



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Doctorado en Ciencias Químicas

**“Tio(seleno)derivados de cumarinas e híbridos estrona-cumarinas como
potenciales agentes antitumorales: síntesis y estudios *in silico*”**

Tesis presentada para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Químicas en
el área de Química Orgánica

Presenta

M.C. Silvia Alejandra Meza Ireta

Directores de tesis

Dr. José Luis Vega Báez

Dra. Penélope Merino Montiel

H. Puebla de Zaragoza, diciembre 2022



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por: Dr. David Miguel Aparicio Solano, Dra. Roxana Martínez Pascual, Dr. Víctor Gómez Calvario, Dra. Anabel Romero López y la Dra. Blanca Iris Colín Lozano, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Tió(seleno)derivados de cumarinas e híbridos estrona-cumarinas como potenciales agentes antitumorales: síntesis y estudios in silico"**, que presenta la alumna **Silvia Alejandra Meza Iréta** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los treinta días del mes de noviembre del año dos mil veintidós.

ATENTAMENTE

Dr. David Miguel Aparicio Solano

Dra. Roxana Martínez Pascual

Dr. Víctor Gómez Calvario

Dra. Anabel Romero López

Dra. Blanca Iris Colín Lozano

Posgrado en Ciencias Químicas
FCQ - ICUAP

Edif. 105 I, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 2 29-55-00 Ext. 7387

Doc ID: 9c93f6009f65c29f3cde343b8919cb97d554a77d



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección del Dr. José Luis Vega Báez y la Dra. Penélope Merino Montiel con el apoyo otorgado por CONACyT a través de su programa de becas nacionales.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:



Advances in Enzyme Research, 2022, *, *-*

<https://www.scirp.org/journal/aer>

ISSN Online: 2328-4854

ISSN Print: 2328-4846

Molecular docking studies of estrone-coumarin derivatives as aromatase and 17 β -HSD1 inhibitors related to hormone receptor positive (HR+) breast cancer.

Silvia Alejandra Meza-Ireta, Blanca Colin-Lozano*, Penélope Merino-Montiel*, José Luis Vega-Báez, Sara Montiel-Smith.

Facultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Pue., México
Email: penelope.merino@correo.buap.mx, colin.lozza@gmail.com

How to cite this paper: Author 1, Author 2 and Author 3 (2022) Paper Title. *****, *, *-*,
https://dx.doi.org/10.4236/****.2022.****

Received: ****, **

Accepted: ****, **

Published: ****, **

Copyright © 2022 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Hormone receptor positive (HR+) breast cancer is the most common malignancy in women. New strategies in the treatments have targeted the estrogen biosynthesis pathways including the inhibition of the aromatase and 17 β -HSD1 enzymes. The present work, describes the study of a new family of 9 hybrid compounds derived from estrone attached to a coumarin fragment, linked through different lengths of hydrocarbon chains. The activity of these compounds was evaluated by molecular docking with two relevant enzymes in breast cancer (HR+). It was proposed nine compounds as 17 β -HSD1 inhibitors and six as aromatase inhibitors. It was determined important interactions with key amino acids at the orthosteric site of each enzyme and their score values compared to the crystallographic ligand. The *in silico* analysis showed good score values in the proposed compounds, where the steroidal portion presented important interactions with Met374 and Tyr155 in aromatase and in 17 β -HSD1 respectively. Highlighting compounds **2**, **5** and **8** with an aromatic ring at the C4 position of the coumarin moiety, which favored arene-H type interactions essential for protein-ligand recognition. In addition, the results related to the 17 β -HSD1 enzyme demonstrated how the length of the linker influences the interaction; the best score was found for derivative **8** with a chain of 8 methylenes.

Keywords

Estrone, coumarins, aromatase inhibitors, 17 β -HSD1 inhibitors, molecular docking

1. Introduction

Congresos y simposios:

- XXIII Simposio interno del posgrado en ciencias químicas-BUAP, del 15 al 19 de octubre de 2018 (modalidad presencial).
- XXIV Simposio interno del posgrado en ciencias químicas-BUAP, del 11 al 15 de noviembre de 2019 (modalidad presencial).
- LatinXChem, 7 de septiembre de 2020 (modalidad virtual).
- XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica del 19 al 23 de abril de 2021 (modalidad virtual).
- XXVI Simposio interno del posgrado en ciencias químicas-BUAP, del 9 al 12 de noviembre de 2021 (modalidad virtual).

DEDICATORIA

A Dios,

al siempre presente recuerdo de mi Abuelita,

a mis padres Silvia Ireta y Gerardo Meza,

a mis hermanos Gera y Ángel,

a mi perrita Sandy,

y a personas importantes en mi vida: Karina Martínez, Luis Cobos y Julio Romero.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a la Dra. Penélope Merino, por combinar mi aprendizaje con la parte biológica que siempre me ha interesado. Esto no hubiera sido posible sin su comprensión y ayuda.

A los integrantes de la comisión revisora:

Dr. David Miguel Aparicio Solano (ICUAP)

Dra. Roxana Martínez Pascual (UNPA)

Dr. Víctor Gómez Calvario (FCQ-BUAP)

Dra. Anabel Romero López (IF BUAP)

Dra. Blanca Iris Colín Lozano (FCQ-BUAP)

Nuevamente gracias a la Dra. Sara Montiel por la ayuda otorgada para terminar mis estudios.

A Salomón Assad por enseñarme a trabajar en un laboratorio de química orgánica, por la disposición que siempre tuvo conmigo y mis múltiples necesidades técnicas.

A mi gran amigo Julio Romero, muchas gracias por tu paciencia y tiempo dedicado para enseñarme. Por todos los momentos divertidos que hemos compartido. Fuiste mi primer amigo en Puebla y me apoyaste desde mis primeros trámites.

Gracias a los estudiantes de servicio: Marco Vargas, José Luis Jiménez, Lucero Franco, Daniel Hernández, Kevin Galindo, Marifer Montañez, Marlén Rojas e Hilda López, por su ayuda en el laboratorio, cuidando de mis experimentos y ayudándome en su montaje.

A Luis Cobos por motivarme a estudiar en otra ciudad, por tu compañía y buenos momentos, así como tu ayuda en los momentos difíciles.

A CONACYT por la beca de doctorado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
SUMMARY	6
RELACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS PREPARADOS	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	9
CAPÍTULO 1. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN <i>IN SILICO</i> DE TIO- Y SELENOCIANATOS DERIVADOS DE CUMARINAS COMO POTENTES INHIBIDORES DE HDAC	11
Introducción	11
Antecedentes	13
<i>Histonas desacetilasas</i>	13
<i>Inhibidores de histonas desacetilasas en el tratamiento del cáncer</i>	16
<i>Cumarinas</i>	20
Objetivos	24
Discusión de resultados	25
Conclusiones	41
CAPÍTULO 2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN <i>IN SILICO</i> DE HÍBRIDOS DERIVADOS DE ESTRONA-CUMARINAS COMO POTENTES INHIBIDORES DE AROMATASA Y 17β- HSD1.....	42
Introducción	42
Antecedentes	44
<i>Cáncer de mama positivo a receptores hormonales (RH+)</i>	44
<i>Inhibidores de aromatasa</i>	47
<i>Inhibidores de 17β-HSD1</i>	51
Objetivos	55
Discusión de resultados	56
Conclusiones	71
PARTE EXPERIMENTAL.....	72
Métodos generales	72
Materias primas	73
<i>Metodología general para la preparación de hidroxycumarinas 38-41</i>	73
<i>Metodología general para la preparación de cumarinas O-alquiladas 42-47</i>	74
<i>Metodología general para la preparación de estrona O-alquilada 60-61</i>	78
Nuevas investigaciones	79

<i>Metodología general para la preparación de tio- y selenocianatos derivados de cumarinas 1-14</i>	79
<i>Metodología general para la preparación de híbridos derivados de estrona-cumarina 15-20</i>	87
Docking molecular	92
<i>Validación de acoplamiento</i>	92

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
3β-HSD	3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
17β-HSD1	17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
Å	Ángstrom
a	Señal ancha
AcOEt	Acetato de etilo
ADMET	Por sus siglas en inglés <i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Anh.	Anhidro
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
MeCN	Acetonitrilo
COSY	Del inglés <i>Correlated Spectroscopy</i>
Cys	Cisteína
d	Señal doble
DMF	Dimetilformamida
E1	Estrona

E2	Estradiol
equiv.	Equivalentes
EtOH	Etanol
FDA	Por sus siglas en inglés <i>Food and Drug Administration</i>
g	gramos
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
h	Horas
H₂O_d	Agua destilada
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histonas desacetilasas
His	Histidina
HSQC	Por sus siglas en inglés <i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
IA	Inhibidores aromatasa
IC₅₀	Del inglés <i>Median inhibitory concentration</i>
iHDAC	Inhibidores de histona desacetilasa
Ile	Isoleucina
J	Constante de acoplamiento
Kcal	Kilocaloría
Leu	Leucina
Lys	Lisina
m	Señal múltiple
Met	Metionina

MHz	Megahertz
min.	Minutos
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MOE	Por sus siglas en inglés <i>Molecular Operating Environment</i>
N	Normalidad
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nM	Nanomolar
PDB	Por sus siglas en inglés <i>Protein Data Bank</i>
p.f.	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
Ph	Fenilo
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
RE	Receptor de estrógenos
Rf	Factor de retención
RH+	Positivo a receptores hormonales
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media
s	Señal simple
SAHA	Por sus siglas en inglés <i>SuberoylAnilide Hydroxamic Acid</i>
Ser	Serina

S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular
t	Señal triple
THF	Tetrahidrofurano
Trp	Triptófano
TST	Testosterona
Tyr	Tirosina
Val	Valina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
ZBG	Por sus siglas en inglés <i>Zinc Binding Group</i>
ΔG	Energía libre de Gibbs
μM	Micromolar

RESUMEN

La presente tesis doctoral esta dividida en dos capítulos. En la primera parte se describen las metodologías para la obtención y evaluación *in silico* de tio- y selenocianatos derivados de cumarina como potentes inhibidores de HDAC de clase I. Los inhibidores de esta clase de enzimas comparten un modelo de farmacóforo que consta de tres partes, un grupo *Cap*, un grupo quelante de zinc y un enlazador que conecta ambos grupos. Se realizó la síntesis de una variedad de derivados con objeto de establecer la relación entre su estructura y actividad. El grupo *Cap* fue modificado por distintas cumarinas (obtenidas por el método de condensación de Pechmann), el grupo quelante de zinc por un grupo tio- o selenocianato y se utilizaron dos tamaños de enlazador para determinar la distancia óptima entre ambos grupos.

En la segunda parte, se aborda la preparación y evaluación *in silico* de híbridos derivados de estrona-cumarina como posibles inhibidores duales de las enzimas aromatasa y 17 β -HSD1 para el tratamiento del cáncer de mama RH+. En el caso de la aromatasa, por implicar un sitio activo más pequeño se utilizaron dos tamaños de enlazador entre el grupo cumarina y estrona. Mientras que en el caso específico de la enzima 17 β -HSD1 se emplearon tres espaciadores. El grupo cumarina se aplicó en este estudio para evitar la actividad estrogénica que presentan los inhibidores esteroideos.

La evaluación de las interacciones entre los compuestos sintetizados con sus proteínas blanco se realizó a través de docking molecular con el programa MOE y la base de datos de Protein Data Bank (PDB), se utilizaron un total de 23 compuestos y tres proteínas implicadas en el cáncer, para visualizar el grado de afinidad entre estos y predecir sus mejores acoplamiento. Se determinaron las interacciones importantes con aminoácidos clave en el sitio ortostérico de cada enzima y los resultados mostraron valores adecuados de ΔG , especialmente los productos que presentan en su estructura una cumarina con un grupo fenilo en la posición C-4. La información en este documento permite emplear los datos observados para la optimización o diseño de nuevos derivados por sustitución en los grupos R de la porción cumarina. Además, comprobar experimentalmente el perfil ADMET y la actividad inhibitoria de los productos sintetizados.

SUMMARY

This doctoral dissertation is divided into two chapters. The first part describes the methodologies for the preparation and *in silico* evaluation of coumarin-derived thio- and selenocyanates as potent HDAC class I inhibitors. In this study, we report a three part pharmacophore model, a *Cap* group, a zinc chelating group, and a linker connecting both groups. The synthesis of a variety of derivatives was carried out to establish the structure-activity relationship. The *Cap* group was modified with different coumarins (obtained by the Pechmann condensation method), the zinc chelating moiety with a thio- or selenocyanate group, and two linker sizes were used to determine the optimal distance between both groups.

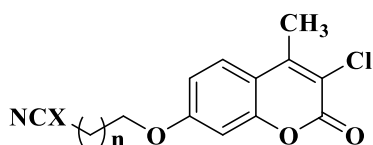
The second part deals with the preparation and *in silico* evaluation of estrone-coumarin derivative hybrids as possible dual inhibitors of aromatase and 17 β -HSD1 enzymes for the treatment of HR+ breast cancer. In the case of aromatase, because it implies a smaller active site, two sizes of linkers were used between the coumarin and the estrone groups. While in the specific case of the 17 β -HSD1 enzyme, three spacers were used. The coumarin group was applied in this study to avoid the estrogenic activity exhibited by steroidal inhibitors.

In chapters I and II, the evaluation of the interactions between the synthesized compounds with their target proteins was carried out through molecular docking with the MOE program and the Protein Data Bank (PDB) database, a total of 23 compounds and three proteins involved in cancer, to visualize the degree of affinity between them and predict their best couplings. The important interactions with key amino acids in the orthosteric site of each enzyme were determined and the results showed adequate values of ΔG , especially the products that present in their structure a coumarin with a phenyl group in the C-4 position.

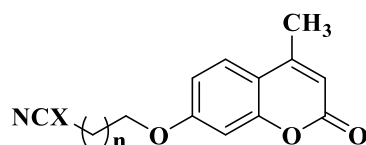
The information in this document allows to use the observed data for the optimization or design of new derivatives by substitution in the R groups of the coumarin portion. Experimentally check the ADMET profile and the inhibitory activity of the synthesized products.

RELACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS PREPARADOS

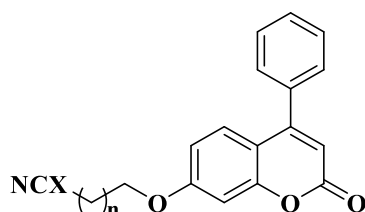
Tio- y selenocianatos derivados de cumarinas



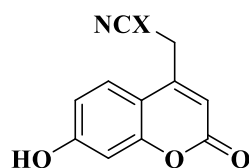
- 1 $n=3$, X= S
 2 $n=3$, X= Se
 3 $n=5$, X= S
 4 $n=5$, X=Se



- 5 $n=3$, X= S
 6 $n=3$, X= Se
 7 $n=5$, X= S
 8 $n=5$, X=Se

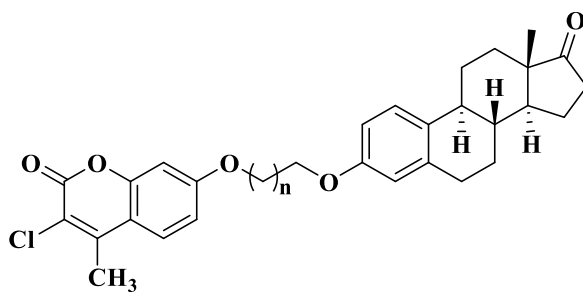


- 9 $n=3$, X= S
 10 $n=3$, X= Se
 11 $n=5$, X= S
 12 $n=5$, X= Se

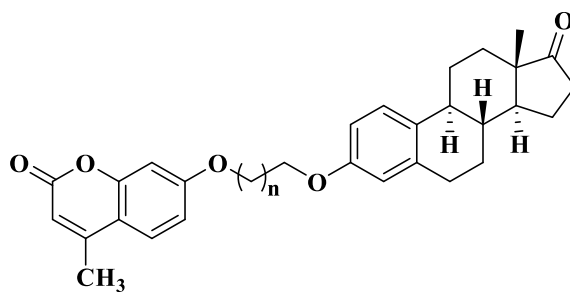


- 13 X= S
 14 X= Se

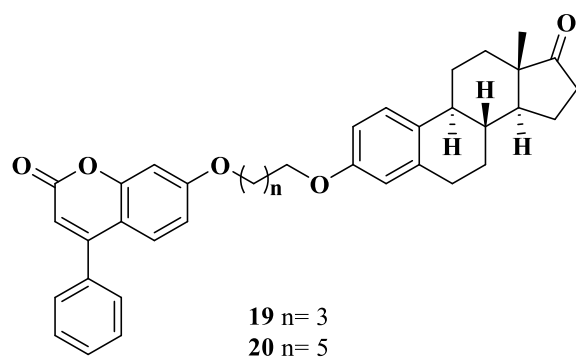
Híbridos derivados de estrona-cumarinas



- 15 $n=3$
 16 $n=5$



- 17 $n=3$
 18 $n=5$



INTRODUCCIÓN GENERAL

La división celular anormal, junto con la acumulación de mutaciones genéticas y la resistencia a la apoptosis, son las características principales en el desarrollo del cáncer. Es la segunda causa de muerte en el mundo después de las enfermedades cardiovasculares.¹ En la actualidad, se cuenta con diferentes dianas terapéuticas para su tratamiento, como inmunoterapia, hormonoterapia, inhibidores de angiogénesis e inductores de apoptosis.² El principal problema que se enfrenta es por la complejidad a nivel celular, dado que algunos receptores se encuentran en uno o más tejidos y modulan diversas funciones, por lo que, a pesar de ser un tratamiento preciso, dirigido a células malignas sin atacar a las células sanas, no están exentas de efectos secundarios o lo que llamamos toxicidad.³

El espacio químico es el conjunto de todas las moléculas que pueden existir o sintetizarse, y las reacciones químicas permiten moverse dentro de él. En la química bioorgánica se utiliza como una herramienta en la búsqueda de nuevos fármacos. Sin embargo, la realidad es que la búsqueda de compuestos biológicamente activos, su relación con dianas específicas y mínimos efectos tóxicos es un universo complejo.^{4,5}

El cribado *in silico* es un instrumento que abre las puertas a seleccionar aquellas moléculas del espacio químico, con el fin de realizar una predicción de la actividad biológica, evitando los procesos de prueba y error de candidatos obtenidos por la síntesis orgánica, permitiendo el ahorro de tiempo y dinero.⁶ El docking molecular o acoplamiento molecular, es una de las técnicas más utilizadas en la química computacional. El método se basa en predecir la orientación más probable entre un “target” y un ligando, como energéticamente prediciendo la afinidad de unión.⁷

¹ Hassan, E. M. y DeRosa, M.C. *Trends Anal. Chem.* **2020**, 124, 115806.

² Folkman, J. *Apms.* **2004**, 112, 496-507.

³ Hornberg, J. J.; Bruggeman, F. J.; Westerhoff, H. V. & Lankelma, J. *Biosystems*, **2006**, 83, 81-90.

⁴ Lipinski, C. & Hopkins, A. *Nature*, **2004**, 432, 855-861.

⁵ Wetzel, S.; Bon, R. S.; Kumar, K. & Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 10800-10826.

⁶ Pyzer-Knapp, E. O.; Suh, C.; Gómez-Bombarelli, R.; Aguilera-Iparraguirre, J. & Aspuru-Guzik, A. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2015**, 45, 195-216.

⁷ Morris, G. M. & Lim-Wilby, M. Molecular docking. Kukol, A. *Molecular modeling of proteins*. **2008**, pp. 365-382. Humana Press.

Respecto a esto, se pueden seleccionar dianas terapéuticas con el fin de desarrollar agentes antineoplásicos más selectivos, enzimas como las histonas desacetilasas,⁸ anhidrasa carbónica,⁹ aromatasas, 17 β -HSD1, sulfatasa,¹⁰ entre otras; dependiendo de los factores genéticos y patológicos de la enfermedad.

Los candidatos son pequeñas piezas que tenemos que encajar comúnmente en el centro activo de algunas de estas enzimas. En el presente trabajo, esta “pieza” se seleccionó dentro de un modelo o farmacóforo, y su análisis *in silico* mediante docking molecular. Las estructuras que presentan mayor afinidad, en un futuro serán validadas en el laboratorio de manera experimental, a través de ensayos enzimáticos y pruebas antiproliferativas *in vitro* para corroborar los resultados obtenidos (Figura 1). El manuscrito se encuentra dividido en dos capítulos, donde se detalla la síntesis y evaluación *in silico* de una nueva serie de inhibidores, enfocados en diferentes mecanismos moleculares implicados en el cáncer.

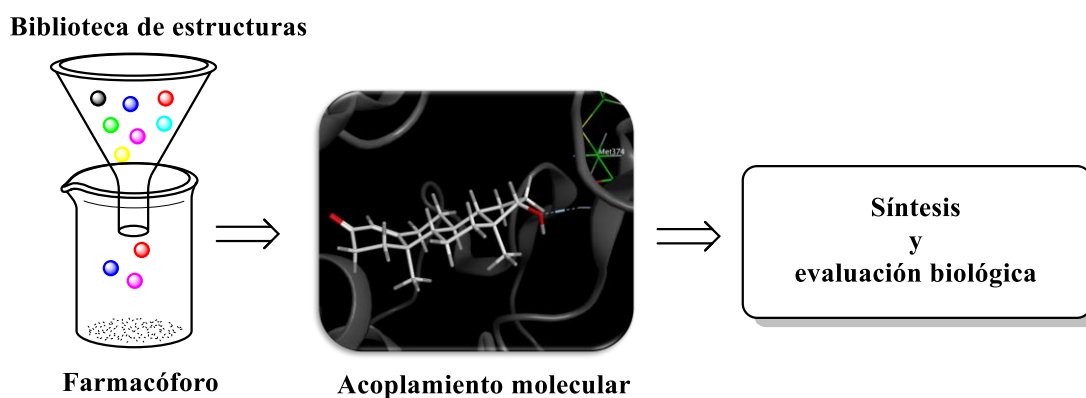


Figura 1. Búsqueda de nuevos fármacos.

⁸ Yoon, S. & Eom, G. H. *Chonnam Med J.* **2016**, 52, 1-11.

⁹ Supuran, C. T. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2016**, 31, 345-360.

¹⁰ Kharb, R.; Haider, K.; Neha, K. & Yar, M. S. *Arch Pharm.* **2020**, 353, 2000081.

CAPÍTULO 1. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN *IN SILICO* DE TIO- Y SELENOCIANATOS DERIVADOS DE CUMARINAS COMO POTENTES INHIBIDORES DE HDAC

Introducción

En el desarrollo del cáncer existen factores genéticos y epigenéticos. La regulación epigenética es una red de compuestos químicos que rodean e interfieren con el ADN sin alterar su secuencia. De esta forma el gen se mantiene encendido o apagado en función de los marcadores que lo rodean.^{11,12} Un ejemplo de esto es la acetilación y desacetilación de histonas por las enzimas histona acetiltransferasa (HAT) y la histona desacetilasa (HDAC), respectivamente. Alteraciones en estos mecanismos, como un aumento en la expresión de la enzima HDAC, puede provocar una hipoacetilación y la represión de genes supresores de tumores, iniciando la transformación de células normales en células cancerosas, junto con la aparición y progresión del desarrollo del cáncer.¹³

Diversas investigaciones sugieren que los inhibidores de histona desacetilasa (iHDAC) son una prometedora opción para el tratamiento del cáncer. Principalmente por el papel que tiene estas enzimas en regular diversas funciones como la proliferación celular.^{14,15} Los iHDAC generalmente tienen un modelo de farmacóforo general: un grupo quelatante de zinc (ZBG, *Zinc Binding Group*), un conector hidrofóbico (*linker*), el cual conecta el ZBG y la zona de reconocimiento de superficie (*cap*). Es esencial que *Cap* presente un grupo hidrofóbico y aromático o grupo heteroaromático para interaccionar con los residuos próximos al sitio activo de la enzima.¹⁶

Las cumarinas son importantes heterociclos oxigenados derivados de la α -pirona de origen natural. Algunos de estos compuestos han mostrado un efecto antiproliferativo

¹¹ Sadikovic, B.; Al-Romaih, K.; Squire, J. A. & Zielenska, M. *Curr. Genomics*, **2008**, 9, 394-408.

¹² Byler, S.; Goldgar, S.; Heerboth, S.; Leary, M.; Housman, G.; Moulton, K. & Sarkar, S. *Anticancer Res.* **2014**, 34, 1071-1077.

¹³ West, A. C. & Johnstone, R. W. *J Clin Invest.* **2014**, 124, 30-39.

¹⁴ Struh, K. *Genes Dev.* **1998**, 12, 599-606.

¹⁵ Dokmanovic, M.; Clarke, C. & Marks, P. A. *Mol. Cancer Res.* **2007**, 5, 981-989

¹⁶ Suzuki, T. y Miyata, N. Non-hydroxamate histone deacetylase inhibitors. Rahman, A.; Choudhary, M. I. & Reitz, A. B. *Frontiers in Medicinal Chemistry*. **2009**, pp. 619-642. Bentham Science Publishers

relacionado con su actividad inhibitoria de la HDAC, además, de diversas propiedades benéficas para la salud.¹⁷ Debido al gran interés y a la necesidad de la búsqueda de nuevos compuestos con mayor actividad biológica que los ya reportados, que sean más selectivos y con menos efectos secundarios. En el presente estudio, se han diseñado, sintetizado y ensayado mediante cribado *in silico* una serie de nuevos derivados cumarínicos como potenciales inhibidores selectivos de la HDAC8, y por ello, como potenciales agentes antiproliferativos.

¹⁷ Klenkar, J. & Molnar, M. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, 7, 1223-1238.

Antecedentes

Histonas desacetilasas

La acetilación de histonas es un proceso controlado por las acciones antagónicas de dos grandes familias de enzimas: las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas desacetilasas (HDAC). El equilibrio entre las acciones de estas enzimas sirve como un mecanismo regulador de la expresión génica (Figura 2).¹³

Las HAT añaden grupos acetilo en los grupos ϵ -amino de residuos de lisina en las colas terminales de las histonas. Esto neutraliza su carga positiva y relaja la estructura de la cromatina, lo cual permite la accesibilidad de los factores de transcripción a sus genes objetivo. Por el contrario, la desacetilación de histonas por las HDAC, favorece la represión transcripcional al permitir la compactación de la cromatina.^{18,19}

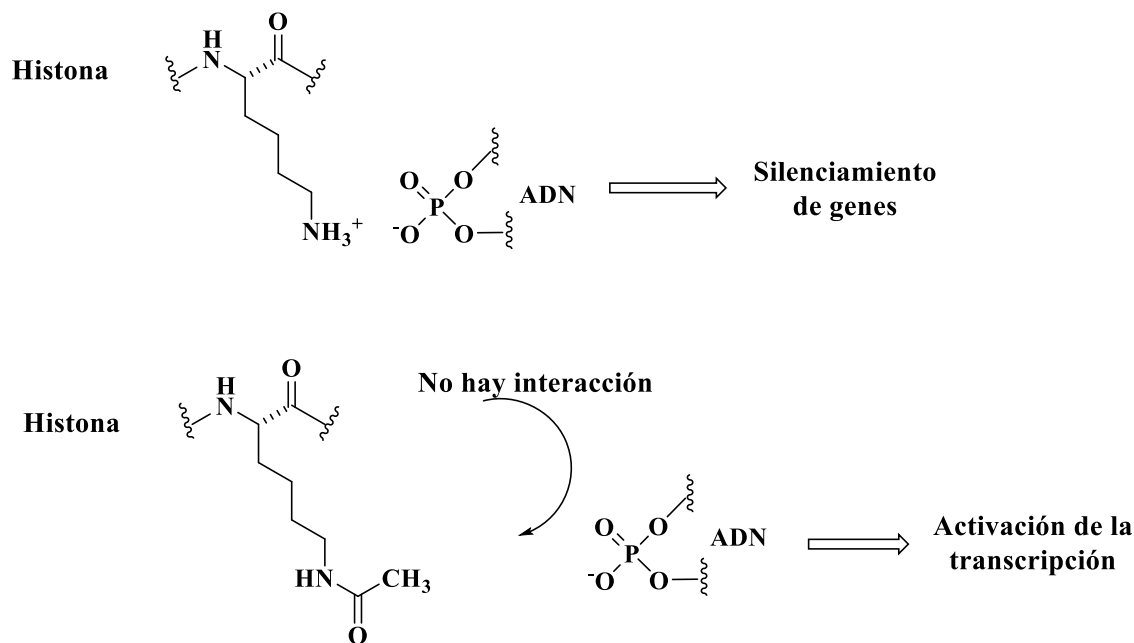


Figura 2. Acetilación de histonas.

¹³ West, A. C. & Johnstone, R. W. *J Clin Invest.* **2014**, 124, 30-39.

¹⁸ Leemhuis, H.; Packman, L. C.; Nightingale, K. P. & Hollfelder, F. *ChemBioChem*, **2008**, 9, 499-503.

¹⁹ Seto, E. & Yoshida, M. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, 6, a018713.

Las HDAC son una familia que se compone de 18 miembros, estas proteínas se pueden clasificar en cuatro clases (I, II, III y IV), que difieren en estructura, función enzimática, localización subcelular y patrones de expresión (Tabla 1).²⁰

Tabla 1. Clasificación de las histonas desacetilasas (HDAC).

Clase	Enzima	Localización
Clase I (dependiente de Zn^{2+})	HDAC 1, 2, 3 y 8	Núcleo
Clase IIa (dependiente de Zn^{2+})	HDAC 4, 5, 7 y 9	Núcleo/citoplasma
Clase IIb (dependiente de Zn^{2+})	HDAC 6 y 10	Principalmente en el citoplasma
Clase III (dependientes de NAD^+)	SIRT 1, 6 y 7	Núcleo
	SIRT 2	Citoplasma
	SIRT 3, 4 y 5	Mitocondria
Clase IV (dependiente de Zn^{2+})	HDAC 11	Núcleo/citoplasma

Las histonas son los sustratos principales para la clase I de HDAC. Estas enzimas poseen estructuras relativamente simples, que consisten en el dominio de desacetilasa conservado con extensiones cortas de amino y carboxi-terminal.¹⁹ La enzima HDAC8 fue la primera isoforma humana cuya estructura cristalina se informó en el año 2004.²¹ Su mecanismo catalítico se menciona a continuación (Figura 3).

La función carbonilo del sustrato ϵ -acetil-lisina se coordina con el ion Zn^{2+} y posteriormente acepta un enlace de hidrógeno del residuo de tirosina (Tyr306). El Zn^{2+} está pentacoordinado con los residuos Asp178, His180 y Asp267, una molécula de agua y el

²⁰ Yang, F.; Zhao, N.; Ge, D. & Chen, Y. *RSC Adv.* **2019**, 9, 19571-19583.

¹⁹ Seto, E. & Yoshida, M. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, 6, a018713.

²¹ Vannini, A.; Volpari, C.; Filocamo, G.; Casavola, E. C.; Brunetti, M.; Renzoni, D.; ... & Di Marco, S. *PNAS.* **2004**, 101, 15064-15069.

oxígeno carbonílico del grupo acetilo del sustrato. La nucleofilicidad del agua se incrementa por los enlaces de hidrógeno con His142 e His143.²²

La desacetilación comienza con el ataque nucleofílico de la molécula de agua del sitio activo sobre el carbonilo del sustrato e His142 abstrae un protón de esta molécula de agua. La interacción del oxígeno carbonílico del sustrato con Zn^{2+} da como resultado una mayor polarización del enlace carbonilo y, por lo tanto, es más susceptible a un ataque nucleofílico. En el ataque nucleofílico, el grupo hidroxilo de la Tyr306 protona el grupo saliente (amina). El intermedio tetraédrico se rompe, produciendo acetato y lisina.²³

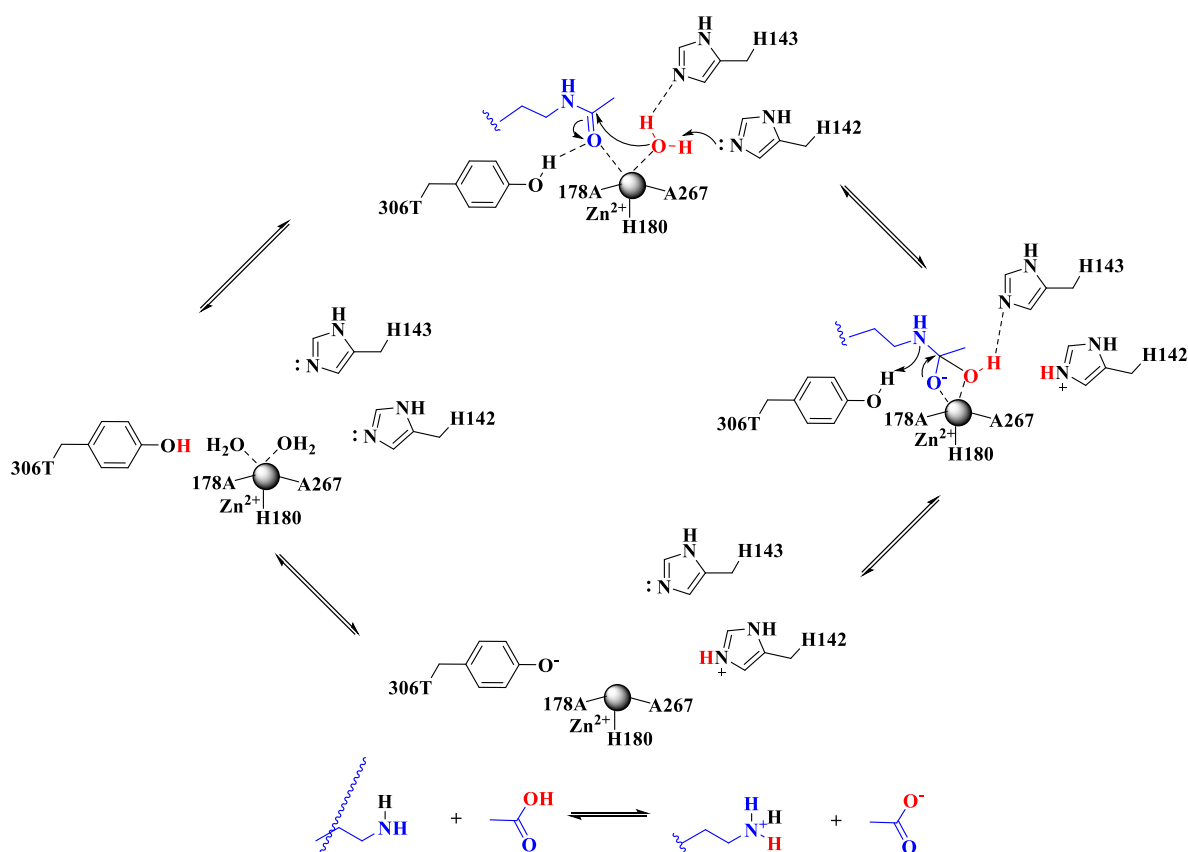


Figura 3. Mecanismo catalítico de HDAC8

²² Chen, K.; Zhang, X.; Wu, Y. D.; & Wiest, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 11636-11643.

²³ Vannini, A.; Volpari, C.; Gallinari, P.; Jones, P.; Mattu, M.; Carfi, A., ... & Di Marco, S. *EMBO Rep.* **2007**, 8, 879-884.

Inhibidores de histonas desacetilasas en el tratamiento del cáncer

Las HDAC son enzimas que se han encontrado sobreexpresadas con frecuencia en tumores humanos y ocasionan la pérdida global de la acetilación en la histona H3 y H4. Esto provoca la inactivación epigenética de genes como *p21*, cuya proteína (p21) regula la progresión del ciclo celular. Esta alteración induce que las células se multipliquen descontroladamente y puedan volverse cancerosas.²⁴

En algunos casos, la desacetilación de histonas no interviene de manera directa en el desarrollo del tumor. La sobreexpresión de HDAC1 genera la desacetilación desregulada de la proteína supresora de tumores p53, causando la pérdida de sus funciones y favoreciendo la resistencia ante señales celulares pro-apoptóticas.²⁵

Las HDAC1-3 se han observado elevadas en cáncer de hígado,²⁶ gástrico, colorrectal,²⁷ mamario²⁸ y pulmonar.²⁴ Mientras que la HDAC8 en neurofibrosarcomas²⁹ y en células de cáncer de colon, donde reprime la actividad del gen *BMF*, cuya proteína funciona como un activador apoptótico.³⁰ Los valores más altos de expresión de HDAC8 se han encontrado en tejidos de cáncer de mama y aumentan la estabilidad de la proteína Snail, provocando la diseminación y la transición epitelial-mesenquimatosa.³¹

Por ello existe un gran interés en el desarrollo de inhibidores específicos de clase I para el tratamiento de estos padecimientos. Diversos compuestos de fuentes naturales, así como derivados sintéticos, han sido identificados y desarrollados como iHDAC.^{32,33}

²⁴ Lin, Y. C.; Lin, J. H.; Chou, C. W.; Chang, Y. F.; Yeh, S. H. & Chen, C. C. *Cancer res.* **2008**, 68, 2375-2383.

²⁵ Ito, A.; Kawaguchi, Y.; Lai, C. H.; Kovacs, J. J.; Higashimoto, Y.; Appella, E. & Yao, T. P. *EMBO J.* **2002**, 21, 6236-6245.

²⁶ Han, R.; Nusbaum, O.; Chen, X. & Zhu, Y. *Mol. Ther. Oncolytics*, **2020**, 19, 8-18.

²⁷ Cao, L. L.; Yue, Z.; Liu, L.; Pei, L.; Yin, Y.; Qin, L.; ... & Jia, M. *Oncotarget*, **2017**, 8, 39241-39253.

²⁸ Terranova-Barberio, M.; Thomas, S.; Ali, N.; Pawlowska, N.; Park, J.; Krings, G.; ... & Munster, P. N. *Oncotarget*, **2017**, 8, 114156-114172.

²⁹ Lopez, G.; Bill, K. L. J.; Bid, H. K.; Braggio, D.; Constantino, D.; Prudner, B.; ... & Pollock, R. E. *PLoS One*, **2015**, 10, e0133302.

³⁰ Kang, Y.; Nian, H.; Rajendran, P.; Kim, E.; Dashwood, W. M.; Pinto, J. T.; ... & Dashwood, R. H. *Cell Death Dis.* **2014**, 5, e1476-e1476.

³¹ An, P.; Chen, F.; Li, Z.; Ling, Y.; Peng, Y.; Zhang, H.; ... & Wang, H. *Oncogene*, **2020**, 39, 4956-4969.

³² Furumai, R.; Matsuyama, A.; Kobashi, N.; Lee, K. H.; Nishiyama, M.; Nakajima, H.; ... & Horinouchi, S. *Cancer Res.* **2002**, 62, 4916-4921.

³³ VanderMolen, K. M.; McCulloch, W.; Pearce, C. J. & Oberlies, N. H. *J. Antibiot.* **2011**, 64, 525-531.

La mayoría de estos inhibidores comparten modelos comunes de farmacóforos que constan de tres partes (Figura 4). Poseen típicamente un grupo quelatante de zinc (ZBG), que coordina el ion de zinc en el sitio activo. Una cola (*Cap*) que interactúa con aminoácidos en la entrada del canal de unión a ϵ -acetil-lisina y un enlazador (*linker*) que conecta a *Cap* con ZBG. Dado que *Cap* y *linker* se unen a residuos en el sitio activo y contribuyen a las interacciones ligando-receptor, es la parte de la molécula que afecta a la selectividad de los inhibidores. A esta disposición de dichos componentes se le denomina estructura tipo pez.^{34,35}

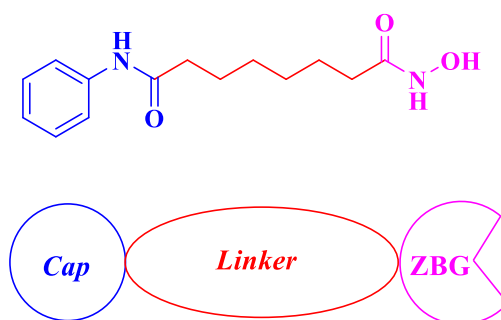


Figura 4. Estructura de un inhibidor de HDAC (SAHA).

Vorinostat o SAHA (abreviado por sus siglas en inglés suberoylanilide hydroxamic acid), es el primer iHDAC aprobado por la FDA para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T. Pertenece al grupo de inhibidores que utilizan el ácido hidroxámico como ZBG (Figura 3). Otros de los inhibidores más estudiados son los ácidos grasos de cadena corta, tetrapéptidos cíclicos y benzamidas.³⁶

Se han realizado modificaciones en SAHA para mejorar su eficacia inhibidora (Figura 5), un ejemplo de esto fue con un derivado monomérico con selenocianato (**21**) y una versión dimérica (**22**). Estos compuestos inhibieron la actividad de HDAC (extracto citosólico y nuclear) de 50 a 60% más que SAHA y aumentaron los niveles de histonas acetiladas en extractos nucleares de la línea celular de melanoma humano (WM-35).³⁷

³⁴ Amin, S. A.; Adhikari, N. & Jha, T. *Future Med. Chem.* **2017**, 9, 2211-2237.

³⁵ Zagni, C.; Citarella, A.; Oussama, M.; Rescifina, A.; Maugeri, A.; Navarra, M.; ... & Micale, N. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 945.

³⁶ Zhang, L.; Zhang, J.; Jiang, Q.; Zhang, L. & Song, W. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, 33, 714-721.

³⁷ Gowda, R.; Madhunapantula, S. V.; Desai, D.; Amin, S. & Robertson, G. P. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, 13, 756-765.

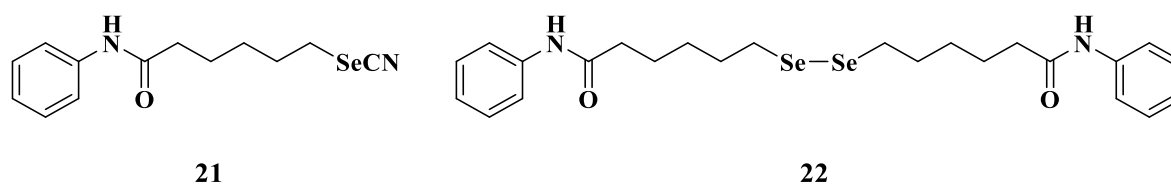
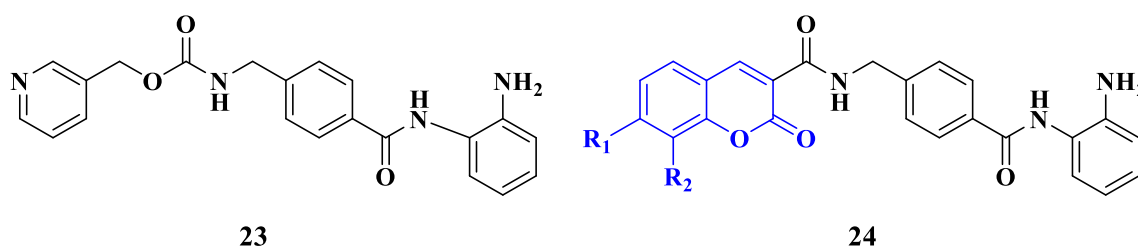


Figura 5. Derivados del fármaco SAHA que contienen selenio como grupo quelante.

Entinostat es otro inhibidor de HDAC que se encuentra en fase clínica para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Abdizadeh y cols. sintetizaron derivados cumarínicos con un *linker* y un ZBG idénticos a Entinostat (Figura 6). Estas moléculas inhibieron la actividad de pan-HDAC *in vitro* en las líneas celulares de cáncer de colon HCT116 y de ovario A2780. El derivado de 7-benciloxicumarina mostró una inhibición más fuerte que el derivado de 7-alcoxicumarina y se atribuyó a su mayor lipofilia. Mientras que el derivado de 7-alcoxicumarina fue más efectivo que su isómero 8-alcoxi.³⁸



	iHDAC IC ₅₀ (μM)	
	HCT116	A2780
R ₁ = OBn, R ₂ = H	2.49	12.82
R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = H	3.08	21.62
R ₁ = H, R ₂ = OCH ₃	5.17	40.09

Figura 6. Entinostat (**23**) e Inhibidores de HDAC a base de cumarinas con ZBG de Entinostat (**24**).

Además de la importancia estructural del grupo *Cap* en los iHDAC, en otro estudio con derivados cumarínicos se determinó que la actividad de inhibición de HDAC1 aumenta

³⁸ Abdizadeh, T.; Kalani, M.R.; Abnous, K.; Tayarani-Najaran, Z.; Khashyarmanesh, B.Z.; Abdizadeh, R.; ... & Hadizadeh, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 132, 42-62.

con la longitud del *linker* (Figura 7). El compuesto **26** con un conector de siete metilenos, mostró la mejor actividad ($IC_{50} = 0.24$ nM) entre sus análogos y fue 90 veces más potente que SAHA ($IC_{50} = 21.1$ nM). Asimismo, como sucedió con Abdizadeh y cols. una sustitución de 7-metoxi en el resto de cumarina elevó ligeramente su potencia que aquellos sin la sustitución (**26** frente **25**, ambos de 5 metilenos).³⁹

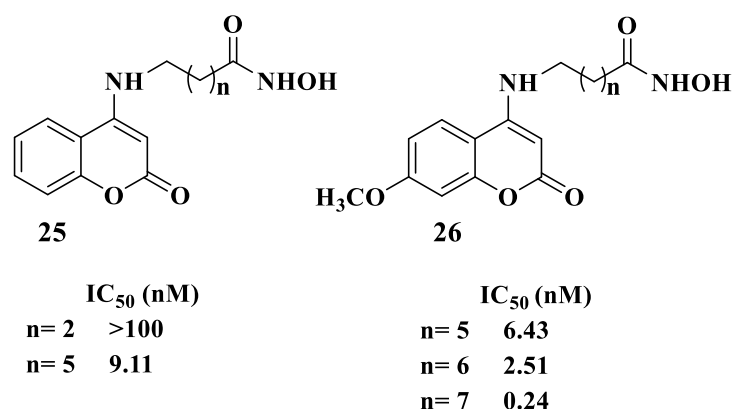


Figura 7. Inhibidores de HDAC a base de cumarinas con diferente longitud de *linker*.

Por otro lado, las actividades de inhibición de los compuestos **27** y **28** (Figura 8) fueron aproximadamente tres veces mejor que las de SAHA. Cuando el átomo de hidrógeno de la posición C-4 fue reemplazado por el metilo, se mantuvo la actividad inhibitoria a una concentración menor.³⁹

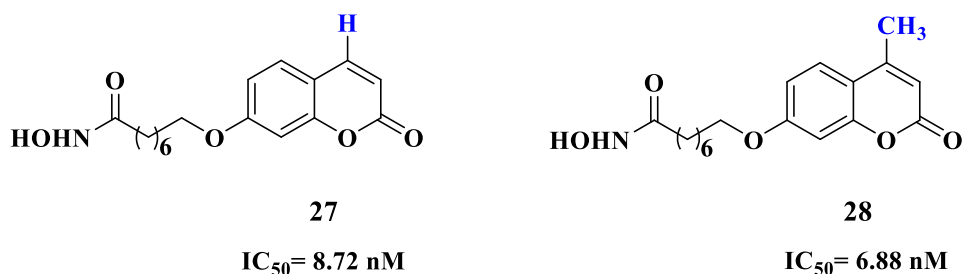


Figura 8. Inhibidores de HDAC a base de cumarinas con diferente sustituyente.

³⁹ Yang, F.; Zhao, N.; Song, J.; Zhu, K.; Jiang, C.S.; Shan, P. y Zhang, H. *Molecules*. **2019**, 24, 2569.

Cumarinas

Las cumarinas son heterociclos oxigenados derivados de la α -pirona (Figura 9) que se producen de forma natural en el reino vegetal. Se encuentran en plantas de la familia *Umbelliferae* y *Rutaceae* en raíces, frutos, hojas y tallos. Algunas cumarinas se han aislado de microorganismos, por ejemplo, las aflatoxinas de la especie *Aspergillus*.⁴⁰

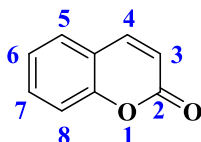


Figura 9. Estructura general de las cumarinas.

Para obtener estos compuestos a partir de plantas se utilizan diferentes métodos de extracción,^{41,42} y en muchos casos, el producto deseado se obtiene con bajos rendimientos, debido a que depende de factores estacionales y de la variable ecológica.⁴⁰ La síntesis química permite el acceso a una amplia variedad de compuestos cumarínicos de manera eficaz y económica. Las rutas sintéticas más utilizadas recurren a reacciones de condensación de Pechmann, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky o Wittig.⁴³ La primera es la más utilizada y consiste en la reacción de un β -cetoéster con un compuesto fenólico con catálisis ácida, dicha reacción procede a través de tres pasos: una transesterificación, seguida de un ataque electrofílico y finalmente una deshidratación (Esquema 1).⁴⁴

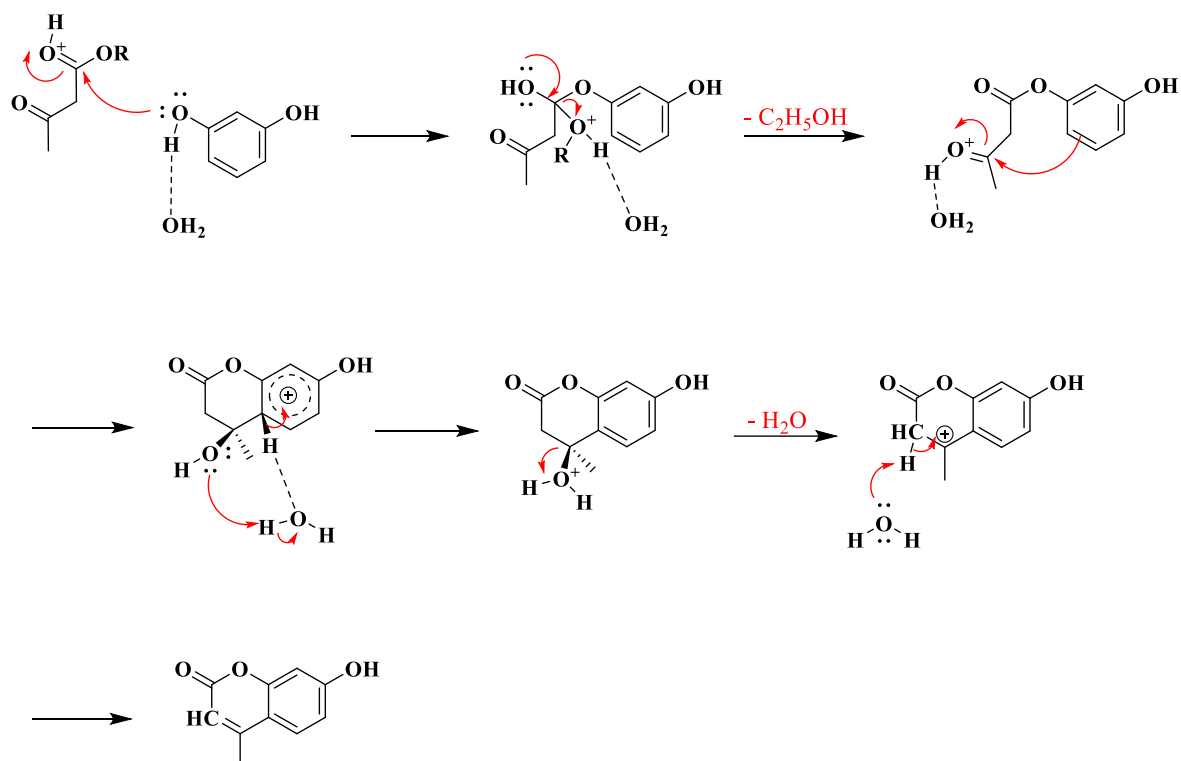
⁴⁰ Mustafa, Y. F.; Bashir, M. K. & Oglah, M. K. *Sys. Rev. Pharm.* **2020**, 11, 598-612.

⁴¹ Wang, S.; Tang, F.; Yue, Y.; Yao, X.; Wei, Q. & Yu, J. *J. AOAC Int.* **2013**, 96, 942-946.

⁴² Nguyen, P. H.; Zhao, B. T.; Kim, O.; Lee, J. H.; Choi, J. S.; Min, B. S. & Woo, M. H. *J. Nat. Med.* **2016**, 70, 276-281.

⁴³ Kuarm, B. S.; Madhav, J. V.; Laxmi, S. V.; Rajitha, B.; Reddy, Y. T.; Reddy, P. N. & Crooks, P. A. *Synth. Commun.* **2010**, 40, 3358-3364.

⁴⁴ Daru, J. & Stirling, A. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 8749-8755.



Esquema 1. Mecanismo de reacción propuesto por Ahmed y Desai para la síntesis de β -metil umbelliferona.

La umbeliferona y sus derivados pertenecen al grupo de cumarinas 7-sustituidas, que se caracterizan por tener un grupo -OH en el C-7. En la Figura 10 se muestran como ejemplo a la escopoletina (**29**),⁴⁵ la esculetina (**30**), la umbeliferona (**31**)⁴⁶ y la 4-metilumbeliferona (**32**).⁴⁷

⁴⁵ Ding, Z.; Dai, Y.; Hao, H.; Pan, R.; Yao, X. & Wang, Z. *Pharm. Biol.* **2008**, 46, 854-860.

⁴⁶ Bruneton, J. Principles of herbal pharmacology. Bone, K. & Mills, S. *Principles and Practice of Phytotherapy*. **2013**, pp. 45-82. Churchill Livingstone, Elsevier.

⁴⁷ Sharma A., Tiwari M. & Supuran C. T. **2014**. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 29, 292-296.

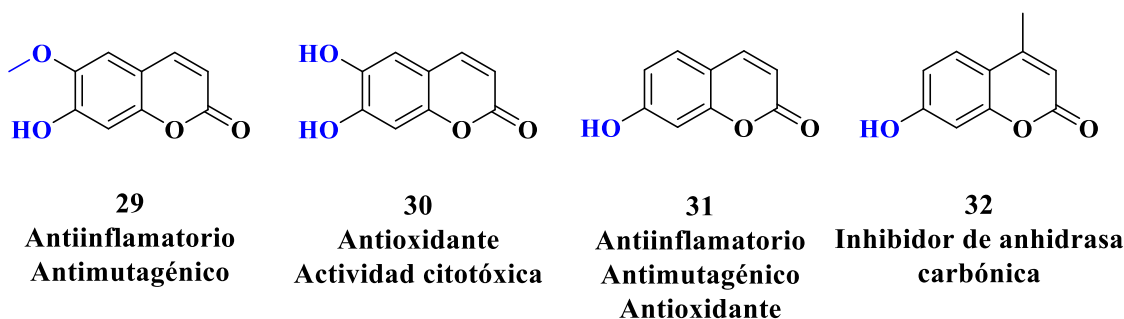


Figura 10. Cumarinas mono y disustituidas con actividad biológica

Debido a que el resto de fenol se puede derivatizar fácilmente en nuevos quimiotipos que no han sido investigados. Este grupo de compuestos son de gran valor debido a sus aplicaciones en la industria farmacéutica, como *building blocks* en la síntesis de moléculas con actividad biológica. Entre sus efectos benéficos se encuentra su actividad antibacterial, antioxidante,⁴⁸ anti-VIH,⁴⁹ anti-Alzheimer⁵⁰ y antitumoral.⁵¹ Como ejemplo, en la Figura 11 se observan inhibidores de acetilcolinesterasa y de la monoaminooxidasa B. Estas cumarinas experimentaron una O-alquilación y posteriormente fueron tratadas con una amina secundaria, disulfuro de carbono y trietilamina en DMF para obtener los compuestos objetivos.⁵⁰ De igual manera, se han generado inhibidores glicosilados haciendo uso del sustituyente hidroxilo de la 4-metilumbeliferona, a partir de azúcares protegidos y utilizando $\text{BF}_3 \cdot \text{OMe}_2$.⁵¹ Estas unidades estructurales desempeñan un papel fundamental para la construcción rápida y confiable de un conjunto de compuestos para el descubrimiento de fármacos.⁵²

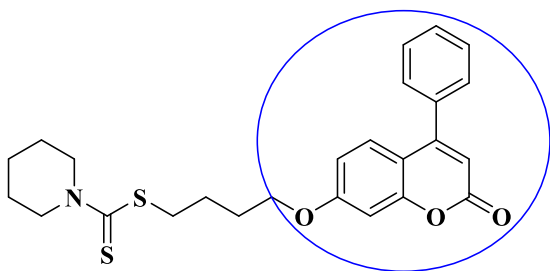
⁴⁸ Manojkumar, P.; Ravi, T. K. & Gopalakrishnan, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 4690-4694.

⁴⁹ Xie, L.; Takeuchi, Y.; Cosentino, L. M.; McPhail, A. T. & Lee, K. H. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 664-671.

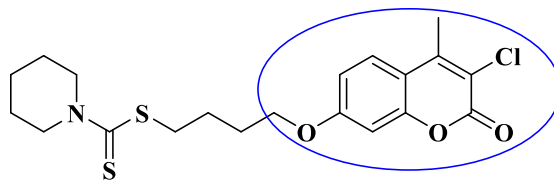
⁵⁰ He, Q.; Liu, J.; Lan, J. S.; Ding, J.; Sun, Y.; Fang, Y.; ... & Xie, S. S. *Bioorg. Chem.* **2018**, 81, 512-528.

⁵¹ Touisni N., Maresca A., McDonald P. C., Lou Y., Scozzafava A., Dedhar S., Winum JY. & Supuran C. T. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 8271-8277.

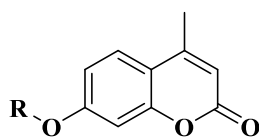
⁵² Anamika, Utreja, D.; Ekta, Jain, N. & Sharma, S. *Curr. Org. Chem.* **2018**, 22, 2509-2536.



Inhibidor de la monoaminoxidasa B



Inhibidor de la acetilcolinesterasa y de la monoaminoxidasa B



R= manosa o galactosa

Inhibidor de isoformas IX y XII de Anhidrasa Carbónica

Figura 11. Cumarinas y aplicaciones en química farmacéutica.

Objetivos

En el presente proyecto se propuso realizar la preparación de diversos tio- y selenocianatos derivados de cumarinas, como análogos del fármaco SAHA, y por consiguiente, potenciales inhibidores de HDAC y agentes antiproliferativos (Figura 12). De forma análoga, se planteó una estructura en forma de pez modificada, con sus tres componentes fundamentales: cumarina como grupo *cap*, fragmento hidrocarbonado como *linker* y el grupo tio- o selenocianato como *ZBG*.

Recientemente se ha descrito que la función selenocianato actúa como ZBG en la inhibición de HDAC,³⁷ por lo que se propuso sintetizar tio-isósteros que podrían tener esa actividad. Además, de determinar la influencia de los grupos sustituyentes presentes en la posición C-3 y C-4 en la porción de cumarina.

Para conseguir este objetivo se planteó realizar la síntesis de una serie de cuatro cumarinas mediante el método de Pechmann, con diferente ZBG y longitud de *linker*, para generar un total de 14 compuestos, y a través de su evaluación *in silico* por medio de docking molecular, predecir energías y modos de enlace entre los ligandos propuestos y la enzima HDAC8.

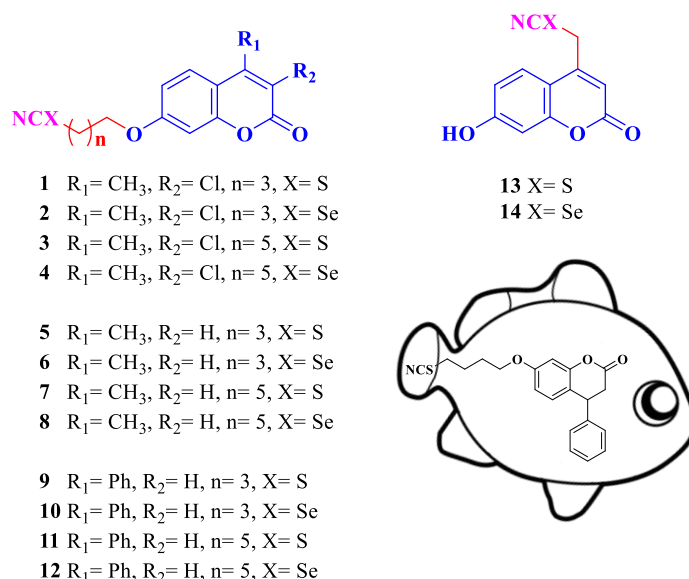
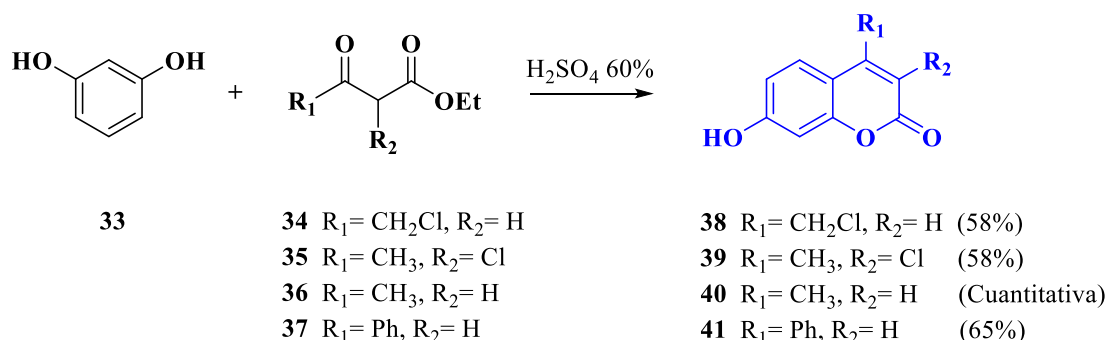


Figura 12. Tio- y selenocianatos derivados de cumarinas.

Discusión de resultados

Como se muestra en el esquema 2, para la síntesis de diferentes hidroxycumarinas **38-41**, se utilizó el método de Pechmann mediante la condensación de resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) con diferentes β -cetoésteres (1equivalente) y H_2SO_4 como catalizador a temperatura ambiente. Esto permitió la obtención de un grupo hidroxilo fenólico en la posición C-7, que fue empleado para la funcionalización de la cumarina, permitiendo la inserción del *linker*. De igual manera, permitió la incorporación de sustituyentes en las posiciones C-3 y/o C-4; la presencia de sustituyentes en esas posiciones disminuye la posible toxicidad del compuesto al ser metabolizado en el organismo, ya que dicha metabolización transcurre mediante la formación de un epóxido reactivo entre dichas posiciones, proceso que se ralentiza al estar sustituidas.⁵³

A las 24 h de reacción aún se observó materia prima en la síntesis de las cumarinas **38**, **39** y **41**, obteniéndose rendimientos moderados del 58% al 65%. En el caso de la cumarina **40** se obtuvieron excelentes rendimientos tras la precipitación del compuesto en el medio de reacción. Una alternativa para aumentar los rendimientos es emplear otro ácido como catalizador. En un protocolo reportado con ácido trifluoroacético se han preparado numerosas cumarinas con buenos rendimientos y excelente regioselectividad.⁵⁴

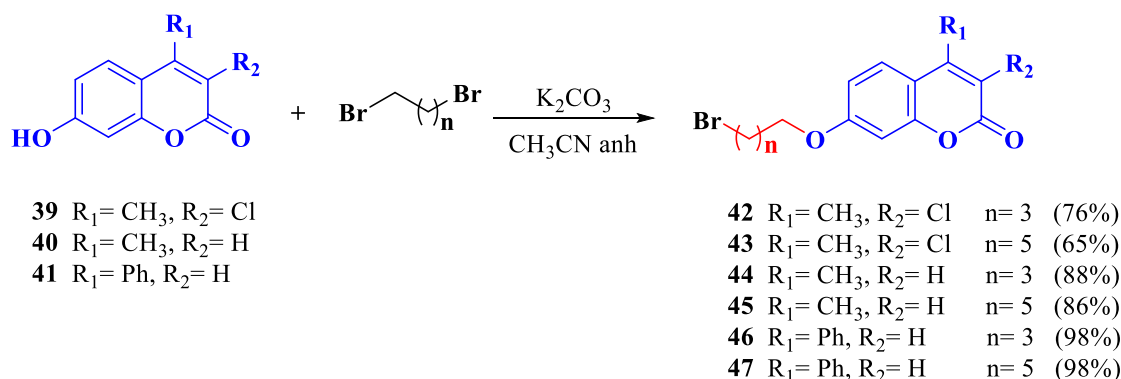


Esquema 2. Síntesis de hidroxycumarinas por el método de Pechmann.

⁵³ Lake, B. G.; Evans, J. G.; Lewis, D. F. V. & Price, R. J. *Food. Chem. Toxicol.* **1994**, 32, 357-363.

⁵⁴ Zak, J.; Ron, D.; Riva, E.; Harding, H. P.; Cross, B. C. & Baxendale, I. R. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 9901-9910.

Las cumarinas obtenidas presentan un carácter nucleofílico por el grupo hidroxilo en la posición 7, por lo que son susceptibles a reaccionar con electrófilos como los haluros de alquilo. Por esta razón, se procedió a realizar una alquilación con el correspondiente α,ω -dibromoalcano (8 equivalentes) en medio básico a los compuestos **39-41** para generar los productos de la O-alquilación (**42-47**) con buenos rendimientos (Esquema 3). Dado que los hidroxilos fenólicos son más ácidos que los alcoholes, basta con una base moderada (K_2CO_3) para obtener el fenóxido como nucleófilo; dicho alcóxido, actúa como nucleófilo en una reacción tipo S_N2 sobre el dihaluro de alquilo. La monoalquilación se logró añadiendo un exceso del dihaluro de alquilo. La reacción se mantuvo a 65 °C durante 4 o 5 h (dependiendo del dibromoalcano) en CH_3CN anhidro, donde hubo un consumo total de materia prima. La O-alquilación es favorecida por este tipo de disolventes polares apróticos.⁵⁵



Esquema 3. Alquilación de hidroxycumarinas.

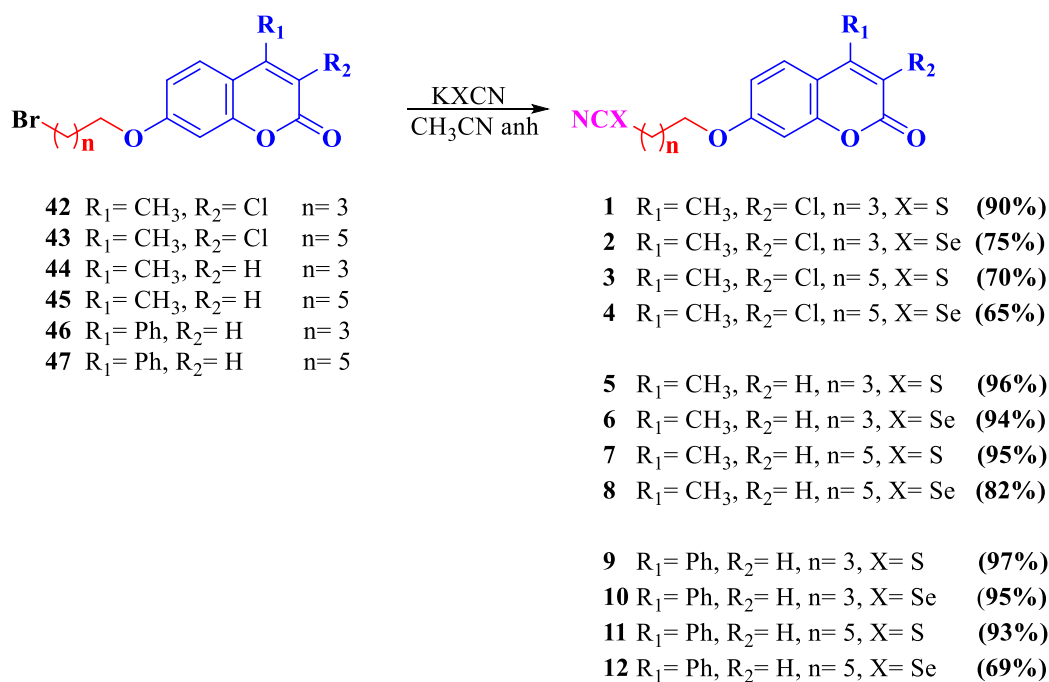
En la siguiente etapa se realizó un nuevo desplazamiento nucleofílico; en este caso, del bromo terminal de los derivados **42-47**, y del átomo de cloro en la cumarina **38** empleando como nucleófilo el tio- o selenocianato de potasio comercial (Esquema 4 y 5). Esto permitió la incorporación del grupo quelante de zinc (ZBG) a las diferentes cumarinas. Inicialmente, se utilizó una metodología reportada por nuestro grupo de investigación.⁵⁶ Como sustrato modelo, con objeto de optimizar las condiciones, se empleó el compuesto **42** con 5.5 equivalentes de tiocianato de potasio en THF anhidro. La mezcla se mantuvo a reflujo y en oscuridad. A las 12 h de reacción se observó materia prima, por lo que se adicionó un extra

⁵⁵ Gonzalez, A. G. & Jorge, Z. D. *An. Quím.* **1983**, 79, 265-269.

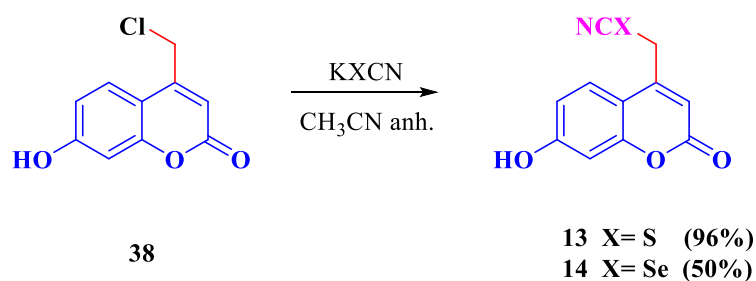
⁵⁶ Fuentes-Aguilar, A., Romero-Hernández, L. L., Arenas-González, A., Merino-Montiel, P., Montiel-Smith, S., Meza-Reyes, S., ... & Fernández-Bolaños, J. G. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 5041-5054.

de KSCN para dar un total de 7.4 equivalentes. Después de 4 h se notó un ligero aumento en la formación del producto **1**. Con objeto de aumentar la polaridad del disolvente, lo cual podría favorecer la reacción S_N2 , se incorporó a la mezcla acetonitrilo anhidro, observando a las 5 h siguientes un consumo total de materia prima. Como segunda prueba y confirmando los detalles anteriores, con 7.4 equivalentes de KSCN en una mezcla de THF/ CH_3CN anhidro (3:2), el compuesto **1** se obtuvo tras sólo 4 h a 66 °C.

En un tercer ensayo y como condiciones finales, el cambio de disolvente a totalmente CH_3CN anhidro, no cambio el rendimiento, ni el tiempo de reacción (4 h), pero disminuyó la temperatura requerida a 60 °C y la cantidad de KSCN a 4 equivalentes. En el caso de los selenocianatos se utilizaron 2 equivalentes de KSeCN. En estos compuestos fue necesario realizar lavados con H_2O para eliminar los subproductos y restos de selenio que interferían en la purificación de los compuestos. Los productos de sustitución se aislaron con rendimientos de excelentes a prácticamente cuantitativos tras purificación cromatográfica, a excepción del compuesto **14** con un rendimiento del 50% (Esquema 5).



Esquema 4. Preparación de una serie de tio- y selenocianatos derivados de cumarina.



Esquema 5. Preparación de tio y selenocumarinas.

Como muestra de los tio- y selenocianatos derivados de cumarina, en la Figura 13a se presentan los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **3** y **4**, donde se observan las señales características de la porción de cumarina. Los protones aromáticos correspondientes al 8-H con una señal simple a 6.80 ppm y dos señales dobles a 6.90 ppm y 7.52 ppm para los 6-H y 5-H, respectivamente, ambas señales con una constante de acoplamiento de $J=8.9$ Hz. Mientras que a 2.55 ppm una señal simple para los protones del sustituyente $-\text{CH}_3$.

Como señales características de la cadena hidrocarbonada, a 4.03 ppm se observa una señal triple para los protones 1'-H. En el compuesto **3** con el grupo $-\text{SCN}$, entre 1.55 ppm y 1.91 ppm las señales correspondientes a los grupos metilenos ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$) y en 2.98 ppm una señal triple para los protones 6'-H. Para el compuesto **4** con el grupo $-\text{SeCN}$, el rango se desplazó hacia la izquierda del espectro hasta 1.98 ppm y de igual manera, la señal triple correspondiente a los protones 6'-H a 3.08 ppm.

En el espectro de ^{13}C -RMN de los compuestos **3** y **4** (Figura 13b) destacan las señales en 112.4 ppm y 101.6 ppm, asignadas al grupo C-S y C-Se, respectivamente. Entre 101.3 y 162.1 se encuentran las señales correspondientes al cuerpo de la cumarina.

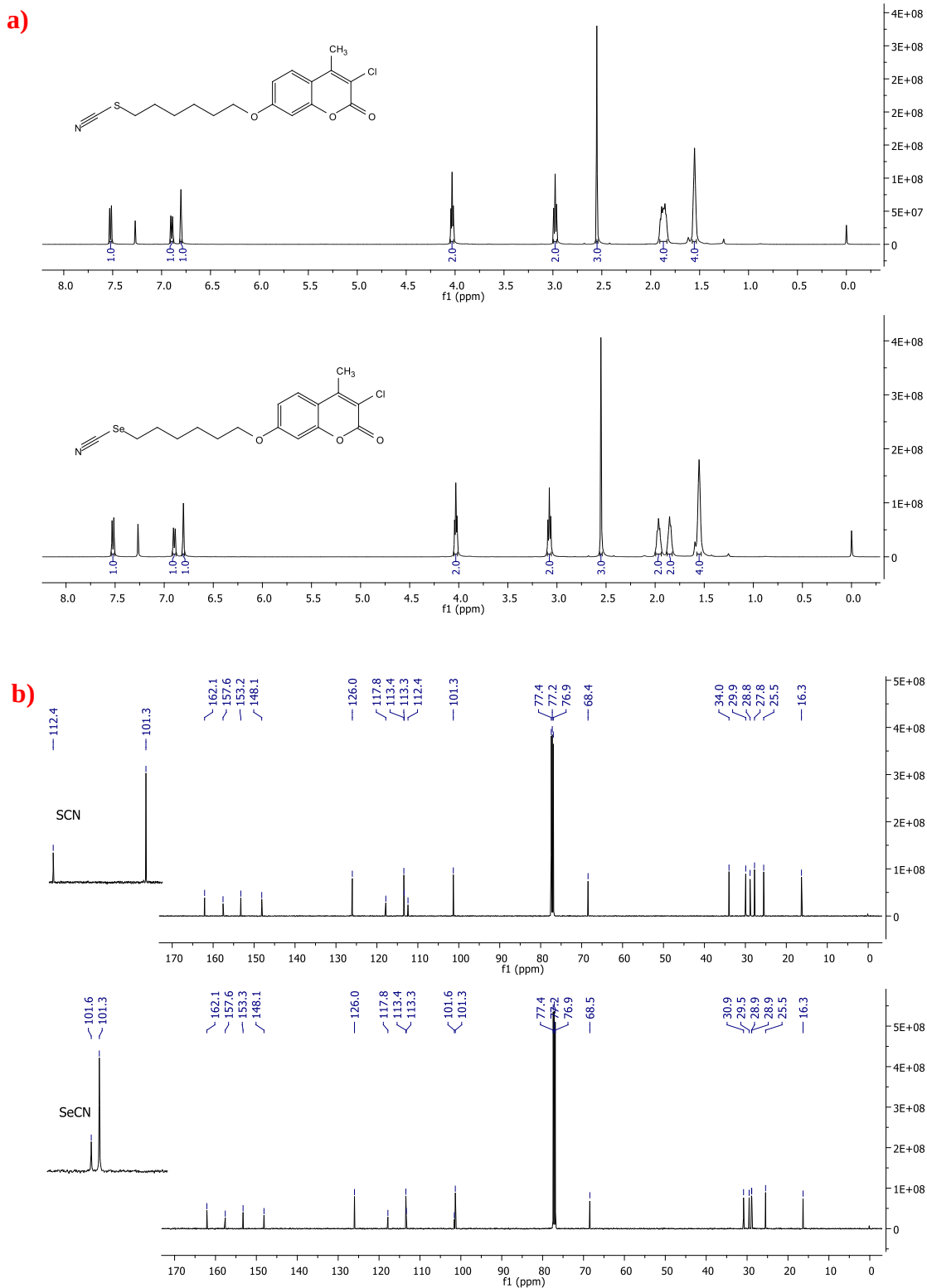


Figura 13. a) Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y b) espectro de ^{13}C -RMN (125.77 MHz, CDCl_3) de los productos **3** y **4**.

Docking molecular

HDAC8

Para validar la preparación de nuestro modelo, se incluyó la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD), como una medida adicional del éxito de reacoplamiento. En el que se obtuvo un valor de 1.3443 ± 0.2846 Å. La pose con menor RMSD y una energía de unión de -5.2281 Kcal/mol se muestra en la figura 14. La enzima HDAC8 se encuentra en complejo con un inhibidor selectivo de ácido hidroxámico (ligando cristalográfico).⁵⁷ El ácido hidroxámico se coordina con el ion zinc y los residuos del sitio activo (Asp178, His180 y Asp267) completan la coordinación del metal. El inhibidor presenta una interacción de enlace de hidrógeno con His142 e interacciones hidrofóbicas con Phe152 y Phe208.

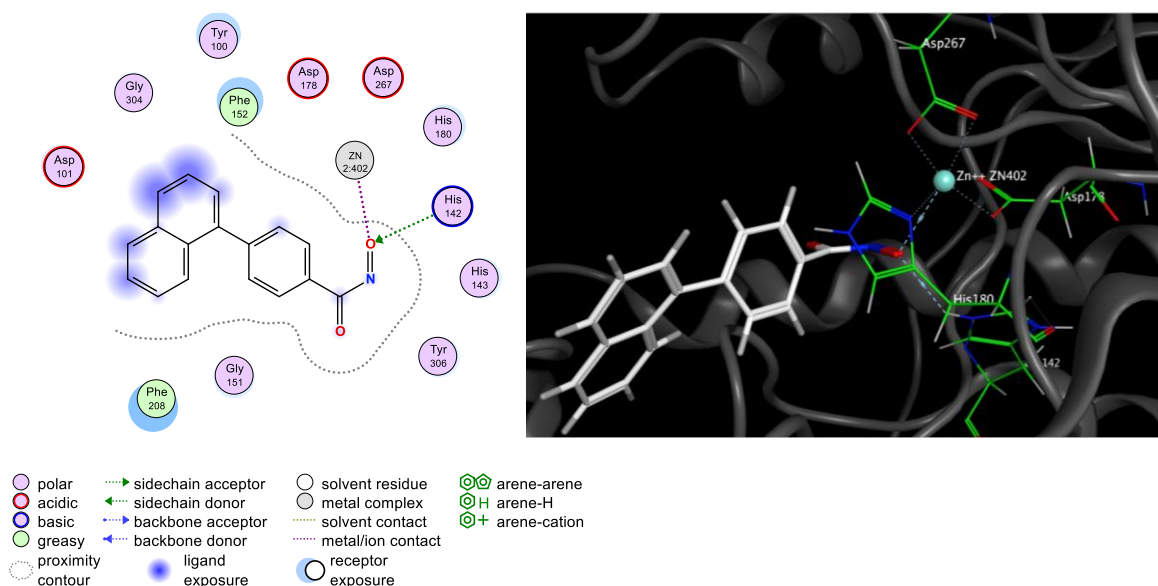


Figura 14. Mapa 2D y 3D del inhibidor de ácido hidroxámico ($\Delta G = -5.2281$ Kcal/mol) en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

Para ilustrar el posible mecanismo de inhibición de HDAC8 por los compuestos **1-14** se realizó un acoplamiento molecular *in silico*. Donde se examinó que dichos compuestos encajan en el bolsillo catalítico de la enzima (Figura 17-23). El grupo tio- o selenocianato (ZBG) se localiza cerca de los aminoácidos de la triada catalítica (His142, His143 y

⁵⁷ Tabackman, A. A., Frankson, R., Marsan, E. S., Perry, K., & Cole, K. E. *J. Struct. Biol.* **2016**, 195, 373-378.

Tyr306)⁵⁸ y se coordina con el ion zinc a través del átomo de nitrógeno. Además, en algunos de estos compuestos el átomo de nitrógeno forma un enlace de hidrógeno con His142. La región espaciadora se localiza en el canal hidrofóbico del sitio activo, que incluye a Phe152, Phe208, Pro273 y Met274. La porción de cumarina o grupo *cap* actúa como tapa en el canal de acceso al sitio activo (figura 15) y ayuda a bloquear el acceso del sustrato. Al unirse estos compuestos a la enzima, se afecta el reconocimiento del ligando endógeno (residuo de lisina acetilado) y este ya no puede unirse ni ser catalizado.³⁵

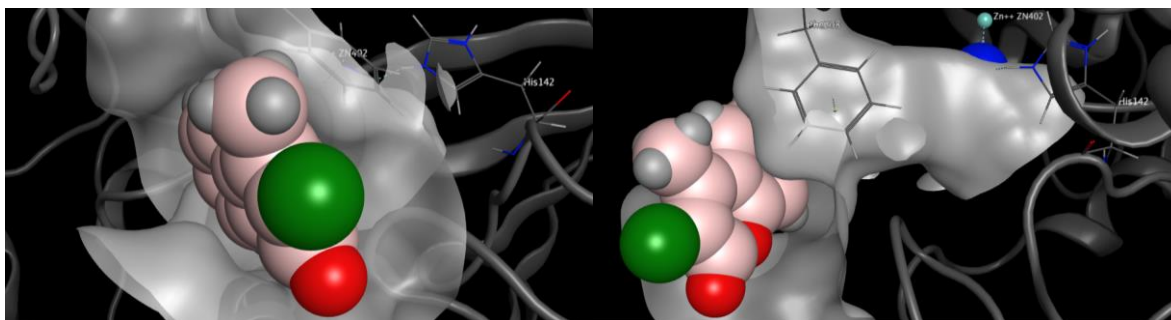


Figura 15. Mapa 3D del compuesto **1** en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenido con el programa MOE. El átomo de nitrógeno del grupo quelante se muestra de color azul cerca del ion zinc. El grupo protector o cumarina (en color rosa) se localiza al final del canal de acceso.

Con respecto a las energías de unión de cada compuesto, se notó una mínima diferencia por el cambio de un espaciador de 4 a 6 metilenos, con menores energías de unión en los productos de cadena de seis carbonos (Figura 16). Principalmente en los ligandos de seis metilenos **7** ($\Delta G = -6.2521$ Kcal/mol) y **8** ($\Delta G = -6.1173$ Kcal/mol) con respecto a los ligandos de cuatro metilenos **5** ($\Delta G = -5.9062$ Kcal/mol) y **6** ($\Delta G = -5.6532$ Kcal/mol).

Los ligandos **13** ($\Delta G = -5.2516$ Kcal/mol) y **14** ($\Delta G = -5.1532$ Kcal/mol) con el espaciador más pequeño, obtuvieron los peores puntajes con valores iguales o menores al ligando cristalográfico ($\Delta G = -5.2281$ Kcal/mol), haciendo notar la importancia del tamaño adecuado

⁵⁸ Somoza, J. R., Skene, R. J., Katz, B. A., Mol, C., Ho, J. D., Jennings, A. J., ... & Tari, L. W. *Structure*, 2004, 12, 1325-1334.

³⁵ Zagni, C.; Citarella, A.; Oussama, M.; Rescifina, A.; Maugeri, A.; Navarra, M.; ... & Micale, N. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 945.

del espaciador. La síntesis de una nueva clase de compuestos requiere un estudio *in silico* e *in vitro* para determinar la estructura más a fin a la enzima.

Otras diferencias notorias se debieron a los cambios de grupo *cap* entre productos. Se sabe que este grupo desempeña un papel importante en la selectividad enzimática, los ligandos **4** y **11** alcanzaron los mejores puntajes con valores de -6.4677 Kcal/mol y -6.7347 Kcal/mol, respectivamente; dichos compuestos presentan una sustitución más voluminosa en los C-3 y/o C-4 que el grupo de cumarinas con un grupo -CH₃ en el C-4. Debido a que el grupo *cap* actúa como grupo protector, los grupos voluminosos en esta posición favorecen su actividad inhibitoria contra HDAC. En general, a excepción de los compuestos **13** y **14**, los compuestos sintetizados presentaron mejores energías de unión que el inhibidor selectivo de HDAC8 (ligando cristalográfico).

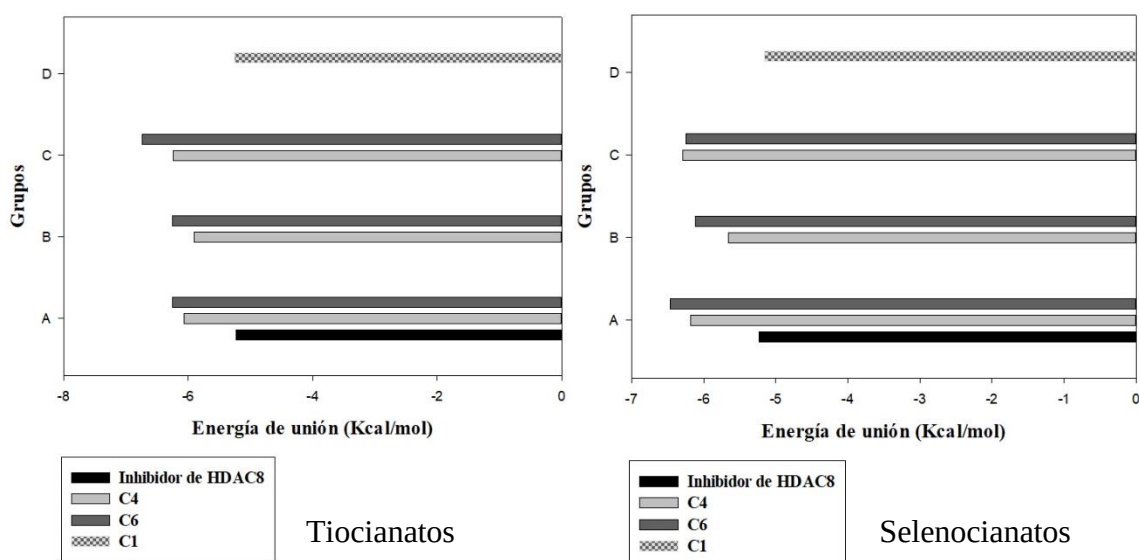
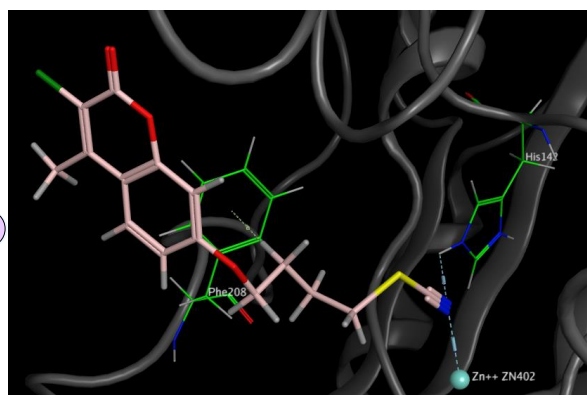
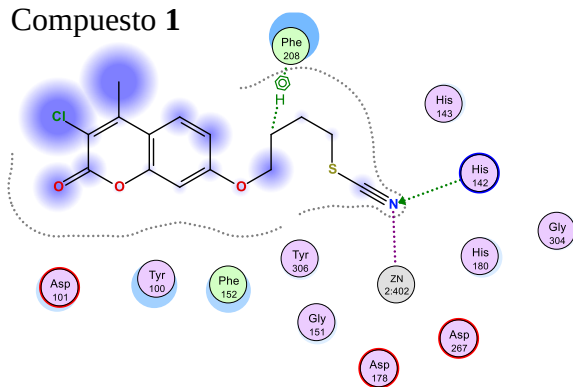


Figura 16. Efecto de la longitud de la cadena en los valores de energía de unión. **Tiocianatos**, Grupo A: compuestos **1** y **3** ($R_1=CH_3$, $R_2=Cl$); grupo B: compuestos **5** y **7** ($R_1=CH_3$, $R_2=H$); grupo C: compuestos **9** y **11** ($R_1=Ph$, $R_2=H$); grupo D: compuestos **13**. **Selenocianatos**, Grupo A: compuestos **2** y **4** ($R_1=CH_3$, $R_2=Cl$); grupo B: compuestos **6** y **8** ($R_1=CH_3$, $R_2=H$); grupo C: compuestos **10** y **12** ($R_1=Ph$, $R_2=H$); grupo D: compuestos **14**.

No se percibieron diferencias uniformes entre los grupos tio- y selenocianato que influyeran en los puntajes obtenidos. Probablemente, sus diferencias citotóxicas como cambios en la

morfología celular, viabilidad y genotoxicidad, serán determinadas en su evaluación *in vitro* en cultivos celulares y ensayos de inhibición enzimática. Normalmente, el grupo de unión a zinc es un derivado de ácido hidroxámico o de benzamida. Sin embargo, estos compuestos presentan inconvenientes farmacocinéticos y toxicidad metabólica por la porción de anilina en los inhibidores de benzamidas, por lo que se necesita buscar ZBG alternativos.⁵⁹

Compuesto 1



Compuesto 2

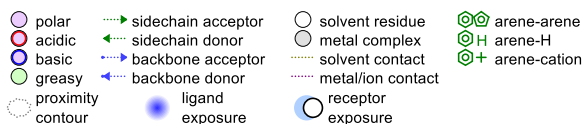
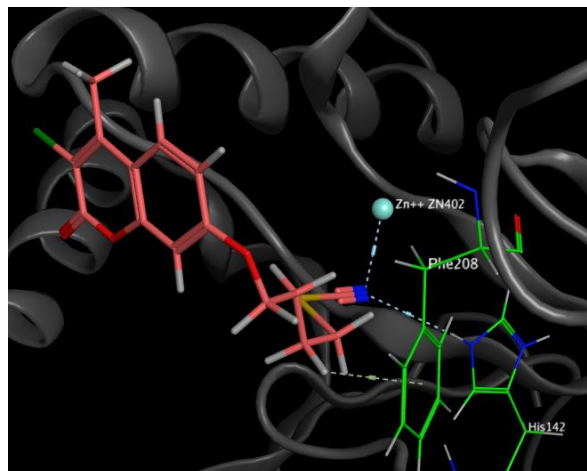
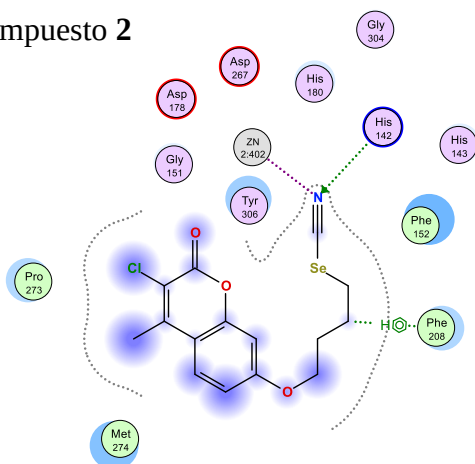
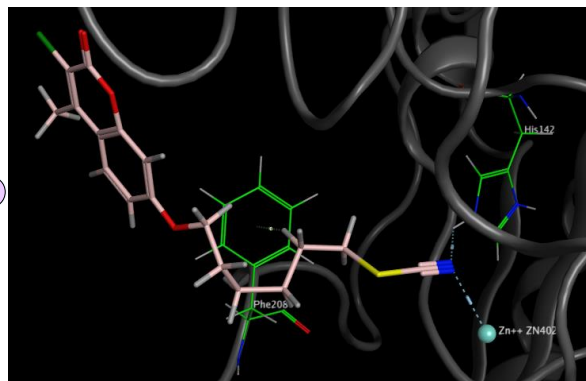
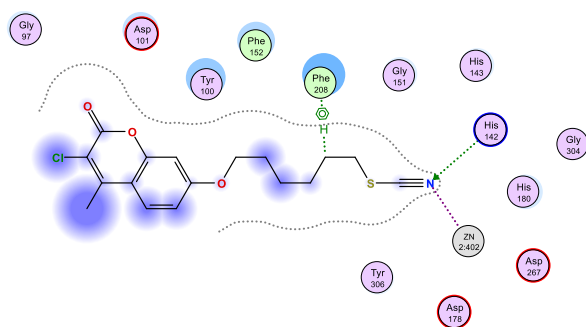


Figura 17. Mapa 2D y 3D de los compuestos 1 ($\Delta G = -6.0713$ Kcal/mol) y 2 ($\Delta G = -6.1791$ Kcal/mol) en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

⁵⁹ Li, Y. & Woster, P. M. *Med. Chem. Commun.* **2015**, 6, 613-618.

Compuesto 3



Compuesto 4

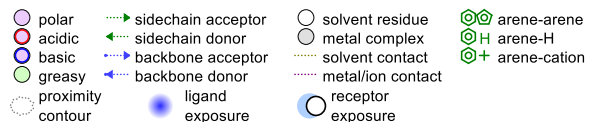
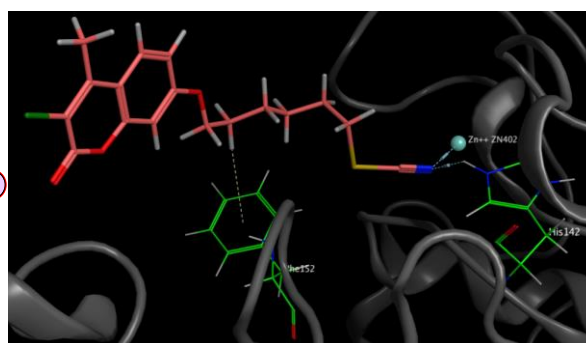
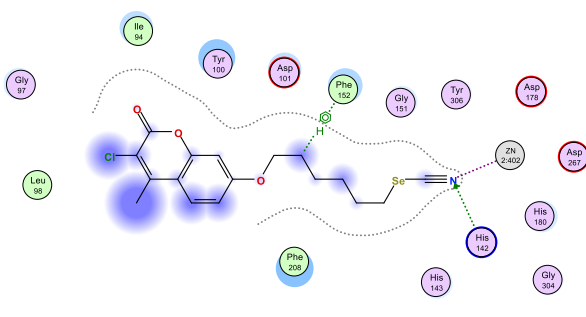
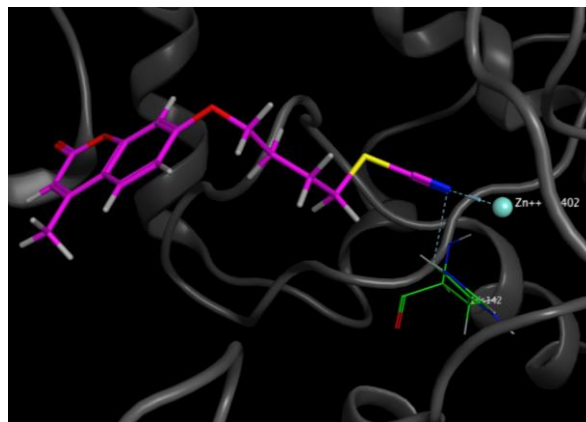
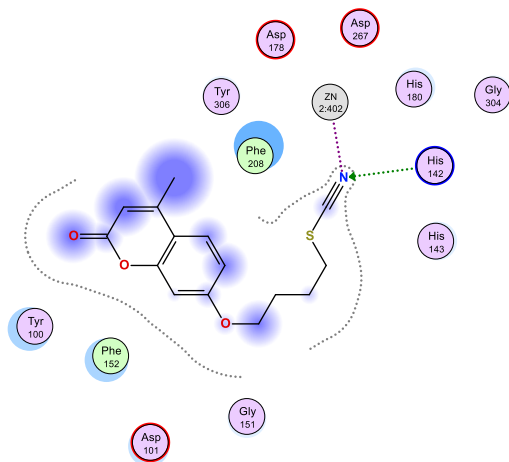
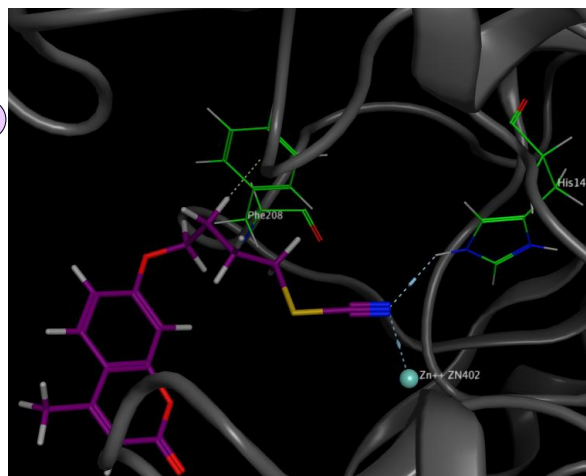
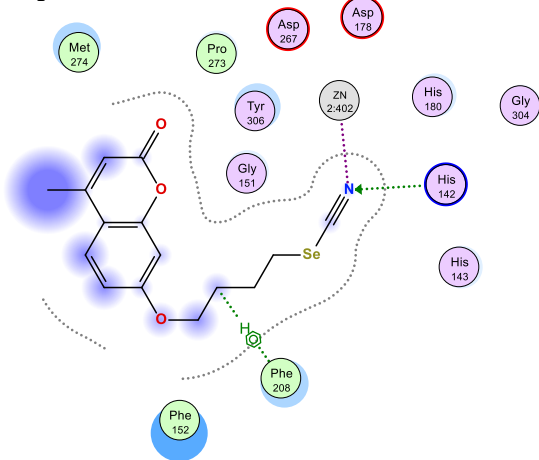


Figura 18. Mapa 2D y 3D de los compuestos **3** ($\Delta G = -6.2491$ Kcal/mol) y **4** ($\Delta G = -6.4677$ Kcal/mol) en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

Compuesto 5



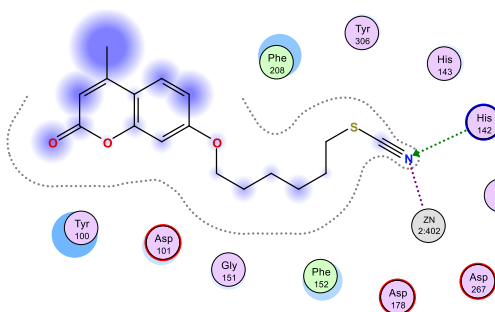
Compuesto 6



- | | | | |
|-------------|----------------------|---------------------|------------------|
| ○ polar | → sidechain acceptor | ○ solvent residue | ⊗ arene-arene |
| ○ acidic | → sidechain donor | ○ metal complex | ⊗ H arene-H |
| ○ basic | → backbone acceptor | ○ solvent contact | ⊗ + arene-cation |
| ○ greasy | → backbone donor | ○ metal/ion contact | |
| ○ proximity | ○ ligand exposure | ○ receptor exposure | |
| ○ contour | | | |

Figura 19. Mapa 2D y 3D de los compuestos **5** ($\Delta G = -5.9062$ Kcal/mol) y **6** ($\Delta G = -5.6532$ Kcal/mol) en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

Compuesto 7



Compuesto 8

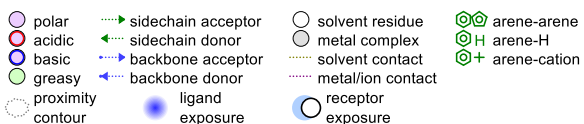
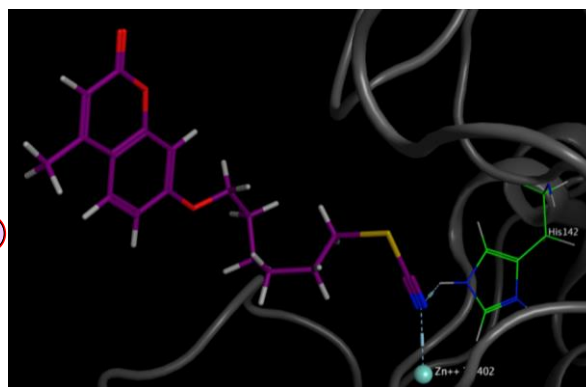
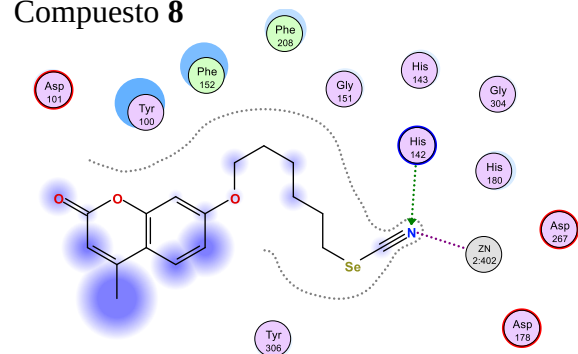
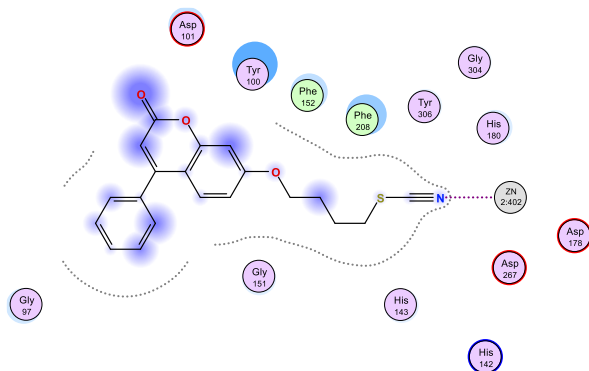


Figura 20. Mapa 2D y 3D de los compuestos **7** ($\Delta G = -6.2521$ Kcal/mol) y **8** ($\Delta G = -6.1173$ Kcal/mol) en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

Compuesto 9



Compuesto 10

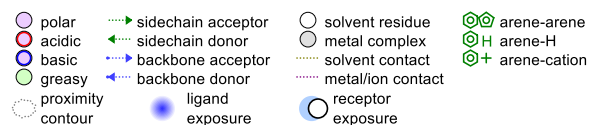
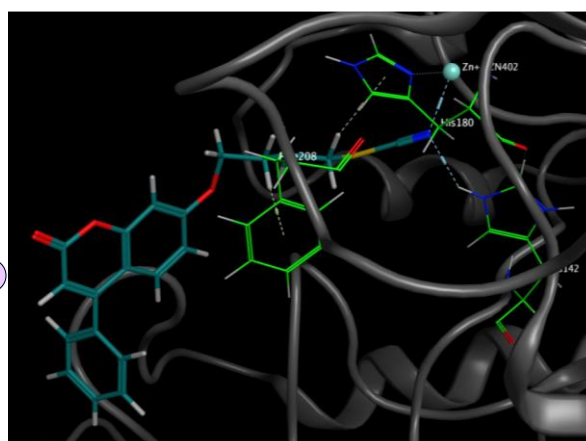
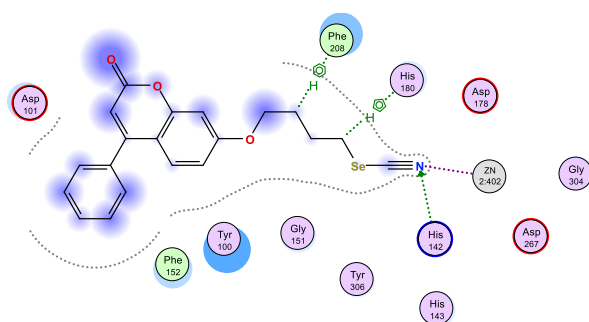
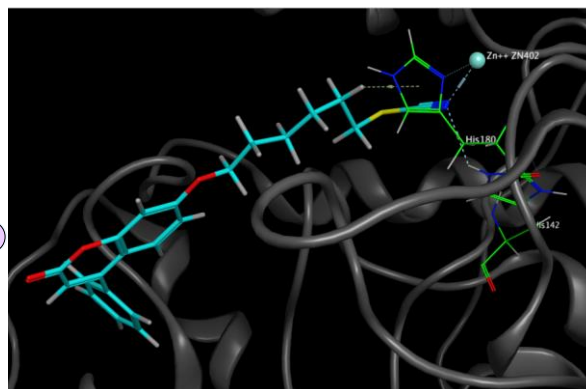
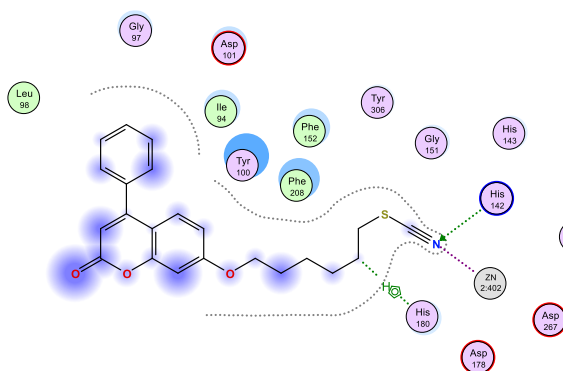


Figura 21. Mapa 2D y 3D de los compuestos **9** ($\Delta G = -6.2457$ Kcal/mol) y **10** ($\Delta G = -6.2850$ Kcal/mol) en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

Compuesto 11



Compuesto 12

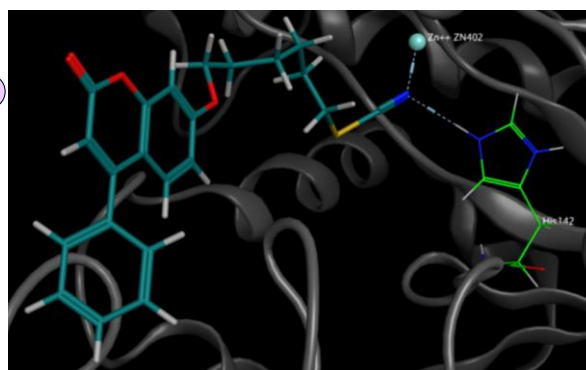
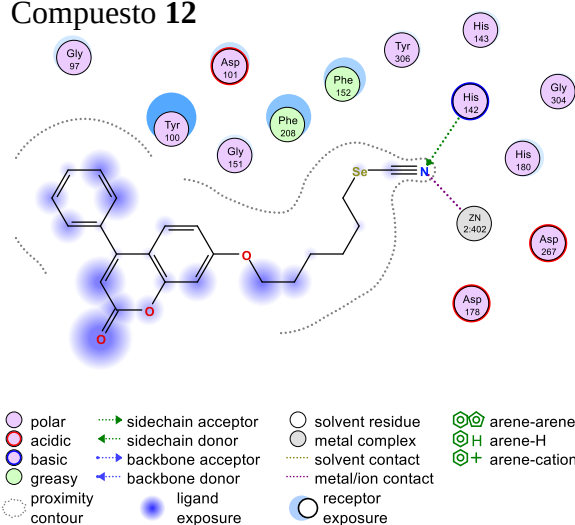
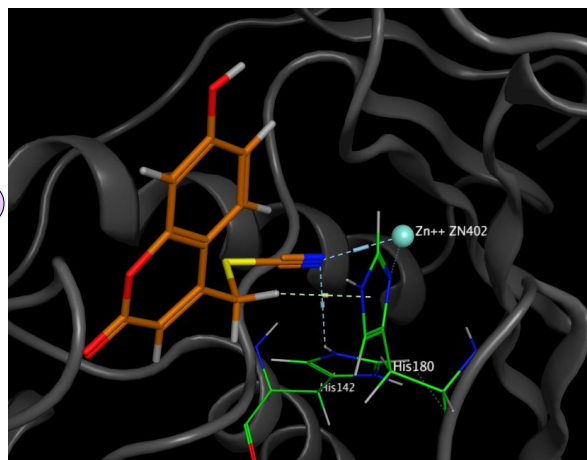
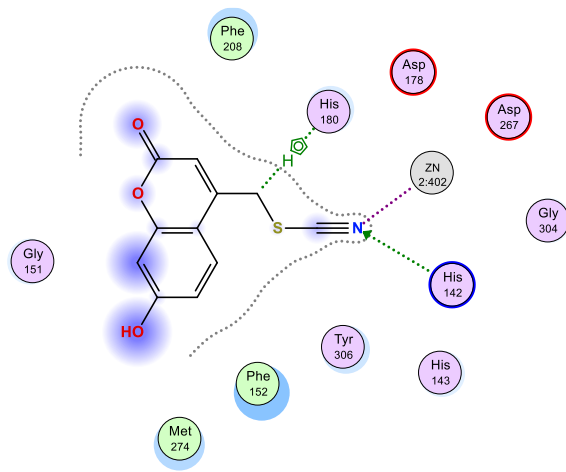
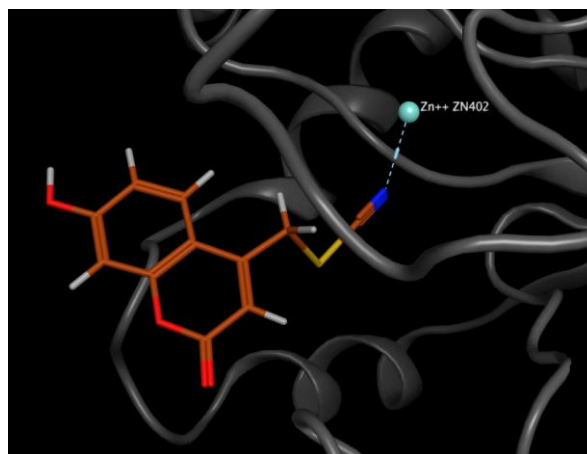
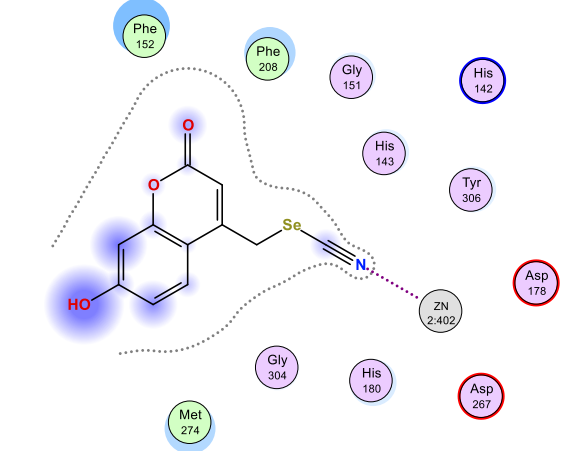


Figura 22. Mapa 2D y 3D de los compuestos **11** ($\Delta G = -6.7347$ Kcal/mol) y **12** ($\Delta G = -6.2509$ Kcal/mol) en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

Compuesto 13



Compuesto 14



- | | | | |
|---------------------|----------------------|---------------------|------------------|
| ○ polar | ⋯ sidechain acceptor | ○ solvent residue | ⊗ arene-arene |
| ○ acidic | ⋯ sidechain donor | ○ metal complex | ⊗ H arene-H |
| ○ basic | ⋯ backbone acceptor | ⋯ solvent contact | ⊗ + arene-cation |
| ○ greasy | ⋯ backbone donor | ⋯ metal/ion contact | |
| ○ proximity contour | ○ ligand exposure | ○ receptor exposure | |

Figura 23. Mapa 2D y 3D de los compuestos **13** ($\Delta G = -5.2516$ Kcal/mol) y **14** ($\Delta G = -5.1532$ Kcal/mol) en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

En el acoplamiento molecular, los compuestos **1-14** actuaron como ligandos monodentados, su grupo ZBG se coordinó con el ion zinc a través del átomo de nitrógeno. Debido a que estos ligandos monodentados pueden tener dos o más sitios donadores, con su átomo de azufre y nitrógeno en los tiocianatos; y selenio/nitrógeno en los selenocianatos, se esperaba un modo de coordinación del zinc con azufre o selenio.

Al no obtenerse, se realizó un acoplamiento adicional con un isotiocianato del compuesto con mejor puntaje **11** (-6.7347 Kcal/mol). Este compuesto se coordinó con el ion zinc a través del par electrónico del azufre y mantuvo las mismas interacciones que su isómero con His142 e His180, así como un puntaje similar (-6.7121 Kcal/mol) (Figura 24).

Esto elucidó que en el acoplamiento molecular no existió una preferencia con respecto a ambos átomos con par electrónico libre y lo que influyó fue la posición del átomo terminal en el grupo quelante de zinc, posición más favorable y cercana al metal.

Compuesto **11**

Isotiocianato

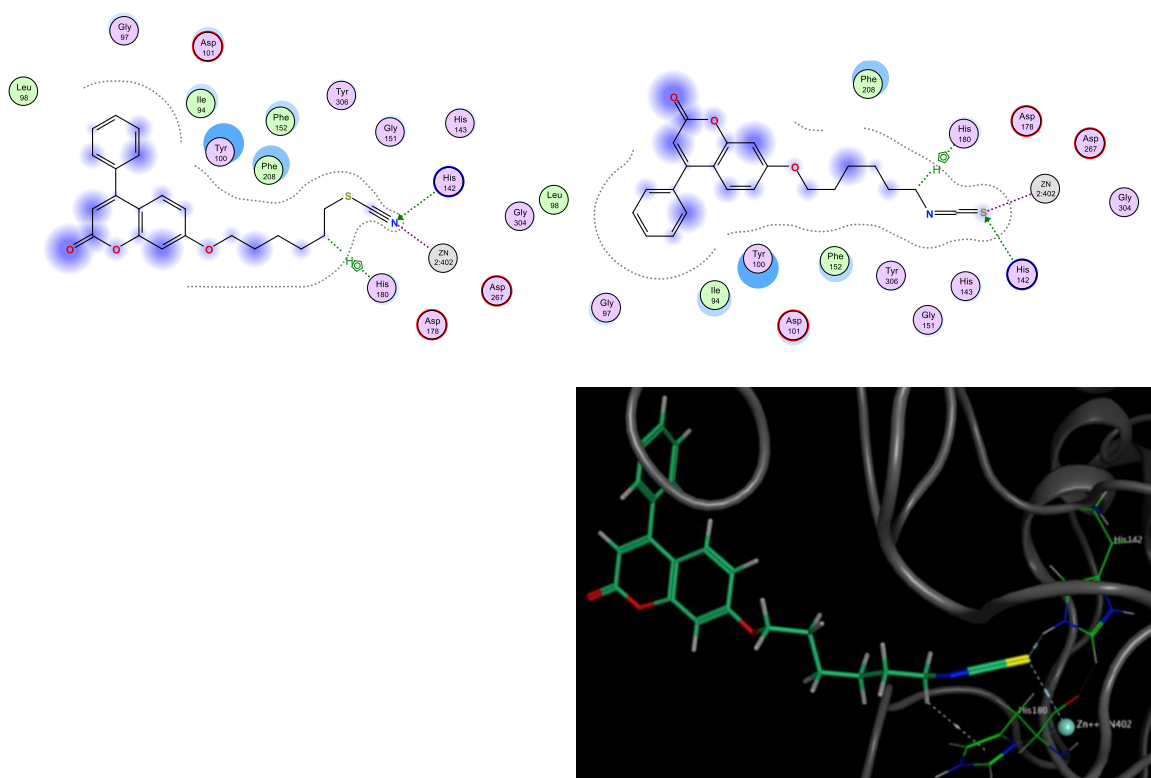


Figura 24. Mapa 2D del compuesto **11** ($\Delta G = -6.7347$ Kcal/mol) y su isómero ($\Delta G = -6.7121$ Kcal/mol); y mapa 3D del isómero en la estructura cristalina de la HDAC8 obtenidos con el programa MOE.

Conclusiones

Se llevó a cabo la obtención, aislamiento y caracterización espectroscópica de los tio y selenocianatos derivados de cumarina **1-14** con excelentes rendimientos. Estos compuestos, que pueden ser considerados como miméticos del fármaco antitumoral SAHA, serán sometidos a pruebas biológicas para evaluar su efecto antiproliferativo y como inhibidores enzimáticos de la histona desacetilasa.

El estudio de acoplamiento molecular y su modelo de farmacóforo, sugieren que los derivados de cumarina podrían ser compuestos prometedores como agentes anticancerígenos. Se identificó a la enzima HDAC8 como posible blanco terapéutico.

El acoplamiento molecular mostró el modo de interacción de los compuestos **1-14** con HDAC8, donde el grupo tio- o selenocianato actuó como grupo quelante, mientras la región espaciadora permitió la inserción del grupo voluminoso (cumarina) al final del canal de acceso al sitio activo.

Se determinó que el espaciador de seis metilenos y las cumarinas con una sustitución voluminosa en el C-3 y/o -4 presentaron menores energías de unión.

CAPÍTULO 2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN *IN SILICO* DE HÍBRIDOS DERIVADOS DE ESTRONA-CUMARINAS COMO POTENTES INHIBIDORES DE AROMATASA Y 17 β -HSD1

Introducción

El cáncer de mama positivo a receptores hormonales (RH+) es la neoplasia maligna más agresiva y frecuente en mujeres, representando la principal causa de mortalidad oncológica.⁶⁰ Los inhibidores de la aromatasa son compuestos que suprimen la biosíntesis de estrógenos a través del bloqueo reversible de esta enzima y se utilizan principalmente como auxiliares en el tratamiento de este padecimiento.⁶¹ Esta enzima pertenece al grupo de la familia citocromo P450, en el tejido mamario cataliza la desmetilación del carbono 19 de la androstenediona, produciendo un estrógeno fenólico de 18 carbonos, la estrona.⁶² Sin embargo, el sulfato de estrona es el estrógeno circulante más abundante en la mujer posmenopáusica y puede ser convertido a estrona a través de la sulfatasa.⁶³ Dado que la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17 β -HSD1), es responsable de la reducción catalítica de estrona a estradiol en ambas rutas y se encuentra sobreexpresada en células de cáncer de mama, se analiza como una potente diana farmacológica.⁶⁴ La inhibición de esta enzima evita la formación de estradiol (E2), hormona que estimula el crecimiento de tumores mamarios y endometriosis a través de la activación del receptor de estrógeno α (RE α).⁶⁵

En la literatura se han descrito inhibidores esteroideos y no esteroideos para estas dianas moleculares. Los inhibidores esteroideos se unen reversiblemente al sitio activo de la enzima, mimetizando el sustrato o el producto, por este motivo, adquieren una mayor especificidad que los no esteroideos, para unirse a las enzimas involucradas en la biosíntesis de estrógenos. Sin embargo, estos compuestos antiestrógenos tienen dos grandes

⁶⁰ DeSantis CE., Ma J., Goding Sauer A., Newman LA. & Jemal A. *CA Cancer J Clin.* **2017**, 67, 439-448.

⁶¹ Brueggemeier RW., Hackett JC. & Díaz-Cruz ES. *Endocr. Rev.* **2005**, 26, 331-345.

⁶² Ghosh D., Griswold J., Erman M. & Pangborn W. *Nature*, **2009**, 457, 219-223.

⁶³ Roberts KD., Rochefort JG., Bleau G. & Chapdelaine A. *Steroids*, **1980**, 35, 179-187.

⁶⁴ Aka J. A., Mazumdar M. & Lin S. X. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, 301, 183-190.

⁶⁵ Aka J. A., Mazumdar M., Chen C. Q., Poirier D. & Lin S. X. *Mol Endocrinol.* **2010**, 24, 832-845.

limitaciones: su perfil mixto de agonista y antagonista, y el desarrollo de resistencia tumoral.^{66,67} Con la hibridación molecular se ha logrado crear fármacos multidiana capaces de modular diferentes dianas simultáneamente. Estas nuevas moléculas presentan una mejor eficacia al reducir estos efectos secundarios y la resistencia que presentan los fármacos originales. Por lo tanto, la investigación de nuevos fármacos anticancerígenos se ha dirigido a la búsqueda de este tipo de moléculas.^{68,69,70}

Con la finalidad de encontrar nuevas moléculas que pudiesen conseguir beneficios en el tratamiento del cáncer de mama (RH+), en este trabajo se han diseñado y sintetizado una serie de nuevos derivados de estrona, con el fin de estudiar sus efectos inhibitorios sobre las enzimas aromatasa y 17 β -HSD1 mediante cribado *in silico*. Estas dos enzimas tienen en común la afinidad por el esqueleto de la estrona, como producto en la aromatasa⁶² y como sustrato en la 17 β -HSD1,⁶⁴ por este motivo se eligió a la estrona como núcleo base. Las moléculas propuestas se diseñaron con base a los siguientes fragmentos farmacofóricos: tres cumarinas como grupo polar y tres cadenas hidrocarbonadas de cuatro, seis y ocho metilenos como enlazadores, partiendo de la estrona como grupo de reconocimiento enzimático.

⁶⁶ Tremblay M. R., Auger S. & Poirier, D. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 505-523.

⁶⁷ Hong, Y. & Chen, S. *Mol Cell Endocrinol.* **2011**, 340, 120-126.

⁶⁸ Ramsay RR., Popovic-Nikolic MR., Nikolic K., Uliassi E. & Bolognesi ML. *Clin Trans Med.* **2018**, 7, 1-14.

⁶⁹ Karthikeyan C., Solomon V. R., Lee H. & Trivedi P. *Biomed Prev Nutr.* **2013**, 3, 325-330.

⁷⁰ Abu Almaaty, A. H.; Elgrahy, N. A.; Fayad, E.; Abu Ali, O. A.; Mahdy, A. R.; Barakat, L. A. & El Behery, M. *Molecules*, **2021**, 26, 4724.

Antecedentes

Cáncer de mama positivo a receptores hormonales (RH+)

El cáncer de mama positivo a receptores hormonales (RH+) es la neoplasia maligna más agresiva y frecuente en mujeres, representando la principal causa de mortalidad oncológica. Aproximadamente, el 70% de los tumores de mama humanos expresan receptores de estrógenos (RE), factores de transcripción que impulsan la oncogénesis en los cánceres de mama RH+. ^{60,71}

La primera reacción involucrada en este proceso bioquímico es la formación de pregnenolona a partir de colesterol por la enzima mitocondrial citocromo P450sc. ⁷² La enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) transforma la pregnenolona a progesterona. ⁷³ Posteriormente, la enzima microsomal citocromo P450c17, enzima con actividad 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa, cataliza la conversión de progesterona, en 17 α -hidroxiprogesterona y a través de la misma enzima es transformada en androstendiona (Figura 25). ⁷⁴

La enzima aromatasa transforma el andrógeno androstendiona en el estrógeno estrona (E1). ⁶² La estrona es sulfatada por sulfotransferasas y actúa como reservorio para la formación de estrógenos activos. En el tejido de cáncer de mama existe una alta concentración de estrógenos, principalmente de estrona sulfatada, la cual, a través de la sulfatasa esteroideal, es hidrolizada a su forma no conjugada. ⁶³ La forma no conjugada de E1 es biológicamente activa y puede ser reducida por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17 β -HSD1) a estradiol (E2, Figura 25). ⁶⁴

⁶⁰ DeSantis CE., Ma J., Goding Sauer A., Newman LA. & Jemal A. *CA Cancer J Clin.* **2017**, 67, 439-448.

⁷¹ Chi, D.; Singhal, H.; Li, L.; Xiao, T.; Liu, W.; Pun, M.; ... & Brown, M. *PNAS.* **2019**, 116, 11437-11443.

⁷² Black, S. M.; Harikrishna, J. A., Szklarz, G. D. & Miller, W. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 7247-7251.

⁷³ Takahashi, M.; Luu-The, V. & Labrie, F. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1990**, 37, 231-236.

⁷⁴ Tee, M. K. & Miller, W. L. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 23903-23913.

⁶² Ghosh D., Griswold J., Erman M. & Pangborn W. *Nature*, **2009**, 457, 219-223.

⁶³ Roberts KD., Rochefort JG., Bleau G. & Chapdelaine A. *Steroids*, **1980**, 35, 179-187.

⁶⁴ Aka J. A., Mazumdar M. & Lin S. X. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, 301, 183-190.

El estradiol estimula la activación de los RE α y β , a través de su dominio de unión al ligando. Esta región se encuentra en el extremo carboxilo-terminal del receptor.⁷⁵ Esta activación promueve cambios conformacionales en el receptor que incluyen dimerización, localización nuclear y activación de la región AF-2 que provoca su interacción con coactivadores transcripcionales. Mientras que el dominio central de unión al ADN, compuesto por dos dedos de zinc, se une a secuencias específicas en el promotor de genes regulados por estrógenos.^{76,77} Los coactivadores modifican la cromatina para facilitar la transcripción y están implicados en la activación de la polimerasa II (Figura 25).⁷⁸

Es por ello, que enzimas como la aromatasa y la 17 β -HSD1, son objeto de estudio en este tipo de padecimiento, ya que representan una etapa limitante en la formación de E2 y la proliferación del tumor.

⁷⁵ Harris, H. A.; Bapat, A. R., Gonder, D. S. & Frail, D. E. *Steroids*, **2002**, 67, 379-384.

⁷⁶ Wang, Z.; Zhang, X.; Shen, P.; Loggie, B. W.; Chang, Y. & Deuel, T. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 336, 1023-1027.

⁷⁷ Peters, G. A. & Khan, S. A. *Mol. Endocrinol.* **1999**, 13, 286-296.

⁷⁸ Kim, M. Y.; Hsiao, S. J. & Kraus, W. L. *EMBO J.* **2001**, 20, 6084-6094.

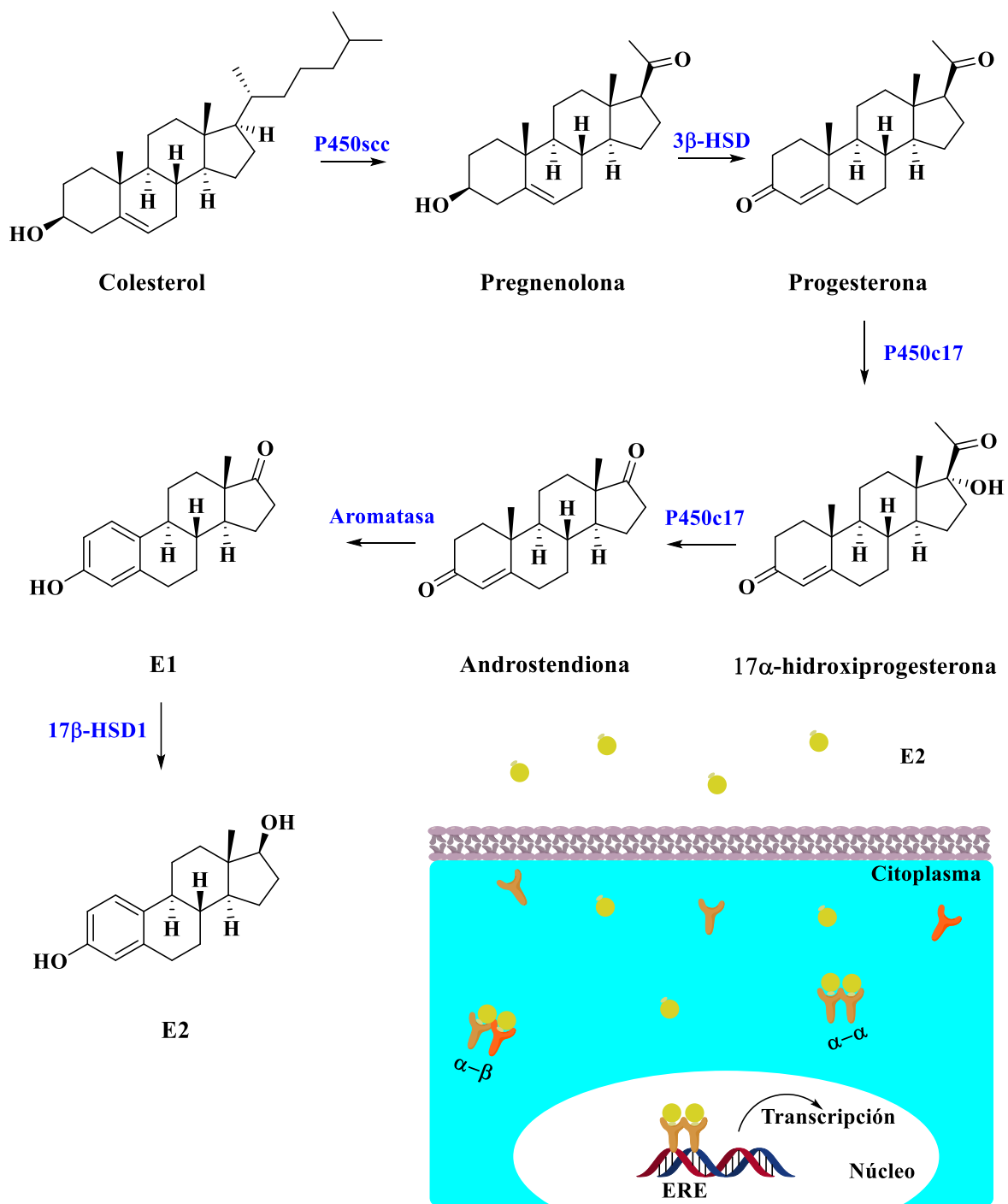


Figura 25. Ruta biosintética de E2 y su mecanismo de acción. Unión ligando-receptor, dimerización (α - α , α - β o β - β), entrada al núcleo y unión del RE a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN.

Inhibidores de aromatasa

La enzima aromatasa es parte de la superfamilia citocromo p450 que presentan un grupo prostético hemo en su sitio activo. Este grupo está formado por una porfirina que contiene en el centro un átomo de hierro. Esta enzima, junto con su compañero redox NADPH-P450 reductasa, catalizan la aromatización del anillo A de los andrógenos para formar el anillo fenólico característico de los estrógenos, con la pérdida del grupo metilo angular del C-19.⁷⁹

Los inhibidores competitivos de la enzima aromatasa (IA) se clasifican en dos categorías con base a su estructura química (Figura 26). Los IA no esteroideos son inhibidores de tipo II, que contienen heteroátomos que se coordinan con el hierro hemo de la aromatasa, algunos ejemplos son aminoglutetimida, anastrozol⁸⁰ y letrozol.⁸¹

Los IA esteroideos o de tipo I, se basan en un núcleo esteroideo, principalmente androstendiona, con la incorporación de varios sustituyentes en diferentes posiciones. Estos compuestos interactúan con el sitio de unión del sustrato y presentan mayor afinidad por la enzima. Los IA esteroideos que se encuentran clínicamente probados son el formestano,⁸² exemestano,⁸³ atamestano⁸⁴ y plomestano.⁸⁵ Son inhibidores irreversibles que inactivan a la enzima. El exemestano a diferencia del formestano, presenta la ventaja de administrarse por vía oral.^{82,83}

⁷⁹ Yoshimoto, F. K. & Guengerich, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 15016-15025.

⁸⁰ Rani, S.; Raheja, K.; Luxami, V. & Paul, K. *Bioorg. Chem.* **2021**, 113, 105017.

⁸¹ Gershanovich, M.; Chaudri, H. A.; Campos, D.; Lurie, H.; Bonaventura, A.; Jeffrey, M.; ... & Letrozole International Trial Group. *Ann. Oncol.* **1998**, 9, 639-645.

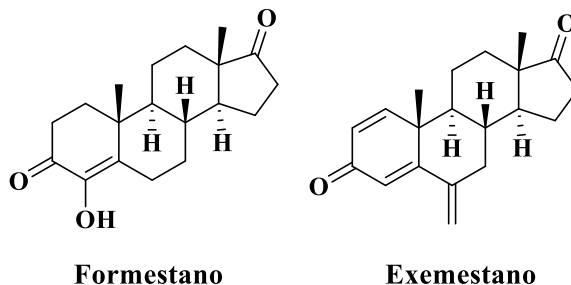
⁸² Geisler, J.; Johannessen, D. C.; Anker, G. & Lønning, P. E. *Eur. J. Cancer*, **1996**, 32, 789-792.

⁸³ Di Salle, E.; Ornati, G.; Giudici, D.; Lassus, M.; Evans, T. R. J. & Coombes, R. C. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1992**, 43, 137-143.

⁸⁴ Goss, P.; Bondarenko, I. N.; Manikhas, G. N.; Pendergrass, K. B.; Miller Jr, W. H.; Langecker, P. & Blanchett, D. *J Clin Oncol.* **2007**, 25, 4961-4966.

⁸⁵ Johnston, J. O; Wright, C. L. & Holbert, G. W. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1995**, 52, 17-34.

Tipo I



Tipo II

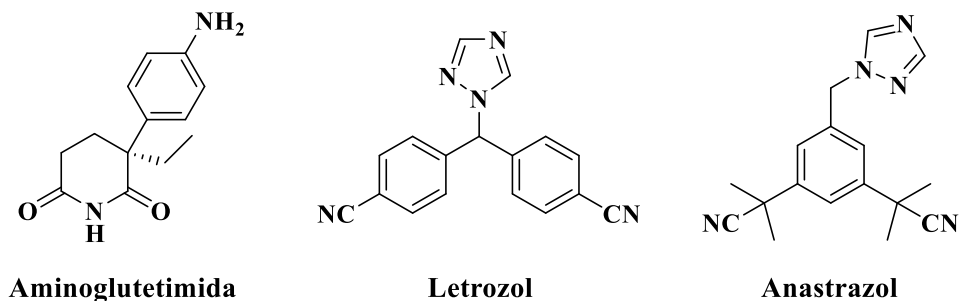


Figura 26. IA esteroideos (tipo I) y no esteroideos (tipo II).

Teniendo en cuenta la importancia de los azoles en los inhibidores de tipo II, Bansal y cols. sintetizaron un grupo de derivados esteroidales con una sustitución en la posición C-16 (Figura 27). Los compuestos fueron probados como inhibidores de aromatasa, donde la presencia de un grupo imidazol le confirió un doble efecto citotóxico (**49** frente a **48**). Los productos **49** y **52** fueron 7 y 13 veces más potentes que aminoglutetimida ($IC_{50} = 28.5 \mu M$), respectivamente. Se menciona que el grupo imidazol posee un átomo de -N estéricamente disponible para interactuar en el sitio activo de la aromatasa y formar un complejo con el hierro hemo.⁸⁶

⁸⁶ Bansal, R.; Guleria, S.; Thota, S.; Hartmann, R. W. & Zimmer, C. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59, 327-331.

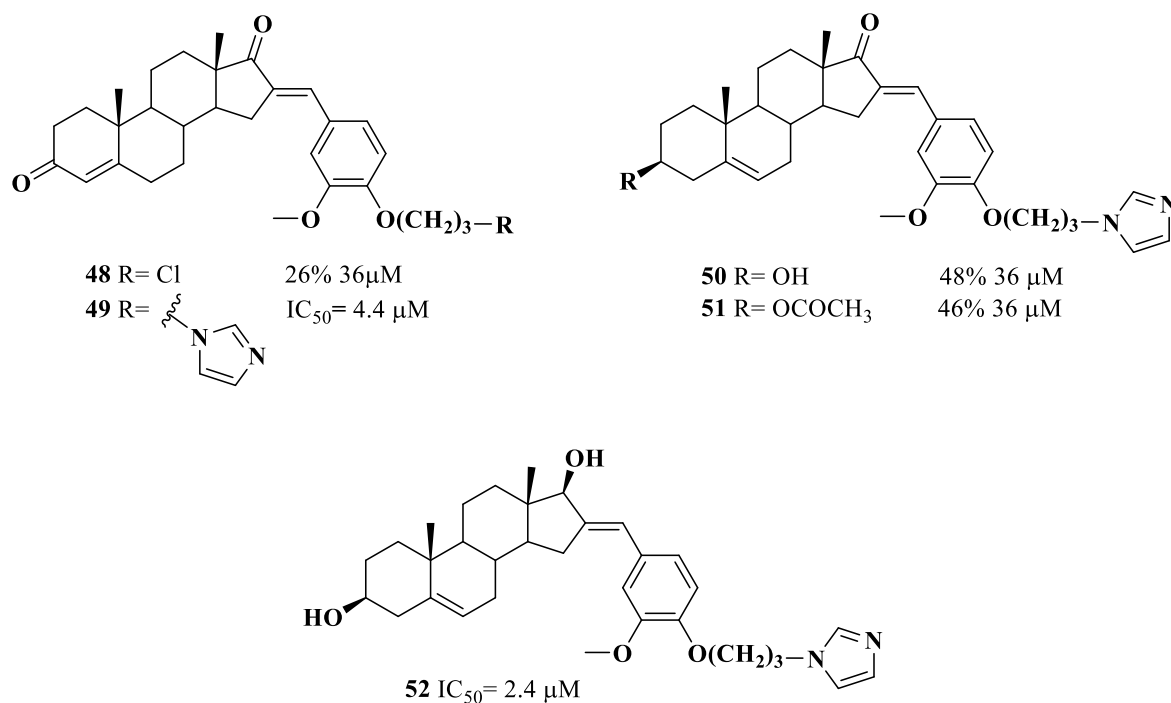


Figura 27. Inhibidores mixtos de aromatasa.

Otras modificaciones observadas en el núcleo esteroidal son sustituciones en el C-6 (Figura 28). Se diseñaron 2-alkiniloxy C-6-sustituidos que inhibieron a la enzima aromatasa con valores IC₅₀ en el rango nM. Destacando los compuestos **53** y **55** con valores de 20 y 11.8 nM, respectivamente, superando los valores de exemestano (IC₅₀= 50.1 nM) y formestano (IC₅₀= 48.6 nM). Es importante mencionar, que se especifica que un alargamiento adicional del grupo lateral, como es el caso de los homólogos **56-58** (de 5 a 9 átomos de carbono), podría dar como resultado choques estéricos en el extremo del canal de acceso a la enzima.⁸⁷

⁸⁷ Ghosh D., Lo J., Morton D., Valette D., Xi J., Griswold J., Hubbell S., Egbuta C., Jiang W., An J. & Davies H. M. **2012.** *J. Med. Chem.* 55, 8464–8476.

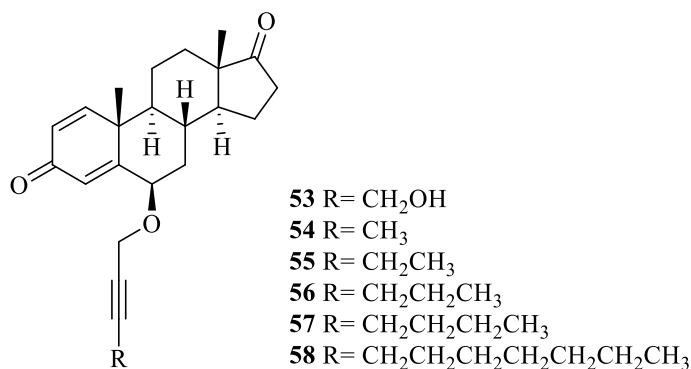


Figura 28. Inhibidores 2-alquinioloxi C-6-sustituidos.

Otro núcleo utilizado para la síntesis de IA es la estrona, la 2-bromoestrone demostró ser un inhibidor eficaz con un valor IC₅₀ de 8.7 μM, mientras que la 2-cloroestrone con un IC₅₀ de 6 μM (K_i = 0.13 μM) mostró una mayor afinidad en comparación a E1 (K_i = 2.50 μM).⁸⁸ De forma contraria a lo reportado anteriormente por Bansal y cols. con los derivados de andrógenos, donde el grupo 17β-hidroxilo otorgó una mayor efectividad al compuesto **52** en comparación con su análogo **50** con un grupo carbonilo en C-17;⁸⁶ en los derivados de estrona se encontró que la actividad inhibitoria fue más alta que los derivados de estradiol. En consecuencia, una función 17-carbonilo juega un papel crucial en la unión de derivados de estrógenos al sitio activo de la enzima aromatasa (Figura 29).⁸⁸

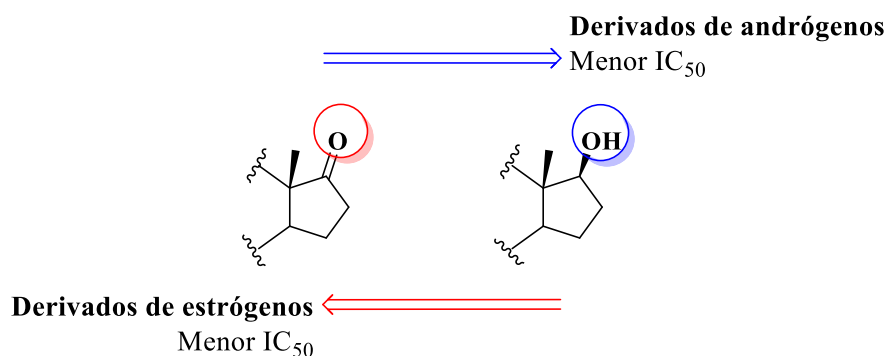


Figura 29. Poder inhibitorio de derivados de andrógenos y estrógenos.

⁸⁸ Bacsá, I.; Herman, B. E.; Jójárt, R.; Herman, K. S.; Wölfling, J.; Schneider, G.; ... & Mernyák, E. *J Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, 33, 1271-1282.

⁸⁶ Bansal, R.; Guleria, S.; Thota, S.; Hartmann, R. W. & Zimmer, C. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59, 327-331.

Pese a que este tipo de inhibición se detalla en el siguiente apartado, se añade que la 2-bromoestrona y la 2-cloroestrona revelaron un IC_{50} de 0.095 μM y de 0.18 μM , respectivamente, en la inhibición de 17β -HSD1.⁸⁸

Inhibidores de 17β -HSD1

Entre las isoformas conocidas de 17β -HSD, el tipo 1 cataliza la reducción mediada por NADPH de E1 a E2, un mitógeno predominante para las células de cáncer de mama.⁸⁹

En la literatura se han reportado 16-(bromoalquil)-estradiolos capaces de inhibir a la enzima 17β -HSD1. Los compuestos mejor evaluados fueron 16α -(bromopropil)-E2 (IC_{50} = 870 nM), 16α -(bromobutil)-E2 (IC_{50} = 970 nM) y 16β -(bromobutil)-E2 (IC_{50} = 2140 nM). Sin embargo, estos compuestos manifestaron un efecto estrogénico al estimular el crecimiento de la línea celular de cáncer de mama humano sensible a estrógenos ZR-75-1.⁶⁶ Para eliminar la actividad estrogénica, Pelletier y Poirier realizaron modificaciones en la cadena lateral, no obstante, esto dio como resultado que se eliminara su actividad inhibitoria en la enzima. A pesar de lo dicho, se dio pie a la síntesis de compuestos híbridos para eliminar la actividad estrogénica de inhibidores esteroideos (Figura 30).⁹⁰

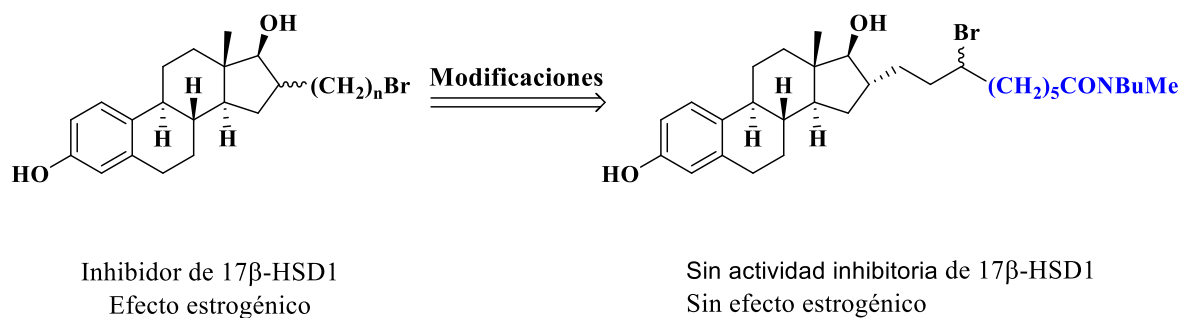


Figura 30. Inhibidores de la enzima 17β -HSD1.

⁸⁸ Bacsa, I.; Herman, B. E.; Jójárt, R.; Herman, K. S.; Wölfling, J.; Schneider, G.; ... & Mernyák, E. *J Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, 33, 1271-1282.

⁸⁹ Abdelsamie, A. S.; Salah, M.; Siebenbürger, L.; Hamed, M. M.; Börger, C.; van Koppen, C. J.; ... & Hartmann, R. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 178, 93-107.

⁶⁶ Tremblay M. R., Auger S. & Poirier, D. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 505-523.

⁹⁰ Pelletier J. D. & Poirier D. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 1617-1628.

Tremblay y cols. plantearon la hipótesis de que las moléculas que contienen componentes hidrofóbicos e hidrofílicos pueden interactuar tanto con el dominio de unión a esteroides como con algunos aminoácidos del dominio de unión al cofactor. Por lo cual, sintetizaron un derivado de 16 β -(3-aminopropil)-E2 a partir de E1 (Figura 31). En el grupo amino de este precursor se acopló un representante de cada clase de aminoácidos, básico (Lys), ácido (Glu), aromático (Phe), alifático (Leu) e hidroxilado (Ser), para generar una serie de 16 β -propilaminoacil derivados de E2. Desafortunadamente, el cribado enzimático reveló que ninguno de los nuevos compuestos inhibió la actividad reductora de la 17 β -HSD1.⁹¹

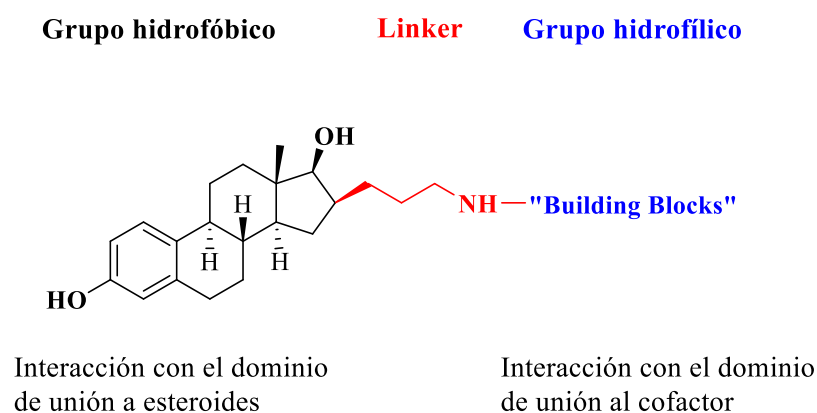


Figura 31. Farmacóforo de un posible inhibidor de 17 β -HSD1.

Cambios en el grupo *linker* y en el grupo hidrofílico dieron como resultado productos más potentes (Figura 32). Estos compuestos híbridos inhibieron la actividad reductora de 17 β -HSD1 con valores de IC₅₀ entre 52 y 1000 nM, especialmente el compuesto con una cadena lateral de ocho metilenos y una orientación 16 β . Su análisis estructural 3D en complejo con 17 β -HSD1 mostró interacciones clave con sitios de unión de sustrato (Tyr155, Ser142 e His221) y cofactor (Gly9, Ser11 y Gly92). La presencia de los dos componentes E2 y adenosina es fundamental, puesto que la existencia de solo uno de ellos no inhibió la enzima.⁹²

⁹¹ Tremblay, M. R.; Lin, S. X. & Poirier, D. *Steroids*, **2001**, 66, 821-831.

⁹² Poirier, D.; Boivin, R. P.; Tremblay, M. R.; Bérubé, M.; Qiu, W. & Lin, S. X. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 8134-8147.

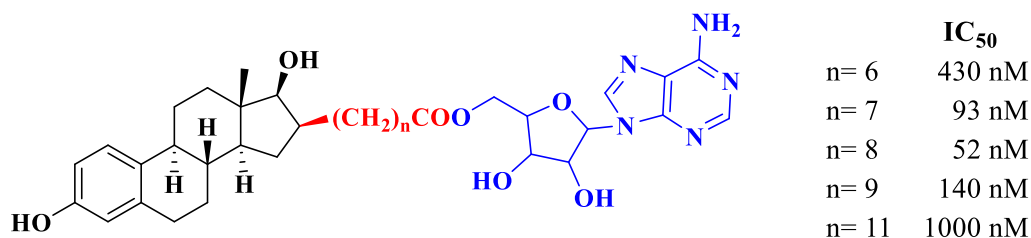


Figura 32. Inhibidores híbridos.

Un estudio más reciente del 2021 (Figura 33), además de incorporar un sustituyente en la posición C-16 del esteroide, posición más estudiada, incorporó una cadena hidrocarbonada en la posición C-3 con el fin de eliminar los efectos estrogénicos en el compuesto inicial. Los compuestos sintetizados obtuvieron mayor probabilidad de unirse al sitio catalítico de la enzima 17 β -HSD1 y valores de IC₅₀ de 0.5 y 0.7 μ M.⁹³

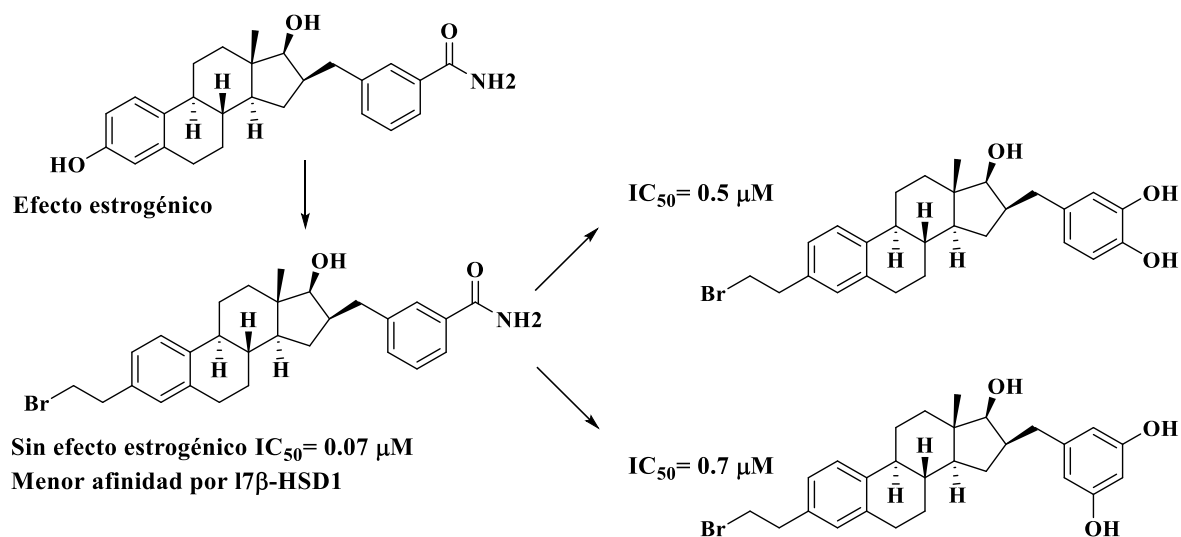


Figura 33. 16 β -derivados de 3-(2-bromoetil)-E2.

Como se ha mencionado anteriormente, la señalización del receptor de estrógenos se puede abordar de manera efectiva bloqueando la biosíntesis de estrógenos con inhibidores de la aromatasa y de la enzima 17 β -HSD1. El problema principal es que varios de ellos presentan efectos estrogénicos. Además, actualmente una minoría significativa de pacientes

⁹³ Lespérance, M.; Roy, J.; Ngueta, A. D.; Maltais, R. & Poirier, D. *Steroids*, **2021**, 172, 108856.

recaen a pesar de la terapia antiestrógeno adyuvante al desarrollar resistencia.⁹⁴ La inhibición dual podría ser de valiosa ayuda, ya que la inhibición de una sola de estas enzimas no resulta eficaz en el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas.⁹⁵

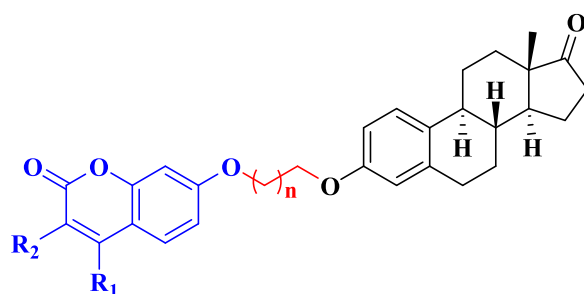
⁹⁴ Fan, P. & Jordan, V. C. *Steroids*, **2014**, 90, 44-52.

⁹⁵ Ragaz, J. J. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2001**, 79, 133-141.

Objetivos

En el presente proyecto se propuso realizar la preparación de híbridos derivados de estrona como potenciales inhibidores duales de la aromatas y de la enzima 17 β -HSD1 en el tratamiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos (Figura 34). Debido a que estas enzimas están involucradas en el paso final de la ruta biosintética de estrógenos, su actividad selectiva no afectará la producción de otros esteroides.

Se planteó el diseño de inhibidores con un núcleo de estrona. Para la eliminación de la posible actividad estrogénica se propuso incorporar diversas cumarinas como grupo hidrofílico y dos tamaños de espaciador o *linker*, haciendo uso de la función fenólica en la posición C-3 de la estrona. Finalmente, a través de su evaluación *in silico* mediante docking molecular, predecir energías y un modelo de unión entre los derivados y las enzimas correspondientes. Adicionalmente, se sugirió una tercera cadena hidrocarbonada o *linker*, para la enzima 17 β -HSD1.



15 R₁ = CH₃, R₂ = Cl n = 3

16 R₁ = CH₃, R₂ = Cl n = 5

17 R₁ = CH₃, R₂ = H n = 3

18 R₁ = CH₃, R₂ = H n = 5

19 R₁ = Ph, R₂ = H n = 3

20 R₁ = Ph, R₂ = H n = 5

62 R₁ = CH₃, R₂ = Cl n = 7

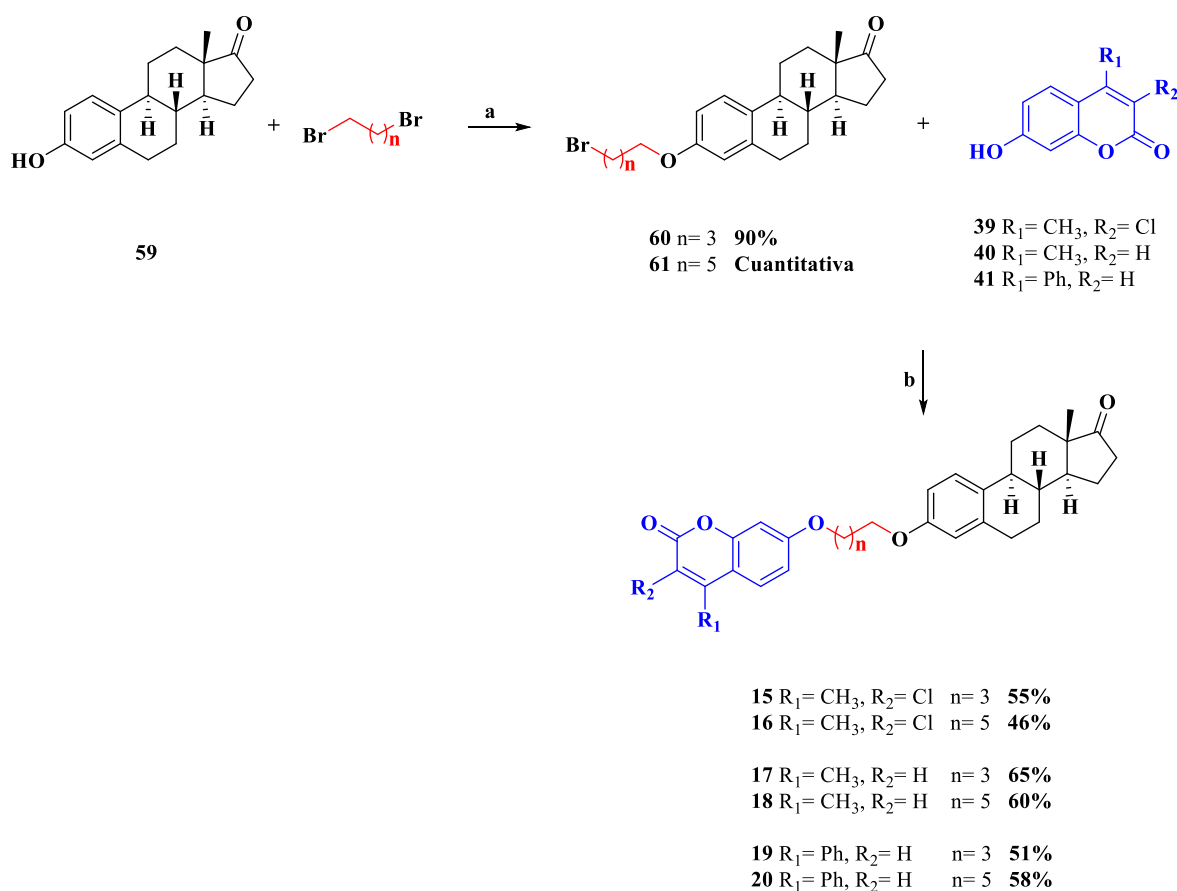
63 R₁ = CH₃, R₂ = H n = 7

64 R₁ = Ph, R₂ = H n = 7

Figura 34. Híbridos derivados de estrona-cumarina.

Discusión de resultados

La síntesis de los híbridos derivados de estrona-cumarina involucró la reacción de Williamson (Esquema 6), usada frecuentemente para preparar un éter a partir de un alcohol.⁹⁶ Esta reacción transcurrió entre el grupo hidroxilo en la posición C-3 de la estrona **59** (en medio básico K_2CO_3) y el correspondiente α,ω -dibromoalcano. Un exceso de 8 equivalentes del haloalcano para favorecer el proceso de monosustitución generó excelentes rendimientos en los compuestos **60** y **61**. Esta modificación permitirá analizar la influencia de la longitud del espaciador en las enzimas aromatasa y 17 β -HSD1.



Esquema 6. Síntesis de híbridos derivados de estrona-cumarina a) K_2CO_3 , MeCN anh., 80 °C, reflujo; b) K_2CO_3 , MeCN anh., 75 °C, reflujo.

⁹⁶ Diamanti, A., Ganase, Z., Grant, E., Armstrong, A., Piccione, P. M., Rea, A. M., ... & Adjiman, C. S. *React. Chem. Eng.* **2021**, 6, 1195-1211.

Posteriormente, el átomo de bromo terminal se sometió a una sustitución nucleofílica empleando diferentes cumarinas **39-41** en medio básico, haciendo uso de su grupo hidroxilo en la posición C-7 para formar el alcóxido correspondiente. La síntesis de cumarinas se detalla en el capítulo I. El tamaño del espaciador en la estrona (**60** y **61**) y el tipo de cumarina utilizada, influyeron en el tiempo de reacción y en los rendimientos obtenidos. Con respecto a lo primero, existió una hora de diferencia en el tiempo de reacción entre los compuestos con cadena de seis metilenos **16** (10 h), **18** (8 h) y **20** (10h), y los compuestos con una cadena de cuatro metilenos **15** (9 h), **17** (7 h) y **19** (9 h). Los compuestos **17** y **18** con la cumarina menos impedida en la posición C-3 y -4 presentaron el menor tiempo de reacción y los mejores rendimientos (65 y 60%, respectivamente).

A pesar de que las cumarinas utilizadas y los productos obtenidos presentan diferente polaridad, el peso molecular de los productos afectaba su purificación en columna, obteniendo un Rf muy parecido a la cumarina. Debido a que no se logró aislar los derivados sintetizados del crudo de reacción, se realizó un tratamiento con KOH 5N hasta alcanzar un pH entre 9 y 10. Esto permitió generar la base conjugada (ion fenóxido) y eliminarse en la fase acuosa después de su extracción. El uso de bicarbonato de sodio y trietilamina no permitieron eliminar los restos de cumarina. Posteriormente, los productos de sustitución **15-20** se aislaron con rendimientos moderados tras purificación cromatográfica (Esquema 6).

En la figura 35 como ejemplo representativo de los derivados de estrona-cumarina, aparece el espectro del producto **18**. Como señales características del cuerpo esteroidal, en el espectro de ^1H -RMN a 0.91 ppm una señal simple para los protones 18-H, en 2.89 ppm una señal múltiple para los protones 6-H; y en 6.65 (d), 6.72 (dd) y 7.19 (d) ppm las señales para los protones aromáticos 4-H, 2-H y 1-H, respectivamente.

Las señales características para el cuerpo de cumarina se localizan a 2.39 ppm una señal simple para los protones del grupo metilo, otra señal simple en 6.13 ppm para el protón 3-H; y en 6.80 (d), 6.85 (dd) y 7.48 (d) ppm las señales para los protones aromáticos 8-H, 6-H, 5-H, respectivamente.

Las señales importantes que indican la unión del grupo cumarina y estrona a través de la cadena hidrocarbonada se encuentran como señales triples en 3.95 y 4.02 ppm, ambas

señales integran para dos protones correspondientes a los grupos metileno enlazados a un átomo de oxígeno. Estos metilenos presentan señales en 67.8 y 68.6 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN. Para el cuerpo de cumarina en 112.0 ppm la señal para el C-3 y en 101.5, 112.8 y 125.6 ppm para los C-8, -6 y -5. En el cuerpo de la estrona en 114.7, 112.2 y 126.4 ppm las señales para los C-4, -2 y -1. En 14.0 ppm la señal para el C-18 y en 221.1 ppm la señal para el C-17.

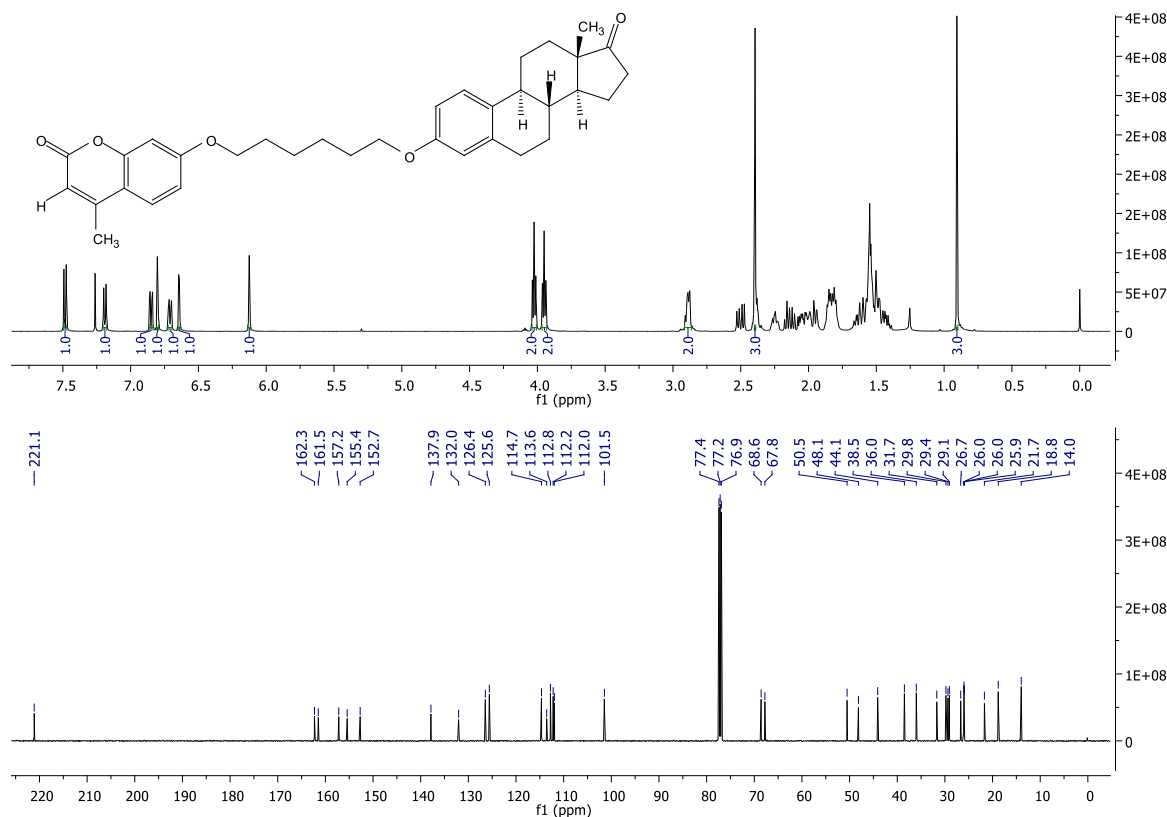


Figura 35. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C -RMN (125.77 MHz, CDCl_3) del producto **18**.

Docking molecular

Aromatasa (CYP19A1)

En la validación del modelo con la enzima aromatasa, se obtuvo un valor de RMSD de 0.2912 ± 0.018 Å. En la figura 36 se observa la pose con menor RMSD y una energía de unión de -8.3711 Kcal/mol. La molécula de testosterona (TST, ligando cristalográfico) se encuentra rodeada por grandes cadenas laterales hidrofóbicas Trp224, Phe221, Phe134, Ile133, Val370 y Met374 que moldean la hendidura del sitio activo. Además, se une con su oxígeno 17β-hidroxilo y recibe un enlace de hidrógeno de la amida del esqueleto -NH de Met374. El aminoácido Met374 es de naturaleza grasa y actúa como donante de la columna vertebral. Estas interacciones, explican la base molecular de la especificidad androgénica de la aromatasa.^{97,98,99}

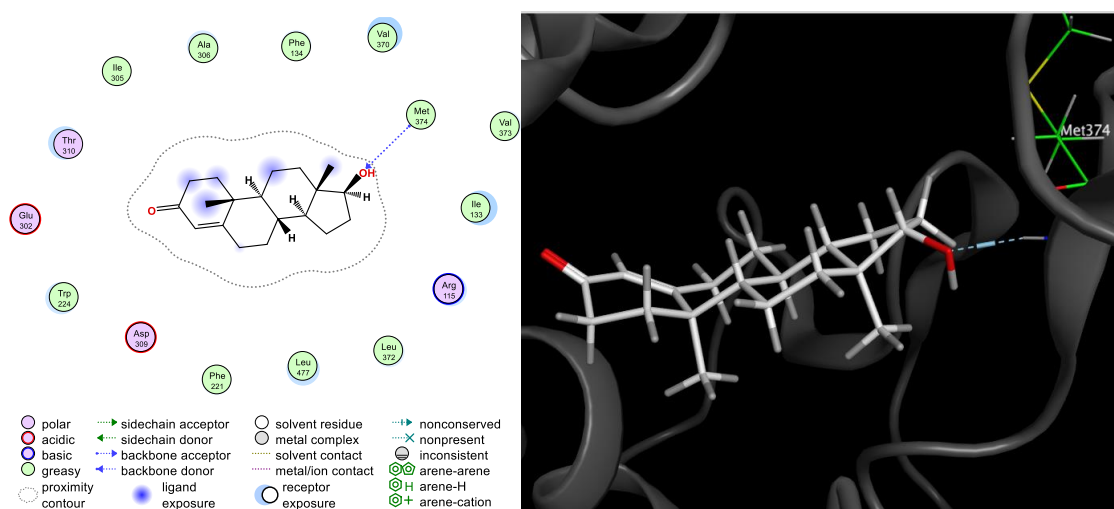


Figura 36. Representación 2D y 3D de la TST en el bolsillo de unión de la enzima aromatasa (5JKW).

⁹⁷ Ghosh D., Egbuta C. & Lo J. **2018**. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 181, 11-19.

⁹⁸ Bhuvaneswari K., Sivaguru P. & Lalitha A. **2020**. *J Chin Chem Soc.* 67, 1877-1886.

⁹⁹ Li, J., Tang, Y., Li, W., & Tu, Y. **2020**. *Chem. Eur. J.* 26, 6214-6223.

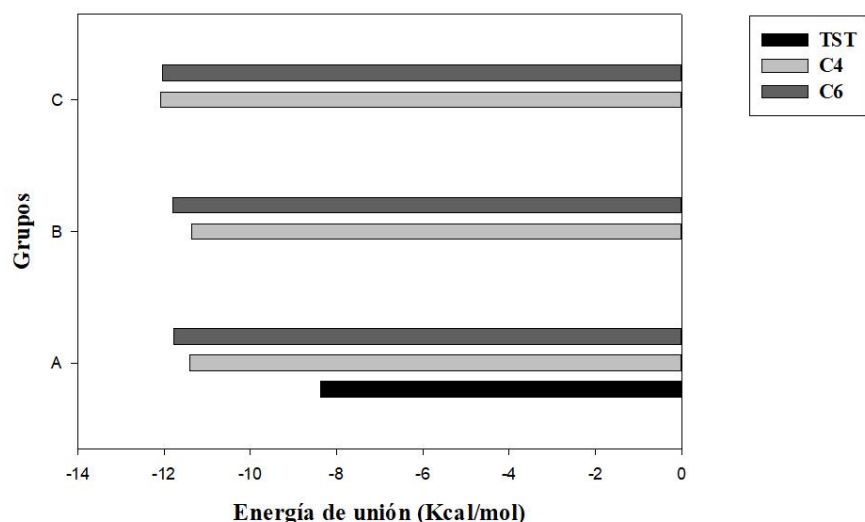


Figura 38. Efecto de la longitud de la cadena en los valores de energía de unión. Grupo A: compuestos **15** y **16** ($R_1=CH_3$, $R_2=Cl$); grupo B: compuestos **17** y **18** ($R_1=CH_3$, $R_2=H$); grupo C: compuestos **19** y **20** ($R_1=Ph$, $R_2=H$).

Además, cerca del sitio de unión de la aromatasasa hay un sitio proximal que alberga un andamio lo suficientemente grande como para acomodar un compañero de interacción y/o una molécula no esteroidea, a diferencia de la mayoría de los citocromos P450, y esa interacción a través de la cavidad proximal también podría influir en la actividad enzimática de la aromatasasa.⁹⁷ De esta forma, la porción cumarina de los compuestos propuestos mostró interacciones que involucran anillos aromáticos, estas interacciones son fundamentales para el reconocimiento proteína-ligando.¹⁰⁰ Los compuestos (**19**, **20**) sustituidos con un anillo de benceno en C-4 de la porción cumarina (Figura 39), mostraron interacciones de tipo areno-H, la nube π rica en electrones interactúa con un átomo de hidrógeno (δ^+) de los aminoácidos Val369 y Val370 en el compuesto **19** (-NH) y con Ala438 en el compuesto **20** (-CH₃). Estas interacciones adicionales podrían estar relacionadas con los valores de puntaje obtenidos por los diferentes ligandos (Figura 38), y por tanto, con su probable afinidad por la aromatasasa.

⁹⁷ Ghosh D., Egbuta C. & Lo J. **2018**. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 181, 11-19.

¹⁰⁰ Hayakawa D., Sawada N., Watanabe Y. & Gouda H. **2020**. *J Mol Graph Model.* 96, 107515.

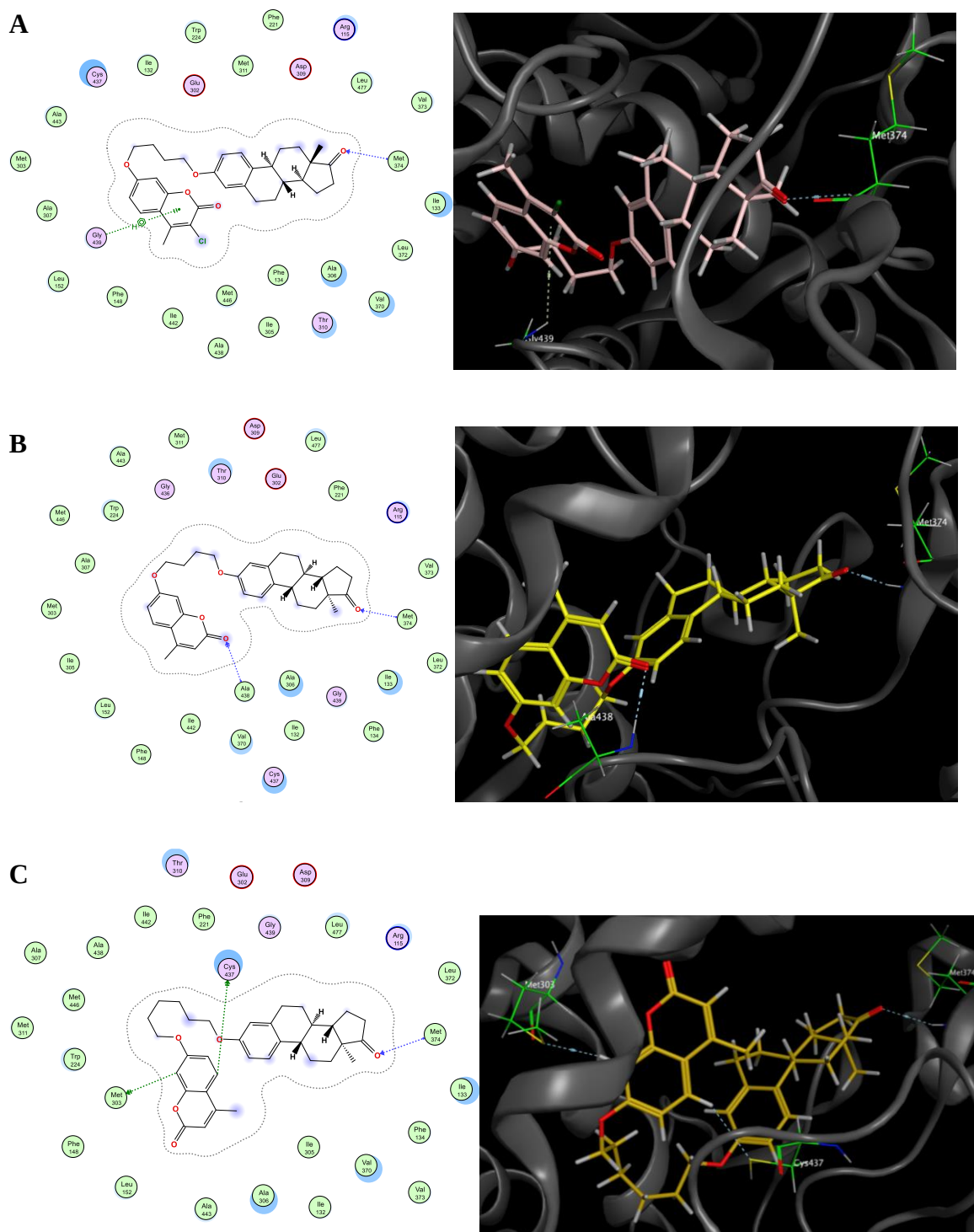


Figura 40. Mapa 2D y 3D de los compuestos **15** (A, $\Delta G = -11.3929$ kcal/mol), **17** (B, $\Delta G = -11.3581$ kcal/mol) y **18** (C, $\Delta G = -11.7957$ kcal/mol) en la estructura cristalina de la aromatasa obtenidos con el programa MOE.

17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17 β -HSD1)

En la validación de la enzima 17 β -HSD1 se obtuvo un valor de RMSD de 0.2067 ± 0.0228 Å. En la figura 41 se observa la pose con menor RMSD y una energía de unión de -7.2788 Kcal/mol. En esta imagen, el estradiol (E2, ligando cristalográfico) se localiza cerca de la tríada catalítica (Ser142, Tyr155 y Lys195), su oxígeno 17 β -hidroxilo recibe un enlace de hidrógeno del grupo -OH de Tyr155.

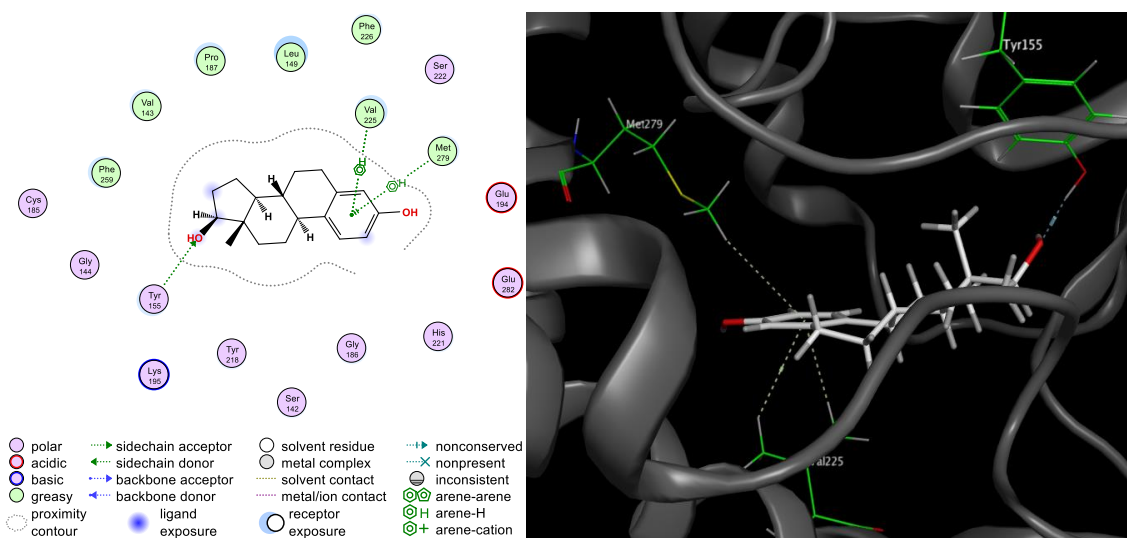


Figura 41. Representación 2D y 3D del estradiol en el bolsillo de unión de la enzima 17 β -HSD1 (1FDT).

El bolsillo lipofílico de la 17 β -HSD1 está formado por Gly92, Leu93, Gly94, Ala291, Phe192 y Val196, el cual se encuentra conectado a una zona hidrofílica compuesta por Ser142, Tyr155, Glu194 y Lys195. En esta zona hidrofílica, que es crucial para la reacción catalítica del estradiol,^{101,102} los nueve compuestos **15-20**, **62-64** presentaron interacciones de tipo areno-H con Tyr155 (Figura 42-44) y algunos de ellos con los residuos hidrofóbicos Pro187 y Phe259 en el sitio de unión al sustrato.

¹⁰¹ Breton R., Housset D., Mazza C. & Fontecilla-Camps JC. **1996**. Structure, 4, 905-915.

¹⁰² Hernández-López H., Leyva-Ramos S., Azael Gomez-Duran CF, Pedraza-Alvarez A., Rodríguez-Gutiérrez IR, Leyva-Peralta MA. & Razo-Hernández, RS. **2020**. ACS Omega, 5, 14061-14068.

En particular, los compuestos presentan cadenas laterales de longitud variable en el anillo A de la porción esteroidal, por lo que presentan una orientación inversa en el sitio activo, con su anillo A mirando hacia el sitio catalítico (Tyr155), mientras que su anillo D mira hacia el extremo de reconocimiento del sitio de unión. La orientación inversa actúa como un inhibidor, formando un complejo sin salida que la enzima no puede catalizar. Este tipo de inhibición, también descrita en otras enzimas, se ha vinculado a altas concentraciones de sustrato.^{103,104,105,106,107}

Por otra parte, el acoplamiento molecular reveló que los compuestos con cadena de 6 y 8 metilenos (compuestos **18**, **20**, **62-64**) obtuvieron los mejores puntajes. De acuerdo con estos resultados y estructuras reportadas como inhibidores de 17 β -HSD1, se realizó un estudio adicional con compuestos con una cadena lateral de ocho metilenos (Figura 44). Estos compuestos híbridos, como se denominan en la bibliografía, poseen una porción esteroidal que interactúa con el sitio de unión del sustrato, un grupo polar que interactúa con el sitio de unión del cofactor y una cadena lateral de metilenos que se utiliza como enlazador. Se ha reportado que los compuestos más efectivos o que permiten la interacción de estos dos grupos en cada región, son aquellos que presentan enlazadores entre 6 y 8 metilenos,^{91,92} y en compuestos con grupos polares más pequeños (1 anillo aromático) hasta 13 metilenos, por lo que el tamaño del enlazador suele variar según el grupo polar incorporado.^{108,109}

¹⁰³ Li T., Stephen P., Zhu D. W., Shi R. & Lin S. X. **2019**. *FEBS J.* 286, 2155-2166.

¹⁰⁴ Chen C., Joo J. C., Brown G., Stolnikova E., Halavaty A. S., Savchenko A., Anderson WF. & Yakunin A. F. **2014**. *Appl Environ Microbiol.* 80, 3992-4002.

¹⁰⁵ Efimov I., Basran J., Sun X., Chauhan N., Chapman SK., Mowat CG. & Raven EL. **2012**. *J Am Chem Soc.* 134, 3034-3041.

¹⁰⁶ Mazumdar M., Fournier D., Zhu D. W., Cadot C., Poirier D. & Lin, S. X. **2009**. *Biochem. J.* 424, 357-366.

¹⁰⁷ Ghosh D. & Vihko P. **2001**. *Chem. Biol. Interact.* 130, 637-650.

⁹¹ Tremblay, M. R.; Lin, S. X. & Poirier, D. *Steroids*, **2001**, 66, 821-831.

⁹² Poirier, D.; Boivin, R. P.; Tremblay, M. R.; Bérubé, M.; Qiu, W. & Lin, S. X. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 8134-8147.

¹⁰⁸ Qiu W., Campbell R. L., Gangloff A., Dupuis P., Boivin R. P., Tremblay M. R., Poirier D. & Lin, S. X. **2002**. *FASEB J.* 16, 1829-1831.

¹⁰⁹ Salah M., Abdelsamie A. S. & Frotscher M. **2019**. *Mol. Cell. Endocrinol.* 489, 66-81.

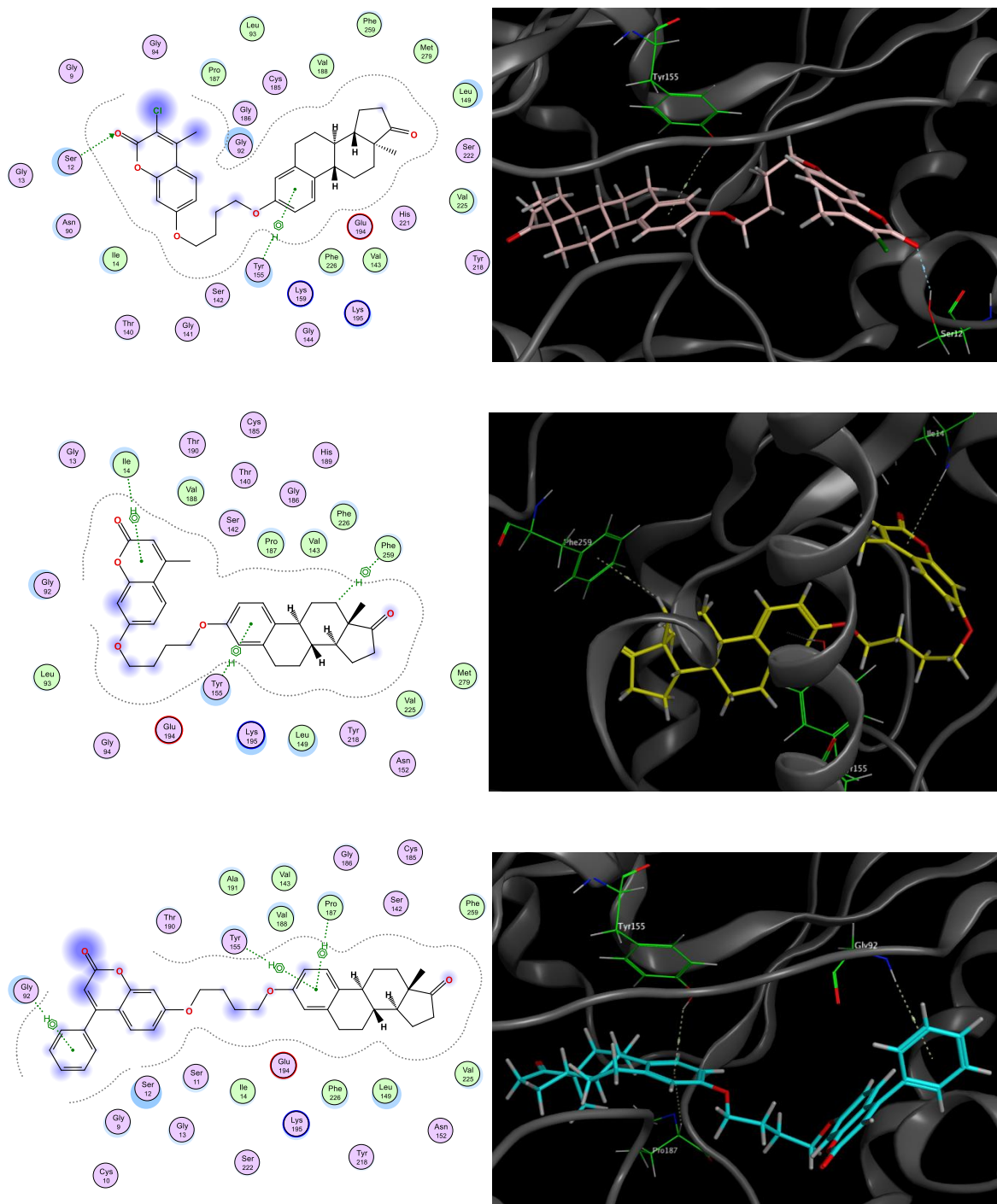


Figura 42. Mapa 2D y 3D de los compuestos **15** (A, -8.9003 kcal/mol), **17** (B, -8.6647 kcal/mol) y **19** (C, -8.9050 kcal/mol) en la estructura cristalina de la 17β-HSD1 obtenidos con el programa MOE.

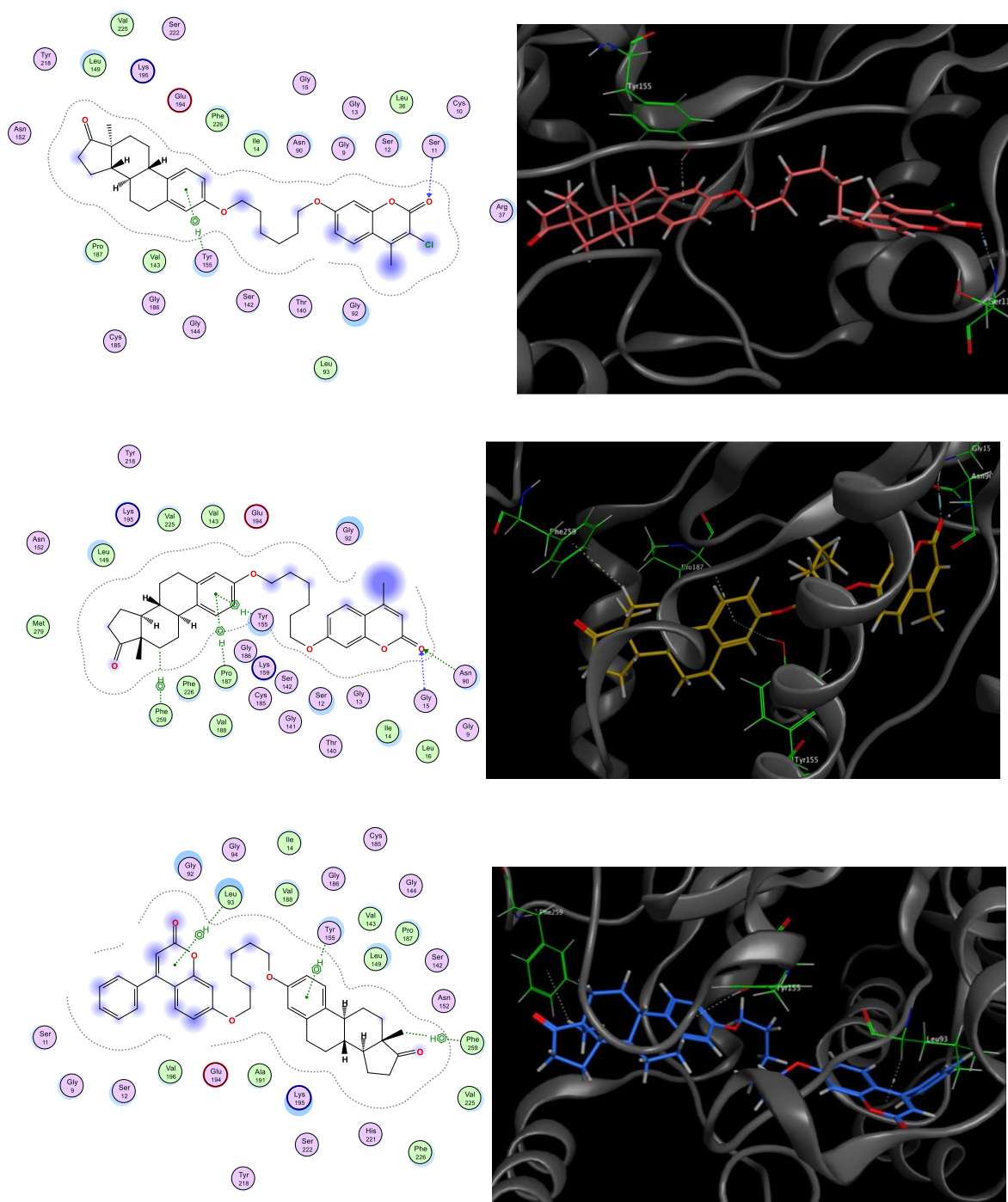


Figura 43. Mapa 2D y 3D de los compuestos **16** (A, $\Delta G = -8.8891$ kcal/mol), **18** (B, $\Delta G = -9.3532$ kcal/mol) y **20** (C, $\Delta G = -9.5301$ kcal/mol) en la estructura cristalina de la 17 β -HSD1 obtenidos con el programa MOE.

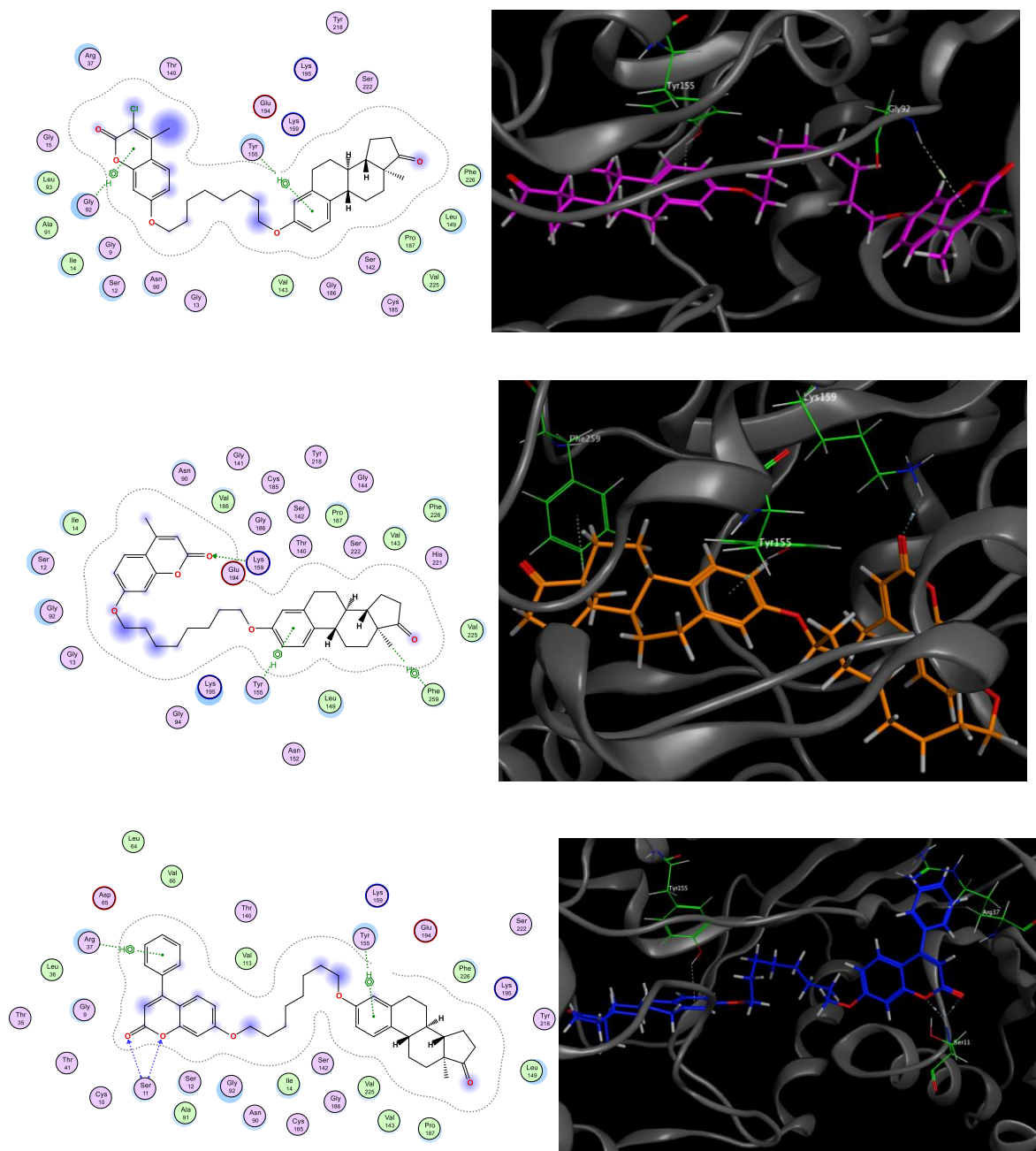


Figura 44. Mapa 2D y 3D de los compuestos **62** (A, $\Delta G = -10.2370$ kcal/mol), **63** (C, $\Delta G = -9.3219$ kcal/mol) y **64** (B, $\Delta G = -11.3970$ kcal/mol) en la estructura cristalina de la 17 β -HSD1 obtenidos con el programa MOE.

17 β -HSD1 usa NADPH como cofactor para catalizar la conversión de E1 a E2. En el sitio de unión del cofactor, la fracción NADP⁺ está rodeada por aminoácidos como Gly9, Cys10, Ser11, Ser12, Ile14, Gly15, Arg37, Asn90, Gly92 y Lys159, formando importantes interacciones de enlaces de hidrógeno con algunos de estos aminoácidos (Figura 45).¹⁰¹

Las cadenas laterales y la porción cumarina de los ligandos propuestos se ubicaron en esta región de la enzima, en los compuestos **15**, **16**, **18**, **63** y **64**, los oxígenos del grupo lactona actúan como aceptores de enlaces de hidrógeno de residuos como Ser11, Ser12, Gly15, Asn90 y Lys159. También destacaron las interacciones de tipo areno-H en los compuestos **17**, **20** y **62**, la nube π rica en electrones de la lactona insaturada interactúa con un átomo de hidrógeno (δ^+) de los aminoácidos Ile14, Leu93 y Gly92, respectivamente. Los compuestos **19** y **64** con un grupo -Ph en la posición C-4 de la cumarina muestran una interacción de tipo areno-H con Gly92 y Arg37, respectivamente.

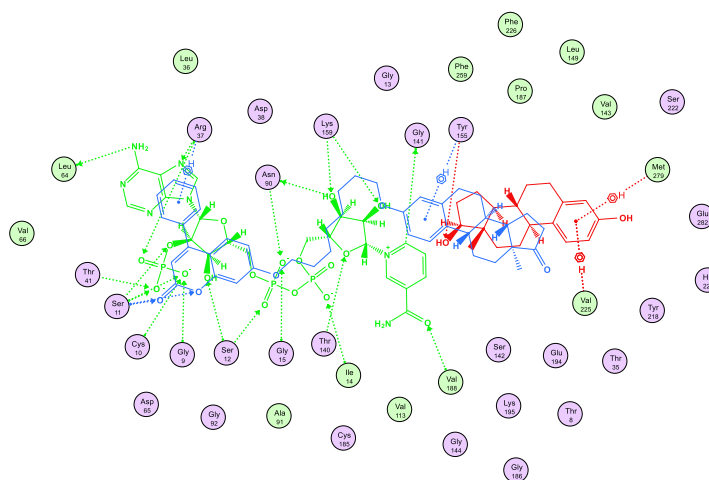


Figura 45. Imagen representativa de la superposición del ligando cristalográfico (E2, rojo), NADP⁺ (verde) y la mejor pose reportada por MOE en el compuesto **64** (azul).

Se usaron cadenas laterales de longitud variable para un estudio más sistemático de la relación estructura/energía de unión en este grupo de potenciales inhibidores. Aunque todos los miembros obtuvieron buenos puntajes en comparación con E2, a medida que la cadena de metilenos aumentó de 4 a 8, se obtuvo una menor energía de unión, destacando los compuestos **62** y **64** con un puntaje de -10.2370 kcal/mol y -11.3970 kcal/mol, respectivamente (Figura 46).

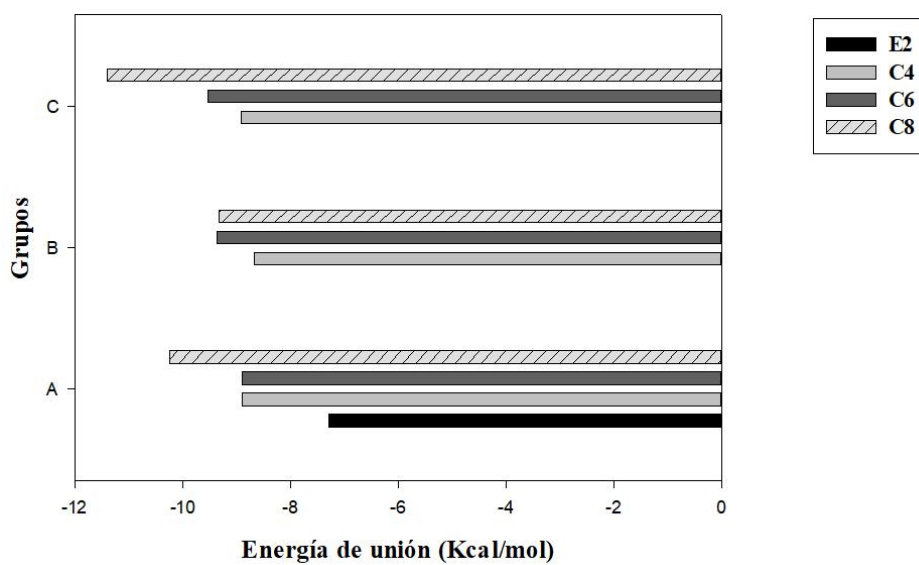


Figura 46. Efecto de la longitud de la cadena en los valores de energía de unión. Grupo A: ligandos **15**, **16** y **62** ($R_1=CH_3$, $R_2=Cl$); grupo B: ligandos **17**, **18** y **63** ($R_1=CH_3$, $R_2=H$); Grupo C: ligandos **19**, **20** y **64** ($R_1=Ph$, $R_2=H$).

Conclusiones

Se llevó a cabo la obtención, aislamiento y caracterización espectroscópica de los derivados estrona-cumarina **15-20** con rendimientos moderados. Estos compuestos serán sometidos a pruebas biológicas para evaluar su efecto antiproliferativo y como inhibidores enzimáticos de las enzimas aromatasa y 17 β -HSD1.

El análisis *in silico* mostró buenos puntajes en los compuestos propuestos, donde la porción esteroidal presentó interacciones importantes con Met374 y Tyr155 en el sitio catalítico de la aromatasa y 17 β -HSD1, respectivamente. Destacando los compuestos **19**, **20** y **64** con un anillo aromático en la posición C-4 de la fracción cumarina, este grupo favoreció las interacciones tipo areno-H esenciales para el reconocimiento proteína-ligando.

En la enzima 17 β -HSD1 se observó cómo influye la longitud de la cadena hidrocarbonada, siendo el compuesto **64** con una cadena de ocho metilenos, el que presentó mejor puntuación. Este enlazador permite que la porción esteroidal se ubique en el sitio de unión del sustrato, mientras que la porción de cumarina interactúa con el sitio de unión del cofactor con los aminoácidos Arg37 y Ser11.

Con este análisis se encontró un excelente punto de partida para la síntesis de moléculas prometedoras para la inhibición de estas dos enzimas relacionadas con el cáncer de mama (RH+). El acoplamiento molecular ayudó a predecir la orientación de unión de los fármacos candidatos a sus proteínas diana y a predecir la afinidad de las moléculas.

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos generales

Con fines cualitativos se utilizó la técnica de **cromatografía en capa fina (C.C.F.)**, en la cual se emplearon placas cromatográficas de gel de sílice sobre aluminio (E. Merck Sílica gel 60 F₂₅₄) con un espesor de 0.25 mm. La visualización de los compuestos se llevó a cabo mediante exposición a luz UV ($\lambda = 254$ nm) e inmersión en el revelador de vainillina (10% en EtOH con H₂SO₄ al 1%), seguido de calentamiento.

La cromatografía en columna fue realizada empleando gel de sílice (E. Merck Sílica gel 60, tamaño de partícula 40-63 μ m) y utilizando la fase móvil mencionada en cada apartado. La elución se efectuó por gravedad y con una pequeña presión ejercida por una bomba de aire.

Los puntos de fusión no fueron corregidos y se midieron en un aparato analógico *Electrothermal-Mel-Temp*[®] 200 watts.

Los espectros de RMN fueron obtenidos con un equipo Bruker Avance-500 (500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C). Como disolventes deuterados se han empleado CDCl₃ y (CD₃)₂SO, usando las señales del disolvente como referencias internas.¹¹⁰ Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm, y las constantes de acoplamiento (*J*), en Hz.

La asignación de las señales se ha realizado con experimentos monodimensionales (¹H y ¹³C), como bidimensionales: COSY (¹H¹H, Correlated Spectroscopy) y HSQC (¹H¹³C, Heteronuclear Single-Quantum Correlation). Las abreviaturas y combinaciones de ellas empleadas en la descripción de la multiplicidad de las señales son: s (simple), d (doble), t (triple), c (cuádruple), q (quíntuple), m (múltiple), a (señal ancha).

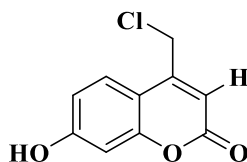
¹¹⁰ Fulmer, G.R.; Miller, A.J.M.; Sherden, N.H.; Gottlieb, H.E.; Nudelman, A.; Stoltz, B.M.; Bercaw, J.E. & Goldberg, K.I. *Organometallics*, **2010**, 29, 2176–2179.

Materias primas

Metodología general para la preparación de hidroxicumarinas 38-41

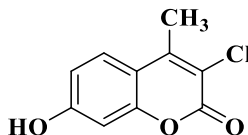
Una mezcla de H₂SO₄ al 60% y resorcinol (1.0 equiv.) se mantuvo en agitación a 0 °C durante 5 min. Posteriormente, se adicionó 1.0 equiv. del β-cetoéster correspondiente. Transcurrida la adición, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 h. Después de este tiempo, el crudo de reacción se vertió en un vaso de precipitado con una mezcla de agua/hielo, el precipitado se filtró y se secó a presión reducida. Durante el secado al vacío se utilizó metanol como codisolvente para eliminar los restos de agua. El residuo se purificó por cromatografía en columna con un sistema hexano-AcOEt (9:1→7:3).

4-(clorometil)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona 38



Se empleó 1 g (9.08 mmol) de resorcinol **33**, 1.49 g (1.23 mL, 9.08 mmol) de 4-cloroacetoacetato de etilo **34** y 23 mL H₂SO₄ al 60%. Se obtuvo **38** como un sólido blanco (1.11 g, 58%). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹¹

3-cloro-7-hidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona 39

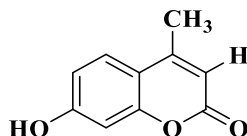


Se empleó 0.5 g (4.54 mmol) de resorcinol **33**, 0.75 g (0.63 mL, 4.54 mmol) de 2-cloroacetoacetato de etilo **35** y 15 mL H₂SO₄ al 60%. Se obtuvo **39** como un sólido blanco (0.56 g, 58%). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹²

¹¹¹ Jawalekar, A. M.; Meeuwenoord, N.; Cremers, J. S. G.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Rutjes, F. P. & van Delft, F. L. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 287-290.

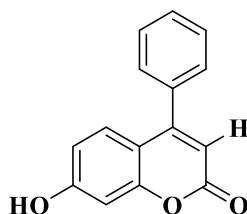
¹¹² Rodriguez-Dominguez, J. C. & Kirsch, G. *Synthesis*, **2006**, 11, 1895-1897.

7-hidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona **40**



Se empleó 1 g (9.08 mmol) de resorcinol **33**, 1.77 g (1.72 mL, 13.62 mmol, 1.5 equiv.) de acetoacetato de etilo **36** y 23 mL H₂SO₄ al 60%. Se obtuvo **40** como un sólido beige (cuantitativa). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹³

7-hidroxi-4-fenil-2H-cromen-2-ona **41**



Se empleó 1 g (9.08 mmol) de resorcinol **33**, 1.74 g (1.57 mL, 9.08 mmol) de acetato de etil benzoilo **37** y 23 mL H₂SO₄ al 60%. Se obtuvo **41** como un sólido blanco (1.41 g, 65%). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹⁴

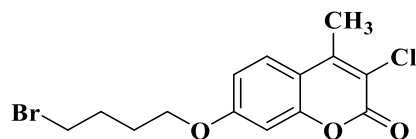
*Metodología general para la preparación de cumarinas O-alquiladas **42-47***

A una disolución de cumarina (1.0 equiv.) en MeCN anhidro, se agregó K₂CO₃ anhidro (1.5 equiv.) y el correspondiente α,ω -dibromoalcano (8.0 equiv.), la reacción se mantuvo bajo Ar a 65 °C durante 4 o 5 h. Posteriormente, se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna, el exceso de α,ω -dibromoalcano se recuperó en hexano para su reutilización y el producto eluyó en un sistema hexano-AcOEt, 8:2.

¹¹³ Shen, Q.; Peng, Q.; Shao, J.; Liu, X.; Huang, Z.; Pu, X.; ... & Gu, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, 40, 1307-1315.

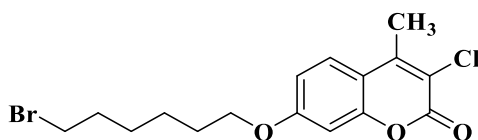
¹¹⁴ Timonen, J. M.; Nieminen, R. M.; Sareila, O.; Goulas, A.; Moilanen, L. J.; Haukka, M.; ... & Aulaskari, P. H. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3845-3850.

7-(4'-Bromobutoxi)-3-cloro-4-metil-2H-cromen-2-ona **42**



Se empleó 0.5 g (2.37 mmol) de cumarina **39**, 0.49 g (3.56 mmol) de K_2CO_3 , 4.1 g (2.28 mL, 18.99 mmol) de 1,4-dibromobutano y 15 mL de MeCN. Después de 4 h de reacción se obtuvo **42** como un sólido blanco (0.62 g, 76%). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹⁵ RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.97-2.03 (m, 2H), 2.06-2.12 (m, 2H), 2.56 (s, 3H, -CH₃), 3.50 (t, 2H, J = 6.4 Hz, 4'-H), 4.07 (t, 2H, J = 5.9 Hz, 1'-H), 6.81 (d, 1H, J = 2.4 Hz, 8-H), 6.89 (dd, 1H, J = 2.4, 8.9 Hz, 6-H), 7.53 (d, 1H, J = 8.9 Hz, 5-H); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 16.3, 27.8, 29.4, 33.3, 67.7, 101.4, 113.4, 113.5, 118.0, 126.0, 148.1, 153.2, 157.6, 161.9.

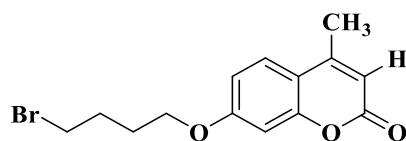
7-[(6'-Bromohexil)oxi]-3-cloro-4-metil-2H-cromen-2-ona **43**



Se empleó 0.5 g (2.37 mmol) de cumarina **39**, 0.49 g (3.56 mmol) de K_2CO_3 , 4.63 g (2.9 mL, 18.99 mmol) de 1,6-dibromohexano y 15 mL de MeCN. Después de 5 h de reacción se obtuvo **43** como un aceite que solidificó en reposo (0.58 g, 65%). RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.52-1.54 (m, 4H), 1.82-1.87 (m, 2H), 1.88-1.94 (m, 2H), 2.54 (s, 3H, -CH₃), 3.44 (t, 2H, J = 6.7 Hz, 6'-H), 4.02 (t, 2H, J = 6.3 Hz, 1'-H), 6.77 (d, 1H, J = 2.4 Hz, 8-H), 6.89 (dd, 1H, J = 2.4, 8.9 Hz, 6-H), 7.51 (d, 1H, J = 8.9 Hz, 5-H); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 16.3, 25.2, 27.9, 28.8, 32.6, 33.9, 68.5, 101.2, 113.1, 113.3, 117.5, 125.9, 148.1, 153.0, 157.5, 162.0.

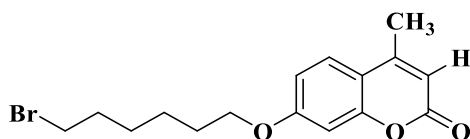
¹¹⁵ Rullo, M.; Niso, M.; Pisani, L.; Carrieri, A.; Colabufo, N. A.; Cellamare, S. & Altomare, C. D. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 161, 433-444.

7-(4'-Bromobutoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona **44**



Se empleó 0.5 g (2.84 mmol) de cumarina **40**, 0.59 g (4.26 mmol) de K_2CO_3 , 4.9 g (2.72 mL, 22.70 mmol) de 1,4-dibromobutano y 15 mL de MeCN. Después de 4 h de reacción se obtuvo **44** como un aceite que solidificó en reposo (0.78 g, 88%). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹⁶ RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.97-2.02 (m, 2H), 2.06-2.12 (m, 2H), 2.40 (s, 3H, $-CH_3$), 3.50 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, 4'-H), 4.06 (t, 2H, $J=6$ Hz, 1'-H), 6.14 (s, 1H, 3-H), 6.80 (d, 1H, $J=2.3$ Hz, 8-H), 6.85 (dd, 1H, $J=2.3, 8.8$ Hz, 6-H), 7.49 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, 5-H); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 18.8, 27.8, 29.4, 33.3, 67.6, 101.5, 112.1, 112.7, 113.8, 125.7, 152.7, 155.4, 161.4, 162.0.

7-[(6'-Bromohexil)oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona **45**

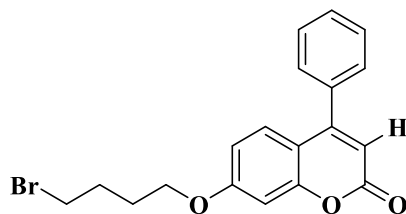


Se empleó 0.5 g (2.84 mmol) de cumarina **40**, 0.59 g (4.26 mmol) de K_2CO_3 , 5.54 g (3.48 mL, 22.70 mmol) de 1,6-dibromohexano y 15 mL de MeCN. Después de 5 h de reacción se obtuvo **45** como un aceite que solidificó en reposo (0.83 g, 86%). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹⁷ RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.52-1.53 (m, 4H), 1.81-1.86 (m, 2H), 1.88-1.93 (m, 2H), 2.39 (s, 3H, $-CH_3$), 3.43 (t, 2H, $J=6.7$ Hz, 6'-H), 4.02 (t, 2H, $J=6.3$ Hz, 1'-H), 6.11 (s, 1H, 3-H), 6.78 (s, 1H, 8-H), 6.85 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, 6-H), 7.48 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, 5-H); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 18.7, 25.2, 27.9, 28.8, 32.6, 33.8, 68.3, 101.3, 111.8, 112.6, 113.5, 125.6, 152.7, 155.3, 161.3, 162.1.

¹¹⁶ Pan, L.; Lei, D.; Jin, L.; He, Y. & Yang, Q. *Molecules*, **2018**, 23, 3002.

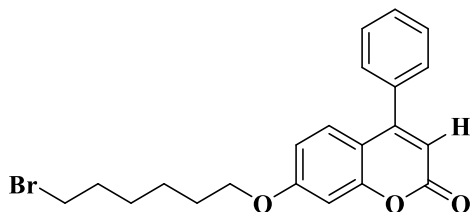
¹¹⁷ Yan, Q.; Mao, L.; Feng, B.; Zhang, L.; Wu, Y. & Huang, W. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13, 7608-7616.

7-(4'-Bromobutoxi)-4-fenil-2H-cromen-2-ona 46



Se empleó 0.5 g (2.10 mmol) de cumarina **41**, 0.43 g (3.15 mmol) de K_2CO_3 , 3.62 g (2 mL, 16.79 mmol) de 1,4-dibromobutano y 15 mL de MeCN. Después de 4 h de reacción se obtuvo **46** como un sólido blanco (0.77 g, 98%). El producto eluyó en un sistema hexano-AcOEt, 85:15. Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹⁸ RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.97-2.02 (m, 2H), 2.06-2.12 (m, 2H) 3.5 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, 4'-H), 4.07 (t, 2H, $J = 6$ Hz, 1'-H), 6.22 (s, 1H, 3-H), 6.78 (dd, 1H, $J = 2.4, 8.9$ Hz, 6-H), 6.88 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 8-H), 7.38 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, 5-H), 7.43-7.46 (m, 2H, -Ph), 7.50-7.53 (m, 3H, -Ph); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 27.8, 29.4, 33.3, 67.6, 101.7, 112.0, 112.7, 112.7, 128.1, 128.5, 129.0, 129.7, 135.7, 155.9, 156.1, 161.4, 162.1.

7-[(6'-Bromohexil)oxi]-4-fenil-2H-cromen-2-ona 47



Se empleó 0.5 g (2.10 mmol) de cumarina **41**, 0.43 g (3.15 mmol) de K_2CO_3 , 4.1 g (2.58 mL, 16.79 mmol) de 1,6-dibromohexano y 15 mL de MeCN. Después de 5 h de reacción se obtuvo **47** como un aceite que solidificó en reposo (0.83 g, 98%). El producto eluyó en un sistema hexano-AcOEt, 9:1. Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹⁸ RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.52-1.53 (m, 4H), 1.82-1.87 (m, 2H), 1.88-1.93 (m, 2H) 3.43 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, 6'-H), 4.03 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, 1'-H), 6.20 (s, 1H, 3-H), 6.78 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 6-H), 6.87 (s, 1H, 8-H), 7.37 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, 5-H), 7.43-7.45 (m, 2H, -Ph), 7.51-7.53 (m, 3H, -Ph); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 25.3, 27.9, 28.9, 32.7,

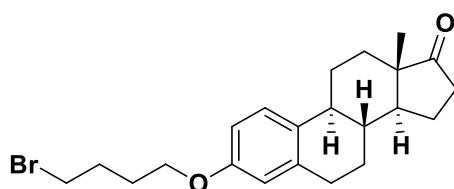
¹¹⁸ Xie, S. S.; Wang, X. B.; Li, J. Y.; Yang, L. & Kong, L. Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 64, 540-553.

33.8, 68.5, 101.6, 111.8, 112.5, 112.7, 128.0, 128.5, 128.9, 129.7, 135.7, 155.9, 156.1, 161.3, 162.3.

Metodología general para la preparación de estrona O-alkilada 60-61

A una disolución de estrona (1.0 equiv.) en MeCN anhidro se agregó K₂CO₃ anhidro (1.5 equiv.) y el correspondiente α,ω -dibromoalcano (8.0 equiv.), la reacción se mantuvo bajo Ar a 80 °C durante 7 u 11 h. Posteriormente, se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna, el exceso de α,ω -dibromoalcano se recuperó en hexano para su reutilización y el producto eluyó en un sistema hexano-AcOEt, 96:4.

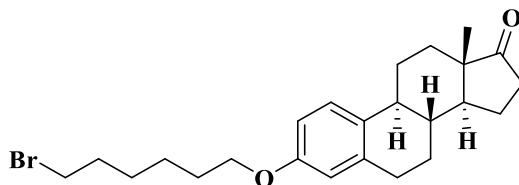
3-(4'-bromobutiloxi)-estra-1,3,5(10)-trieno17-ona 60



Se empleó 0.45 g (1.66 mmol) de estrona **59**, 0.36 g (2.6 mmol) de K₂CO₃, 2.87 g (1.59 mL, 13.3 mmol) de 1,4-dibromobutano y 15 mL de MeCN. Después de 7 h de reacción se obtuvo **60** como un aceite que solidificó en reposo (0.61 g, 90%). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹⁹ RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 0.91 (s, 3H, 18-H), 2.89 (m, 2H, 6-H), 3.48 (t, 2H, *J*= 6.6 Hz, 4'-H), 3.97 (t, 2H, *J*= 6 Hz, 1'-H), 6.64 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz, 4-H), 6.70 (dd, 1H, *J*= 2.5, 8.5 Hz, 2-H), 7.20 (d, 1H, *J*= 8.6 Hz, 1-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ : 14.0, 21.7, 26.1, 26.7, 28.1, 29.6, 29.8, 31.7, 33.6, 36.0, 38.5, 44.1, 48.1, 50.5, 66.9, 112.2, 114.6, 126.5, 132.3, 137.9, 157.0, 221.1.

¹¹⁹ Lange, C.; Holzhey, N.; Schönecker, B.; Beckert, R.; Möllmann, U. & Dahse, H. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3357-3362.

3-(6'-Bromohexiloxi)-estra-1,3,5(10)-trieno17-ona **61**



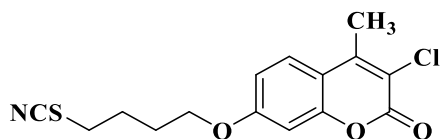
Se empleó 1 g (3.7 mmol) de estrona **59**, 0.80 g (5.7 mmol) de K_2CO_3 , 7.22 g (4.57 mL, 29 mmol) de 1,6-dibromohexano y 30 mL de MeCN. Después de 11 h de reacción se obtuvo **61** como un aceite que solidificó en reposo (1.61 g, cuantitativa). Los datos de RMN coinciden a los reportados en la bibliografía.¹¹⁹ RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.91 (s, 3H, 18-H), 2.89 (m, 2H, 6-H), 3.42 (t, 2H, J = 6.7 Hz, 6'-H), 3.93 (t, 2H, J = 6.4 Hz, 1'-H), 6.64 (d, 1H, J = 2.3 Hz, 4-H), 6.70 (dd, 1H, J = 2.5, 8.5 Hz, 2-H), 7.19 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 1-H); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.0, 21.7, 25.4, 26.1, 26.7, 28.0, 29.3, 29.8, 31.7, 32.8, 34.0, 36.0, 38.5, 44.1, 48.2, 50.5, 67.7, 112.2, 114.7, 126.4, 132.1, 137.9, 157.2, 221.1.

Nuevas investigaciones

Metodología general para la preparación de tio- y selenocianatos derivados de cumarinas **1-14**

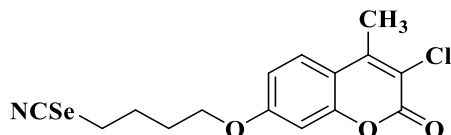
A una disolución de cumarina *O*-alquilada (1.0 equiv.) en MeCN anhidro se agregó el tio- o selenocianato de potasio correspondiente (4 o 2 equiv., respectivamente), la reacción se mantuvo bajo Ar y oscuridad a 60 °C durante 4 h. Posteriormente, se concentró a sequedad y en el caso de los selenocianatos, se vertió 30 mL de H_2O_d . Enseguida, se realizó una extracción con 30 mL de CH_2Cl_2 (x2), la fase orgánica resultante se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Los tio- y selenocianatos se purificaron mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt).

3-cloro-4-metil-7-(4'-tiocianatobutoxi)-2H-cromen-2-ona 1



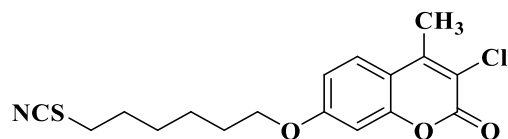
Se empleó 0.2 g (0.58 mmol) de cumarina *O*-alquilada **42**, 0.225 g (2.31 mmol) de KSCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2→7:3). Se obtuvo **1** como un sólido blanco (0.169 g, 90%). p.f: 100-101 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.98-2.04 (m, 2H), 2.06-2.12 (m, 2H), 2.55 (s, 3H, -CH₃), 3.06 (t, 2H, *J*= 7 Hz, 4'-H), 4.09 (t, 2H, *J*= 5.7 Hz, 1'-H), 6.80 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz, 8-H), 6.90 (dd, 1H, *J*= 2.3, 8.8 Hz, 6-H), 7.53 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, 5-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 16.3, 26.9, 27.4, 33.8, 67.7, 101.4, 112.1, 113.3, 113.6, 118.0, 126.1, 148.1, 153.2, 157.5, 161.7.

3-cloro-4-metil-7-(4'-selenocianatobutoxi)-2H-cromen-2-ona 2



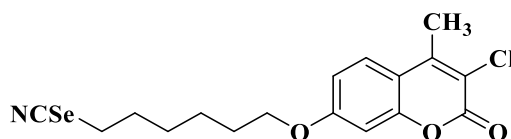
Se empleó 0.2 g (0.58 mmol) de cumarina *O*-alquilada **42**, 0.167 g (1.16 mmol) de KSeCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2→7:3). Se obtuvo **2** como un sólido blanco (0.161 g, 75%). p.f: 86-87 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.99-2.04 (m, 2H), 2.13-2.19 (m, 2H), 2.55 (s, 3H, -CH₃), 3.16 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz, 4'-H), 4.09 (t, 2H, *J*= 5.7 Hz, 1'-H), 6.80 (s, 1H, 8-H), 6.90 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, 6-H), 7.53 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 5-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 16.3, 27.9, 28.5, 29.2, 67.7, 101.4, 101.4, 113.3, 113.5, 118.0, 126.1, 148.1, 153.2, 157.5, 161.7.

3-cloro-4-metil-7-[(6'-tiocianatohexil)oxi]-2H-cromen-2-ona 3



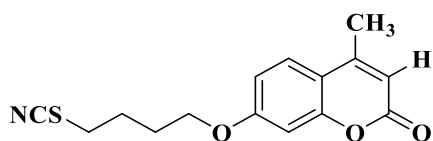
Se empleó 0.2 g (0.53 mmol) de cumarina *O*-alquilada **43**, 0.208 g (2.14 mmol) de KSCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2). Se obtuvo **3** como un sólido blanco (0.132 g, 70%). p.f: 62-63 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.55 (ma, 4H), 1.83-1.91 (m, 4H), 2.55 (s, 3H, -CH₃), 2.98 (t, 2H, *J*= 7.1 Hz, 6'-H), 4.03 (t, 2H, *J*= 6.2 Hz, 1'-H), 6.80 (s, 1H, 8-H), 6.90 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, 6-H), 7.52 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, 5-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 16.3, 25.5, 27.8, 28.8, 29.9, 34.0, 68.4, 101.3, 112.4, 113.3, 113.4, 117.8, 126.0, 148.1, 153.2, 157.6, 162.1.

3-cloro-4-metil-7-[(6'-selenocianatohexil)oxi]-2H-cromen-2-ona 4



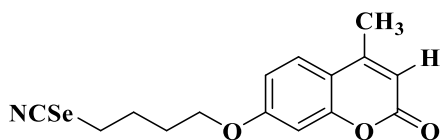
Se empleó 0.2 g (0.53 mmol) de cumarina *O*-alquilada **43**, 0.154 g (1.07 mmol) de KSeCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2). Se obtuvo **4** como un sólido blanco (0.137 g, 65%). p.f: 61-62 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.55 (ma, 4H), 1.84-1.86 (m, 2H), 1.95-1.98 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 3.08 (t, 2H, *J*= 7.3 Hz, 6'-H), 4.03 (t, 2H, *J*= 6.1 Hz, 1'-H), 6.80 (s, 1H, 8-H), 6.90 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, 6-H), 7.52 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 5-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 16.3, 25.5, 28.9, 28.9, 29.5, 30.9, 68.4, 101.3, 101.6, 113.3, 113.4, 117.8, 126.0, 148.1, 153.3, 157.6, 162.1.

4-metil-7-(4'-tiocianatobutoxi)-2H-cromen-2-ona 5



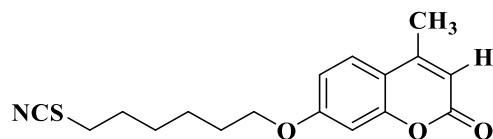
Se empleó 0.2 g (0.64 mmol) de cumarina *O*-alquilada **44**, 0.249 g (2.6 mmol) de KSCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2→7:3). Se obtuvo **5** como un sólido blanco (0.178 g, 96%). p.f: 101-102 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.98-2.03 (m, 2H), 2.05-2.11 (m, 2H), 2.39 (s, 3H, -CH₃), 3.08 (t, 2H, *J*= 7 Hz, 4'-H), 4.08 (t, 2H, *J*= 5.8 Hz, 1'-H), 6.11 (s, 1H, 3-H), 6.76 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz, 8-H), 6.85 (dd, 1H, *J*= 2.3, 8.8 Hz, 6-H), 7.49 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 5-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 18.6, 26.7, 27.2, 33.7, 67.4, 101.2, 111.8, 112.1, 112.4, 113.6, 125.6, 152.6, 155.1, 161.1, 161.6.

4-metil-7-(4'-selenocianatobutoxi)-2H-cromen-2-ona 6



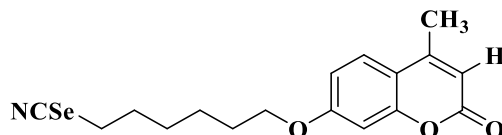
Se empleó 0.2 g (0.64 mmol) de cumarina *O*-alquilada **44**, 0.185 g (1.28 mmol) de KSeCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2→7:3). Se obtuvo **6** como un sólido blanco (0.203 g, 94%). p.f: 126-127 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.98-2.03 (m, 2H), 2.13-2.19 (m, 2H), 2.40 (s, 3H, -CH₃), 3.15 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz, 4'-H), 4.08 (t, 2H, *J*= 5.9 Hz, 1'-H), 6.14 (s, 1H, 3-H), 6.80 (s, 1H, 8-H), 6.85 (d, 1H, *J*= 8.7 Hz, 6-H), 7.50 (d, 1H, *J*= 8.7 Hz, 5-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 18.8, 27.9, 28.6, 29.2, 67.5, 101.4, 101.5, 112.2, 112.6, 113.9, 125.7, 152.7, 155.4, 161.4, 161.8.

4-metil-7-[(6'-tiocianatohexil)oxi]-2H-cromen-2-ona 7



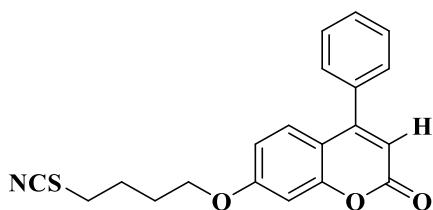
Se empleó 0.2 g (0.59 mmol) de cumarina *O*-alquilada **45**, 0.229 g (2.36 mmol) de KSCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2→7:3). Se obtuvo **7** como un aceite que solidificó en reposo (0.178 g, 95%). Polvo blanco, p.f: 32 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.55 (ma, 4H), 1.84-1.90 (m, 4H), 2.40 (s, 3H, -CH₃), 2.98 (t, 2H, *J*= 7.1 Hz, 6'-H), 4.03 (t, 2H, *J*= 6.1 Hz, 1'-H), 6.13 (s, 1H, 3-H), 6.79 (s, 1H, 8-H), 6.85 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 6-H), 7.49 (d, 1H, *J*=8.7 Hz, 5-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 18.8, 25.5, 27.8, 28.8, 29.9, 34.0, 68.3, 101.4, 112.0, 112.4, 112.7, 113.6, 125.6, 152.7, 155.4, 161.4, 162.1.

4-metil-7-[(6'-selenocianatohexil)oxi]-2H-cromen-2-ona 8



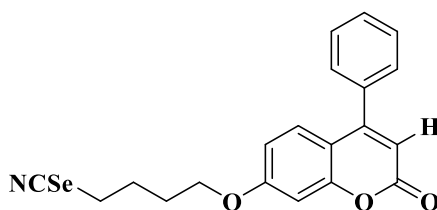
Se empleó 0.2 g (0.59 mmol) de cumarina *O*-alquilada **45**, 0.170 g (1.18 mmol) de KSeCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2→7:3). Se obtuvo **8** como un aceite que solidificó en reposo (0.176 g, 82%). Polvo blanco, p.f: 41-42 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.55 (ma, 4H), 1.84-1.86 (m, 2H), 1.95-1.98 (m, 2H), 2.40 (s, 3H, -CH₃), 3.08 (t, 2H, *J*= 7.3 Hz, 6'-H), 4.03 (t, 2H, *J*= 6.1 Hz, 1'-H), 6.13 (s, 1H, 3-H), 6.80 (s, 1H, 8-H), 6.85 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 6-H), 7.49 (d, 1H, *J*= 8.7 Hz, 5-H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 18.8, 25.5, 28.9, 28.9, 29.5, 30.8, 68.3, 101.4, 101.6, 112.0, 112.7, 113.6, 125.6, 152.7, 155.4, 161.4, 162.2.

4-fenil-7-(4'-tiocianatobutoxi)-2H-cromen-2-ona **9**



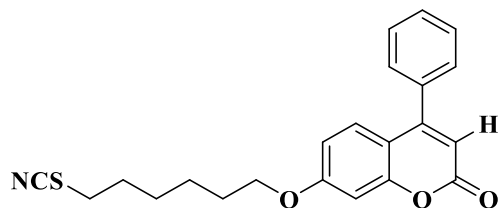
Se empleó 0.2 g (0.53 mmol) de cumarina *O*-alquilada **46**, 0.208 g (2.14 mmol) de KSCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2). Se obtuvo **9** como un sólido blanco (0.182 g, 97%). p.f: 68-69 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.98-2.03 (m, 2H), 2.05-2.11 (m, 2H), 3.06 (t, 2H, *J*= 6.9 Hz, 4'-H), 4.09 (t, 2H, *J*= 5.7 Hz, 1'-H), 6.22 (s, 1H, 3-H), 6.79 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 6-H), 6.87 (s, 1H, 8-H), 7.39 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 5-H), 7.42-7.45 (m, 2H, -Ph), 7.50-7.53 (m, 3H, -Ph); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 26.9, 27.4, 33.8, 67.6, 101.7, 112.1, 112.1, 112.6, 112.8, 128.2, 128.5, 128.9, 129.7, 135.6, 155.9, 156.1, 161.2, 161.9.

4-fenil-7-(4'-selenocianatobutoxi)-2H-cromen-2-ona **10**



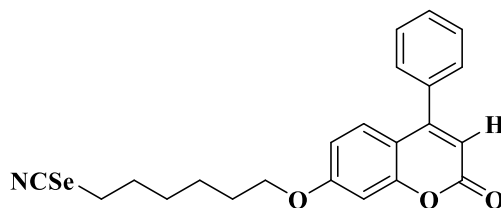
Se empleó 0.2 g (0.53 mmol) de cumarina *O*-alquilada **46**, 0.154 g (1.07 mmol) de KSeCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2). Se obtuvo **10** como un sólido blanco (0.202 g, 95%). p.f: 79 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.99-2.04 (m, 2H), 2.14-2.19 (m, 2H), 3.16 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz, 4'-H), 4.10 (t, 2H, *J*= 5.6 Hz, 1'-H), 6.23 (s, 1H, 3-H), 6.79 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 6-H), 6.87 (s, 1H, 8-H), 7.40 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, 5-H), 7.43-7.45 (m, 2H, -Ph), 7.52 (ma, 3H, -Ph); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 27.9, 28.5, 29.2, 67.6, 101.6, 101.6, 112.0, 112.7, 112.7, 128.2, 128.5, 128.9, 129.7, 135.6, 155.9, 156.0, 161.3, 161.9.

4-fenil-7-[(6'-tiocianatohexil)oxi]-2H-cromen-2-ona **11**



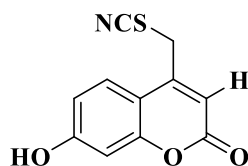
Se empleó 0.2 g (0.50 mmol) de cumarina *O*-alquilada **47**, 0.194 g (1.99 mmol) de KSCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 85:15). Se obtuvo **11** como un sólido blanco (0.177 g, 93%). p.f: 59-60 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.55 (ma, 4H), 1.84-1.90 (m, 4H), 2.98 (t, 2H, J = 7.1 Hz, 6'-H), 4.04 (t, 2H, J = 6.1 Hz, 1'-H), 6.21 (s, 1H, 3-H), 6.78 (d, 1H, J = 8.9 Hz, 6-H), 6.87 (s, 1H, 8-H), 7.38 (d, 1H, J = 8.8 Hz, 5-H), 7.43-7.45 (m, 2H, -Ph), 7.51 (ma, 3H, -Ph); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 25.5, 27.7, 28.8, 29.9, 34.0, 68.3, 101.6, 111.8, 112.4, 112.5, 112.7, 128.1, 128.5, 128.9, 129.7, 135.6, 155.9, 156.1, 161.3, 162.3.

4-fenil-7-[(6'-selenocianatohexil)oxi]-2H-cromen-2-ona **12**



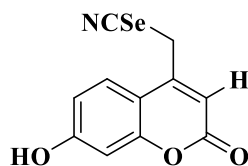
Se empleó 0.2 g (0.50 mmol) de cumarina *O*-alquilada **47**, 0.144 g (1 mmol) de KSeCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 8:2). Se obtuvo **12** como un aceite (0.147 g, 69%). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.54-1.56 (m, 4H), 1.83-1.88 (m, 2H), 1.94-1.99 (m, 2H), 3.08 (t, 2H, J = 7.3 Hz, 6'-H), 4.04 (t, 2H, J = 6.2 Hz, 1'-H), 6.21 (s, 1H, 3-H), 6.78 (dd, 1H, J = 2.4, 8.8 Hz, 6-H), 6.87 (d, 1H, J = 2.3 Hz, 8-H), 7.38 (d, 1H, J = 8.9 Hz, 5-H), 7.43-7.46 (m, 2H, -Ph), 7.51-7.53 (m, 3H, -Ph); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 25.5, 28.9, 28.9, 29.5, 30.9, 68.4, 101.6, 101.7, 111.9, 112.6, 112.8, 128.1, 128.5, 129.0, 129.7, 135.7, 156.0, 156.1, 161.4, 162.3.

7-hidroxi-4-(tiocianatometil)-2H-cromen-2-ona **13**



Se empleó 0.1 g (0.47 mmol) de cumarina **38**, 0.184 g (1.90 mmol) de KSCN y 10 mL de MeCN. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 6:4). Se obtuvo **13** como un sólido blanco (0.106 g, 96%). p.f: 190 °C. RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 4.50 (s, 2H, $-\text{CH}_2$), 6.34 (s, 1H, 3-H), 6.77 (s, 1H, 8-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 6-H), 7.80 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 5-H), 10.69 (s, 1H, $-\text{OH}$); RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 32.5, 102.7, 109.1, 112.2, 112.2, 113.1, 126.7, 149.8, 155.5, 159.8, 161.6.

7-hidroxi-4-(selenocianatometil)-2H-cromen-2-ona **14**

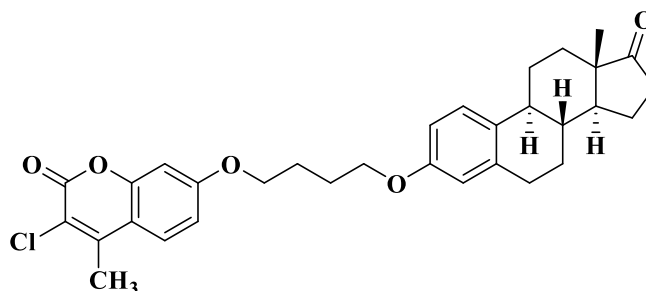


Se empleó 0.1 g (0.47 mmol) de cumarina **38**, 0.137 g (0.95 mmol) de KSeCN y 10 mL de MeCN. Después de eliminar el disolvente, el crudo de reacción se precipitó en una mezcla de agua/hielo, el precipitado se filtró y se lavó con H_2O (x3). El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 6:4). Se obtuvo **14** como un sólido amarillo (0.066 g, 50%). p.f: 192-193 °C. RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 4.37 (s, 2H, CH_2), 6.26 (s, 1H, 3-H), 6.76 (d, 1H, J = 2.2 Hz, 8-H), 6.81 (dd, 1H, J = 2.2, 8.7 Hz, 6-H), 7.84 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 5-H), 10.65 (s, 1H, $-\text{OH}$); RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 27.3, 102.6, 104.6, 109.3, 111.4, 112.9, 126.8, 151.8, 155.5, 159.9, 161.4.

Metodología general para la preparación de híbridos derivados de estrona-cumarina 15-20

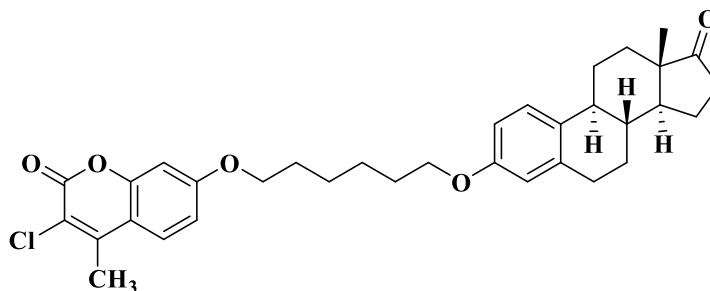
A una disolución de estrona *O*-alquilada (1.0 equiv.) en MeCN anhidro se agregó K₂CO₃ (3 equiv.) y la cumarina correspondiente (2 equiv.), la reacción se mantuvo bajo Ar a 75 °C entre 7 y 10 h dependiendo de la cumarina utilizada. Posteriormente, se concentró a sequedad y se vertió 30 mL de H₂O_d y 3 gotas de KOH 5N (pH ~9 y 10). Enseguida, se realizó una extracción con 30 mL de CH₂Cl₂ (x2). El tratamiento del crudo de reacción se repitió 4 veces y las fases orgánicas resultantes se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 85:15→hexano-AcOEt-CH₂Cl₂ 7:2:1).

3-cloro-4-metil-7-(4-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-metil-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-il)oxi)butoxi)-2*H*-cromen-2-ona 15



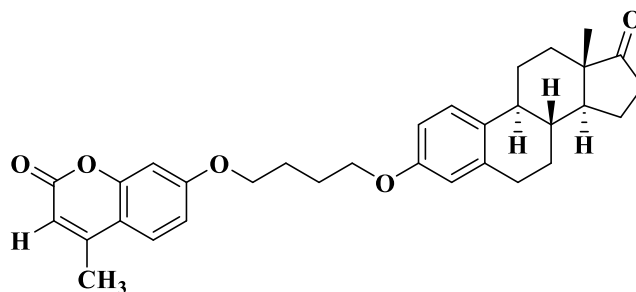
Se empleó 0.24 g (0.58 mmol) de estrona *O*-alquilada **60**, 0.25 g (1.8 mmol) de K₂CO₃, 0.24 g (1.18 mmol) de **39** y 10 mL de MeCN. Después de 9 h de reacción se obtuvo **15** como un sólido beige (0.1719 g, 55%). p.f: 147-148 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.91 (s, 3H, 18-H), 2.55 (s, 3H, -CH₃), 2.89 (m, 2H, 6-H), 4.02 (t, 2H, *J*= 5.7 Hz, -OCH₂), 4.10 (t, 2H, *J*= 5.8 Hz, -OCH₂), 6.65 (d, 1H, *J*= 1.9 Hz, 4-H), 6.72 (dd, 1H, *J*= 2.2, 8.5 Hz, 2-H), 6.81 (d, 1H, *J*= 2.2 Hz, 8-H cumarina), 6.90 (dd, 1H, *J*= 2.3, 8.9 Hz, 6-H cumarina), 7.20 (d, 1H, *J*= 8.6 Hz, 1-H), 7.52 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, 5-H cumarina); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 13.9, 16.3, 21.7, 25.9, 26.0, 26.6, 29.8, 29.8, 31.6, 36.0, 38.4, 44.0, 48.1, 50.4, 67.3, 68.3, 101.3, 112.1, 113.3, 113.4, 114.5, 117.7, 126.0, 126.5, 132.2, 137.9, 148.2, 153.2, 156.9, 157.6, 162.1, 221.3.

3-cloro-4-metil-7-(((6-(((8R,9S,13S,14S)-13-metil-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)oxi)hexil)oxi)-2H-cromen-2-ona **16**



Se empleó 0.35 g (0.8 mmol) de estrona *O*-alquilada **61**, 0.33g (2.4 mmol) de K₂CO₃, 0.34 g (1.61 mmol) de **39** y 15 mL de MeCN. Después de 10 h de reacción se obtuvo **16** como un sólido beige (0.2052 g, 46%). p.f: 158 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.91 (s, 3H, 18-H), 2.55 (s, 3H, -CH₃), 2.89 (m, 2H, 6-H), 3.95 (t, 2H, *J*= 6.3 Hz, -OCH₂), 4.03 (t, 2H, *J*= 6.4 Hz, -OCH₂), 6.65 (d, 1H, *J*= 2.2 Hz, 4-H), 6.72 (dd, 1H, *J*= 2.5, 8.5 Hz, 2-H), 6.81 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz, 8-H cumarina), 6.90 (dd, 1H, *J*= 2.4, 8.9 Hz, 6-H cumarina), 7.19 (d, 1H, *J*= 8.6 Hz, 1-H), 7.52 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, 5-H cumarina); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 13.9, 16.3, 21.7, 25.9, 26.0, 26.0, 26.6, 29.0, 29.3, 29.8, 31.6, 36.0, 38.4, 44.0, 48.1, 50.4, 67.7, 68.6, 101.3, 112.1, 113.2, 113.4, 114.5, 117.7, 125.9, 126.4, 132.0, 137.8, 148.2, 153.2, 157.1, 157.7, 162.2, 221.3.

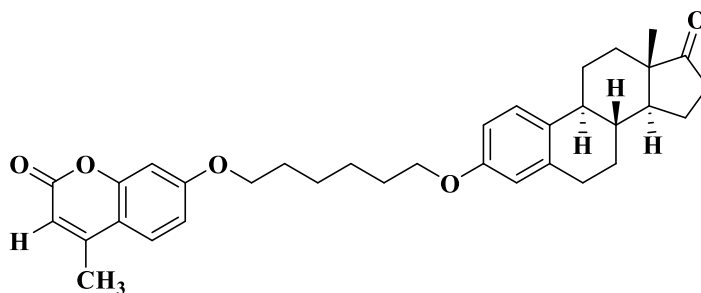
4-metil-7-(4-(((8R,9S,13S,14S)-13-metil-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro -6H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)oxi)butoxi)-2H-cromen-2-ona **17**



Se empleó 0.20 g (0.49 mmol) de estrona *O*-alquilada **60**, 0.20 g (1.48 mmol) de K₂CO₃, 0.17 g (0.98 mmol) de **40** y 10 mL de MeCN. Después de 7 h de reacción se obtuvo

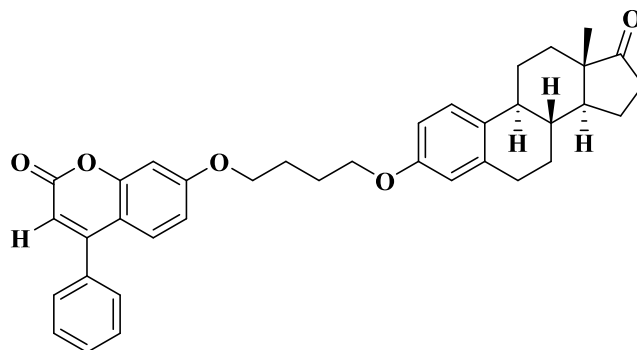
17 como un sólido blanco (0.1588 g, 65%). p.f: 160 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.91 (s, 3H, 18-H), 2.40 (s, 3H, - CH_3), 2.89 (m, 2H, 6-H), 4.02 (t, 2H, J = 5.7 Hz, - OCH_2), 4.09 (t, 2H, J = 5.8 Hz, - OCH_2), 6.14 (s, 1H, 3-H cumarina), 6.65 (d, 1H, J = 2.4 Hz, 4-H), 6.72 (dd, 1H, J = 2.5, 8.5 Hz, 2-H), 6.81 (d, 1H, J = 2.4 Hz, 8-H cumarina), 6.86 (dd, 1H, J = 2.4, 8.8 Hz, 6-H cumarina), 7.20 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 1-H), 7.49 (d, 1H, J = 8.8 Hz, 5-H cumarina); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 13.9, 18.8, 21.7, 25.9, 26.0, 26.6, 29.8, 29.8, 31.6, 36.0, 38.4, 44.0, 48.1, 50.4, 67.3, 68.2, 101.4, 111.9, 112.1, 112.7, 113.6, 114.6, 125.6, 126.5, 132.2, 137.9, 152.8, 155.3, 157.0, 161.5, 162.1, 221.3.

4-metil-7-((6-(((8R,9S,13S,14S)-13-metil-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)oxi)hexil)oxi)-2H-cromen-2-ona **18**



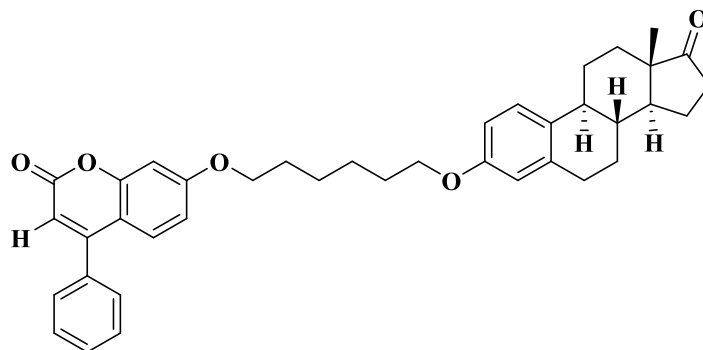
Se empleó 0.40 g (0.92 mmol) de estrona *O*-alquilada **61**, 0.38 g (2.76 mmol) de K_2CO_3 , 0.32 g (1.84 mmol) de **40** y 15 mL de MeCN. Después de 8 h de reacción se obtuvo **18** como un sólido blanco (0.2921 g, 60%). p.f: 137-138 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.91 (s, 3H, 18-H), 2.39 (s, 3H, - CH_3), 2.89 (m, 2H, 6-H), 3.95 (t, 2H, J = 6.3 Hz, - OCH_2), 4.02 (t, 2H, J = 6.4 Hz, - OCH_2), 6.13 (s, 1H, 3-H cumarina), 6.65 (d, 1H, J = 2.3 Hz, 4-H), 6.72 (dd, 1H, J = 2.5, 8.5 Hz, 2-H), 6.80 (d, 1H, J = 2.4 Hz, 8-H cumarina), 6.85 (dd, 1H, J = 2.4, 8.8 Hz, 6-H cumarina), 7.19 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 1-H), 7.48 (d, 1H, J = 8.8 Hz, 5-H cumarina); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 14.0, 18.8, 21.7, 25.9, 26.0, 26.0, 26.7, 29.1, 29.4, 29.8, 31.7, 36.0, 38.5, 44.1, 48.1, 50.5, 67.8, 68.6, 101.5, 112.0, 112.2, 112.8, 113.6, 114.6, 125.6, 126.4, 132.0, 137.8, 152.7, 155.4, 157.2, 161.5, 162.3, 221.1.

7-(4-(((8R,9S,13S,14S)-13-metil-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta [a]fenantren-3-il)oxi)butoxi)-4-fenil-2H-cromen-2-ona **19**



Se empleó 0.20 g (0.49 mmol) de estrona *O*-alquilada **60**, 0.20 g (1.48 mmol) de K_2CO_3 , 0.23 g (0.98 mmol) de **41** y 10 mL de MeCN. Después de 9 h de reacción se obtuvo **19** como un sólido blanco (0.1410 g, 51%). p.f: 145 °C. RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.91 (s, 3H, 18-H), 2.89 (m, 2H, 6-H), 4.02 (t, 2H, J = 5.8 Hz, -OCH₂), 4.11 (t, 2H, J = 5.9 Hz, -OCH₂), 6.22 (s, 1H, 3-H cumarina), 6.65 (d, 1H, J = 2.5 Hz, 4-H), 6.72 (dd, 1H, J = 2.6, 8.5 Hz, 2-H), 6.79 (dd, 1H, J = 2.4, 8.9 Hz, 6-H cumarina), 6.89 (d, 1H, J = 2.4 Hz, 8-H cumarina), 7.20 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 1-H), 7.39 (d, 1H, J = 8.9 Hz, 5-H cumarina) 7.43-7.45 (m, 2H -Ph), 7.51-7.53 (m, 3H -Ph); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.0, 21.7, 26.0, 26.0, 26.6, 29.8, 29.8, 31.6, 36.0, 38.4, 44.1, 48.1, 50.5, 67.3, 68.3, 101.7, 111.9, 112.1, 112.5, 112.8, 114.6, 126.5, 128.1, 128.5, 128.9, 129.7, 132.2, 135.7, 137.9, 156.0, 156.1, 157.0, 161.5, 162.3, 221.3.

7-((6-(((8R,9S,13S,14S)-13-metil-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)oxi)hexil)oxi)-4-fenil-2H-cromen-2-ona **20**



Se empleó 0.40 g (0.92 mmol) de estrona *O*-alquilada **61**, 0.38 g (2.76 mmol) de K_2CO_3 , 0.44 g (1.84 mmol) de **41** y 15 mL de MeCN. Después de 10 h de reacción se obtuvo **20** como una espuma (0.3160 g, 58%). RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.90 (s, 3H, 18-H), 2.89 (m, 2H, 6-H), 3.95 (t, 2H, J = 6.4 Hz, -OCH₂), 4.04 (t, 2H, J = 6.4 Hz, -OCH₂), 6.21 (s, 1H, 3-H cumarina), 6.65 (d, 1H, J = 2.5 Hz, 4-H), 6.71 (dd, 1H, J = 2.6, 8.5 Hz, 2-H), 6.78 (dd, 1H, J = 2.5, 8.8 Hz, 6-H cumarina), 6.88 (d, 1H, J = 2.5 Hz, 8-H cumarina), 7.19 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 1-H), 7.37 (d, 1H, J = 8.8 Hz, 5-H cumarina) 7.43-7.45 (m, 2H -Ph), 7.50-7.52 (m, 3H -Ph); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.0, 21.7, 25.9, 26.0, 26.0, 26.7, 29.0, 29.3, 29.8, 31.7, 36.0, 38.5, 44.1, 48.1, 50.5, 67.8, 68.6, 101.7, 111.9, 112.2, 112.5, 112.8, 114.6, 126.4, 128.0, 128.5, 128.9, 129.7, 132.0, 135.7, 137.8, 156.0, 156.1, 157.2, 161.4, 162.4, 221.1.

Docking molecular

Las estructuras cristalinas de las enzimas HDAC8, aromataza y 17 β -HSD1 se obtuvieron de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) con los códigos PDB: 5FCW, 5JKW y 1FDT, respectivamente. El acoplamiento molecular se realizó con el software Molecular Operating Environment (<https://www.chemcomp.com/MOE> v2020.0901).

Se eliminaron las moléculas innecesarias (H₂O y SO₄), dejando la cadena A en aromataza y la cadena B en 17 β -HSD1, los átomos de hidrógeno, las cargas y la minimización de energía se ajustaron con el campo de fuerza AMBER10:EHT y R-field de solvatación de MOE. Los ligandos (15-20, 62- 64) se construyeron con el software ChemDraw Professional 16.0. La ionización y minimización de energía de los compuestos se realizó con el campo de fuerza AMBER10:EHT. El tratamiento de la proteína 5FCW fue con la cadena A, se eliminaron los iones de potasio y las moléculas de hexa(etilenglicol). Se conservaron las moléculas de H₂O. Para la proteína y los tiocianatos (**1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13**) se utilizó el campo de fuerza pffrosst. La minimización y optimización de la geometría de los selenocianatos (**2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14**) fue en Avogadro con el campo de fuerza UFF.

Como método de colocación se seleccionó Triangle Matcher, las puntuaciones se calcularon con la función London dG y la selección de las 100 mejores poses se realizó utilizando la función de puntuación GBVI/WSA dG (Generalized-Born Volume Integral/Weighted Surface area). Estos parámetros se establecieron para la validación del acoplamiento. El sitio de unión se definió utilizando el ligando cristalográfico (sitio ortostérico). Para cada ligando se generaron 100 repeticiones con 100 poses. Se inspeccionaron visualmente las mejores poses de unión, se eligió la pose que más se superponía con el ligando cristalográfico y se informaron sus puntuaciones ($\Delta G =$ kcal/mol). Las representaciones gráficas de las interacciones de los ligandos se crearon en MOE.

Validación de acoplamiento

Los protocolos de acoplamiento se validaron mediante un reacoplamiento en los sitios de unión a ligandos de HDAC8, aromataza y 17 β -HSD1 con sus ligandos cocrystalizados ácido hidroxámico, testosterona y estradiol, respectivamente, con un RMSD menor a 2 Å. La validación se realizó por triplicado.