

# Aplicación del cribado virtual para la obtención de nuevos esteroides 17 $\alpha$ -metilados con potencial actividad anabólica y androgénica

**Reyes-Moreno M, Ruiz-García J A, Álvarez-Ginarte Y M, Ruiz-Reyes A, Ibarra-Reyes Y, Sandoval-Ramírez J, Mesa-Reyes S, Montiel-Smith S.**

Centro de Química Biomolecular. 200 y 21, Atabey, Aptado 16042. Playa, Centro Habana, Cuba. Telf. 271-7925; 870-0657. mayra.reyes@cqb.cu Facultad de Química, Universidad de la Habana. Benemérita Universidad de Puebla, México.

Recibido: 26 de enero de 2011.

Aceptado: 31 de agosto de 2011.

Palabras clave: esteroides, anabólicos, androgénicos, descriptores, cribado.  
Key words: steroids, anabolics, androgens, descriptors, screening.

**RESUMEN.** Los métodos computacionales de cribado virtual de grandes bases de datos se tienen en cuenta en el uso de modelos de relación estructura-actividad biológica (QSAR), los que se convierten en una alternativa interesante para la selección de elevado rendimiento y como una importante herramienta de descubrimiento de nuevos medicamentos. En trabajos anteriores, se construyó por primera vez un modelo QSAR para la predicción de nuevos esteroides anabólicos-androgénicos en una serie heterogénea de moléculas cuya actividad biológica fue previamente evaluada *in vivo*. En dicho modelo, se emplearon descriptores moleculares cuánticos y químico-físicos, unido a técnicas quimiométricas que ayudan a explicar cómo influyen las características estéricas, electrónicas e hidrofóbicas en la respuesta biológica de dichos compuestos. En este trabajo, se utilizó la ecuación del modelo antes mencionado y se realizó un cribado virtual aplicado a esteroides anabólicos-androgénicos sintetizados y evaluados por los autores con anterioridad, en el cual se demuestra que el modelo desarrollado puede ser aplicado en la identificación de nuevos compuestos líderes con mejor actividad anabólica. Atendiendo estos resultados, se diseñó una secuencia apropiada de síntesis para obtener esteroides 17 $\alpha$ -metilados, lo que permitió obtener cinco nuevos compuestos con potencial actividad anabólica, que se caracterizan correctamente por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , así como por espectrometría de masas.

**ABSTRACT.** Computational methods for virtual screening of large databases are taken into account in the use of models of biological structure-activity relationship (QSAR), which makes an interesting alternative for high-through put screening (SAR) as an important tool for drug discovery. In previous builds first QSAR model for prediction of new anabolic-androgenic a loose collection of molecules whose biological activity was previously evaluated *in vivo*. In this model it was used quantum molecular descriptors and chemical-physical, coupled with chemometric techniques that help explain how the steric, electronic and hydrophobic characteristics influence in the biological response of these compounds. In this paper it was use the model equation above and perform a virtual screening applied to anabolic- androgenic steroids synthesized and evaluated by the authors before, where it is shown that the model developed can be applied in the identification of new lead compounds with best anabolic activity. Because these results are designing an appropriate sequence for synthetic 17 $\alpha$ -methyl steroids, which yielded five new compounds with potential anabolic activity, correctly characterized by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and mass spectrometry.

## INTRODUCCIÓN

Conocidas modificaciones de la molécula de testosterona incluyen la alquilación en la posición 17 $\alpha$  y modificaciones en la estructura de los anillos. Fue objetivo de estas modificaciones la producción de derivados con una mayor actividad anabólica y/o androgénica que la molécula de origen. La esterificación del grupo 17 $\beta$ -hidroxilo por ácidos carboxílicos también aumenta la actividad de los esteroides, debido a la prolongación de la acción, ya que se aumentan sus propiedades lipofílicas y por ende, la capacidad de retención en el tejido graso.

Los andrógenos ejercen sus efectos mediante la unión a su receptor (RA).<sup>1</sup> La función del RA es regulada por la unión de los andrógenos, la cual inicia una secuencia de cambios conformacionales en el re-

ceptor que afectan a las interacciones proteína-receptor y DNA-receptor.

Además de los andrógenos naturales, al RA se une una gran variedad de moléculas sintéticas con diferentes afinidades. Los ligandos RA conocidos son clasificados como esteroideos o no esteroideos sobre la base de su estructura, o como agonistas o antagonistas en función de su capacidad de activar o inhibir la transcripción de genes que contribuyen al RA diana. Una considerable atención se dirige a la elucidación de los efectos de los cambios estructurales en la acción de los esteroides anabólicos-androgénicos (EAA).

Los estudios de estructura-actividad apoyan lo anteriormente expuesto y dan lugar a importantes conclusiones:

■ Un grupo 3-ceto en el anillo A del esteroide (Fig. 1): El

átomo de oxígeno del grupo ceto en la posición C-3 tiene un par solitario de electrones y por lo tanto, puede actuar como un aceptor de enlace de hidrógeno capaz de establecer una fuerte interacción con aminoácidos polares o cargados.<sup>2</sup> La reducción del grupo ceto a un alcohol en la posición C-3 (ya sea  $\alpha$  o  $\beta$  isómeros) no es favorable para la unión.<sup>3</sup> Por ejemplo, tanto el androstanodiol como el  $3\beta$ -androstanodiol muestran una más débil unión que la  $5\alpha$ -dehidrotestosterona (DHT). Del mismo modo, la reducción del grupo ceto en la posición C-3 en la molécula de testosterona al  $3\alpha$ -hidroxi isómero (4-androstanodiol) reduce la afinidad de la unión.

■ Un grupo  $17\beta$ -hidroxi en el anillo D del esteroide (Fig. 1): El átomo de hidrógeno del grupo  $17\beta$ -hidroxi lleva una carga positiva que permite la interacción con un átomo muy electronegativo debido a un residuo de amino ácido adyacente.<sup>1</sup> Cualquier modificación o eliminación del grupo  $17\beta$ -hidroxi reduce la afinidad de unión con el RA. Una reducción en la afinidad de unión también se observa por esterificación del grupo  $17\beta$ -hidroxilo de la testosterona y la DHT con ácido benzoico.<sup>2</sup> El grupo  $17\alpha$ -hidroxilo no favorece tampoco la unión con el RA. El movimiento del grupo hidroxilo de la posición  $17\beta$  a la  $17\alpha$  da lugar a la pérdida de la actividad en casi 190 veces de la testosterona. También se sabe que la introducción de grupos metilo en las posiciones 1, 2, 4, 6, 16 y 17 conduce a un notable incremento en la actividad anabólica.<sup>4</sup>

■ El grupo metilo C-19 del esteroide (Fig. 1): La eliminación de este grupo reduce en gran medida las propiedades androgénicas<sup>5,6</sup> y ofrece, en parte, la disociación de las actividades androgénicas y anabólicas de una molécula.

Los elementos estructurales que contribuyen a condicionar los efectos de los esteroides anabólicos son:

La modificación del anillo A (Fig. 2): La modificación del anillo A como resultado de su unión con un anillo de pirazol, como en el stanozolol, o por la introducción de un átomo de oxígeno en la posición C-2, como en la oxandrolona, producen cambios en el entorno electrónico y estérico de la molécula, dando lugar a un aumento considerable de la actividad anabólica. Por otra parte, la introducción de sustituyentes alquílicos en el anillo A en la posición C-1 (metenolona) o en la posición C-2 (stenbolona), en combinación o no con un doble enlace

en la posición C-1, -2, conduce a la intensificación de la actividad de los esteroides anabólicos.

Recientes acontecimientos en la química combinatoria y la selección de un elevado rendimiento (SAR) han aumentado dramáticamente la escala de los programas de descubrimiento de fármacos que se llevan a cabo. Junto con estos avances surge la necesidad de utilizar métodos automatizados para determinar cómo a partir de una biblioteca deben ser escogidos dos para ser sintetizados los nuevos compuestos. Los métodos computacionales de cribado virtual de grandes bases de datos se tienen en cuenta en el uso de modelos de relación estructura-actividad biológica (QSAR), los que se convierten en una alternativa interesante para la selección de elevado rendimiento (SAR) y como una importante herramienta de descubrimiento de medicamentos. Debido a esto, en lugar de ensayar un gran número de compuestos químicos en una serie de pruebas biológicas, lo que se hace es un ensayo virtual de estos compuestos mediante la evaluación de sus actividades con modelos desarrollados para este fin, proceso que se conoce hoy como cribado computacional (virtual o en silico).<sup>7,8</sup>

El principal objetivo del cribado virtual es discriminar moléculas activas de aquellas menos activas o inactivas. Una vez identificado el compuesto cabeza de la serie comienza el proceso de optimización del líder, cuyo objetivo es mejorar su eficacia terapéutica: incremento de su potencia frente a una diana terapéutica (receptor), selectividad frente a dianas relacionadas, farmacocinética, minimización de su toxicidad y los eventos o reacciones adversas.<sup>9,10</sup>

Las técnicas de cribado virtual se pueden clasificar de acuerdo con un modelo particular de reconocimiento molecular y el tipo de algoritmo que se utiliza en la base de datos de búsqueda. Si la estructura 3D del blanco terapéutico (o al menos en su sitio activo) se conoce, se puede aplicar uno de los métodos de detección basados en estructuras virtuales. Por el contrario, los métodos basados en ligandos se encuentran sobre el principio de similitud, es decir, compuestos similares se supone que producen acciones similares. Sin embargo, el no conocimiento sobre la estructura 3D del receptor (en el nivel adecuado y con varios ligandos) es la principal razón de la aplicación de métodos basados en ligandos.

Álvarez en su trabajo de tesis doctoral<sup>11</sup> construyó

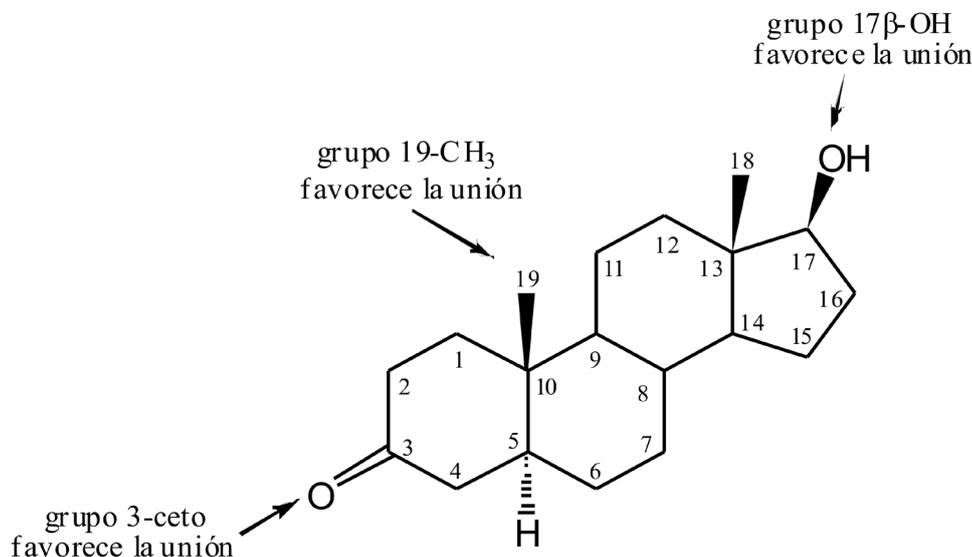


Fig. 1. Estructura de la molécula de esteroide y sitios importantes de unión.

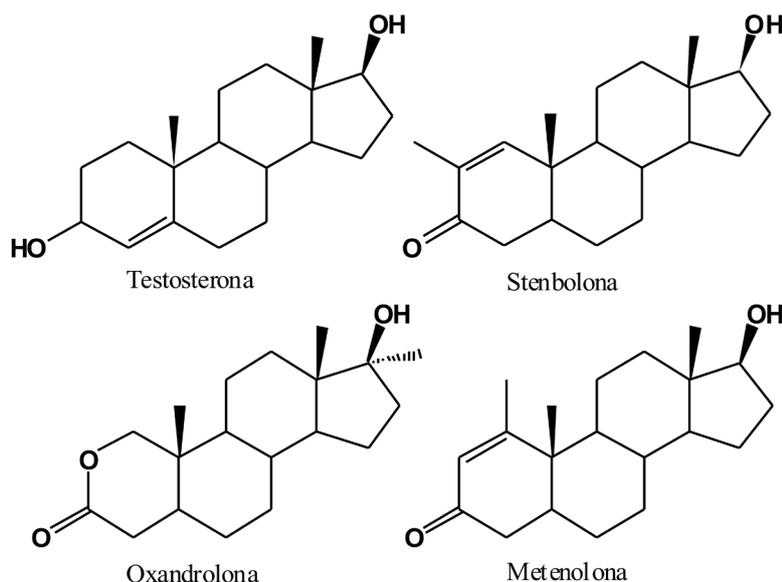


Fig. 2. Estructuras esteroideas modificadas en el anillo A.

por primera vez un modelo QSAR para la predicción de nuevos esteroides anabólicos-androgénicos en una serie heterogénea de moléculas cuya actividad biológica fue previamente evaluada *in vivo*.<sup>12</sup> En dicho modelo, se emplearon descriptores moleculares cuánticos y químico-físicos, unido a técnicas quimiométricas que ayudan a explicar cómo influyen las características estéricas, electrónicas e hidrofóbicas en la respuesta biológica de tales compuestos.<sup>13-16</sup>

Con el fin de evaluar la capacidad del modelo QSAR basado en ligandos, se utilizó la ecuación 1 reportada por Álvarez con anterioridad,<sup>11,15</sup> para la detección de nuevos EAA con buen perfil biológico.

Este trabajo da continuidad a otros anteriores<sup>17</sup> del mismo colectivo autoral y en él a través del cribado virtual empleado, se predice la actividad anabólica y/o androgénica de nuevos esteroides metilados en C-17. Se diseñó una ruta para su síntesis y se caracterizaron adecuadamente mediante la espectroscopia RMN<sup>1</sup>H, y de <sup>13</sup>C, así como por espectrometría de masas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para sintetizar todos los compuestos se empleó el intermedio avanzado acetato de 5 $\alpha$ -9(11)-androstén-3 $\beta$ -ol-17-ona (**1**) purificado, con una temperatura de fusión de 96-99 °C. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$  5,38 (1H, d, H-11, [<sup>3</sup>J(H-11, H-12<sub>ec</sub>) = 5,9 Hz]); 4,7 (1H, m, H-3); 2,05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); 1,0 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19); 0,81 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$  222,2 C-17; 170,5 C-20; 147,1 C-9; 114,7 C-11; 73,1 C-3; 48,6 C-14; 45,8 C-13; 42,5 C-5; 37,7 C-10; 36,0 C-12; 35,8 C-8; C-1 34,8; 33,7 C-4; 32,9 C-16; 31,7 C-6; 27,7 C-7; 27,1 C-2; 22,4 C-15; 21,0 C-21; 17,6 C-19; 13,5 C-18.

Los reactivos y disolventes empleados en cada uno de los procedimientos fueron de calidad para síntesis (Merck). El agua empleada siempre fue desionizada.

Para la determinación de las temperaturas de fusión de los compuestos sintetizados se empleó un equipo de punto de fusión directo de lectura digital marca GALLENKAMP, con intervalo de temperatura entre 20 y 400 °C.

Los espectros de RMN de protones y carbono 13 se registraron en un equipo Varian Mercury a 300 MHz. Se utilizaron como disolventes cloroformo y metanol deuterado y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los corrimientos químicos fueron expresados en la escala  $\delta$  (ppm). La multiplicidad de las señales para los protones se designó de la manera siguiente: singlete (s), doblete (d), doblete de doblete (dd), triplete (t), cuarteto (q), multiplete (m) y señal ancha (s.a.). El tipo de carbono se determinó empleando la técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). En el caso de la RMN <sup>13</sup>C, las asignaciones estuvieron basadas en datos tabulados por Blunt<sup>18</sup> Römer<sup>19</sup> y Ruiz.<sup>20,21</sup>

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas cuadrupolar TRIO 1000 Fisons Instruments a 70 eV por ionización electrónica (IE), empleando el método de introducción directa de la muestra. Para su análisis se utilizaron los resultados descritos para las fragmentaciones características de moléculas esteroideas.<sup>22,23</sup>

## Cribado Virtual.

Para el cribado virtual, las moléculas de esteroides utilizadas se dibujaron mediante un programa para la modelación molecular.<sup>24</sup> El cálculo del descriptor *Log P* (coeficiente de partición octanol-agua) se realizó con el programa HYPERCHEM 7.<sup>24</sup> Los cálculos químicos-cuánticos semiempíricos del tipo PM3 se efectuaron con el programa MOPAC, versión 6.0.<sup>25</sup> En todos los casos, se optimizó totalmente la geometría de las moléculas, usando el algoritmo *eigenvector following* con una precisión que rebaja la norma del gradiente hasta 0,001 kcal/Å. El calor de formación de las moléculas (CF), la energía electrónica (EE), la energía del LUMO, así como las cargas parciales ( $q_1$  hasta  $q_{19}$ ) sobre cada átomo de carbono del núcleo esteroideal se obtuvieron de los ficheros de salida del programa MOPAC.<sup>25</sup>

El cribado virtual aplicado en este trabajo, estuvo basado en ligandos de esteroides anabólicos-androgénicos

$$\begin{aligned} \text{Clase} = & -6,35 + 2,55 \text{Log } P + 0,50 \text{EE} - 2,12 \text{LUMO} - 2,68 \text{CF} + 11,70 q_4 - 56,41 q_{10} + 10,08 \\ & q_{11} - 314,05 q_{14} + 156,46 q_{15} - 23,49 q_{17} \\ N = & 266. \lambda = 0.43. D^2 = 5.13. F(10.253) = 32.86. D < 0.0001 \end{aligned}$$

comerciales tomados de la literatura,<sup>15</sup> el cual clasifica con una exactitud del 80 % y la ecuación 1 es el resultado del desarrollo del modelo planteado:

## PARTE EXPERIMENTAL

### Obtención del 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -metil-9(11)-5 $\alpha$ -androsteno (2)

Una disolución de 1 g (3,467 mmol) of 3 $\beta$ -acetoxi-5 $\alpha$ -9(11)-androsteno-17-ona en 10 mL de benceno seco, se añade lentamente sobre 5 mL (1,12 g; 15 mmol) de una disolución de cloruro de metilmagnesio 3 mol/L en tetrahidrofurano y en atmósfera de nitrógeno. Después que la reacción ha terminado, se adicionan 20 mL de agua y 3 mL de disolución de ácido clorhídrico 6 mol/L. La mezcla se filtra y se lava con agua hasta pH 7 para obtener **2** (76 %), t.f. 191-194 °C. RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>, ppm): 0,72 (3H, s, H<sub>3</sub>C-18); 0,90 (3H, s, H<sub>3</sub>C-19); 1,14 (3H, s, H<sub>3</sub>C-20); 3,49 (1H, m, H-3); 3,2 (2H, s, OH-3, 17); 5,87 (1H, d, H-11, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm): C9 147,0; C11 115,9; C17 81,3; C3 70,7; C14 48,4; C13 44,0; C5 43,2; C16 38,8; C8 38,0; C4 37,9; C1 35,4; C12 32,8; C6 32,7; C2 31,1; C20 25,6; C19 17,8; C18 13,3. EM (m/z): 304 (M<sup>+</sup>).

### 3 $\beta$ -acetoxi-17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metil-9(11)-5 $\alpha$ -androsteno (3)

Se añaden con agitación 0,44 g (1,445 mmol) del compuesto **1** a una disolución de 2,2 mL de anhídrido acético (2,376 g; 23,27 mmol) y 0,44 mL (0,431 g; 5,45 mmol) de piridina. La mezcla de reacción se agita durante 7 h. El progreso de la misma se sigue por CCD (tolueno-etilacetato, 2 : 1). La mezcla de reacción se vierte sobre 50 mL de agua 50 g de hielo. El producto se filtra, se lava con agua y se seca para obtener **3** (100 %). t.f. 115 - 119 °C. RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>, ppm): 0,79 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18); 0,97 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19); 1,21 (3H, s, CH<sub>3</sub>-20); 2,02 (3H, s, COCH<sub>3</sub>); 4,66 (1H, m, H-3); 5,36 (1H, d, H-11, J = 5,96 Hz). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm): C21 170,6; C9 146,6; C11 116,2; C17 81,4; C3 73,4; C14 48,4; C13 44,0; C16 39,2; C8 38,0; C10 37,8; C1 35,2; C4 34,1; C12 32,8; C6 32,7; C7 28,3; C2 27,5; C20 25,9; C15 23,9; C22 21,4; C19 17,9; C18 13,4. EM (m/z): 346 (M<sup>+</sup>).

### 9 $\beta$ ,11 $\beta$ -epoxi-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstano (4)

Se añaden 0,2 g (0,57 mmol) del compuesto **2** a una mezcla bajo agitación de 1,16 mL de tetrahidrofurano (THF) y 1,16 mL de agua a 15 °C. Después, se añaden lentamente 0,24 mL de ácido perclórico al 70 % con cuidado para que la temperatura no exceda los 20 °C. La mezcla de reacción se agita por 10 min. Entonces, se añaden muy lentamente 0,2 g (1,12 mmol) of *N*-bromosuccinimida de tal manera que la temperatura no exceda los 15 °C por 20 min. El progreso de la reacción se sigue por CCD (tolueno-etilacetato, 2 : 1). El exceso de *N*-bromosuccinimida se elimina con la adición de 1 mL de una disolución de metabisulfito de sodio al 20 %. La reacción se vierte sobre 50 mL de agua y hielo. El producto se filtra, se lava con agua y se seca. Finalmente, el 9 $\beta$ ,11 $\beta$ -epóxido se obtiene por reacción con una disolución de carbonato de potasio en metanol, agua agitando por 12 h a temperatura ambiente. Se puede cambiar por el siguiente: El producto húmedo obtenido se trata con una disolución de carbonato de potasio en metanol al 5 %, con agitación y a temperatura ambiente por un tiempo de 12 h. Después, la reacción se neutraliza con una disolución al 50 % de ácido acético en metanol. El producto se filtra, se lava con agua hasta neutralidad y se filtra y se seca para obtener **4** (70 %). t.f. 105-109 °C. RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>, ppm): 0,99 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18); 1,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19); 1,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-20); 3,4 (2H, s, OH-3,17); 3,49 (1H, s.a., H-11); 3,53 (1H, m, H-3). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm): C17 81,3; C4 70,0; C9 66,9; C11 61,2; C14 51,8; C13 43,5; C5 41,2; C4 37,7; C16 37,6; C10 37,1; C8 35,1; C2 32,8; C6 32,7; C2 32,8; C1 30,1; C7 26,6; C20 25,8; C18 16,4; C19

15,2. EM (m/z): 320 (M<sup>+</sup>).

### 9 $\alpha$ -cloro-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstano (5)

Una mezcla de **3** [2 g (6,2 mmol)] y cloroformo (40 mL) se enfría a 10 °C y se añaden 48,4 mL [0,95 g (26 mmol)] de una disolución de cloruro de hidrógeno (0,54 mol/L) en cloroformo (16 mL). La mezcla de reacción se agita por 30 min. y su progreso se sigue por CCD (mezcla cloroformo-metanol (9,8 : 0,2)). Cuando la reacción se completa, se añaden 60 mL de agua y la mezcla resultante se agita por 5 min. La capa orgánica se lava con disolución acuosa al 10 % de bicarbonato de sodio y después con agua hasta neutralidad. Se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra hasta sequedad. El producto crudo se cristaliza de metanol para obtener **5** (85 %). t.f. 188 - 189 °C. RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>, ppm): 1,08 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18); 1,23 (3H, s, CH<sub>3</sub>-20); 1,31 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19); 3,54 (1H, m, H-3); 4,34 (3H, s, OH-3,11,17); 4,38 (1H, t, H-11, <sup>3</sup>J<sub>H11ec,H12ec</sub> = <sup>3</sup>J<sub>H11ec,H12ax</sub> = 2,2). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm): C9 92,1; C17 81,5; C11 73,3; C3 69,7; C14 44,6; C10 41,5; C13 44,1; C4 37,8; C5 37,4; C16 36,9; C8 36,3; C12 35,8; C2 30,6; C1 30,1; C6 27,2; C7 25,8; C20 25,5; C19 17,7; C18 16,0. EM (m/z): 358 (M<sup>+</sup>).

### 9 $\alpha$ -flúor-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstano (6)

Se añaden lentamente 5 g (15,6 mmol) de **3** disuelto en 75 mL de cloroformo a 25 mL de una disolución de HF en piridina enfriada previamente a 0 °C. El progreso de la reacción se sigue por CCD (cloroformo-metanol, 9,8 : 0,2). La mezcla de reacción se vierte sobre una disolución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 % (1500 mL), se extrae con cloroformo, se lava la capa orgánica con disolución de ácido clorhídrico 6 mol/L. Después de eliminar el disolvente por evaporación a vacío, el producto crudo se cristaliza de metanol para obtener **6** (80 %) t.f. 269 - 270 °C. RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>, ppm): 0,99 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18); 1,07 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19); 1,12 (3H, s, CH<sub>3</sub>-20); 3,33 (1H, s, OH-17); 3,46 (1H, m, H-3); 3,56 (2H, s, OH-3,11), 4,09 (1H, ddd, H-11, <sup>3</sup>J<sub>H11-F</sub> = 10,2 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H11ec,H12ec</sub> = 3,8 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H11ec,H12ax</sub> = 2,3 Hz). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm): C9 99,7; C17 81,7; C11 69,7; C3 70,1; C14 44,7; C13 44,2; C10,39,6; C4 38,2; C5 36,9; C12 36,9; C16 36,5; C8 34,9; C1 30,3; C2 29,7; C6 27,2; C7 25,9; C20 25,6; C18 15,7; C19 15,2; EM (m/z): 340 (M<sup>+</sup>).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados positivos obtenidos por Álvarez y cols. en los estudios QSAR,<sup>11,15</sup> se decidió aplicar en este trabajo el modelo desarrollado por los autores y realizar un cribado virtual con un grupo de nuevos esteroides de la serie del androstano sintetizados y evaluados farmacológicamente por los autores,<sup>17,26</sup> con el objetivo de comprobar cuán acertado era este modelo y valorar su futura aplicación en la predicción de otros nuevos (Tabla 1).

donde, P(A) es la probabilidad posterior con la cual el compuesto es clasificado como un EAA con una relación A/A alta (A) y P (M-B) es la probabilidad posterior con la cual el compuesto es clasificado como EAA con una relación A/A moderada-baja (M-B).

Los compuestos con una A/A  $\geq 2$  fueron tomados como EAA con una A/A alta (A) y A/A < 2 fueron considerados como EAA con una A/A moderada - baja (M-B). Si los compuestos tenían un  $\Delta P \geq 0$ , entonces, eran EAA con una A/A  $\geq 2$  (A). Si el compuesto presentaba un  $\Delta P < 0$ , entonces, eran EAA con un A/A < 2 (M-B).

Los compuestos sintetizados y evaluados farmacológicamente con anterioridad<sup>17,26</sup> (n = 14) fueron clasificados en el cribado virtual con una exactitud del

**Tabla 1.** Resultados experimentales y calculados (según ecuación 2,5) de actividad anabólica y/o androgénica de los compuestos sintetizados.

EAA	MEA	VS (%)	P	A/A	Clasificación		$\Delta P$ (%)
					1-1 Observada	Predicha	
3 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihidroxi-9 $\alpha$ -flúor-5 $\alpha$ -androstan-17-ona	86,6	49,7	15,3	3,7	A	M-B	- 84,9
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -flúor-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona	60,0	43,2	54,0	1,3	M-B	M-B	- 91,8
9 $\alpha$ -flúor-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3,17-diona	62,5	25,2	60,2	1,8	M-B	M-B	- 64,9
9 $\alpha$ -flúor-5 $\alpha$ -androstan-3,11,17-triona	119,8	95,7	198,4	0,9	M-B	M-B	- 71,9
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -cloro-11 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona	89,4	76,1	81,4	1,1	M-B	A	94,2
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -flúor-11 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona	175,0	59,6	151,1	2,1	A	A	30,7
3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diacetoxi-9 $\alpha$ -cloro-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona (13)	73,5	22,2	31,4	2,8	A	A	85,3
3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diacetoxi-9 $\alpha$ -flúor-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona	115,1	113,1	121,7	0,98	M-B	A	3,1
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -cloro-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -propionato	72,2	25,6	20,9	3,1	A	A	91,3
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -flúor-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -propionato	140,0	270,9	126,1	0,8	M-B	A	6,7
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -cloro-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -enantato	97,7	23,6	24,9	4,0	A	A	90,0
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -flúor-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -enantato	111,9	58,5	24,9	3,2	A	A	32,9
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -cloro-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -isobutírico	59,4	350,1	350,1	0,2	M-B	A	0,5
3 $\beta$ -acetoxi-9 $\alpha$ -flúor-11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -isobutírico	84,7	40,8	55,7	1,8	M-B	A	0,03

EAA Esteroides arabólicos-androgénicos sintetizados. Valores experimentales de la dosis efectiva en la prueba del músculo elevador del ano (MEA). Valores experimentales de la dosis efectiva en la prueba de vesícula seminal (VS). Valores experimentales de la dosis efectiva en la prueba de próstata ventral (P). A/A relación expresada por el promedio de las relaciones: MEA %/ PV % y MEA %/ VS % experimental. Clasificación observada según la relación A/A.

Clasificación predictiva empleando la ecuación desarrollada en el modelo.  $\Delta P$  Probabilidad parcial %.

57 % (n = 8). No obstante, en un 29 % (n = 4) los valores de la clasificación parcial (%  $\Delta P$ ) se encontraron en un intervalo entre 0 y 7, muy cercano al límite inferior de clasificación. El modelo predice mal solamente el 14 % (n = 2), por lo que este resultado simulado para estos compuestos puede ser aplicado en la identificación de nuevos compuestos líderes con mejor relación anabolismo-androgenismo.

Un interés del grupo de trabajo consistió en comprobar si realmente los derivados metilados en la posición 17 eran activos tal y como ha sido reportado,<sup>27</sup> con vistas a la futura preparación de compuestos que fuesen activos por vía oral y con ese fin, fueron evaluados según el modelo de predicción (Tabla 2).

$$^a\Delta P \% = [P(+)-P(-)] \times 100$$

donde: P(+) probabilidad posterior con la cual el compuesto es predicho como un EAA de elevada actividad (A) y P(-) probabilidad con la cual el compuesto es predicho como un EAA de baja actividad (B).

El modelo aplicado en los esteroides metilados diseñados presenta un alto valor predictivo, por lo que se diseñó una ruta de síntesis con el fin de evaluarlos farmacológicamente en el futuro y corroborar los resultados de la predicción.

El intermedio clave - 3 $\beta$ -acetoxi-9(11)-5 $\alpha$ -androsten-17-ona (1) - se sintetizó a partir de hecogenina según un método descrito por Ruiz.<sup>28</sup> El 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -metil-9(11)-5 $\alpha$ -androsten-17-ona (2) se obtuvo por reacción con

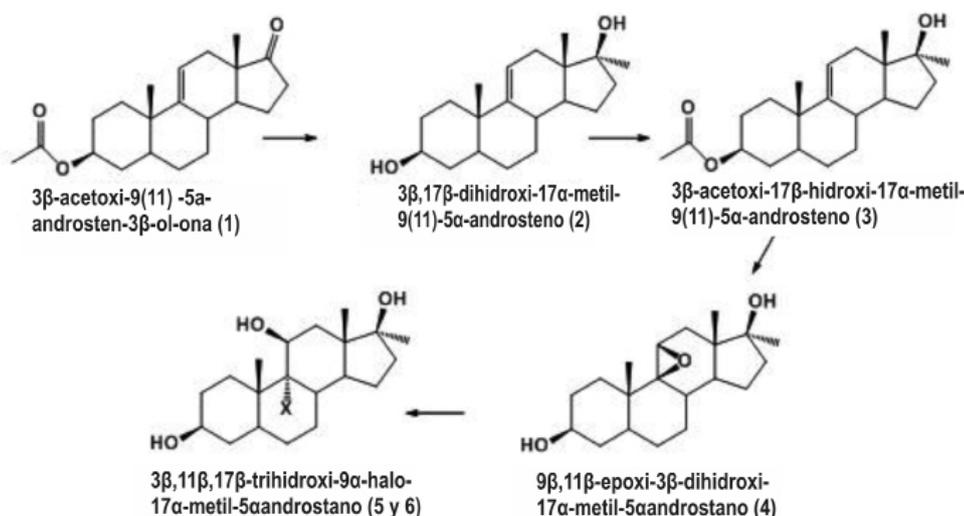
el reactivo de Grignard, cloruro de metilmagnesio en disolución (3 mol/L) en tetrahidrofurano a temperatura ambiente. El 3 $\beta$ -acetoxi-17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metil-9(11)-5 $\alpha$ -androsten-17-ona (3) se preparó a partir de 2 por acetilación en presencia de anhídrido acético en piridina como catalizador. El 9 $\beta$ ,11 $\beta$ -epoxi-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstan-17-ona (4) se obtuvo mediante la adición de la N-bromosuccinimida y posterior alcalinización del medio. El epóxido 4 fue abierto para la obtención de 9 $\alpha$ -cloro-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstan-17-ona (5) y 9 $\alpha$ -flúor-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstan-17-ona (6). El primero, se obtuvo mediante la adición de ácido clorhídrico (0,54 mol/L) en cloroformo. El derivado fluorado se obtuvo mediante la adición de una disolución de HF en piridina al 65 % a 0 °C en cloroformo (Esquema 1).

La elucidación estructural de los nuevos compuestos obtenidos estuvo soportada por el análisis espectroscópico realizado por RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y espectrometría de masas. Debido a que el átomo de flúor (9 $\alpha$ -F) tiene un número cuántico de spin 1/2, las señales cercanas de los átomos de carbono  $\alpha$ ,  $\beta$ , y algunas señales  $\gamma$  respecto a él aparecen como dobletes en el espectro desacoplado de RMN <sup>13</sup>C. Los datos de <sup>a</sup>J(13C, 19F) fue muy útil para la asignación del desplazamiento químico de los átomos cercanos al flúor. Los resultados observados estuvieron de acuerdo con las constantes de acoplamiento previamente reportadas para compuestos similares. Otras señales fueron asignadas con el empleo de los datos reportados con anterioridad.<sup>29-31</sup>

**Tabla 2.** Valoración predictiva de acuerdo con el cribado virtual de los compuestos metilados.

EAA <sup>1</sup>	Log P <sup>2</sup>	EE <sup>3</sup>	LUMO <sup>4</sup>	$\Delta H_F$ <sup>5</sup>	q <sub>4</sub> <sup>6</sup>	q <sub>10</sub> <sup>7</sup>	q <sub>11</sub> <sup>8</sup>	q <sub>14</sub> <sup>9</sup>	q <sub>15</sub> <sup>10</sup>	q <sub>17</sub> <sup>11</sup>	$\Delta P\%$ <sup>a</sup>	Clasificación Predicha
1	3,16	-37,68	0,90	-1,91	-0,14	-0,02	0,07	-0,11	-0,08	0,11	97,2	A
2	2,62	-37,89	2,32	-2,26	-0,15	-0,04	0,06	-0,10	-0,09	0,11	5,3	A
3	3,29	-43,77	0,77	-2,31	-0,14	-0,02	0,07	-0,11	-0,08	0,11	93,6	A
4	2,75	-43,98	1,12	-2,67	-0,12	-0,04	0,06	-0,10	-0,09	0,11	55,3	A
5	3,37	-36,90	0,78	-1,80	-0,16	-0,03	0,07	-0,11	-0,08	0,11	98,6	A
6	2,83	-37,11	0,86	-2,15	-0,16	-0,04	0,06	-0,10	-0,09	0,11	91,6	A

<sup>1</sup> Esteroides anabólicos y androgénicos (EAA). <sup>2</sup> Coeficiente de partición octanol-agua. <sup>3</sup> Energía electrónica. <sup>4</sup> Energía del orbital molecular no ocupado (LUMO). <sup>5</sup> Calor de formación. <sup>6, 7, 8, 9, 10, 11</sup> Carga atómica neta de los átomos de carbono 4, 10, 11, 15 y 17, respectivamente en el esqueleto esteroidal.


**Esquema 1.** Ruta de síntesis de los compuestos metilados.

## CONCLUSIONES

Se realizó un cribado virtual de nuevos esteroides anabólicos-androgénicos sintetizados y evaluados por el grupo de trabajo de los autores y se demostró que el modelo desarrollado puede ser aplicado en la identificación de nuevos compuestos líderes con mejor actividad anabólica. A partir de estos resultados se diseñó una secuencia apropiada de síntesis para obtener esteroides 17 $\alpha$ -metilados, lo que permitió obtener cinco nuevos compuestos con potencial actividad anabólica, que se caracterizan correctamente por espectroscopía de RMN 1H y de 13C, así como por espectrometría de masas, lo que constituye una información novedosa para la comunidad científica internacional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chemical Review*. 2005;105:3352-70.
- Pereira de Jesús K, Côté P, Cantin L, Blanchet J, Labrie F, Breton R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Science*. 2006;15:987-99.
- Fang H, Tong W, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, *et al.* Study of 202 natural, synthetic and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chemical Research Toxicology*. 2003;16:1338-58.
- Halkes SJ, Hartog J. Investigations on sterols. Synthesis of 1,2 $\beta$ -methylene 17 $\alpha$ -acetoxi 9 $\beta$ ,10 $\alpha$ -pregnanes, a Class of Potent Progestational Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*; 1972;15(12):1288-92.
- Chan KMB, Smythe S, Liao S. Androgen receptor binding and androgenicity of methylated 4-ene-3-ketosteroids having no 17-hydroxy group. *Journal Steroid Biochemistry*. 1979;11:1193-96.
- Bergink EW, Janssen PLS, Turpijn EW, Van Der Vies J. Comparison of the receptor binding properties of nandrolone and testosterone under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Journal Steroid Biochemistry*, 1985;22:831-36.
- Vega MC, Montero A, Marrero Y, Rolon M, Gómez A, Escario, JA, *et al.* New ligand-based approach for the discovery of antitrypanosomal compounds. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter*. 2006;16:1898-99.
- Oprea TI, Bologa CG, Edwards BS, Prossnitz ER, Sklar LA. Post-High-Throughput Screening Analysis: An Empirical Compound Prioritization Scheme. *Journal Biomolecular Screening*, 2005;10:409-12.
- Cole J, Nissink J W, Taylor R. Protein-Ligand Docking and Virtual Screening with GOLD, in *Virtual Screening in Drug Discovery*, Taylor & Francis Alvarez, J. and Shoichet, B, Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 2005 p. 200-496.
- Jorgensen W. L., *The Many Roles of Computation in Drug Discovery*. *Science*. 2004;303(19),1813-18.
- Álvarez YM. Procedimiento *in silico* para la obtención de modelos QSAR en esteroides anabólicos y androgénicos.

- cos. Aplicaciones al diseño de nuevas moléculas. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Químicas], Ciudad de La Habana, Universidad de la Habana, Julio de 2008.
12. Vida JA. Androgens and Anabolic Agents, Chemistry and Pharmacology. Chapter 1. General Aspects, New York and London: Academic Press;1969;p.7-9.
  13. Álvarez YM, Crespo R, Montero LA, Ruiz JA, Marrero Y, Santana R, y col. A novel in-silico approach for QSAR Studies of Anabolic and Androgenic Activities in the 17-hydroxy-5-androstane Steroid Family. QSAR Combinatorial Science, 2005;24,218-26.
  14. Álvarez YM, Crespo R, Marrero Y, Montero LA, Ruiz JA, Padrón A y col. Quantitative Structure-Activity Relationship of the 4,5-Dihydrotestosterone Steroid Family, QSAR Combinatorial Science. 2006;25(10):881-84.
  15. Álvarez YM, Marrero Y, Ruiz JA, Montero LA, García de la Vega JM, Noheda P y col. Applying Pattern Recognition Methods Plus Quantum and Physico-Chemical Molecular Descriptors to Analyze the Anabolic Activity of structurally diverse steroids, Journal of Computational Chemistry. 2008;29(3):317-33.
  16. Álvarez YM, Crespo R, Marrero Y, Noheda P, Garcia de la Vega J M, Montero LA y col. Chemometric and chemoinformatic analyses of anabolic and androgenic activities of testosterone and dihydrotestosterone analogues. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008;16:6448-59.
  17. Reyes M, Ruiz JA, Ibarra Y, Fuente A, Vélez H, Hernández I y col. Synthesis and anabolic/androgenic evaluation of novel 9 $\alpha$ -fluorosteroids. European Journal of Medicinal Chemistry 2009;44:4567-71.
  18. Blunt JW, Stothers JB. <sup>13</sup>C NMR Spectra of Steroids. A Survey and Commentary. Organic Magnetic Resonance. 1977;9(8):439-68.
  19. Römer J, Scheller D, Grossmann G, Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study of the Bromo Derivatives of 5 $\alpha$ -Cholestan-3-one and Cholest-4-en-3-one, Magnetic Resonance in Chemistry. 1987;25:135-40.
  20. Ruiz JA, Vélez H. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopic of some (23R)-5 $\alpha$ -spirostanes. Magnetic Resonance in Chemistry, 1987;25(9):831-34.
  21. Ruiz JA, Vélez H. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopic of some 20-ketopregnanes; Magnetic Resonance in Chemistry. 1994;32:547-68.
  22. Budzikiewics H. Biochemical Applications of Mass Spectrometry. First Supplementary Volume, Chapter 10. Steroids Ed. By G.R. Waller O.C. Derek, Published By John Wiley and Sons. 1980:p.211-27.
  23. Hesse M, Meier H, Zeeh B, Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica, Madrid: Ed. Síntesis;1995;p.222-31.
  24. Hyperchem Release 7.0, H., Inc., Irvine, 2002.
  25. Stewart J J P. MOPAC, V. 6, Universidad de la Habana, 1993-1997.
  26. Reyes M. Síntesis y caracterización de nuevos esteroides de la serie del androstano con actividad anabólica y/o androgénica. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas], Ciudad de La Habana, Universidad de la Habana, noviembre de 2010.
  27. Llewellyn W. Anabolic Steroid Reference Manual. 6<sup>th</sup> Edition, 2007; p.66-76.
  28. Ruiz JA. Síntesis de esteroides a partir de materias primas provenientes de fuentes naturales nacionales. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas], Ciudad de La Habana, Universidad de la Habana, diciembre de 1999.
  29. Fuente A, Reyes M, Álvarez YMa, Ruiz J.A, Vélez H, Viñas O, *et al.* <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral assignment of androstane Derivatives, Magnetic Resonance in Chemistry. 2005;43:676-8,.
  30. Blunt JW, Stothers JB. <sup>13</sup>C NMR spectra of steroids. A survey and commentary, Organic Magnetic. Resonance. 1977;9(8)439-463.
  31. Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Versión española de J. Castells y F. Camps. Ed. Alhambra Longman; 1995. FICAS