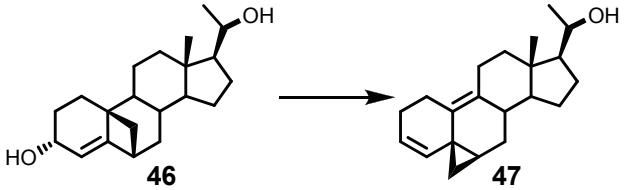
A una solución del esteroide **46** (0,032 g, 0,100 mmol) en acetona (6 ml) se le agregó ácido *p*-toluensulfónico (0,001 g, 0,005 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente por 1,5 horas, luego se agrego $NaHCO_3$ (ss, 2 gotas) y se llevo a sequedad. El residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 9:1) para dar el B-homopregnano **48** (0,006 g, 19%) como un sólido blanco.

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,92 (1H, d, *J*= 9,3, H-2), 5,74 (1H, ddd, *J*= 8,9, 4,2, 4,2, H-3), 4,48 (1H, m, $W_{½}$ = 23, H-6), 3,87 (1H, m, H-21), 3,20 (1H, t, *J*= 12,6, H-1), 2,64 (1H, dd, *J*= 12,4 y 3,0, H-12), 2,47 (1H, dd, *J*= 13,7 y 5,4, H-1), 2,35 (1H, c, *J*= 10,5, H-8), 2,14 (1H, H-19), 2,02 (1H, H-11), 2,01 (1H, H-4), 1,80 (1H, H-4), 1,79 (1H, H-7), 1,78 (1H, H-19), 1,77 (1H, H-15), 1,75 (1H, H-9), 1,60 (1H, H-16), 1,58 (1H, H-17), 1,32 (1H, H-15), 1,79 (1H, H-7), 1,29 (1H, d, *J*= 6,1, H-21), 1,20 (1H, H-14), 0,98 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 149,82 (C-10), 136,05 (C-5), 132,43 (C-2), 124,07 (C-3), 69,20 (C-20), 69,14 (C-6), 58,82 (C-17), 55,54 (C-14), 55,33 (C-9), 43,75 (C-13), 40,90 (C-12), 39,47 (C-1), 39,10 (C-4), 33,74 (C-8), 28,22 (C-19), 27,20 (C-7), 25,64 (C-16), 25,02 (C-15), 24,07 (C-21), 23,04 (C-11), 12,52 (C-18.)

Continuando la elución con el mismo solvente se obtuvo el ciclopropilesteroide **47** (0,0013 g, 40%) idéntico al obtenido abajo.

20β-Hidroxi-5β,6β-metilen-19-nor-3,9(10)-pregnadieno (47)



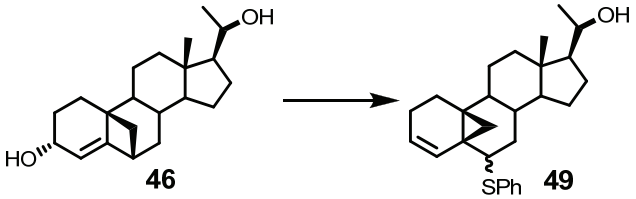
Una solución del esteroide **46** (0,100 g, 0,316 mmol) en diclorometano (36 ml) se enfrió a -50ºC y se le agregó eterato de trifluoruro de boro (0,035, 0277 ml). A los 10 minutos se volcó sobre

$NaHCO_3$ 5% y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 9:5) para dar el ciclopropilesteroide **47** (0,030 g, 53%), recuperando parcialmente **46** sin reaccionar (0,040 g).

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 5,72 (1H, ddd, *J*= 9,6, 4,7 y 1,6, H-3), 4,94 (1H, dd, *J*= 9,6 y 1,8, H-4), 3,75 (1H, m, H-20), 2,84 (1H, dd, *J*= 14,0 y 2,9, H-1), 2,63 (1H, dd, *J*= 13,7 y 3,3, H-11β), 1,14 (3H, d, *J*= 6,0, H-21), 0,86 (1H, dd, *J*= 6,0 y 4,0, 19a), 0,80 (1H, s, H-18), 0,74 (1H, dd, *J*= 8,5 y 4,0, H-19b).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 135,21 (C-4), 129,97 (C-10), 125,65 (C-9), 124,37 (C-3), 70,62 (C-20), 58,32 (C-17), 55,03 (C-14), 41,98 (C-13), 39,37 (C-12), 33,06 (C-8), 26,59 (C-7), 25,70 (C-15 y C-16), 25,35 (C-1), 25,05 (C-2), 23,80 (C-11), 23,71 (C-6), 23,35 (C-21), 21,39 (C-5), 19,12 (C-19), 11,38 (C-18).

20β-Hidroxi-6-feniltio-19β,5-ciclo-3-pregneno (49)



Una solución del esteroide **46** (0,030 g, 0,095 mmol) en diclorometano (13 ml) se enfrió a -50ºC y se le agregó tiofenol (0,098 ml, 0,957 mmol) y eterato de trifluoruro de boro (0,031 ml, 0,190 mmol). A los 10 minutos se volcó sobre $NaHCO_3$ 5% y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por CF (hexano-acetato de etilo 9:5) para dar el tioéter **49** (0,0053 g, 14%) como un sólido blanco.

RMN ^{1}H (500,13 MHz): 7,42 (1H, dd, *J*= 8,4 y 1,4, Ar-2), 7,29 (1H, dt, *J*= 7,5 y 1,4, Ar-3), 7,24 (1H, tt, *J*= 7,5 y 1,5, Ar-4), 5,89 (1H, dd, *J*= 9,8 y 2,7, H-4), 5,38 (1H, ddd, *J*= 9,8, 6,9 y 2,0, H-3), 3,75 (1H, m, H-20), 3,68 (1H, d, *J*= 6,3, H-6), 1,14 (3H, d, *J*=6,2, H-21), 1,08 (1H, d, *J*=4,6, H-19a), 0,84 (1H, d, *J*=4,6, H-19b) 0,82 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125,77 MHz): 136,07 (Ar-1), 134,90 (C-4), 132,58 (Ar-2), 128,76 (Ar-3), 126,76 (Ar-4), 121,39 (C-3), 70,50 (C-20), 58,65 (C-17), 54,03 (C-14), 50,56 (C-6), 47,65 (C-9), 43,11 (C-13), 39,95 (C-12), 33,67 (C-7), 32,09 (C-10 y 5), 30,54 (C-8), 25,81 (C-16), 25,56 (C-1), 24,51 (C-2), 24,27 (C-15), 23,62 (C-21), 21,68 (C-11), 17,17 (C-19), 12,82 (C-18).

5.3 Actividad Biológica

Actividad de transactivación PR y MR, inducción de MMTV-Luc en células Cos-1

Las células Cos-1 se hicieron crecer a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% CO_2 en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de caballo (FCS) conteniendo penicilina (100 IU/mL), streptomicina (100 mg/mL) y glutamina (2 mM) en placas p100. Para las transfecciones transientes, se plaquearon 5×10^5 células en placas de 60 mm y se transfectaron, utilizando el método lipofectina de acuerdo al protocolo estándar (Lipofectine Plus, Gibco, Inc.). Para el análisis de la actividad PR se transfectó con 3 μg de pMMTV-Luc, plásmido que expresa la enzima luciferasa bajo control del promotor del Virus de Tumor Mamario de Ratón, promotor que contiene varias unidades del elementos de respuestas a hormonas (HRE), 1 μg de phPR que expresa la isoforma B del PR humano y 3 μg de pRSV-LacZ (Clontech Inc., Palo Alto, CA) como control de trasfección. Veinte horas después de la transfección, el medio se remplazó por medio fresco conteniendo 10% de suero deslipidizado y antibióticos. Las células fueron entonces incubadas durante 24 hs con los esteroides a las concentraciones indicadas. Los esteroides se agregaron de soluciones madres 10^{-2} M en DMSO. La incubación se detuvo aspirando el medio y las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS). Las células se cosecharon con buffer de lisis y la actividad luciferasa se midió de acuerdo con el protocolo estándar (Promega Inc.). La actividad galactosidasa se midió según el procedimiento descripto por Veleiro y *col.*[10] El análisis de la actividad MR se realizó de igual manera, utilizando 1 μg de phMR, plásmido que expresa el receptor de mineralocorticoides humano.

Actividad de transactivación GR, inducción de MMTV-Luc en células BHK

Las células BHK se hicieron crecer a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% CO_2 en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de caballo (FCS) conteniendo penicilina (100 IU/mL) y streptomicina (100 mg/mL) en placas p100. Para las transfecciones transientes, se plaquearon 5×10^5 células en placas de 24 wells y se transfectaron, utilizando el método lipofectina de acuerdo al protocolo estándar (Lipofectine Plus, Gibco, Inc.): 0,3 μg pMMTV-Luc, y 0,3 μg de pRSV-LacZ (Clontech Inc., Palo Alto, CA). Veinte horas después de la transfección, el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo antibióticos. Las células fueron entonces incubadas durante 20 hs con los esteroides a las concentraciones indicadas. La incubación se detuvo aspirando el medio y lavando las células dos veces con buffer fosfato salino (PBS). Las células fueron entonces lisadas y la actividad luciferasa medida de acuerdo con el protocolo estándar (Promega Inc.). La actividad galactosidasa se midió como se describió previamente.

[10] Veleiro, A.S., Pecci, A., Monteserin, M.C., Baggio, R., Garland, M.T, Lantos, C.P., Burton, G., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5675-

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de tesis fue la obtención de análogos de esteroides bioactivos, el estudio de su actividad biológica y la relación estructura-actividad. Por un lado, se sintetizó un análogo no hidrolizable del modulador selectivo del GR, 21HS-6,19OP. Estudios de modelado molecular sugerían que el reemplazo de la unión ester por dos metilenos podría dar lugar a un novedoso análogo. Por otro lado, se diseñaron y sintetizaron cuatro A-homoanálogos del neuroesteroide allopregnanolona. Estos análogos, al poseer un anillo A de siete miembros, tienen mayor flexibilidad conformacional que los neuroesteroides naturales. Además, dos de los A-homoesteroides intermediarios de síntesis con funcionalidad ceto en el anillo A y 20-ceto se adecúan a la descripción del farmacóforo para el PR sugiriendo que podían ser análogos de progesterona por lo que se estudió su actividad transcripcional sobre dicho receptor.

En el **Capítulo 1** se realiza una introducción general a los esteroides y sus funciones biológicas, enfatizando en los esteroides neuroactivos las hormonas esteroidales glucocorticoides y los progestágenos, indicando para cada caso el tipo de actividad fisiológica y farmacológica de los mismos, la estructura del farmacóforo y la relación estructura-actividad haciendo una breve reseña de los distintos tipos de análogos preparados hasta el momento.

En el **Capítulo 2** se describe la síntesis del compuesto **5** (Ácido 7-(3-oxo-6,19-epoxiandrost-4-en-17β-il)-7-oxo-heptanoico) a partir del compuesto **14** (3α-hidroxi-6,19-epoxipregn-4-en-20-ona). Dicha síntesis requirió el desarrollo de una metodología sencilla, para la alquilación de 20-cetopregnanos, que consistía en la formación del sililenoléter, seguido de la condensación de Mukaiyama con un aldehído one-pot. Además, a través de esta metodología se obtuvo el compuesto **19** (6-(3β-t-Butildimetilsililoxi-androst-5-en-17β-il)-6-oxo-4-hidroxihexanoato de metilo), precursor de la síntesis de análogos del LXR y el DAF-12.

En el **Capítulo 3** se describe la síntesis de los A-homoanálogos de allopregnanolona **1-4**, y de progesterona **6** y **7**. Para dicha síntesis de optimizó la reacción de expansión previamente desarrollada en nuestro laboratorio. Para ello se sometido al ciclopropilcarbinol **29** a un reordenamiento catiónico catalizado por ácidos y promovido por microondas, para dar el A-homo-3,5-pregnadieno **30** de modo limpio, rápido y con muy buen rendimiento. Con el objetivo de funcionalizar el anillo A del A-homopregnadieno **30** para la síntesis de análogos de hormonas y neuroesteroides, fue necesario realizar una epoxidación selectiva del doble enlace 3,4 frente al 5,6. Dado que desde el punto de vista electrónico, la reacción de epoxidación es más favorable sobre el doble enlace 5,6 más sustituido, pero por otro lado ese doble enlace está estéricamente más impedido que el 3,4, la regioselectividad se logró epoxidando con dioxiranos voluminosos generados *in situ*, con un derivado de fructosa como catalizador y Oxone® como oxidante para dar el epóxido β. Por de reducción del epóxido se obtuvieron una mezcla de los dioles 3β,20 y 4β,20, que por oxidación dieron las dionas **6** y **7** análogas de progesterona (A-Homo-5-pregneno-3,20-diona y A-Homo-5-pregneno-4,20-diona) respectivamente. El análogo 3β-Hidroxi-A-homo-

5-pregnen-20-ona **1** y su regioisómero 4α-hidroxi **4** se obtuvieron por reducción regioselectiva de las dionas **6** y **7** respectivamente. El análogo 3β-hidroxi-5αH **3** se obtuvo por hidrogenación de **1**. El análogo 3α-hidroxi **2** se obtuvo a través de una inversión de Mitsunobu el diol 3β,20, obteniéndose el formiato en 3α. Luego se oxidó la posición 20, y se hidrolizó el formiato, obteniéndose el neuroesteroide **2**.

En el **Capítulo 4** se describe la actividad biológica de los compuestos sintetizados. En cuanto a los análogos de esteroides neuroactivos el compuesto **1** resultó ser el más activo de la serie de A-homoanálogos de esteroides neuroactivos, con una actividad comparable a la de pregnanolona. Por métodos computacionales se demostró que la flexibiliad que le otorga anillo A 7 miembros le permite a este análogo explorar múltiple conformaciones, una de estas con una excelente superposición con la del neuroesteroide natural. Los otros análogos **2**-**4** resultaron levemente activos, y los intentos de superponer las sus estructuras con este neuroesteroide sólo dieron encajes pobres Por otro lado los ensayos de actividad de los análogos de hormonas mostraron que el compuesto **5**, análogo no hidrolizable del 21HS-6,19-OP resultó ser inactivo. Esto podría deberse a que el aumento de la hidrofobicidad de la cadena, generado por el reemplazo del éster por dos metilenos, favorezca una conformación no activa del esteroide. Los A-homo análogos de progesterona **6** y **7** resultaron ser agonistas selectivos del PR, demostrando que el aumento de flexibilidad del anillo A expandido les permitiría a los análogos explorar conformaciones activas, y que, por otro lado, el aumento de hidrofobicidad el anillo A expandido disminuiría su afinidad por el MR, haciéndolos selectivos por el PR.

En el **Capítulo 5** se describe la parte experimental del trabajo realizado que incluye datos espectroscópicos y propiedades físicas de los compuestos descriptos.

En el **Apéndice A** se detallan las estructuras de los compuestos sintetizados en esta tesis doctoral.

En el **Apéndice B** se encuentran las tablas con las asignaciones de RMN ^{13}C de los compuestos más significativos.

Parte de este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones

- Alvarez, L. D., Dansey, M. V., Martí, M. A., Bertucci, P. Y., Di Chenna, P. H., Pecci, A., Burton, G., "Biological activity and ligand binding mode to the progesterone receptor of A-homo analogues of progesterone", *Bioorganic and Medicinal Chemistry,* **2011**, *19*, 1683-1691.

- Dansey, M. V., Di Chenna, P. H., Veleiro, A. S., Chodounska, H., Kasal, A., Burton, G., "Synthesis and $GABA_A$ receptor activity of A-homo analogues of neuroactive steroids". *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, *45*, 3063-3069.