



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Doctorado en Ciencias Químicas

“Síntesis, evaluación antiproliferativa y estudios *in silico* de nuevos derivados
esteroidales híbridos a partir de estrona”

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

Presenta

M.C. Luis Antonio Cobos Ontiveros

Directores de tesis

Dra. María Concepción Sara Montiel Smith Dra. Penélope Merino Montiel

H. Puebla de Zaragoza, Mayo 2023



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. José Luis Vega Báez, Dra. Martha Virginia Sosa Rivadeneyra, Dra. Roxana Martínez Pascual, Dra. Anabel Romero López y la Dra. Laura Leticia Romero Hernández, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Síntesis, evaluación antiproliferativa y estudios in silico de nuevos derivados esteroidales híbridos a partir de estrona”**, que presenta el alumno **M.C. Luis Antonio Cobos Ontiveros** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los diecisiete días del mes de abril del año dos mil veintitrés.

ATENTAMENTE



Dr. José Luis Vega Báez




Dra. Martha Virginia Sosa Rivadeneyra



Dra. Roxana Martínez Pascual



Dra. Anabel Romero López



Dra. Laura Leticia Romero Hernández

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



BUAP

Oficio PCQ/090/2023

Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza
Director General de Bibliotecas
Presente

A través de este medio me dirijo a usted para informarle que la tesis con título **Síntesis, evaluación antiproliferativa y estudios in silico de nuevos derivados esteroideos híbridos a partir de estrona**, ha sido avalada bajo los preceptos de integridad académica; por tanto se autoriza la impresión de tesis del alumno:


Nombre del alumno: **Luis Antonio Cobos Ontiveros**
Matrícula: **218570727**
Facultad: **Facultad de Ciencias Químicas – Instituto de Ciencias**
Programa Educativo: **Doctorado en Ciencias Químicas**
Licenciatura o Posgrado: **Posgrado**

Sin más por el momento, agradezco la atención al presente.

ATENTAMENTE
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 02 de mayo de 2023


Dra. Jaqueline Jiménez Hernández
Secretaria Académica




Dra. María Concepción Sara Montiel Smith
Directora de Tesis


Dra. Penélope Merino Montiel
Codirectora de Tesis

Posgrado en Ciencias Químicas
FCQ - ICIJAP

Edif. FCQ10, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
22-22-29-55-00 Ext. 7397



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 Dra. Sara Montiel Smith y la Dra. Penélope Merino Montiel con el apoyo otorgado por CONACyT a través de su programa de becas nacionales.



Synthesis, antiproliferative evaluation and *in silico* studies of a novel steroidal spiro morpholinone

Luis A. Cobos-Ontiveros^a, Laura L. Romero-Hernández^{a,*}, Eduardo B. Mastranzo-Sánchez^a, Blanca Colín-Lozano^a, Adrián Puerta^b, José M. Padrón^b, Penélope Merino-Montiel^{a,*}, Jose Luis Vega Baez^a, Sara Montiel-Smith^a

^a Facultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Puebla, Mexico

^b BioLab, Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO-AG), Universidad de La Laguna, c/ Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Morpholinone
Spiroheterocycle
Steroid
Antiproliferative agent
Docking simulations
Aromatase

ABSTRACT

Estrogens play a pivotal role in the development of estrogen-dependent breast cancer and other hormone-dependent disorders. A common strategy to overcome the pathological effects of estrogens is the use of aromatase inhibitors (AIs), which bind to the enzyme and prevent the union with the natural substrate, decreasing the amount of estrogens produced. Several AIs have been developed, including inhibitors with a steroidal backbone and a nitrogen heterocycle in their structure. Encouraged by the notable results presented by current and clinical steroidal drugs, herein we present the synthesis of a steroidal spiro morpholinone derivative as a plausible aromatase inhibitor.

The morpholinone derivative was synthesized over a six-step methodology starting from estrone. The title compound and its hydroxychloroacetamide derivative precursor were evaluated for their antiproliferative profile against estrogen-dependent and independent solid tumor cell lines: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D and WiDr. Both compounds exhibited a potent antiproliferative activity in the micromolar range against the six cancer cell lines, with the hydroxychloroacetamide derivative precursor being a more potent inhibitor ($GI_{50} = 0.25\text{--}2.4 \mu\text{M}$) than the morpholinone derivative ($GI_{50} = 2.0\text{--}11 \mu\text{M}$). Furthermore, both compounds showed, in almost all cases, better GI_{50} values than the steroidal anticancer drugs abiraterone and galeterone.

Docking simulations of the derivatives were performed in order to explain the experimental biological activity. The results showed interactions with the iron heme (derivative 3) and important residues of the steroidal binding-site (Met374) for the inhibition of human aromatase. A correlation was found between *in vitro* assays and the score obtained from the molecular docking study.

1. Introduction

Aromatase is an enzyme which belongs to the cytochrome P450 family, involved in the final step of the estrogen biosynthesis. It catalyzes the transformation of androgens (androstenedione, testosterone (TST) and 16-hydroxytestosterone) into estrogens (estrone, estradiol and estriol) through the A-ring aromatization. Aromatase is the largest producer of estrogens in post-menopausal women. It is present in many human organs such as brain, bone, ovaries, placenta, testis, prostate and adipose and breast tissue [1], however it has been found at high levels in breast tumors and in the adipose tissue close to them [2].

In estrogen-dependent breast cancer, estrogens play a key role in the

growth and progress of tumor cells, modulating the release of growth factors in human breast cancer cell lines such as MCF-7, T-47D, and ZR-75-1 [3]. Two strategies have been developed to block the adverse effect of estrogens in breast carcinoma. The first method is based on the use of estrogen receptor (ER) antagonists to block the binding of estrogens to their receptors [4]. The second approach consist of the development of aromatase inhibitors (AIs) which compete with the aromatase substrate androstenedione, reducing the amount of estrogens levels [5]. AIs can be classified according to their structure as steroidal (type I) and non-steroidal (type II) inhibitors. Steroidal inhibitors bind covalently to the substrate site of the enzyme inactivating it, whereas non-steroidal inhibitors bind non-covalently to the heme group of the enzyme

* Corresponding authors.

E-mail addresses: laura.romerohernandez@correo.buap.mx (L.L. Romero-Hernández), penelope.merino@correo.buap.mx (P. Merino-Montiel).

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109173>

Received 4 October 2022; Received in revised form 20 December 2022; Accepted 23 December 2022

Available online 6 January 2023

0039-128X/© 2023 Published by Elsevier Inc.

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 la persona que siempre me ha apoyado, se encuentra a mi lado, con la que comparto mis alegrías, tristezas, preocupaciones, fracasos y éxitos., al amor de mi vida

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quisiera agradecer a la Doctora Sara María Montiel, principalmente por haber aceptado que formará parte de su grupo de trabajo bajo condiciones extraordinarias. Por lo mismo agradezco a la Doctora Penélope Merino. También agradezco a la Doctora Laura Leticia Romero por todos sus consejos, comentarios y contribuciones tanto en la elaboración de esta tesis como en la publicación del artículo.

A mi comisión revisora por el tiempo dedicado:

Dra. Laura Leticia Romero

Dra. Roxana Martínez Pascual

Dra. Martha Virginia Sosa

Dra. Anabel Romero López

Dr. José Luis Vega

A todos mi compañeros de Laboratorio pero en especial; Isabel, Cinthia, Martha, Jorge, Rosa, Eduardo y Alejandra.

A mi familia y al amor de mi vida.

Por último a CONACYT por la beca de Doctorado otorgada durante 4 años.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
SUMMARY	6
RELACIÓN DE COMPUESTOS PREPARADOS	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
CAPITULO 1. SÍNTESIS, EVALUACIÓN BIOLÓGICA E IN SILCO DE LA MORFOLINONA DE ESTRONA E INTERMEDIARIOS	9
Introducción	9
Antecedentes	11
<i>Cáncer RH+ y biosíntesis de estrógenos</i>	11
<i>La aromatasas, estructura y reacciones</i>	14
<i>Inhibidores esteroideos y no esteroideos de la aromatasas</i>	18
<i>Inhibidores esteroideos de la aromatasas modificados mediante anillos heterociclos nitrogenados</i>	22
Objetivos	25
Discusión de resultados.....	26
Conclusiones	39
CAPITULO 2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN <i>IN SILICO</i> DE HÍBRIDOS DERIVADOS DE ESTRONA-CUMARINA COMO POTENTES INHIBIDORES DE LA 17β-HSD1	40
Introducción	40
Antecedentes	41
<i>17β-HSD; estructura, función y diferentes isoformas</i>	41
<i>Inhibidores no esteroideos de la 17 β-HSD de tipo 1</i>	46
<i>Inhibidores no esteroideos de la 17 β-HSD de tipo 1</i>	48
Objetivos	53
Discusión de resultados.....	54
Conclusiones	72
PARTE EXPERIMENTAL	73
Métodos generales.....	73
Materias primas y productos	75

Docking Molecular.....	101
Referencias.....	102

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
DCM	Dicloro metano
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
t.a.	Temperatura ambiente
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 se encuentra segmentada en dos capítulos. En la primera parte se describen las metodologías para la obtención, pruebas biológicas y evaluación *in silico* de la morfolinona esteroidal y su intermediario inmediato como potentes inhibidores de la aromatasas. Se realizó la evaluación biológica, así como se efectuaron los análisis por Docking molecular de la morfolinona esteroidal y su intermediario la hidroxiclороacetamida. Los resultados fueron muy contundentes pues describen que ambos compuestos poseen actividad antiproliferativa frente a diferentes líneas celulares de crecimiento de cáncer, a su vez, los resultados *in silico* mostraron que pueden actuar como agentes inhibidores de la aromatasas, por lo que esta información sugiere un mecanismo biológico en la que estos compuestos de estrona pueden actuar como agentes anticancerígenos.

En la segunda parte se trata la preparación y evaluación *in silico* de compuestos híbridos de estrona-cumarina como posibles inhibidores de la enzima 17 β -HSD1 para el tratamiento del cáncer de mama RH+. 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. La finalidad de realizar la síntesis de una familia de estos derivados, es la de establecer la relación entre su estructura y actividad. Para el grupo *Cap* se seleccionaron distintas cumarinas, para el grupo quelante de zinc se utilizó un grupo tiourea-esteroidal y para los enlazadores se utilizaron cadenas carbonadas de diferentes longitudes, para determinar la distancia óptima entre ambos grupos. Adicionalmente, el grupo cumarina también tiene como objetivo estructural el de evitar la actividad estrogénica intrínseca que presentan los esteroides.

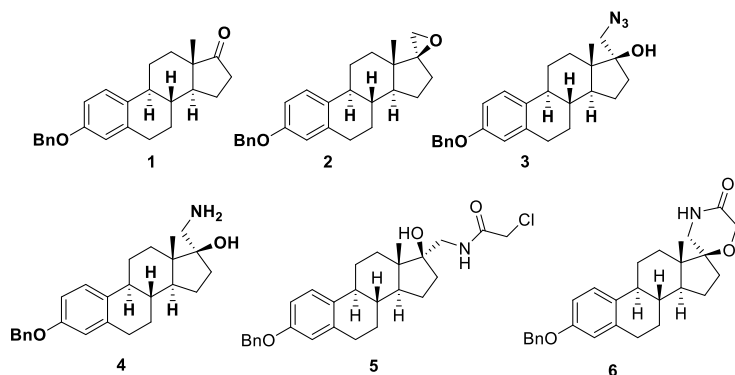
SUMMARY

This doctoral Thesis is divided into two chapters. The first part describes synthesis methodologies, biological tests and *in silico* evaluation of a steroidal morpholinone as potent aromatase inhibitor. The steroidal morpholinone and its intermediate, hydroxychloroacetamide, were evaluated in biological tests and in molecular docking analyses. The results were very compelling because they describe that both compounds can act as antiproliferative agents against different cancer growth cell lines, while the *in silico* results showed that they can act as aromatase inhibitors, so this information suggests a biological pathway in which these estrone compounds may act as anticancer agents.

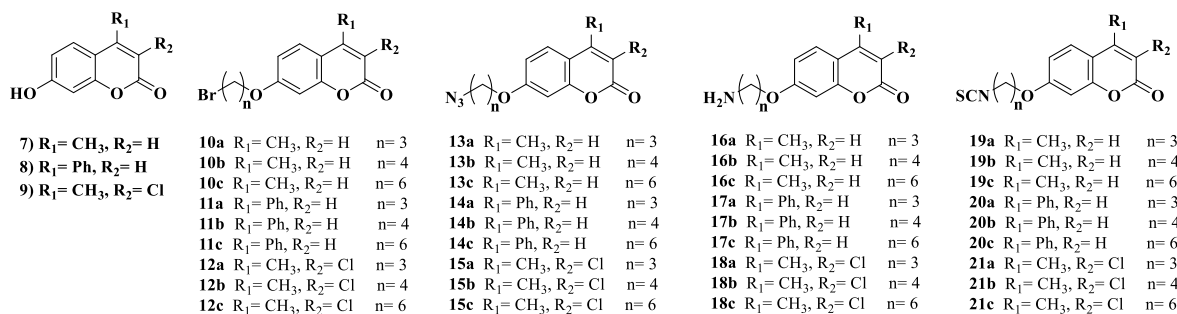
The second part deals with the preparation and *in silico* evaluation of hybrids compounds strone-coumarins, as possible inhibitors of the 17 β -HSD1 enzyme for the treatment of HR+ breast cancer. Inhibitors of this class of enzymes share a pharmacophore model that consists of three parts, a *cap* group, a zinc chelating group, and a linker that connects both groups. The purpose of performing the synthesis of a variety of this class of derivatives is to establish the relationship structure-activity. For the *Cap* group it was used different coumarins, as the zinc chelating group it was used a thiourea-steroidal group and for the linkers we used carbon chains of different length to determine the optimal distance between both groups. Furthermore, the coumarin group also has the structural objective of avoiding the intrinsic estrogenic activity that steroids present.

RELACIÓN DE COMPUESTOS PREPARADOS

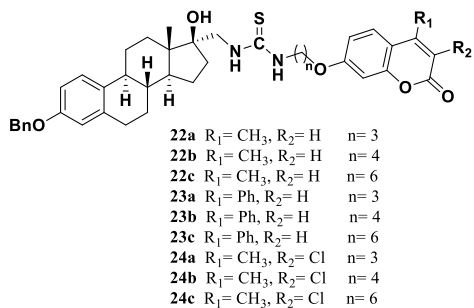
Derivados de estrona y morfolinona



Derivados de la cumarina



Tioureas



INTRODUCCIÓN GENERAL

El cáncer es la segunda principal causa de muerte en el mundo. Esta enfermedad que a nivel fisiológico posee muchas implicaciones, a nivel celular siempre implica una división descontrolada de células, es decir, una resistencia a la apoptosis. A pesar de que existen un sinnúmero de terapias para el tratamiento de esta enfermedad; quimioterapia, radiación, quirúrgica, hormonoterapia, factores de crecimiento como inductores de la apoptosis e inhibidores de la angiogénesis., es importante destacar que estos procedimientos tienen diversos objetivos y que en muchas ocasiones estos tratamientos no se encuentran bien dirigidos, por lo que las células sanas o no mutadas son altamente afectadas.¹

Debido a lo anterior se hace necesario el uso de herramientas computacionales que ayudan al químico orgánico a diseñar y modelar moléculas específicamente dirigidas para una o más dianas en particular; lo cual a posterior disminuye significativamente los efectos secundarios o toxicidad que un fármaco puede generar una vez que este sea administrado.²

El docking molecular o acoplamiento molecular es quizá la técnica más importante utilizada en la química computacional.³ Ya que se fundamenta en elegir la mejor posición en la que un ligando puede orientarse con una determinada diana molecular y además predice energéticamente afinidad de unión entre estos dos.⁴ Esta información, por lo tanto predice si una molécula servirá o no para un determinado blanco, por lo que le ahorra al químico tiempo y dinero en el proceso de síntesis.⁵

Debido a esto, se pueden seleccionar dianas terapéuticas con el fin de sintetizar agentes antineoplásicos más selectivos; por ejemplo sería posible desarrollar inhibidores para determinadas enzimas que a nivel bioquímico se encuentran altamente implicadas en el inicio y desarrollo del cáncer como; anhidrasa carbónica, histona desacetilasa, sulfatasa, proteína p53, aromatasas, 17β-HSD, entre otras.^{6,7}

El manuscrito de este proyecto se divide en dos capítulos, los cuales implican precisamente el desarrollo de agentes antiproliferativos e inhibidores de las últimas dos enzimas mencionadas con anterioridad, en donde se trata la síntesis de dichas moléculas, evaluación biológica y su desarrollo con estudios *in silico*.

CAPITULO 1. SÍNTESIS, EVALUACIÓN BIOLÓGICA E IN SILCO DE LA MORFOLINONA DE ESTRONA E INTERMEDIARIOS

Introducción

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte por enfermedad en mujeres, sobre todo en aquellas que se encuentran post-menopáusicas. El principal tipo de cáncer que se expresa en mujeres es el positivo a receptores hormonales (RH+). Éste cáncer se implica precisamente en la biosíntesis de estrógenos.⁸

Una de las principales enzimas implicadas en el cáncer RH+ es la aromatasa, la cual pertenece al grupo de la familia de citocromo P450, a nivel celular se encuentra en la mitocondria, mientras que a nivel anatómico se aloja en el tejido mamario.⁹ La enzima cataliza la demetilación de la testosterona y la androstenodiona, además de aromatizar el anillo A del cuerpo esteroidal, convirtiendo estos esteroides de esqueleto de 19 carbonos a 18 carbonos como el estradiol y la estrona, respectivamente.^{10,11}

La inhibición de la aromatasa 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).¹²

Se han descrito numerosos inhibidores de la aromatasa, los cuales pueden clasificarse como esteroideos o no esteroideos.¹³ Los primeros se unen de manera reversible al sitio activo de la enzima mimetizando ya sea al sustrato o al producto.¹⁴ Mientras que los no esteroideos se unen a los sitios ortostéricos de la enzima, por lo que generalmente son del tipo no competitivos o incompetivos.¹⁵ Aunque definitivamente los inhibidores esteroideos por su gran afinidad con la aromatasa son el tipo de moléculas predilectas para diseñar inhibidores dirigidos a dicha enzima.¹⁶

Sin embargo, en muchas ocasiones debido a la enorme dualidad tanto para actuar como agonista y antagonista, es necesario realizar una modificación en el esteroide para que puedan funcionar como inhibidores totalmente selectos hacia una determinada diana molecular, en este caso la aromatasa.¹⁷ Se ha demostrado que los anillos heterociclos nitrogenados, son buenos modificadores y reguladores de la actividad del esteroide, pues

permiten que en conjunto sean moléculas más selectas, que pueden actuar de manera específica y con un menor número de efectos secundarios frente a una diana molecular.¹⁸

Con el propósito de desarrollar moléculas que puedan ayudar para el tratamiento del cáncer de mama (RH+), en este trabajo se ha desarrollado una molécula de estrona de espiromorfolinona, con el fin de estudiar sus efectos antiproliferativos contra diferentes líneas de cáncer, además de estudiar de forma *in silico* su efecto como posible inhibidor de la aromatasa.

Antecedentes

Cáncer RH+ y biosíntesis de estrógenos

El cáncer es una enfermedad crónica relacionada a nivel celular con la división descontrolada de la células, lo cual a nivel fisiológico implica la formación de neoplasias o masas anormal de tejido cuyo crecimiento excede el de los tejidos normales, y éste persiste aún después de que finalizó el estímulo que genero el origen de la enfermedad.¹⁹

El cáncer de mama se ha convertido en el cáncer diagnosticado más común superando al de pulmón, además es la quinta causa principal de muerte en el mundo, con unos números alarmantes; 2.3 millones de casos clínicos y al menos 685,000 decesos en el año 2020, sin embargo, se estima que para el año 2070 los casos puedan llegar a los 4.4 millones. Es importante mencionar que en el caso de las mujeres representó aproximadamente el 24.5% de todos los casos de cáncer y el 15.5 % de las muertes por cáncer, ocupando el primer lugar en incidencia y mortalidad en la mayoría de los países del mundo en 2020 (Figura 1).²⁰

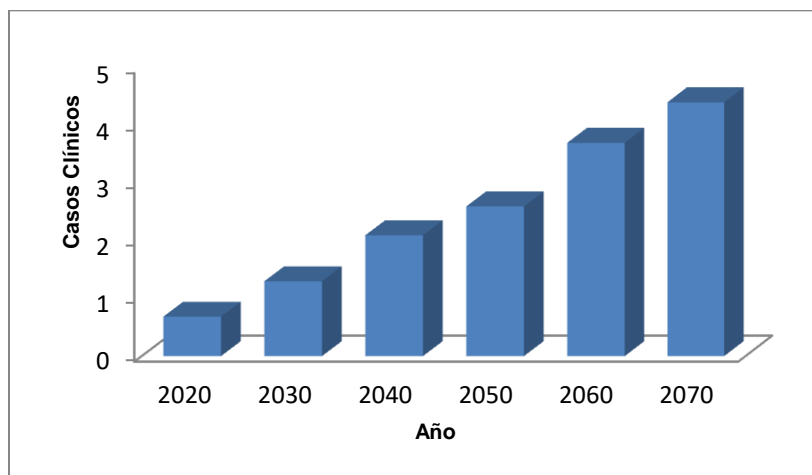


Figura 1. Aumento de casos clínicos del cáncer de mama durante el tiempo.

Los estrógenos tienen un papel importante en el origen y crecimiento de tumores en tejidos dependientes de hormonas como la mama y el endometrio. La mayor incidencia de cáncer de mama ocurre en mujeres posmenopáusicas después del cese de la producción ovárica de estrógenos.²¹

Aproximadamente el 70 % de los tumores de mama expresan receptores hormonales (RH): el receptor de estrógeno- α (RE- α) y/o el receptor de progesterona (RP); estos son los principales factores de transcripción que impulsan la oncogénesis en los cánceres de mama RH positivos (RH+). Por tanto, la terapia endocrina es considerada la primera línea de tratamiento en pacientes cuyo cáncer de mama presenta receptores hormonales positivos.²²

La expresión y activación del receptor estrogénico es importante para el control del crecimiento tumoral, por tanto, los fármacos que bloquean selectivamente el receptor estrogénico (antagonistas como fulvestrant o moduladores como tamoxifeno) o aquellos que bloquean la biosíntesis de estrógenos (inhibidores de sulfatasa estrogénica, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y aromatasas) representaron durante años la terapia inicial en el tratamiento del cáncer de mama metastásico con RH+.²³

De las 2 formas antes mencionadas, bloqueo del receptor estrogénico o inhibición de la generación de estrógenos, es esta última, la forma de tratamiento contra el cáncer de mamá la que puede tener más versatilidad, ya que la formación de estrógenos puede ser inhibida en diversas etapas.²⁴

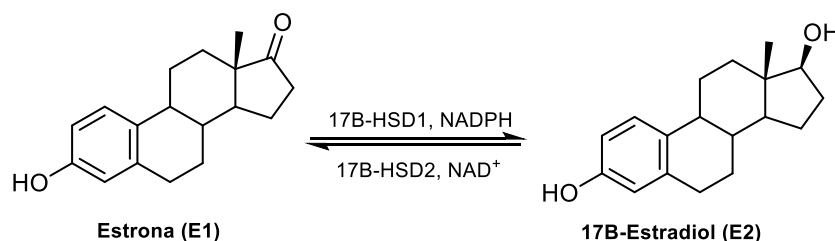
El estradiol (E2) el cual se forma a partir de estrona (E1) promueve el crecimiento de células de cáncer de mama al interactuar con el RE- α , induciendo la transcripción de genes diana y provocando la producción de factores de crecimiento que actúan de manera autocrina/paracrina.²⁵ También se ha informado que el estradiol evita la apoptosis en las células de cáncer de mama, y este efecto antiapoptótico se ha relacionado con un efecto postraduccional rápido (no genómico) del estrógeno provocado a nivel de la membrana plasmática.²⁶

Se requieren tres sistemas enzimáticos para la formación de E2 a partir de precursores de andrógenos que se encuentran en los tejidos mamarios e incluyen la aromatasas (Cyp19), que convierte androstenediona en E1, la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) tipo 1, que reduce la E1 en E2, el cual como se mencionaba anteriormente es el estrógeno biológicamente activo que interactúa con el RE- α .²⁷ Además, la sulfotransferasa esteroidea (STS) que puede actuar sobre la estrona sulfatada (E1S), formado como resultado de la

prolongada han dado lugar a la opinión de que E1S puede actuar como un reservorio para la formación de estrógenos biológicamente activos a través de la acción de STS.³³

La 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 y tipo 2 (17 β -HSD1 y 17 β -HSD2) son oxidorreductasas pertenecientes a la familia de la deshidrogenasa-reductasa de cadena corta (SDR) que interconvierten cetonas a sus correspondientes alcoholes secundarios.³⁴

La 17 β -HSD1 cataliza la reducción de la estrona al estrógeno más potente 17 β -estradiol, por otro lado la 17 β -HSD2, cataliza la reacción inversa, es decir, la inactivación de E2 por oxidación a E1 (Esquema 2).³⁵ Por lo tanto, puede considerarse como un adversario fisiológico de la enzima tipo 1. Estas enzimas pueden verse como "interruptores moleculares", ya que aumentan (se encienden) y disminuyen (se apagan) la ocupación del ligando y la transactivación concomitante del RE- α , respectivamente.³⁶



Esquema 2. Transformación del E2 en E1 y en E1 en E2 mediante la 17 β -HSD2 y 17 β -HSD1.

La aromatasa, estructura y reacciones

La familia de enzimas CYP450 cataliza reacciones que van desde el metabolismo de xenobióticos hasta la biosíntesis de esteroides. A pesar de la gran cantidad de enzimas que hay en la familia CYP y su diferencia en la identidad de secuencia, adoptan un pliegue terciario común, que consta de 12 a 15 hélices (A a L) y 4 hojas (1 a 4) (figura 2). La aromatasa (estrógeno sintetasa, CYP19) es el único miembro de su familia que comparte una similitud de secuencia baja (<20 %) con otras enzimas CYP450.^{37, 38}

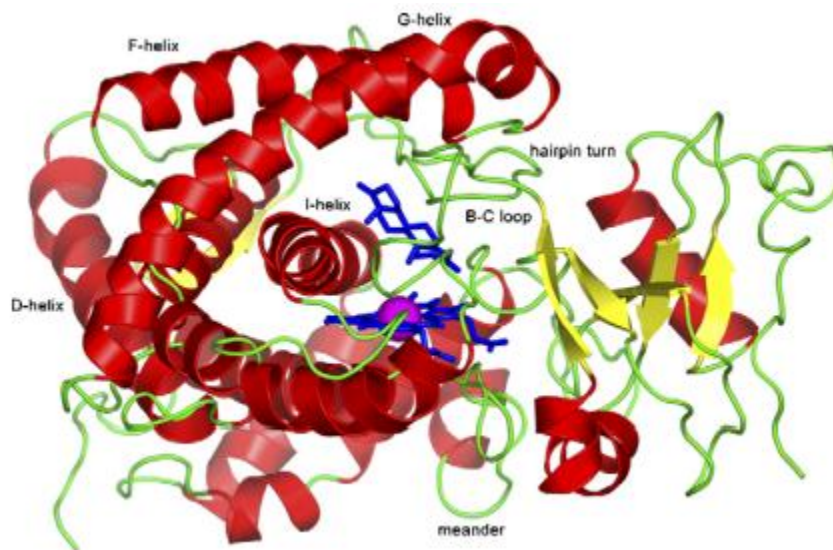
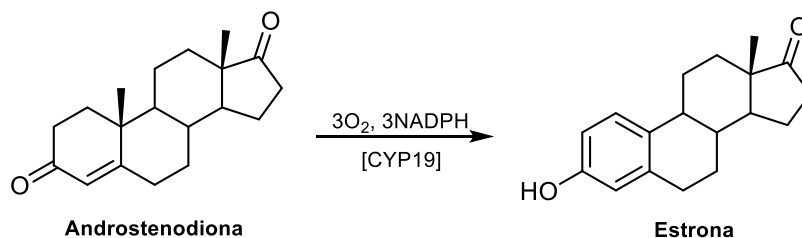


Figura 2. Una vista general de la estructura de la aromatasa. Las hélices son de color rojo, las hojas son de color amarillo. El grupo hemo y el NADPH están coloreados de azul y el hierro del grupo hemo se muestra como una esfera magnética morada.³⁷

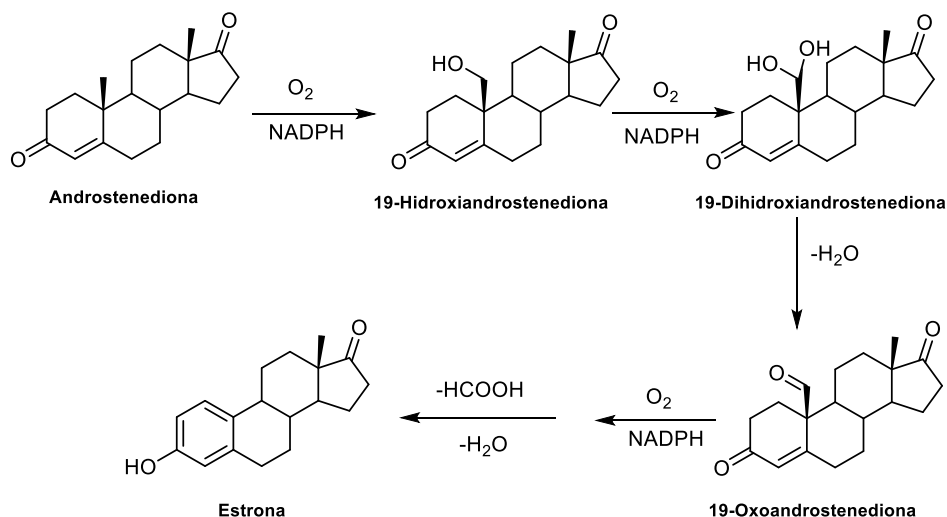
La aromatasa se expresa principalmente en los ovarios de las mujeres premenopáusicas, en la placenta de las mujeres embarazadas y, además, en el tejido adiposo periférico, el tejido mamario y el cerebro.³⁹ La enzima se sobreexpresa en o cerca del tejido del cáncer de mama y, por lo tanto, es responsable de la producción local de estrógenos y de la proliferación del tumor del cáncer de mama.⁴⁰

La aromatasa humana cataliza la reacción donde el anillo A de testosterona o androstenediona se aromatiza produciendo estradiol o estrona, respectivamente. Además también cataliza la desmetilación del metilo 19. La reacción tiene lugar en el sitio activo de la aromatasa, requiere de 3 moles de oxígeno y 3 moles de NADPH por 1 mol de sustrato (Esquema 3).⁴⁰



Esquema 3. La reacción neta catalizada por la aromatasas de andrógenos (androstenediona) a estrógenos (estrona) que requiere 3 moles de oxígeno y 3 moles de NADPH.

La aromatización procede con tres pasos oxidativos consecutivos, en donde los primeros dos pasos implican hidroxilaciones consecutivas del grupo metilo C-19. La primera hidroxilación da el intermedio hidroxi C-19 y la segunda hidroxilación es un paso que forma gemdiol C-19, el cual se deshidrata formando aldehído en C-19. El último paso implica la escisión oxidativa del enlace entre C-10 y C-19 que da como resultado la aromatización del anillo A con la posterior liberación del ácido fórmico (Esquema 4).⁴²



Esquema 4. Mecanismo en cascada para la aromatización del anillo-A durante la biosíntesis de estrona.

Otro mecanismo postulado por Ghosh et al. es el que involucra la 2,3-enolización en el anillo A, la cual podría iniciarse por dos residuos de aminoácidos Ala₃₀₆CO-HOThr₃₁₀ de la enzima a través de un ataque nucleofílico. Uno de los pasos importantes involucrados en esta cascada de mecanismos, es decir, el ataque electrofílico al grupo carbonilo C-3 por un residuo de Asp₃₀₉ protonado, da como resultado la aromatización del anillo A del esteroide

sin hidroxilación del C-19 (Fig. 3a y 3b). También se especula sobre la participación de una molécula de agua catalítica.⁴³

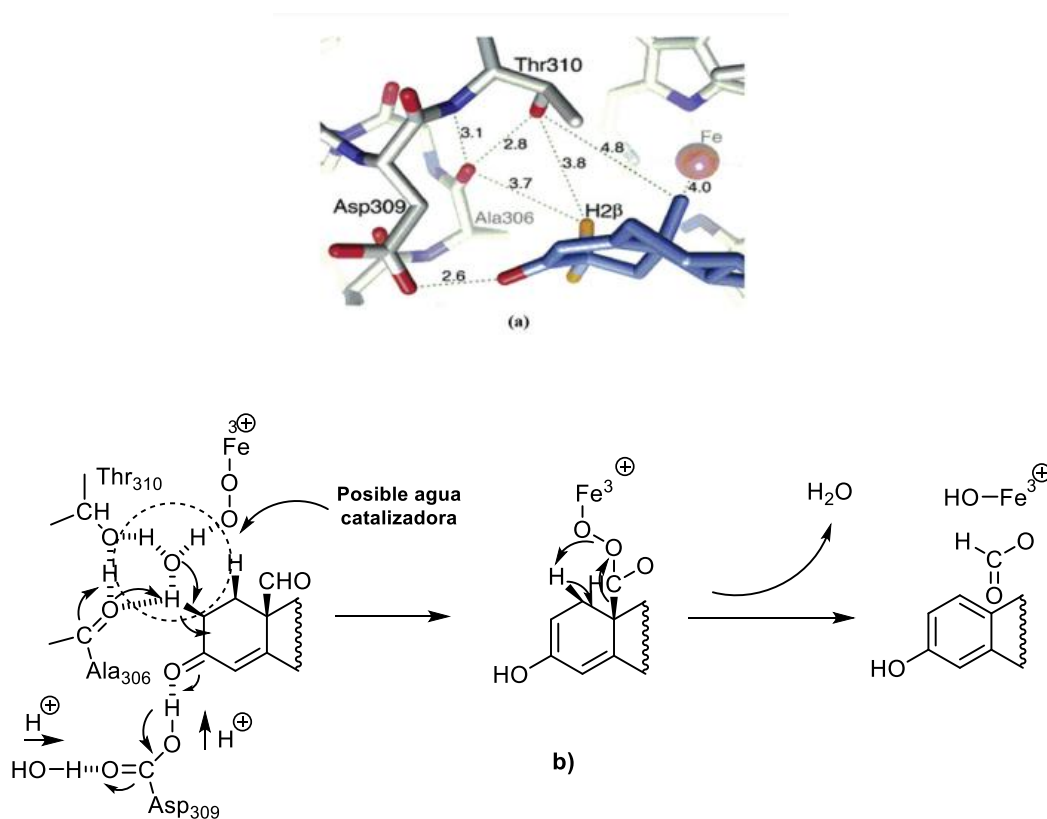
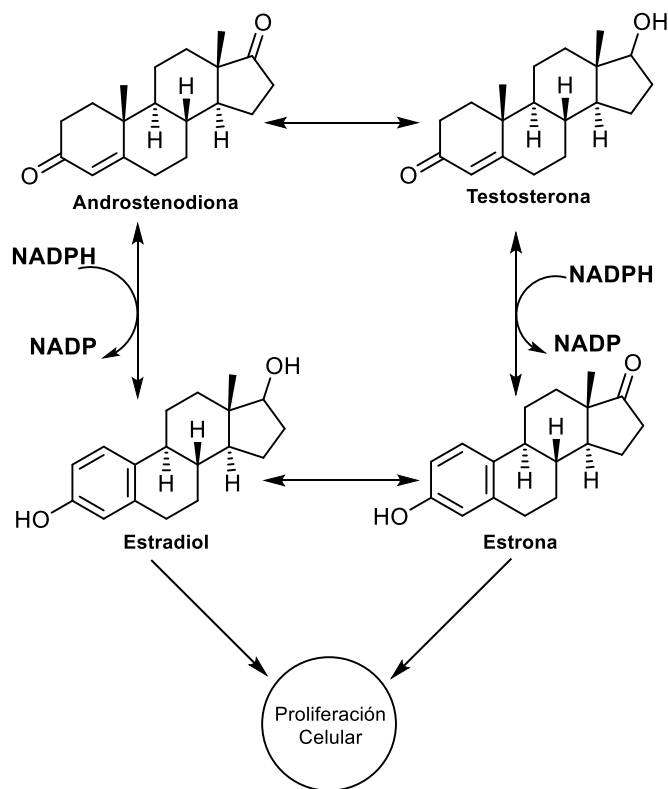


Figura 3. a) Vista del primer plano para la aromatización del anillo-A a través del par Ala₃₀₆CO-HOThr₃₁₀ junto con la posición del átomo de hidrógeno del C-2⁴³ b) Cascada del mecanismo que representa la abstracción del 2β-H por función del par Ala₃₀₆CO-HOThr₃₁₀ y también muestra la naturaleza nucleófila del oxígeno de molécula de agua.

Un enfoque en el tratamiento del cáncer dependiente de hormonas es interferir con la producción de hormonas endógenas. Al inhibir la enzima aromatasa, se reduce la producción de estrógenos y se detiene o reduce el crecimiento del tumor. Los inhibidores de la aromatasa (IA) tienen la capacidad de bloquear o inactivar la aromatasa, evitando así la biosíntesis de estrógenos, lo que resulta en una disminución de la proliferación celular (esquema 5).⁴⁴



Esquema 5. Mecanismo de acción de los inhibidores de la aromatasa.

Inhibidores esteroideos y no esteroideos de la aromatasa

Los IA se pueden clasificar en dos tipos según su modo de acción; tipo I (esteroideos) y tipo II (no esteroideos). En 1973, Harry y Angela Brodie trabajaron en la bioquímica de la aromatasa para mejorar la terapia endocrina del cáncer de mama y desarrollaron una serie de IA esteroideos.⁴⁵ Dedujeron que el derivado esteroideo de la 4-hidroxi-androstenediona (4-OH-A) se consideraba más potente como IA entre otros análogos sintetizados. La aminoglutetimida se usó inicialmente para tratar la epilepsia, pero más tarde, en la década de 1970, se convirtió en el primer inhibidor de la aromatasa no esteroideo (Figura 4).⁴⁶

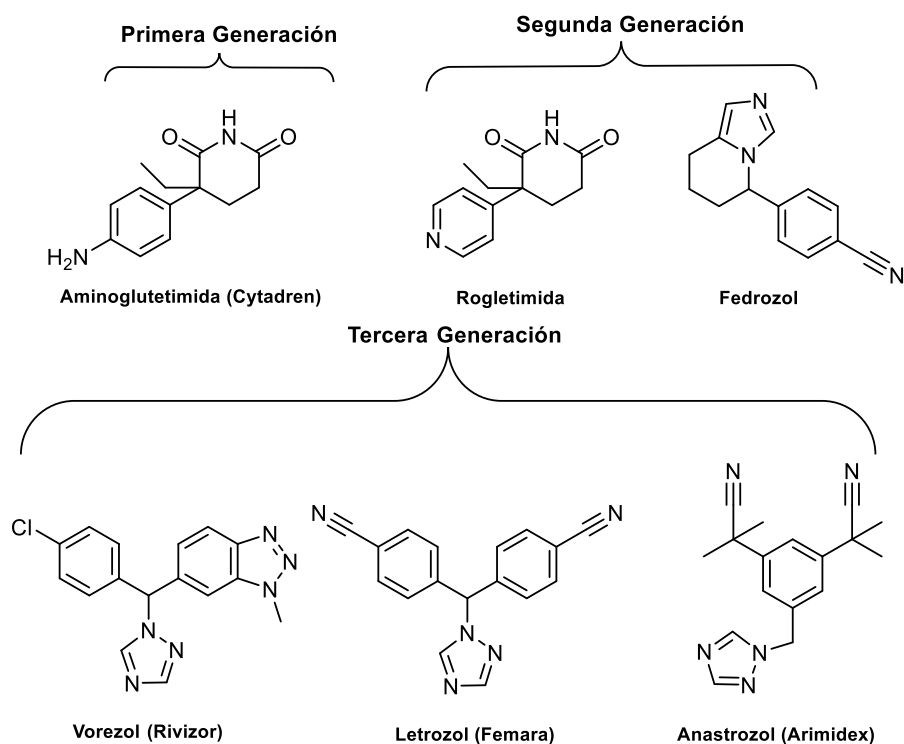


Figura 4. Estructuras químicas de inhibidores de la aromatasa no esteroideos (heterocíclicos) clínicamente aprobados (aminoglutetimida, fadrozol, anastrozol, letrozol y vorozol) y en ensayos clínicos; rogletimida.

Los agentes de tipo II actúan principalmente como inhibidores competitivos formando complejos de coordinación entre uno de los heteroátomos (O, N y S) presentes en la estructura del inhibidor y el grupo hemo del CYP-450.⁴⁷

La aminoglutetimida se consideró un prototipo de los inhibidores de la aromatasa de tipo II y se le denominó como el inhibidor de la aromatasa de primera generación para tratar el cáncer de mama. En 1981, Richard Santan informó que la aminoglutetimida también inhibe la enzima CYP11, que convierte el estrógeno en pregnenolona, lo que aumenta la toxicidad en las vías endocrinas.⁴⁸

Posteriormente, se prohibió en el mercado y se reemplazó con IA de segunda generación, durante las décadas de 1980 y 1990, se desarrollaron los IA de segunda generación, como el fadrozol. Sin embargo, se encontró que el fadrozol que contiene el grupo imidazol es 700 veces más potente y más selectivo que la aminoglutetimida, pero este fármaco también mostró cierta actividad de inhibición no selectiva hacia otros esteroides como la progesterona y la aldosterona.⁴⁹

En el año 1992, la rogletimida se estudió ampliamente en ensayos clínicos y fracasó debido a algunos efectos secundarios indeseables. Los fármacos sustituidos con triazol, como vorozol, letrozol y anastrozol, se denominaron como IA de tercera generación que mostraron efectos secundarios reducidos y un perfil superior de toxicidad.⁵⁰

En 1995 y 1998, la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) aprobó solo el anastrozol y el letrozol para el tratamiento endocrino del cáncer de mama en etapa temprana y avanzada en mujeres posmenopáusicas. Además, los IA también tienen importancia terapéutica para tratar trastornos como la endometriosis, los miomas uterinos, el cáncer de endometrio y la ginecomastia en los hombres.⁵¹

Los agentes inhibidores de la aromatasa del tipo I esteroideos, son inhibidores competitivos que tienen una estructura similar con el sustrato o actúan como inhibidores suicidas como formestano [4-hidroxiandrostenediona (4-OHA)], y exemestano. Estos inhibidores poseen un mecanismo que consiste en imitar al sustrato convirtiéndolo en un intermediario reactivo que inactiva la enzima aromatasa uniéndose a ella de manera irreversible (Figura 5).^{52, 53}

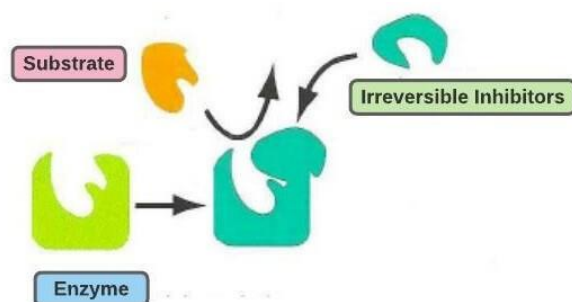


Figura 5. Mecanismo de inhibidores irreversibles.⁵²

Los inhibidores basados en mecanismos de mimetización provocan la inactivación dependiente del tiempo de la enzima aromatasa, catalíticamente activa. En ausencia del cofactor NADPH, no se produce la inactivación de la enzima aromatasa. Estos inhibidores también se denominan "inhibidores irreversibles activados por enzimas, sustratos suicidas o inactivadores suicidas". Estos inhibidores forman enlaces no covalentes con el sitio activo de la aromatasa al competir con el sustrato (androstenediona) y reducir la cantidad del producto formado.⁵⁴

Los inhibidores esteroideos exhiben el mismo patrón de unión hacia el CYP-450 como lo muestra la androstenediona. Por lo que se han desarrollado varios inhibidores de la aromatasa esteroideal mediante la sustitución de varias posiciones del andamio de androstenediona con diversos restos químicos.⁵⁵ El esqueleto del anillo de androstano forma la estructura básica de los inhibidores de la aromatasa tipo I, que muestra afinidad hacia el sitio de unión del sustrato de la enzima. Las relaciones entre estructura y actividad de estos inhibidores han sido bien revisadas en la literatura.⁵⁶

Se encontró que los inhibidores de la aromatasa esteroideos como la testolactona y la metildienolona tienen un metabolismo desfavorable y una biodisponibilidad oral deficiente. La búsqueda de mejores agentes que no tuvieran estas desventajas condujo al descubrimiento del exemestano. Éste demostró ser más eficaz y de gran potencial como tratamiento de primera línea del cáncer de mama sobre los otros fármacos existentes (Figura 6).⁵⁷

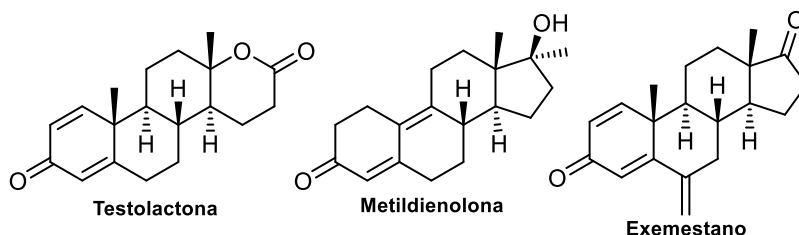


Figura 6. Inhibidores de la aromatasa esteroideos.

El andamio básico de esteroides es la estructura más privilegiada. Los esteroides han sido dotados de un amplio espectro de actividades biológicas. Los químicos medicinales han explotado el esqueleto de esteroides modificándolo químicamente para obtener muchos agentes medicinales útiles.⁵⁸

Una clasificación clara de las moléculas de esteroides sobre la base de las variaciones estructurales que acompañan a los cambios en la actividad inhibidora de la aromatasa no es posible debido a la complejidad involucrada en sus estructuras. Pero se ha tratado de clasificar las modificaciones químicas sobre la base de los cambios efectuados en los anillos individuales del esqueleto de esteroides (Tabla 1).^{59, 60}

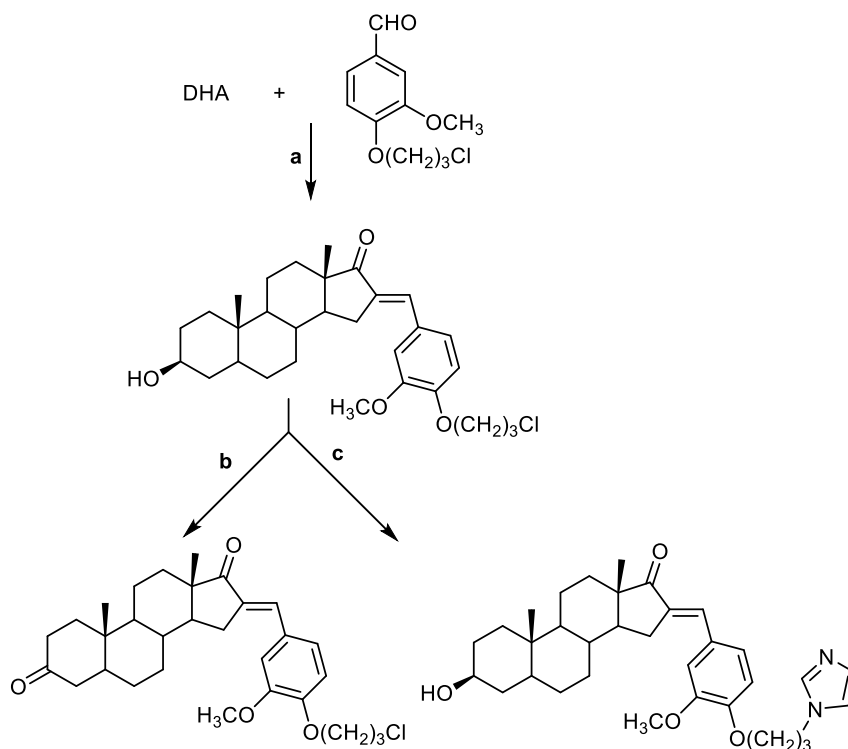
Tabla 1. Clasificación de inhibidores tipo I

Derivados sustituidos del anillo A	Derivados sustituidos del anillo B	Derivados sustituidos de la unión anular A-B	Derivados sustituidos del anillo D	Derivados modificados del anillo D
2- Androstanos sustituidos	6- Androstanos sustituidos	10- Esteroides sustituidos	15- Androstanos sustituidos	Modificando la cadena lateral
3-Androstanos sustituidos	7- Androstanos sustituidos	19-Androstanos sustituidos	16- Androstanos sustituidos	Añadiendo heterociclos
4-Androstanos sustituidos	N/A	N/A	17-Androstanos sustituidos	Añadiendo heterociclos espiro

Inhibidores esteroideos de la aromatasas modificados mediante anillos heterociclos nitrogenados

A pesar del éxito de los IA esteroideos y no esteroideos de segunda y tercera generación, todavía presentan algunos efectos secundarios importantes, entre los cuales destaca principalmente el aumento de la pérdida ósea. Por esta razón, es importante buscar otras moléculas potentes y específicas con menores efectos secundarios. Sin embargo, los derivados modificados de la cadena D, los 16 y 17-Androstanos que poseen incorporaciones de heterociclos como los azoles u otros grupos forman potentes y específicos inhibidores del P450, mejorando la especificidad de los inhibidores esteroideos y disminuyendo los efectos secundarios que puedan generar.⁶¹

En 2011 Bansal y colaboradores sintetizaron derivados esteroidales con sustitución en la posición 16 que actuaron como potentes agentes citotóxicos. La preparación de los 16E-arilidensteroides incluye rutas sintéticas que inicia la condensación aldólica catalizada por una base de dehidroepiandrosterona (DHA) con 4-(3-cloropropoxi)-3-metoxibenzaldehído que se llevó a cabo a temperatura ambiente para producir el producto aldólico esteroideal, posteriormente se añade el imidazol mediante fusión (Esquema 6). Con base a este producto se generan posteriores derivados que resultaron en potentes inhibidores de la aromatasas.



a) MeOH, KOH, Tamb; **b)** Al(*t*-BuO)₃, ciclohexano y reflujo 5 h, **c)** imidazol, fusión 110-120 °C, 5 h.

Esquema 6. Ruta sintética de la formación de la síntesis de IA de esteroides de imidazolio.

Los nuevos análogos de esteroides del imidazolilo exhibieron efectos citotóxicos significativos cuando se examinaron contra tres líneas celulares de cáncer; MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmón) y SF-268 del sistema nervioso central (SNC), a una concentración de 100 mM y efectos citotóxicos sensibles posteriormente en 60 líneas celulares de cáncer derivadas de nueve tipos de cáncer (leucemia, cáncer de pulmón, colon, SNC, melanoma, ovario, riñón, próstata y mama). Además de que mostraron 13 veces más potencia en comparación a la aminoglutetimida.⁶²

En el 2018 Caporuscio y colaboradores establecieron una selección exitosa de acoplamiento molecular de alto rendimiento (HTD, por sus siglas en inglés) e identificaron inhibidores de la aromatasa altamente activos con nuevos motivos estructurales, como por ejemplo los compuestos que contienen derivados de imidazol, morfolina y morfolinona.

En dicho proyecto se estableció una selección exitosa de HTD de una biblioteca de diversos compuestos. Se identificaron inhibidores altamente activos con nuevos motivos estructurales, como por ejemplo los compuestos que contienen sulfonamida, derivados de

imidazolil, derivados de morfolina y morfolinona. Estos últimos 2 mostraron altas interacciones con la aromataasa y alto reconocimiento de ligandos de proteínas, particularmente en sitios activos altamente flexibles del Cyp19 (Figura 7). Esto indica una muy alta probabilidad de que puedan ejercer como inhibidores de la aromataasa.⁶³

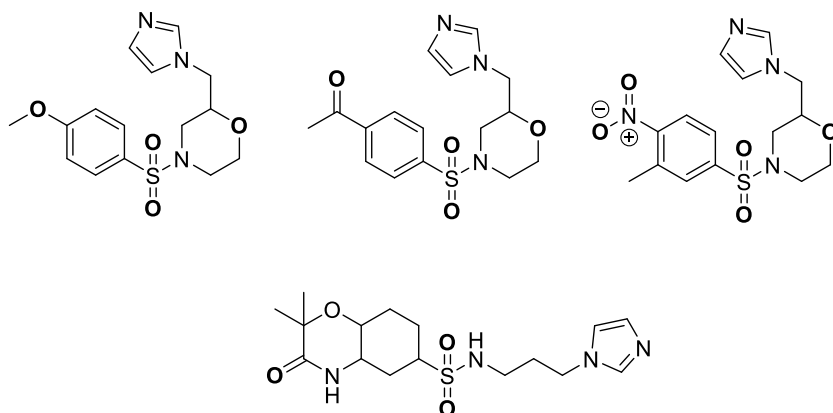


Figura 7. Compuesto analizados por Caporuscio mediante HDT que tuvieron los mejores resultados como agentes antiproliferativos frente a diversas líneas de cáncer.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente capítulo de la Tesis Doctoral es la síntesis de morfolinona de estrona y sus intermediarios, evaluar su potencial como agentes antiproliferativos y de forma teórica su posible acción como un inhibidores de la aromatasas Cyp19.

Objetivos particulares

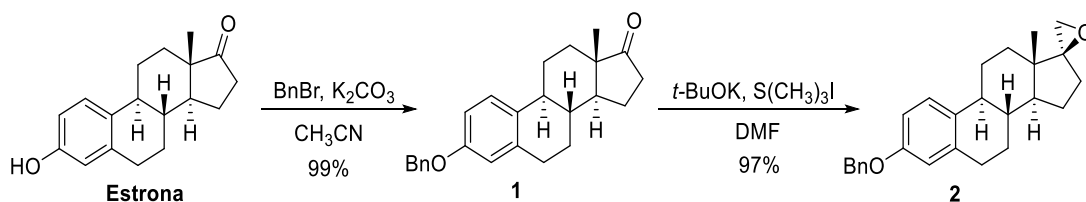
1. Realizar la síntesis de un heterociclo de espiromorfolinona en el C-17 de la estrona.
2. Efectuar la caracterización estructural de los compuestos preparados.
3. Realizar la evaluación biológica de los compuestos preparados como agentes antiproliferativos frente a diferentes líneas celulares de cáncer humano.
4. Evaluar mediante docking molecular de los compuestos preparados para determinar su posible actividad como inhibidores de la aromatasas.

Discusión de resultados

Síntesis de la morfolina esteroidal

En la primera parte de este proyecto se emplearon metodologías reportadas en la literatura para la obtención de la morfolina esteroidal.⁶⁴ La síntesis se inició como se muestra en el esquema 7 con la transformación de estrona en bencilstrona (**1**). Esta reacción se llevó a cabo a reflujo durante 8 horas, empleando como disolvente CH₃CN, 1 equivalente (eq) de estrona, 1.49 eq de K₂CO₃ y 1.22 eq de BnBr obteniendo un rendimiento del 99%. En la segunda etapa el compuesto **1** se transformó al epoxiespiroesteroide (**2**), la reacción se realizó bajo condiciones anhidras a temperatura ambiente durante 45 minutos utilizando DMF como disolvente, 1 eq del compuesto **1**, 1.62 eq de yoduro de trimetil sulfonio (SMI₃) y 2.2 eq de *t*-BuOK el rendimiento obtenido fue del 97%.

Como se describió para la obtención del compuesto **2**, primeramente, fue necesario realizar una reacción de sustitución nucleofílica en el grupo hidroxilo del C-3 con la finalidad de proteger dicho grupo para las siguientes reacciones. Después al compuesto **1** se le realizó una reacción de Corey-Chaykovsky para obtener de forma estereoselectiva el epoxiespiroesteroide.



Esquema 7. Obtención del compuesto **2** a partir de estrona.

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 8) se observan todas las señales características para este compuesto, a frecuencias altas (7.45–7.37 ppm) se observan las señales de los hidrógenos aromáticos que integran para 8 H, a 5.02 ppm la señal simple de los dos hidrógenos del metileno unido al bencilo, en 0.85 ppm se encuentra la señal simple del metilo en la posición del C-18, en 2.81 ppm la señal que corresponde a los dos hidrógenos del metileno del C-6, entre 1.23-2.30 ppm las señales del resto del cuerpo esteroidal que

integra para 13 y las principales señales del epóxido aparecen como dos señales dobles a frecuencias bajas (2.99-2.68 ppm) pertenecientes a cada uno de los protones del metileno del epóxido (19a y 19b).

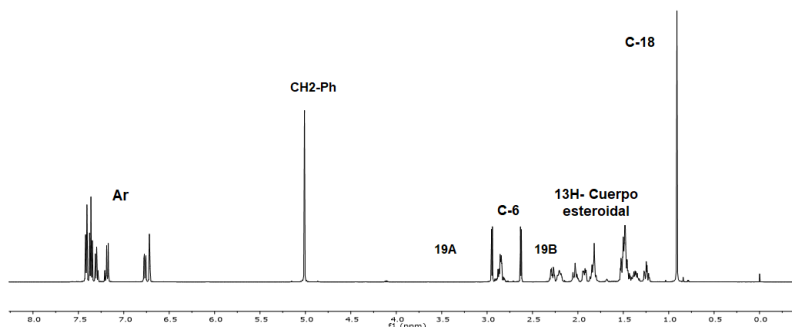
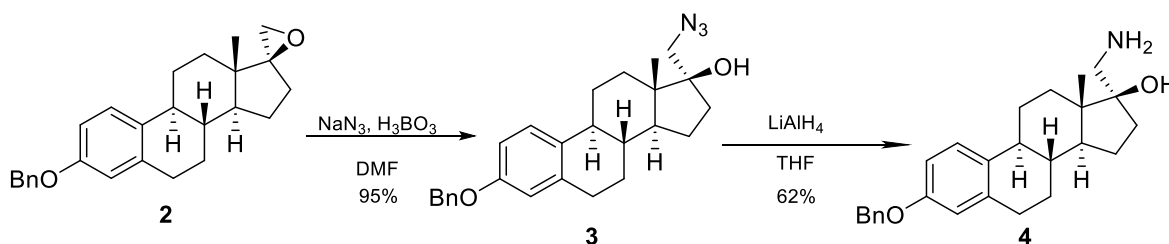


Figura 8. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **2**.

En el esquema 8 se muestra que la síntesis continuó con la conversión del compuesto **2** en la azida de estrona **3**, éste proceso se realizó bajo condiciones anhidras durante 3 h usando DMF como disolvente, 1 eq del compuesto **2**, 4.22 eq de H_3BO_3 y 10 eq de NaN_3 , se obtuvo un rendimiento del 91%. La cuarta etapa de la síntesis consistió en obtener el aminoalcohol de estrona **4** a partir del compuesto **3**. Esta reacción se realizó bajo condiciones anhidras durante 1 h a reflujo utilizando THF como disolvente, 1 eq de **3** y 10 eq de LiAlH_4 con un rendimiento final del 62%.

Para las reacciones antes descritas se realizó una apertura al epóxido de estrona mediante una sustitución nucleofílica dirigida por la azida de sodio obteniendo **3** el cual se redujo con LiAlH_4 para obtener **4**.



Esquema 8. Obtención del compuesto **4** a partir de **2**.

El espectro de RMN de ^1H (Figura 9) muestra un cambio significativo de **4** con respecto a **2**, el desplazamiento de las dos señales dobles del metileno de C-19 se encuentra a frecuencias más altas de 3.33 ppm y 3.62 ppm.

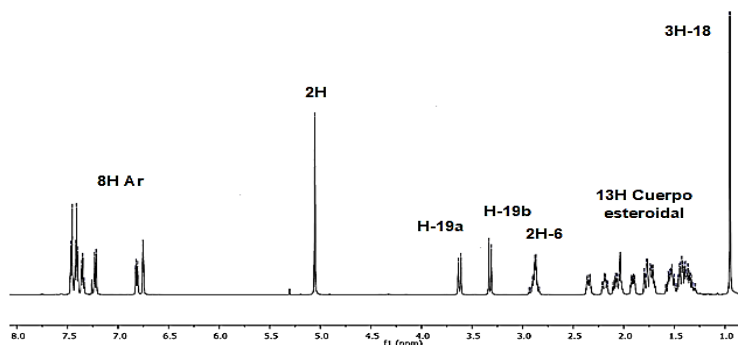
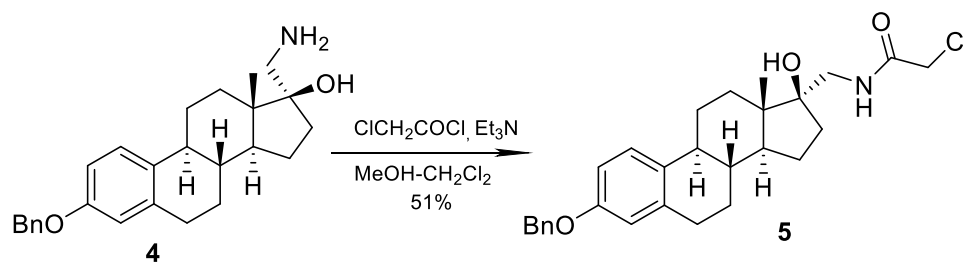


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4**.

Obtención de la hidroxicloroacetamida esteroidal

En el esquema 9 se observa que la quinta etapa de la síntesis consiste en la formación de la hidroxicloroacetamida de estrona (**5**) a partir de **4**, la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 4 h en $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$, 1 eq de **4**, 1 eq $(\text{ACO})\text{Cl}_2$ y 2 eq de Et_3N . Esta etapa tuvo un rendimiento del 51%. La reacción consiste en una sustitución nucleofílica del aminoalcohol sobre el cloruro de cloro acetilo.



Esquema 9. Obtención del compuesto **5** a partir de **4**.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 10) se observa la aparición de una señal simple que corresponde a los dos hidrógenos del metileno alfa al carbonilo. Esta señal se encuentra a 4.11 ppm.

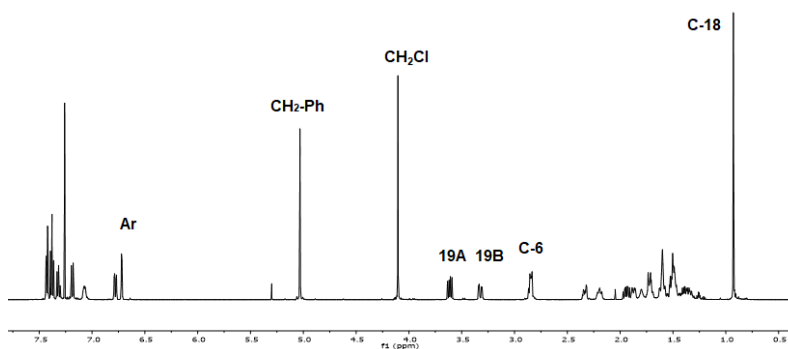
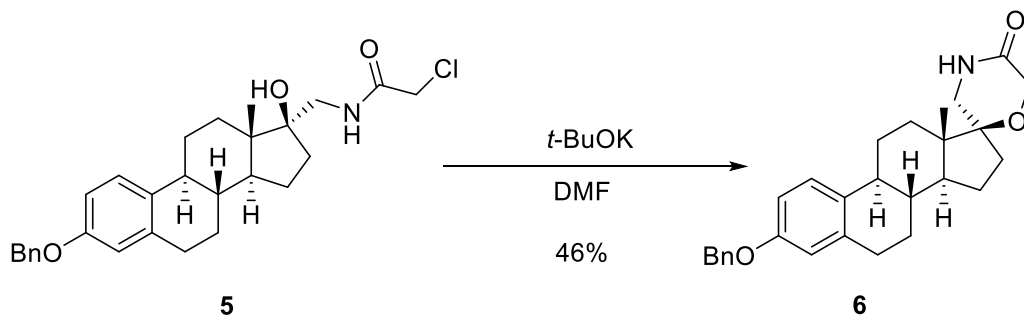


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **5**.

Obtención de la morfolinona esteroidal

En el esquema 10 se muestra la sexta etapa de la síntesis, la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 6 h en DMF, 1 eq de **5** y 3.86 eq de *t*-BuOK, la reacción tuvo un rendimiento del 46%. El mecanismo de esta etapa es una ciclación intramolecular de la hidroxicloroacetamida esteroidal mediada por una sustitución nucleofílica.



Esquema 10. Obtención de **6** a partir de la ciclación intramolecular de **5**.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 11) se observa la aparición de las señales de los hidrógenos heterociclos, por ejemplo, las dos señales dobles de los hidrógenos de C-5' se encuentran en 3.23 ppm y 3.64 ppm las cuales integran para 1 protón cada una, mientras que la señal cuádruple correspondiente de C-2' se localiza a frecuencias más altas, 4.26 ppm, la cual integra para dos protones.

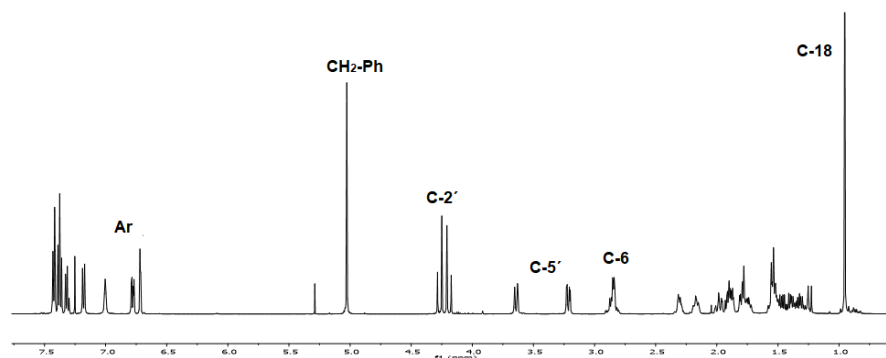


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **6**.

Obtención de la morfolina esteroidal

Para obtener el compuesto **6A** a partir de **6** se realizaron varios ensayos los cuales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Ensayos realizados para obtener el compuesto **6A** a partir de la reducción de **6**.

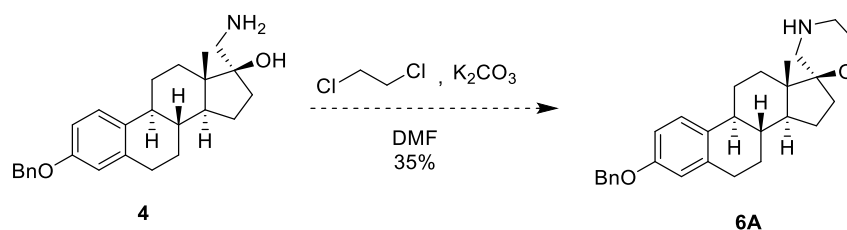
No	Reductor/Reactivo (R/R)	Equivalentes R/R	Condiciones	Temperatura	Tiempo
1	LiAlH_4	2	Anhidras	Ambiente	12 h
2	LiAlH_4	4	Anhidras	Ambiente	12 h
3	LiAlH_4	5	Anhidras	Ambiente	12 h
4	LiAlH_4	10	Anhidras	Ambiente	12 h
5	LiAlH_4	10	No Anhidras	Ambiente	12 h
6	LiAlH_4	10	Anhidras	80 °C	12 h
7	LiAlH_4	10	Anhidras	80 °C	24 h
8	LiAlH_4	10	Anhidras	80 °C	48 h
9	LiAlH_4	10	Anhidras	80 °C	72 h
10	LiAlH_4	10	No Anhidra	80 °C	12 h
11	LiAlH_4	10	No Anhidra	80 °C	24 h
12	LiAlH_4	10	No Anhidra	80 °C	48 h
13	LiAlH_4	10	No Anhidra	80 °C	72 h
14	NaBH_4	10	Anhidra	80 °C	12 h
15	NaBH_4	10	Anhidra	80 °C	24 h
16	NaBH_4	10	Anhidra	80 °C	48 h
17	NaBH_4	10	No Anhidra	80 °C	12 h
18	NaBH_4	10	No Anhidra	80 °C	24 h
19	NaBH_4	10	No Anhidra	80 °C	48 h

Nota: En todos los ensayos se utilizó THF como disolvente.

No hubo cambio alguno en la materia prima en todos los ensayos presentados en la tabla 2, con excepción de 6, 13 y 19 en donde se produjo una degradación del compuesto **6**. Debido

a esto fue necesario implementar una metodología diferente para poder obtener la morfolina esteroidal, optando por usar el aminoalcohol como materia prima.

Debido a lo anterior se llevó a cabo la formación del compuesto **6A** a partir de **4**, (esquema 11) siendo además la última etapa de la síntesis realizada actualmente, en condiciones anhidras a 40 °C durante 24 h en DMF, 1 eq de **6**, 10 eq de K₂CO₃ y 10 eq de ClCH₂CH₂Cl. La reacción tuvo un rendimiento del 35%. Esta reacción es una doble sustitución nucleofílica del aminoalcohol hacia el dicloroetano para obtener el heterociclo de morfolina.



Esquema 11. Obtención del compuesto **6A** a partir de **4**.

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 12) se observa la aparición de la señal de los hidrógenos en C-3' que se encuentra a 3.65 ppm. Esta señal que integra para 2 protones es la más importante del compuesto **6A** ya que evidencia la reducción del carbonilo que se encontraba en esa misma posición. Además, las dos señales dobles de los hidrógenos de C-5' ahora se encuentran en 3.10 ppm y 4.00 ppm, cada una integra para 1 protón, mientras que la señal de los hidrógenos de C-2' se localiza a 4.35 ppm, esta señal integra para dos protones.

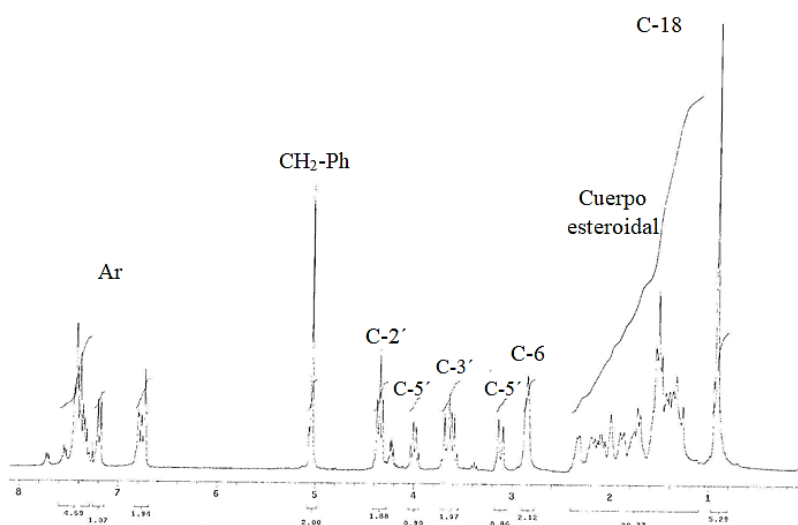


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del compuesto **6A**.

Es importante mencionar que después de la pandemia, se intentó replicar la formación de compuesto **6A**, sin embargo, al parecer la metodología antes descrita para su formación no fue reproducible, por lo que se optó por dejar el proyecto en cuanto a la síntesis hasta la formación del compuesto **6**.

Ensayos antiproliferativos de los intermediarios de la morfina esteroidal

Para estudiar la actividad antiproliferativa de los compuestos sintetizados, los derivados esteroideos **5** y **6** se examinaron frente a un panel de seis líneas celulares de tumores sólidos humanos representativas: A549 (células de pulmón no pequeñas), HBL-100 (mama), HeLa (cuello uterino), SW1573 (pulmón de células no pequeñas) como líneas celulares sensibles a fármacos, y T-47D (mama) y WiDr (colon) como líneas celulares resistentes a fármacos. Las líneas celulares se eligieron para los ensayos debido a que los cánceres de mama, pulmón y colorrectal son los tipos de cáncer más comunes en hombres y mujeres en todo el mundo; mientras que el cáncer de cuello uterino fue el cuarto cáncer más común en mujeres informado en 2020.^{65, 66, 67} Además, las líneas seleccionadas nos permiten evaluar su acción antiproliferativa tanto en carcinomas dependientes de estrógenos (A549 y T-47D) como en líneas independientes de estrógenos (HBL-100, HeLa, SW1573 y WiDr).

La actividad antiproliferativa se expresa como el valor GI_{50} , la concentración a la que el compuesto inhibe el 50% de la proliferación celular. Los agentes anticancerígenos

esteroideos abiraterona y galeterona también se probaron para comparar sus valores antiproliferativos.

Los valores de GI_{50} obtenidos de los derivados esteroideos **5** y **6** revelan que ambos compuestos son potentes agentes antiproliferativos con la mayoría de los valores en el rango micromolar bajo (0,25-11 μ M). Los compuestos probados tenían mejores valores de GI_{50} que los agentes anticancerígenos en casi todas las líneas celulares de cáncer. Sin embargo, el derivado de hidroxiclороacetamida **5** mostró ser más potente que el derivado de espiromorfolinona **6** con valores de GI_{50} por debajo de **5** μ M en las seis líneas celulares (0.25–2.4 μ M), siendo más selectivo para la línea de cáncer de pulmón SW1573. Cabe señalar que ambos compuestos tienen valores notables frente a las líneas celulares resistentes a fármacos T-47D y WiDr (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de los ensayos antiproliferativos de los intermediarios de morfolina esteroidal frente a 6 líneas celulares de cáncer humano.

Compuesto	HBL-100 (MAMA)	T-47D (MAMA)	A549 (PULMÓN)	SW1573 (PULMÓN)	WiDr (COLON)	Hela (CUELLO UTERINO)
5	2.4 \pm 0.65	1.8 \pm 0.61	1.2 \pm 0.27	0.25 \pm 0.098	1.9 \pm 0.14	1.7 \pm 0.28
6	11 \pm 3.1	2.0 \pm 0.32	3.5 \pm 0.15	8.0 \pm 1.7	4.1 \pm 1.1	4.6 \pm 2.2
Abiraterona	>100	24 \pm 4.5	95 \pm 8	85 \pm 8.9	42 \pm 7.7	7.9 \pm 0.5
Galaterona	10 \pm 0.9	2.1 \pm 0.1	3.9 \pm 1.3	3.9 \pm 0.5	2.7 \pm 0.2	5.3 \pm 0.4

Ensayos in silico

Las propiedades moleculares y fisicoquímicas de los derivados esteroideos se obtuvieron mediante los programas online de Molinspiration y AdmetStar. Estos servidores calculan y predicen las características de los compuestos mediante una base de datos que se alimenta de forma constante. Los datos proporcionados permiten determinar de manera objetiva la biodisponibilidad, dianas moleculares y celulares.⁶⁸

Los compuestos **5-7** (Figura 13) fueron analizados mediante el servidor en línea de Molinspiration, el cual nos proporciona datos de la biodisponibilidad de estos compuestos que se muestran en la tabla 4.

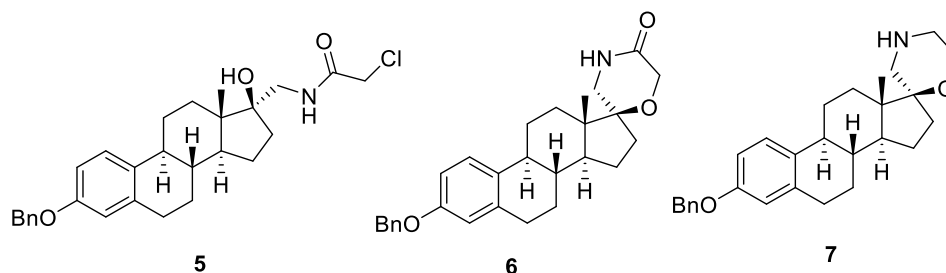


Figura 13. Derivados esteroides evaluados en los ensayos *in silico* (compuesto **5-7**).

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de los compuestos **5-7**.

Compuesto	LogP	MW	nON	nOHNH
5	5.65	467.22	3	1
6	3.92	431.25	2	1
7	4.15	417.27	4	2

Los resultados de la tabla 4 son de suma utilidad para determinar la función farmacológica o actividad biológica que pudiera cumplir un compuesto químico una vez que es ingerido, es decir; nos ayuda a identificar si un fármaco en particular cumple con la regla de los cinco de Lipinski, la cual consta de los siguientes 4 puntos:⁶⁹

- Peso molecular menor de 500 uma.
- Número de donadores de puente hidrógeno igual o menor a 5.
- Número de aceptores de puente hidrógeno igual a menor a 10.
- Log P calculado menor a 5.

Los compuestos **5-7** cumplen con todos los requisitos de la regla de Lipinski, solo el Log P del compuesto **5** es mayor (5.65), los otros 2 compuestos poseen valores de LogP de 3.92-4.15. Los valores de nON (aceptor de puentes de hidrógeno) son de 4-2, los nOHNH

(donador de puentes de hidrógeno) de 2-1 y el peso molecular (MW) es de menos de 500 en los 3 compuestos. Estos resultados sugieren que los compuestos serán permeables mediante un transporte pasivo, sin embargo, este no es el caso de los esteroides hormonales, pues se sabe que estos compuestos no entran a un sistema celular a través de un transporte pasivo. Incluso estudios recientes indican que es muy posible que los esteroides hormonales, como la estrona y testosterona, entren a la célula mediante un transporte activo primario que se basa en un sistema de lanzaderas, en donde los esteroides son transportados a través de proteínas dependientes de ubiquinonas.⁷⁰

Las propiedades farmacocinéticas y biofarmacéuticas mediante servidor ADMESstar, los resultados se encuentran en la tabla 5.

Tabla 5. Propiedades farmacocinéticas y biofarmacéuticas de los compuestos **5-7**.

Compuestos Propiedad	5	6	7
GIA	Media	Media	Media
Permeabilidad BBB	No	No	No
Inhibidor de CYP1A2	Si	Si	Si
Inhibidor de CYP2C19	Si	Si	Si
Inhibidor de CYP2C9	Si	Si	Si
Inhibidor de CYP2D6	Si	Si	Si
Log K _p (permeabilidad en piel) cm/s	-1.17	-2.28	-2.04

En la tabla 5 se muestra que los compuestos **5-7** poseen una GIA lenta, parámetro que se refiere a su absorción por administración oral. También en la tabla se muestra que ninguno de los compuestos atraviesa la barrera hematoencefálica (permeabilidad BBB) lo que es un parámetro positivo para estos compuestos.⁷¹

El dato más interesante sobre los compuestos estudiados es que pueden interactuar con todos los receptores relacionados con el citocromo p450 (CYP), esto sugiere claramente que esta puede ser una diana de interés para estas moléculas.

Docking molecular

En la validación del modelo se obtuvo un valor de RMSD de $0.2912 \pm 0.018 \text{ \AA}$ y una energía de unión de -8.3711 Kcal/mol . En la figura 2A la molécula de TST (ligando cristalográfico) se une con su oxígeno 17β -hidroxilo y recibe un enlace de hidrógeno de la amida del esqueleto $-\text{NH}$ de Met_{374} . En los compuestos **5** y **6** la interacción con Met_{374} se llevó a cabo con el grupo carbonilo de la amida abierta y cíclica, respectivamente (Figura 3A y 3B). Las energías de unión de ambos compuestos (-10.1244 y -9.7851 , respectivamente) resultaron inferiores en comparación con la TST.⁷²

Además, estos compuestos presentaron interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos que rodean el sitio activo de la enzima (Trp_{224} , Phe_{221} , Phe_{134} , Ile_{133} , Val_{370} y Met_{374}), al interactuar con esta región, impiden la unión del sustrato endógeno y este no puede ser catalizado. Estas interacciones podrían explicar su mecanismo de acción frente a línea celular de cáncer de mama (RH+), HBL-100 y T-47D, impidiendo la conversión de androstenediona a estrona a través de la inhibición de la enzima aromatasa.

Cabe destacar que el acoplamiento molecular reveló una correlación con los ensayos antiproliferativos en células cancerosas dependientes de estrógenos (Tabla 3). El derivado de hidroxiclороacetamida **5** obtuvo una mejor puntuación ($-10,12 \text{ kcal/mol}$) que el derivado de espiromorfolinona **6** ($-9,79 \text{ kcal/mol}$). Estos resultados concuerdan claramente con la actividad antiproliferativa mostrada por estas moléculas.

En la Figura 14 y 15 se observan a los ligandos sintetizados en el bolsillo de unión a esteroides de la aromatasa, estos posibles inhibidores, utilizan de manera óptima la hendidura del sitio activo específico de andrógenos y se ha reportado que las interacciones con la grieta hidrofoba rodeada por Thr_{310} y Val_{370} podrían aumentar la afinidad de unión.

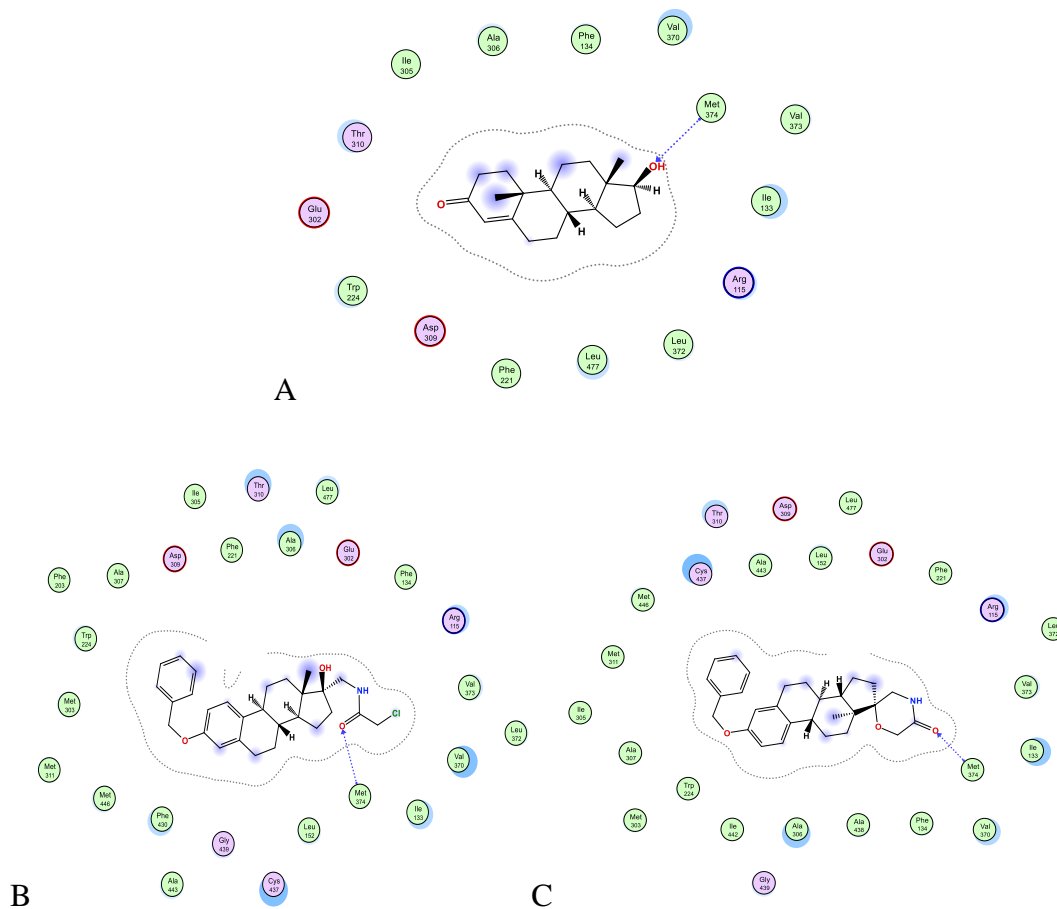


Figura 14. Representación 2D de la TST (A) y los compuestos **5** (B) y **6** (C) en la estructura cristalina de la aromatasa obtenida con el programa MOE.

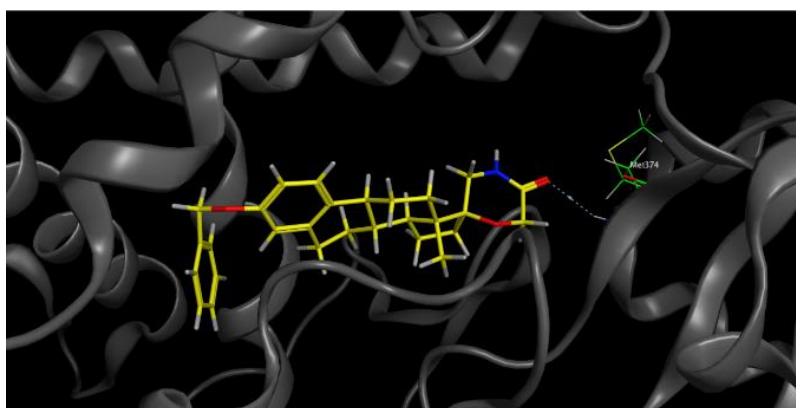
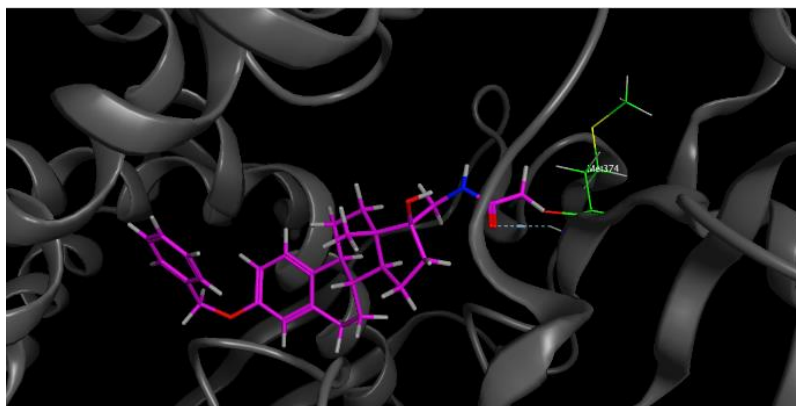


Figura 15. Representación 3D de los compuestos **5** (A) y **6** (B) en la estructura cristalina de la aromatasa obtenida con el programa MOE.

Conclusiones

Se llevó a cabo la obtención, aislamiento y caracterización espectroscópica de la morfolinona esteroideal y sus intermediarios (1-6). Los compuestos **5** y **6** fueron evaluados como agentes antiproliferativos frente a 6 diferentes líneas celulares obteniendo resultados muy prometedores sobre todo del compuesto **5**.

También se realizaron ensayos *in silico* de los compuestos **5-7** con citocromo p450, los resultados demostraron que esta proteína puede ser una diana molecular de estos compuestos y que las señales de apoptosis activadas por el citocromo puede ser la ruta por la cual los compuestos **5-6** actúan como agentes antiproliferativos.

Los estudios de acoplamiento molecular de los compuestos **5** y **6** con la aromatasa, sugieren que los derivados interaccionan con el sitio activo de la enzima, además la energía de unión más favorable que posee el compuesto **5** con la aromatasa concuerda con los resultados antiproliferativos de dicho compuesto, por lo que es posible que este compuesto sea un mejor agente inhibidor que la propia morfolinona esteroideal.

CAPITULO 2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN *IN SILICO* DE HÍBRIDOS DERIVADOS DE ESTRONA-CUMARINA COMO POTENTES INHIBIDORES DE LA 17 β -HSD1

Introducción

El cáncer de mama RH+ tiene demasiadas implicaciones en cuanto a las diferentes vías que intervienen en la biosíntesis de estrógenos. Pues son demasiadas las enzimas que se encuentran involucradas en cada paso de la esterogénesis; sulfatasa, aromatasas, sulfatasa transferasa, 17 β -HSD, entre otras. Esta última enzima, la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, cuya función principal es la de interconvertir cetonas en sus debidos alcoholes secundarios, también participa en la biosíntesis de estrógenos transformando la estrona (E1) en estradiol (E2).⁷³

Es por lo anterior que se han reportado un gran número de inhibidores para la 17 β -HSD, los cuales por su estructura se clasifican como esteroideos y no esteroideos. Y como en el caso de los inhibidores de la aromatasas, también los esteroideos para esta enzima son mucho más versátiles, ya que poseen una alta afinidad por el sitio activo de la enzima.⁷⁴

Aunque estas moléculas poseen dos grandes defectos para su uso; el primero es que son precursores del desarrollo de tumores, especialmente benignos, y la otra es su dualidad como agonista y antagonista.⁷⁵ Por lo que una manera de poder contrarrestar estas dos limitaciones es la de generar híbridos de los esteroideos con otro tipo de moléculas, eliminando el efecto estrogénico, produciendo de esta manera fármacos multidiana capaces de modular diferentes dianas simultáneamente.⁷⁶ Las moléculas híbridas disminuyen significativamente los efectos secundarios que generan las moléculas monodianas, ya que son mucho más específicas y no interactúan con cualquier tipo de molécula.⁷⁷

En este capítulo se propone el diseño de moléculas con 2 tipos diferentes de fragmentos farmacofóricos: la cumarinas como grupo polar, cadenas hidrocarbonadas como enlazadores y la estrona como grupo de reconocimiento enzimático.

Antecedentes

17 β -HSD; estructura, función y diferentes isoformas

Es importante destacar que alrededor de 40% de todos los cánceres humanos; cáncer de mama, próstata, ovario y útero, son sensibles a las hormonas esteroides y, por lo tanto, son posibles objetivos para la modulación de las actividades intracrinas, lo cual se refiere a la síntesis de esteroides en tejidos periféricos.⁷⁸

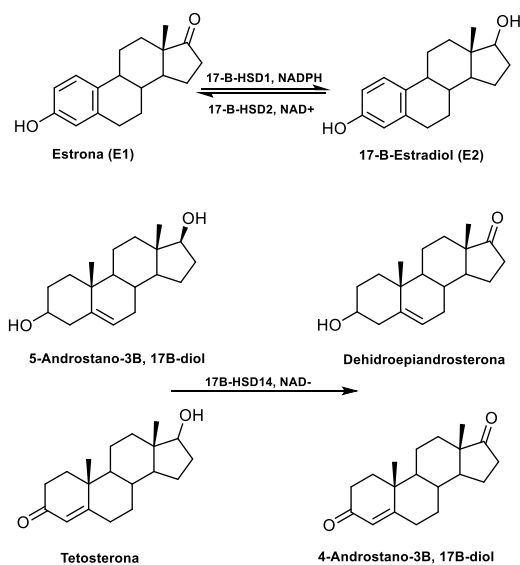
En el capítulo anterior de esta tesis doctoral se abordó el tema de cáncer de mama, y de manera particular el desarrollo de agentes antiproliferativos esteroideos, los cuales mediante estudios de docking molecular, se comprobó que pueden funcionar como potentes inhibidores de la aromatasa para el tratamiento del cáncer de mama.⁷⁹

Por lo tanto, es concebible que los inhibidores selectivos de 17 β -HSD sean igualmente efectivos, lo cual sería de alta importancia pues dichas enzimas están al igual que la aromatasa, altamente implicadas en la regulación de esteroides a nivel fisiológico.⁸⁰

Como se mencionó en el capítulo anterior una de las principales enzimas pertenecientes a la familia de las deshidrogenasa-reductasa son las enzimas 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, cuya función principal es la de interconvertir cetonas en sus debidos alcoholes secundarios.⁸¹

Las hidroxiesteroides deshidrogenasas (HSD) catalizan las reacciones de óxido-reducción de forma estereoespecífica de alcoholes o carbonilos utilizando NADPH o NAD⁺ como cofactor.⁸² Entre los diferentes HSD (3 α -, 3 β -, 11 β -, 17 β - y 20 α -HSD) que se encuentran en el ser humano, están los 17 β -HSD, como ya habíamos mencionado, que están involucrados en la formación y degradación de las hormonas esteroides y, por lo tanto, en su regulación.⁸³

Las 17 β -HSD catalizan la última reacción de la biosíntesis de la mayoría de los estrógenos y andrógenos activos, como el estradiol (E2), el 5 androstene-3 β ,17 β -diol (Δ 5-diol), la testosterona (T) y la dihidrotestosterona (DHT) (Esquema 12).⁸⁴



Esquema 12. Conversiones de hormonas esteroideas catalizadas por; 17β-HSD1, 17β-HSD2 y 17β-HSD14.

Al ser capaces de convertir las hormonas esteroideas inactivas o menos activas en otras más potentes y viceversa, las 17β-HSD desempeñan un papel clave en la regulación y función hormonal en el ser humano.⁸⁵

En la actualidad, se han caracterizado 14 isoformas de la 17β-HSD de diferentes mamíferos y, con la excepción de 17β-HSD5, 17β-HSD12 y 17β-HSD13 que son aldo-ceto reductasa (AKR), todos son miembros de la familia de la deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR).⁸⁶ Las 17β-HSD humanas difieren en las especificidades de sustrato y cofactor de nucleótido, la compartimentación subcelular y los patrones de expresión específicos de tejido. En consecuencia, las 17β-HSD se agrupan en gran medida en enzimas oxidativas *in vivo* (17β-HSD tipos 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14) que catalizan la inactivación dependiente de NAD⁺ de los ligandos del receptor y enzimas reductoras *in vivo* (17β-HSD tipos 1, 3, 5, 7) que son dependientes de NADPH, cuyas reacciones conducen a ligandos de receptores de esteroides (Tabla 6).⁸⁷

Tabla 6. Diferentes isoformas de la 17 β -HSD.

Enzima	Tipo	Cofactor	Sustrato
17 β -HSD1	SDR	NADPH	Estrógenos
17 β -HSD2	SDR	NAD ⁺	Estrógenos, Andrógenos
17 β -HSD3	SDR	NADPH	Andrógenos
17 β -HSD4	SDR	NAD ⁺	Estrógenos
17 β -HSD5	AKR	NADPH	Andrógenos, Eicosanoides
17 β -HSD6	SDR	NAD ⁺	Estrógenos
17 β -HSD7	SDR	NAPH	Colesterol
17 β -HSD8	SDR	NAD ⁺	Andrógenos
17 β -HSD9	SDR	NAD ⁺	Estrógenos
17 β -HSD10	SDR	NAD ⁺	Ácidos biliares
17 β -HSD11	SDR	NAD ⁺	Andrógenos
17 β -HSD12	AKR	NAPH	Acetil CoA
17 β -HSD13	AKR	NAD ⁺	Andrógenos
17 β -HSD14	SDR	NADPH	Estrógenos, Andrógenos

Los SDR constituyen una gran familia de proteínas de oxidorreductasas, presentes en todas las formas de vida. Los miembros de esta familia son principalmente enzimas oligoméricas y, por lo general, muestran una longitud de cadena de subunidades de aproximadamente 250 a 350 residuos de aminoácidos.⁸⁸ Las enzimas SDR comparten pocos motivos de secuencia distintos, con una identidad de residuos general típica del 15 al 30 %, que comprende la unión del cofactor de nucleótido conservado y los residuos del sitio activo.⁸⁹

En la mayoría de las enzimas SDR caracterizadas hasta la fecha, un residuo de Tyr altamente conservado funciona como un catalizador ácido/base general, facilitado por la reducción del pKa de Tyr-OH a través de un residuo de Lys vecino, la unión del carbonilo del sustrato se ve favorecida por un lado mediante el aminoácido de Ser (Figura 16).⁹⁰

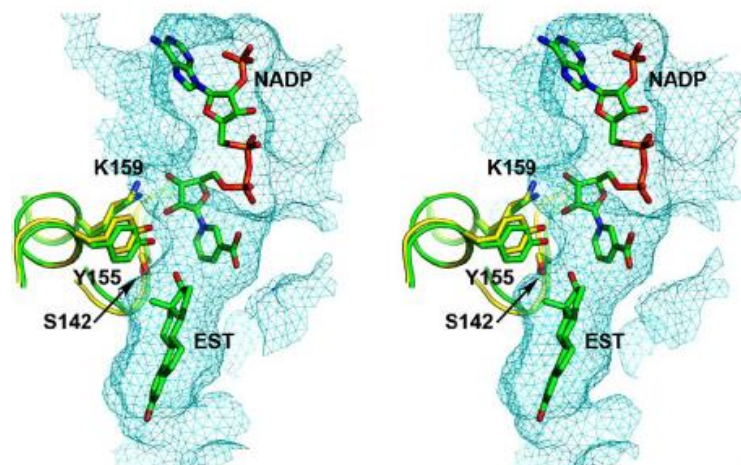


Figura 16. Vista estéreo de los sitios activos superpuestos de 17β-HSD1 (código PDB = 1FDT) y 17β-HSD14 (código PDB = 1YDE). Los átomos de C y partes de la estructura secundaria de 17β-HSD1 están coloreados en verde y 17β-HSD14 están coloreados en amarillo. La malla perfila la forma del bolsillo de unión al ligando de 17β-HSD1. El cofactor cocrystalizado NADPH y el sustrato de estradiol de 17β-HSD1 se unen dentro del bolsillo. La numeración de los residuos en la figura se basa en la secuencia de 17β-HSD1 y los números de residuos correspondientes en 17β-HSD14 son Y154, K158, S141. Los residuos catalíticos están claramente en conformaciones muy similares en las dos enzimas 17β-HSD.

En muchos SDR parece estar operativo un sistema de relevo de protones, que involucra el 2-OH⁻ de la nicotinamida ribosa, una molécula de agua conservada y un carbonilo de la cadena principal de un residuo de Asn o Ser. La transferencia de hidruro entre el cofactor y el sustrato se produce en la cara *Si* de la posición C-4 de la nicotinamida. A pesar de su bajo nivel de conservación, las enzimas de esta familia muestran un patrón de plegamiento conservado/sándwich, en el que una hoja central está flanqueada por varias hélices, lo que representa un motivo típico de plegamiento de Rossmann (Figura 17).⁹¹

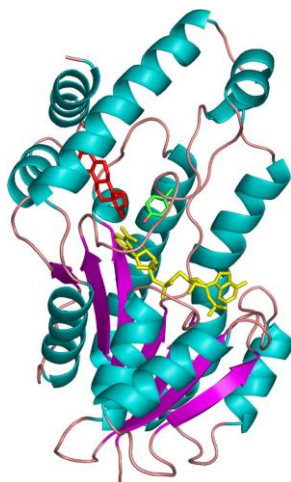


Figura 17. Diagrama de cinta para 17 β -HSD1 humano (código PDB = 1FDT). Las β -hebras están coloreadas en magenta, las α -hélices y las regiones de bucle en rosa. 17 β -HSD1 se muestra en complejo con NADPH (amarillo) y estradiol (rojo). Los átomos C de la cadena lateral del residuo catalítico Tyr155 están coloreados en verde.

En consecuencia, las enzimas SDR son en su mayoría deshidrogenasas/reductasas dependientes de NADPH que actúan sobre un gran conjunto heterogéneo de sustratos que incluyen esteroides, retinoides, prostaglandinas, polioles y xenobiótico. La enorme variabilidad de sustrato observada entre diferentes proteínas de esta familia se logra a través de un segmento C-terminal altamente variable, creando sitios activos únicos y propiedades de unión a ligandos.⁹²

Como se ha mencionado con anterioridad las familias de hormonas esteroides, los esteroides sexuales estrogénicos y androgénicos están involucrados en varias enfermedades, como sabemos el estrógeno E2 es el más potente, pues controla la diferenciación, el crecimiento, las funciones de los tejidos reproductivos femeninos, está involucrado en el crecimiento de los cánceres de mama y endometrio sensibles al estrógeno.⁹³

Las hormonas sexuales actúan a través de receptores nucleares específicos, como los receptores de estrógenos y andrógenos, además se sabe que desempeñan funciones clave en la regulación del crecimiento de los cánceres de mama y próstata en humanos.⁹⁴ La inhibición de las 17 β -HSD reductoras es una estrategia atractiva para reducir el nivel de hidroxisteroides, como el E2, disminuyendo así sus efectos mitogénicos sobre los receptores de esteroides. Además del uso clásico de los inhibidores de 17 β -HSD para

reducir el nivel de estrógenos y andrógenos activos, investigaciones recientes se centraron en el desarrollo de inhibidores de 17 β -HSD oxidativos para ayudar a mantener altos niveles de E2.⁹⁵

Además, desde el punto de vista de la investigación, los inhibidores de 17 β -HSD también son herramientas útiles para dilucidar el papel de estas enzimas en sistemas biológicos particulares. Debido a la amplia familia de 17 β -HSD, discutidos anteriormente, los inhibidores para este tipo de enzimas se clasifican dependiendo de la isoforma al cual van dirigidos y si son esteroideos o no esteroideos.⁹⁶

Inhibidores no esteroideos de la 17 β -HSD de tipo 1

La primera isoforma de la familia de 17 β -HSD reportada en la literatura, el tipo 1 o estradiol deshidrogenasa de placenta humana, cataliza la transformación reductora del estrógeno menos potente, E1, en el más potente, E2.⁹⁷

Derivados de pirimidinona

En una solicitud de patente, Vihko e Isomaa informaron sobre el uso de tiofenepirimidinona como inhibidor de la 17 β -HSD de tipo 1 para la prevención o el tratamiento del cáncer de mama. Este compuesto fue identificado como el inhibidor más potente en una selección de aproximadamente 1000 compuestos disponibles en una biblioteca comercial de moléculas pequeñas. En el ensayo enzimático, se midió la transformación de E1 (20 nM) en E2 en células MCF-7 intactas que expresan de forma estable 17 β -HSD1. A una concentración de 1 μ M, el compuesto del tiofenepirimidinona inhibió el 80 % de la reducción de E1 mientras que el inhibidor de referencia apigenina, un fitoestrógeno, proporcionó un 48% de inhibición (Figura 18).⁹⁸

Genisteína y enterolactona

Brooks y Thompson determinaron que la isoflavona genisteína y la enterolactona inhibían la producción de E2 a partir de E1 (50 nM) mediante la actividad de 17 β -HSD que se encuentra en las células MCF-7. La mayor reducción de la producción de E2 ocurre entre 59-84%. Además, estos productos naturales también disminuyeron la proliferación de células MCF-7, un efecto que se obtendría al modular la producción de E2 (al inhibir tanto

la reducción de 17β -HSD de E1 como la transformación de la aromatasa P450). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la modulación de la actividad enzimática esteroideogénica puede ser un mecanismo a través del cual estos compuestos ejercen su efecto protector contra el cáncer de mama (Figura 18).⁹⁹

Compuestos similares a gossipol

Se sabe que el producto natural gossipol, un binaftilo polifenólico aislado de la semilla de algodón, inhibe todas las isoenzimas del lactato deshidrogenasa humana, que contiene un pliegue de Rossmann como las 17β -HSD. Siete compuestos relacionados con el gossipol se probaron como inhibidores de la 17β -HSD tipo 1 purificada de la placenta humana. El ensayo enzimático se realizó a pH 9.2 utilizando NAD^+ como cofactor para evaluar la oxidación de E2 (25 μM) en E1. La lactona gossilica y la iminolactona gossilica fueron los compuestos más prometedores que inhibieron el 80-90 % de la actividad enzimática a 25 μM (Figura 18).¹⁰⁰

Organoestaños

Los organoestaños poseen propiedades lipofílicas e iónicas que promueven su acumulación en lípidos y su unión a macromoléculas respectivamente. Después de haber determinado que el cloruro de trifenilestaño era el principal compuesto organoestánico encontrado en la sangre humana, Lo y colaboradores investigaron el efecto *in vitro* de dicho compuesto sobre las actividades de las enzimas esteroideogénicas. Para la 17β -HSD1 obtenida de placenta humana, se obtuvo un valor de IC_{50} de 10.5 μM para la transformación de E1 (0.5 μM) en E2 (Figura 18).¹⁰¹

Derivados de flavanona

Owen y Ahmed derivaron una representación aproximada del sitio activo de la 17β -HSD1, que se utilizó como modelo para racionalizar la actividad inhibitoria de una serie de inhibidores basados en Flavanona. Se llegó a la conclusión de que la capacidad de los inhibidores para adaptarse al sitio activo abarrotado es el factor principal en su actividad inhibitoria. Este modelo se propone como un buen punto de partida para el desarrollo de nuevos inhibidores (Figura 18).¹⁰²

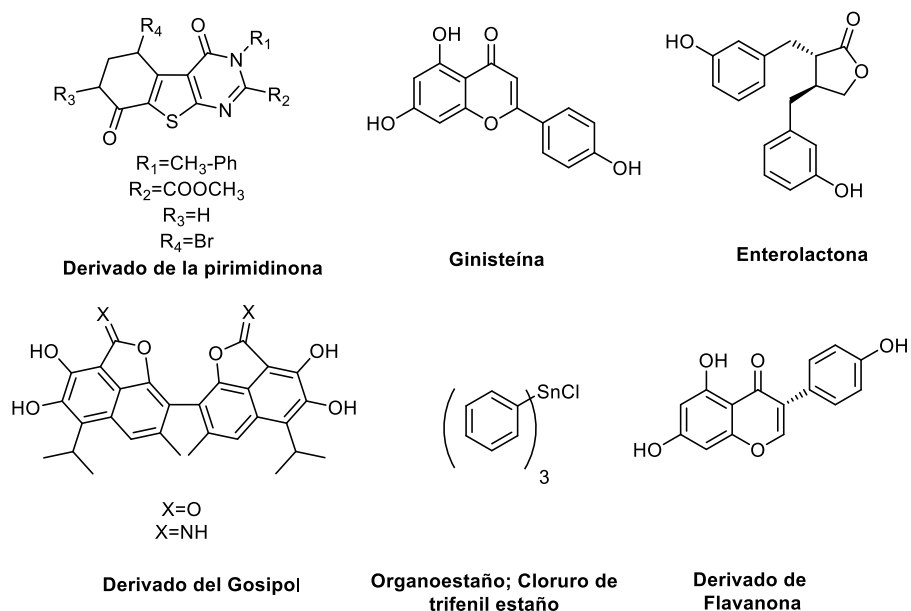


Figura 18. Inhibidores no esteroideos de la $17\beta\text{-HSD1}$.

Inhibidores no esteroideos de la $17\beta\text{-HSD}$ de tipo 1

Shields-Botella y colaboradores resumieron la acción del acetato de nomegestrol sobre las actividades de $17\beta\text{-HSD}$ tipo 1 en dos líneas celulares de cáncer de mama humano dependiente de hormonas (MCF-7 y T-47D). Para la reducción de E1 (5 nM) por $17\beta\text{-HSD}$ tipo 1, el nomegestrol inhibió esta transformación en un 35-85 % a 0.5 y 5 μM en células T-47D intactas, mientras que el efecto inhibitorio fue significativo solo a 50 μM en MCF-7 (Figura 19).¹⁰³

E2 C6-derivados

Tremblay y colaboradores ampliando su trabajo sobre los inhibidores de $17\beta\text{-HSD}$ de tipo 1 condujeron a un derivado de estrona que lleva una cadena lateral de *N*-metil, butil tiaheptanamida en la posición 6. Probaron estrategias para modificar el perfil biológico (estrogenicidad y potencia inhibitoria) de este compuesto. El estudio confirmó que la configuración *S* de la cadena lateral en la posición 6 condujo a una inhibición mucho mejor que la configuración *R*. La sustitución del 3-OH por un átomo de hidrógeno, así como la del grupo amida por un metilo fue claramente desfavorable para la inhibición de la $17\beta\text{-HSD}$ tipo 1.¹⁰⁴

Derivados E2 como inhibidores de doble sitio

Poirier y colaboradores informaron del modelado y el análisis cristalográfico de un complejo entre la 17 β -HSD1 y el potente inhibidor híbrido derivado del E2, que interactúa con los sitios de unión del sustrato (E1 o E2) y del cofactor NADPH. Ellos publicaron los detalles completos del estudio de síntesis química y relación estructura-actividad que hacen posible la creación de esta nueva familia de inhibidores de sitio dual. En estos derivados de E2, el resto adenosina del cofactor NADPH se reemplazó por un grupo arilo sustituido y el enlace éster por un grupo metileno.

Los derivados E2 con uno o más grupos de heterociclos se acoplan a la estructura 3D de 17 β -HSD1, lo que demuestra que las interacciones del inhibidor con la tríada catalítica compuesta por Tyr₁₅₅, Lys₁₅₉ y Ser₁₄₂ son de total anclaje, así mismo estos inhibidores pueden ser del tipo competitivos, aunque también es muy importante indicar que el linker formado por los grupos metilenos pueden acercarse a un bolsillo hidrofóbico formado por los residuos Leu₉₆ y Val₁₉₆. Lo anterior sugiere, que la interacción que involucra este tipo de compuestos con las enzimas 17 β -HSD1, forman o pueden formar un gran número de interacciones lo que hace que puedan funcionar como muy potentes inhibidores de dicha enzima.⁹⁸

E1 o E2 C16-derivados

Poirier y colaboradores introdujeron una cadena lateral corta (grupo R) en la posición C-16 de E1 o E2 para generar potencialmente una interacción con un aminoácido de la tríada catalítica o con otro de los aminoácidos que rodean el residuo del cofactor NADPH. Los compuestos, se ensayaron como inhibidores de la reducción de E1 (0.1 μ M) mediante 17 β -HSD1. Se obtuvieron muy buenas actividades inhibitorias especialmente para 16-fenilmetil-E2 (IC₅₀ = 0,79-1,0 μ M). Para los derivados arilo (R), la potencia inhibitoria aumentó significativamente lo que sugiere que la presencia de un grupo 16 β -metileno más flexible permite un mejor posicionamiento del resto arilo (menos interacciones estéricas con la enzima residuos de aminoácidos).

Algo muy importante que se destaca de los inhibidores esteroideos de la 17 β -HSD1 a diferencia de los no esteroideos, es lo que se observó en el estudio de Poirier y colaboradores

en cuanto a los inhibidores de doble sitio derivados de E2, y es que pueden actuar con el bolsillo hidrofóbico de las enzimas 17 β -HSD1, esta característica fortalece la unión entre el ligando y la enzima, lo cual además de potenciar su papel como inhibidores disminuye la posibilidad de generar efectos secundarios.

Además de los inhibidores esteroideos para la 17 β -HSD1 mencionados anteriormente, también existen otros tipos de inhibidores de esta misma clase, por ejemplo; los E1 C-16 y C17-derivados, E1 C-3 o C15-derivados, E1 C2-derivados. Todos estos inhibidores esteroideos, poseen grupos como anillos de heterociclos nitrogenados, diversos grupos funcionales, entre otros grupos químicos (Figura 19).¹⁰⁰

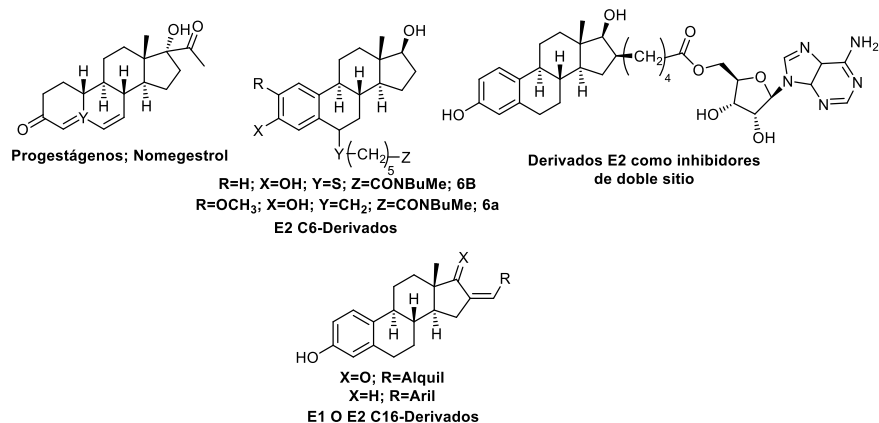


Figura 19. Inhibidores esteroideos de la 17 β -HSD1.

Como se había tratado con anterioridad existen diversas isoformas de la enzima 17 β -HSD1, (tabla 6), por lo que en la tabla 7 se muestran los diversos inhibidores utilizados para todas las variantes de dicha enzima.

Tabla 7. De los diferentes tipos de inhibidores de la diversas isoformas de la 17 β -HSD.

Tipo de 17 β -HSD	No esteroideo	Esteroido
2	*Pirrolidinonas	*C18-esteroides espiro- δ -lactonas *Derivados de Estratrieno
3	*18 β -Ácido glicirretínico * Hidroxifenil cetonas *organoestaños	*Derivados de androsterona *Benciletiocolanolona
4	*Ácidos grasos	*Derivados de la E1
5	*Dionas	*Derivados del E2
6	*Lactonas	*Esteroides sustituidos en C17
7	*Pirimidinas	*Derivados de DHT
8	/	/
9	/	/
10	*Ácidos grasos	*Derivados de DHT *Derivados de E1 y E2
11	/	/
12-14	/	*Derivados de DHT

Nota: La / representa que no se han identificado inhibidores para dichas isoformas de la 17 β -HSD.

En 2005 Poirier y colaboradores para obtener compuestos capaces de controlar la formación de E2, unieron dos compuestos mediante una cadena lateral de metileno: un resto de adenosina que interactuó con el sitio de unión del cofactor y un derivado de estrona que interactuó con el sitio de unión del sustrato. Cuando se probaron como inhibidores de 17 β -HSD1, los compuestos híbridos inhibieron la actividad reductora (E1 en E2) con valores IC₅₀ que oscilaron entre 52 y 1000 nM. Ellos determinaron que la longitud óptima de la cadena lateral era de ocho grupos metileno en una 16 β -orientación, este compuesto denominado como EM-1745, dio mucho mejores resultados que el compuesto derivado E2 con doble sitio de inhibición (Figura 19), cuya longitud de cadena es de 4 metilenos.

Además, también indicaron que la presencia de los dos componentes (E2 y adenosina) son esenciales para una buena inhibición, ya que 16 β -nonil-E2 y 5-nonanoil-*O*-adenosina, dos

compuestos que tienen solo uno de los componentes, no inhibieron la enzima. Por último, el análisis de estructura 3D del compuesto EM-1745 (Figura 20) acomplejado con 17 β -HSD1 mostró interacciones clave con sitios de unión de sustrato y cofactor de dicha enzima.¹⁰⁵

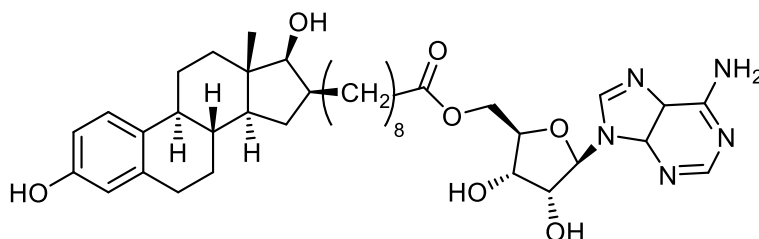


Figura 20. Compuesto EM-1745 sintetizado por Poirier y colaboradores utilizado como inhibidor del 17 β -HSD1.

En el año 2018 Boutin y colaboradores diseñaron compuestos derivados de androstano, que poseen un alta inhibición ($IC_{50} = 235 \mu M$ y E2, $IC_{50} = 610 \mu M$) frente a 17 β -HSD1 y 17 β -HSD10. Algunos de estos compuestos son inhibidores duales en menor medida, y otros parecen selectivos para una de las isoformas de la enzima en particular. Sin embargo, cabe destacar que algunos de estos compuestos poseen grupos tiourea, grupo que no se había reportado hasta la fecha que pudiera inhibir este tipo de enzimas (Figura 21). Aunque en los ensayos de Docking molecular realizados no es muy claro en qué zona de la enzima interacciona la tiourea.¹⁰⁶

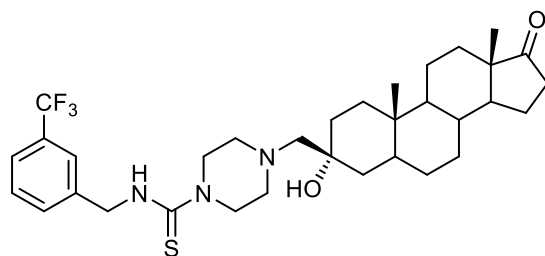


Figura 21. Uno de los compuestos sintetizado por Boutin y colaboradores que inhibe tanto a la 17 β -HSD1 como a la 17 β -HSD10.

Objetivos

Objetivo general

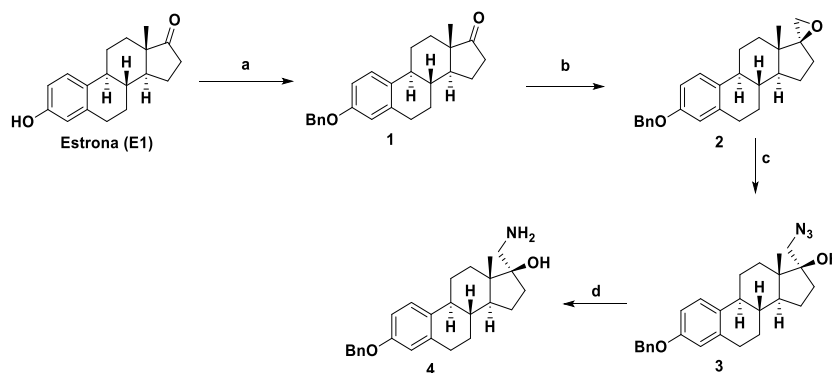
El objetivo general del presente capítulo de la Tesis Doctoral es el de sintetizar una familia de derivados de tiourea de estrona con fragmentos de cumarina y evaluar de forma teórica su potencial como inhibidores de la 17 β -HSD1 mediante Docking molecular.

Objetivos particulares

1. Realizar la síntesis de una familia de derivados de tiourea de estrona con fragmentos de cumarina.
2. Caracterización estructural de los compuestos preparados.
3. Evaluación mediante Docking molecular de los compuestos preparados para determinar su posible actividad como inhibidores de la 17 β -HSD1.

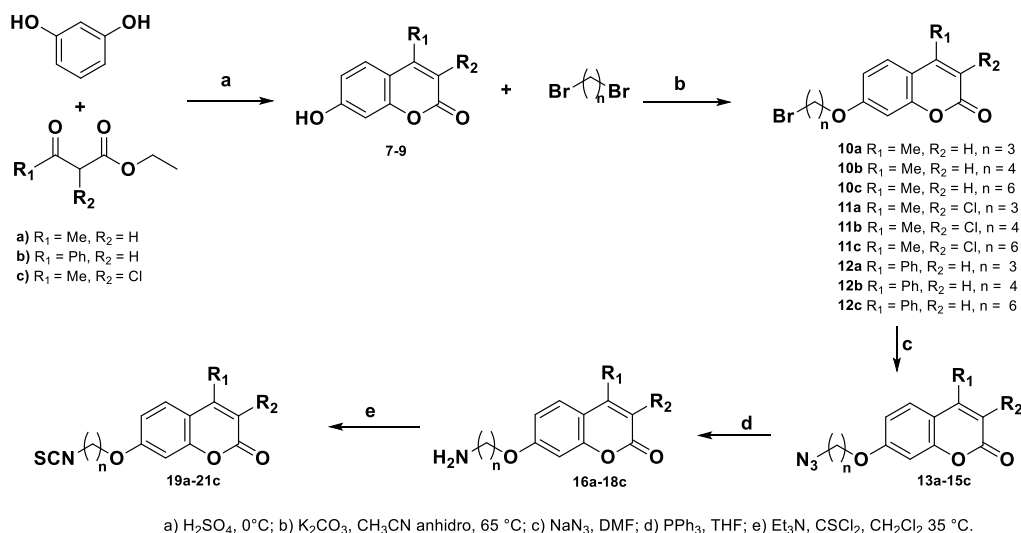
Discusión de resultados

La metodología utilizada se divide en 3 partes, la preparación del aminoalcohol esteroidal (4), esquema 13, el cual ya fue mencionado en el capítulo anterior, generar el isotiocionato de cumarina, esquema 14, y finalmente la síntesis de las tioureas las cuales se obtuvieron a partir del compuesto 4 y los isotiocionatos.



a) BnBr, K₂CO₃, CH₃CN a reflujo, 99%; b) t-BuOK, S(CH₃)₃I, DMF a 0 °C, 97%; c) NaN₃, H₃BO₃, DMFa reflujo, 91%; d) LiAlH₄, THF a reflujo, 66%.

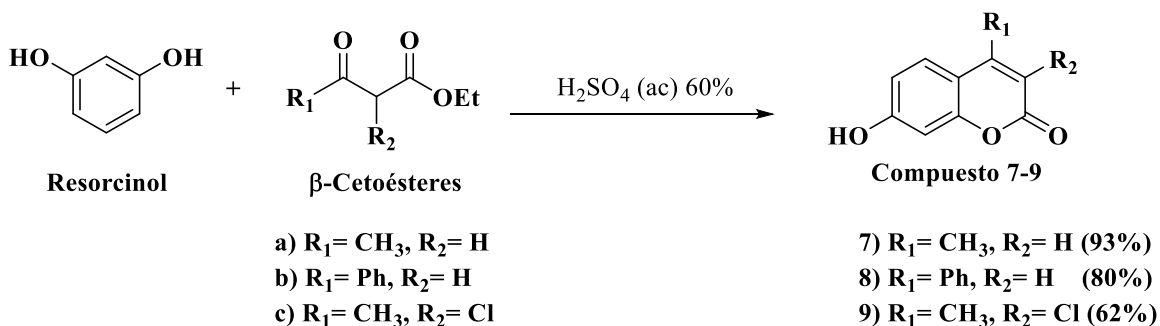
Esquema 13. Ruta sintética para la formación del aminoalcohol esteroidal 4 a partir de estrona.



Esquema 14. Ruta sintética para la formación de los isotiocionatos de cumarina 19a-21c.

En el esquema 15 se observa la síntesis de las 3 diferentes hidroxycumarinas 7-9, mediante el método de Pechmann; el cual describe la condensación de resorcinol (1,3-

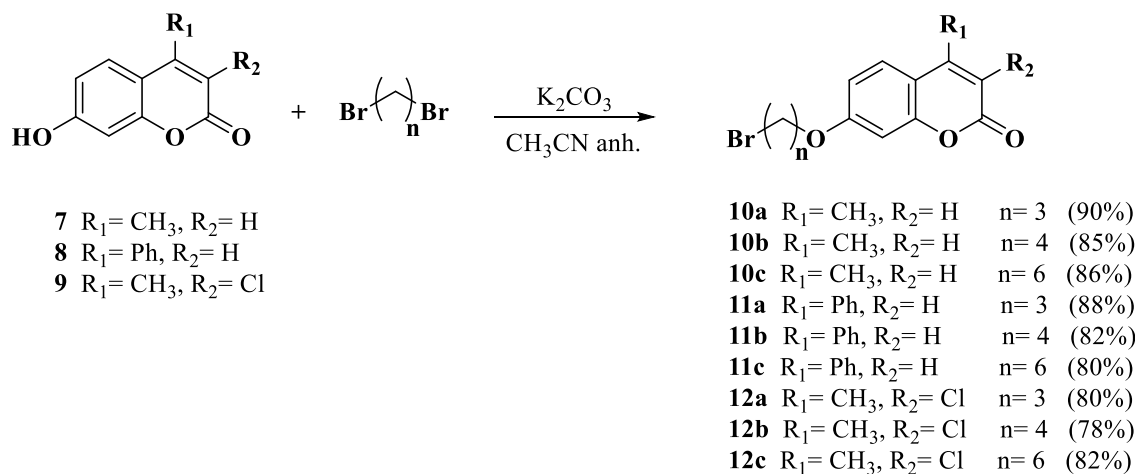
dihidroxibenceno) con diferentes β -cetoésteres (1 equivalente) y utilizando H_2SO_4 como catalizador a temperatura ambiente. Dicha reacción generó un grupo hidroxilo fenólico en la posición C-7 el cual funcionaliza la cumarina, lo que permite la posterior inserción del linker.^{107, 108, 109}



Esquema 15. Síntesis de los compuestos **7-9**.

Los rendimientos obtenidos para las cumarinas **7**, **8** y **9** fueron 93%, 80% y 62%, respectivamente. Es importante mencionar que el rendimiento de la cumarina **9**, decayó bastante comparado con las otras 2, sin embargo, se ha reportado que con el uso del ácido trifluoroacético se han sintetizado diversas cumarinas, incluyendo la que posee el Cl en R_2 con muy altos rendimientos (80-90 %) y excelente regioselectividad.

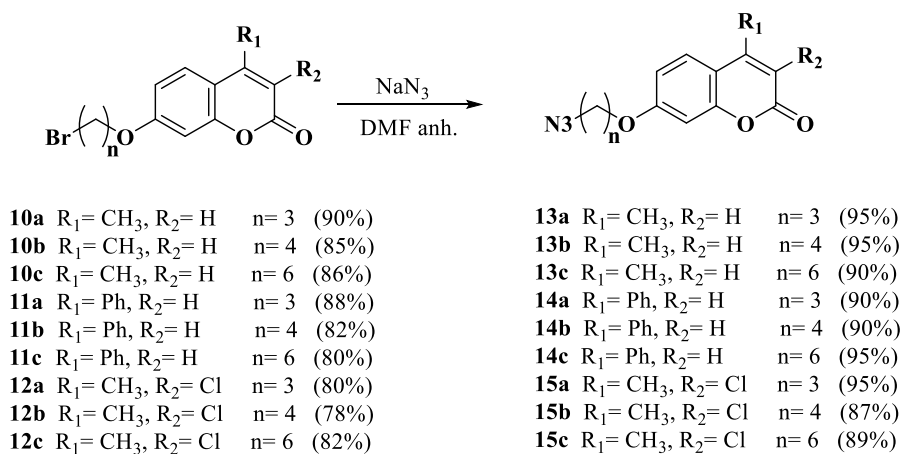
El grupo hidroxilo de las cumarinas le confiere un carácter nucleófilico, lo cual hace posible que reaccionen con electrófilos como los haluros de alquilo. Debido a lo anterior se realizó la alquilación de las cumarinas con los diferentes α, ω -dibromoalcanos (8 equivalentes) en medio básico, generando los productos *O*-alquilados (**10a-12c**) con rendimientos de moderados a altos (Esquema 16).



Esquema 16. Síntesis de los compuestos **10a-12c**.

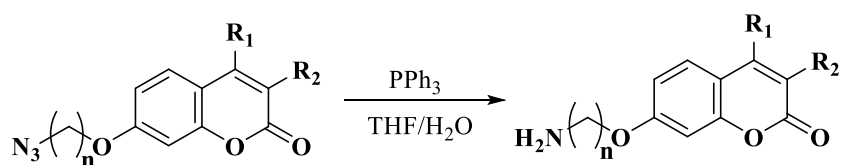
El K₂CO₃ es la base utilizada que generó al ion fenóxido, este alcóxido actúa como nucleófilo en una reacción tipo S_N2 sobre el dihaluro de alquilo. El utilizar exceso de dicho reactivo permitió que se obtenga una monoalquilación con muy buenos rendimientos. La reacción se llevó a cabo a 65 °C durante 4 o 5 h (dependiendo del dibromoalcano) en CH₃CN anhidro.

Posteriormente, el átomo de bromo terminal se sometió a sustitución nucleofílica con NaN₃ (5 equivalentes), esta reacción se llevó a cabo a 40 °C utilizando un disolvente polar aprótico como la DMF, pues esto favorece la reacción S_N2, los productos obtenidos (**13a-15c**) tuvieron excelentes rendimientos; 87-95 % (Esquema 17).



Esquema 17. Síntesis de los compuestos **13a-15c**.

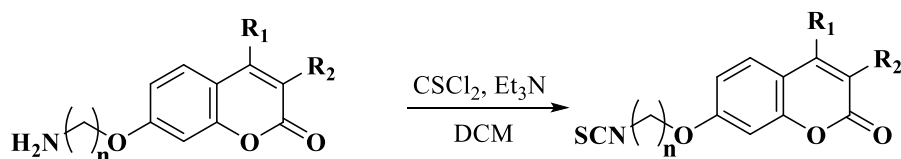
La reacción posterior implica la reducción de las azidas en aminas, para lo cual se utilizó trimetilfosfina (1.4 equivalentes), la cual ataca el nitrógeno terminal de las azidas, formándose así una fosforazida. Ésta se descompone en nitrógeno gaseoso y un iminofosforano, el cual se hidrolizó para formar los correspondientes aminoderivados con muy altos rendimientos 72-92 % (Esquema 18).



13a	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n = 3	(95%)	16a	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n = 3	(92%)
13b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n = 4	(95%)	16b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n = 4	(88%)
13c	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n = 6	(90%)	16c	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n = 6	(83%)
14a	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n = 3	(90%)	17a	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n = 3	(86%)
14b	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n = 4	(90%)	17b	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n = 4	(80%)
14c	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n = 6	(95%)	17c	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n = 6	(79%)
15a	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n = 3	(95%)	18a	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n = 3	(78%)
15b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n = 4	(87%)	18b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n = 4	(75%)
15c	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n = 6	(89%)	18c	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n = 6	(72%)

Esquema 18. Síntesis de los compuestos **16a-18c**.

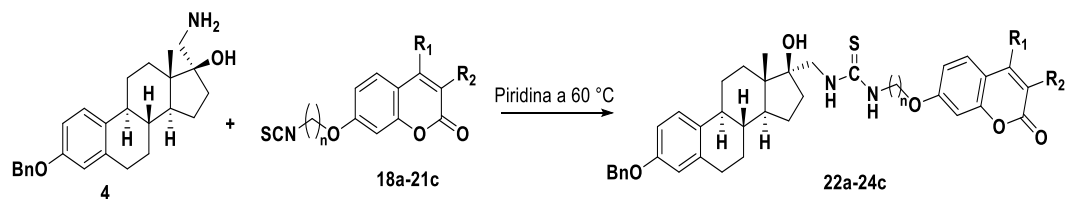
La última reacción de la etapa para la formación de los isotiocianatos de cumarina fue el tratamiento final de los aminoderivados con CSCI₂ (3 equivalentes), para poder realizar esta reacción de sustitución fue necesario utilizar una base como la Et₃N (2 equivalentes) y usar DCM (Esquema 19), los productos obtenidos se obtuvieron con rendimientos moderados 62-80 %.



16a	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n= 3	(92%)	19a	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n= 3	(75%)
16b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n= 4	(88%)	19b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n= 4	(71%)
16c	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n= 6	(83%)	19c	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	n= 6	(69%)
17a	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n= 3	(86%)	20a	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n= 3	(80%)
17b	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n= 4	(80%)	20b	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n= 4	(73%)
17c	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n= 6	(79%)	20c	R ₁ = Ph, R ₂ = H	n= 6	(65%)
18a	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n= 3	(78%)	21a	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n= 3	(72%)
18b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n= 4	(75%)	21b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n= 4	(62%)
18c	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n= 6	(72%)	21c	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = Cl	n= 6	(66%)

Esquema 19. Síntesis de los compuestos **19a-21c**.

Por último, como se muestra en el esquema 20 se sintetizaron las tioureas mediante una reacción de adición entre el aminoalcohol y los isotiocianatos de cumarina, para lo cual se hizo reaccionar 1eq de los isotiocianatos (**19a-21c**) y 1 equivalente del compuesto **4** usando como base y disolvente piridina durante 1 h a 60 °C. Las tioureas obtenidas tuvieron rendimientos relativamente bajos de 29-48%.



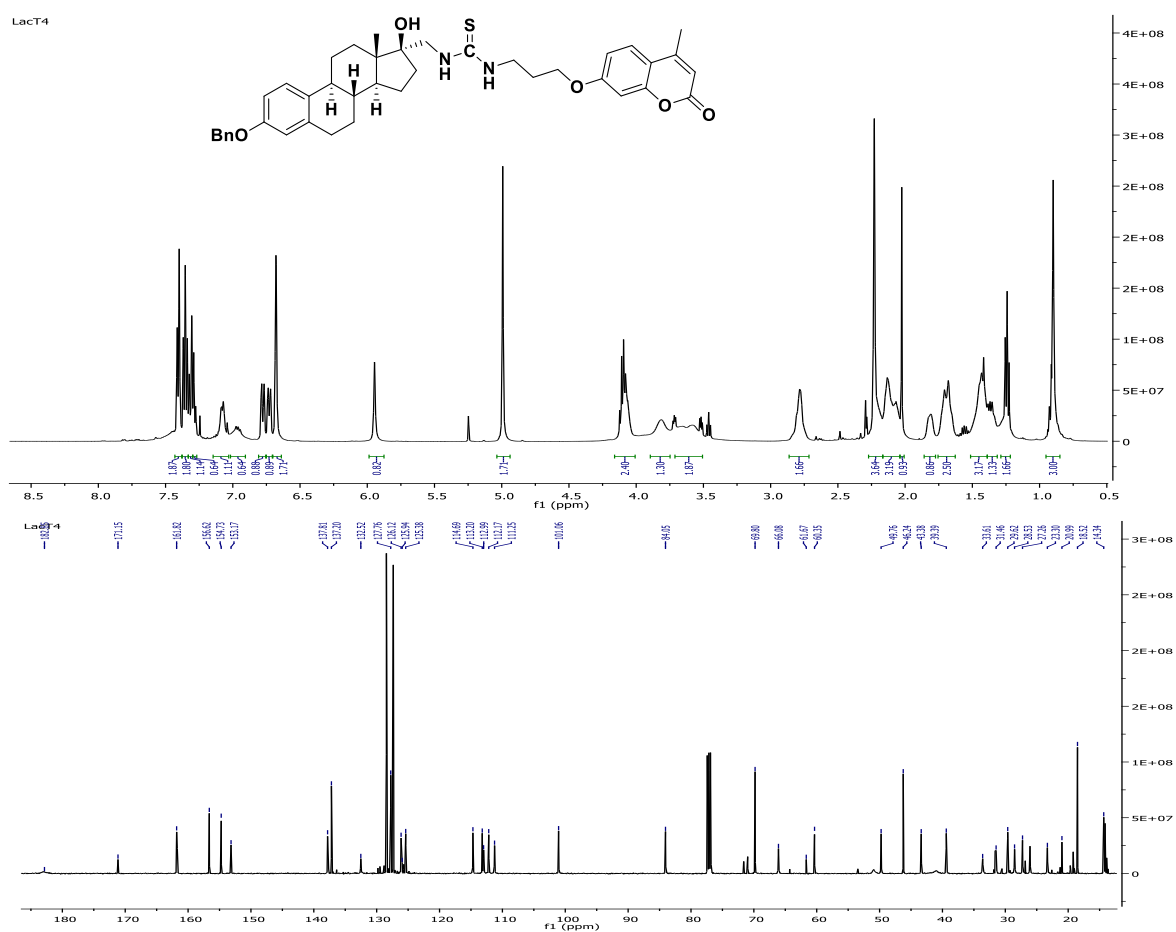
Esquema 20. Ruta sintética para la formación de las tioureas **22a-24c** a partir de los isotiocianatos de cumarina y el aminoalcohol.

En el espectro de RMN de ¹H se observa que las señales características para el cuerpo de cumarina de las tioureas **22a-22c** se localizan a 2.25-2.21 ppm como una señal simple para los protones del grupo metilo, otras señales múltiples para 1H aromático en 7.29-7.28, 7.15-7.03, 7.01-6.91 ppm y por último una señal simple para 1H aromático en 5.98-5.88 ppm.

Las señales importantes que indican la unión del grupo cumarina y estrona a través de la cadena hidrocarbonada se encuentran como señales múltiples en 4.16-4.02 y 3.70-3.50

ppm, ambas señales integran para dos protones correspondientes a los grupos metileno enlazados a un átomo de oxígeno y nitrógeno, respectivamente.

Las señales importantes de ^{13}C -RMN para el cuerpo de cumarina se encuentran a 110-113.2 ppm, las cuales corresponde al grupo metilo. Para el cuerpo de estrona las principales señales son 84.06-88.20 ppm para el C-17, 14.34-14.11 ppm para C-18 y la principal señal que determina la naturaleza de la molécula se encuentra a 182.85-183.15 ppm que es el C-20 o el carbono de la tiourea (Figura 22-24).



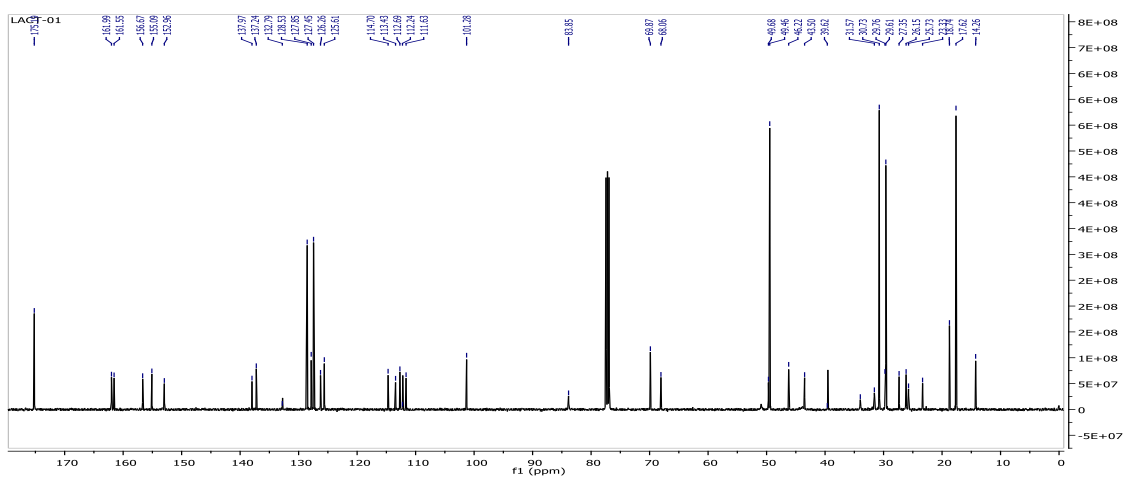
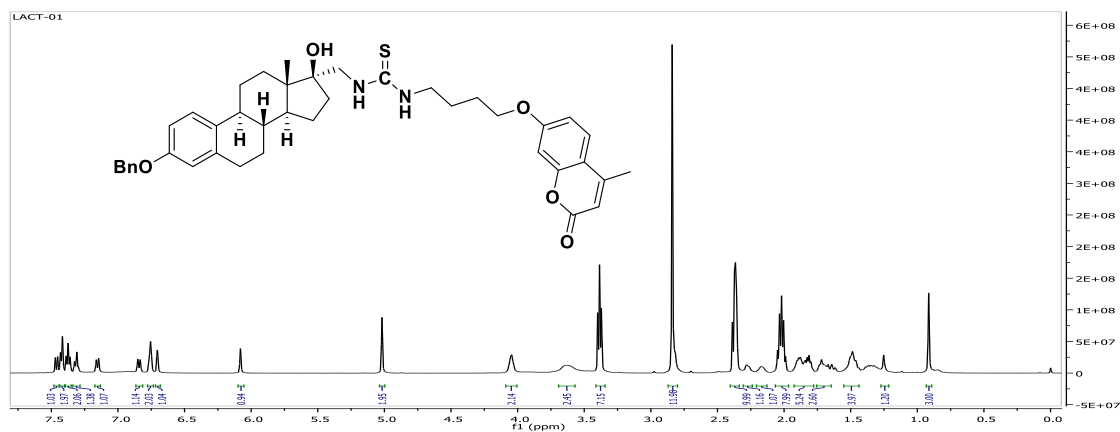
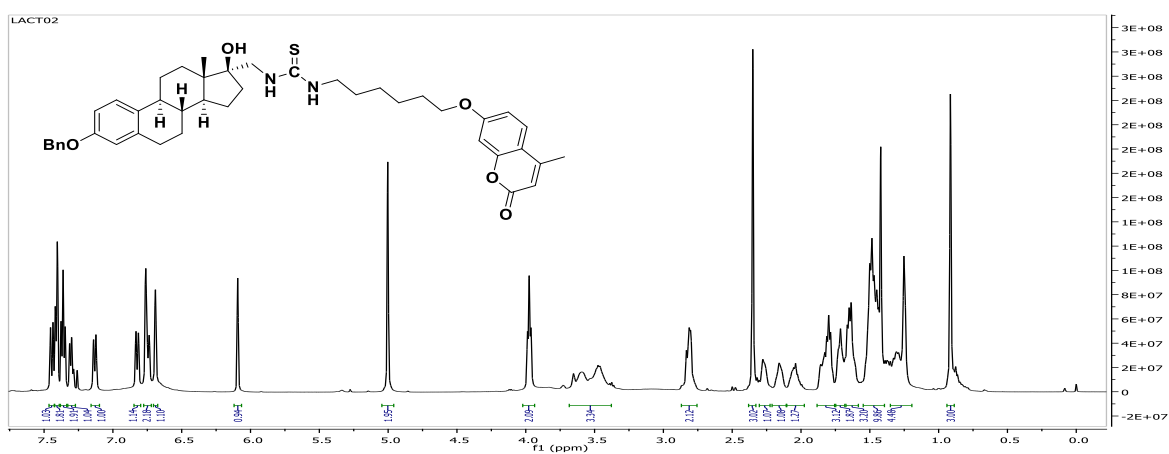


Figura 23. Espectros de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C -RMN (125.77 MHz, CDCl_3) del producto **22b**.



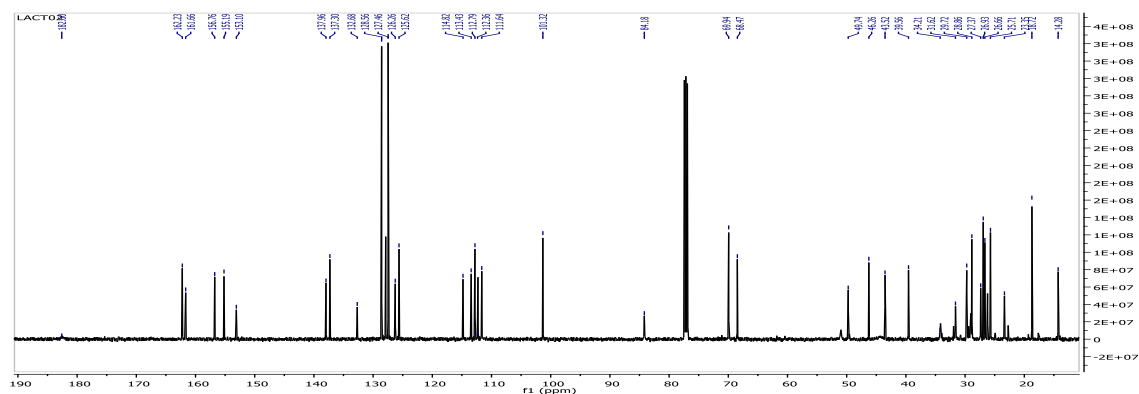
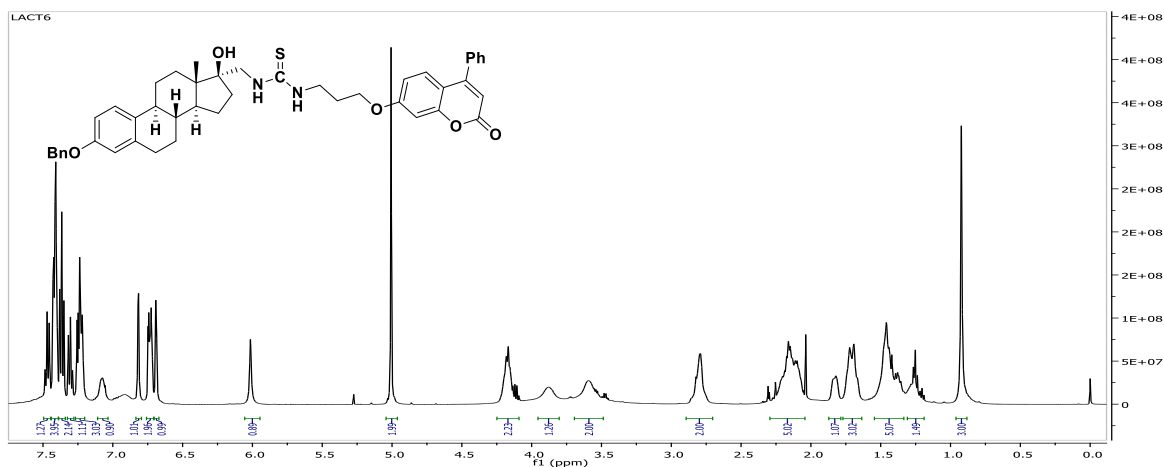


Figura 24. Espectros de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C -RMN (125.77 MHz, CDCl_3) del producto **22c**.

Las señales características del cuerpo de cumarina de fenilo **23a-23c** se localizan a 7.69-7.58, 7.57-7.49, 7.47-7.42 ppm que corresponden a señales múltiples para los protones del grupo fenilo.

Las señales importantes que indican la unión del grupo cumarina y estrona a través de la cadena hidrocarbonada se encuentran como señales múltiples en 4.29-3.97 y 4.15-3.70 ppm, ambas señales integran para dos protones correspondientes a los grupos metileno enlazados a un átomo de oxígeno y nitrógeno, respectivamente. Las señales más relevantes del ^{13}C -RMN para el cuerpo de cumarina se encuentran a 130.68-124.07 ppm, la cual corresponde al grupo metilo. Par el cuerpo de estrona las principales señales se encuentran en 98.66-88.39 ppm para el C-17, 14.01-13.28 ppm para C-18 y la principal señal que determina la naturaleza de la molécula se encuentra a 183.25-175.23 ppm que es el C-20 o el carbono de la tiourea (Figura 25-27).



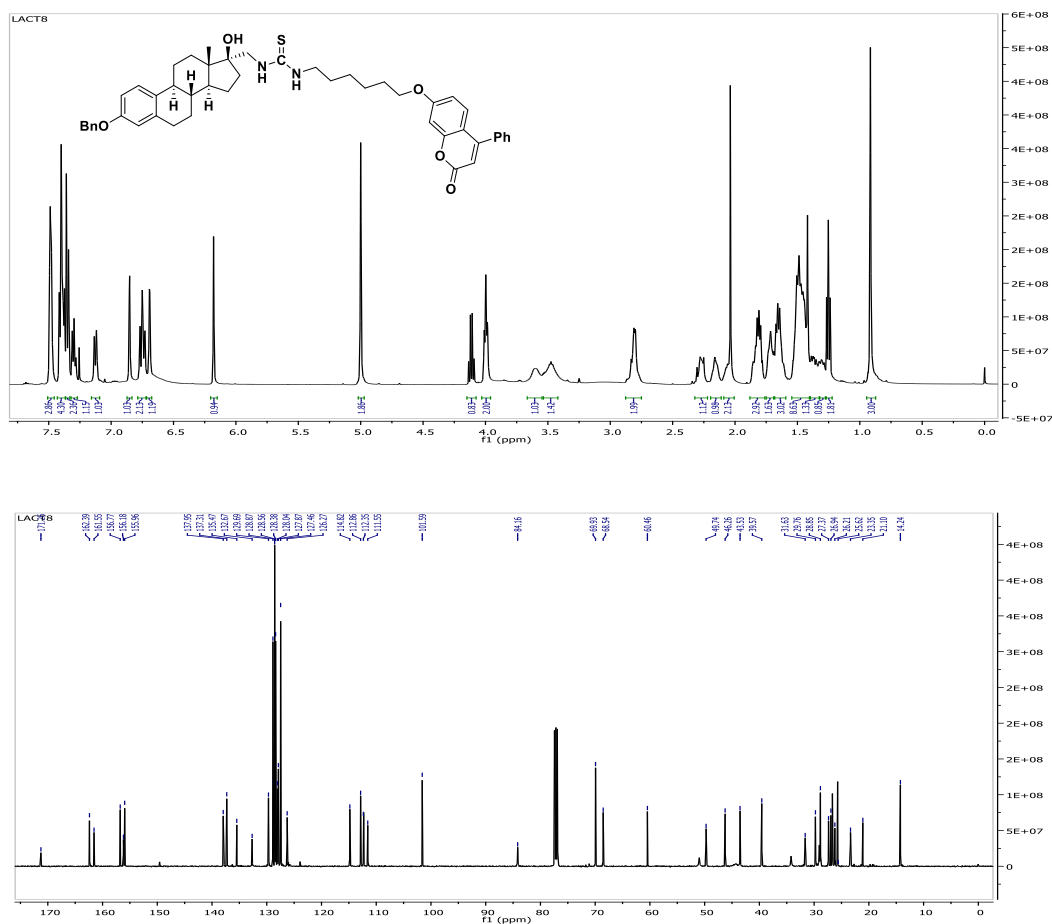


Figura 27. Espectros de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C -RMN (125.77 MHz, CDCl_3) del producto **23c**.

Las señales características para el cuerpo de cumarina de las tioureas **24a-24c** se localizan como señales múltiples para 1H aromático en 7.45-7.10, 7.08-6.85 y 6.92-6.75 ppm. Además otra dato que demuestra la presencia del cuerpo de cumarina es la ausencia de la señal para 1H aromático (C-10'), ya que éste carbono aromático es el que se encuentra enlazado con el átomo de cloro.

Las señales importantes que indican la unión del grupo cumarina y estrona a través de la cadena hidrocarbonada se encuentran como señales múltiples en 4.22-4.02 y 3.78-3.21 ppm, ambas señales integran para dos protones correspondientes a los grupos metileno enlazados a un átomo de oxígeno y nitrógeno respectivamente. Las señales importantes de ^{13}C -RMN para el cuerpo de cumarina se encuentra a 121-110.05 ppm. Par el cuerpo de estrona las principales señales son 86.44-82.01 ppm para el C-17, 14.02-13.77 ppm para C-

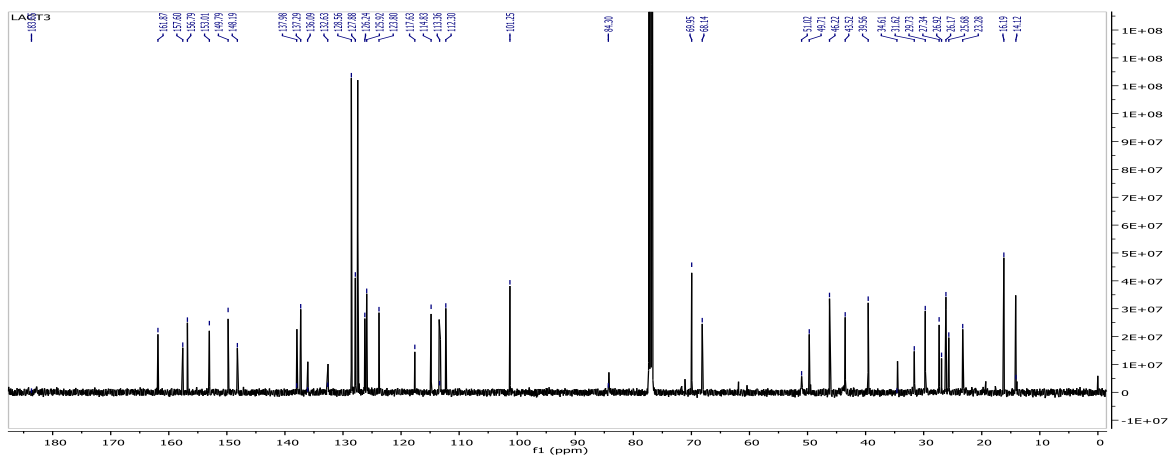


Figura 29. Espectros de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C -RMN (125.77 MHz, CDCl_3) del producto **24b**.

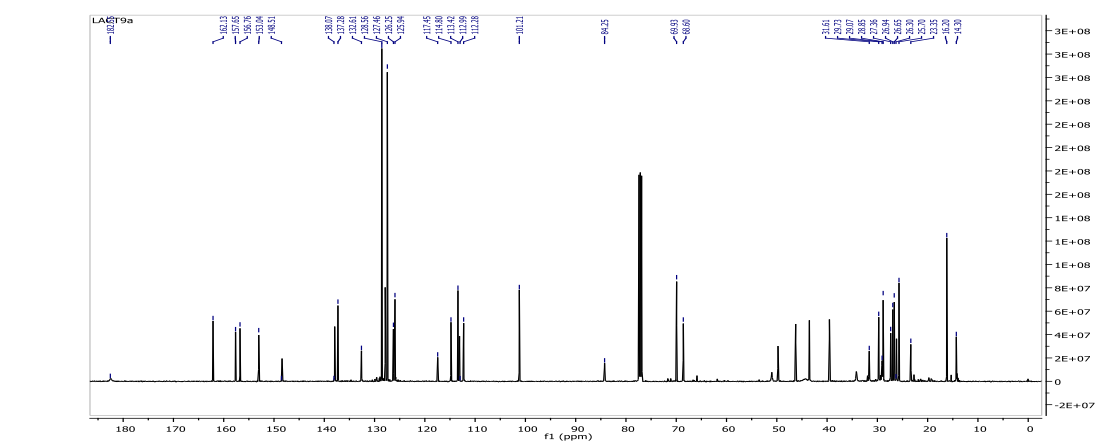
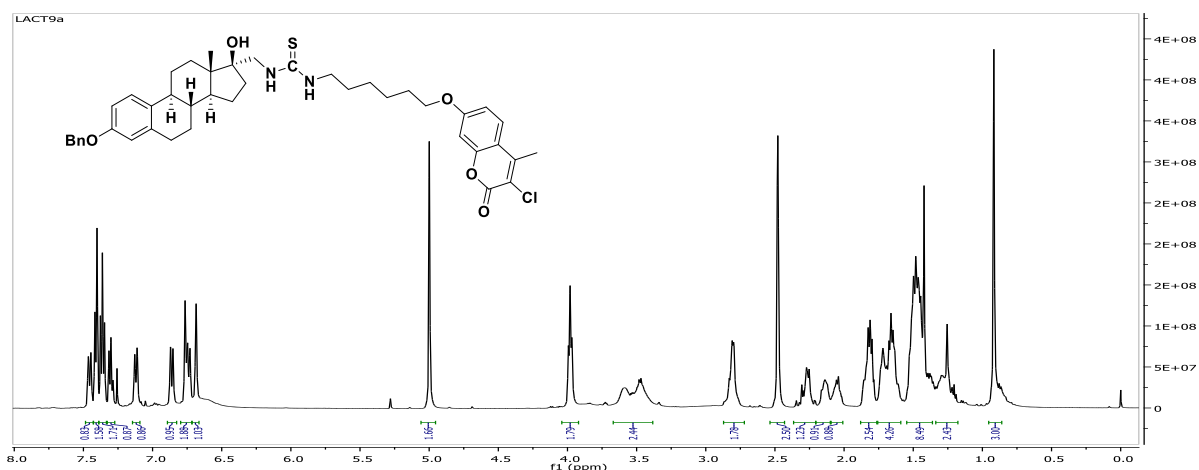


Figura 30. Espectros de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C -RMN (125.77 MHz, CDCl_3) del producto **24c**.

Docking molecular

17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17β-HSD1)

La validación del modelo de la enzima de la 17β-HSD1 se realizó mediante la unión entre la testosterona como ligando cristalográfico y el bolsillo de unión de la propia 17β-HSD1, en donde se obtuvo un valor de RMSD de $0.2898 \pm 0.016 \text{ \AA}$. De todas las poses obtenidas, alrededor de 100, la que se muestra en la figura 31 fue la elegida ya que es la que presenta un menor RMSD y una energía de unión de -8.3711 Kcal/mol . La molécula de testosterona que se utilizó en el modelo de validación interacciona con las cadenas laterales hidrofóbicas de numerosos residuos de aminoácidos como Ile₁₃₃, Phe₁₃₄, Phe₂₂₁, Trp₂₂₄, Val₃₇₀ y Met₃₇₄, los cuales se encuentran en la hendidura del sitio activo. En cuanto a la unión con la Met₃₇₄ esta también ocurre mediante un puente de hidrogeno entre el oxígeno 17β-hidroxilo de la testosterona y la amida del esqueleto -NH de la Met₃₇₄. Dichas interacciones, son la base molecular de la especificidad androgénica de la 17β-HSD1.¹¹⁰

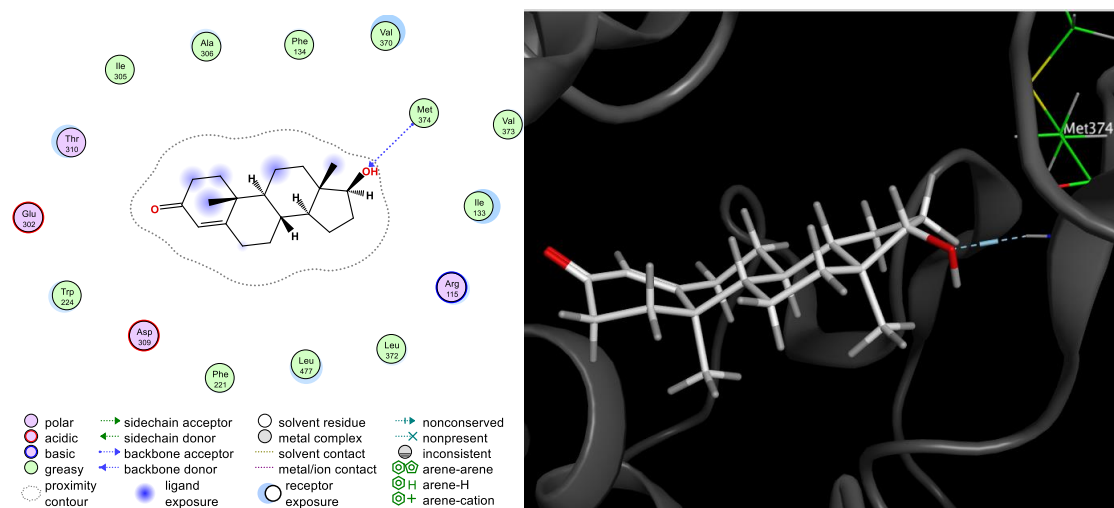
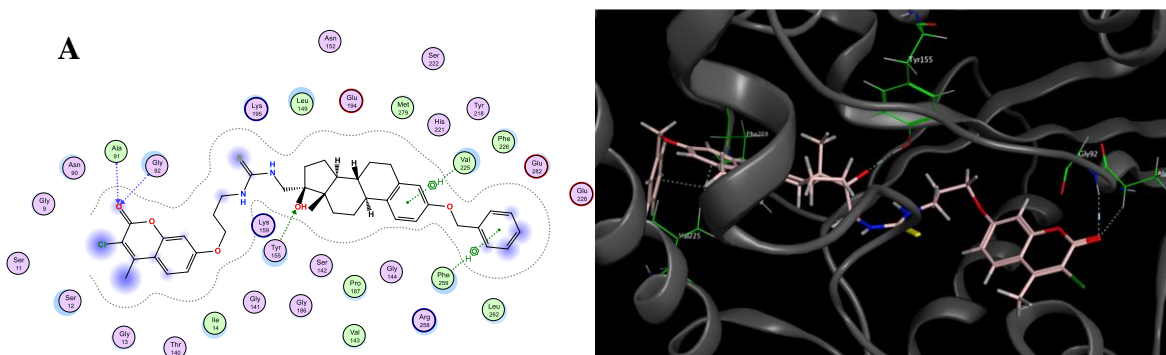


Figura 31. Representación del modelo de validación en 2D y 3D de la testosterona interaccionando con la 17β-HSD1.

Para determinar el modelo de unión entre los compuestos **22a-24c** y la 17β-HSD1 humana, se sometieron a un modelo de acoplamiento molecular *in silico* mediante el programa de MOE, el cual arroja un gran número de posibles poses de unión entre cada uno de los diferentes compuestos y la 17β-HSD1, por lo que se seleccionó solo una pose por compuesto.

Es importante mencionar que en las tioureas analizadas la porción correspondiente al grupo protector bencilo unido al esteroide en el carbono 3, interacciona muy cerca del sitio de unión de la 17 β -HSD1, lo hace en una región proximal que tiene un andamio hidrofóbico lo suficientemente grande para que una molécula de tamaño esteroideal pueda interaccionar en dicho sitio. La importancia de este sitio en el cual se encuentra el aminoácido Phe₂₅₉ es la de participar directamente en la actividad enzimática, esto mediante interacciones entre anillos aromáticos que son fundamentales para el reconocimiento proteína-ligando.¹¹¹

Los compuestos con el linker más pequeño, 3 carbonos; **22a**, **23a** y **24a** interaccionan con la 17 β -HSD1 de la siguiente forma; la porción de la cumarina interacciona con el bolsillo hidrofóbico que corresponde con los aminoácidos; Gly₉, Gly₁₃, Ile₁₄, Ala₉₁, Gly₉₂ y Gly₁₄₁, mientras que la porción correspondiente a la tiourea y parte del esqueleto esteroideal interaccionan con una región hidrofílica que se encuentra conectada al bolsillo hidrofóbico, algunos de los aminoácidos de dicha región son; Ser₁₄₂, Tyr₁₅₅, Lys₁₅₉ y Pro₁₈₇. Es importante indicar que los 2 primeros corresponden a 3 de los aminoácidos que componen la triada catalítica de la 17 β -HSD1. Además, mediante el oxígeno esteroideal del 17 β -hidroxilo, se forma un enlace de hidrógeno hacia la amida del esqueleto -NH de la Tyr₁₅₅. Esto último es muy importante ya que indica que la unión entre los compuestos **22a**, **23a** y **24a** y la 17 β -HSD1 es bastante fuerte pues están involucrados enlaces por puentes de hidrógeno (Figura 32).¹¹²



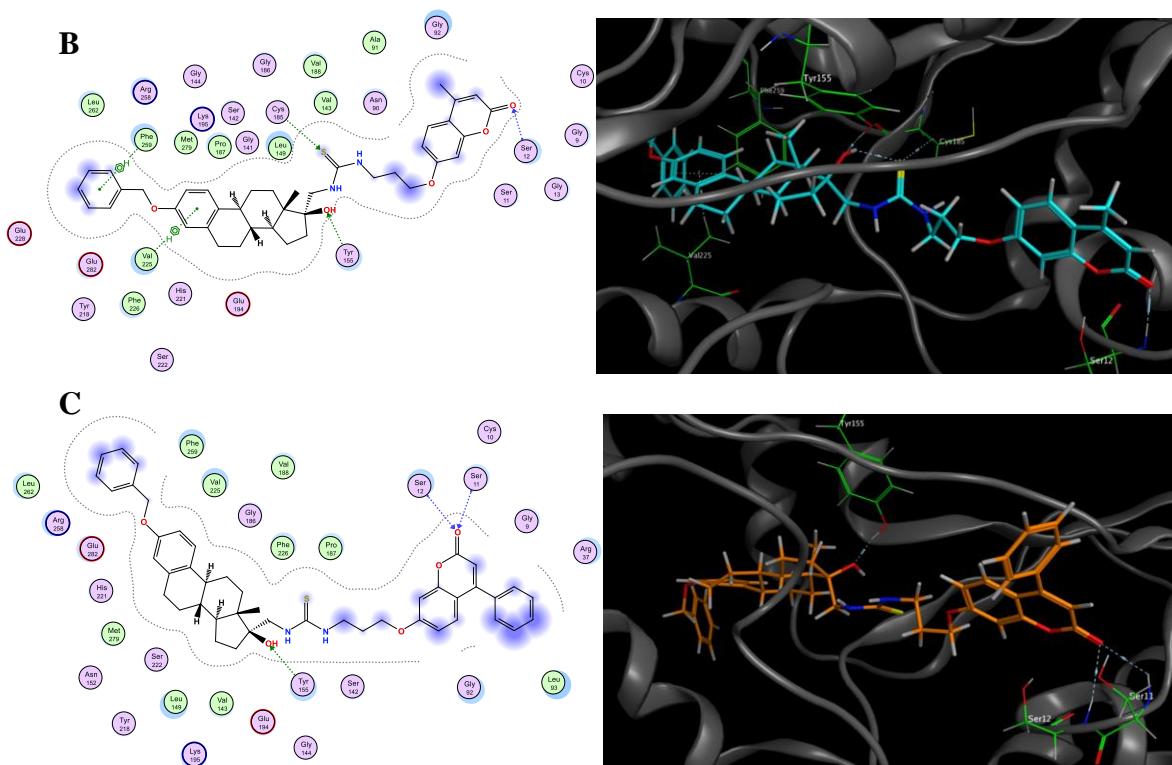
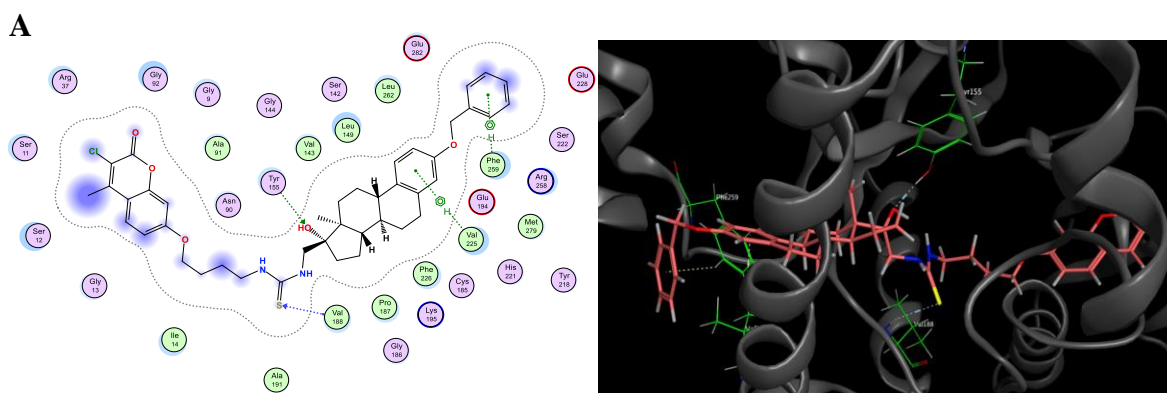


Figura 32. Mapa 2D y 3D de los compuestos **22a** (A, $\Delta G = -11.1769$ kcal/mol) **23a** (B, $\Delta G = -10.4205$ kcal/mol) y **24a** (C, $\Delta G = -10.5847$ kcal/mol) interaccionando con la estructura cristalina de la 17β -HSD1 obtenida mediante el programa MOE.

Los compuestos de linker de 4 (**22b**, **23b** y **24b**) y 6 (**22c**, **23c** y **24c**) carbonos interactúan básicamente de la misma forma que lo hacen tanto en su porción esteroidal, de cumarina y del grupo protector (Figura 33 y 34).



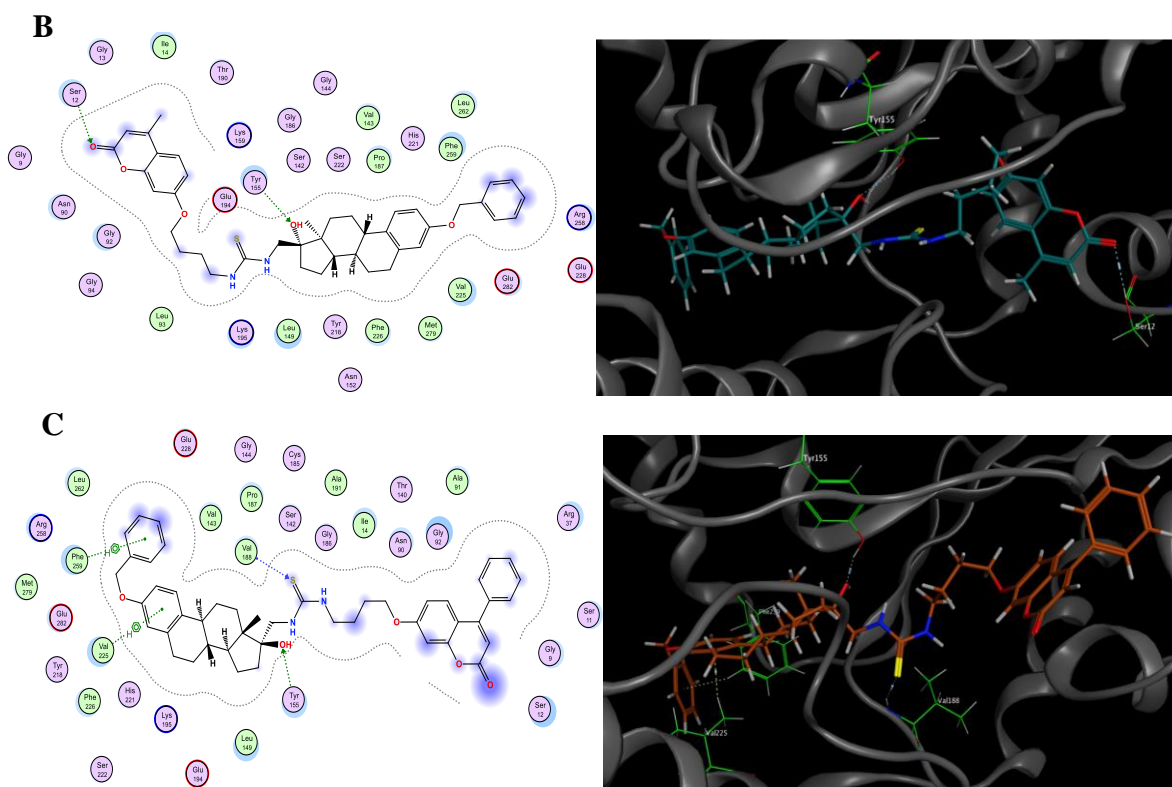
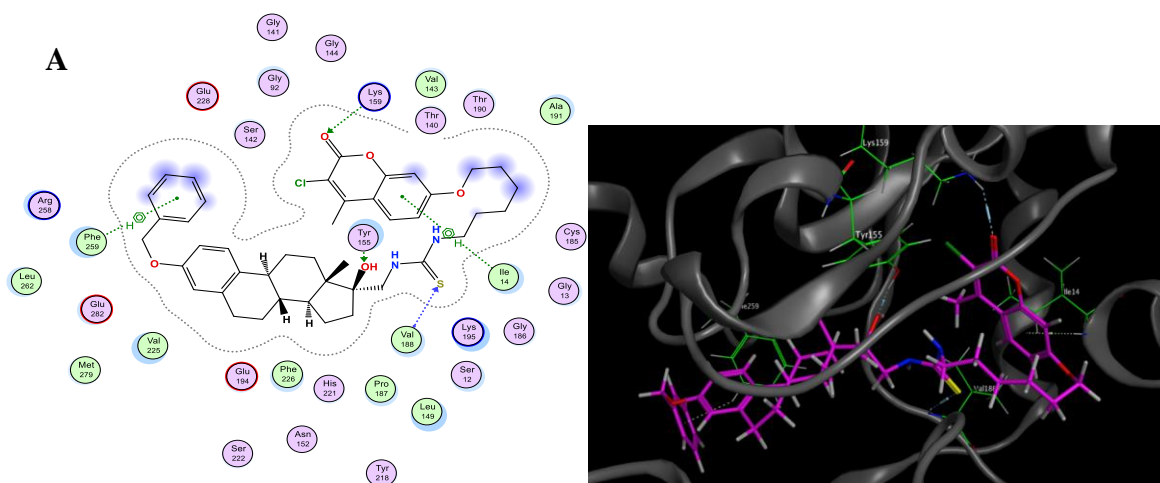


Figura 33. Mapa 2D y 3D de los compuestos **22b** (A, $\Delta G = -11.4435$ kcal/mol) **23b** (B, $\Delta G = -10.8395$ kcal/mol) y **24b** (C, $\Delta G = -11.7535$ kcal/mol) interaccionando con la estructura cristalina de la 17 β -HSD1 obtenida mediante el programa MOE.



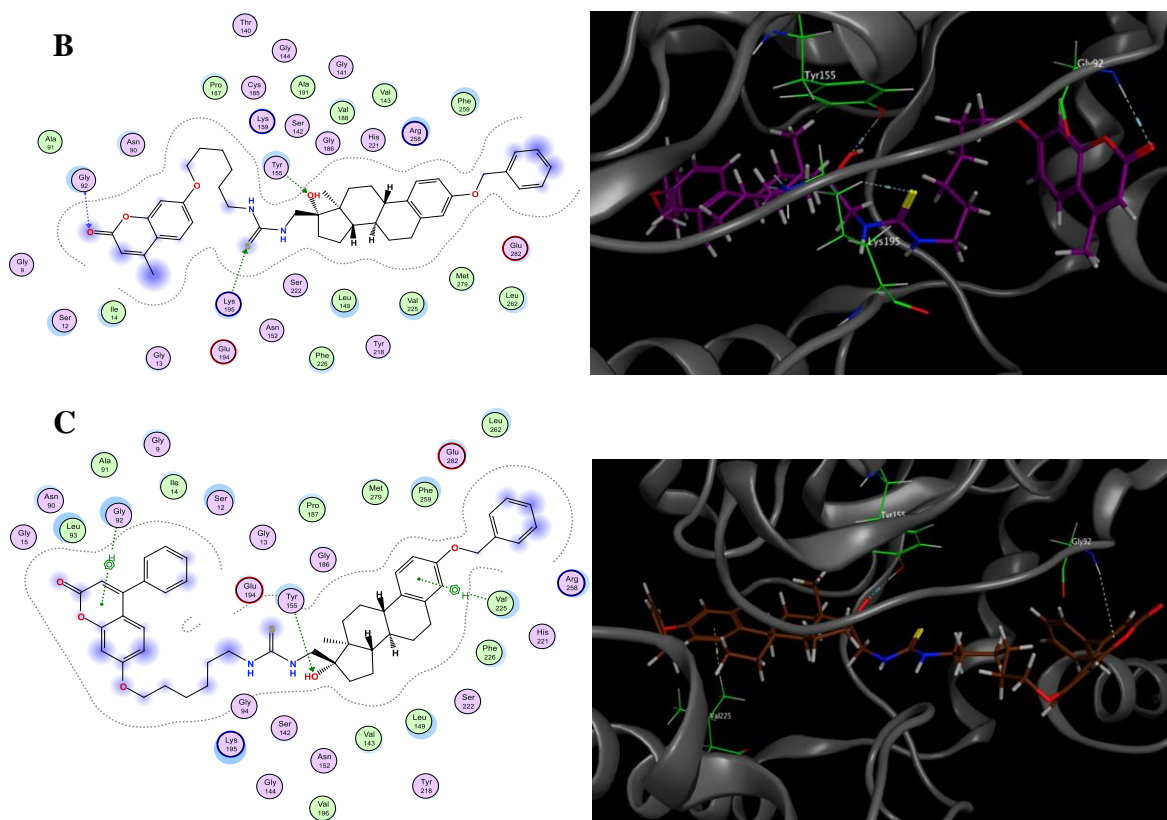


Figura 34. Mapa 2D y 3D de los compuestos **22c** (A, $\Delta G = -12.1547$ kcal/mol) **23c** (B, $\Delta G = -11.6253$ kcal/mol) y **24c** (C, $\Delta G = -12.2651$ kcal/mol) interaccionando con la estructura cristalina de la 17β -HSD1 obtenida mediante el programa MOE.

De las interacciones que presentan todas las tioureas la más importante en definitiva es la que involucra el puente de hidrógeno con la Tyr₁₅₅ debido a su implicación en la actividad catalítica de la aromatasas. Es sabido que los compuestos esteroidales que tienen cadenas laterales de longitud variable en el anillo D presentan una orientación hacia el sitio activo, en donde su anillo A mira hacia el extremo de reconocimiento del sitio de unión. Este tipo de inhibición enzimática describe a complejos, en este caso las tioureas esteroidales, cuya actividad inhibitoria no depende de la concentración de sustrato, por lo que estos inhibidores pueden ser del tipo no competitivo o acompetitivo.¹¹³

Por último, es importante destacar que ninguna de las tioureas presento una interacción con la Met₃₇₄, a diferencia del Docking de validación con la molécula de testosterona, sin embargo, cabe mencionar que la interacción con dicho aminoácido no es determinante para que exista una actividad inhibitoria de la molécula, pues como se ha descrito todas las

tioureas interacción con el bolsillo hidrofóbico de la enzima, la región hidrofílica y con 2 de los aminoácidos de la triada catalítica de la 17 β -HSD1, lo cual es suficiente para que los compuestos **22a-24c** pueden actuar como inhibidores de la 17 β -HSD1.

Conclusiones

Se llevó a cabo la obtención, aislamiento y caracterización espectroscópica de las tioureas esteroidales **22a-24c** con rendimientos de bajos a moderados. Estos compuestos serán sometidos a pruebas biológicas para evaluar su efecto antiproliferativo y como inhibidores enzimáticos de la enzima 17 β -HSD1.

Las pruebas de acoplamiento molecular muestran que todas las tioureas interaccionan de manera precisa con la 17 β -HSD1, pues se internalizan en el bolsillo hidrofóbico de la enzima, la porción de cumarina, mientras que también parte del cuerpo esteroidal y de la tiourea interaccionan con región hidrofílica.

Por último, el hecho de que las tioureas interaccionen con 2 de los aminoácidos de la tríada catalítica y en especial con la Tyr₁₅₅ en forma de enlaces de puente de hidrógeno, demuestra la muy probable actividad inhibitoria que presentan estos compuestos frente a la 17 β -HSD1. Además de que la disposición en la que ocurren las interacciones determina que las tioureas posiblemente actúen como inhibidores de tipo no competitivo o acompetitivo.

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos generales

La cromatografía en capa fina (c.c.f.) se realizó con placas cromatográficas de gel de sílice sobre aluminio (E. Merck Sílica gel 60 F254) las cuales tienen con un espesor de 0.25 nm. Para visualizar los compuestos se expusieron a luz UV ($\lambda = 254$ nm), además de revelar las placas en diferentes mezclas químicas como; ninhidrina etanólica (0.1%), vainillina (10% en EtOH con H₂SO₄ al 1%).

Para la cromatografía en columna se utilizó como fase estacionaria relleno gel de sílice (E. Merck Sílica gel 60; partículas de 40–63 μ m), y como fase móvil diferentes mezclas de solventes según sea el caso. La elución se efectuó por gravedad o con una pequeña presión ejercida por una bomba de aire.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato manual de *Electrothermal* y no están corregidos.

RMN y espectro de masas

Los espectros de RMN se registraron en equipos de *Bruker Avance-300* (300.1 MHz para ¹H y 75.5 MHz ¹³C); *Bruker Avance-500* y *Bruker Ascend 500* (500.13 MHz para ¹H y 125.77 MHz para ¹³C). Como disolventes deuterados se han empleado CDCl₃, CD₃OD, (CD₃)₂CO, (CD₃)₂SO; los espectros se han calibrado usando las señales del disolvente como referencias internas. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm, y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz. La asignación de las señales de los espectros de ¹H se ha realizado usando tanto experimentos monodimensionales (¹H, ¹³C), como bidimensionales: COSY (¹H-¹H, Correlated Spectroscopy), HSQC (¹H-¹³C, *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) y HMBC (¹H-¹³C, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Las abreviaturas empleadas en la descripción de la multiplicidad de las señales son: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuartete), q (quintete), m (multiplete) dd (doble doblete), ddd (doble doblete de doblete), dt (doblete de triplete), td (triplete de doblete), sa (singulete ancho), da (doblete ancho), ta (triplete ancho).

Los espectros de masas se han realizado en un espectrómetro Qexactive, usando como fuente de ionización el electrospray (ESI). La inyección de la muestra (MeOH) se llevó a cabo usando UHPLC sin columna (50 μ L, tiempo de adquisición de 3 min. a 0.200 mL/min); la adquisición efectuó con una resolución de 60,000. La temperatura del capilar fue de 350 °C, y el voltaje, de 3.5 kV. Los espectros se registraron en modo positivo, y calibrados con la disolución de calibración de ion positivo ESI (Pierce™ LTQ Velos).

Medidas de antiproliferación in vitro

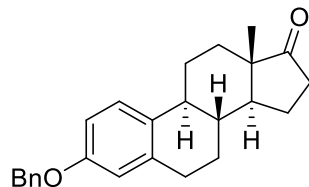
Las medidas de antiproliferación *in vitro* se llevaron a cabo en el grupo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, España). Para ello se emplearon pequeñas modificaciones sobre el protocolo original del Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (NCI, *National Cancer Institute*), mediante el método de la sulforrodamina B (SBR).

Los compuestos puros se disolvieron en DMSO, empleando una disolución madre de 40.0 mM, y una concentración inicial en el pocillo de 100 μ M, con un tiempo de incubación de 48 h. Las células se inocularon en una placa de 96 pocillos, con una densidad de 2500 (A549, HBL-100, HeLa y SW1573), 5000 (T-47D y WiDr) o 7000 (Bj-hTERT) células/pocillo. Las células de control se expusieron a una concentración equivalente de DMSO (0.25% V/V, control negativo). Para aquellos compuestos que exhibieron una actividad superior al 50% en la inhibición del crecimiento celular, se calculó el valor de GI₅₀ (Growth Inhibition 50%), con un rango de concentraciones de hasta 0.001 – 100 μ M, según la actividad exhibida. Las medidas se expresan como el promedio \pm SD.

Para evaluar los cambios fenotípicos inducidos por los compuestos en estudio y relacionarlos con mecanismos de acción, se realizó microscopía de células vivas utilizando el sistema de imágenes de células sin marcaje CX-A (Nanolive S.A., Suiza). En primer lugar, las células tumorales se tripsinizaron y, después de contar, se sembraron 100.000 células en una placa con fondo de vidrio de 35 mm de diámetro (IBIDI, Alemania). Después de 24 h, se cambió el medio por RPMI 1640 sin rojo fenol y las células se trataron con los diferentes compuestos a una concentración de 200 nM. Inmediatamente después, las placas se colocaron en el CX-A y se tomaron imágenes de un área de 236 μ m x 236 μ m cada 3 minutos durante 20 h.

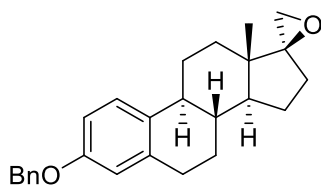
Materias primas y productos

Bencil estrona (1)



A una solución de estrona (1 g, 3,7 mmol) en CH_3CN anhidro (15 mL) se le añadió BnBr (0,77 g, 4,51 mmol) y K_2CO_3 (0,78 g, 5,55 mmol) bajo atmosfera de Ar. La mezcla se agitó y calentó a reflujo durante 8 h, se vertió en AcOEt y filtraron las sales. La fase orgánica se extrajo con salmuera (3 x 25 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. La cromatografía en columna (20:1 Hexano- AcOEt) dio el compuesto **1** como un polvo blanco (1,32 g, 99 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.45 – 7.37 (m, 4H, Ar-H m), 7.34 – 7.31 (m, 1H, Ar-H p), 7.20 (d, 1H, $J_{1,2}=8.5$ Hz, H-1), 6.80 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.5$ Hz, $J_{2,4}=2.8$ Hz, H-2), 6.70 (d, 1H, $J_{2,4}=2.8$ Hz, H-4), 5.04(s, 2H, CH_2Ph), 2.90 (m, 2H, H-6), 2.50 (m, 1H, H-16a), 2.15 (m, 1H, H-16b), 1.26 (m, 1H, H-7b), 0.92 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 157 (C-3), 137.9 (C-5), 137.4 (Ar-C $ipso$), 132.4 (C-10), 128.7 (C m), 128 (C p), 127.5 (Ar-C o), 126.5 (C-1), 115 (C-4), 112.5(C-2), 77.4, 77.2, 76.9, 70.1 (CH_2Ph), 50.5 (C-14), 48.1, 44.1 (C-9), 38.5 (C-8), 36 (C-16), 31.7, 29.8 (C-7), 26.7, 26, 21.7 (C-15), 14 (C-18).

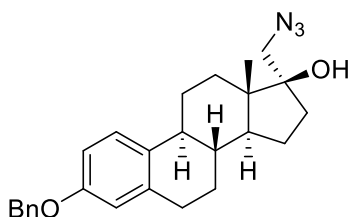
Oxirano de estrona (2)



Se agregó SMe_3I (0,63 g, 3,09 mmol) y $t\text{-BuOK}$ (0,47 g, 4,24 mmol) a una solución de **1** (0,69 g, 1,91 mmol) en DMF anhidra (10 mL) bajo Ar. La reacción se agitó a 0 °C durante 20 minutos y luego a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después de este tiempo, se añadió agua fría y el producto se extrajo con AcOEt . La fase orgánica se lavó con salmuera

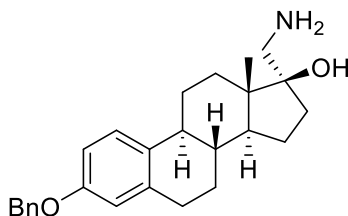
(3 x 25 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. La cromatografía en columna (20:1 Hexano-AcOEt) dio el compuesto **2** como cristales blancos (0,69 g, 97%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (d, 2H, *J*=7.3 Hz, Ar-*Ho*), 7.38 (m, 2H, Ar-*Hm*), 7.32(t, 1H, *J*=7.3 Hz, Ar-*Hp*), 7.21 (d, 1H, *J*=8.6 Hz, H-1), 6.79 (dd, 1H, *J*_{2,1}=8.6 Hz, *J*_{2,4}=2.8 Hz, H-2), 6.74 (d, 1H, *J*_{4,2}=2.6 Hz, H-4), 5.04 (s, 2H, CH₂Ph), 3.62 (m, 1H, H-19a), 3.33 (d, 1H, *J*_{gem}=12.1 Hz, H-19b), 2.51 (dd, 1H, *J*_{H,H}=19.0, *J*_{H,H}=8.6 Hz, H-16a) 2.15 (m, 1H, H-16b), 0.91 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 157.0 (C-3), 138.0 (C-5), 137.3 (Ar-*Cipso*), 132.5 (C-10), 128.7 (*Cm*), 128.0 (*Cp*), 127.6 (*Co*), 126.5 (C-1), 115.0 (C-4), 112.5 (C-2), 83.6, 70.0 (CH₂Ph), 58.5 (C-19), 50.5 (C-14), 48.2, 44.1, 38.4, 36.0 (C-16), 31.7, 29.8, 26.7, 26 (C-11), 21.7, 14.0 (C-18).

Azida de estrona (**3**)



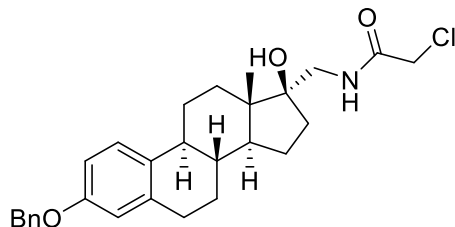
A una solución de **2** (1,50 g, 4,01 mmol) en DMF anhidra (25 mL) se añadió NaN₃ (2,60 g, 40,08 mmol) y H₃BO₃ (1,04 g, 16,91 mmol) bajo Ar. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 h, se vertió en agua y se extrajo con AcOEt (4 x 25 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera (3 x 25 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. La cromatografía en columna (19:1 Hexano-AcOEt) dio el compuesto **3** como cristales blancos (1,52 g, 91%). ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (d, 2H, *J*=7.3 Hz, Ar-*Ho*), 7.38 (m, 2H, Ar-*Hm*), 7.32(t, 1H, *J*=7.3 Hz, Ar-*Hp*), 7.21 (d, 1H, *J*=8.6 Hz, H-1), 6.79 (dd, 1H, *J*_{2,1}=8.6 Hz, *J*_{2,4}=2.8 Hz, H-2), , 6.74 (d, 1H, *J*_{4,2}=2.6 Hz, H-4), 5.04 (s, 2H, CH₂Ph), 3.62 (m, 1H, H-19a), 3.33 (d, 1H, *J*_{gem}=12.1 Hz, H-19b), 2.51 (dd, 1H, *J*_{H,H}=19.0, *J*_{H,H}=8.6 Hz, H-16a) 2.15 (m, 1H, H-16b), 0.91 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 157.0 (C-3), 138.0 (C-5), 137.3 (Ar-*Cipso*), 132.5 (C-10), 128.7 (*Cm*), 128.0 (*Cp*), 127.6 (*Co*), 126.5 (C-1), 115.0 (C-4), 112.5 (C-2), 83.6, 70 (CH₂Ph), 58.5 (C-19), 50.5 (C-14), 48.2, 44.1, 38.4, 36 (C-16), 31.7, 29.8, 26.7, 26 (C-11), 21.7, 14.0 (C-18).

Aminoalcohol de estrona (4)



Se agregó LiAlH_4 (0,18 g, 4,8 mmol) a una solución de **3** (0,2 g, 0,48 mmol) en THF anhidro bajo Ar. La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h, posteriormente el agente reductor se eliminó por filtración a través de una almohadilla de Celite® y el filtrado se concentró hasta sequedad, se disolvió con MeOH y se precipitó con CH_2Cl_2 . El compuesto se filtró y se lavó con éter dietílico enfriado para dar el compuesto **4** como un sólido blanco (0,12 g, 66%). ^1H (500 MHz, MeOD) δ 7.07 (d, 1H, $J_{1,2}=8.4$ Hz, H-1), 6.54 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.4$ Hz, $J_{2,4}=2.6$ Hz, H-2), 6.48 (d, 1H, $J_{4,2}=2.6$ Hz, H-4), 3.04 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 2.78 (m, 2H, H-6), 2.33 (m, 1H, H-11a), 2.12 (m, 1H, H-9), 1.98 (ddd, 1H, $J_{\text{H,H}}=14.3$ Hz, $J_{\text{H,H}}=9.2$ Hz, $J_{\text{H,H}}=5.3$ Hz, H-16a), 1.88 (m, 1H, H-7a), 1.78 (m, 1H, H-15a), 1.76 (m, 1H, H-16b), 1.74 (m, 1H, H-12a), 1.49 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-15b), 1.45 (m, 1H, H-8), 1.44 (m, 1H, H-14), 1.40 (m, 1H, H-12b), 1.30 (m, 1H, H-7b), 0.95 (s, 3H, H-18). ^{13}C (125 MHz, MeOD) δ 156 (C-3), 138.7 (C-5), 132.2 (C-10), 127.2 (C-1), 116.1 (C-4), 113.8 (C-2), 81.9 (C-17), 51.1 (C-14), 47.5 (C-13), 46.7 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 44.9 (C-9), 41.1 (C-8), 33.6 (C-16), 32.6 (C-12), 30.6 (C-6), 28.6 (C-7), 27.4 (C-11), 24.2 (C-15), 14.6 (C-18).

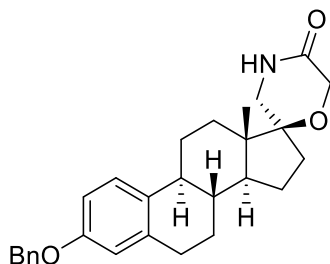
Hidroxicloroacetamida de estrona (5)



A una solución de **4** (0,18 g, 0,46 mmol) en una mezcla MeOH- CH_2Cl_2 anhidro (1:1, 10 mL) se agregó Et_3N (0,09 g, 0,92 mmol) y $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2\text{O}$ (0,05 g, 0,51 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, se vertió en AcOEt y después de neutralizó hasta

un pH de 7 con NaHCO₃. La fase orgánica se lavó con salmuera (3 x 25 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. La cromatografía en columna (14: 6 Hexano-AcOEt) dio el compuesto **5** como un polvo blanco (0,11 g, 51%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.44-7.36 (m, 4H, Ar-H), 7.32 (m, 1H, Ar-Hp), 7.19 (d, 1H, *J*_{1,2}=8.5 Hz, H-1), 6.75 (dd, 1H, *J*_{2,1}=8.5 Hz, *J*_{2,4}=2.7 Hz, H-2), 6.72 (d, 1H, *J*_{4,2}=2.7 Hz, H-4), 5.03 (s, 2H, CH₂Ph), 4.11 (s, 2H, CH₂Cl), 3.62 (dd, 1H, *J*_{gem}=13.5 Hz, *J*_{CHa,NH}=7.6 Hz, CH_{2a}NH), 3.32 (dd, 1H, *J*_{gem}=13.5 Hz, *J*_{CHb,NH}=2.1 Hz, CH_{2b}NH), 2.85 (m, 2H, H-6), 2.34 (m, 1H, H-11a), 2.19 (m, 1H, H-9), 1.94 (ddd, 1H, *J*_{gem}=14.5 Hz, *J*_{H,H}=9.6 Hz, *J*_{H,H}=6.7 Hz, H-16a), 1.88 (m, 1H, H-7a), 1.72 (m, 1H, H-15a), 1.72 (m, 1H, H-12a), 1.60 (m, 1H, H-16b), 1.51 (m, 1H, H-11b), 1.50 (m, 1H, H-14), 1.50 (m, 1H, H-8), 1.48 (m, 1H, H-12b), 1.39 (m, 1H, H-15b), 1.34 (m, 1H, H-7b), 0.93 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.8 (C=O), 156.9 (C-3), 138.1 (C-5), 137.4 (Ar-Cipso), 132.7 (C-10), 128.7 (Ar-C), 128.0 (Ar-Cp), 127.6 (Ar-C), 126.4 (C-1), 115.0 (C-4), 112.4 (C-2), 83.5 (C-17), 70.1 (CH₂Ph), 49.7 (C-14), 46.1 (C-13), 45.8 (CH₂NH), 43.7 (C-9), 42.9 (CH₂Cl), 39.7 (C-8), 34.9 (C-16), 31.7 (C-12), 29.9 (C-6), 27.4 (C-7), 26.3 (C-11), 23.3 (C-15), 14.0 (C-18).

Morfolinona de estrona (**6**)



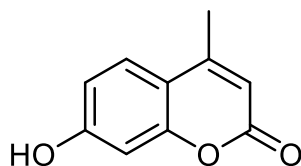
A una solución de **5** (0,10 g, 0,21 mmol) en DMF anhidra (5 mL) se agregó *t*-BuOK (0,92 g, 0,81 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h, se vertió en agua y se extrajo con AcOEt (4 x 10 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera (3 x 15 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. La cromatografía en columna (1: 1 Hexano-AcOEt) dio el compuesto **6** como un polvo blanco (0,04 g, 46 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (sa, 1H, NH), 7.45-7.38 (m, 4H, Ar-H), 7.33 (m, 1H, Ar-Hp), 7.20 (d, 1H, *J*_{1,2}=8.5 Hz, H-1), 6.79 (dd, 1H, *J*_{2,1}=8.6 Hz, *J*_{2,4}=2.7 Hz, H-2), 6.73 (d, 1H, *J*_{4,2}=2.7 Hz, H-4), 5.03 (s, 2H, CH₂Ph), 4.28 (d, 1H, *J*_{gem}=17.6 Hz, H-2'a), 4.20 (d, 1H, *J*_{gem}=17.6 Hz, H-2'b), 3.64 (d, 1H, *J*_{gem}=11.9 Hz, H-5'a), 3.22 (dd, 1H, *J*_{gem}=12.2 Hz,

$J_{5'b,NH}=3.5$ Hz, H-5'b), 2.87 (m, 2H, H-6), 2.31 (m, 1H, H-11a), 2.18 (m, 1H, H-9), 1.98 (m, 1H, H-16a), 1.92 (m, 1H, H-16b), 1.89 (m, 1H, H-7a), 1.80 (m, 1H, H-12a), 1.76 (H-15a), 1.55 (m, 1H, H-8), 1.55 (m, 1H, H-12b), 1.53 (m, 1H, H-11b), 1.47 (H-15b), 1.40 (m, 1H, H-14), 1.32 (m, 1H, H-7b), 0.95 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 169.8 (C-3'), 156.9 (C-3), 138.0 (C-5), 137.3 (Ar-Cipso), 132.5 (C-10), 128.7 (Ar-C), 128.0 (Ar-Cp), 127.6 (Ar-C), 126.4 (C-1), 114.9 (C-4), 112.4 (C-2), 82.9 (C-17), 70.0 (CH_2Ph), 64.9 (C-2'), 50.7 (C-14), 47.1 (C-5'), 46.1 (C-13), 43.8 (C-9), 39.3 (C-8), 33.5 (C-12), 31.4 (C-16), 29.8 (C-6), 27.5 (C-7), 26.3 (C-11), 23.1 (C-15), 13.6 (C-18).

Procedimiento general para la preparación de las cumarinas 100a-c

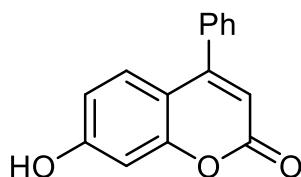
Para preparar la cumarinas el resorcinol (1.0 g, 9.08 mmol, 1.0 equivalentes) se mantuvo en agitación durante 5 min a una temperatura de 0 °C, posteriormente se añadió el correspondiente β -cetoéster (1.1 equivalentes) por goteo. Después la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 4 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido dicho tiempo la reacción se vertió en agua/hielo, el precipitado generado se filtró y lavó con agua fría. Los tres productos que se generaron, dependiendo del β -cetoéster que se utilizó, se purificaron en cromatografía de columna (hexano-AcOEt 7:3).

7-Hidroxi-4-metilcumarina (7)



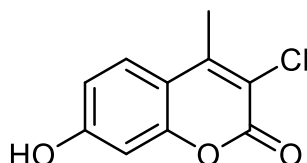
Se utilizó acetoacetato de etilo (1.27 mL, 9.98 mmol, 1.1 equivalentes) obteniendo el compuesto **7** como un sólido blanco (1.49, 93 %). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹¹⁴

7-Hidroxi-4-fenilcumarina (8)



Se utilizó benzoilacetoacetato de etilo (1.72 mL, 9.98 mmol, 1.1 equivalentes) obteniendo el compuesto **8** como cristales amarillos (1.72, 80 %). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹¹⁵

3-Cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina (9)

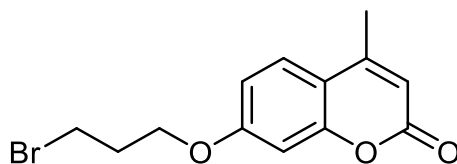


Se utilizó cloroacetato de etilo (1.72 mL, 9.98 mmol, 1.1 equivalentes) obteniendo el compuesto **9** como cristales blancos (1.18, 62 %). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹¹⁵

Procedimiento general para la preparación de las cumarinas *O*-alquiladas 10a-12c

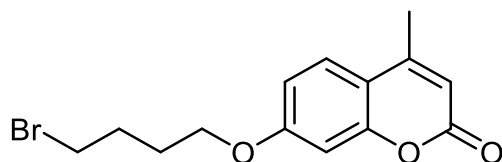
En una disolución de cumarina (**7-9**, 1.0 equivalente) en CH₃CN anhidro (15 mL) se añadió K₂CO₃ seco (1.6 equivalentes) y el correspondiente dibromado (8.0 equivalentes), la reacción se mantuvo en ambiente de Ar a una temperatura de 65 °C durante 5 h. Posteriormente la reacción se concentró a sequedad y el producto se purificó en cromatografía de columna (Hexano → Hexano:AcOEt 8:2).

7-(3'-Bromopropoxi)-4-metilcumarina (10a)



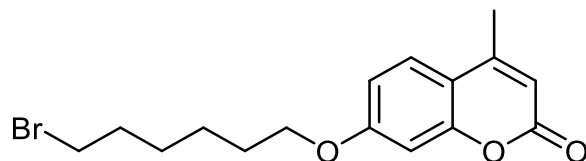
Se utilizó la cumarina **7** (0.5 g, 2.8 mmol, 1.0 equivalente), 1,3-dibromopropano (2.24 mL, 22.4 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (627.2 mg, 4.48 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **10a** como un sólido blanco (740.2 mg, 90 %).¹¹⁶

7-(4'-Bromobutoxi)-4-metilcumarina (**10b**)



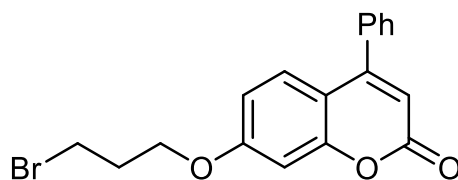
Se utilizó la cumarina **7** (0.5 g, 2.8 mmol, 1.0 equivalente), 1,4-dibromobutano (2.72 mL, 22.4 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (627.2 mg, 4.48 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **10b** como un sólido blanco (732.4 mg, 85 %). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹¹⁶

7-[(6'-Bromohexil)oxi]-4-metilcumarina (**10c**)



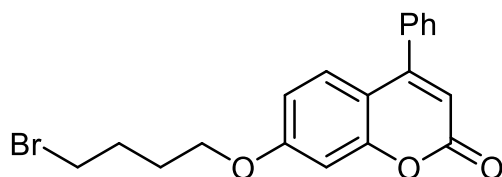
Se utilizó la cumarina **7** (0.5 g, 2.8 mmol, 1.0 equivalente), 1,6-dibromohexano (4.24 mL, 22.4 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (627.2 mg, 4.48 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **10c** como un sólido blanco (809.1 mg, 86 %).¹¹⁶

7-(3'-Bromopropoxi)-4-fenilcumarina (**11a**)



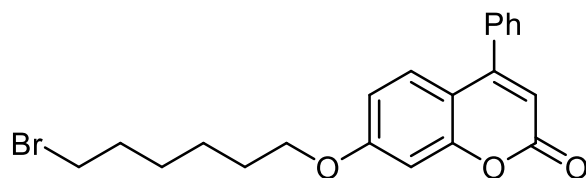
Se utilizó la cumarina **8** (0.5g, 2.1 mmol, 1.0 equivalente), 1,3-dibromopropano (1.76 mL, 16.8 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (464 mg, 3.31 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **11a** como un sólido amarillo (662.3 mg, 88 %).¹¹⁵

7-(4'-Bromobutoxi)-4-fenilcumarina (**11b**)



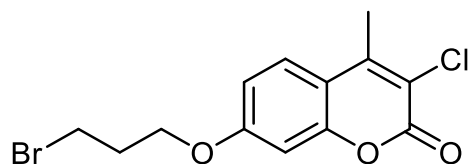
Se utilizó la cumarina **8** (0.5g, 2.1 mmol, 1.0 equivalente), 1,4-dibromobutano (2.0 mL, 16.8 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (464 mg, 3.31 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **11b** como un sólido amarillo (639 mg, 82 %). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹¹⁵

7-[(6'-Bromohexil)oxi]-4-fenilcumarina (**11c**)



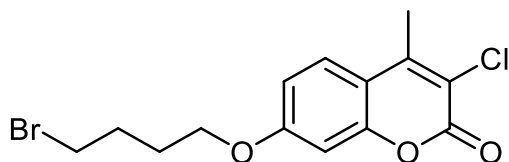
Se utilizó la cumarina **8** (0.5 g, 2.1 mmol, 1.0 equivalente), 1,6-dibromohexano (2.6 mL, 16.8 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (464 mg, 3.31 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **11c** como un sólido amarillo (697 mg, 80 %).¹¹⁵

7-(3'-Brompropoxi)-3-cloro-4-metilcumarina (**12a**)



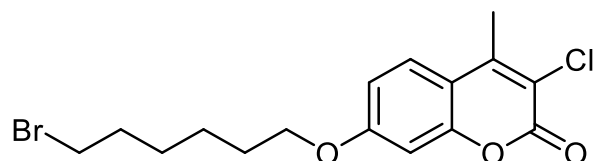
Se utilizó la cumarina **9** (0.5 g, 2.3 mmol, 1.0 equivalente), 1,3-dibromopropano (1.92 mL, 18.8 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (508 mg, 3.63 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **12a** como un sólido blanco (576 mg, 80 %).¹¹⁷

7-(4'-Bromobutoxi)-3-cloro-4-metilcumarina (12b)



Se utilizó la cumarina **9** (0.5 g, 2.3 mmol, 1.0 equivalente), 1,4-dibromobutano (2.24 mL, 18.8 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (508 mg, 3.63 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **12b** como un sólido blanco (623 mg, 78 %). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹¹⁷

7-[(6'-Bromohexil)oxi]-3-cloro-4-metilcumarina (12c)

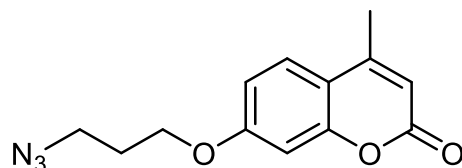


Se utilizó la cumarina **9** (0.5 g, 2.3 mmol, 1.0 equivalente), 1,6-dibromohexano (2.88 mL, 18.8 mmol, 8.0 equivalentes) y K_2CO_3 (508 mg, 3.63 mmol, 1.6 equivalentes) obteniendo el compuesto **12c** como un sólido blanco (699 mg, 82 %).¹¹⁷

Procedimiento general para la preparación de los azidoderivados 13a-15c

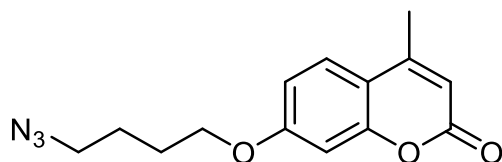
En una disolución de cumarina alquilada, **10a-12c**, (500 mg) en DMF (12 mL) se agregó NaN_3 (5.0 equivalentes), la reacción se calentó a 40 °C durante 2 h. Después se diluyó con AcOEt (40 mL), se lavó con salmuera (10 x 25 mL) se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El producto se purificó en cromatografía de columna (Hexano: AcOEt 7:3).

7-(3'-Azidopropoxi)-4-metilcumarina (13a)



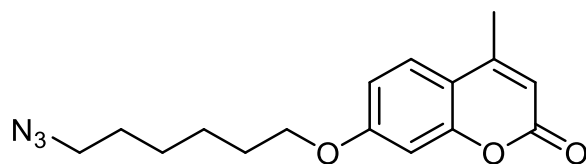
Se empleó la cumarina **10a** (500 mg, 1.68 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (549 mg, 8.44 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **13a** como un sólido blanco (413 mg, 95 %).¹¹⁸

7-(4'-Azidobutoxi)-4-metilcumarina (**13b**)



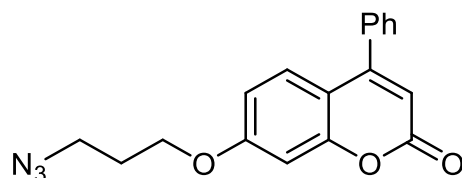
Se empleó la cumarina **10b** (500 mg, 1.61 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (524 mg, 8.06 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **13b** como un sólido blanco (419 mg, 95 %). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹¹⁸

7-[(6'-Azidohexil)oxi]-4-metilcumarina (**13c**)



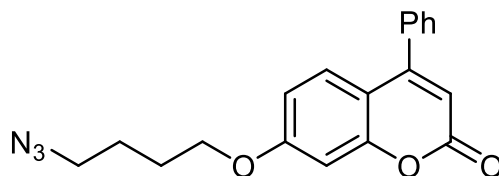
Se empleó la cumarina **10c** (500 mg, 1.47 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (481 mg, 7.4 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **13c** como un sólido blanco (400 mg, 90 %).¹¹⁸

7-[(3'-Azidohexil)oxi]-4-fenilcumarina (**14a**)



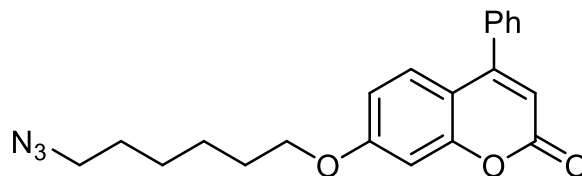
Se empleó la cumarina **11a** (500 mg, 1.39 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (452 mg, 6.96 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **14a** como un sólido blanco (401 mg, 90 %).¹¹⁷

7-[(4'-Azidohexil)oxi]-4-fenilcumarina (14b)



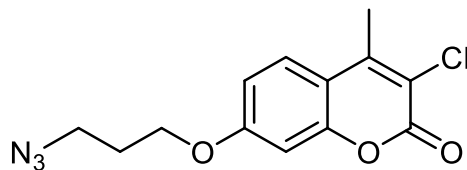
Se empleó la cumarina **11b** (500 mg, 1.34 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (436 mg, 6.7 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **14b** como un sólido blanco (404 mg, 90 %).¹¹⁷

7-[(6'-Azidohexil)oxi]-4-fenilcumarina (14c)



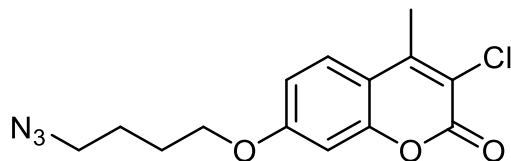
Se empleó la cumarina **11c** (500 mg, 1.25 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (406 mg, 6.25 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **14c** como un sólido blanco (432 mg, 95 %).¹¹⁸

7-[(3'-Azidohexil)oxi]-3-cloro-4-metilcumarina (15a)



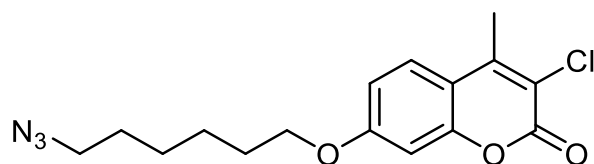
Se empleó la cumarina **12a** (500 mg, 1.51 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (491 mg, 7.55 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **15a** como un sólido blanco (421 mg, 95 %).¹¹⁸

7-[(4'-Azidohexil)oxi]-3-cloro-4-metilcumarina (15b)



Se empleó la cumarina **12b** (500 mg, 1.45 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (471 mg, 7.25 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **15b** como un sólido blanco (388 mg, 87 %).¹¹⁸

7-[(6'-Azidohexil)oxi]-3-cloro-4-metilcumarina (15c)

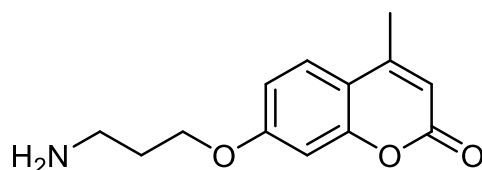


Se empleó la cumarina **12c** (500 mg, 1.34 mmol, 1.0 equivalente) y NaN_3 (436 mg, 6.7 mmol, 5.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **15c** como un sólido blanco (405 mg, 89 %).¹¹⁸

Procedimiento general para la preparación de las aminocumarinas 16a-18c

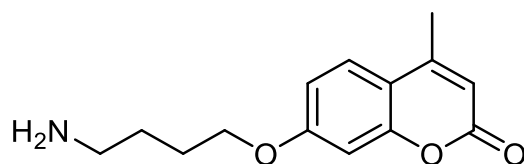
A una disolución de la correspondiente azida **13a-15c** (400 mg) en una mezcla 4:1 THF/ H_2O (16 mL) se agregó PPh_3 (1.4 equivalentes), y se mantuvo a t.a. durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se coevaporó el disolvente con MeOH y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (DCM: MeOH 20:1).

7-(3'-Aminopropoxi)-4-metilcumarina (16a)



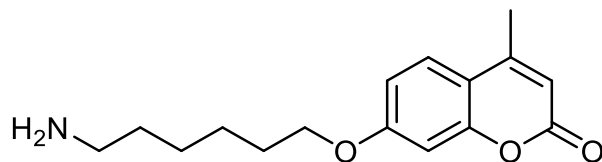
Se utilizó la cumarina **13a** (400 mg, 1.54 mmol, 1.0 equivalente) y PPh_3 (565 mg, 2.16 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **16a** como un sólido blanco (330 mg, 92 %).¹¹⁶

7-(4'-Aminobutoxi)-4-metilcumarina (**16b**)



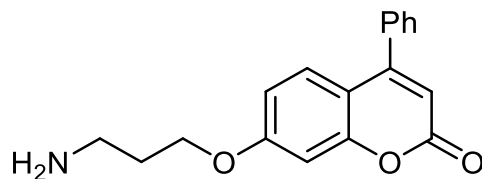
Se utilizó la cumarina **13b** (400 mg, 1.46 mmol, 1.0 equivalente) y PPh_3 (536 mg, 2.04 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **16b** como un sólido blanco (318 mg, 88 %).¹¹⁶

7-[(6'-Aminohexil)oxi]-4-metilcumarina (**16c**)



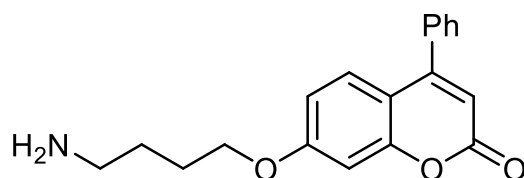
Se utilizó la cumarina **13c** (400 mg, 1.33 mmol, 1.0 equivalente) y PPh_3 (488 mg, 1.86 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **16c** como un sólido blanco (304 mg, 83 %).¹¹⁶

7-(3'-Aminopropoxi)-4-fenilcumarina (**17a**)



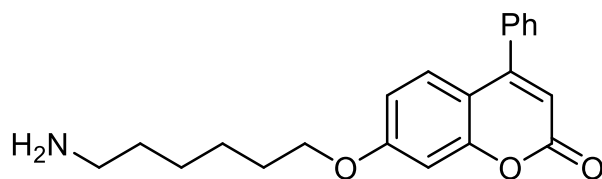
Se utilizó la cumarina **14a** (400 mg, 1.24 mmol, 1.0 equivalente) y PPh_3 (455 mg, 1.74 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **17a** como un sólido amarillo (315 mg, 86 %).¹¹⁵

7-(4'-Aminobutoxi)-4-fenilcumarina (17b)



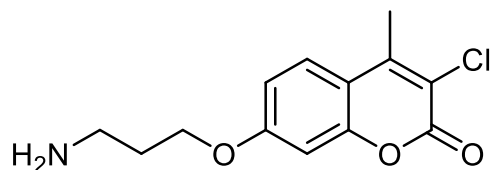
Se utilizó la cumarina **14b** (400 mg, 1.19 mmol, 1.0 equivalente) y PPh_3 (437 mg, 1.67 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **17b** como un sólido amarillo (295 mg, 80 %).¹¹⁵

7-[(6'-Aminohexil)oxi]-4-fenilcumarina (17c)



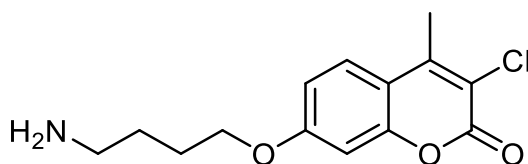
Se utilizó la cumarina **14c** (400 mg, 1.10 mmol, 1.0 equivalente) y PPh_3 (404 mg, 1.54 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **17c** como un sólido amarillo (293 mg, 79 %).¹¹⁵

7-(3'-Aminopropoxi)-3-cloro-4-metilcumarina (18a)



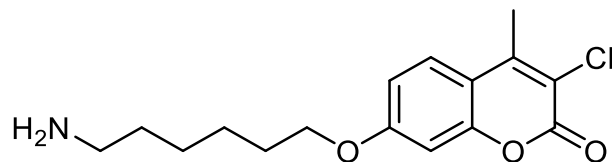
Se utilizó la cumarina **15a** (400 mg, 1.36 mmol, 1.0 equivalente) y PPh₃ (501 mg, 1.91 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **18a** como un sólido blanco (284 mg, 78 %).¹¹⁶

7-(4'-Aminobutoxi)-3-cloro-4-metilcumarina (**18b**)



Se utilizó la cumarina **15b** (400 mg, 1.30 mmol, 1.0 equivalente) y PPh₃ (477 mg, 1.82 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **18b** como un sólido blanco (275 mg, 75 %).¹¹⁶

7-[(6'-Aminohexil)oxi]-3-cloro-4-metilcumarina (**18c**)

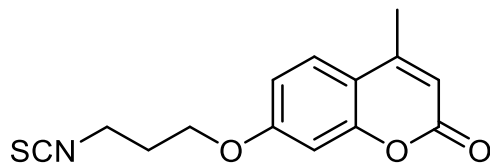


Se utilizó la cumarina **15c** (400 mg, 1.19 mmol, 1.0 equivalente) y PPh₃ (437 mg, 1.67 mmol, 1.4 equivalentes) obteniendo el compuesto **18c** como un sólido blanco (265 mg, 72 %).¹¹⁶

Procedimiento general para la preparación de los isotiocianatos **19a-21c**

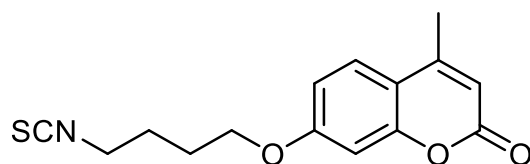
En una solución de la correspondiente cumarina **16a-18c** (250 mg, 1.0 equivalente) en DCM (6 mL) se añadió Et₃N (2.0 equivalentes) y la solución resultante se agitó durante 10 min a 35 °C. Posteriormente la reacción se enfría a t.a. y añade por goteo el tiofosgeno (3.0 equiv.), la reacción se llevó a 35 °C durante 20 min. Después se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (Hexano: AcOEt 8:2).

7-(3'-Isotiocianatopropoxi)-4-metilcumarina (19a)



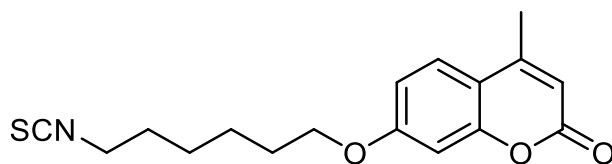
Se utilizó la aminocumarina **16a** (250 mg, 1.07 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.30 mL, 2.14 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.25 mL, 3.21 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **19a** como un sólido blanco (221 mg, 75 %).¹¹⁸

7-(4'-Isotiocianatobutoxi)-4-metilcumarina (19b)



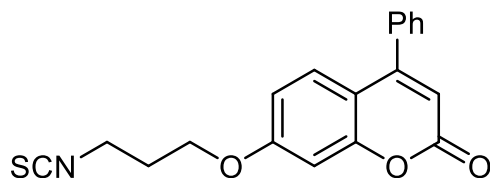
Se utilizó la aminocumarina **16b** (250 mg, 1.01 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.28 mL, 2.02 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.24 mL, 3.03 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **19b** como un sólido blanco (207 mg, 71 %).¹¹⁸

7-[(6'-Isotiocianatohexil)oxi]-4-metilcumarina (19c)



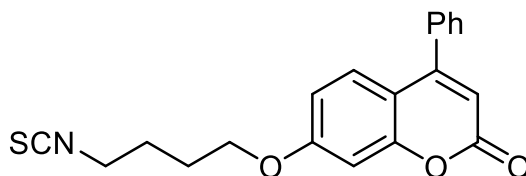
Se utilizó la aminocumarina **16c** (250 mg, 0.91 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.25 mL, 1.82 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.22 mL, 2.73 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **19c** como un sólido blanco (199 mg, 69 %).¹¹⁸

4-Fenil -7-[(3'-isotiocianatohexil)oxi]cumarina (20a)



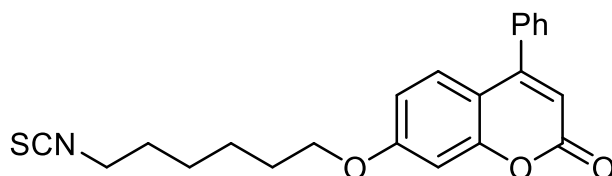
Se utilizó la aminocumarina **17a** (250 mg, 0.85 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.23 mL, 1.70 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.20 mL, 2.55 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **20a** como un sólido blanco (229 mg, 80 %).¹¹⁵

4-Fenil -7-[(4'-isotiocianatohexil)oxi]cumarina (20b)



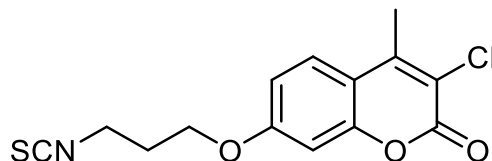
Se utilizó la aminocumarina **17b** (250 mg, 0.81 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.22 mL, 1.62 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.19 mL, 2.43 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **20b** como un sólido blanco (208 mg, 73 %).¹¹⁵

4-Fenil -7-[(6'-isotiocianatohexil)oxi]cumarina (20c)



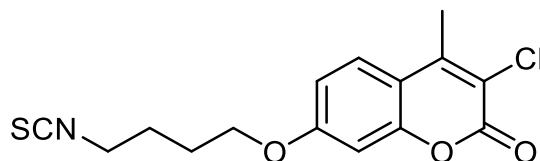
Se utilizó la aminocumarina **17c** (250 mg, 0.74 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.20 mL, 1.48 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.17 mL, 2.22 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **20c** como un sólido blanco (183 mg, 65 %).¹¹⁵

3-Cloro-4-fenil -7-[(3'-isotiocianatohexil)oxi]cumarina (21a)



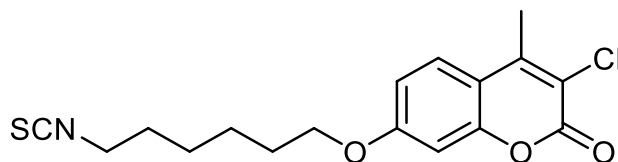
Se utilizó la aminocumarina **18a** (250 mg, 0.93 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.25 mL, 1.86 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.21 mL, 2.79 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **21a** como un sólido blanco (207 mg, 72 %).¹¹⁸

3-Cloro-4-fenil -7-[(4'-isotiocianatohexil)oxi]cumarina (21b)



Se utilizó la aminocumarina **18b** (250 mg, 0.89 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.24 mL, 1.78 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.20 mL, 2.67 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **21b** como un sólido blanco (179 mg, 62 %).¹¹⁸

3-Cloro-4-fenil -7-[(6'-isotiocianatohexil)oxi]cumarina (21c)

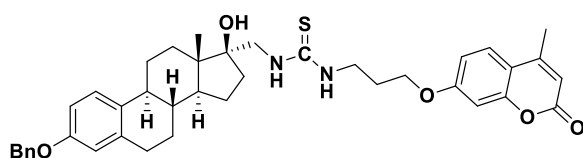


Se utilizó la aminocumarina **18c** (250 mg, 0.81 mmol, 1.0 equivalente), Et₃N (0.22 mL, 1.62 mmol, 2.0 equivalentes) y tiofosgeno (0.18 mL, 2.43 mmol, 3.0 equivalentes) obteniendo el compuesto **21c** como un sólido blanco (188 mg, 66 %).¹¹⁸

Procedimiento general para la preparación de las tioureas 22a-24c

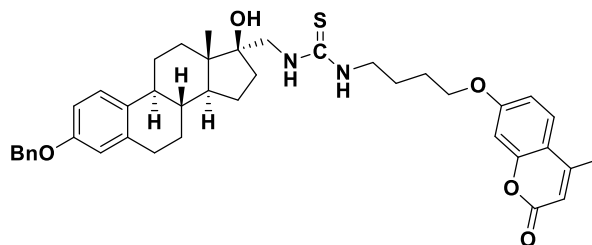
En una solución del correspondiente isotiocianato de cumarina **19a-21c** (150 mg, 1.0 equivalente) en piridina (4 mL) se añadió el compuesto **4** (1.0 equivalente), la solución resultante se agitó durante 1h a 55 °C. Transcurrido ese tiempo se coevaporó la piridina con tolueno y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (Hexano: AcOEt 1:1).

Tiourea 1 (22a)



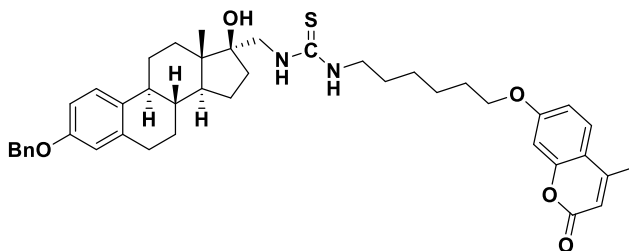
Se empleó el isotiocianatocumarina **19a** (150 mg, 0.54 mmol, 1.0 equivalente) y el compuesto **4** (211 mg, 0.54 mmol, 1.0 equivalente) obteniendo el compuesto **22a** como un sólido blanco (162 mg, 45 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.43-7.38 (d, 2H, $J=7.3$ Hz, Ar-Ho), 7.37-7.34 (m, 2H, Ar-Hm), 7.33-7.30 (m, 1H, Ar-Hp), 7.29-7.28 (m, 1H, 4'), 7.15-7.03 (m, 1H, 6'), 7.01-6.91 (m, 1H, 7'), 6.81-6.75 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.7$ Hz, $J_{2,4}=1.9$ Hz, H-1), 6.75-6.71 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.6$ Hz, $J_{2,4}=1.7$ Hz, H-2), 6.70-6.64 (s, 1H, H-4), 5.98-5.88 (s, 1H, 10'), 5.04-4.94 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.16-4.02 (m, 2H, H-21), 3.50-3.70 (m, 2H, H-23), 2.86-2.72 (m, 2H, H-19), 2.25-2.21 (s, 3H, 11') 1.75-1.63 (m, 2H, H-22), 0.95-0.84 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 182.9 (C-20), 171.2 (C-1'), 161.8 (C-4'), 161.7 (C-3), 156.6 (C-3), 154.7 (C-2'), 154.2 (C-8'), 137.8 (C-5), 137.3 (Ar-Cipso), 133.5 (C-10), 127.8 (C-6'), 126.1 (Cm), 126 (Cp), 125.4 (Ar-Co), 114.7 (C-4), 113.2 (C-10'), 113 (C-2), 112.2, 111.3, 101.1 (C-3'), 84.1 (C-17), 69.8 (CH_2Ph), 66.1 (C-23), 61.7, 60.4, 49.8 (C-14), 46.2 (C-21), 43.4 (C-9), 39.4 (C-8), 33.6 (C-16), 31.5, 29.6 (C-7), 28.5, 27.3, 23.3, 21 (C-15), 18.5, 14.3 (C-18).

Tiourea 2 (22b)



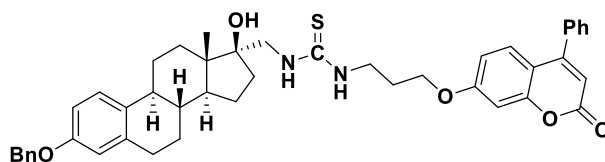
Se empleó el isotiocianatocumarina **19b** (150 mg, 0.52 mmol, 1.0 equiv.) y el compuesto **4** (204 mg, 0.52 mmol, 1.0 equiv.) obteniendo el compuesto **22b** como un sólido blanco (137 mg, 37 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.55-7.51 (d, 2H, $J=7.5$ Hz, Ar-Ho), 7.37-7.34 (m, 2H, Ar-Hm), 7.29-7.27 (m, 1H, Ar-Hp), 7.26-7.25 (m, 1H, 4'), 7.20-7.18 (m, 1H, 6'), 7.15-7.05 (m, 1H, 7'), 6.99-6.89 (dd, 1H, $J_{2,1}=9.0$ Hz, $J_{2,4}=2.1$ Hz, H-1), 6.82-6.72 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.8$ Hz, $J_{2,4}=1.9$ Hz, H-2), 6.70-6.68 (s, 1H, H-4), 6.25-5.95 (s, 1H, 10'), 5.15-4.98 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.42-4.22 (m, 2H, H-24), 4.05-3.78 (m, 2H, H-21), 2.86-2.72 (m, 2H, H-19), 2.18-2.22 (s, 3H, 11'), 1.85-1.78 (m, 2H, H-23), 1.77-1.60 (m, 2H, H-22), 0.90-0.82 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 183.2 (C-20), 173.1 (C-1'), 162 (C-4'), 160 (C-3), 158.3 (C-3), 156.8 (C-2'), 153.1 (C-8'), 141.2 (C-5), 138.4 (Ar-Cipso), 130.1 (C-10), 128.2 (C-6'), 125.2 (Cm), 126.9 (Cp), 124 (Ar-Co), 112.1 (C-4), 110.2 (C-10'), 109.3 (C-2), 109.2, 108.4, 100 (C-3'), 86.8 (C-17), 71.3 (CH_2Ph), 70.1 (C-23), 60.5, 60.4, 54.2 (C-14), 51.3 (C-21), 47 (C-9), 37.4 (C-8), 35.2 (C-16), 30.2, 28.5 (C-7), 28, 27.2, 22.2, 21.1 (C-15), 18.1, 14.1 (C-18).

Tiourea 3 (22c)



Se empleó el isotiocianatocumarina **19c** (150 mg, 0.47 mmol, 1.0 equivalente) y el compuesto **4** (184 mg, 0.47 mmol, 1.0 equivalente) obteniendo el compuesto **22c** como un sólido blanco (133 mg, 40 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.68-7.60 (d, 2H, $J=7.8$ Hz, Ar-Ho), 7.51-7.44 (m, 2H, Ar-Hm), 7.38-7.33 (m, 1H, Ar-Hp), 7.31-7.29 (m, 1H, 4'), 7.28-7.19 (m, 1H, 6'), 7.17-7.11 (m, 1H, 7'), 7.08-6.97 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.9$ Hz, $J_{2,4}=2.2$ Hz, H-1), 6.95-6.89 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.7$ Hz, $J_{2,4}=2.1$ Hz, H-2), 6.82-6.77 (s, 1H, H-4), 6.30-5.91 (s, 1H, 10'), 5.22-5.12 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.15-4.21 (m, 2H, H-26), 4.19-3.87 (m, 2H, H-21), 2.89-2.79 (m, 2H, H-19), 2.25-2.20 (s, 3H, 11'), 2.21-2.05 (m, 2H, H-25), 1.88-1.81 (m, 2H, H-23), 1.82-1.75 (m, 2H, H-24), 1.72-1.61 (m, 2H, H-22), 0.85-0.79 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 183 (C-20), 175.8 (C-1'), 163.2 (C-4'), 161.9 (C-3), 159.4 (C-3), 156.4 (C-2'), 155.3 (C-8'), 140.1 (C-5), 138 (Ar-Cipso), 129.3 (C-10), 128.1 (C-6'), 126 (Cm), 124.3 (Cp), 124 (Ar-Co), 117.1 (C-4), 115.8 (C-10'), 110.1 (C-2), 109.3, 108.3, 102.2 (C-3'), 84.9 (C-17), 71.4 (CH_2Ph), 70.6 (C-23), 62.1, 61, 53.4 (C-14), 53 (C-21), 46.9 (C-9), 37.9 (C-8), 35.2 (C-16), 31.3, 29.3 (C-7), 28.4, 28, 24.7, 22.1 (C-15), 19, 14 (C-18).

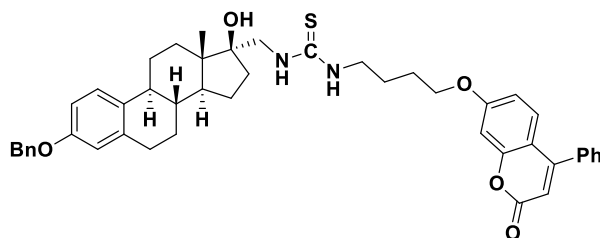
Tiourea 4 (23a)



Se empleó el isotiocianatocumarina **20a** (150 mg, 0.44 mmol, 1.0 equivalente) y el compuesto **4** (172 mg, 0.44 mmol, 1.0 equivalente) obteniendo el compuesto **23a** como un

sólido blanco (154 mg, 48 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.62-7.59 (m, 2H, Ar-Ho), 7.55-7.50 (m, 2H, Ar-Hm), 7.47-7.43 (m, 1H, Ar-Hp), 7.39-7.36 (d, 2H, $J=6.9$ Hz, Ar-Ho), 7.31-7.29 (m, 2H, Ar-Hm), 7.22-7.19 (m, 1H, Ar-Hp), 7.15-7.10 (m, 1H, 4'), 7.05-7.01 (m, 1H, 6'), 6.96-6.92 (m, 1H, 7'), 6.88-6.80 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.4$ Hz, $J_{2,4}=2.1$ Hz, H-1), 6.74-6.69 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.7$ Hz, $J_{2,4}=1.9$ Hz, H-2), 6.59-6.53 (s, 1H, H-4), 6.17-6.09 (s, 1H, 10'), 5.25-5.15 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.29-4.11 (m, 2H, H-21), 3.82-3.69 (m, 2H, H-23), 2.99-2.71 (m, 2H, H-19), 2.44-2.19 (s, 3H, 11') 1.89-1.77 (m, 2H, H-22), 0.91-0.87 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 183.3 (C-20), 172.1 (C-1'), 164.5 (C-4'), 163 (C-3), 159.1 (C-3), 152.4 (C-2'), 150.8 (C-8'), 139.8 (C-5), 136.8 (Ar-Cipso), 134.9 (C-10), 130 (C-6'), 129.8 (Cm), 127.9 (Cp), 126.8 (Ar-Co), 125.1 (Cm), 124.9 (Cp), 123.1 (Ar-Co), 118.1 (C-4), 115.4 (C-10'), 113.1 (C-2), 112.1, 110.9, 105.8 (C-3'), 88.4 (C-17), 72.2 (CH_2Ph), 68.2 (C-23), 63.8, 62.1 51 (C-14), 49 (C-21), 44.2 (C-9), 40.3 (C-8), 34.3 (C-16), 32.8, 31 (C-7), 29.1, 28.8, 24.5, 22.1 (C-15), 19, 14 (C-18).

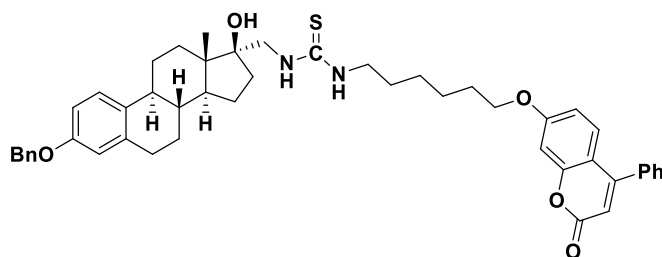
Tiourea 5 (23b)



Se empleó el isotiocianatocumarina **20b** (150 mg, 0.43 mmol, 1.0 equivalente) y el compuesto **4** (168 mg, 0.43 mmol, 1.0 equivalente) obteniendo el compuesto **23b** como un sólido blanco (136 mg, 41 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.61-7.58 (m, 2H, Ar-Ho), 7.52-7.49 (m, 2H, Ar-Hm), 7.47-7.42 (m, 1H, Ar-Hp), 7.41-7.35 (d, 2H, $J=7.2$ Hz, Ar-Ho), 7.33-7.27 (m, 2H, Ar-Hm), 7.25-7.21 (m, 1H, Ar-Hp), 7.17-7.10 (m, 1H, 4'), 7.08-6.99 (m, 1H, 6'), 6.91-6.82 (m, 1H, 7'), 6.80-6.75 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.7$ Hz, $J_{2,4}=1.9$ Hz, H-1), 6.68-6.63 (dd, 1H, $J_{2,1}=9.1$ Hz, $J_{2,4}=2.01$ Hz, H-2), 6.58-6.52 (s, 1H, H-4), 6.35-6.31 (s, 1H, 10'), 5.29-5.17 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.08-3.97 (m, 2H, H-24), 3.92-3.77 (m, 2H, H-21), 3.05-2.88 (m, 2H, H-19), 2.53-2.26 (s, 3H, 11'), 1.89-1.81 (m, 2H, H-23), 1.79-1.62 (m, 2H, H-22), 0.92-0.84 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 178.4 (C-20), 172 (C-1'), 166.1

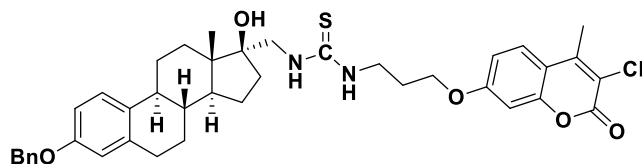
(C-4'), 164.9 (C-3), 158.5 (C-3), 153.2 (C-2'), 149.2 (C-8'), 142 (C-5), 138.3 (Ar-Cipso), 137.6 (C-10), 132.1 (C-6'), 130.1 (Cm), 128.2 (Cp), 127.7 (Ar-Co), 126.3 (Cm), 125.1 (Cp), 124.1 (Ar-Co), 119.9 (C-4), 117.3 (C-10'), 115.4 (C-2), 113, 111.5, 110.1 (C-3'), 90.2 (C-17), 74.9 (CH₂Ph), 69.2 (C-23), 64.5, 62.3, 49 (C-14), 48 (C-21), 45 (C-9), 39.8 (C-8), 36.2 (C-16), 36, 34.2, 31.1, 28.2 (C-7), 27.3, 26.1, 23.5, 21.8 (C-15), 18.8, 13.3 (C-18).

Tiourea 6 (23c)



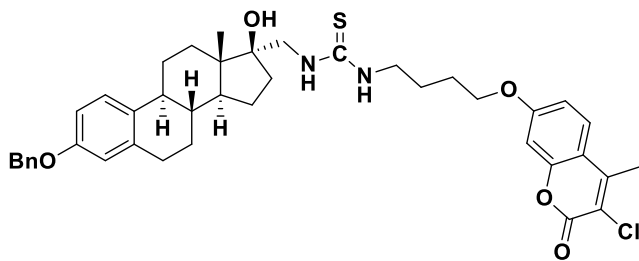
Se empleó el isotiocianatocumarina **20c** (150 mg, 0.40 mmol, 1.0 equivalente) y el compuesto **4** (157 mg, 0.40 mmol, 1.0 equivalente) obteniendo el compuesto **23c** como un sólido blanco (117 mg, 38 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.69-7.61 (m, 2H, Ar-Ho), 7.57-7.52 (m, 2H, Ar-Hm), 7.51-7.45 (m, 1H, Ar-Hp), 7.44-7.38 (d, 2H, *J*=6.9 Hz, Ar-Ho), 7.36-7.28 (m, 2H, Ar-Hm), 7.26-7.18 (m, 1H, Ar-Hp), 7.16-7.08 (m, 1H, 4'), 7.06-6.92 (m, 1H, 6'), 6.90-6.81 (m, 1H, 7'), 6.79-6.74 (dd, 1H, *J*_{2,1}=8.6 Hz, *J*_{2,4}=1.9 Hz, H-1), 6.70-6.65 (dd, 1H, *J*_{2,1}=8.8 Hz, *J*_{2,4}=2.01 Hz, H-2), 6.59-6.53 (s, 1H, H-4), 6.46-6.38 (s, 1H, 10'), 5.42-5.29 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.29-4.22 (m, 2H, H-26), 4.15-3.96 (m, 2H, H-21), 3.28-2.91 (m, 2H, H-19), 2.65-2.44 (s, 3H, 11'), 2.38-2.23 (m, 2H, H-25), 1.99-1.86 (m, 2H, H-23), 1.78-1.68 (m, 2H, H-24), 1.65-1.52 (m, 2H, H-22), 0.93-0.87 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 175.2 (C-20), 172.1 (C-1'), 167.1 (C-4'), 162.1 (C-3), 160 (C-3), 155.9 (C-2'), 150.2 (C-8'), 142.5 (C-5), 137.4 (Ar-Cipso), 136 (C-10), 132 (C-6'), 130.3 (Cm), 129.1 (Cp), 128.3 (Ar-Co), 127.1 (Cm), 126.8 (Cp), 125.4 (Ar-Co), 120.5 (C-4), 118.7 (C-10'), 116.3 (C-2), 113, 111.3, 108.8 (C-3'), 98.7 (C-17), 81.3 (CH₂Ph), 75.23 (C-23), 62.3, 57.4, 48 (C-14), 45.4 (C-21), 41.4 (C-9), 37 (C-8), 35.2 (C-16), 34.5, 32.1, 29.8, 28.2 (C-7), 28.1, 27.6, 25.4, 23.8, 22.9, 21 (C-15), 18, 14 (C-18).

Tiourea 7 (24a)



Se empleó el isotiocianatocumarina **21a** (150 mg, 0.48 mmol, 1.0 equivalente) y el compuesto **4** (188 mg, 0.48 mmol, 1.0 equivalente) obteniendo el compuesto **24a** como un sólido blanco (142 mg, 42 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.44-7.39 (d, 2H, $J=7.1$ Hz, Ar-Ho), 7.38-7.35 (m, 2H, Ar-Hm), 7.30-7.27 (m, 1H, Ar-Hp), 7.25-7.23 (m, 1H, 4'), 7.20-7.12 (m, 1H, 6'), 7.08-6.93 (m, 1H, 7'), 6.82-6.77 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.4$ Hz, $J_{2,4}=1.9$ Hz, H-1), 6.76-6.70 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.4$ Hz, $J_{2,4}=1.9$ Hz, H-2), 6.62-6.57 (s, 1H, H-4), 5.25-4.99 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.22-4.04 (m, 2H, H-21), 3.45-3.21 (m, 2H, H-23), 2.92-2.71 (m, 2H, H-19), 2.33-2.26 (s, 3H, 11'), 1.70-1.63 (m, 2H, H-22), 0.94-0.87 (s, 3H, H-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 180 (C-20), 172.1 (C-1'), 162.1 (C-4'), 159.8 (C-3), 157.8 (C-3), 156 (C-2'), 154 (C-8'), 139.2 (C-5), 138 (Ar-Cipso), 135 (C-10'), 134 (C-10), 128.1 (C-6'), 125.9 (Cm), 125.1 (Cp), 122.4 (Ar-Co), 113 (C-4), 111.1 (C-2), 110.4, 109.8, 99.5 (C-3'), 82 (C-17), 72.4 (CH_2Ph), 69.3 (C-23), 64.1, 62.3, 48 (C-14), 46.1 (C-21), 44.8 (C-9), 41.6 (C-8), 36.9 (C-16), 32.3, 30.2 (C-7), 29.1, 28.1, 24.9, 22.3 (C-15), 18, 14 (C-18).

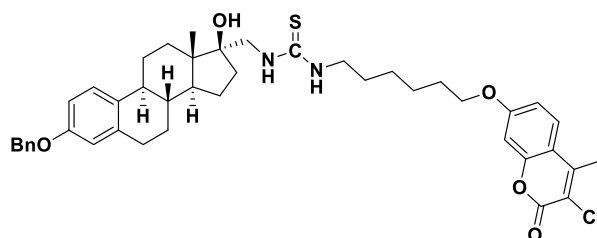
Tiourea 8 (24b)



Se empleó el isotiocianatocumarina **21b** (150 mg, 0.46 mmol, 1.0 equivalente) y el compuesto **4** (180 mg, 0.46 mmol, 1.0 equivalente) obteniendo el compuesto **24b** como un sólido blanco (100 mg, 29 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.51-7.45 (d, 2H, $J=6.6$ Hz, Ar-Ho), 7.42-7.37 (m, 2H, Ar-Hm), 7.35-7.25 (m, 1H, Ar-Hp), 7.22-7.09 (m, 1H, 4'), 7.08-

6.98 (m, 1H, 6'), 6.94-6.84 (m, 1H, 7'), 6.80-6.75 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.7$ Hz, $J_{2,4}=2.01$ Hz, H-1), 6.73-6.63 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.7$ Hz, $J_{2,4}=2.02$ Hz, H-2), 6.54-6.48 (s, 1H, H-4), 5.32-5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.19-4.02 (m, 2H, H-21), 3.78-3.64 (m, 2H, H-24), 3.23-2.99 (m, 2H, H-19), 2.39-2.33 (s, 3H, 11'), 1.82-1.67 (m, 2H, H-22), 1.62-1.43 (m, 2H, H-23), 0.91-0.84 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 182.7 (C-20), 174.1 (C-1'), 164.2 (C-4'), 159.3 (C-3), 158.9 (C-3), 157.2 (C-2'), 155 (C-8'), 144 (C-5), 140 (Ar-Cipso), 139.2 (C-10'), 137.2 (C-10), 129 (C-6'), 127.1 (Cm), 126.1 (Cp), 124.7 (Ar-Co), 120 (C-4), 115.3 (C-2), 113.2, 109.1, 99 (C-3'), 86.4 (C-17), 75.1 (CH₂Ph), 73.1 (C-23), 67.1, 66, 49.3 (C-14), 45 (C-21), 44.3 (C-9), 42.2 (C-8), 39.8 (C-16), 35.2, 34 (C-7), 29.4, 28.1, 27.9, 27.4, 24, 22.5, 20.3 (C-15), 17.5, 13.9 (C-18).

Tiourea 9 (24c)



Se empleó el isotiocianatocumarina **21c** (150 mg, 0.43 mmol, 1.0 equivalente) y el compuesto **4** (168 mg, 0.43 mmol, 1.0 equivalente) obteniendo el compuesto **24c** como un sólido blanco (105 mg, 33 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.48-7.44 (d, 2H, $J=7.02$ Hz, Ar-Ho), 7.41-7.36 (m, 2H, Ar-Hm), 7.35-7.22 (m, 1H, Ar-Hp), 7.18-7.07 (m, 1H, 4'), 7.06-6.90 (m, 1H, 6'), 6.88-6.74 (m, 1H, 7'), 6.71-6.65 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.4$ Hz, $J_{2,4}=1.7$ Hz, H-1), 6.60-6.54 (dd, 1H, $J_{2,1}=8.7$ Hz, $J_{2,4}=2.01$ Hz, H-2), 6.52-6.47 (s, 1H, H-4), 5.34-5.18 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.18-4.10 (m, 2H, H-21), 3.68-3.52 (m, 2H, H-26), 3.05-2.85 (m, 2H, H-19), 2.42-2.35 (s, 3H, 11'), 2.27-2.17 (m, 2H, H-22), 2.05-1.92 (m, 2H, H-25), 1.65-1.41 (m, 2H, H-24), 1.33-1.21 (m, 2H, H-23), 0.92-0.85 (s, 3H, H-18). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 181.4 (C-20), 173.2 (C-1'), 163.2 (C-4'), 158.8 (C-3), 157.1 (C-3), 156.1 (C-2'), 155 (C-8'), 142 (C-5), 139.4 (Ar-Cipso), 138 (C-10'), 136.2 (C-10), 127.1 (C-6'), 126.3 (Cm), 125 (Cp), 123.8 (Ar-Co), 117.1 (C-4), 112.1 (C-2), 111.9, 108.2, 97.3 (C-3'), 84.1 (C-17), 73.3

(CH₂Ph), 71.5 (C-23), 66.2, 64.7, 48.6 (C-14), 46.4 (C-21), 42.1 (C-9), 40.1 (C-8), 38.7 (C-16), 31.9, 31 (C-7), 28, 27.6, 25.1, 23.8, 21.5 (C-15), 18, 13.8 (C-18).

Docking Molecular

Las estructuras cristalinas de las enzimas aromatasas y 17 β -HSD1 fueron obtenidas de la página de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) mediante los códigos PDB: 5JKW y 1FDT, respectivamente. El ensayo de acoplamiento molecular se llevó a cabo gracias a el software Molecular Operating Environment (https://www.chemcomp.com/MOE_v2020.0901).

Para iniciar el ensayo de acoplamiento primeramente se prepararon las moléculas implicadas, para lo cual se descartaron las que “no intervienen” en las interacciones químicas como el H₂O y SO₄²⁻. Posteriormente se seleccionan las cadenas proteicas de “mayor calidad”, estas fueron la cadena A en aromatasas 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 utilizados (**5** y **6**, **22a- 24c**) se construyeron mediante el software ChemDraw Professional 16.0. La ionización y minimización de energía, las cuales son necesarias de realizar para que las interacciones sean lo más precisas posibles, estas llevaron a cabo con el campo de fuerza AMBER10:EHT.

Para determinar la mejor pose se usó el método de 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). Los parámetros obtenidos se utilizaron posteriormente para realizar la validación del acoplamiento. El sitio de unión se determina usando la posición del ligando cristalográfico, el cual se conoce como sitio ortostérico. La unión del ligando con la diana molecular genera alrededor de 100 repeticiones con 100 poses. Para seleccionar la mejor de dichas poses se considera lo siguiente: las interacciones más importantes que deben de incluir puentes de hidrógeno, unión con el bolsillo hidrofóbico e interacción con algunos de los aminoácidos que esté implicado en la actividad catalítica de la enzima, se selecciona también la pose que más se superpone con el ligando cristalográfico y por último se considera aquella que posee una menor energía de unión (ΔG).

Referencias

- [1] Hassan, E.M.; DeRosa, M.C. *Trends Anal. Chem.* **2020**, *124*, 115806-115821.
- [2] Peluso, P.; Dessì, A.; Dallochio, R.; Mamane, V.; Cossu, S. *Electrophoresis.* **2019**, *40*, 1881-1896.
- [3] Kheeree, N.; Sangtanoo, P.; Srimongkol, P.; Saisavoey, T.; Reamtong, O.; Choowongkomon, K.; Karnchanatat, A. *Food Funct.* **2020**, *11*, 8161-8178.
- [4] Deng, Y.; Huang, L.; Zhang, C.; Xie, P.; Cheng, J.; Wang, X.; Liu, L. *Ind Crops Prod.* **2020**, *148*, 112331-112345.
- [5] Sanjukta, S.; Padhi, S.; Sarkar, P.; Singh, S. P.; Sahoo, D.; Rai, A. K. *Int. Food Res. J.* **2021**, *141*, 110161-110177.
- [6] Saha, T.; Makar, S.; Swetha, R.; Gutti, G.; Singh, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *177*, 116-143.
- [7] Mediavilla, D.; Sanchez-Barcelo M. J.; Tan, E. X.; Manchester, D. L.; Reiter, J. R. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 4462-4481.
- [8] Britt, K. L.; Cuzick, J.; Phillips, K. A. **2020**, *Nat. Rev. Cancer*, *20*, 417-436.
- [9] Valenzuela-Vidales, A. K.; Armengol-Alonso, A. *Ann. Oncol.* **2021**, *32*, S36-S44.
- [10] Kharb, R.; Haider, K.; Neha, K.; Yar, M. S. *Arch. Pharm.* **2020**, *353*, 2000081-2000092.
- [11] Jin, Y.; Choi, Y. J.; Heo, K.; Park, S. J. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 438-449.
- [12] Williams, G. P.; Darbre, P. D. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *486*, 55-64.
- [13] Rani, S.; Raheja, K.; Luxami, V.; Paul, K. *Bioorg. Chem.* **2021**, *113*, 105017-105028.
- [14] Bertelli, G.; Garrone, O.; Merlano, M.; Ocelli, M.; Bertolotti, L.; Castiglione, F.; Pepi, F.; Fusco, F.; Del Mastro, L.; Leonard, R. C. *Oncology* **2005**, *69*, 471-477.

- [15] Beresford, M.; Tumor, I.; Chakrabarti, J.; Barden, J.; Rao, N.; Makris, A. *Clin. Oncol.* **2011**, *23*, 209-215.
- [16] Sayyad, N. B.; Sabale, P. M.; Umare, M. D.; Bajaj, K. K. *Indian J. Pharm. Educ. Res* **2022**, *56*, 311-320.
- [17] Wang, X.; Zhu, A.; Wang, J.; Ma, F.; Liu, J.; Fan, Y.; Luo, Y.; Zhang, P.; Li, Q.; Xu, B.; Yuan, P. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2020**, *12*, 1758835920925991.
- [18] Giampietro, L.; Gallorini, M.; Gambacorta, N.; Ammazalorso, A.; De Filippis, B.; Della Valle, A.; Fantacuzzi, M.; Maccallini, C.; Mollica, A.; Catalidi, A.; Nicolotti, O.; Amoroso, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *224*, 113737-113745.
- [19] Cruceriu, D.; Baldasici, O.; Balacescu, O.; Berindan-Neagoe, I. *Cell. Oncol.* **2020**, *43*, 1-18.
- [20] Barbosa, A. M.; Martel, F. *Cancers* **2020**, *12*, 154-168.
- [21] Mohanty, S. S.; Mohanty, P. K. *Genes dis.* **2021**, *8*, 117-123.
- [22] Iyengar, N. M.; Arthur, R.; Manson, J. E.; Chlebowski, R. T.; Kroenke, C. H.; Peterson, L.; Ting-Yuan, D.; Feliciano, E. C.; Lane, D.; Luo, J.; Nassir, R.; Pan, K.; Wassertheil-Smolle, S.; Kamensky, V.; Rohan, T. E.; Dannenberg, A. J. *Oncology* **2019**, *5*, 155-163.
- [23] Hui, R.; Pearson, A.; Cortes, J.; Campbell, C.; Poirrot, C.; Azim Jr, H. A.; Fumagalli, D.; Lambertini, M.; Daly, F.; Arahmani, A.; Pérez-García, J.; Aftimos, P.; Bedard, P. L.; Xuereb, L.; Scheepers, E. D.; Vicente, M.; Goulioti, T.; Loibl, S.; Pierrat, M. J.; Turner, N. C.; Andre, F.; Curigliano, G. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 354-363.
- [24] Yeo, W.; Ueno, T.; Lin, C. H.; Liu, Q.; Lee, K. H.; Leung, R.; Naito, Y.; Park, Y. H.; Im, S. A.; Li, H.; Yap, S. M.; Lu, Y. S. *Breast Cancer Res. Treat.* **2019**, *177*, 549-559.
- [25] Dehdashti, F.; Wu, N.; Ma, C. X.; Naughton, M. J.; Katzenellenbogen, J. A.; Siegel, B. A. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 733-749.

- [26] Contreras-Zárate, M. J.; Day, N. L.; Ormond, D. R.; Borges, V. F.; Tobet, S.; Gril, B.; Steeg, P. S.; Cittelly, D. M. *Oncogene* **2019**, *38*, 4685-4699.
- [27] Vydra, N.; Janus, P.; Toma-Jonik, A.; Stokowy, T.; Mrowiec, K.; Korfanty, J.; Długajczyk, A.; Wojta's, B.; Gielniewsk, B.; Widłak, W. *Cancers* **2019**, *11*, 1533-1545.
- [28] Lara-Cruz, C.; Jiménez-Salazar, J. E.; Arteaga, M.; Arredondo, M.; Ramón-Gallegos, E.; Batina, N.; Damián-Matsumura, P. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *38*, 2705-2718.
- [29] Anbar, H. S.; Isa, Z.; Elounais, J. J.; Jameel, M. A.; Zib, J. H.; Samer, A. M.; Jawad, A. F.; El-Gamal, M. I. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2021**, *31*, 453-472.
- [30] Singh, V.; Jha, K. K.; Kumar, R. V.; Raghunathan, V.; Bhat, R. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1562-1573.
- [31] Kumari, K.; Kar, A.; Nayak, A. K.; Mishra, S. K.; Subudhi, U. *RSC advances* **2021**, *11*, 10670-10680.
- [32] Maltais, R.; Djiemeny, A. N.; Roy, J.; Barbeau, X.; Lambert, J. P.; Poirier, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115368-115376.
- [33] Grienke, U.; Kaserer, T.; Kirchweger, B.; Lambrinidis, G.; Kandel, R. T.; Foster, P. A.; Schuster, D.; Mikros, E.; Rollinger, J. M. *Bioorg. Chem.* **2020**, *95*, 103495.-103508.
- [34] Salah, M.; Abdelsamie, A. S.; Frotscher, M. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *489*, 66-81.
- [35] Li, T.; Stephen, P.; Zhu, D. W.; Shi, R.; Lin, S. X. *FEBS J.* **2019**, *286*, 2155-2166.
- [36] Hasegawa, Y.; Ijiri, S.; Surugaya, R.; Sakai, R.; Adachi, S. *Aquaculture* **2022**, *546*, 737238-737255.
- [37] Agarwal, V. R.; Bulun, S. E.; Leitch, M.; Rohrich, R.; Simpson, E. R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, *81*, 3843-3849.
- [38] Doering, J. A.; Villeneuve, D. L.; Fay, K. A.; Randolph, E. C.; Jensen, K. M.; Kahl, M. D.; Lalone, C. A.; Ankley, G. T. *Toxicol. Sci.* **2019**, *170*, 394-403.

- [39] Harborg, S.; Heide-Jørgensen, U.; Ahern, T. P.; Ewertz, M.; Cronin-Fenton, D.; Borgquist, S. *Breast Cancer Res. Treat.* **2020**, *183*, 153-160.
- [40] Martino, G.; Catalano, A.; Agostino, R. M.; Bellone, F.; Morabito, N.; Lasco, C. G.; Vicario, C. M.; Schwarz, P.; Feldt-Rasmussen, U. *PLoS one* **2020**, *15*, e0230681.
- [41] Golbaghi, G.; Haghdoost, M. M.; Yancu, D.; Lopez de los Santos, Y.; Doucet, N.; Patten, S. A.; Sanderson, J. T.; Castonguay, A. *Organometallics* **2019**, *38*, 702-711.
- [42] Spinello, A.; Martini, S.; Berti, F.; Pennati, M.; Pavlin, M.; Sgrignani, J.; Grazioso, G.; Colombo, G.; Zaffaroni, N.; Magistrato, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *168*, 253-262.
- [43] Acar Çevik, U.; Kaya Çavuşoğlu, B.; Sağlık, B. N.; Osmaniye, D.; Levent, S.; İlgin, S.; Özkay, Y.; Kaplancıklı, Z. A. *Molecules* **2020**, *25*, 1642-1653.
- [44] Acar-Çevik, U.; Sağlık, B. N.; Osmaniye, D.; Levent, S.; Kaya-Çavuşoğlu, B.; Karaduman, A. B.; Özkay, Y.; Kaplancıklı, Z. A. *Arch. Pharm* **2020**, *353*, e2000008.
- [45] Tenti, S.; Correale, P.; Cheleschi, S.; Fioravanti, A.; Pirtoli, L. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5625-5638.
- [46] Smith, I. E.; Dowsett, M. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2431-2442.
- [47] Chumsri, S.; Howes, T.; Bao, T.; Sabnis, G.; Brodie, A. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *125*, 13-22.
- [48] Martínez-Campa, C.; Gonzalez, A.; Mediavilla, M. D.; Alonso-Gonzalez, C.; Sanchez-Barcelo, E. J.; Cos, S. *Breast Cancer Res. Treat.* **2005**, *94*, 249-254.
- [49] Iannone, M.; Botrè, F.; Cardillo, N.; de la Torre, X. *Drug Test Anal.* **2019**, *11*, 208-214.
- [50] McCague, R.; Rowlands, M. G. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3699-3704.
- [51] Geisler, J. Br. *J. Cancer* **2011**, *104*, 1059-1066.
- [52] Rani, S.; Raheja, K.; Luxami, V.; Paul, K. *Bioorg. Chem.* **2021**, *113*, 105017-105031.

- [53] Lu, Q.; Xia, W.; Lee, K.; Zhang, J.; Yuan, H.; Yuan, Z.; Shi, Y.; Wang, S.; Xu, F. *The Oncologist* **2020**, *25*, 21-35.
- [54] Rani, S.; Raheja, K.; Luxami, V.; Paul, K. *Bioorg. Chem.* **2021**, *113*, 105017-105029.
- [55] Augusto, T. V.; Amaral, C.; Varela, C. L.; Bernardo, F.; da Silva, E. T.; Roleira, F. F.; Costa, S.; Teixeira, N.; Correia-da-Silva, G. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *195*, 105486-105501.
- [56] Giampietro, L.; Gallorini, M.; Gambacorta, N.; Ammazalorso, A.; De Filippis, B.; Della Valle, A.; Fantacuzzi, M.; Maccallini, C.; Mollica, Cataldi, A.; Nicolotti, O.; Amoroso, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *224*, 113737-113748.
- [57] Adhikari, N.; Baidya, S. K.; Jha, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*, 112845-112862.
- [58] Tauchen, J.; Jurásek, M.; Huml, L.; Rimpelová, S. *Molecules* **2021**, *26*, 1032-1044.
- [59] Miller, W. R. *Semin. Oncol.* **2003**, *30*, 3-11.
- [60] Caciolla, J.; Bisi, A.; Belluti, F.; Rampa, A.; Gobbi, S. *Molecules* **2020**, *25*, 5351-5367.
- [61] Banday, A. H.; Singh, S.; Alam, M. S.; Reddy, D. M.; Gupta, B. D.; Kumar, H. S. *Steroids* **2008**, *73*, 370-374.
- [62] Bansal, R.; Guleria, S.; Thota, S.; Hartmann, R. W. Zimmer, C. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 327-331.
- [63] Caporuscio, F.; Tinivella, A.; Restelli, V.; Semrau, M. S.; Pinzi, L.; Storici, P.; Broggini, M.; Rastelli, G. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 1545-1553.
- [64] Romero-Hernández, L. L.; Merino-Montiel, P.; Meza-Reyes, S.; Vega-Baez, J. L.; López, Ó.; Padrón, J. M.; Montiel-Smith, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 21-32.
- [65] Zhang, N.; Ng, A. S.; Cai, S.; Li, Q.; Yang, L.; Kerr, D. *Lancet Oncol.* **2021**, *22*, 358-368.

- [66] Sheng, J.; Sun, H.; Yu, F. B.; Li, B.; Zhang, Y.; Zhu, Y. T. *Int. J. Med. Sci.* **2020**, *17*, 1095-1109.
- [67] Arbyn, M.; Weiderpass, E.; Bruni, L.; de Sanjosé, S.; Saraiya, M.; Ferlay, J.; Bray, F. *Lancet Glob. Health* **2020**, *8*, 191-203.
- [68] Weerakoon, T.; Nadarajah, N.; Rizwan, R.; Ranathunga, R.; Vithanage, J. *In Chem. Proc.* **2022**, *120*, 115-129.
- [69] Chen, X.; Li, H.; Tian, L.; Li, Q.; Luo, J.; Zhang, Y. *Comput. Biol.* **2020**, *27*, 1397-1406.
- [70] Kramer, A. C.; Steinhauser, C. B.; Gao, H.; Seo, H.; McLendon, B. A.; Burghardt, R. C.; Wu, G.; Bazer, F. W.; Johnson, G. A. *Endocrinology* **2020**, *161*, 158-176.
- [71] Thompson, K. H.; Turnlund, J. R. *J. Nutr.* **1996**, *126*, 963-972.
- [72] Ghosh, D.; Egbuta, C.; Lo, J. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *181*, 11-19.
- [73] Zhang, C. Y.; Calvo, E. L.; Yang, C. Q.; Liu, J.; Sang, X. Y.; Lin, S. X. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *195*, 105471-105500.
- [74] Penning, T. M. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *489*, 82-91.
- [75] Wadhwa, R.; Dua, K.; Adcock, I. M.; Horvat, J. C.; Kim, R. Y.; Hansbro, P. M. *Eur. Respir. Rev.* **2019**, *28*, 142-151.
- [76] Morales-Lázaro, S. L.; González-Ramírez, R.; Rosenbaum, T. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 419-430.
- [77] Thomas, P. *Endocrinology* **2019**, *160*, 772-781.
- [78] Mollica, V.; Di Nunno, V.; Cimadamore, A.; Lopez-Beltran, A.; Cheng, L.; Santoni, M.; Scarpelli, M.; Montironi, R.; Massari, F. *Cells* **2019**, *8*, 43-57.
- [79] Leechaisit, R.; Pingaew, R.; Prachayasittikul, V.; Worachartcheewan, A.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 115040-115063.

- [80] Sagiroglu, S.; Kılinc, M.; Doganer, A.; Bilal, N.; Orhan, I.; Kılıc, M. A. *Eur. Arch.* **2020**, *277*, 1121-1127.
- [81] Graeff, M.; Buchholz, P. C.; Stockinger, P.; Bommarius, B.; Bommarius, A. S.; Pleiss, J. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **2019**, *87*, 443-451.
- [82] Miralles-Robledillo, J. M.; Torregrosa-Crespo, J.; Martínez-Espinosa, R. M.; Pire, C. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3349-3371.
- [83] Kiani, A. K.; Mor, M.; Bernini, A.; Fulcheri, E.; Michelini, S.; Herbst, K. L.; Bertelli, M. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2021**, *25*, 23-32.
- [84] Steckelbroeck, S.; Watzka, M.; Reissinger, A.; Wegener-Topper, P.; Bidlingmaier, F.; Bliesener, N.; Volkmar, H. J.; Clusmann, H.; Ludwig, M.; Siekmann, L.; Klingmüller, D. J. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *86*, 79-92.
- [85] Labrie, F.; Luu-The, V.; Lin, S. X.; Claude, L.; Simard, J.; Breton, R.; Bélanger, A. *Steroids* **1997**, *62*, 148-158.
- [86] Cornel, K. M.; Kruitwagen, R. F.; Delvoux, B.; Visconti, L.; Van de Vijver, K. K.; Day, J. M.; Gorp, T. V.; Hermans, J. J.; Duseleman, G. A.; Romano, A. J. *Clin. Endocr.* **2012**, *97*, 591-601.
- [87] Luu-The, V.; Tremblay, P.; Labrie, F. *J. Mol. Endocrinol.* **2006**, *20*, 437-443.
- [88] Liu, C.; Liu, K.; Zhao, C.; Gong, P.; Yu, Y. *Toxicol. Rep.* **2020**, *7*, 460-467.
- [89] Chen, W.; Song, M. S.; Napoli, J. L. *Gene* **2002**, *294*, 141-146.
- [90] Liu, C.; Liu, K.; Zhao, C.; Gong, P.; Yu, Y. *Toxicol. Rep.* **2020**, *7*, 460-467.
- [91] Kamitori, S.; Iguchi, A.; Ohtaki, A.; Yamada, M.; Kita, K. *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 551-558.
- [92] Persson, B.; Kallberg, Y. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *202*, 111-115.
- [93] ThyagaRajan, S.; Hima, L.; Pratap, U. P.; Priyanka, H. P.; Vasantharekha, R. *J. Chem. Neuroanat.* **2019**, *95*, 6-12.

- [94] Ezhilarasan, D. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2020**, *19*, 429-434.
- [95] Li, T.; Stephen, P.; Zhu, D. W.; Shi, R.; Lin, S. X. *FEBS Lett.* **2019**, *286*, 2155-2166.
- [96] Xanthoulea, S.; Konings, G. F.; Saarinen, N.; Delvoux, B.; Kooreman, L. F.; Koskimies, P.; Romano, A. *Cancer Lett.* **2021**, *508*, 18-29.
- [97] Salah, M.; Abdelsamie, A. S.; Frotscher, M. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *489*, 66-81.
- [98] Poirier, D. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2010**, *20*, 1123-1145.
- [99] Brooks, J. D.; Thompson, L. U. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *94*, 461-467.
- [100] Poirier, D. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 642-660.
- [101] Luu-The, V.; Zhang, Y.; Poirier, D.; Labrie, F. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *55*, 581-587.
- [102] Maltais, R.; Poirier, D. *Steroids* **2011**, *76*, 929-948.
- [103] Shields-Botella, J.; Chetrite, G.; Meschi, S.; Pasqualini, J. R. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *93*, 1-13.
- [104] Tremblay, M. R.; Boivin, R. P.; Luu-The, V.; Poirier, D. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005**, *20*, 153-163.
- [105] Poirier, D.; Boivin, R. P.; Tremblay, M. R.; Bérubé, M.; Qiu, W.; Lin, S. X. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8134-8147.
- [106] Boutin, S.; Roy, J.; Maltais, R.; Alata, W.; Calon, F.; Poirier, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *28*, 3554-3559.
- [107] Maheswara, M.; Siddaiah, V.; Damu, G. L. V.; Rao, Y. K.; Rao, C. V. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2006**, *255*, 49-52.
- [108] Yaghoobi, M.; Zareyee, D.; Khalilzadeh, M. A. *Appl. Organomet. Chem.* **2020**, *34*, e5787.

- [109] Kumar, V.; Tomar, S.; Patel, R.; Yousaf, A.; Parmar, V. S.; Malhotra, S. V. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 2646-2654.
- [110] Breton, R.; Housset, D.; Mazza, C.; Fontecilla-Camps, J. C. *Structure* **1996**, *4*, 905-915.
- [111] Huang, S. Y.; Zou, X. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 3016-3034.
- [112] Karkola, S.; Lilienkampf, A.; Wähälä, K. *Molecules* **2008**, *3*, 461-472.
- [113] Gupta, A.; Kumar, B. S.; Negi, A. S. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *137*, 242-270.
- [114] Samanta, P.; Kapat, K.; Maiti, S.; Biswas, G.; Dhara, S.; Dhara, D. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *555*, 132–144.
- [115] He, Q.; Liu, J.; Lan, J.-S.; Ding, J.; Sun, Y.; Fang, Y.; Jiang, N.; Yang, Z.; Sun, L.; Jin, Y.; Xie, S.S. *Bioorg. Chem.* **2018**, *81*, 512–528.
- [116] Pan, L.; Lei, D.; Jin, L.; He, Y.; Yang, Q. *Molecules* **2018**, *23*, 3002-3017.
- [117] Tian, Y.; Liang, Z.; Xu, H.; Mou, Y.; Gou, C. *Molecules* **2016**, *21*, 758-775.
- [118] Hatano, A.; Kanno, Y.; Kondo, Y.; Sunaga, Y.; Umezawa, H.; Okada, M.; Yamada, H.; Iwaki, R.; Kato, A.; Fukui, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 773-778.