



Univerzitet u Novom Sadu
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Department za hemiju, biohemiju i zaštitu
životne sredine



Mr Andrea Nikolić

**SINTEZA NOVIH STEROIDNIH JEDINJENJA OD
POTENCIJALNOG BIOMEDICINSKOG ZNAČAJA**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2014.

PREDGOVOR

Doktorska disertacija je urađena na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu pod mentorstvom **dr Marije Sakač**, redovnog profesora PMF-a u Novom Sadu, koja je predložila temu i rukovodila radom. Rad je urađen u okviru istraživanja na projektu „Sinteza, karakterizacija i biološka ispitivanja steroidnih derivata i njihovih molekulskih agregata“ (br. projekta 172021) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kojima se zahvaljujem.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, **dr Mariji Sakač**, koja mi je nesebično i strpljivo prenosila svoje znanje, iskustvo i mudrost, i čija je pomoć i podrška bila bezrezervna. Zahvaljujem se na dragocenim savetima, posvećenom vremenu i razumevanju tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Katarini Penov Gaši**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu i **dr Evgeniji Đurendić**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, ne samo za pomoć koju su mi pružale tokom izrade disertacije, već i za veliku podršku i razumevanje tokom pisanja rada. Hvala **dr Suzani Jovanović-Šanta**, docentu PMF-a u Novom Sadu, na nesebičnoj pomoći prilikom tumačenja rezultata bioloških ispitivanja i što je korisnim sugestijama doprinela uspešnom završetku ove disertacije. Takođe se zahvaljujem **dr Sonji Đilas**, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na interesovanju koje je pokazala za ovaj rad.

Zahvaljujem se **dr Janošu Čanadiju**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na korisnim savetima tokom izrade doktorske disertacije i pomoći u tumačenju NMR spektara. Takođe se zahvaljujem **dr Branislavu Joviću**, docentu PMF-a u Novom Sadu, na snimanju i pomoći u tumačenju IR spektara.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Gordani Bogdanović**, **dr Vesni Kojić** i **Dimitru Jakimovu** sa Instituta za onkologiju, Sremska Kamenica, na određivanju antiproliferativne aktivnosti novosintetizovanih jedinjenja, kao i **dr Oliveri Klisurić**, vanrednom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na rezultatima rendgeno-strukturne analize.

Veliko hvala **dr Mirjani Popsavin**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na pomoći i podršci tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se **dr Bojani Srećo Zelenović** i **dr Ljubici Grbović** na pomoći, korisnim savetima i odličnoj saradnji.

Posebnu zahvalnost za nesebičnu pomoć, savete, безусловnu podršku i sjajno druženje dugujem **mr Kseniji Pavlović**, **dr Jovani Ajduković** i **dr Marini Savić**.

Zahvalnost za pomoć i podršku u izradi doktorske disertacije dugujem dragim kolegama: **ms Aleksandru Oklješi, ms Bojani Vasiljević, ms Jeleni Marković, ms Srđanu Bjedovu, ms Dušanu Škoriću, Ester Foro, Otu Arčonu, Silviji Kantardžić,** kao i **dr Goranu Benedekoviću, mr Milošu Svirčevu, ms Jovani Francuz, ms Ivani Kovačević, ms Branku Kordiću** koji su mi pomogli u rešavanju različitih laboratorijskih problema.

Posebno bih se zahvalila mojoj **mami, bratu Ivanu, Milici i Teodori** za podršku, razumevanje i ljubav koju su mi pružili, kao i mojim prijateljima koji su me podržavali tokom izrade ove disertacije.

Nemerljivu zahvalnost dugujem suprugu **Nemanji** i kćerki **Katarini** na ljubavi, bezuslovnoj podršci, podsticaju i veri u uspeh. Najlepše vam hvala!

Andrea Nikolić

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Opšti deo	3
2.1. Načini lečenja tumora	3
2.1.1. Hormonska terapija	5
2.1.2. Hormonska terapija u lečenju karcinoma dojke	6
2.1.2.1. Antiestrogeni	8
2.1.2.2. Inhibitori aromataze	9
2.2. Sinteze Eksemestana	13
2.3. Sinteze 6-okso steroida	20
2.4. Sinteze 6-oksimino steroida	27
3. Naši radovi	40
3.1. Sinteze 16,17-seko-16,17a-dinitrilaandrostanske serije	40
3.1.1. Sinteze androstanskih 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa 4-en-3-on, 1,4-dien-3-on ili 1,4,6-trien-3-on sistemom	46
3.1.2. Sinteze androstanskih 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa 6-metilen-4-en-3-on ili 6-metilen-1,4-dien-3-on sistemom	49
3.1.3. Sinteze androstanskih 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa 4-en-3,6-dion ili 1,4-dien-3,6-dion sistemom	52
3.1.4. Sinteze androstanskih 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa 4-en-3,6-dion 6-oksimino ili 4-en-3-on oksimo sistemom	53
3.1.5. Sinteza androstanskog 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa 4-hidroksi-4-en-3-on sistemom	63
3.2. Sinteze 16,17-seko-16,17a-dinitrila estranske serije	65
3.3. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti	68
4. Eksperimentalni deo	74
4.1. 3 β -Hidroksiandrost-5-en-16,17-dion 16-oksim (2)	74
4.2. 3 β ,17 β -Dihidroksiandrost-5-en-16-on oksim (3)	75

4.3. 3 β -Hidroksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (4)	75
4.4. 3 β -Acetoksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (5)	75
4.5. 3 β -Acetoksi-17-hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (6)	75
4.6. 3 β -Acetoksi-17- <i>p</i> -toluensulfoniloksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (7)	76
4.7. 3 β -Acetoksi-17-metansulfoniloksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (8)	76
4.8. 3 β -Acetoksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitril (10)	76
4.9. Di-(3 β -acetoksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril-17-il)-etar (11)	78
4.10. 3 β -Hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitril (12)	78
4.11. 3 β -Hidroksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril <i>p</i> -toluensulfonilhidrazon (13)	79
4.12. 3-Okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (14)	79
4.13. 3-Okso-16,17-sekoandrosta-1,4-dien-16,17a-dinitril (15)	80
4.14. 3-Okso-16,17-sekoandrosta-1,4,6-trien-16,17a-dinitril (16)	81
4.15. 6-Metilen-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (17)	82
4.16. 6-Metilen-3-okso-16,17-sekoandrosta-1,4-dien-16,17a-dinitril (18)	82
4.17. 3,6-Diokso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (19)	83
4.18. 3-Okso-6,7:16,17-disekoandrost-4-en-16,17a-dinitril-6,7-dionska kiselina (20)	84
4.19. 3,6-Diokso-16,17-sekoandrosta-1,4-dien-16,17a-dinitril (21)	84
4.20. 5 α ,6 α - i 5 β ,6 β -Epoksi-3 β -acetoksi-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitril (22a i 22b)	85
4.21. 3 β -Acetoksi-5 α -hidroksi-6-okso-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitril (23)	85
4.22. 3 β -acetoksi-5-okso-5,6:16,17-disekoandrostan-16,17a-dinitril-6-onska kiselina (24)	87
4.23. 3 β -Acetoksi-6-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (25)	87
4.24. 3 β -Acetoksi-(6 <i>E</i>)-hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (26)	88
4.25. 3 β -Hidroksi-(6 <i>E</i>)-hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (27)	88
4.26. 3 β -Hidroksi-6-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (28)	89
4.27. (6 <i>E</i>)-Hidroksiimino-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (29)	90
4.28. (3 <i>E</i>) i (3 <i>Z</i>)-Hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (30a i 30b)	91
4.29. 4 α ,5 α - i 4 β ,5 β -Epoksi-3-okso-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitril (31a i 31b)	91
4.30. 4 α ,5 α - i 4 β ,5 β -Epoksi-17-cijano-3-okso-16,17-sekoandrostan-16-amid (32a i 32b)	92
4.31. 4-Hidroksi-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (33)	93
4.32. 3-Benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-17-on (35)	93
4.33. 3-Benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-16,17-dion 16-oksim (36)	93

4.34. 3-Benziloksi-17 β -hidroksiestra-1,3,5(10)-trien-16-on oksim (37)	94
4.35. 3-Benziloksi-17-okso-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (38)	94
4.36. 3-Benziloksi-17-hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (39)	94
4.37. 3-Benziloksi-17-metansulfoniloksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (40)	95
4.38. 3-Benziloksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16,17a-dinitril (41)	95
4.39. 3-Hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16,17a-dinitril (42)	96
5. Zaključak	97
6. Skraćenice	102
7. Literatura	104
8. Biografija	112

1. Uvod

Steroidni hormoni su hemijski glasnici i imaju važnu ulogu u ljudskom organizmu. Androgeni, muški polni hormoni, utiču na razvoj muških sekundarnih polnih karakteristika. Pored toga, imaju snažan uticaj na sintezu proteina i razvoj muskulature, koja je kod muškaraca razvijenija nego kod žena. Važni su za rast kostiju i imaju snažan uticaj na metabolizam ugljenih hidrata i masti, kao i na balans holesterola (HDL/LDL), nivo triglicerida i insulina. Takođe mogu uticati na ljudsko ponašanje pošto su neki neuroni osetljivi na steroidne hormone. Ženski polni hormoni, estrogeni, utiču na razvoj ženskih polnih karakteristika. Estrogeni takođe imaju bitnu ulogu i u smanjenju koštane resorpcije, hrane kožu i daju joj elastičnost, povećavaju sintezu vezivnih proteina u jetri, utiču na zadržavanje vode i soli, povećavaju nivo holesterola u žuči.¹⁻³

Steroidni hormoni pored svog normalnog, fiziološkog dejstva mogu da utiču na razvoj hormon-zavisnih oboljenja poput karcinoma prostate, dojke, cerviksa, ovarijuma i dr. Karcinom dojke u velikom broju zemalja čini oko 25% svih malignih bolesti ženske populacije (u najrazvijenijim zemljama čak 28%), dok u strukturi mortaliteta učestvuje sa oko 14-15%.⁴ U Srbiji, 26% svih obolelih i 17,5% svih umrlih žena zbog malignih tumora imaju dijagnozu karcinoma dojke. Svake godine se registruje oko 4000 novih slučajeva karcinoma dojke, a od ove bolesti umire oko 1300 žena.⁵ Kod muškaraca, najčešće se radi o malignim tumorima pluća, debelog creva i prostate.^{6,7} Smanjenje nivoa hormona ili blokiranje njihovog dejstva u tkivima tumora su primarni ciljevi u strategiji lečenja karcinoma dojke i prostate.

Dizajniranje i dobijanje novih antitumorskih agenasa ima za osnovni cilj pronalaženje takvih jedinjenja koja pokazuju što veći stepen inhibicije rasta neoplastičnih ćelija pri što nižim koncentracijama, deluju specifično i selektivno samo na maligne ćelije, a da pri tome ne oštećuju zdrave. Poslednjih godina se u svetu veliki značaj pridaje sintezi lekova koji bi delovali na nivou inhibicije enzima aromataze kao važnog cilja u efikasnom i selektivnom tretmanu kancera dojke kod pacijenata u postmenopauzi.^{8,9}

Kao polazna jedinjenja za sintezu novih potencijalnih steroidnih biološki aktivnih jedinjenja koriste se prirodni steroidi, kod kojih se odgovarajućim hemijskim transformacijama izmeni njihova izvorna struktura. Na taj način se najčešće postiže i izmena njihove biološke aktivnosti. Eksemestan (6-metilenandrosta-1,4-dien-3,17-dion) je najpotentniji oralni steroidni inhibitor enzima aromataze. Trajno se vezuje za enzim i sprečava ga da konvertuje androgene u estrogene. Pokazao je impresivno farmakološko i kliničko dejstvo u lečenju hormon-zavisnih karcinoma dojke kod žena u postmenopauzi.^{10,11} Takođe,

veliku efikasnost pokazuju i nesteroidni inhibitori aromataze, Anastrozol i Letrozol koji u svojoj strukturi imaju dve nitrilne grupe.^{12,13}

Steroidna jedinjenja sa 4-en-3,6-dionskim sistemom su izolovani iz morskih sundera.^{14,15} Oni su se pokazali kao pogodni intermedijeri u daljoj transformaciji steroidnog jezgra¹⁶, a pokazali su i značajnu inhibitornu aktivnost na enzim aromatazu¹⁷⁻²⁰. Najpoznatije jedinjenje iz ove klase je 4-androsten-3,6,17-trion (4-AT, 6-okso ili 4-etioaloholen-3,6,17-trion) koji je jedan od prvih otkrivenih suicidalnih supstrata enzima aromataze. On se ireverzibilno vezuje za enzim u adipoznom i perifernom tkivu i povećava odnos testosterona u odnosu na estrogene, pa se koristi i kao dodatak ishrani za povećanje mišićne mase.²¹⁻²³

Istraživanja su pokazala da steroidni oksimi i njihovi derivati mogu imati različitu biološku aktivnost, i to pre svega antikancerogenu, anti-inflamatornu i anti-viralnu aktivnost, kao i druge fiziološke aktivnosti. Stoga je sinteza i ispitivanje biološke aktivnosti ovih jedinjenja u cilju pronalaženja potencijalnih antitumornih agenasa bila predmet istraživanja mnogih naučnika.²⁴⁻³² Oksimino steroidi predstavljaju posebnu kategoriju antineoplastičnih agenasa i razne varijacije položaja oksimino grupe na steroidnom skeletu daju izuzetne rezultate i velike promene u antineoplastičnoj aktivnosti jedinjenja.³³

Imajući u vidu strukturne karakteristike steroidnih i nesteroidnih lekova koji se koriste u tretmanu kancera, cilj istraživanja u okviru ove disertacije je sinteza novih steroidnih jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju funkcionalne grupe prisutne u navedenim lekovima. Istraživanja su usmerena ka sintezi novih steroidnih 16,17-seko-16,17a-dinitrila polazeći od dehidroepi-androsterona, prirodnog androgena, i estrona, prirodnog estrogena. U androstanskoj seriji rad je dalje usmeren ka dobijanju 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa modifikacijama u A i/ili B prstenu steroidnog jezgra, u kojima novosintetizovana jedinjenja imaju 4-en-3-on, 1,4-dien-3-on ili 1,4,6-trien-3-on sistem, kao i supstituente u položajima C-4, odnosno C-6. U položaj C-4 kod 4-en-3-on sistema biće uvedena hidroksilna grupa, dok će se u položaj C-6 uvesti metilenska, keto, odnosno oksimino grupa.

Pored sinteze, dodatni zadatak ovog rada predstavlja i *in vitro* ispitivanje antiproliferativne aktivnosti novosintetizovanih jedinjenja prema odabranim ćelijskim linijama humanih tumora, kao i pokušaj uspostavljanja korelacionih odnosa struktura-biološka aktivnost (SAR - *structure-activity relationship*).

S obzirom na ovako postavljeni cilj i zadatke, u „Opštem delu“ ovog rada dat je kratak prikaz načina lečenja tumora, sinteza inhibitora aromataze Eksemestana, kao i 6-okso i 6-oksimino steroida. U odeljku "Naši radovi" detaljno su prikazani i diskutovani rezultati koji se odnose na dobijanje novosintetizovanih jedinjenja i na ispitivanje njihove antiproliferativne aktivnosti prema sedam neoplastičnih, kao i prema jednoj zdravoj ćelijskoj liniji. U „Eksperimentalnom delu“ dati su detaljni postupci dobijanja svih sintetizovanih jedinjenja, dok su slike IR i NMR spektara novosintetizovanih jedinjenja date u „Prilogu“ rada.

2. OPŠTI DEO

2.1. NAČINI LEČENJA TUMORA

Sa lečenjem malignih tumora se obično započinje nekoliko nedelja nakon dijagnoze. Terapija može biti lokalna ili sistemska. Hirurški zahvat i radioterapija su lokalne, dok su hemoterapija, hormonska terapija i biološka terapija sistemske.

Tumori se uglavnom uklanjaju *hirurškim putem* i do 19. veka je to bila specifična metoda lečenja. Međutim, tim pristupkom ova bolest se može izlečiti jedino ako je u ranoj fazi razvoja i ako se sekundarni depoziti – metastaze – nisu razvili. Britanski hirurk, Stephen Paget,³⁴ otkrio je 1889. godine da iako se ćelije raka raznose kroz telo posredstvom krvi i limfe, metastaze imaju tendenciju da nastaju naročito u određenim organima. Naknadnim hirurškim odstranjivanjem limfnih čvorova u predelu oko obolelog organa mogu se u znatnoj meri smanjiti recidivi u slučaju raka dojke, creva i želuca. Kod kancera dojke operacijom se može ukloniti cela dojka (mastektomija) ili samo deo dojke sa tumorom i njegovom okolinom, kao i limfni čvorovi iz istostrane pazušne jame.

Radioterapija podrazumeva lečenje maligne bolesti pomoću jonizujućeg zračenja. Od otkrića zračenja, radioterapija predstavlja alternativu hirurškom zahvatu, kojom se može sačuvati organ zahvaćen rakom. Ovakav pristup je prvi primenio austrijski dermatolog Leopold Freund 1897. godine. Kod kancera dojke ova terapija obuhvata izlaganje predela operisane dojke i regionalnih limfnih čvorova X-zracima visoke energije. Obično se koristi nakon hirurške intervencije, da bi se smanjio rizik od pojave lokalnog recidiva.³⁵

Hemoterapija je sistemsko lečenje i kontrola tumora hemijskim supstancama prirodnog ili sintetičkog porekla, koje se još nazivaju antitumorski, antineoplastični, citotoksični lekovi ili citostatiki. Prednost hemoterapije u odnosu na druge vrste lečenja je u tome što citostatiki dospevaju i do metastaza tumora, na mnogim lokacijama u telu gde drugi lekovi ili postupci nemaju odgovarajući pristup. Mehanizam dejstva citostatika najčešće se ogleda u remećenju sinteze i funkcije makromolekula (DNK, RNK, proteina) i funkcije ćelijskih organela, koje omogućavaju normalnu deobu ćelija (mitozu).³⁶

Citotoksični lekovi uključuju širok raspon hemijskih jedinjenja. U savremenoj terapiji zloćudnih tumora danas se upotrebljava više od pedeset vrsta citotoksičnih lekova. Da bi se pronašla adekvatna antitumorska terapija bila su neophodna saznanja o samoj biologiji malignog procesa. Proces istraživanja i otkrivanja lekova zahtevao je izučavanje, shvatanje i

poznavanje organizacije i funkcionisanja malignih ćelija jer se uočavanjem razlika između normalnih i malignih ćelija mogu lokalizovati slabe tačke na njima, koje predstavljaju strateška mesta na koja se može selektivno delovati. Najpre su se supstance sa potencijalnim antiproliferativnim dejstvom ispitivale na životinjama ili na humanim tumorima inokuliranim u glodare, kao i u kulturama tumorskih ćelija *in vitro*. Međutim, većina humanih solidnih tumora se biološki značajno razlikuje od tumora koji se razvijaju u životinjama, a sa druge strane rast tumora u *in vitro* i *in vivo* uslovima je različit. Ekstrapolacija podataka sa životinja na čoveka može biti prilično nepouzdana. Ipak, ova saznanja su bila osnova za dalja ispitivanja i otkrivanja supstanci sa antitumorskim dejstvom. Sredinom osamdesetih godina prošlog veka nastupio je značajan napredak u ispitivanju i pronalaženju novih lekova sa antitumorskim dejstvom. Od 1990. godine testiranje na životinjama je zamenjeno skriningom na 60 različitih tumorskih ćelija (NCI-60 screen) koje potiču od devet vrsta malignih tumora (tumor dojke, pluća, debelog creva, melanoma, bubrega, jajnika, prostate, mozga i leukemije). Ove ćelijske linije se stalno menjaju i dopunjuju i karakterišu se molekulskim markerima i drugim karakteristikama koje su relevantne za regulaciju rasta i diferencijaciju ćelija.³⁷⁻³⁹

Identifikacija citotoksičnih jedinjenja vodi otkriću novih antikancer terapeutika. Schwartsmann i saradnici⁴⁰ su 1988. godine objavili da je od preko 600.000 sintetizovanih jedinjenja koja su ispitivana za kliničku upotrebu, samo 40 agenasa u upotrebi. Prihvatanje nekog jedinjenja za kliničku upotrebu je sistematički postupak i obuhvata nekoliko faza.³⁸

- Dobijanje potencijalnih jedinjenja – obuhvata hemijsku sintezu novih jedinjenja i/ili ekstrakciju jedinjenja iz prirodnih resursa, kao i identifikaciju i određivanje čistoće pomoću analitičkih metoda, određivanje stabilnosti pri uslovima skladištenja i određivanje fizičkih karakteristika novih jedinjenja.
- Skrining lekova i preklinička farmakologija – podrazumeva poređenje strukture jedinjenja sa strukturama jedinjenja u postojećoj bazi podataka da bi se identifikovala potencijalna aktivnost, toksičnost, degradacija i metabolički put. Preliminarni skrining jedinjenja na ćelijskim kulturama se vrši kako bi se identifikovao obim i specifičnost antitumorske aktivnosti.
- Klinička ispitivanja – obuhvata tri faze ispitivanja. U I fazi kliničkih ispitivanja se jedinjenja testiraju na dobrovoljcima kako bi se odredila toksičnost i maksimalna tolerantna doza (MTD). Nakon toga, u II fazi se sprovode studije na pacijentima sa određenim tipom tumora kako bi se odredila efikasnost i potvrdila doza. U poslednjoj, III fazi kliničkog ispitivanja vrši se poređenje ispitivanog leka sa do tada najboljom dostupnom terapijom.

Hormonska terapija lečenja kancera primenjuje se u lečenju pojedinih vrsta kancera čiji rast podstiču hormoni (estrogen i progesteron kod žena i testosteron kod muškaraca).

Biološka terapija je terapija za stimulaciju ili uspostavljanje sposobnosti imunog sistema da se bori protiv infekcija ili drugih bolesti. Koristi se i za smanjenje neželjenih efekata prilikom lečenja raka. Zove se još i imunoterapija, bioterapija ili modifikator biološke reakcije.

Uprkos mnogobrojnim terapijskim pristupima, i dalje je teško lečiti rak. Uzrok tome je što se vrste raka ne razlikuju samo prema organu u kojem prvobitno nastaju. Veoma je važno postaviti tačnu i detaljnu dijagnozu pre odluke o individualnoj terapiji.

2.1.1. HORMONSKA TERAPIJA

Hormonska terapija se danas koristi kao samostalna terapija ili u kombinaciji s drugim oblicima lečenja (hirurška, hemoterapija, radioterapija) tumora dojke, prostate i endometrija, kao i limfoma i leukoza (kortikosteroidna terapija). Povezanost hormona i tumora, tj. primena hormona u lečenju tumora poznata je više od stotinu godina. Ključni korak ka boljem razumevanju delovanja hormona na rast tumora napravljen je otkrićem receptora za steroidne hormone. Steroidni receptori su ligand-zavisni intracelularni transkripcioni faktori koji utiču na rast i razvoj mnogih humanih kancera.⁴¹⁻⁴⁵ Oni prenose signale od hormona do ciljnih gena interakcijom sa specifičnom DNK sekvencom i koregulatorima koji se sastoje od aktivatora i/ili represora.⁴⁶⁻⁴⁸ Poremećaji u fiziološkoj funkciji steroidnih receptora dovode do nekoliko vrsta maligniteta. U steroidne receptore ubrajaju se proteini koji vežu estrogene, progestine, androgene, glukokortikoide, mineralokortikoide, tiroidne hormone. Receptori za estrogene (ER), androgene (AR) i gestagene (PgR) nađeni su u brojnim tumorima, kao što su tumor dojke, prostate, endometrija, ovarijuma, bubrega, grkljana, kolona, melanoma i sarkoma, dok su receptori za glukokortikoide prisutni u ćelijama malignih limfoma i limfatične leukoze.⁴⁹

Hormonska terapija može biti:

1. Ablativna - tretman kojim se uklanja ili uništava funkcija jednog organa. Na primer, uklanjanje jajnika ili upotreba određenih citostatika koji prouzrokuju prestanak njihovog rada.
2. Kompetitivna - kada mesto za estrogene hormon na receptoru zauzme sintetski hormon sličnih osobina. U slučaju raka dojke koriste se antiestrogeni.
3. Inhibitori aromataze - Kada se spreči produkcija hormona u perifernim tkivima (masna tkiva, mišići), inhibicijom enzima aromataze.
4. Aditivna - dodavanje hormona sa različitim efektima: na primer dodatak gestagena smanjuje oslabađanje luteinizirajućeg i folikulostimulirajućeg hormona putem kočenja hipofize

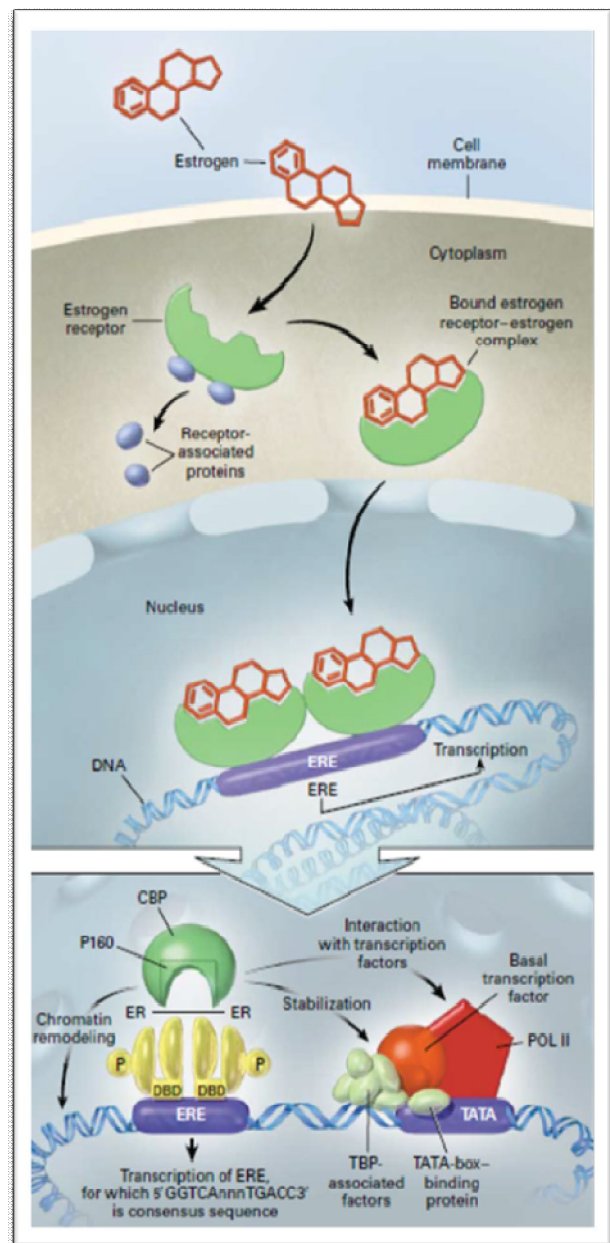
Danas je hormonska terapija nezaobilazni segment onkološkog lečenja pojedinih vrsta tumora. Glavne prednosti hormonskog lečenja su selektivnost, tj. ciljano delovanje na određene tumore, dobra delotvornost, mala toksičnost i niska cena, a nedostatak je ograničenost primene na hormon zavisne tumore.

2.1.2. HORMONSKA TERAPIJA U LEČENJU KARCINOMA DOJKE

Karcinom dojke se na osnovu rastućeg faktora može podeliti na estrogen zavisan i estrogen nezavisan. Oko 75% karcinoma dojke kod žena u postmenopauzi i 50% u premenopauzi su hormon zavisni.

Tri glavna prirodna estrogena kod žena su estron, estradiol, i estriol. Estradiol je glavni oblik estrogena kod žena u reproduktivnom dobu, estron kod žena u postmenopauzi, a estriol se formira prvenstveno tokom trudnoće.⁵⁰ Dok je pre menopauze glavno mesto sinteze estrogena (prvenstveno estradiola) jajnik,^{51,52} u periodu posle menopauze glavni način sinteze estrogena je aromatizacija adrenalnih i ovarijalnih androgena (androstendion i testosteron) u estrogene (estron i estradiol) pomoću enzima aromataze i to u perifernim tkivima (mišići i masno tkivo).^{53,54} Estrogeni su od suštinskog značaja za funkcionisanje ženskog reproduktivnog sistema i neophodni su za proliferaciju i diferencijaciju zdravog epitela dojke. Oni imaju važnu ulogu i u razvoju i progresiji karcinoma dojke. Ovi hormoni utiču na deobu ćelije i izazivaju proliferaciju epitela, koji su podložni genetskim greškama tokom replikacije DNK. Ove genetske greške mogu dovesti do malignog fenotipa.⁵⁵

Estrogeni se vezuju za estrogene receptore (ER), koji se ubrajaju u veliku grupu receptorskih proteina. Otkriveni su krajem 50-ih godina XX veka, što je doprinelo daljem razumevanju koncepta hormon zavisnih tumora i razvitku novih modaliteta lečenja.⁵⁶ Poznate su dve forme estrogenog receptora, α i β , koji se razlikuju u aminokiselinskom sastavu i afinitetu za estrogene. Tip α ima veći afinitet za estradiol nego tip β , koji je aktivan pri većim koncentracijama estradiola. Receptori ER α su prisutni u ćelijama karcinoma dojke, endometrijumu i stromi jajnika. Oni su



Slika 2.1. Aktivacija estrogenih receptora⁵⁹

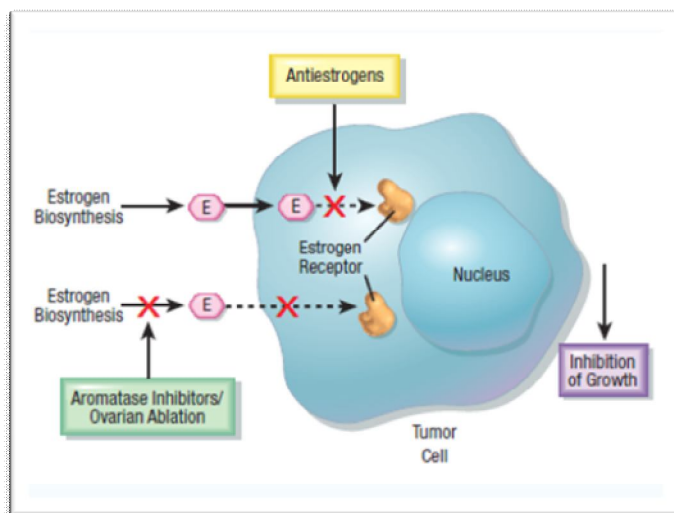
odgovorni za rast i razvoj hormon zavisnog karcinoma dojke. Uloga ER β nije potpuno razjašnjena. Dosadašnji podaci sugerišu da je nivo ER β receptora u karcinomu dojke nizak i da oni smanjuju proliferaciju ćelija, pa se smatra da je odnos ER α i ER β pokretačka sila za proliferaciju ćelija tumora.⁵⁷ Ovaj podtip ER se nalazi uglavnom u granulocelularnim ćelijama, a prisutan je i u tkivima bubrega, pluća, sluzokoži creva, koštanoj srži, kostima, mozgu, endotelnim ćelijama i prostati.⁵⁸

ER je bez prisustva estrogena inaktivan i nema uticaj na DNK. Estrogeni slobodno prolaze kroz ćelijsku membranu i vezuju se za ER formirajući hormon-receptor kompleks koji dovodi do dimerizacije receptora, konformacionih promena i vezivanja hormon-receptor kompleksa za specifičnu DNK sekvencu, tzv. EREs - estrogen response elements (*Slika 2.1.*). Na ovaj način dolazi do aktiviranja transkripcije gena, odnosno sinteze DNK i pripreme ćelije za umnožavanje. Ova interakcija je regulisana proteinima unutar jezgra ćelije, ko-aktivatorima i ko-represorima, čija je uloga da aktiviraju transkripciju gena.^{59,60}

Razumevanje uloge estrogena u razvoju karcinoma dojke dovelo je do razvoja dve glavne terapijske strategije za lečenje ove bolesti:

- upotreba antiestrogena koji blokiraju funkciju estrogenih receptora
- upotreba inhibitora aromataze koji sprečavaju sintezu estrogena inhibirajući ključni enzim u sintezi estrogena iz androgena.

Shematski prikaz mehanizma delovanja antiestrogena i inhibitora aromataze dat je na *Slici 2.2.*⁶¹



Slika 2.2. Mehanizam delovanja antiestrogena i inhibitora aromataze⁶¹

2.1.2.1. ANTIESTROGENI

Selektivni estrogen receptor modulatori (SERM) se koriste kao terapija za lečenje hormon zavisnih karcinoma dojke bez obzira na status menopauze. Oni kompetituju vezivanju za estrogene receptore i na taj način sprečavaju endogeni estrogen da aktivira receptore i dovede do proliferacije tumorskih ćelija.^{62,63}

Početak 70-ih godina prošlog veka počela je upotreba Tamoksifena (ICI 46,474, Nolvadex) kao antiestrogena u lečenju uznapredovalog karcinoma dojke kod žena u postmenopauzi.⁶⁴ Tamoksifen ima mali afinitet za vezivanje za estrogene receptore. On se u krvi metaboliše dejstvom odgovarajućeg enzima u aktivne metabolite 4-hidroksitamoksifen i *N*-desmetil-4-hidroksitamoksifen⁶⁵ koji imaju 30-100 puta veći afinitet prema ER nego Tamoksifen. Ovi aktivni metaboliti kompetituju estrogenu za vezivanje za ER. U tkivu dojke, 4-hidroksitamoksifen deluje kao ER antagonista i na taj način inhibira sintezu estrogena.⁶⁶ Tamoksifen se koristi kao hormonska terapija za lečenje hormon zavisnih karcinoma dojke kod žena u premenopauzi, kao i u tretmanu obolelih žena u postmenopauzi, mada se u ovom slučaju češće koriste inhibitori aromataze.⁶⁷ Sem što se upotrebljava u lečenju uznapredovale bolesti, tamoksifen se može koristiti kao prevencija kod žena sa visokim rizikom za razvoj karcinoma dojke.⁶⁸ Uspešnost u lečenju kancera dojke smanjuje to što nakon duže upotrebe dolazi do vraćanja metastaznih tumora koji su još uvek hormon-senzitivni.⁶⁹ Tamoksifen se pored antagonističkog dejstva, u nekim tkivima ponaša i kao agonista. Estrogeno dejstvo ispoljava pri delovanju na serumske lipide, endometrijum i kosti. Proliferativni efekat u endometrijumu usled dugoročne terapije Tamoksifenom može da dovede do povećanog rizika od pojave raka endometrijuma. Takođe može da izazove povećanje rizika od venske tromboembolije i moždanog udara, kao i povećanje koštane gustine i smanjenje holesterola kod žena u postmenopauzi.⁷⁰⁻⁷⁴

Lek druge generacije SERM je Raloksifen i prvobitno je bio namenjen lečenju karcinoma dojke, a kasnije je počeo da se upotrebljava i kao alternativna hormonska terapija za lečenje osteoporoze. Raloksifen je derivat benzotiofena i ima potpuno različitu strukturu od Tamoksifena.⁷⁵ Njegova aktivnost je slična Tamoksifenu u grudima i kostima, ali ne pokazuje agonističku aktivnost u endometrijumu.⁷⁶ Smanjuje učestalost karcinoma dojke za 62%, pri čemu svoje delovanje pokazuje samo prema ER pozitivnom karcinomu, a ne povećava proliferaciju u endometrijumu.⁷⁷ Takođe, izaziva povećanje koštane gustine i smanjuje rizik od preloma.

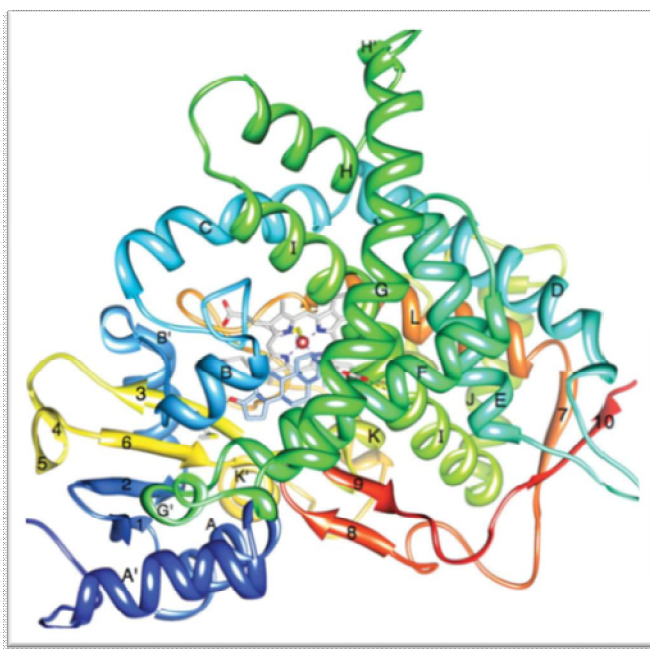
Trenutna interesovanja za nove SERM su zasnovana na iskustvu sa Tamoksifenom, koji ima jaku antitumorsku aktivnost i Raloksifenom, koji ima poboljšani bezbednosni profil i nudi zaštitu kostima. Sa ciljem dobijanja lekova koji imaju samo pozitivne efekte, u razvoju je treća generacija SERM.

Zapažanje da dokle god je prisutna ER α transkripcija odgovarajućeg gena i da rast tumora može biti stimulisan i malim količinama estrogena dovela su do razvoja nove

generacije čistih antiestrogena, selektivnih estrogen receptor destabilizatora (SERD). Prvi prototip čistog antiestrogena, Fulvestrant (ICI 182.780) je uveden u upotrebu 1991 godine.^{78,79} S obzirom da ova grupa jedinjenja nema agonističku aktivnost već destabilizuju ER α protein, pri čemu dovode do poremećaja u ER α posredovanju u stimulaciji rasta karcinoma, SERD predstavljaju važnu terapijsku opciju za lečenje kancera dojke.

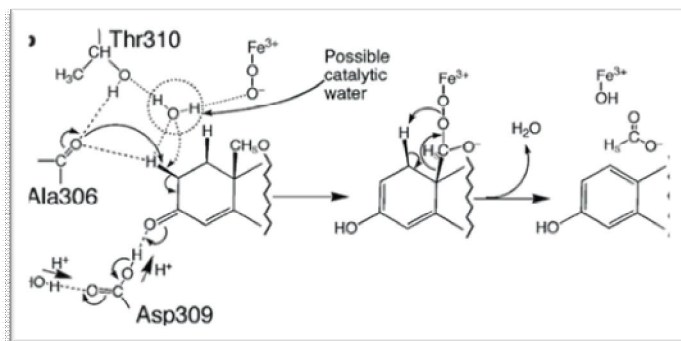
2.1.2.2. INHIBITORI AROMATAZE

Enzim aromataza pripada citohrom P450 familiji i proizvod je gena CYP19A1 koji se nalazi u hromozomu 15 (*Slika 2.3.*).^{80,81} Ljudska aromataza sadrži hem grupu, jedan polipeptidni lanac sastavljen od 503 aminokiselinska ostatka i integralni je membranski protein endoplazmatičnog retikuluma.⁸²⁻⁸⁵



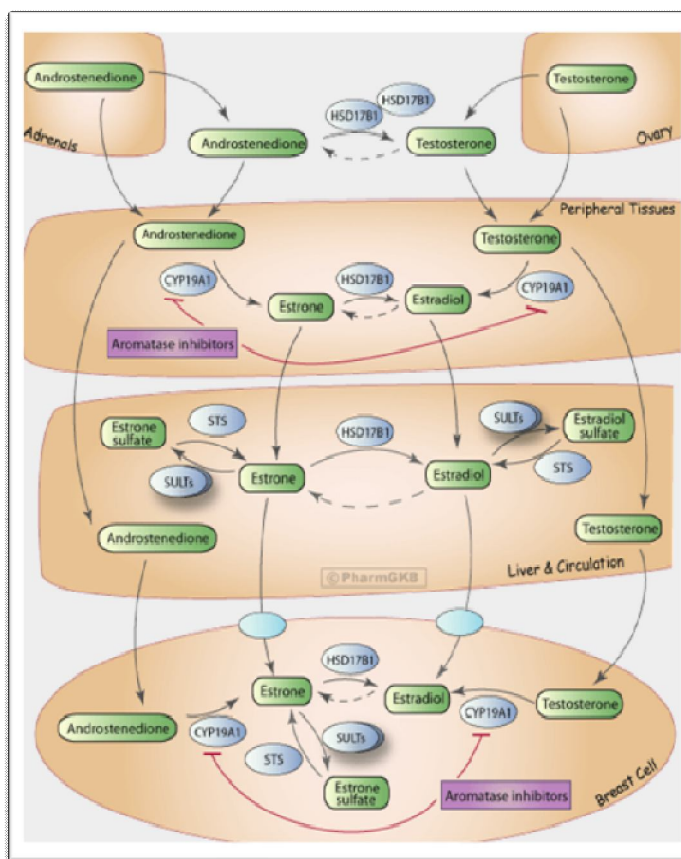
Slika 2.3. Enzim aromataza⁸⁴

Aromataza katalizuje ključni korak u biosintezi estrogena – aromatizaciju prstena A kod androgena. Ovo se odigrava preko tri oksidacione reakcije na C-19 atomu. Prva dva koraka su zajednička za sve P450 citohrome, a treći korak je jedinstven za enzim aromatazu.⁸⁶ U prvom oksidacionom stupnju androgeni se oksiduju do C-19 hidroksi androgena, koji daljom oksidacijom daju geminalni diol kao intermedijer, a eliminacijom vode nastaje aldehid. U trećem, poslednjem stupnju dolazi do oksidativnog raskidanja veze između C-10 i C-19 ugljenikovih atoma, pri čemu dolazi do aromatizacije A prstena, a C-19 ugljenik se izdvaja kao mravlja kiselina (*Slika 2.4.*).⁵⁴



Slika 2.4. Aromatizacija prstena A kod androgena⁵⁴

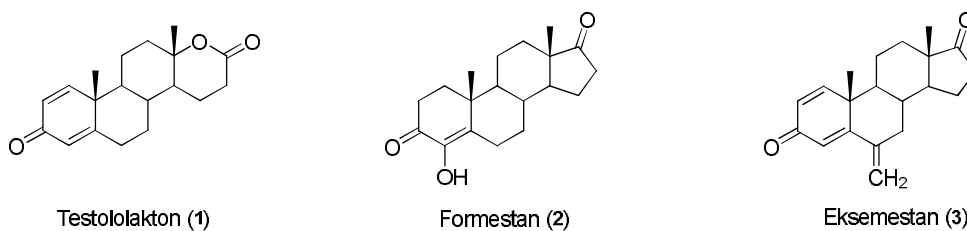
Kod žena u premenopauzi aromataza je prisutna u posteljici i granuloznim ćelijama folikula jajnika, a u manjoj količini u adipoznom tkivu⁸⁷, kostima⁸⁸, jetri, mišićima⁸⁷, mozgu⁸⁹, dojci i u tkivu karcinoma dojke⁹⁰⁻⁹⁷. Posle menopauze estrogen se sintetise isključivo u perifernim tkivima, naročito u adipoznom tkivu. U menopauzi androstendion sintetisan u nadbubrežnoj žlezdi, i u manjoj meri testosteron sintetisan u jajnicima se prevode u perifernim tkivima (jetra, ćelije dojke) u estron, odnosno estradiol dejstvom enzima aromataze. U svim tkivima 17β-hidroksisteroid dehidrogenaza katalizuje konverziju androstendiona u testosteron, odnosno estrona u estradiol (Slika 2.5).⁹⁸



Slika 2.5. Put biosinteze estrogena⁹⁸

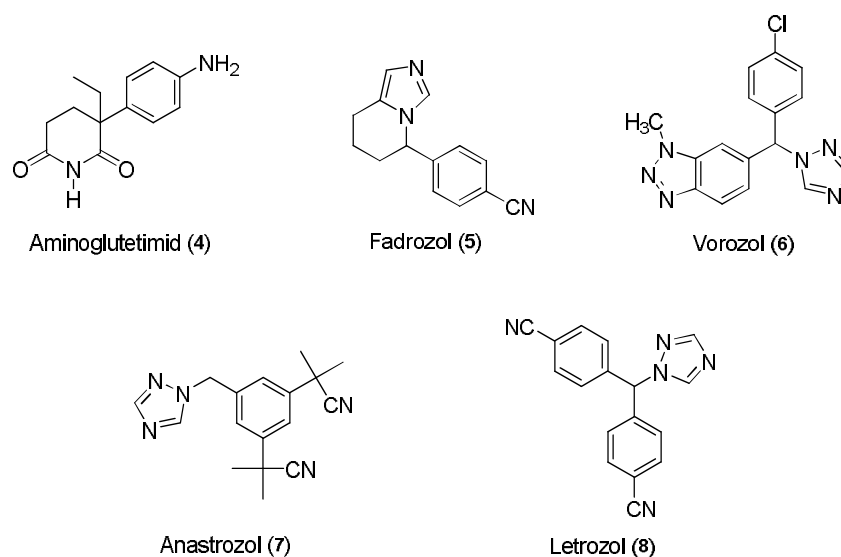
Do povećane aktivnosti aromataze dovode starenje, gojaznost, insulin, gonadotropini, konzumiranje cigareta i alkohola, dok su za smanjenu aktivnost odgovorni prolaktin i Anti-Milerov hormon. Primećeno je da je aktivnost aromataze povećana u estrogen zavisnim tkivima u organizmima u kojima postoji kancer dojke, kancer endometrija i neka druga obolenja.⁹⁹ Inhibicija ovog enzima dovodi do hipoestrogenizma (nizak nivo estrogena), te se inhibitori aromataze mogu koristiti u terapiji stanja ili bolesti u kojima je povećana koncentracija estrogena uzrok nastanka bolesti. Stoga se u svetu veliki značaj pridaje sintezi lekova koji bi delovali na nivou inhibicije enzima aromataze kao važnog cilja u efikasnom i selektivnom tretmanu kancera dojke kod pacijenata u postmenopauzi.^{100,101}

Inhibitori aromataze se mogu podeliti u dve grupe prema strukturi i mehanizmu delovanja. Inhibitori aromataze koji imaju androgenu strukturu nazivaju se steroidni inhibitori aromataze ili tip I. Oni se kovalentno vezuju za katalitički centar enzima formirajući reaktivni intermedijer i na taj način ireverzibilno uništavaju enzimsku aktivnost. Zahvaljujući ireverzibilnoj prirodi inhibicije, enzim ostaje neaktivan i nakon prestanka unošenja inhibitora u organizam. Prema mehanizmu delovanja ovi inhibitori spadaju u inaktivatore ili ireverzibilne inhibitore.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Predstavnici ove grupe jedinjenja su Testololakton (**1**), Formestan (**2**) i Eksemestan (**3**) (Slika 2.6.).



Slika 2.6. Strukture steroidnih inhibitora aromataze

Druga grupa inhibitora aromataze obuhvata nesteroidna jedinjenja (Tip II), većinom azole, koja se nekovalentno vezuju sa gvožđem iz hema preko svog heteroatoma, sprečavajući vezivanje androgena za aktivni centar enzima. Prva jedinjenja ove grupe inhibitora su imala nizak stepen specifičnosti prema enzimu aromatazi jer su se javljale i interakcije sa drugim enzimima citohrom P450 familije.¹⁰⁵ Međutim, aminokiselinska sekvenca aromataze se razlikuje od drugih članova citohrom P450 familije¹⁰⁶ i novija jedinjenja su visoko selektivna prema ovom enzimu. Za razliku od steroidnih inhibitora, ova jedinjenja se reverzibilno vezuju za enzim i rezultat blokiranja sinteze estrogena zavisi od konstantnog prisustva leka. Prema mehanizmu delovanja Tip II spada u kompetitivne inhibitore.^{81,107} Predstavnici nesteroidnih inhibitora su Aminoglutetimid (**4**), Fadrozol (**5**), Rogletimid, Vorozol (**6**), Anastrozol (**7**) i Letrozol (**8**) (Slika 2.7.).



Slika 2.7. Strukture nesteroidnih inhibitora aromataze

Evolucijom inhibitora aromataze došlo je do razvoja jedinjenja obe klase kojima se svakom generacijom postepeno povećavala specifičnost i potencija (Tabela 2.1.).

Tabela 2.1. Podela inhibitora aromataze

<i>Generacija</i>	<i>Tip I</i> <i>(steroidni inhibitori)</i>	<i>Tip II</i> <i>(nesteroidni inhibitori)</i>
Prva generacija	Testololakton	Aminoglutetimid
Druga generacija	Formestan	Fadrozol Rogletimid
Treća generacija	Eksemestan	Anastrozol Letrozol Vorozol
	<i>Inaktivatori</i> <i>(ireverzibilni inhibitori)</i>	<i>Reverzibilni inhibitori</i>

Iako su Formestan, Fadrozol, Vorozol i Rogletimid pokazali kliničku aktivnost prema karcinomu dojke^{102,103,108} oni više nisu u kliničkoj upotrebi jer nisu efikasniji od najšire primenjivanog antiestrogena Tamoksifena ili se u organizam unose intramuskularnom injekcijom, imaju neželjena dejstva ili dovode do smanjenja produkcije aldosterona i kortizola. Ova jedinjenja su zamenjena trećom generacijom inhibitora aromataze koji su visoko selektivni za enzim i imaju manje neželjenih efekata.¹⁰⁹ Inhibitori aromataze koji su trenutno u

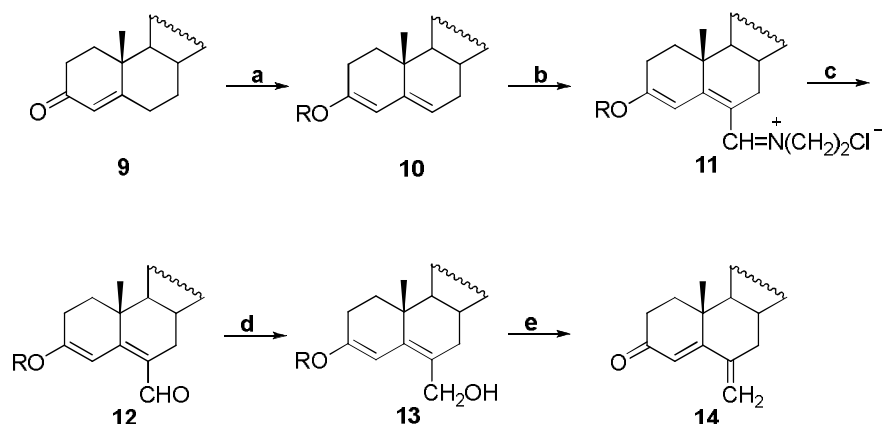
kliničkoj upotrebi i odobreni od strane US Food and Drug Administration (FDA) su Anastrozol, Letrozol i Eksemestan. Oni su prihvaćeni kao lekovi za kliničko lečenje hormon zavisnih karcinoma dojke kod žena u postmenopauzi.⁸⁶ Anastrozol, Letrozol i Eksemestan su znatno jači inhibitori u odnosu na Aminoglutetimid u smislu inhibicije *in vitro* aktivnosti aromataze. Dok je za delovanje leka potrebna koncentracija Aminoglutetimida izražena u mikromolovima, za inhibitore aromataze treće generacije to su nanomolovi. Bolji farmakokinetički profil treće generacije takođe znači da su oni još efikasniji *in vivo*. Miligram dnevne doze leka efikasno inhibira aromatizaciju u celom telu, a nivo slobodnog estrogena opada ispod nivoa detekcije.¹¹⁰ Prva i druga generacija inhibira aromatizaciju u telu <90%, dok se treća generacija pokazala kao veoma efikasna i dovodi do inhibicije aromataze >98%.¹¹¹

Inhibitori aromataze su potisnuli Tamoksifen kao najrasprostranjeniji lek u lečenju karcinoma dojke. Oni su veoma efikasni kao terapija kod žena u postmenopauzi sa uznapredovalom bolešću, kod žena koje nisu imale uspeha u lečenju samo sa Tamoksifenom, kao i sa Tamoksifenom u kombinaciji sa drugim oblicima lečenja. Takođe su efikasni u adjuvantnoj i neoadjuvantnoj terapiji.¹¹² Inhibitori aromataze treće generacije se dobro podnose, neželjene posledice se retko javljaju i obično su blagog intenziteta. Kao i Tamoksifen često izazivaju simptome karakteristične za menopauzu (noćno znojenje i valunzi) ali je niža stopa pojave vaginalnog krvarenja, krvnog ugruška i raka endometrijuma u odnosu na Tamoksifen. Karakteristični neželjeni efekti ove grupe jedinjenja su bol u mišićima, osteoporoza i srčani problemi.

2.2. SINTEZE EKSEMESTANA

Eksemestan (Aromasin, 6-metilenandrost-1,4-dien-3,17-dion) je uveden u upotrebu 2000-te godine, kao prvi inhibitor aromataze koji se može upotrebljavati oralno, a istovremeno ima ireverzibilni efekat na enzim aromatazu. Koristi se za lečenje rano otkrivenog ili uznapredovalog karcinoma dojke kod žena u postmenopauzi. On smanjuje nivo estrogena u plazmi u fazi u kojoj se androstendion i testosteron prevode u estron i estradiol vezujući se na njihovo mesto na enzimu.^{10,113,114}

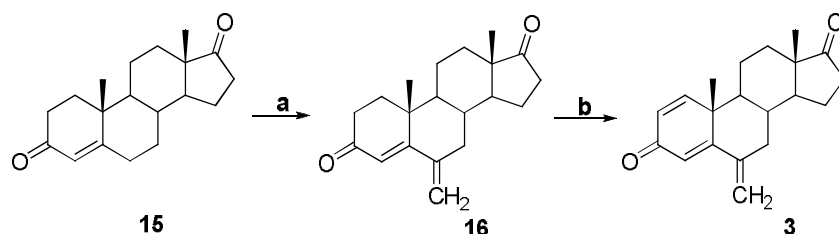
Uvođenje metilenske grupe u položaj C-6 kod 4-en-3-on steroida opisali su Burn i saradnici¹¹⁵ još 1964. godine. Ova metoda podrazumevala je najpre konverziju 4-en-3-on steroida **9** u njegov 3,5-dienoletar **10**. U reakciji jedinjenje **10** sa *Vilsmeier*-ovim reagensom (fosforil-hlorid – dimetilformamid) dobijena je imino so **11**, čijom je hidrolizom nastao 6-formil derivat **12**. Ovaj intermedijer je zatim redukovao do 3-alkoksi-6-hidroksimetil-3,5-diena **13**, a njegovom dehidratacijom je dobijen 6-metilen-4-en-3-on derivat **14** (*Shema 2.1.*).



Shema 2.1. Reagensi: **a**) 1. Etilortoformijat, *p*-TsOH, dioksan; 2. Py, voda; **b**) Vilsmeier-ov reagens, etilen-dihlorid, Py; **c**) NaOAc; **d**) NaBH_4 , MeOH; **e**) AcOH

Međutim, ova metoda obuhvata veliki broj sintetskih faza što je navelo naučnike da teže otkrivanju novih i efikasnijih postupaka za uvođenje metilenske grupe.

Italijanski naučnici su objavili nekoliko načina sinteze Eksemestana (**3**).^{54,116} Laboratorijska sinteza se odigrava u dve sintetske faze, polazeći od androstendiona (**15**). U prvoj fazi je uvedena metilenska grupa u položaj C-6 dejstvom formaldehid acetala, u prisustvu POCl_3 , po metodi koju su opisali Annen i saradnici,¹¹⁷ i dobijen je 6-metilenandrost-4-en-3,17-dion (**16**). U drugoj fazi reakcijom dehidrogenacije sa 2,3-dihloro-5,6-dicijano-1,4-benzohinonom je uvedena Δ^1 nezasićena veza i dobijen je Eksemestan (**3**) (Shema 2.2.).¹¹⁶

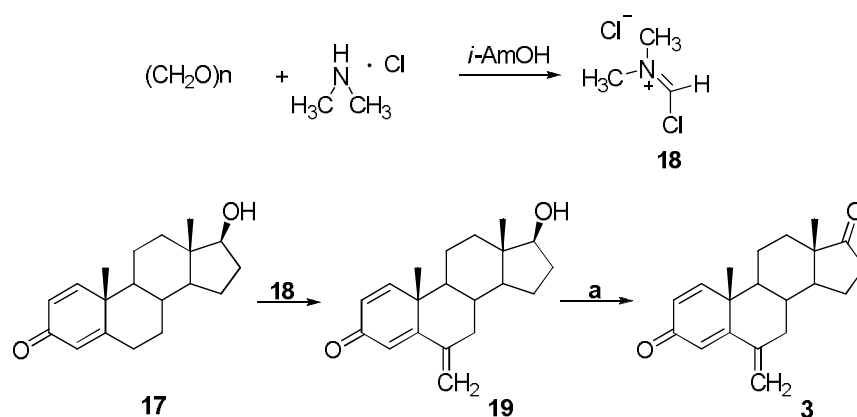


Shema 2.2. Reagensi: **a**) $\text{CH}_2(\text{OEt})_2$, POCl_3 , NaOAc, CHCl_3 ; **b**) DDQ, *p*-TsOH, dioksan

S obzirom na nedostatke ove metode kao što su mali prinos, visoka cena DDQ reagensa, hromatografsko prečišćavanje, tragano je za praktičnijim i pogodnijim postupcima koji bi se mogli koristiti i u industrijskoj sintezi Eksemestana.

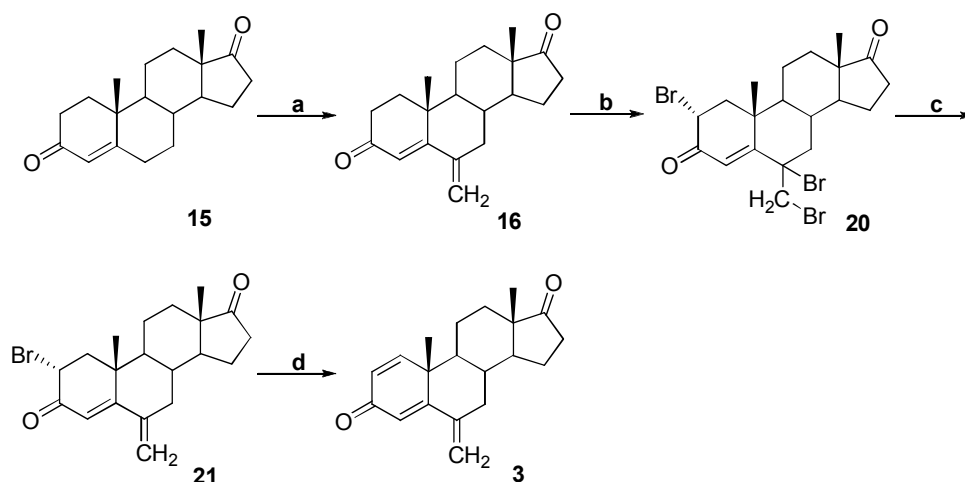
Farmitalia je razvila komercijalniji i pristupačniji postupak⁵⁴ sinteze Eksemestana koji se zasnivao na upotrebi 17β -hidroksiandrost-1,4-dien-3-ona (dehidrottestosteron, **17**), kao polaznog jedinjenja. Paraformaldehid i dimetilamin u *i*-amil-alkoholu su nakon zagrevanja na temperaturi od 131°C i uklanjanja vode pomoću *Dean-Stark*-ovog nastavka, dali *Vilsmeier-Haack*-ov reagens (**18**). Nakon hlađenja na $10-15^\circ\text{C}$, dobijenom reagensu je dodat 17β -hidroksiandrost-1,4-dien-3-on (**17**), i posle zagrevanja reakcione smeše na tački ključanja u

toku 15 sati dobijen je 6-metilenski derivat **19**. U ovoj sintezi je došlo do *Mannich*-ove reakcije na konjugovani dienon, pri čemu je uvedena metilenska grupa u položaj C-6 kod 3-okso-1,4-dienkog sistema. Da bi se izbegla kompetitivna *Mannich*-ova reakcija u položaju C-16, u polaznom jedinjenju na C-17 atomu ne sme biti prisutna keto, već hidroksilna grupa. Oksidacijom intermedijera **19** sa *Jones*-ovim reagensom dobijen je Eksemestan (**3**) (*Shema 2.3*).⁵⁴



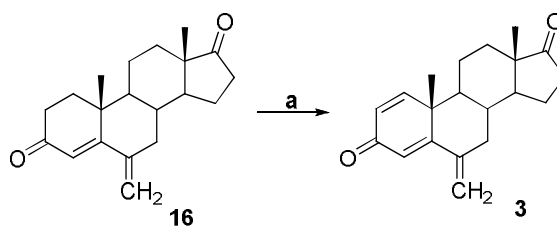
Shema 2.3. Reagensi: **a)** *Jones*-ov reagens, Me₂CO

Alternativni put dobijanja Eksemestana razvijen je takođe od strane Farmitalia (*Shema 2.4*).⁵⁴ Kao polazno jedinjenje je upotrebljen relativno jeftin i lako dostupan androstendion (**15**) koji je sa trietilortoformijatom u smeši tetrahidrofuran – etanol u prisustvu *p*-toluensulfonske kiseline nagradio 3,5-dienoletar. Ovaj intermedijer je bez izolovanja podvrgnut *Mannich*-ovoj reakciji sa *N*-metilanilinom i vodenim rastvorom formaldehida. Nakon zakišeljavanja dobijen je 6-metilenski intermedijer **16**, kojem je zatim Δ¹-dvostruka veza uvedena reakcijama bromovanja-dehidrobromovanja. Bromovanje je izvršeno u smeši THF-AcOH i u prisustvu HBr, pri čemu je nastao tribromid **20**. Delimičnim debromovanjem sa NaI u acetonu dobijen je 2-brom derivat **21**, koji je zatim dehidrobromovanjem sa LiBr i 1,4-diazabiciklo[2.2.2]oktanom u *N,N*-dimetilformamidu dao Eksemestan (**3**).⁵⁴



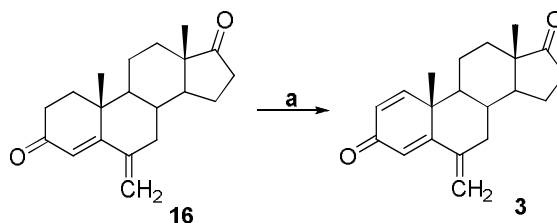
Shema 2.4. Reagensi: a) 1. TEOF, THF-EtOH, *p*-TsOH; 2. MeNHPH, vodeni rastvor HCHO b) Br₂-HBr, AcOH-THF; c) NaI, Me₂CO; d) DABCO, LiBr, DMF

Chen i saradnici¹¹⁸ su za uvođenje dvostruke veze u položaju 1,2 kod jedinjenja **16** upotrebili DDQ, u prisustvu *t*-butildimetilhlorsilana u dioksanu (Shema 2.5.).



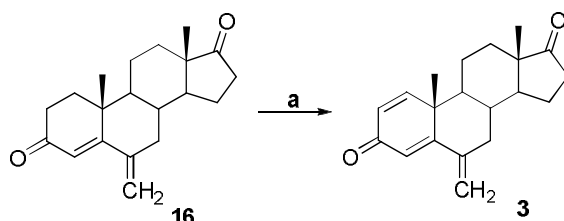
Shema 2.5. Reagensi: a) DDQ, TBDMSCl, dioksan

Uvođenje Δ^1 -dvostruke veze kod 4-en-3-on derivata **16** i dobijanje Eksemestana (**3**) izvedeno je i sa hloranilom, u prisustvu bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida i trifluormetansulfonske kiseline kao katalizatora (Shema 2.6.).¹¹⁹



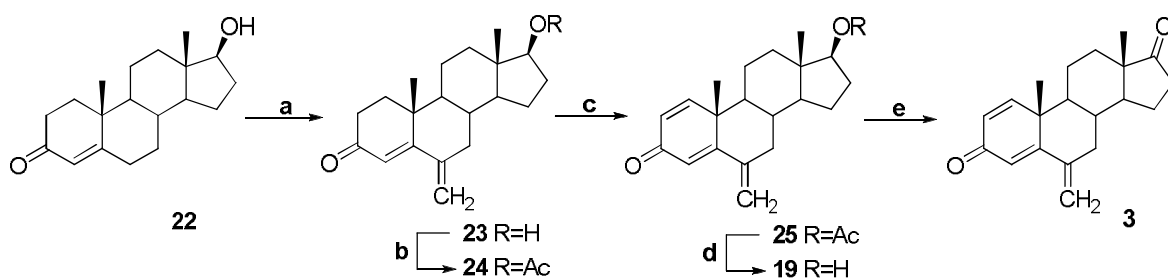
Shema 2.6. Reagensi: a) Hloranil, BSTFA, TfOH, toluen

Jedan od načina dobijanja Eksemestana (**3**) iz jedinjenja **16** uključuje enzimatsku 1,2-dehidrogenaciju.¹²⁰ 6-Metilenandrost-4-en-3,17-dion (**16**) je mešan sa kulturom bakterije *Arthrobacter simplex* i inkubiran je nekoliko dana u toluenu i vodi u prisustvu menadiona (agens za neutralizaciju slobodnih radikala) i fosfatnog pufera. Eksemestan (**3**) je sakupljan iz toluenske faze nakon koncentrovanja i taloženja sa oktanom (*Shema 2.7.*).



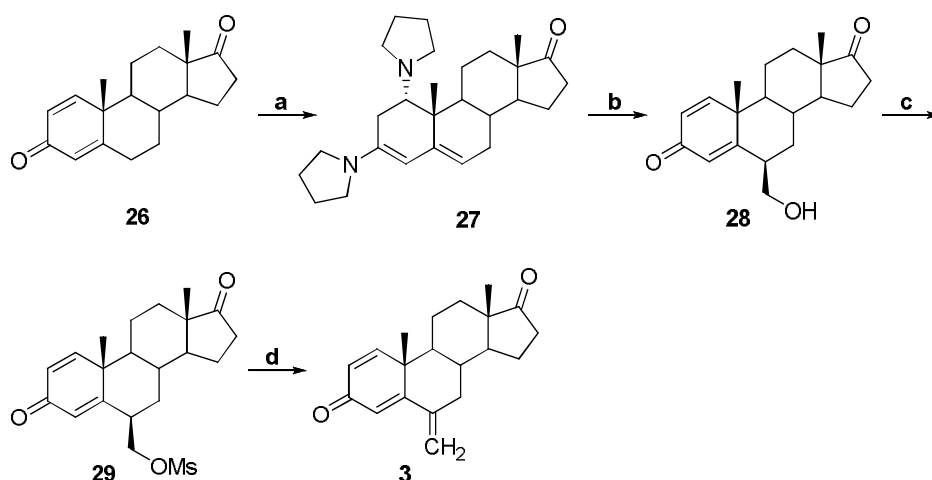
Shema 2.7. Reagensi: a) *A. simplex*, H₂O-toluen/fosfatni pufer, 4% menadion

U jednom od novijih radova opisan je postupak u kome se kao polazno jedinjenje u sintezi koristi testosteron (**22**) i u pet sintetskih faza je dobijen Eksemestan (**3**) sa ukupnim prinostom od 70% (*Shema 2.8.*).¹¹⁹ U molekul testosterona u položaj C-6 je uvedena metilenska grupa prema postupku koji je opisao Lombardi,⁵⁴ a u kojem je korišćen trietilortoformijat, smeša etanol – tetrahidrofuran i *p*-TsOH. Dobijeni intermedijer etil $\Delta^{3,5}$ -enoletar je tretiran sa *N*-metilanilinom i vodenim rastvorom formaldehida (*Mannich*-ova reakcija) pri čemu je nakon zakišeljavanja sa HCl dobijen 6-metilentestosteron (**23**). Acetilovanjem hidroksilne grupe jedinjenja **23** i dehidrogenacijom dobijenog proizvoda **24** hloranilom, u prisustvu bis(trimetilsilil)-trifluoracetamida i trifluormetansulfonske kiseline kao katalizatora, dobijen je 6-metilenandrost-1,4-dien-3-on-17 β -acetat (**25**). Saponifikacijom acetata **25** dobijen je 17 β -hidroksi derivat **19** koji je oksidacijom *Jones*-ovim reagensom dao jedinjenje **3**.



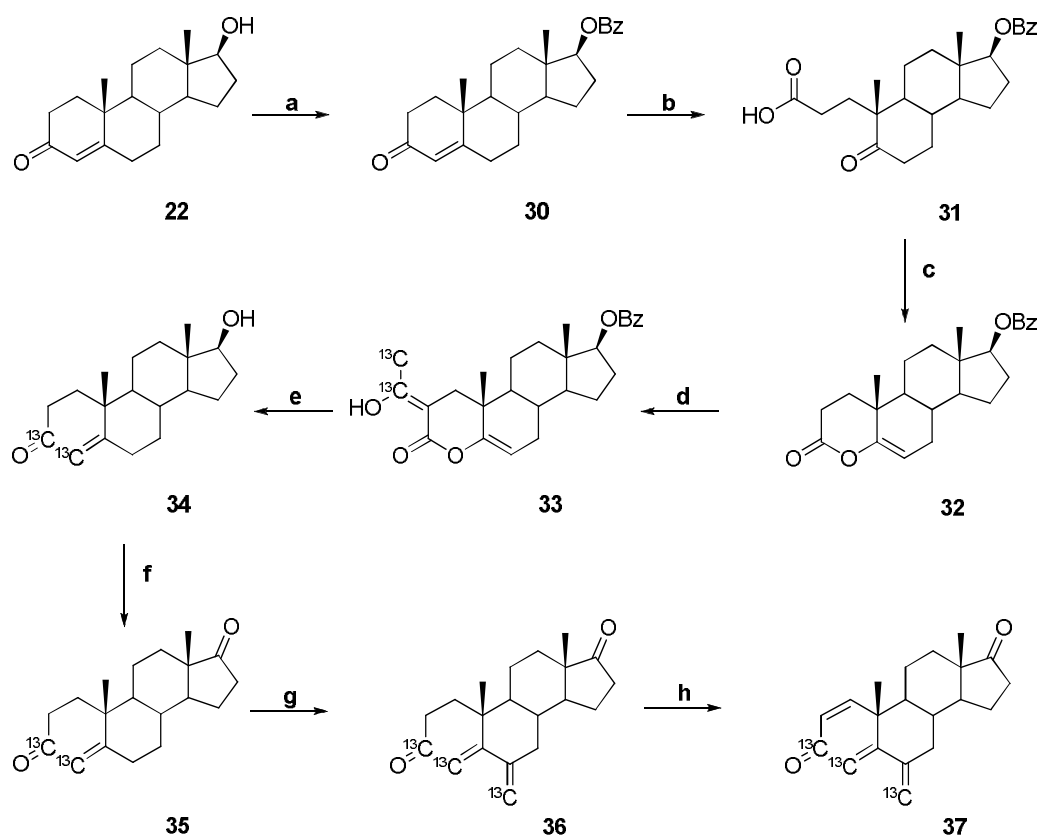
Shema 2.8. Reagensi: a) 1. TEOF, *p*-TsOH, THF-EtOH; 2. MeNHPh, HCHO, HCl; b) Ac₂O, Py, CH₂Cl₂; c) hloranil, BSTFA, TfOH, toluen; d) 1M NaOH, MeOH; e) *Jones*-ov reagens, aceton

Eksemestan je dobijen iz androsta-1,4-dien-3,17-diona (**26**) u četiri sintetske faze (*Shema 2.9.*).¹²¹ U prvoj fazi sinteze relativno lako dostupno jedinjenje **26** je zagrevanjem sa pirolidinom, u prisustvu katalitičke količine sirćetne kiseline, na tački ključanja prevedeno u 1 α ,3-dipirolidinoandrosta-3,5-dien-17-on (**27**).¹²² Ova faza je znatno poboljšana u odnosu na istu koja je opisana ranije.¹²³ Sledeća faza je obuhvatala reakciju jedinjenja **27** sa formaldehidom u metilen-hloridu, pri čemu je dobijen 6 β -hidroksimetilenski derivat **28**. I ova faza je znatno poboljšana u odnosu na onu koja je ranije opisana u literaturi.¹²⁴ Eksemestan (**3**) je dobijen iz jedinjenja **28** u dve faze: najpre je hidrosilna grupa prevedena u bolje odlazeću meziloksi grupu sa mezil-hlorid, pri čemu je nastao intermedijer **29**, koji je eliminacijom MsOH dao krajnji proizvod **3**.



Shema 2.9. Reagensi: **a)** pirolidin, AcOH, EtOH, THF; **b)** formaldehid, CH₂Cl₂; **c)** MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; **d)** NaOH, KOH, MeOH

Za razvoj i potvrdu osetljivosti, specifičnosti i pouzdanosti metode za merenje nivoa Eksemestana u biološkim tečnostima korišćenjem tačne hromatografije - masene spektroskopije (LC-MS), neophodna je priprema stabilnog, označenog Eksemestana kao internog standarda.¹²⁵⁻¹²⁹ Iz datog razloga polazeći od testosterona (**22**) u osam faza sintetisan je [¹³C₃]eksemestan (**37**) (*Shema 2.10.*).¹³⁰

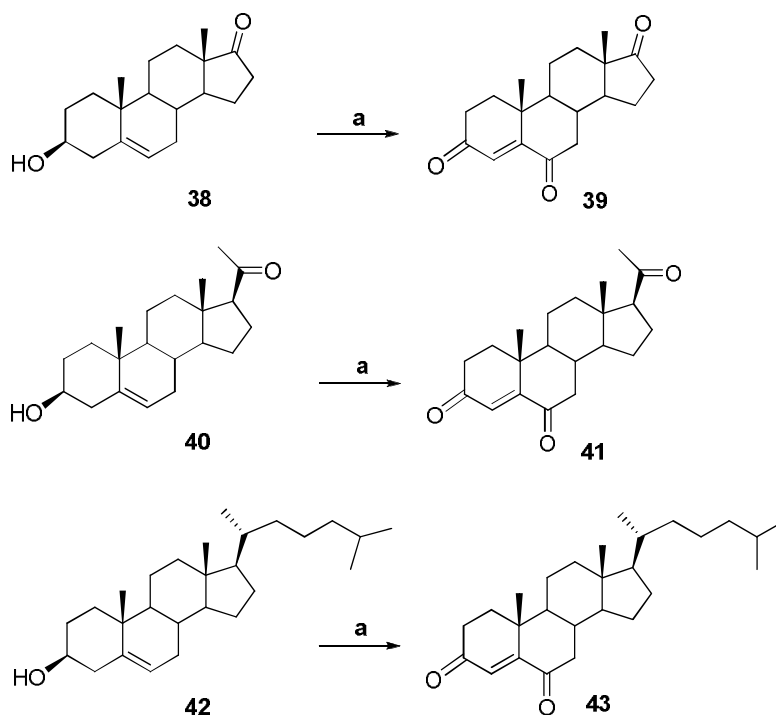


Shema 2.10. Reagensi: **a**) BzCl, Py, toluen; **b**) KMnO_4 , KIO_4 , K_2CO_3 , *t*-BuOH; **c**) HClO_4 , Ac_2O , EtOAc; **d**) $^{13}\text{C}_3\text{CH}_3\text{COCl}$ ($(\text{CH}_3)_3\text{Si})_2\text{N-Li}$, THF; **e**) KOH, MeOH, H_2O ; **f**) PCC, CH_2Cl_2 ; **g**) 1. TEOF, THF, EtOH, *p*-TsOH; 2. MeNHPPh, H^{13}CHO ; **h**) DDQ, *p*-TsOH, dioksan.

Nakon zaštite 17-hidroksilne grupe testosterona (**22**) sa benzoil-hloridom, A-prsten jedinjenja **30** je otvoren oksidacijom sa $\text{KMnO}_4/\text{KIO}_4$. Dobijena ketokiselin **31** je zatim tretirana sa HClO_4 , pri čemu je nagrađen lakton **32**, koji je sa $^{13}\text{C}_2$ -acetil-hloridom u prisustvu litijum-bis(trimetilsilil)amidom dao intermedijer **33**. Jedinjenje **33** je prevedeno u $^{13}\text{C}_2$ -testosteron **34** zagrevanjem na tački ključanja u smeši metanol – voda, u prisustvu kalijum-hidroksida. Obeleženi androstendion (**35**) je dobijen u reakciji jedinjenja **34** sa piridinium-hlorhromatom u metilen-hloridu. U sledećoj fazi sinteze jedinjenje **35** je sa ^{13}C -formaldehydom u prisustvu *N*-metilanilina nagradilo intermedijer **36**, koji je nakon tretiranja sa DDQ u dioksanu, u prisustvu *p*-toluensulfonske kiseline dao ciljni $^{13}\text{C}_3$ -eksemestan (**37**).¹³⁰

2.3. SINTEZE 6-OKSO STEROIDA

U literaturi^{16,131-134} je opisano nekoliko načina sinteze steroidnih jedinjenja sa 4-en-3,6-dionskim sistemom. Sintetički 5-en-3 β -ol steroidi, koji su komercijalno dostupni, kao i njihovi acetatni derivati se najčešće koriste kao polazna jedinjenja u sintezama. Reagensi i metode koje su ranije korišćene su rezultovale niskim prinosima, pa su danas modifikovane u jednostavne, brze i ekonomične sinteze. Tako su Hunter i Priest¹³¹ za prevođenje steroidnih 5-en-3 β -ola u odgovarajuće 4-en-3,6-dione upotrebili modifikovanu *Jones*-ovu oksidaciju (*Shema 2.11.*). Kao oksidaciono sredstvo je korišćen CrO₃, a reakcija je izvedena na niskoj temperaturi i u relativno velikoj zapremini rastvarača. Reakcijom su dobijeni odgovarajući steroidni 4-en-3,6-dioni u visokom prinosu (77-89%) i za relativno kratko reakciono vreme (1-2h). Ovim postupkom je iz komercijalno dostupnog dehidroepiandrosterona (**38**) dobijen i potentan 4-androsten-3,6,17-trion (**39**).¹³¹

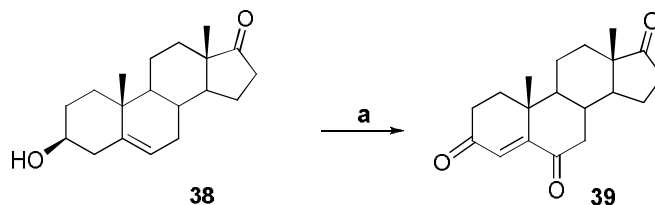


Shema 2.11. Reagensi: a) CrO₃, H₂SO₄, aceton

Pomenuti postupak¹³¹ sinteze 4-en-3,6-diona je primenjen i za dobijanje novog 17-pikolil derivata androstana, koji je pokazao snažnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijskoj liniji kancera prostate.¹³⁵

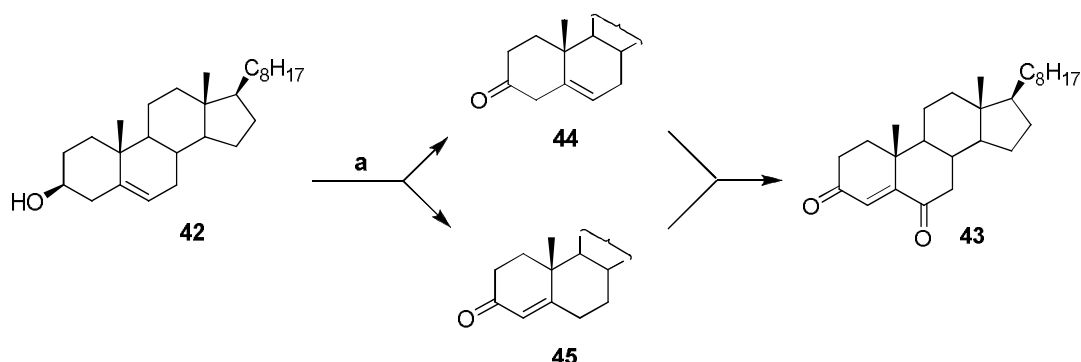
Portugalski naučnici¹³² su za oksidaciju dehidroepiandrosterona (**38**) koristili piridinium-hlorohromat na montmorilonitu K10, uz istovremeno izlaganje ultrazvučnim talasima, pri čemu je dobijeno jedinjenje **39** u prinosu od 90% (*Shema 2.12.*). Kombinacija

ultrazvuka sa PCC-om na glini kao nosaču se pokazala veoma dobra u smislu brzine reakcije, ekonomičnosti reagenasa i predstavlja pojednostavljenu metodu za dobijanje potentnog inhibitora aromataze **39** pri blagim reakcionim uslovima.



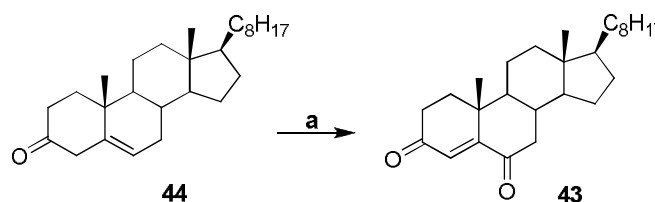
Shema 2.12. Reagensi: a) PCC, montmorilonit K10, dioksan, ultrazvuci

U cilju uvođenja 4-en-3,6-dionskog sistema, kineski naučnici¹⁶ su podvrgli holesterol (**42**) reakciji oksidacije sa piridinijum-dihromatom ili PCC, u dimetilformamidu ili metilenhloridu. Derivat **43** je dobijen u prinosu od 60-70%. Pretpostavlja se da reakcija protiče preko intermedijernih 5-en-3-ona **44** i 4-en-3-ona **45** (Shema 2.13.).



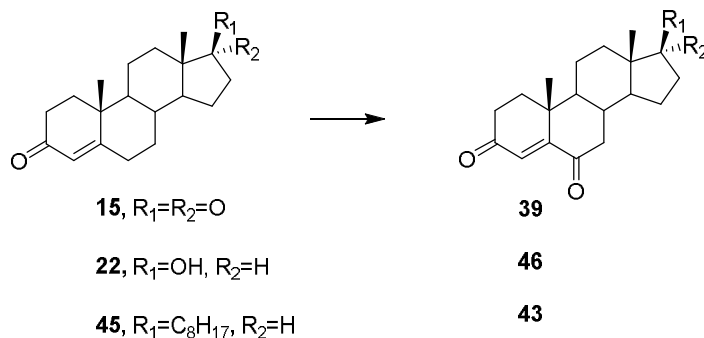
Shema 2.13. Reagensi: a) PDC, DMF ili PDC, CH₂Cl₂ ili PCC, DMF ili PCC, CH₂Cl₂

U jednoj od opisanih sinteza, oksidacijom holest-5-en-3-ona (**44**) sa 70% *tert*-butilhidroperoksidom u prisustvu katalitičke količine CrO₃ uveden je 4-en-3,6-dionski sistem u molekul (Shema 2.14.). U reakciji je došlo do migracije Δ⁵-dvostruke veze i oksidacije alilne metilenske grupe do keto grupe.¹³³



Shema 2.14. Reagensi: a) 70% TBHP, CrO₃, CH₂Cl₂

Steroidni 4-en-3,6-dionski derivati su dobijeni i alilnom oksidacijom odgovarajućih 4-en-3-ona. Ova transformacija je izvedena sa TBHP u prisustvu dirodijum-kaprolaktama kao katalizatora. Na *Shemi 2.15.* prikazane su strukture polaznih jedinjenja i proizvoda, a u *Tabeli 2.2.* reakcioni uslovi pri kojima je došlo do reakcije.¹³⁴

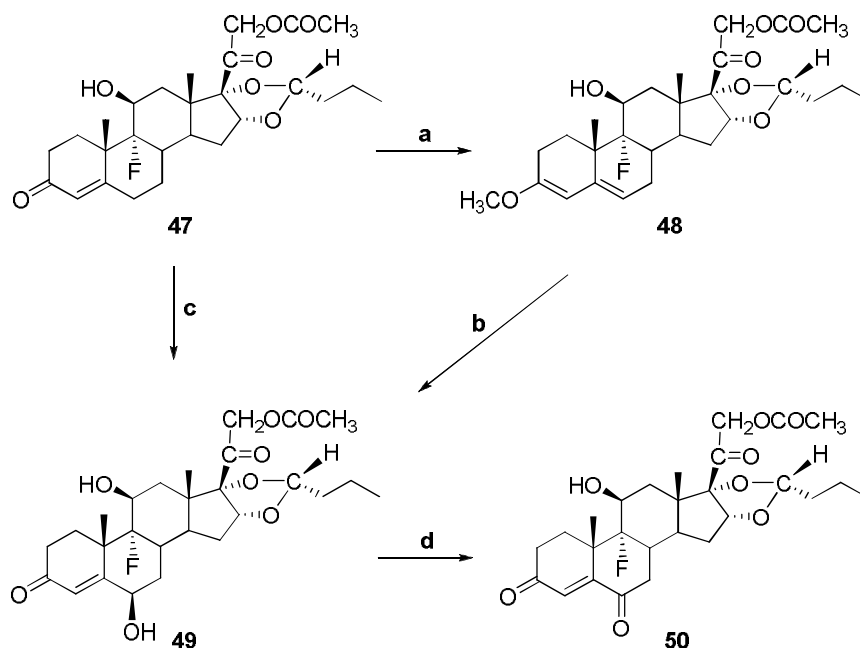


Shema 2.15. Reagensi: TBHP, Rh₂(cap)₄

Tabela 2.2. Reakcioni uslovi alilne oksidacije 4-en-3-on steroida

Jedinjenje	Katalizator	Reakcioni uslovi	Proizvod/Prinos
15	Rh ₂ (cap) ₄	TBHP, CH ₂ ClCH ₂ Cl, 40°C, 40h	39 / 80%
15	Rh ₂ (cap) ₄	TBHP, H ₂ O, 40°C, 40h	39 / 62%
22	Rh ₂ (cap) ₄	TBHP, CH ₂ ClCH ₂ Cl, 40°C, 16h	46 / 28%
45	Rh ₂ (cap) ₄	TBHP, H ₂ O, 25°C, 48h	43 / 50%

Thalen i Wickstrom¹³⁶ su 4-en-3,6-dionski sistem uveli kod pregnanskog 4-en-3-on derivata **47** (*Shema 2.16.*). Naime, alilnom oksidacijom jedinjenja **47** sa selen(IV)-oksidom u dioksanu dobijen je (22*R*)-21-acetoksi-9α-fluoro-6β,11β-dihidroksi-16α,17α-propilmetilendioksi-pregn-4-en-3,20-dion (**49**). Jedinjenje **49** je zatim podvrgnuto selektivnoj oksidaciji OH-grupe u položaju C-6 sa *Pfitzner-Moffat*-ovim reagensom, pri čemu je nastao (22*R*)-21-acetoksi-9α-fluoro-11β-hidroksi-16α,17α-propilmetilendioksi-pregn-4-en-3,6,20-trion (**50**).



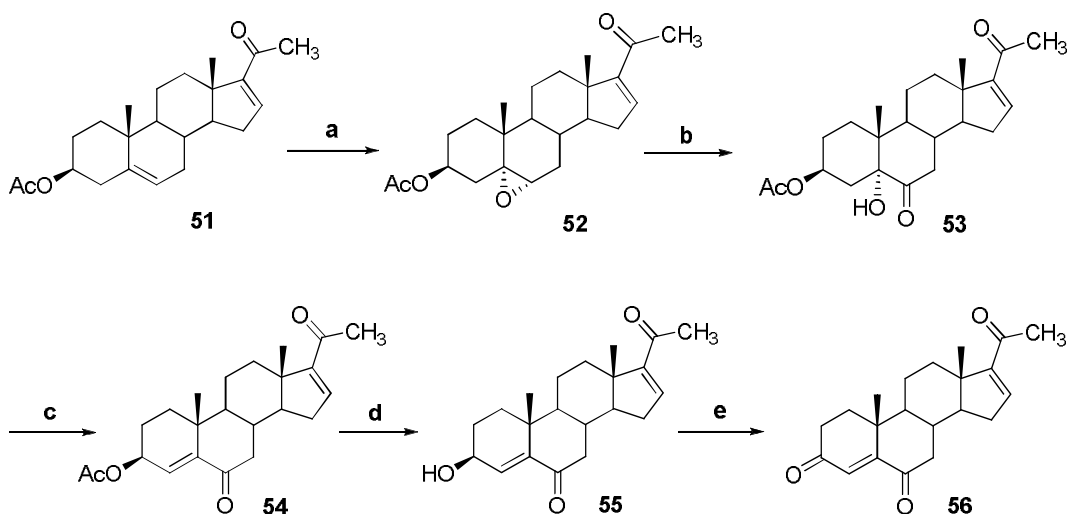
Shema 2.16. Reagensi: **a)** $\text{HC}(\text{OCH}_3)_3$, CH_2Cl_2 , dioksan; **b)** autooksidacija, EtOH; **c)** SeO_2 , dioksan; **d)** Pfitzner-Moffat-ov reagens

Pokušaji da se poboljša prinos jedinjenja **49** produženjem reakcionog vremena rezultovali su u potpunoj konverziji jedinjenja **47** u **49**, ali i degradaciji, tako da se željeni proizvod **49** nije mogao detektovati. Zato su pomenuti autori¹³⁶ jedinjenje **49** sintetizovali iz **47** i alternativnim putem. Pregn-4-enski derivat **47** je dejstvom trimetilortoformijata u CH_2Cl_2 i dioksanu, nakon enolizacije i metilovanja hidroksilne grupe u položaju C-3, dao (22*R*)-21-acetoksi-9 α -fluoro-11 β -hidroksi-3-metoksi-16 α ,17 α -propilmetilendioksipregna-3,5-dien-20-on (**48**). 9 α ,11 β -Halohidrin **48** je zatim autooksidacijom dao stereospecifično 6 β -alkohol **49**, dok je 6 α -izomer dobijen u slučaju prednizolonskog derivata koji nema fluor u položaju C-9 α . Na ovaj način je 6 β -hidroksi-4-en-3-on derivat **49** dobijen u približno istom prinosu kao i oksidacijom pregn-4-ena **47** sa selen(IV)-oksidom.

Ranije je utvrđeno da autooksidacija steroidnih jedinjenja sa 3,5-dien-3-ol sistemom u 6-hidroksi-4-en-3-on uključuje stvaranje intermedijernog 6-hidroksiperoksida.¹³⁷ Na sličan način je i uvođenje OH-grupe autooksidacijom u položaju C-6 kod 9 α -fluoro-3-metoksi-pregna-3,5-diena **48**, praćeno stvaranjem hidroksiperoksida. Stereohemija na C-6 atomu zavisi od strane sa koje singlet kiseonik napada 5,6-dvostruku vezu. Napad sa α -strane je manje verovatan od napada sa β -strane, i to više zbog elektronskih, nego sternih razloga.

Perez-Ornelas i saradnici¹³⁸ su izveli sintezu nekoliko 3-supstituissanih pregna-4,16-dien-6,20-dionskih derivata iz 16-dehidropregnenolon-acetata (**51**) (Shema 2.17.). Polazno jedinjenje **51** je dejstvom *m*-hlorperbenzoeve kiseline prevedeno u 5 α ,6 α -epoksi derivat **52**, koji je zatim oksidativnim otvaranjem oksiranskog prstena sa hrom(VI)-oksidom dao α -hidroksi-keton **53**. Eliminacijom hidroksilne grupe sa tionil-hloridom, dobijen je α,β -nezasićeni

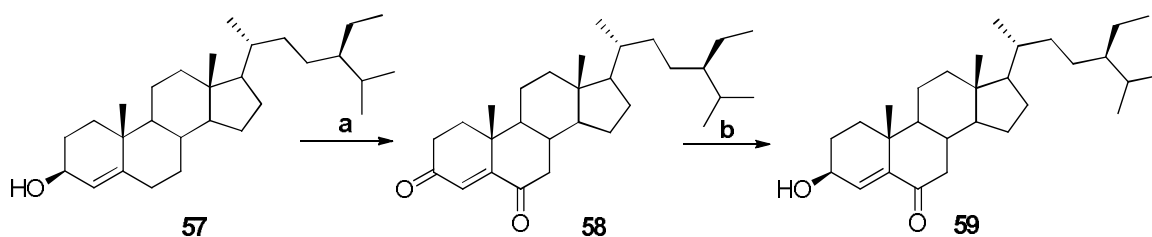
keton **54**. Hidrolizom acetoksi grupe kod jedinjenja **54** dobijen je alkohol **55**, koji je oksidacijom sa CrO_3 dao 4,16-dien-3,6,20-trionski derivat **56**.



Shema 2.17. Reagensi: **a)** *m*-CPBA, CH_2Cl_2 ; **b)** CrO_3 , aceton; **c)** SOCl_2 , Py; **d)** NaOH, MeOH; **e)** CrO_3 , H_2O , aceton

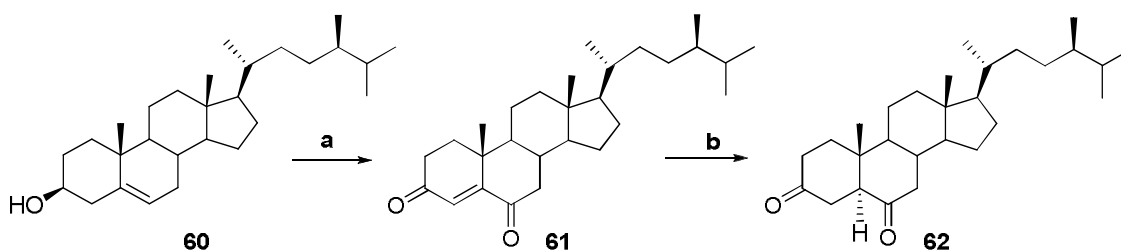
U pomenutom radu¹³⁸, ispitana je biološka aktivnost sintetizovanih jedinjenja u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima, a dobijeni podaci su pokazali da su jedinjenja **52**, **54** i **56** dobri inhibitori enzima 5α -reduktaze. Enzim 5α -reduktaza je odgovoran za konverziju testosterona u mnogo potentniji androgen, dihidrotestosteron, koji je povezan sa androgen-zavisnim bolestima kao što su: benigna hiperplazija prostate, kancer prostate, akne i androgena alopecija. Inhibicija enzima 5α -reduktaze nudi potencijalno koristan tretman za te bolesti.

Steroidi sa 4-en-3,6-dionskim sistemom su korišćeni za sinteze drugih derivata sa 6-keto funkcijom. Tako je jedinjenje **58**, koje je dobijeno iz **57** oksidacijom sa PCC u metilenhloridu, selektivnom redukcijom sa NaBH_4 u prisustvu CoCl_2 dalo 24-etilholest-4-en-3 β -ol-6-on (**59**) (Shema 2.18.).²⁴



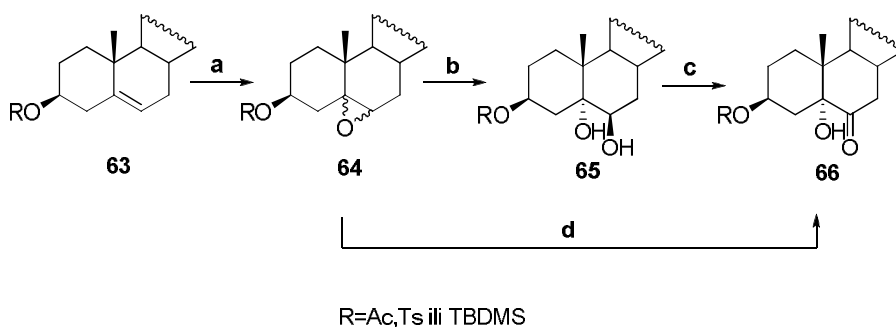
Shema 2.18. Reagensi: **a)** PCC, CH_2Cl_2 ; **b)** NaBH_4 , MeOH, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Japanski naučnici¹³⁹ su dobili kampest-4-en-3,6-dion (**61**) iz kampesterola (**60**) oksidacijom sa PCC u metilen-hloridu (*Shema 2.19.*). Hidrogenizacijom Δ^4 dvostruke veze u jedinjenju **61** sa titan(III)-hloridom, pri čemu je reakcija visoko stereoselektivna, dobijen je 5α -kampestan-3,6-dion (**62**) sa trans kondenzovanim A/B prstenovima. Jedinjenje **62** je dobijeno u prinosu od 85%, dok je njegov C-5 epimer nastao u tragovima. Katalitička hidrogenizacija kampest-4-en-3,6-diona (**61**) sa 5% paladijumom na uglju u etil-acetatu je znatno manje stereoselektivna, i rezultuje građenjem smeše 5α - i 5β -kampestan-3,6-diona u prinosima 63% i 23% respektivno.



Shema 2.19. Reagensi: **a)** PPC, CH_2Cl_2 ; **b)** 20%-ni rastvor TiCl_3 , aceton

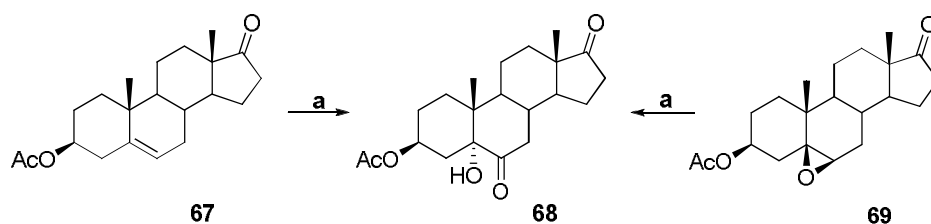
Značajna jedinjenja iz klase 6-keto steroida su 5α -hidroksi-6-keto derivati (α -ketoli) koji služe kao polazna jedinjenja za sintezu različitih bioaktivnih molekula kao što su regulatori rasta biljaka¹⁴⁰⁻¹⁴², inhibitori 5α -reduktaze^{138,143}, antagonisti androgenih receptora¹⁴⁴. Sinteze 5α -hidroksi-6-on steroida tipa **66** iz 3β -hidroksi-5-en derivata **63** podrazumevaju oksidaciju 5,6-diola **65**^{140,142,145}, ili oksidativno otvaranje 5,6-epoksida **64** (*Shema 2.20.*).



Shema 2.20. Reagensi: **a)** *m*-CPBA, CH_2Cl_2 ili $\text{KMnO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, *t*-BuOH, CH_2Cl_2 , H_2O ; **b)** H_2O , HClO_4 , aceton; **c)** Jones-ov reagens ili PCC; **d)** Jones-ov reagens ili CrO_3

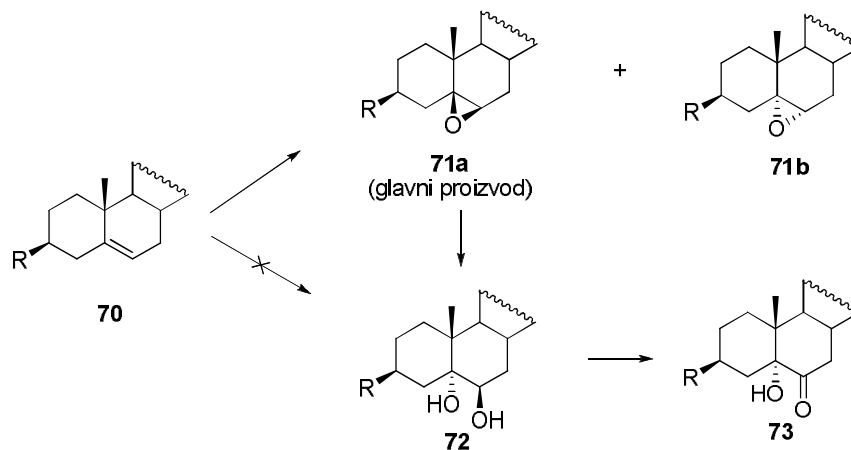
Primenjujući postupak koji je ranije opisan u literaturi¹⁴⁰, Djurendić i saradnici¹⁴⁶ su sintetizovali 5 α -hidroksi-6-keto-D-homo-laktonski derivat androstana koji je pokazao značajnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijskoj liniji MDA-MB-231 (kancer dojke).

Tretiranjem različitih 3 β -acetoksi-5-en steroida ili njihovih 5 β ,6 β -epoksi analoga sa $\text{KMnO}_4/\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ dobijeni su 5 α -hidroksi-6-on derivati u visokom prinosu.¹⁴⁷ Zaštitne grupe (acetat, benzoat) u položaju C-3 su rezistentne na ove reakcione uslove. Na *Shemi 2.21.* je prikazana sinteza 3 β -acetoksi-5 α -hidroksi-6,17-dioeksoandrostana (**68**) polazeći od 3 β -acetoksi-17-oksoandrost-5-ena (**67**) i 3 β -acetoksi-5 β ,6 β -epoksi-17-oksoandrostana (**69**).



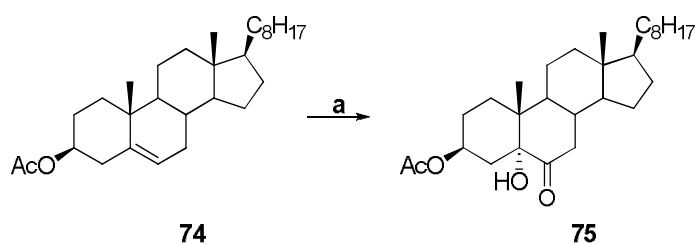
Shema 2.21. Reagensi: $\text{KMnO}_4/\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , $t\text{-BuOH}$, H_2O

Pretpostavlja se da se reakcija C-3 zaštićenih Δ^5 steroida (**70**) sa $\text{KMnO}_4/\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ odigrava preko intermedijernih epoksida **71a** i **71b** koji se razlažu do *trans*-diola **72**, a ovaj oksidacijom daje α -ketol **73** (*Shema 2.22.*).



Shema 2.22. Pretpostavljeni put nastajanja α -ketola iz Δ^5 steroida pomoću $\text{KMnO}_4/\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$

Mada ova metoda daje zadovoljavajuće prinose (70-80%), zbog eksplozivne prirode $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ nije pogodna za dobijanje većih količina željenih ketola. Daljim traganjem za novim i efikasnijim postupcima, Rosado-Abon i saradnici¹⁴⁸ objavili su „one-pot“ sintezu α -ketola iz Δ^5 steroida.

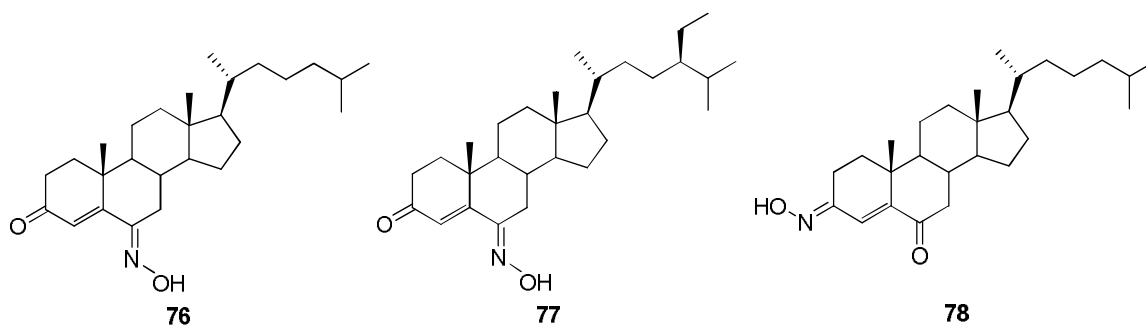


Shema 2.23. Reagensi: a) 1. *m*-CPBA, CH₂Cl₂; 2. CrO₃, aceton, H₂O

Oksidacijom holesteril-acetata (**74**) sa *m*-CPBA u CH₂Cl₂, a zatim oksidativnim otvaranjem nastalih 5 α - i 5 β -epoksida sa CrO₃, dobijen je odgovarajući α -ketol (**75**) u prinosu od 96% (Shema 2.23.).

2.4. SINTEZE 6-OKSIMINO STEROIDA

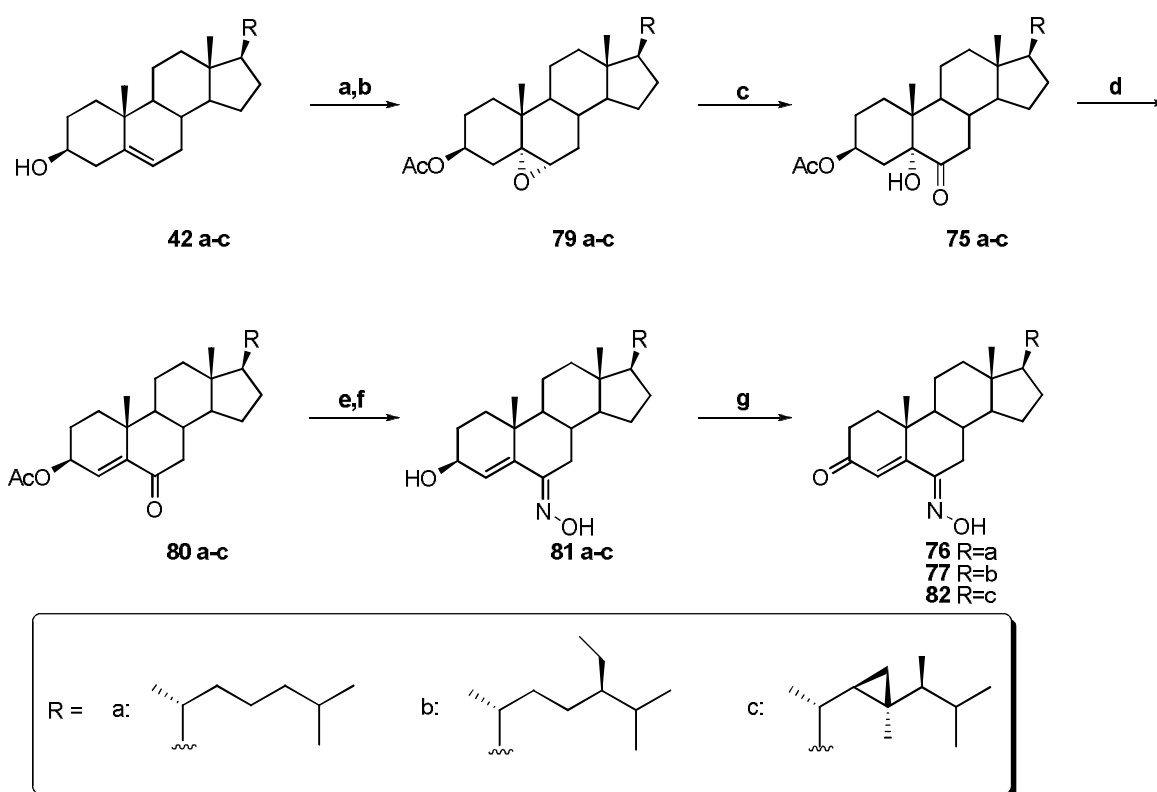
Iz morskih sunđerâ su izolovani raznovrsni steroidi neobične i interesantne strukture.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Među njima, dva steroidna oksima (6*E*)-hidroksiiminoholest-4-en-3-on (**76**) i (6*E*)-hidroksiimino-24-etilholest-4-en-3-on (**77**) su izolovani iz *Cinachyrella alloclada* i *C. apion*,²⁵ dok je (3*E*)-hidroksiiminoholest-4-en-6-on (**78**) izolovan iz *Cinachyrella australiensis* (Slika 2.8.).²⁶ Istraživanja su pokazala da ovi steroidi imaju raznovrsnu biološku aktivnost. Na primer, (3*E*)-oksimino derivat **78** pokazuje antiviralnu aktivnost prema virusu hepatitisa *in vitro*,²⁶ a (6*E*)-oksimino derivat **76** pokazuje citotoksičnu aktivnost prema nekoliko tipova ćelija kancera, kao što su P-388 (murinska leukemija), A-549 (humani karcinom pluća), HT-29 (humani karcinom debelog creva) i MEL-28 (humani mijelom) tumorske ćelije.²⁷ Citotoksičnost ovih jedinjenja zavisi od položaja oksimino grupe u steroidnoj strukturi. Na primer, prisustvo oksimino grupe u položaju C-6 dovodi do veće citotoksičnosti u odnosu na istu grupu u položaju C-3.³¹



Slika 2.8. Prirodni steroidni oksimi

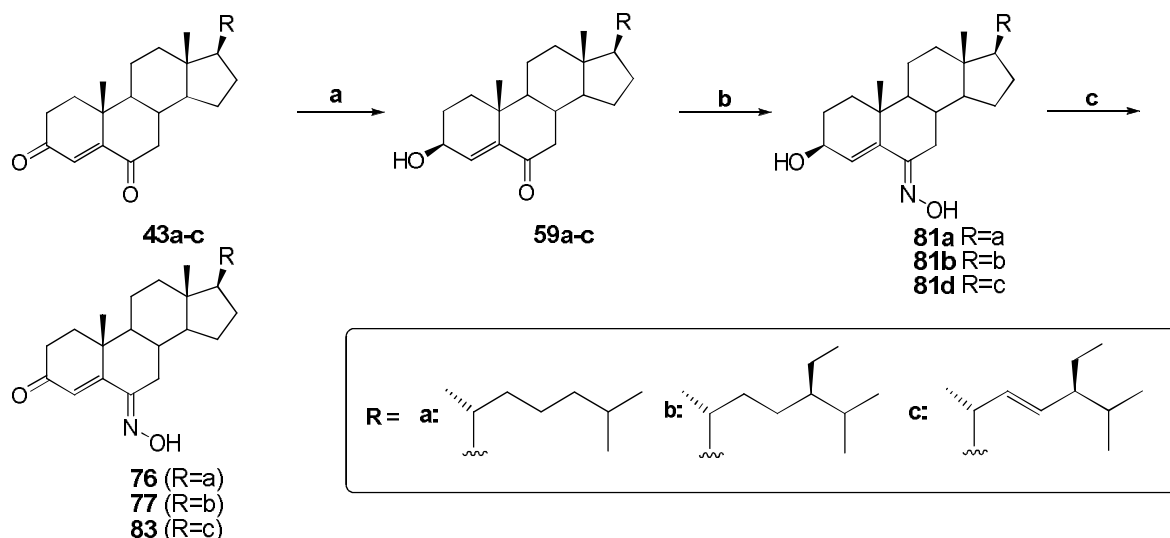
U literaturi²⁷ je opisana sinteza nekoliko 6-hidroksiimino-steroidnih analoga jedinjenja **76** i **77** i ispitana je njihova citotoksična aktivnost.

Polazeći od jedinjenja **42a-c** sintetizovani su (6*E*)-hidroksiimino-4-en-3-on derivati **76**, **77** i **82** (Shema 2.24.).^{27,31} Acetilovanjem, a zatim epoksidacijom 5-en-3β-ola **42a-c** dobijeni su 3β-acetoksi-5α,6α-epoksi derivati **79a-c** koji su oksidacijom sa CrO₃ dali 3β-acetoksi-5α-hidroksi-6-on derivate **75a-c**. Eliminacijom C-5 hidroksilne grupe sa tionil-hloridom u piridinu, sintetisani su 4-en-6-onski derivati **80a-c**, a daljim tretmanom sa hidroksilamin-hidrohloridom dobijeni su 6-hidroksiimino derivati **81a-c**. Oksidacijom hidroksilne grupe u položaju C-3 kod jedinjenja **81a-c**, dobijeni su odgovarajući (6*E*)-hidroksiimino-4-en-3-on derivati **76**, **77** i **82**.



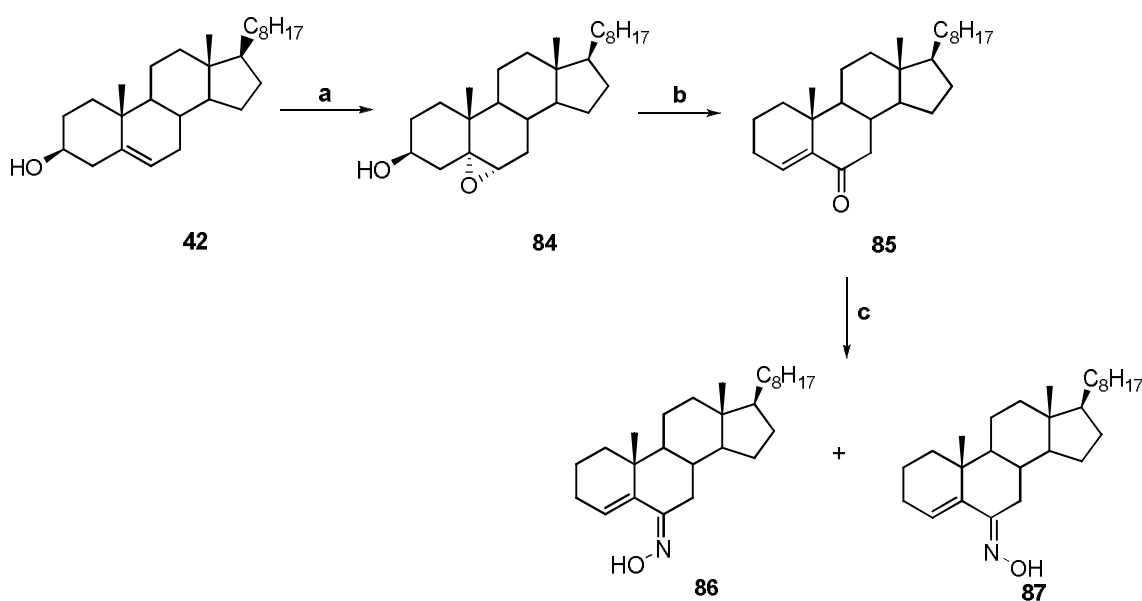
Shema 2.24. Reagensi: **a)** Ac₂O, Py; **b)** *m*-CPBA, CH₂Cl₂; **c)** CrO₃, H₂O; **d)** SOCl₂, Py; **e)** KOH, MeOH; **f)** NH₂OH·HCl, EtOH, H₂O; **g)** CrO₃, H₂O

Kineski naučnici³¹ su takođe sintetizovali jedinjenja **76** i **77**. Naime, polazeći od 4-en-3,6-dionskih derivata holesterola **43a**, β-sitosterola **43b** i stigmasterola **43c** regioselektivnom redukcijom sa NaBH₄ u prisustvu CoCl₂, dobijeni su derivati **59a-c** (Shema 2.25.). U reakciji jedinjenja **59a-c** sa hidroksilamin-hidrohloridom u etanolu, u prisustvu natrijum-acetata dobijeni su 6*E*-oksimi **81a-c** koji su oksidacijom sa Jones-ovim reagensom u acetonu dali odgovarajuće (6*E*)-hidroksiimino-4-en-3-on derivate **76**, **77** i **83**.



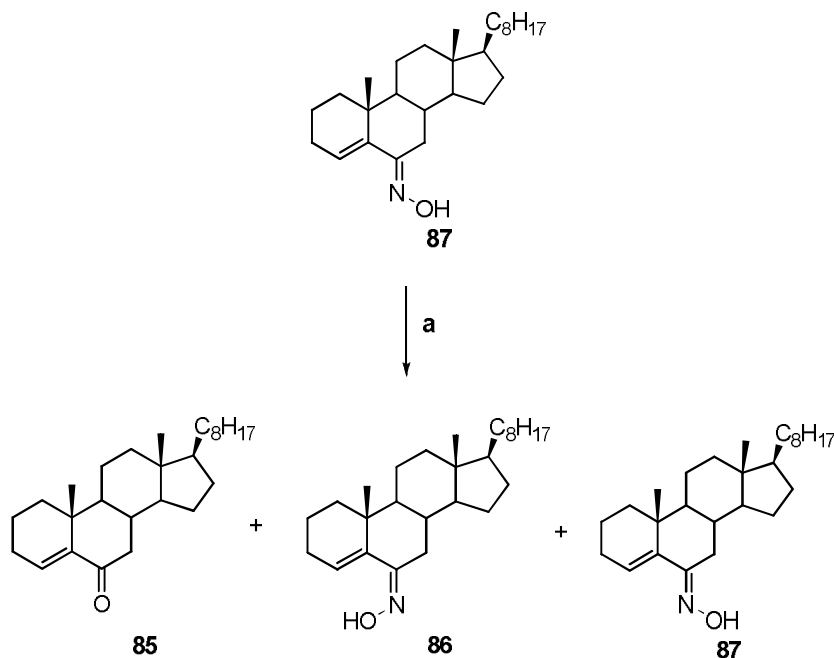
Shema 2.25. Reagensi: **a)** NaBH_4 , MeOH, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; **b)** $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, AcONa, EtOH; **c)** Jones-ov reagens, aceton

Krstić i saradnici^{29,152} su sintetizovali i ispitali antiproliferativnu aktivnost oksima **86** i **87**. Ključni intermedijer u sintezi pomenutih oksima je bio holest-4-en-6-on (**85**). Postoji nekoliko načina za njegovo dobijanje, a kao polazno jedinjenje u svim postupcima je korišćen 5 α ,6 α -epoksiholesterol (**84**)¹⁵³ ili njegov 3 β -hloro ili 3 β -acetoksi derivat¹⁵⁴. Najbolji način za sintezu jedinjenja **85** je zagrevanje jedinjenja **84** u DMSO na tački ključanja (*Shema 2.26.*)¹⁵⁵. Oksiminovanjem enona **85** sa hidroksilamin-hidrohloridom u smeši etanol-piridin na tački ključanja u toku 15 minuta, dobijena je stereoizomerna smeša (6Z)- i (6E)-hidroksiimino-olest-4-ena **86** i **87** u prinosu od 5% i 80%.¹⁵²



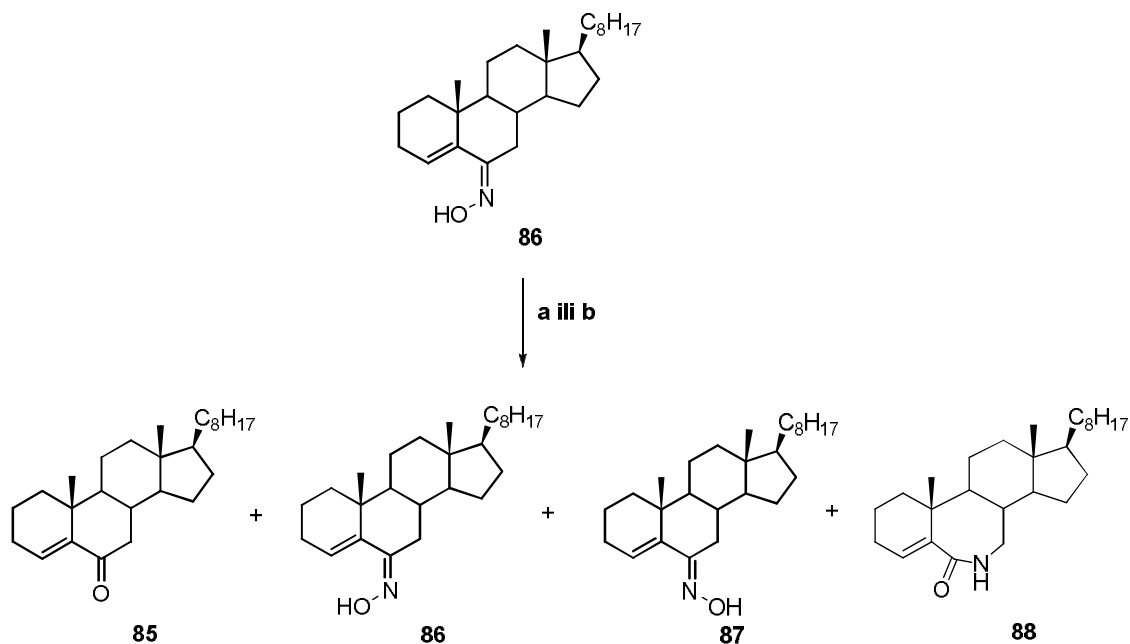
Shema 2.26. Reagensi: **a)** *m*-CPBA, CH_2Cl_2 ; **b)** DMSO; **c)** $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, EtOH, Py

Kada je (6*E*)-hidroksiimino-holest-4-en (**87**) podvrgnut fotohemijskoj reakciji u smeši etanol – piridin, u prisustvu hidroksilamin-hidrohlorida došlo je do nastajanja polaznog jedinjenja **85** u prinosu od 5% i izomernih (6*Z*) i (6*E*)-oksima **86** i **87** u prinosu od 34%, odnosno 57% respektivno (*Shema 2.27.*).¹⁵²



Shema 2.27. Reagensi: a) NH₂OH·HCl, EtOH, Py, hv

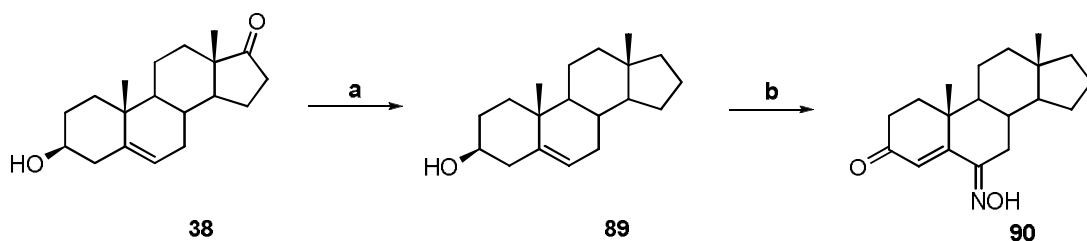
S druge strane, (6*Z*)-hidroksiimino-holest-4-en (**86**) je podvrgnut fotohemijskoj reakciji u metanolu, ili u smeši benzen – sirćetna kiselina (*Shema 2.28.*). Kada je reakcija rađena u metanolu u toku 6 sati, dobijena je smeša proizvoda koju čine keton **85** (21%), proizvod *Z/E* izomerizacije **87** (23%), laktam **88** (7%) i nepromenjeni oksim **86** (25%). Ukoliko je reakcija rađena u smeši benzen – sirćetna kiselina, dobijeni su izomerni *E*-oksim **87** u prinosu od svega 2%, keton **85** (17%) i polazni *Z*-oksim **86** (77%).¹⁵²



Shema 2.28. Reagensi: **a)** MeOH, hv; **b)** benzen-AcOH, hv

U cilju proučavanja uticaja bočnog niza u položaju C-17 na biološku aktivnost, sintetizovan je 17-supstituisani 6-oksmino derivat **90**, kao i jedinjenja sa različitim stepenom oksidacije na ugljenikovom atomu C-17, **92a** i **92b**.

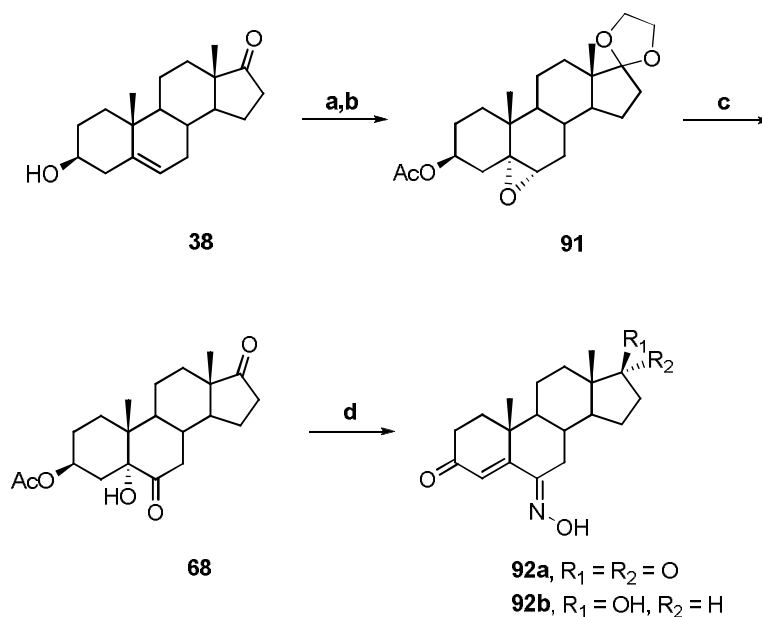
Wolff-Kishner-ovom redukcijom dehidroepiandrosterona (**38**), dobijen je androst-5-en-3 β -ol (**89**), koji je zatim na isti način, kako je prikazano na Shemi 2.24., preveden u oksimino **90** (Shema 2.29.).¹⁵³



Shema 2.29. Reagensi: **a)** dietilen-glikol, $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2CO_3 ; **b)** Faze a-g, Shema 2.24.

Dehidroepiandrosteron (**38**) je poslužio i za dobijanje jedinjenja **92a** i **92b**.¹⁵³ Jedinjenje **38** je najpre podvrgnuto reakciji sa etilenglikolom, radi zaštite 17-keto grupe u ketal, a zatim je izvršena zaštita C-3 hidroksilne grupe, potom oksidacija sa *m*-hlorperbenzoevom kiselinom pri čemu je dobijen epoksid **91** (Shema 2.30.). Na isti način, kako je opisano na Shemi 2.24. jedinjenje **91** je prevedeno u (6*E*)-hidroksiimino derivat **92a**. S obzirom na prisustvo dve keto funkcije kod jedinjenja **68** uvođenje oksimino funkcije isključivo u položaj C-6 ukazuje da je ova sinteza regioselektivna jer nije detektovano dobijanje 17-

oksimino derivata. 17 β -Hidroksi analog **92b** je sintetizovan prema postupku koji je opisan od strane Hollanda i saradnika.¹⁵⁶

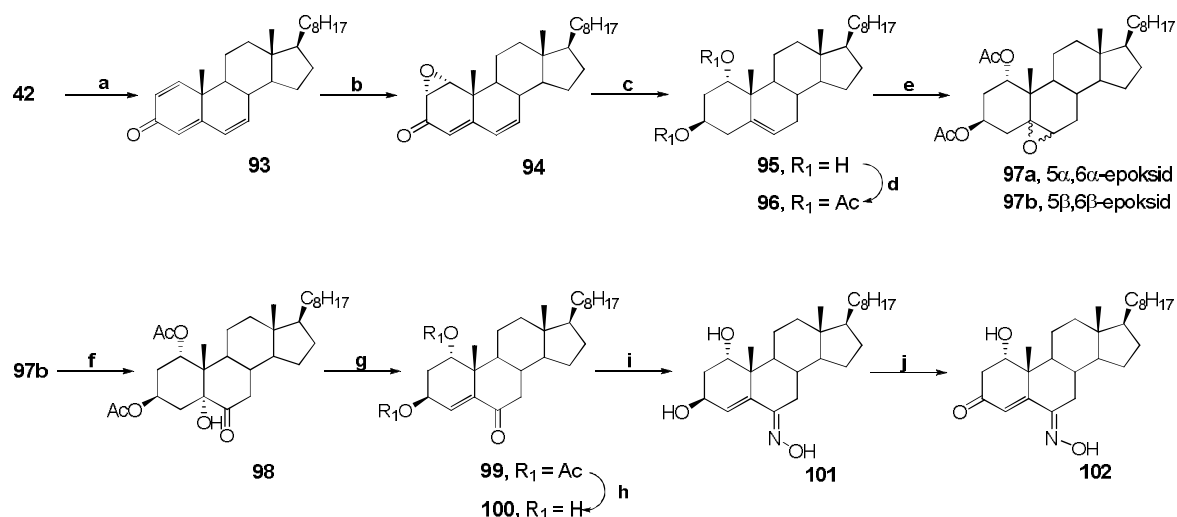


Shema 2.30. Reagensi: **a)** etilen-glikol, adipinska kiselina, toluen; **b)** Ac₂O, Py, zatim *m*-CPBA, CH₂Cl₂; **c)** CrO₃, H₂O; **d)** Faze **d-g**, *Shema 2.24*.

Jedinjenje **90** je pokazalo blagu citotoksičnost prema odabranim linijama humanih kancera, a u aktivnosti jedinjenja **92a** i **92b** nema bitne razlike u odnosu na jedinjenje **76**.

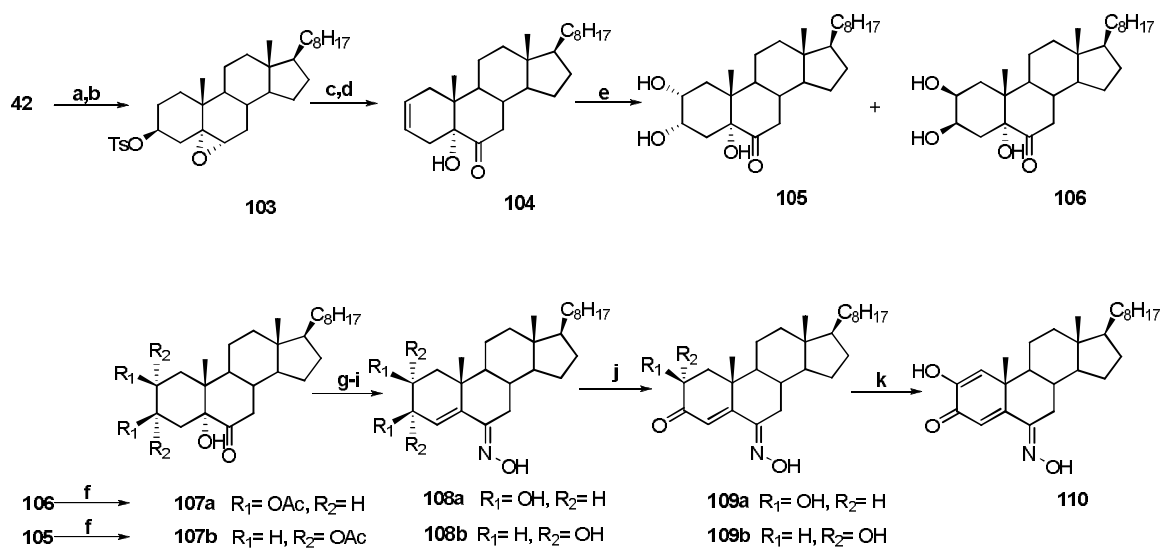
Sintetisana je i serija 6-oksimino derivata holesterola sa različitim stepenom oksidacije u prstenu A^{27,30}, B^{30,157} i D³⁰.

Polazeći od holesterola (**42**) sintetizovani su (6*E*)-hidroksiiminoholest-4-enski derivati **101** i **102** sa hidroksilnom grupom u položaju C-1 α (*Shema 2.31.*),³⁰ pri čemu je za uvođenje hidroksilne grupe korišćena metodologija koju su razvili Fürst i saradnici.¹⁵⁸ Oksidacijom holesterola sa DDQ dobijen je trienon **93**, koji je dalje oksidovan sa vodonik-peroksidom u baznoj sredini do epoksidnog derivata **94**. Redukcijom jedinjenja **94** sa litijumom u tečnom amonijaku uz kontrolisane anhidrovane uslove dobijen je 1 α ,3 β -dihidroksihoolest-5-en (**95**). U cilju zaštite hidroksilnih grupa, jedinjenje **95** je prevedeno u diacetat **96**, koji je sa *m*-hlorperbenzoevom kiselinom dao smešu α - i β -epoksida, **97a** i **97b**, u odnosu 1:2. Oksidacijom epoksida **97b** Jones-ovim reagensom u acetanhidridu dobijen je 1 α ,3 β -diacetoksi-5 α -hidroksi-6-on steroid **98**, dok jedinjenje **97a** nije reagovalo pri ovim uslovima. Eliminacijom C-5 hidroksilne grupe tionil-hloridom u piridinu, dobijen je diacetoksi- α , β -nezasićeni keton **99**, a uklanjanjem acetatne zaštite jedinjenje **100**. Tretiranjem jedinjenja **100** sa hidroksilamin-hidrohloridom dobijen je (6*E*)-hidroksiiminoholest-4-en-1 α ,3 β -diol (**101**), koji je alilnom oksidacijom 3 β -hidroksilne grupe dao 1 α -hidroksi derivat **102**.³⁰



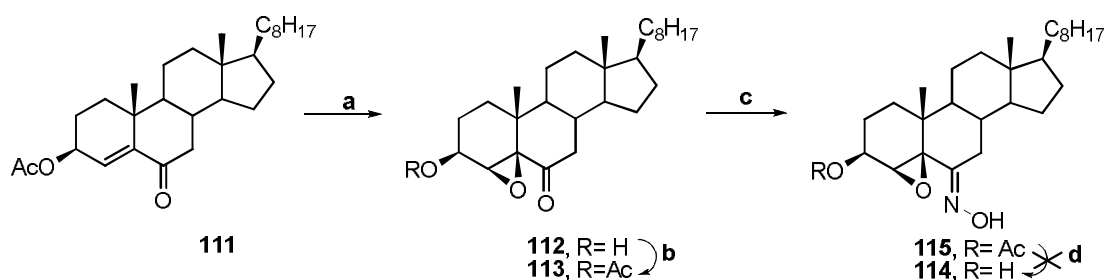
Shema 2.31. Reagensi: **a)** DDQ, dioksan; **b)** 35% H₂O₂, NaOH, MeOH (5:95); **c)** 1. Li, NH₃, THF; 2. NH₄Cl; **d)** Ac₂O, Py; **e)** *m*-CPBA, CHCl₃; **f)** Jones-ov reagens, Ac₂O; **g)** SOCl₂, Py; **h)** KOH, MeOH (5:95); **i)** NH₂OH·HCl, Py; **j)** MnO₂, CHCl₃ ili CrO₃, Py

Deive i saradnici²⁷ su sintetizovali (6*E*)-hidroksiiminoholest-1,4-dien-3-onski derivat **110** sa hidroksilnom grupom u položaju C-2 polazeći od holesterola (**42**). Tozilovanjem, a zatim epoksidacijom holesterola (**42**), dobijen je epoksidni derivat **103**, koji je nakon oksidacije i dehidrotzilovanja dao jedinjenje **104**. Dihidroksilacijom, katalizovanom osmijum-tetroksidom, dobijena je smeša 2 α ,3 α ,5 α - i 2 β ,3 β ,5 α -trihidroksi-holestan-6-ona (**105** i **106**). Nakon zaštite hidroksilnih grupa u položaju C-2 i C-3, dobijena jedinjenja **107a** i **107b** su prevedena u odgovarajuće 6-oksime **108a** i **108b**. Alilnom oksidacijom pomoću CrO₃ dobijeni su (6*E*)-hidroksiimino-2-hidroksi-4-en-3-on epimeri **109a** i **109b**. Oksidacijom jedinjenja **109b** sa MnO₂ nastao je (6*E*)-hidroksiimino-2-hidroksi-3-okso-1,4-dienski derivat **110** (*Shema 2.32*).



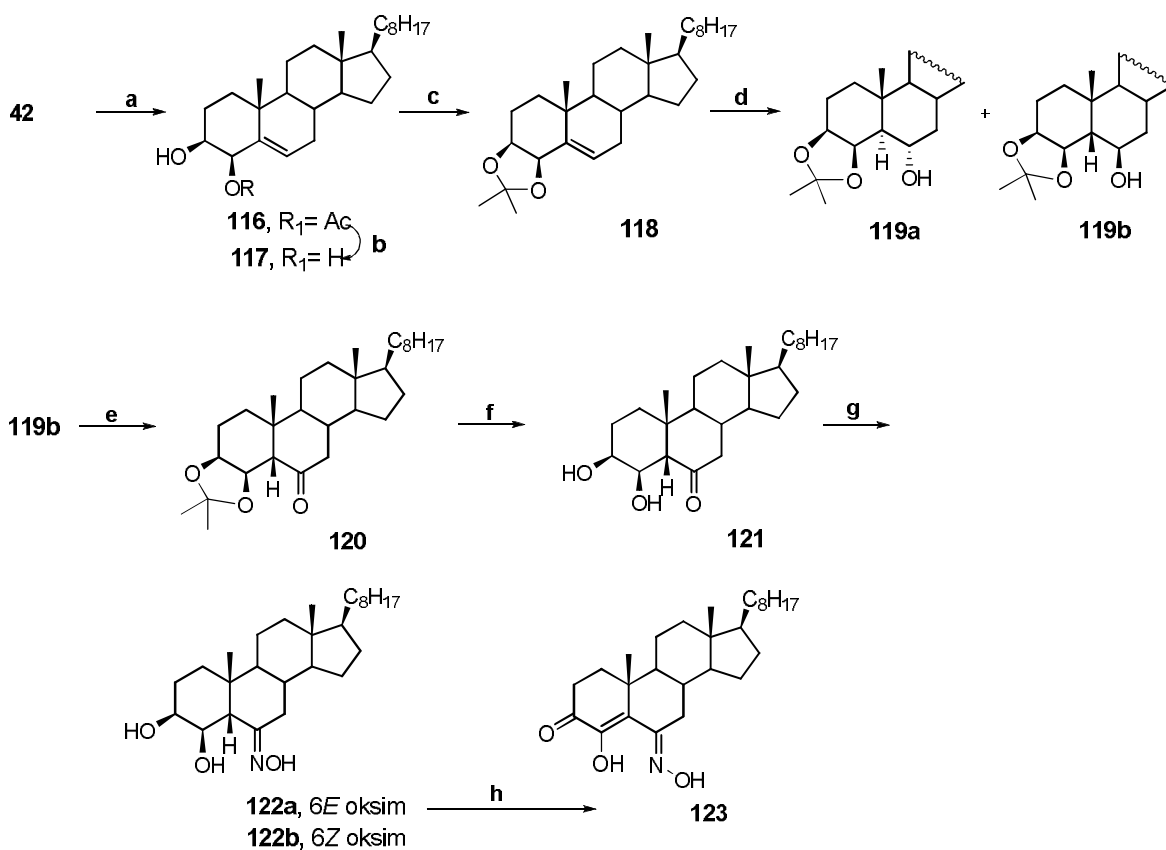
Shema 2.32. Reagensi: **a)** TsCl, Py; **b)** *m*-CPBA, CH₂Cl₂; **c)** CrO₃, H₂O; **d)** LiBr, DMF; **e)** OsO₄, NMO, THF, *t*-BuOH, H₂O; **f)** Ac₂O, Py; **g)** SOCl₂, Py; **h)** KOH, MeOH; **i)** NH₂OH·HCl, EtOH, H₂O; **j)** CrO₃, H₂O; **k)** MnO₂, CHCl₃

Pokušana je i sinteza 3 β -hidroksi-4 β ,5 β -epoksi-(6*E*)-hidroksiimino derivata holesterola **114**.³⁰ Naime, 6-okso derivat sa 4 β ,5 β -epoksidnom funkcijom **112** je dobijen iz 3 β -acetoksiholest-4-en-6-ona (**111**), pomoću baznog vodonik-peroksida (*Shema 2.33.*). Jedinjenje **112** je zatim prevedeno u 4 β ,5 β -epoksi-(6*E*)-hidroksiimino derivat **114**, koji je veoma nestabilan. U cilju dobijanja stabilnijeg analoga, 4 β ,5 β -epoksi-3 β -hidroksiholeston-6-on (**112**) je prvo acetilovan, a nastali acetat **113** oksiminovan standardnom procedurom, pri čemu je dobijen oksiminoacetat **115**. Međutim, hidroliza jedinjenja **115** u cilju dobijanja **114** je bila neuspešna.



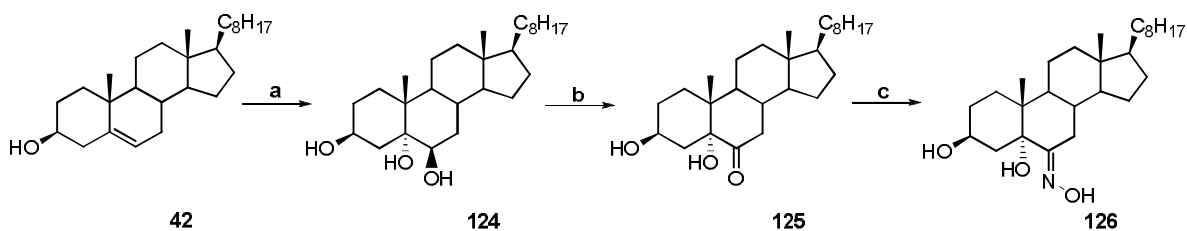
Shema 2.33. Reagensi: **a**) 35% H₂O₂, NaOH, MeOH (1:9); **b**) Ac₂O, Py; **c**) NH₂OH·HCl, Py; **d**) K₂CO₃, MeOH.

Uzimajući u obzir strukturne karakteristike inhibitora aromataze druge generacije Formestana (**2**), Poza i saradnici³⁰ su sintetizovali 6-oksimino-4-en-3-on derivat **123** sa hidroksilnom grupom u položaju C-4. Reakcijom holesterola (**42**) sa bromom u hloroformu i tretmanom sa srebro-acetatom u piridinu, dobijen je 4 β -acetoksi-3 β -hidroksi steroid **116**, koji je baznom hidrolizom dao 3,4-diol derivat **117**. Tretiranjem dobijenog jedinjenja sa *p*-toluensulfonskom kiselinom u acetonu, nastao je dioksolan **118**. Hidroborovanjem dvostruke veze dobijen je alkilboran, koji je sa vodonik-peroksidom dao smešu dva izomerna C-6 alkohol acetonida **119a** i **119b**, u odnosu 1:4. *Dess-Martin*-ovom oksidacijom 6 β -izomera **119b**, raskidanjem acetonida pod kiselim uslovima, dobijen je diol-keton derivat **121**. Oksiminovanjem jedinjenja **121** sa hidroksilamin-hidrohloridom u etanolu, u prisustvu natrijum-acetata, dobijena je smeša *E/Z* oksima **122a** i **122b**. Oksidacijom *E*-izomera sa dimetilsulfoksidom u prisustvu trifluoroacetanhidrida nastao je (6*E*)-oksimino-4-en steroidni derivat **123** (*Shema 2.34.*).



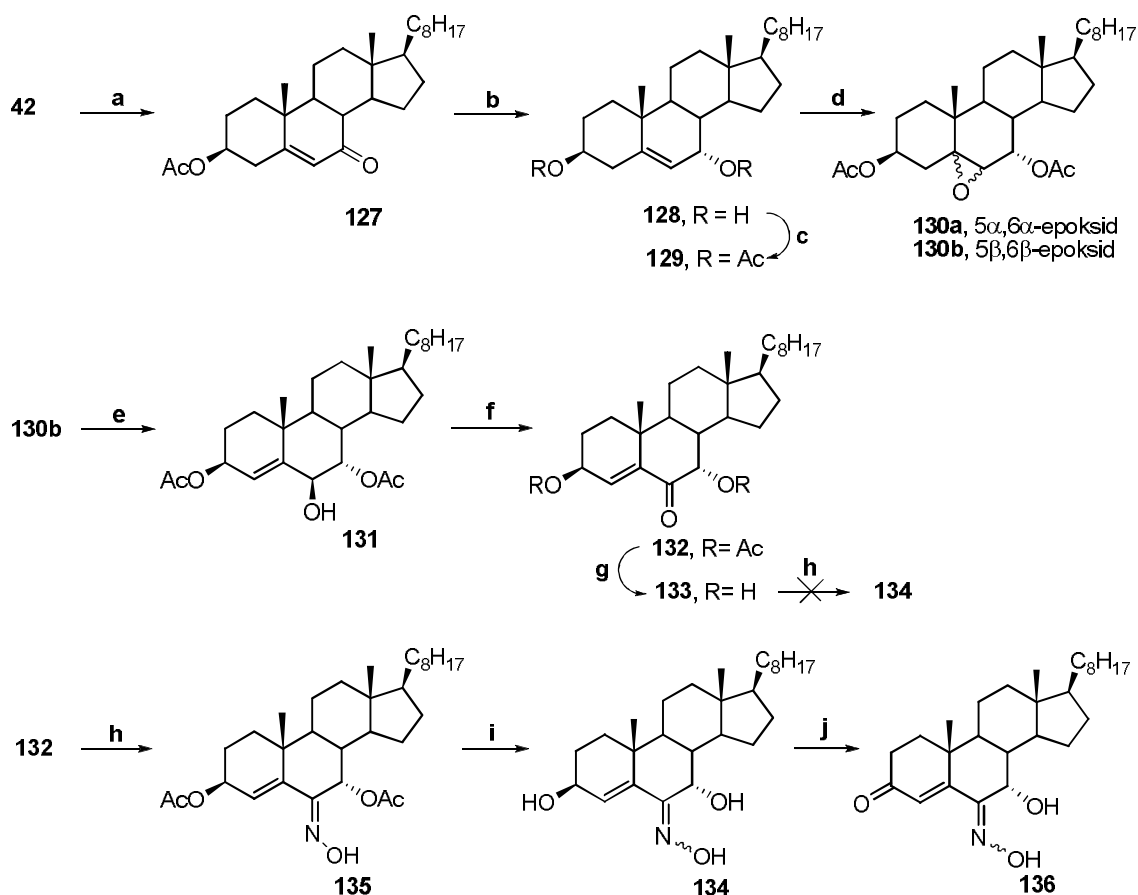
Shema 2.34. Reagensi: a) Br₂, AcOAg, CHCl₃, Py; b) KOH, MeOH; c) *p*-TsOH, aceton; d) 1. BH₃, THF, 2. 35% H₂O₂, NaOH, THF; e) *Dess-Martin*-ov reagens, CH₂Cl₂; f) 1M HCl, THF (1:1); g) NH₂OH·HCl, AcONa, EtOH, H₂O; h) DMSO, TFAA, Et₃N, CH₂Cl₂

Carvalho i saradnici¹⁵⁷ su sintetizovali 3β,5α-dihidroksi-(6*E*)-hidroksiimino derivat holesterola **126**. Holesterol (**42**) je podvrgnut reakciji sa magnezijum-*bis*(monoperoksifalat)-heksahidratom i bizmut(III)-triflatom, pri čemu je dobijen *trans*-diaksijalni proizvod hidroksilacije **124** (*Shema 2.35*).¹⁵⁹ Oksidacijom jedinjenja **124** *N*-bromsukcinimidom dobijen je oksisterol **125**,¹⁶⁰ koji je oksiminovanjem, primenom modifikovanog postupka koji su objavili Zaitsev i saradnici¹⁶¹, dao (6*E*)-hidroksiimino derivat **126**.



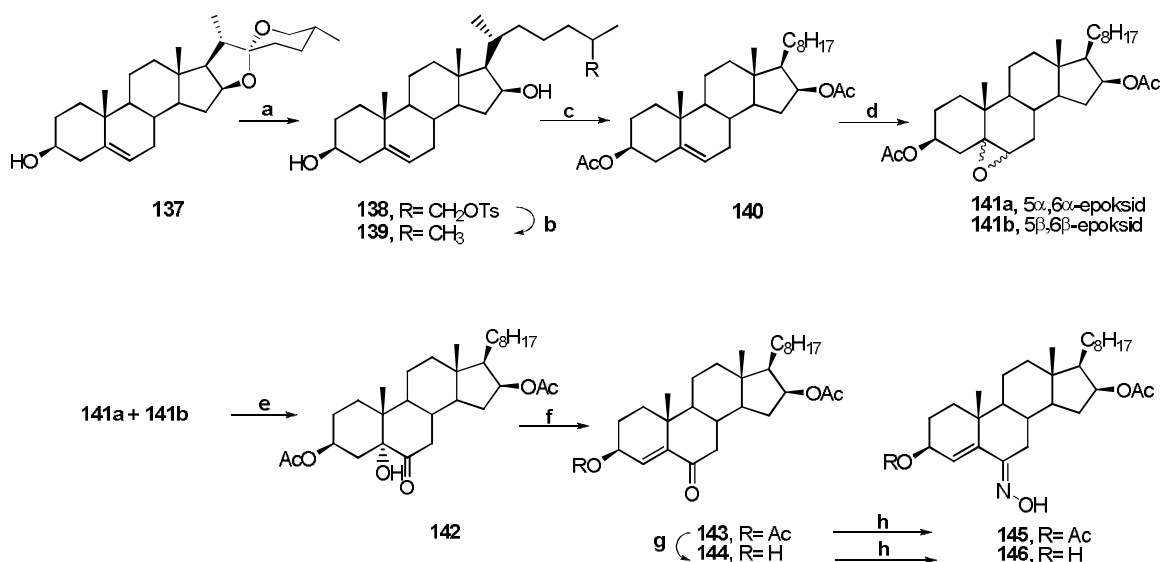
Shema 2.35. Reagensi: a) MMPP, Bi(OTf)₃; b) NBS; c) AcONa, NH₂OH·HCl, Py, MeOH

Poza i saradnici³⁰ su sintetizovali 6-oksmino derivate sa hidroksilnom grupom u položaju C-7 α . Alilnom oksidacijom holesteril-acetata sa *t*-butil-hidroperoksidom u benzenu, u prisustvu CuI kao katalizatora, dobijen je enon **127**, koji je stereoselektivnom redukcijom sa L-selektridom preveden u jedinjenje **128**. Zaštitom hidroksilnih grupa u položajima C-3 i C-7 u jedinjenju **128**, a zatim epoksidacijom derivata **129**, dobijena je smeša α - i β -epoksida **130a** i **130b**. Pokušaji oksidativnog otvaranja epoksidnog prstena u jedinjenju **130**, hrom(VI)-oksidom u vodi ili *N*-bromsukcinimidom u dioksanu ili perhlornom kiselinom u dioksanu, nisu bili uspešni. Regioselektivno otvaranje epoksidnog prstena u jedinjenju **130b**, postignuto je upotrebom vodenog rastvora cerijum(III)-hlorida, pri čemu je dobijen 3 β ,7 α -diacetoksi-6 β -hidroksihoolest-4-en (**131**), koji je zatim oksidovan *Dess-Martin*-ovim reagensom do enon derivata **132**. Deacetilovanjem sa KOH dobijen je dihidroksi derivat **133** koji nije mogao da se oksiminuje. Jedinjenje **135** je dobijeno iz diacetata **132** nakon oksiminovanja sa hidroksilamin-hidrohloridom, a nakon toga je urađena bazna hidroliza. Oksidacijom jedinjenja **134** sa hrom-trioksidom u piridinu, dobijeno je željeno jedinjenje **136** u obliku smeše *E,Z*-oksima (*Shema 2.36.*).



Shema 2.36. Reagensi: **a**) 1. Ac₂O, Py; 2. TBHP, CuI, C₆H₆; **b**) L-selektrid, THF; **c**) Ac₂O, Py; **d**) *m*-CPBA, CHCl₃; **e**) CeCl₃·7H₂O, CH₃CN, THF (2:1); **f**) *Dess-Martin*-ov reagens, CH₂Cl₂; **g**) KOH, MeOH (5:95); **h**) NH₂OH·HCl, Py; **i**) KOH, MeOH (5:95); **j**) CrO₃, Py

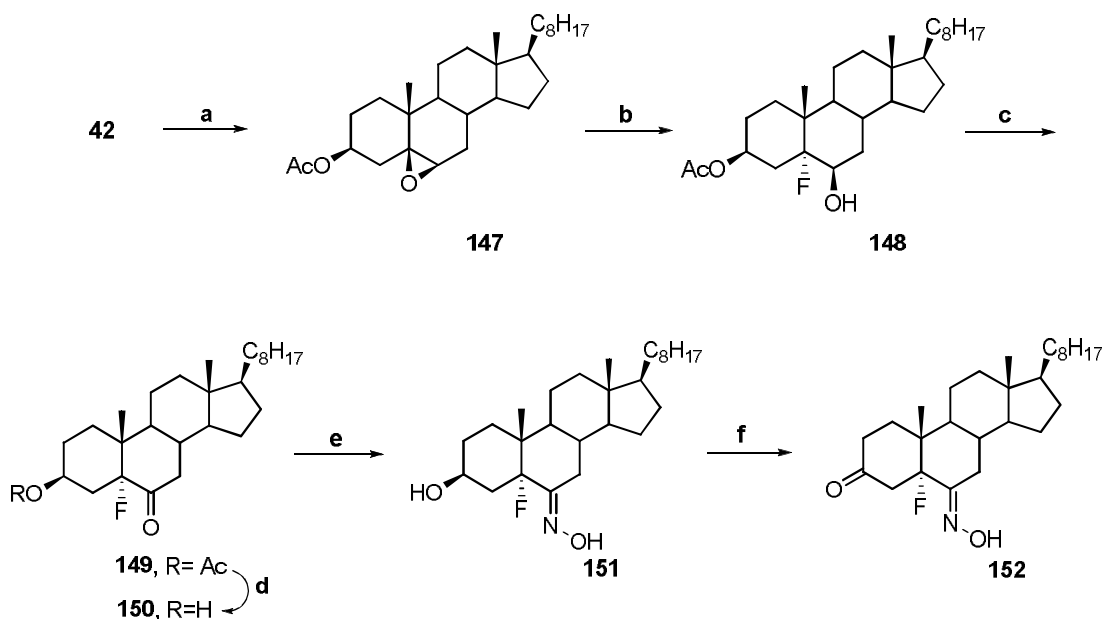
Polazeći od diosgenina (**137**) sintetisani su (6E)-oksimino derivati holesterola sa acetoksi funkcijom u položaju C-16 (*Shema 2.37*).³⁰ Clemmensen-ovom redukcijom jedinjenja **137**, a zatim selektivnim tozilovanjem primarnog alkohola *p*-toluensulfonil-hloridom u piridinu, dobijen je monotozil diol **138**, koji je redukcijom sa litijum-aluminijum-hidridom u etru preveden u diol **139**. Acetilovanjem dobijenog jedinjenja nastao je diacetil derivat **140**, koji je epoksidacijom sa *m*-hlorperbenzoevom kiselinom ili kalijum-permanganat/gvožđe(III)-sulfatom dao smešu α -, β -epoksida **141a** i **141b**. Oksidacijom epoksidne smeše Jones-ovim reagensom u acetanhidridu, dobijen je 5 α -hidroksi-6-on derivat **142**, pri čemu 5 β ,6 β -epoksid **141b** ne podleže reakciji pri ovim reakcionim uslovima. Eliminacijom tercijarne hidroksilne grupe u položaju C-5 sa tionil-hloridom u piridinu, nastalo je jedinjenje **143**. Oksiminovanjem jedinjenja **143** dobijen je 6E-oksimino derivat **145**. S druge strane, hidrolizom C-3 acetatne grupe do hidroksilne u jedinjenju **143**, a zatim oksiminovanjem dobijen je C-3 hidroksi analog **146**.



Shema 2.37. Reagensi: **a**) 1. Zn, HCl, EtOH; 2. TsCl, Py; **b**) LiAlH₄, Et₂O; **c**) Ac₂O, Py; **d**) *m*-CPBA, CHCl₃ ili KMnO₄, Fe(SO₄)₃·nH₂O, CH₂Cl₂; **e**) Jones-ov reagens, Ac₂O; **f**) SOCl₂, Py; **g**) KOH, MeOH (5:95); **h**) NH₂OH·HCl, Py.

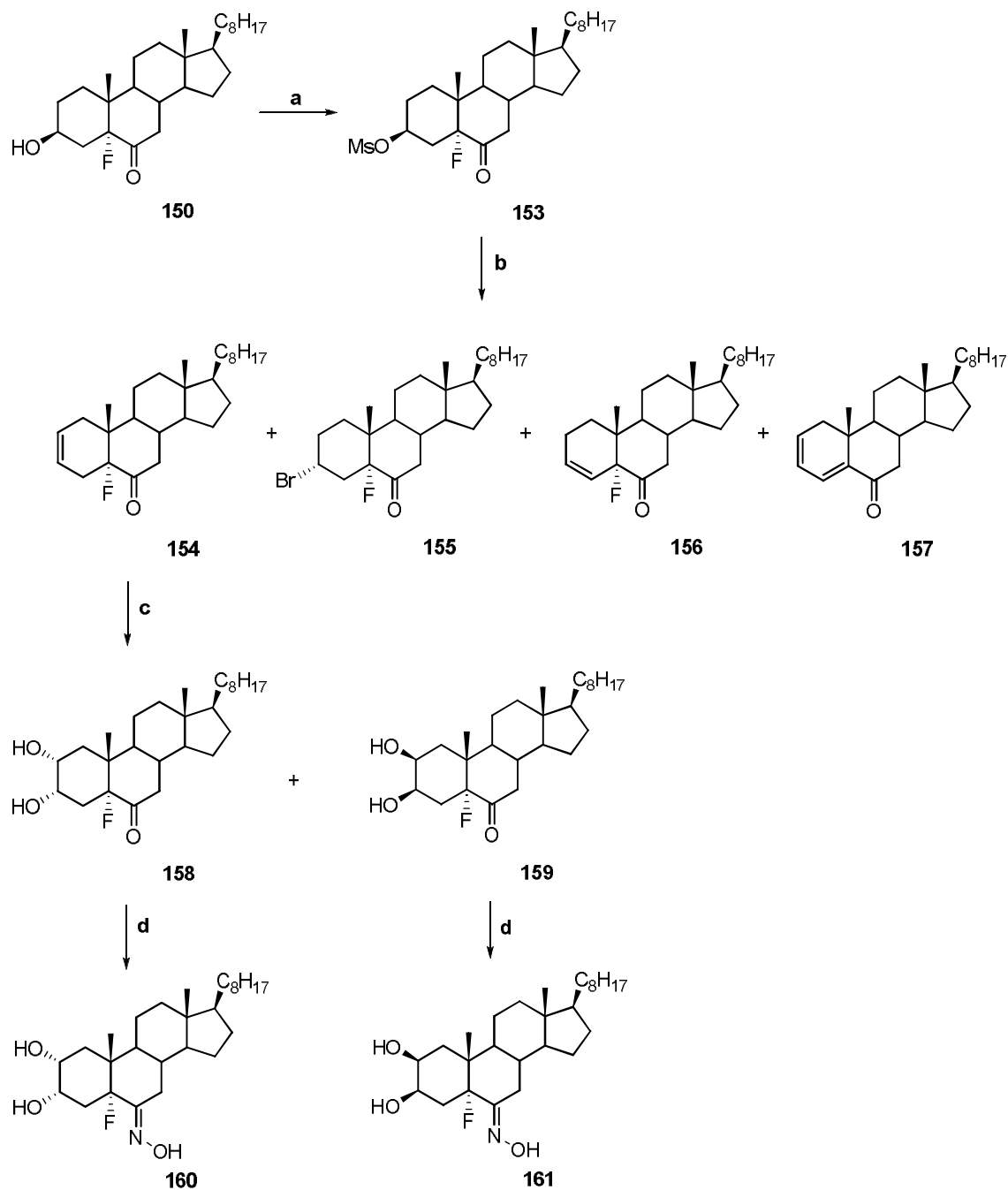
Poza i saradnici³⁰ su sintetizovali 5 α -fluoro-6-oksimino derivate **151** i **152** (*Shema 2.38*.) i ispitali uticaj fluora na biološku aktivnost. Strategija uvođenja fluora je slična onoj koju su opisali Galagovsky i saradnici.¹⁶² Sinteza 6E-oksimino steroida sa fluorom u položaju C-5 započinje acetilovanjem holesterola (**42**), a zatim nakon regio- i stereoselektivne epoksidacije intermedijernog holesteril-acetata, sa KMnO₄/Fe(SO₄)₃·nH₂O u metilen-hloridu, dobijen je 5 β ,6 β -epoksid **147**. Otvaranjem epoksidnog prstena bor-trifluorid-eteratom, dobijen je 5 α -fluoro-6 β -hidroksi derivat **148**. Oksidacijom jedinjenja **148** Dess-Martin-ovim reagensom dobijen je keton **149**, koji je uklanjanjem zaštite na C-3 atomu dao jedinjenje **150**. Oksiminovanjem jedinjenja **150** hidrosilamin-hidrohloridom u piridinu dobijeno je jedinjenje

151 koje je u narednoj fazi oksidovano *Jones*-ovim reagensom ili CrO_3 u piridinu, pri čemu je dobijen 5α -fluoro analog $6E$ -oksimino derivat **152**.



Shema 2.38. Reagensi: **a**) 1. Ac_2O , Py; 2. $\text{KMnO}_4/\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 ; **b**) BF_3 , Et_2O ; **c**) *Dess-Martin*-ov reagens, CH_2Cl_2 ; **d**) K_2CO_3 , MeOH; **e**) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, Py; **f**) CrO_3 , Py ili *Jones*-ov reagens

5α -Fluoro-6-okso derivat **150** poslužio je za dobijanje 2,3-dihidroksi-6-oksimino derivata **160** i **161**.³⁰ Prva faza sinteze sastojala se u prevođenju C-3 hidroksilne grupe u meziloksi, pri čemu je dobijen mezilat **153** (*Shema 3.39.*) koji je sa litijum-bromidom u suvom DMF dao Δ^2 derivat **154**, kao glavni proizvod i jedinjenja **155-157**, kao sporedne proizvode. Jedinjenje **154** je zatim podvrgnuto reakciji sa osmijum-tetraoksidom u prisustvu *N*-metilmorfolin *N*-oksida, pri čemu su nastali $2\alpha,3\alpha$ - i $2\beta,3\beta$ -dihidroksi derivati **158** i **159**. Oksiminovanjem ovih jedinjenja standardnom procedurom dobijeni su ($6E$)-oksimi **160** i **161**.



Shema 2.39. Reagensi: **a**) MsCl, Py; **b**) LiBr, DMF; **c**) OsO₄, NMO, THF; **d**) NH₂OH·HCl, Py

Poza i saradnici³⁰ su testirali dobijene 6-oksmino derivate holesterola (**76**, **101**, **110**, **115**, **122a**, **122b**, **123**, **134**, **136**, **145** i **146**) *in vitro* na tumorske ćelije A-549 (adenokarcinom pluća), HCT-116 (kolorektalni karcinom), PSN1 (adenokarcinom pankreasa) i T98G (glioblastoma multiforme). Na osnovu dobijenih rezultata zaključili su da se povećanjem stepena oksidacije u prstenu A povećava citotoksična aktivnost.

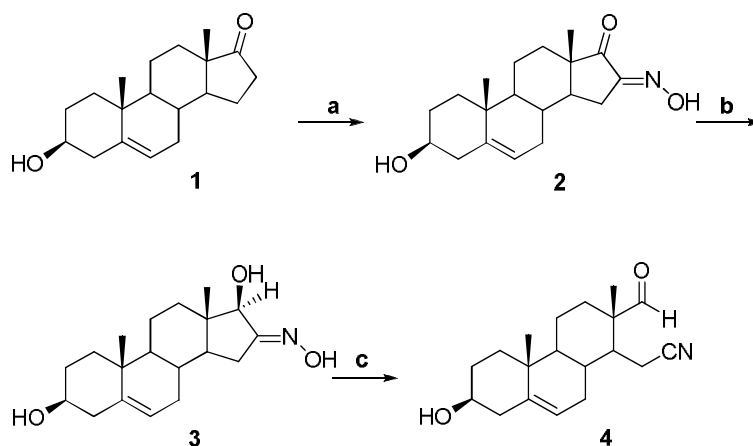
3. NAŠI RADovi

Imajući u vidu strukturne elemente koje poseduju Anastrozol i Letrozol (dve nitrilne grupe), kao i Formestan (4-hidroksi-4-en-3-on sistem) i Eksemestan (6-metilen-4-en-3-on sistem), u ovom radu su sintetizovana nova steroidna jedinjenja koja u svojoj strukturi poseduju funkcionalne grupe prisutne u pomenutim lekovima. U skladu sa tim sintetizovani su novi steroidni 16,17-seko-16,17a-dinitrili polazeći od dehidroepiandrosterona (**1**), prirodnog androgena, i estrona (**34**), prirodnog estrogena. U androstanskoj seriji, kod dobijenog 16,17-seko-16,17a-dinitrila **12** izvršene su modifikacije u A i/ili B prstenu, pri čemu novosintetizovana jedinjenja imaju 4-en-3-on, 1,4-dien-3-on ili 1,4,6-trien-3-on sistem, kao i supstituente u položajima C-4, odnosno C-6. Odabrana novosintetizovana jedinjenja su podvrgnuta ispitivanju *in vitro* antiproliferativne aktivnosti prema odabranim ćelijskim linijama humanih tumora.

3.1. SINTEZE 16,17-SEKO-16,17a-DINITRILA ANDROSTANSKE SERIJE

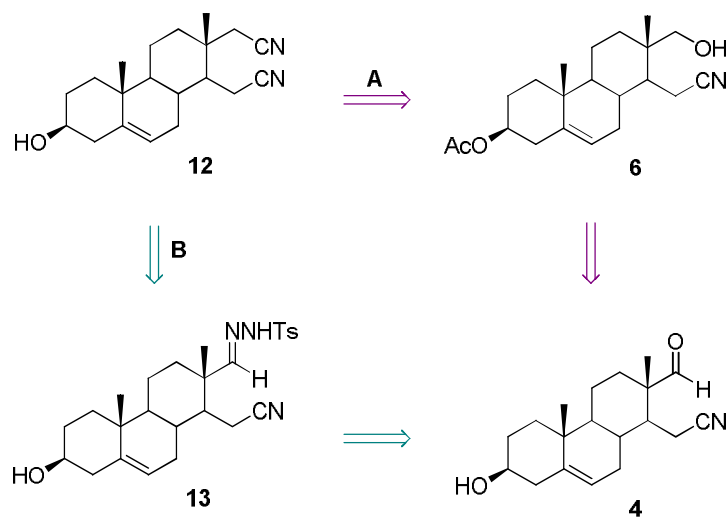
U planiranoj sintezi 3 β -hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitrila (**12**) kao polazno jedinjenje poslužio je 3 β -hidroksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**4**) koji je dobijen iz dehidroepiandrosterona (**1**) prema postupku opisanom u ranijem radu (*Shema 3.1.*)^{163,164}.

Višefazna transformacija komercijalno dostupnog dehidroepiandrosterona (**1**) u 16,17-seko derivat **4** započeta je reakcijom oksiminovanja pomoću *n*-amil-nitrita u baznoj sredini, na sobnoj temperaturi, u toku 20 sati, pri čemu je dobijen 3 β -hidroksiandrost-5-en-16,17-dion 16-oksim (**2**) u prinosu od 92%. Stereospecifičnom redukcijom jedinjenja **2** sa natrijum-borhidridom u etanolu, na sobnoj temperaturi, u toku od 10 minuta, dobijen je isključivo 17 β -alkohol, odnosno 3 β ,17 β -dihidroksiandrost-5-en-16-on oksim (**3**), u prinosu od 99%. U narednoj fazi izvršena je *Beckmann*-ova fragmentacija jedinjenja **3** sa *p*-toluensulfonil-hloridom, u apsolutnom piridinu. Reakcija je izvedena na sobnoj temperaturi, u toku 25 minuta, pri čemu je dobijen 3 β -hidroksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**4**), u prinosu od 70%.



Shema 3.1. Reakcioni uslovi: a) *n*-AmONO, *t*-BuOK, *t*-BuOH, st, 20 h; b) NaBH₄, EtOH, st, 10 min; c) *p*-TsCl, Py, st, 25 min

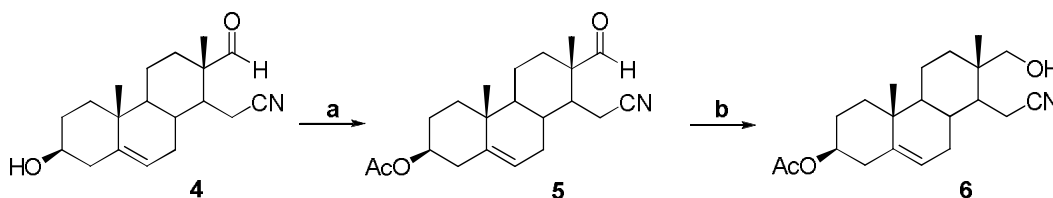
Retrosintetska analiza ciljnog 3 β -hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitrila (**12**) je predstavljena na Shemi 3.2., u dva pravca. Retrosintetskom analizom jedinjenja **12**, putem **A**, da bi se uvela cijano funkcija u položaj C-17 potrebno je uraditi dvostruki transform, supstituciju i acetilovanje, pri čemu se dolazi do intermedijera **6**, koji se zatim nakon dvostrukog transforma, hidrolize i oksidacije, prevodi u polazno jedinjenje **4**. Prema retrosintetskom putu **B** prekursor za sintezu jedinjenja **12** je hidrazon **13** koji se dobija iz jedinjenja **4**.



Shema 3.2. Retrosintetska analiza jedinjenja **12** do sekocijano-aldehida **4**.

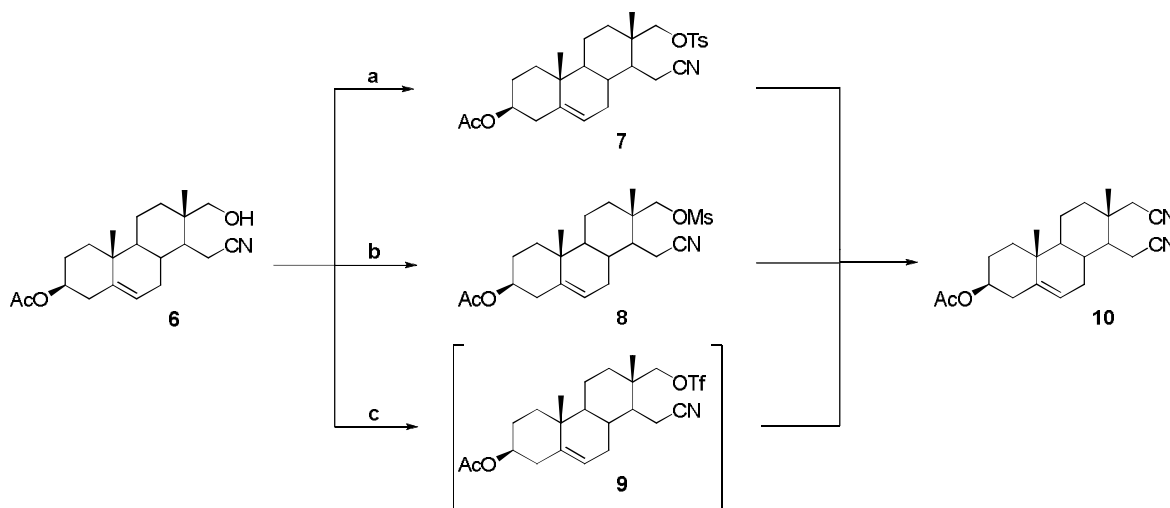
Prvi pravac sinteze jedinjenja **12** (prema retrosintetskom putu **A**) podrazumeva najpre dobijanje jedinjenja **6** iz jedinjenja **4**, u dve sintetske faze (Shema 3.3.).¹⁶⁵ U cilju zaštite hidroksilne grupe u položaju C-3, jedinjenje **4** je podvrgnuto acetilovanju sa acetanhidridom u apsolutnom piridinu, na sobnoj temperaturi, u toku 20 sati pri čemu je dobijen 3 β -acetoksi-

17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**5**) u prinosu od 95%. Za redukciju aldehidne funkcije u položaju C-17 do primarne hidroksilne grupe upotrebljen je natrijum-borhidrid u etanolu. Nakon mešanja reakcione smeše na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta dobijen je 3 β -acetoksi-17-hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**6**) u prinosu od 95%.



Shema 3.3. Reakcioni uslovi: **a)** Ac₂O, Py, st, 20 h; **b)** NaBH₄, EtOH, st, 10 min

U cilju uvođenja cijano funkcije u položaj C-17 i dobijanja 3 β -acetoksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitrila (**10**), hidroksilna grupa jedinjenja **6** je najpre morala da se prevede u bolju odlazeću grupu. Radi pronalaženja što boljih reakcionih uslova i dobijanja što većeg prinosa jedinjenja **10**, jedinjenje **6** je podvrgnuto različitim uslovima supstitucije, pri čemu su sintetizovani toziloksi derivat **7**¹⁶⁵, meziloksi derivat **8**¹⁶⁶ i trifluormetansulfoniloksi derivat **9** (Shema 3.4.).



Shema 3.4. Reakcioni uslovi: **a)** *p*-TsCl, Py, st, 24 h; **b)** MsCl, Py, 4°C, 22 h; **c)** (TfO)₂O, Py, CH₂Cl₂, st, 4h

Tozilovanje jedinjenja **6** je postignuto *p*-toluensulfonil-hloridom u piridinu, na sobnoj temperaturi, u toku 24 sata, pri čemu je dobijen 3 β -acetoksi-17-*p*-toluensulfoniloksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**7**) u prinosu od 89%. U drugom postupku, jedinjenje **6** je podvrgnuto reakciji mezilovanja sa metansulfonil-hloridom u apsolutnom piridinu na 4°C u

toku 22 sata, pri čemu je dobijen 3 β -acetoksi-17-metansulfoniloksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**8**) u prinosu od 86%. Kada je jedinjenja **6** podvrgnuto reakciji sa anhidridom trifluormetansulfonske kiseline u smeši piridina i metilen-hlorida na sobnoj temperaturi, nakon 4 sata dobijen je 3 β -acetoksi-17-trifluormetansulfoniloksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**9**), koji je odmah nakon obrade reakcione smeše korišćen za sledeću reakciju.

U cilju dobijanja 3 β -acetoksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitrila (**10**), jedinjenja **7**, **8** i **9** su podvrgnuta reakciji supstitucije, pri čemu su reakcioni uslovi i prinosi reakcija prikazani u *Tabeli 3.1*. Sve reakcije su izvedene u atmosferi argona, pri molskom odnosu 1 : 1,54-1,85 polaznog jedinjenja i odgovarajućeg cijanida.

Tabela 3.1. Reakcioni uslovi i prinosi reakcija dobijanja jedinjenja **10**

Polazno jedinjenje	Reakcioni uslovi	Prinos (%)
Jedinjenje 7	KCN, DMSO, 150-155°C, 75 min	84
Jedinjenje 7	KCN, DMSO, refluks, 2,5 h	73
Jedinjenje 8	NaCN, DMSO, refluks, 7,5 h	63
Jedinjenje 8	NaCN, DMSO, refluks, 10 h	2
Jedinjenje 8	NaCN, DMF, refluks, 9 h	Nije došlo do reakcije
Jedinjenje 6	1. (TfO) ₂ O, Py, CH ₂ Cl ₂ , st, 4h 2. KCN, DMSO, st, 18,5 h	30

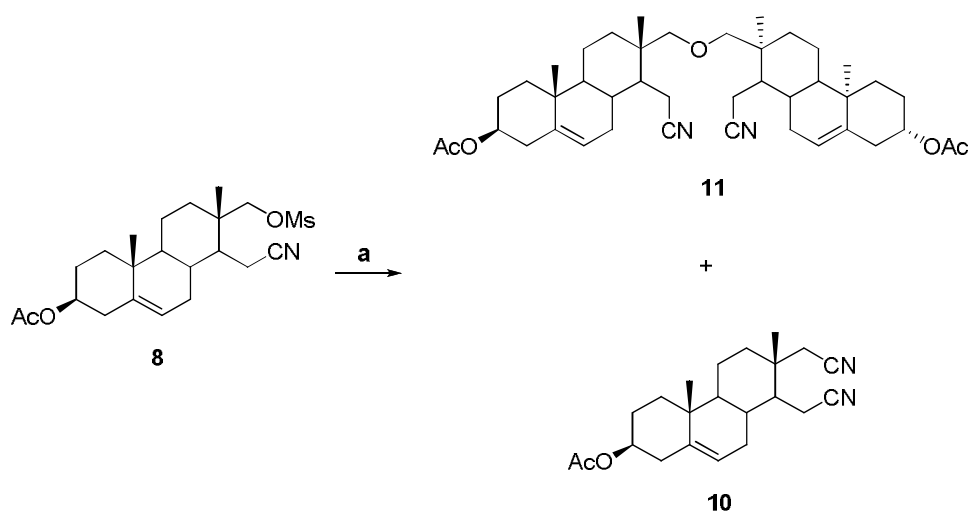
Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da povećanje temperature i/ili produžetak reakcionog vremena pri supstituciji sa cijano grupom u jedinjenjima **7** i **8** dovodi do opadanja prinosa reakcije. Takođe, supstitucija toziloksi grupe cijanidnim anjonom iz KCN se pokazala efikasnijom od supstitucije meziloksi grupe sa NaCN. Dimetilsulfoksid kao rastvarač se pokazao efikasnijim od dimetilformamida. Kao najpovoljniji postupak dobijanja jedinjenja **10** pokazao se prvi postupak, u kojem je supstitucija u jedinjenju **7** izvedena sa kalijum-cijanidom u dimetilsulfoksidu, na 150-155°C u toku 75 minuta, pri čemu je prinos jedinjenja **10** iznosio 84%. Prinos jedinjenja **10** iz jedinjenja **6** iznosio je 75% (**6** → **7**, 89%; **7** → **10**, 84%).

Struktura novosintetizovanog jedinjenja **10** utvrđena je na osnovu detaljne analize spektroskopskih podataka*, dok je njegova molekulska formula potvrđena elementalnom mikroanalizom. Prisustvo nitrilnih grupa u jedinjenju **10** je utvrđeno na osnovu IR spektra koji sadrži traku na 2237 cm⁻¹, kao i ¹³C NMR spektra, gde se javljaju signali na 117,10 ppm i 118,29 ppm, koji potiču od ugljenikovih atoma dve cijano grupe. U ¹H NMR spektru

* Slike IR, ¹H i ¹³C NMR spektara svih novosintetizovanih jedinjenja date su u Prilogu

vodonikovi atomi C-17 metilenske grupe daju signal u obliku singleta na 2,38 ppm. Karakteristični su i signali za vodonikove atome H-3 [δ 4,61 (*m*, 1H)], H-6 [δ 5,39 (*m*, 1H)], kao i H-15a [δ 2,57 (*dd*, 1H, $J_{gem} = 17,7$ Hz, $J_{15a,14} = 5,5$ Hz)]. Struktura jedinjenja je dodatno potvrđena prisustvom pika na 295 masenih jedinica u masenom spektru, koji potiče od $M^+ + 1$ - AcOH fragmenta.

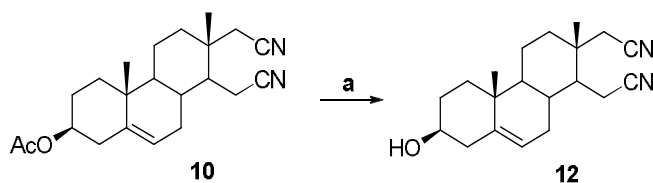
Iz *Tabele 3.1.* se vidi da je reakcijom supstitucije mezil grupe u jedinjenju **8** sa natrijum-cijanidom u dimetilsulfoksidu na tački ključanja, u trajanju od 10 sati u atmosferi argona, jedinjenje **10** dobijeno u prinosu od samo 2%. Pri ovim reakcionim uslovima nastaje kompleksna smeša, a glavni proizvod reakcije je di-(3 β -acetoksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril-17-il)-etar (**11**), koji je dobijen u prinosu od 27% (*Shema 3.5.*).



Shema 3.5. Reakcioni uslovi: **a**) NaCN, DMSO, refluks, 10 h

Struktura novosintetizovanog jedinjenja **11** utvrđena je na osnovu detaljne analize spektroskopskih podataka. U IR spektru može se uočiti prisustvo trake na 2242 cm^{-1} , koja ukazuje da je u jedinjenju prisutna nitrilna funkcija, dok traka na 1252 cm^{-1} potiče od C-O-C deformacionih vibracija. U ^1H NMR spektru signali na 3,35 i 3,53 ppm potiču od vodonikovih atoma H-17a i H-17a' odnosno H-17b i H-17b', a u ^{13}C NMR spektru, signal na 54,44 ppm potiče od C-17 i C-17' ugljenikovih atoma.

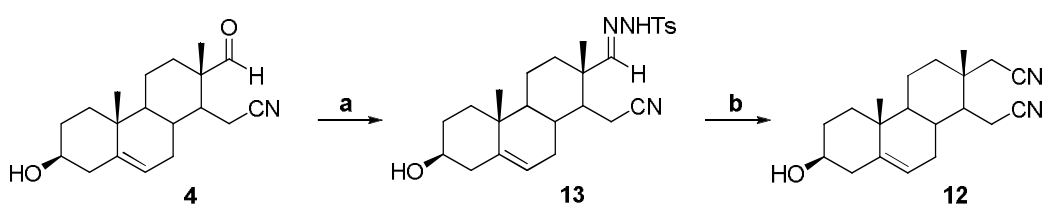
Kako bi se dobila slobodna hidroksilna grupa u položaju C-3, naredna faza sinteze sastojala se u uklanjanju acetoksi zaštite kod jedinjenja **10**. Reakcija je izvedena sa natrijum-etoksidom u etanolu na $50\text{--}55^\circ\text{C}$ u toku jednog sata, pri čemu je dobijen 3 β -hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitril (**12**) u prinosu od 99% (*Shema 3.6.*).



Shema 3.6. Reakcioni uslovi: **a)** EtONa, EtOH, 50-55°C, 1 h

Odsustvo acetoksi funkcije u jedinjenju **12** je utvrđeno poređenjem njegovih spektara sa spektrima polaznog jedinjenja **10**. Naime, u IR spektru jedinjenja **12** izostaje traka na 1734 cm^{-1} (vibracije C=O iz Ac), u ^1H NMR spektru izostaje signal na 2,05 ppm (CH_3 iz Ac), a u ^{13}C NMR spektru izostaju signali na 21,41 ppm (CH_3 iz Ac) i 170,54 ppm (C=O iz Ac). Prisustvo C-3 hidroksilne grupe utvrđeno je u IR spektru na osnovu prisustva široke trake na 3480 cm^{-1} . Takođe, javljaju se promene u hemijskom pomeranju vodonikovog atoma H-3 u protonskom NMR spektru u odnosu na polazno jedinjenje [δ 4,61 ppm kod jedinjenja **10** \rightarrow 3,53 ppm kod jedinjenja **12**] i ugljenikovog atoma C-3 u ^{13}C NMR spektru [δ 73,43 ppm kod jedinjenja **10** \rightarrow 71,35 ppm kod jedinjenja **12**]. Struktura jedinjenja **12** je dodatno potvrđena i masenim spektrom visoke rezolucije gde se javlja pik na 335,20906 masenih jedinica koji potiče od $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Produžetak ugljeničnog niza i uvođenje nitrilne funkcionalne grupe kod aldehida može se postići preko intermedijernog tozil-hidrazona, kako su to opisali Marczak i Wicha.¹⁶⁷ Tako je drugi sintetski put dobijanja jedinjenja **12** polazeći od jedinjenja **4** (prema retrosintetskom putu **B**, Shema 3.2.) obuhvatao dve sintetske faze (Shema 3.7.). Prva faza je podrazumevala prevođenje sekocijano-aldehida **4** u odgovarajući tozil-hidrazon **13**¹⁶⁸, koji je daljom reakcijom sa dietil-aluminijum-cijanidom u aprotičnom rastvaraču dao jedinjenje **12**.



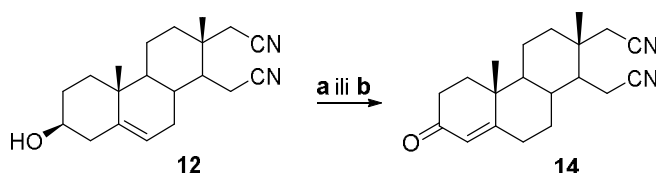
Shema 3.7. Reakcioni uslovi: **a)** TsNHNH₂, EtOH, refluks, 2 h; **b)** Et₂AlCN, THF, refluks, 18 h

Jedinjenje **4** je prevedeno u hidrazon **13** sa *p*-toluensulfonilhidrazidom u apsolutnom etanolu. Reakcija je izvedena na tački ključanja reakcione smeše u toku 2 sata, pri čemu je dobijen 3 β -hidroksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril *p*-toluensulfonilhidrazon (**13**) u prinosu od 86%. U sledećoj fazi sinteze jedinjenje **13** je podvrgnuto reakciji sa dietil-aluminijum-cijanidom u THF na tački ključanja, u toku 18 sati, u atmosferi argona, a jedinjenje **12** je dobijeno u prinosu od 9%.

Analizom dobijenih rezultata i poređenjem sintetskih puteva, za dobijanje jedinjenja **12** iz jedinjenja **4**, može se zaključiti da iako je prvi sintetski put (prema retrosintetskom putu **A**) duži, obuhvata pet sintetskih faza (**4** → **5**, 95% → **6**, 95% → **7**, 89% → **10**, 84% → **12**, 99%), ukupan prinos u odnosu na drugi sintetski put (**4** → **13**, 86% → **12**, 9%) je znatno veći i iznosi 67%.

3.1.1. SINTEZE ANDROSTANSKIH 16,17-SEKO-16,17A-DINITRILA SA 4-EN-3-ON, 1,4-DIEN-3-ON I 1,4,6-TRIEN-3-ON SISTEMOM

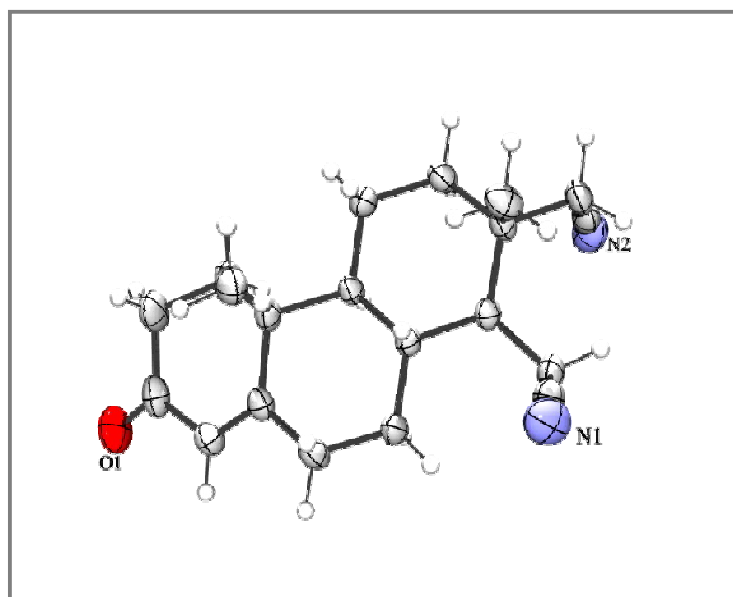
3 β -Hidroksi-5-en derivat **12** je poslužio za dobijanje novih 16,17-seko-16,17a-dinitrila koji u svojoj strukturi sadrže 4-en-3-on, 1,4-dien-3-on i 1,4,6-trien-3-on sistem. Sa ciljem uvođenja 4-en-3-on sistema, izvršena je *Oppenauer*-ova oksidacija jedinjenja **12**. Za oksidaciju su upotrebljeni cikloheksanon i aluminijum-izopropoksid (*Shema 3.8.*). Reakcija je izvedena na dva načina. Prema prvom načinu reakcionoj smeši je dodat toluen i uz zagrevanje je istovremeno vršena destilacija. Nakon 4 sata dobijen je 3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**14**) u prinosu od 87%. Kada je reakcija rađena bez dodatka toluena i bez destilacije, već samo zagrevanjem na tački ključanja, dobijen je enon **14** u prinosu od svega 44%.



Shema 3.8. Reakcioni uslovi: **a**) cikloheksanon, Al(*i*-PrO)₃, toluen, refluks, 4 h, uz destilaciju; **b**) cikloheksanon, Al(*i*-PrO)₃, refluks, 3 h

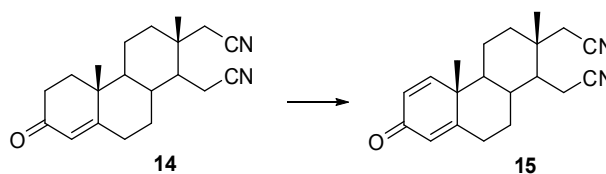
S obzirom da je došlo do oksidacije C-3 hidroksilne grupe do keto grupe i izomerizacije dvostruke veze iz položaja 5,6 u položaj 4,5, u IR spektru jedinjenja **14** je prisutna intenzivna traka na 1661 cm⁻¹ koja potiče od vibracija keto grupe konjugovane sa dvostrukom vezom. Signal na 198,93 ppm u ¹³C NMR spektru potiče od ugljenikovog atoma konjugovane keto grupe. Takođe se u ¹H NMR spektru jedinjenja **14** može uočiti odsustvo signala na 3,53 ppm koji je kod jedinjenja **12** poticao od vodonikovog atoma H-3, dok signal na 5,77 ppm potiče od vinilnog H-4 atoma. U ¹³C NMR spektru prisutni su signali na 124,08 i 168,68 ppm od ugljenikovih atoma C-4, odnosno C-5. U TOF masenom spektru jedinjenja **14** čija je molekulska masa 310,20451 javlja se pik na 311,21204 masenih jedinica koji potiče od [M+H]⁺.

Struktura jedinjenja **14** je dodatno potvrđena rendgeno-strukturnom analizom (Slika 3.1.).



Slika 3.1. Prikaz molekulske strukture jedinjenja **14**

Jedinjenje **14** je poslužilo za dobijanje 1,4-dien-3-on sistema. U tom cilju ono je podvrgnuto reakciji dehidrogenacije (Shema 3.9.), pri čemu su primenjeni različiti reakcioni uslovi, koji su prikazani u Tabeli 3.2.



Shema 3.9. Reakcioni uslovi su prikazani u Tabeli 3.2.

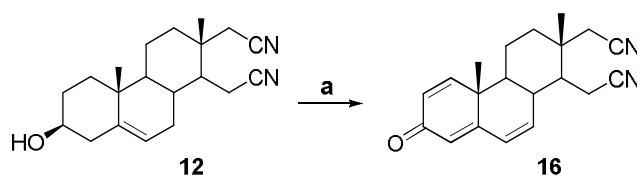
Tabela 3.2. Reakcioni uslovi u reakciji dehidrogenacije jedinjenja **14**

Reakcioni uslovi	Prinos (%)
DDQ, toluen, TFA, BSTFA, refluks, 6 h	45
DDQ, benzen, refluks, 10 h	28
Hloranil, toluen, TFA, BSTFA, refluks, 10 h	Nije došlo do reakcije

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da prvi postupak predstavlja najpovoljniju metodu za uvođenje Δ^1 nezasićene veze u molekul **14**. Prema ovom postupku, dehidrogenacijom jedinjenja **14** sa DDQ u apsolutnom toluenu, u prisustvu TFA i BSTFA, zagrevanjem uz refluks u atmosferi argona, u toku 6 sati došlo je do nastajanja 3-okso-16,17-sekoandrosta-1,4-dien-16,17a-dinitrila (**15**) u prinosu od 45%. Kada je reakcija dehidrogenacije jedinjenja **14** urađena bez prisustva katalizatora, pomoću DDQ u apsolutnom benzenu, reakciono vreme je bilo duže, a jedinjenje **15** je dobijeno u gotovo dva puta manjem prinosu (28%). Ukoliko se umesto DDQ za dehidrogenaciju primeni hloranil, čak ni u prisustvu katalizatora ne dolazi do reakcije.

U IR spektru jedinjenja **15** pored trake na 1623 cm^{-1} koja potiče od ranije prisutne dvostruke veze u položaju Δ^4 može se uočiti i traka na 1604 cm^{-1} koja potiče od vibracija novouvedene dvostruke veze u položaju Δ^1 . U ^1H NMR spektru karakteristični su dublet dubleta na 6,26 ppm koji potiče od vodonikovog atoma H-2 i dublet na 7,03 ppm od vodonikovog atoma H-1, a u ^{13}C NMR spektru signali na 128,10 i 154,10 ppm potiču od ugljenikovih atoma C-2, odnosno C-1. Takođe se u protonskom NMR spektru usled proširenja konjugacije u A-prstenu javlja veće hemijsko pomeranje za vodonikov atom H-4 [δ 5,77 ppm kod jedinjenja **14** \rightarrow 6,11 ppm kod jedinjenja **15**], a u ^{13}C NMR spektru manje hemijsko pomeranje signala za ugljenikove atome C-3 [δ 198,93 ppm kod jedinjenja **14** \rightarrow 185,81 ppm kod jedinjenja **15**] i C-5 [δ 168,68 ppm kod jedinjenja **14** \rightarrow 166,82 ppm kod jedinjenja **15**]. Svi ovi podaci zajedno sa registrovanim pikom na 309,19609 masenih jedinica koji potiče od $[\text{M}+\text{H}]^+$ u masenom spektru visoke rezolucije, nedvosmisleno dokazuju pretpostavljenu strukturu.

1,4,6-trien-3-on sistem kod 16,17-seko-16,17a-dinitrila je uveden u reakciji jedinjenja **12** sa DDQ u dioksanu, na tački ključanja u toku 10 sati. Dobijen je 3-okso-16,17-sekoandrosta-1,4,6-trien-16,17a-dinitril (**16**) u prinosu od 43% (*Shema 3.10*).



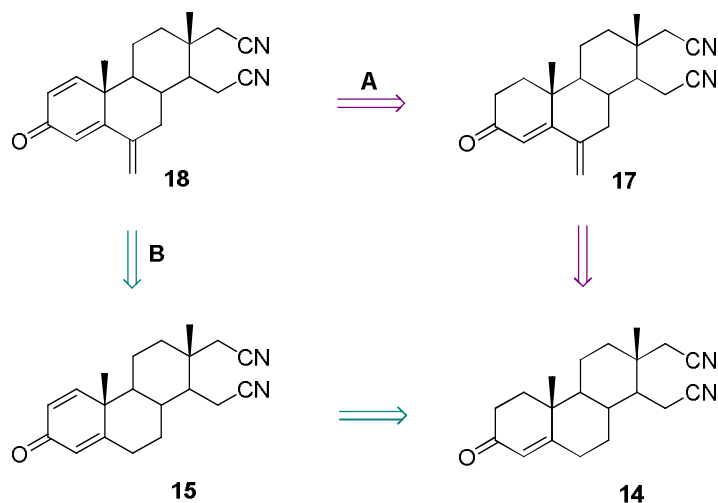
Shema 3.10. Reakcioni uslovi: a) DDQ, dioksan, refluks, 10 h

Prisustvo keto funkcije u položaju C-3 utvrđeno je na osnovu prisustva trake na 1727 cm^{-1} u IR spektru jedinjenja **16**, kao i signala na 185,95 ppm u ^{13}C NMR spektru čije hemijsko pomeranje odgovara karbonilnom ugljeniku. Da su u molekulu **16** prisutne tri dvostruke veze dokazuju signali na 5,31 ppm (s, 1H, H-4), 6,12 ppm (d, 1H, $J = 10,0\text{ Hz}$, H-6), 6,30 ppm (dd, 1H, $J_{1,2} = 10,2\text{ Hz}$, $J_{2,4} = 1,7\text{ Hz}$, H-2), 6,42 ppm (dd, 1H, $J_{6,7} = 10,0\text{ Hz}$, $J_{7,8} = 2,8\text{ Hz}$, H-7) i 7,07 ppm (d, 1H, $J = 10,2\text{ Hz}$, H-1) u ^1H NMR spektru, kao i signali na 124,61 ppm za C-4, 128,68 ppm za C-2, 129,85 ppm za C-6, 133,11 ppm za C-7, 151,68 ppm za C-1 i 160,17 ppm za C-5

ugljenikove atome u ^{13}C NMR spektru. U TOF masenom spektru jedinjenja **16** čija je molekulska masa 306,17321 javlja se pik na 307,18130 masenih jedinica koji potiče od $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.2. SINTEZE ANDROSTANSKIH 16,17-SEKO-16,17a-DINITRILA SA 6-METILEN-4-EN-3-ON ILI 6-METILEN-1,4-DIEN-3-ON SISTEMOM

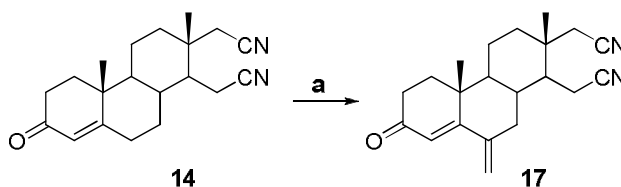
U ovom delu rada su opisane sinteze androstanskih 16,17-seko-16,17a-dinitrila koji u položaju C-6 sadrže metilensku funkciju, kao i 4-en-3-on (**17**), odnosno 1,4-dien-3-on (**18**) sistem. Na *Shemi 3.11.* dat je retrosintetski put dobijanja jedinjenja **18** u dva pravca (**A** i **B**). Retrosintetskom analizom ciljnog molekula može se uočiti da oba pravca vode do jedinjenja **14**, koji je korišćen kao polazno jedinjenje u sintezama.



Shema 3.11. Retrosintetski put dobijanja jedinjenja **18**

Prema retrosintetskom putu **A**, sinteza jedinjenja **18** podrazumeva uvođenje C-6 metilenske grupe u jedinjenje **14**, a zatim dehidrogenaciju u cilju uvođenja Δ^1 dvostruke veze.

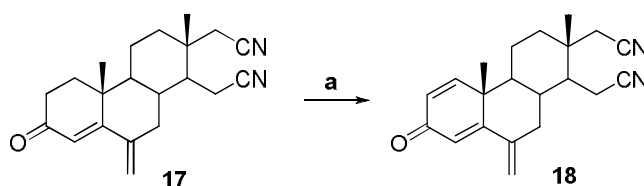
Jedinjenje **14** je podvrgnuto reakciji sa trietilortoformijatom, u prisustvu *p*-toluensulfonske kiseline, u smeši etanol – tetrahidrofuran na temperaturi od 55°C u toku 4 sata, a zatim još narednih 4 sata na 55°C po dodatku formaldehida i *N*-metilanilina, pri čemu je dobijen 6-metilen-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**17**) u prinosu od 56% (*Shema 3.12.*).



Shema 3.12. Reakcioni uslovi: **a)** 1. HC(OEt)₃, THF-EtOH, *p*-TsOH, 55°C, 4 h; 2. MeNHPh, 40% vodeni rastvor CH₂O, 55°C, 4 h

U ¹H NMR spektru jedinjenja **17** javljaju se dva karakteristična singleta, na 5,08 i 5,16 ppm koji potiču od dijastereotopnih vodonikovih atoma iz uvedene metilenske grupe, a u ¹³C NMR spektru signali na 115,85 i 143,85 ppm potiču od sekundarnog metilenskog ugljenikovog atoma i kvaternernog C-6 ugljenikovog atoma. Takođe se može uočiti veće hemijsko pomeranje signala za vodonikov atom H-4 u odnosu na isti atom kod jedinjenja **14** [δ 5,77 ppm kod jedinjenja **14** → 5,94 ppm kod jedinjenja **17**]. U ¹³C NMR spektru uočava se manje hemijsko pomeranje signala za tercijarni C-4 atom [δ 124,08 ppm kod jedinjenja **14** → 121,84 ppm kod jedinjenja **17**] i kvaternerni C-5 atom [δ 168,68 ppm kod jedinjenja **14** → 166,93 ppm kod jedinjenja **17**]. U IR spektru jedinjenja **17** može se uočiti, u odnosu na spektar jedinjenja **14**, pomeranje trake za keto grupu [1661 cm⁻¹ kod jedinjenja **14** → 1667 cm⁻¹ kod jedinjenja **17**] i trake za dvostruku vezu [1624 cm⁻¹ kod jedinjenja **14** → 1601 cm⁻¹ kod jedinjenja **17**], što je posledica produženja konjugacije. Dodatnu potvrdu strukture dao je i pik na 323,21271 masenih jedinica u masenom spektru visoke rezolucije, koji potiče od [M+H]⁺.

Kao što je prethodno napomenuto, cilj ovog rada je i uvođenje Δ¹ dvostruke veze kod novosintetizovanog jedinjenja **17**. Stoga je jedinjenje **17** podvrgnuto reakciji sa DDQ u apsolutnom toluenu u prisustvu TFA i BSTFA (Shema 3.13.). Nakon zagrevanja uz refluks u toku 22 sata, u atmosferi argona, dobijen je 6-metilen-3-okso-16,17-sekoandrosta-1,4-dien-16,17a-dinitril (**18**) u prinosu od 8%.



Shema 3.13. Reakcioni uslovi: **a)** DDQ, toluen, TFA, BSTFA, refluks, 22 h

U ¹H NMR spektru jedinjenja **18** može se uočiti prisustvo dublet dubleta na 6,30 ppm i dubleta na 7,07 ppm koji potiču od vodonikovih atoma H-2, odnosno H-1, respektivno. Takođe, u ¹³C NMR spektru signali na 128,29 i 152,89 ppm potiču od ugljenikovih atoma C-2 odnosno C-1, što nedvosmisleno dokazuje prisustvo dvostruke veze u položaju C1-C2. Da je

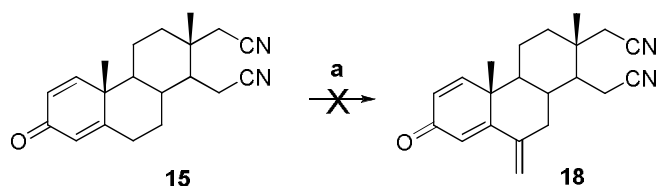
došlo do građenja željenog jedinjenja utvrđeno je i masenim spektrom visoke rezolucije prisustvom pika na 321,19606 masenih jedinica koji potiče od $[M+H]^+$.

Pokušana je i dehidrogenizacija kod jedinjenja **17** sa hloranilom u prisustvu katalitičkih količina TFA i BSTFA. Međutim, pri ovim reakcionim uslovima ni posle dužeg zagrevanja na tački ključanja polazno jedinjenje nije reagovalo.

Na osnovu dobijenih rezultata u reakcijama dehidrogenacije jedinjenja **14** i **17** može se zaključiti da se Δ^1 veza u pomenute molekule može uvesti samo korišćenjem DDQ kao reagensa.

Drugi sintetski put dobijanja jedinjenja **18** (prema retrosintetskom putu **B**) podrazumeva najpre uvođenje Δ^1 dvostruke veze u jedinjenje **14** (*Shema 3.11.*), a zatim metilenske grupe u C-6 položaj, kod jedinjenja **15**.

U tom cilju je 1,4-dien-3-on **15** podvrgnut reakciji u kojoj su reakcioni uslovi bili identični onim kod dobijanja 6-metilen derivata **17**. Naime, jedinjenje **15** je najpre zagrevano na 55°C u toku 4 sata sa trietilortoformijatom, u prisustvu *p*-toluensulfonske kiseline, u smeši etanol-tetrahidrofuran. Nakon toga su dodati formaldehid i *N*-metilanilin i zagrevanje nastavljeno još 4 sata na istoj temperaturi (*Shema 3.14.*). Međutim, pri ovim reakcionim uslovima polazno jedinjenje nije reagovalo.



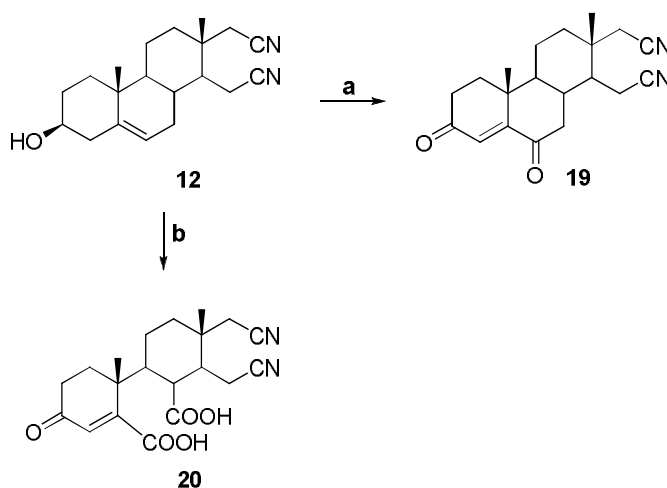
Shema 3.14. Reakcioni uslovi: **a**) 1. HC(OEt)_3 , THF-EtOH, *p*-TsOH, 55°C, 4h; 2. MeNHPh, 40% vodeni rastvor CH_2O , 55°C, 4h

Na osnovu izloženih rezultata može se zaključiti da je prilikom prevođenja 4-en-3-ona **14** u 6-metilen-1,4-dien-3-on **18** neophodno prvo uvesti metilensku grupu u položaj C-6, a zatim Δ^1 dvostruku vezu.

3.1.3. SINTEZE ANDROSTANSKIH 16,17-SEKO-16,17a-DINITRILA SA 4-EN-3,6-DION ILI 1,4-DIEN-3,6-DION SISTEMOM

Kako je u uvodnom delu istaknuto da su steroidna jedinjenja sa 4-en-3,6-dionskim sistemom poznati prirodni proizvodi,^{14,15} kao i važni intermedijeri u daljim transformacijama steroidnog jezgra¹⁶ i značajni molekuli u proučavanju inhibicije enzima aromataze¹⁷⁻²⁰, cilj ovog dela rada je bila sinteza novog androstanskog 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa 4-en-3,6-dionskim sistemom, kao i njegovog Δ^1 analoga.

U skladu sa postavljenim ciljem izvršena je modifikovana *Jones*-ova oksidacija 5-en-3 β -ola **12**. Reakcija je izvedena na 0°C u toku 25 minuta (*Shema 3.15.*), pri čemu je željeni proizvod **19** dobijen u prinosu od 65%.



Shema 3.15. Reakcioni uslovi: **a)** CrO₃, H₂SO₄, H₂O, aceton, 0°C, 25 min; **b)** CrO₃, H₂SO₄, H₂O, aceton, st, 75 min

Ukoliko je oksidacija jedinjenja **12** sa *Jones*-ovim reagensom rađena u koncentrovanijem acetonskom rastvoru, na sobnoj temperaturi i u toku 75 minuta došlo je do nastajanja B-seko dikiselina **20** (*Shema 3.15.*).

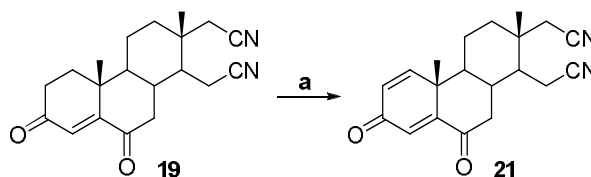
Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da su za dobijanje 4-en-3,6-dionskog sistema oksidacijom 5-en-3 β -ola *Jones*-ovim reagensom neophodni niska temperatura, kratko reakciono vreme i postepeno dodavanje reagensa u razblaženi acetonski rastvor polaznog jedinjenja. U suprotnom, dolazi do dalje oksidacije dobijenog jedinjenja **19** i nastajanja 6,7-seko dikiseline **20**.

Potvrda transformacije jedinjenja **12** do jedinjenja **19** dobijena je odsustvom široke trake na 3480 cm⁻¹ u IR spektru jedinjenja **19** koja je kod jedinjenja **12** poticala od vibracija C-3 hidroksilne grupe, kao i većim hemijskim pomeranjem signala za C-3 atom u ¹³C NMR

spektru [δ 71,35 ppm kod jedinjenja **12** \rightarrow 198,72 ppm kod jedinjenja **19**]. Takođe, u IR spektru je registrovana intenzivna traka na 1686 cm^{-1} koja potiče od keto grupa. U protonskom NMR spektru se uočava singlet na 6,30 ppm koji potiče od vodonikovog atoma H-4, dok se u ^{13}C NMR spektru javljaju signali na 199,20 ppm za C-6 atom, na 126,35 ppm za C-4 atom, a za C-5 atom na 158,02 ppm. U masenom spektru visoke rezolucije jedinjenja **19** čija je molekulska masa 324,18378 javlja se pik na 325,18996 masenih jedinica koji potiče od $[\text{M}+\text{H}]^+$.

I struktura novosintetizovanog jedinjenja **20** je utvrđena na osnovu spektroskopskih podataka. U IR spektru se uočava široka traka u intervalu od $3500\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$ koja potiče od vibracija hidrosilnih grupa iz karboksilnih funkcija, kao i intenzivna traka na 1697 cm^{-1} koja potiče od vibracija karbonilnih funkcija. U ^{13}C NMR spektru signali na 168,11 i 176,31 ppm potiču od ugljenikovih atoma C-6 i C-7. Signal na 130,66 ppm potiče od C-4 ugljenikovog atoma, a na 157,58 ppm od C-5 ugljenikovog atoma.

U daljem radu je u jedinjenje **19** uvedena Δ^1 dvostruka veza. Dehidrogenacija jedinjenja **19** izvršena je sa DDQ u apsolutnom toluenu, u prisustvu TFA i BSTFA (*Shema 3.16.*). Reakcija se odigravala na tački ključanja u trajanju od 42 sata, pri čemu je dobijen 3,6-diokso-16,17-sekoandrosta-1,4-dien-16,17a-dinitril (**21**) u prinosu od 11%.

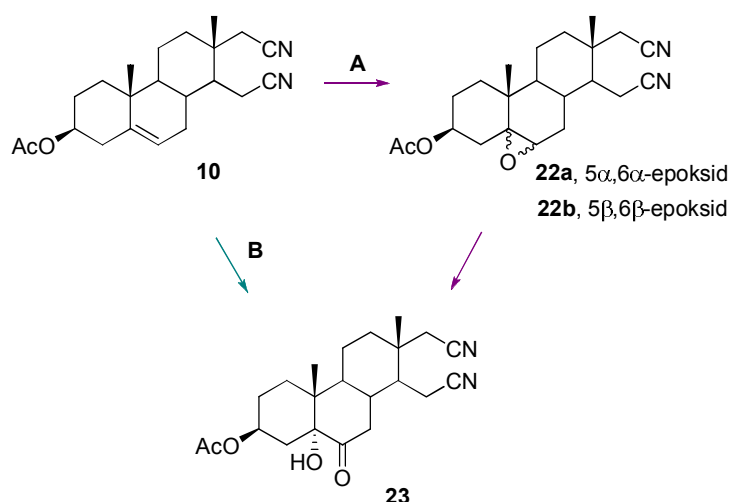


Shema 3.16. Reakcioni uslovi: a) DDQ, toluen, TFA, BSTFA, refluks, 42 h

U protonskom NMR spektru jedinjenja **21** javljaju se signali na 6,23 i 7,31 ppm koji potiču od vodonikovih atoma H-2 i H-1, a u ^{13}C NMR spektru signali na 128,64 i 154,16 ppm potiču od ugljenikovih atoma C-2 i C-1, što nedvosmisleno dokazuje prisustvo dvostruke veze u položaju Δ^1 .

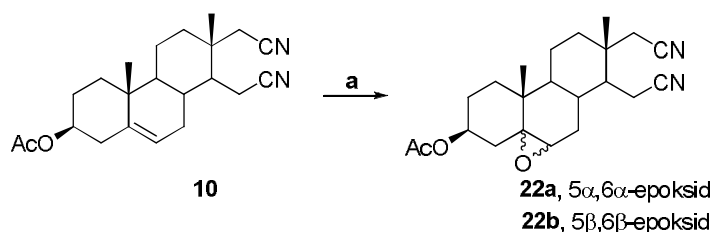
3.1.4. SINTEZE ANDROSTANSKIH 16,17-SEKO-16,17a-DINITRILA SA 4-EN-3,6-DION 6-OKSIMINO ILI 4-EN-3-ON OKSIMINO SISTEMOM

Kako je u uvodnom delu navedeno, jedan od ciljeva ovog rada je sinteza 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa 4-en-3,6-dion 6-oksimumo funkcijom. Kao pogodan intermedijer za pomenutu planiranu sintezu poslužio je 3β -acetoksi- 5α -hidroksi-6-okso-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitril (**23**) koji je dobijen iz jedinjenja **10**, na dva načina (*Shema 3.17.*).



Shema 3.17. Putevi sinteze jedinjenja **23** iz jedinjenja **10**

Prvi način dobijanja jedinjenja **23** (put **A**) se sastojao iz dve sintetske faze. U prvoj fazi je urađena oksidacija dvostruke veze u jedinjenju **10** sa *m*-hlorperbenzoevom kiselinom, u baznoj sredini, na 0°C, u toku jednog sata (Shema 3.18.). Pri ovim reakcionim uslovima dobijen je 3 β -acetoksi-5,6-epoksi-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitril u obliku smeše 5 α ,6 α - (**22a**) i 5 β ,6 β -epoksida (**22b**), u prinosu od 70%.



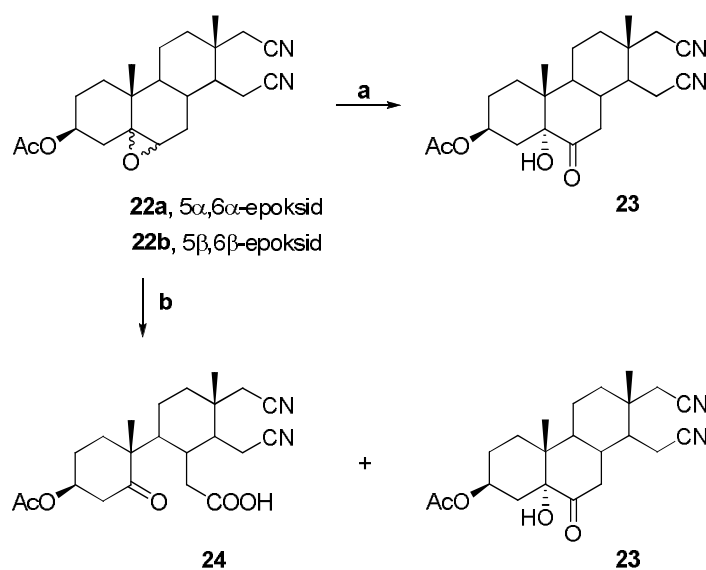
Shema 3.18. Reakcioni uslovi: a) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, NaHCO₃, 0°C, 1 h

U IR spektru smeše epoksida **22a** i **22b** javlja se traka na 3018 cm⁻¹ koja potiče od valencionih vibracija C-H veze, a intenzivna traka na 1248 cm⁻¹ od C-O-C vibracija epoksidnog prstena. U ¹H NMR spektru uočavaju se signali na 2,95 i 3,15 ppm koji potiču od H-6 vodonikovog atoma. U ¹³C NMR spektru signali na 58,11 i 62,65 ppm potiču od tercijarnog C-6 atoma, a signali na 61,90 i 64,53 ppm od kvaternernog C-5 atoma. Ovi signali imaju znatno manje hemijsko pomeranje od signala za iste atome u ¹³C NMR spektru polaznog jedinjenja **10** (120,97 ppm za C-6 i 139,39 ppm za C-5).

U drugoj fazi sinteze smeša jedinjenja **22a** i **22b** je podvrgnuta oksidativnom otvaranju oksiranskog prstena. Reakcija je izvedena na dva načina.

Prvi način je podrazumevao dokapavanje 3,3 M aq CrO₃ u acetonski rastvor smeše jedinjenja **22a** i **22b** na 0°C, do postojane narandžaste boje. Reakciona smeša je zatim mešana na sobnoj temperaturi u toku 24 sata, nakon čega je postupak ponovljen. Dobijen je 3β-acetoksi-5α-hidroksi-6-okso-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitril (**23**) u prinosu od 87% (Shema 3.19.).

Kada je u acetonski rastvor epoksida **22a** i **22b** dodata odjednom celokupna količina CrO₃, pored građenja 5α-ol-6-ona **23** (26%) došlo je i do cepanja C5-C6 veze i nastajanja 5,6-seko-5-keto-6-kiseline **24** u prinosu od 32% (Shema 3.19.).



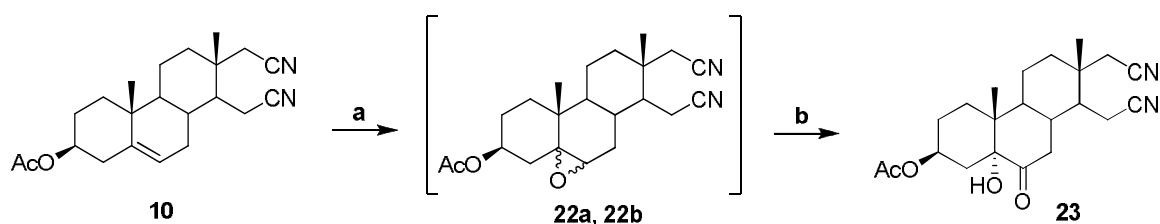
Shema 3.19. Reakcioni uslovi: **a**) CrO₃, H₂O, aceton, 0°C, 30 min, st, 48 h; **b**) CrO₃, H₂O, aceton, 0°C, 30 min, st, 24 h, CrO₃:**22**=27:1

Prisustvo hidroksilne grupe u jedinjenju **23** potvrđeno je širokom trakom u IR spektru na 3446 cm⁻¹, kao i prisustvom singleta na 4,91 ppm u ¹H NMR spektru koji se gubi nakon dodatka D₂O. U ¹³C NMR spektru jedinjenja **23** uočava se signal na 79,69 ppm koji potiče od ugljenikovog atoma C-5. Iz protonskog i ¹³C NMR spektra jedinjenja **23** se može zaključiti da je pri oksidativnom otvaranju epoksidnog prstena smeše jedinjenja **22a** i **22b** dobijen samo jedan stereoisomer za koji se, na osnovu literaturnih podataka¹³⁸, pretpostavlja da ima α -orijentisanu hidroksilnu grupu na C-5 atomu. Traka na 1715 cm⁻¹ u IR spektru koja potiče od valencionih vibracija C-6 keto grupe i karbonilne grupe iz acetoksi funkcije, zajedno sa signalom na 210,34 ppm u ¹³C NMR spektru nedvosmisleno dokazuju prisustvo keto grupe u položaju C-6. Registrovani pikovi na 404,25380 i 409,20897 masenih jedinica u masenom spektru visoke rezolucije koji potiču od [M+NH₄]⁺, odnosno [M+Na]⁺ dodatno potvrđuju strukturu jedinjenja **23**.

U IR spektru jedinjenja **24** uočava se široka traka u intervalu od 3700-2500 cm⁻¹, koja potiče od vibracija hidroksilne grupe, a traka na 1790 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija C=O

grupe iz karboksilne funkcije. U ^{13}C NMR spektru javljaju se signali na 167,67 ppm od karboksilnog ugljenikovog atoma, odnosno na 216,45 ppm od C-5 karbonilnog ugljenikovog atoma.

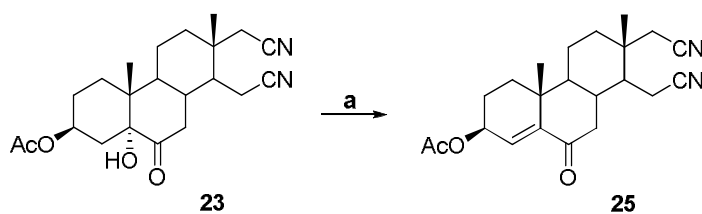
Jedinjenje **23** je dobijeno i bržim i jednostavnijim „one-pot“ postupkom (Put B, *Shema 3.17.*). Naime, u okviru ovog postupka urađena je reakcija epoksidacije jedinjenja **10** sa *m*-hlorperbenzoevom kiselinom, u metilen-hloridu, na sobnoj temperaturi, u toku 90 minuta (*Shema 3.20.*), nakon čega je dobijena smeša 5 α ,6 α - (**22a**) i 5 β ,6 β -epoksida (**22b**). U reakcionu smešu je zatim dodat aceton i vodeni rastvor hrom(VI)-oksida na 0°C. Nakon 70 minuta mešanja na sobnoj temperaturi dobijen je 3 β -acetoksi-5 α -hidroksi-6-okso-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitril (**23**) u visokom prinosu od 97%.



Shema 3.20. Reakcioni uslovi: **a)** *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , st, 1,5 h; **b)** CrO_3 , H_2O , aceton, st, 70 min

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je postupak **B** (*Shema 3.17.*) pogodniji za sintezu jedinjenja **23**. Naime, prema postupku **A** jedinjenje **23** je dobijeno u prinosu od 61% u odnosu na jedinjenje **10**, dok je prema „one-pot“ postupku **B** dobijeno u prinosu od 97%. Takođe je i reakciono vreme u **B** postupku znatno kraće i iznosi svega 160 minuta, dok prema prvom postupku ono iznosi 49 sati.

U daljem radu jedinjenje **23** je podvrgnuto dehidrataciji sa tionil-hloridom u apsolutnom piridinu, na 0°C u toku 90 minuta (*Shema 3.21.*), pri čemu je dobijen 3 β -acetoksi-6-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**25**) u prinosu od 80%.

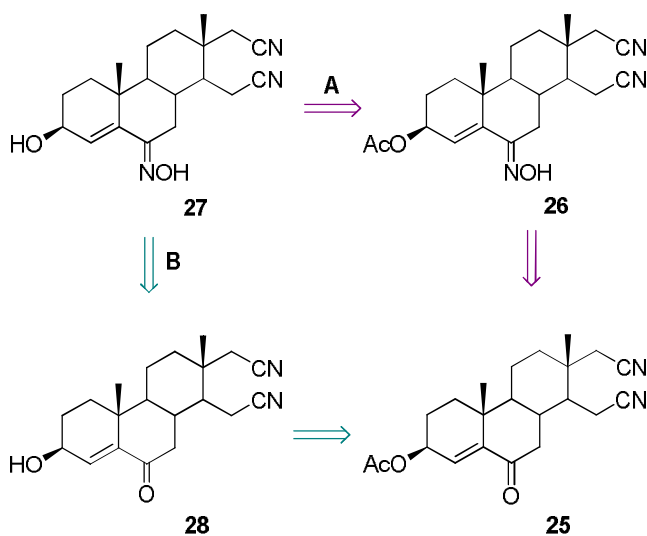


Shema 3.21. Reakcioni uslovi: **a)** SOCl_2 , piridin, 0°C, 90 min

Da je došlo do eliminacije vode i građenja dvostruke veze u položaju C4-C5 kod jedinjenja **25** utvrđeno je na osnovi analize spektroskopskih podataka. Naime, u IR spektru je

odsutna traka na 3446 cm^{-1} , dok je u protonskom NMR spektru odsutan signal na 4,91 ppm. Prisustvo dvostruke veze je utvrđeno protonskim i ^{13}C NMR spektrima na osnovu signala na 6,20 ppm i 130,32 ppm koji potiču od vinilnog vodonikovog atoma H-4, odnosno ugljenikovog atoma C-4. Takođe, u IR spektru se javlja traka na 1637 cm^{-1} od konjugovane C=C veze. Promene u hemijskim pomeranjima signala u ^1H i ^{13}C NMR spektrima u odnosu na jedinjenje **23** usled prisustva nezasićene Δ^4 veze primećuju se kod vodonikovog atoma H-3 [δ 5,04 ppm kod jedinjenja **23** \rightarrow 5,33 ppm kod jedinjenja **25**], odnosno ugljenikovih atoma C-3 [δ 70,76 ppm kod jedinjenja **23** \rightarrow 68,86 ppm kod jedinjenja **25**], C-5 [δ 79,69 ppm kod jedinjenja **23** \rightarrow 145,75 ppm kod jedinjenja **25**] i C-6 [δ 210,34 ppm kod jedinjenja **23** \rightarrow 199,28 ppm kod jedinjenja **25**].

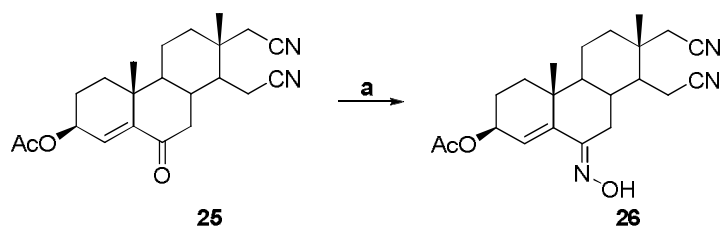
S obzirom da je cilj ovog dela rada dobijanje androstanskog 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa 4-en-3,6-dion 6-oksmino sistemom, na *Shemi* 3.22. prikazana je retrosintetska analiza 3 β -hidroksi-4-en-6-on oksima **27**, ključnog prekursora za dobijanje planiranog jedinjenja, do jedinjenja **25** u dva pravca (**A** i **B**).



Shema 3.22. Retrosintetska analiza jedinjenja **27** do jedinjenja **25**

Prema retrosintetskom putu **A**, sinteza jedinjenja **27** iz jedinjenja **25** se odigrava tako što se najpre dobije oksim **26**, a zatim uradi hidroliza acetoksi grupe u položaju C-3, dok je kod drugog pravca, redosled reakcija obrnut.

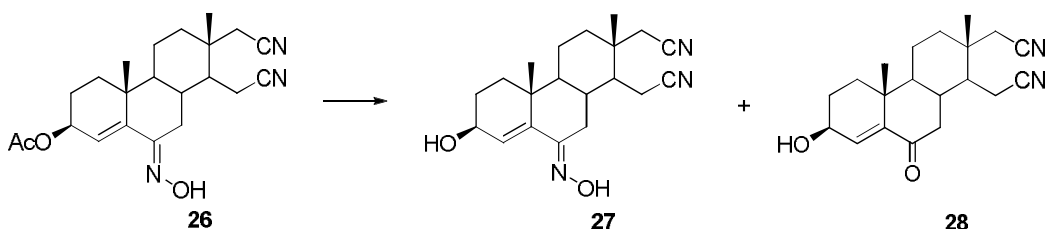
U cilju uvođenja oksimino grupe u položaj C-6, jedinjenje **25** je podvrgnuto reakciji sa hidroksilaminom-hidrohloridom u apsolutnom piridinu, na sobnoj temperaturi (*Shema* 3.23.). Nakon 24 sata dobijen je 3 β -acetoksi-(6*E*)-hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**26**) u prinosu od 99%.



Shema 3.23. Reakcioni uslovi: a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, piridin, st, 24 h

Prisustvo oksimino funkcije u položaju C-6 u jedinjenju **26** utvrđeno je na osnovu IR spektra gde se javlja široka traka sa maksimumom na 3385 cm^{-1} koja potiče od valencionih vibracija hidroksilne grupe iz oksimino funkcije, kao i ^{13}C NMR spektrom gde se javlja signal na $155,65\text{ ppm}$ koji potiče od kvaternernog C-6 atoma. Strukturne promene na ugljenikovom atomu C-6 potvrđene su i promenom hemijskih pomeranja signala u odnosu na jedinjenje **25**, u protonskom NMR spektru za vodonikove atome H-4 i H-7 β , kao i ugljenikove atome C-4 i C-5 u ^{13}C NMR spektru. Iz ^1H i ^{13}C NMR spektara se vidi da je u reakciji oksiminovanja dobijen samo jedan od dva moguća stereoizomera, a na osnovu položaja signala za H-7 atom, i u skladu sa rezultatima objavljenim u literaturi²⁴ zaključeno je da jedinjenje **26** na dvostrukoj vezi oksimino funkcije ima *E*-konfiguraciju.

U narednoj fazi sinteze jedinjenje **26** je podvrgnuto reakciji uklanjanja acetatne zaštite, pri čemu su dobijeni različiti rezultati (Shema 3.24.) u zavisnosti od primenjenih reakcionih uslova koji su prikazani u Tabeli 3.3.



Shema 3.24. Reakcioni uslovi su dati u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Reakcioni uslovi i prinos reakcija uklanjanja acetatne zaštite

Reakcioni uslovi	Proizvod	Prinos (%)
EtONa, EtOH, 50-57°C, 2,5 h	Jedinjenje 27	63
	Jedinjenje 28	25
EtONa, EtOH, st, 1 h	Jedinjenje 27	53
KOH, MeOH, st, 1 h	Jedinjenje 27	49

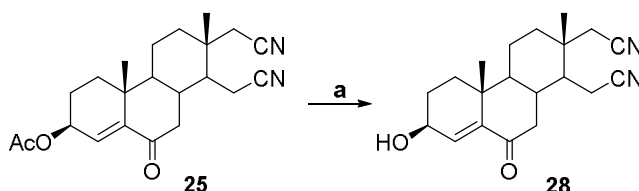
Kada je reakcija uklanjanja zaštite kod jedinjenja **26** izvedena sa natrijum-etoksidom u etanolu, na 50-57°C, nakon 2,5 sata dobijen je očekivani 3 β -hidroksi-(6*E*)-hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**27**), u prinosu od 63%. Pored oksimino derivata **27** koji je dobijen kao glavni proizvod reakcije, pri ovim reakcionim uslovima je došlo i do hidrolize oksimino funkcije i građenja 6-keto derivata **28**, u prinosu od 25%. Istom reakcijom, ali na sobnoj temperaturi, u toku jednog sata, jedinjenje **27** je dobijeno u nešto nižem prinosu (53%). Uklanjanjem zaštite kod jedinjenja **26** sa kalijum-hidroksidom u metanolu, nakon jednog sata na sobnoj temperaturi, jedinjenje **27** je nastalo u prinosu od 49%.

Odsustvo acetoksi funkcije u položaju C-3 kod jedinjenja **27** dokazano je izostankom trake u IR spektru na 1729 cm⁻¹ koja je poticala od vibracija karbonilne grupe iz acetoksi funkcije kod jedinjenja **26**, a u ¹H i ¹³C NMR spektrima izostankom signala od vodonikovih (na 2,06 ppm) i ugljenikovog atoma metil grupe (na 21,25 ppm), kao i signala za karbonilni ugljenik (na 170,95 ppm) acetoksi funkcije. U NMR spektrima jedinjenja **27** uočavaju se i promene u hemijskim pomeranjima H-3 atoma [δ 5,28 ppm kod jedinjenja **26** \rightarrow 4,14 ppm kod jedinjenja **27**], odnosno C-3 atoma [δ 69,35 ppm kod jedinjenja **26** \rightarrow 66,85 ppm kod jedinjenja **27**]. Takođe, u IR spektru se može uočiti povećanje intenziteta trake na 3336 cm⁻¹ koja potiče od hidroksilne grupe u položaju C-3 i hidroksilne grupe iz oksimino funkcije. Pomenuti karakteristični signali zajedno sa pikom na 342,21789 masenih jedinica koji potiče od [M+H]⁺ u masenom spektru visoke rezolucije, nedvosmisleno potvrđuju strukturu jedinjenja **27**.

Prisustvo hidroksilne grupe u jedinjenju **28** utvrđeno je na osnovu prisustva dubleta na 5,03 ppm u protonskom NMR spektru koji potiče od vodonikovog atoma iz pomenute grupe i intenzivne trake u IR spektru sa maksimumom na 3480 cm⁻¹ koja potiče od vibracija O-H. Takođe se u IR spektru uočava odsustvo trake na 1729 cm⁻¹ koja je kod jedinjenja **26** poticala od vibracija karbonilne grupe iz acetoksi funkcije, dok u ¹H i ¹³C NMR spektrima izostaju singlet na 2,06 ppm od vodonikovih atoma, odnosno signal na 21,25 ppm od ugljenikovog atoma metil grupe iz acetoksi funkcije, kao i signal na 170,95 ppm od karbonilnog ugljenikovog atoma iz acetoksi funkcije. U IR spektru prisutna je traka na 1673 cm⁻¹ koja potiče od C=O vibracija keto grupe konjugovane sa C=C dvostrukom vezom čija se traka nalazi na 1612 cm⁻¹. Prisustvo keto grupe potvrđeno je i ¹³C NMR spektrom većim hemijskim pomeranjem signala za ugljenikov atom C-6 [δ 155,65 ppm kod jedinjenja **26** \rightarrow 200,19 ppm kod jedinjenja **28**]. Takođe se u protonskom NMR spektru mogu uočiti promene u hemijskim pomeranjima signala za vodonikove atome H-3 [δ 5,28 ppm kod jedinjenja **26** \rightarrow 4,06 ppm kod jedinjenja **28**] i H-4 [δ 5,78 ppm kod jedinjenja **26** \rightarrow 6,05 ppm kod jedinjenja **28**]. U ¹³C NMR spektru se javlja manje hemijsko pomeranje signala za ugljenikov atom C-3 [δ 69,35 ppm kod jedinjenja **26** \rightarrow 65,30 ppm kod jedinjenja **28**]. Svi ovi podaci nedvosmisleno ukazuju da je došlo ne samo do uklanjanja acetoksi zaštite, nego i hidrolize oksimino grupe do keto. Ova činjenica je potvrđena i TOF masenim spektrom pikom na 327,20618 masenih jedinica koji potiče od [M+H]⁺.

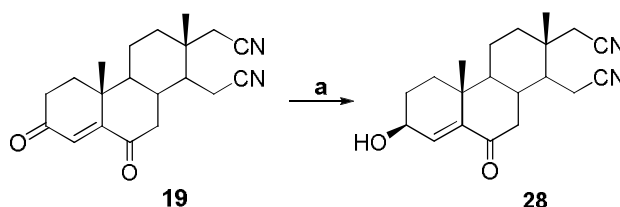
Prema retrosintetskom putu **B** (*Shema 3.22.*), sinteza jedinjenja **27** bi se odigravala tako što bi se jedinjenje **25** najpre podvrglo reakciji uklanjanja acetoksi zaštite, a zatim reakciji oksiminovanja.

Uklanjanje acetoksi zaštite kod jedinjenja **25** je pokušano sa kalijum-hidroksidom u metanolu, na sobnoj temperaturi, u toku 2 sata (*Shema 3.25.*). Pri ovim reakcionim uslovima 3 β -hidroksi-6-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**28**) je dobijen u prinosu od 40%.



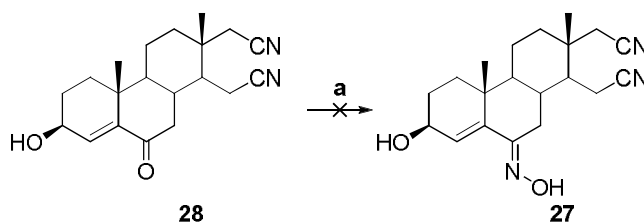
Shema 3.25. Reakcioni uslovi: a) KOH, MeOH, st, 2 h

Kako bi se dobilo jedinjenje **28**, izvršena je i regioselektivna redukcija keto grupe u položaju C-3 jedinjenja **19**. Reakcija je izvedena sa natrijum-borhidridom u prisustvu kobalt(II)-hlorida heksahidrata, u metanolu (*Shema 3.26.*). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi u toku 15 minuta, pri čemu je dobijen 3 β -hidroksi-6-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**28**), u prinosu od 64%.



Shema 3.26. Reakcioni uslovi: a) NaBH₄, CoCl₂·6H₂O, MeOH, st, 15 min

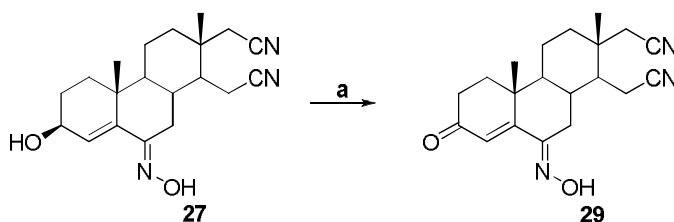
U završnoj fazi pokušana je reakcija oksiminovanja jedinjenja **28** sa hidroksilamin-hidrohloridom, u prisustvu natrijum-acetata u etanolu na sobnoj temperaturi u toku 20 sati (*Shema 3.27.*). Međutim, pri ovim reakcionim uslovima nije dolazilo do reakcije i nastajanja željenog oksima **27**.



Shema 3.27. Reakcioni uslovi: a) NH₂OH·HCl, AcONa, EtOH, st, 20 h

Na osnovu izloženih rezultata može se zaključiti da sinteza jedinjenja **27** iz **25** zahteva prvo uvođenje oksimino funkcije u položaj C-6 kod jedinjenja **25**, a zatim uklanjanje acetoksi zaštite u položaju C-3. Obrnuti redosled reakcija ne dovodi do željenog proizvoda.

U daljoj sintezi, a u cilju dobijanja 4-en-3-onskog sistema, izvršena je oksidacija hidroksilne grupe u položaju C-3 kod jedinjenja **27** do keto funkcije. Jedinjenje **27** je podvrgnuto oksidaciji sa hrom(VI)-oksid-piridinskim kompleksom, na sobnoj temperaturi, u toku 75 minuta (*Shema 3.28.*). (6*E*)-Hidroksiimino-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**29**) je dobijen u prinosu od 80%.

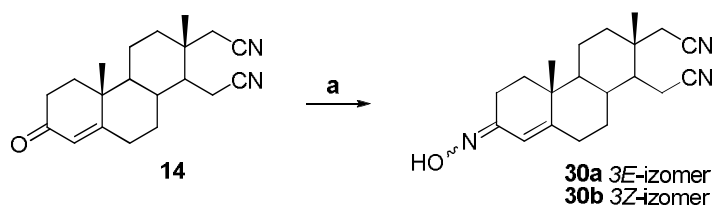


Shema 3.28. Reakcioni uslovi: a) CrO₃/Py, st, 75 min

U IR spektru jedinjenja **29** prisutne su trake na 1651 cm⁻¹ i 1455 cm⁻¹ koje potiču od vibracija konjugovane C-3 keto grupe i C4-C5 dvostruke veze. U ¹H NMR spektru može se uočiti odsustvo signala na 4,14 ppm koji je kod jedinjenja **27** poticao od vodonikovog atoma H-3, a u ¹³C NMR spektru značajno pomeranje signala za ugljenikov atom C-3 [δ 66,85 ppm kod jedinjenja **27** → 201,09 ppm kod jedinjenja **29**]. Struktura jedinjenja **29** je potvrđena i TOF masenim spektrom, prisustvom pika na 340,20154 masenih jedinica koji potiče od [M+H]⁺.

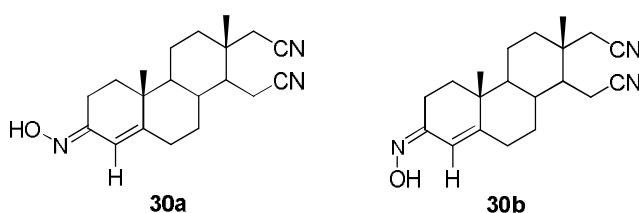
Jedinjenje **29** je bilo podvrgnuto reakciji dehidrogenacije sa DDQ u apsolutnom toluenu, u prisustvu TFA i BSTFA. Iako su se ovi reakcioni uslovi u dosadašnjem radu pokazali kao najbolji za uvođenje Δ^1 dvostruke veze, u ovom slučaju nije bilo tako. Naime, došlo je do građenja kompleksne smeše koja se stubnom hromatografijom nije mogla uspešno razdvojiti na pojedine komponente.

Osim sinteze C-6 oksimino derivata, u ovom delu rada sintetisani su i C-3 oksimino derivati. U tu svrhu kao polazno jedinjenje je odabran 4-en-3-on **14**. Jedinjenje **14** je podvrgnuto reakciji sa hidroksilamin-hidrohloridom u etanolu, u prisustvu natrijum-acetata (*Shema 3.29.*). Nakon zagrevanja reakcione smeše na 70°C u toku 2 sata dobijena je smeša (3*E*)- i (3*Z*)-hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitrila (**30a** i **30b**) u prinosu od 90%.



Shema 3.29. Reakcioni uslovi: a) NH₂OH·HCl, EtOH, AcONa, 70°C , 2 h

Struktura smeše 3E- i 3Z-oksmino derivata **30a** i **30b** potvrđena je na osnovu analize spektroskopskih podataka. U IR spektru se može uočiti prisustvo široke trake sa maksimumom na 3195 cm⁻¹ koja potiče od valencionih vibracija hidroksilne grupe iz oksimino funkcije. Takođe se može uočiti izostanak trake na 1661 cm⁻¹ koja je kod jedinjenja **14** poticala od karbonilne grupe u položaju C-3. U ¹H NMR spektru smeše jedinjenja **30a** i **30b** koji je snimljen u CDCl₃ može se uočiti širok signal na 6,92 ppm koji potiče od protona iz oksimino funkcije u položaju C-3. Singleti na 5,92 i 6,55 ppm potiču od H-4 vodonikovih atoma 3E- i 3Z-izomera. Da bi se utvrdilo koji je stereoizomer dobijen u višku, spektar je snimljen i u deuterodimetilsulfoksidu. U protonskom NMR spektru koji je snimljen u deuterodimetilsulfoksidu mogu se uočiti dva jasno diferencirana singleta na 10,27 i 10,54 ppm koji potiču od protona hidroksilne grupe dveju oksimino funkcija, dok singleti na 5,73 i 6,36 ppm potiču od H-4 vodonikovih atoma. Ozračivanjem protona koji daje signal na 6,36 ppm uočena je promena intenziteta signala na 10,27 ppm. Ova činjenica ukazuje da se ozračeni H-4 vodonikov atom nalazi na rastojanju manjem od 4 Å od vodonikovog atoma iz oksimino funkcije, a to znači da se oni nalaze sa iste strane dvostruke veze (Slika 3.2.). Na osnovu ovih podataka, kao i intenziteta signala, može se zaključiti da se kao glavni proizvod reakcije dobija 3E-izomer **30a**.



Slika 3.2. Strukture oksimino derivata **30a** i **30b**

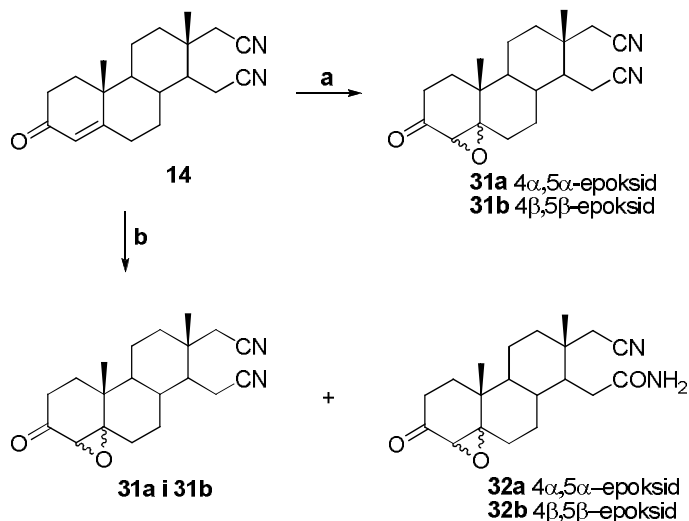
U ¹³C NMR spektru smeše jedinjenja **30a** i **30b** mogu se uočiti duplirani signali za C-3 ugljenikove atome koji imaju manje hemijsko pomeranje u odnosu na jedinjenje **14** [δ 198,93 ppm kod jedinjenja **14** → 155,43 i 154,16 ppm kod 3E i 3Z-izomera jedinjenja **30**]. Takođe se može uočiti manje hemijsko pomeranje signala koji potiču od ugljenikovog atoma C-4 [δ 124,08 ppm kod jedinjenja **14** → 117,97 i 110,81 ppm kod 3Z i 3E-izomera jedinjenja **30** respektivno].

Veće hemijsko pomeranje za H-4 i C-4 atom Z-izomera (**30b**) je posledica blizine elektronegativnog kiseonika iz oksimino funkcije koji smanjuje elektronsku gustinu oko pomenutih atoma.

3.1.5. SINTEZA ANDROSTANSKOG 16,17-SEKO-16,17a-DINITRILA SA 4-HIDROKSI-4-EN-3-ON SISTEMOM

Cilj ovog dela rada je dobijanje 4-hidroksi-4-en-3-onskog sistema kod 16,17-seko-16,17a-dinitrilnog derivata androstana, a koji je prisutan i u strukturi Formestana, važnog inhibitora enzima aromataze. Jedan od postupaka za dobijanje 4-hidroksiandrostendiona koji je opisan u literaturi^{169,170} iskorišćen je za sintezu novog 4-hidroksi-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitrila (**33**). Ovaj postupak je podrazumevao dobijanje jedinjenja **33** iz 4-en-3-on derivata **14**, a sastojao se od dve sintetske faze.

Jedinjenje **14** je podvrgnuto reakciji sa 30%-nim vodonik-peroksidom, u prisustvu natrijum-hidroksida, u metanolu u toku 90 minuta, na temperaturi od -14°C (*Shema 3.30.a*). Nakon hromatografskog prečišćavanja dobijena je smeša 4 α ,5 α - i 4 β ,5 β -epoksi-3-okso-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitrila (**31a** i **31b**), u prinosu od 30%.



Shema 3.30. Reakcioni uslovi: **a**) 30% H₂O₂, NaOH, MeOH, -14°C, 90 min; **b**) 30% H₂O₂, NaOH, MeOH, st, 5 min, zatim 4°C, 25 min

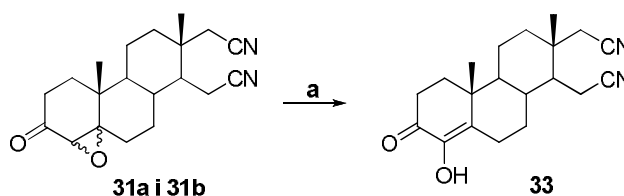
Promenom reakcionih uslova epoksidacije jedinjenja **14**, u odnosu na prethodno opisan postupak, tj. ukoliko se reakcija izvodi na sobnoj temperaturi u toku 5 minuta, a zatim na 4°C u toku 25 minuta, smeša epoksida **31a** i **31b** se dobija u prinosu od 23%, dok se kao glavni proizvod (38%) dobija smeša jedinjenja **32a** i **32b**, kod koje je pored građenja epoksida došlo i do hidrolize C-16 nitrilne funkcije do amidne (*Shema 3.30.b*).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se reakcija epoksidacije jedinjenja **14** mora izvoditi na niskim temperaturama, jer pri povećanju temperature dolazi do neželjene hidrolize C-16 nitrilne funkcije.

Spektroskopski podaci dobijene smeše proizvoda **31a** i **31b** ukazuju na odsustvo Δ^4 -dvostruke veze. Naime, u IR spektru je odsutna traka na 1624 cm^{-1} koja je kod jedinjenja **14** poticala od olefinske veze, a u protonskom NMR spektru se javlja manje hemijsko pomeranje signala za vodonikov atom H-4 [δ 5,77 ppm kod jedinjenja **14** \rightarrow 3,04, tj. 3,11 ppm kod smeše jedinjenja **31a** i **31b**]. Prisustvo dva signala za vodonikov atom H-4 ukazuje da je dobijena smeša $4\alpha,5\alpha$ - i $4\beta,5\beta$ -epoksida. U ^{13}C NMR spektru signali na 62,33 i 62,58 ppm koji potiču od C-4 ugljenikovih atoma, kao i signali na 69,01 i 69,29 ppm koji potiču od C-5 ugljenikovih atoma, takođe imaju manje hemijsko pomeranje u odnosu na signale istih atoma u ^{13}C NMR spektru jedinjenja **14** [δ 124,08 ppm za C-4 i 168,68 ppm za C-5], dok signal za C-3 atom ima veće hemijsko pomeranje [δ 198,93 ppm kod jedinjenja **14** \rightarrow 205,75, tj. 206,05 ppm kod jedinjenja **31**]. U TOF masenom spektru prisutan je pik na 653,40750 masenih jedinica koji potiče od $[2\text{M}+\text{H}]^+$ što dodatno potvrđuje strukturu jedinjenja **31**.

U IR spektru smeše jedinjenja **32a** i **32b** javljaju se trake na 3447 , 3354 i 3201 cm^{-1} koje potiču od valencionih N–H vibracija, dok traka na 1674 cm^{-1} potiče od C=O vibracija karbonilne grupe iz amidne funkcije. U ^1H NMR spektru smeše jedinjenja **32a** i **32b** osim signala za vodonikov atom u položaju C-4 koji se javlja na 2,96, tj. 3,04 ppm prisutna su i dva proširena signala na 5,75 i 5,96 ppm, koji se gube pri dodatku deuterio vode, što je još jedan dokaz da je u molekulima prisutna amidna funkcija. U ^{13}C NMR spektru u odnosu na polazno jedinjenje **14** izostaje signal na 116,87 ppm, a prisutni signali na 118,15, tj. 118,27 ppm govore da se u molekulima nalazi samo jedna nitrilna grupa. Prisustvo signala na 174,39, tj. 174,58 ppm, koji potiču od ugljenikovog atoma amidne funkcije, nam zajedno sa pomenutim signalima nedvosmisleno potvrđuje strukturu jedinjenja **32a** i **32b**.

Otvaranje oksiranskog prstena smeše epoksida **31a** i **31b** izvršeno je sa mravljom kiselinom na temperaturi ključanja reakcione smeše, u toku jednog sata, pri čemu je dobijen 4-hidroksi-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**33**) u prinosu od 41% (*Shema 3.31*).



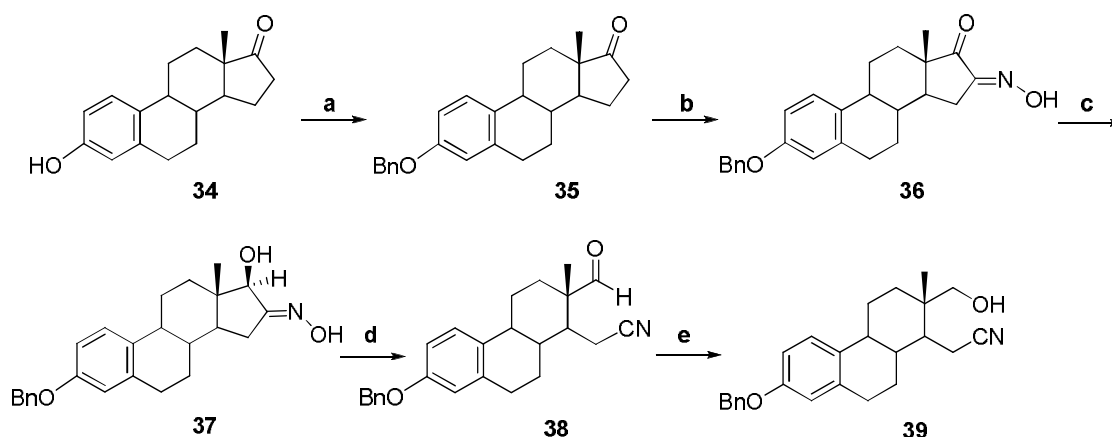
Shema 3.31. Reakcioni uslovi: a) HCOOH , refluks, 1 h

U IR spektru jedinjenja **33** uočava se široka traka sa maksimumom na 3420 cm^{-1} koja potiče od valencionih O–H vibracija hidroksilne grupe. Prisustvo ove grupe dokazano je i u ^1H

NMR spektru gde se javlja signal na 6,09 ppm, koji se dodatkom D₂O gubi. Usled prisustva 4-en-3-onskog sistema kod jedinjenja **33**, u IR spektru se javljaju trake na 1662 i 1636 cm⁻¹ koje potiču od keto grupe i konjugovane dvostruke veze. U protonskom NMR spektru u odnosu na spektar smeše jedinjenja **31a** i **31b**, izostaju signali na 3,04 i 3,11 ppm koji su poticali od H-4 atoma, a u ¹³C NMR spektru hemijsko pomeranje C-4 i C-5 atoma je znatno veće u odnosu na hemijsko pomeranje istih atoma kod polaznog jedinjenja [δ 62,33 i 62,58 (C-4) i 69,01 i 69,29 (C-5) kod jedinjenja **31a** i **31b** → 137,40 (C-4) i 141,22 (C-5) kod jedinjenja **33**].

3.2. SINTEZA 16,17-SEKO-16,17a-DINITRILA ESTRANSKE SERIJE

U cilju ispitivanja uticaja strukture A prstena na biološku aktivnost, sintetizovan je i 16,17-seko-16,17a-dinitril u estranskoj seriji. Kao polazno jedinjenje poslužio je 3-benziloksi-17-hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**39**) koji je dobijen transformacijom komercijalno dostupnog estrona (**34**) u pet sintetskih faza (*Shema 3.32.*), a prema postupku koji je ranije opisan u literaturi.¹⁷¹⁻¹⁷³

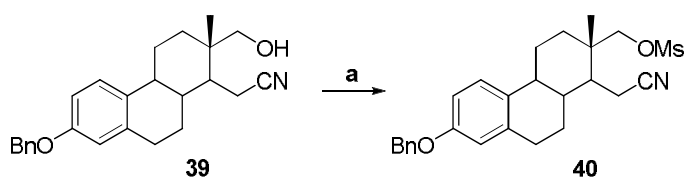


Shema 3.32. Reakcioni uslovi: **a)** BnCl, K₂CO₃, MeOH, aceton, refluks, 8 h; **b)** *i*-Am-ONO, *t*-BuOH, *t*-BuOK, st, 19 h, **c)** NaBH₄, metanol, CH₂Cl₂, 1% aq KOH, st, 30 min; **d)** *p*-TsCl, Py, st, 3 h; **e)** NaBH₄, EtOH, st, 30 min

U prvoj fazi sinteze fenolna OH grupa jedinjenja **34** je zaštićena prevođenjem u benziletarsku funkciju. Reakcija je izvedena dejstvom benzil-hlorida u smeši aceton – metanol, i u prisustvu kalijum-karbonata i na tački ključanja reakcione smeše. Nakon 8 sati dobijen je 3-benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-17-on (**35**) u prinosu od 92%. Zatim je jedinjenje **35** podvrgnuto reakciji oksimovanja delovanjem *i*-amil-nitrita, u prisustvu kalijum-*t*-butoksida u *t*-butil-alkoholu. Reakcija je izvedena na sobnoj temperaturi, u toku 19 sati, pri čemu je nagrađen 3-benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-16,17-dion 16-oksime (**36**) u prinosu od 93%. Dobijeni oksimino-keton **36** je zatim redukovao natrijum-borhidridom u smeši metanol –

metilen-hlorid, uz dodatak 1%-nog vodenog rastvora kalijum-hidroksida. Reakcija je izvedena na sobnoj temperaturi, u trajanju od 30 minuta, pri čemu je dobijen 3-benziloksi-17 β -hidroksiestra-1,3,5(10)-trien-16-on oksim (**37**) u prinosu od 93%. Beckmann-ova fragmentacija D-prstena oksimino-alkohola **37** urađena je pomoću *p*-toluensulfonil-hlorida u piridinu, na sobnoj temperaturi u toku 3 sata. Dobijen je 3-benziloksi-17-okso-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**38**) u prinosu od 43%. Zatim je urađena redukcija aldehidne grupe kod jedinjenja **38** sa natrijum-borhidridom u etanolu, na sobnoj temperaturi. Reakcija je trajala 30 minuta, pri čemu je dobijen 3-benziloksi-17-hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**39**) u prinosu od 99%.

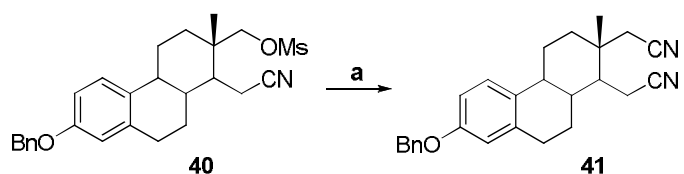
Jedinjenje **39** je poslužilo kao prekursor za uvođenje cijano grupe u položaj C-17. Međutim, najpre je primarna hidroksilna grupa jedinjenja **39** morala da se prevede u dobru odlazeću, meziloksi grupu. Reakcija je izvedena sa metansulfonil-hloridom u piridinu, na 4°C u toku 22 sata, pri čemu je dobijen 3-benziloksi-17-metansulfoniloksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**40**) u prinosu od 48% (*Shema 3.33.*)¹⁷⁴



Shema 3.33. Reakcioni uslovi: a) MsCl, Py, 4°C, 22 h

U IR spektru jedinjenja **40** javljaju se intenzivne trake na 1356 cm⁻¹ i 1175 cm⁻¹ koje su karakteristične za simetrične i asimetrične valencione vibracije SO₂ grupe, što zajedno sa prisustvom singleta u protonskom NMR spektru na 3,08 ppm za vodonikove atome metil grupe i signalom iz ¹³C NMR spektra na 37,89 ppm od ugljenikovog atoma metil grupe, nedvosmisleno dokazuje prisustvo metansulfoniloksi grupe u molekulu. U masenom spektru visoke rezolucije jedinjenja **40** prisutan je pik na 454,20379 masenih jedinica koji potiče od [M+H]⁺.

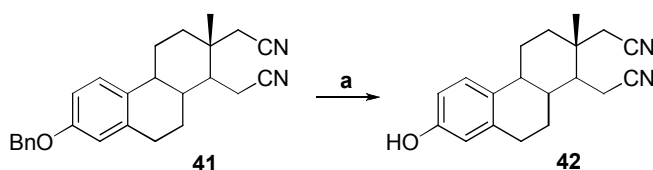
U sledećoj fazi sinteze jedinjenje **40** je podvrgnuto reakciji supstitucije meziloksi grupe sa natrijum-cijanidom u dimetilsulfoksidu (*Shema 3.34.*). Reakcija je izvedena zagrevanjem uz refluks u toku 7 sati, pri čemu je dobijen 3-benziloksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16,17a-dinitril (**41**) u prinosu od 34%.



Shema 3.34. Reakcioni uslovi: a) NaCN, DMSO, refluks, 7 h

Da je došlo do supstitucije i građenja dicijano derivata **41** dokazano je ^{13}C NMR spektrom u kome je, pored signala za C-16 nitrilnu grupu na 118,38 ppm, prisutan i signal na 117,12 ppm, koji potiče od novouvedene nitrilne grupe. Struktura je potvrđena i TOF masenim spektrom, gde se javlja pik na 385,22694 masenih jedinica koji potiče od $[\text{M}+\text{H}]^+$.

U završnoj fazi, kod jedinjenja **41** uklonjena je benziletarska zaštita u položaju C-3 reakcijom hidrogenolize. Naime, jedinjenje **41** je mešano u atmosferi vodonika, u prisustvu 10% paladijuma na uglju kao katalizatora, na sobnoj temperaturi. Nakon 48 sati dobijen je ciljani 3-hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16,17a-dinitril (**42**) u prinosu od 98% (*Shema 3.35.*).



Shema 3.35. Reakcioni uslovi: **a)** H_2 , 10% Pd/C, CH_2Cl_2 , st, 48 h

U IR spektru jedinjenja **42** javlja se traka na 3344 cm^{-1} koja potiče od O-H valencionih vibracija fenolne hidroksilne grupe. Prisustvo hidroksilne grupe je potvrđeno i protonskim NMR spektrom gde se na 8,05 ppm javlja singlet od vodonikovog atoma iz pomenute grupe. Takođe, u ^1H i ^{13}C NMR spektrima može se uočiti izostanak signala na 5,06 ppm, odnosno na 69,94 ppm, kao i signala za aromatične vodonikove i ugljenikove atome koji su kod jedinjenja **41** poticali od benziloksi grupe. Svi ovi podaci zajedno sa pikom na 295,17978 masenih jedinica koji potiče od $[\text{M}+\text{H}]^+$ u TOF masenom spektru nedvosmisleno potvrđuju strukturu jedinjenja **42**.

3.3. ISPITIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI

Razvoj novih, efikasnijih antitumorskih agenasa podrazumeva pronalaženje takvih molekula koji u niskim koncentracijama izazivaju visok stepen inhibicije rasta neoplastičnih ćelija. Sposobnost nekog jedinjenja da inhibira rast kulture ćelija kvantitativno se izražava u procentima ili kao IC_{50} vrednost – koncentracija ispitivane supstance pri kojoj se broj tretiranih ćelija smanjuje za 50% u odnosu na kontrolu. Prema opšte prihvaćenim kriterijumima, neko jedinjenje pokazuje zadovoljavajuću antiproliferativnu aktivnost ukoliko je njegova IC_{50} vrednost niža od 20 μM . Ako je IC_{50} u intervalu 20–100 μM supstanca pokazuje umerenu, odnosno slabu aktivnost, dok se jedinjenja čija vrednost IC_{50} prelazi 100 μM smatraju neaktivnim.

U ovom radu proučavan je uticaj odabranih novosintetizovanih jedinjenja na proliferaciju sedam ćelijskih linija humanih tumora, dok je kao kontrola služila jedna zdrava humana ćelijska linija:

MCF-7 – adenokarcinom dojke, estrogen receptor pozitivan (ER+),

MDA-MB-231 – adenokarcinom dojke, estrogen receptor negativan (ER-),

PC3 – karcinom prostate, androgen receptor negativan (AR-),

HeLa – karcinom grlića materice,

HT-29 – karcinom debelog creva

K562 – hronična mijeloidna leukemija,

A549 – karcinom pluća,

MRC-5 – zdrava ćelijska linija fibroblasta pluća.

In vitro citotoksičnost je određena kolorimetrijskim MTT testom.¹⁷⁵ Test se bazira na detekciji živih ćelija i zbog toga se može koristiti za merenje citotoksičnosti, proliferacije ili aktivacije ćelija. Princip testa je konverzija, odnosno redukcija tetrazolijumove soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum-bromid] (MTT), u plavo obojeni proizvod – formazan, u prisustvu mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Količina nastalog formazana je direktno proporcionalna broju vijabilnih ćelija, a apsorbancija se čita na spektrofotometru na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini 690 nm. Eksperimenti su izvedeni tako što su kulture ćelija izlagane dejstvu različitih koncentracija (0,01, 0,1, 1, 10 i 100 μM) ispitivanih jedinjenja. Formestan je korišćen kao referentno jedinjenje. Vrednosti IC_{50} su određene “Median effect” analizom pomoću programa *CalcuSyn* i prikazane su u *Tabeli 3.4*.

Tabela 3.4. *In vitro* antiproliferativna aktivnost odabranih novosintetizovanih jedinjenja i Formestana

Jedinjenje	IC ₅₀ (µM)							
	MCF-7	MDA-MB-231	PC3	HeLa	HT-29	K562	A549	MRC-5
12	31,09	58,32	25,31	2,73	>100	>100	>100	>100
14	16,34	22,43	11,23	6,42	>100	>100	>100	>100
15	>100	0,11	67,8	12,49	>100	-	>100	>100
17	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	>100
19	>100	7,99	15,87	4,31	>100	>100	>100	>100
27	>100	12,41	17,42	0,48	19,58	-	>100	>100
28	>100	>100	>100	>100	53,26	-	>100	>100
29	>100	2,78	>100	2,64	16,18	-	58,12	>100
33	60,37	50,15	12,34	15,81	>100	>100	>100	>100
42	22,96	9,89	23,65	8,69	>100	>100	>100	>100
Formestan	>100	55,5	48,36	5,55	>100	>100	>100	>100

Analizom rezultata dobijenih prilikom ispitivanja antiproliferativne aktivnosti 3β-hidroksi-5-en derivata **12** uočena je jaka inhibicija rasta ćelijske linije HeLa (IC₅₀ 2,73 µM). Umerenu citotoksičnost jedinjenje **12** je ispoljilo prema ćelijskim linijama PC3 (IC₅₀ 25,31 µM) i MCF-7 (IC₅₀ 31,09 µM), slabu prema MDA-MB-231 (IC₅₀ 58,32 µM), dok prema HT-29, K562 i A549 malignim ćelijama nije bilo aktivno.

Iz Tabele 3.4. se vidi da je 4-en-3-on derivat **14** pokazao jaku antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskoj liniji HeLa (IC₅₀ 6,42 µM), značajnu prema PC3 (IC₅₀ 11,23 µM) i MCF-7 (IC₅₀ 16,34 µM), a umerenu prema MDA-MB-231 ćelijskoj liniji (IC₅₀ 22,43 µM). Prema ostalim testiranim tumorskim ćelijama ovo jedinjenje nije pokazalo citotoksičnu aktivnost.

Jedinjenje **15** (1,4-dien-3-on derivat) je pokazalo izuzetnu antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskoj liniji MDA-MB-231, IC₅₀ koncentracija je bila čak submikromolarna (0,11 µM). Značajnu citotoksičnost ovo jedinjenje je ispoljilo prema HeLa ćelijskoj liniji (IC₅₀ 12,49 µM), slabu prema ćelijama kancera prostate AR-, PC3 (IC₅₀ 67,8 µM), dok je prema tri maligne ćelijske linije (MCF-7, HT-29 i A549) bilo neaktivno.

Jaku antiproliferativnu aktivnost jedinjenje **19** (3,6-dion-4-en derivat) je pokazalo prema tri ćelijske linije (HeLa, MDA-MB-231, i PC3), a najpotentnije je bilo prema HeLa ćelijskoj liniji (IC₅₀ 4,31 µM). Prema ostalim ćelijskim linijama jedinjenja **19** je bilo neaktivno.

Jedinjenje **27** (3 β -hidroksi-6-oksimino-4-en derivat) je prema HeLa ćelijskoj liniji, sa IC₅₀ koncentracijom koja je bila čak submikromolarna (0,48 μ M), ispoljilo izuzetno snažnu citotoksičnost, dok je značajnu aktivnost ispoljilo prema MDA-MB-231 (IC₅₀ 12,41 μ M), PC3 (IC₅₀ 17,42 μ M) i HT-29 (IC₅₀ 19,58 μ M) ćelijskim linijama.

Jaku inhibiciju proliferacije neoplastičnih ćelijskih linija 6-oksimino-4-en-3-on derivat **29** je pokazao prema dve ćelijske linije, MDA-MB-231 (IC₅₀ 2,78 μ M) i HeLa (IC₅₀ 2,64 μ M), a značajnu prema HT-29 ćelijskoj liniji (IC₅₀ 16,18 μ M). Slabu citotoksičnu aktivnost ovo jedinjenje je ispoljilo prema A549 ćelijskoj liniji (IC₅₀ 58,12 μ M), dok prema ostalim ispitivanim malignim ćelijskim linijama nije bilo aktivno.

Jedinjenje **33** (4-hidroksi-4-en-3-on derivat) je ispoljilo značajnu citotoksičnost prema dvema ćelijskim linijama: PC3 (IC₅₀ 12,34 μ M) i HeLa (IC₅₀ 15,81 μ M), slabu prema ćelijama ER+ i ER- adenokarcinoma dojke (MCF-7 i MDA-MB-231), dok prema ostalim tretiranim ćelijskim linijama ovo jedinjenje nije pokazalo aktivnost.

Iz *Tabele 3.4.* se vidi da je estra-1,3,5(10)-trienski derivat **42** bio najpotentniji prema ćelijskim linijama HeLa (IC₅₀ 8,69 μ M) i MDA-MB-231 (IC₅₀ 9,89 μ M). Prema MCF-7 (IC₅₀ 22,96 μ M) i PC3 (IC₅₀ 23,65 μ M) jedinjenje **42** je pokazalo umerenu aktivnost, dok prema HT-29, K562 i A549 linijama nije bilo aktivno.

Jedinjenje **17** (6-metilen-4-en-3-on derivat) i 3 β -hidroksi-4-en-6-on derivat **28** nisu pokazali antiproliferativnu aktivnost prema testiranim tumorskim ćelijskim linijama.

Važno je naglasiti da ni jedno od testirana jedinjenja nije inhibiralo proliferaciju populacije zdravih ćelija (MRC-5).

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da je najveći broj sintetizovanih jedinjenja pokazao jaku antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskoj liniji karcinoma cerviksa (HeLa), od kojih su jedinjenja **12**, **19**, **27** i **29** bila potentnija od referentnog jedinjenja, Formestana. Jedinjenja **15**, **19**, **29** i **42** su ispoljila jaku citotoksičnu aktivnost prema ćelijama ER- adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231). Jedinjenje **15** je pokazalo čak 500 puta veću antiproliferativnu aktivnost u odnosu na Formestan. Snažnu aktivnost prema ćelijama kancera prostate (PC3), i to veću od referentne supstance, pokazala su jedinjenja **14**, **19**, **27** i **33**. Formestan nije pokazao aktivnost prema ćelijskim linijama MCF-7 i HT-29, dok su jedinjenja **27** i **29** pokazala značajnu antiproliferativnu aktivnost prema HT-29, odnosno jedinjenje **14** prema MCF-7 ćelijskoj liniji. Testirana jedinjenja i Formestan nisu bili aktivni prema neoplastičnim ćelijama K562 i A549 linija.

Kako bi se ispitao uticaj pojedinih funkcionalnih grupa u molekulima novosintetizovanih jedinjenja na antitumorsku aktivnost, analizirani su rezultati dobijeni prilikom ispitivanja antiproliferativne aktivnosti. Ovom analizom uspostavljeni su korelacioni odnosi (SAR, eng. structure-activity relationship) između strukture i antiproliferativne aktivnosti ispitivanih jedinjenja.

Antiproliferativna aktivnost je kvantitativno izražena kao razlika dekadnih logaritama IC₅₀ vrednosti pojedinih parova jedinjenja po jednoj određenoj ćelijskoj liniji. Negativna

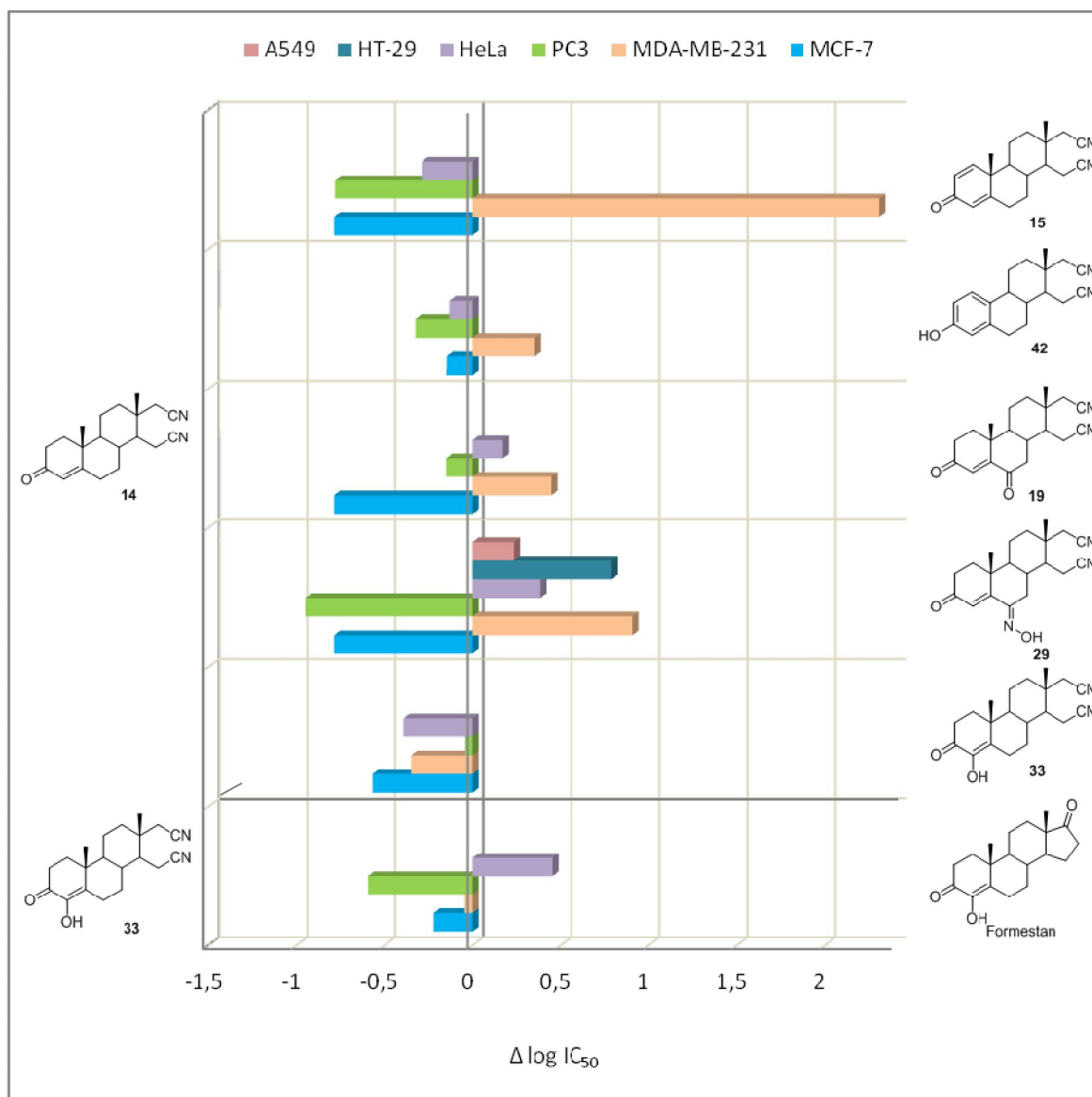
vrednost pokazuje da analog I ima snažniju antiproliferativnu aktivnost od analoga II, dok pozitivna vrednost odgovara većoj aktivnosti analoga II u odnosu na analog I za datu ćelijsku liniju.

U cilju ispitivanja uticaja supstituenata u položaju C-4 i C-6 i prisustva dvostrukih veza u A prstenu na antiproliferativnu aktivnost upoređena je citotoksičnost jedinjenja **14** sa citotoksičnošću jedinjenja **15**, **42**, **19**, **29** i **33** (*Slika 3.3.*). Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da uvođenje Δ^1 dvostruke veze i aromatizacija A prstena dovode do povećanja antiproliferativne aktivnosti samo prema MDA-MB-231 ćelijskoj liniji, dok se prisustvo samo 4-en-3-on sistema u jedinjenju **14** može povezati sa većom potentnošću prema ćelijskim linijama HeLa, PC3 i MCF-7.

Uvođenje metilenske, keto ili oksimino grupe u položaj C-6 jedinjenja **14** dovodi do različitih promena u antiproliferativnoj aktivnosti. Iz *Tabele 3.4.* se vidi da C-6 metilenska grupa (jedinjenje **17**) utiče na potpuni gubitak antiproliferativne aktivnosti, dok se iz *Slike 3.3.* može videti da prisustvo C-6 keto (proton akceptorske) grupe (jedinjenje **19**) povećava antiproliferativnu aktivnost prema MDA-MB-231 i nešto malo prema HeLa ćelijama. Prisustvo oksimino (proton donorske) grupe u istom položaju (jedinjenje **29**) povećava citotoksičnost prema MDA-MB-231, HeLa, HT-29 i A549 ćelijama.

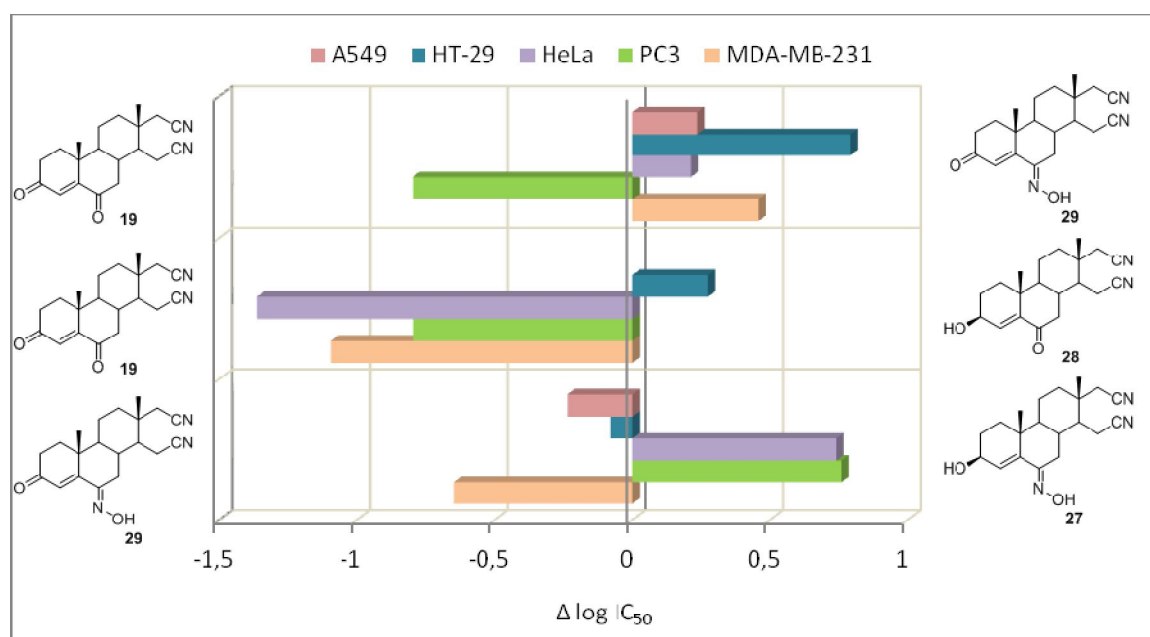
Uvođenje hidroksilne grupe u položaju C-4 jedinjenja **14** (jedinjenje **33**) dovodi do smanjenja citotoksičnosti prema malignim ćelijskim linijama MCF-7, MDA-MB-231, PC3 i HeLa.

U cilju ispitivanja uticaja modifikacija D prstena na antiproliferativnu aktivnost jedinjenja upoređeni su citotoksični efekti jedinjenja **33** i Formestana. Na osnovu dijagrama prikazanog na *Slici 3.3.* može se zaključiti da modifikacija D-prstena, otvaranje i uvođenje nitrilnih funkcija, dovodi do povećanja antiproliferativne aktivnosti prema PC3 i MCF-7 ćelijskim linijama.



Slika 3.3. Uticaj 1-en i 1,3,5(10)-trien sistema, kao i prisustva supstituenata u položaju C-4 i C-6 na antiproliferativnu aktivnost

Na Slici 3.4. su upoređene antiproliferativne aktivnosti 6-supstituisanih jedinjenja. Poređenjem jedinjenja **19** i **29** može se zapaziti da prisustvo proton akceptorske keto grupe doprinosi povećanju citotoksičnosti jedino prema PC3 ćelijskoj liniji, dok proton donorska oksimino grupa dovodi do veće potentnosti prema A459, HT-29, HeLa i MDA-MB-231 ćelijskim linijama.



Slika 3.4. Uticaj prirode supstituenta u položajima C-3 i C-6 na antiproliferativnu aktivnost

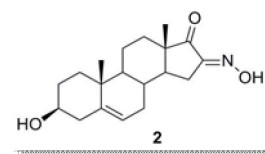
Ukoliko je u položaju C-3 umesto keto grupe u molekulu jedinjenja **19** i **29** prisutna 3 β -hidroksilna grupa, smanjuje se konjugacija u molekulu, što utiče na antiproliferativnu aktivnost. Kod 6-keto derivata prisustvo 3 β -hidroksilne grupe (jedinjenje **28**) dovelo je do povećanja antiproliferativne aktivnosti prema HT-29 ćelijama, dok je u slučaju 6-oksimino derivata **27** prisustvo ove funkcionalne grupe povezano sa povećanjem antiproliferativne aktivnosti prema HeLa i PC3 ćelijskim linijama.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Opšte metode – NMR spektri su snimljeni na instrumentu BRUKER AC-250 E, a hemijska pomeranja (δ skala) su izražena u ppm, uz tetrametilsilan (TMS) kao interni standard. Protonski NMR spektri su asignirani metodom *homo*-dekuplovanja ili 2D COSY tehnikom. ^{13}C NMR spektri su asignirani metodom selektivnog dekuplovanja. IR spektri su snimljeni na FT spektrofotometru Nexus 670, a položaj traka je dat u cm^{-1} . Maseni spektar visoke rezolucije (HRMS) je snimljen na aparatu 6210 Time-of-Flight LC/MS Agilent Technologies (ESI+). Tačke topljenja su određene na aparatu Boetius (VEB Kombinat Nagema), metodom po Kofler-u i nisu korigovane. Za stubnu hromatografiju korišćen je silikagel Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm; MERCK), kao i Kieselgel 60 (0,063-0,2 mm; MERCK). Tok reakcije je praćen tankoslojnom hromatografijom na aluminijumskim folijama Kieselgel 60 F254 (Merck). Hromatogrami su izazivani sa 50% H_2SO_4 , uz naknadno zagrevanje na 120°C . Rastvori su sušeni sa anhidrovanim Na_2SO_4 , a rastvarači su uklanjani na rotacionom vakuum uparivaču.

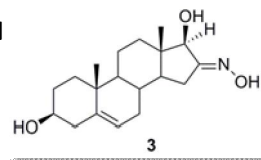
4.1. 3β -HIDROKSIANDROST-5-EN-16,17-DION

16-OKSIM (2)



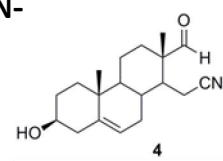
U rastvor kalijum-*t*-butoksida u *t*-butil-alkoholu (0,4 M, 300 mL) se uz mešanje doda dehidroepiandrosteron (**1**; 10 g, 34,67 mmol) i *n*-amil-nitrit (14 mL). Reakciona smeša se ostavi na sobnoj temperaturi u toku 20 sati. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu, a zatim ekstrahuje etrom (3 x 50 mL) u cilju uklanjanja nečistoća. Vodeni sloj se nakon ekstrakcije zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1 i dobijeni talog procedi. Sirovi proizvod **2** (10,1 g, 92%), koji se dobija u obliku belog praha, se prekrystalise iz metanola (t.t. 223°C , lit.¹⁶³ t.t. 223°C).

4.2. 3 β ,17 β -DIHIDROKSIANDROST-5-EN-16-ON OKSIM (3)



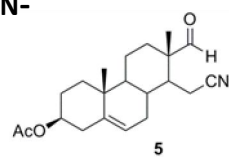
Suspenziji jedinjenja **2** (2,4 g, 7,56 mmol) u etanolu (95%, 40 mL) se doda natrijum-borhidrid (0,81 g, 21,41 mmol) i reakciona smeša meša na sobnoj temperaturi, u toku 10 minuta. Po isteku reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (50 mL) i zakiseli do pH 1 sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1), pri èemu se izdvaja beo talog. Talog se procedi, ispere vodom i osuši. Sirovo jedinjenje **3** (2,4 g, 99%) se prekrystalise iz metanola (t.t. 255°C, lit.¹⁶³ t.t. 255°C).

4.3. 3 β -HIDROKSI-17-OKSO-16,17-SEKOANDROST-5-EN- 16-NITRIL (4)



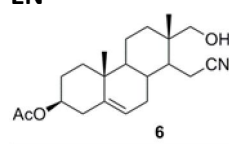
Jedinjenje **3** (7,44 g, 23,29 mmol) se rastvori u apsolutnom piridinu (104 mL), a zatim doda *p*-toluensulfonil-hlorid (13,39 g, 70,24 mmol). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku 25 minuta, nakon èega se izlije u smešu leda i vode (400 mL), a zatim zakiseli sa hlorovodoniènom kiselinom (1:1) do pH 1. Dobijen beo talog se procedi i osuši. Sirovi proizvod se preèisti fleš hromatografijom (petroletar – aceton, 3:1), pri èemu se dobija èisto jedinjenje **4** (4,98 g, 70%, t.t. 129-130°C nakon prekrystalizacije iz etanola, lit.¹⁶⁴ t.t. 130-131°C).

4.4. 3 β -ACETOKSI-17-OKSO-16,17-SEKOANDROST-5-EN- 16-NITRIL (5)



Jedinjenje **4** (4,98 g, 16,52 mmola) se rastvori u apsolutnom piridinu (50 mL), a zatim se doda acetanhidrid (100 mL). Reakciona smeša se ostavi na sobnoj temperaturi u toku 20 sati, a zatim izlije u smešu leda i vode (400 mL) i zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1. Beo talog se procedi i osuši, pri èemu se dobija jedinjenje **5** (5,40 g, 95%, t.t. 130-131°C nakon prekrystalizacije iz metanola, lit.¹⁶⁵ t.t. 131°C).

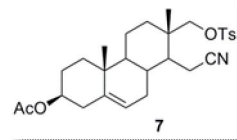
4.5. 3 β -ACETOKSI-17-HIDROKSI-16,17-SEKOANDROST-5-EN- 16-NITRIL (6)



Jedinjenje **5** (3 g, 8,73 mmol) se rastvori u etanolu (96%, 190 mL), a zatim se doda natrijum-borhidrid (0,66 g, 17,45 mmol). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku 10 minuta. Nakon isteka reakcionog vremena, sadržaj balona se izlije u vodu (500 mL) i

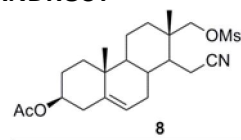
zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1. Sirov proizvod **6** (2,86 g, 95%) se dobija u obliku belog taloga koji se prekrstališe iz dietiletra (t.t. 162-164°C, lit.¹⁶⁵ t.t. 164°C).

4.6. 3 β -ACETOKSI-17-*p*-TOLUENSULFONILOKSI-16,17-SEKOANDROST-5-EN-16-NITRIL (**7**)



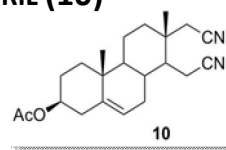
Rastvor sekocijano-alkohola **6** (5,3 g, 15,34 mmol) u apsolutnom piridinu (113 mL) se ohladi na 0°C, a zatim doda *p*-toluensulfonil-hlorid (12,2 g, 63,99 mmol). Reakciona smeša se ostavi na sobnoj temperaturi u toku 24 sata. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u smešu leda i vode (1000 mL), a zatim zakiseli do pH 1 sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1). Sirovi proizvod se prekrstališe iz smeše *n*-heksan – aceton, pri čemu se dobija čisto jedinjenje **7** u obliku belih kristala (6,8 g, 89%, t.t. 156-159°C, lit.¹⁶⁵ t.t. 164°C).

4.7. 3 β -ACETOKSI-17-METANSULFONILOKSI-16,17-SEKOANDROST-5-EN-16-NITRIL (**8**)



Rastvor jedinjenja **6** (0,5 g, 1,45 mmol) u apsolutnom piridinu (16 mL) se ohladi na 0°C, a zatim doda metansulfonil-hlorid (0,9 mL, 1,32 g, 11,52 mmol). Reakciona smeša se ostavi na 4°C u toku 22 sata, a zatim izlije u 100 ml leda. Nakon zakišeljavanja reakcione smeše do pH 1 sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) izdvaja se beo talog koji se nakon ceđenja i sušenja prečisti fleš hromatografijom (toluen – etil-acetat, 3:1). Čisto jedinjenje **8** se dobija u prinosu od 0,53 g (86%, t.t. 178-179°C nakon prekrstalizacije iz smeše *n*-heksan – aceton, lit.¹⁶⁶ t.t. 178-179°C).

4.8. 3 β -ACETOKSI-16,17-SEKOANDROST-5-EN-16,17A-DINITRIL (**10**)



POSTUPAK A

Jedinjenje **7** (1,0 g, 2,0 mmol) se rastvori u suvom dimetilsulfoksidu (8 mL) i doda kalijum-cijanid (0,24 g, 3,68 mmol). Reakciona smeša se zagreva na 150-155°C u toku 75 minuta, u atmosferi argona nakon čega se izlije u zasićeni rastvor amonijum-hlorida (100 mL). Sirov proizvod koji se dobija u obliku smeđeg taloga se procedi i osuši, a zatim prečisti fleš hromatografijom (toluen – etil-acetat, 8:1). Čisto jedinjenje **10** se dobija u obliku belih kristala (572,7 mg, 84%, t.t. 166-169°C nakon prekrstalizacije iz etil-acetata).

POSTUPAK B

Jedinjenje **8** (1,40 g, 3,30 mmol) se rastvori u suvom dimetilsulfoksidu (15 mL) i doda natrijum-cijanid (0,25 g, 5,10 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks u toku 7,5 sati u atmosferi argona. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u zasićeni rastvor amonijum-hlorida (600 mL), pri čemu se izdvaja smeđ talog (1,07 g). Sirovi proizvod se hromatografski prečisti na stubu silikagela (100 g silikagela, toluen – etil-acetat, 8:1) nakon čega se dobija čisto jedinjenje **10** (0,74 g, 63%).

POSTUPAK C

Rastvor jedinjenja **6** (145 mg, 0,42 mmol) u smeši apsolutnog piridina (0,2 mL) i apsolutnog metilen-hlorida (4 mL) se ohladi na -10°C , a zatim doda ohlađen rastvor anhidrida trifluormetansulfonske kiseline (0,2 mL, 1,19 mmol) u apsolutnom metilen-hloridu (2 mL). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku 4 sata. Nakon isteka reakcionog vremena, u reakcionu smešu se doda ohlađena 10% hlorovodonična kiselina do pH 1 i vrši ekstrakcija metilen-hloridom (3 x 5 mL). Organski sloj se ispere vodom do neutralne sredine, osuši i upari, pri čemu se dobija jedinjenje **9** koje se odmah koristi za dalju reakciju.

Jedinjenje **9** se rastvori u suvom dimetilsulfoksidu (1,5 mL) i doda kalijum-cijanid (53 mg, 0,81 mmol), a zatim se meša na sobnoj temperaturi u toku 18,5 sati u atmosferi argona. Nakon isteka reakcionog vremena reakciona smeša se izlije u zasićeni rastvor amonijum-hlorida i dobijeni talog procedi. Nakon hromatografskog prečišćavanja (6 g, toluen – etil-acetat, 10:1) dobija se čisto jedinjenje **10** (45 mg, 30%).

IR spektar (KBr, cm^{-1}): 2944, 2909, 2856, 2237, 1734, 1723, 1247, 1030.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,05 (s, 3H, H-19); 1,15 (s, 3H, H-18); 2,05 (s, 3H, CH_3 , Ac); 2,38 (s, 2H, H-17); 2,57 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 17,7$ Hz, $J_{15a,14} = 5,5$ Hz, H-15a); 4,61 (m, 1H, H-3); 5,39 (m, 1H, H-6).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,60 (C-15); 19,08; 19,12; 20,13; 21,41 (CH_3 , Ac); 27,46; 31,09; 31,61; 31,98; 36,49; 36,65; 36,79; 37,59; 38,08; 45,82; 48,63; 73,43 (C-3); 117,10 (CN); 118,29 (CN); 120,97 (C-6); 139,39 (C-5); 170,54 (C=O, Ac).

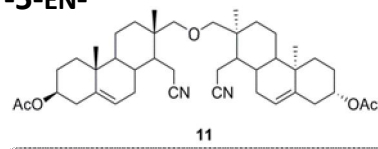
M spektar: 295 ($M^+ + 1$ - AcOH)

Elementalna mikroanaliza, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot x/4\text{H}_2\text{O}$ (358,99):

Izračunato: C%, 73,60; H%, 8,56; N%, 7,84

Nađeno: C%, 73,82; H%, 8,84; N%, 7,93

4.9. DI-(3 β -ACETOKSI-16,17-SEKOANDROST-5-EN-16-NITRIL-17-IL)-ETAR (11)



Jedinjenje **8** (1 g, 2,36 mmol) se rastvori u suvom dimetilsulfoksidu (13 mL) i doda natrijum-cijanid (0,19 g, 3,88 mmol). Reakciona smeša se zagreva na tački ključanja, uz mešanje, u toku 10 sati u atmosferi argona. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u zasićeni rastvor amonijum-hlorida (500 mL) i dobijeni talog se procedi. Sirov proizvod se hromatografski prečisti na koloni silikagela (50 g, toluen – etil-acetat, 20:1) pri čemu se dobijaju jedinjenje **11** (0,21 g, 27%, t.t. 155-156°C nakon prekrizacije iz metanola) i jedinjenje **10** (0,08 g, 2%).

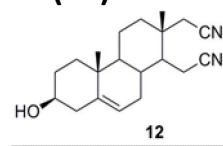
Jedinjenje **11**

IR spektar (KBr, cm^{-1}): 2944, 2854, 2242, 1731, 1252, 1039.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,05 (s, 6H, H-19 i H-19'), 1,07 (s, 6H, H-18 i H-18'); 2,04 (s, 6H, 2CH₃, Ac); 2,50 (dd, 2H, $J_{\text{gem}} = 17,9$ Hz, $J_{15a,14} = 5,4$ Hz, H-15a i H-15a'); 3,35 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11,6$ Hz, H-17a i H-17a'); 3,53 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11,6$ Hz, H-17b i H-17b'); 4,60 (m, 2H, H-3 i H-3'); 5,38 (m, 2H, H-6 i H-6').

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 14,96 (C-15); 18,10 (C-18 i C-18'); 19,09 (C-19 i C-19'); 19,96; 27,48; 31,58; 35,49; 36,49; 37,61; 42,63; 48,77; 54,44 (C-17 i C-17'); 73,51 (C-3 i C-3'); 118,76 (2CN); 121,16 (C-6 i C-6'); 139,35 (C-5 i C-5'); 170,47 (2C=O).

4.10. 3 β -HIDROKSI-16,17-SEKOANDROST-5-EN-16,17A-DINITRIL (12)



POSTUPAK A

Jedinjenje **10** (1,16 g, 3,27 mmol) se zagreva sa rastvorom natrijum-etoksida u etanolu (0,1 M, 50 mL) na 50-55°C u toku jednog sata. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (300 mL) i zakiseli hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1. Dobijeni beli talog se procedi i osuši. Dobija se jedinjenje **12** (1,01 g, 99%, t.t. 158-161°C nakon prekrizacije iz etil-acetata) u obliku belih kristala.

POSTUPAK B

Rastvor jedinjenja **13** (99,9 mg, 0,21 mmol) u apsolutnom THF (5,5 mL) se ohladi na 0°C i doda se dietil-aluminijum-cijanid (1,2 mL). Reakciona smeša se zagreva na tački ključanja u toku 18 sati, u atmosferi argona. Po isteku reakcionog vremena, reakcionoj smeši se doda hlorovodonična kiselina (1:1) (2,5 mL) i ostavi da se meša u toku jednog sata na sobnoj temperaturi. Proizvod se ekstrahuje etil-acetatom (4 x 5 mL), a zatim hromatografski prečisti

na stubu silikagela (8 g, toluen – etil-acetat, 5:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **12** (5,7 mg, 9%).

IR spektar (KBr, cm^{-1}): 3480, 2967, 2939, 2898, 2246, 1052.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,03 (s, 3H, H-19); 1,13 (s, 3H, H-18); 2,38 (s, 2H, H-17); 2,57 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 17,7$ Hz, $J_{15\text{a},14} = 5,5$ Hz, H-15a); 3,53 (m, 1H, H-3); 5,36 (m, 1H, H-6).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,61 (C-15); 19,09; 19,20; 20,17; 31,05; 31,28; 31,62; 32,10; 36,64; 36,68; 36,73; 38,09; 41,70; 45,87; 48,72; 71,35 (C-3); 117,12 (CN); 118,37 (CN); 120,04 (C-6); 140,42 (C-5).

CI M spektar: m/e 313 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

HRMS (TOF) m/z : $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ izračunato: 335,20938; nađeno: 335,20906.

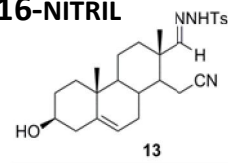
Elementalna mikroanaliza, $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O} \times \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (321,46):

Izračunato: C%, 74,72; H%, 9,09; N%, 8,71

Nađeno: C%, 74,38; H%, 9,31; N%, 8,77

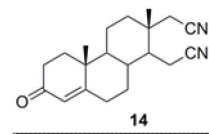
4.11. 3 β -HIDROKSI-17-OKSO-16,17-SEKOANDROST-5-EN-16-NITRIL

P-TOLUENSULFONILHIDRAZON (**13**)



Sekocijano-aldehid **4** (0,495 g, 1,64 mmol) se rastvori u apsolutnom etanolu (20 mL) i doda se *p*-toluensulfonilhidrazid (0,55 g, 2,95 mmol). Reakciona smeša se zagreva na tački ključanja u toku 2 sata, a zatim ostavi da stoji na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon toga se reakciona smeša izlije u vodu (200 mL), dobijeni talog se procedi, ispere vodom i osuši. Sirov proizvod se prečisti fleš hromatografijom (toluen – etil-acetat, 1:1) pri čemu se dobija čisto jedinjenje **13** (0,664 g, 86%, t.t. 190°C nakon prekrizacije iz benzena, lit.¹⁶⁸ t.t. 190°C uz razlaganje).

4.12. 3-OKSO-16,17-SEKOANDROST-4-EN-16,17A-DINITRIL (**14**)



POSTUPAK A

Jedinjenje **12** (1,06 g, 3,41 mmol) se rastvori u cikloheksanonu (100 mL) i apsolutnom toluenu (300 mL), sklopi se aparatura za destilaciju i smeša se zagreje do tačke ključanja. Nakon početka destilacije započinje se sa dokapavanjem suspenzije aluminijum-izopropoksida (1,39 g, 6,81 mmol) u apsolutnom toluenu (35 mL) u trajanju od oko 20 minuta. Reakciona

smeša se dalje zagreva na tački ključanja u toku 4 sata, uz istovremenu destilaciju. Po isteku reakcionog vremena, reakciona smeša se zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1, a višak cikloheksanona i toluena se ukloni destilacijom sa vodenom parom. Nakon završene destilacije, proizvod se ekstrahuje metilen-hloridom (4 x 20 mL), organski ekstrakt se osuši i upari. Sirov proizvod se prečisti fleš hromatografijom (toluen – etil-acetat, 30:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **14** (0,92 g, 87%, t.t. 128°C nakon prekrizacije iz smeše *n*-heksan – etil-acetat).

POSTUPAK B

Jedinjenje **12** (0,22 g, 0,71 mmol) se rastvori u cikloheksanonu (6 mL) i doda se prethodno osušeni aluminijum-izopropoksid (0,24 g, 1,18 mmol). Reakciona smeša se zagreva na tački ključanja u toku 3 sata. Nakon hlađenja do sobne temperature, reakciona smeša se obradi kako je opisano u Postupku A, pri čemu se dobija čisto jedinjenje **14** (0,10 g, 44%).

IR spektar (KBr, cm^{-1}): 2930, 2855, 2243, 1661, 1624, 1437, 1390, 1215, 735.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,17 (s, 3H); 1,22 (s, 3H); 2,61 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 18,1$ Hz, $J_{15a,14} = 6,0$ Hz, H-15a); 5,77 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,80 (C-15); 17,50 (C-19); 19,09 (C-18); 20,28; 31,04; 31,15; 32,20; 33,75; 35,41; 35,77; 36,71; 38,29; 38,51; 44,87; 52,33; 116,87 (CN); 118,09 (CN); 124,08 (C-4); 168,68 (C-5); 198,93 (C-3).

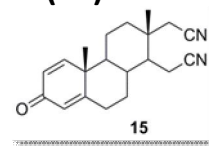
HRMS (TOF) m/z : $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 311,21179; nađeno: 311,21204.

Elementalna mikroanaliza, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O} \times 0,1\text{H}_2\text{O}$ (312,43):

Izračunato: C%, 76,81; H%, 8,39; N%, 8,96

Nađeno: C%, 76,93; H%, 8,39; N%, 8,97

4.13. 3-OKSO-16,17-SEKOANDROSTA-1,4-DIEN-16,17A-DINITRIL (**15**)



POSTUPAK A

Jedinjenje **14** (204 mg, 0,66 mmol) se rastvori u apsolutnom toluenu (9 mL) i doda se DDQ (296 mg, 1,32 mmol), TFA (0,02 mL, 0,26 mmol) i BSTFA (0,8 mL, 2,98 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz reflux u atmosferi argona u toku 6 sati. Nakon isteka reakcionog vremena sadržaj balona se ispira zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata sve dok se vodeni sloj boji žuto, a zatim organski sloj osuši i upari. Sirov proizvod se prečisti fleš hromatografijom (toluen – etil-acetat, 15:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **15** (91,4 mg, 45%, t.t. 180°C nakon prekrizacije iz smeše *n*-heksan – etil-acetat).

POSTUPAK B

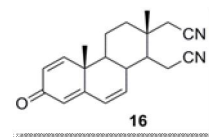
Jedinjenje **14** (50,5 mg, 0,16 mmol) se rastvori u apsolutnom benzenu (3 mL) i doda se DDQ (47 mg, 0,21 mmol). Reakciona smeša se zagreva na tački ključanja, u atmosferi argona, u toku 10 sati. Nakon isteka reakcionog vremena, reakcionoj smeši se doda benzen (10 mL) i procedi od neizreagovanog DDQ. Filtrat se ispere sa zasićenim rastvorom natrijum-karbonata, a organski sloj se osuši i upari. Sirov proizvod se hromatografski prečisti (17 g, toluen – etil-acetat, 10:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **15** (14,2 mg, 28%).

IR spektar (KBr, cm^{-1}): 2944, 2857, 2243, 1662, 1623, 1604, 755.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,20 (s, 3H); 1,26 (s, 3H); 6,11 (s, 1H, H-4); 6,26 (dd, 1H, $J_{1,2} = 10,4$ Hz, $J_{2,4} = 1,8$ Hz, H-2); 7,03 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-1).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 16,04 (C-15); 18,78 (C-19); 19,16 (C-18); 21,91; 30,96; 32,12; 32,78; 35,67; 36,91; 38,21; 42,89; 44,76; 50,54; 116,71 (CN); 117,97 (CN); 124,06 (C-4); 128,10 (C-2); 154,10 (C-1); 166,82 (C-5); 185,81 (C-3).

HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 309,19614; nađeno: 309,19609.

4.14. 3-OKSO-16,17-SEKOANDROSTA-1,4,6-TRIEN-16,17A-DINITRIL (16)

Jedinjenje **12** (47,9 mg, 0,15 mmol) se rastvori u apsolutnom dioksanu (2 mL) i doda se DDQ (47 mg, 0,21 mmol). Reakciona smeša se zagreva na tački ključanja, u atmosferi argona, u toku 10 sati. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u zasićen rastvor natrijum-karbonata (10 mL), ekstrahuje metilen-hloridom (5 x 10 mL), a organski sloj se osuši i upari. Sirov proizvod se hromatografski prečisti na koloni silikagela (4,5 g, toluen – etil-acetat, 10:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **16**, u obliku čvrstog ulja (20,2 mg, 43%).

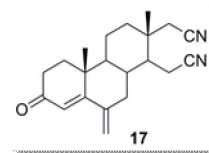
IR spektar (film, cm^{-1}): 3018, 2934, 2245, 1727, 1652, 1602, 1456.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,23 (s, 3H); 1,26 (s, 3H); 5,31 (s, 1H, H-4); 6,12 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz, H-6); 6,30 (dd, 1H, $J_{1,2} = 10,2$ Hz, $J_{2,4} = 1,7$ Hz, H-2); 6,42 (dd, 1H, $J_{6,7} = 10,0$ Hz, $J_{7,8} = 2,8$ Hz, H-7); 7,07 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-1).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,77 (C-15); 19,12 (C-19); 20,56 (C-18); 21,14; 30,94; 37,01; 38,09; 38,21; 40,84; 42,91; 46,74; 116,63 (CN); 117,81 (CN); 124,61 (C-4); 128,68 (C-2); 129,85 (C-6); 133,11 (C-7); 151,68 (C-1); 160,17 (C-5); 185,95 (C-3).

HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 307,18049; nađeno: 307,18130.

**4.15. 6-METILEN-3-OKSO-16,17-SEKOANDROST-4-EN-
16,17A-DINITRIL (17)**



Jedinjenje **14** (270 mg, 0,87 mmol), trietilortoformijat (0,57 mL, 0,51 g, 3,78 mmol), *p*-toluensulfonska kiselina (8,2 mg, 0,04 mmol), apsolutni etanol (0,4 mL) i apsolutni tetrahidrofuran (2,8 mL) se zagrevaju na 55°C, u toku jednog sata, uz mešanje. Nakon toga, reakcionoj smeši se doda nova količina *p*-toluensulfonske kiseline (8,2 mg, 0,04 mmol) i zagreva se još 3 sata na 55°C. Zatim se u reakcionu smešu doda 40% formaldehid (0,23 mL, 8,29 mmol) i *N*-metilanilin (0,23 mL, 0,23 g, 2,13 mmol) i zagreva na 55°C u toku 4 sata. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se ohladi na 0°C, doda se koncentrovana hlorovodonična kiselina (1,5 mL) i reakciona smeša meša na sobnoj temperaturi u toku jednog sata. Zatim se doda voda (75 mL) i nastavi se sa mešanjem još 2 sata. Nakon ekstrakcije proizvoda sa metilen-hloridom (3 x 15 mL), ekstrakt se osuši i upari. Sirovi proizvod se prečisti na koloni silikagela (35 g, petroletar – etil-acetat, 3:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **17** u obliku belih kristala (156,1 mg, 56%, t.t. 196-198°C nakon prekrystalizacije iz smeše *n*-heksan – etil-acetat).

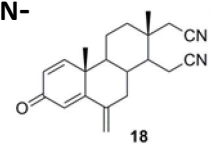
IR spektar (KBr, cm^{-1}): 3017, 2947, 2858, 2244, 1667, 1601, 754.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,12 (s, 3H); 1,16 (s, 3H); 5,08 (s, 1H, =CH₂); 5,16 (s, 1H, =CH₂); 5,94 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,71 (C-15); 17,21 (C-19); 19,07 (C-18); 20,18; 31,01; 33,64; 34,79; 35,75 (CH); 36,71; 38,14; 38,92; 39,08; 45,18 (CH); 51,02 (CH); 115,85 (=CH₂); 116,80 (CN); 117,92 (CN); 121,84 (C-4); 143,85 (C-6); 166,93 (C-5); 199,21 (C-3).

HRMS (TOF) m/z : $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 323,21179, nađeno: 323,21271.

**4.16. 6-METILEN-3-OKSO-16,17-SEKOANDROSTA-1,4-DIEN-
16,17A-DINITRIL (18)**



Jedinjenje **17** (56,4 mg, 0,18 mmol) se rastvori u apsolutnom toluenu (3 mL) i doda se DDQ (82,3 mg, 0,37 mmol), TFA (0,02 mL, 0,26 mmol) i BSTFA (0,22 mL, 0,82 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks u atmosferi argona u toku 22 sata. Nakon isteka reakcionog vremena sadržaj balona se ispira zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata dok se vodeni sloj boji žuto, a zatim organski sloj osuši i upari. Sirov proizvod se prečisti fleš hromatografijom (petroletar – etil-acetat, 2:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **18** u obliku čvrstog ulja (4,4 mg, 8%).

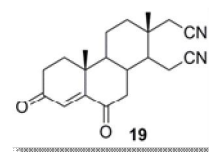
IR spektar (film, cm^{-1}): 2924, 2855, 2244, 1728, 1658, 1619.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,18 (s, 3H); 1,21 (s, 3H); 5,10 (s, 1H, $=\text{CH}_2$); 5,13 (s, 1H, $=\text{CH}_2$); 6,20 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, H-4), 6,30 (dd, 1H, $J_{1,2} = 10,2$ Hz, $J_{2,4} = 1,8$ Hz, H-2); 7,07 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-1).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,91 (C-15); 19,23 (C-19); 19,73 (C-18); 21,81 (CH_2); 31,00 (CH_2); 35,83 (CH); 36,90 (Cq); 38,13 (CH_2); 39,66 (CH_2); 43,14 (Cq); 45,11 (CH); 48,36 (CH); 113,78 ($=\text{CH}_2$); 116,62 (CN); 117,74 (CN); 122,72 (C-4); 128,29 (C-2); 143,71 (C-6); 152,89 (C-1); 165,90 (C-5); 186,02 (C-3).

HRMS (TOF) m/z : $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 321,19614, nađeno: 321,19606.

4.17. 3,6-DIOKSO-16,17-SEKOANDROST-4-EN- 16,17A-DINITRIL (19)



U ohlađeni rastvor (0°C) jedinjenja **12** (384,6 mg, 1,23 mmol) u acetonu (50 mL) dokapava se, uz intenzivno mešanje, *Jones-ov* reagens (3,43 g CrO_3 u 3 mL H_2SO_4 i 12 mL vode) dok se ne dobije postojana narandžasta boja. Reakciona smeša se meša na 0°C u toku 25 minuta. Reakcija se prekida izlivanjem u vodu (100 mL), vodeni rastvor se ekstrahuje metilen-hloridom (5 x 20 mL), a spojeni ekstrakti se osuše i rastvarač upari. Zaostalo ulje se prečisti fleš hromatografijom (petroletar – aceton, 2,5 : 1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **19** u obliku žutih kristala (252,6 mg, 65%, t.t. 195°C nakon prekrizalizacije iz smeše *n*-heksan – aceton).

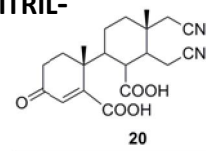
IR spektar (KBr, cm^{-1}): 2948, 2244, 1686.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,17 (s, 3H, H-18); 1,20 (s, 3H, H-19); 2,98 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 15,4$ Hz, $J_{15a,14} = 3,6$ Hz, H-15a); 6,30 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,55 (C-15); 17,50 (C-18); 19,20 (C-19); 19,89 (C-11); 30,90 (C-17); 33,82 (C-2 i C-8); 35,08 (C-1); 36,76 (C-10); 37,81 (C-12); 38,95 (C-13); 45,13 (C-7); 45,43 (C-9); 49,08 (C-14); 116,58 (CN); 117,34 (CN); 126,35 (C-4); 158,02 (C-5); 198,72 (C-3, CO); 199,20 (C-6, CO).

HRMS (TOF) m/z : $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 325,19105, nađeno: 325,18996.

**4.18. 3-OKSO-6,7:16,17-DISEKOANDROST-4-EN-16,17A-DINITRIL-
6,7-DIONSKA KISELINA (20)**



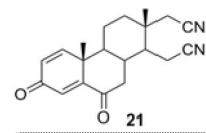
U rastvor jedinjenja **12** (0,41 g, 1,31 mmol) u acetonu (30 mL) dokapava se, uz intenzivno mešanje na sobnoj temperaturi, *Jones*-ov reagens (pripremljen na isti način kao u postupku 4.17.) dok se ne dobije postojana narandžasta boja. Reakciona smeša se meša u toku 75 min. Po završetku reakcije, reakciona smeša se izlije u vodu (100 mL), a proizvod ekstrahuje metilen-hloridom (4 x 30 mL). Spojeni ekstrakti se osuše i rastvarač upari. Zaostalo ulje se prečisti stubnom hromatografijom (30 g, toluen – etil-acetat, 1:3). Čisto jedinjenje **20** se dobija u obliku žutog ulja (0,13 g, 27%).

IR spektar (film, cm^{-1}): 3500-2300, 2243, 1697, 1605.

^1H NMR spektar (DMSO- D_6 , ppm): 0,92 (s, 3H, H-18); 1,43 (s, 3H, H-19); 6,29 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (DMSO- D_6 , ppm): 15,88 (C-15); 17,94 (C-18); 22,87 (C-19); 23,61; 28,39; 29,09; 33,51; 35,53; 37,19; 40,84; 42,61; 45,32; 48,64, 118,43 (CN); 119,12 (CN); 130,66 (C-4); 157,58 (C-5); 168,11 (C-7, COOH); 176,31 (C-6, COOH); 198,95 (C-3, C=O).

**4.19. 3,6-DIOKSO-16,17-SEKOANDROSTA-1,4-DIEN-
16,17A-DINITRIL (21)**



Jedinjenje **19** (252,6 mg, 0,79 mmol) se rastvori u apsolutnom toluenu (11 mL) i doda se DDQ (343 mg, 1,53 mmol), TFA (0,04 mL, 0,52 mmol) i BSTFA (0,95 mL, 3,54 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks u atmosferi argona u toku 42 sata. Nakon isteka reakcionog vremena sadržaj balona se ispira zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata sve dok se vodeni sloj boji žuto, a zatim organski sloj osuši i upari. Sirov proizvod se prečisti fleš hromatografijom (toluen – aceton, 8:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **21** u obliku ulja (28,1 mg, 11%).

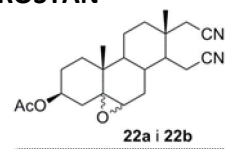
IR spektar (film, cm^{-1}): 3019, 2944, 2877, 2245, 1699, 1660, 1624.

^1H NMR spektar (Aceton- D_6 , ppm): 1,18 (s, 3H, H-18); 1,26 (s, 3H, H-19); 6,23 (dd, 1H, $J_{1,2} = 10,0$ Hz, $J_{2,4} = 1,9$ Hz, H-2); 6,28 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-4); 7,31 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz, H-1).

^{13}C NMR spektar (Aceton- D_6 , ppm): 15,94 (C-15); 18,57 (C-18); 19,10 (C-19); 22,52; 29,50; 35,94 (CH); 37,47; 38,32; 44,83; 46,29; 46,52 (CH); 48,18 (CH); 118,28 (CN);

119,79 (CN); 125,18 (C-4); 128,64 (C-2); 154,16 (C-1); 161,36 (C-5); 185,22 (C-3, CO); 198,89 (C-6, CO).

4.20. 5 α ,6 α - i 5 β ,6 β -EPOKSI-3 β -ACETOKSI-16,17-SEKOANDROSTAN- 16,17A-DINITRIL (**22a** i **22b**)



Jedinjenje **10** (206 mg, 0,58 mmol) se rastvori u metilen-hloridu (11 mL) i podesi pH na 8 pomoću zasićenog rastvora natrijum-hidrogenkarbonata. Reakciona smeša se ohladi na 0°C, zatim se doda *m*-hlorperbenzoeva kiselina (284,7 mg, 1,65 mmol) i meša na istoj temperaturi u toku jednog sata. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu, a zatim ekstrahuje metilen-hloridom (3 × 20 mL). Ekstrakti se spoje i isperu sa rastvorom natrijum-tiosulfata (5%, 20 mL), a zatim sa rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (10%, 20 mL). Nakon sušenja i uklanjanja sušila, rastvor se upari. Sirova smeša se hromatografski prečisti na stubu silikagela (25 g, toluen – etil-acetat, 7:1) pri čemu se dobija smeša jedinjenja **22a** i **22b** u obliku belih kristala (150 mg, 70%, t.t. 115°C nakon prekrizalizacije iz smeše *n*-heksan – aceton).

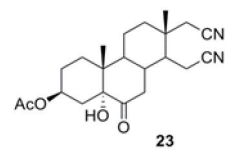
IR spektar (film, cm⁻¹): 3018, 2947, 2875, 2244, 1732, 1248, 756.

¹H NMR spektar (CDCl₃, ppm): 0,98 i 1,00 (2s, 3H, 2CH₃); 1,05 i 1,08 (2s, 3H, 2CH₃); 1,99 i 2,00 (2s, 3H, 2CH₃, Ac); 2,95 i 3,15 (2m, 1H, H-6 β i H-6 α); 4,72 i 4,90 (2m, 1H, 2H-3).

¹³C NMR spektar (CDCl₃, ppm): 15,33 i 15,80 (2C-15); 15,56; 16,85; 18,38; 18,90; 19,53; 20,84; 21,15; 26,76; 26,84; 28,50; 30,03; 30,78; 30,88; 31,15; 31,68; 31,94; 35,12; 35,23; 35,51; 36,13; 36,44; 37,32; 37,83; 41,36; 45,54; 46,00; 49,48; 58,11 i 62,65 (C-6); 61,90 i 64,53 (C-5); 70,80; 116,99 (CN); 118,14 i 118,51 (2CN); 170,06 i 170,32 (C=O).

HRMS (TOF) m/z: C₂₂H₃₀N₂O₃: [M+H]⁺ izračunato 371,23292, nađeno 371,23424.

4.21. 3 β -ACETOKSI-5 α -HIDROKSI-6-OKSO-16,17-SEKOANDROSTAN- 16,17a-DINITRIL (**23**)



POSTUPAK A

Smeša epoksida **22a** i **22b** (92,3 mg, 0,25 mmol) se rastvori u acetonu (5 mL), zatim se rastvor ohladi na 0°C i doda ohlađeni vodeni rastvor hrom(VI)-oksida (3,3 M) do postojane narandžaste boje. Reakciona smeša se meša na 0°C u toku 30 minuta, a zatim na sobnoj

temperaturi u toku 24 sata. Nakon toga se na 0°C doda nova količina rastvora hrom(VI)-oksida i nastavi mešanje na sobnoj temperaturi naredna 24 sata. Reakciona smeša se zatim izlije u vodu (100 mL) i ekstrahuje metilen-hloridom (3 x 25 mL). Spojeni ekstrakti se osuše, a rastvarač upari. Sirov proizvod se prekrystalise iz smeše *n*-heksan – aceton, pri čemu se dobija čisto jedinjenje **23** (83,9 mg, 87%, t.t. 206-208°C) u obliku belih kristala.

POSTUPAK B

Rastvor jedinjenja **10** (0,38 g, 1,07 mmol) u metilen-hloridu (6 mL) se ohladi na 0°C, a zatim doda *m*-hlorperbenzoeva kiselina (0,26 g, 1,51 mmol). Reakciona smeša se zagreje do sobne temperature na kojoj se meša u toku 90 minuta. Nakon toga se u reakcionu smešu doda aceton (14 mL), rastvor se ohladi na 0°C i doda vodeni rastvor hrom(VI)-oksida (0,10 g, 1 mmol u 0,30 mL vode). Reakciona smeša se zagreje do sobne temperature na kojoj se meša u toku 20 minuta. Zatim se smeša ponovo ohladi na 0°C i doda nova količina vodenog rastvora hrom(VI)-oksida (0,05 g u 0,15 mL vode). Rastvor se dalje meša na sobnoj temperaturi u toku narednih 50 minuta. Kada je reakcija završena, reakciona smeša se izlije u vodu (50 mL) i ekstrahuje etil-acetatom (2 x 50 mL). Ekstrakti se spoje i isperu vodom (9 x 50 mL), zatim 10% rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (5 x 50 mL), vodom (2 x 50 mL) i na kraju zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (1 x 50 mL). Nakon sušenja i uklanjanja sušila i rastvarača, sirov proizvod se prečisti fleš hromatografijom (toluen – etil-acetat, 2:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **23** (0,41 g, 97%).

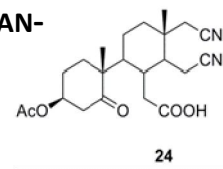
IR spektar (film, cm⁻¹): 3446, 3019, 2947, 2875, 2245, 1715, 1246, 755.

¹H NMR spektar (Aceton-D₆, ppm): 0,83 i 1,08 (2s, 3H, H-18 i H-19); 1,96 (s, 3H, CH₃, Ac); 2,30 (dd, 1H, $J_{7a,7e} = 12,9$ Hz, $J_{7e,8} = 4,8$ Hz, H-7β); 2,55 (dd, 1H, $J_{15a,15b} = 18,2$ Hz, $J_{15a,14} = 4,2$ Hz, H-15a); 2,71 (dd, 1H, $J_{15a,15b} = 18,2$ Hz, $J_{15b,14} = 4,8$ Hz, H-15b); 2,89 (dd, 1H, $J_{7a,7e} = 12,9$ Hz, $J_{7a,8} = 12,0$ Hz, H-7α); 4,91 (s, 1H, OH); 5,04 (m, 1H, H-3).

¹³C NMR spektar (Aceton-D₆, ppm): 13,88 (CH₃); 15,68 (C-15); 18,58 (CH₃); 21,05 (CH₃, Ac); 21,09; 26,95; 30,00; 30,50; 32,85; 37,59; 38,58; 38,89; 41,32; 42,30; 43,99; 46,66; 70,76 (C-3); 79,69 (C-5); 118,36 (CN); 119,83 (CN); 170,36 (CO, Ac); 210,34 (C-6, CO).

HRMS (TOF) m/z: C₂₂H₃₀N₂O₄: [M+NH₄]⁺ izračunato 404,25438, nađeno 404,25380; [M+Na]⁺ izračunato 409,20978, nađeno 409,20897.

4.22. 3 β -ACETOKSI-5-OKSO-5,6:16,17-DISEKOANDROSTAN- 16,17A-DINITRIL-6-ONSKA KISELINA (24)



Smeša epoksida **22a** i **22b** (1,24 g, 3,35 mmol) se rastvori u acetonu (67 mL), a zatim rastvor ohladi na 0°C i doda ohlađeni vodeni rastvor hrom(VI)-oksida (26 mL, 3,5 M, 91 mmol). Reakciona smeša se meša na 0°C u toku 30 minuta, a zatim na sobnoj temperaturi u toku 24 sati. Reakciona smeša se izlije u vodu (300 mL) i ekstrahuje metilen-hloridom (3 x 50 mL). Spojeni ekstrakti se osuše, a rastvarač upari. Sirov proizvod se prečisti stubnom hromatografijom (50 g, toluen – etil-acetat, 2:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **23** (0,33 g, 26%) u obliku belih kristala i jedinjenje **24** (0,43 g, 32%) u obliku bezbojnog ulja.

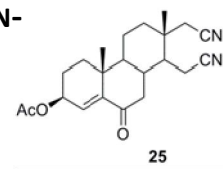
Jedinjenje 24

IR spektar (film, cm⁻¹): 3700-2500, 2245, 1790, 1728, 1600, 1458, 1427, 1379, 1274, 1128, 1074, 1037, 758.

¹H NMR spektar (CDCl₃, ppm): 0,90 i 1,30 (2s, 3H, H-18 i H-19); 1,99 (s, 3H, CH₃, Ac); 4,20 (m, 1H, H-3).

¹³C NMR spektar (CDCl₃, ppm): 10,81 (CH₃); 13,96 (CH₃); 15,97 (C-15); 17,39; 18,34; 21,11 (CH₃, Ac); 22,82; 23,58; 28,76; 29,52; 30,19; 31,04; 36,63; 38,56; 52,49; 68,03; 73,59 (C-3); 117,30 (CN); 118,65 (CN); 167,67 (COOH); 170,47 (C=O, Ac); 216,45 (C=O).

4.23. 3 β -ACETOKSI-6-OKSO-16,17-SEKOANDROST-4-EN- 16,17A-DINITRIL (25)



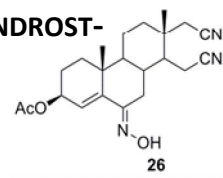
Rastvor jedinjenja **23** (0,45 g, 1,12 mmol) u apsolutnom piridinu (21 mL) se ohladi na 0°C i doda tionil-hlorid (0,76 mL, 1,27 g, 10,67 mmol). Reakciona smeša se meša na 0°C u toku 90 minuta. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (10 mL) i zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1, a zatim ekstrahuje sa metilen-hloridom (4 x 10 mL). Ekstrakti se spoje i osuše, a zatim rastvarač upari. Sirovi proizvod se prečisti fleš hromatografijom (petroletar – etil-acetat, 7:4), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **25** u obliku bezbojnog ulja (0,34 g, 80%),.

IR spektar (film, cm⁻¹): 2947, 2244, 1734, 1689, 1637, 1237, 754.

¹H NMR spektar (CDCl₃, ppm): 1,05 i 1,15 (2s, 3H, H-18 i H-19); 2,07 (s, 3H, CH₃, Ac); 2,52 (dd, 1H, $J_{15a,15b} = 18,1$ Hz, $J_{15a,14} = 5,5$ Hz, H-15a); 2,83 (dd, 1H, $J_{7a,7e} = 15,9$ Hz, $J_{7e,8} = 4,3$ Hz, H-7 β); 5,33 (m, 1H, H-3); 6,20 (m, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,41 (C-15); 19,09 (CH_3); 19,44 (CH_3); 19,70; 21,03 (CH_3 , Ac); 23,95; 30,81; 33,88; 34,01; 36,71; 37,56; 37,87; 44,66; 45,48; 49,28; 68,86 (C-3); 116,82 (CN); 117,66 (CN); 130,32 (C-4); 145,75 (C-5); 170,57 (C=O, Ac); 199,28 (C-6). HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ izračunato 386,24382, nađeno 386,24393.

4.24. 3β -ACETOKSI-(6E)-HIDROKSIIMINO-16,17-SEKOANDROST-4-EN-16,17A-DINITRIL (26)



Jedinjenje **25** (0,34 g, 0,92 mmol) se rastvori u apsolutnom piridinu (30 mL) i doda se hidroksilamin-hidroklorid (0,39 g, 5,59 mmol). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku 24 sata. Nakon isteka reakcionog vremena, iz reakcione smeše se ukloni piridin kodestilacijom sa benzenom, a zatim se doda voda (100 mL) i ekstrahuje etil-acetatom (4×30 mL). Spojeni ekstrakti se osuše i rastvarač upari, nakon čega se dobija jedinjenje **26** u obliku ulja (0,35 g, 99%).

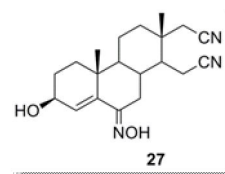
IR spektar (film, cm^{-1}): 3385, 3019, 2944, 2857, 2245, 1729, 1245, 756.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,02 i 1,14 (2s, 3H, H-18 i H-19); 2,06 (s, 3H, Ac); 3,63 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 15,1$ Hz, $J_{7e,8} = 4,8$ Hz, H-7 β); 5,28 (m, 1H, H-3); 5,78 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,59 (C-15); 18,54 (CH_3); 19,08 (CH_3); 19,87; 21,25 (CH_3 , Ac); 24,20; 28,62; 30,96; 33,70; 33,74; 36,81; 37,57; 38,09; 45,81 (C-9); 50,83 (C-14); 69,35 (C-3); 116,92 (CN); 118,06 (CN); 123,86 (C-4); 142,08 (C-5); 155,65 (C-6); 170,95 (C=O, Ac).

HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato 384,22817, nađeno 384,22719.

4.25. 3β -HIDROKSI-(6E)-HIDROKSIIMINO-16,17-SEKOANDROST-4-EN-16,17A-DINITRIL (27)



POSTUPAK A

U rastvor natrijum-etoksida u etanolu (0,1 M, 22 mL) doda se jedinjenje **26** (0,35 g, 0,92 mmol) i reakciona smeša se zagreva na 50-57°C u toku 2,5 sata. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (500 mL) i zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1. Proizvod se izdvaja u obliku taloga koji se procedi i ispere vodom do pH 6. Dobijeni talog se hromatografski prečisti na koloni silikagela (30 g, toluen – etil-acetat, 2:1), pri čemu se dobija jedinjenje **27**, u obliku belih kristala (0,197 g, 63%, t.t. 122-124 °C nakon prekrizalizacije iz benzena) i jedinjenje **28**, u obliku amorfnog taloga (0,075 g, 25%).

POSTUPAK B

U rastvor natrijum-etoksida u etanolu (0,1 M, 17 mL) se doda jedinjenje **26** (192 mg, 0,50 mmol) i reakciona smeša meša na sobnoj temperaturi u toku jednog sata. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (500 mL) i zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1. Dobijeni talog se procedi i ispere vodom do pH 6. Proizvod se prečisti fleš hromatografijom (petroletar – aceton, 1:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **27** (91 mg, 53%) u obliku belih kristala.

POSTUPAK C

U rastvor kalijum-hidroksida u metanolu (0,2 M, 4,5 mL) doda se jedinjenje **26** (94,7 mg, 0,25 mmol) i reakciona smeša meša na sobnoj temperaturi u toku jednog sata, u atmosferi argona. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (50 mL), zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1. Dobijeni talog se procedi i ispere vodom do pH 6. Proizvod se prečisti fleš hromatografijom (petroletar – etil-acetat, 1:6), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **27** (41 mg, 49%) u obliku belih kristala.

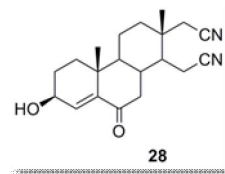
Jedinjenje **27**

IR spektar (film, cm^{-1}): 3336, 3057, 2931, 2855, 2245, 1455, 1267, 736.

^1H NMR spektar (Aceton- D_6 , ppm): 0,96 i 1,09 (2s, 3H, H-18 i H-19); 3,69 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 15,3$ Hz, $J_{7e,8} = 4,9$ Hz, H-7 β); 4,14 (m, 1H, H-3); 5,78 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,77 (C-15); 18,68; 19,13; 19,98; 28,31; 29,28; 31,04; 33,97; 34,07; 36,87; 37,85; 38,14; 45,86 (C-9); 50,98 (C-14); 66,85 (C-3); 116,99 (CN); 118,28 (CN); 129,60 (C-4); 139,86 (C-5); 157,39 (C-6).

HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato 342,21760, nađeno 342,21789.

4.26. 3 β -HIDROKSI-6-OKSO-16,17-SEKOANDROST-4-EN-16,17A-DINITRIL (28)**POSTUPAK A**

U rastvor kalijum-hidroksida u metanolu (2 M, 9 mL) doda se jedinjenje **25** (230 mg, 0,62 mmol) i reakciona smeša meša na tački ključanja u toku 2 sata, u atmosferi argona. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (30 mL), zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1 i ekstrahuje etil-acetatom (3 x 10 mL). Organski sloj se osuši i rastvarač upari. Sirov proizvod se hromatografski prečisti (15 g, toluen – etil-acetat, 5:1), pri čemu se dobija amorfnno jedinjenje **28** (80 mg, 40%).

POSTUPAK B

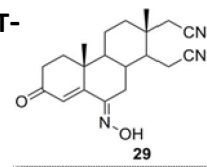
Rastvoru jedinjenja **19** (0,11 g, 0,34 mmol) u metanolu (5 mL) se doda kobalt(II)-hlorid heksahidrat (0,06 g, 0,25 mmol), a zatim se uz mešanje na sobnoj temperaturi dodaje natrijum-borhidrid (0,04 g, 0,10 mmol), u porcijama, u toku 8 minuta. Nakon 15 minuta reakcija je završena. Reakciona smeša se neutrališe sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1), a metanol upari. Nakon uparavanja, ostatak se rastvori u etil-acetatu (10 mL), ispere vodom (10 mL) i zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (10 mL), zatim osuši i upari. Sirov proizvod se prekrystalizuje iz smeše *n*-heksan – aceton, pri čemu se dobija amorfno jedinjenje **28** (0,07 g, 64%).

IR spektar (film, cm^{-1}): 3480, 2949, 2928, 2870, 2855, 2244, 1673, 1612, 1400, 1259.

^1H NMR spektar (DMSO- D_6 , ppm): 0,90 i 0,94 (s, 3H, H-18 i H-19); 4,06 (m, 1H, H-3); 5,03 (d, 1H, OH); 6,05 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (DMSO- D_6 , ppm): 14,74 (C-15); 17,85 (CH_3); 19,32; 19,37 (CH_3); 27,76; 29,25; 33,86; 34,21 (CH); 36,16; 37,09; 37,15; 44,61; 45,07 (CH); 48,75 (CH); 65,30 (C-3); 118,50 (CN); 119,97 (CN); 135,04 (C-4); 143,52 (C-5); 200,19 (C-6).

HRMS (TOF) m/z : $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato 327,20670, nađeno 327,20618.

4.27. (6E)-HIDROKSIIMINO-3-OKSO-16,17-SEKOANDROST-4-EN-16,17A-DINITRIL (29)

Jedinjenje **27** (91 mg, 0,26 mmol) se rastvori u piridinu (12 mL) i u kapima doda u rastvor hrom(VI)-oksid – piridinskog kompleksa, koji je prethodno pripremljen rastvaranjem hrom(VI)-oksida (0,35 g, 3,50 mmol) u piridinu (12 mL) na 0°C , u toku 2 sata. Kada se sav rastvor jedinjenja **27** doda u rastvor kompleksa, ledeno kupatilo se ukloni i reakciona smeša meša na sobnoj temperaturi u toku 75 minuta. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u 200 mL etil-acetata i filtrira. Filtrat se ispira prvo sa 10% HCl (3×20 mL), zatim 10% NaHCO_3 (3×20 mL) i zasićenim rastvorom NaCl (20 mL). Na kraju se filtrat osuši i rastvarač upari. Proizvod se prečisti fleš hromatografijom (petrol-etar – aceton, 3:1), pri čemu se dobija jedinjenje **29** u obliku belog praha (73 mg, 80%, t.t. $128\text{--}129^\circ\text{C}$ nakon prekrystalizacije iz smeše *n*-heksan – aceton).

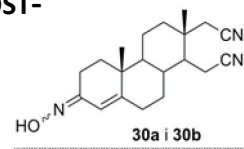
IR spektar (KBr, cm^{-1}): 3221, 3018, 2947, 2874, 2245, 1651, 1455, 1233, 756.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,17 i 1,64 (2s, 3H, H-18 i H-19); 2,69 (dd, 1H, $J_{15a,15b} = 18,1$ Hz, $J_{15a,14} = 5,5$ Hz, H-15); 3,68 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 15,4$ Hz, $J_{7e,8} = 4,9$ Hz, H-7 β); 6,63 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,54 (C-15); 16,48; 19,01; 19,82; 28,51; 30,92; 32,52; 33,35; 34,24; 36,67; 37,89; 38,28; 45,95 (C-9); 49,28 (C-14); 116,88 (CN); 117,99 (CN); 122,25 (C-4); 152,93 (C-5); 160,59 (C-6); 201,09 (C-3, C=O).

HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato 340,20195, nađeno 340,20154.

4.28. (3E) i (3Z)-HIDROKSIIMINO-16,17-SEKOANDROST-4-EN-16,17A-DINITRIL (30a i 30b)



Jedinjenje **14** (0,1 g, 0,32 mmol) se rastvori u etanolu (16 mL), a zatim se doda natrijum-acetat (34 mg, 0,41 mmol) i hidroksilamin-hidrohlorid (37 mg, 0,53 mmol). Reakciona smeša se zagreva na 70°C u toku 2 sata. Nakon isteka reakcionog vremena, etanol se ukloni uparavanjem, a u ostatak se doda voda (10 mL) i ekstrahuje sa metilen-hloridom (3 x 10 mL). Organski sloj se osuši i rastvarač upari. Sirov proizvod se hromatografski prečisti (15 g, toluen – aceton, 20:1), pri čemu se dobija smeša *E*- i *Z*- diastereoizomera, jedinjenja **30a** i **30b** (94,4 mg, 90%, t.t. $210\text{--}212^\circ\text{C}$ nakon prekrizalizacije iz smeše *n*-heksan – aceton), u obliku belih kristala.

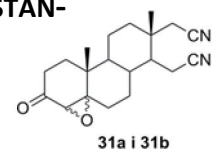
IR spektar (KBr, cm^{-1}): 3195, 3019, 2942, 2857, 2244, 1637, 1434, 1390, 962, 754.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,10 (s, 3H, CH_3); 1,15 (s, 3H, CH_3); 2,60 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 18,0$ Hz, $J_{15a,14} = 5,8$ Hz, H-15a); 3,07 i 3,14 (2m, 1H, H-2a); 5,92 (s, 1H, H-4, *E*-izomer); 6,55 (s, 1H, H-4, *Z*-izomer); 6,92 (bs, 1H, NOH).

^1H NMR spektar (DMSO- D_6 , ppm): 0,95 (s, 3H, CH_3); 1,00 (s, 3H, CH_3); 5,73 (s, 1H, H-4, *E*-izomer); 6,36 (s, 1H, H-4, *Z*-izomer); 10,27 (s, 1H, NOH, *Z*-izomer); 10,54 (s, 1H, NOH, *E*-izomer).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,23 (C-15); 17,72 (CH_3); 17,91 (CH_3); 18,49 i 20,08; 20,28 (CH_2); 29,51 (CH_2); 31,45 i 31,78 (CH_2); 31,97 i 32,60; 34,07; 35,76 i 36,23; 36,30 (CH); 36,43; 45,12 (CH); 52,04 i 52,28 (CH); 110,81 i 117,97 (C-4); 118,76 (CN); 120,34 (CN); 151,01 i 151,61 (C-5); 154,16 i 155,43 (C-3).

4.29. 4 α ,5 α - i 4 β ,5 β -EPOKSI-3-OKSO-16,17-SEKOANDROSTAN-16,17A-DINITRIL (31a i 31b)



Jedinjenje **14** (0,1 g, 0,32 mmol) se rastvori u metanolu (3,6 mL), a zatim se rastvor ohladi na 0°C i doda se vodeni rastvor natrijum-hidroksida (0,1 M, 0,25 mL, 0,025 mmol) i vodonik-peroksid (30%, 0,4 mL, 0,35 mmol). Reakciona smeša se ostavi na -14°C u toku 90

minuta. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (100 mL) i zakiseli do pH 1 sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1). Vodeni rastvor se ekstrahuje metilen-hloridom (3 x 20 mL), zatim se ekstrakt osuši i rastvarač upari. Sirovi proizvod se prečisti hromatografski na koloni silikagela (14 g, toluen – etil-acetat, 30:1), pri čemu se dobija prečišćena smeša 4 α ,5 α - i 4 β ,5 β -epoksida **31a** i **31b** u obliku bezbojnog ulja (0,031 g, 30%).

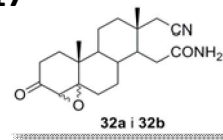
IR spektar (film, cm⁻¹): 3058, 2946, 2856, 2243, 1707, 1438, 1391, 1267, 861, 786, 736, 702.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): 1,17 i 1,18 (2s, 1H, H-19); 1,20 (s, 1H, H-18); 2,58 i 2,65 (2dd, 1H, $J_{gem} = 10,4$ Hz, $J_{15b,14} = 6,0$ Hz, H-15a); 3,04 i 3,11 (2s, 1H, H-4 α i H-4 β).

¹³C NMR (CDCl₃, ppm): 15,80 i 15,91 (C-15); 16,55 (C-18); 18,83 i 19,14 (C-19); 20,68; 25,86; 29,06 i 29,18; 29,67 i 29,78; 31,04 i 31,16; 32,40; 32,85; 35,28 i 35,52; 38,24 i 38,34; 44,70 i 44,90; 45,34; 49,28; 62,33 i 62,58 (C-4); 69,01 i 69,29 (C-5); 116,84 i 116,92 (C-20, CN); 118,04 i 118,09 (C-16, CN); 205,75 i 206,05 (C-3, CO).

HRMS (TOF) m/z: C₂₀H₂₆N₂O₂ [2M+H]⁺ izračunato: 653,40613; nađeno: 653,40750.

4.30. 4 α ,5 α - i 4 β ,5 β -EPOKSI-17-CIJANO-3-OKSO-16,17-SEKOANDROSTAN-16-AMID (**32a** i **32b**)



Jedinjenje **14** (0,298 g, 0,96 mmol) se rastvori na sobnoj temperaturi u metanolu (13 mL), a zatim se rastvoru doda natrijum-hidroksid (0,1 M, 0,85 mL, 0,085 mmol) i vodonik-peroksid (30%, 1,4 mL, 1,23 mmol). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku 5 minuta, a zatim se ostavi da stoji na 4°C u toku 25 minuta. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (100 mL) i zakiseli do pH 1 sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1). Vodeni rastvor se ekstrahuje metilen-hloridom (3 x 40 mL), zatim se ekstrakt osuši i rastvarač upari. Sirova smeša proizvoda se razdvoji na koloni silikagela (30 g, toluen – etil-acetat, 15:1, zatim toluen – etil-acetat, 1:1), pri čemu se dobija smeša 4 α ,5 α - i 4 β ,5 β -epoksida **31a** i **31b**, (0,072 g, 23%), i smeša jedinjenja **32a** i **32b**, u obliku žutog ulja (0,126 g, 38%).

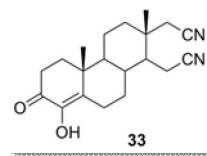
Jedinjenja **32a** i **32b**:

IR spektar (film, cm⁻¹): 3447, 3354, 3201, 3057, 2944, 2243, 1706, 1674, 1613, 736.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): 0,97 i 1,02 (2s, 1H, H-19); 1,11 (s, 1H, H-18); 2,96 i 3,04 (2s, 1H, H-4 α i H-4 β); 5,75 i 5,96 (2bs, 2H, NH₂).

¹³C NMR (CDCl₃, ppm): 16,49 (C-18); 18,07 i 18,78 (C-19); 20,68; 25,74; 29,37 i 29,43; 30,92 i 31,01; 32,42 i 32,84; 35,66 i 35,80; 36,27; 36,56; 36,94; 37,92; 38,05 i 38,41; 45,25 i 45,34; 49,52; 62,28 i 62,54 (C-4); 69,39 i 69,44 (C-5); 118,15 i 118,27 (CN); 174,39 i 174,58 (C-16, CONH₂); 205,91 i 206,57 (C-3, CO).

4.31. 4-HIDROKSI-3-OKSO-16,17-SEKOANDROST-4-EN- 16,17A-DINITRIL (33)



Smeša epoksida **31a** i **31b** (68,3 mg, 0,21 mmol) se rastvori u mravljoj kiselini (1 mL) i zagreva na tački ključanja u toku jednog sata. Nakon završetka reakcije reakcionoj smeši se doda voda (5 mL), zatim ekstrahuje metilen-hloridom (3 x 5 mL), organski sloj se osuši i upari. Sirov proizvod se prečisti fleš hromatografijom (toluen – etil-acetat, 2:1), pri čemu se dobijaju beli kristali jedinjenja **33** (28 mg, 41%, t.t. 129-130°C nakon prekrizalizacije iz smeše *n*-heksan – aceton).

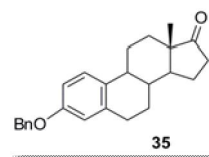
IR spektar (KBr, cm^{-1}): 3420, 2937, 2244, 1662, 1636, 1383, 1170.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,16 (s, 3H, H-19); 1,20 (s, 3H, H-18); 6,09 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,70 (C-15); 15,80 (CH_3); 17,25 (CH_3); 19,23; 22,62; 27,34; 30,28; 31,11; 31,22; 34,35; 35,35; 36,71; 38,48; 45,00 (C-14); 52,83 (C-9); 116,91 (CN); 118,13 (CN); 137,40 (C-4); 141,22 (C-5); 193,24 (C-3).

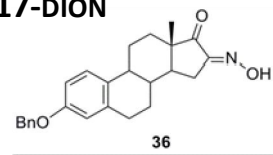
HRMS (TOF) m/z : $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 327,20670; nađeno: 327,20652.

4.32. 3-BENZILOKSIESTRA-1,3,5(10)-TRIEN-17-ON (35)



Jedinjenje **34** (5 g, 18,49 mmol) se rastvori u smeši acetona i metanola (1:1, 250 mL), a zatim doda kalijum-karbonat (5 g, 36,18 mmol) i benzil-hlorid (38,6 mL, 0,33 mmol). Smeša se zagreva uz refluks u toku 8 sati, nakon čega se ohladi i procedi radi uklanjanja kalijum-karbonata. Filtrat se upari, a višak benzil-hlorida ukloni destilacijom sa vodenom parom. Ostatak nakon destilacije se procedi, pri čemu se dobija jedinjenje **35** u obliku belog praha (6,12 g, 92%, t.t. 133-135°C nakon prekrizalizacije iz metanola, lit.¹⁷² t.t. 135-136°C).

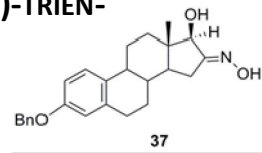
4.33. 3-BENZILOKSIESTRA-1,3,5(10)-TRIEN-16,17-DION 16-OKSIM (36)



Metalni kalijum (2,20 g, 56,40 mmol) se rastvori u *t*-butil-alkoholu (92 mL) u anhidrovanim uslovima. Dobijenom rastvoru kalijum *t*-butoksida u *t*-butil-alkoholu se doda benziletar estrona **35** (2,20 g, 6,10 mmol) i nakon 15 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se *i*-amil-nitrit (10,3 mL, 75,8 mmol). Reakciona smeša se meša u toku jednog sata, a zatim ostavi 18 sati na sobnoj temperaturi. Po isteku reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu i neutrališe hlorovodoničnom kiselinom (1:4). Dobijeni talog se procedi i osuši, pri

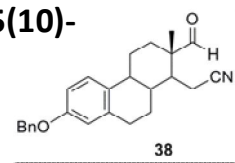
čemu se dobija jedinjenje **36** (2,21 g, 93%, t.t. 194-196°C nakon prekrizacije iz metanola, lit.¹⁷³ t.t. 193,5-195,5°C) u obliku belog praha.

4.34. 3-BENZILOKSI-17 β -HIDROKSIESTRA-1,3,5(10)-TRIEN-16-ON OKSIM (37)



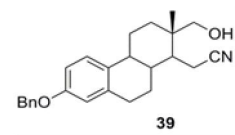
Oksimino-keton **36** (7,32 g, 18,77 mmol) rastvori se uz zagrevanje u smeši metanola (150 mL) i metilen-hlorida (60 mL), uz dodatak 1%-nog vodenog rastvora kalijum-hidroksida (220 mL). Ohlađenom rastvoru se doda natrijum-borhidrid (1,42 g, 37,56 mmol) u porcijama, uz mešanje. Nakon mešanja reakcione smeše na sobnoj temperaturi u toku 30 minuta, doda se glacialna sirćetna kiselina do pH 5. Organski sloj se odvoji i upari, a zaostalo ulje tretira acetonom, pri čemu proizvod očvrzne. Izdvojeni kristali se isperu vodom do pH 7 i osuše, pri čemu se dobija jedinjenje **37** (6,4 g, 93%, t.t. 193-194°C nakon prekrizacije iz metanola, lit.¹⁷¹ t.t. 195-196°C) u obliku belih kristala.

4.35. 3-BENZILOKSI-17-OKSO-16,17-SEKOEESTRA-1,3,5(10)-TRIEN-16-NITRIL (38)



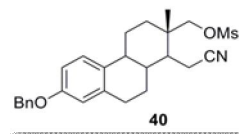
Jedinjenje **37** (4,78 g, 12,2 mmol) i *p*-toluensulfonil-hlorid (7,31 g, 47,16 mmol) se rastvori u apsolutnom piridinu (30 mL). Reakciona smeša se meša 3 sata na sobnoj temperaturi, a zatim se izlije u smešu leda i vode (400 mL) i zakiseli pomoću hlorovodonične kiseline (1:1) do pH 3. Izdvojeni talog se procedi, ispere vodom do pH 7 i osuši. Hromatografskim prečišćavanjem na koloni silikagela (400 g, toluen – etil-acetat, 19:1) dobija se čisto jedinjenje **38** (1,94 g, 43%, t.t. 137°C nakon prekrizacije iz metanola, lit.¹⁷¹ t.t. 137-138°C).

4.36. 3-BENZILOKSI-17-HIDROKSI-16,17-SEKOEESTRA-1,3,5(10)-TRIEN-16-NITRIL (39)



Jedinjenje **38** (1,54 g, 4,13 mmol) se rastvori u etanolu (95%, 20 mL), a zatim se doda natrijum-borhidrid (0,40 g, 1,06 mmol). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi, u toku 30 minuta. Po isteku reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u vodu (50 mL) i zakiseli do pH 1 sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1), pri čemu se izdvaja jedinjenje **39** u obliku belog taloga (1,53 g, 99%, t.t. 134-136, lit.¹⁷¹ t.t. 135-136°C).

**4.37. 3-BENZILOKSI-17-METANSULFONILOKSI-16,17-SEKOESTRA-
1,3,5(10)-TRIEN-16-NITRIL (40)**



Rastvor jedinjenja **39** (1,53 g, 4,16 mmol) u apsolutnom piridinu (20 mL) se ohladi na 0°C, doda metansulfonil-hlorid (4 mL, 5,92 g, 51,68 mmol) i reakciona smeša se ostavi na 4°C u toku 22 sata. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se izlije u ledenu vodu (200 mL) i zakiseli sa hlorovodoničnom kiselinom (1:1) do pH 1. Dobijeni talog se procedi, a zatim hromatografski prečisti na koloni silikagela (102 g, toluen – etil-acetat, 10:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **40** u obliku ulja (0,90 g, 48%).

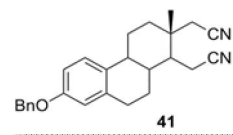
IR spektar (film, cm^{-1}): 3027, 2938, 2866, 2243, 1731, 1608, 1500, 1356, 1175, 960, 842, 754.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,05 (s, 3H, H-18); 2,65 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 17,9$ Hz, $J_{15a,14} = 5,4$ Hz, H-15a); 3,08 (s, 3H, CH_3 , Ms); 3,92 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 10,2$ Hz, H-17a); 4,19 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 10,2$ Hz, H-17b); 5,06 (s, 2H, CH_2 , Bn); 6,76-7,49 (grupa signala, 8H, aromatični protoni).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,42 (C-15); 15,77; 25,63; 26,80; 29,73; 35,51; 37,13; 37,89 (CH_3 , Ms); 39,07; 40,90; 42,43; 69,76 (CH_2 , Bn); 75,70 (C-17); 112,59; 114,28; 118,96 (CN); 126,24; 127,30; 127,74; 128,40; 131,45; 137,02; 137,28; 156,83 (C-3).

HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{NO}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 454,20466; nađeno: 454,20379.

**4.38. 3-BENZILOKSI-16,17-SEKOESTRA-1,3,5(10)-TRIEN-
16,17A-DINITRIL (41)**



Jedinjenje **40** (0,53 g, 1,38 mmol) se rastvori u dimetilsulfoksidu (15 mL) i doda se natrijum-cijanid (120 mg, 2,45 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz reflux u toku 7 sati u atmosferi azota. Po završetku reakcije, reakciona smeša se izlije u zasićen rastvor amonijum-hlorida (100 mL) i ekstrahuje metilen-hloridom (3 x 20 mL). Organski sloj se osuši i upari, a sirov proizvod hromatografski prečisti na koloni silikagela (50 g, toluen – etil-acetat, 10:1). Čisto jedinjenje **41** se dobija u obliku belih kristala (0,15 g, 34%, t.t. 144°C nakon prekrizalizacije iz smeše *n*-heksan – acetone).

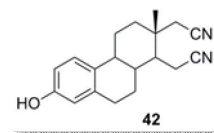
IR spektar (KBr, cm^{-1}): 3032, 2923, 2242, 1608, 1500, 1237, 1025.

^1H NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 1,15 (s, 3H, H-18); 2,67 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 17,8$ Hz, $J_{15a,14} = 5,4$ Hz, H-15a); 5,06 (s, 2H, CH_2 , Bn); 6,74-7,47 (grupa signala, 8H, aromatični protoni).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , ppm): 15,87 (C-15); 19,06 (C-18); 26,07; 26,99; 29,79; 31,20; 37,03; 38,52; 39,46; 42,58; 44,34; 69,94 (CH_2 , Bn); 112,77; 114,44; 117,12 (CN); 118,38 (CN); 126,33; 127,42; 127,88; 128,54; 131,28; 137,10; 137,28; 157,06 (C-3).

HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 385,22744; nađeno: 385,22694.

4.39. 3-HIDROKSI-16,17-SEKOESTRA-1,3,5(10)-TRIEN-16,17A-DINITRIL (42)



Jedinjenje **41** (47,8 mg, 0,16 mmol), metilen-hlorid (2,5 mL) i paladijum na ugljeniku (10%, 6,5 mg) se intenzivno mešaju na sobnoj temperaturi u atmosferi vodonika u toku 24 sata. Nakon toga doda se još jedna porcija paladijuma na ugljeniku (10%, 4,9 mg) i nastavi mešanje u atmosferi vodonika u toku naredna 24 sata. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se procedi od katalizatora preko celita, a rastvor se posle ceđenja upari, pri čemu se dobija sirovo jedinjenje **42** (35,7 mg, 98%), koje se prekrstališe iz smeše metilen-hlorid – metanol (t.t. 222°C).

IR spektar (KBr , cm^{-1}): 3344, 2944, 2921, 2254, 1611, 1508, 1446, 1230.

^1H NMR spektar (Aceton- D_6 , ppm): 1,11 (s, 3H, H-18); 2,64 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 18,0$ Hz, $J_{15\text{a},14} = 3,9$ Hz, H-15a); 6,56 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-4); 6,63 (dd, 1H, $J_{1,2} = 8,4$ Hz, $J_{2,4} = 2,6$ Hz, H-2); 7,15 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-1); 8,05 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR spektar (Aceton- D_6 , ppm): 16,01 (C-15); 18,68 (C-18); 27,02; 27,82; 30,50; 30,85; 37,56; 39,02; 41,12; 43,54; 45,54; 113,90; 115,65; 118,59 (CN); 120,17 (CN); 127,25; 131,07; 138,03; 156,24 (C-3).

HRMS (TOF) m/z: $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato: 295,18049; nađeno: 295,17978.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji su opisane sinteze novih androstanskih i estranskih 16,17-seko-16,17a-dinitrila. Antiproliferativna aktivnost odabranih novosintetizovanih jedinjenja testirana je *in vitro* na ćelijama humanih tumora.

U planiranoj sintezi 3 β -hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitrila (**12**) kao polazno jedinjenje poslužio je 3 β -hidroksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**4**) koji je dobijen iz dehidroepiandrosterona (**1**). Transformacija dehidroepiandrosterona (**1**) započeta je reakcijom oksiminovanja sa *n*-amil-nitritom u baznoj sredini, pri čemu je dobijen 3 β -hidroksiandrost-5-en-16,17-dion 16-oksim (**2**) u prinosu od 92%. Stereospecifičnom redukcijom jedinjenja **2** natrijum-borhidridom dobijen je isključivo 3 β ,17 β -dihidroksiandrost-5-en-16-on oksim (**3**), u prinosu od 99%. *Beckmann*-ovom fragmentacijom u D-prstenu jedinjenja **3** pomoću *p*-toluensulfonil-hlorida sintetizovan je 3 β -hidroksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**4**) u prinosu od 70%. Sinteza ciljnog 3 β -hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitrila (**12**) je urađena na dva načina. Prvi pravac obuhvatao je najpre zaštitu hidroksilne grupe u položaju C-3 kod jedinjenja **4** sa acetanhidridom pri čemu je 3 β -acetoksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**5**) sintetisan u prinosu od 95%. Zatim je redukovana aldehidna funkcija u položaju C-17, pri čemu je dobijen 3 β -acetoksi-17-hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**6**) u prinosu od 95%. U cilju uvođenja cijano funkcije u molekul i dobijanja 3 β -acetoksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitrila (**10**), bilo je neophodno C-17 hidroksilnu grupu jedinjenja **6** prevesti u bolju odlazeću grupu. Stoga je rađena reakcija tozilovanja jedinjenja **6** sa *p*-toluensulfonil-hloridom i 3 β -acetoksi-17-*p*-toluensulfoniloksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**7**) je dobijen u prinosu od 89%. Jedinjenje **6** je podvrgnuto i mezilovanju sa metansulfonil-hloridom, pri čemu je dobijen 3 β -acetoksi-17-metansulfoniloksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**8**) u prinosu od 86%. U reakciji jedinjenja **6** sa anhidridom trifluormetansulfonske kiseline dobijen je 3 β -acetoksi-17-trifluorometansulfoniloksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril (**9**) koji je odmah nakon obrade reakcione smeše korišćen za sledeću reakciju supstitucije. Jedinjenja **7**, **8** i **9** su zatim podvrgnuta reakciji supstitucije sa kalijum- ili natrijum-cijanidom, pri čemu se kao najpovoljniji postupak dobijanja jedinjenja **10** pokazao postupak supstitucije jedinjenja **7** sa kalijum-cijanidom u dimetilsulfoksidu, na 150-155°C u trajanju od 75 minuta. Pri reakciji jedinjenja **8** sa natrijum-cijanidom u dimetilsulfoksidu na tački ključanja, u trajanju od 10 sati kao glavni proizvod je nastao di-(3 β -acetoksi-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril-17-il)-etar (**11**)

u prinosu od 27%. U cilju uklanjanja acetoksi zaštite u položaju C-3, jedinjenje **10** je tretirano sa natrijum-etoksidom i dobijen je 3 β -hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitril (**12**) u prinosu od 99%. Drugi sintetski put dobijanja jedinjenja **12** iz jedinjenja **4** obuhvatao je dve sintetske faze. U prvoj fazi je jedinjenje **4** sa *p*-toulensulfonilhidrazidom prevedeno u 3 β -hidroksi-17-okso-16,17-sekoandrost-5-en-16-nitril *p*-toluensulfonilhidrazon (**13**) koji je u reakciji sa dietil-aluminijum-cijanidom dao jedinjenje **12**. Analizom dobijenih rezultata zaključeno je da je prvi sintetski put iako duži, povoljniji jer je ukupan prinos u odnosu na drugi sintetski put značajno veći.

Sa ciljem uvođenja 4-en-3-on sistema izvršena je *Oppenauer*-ova oksidacija jedinjenja **12** sa cikloheksanonom i aluminijum-izopropoksidom. Reakcija je izvedena na dva načina. Prema prvom načinu reakcionoj smeši je dodat toluen i uz zagrevanje je istovremeno vršena destilacija, dok je prema drugom načinu reakciona smeša zagrevana uz refluks, bez dodatka toluena. 3-Okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**14**) je dobijen u prinosu od 87%, odnosno 44%. Iz jedinjenja **14** je dobijen 1,4-dien-3-on derivat **15** reakcijom dehidrogenacije koja je izvedena pri različitim uslovima. Kao najpogodnija se pokazala reakcija jedinjenja **14** sa DDQ u apsolutnom toluenu u prisustvu TFA i BSTFA, pri čemu je nastao 3-okso-16,17-sekoandrosta-1,4-dien-16,17a-dinitril (**15**) u prinosu od 45%. U reakciji jedinjenja **12** sa DDQ u dioksanu dobijen je 3-okso-16,17-sekoandrosta-1,4,6-trien-16,17a-dinitril (**16**) u prinosu od 43%.

U cilju uvođenja metilenske grupe u položaj C-6 jedinjenje **14** je podvrgnuto reakciji sa trietilortoformijatom, u prisustvu *p*-toluensulfonske kiseline, nakon čega su dodati formaldehid i *N*-metilanilin. Dobijen je 6-metilen-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**17**) u prinosu od 56%. Jedinjenje **17** je podvrgnuto reakciji sa DDQ u prisustvu TFA i BSTFA, pri čemu je dobijen 6-metilen-3-okso-16,17-sekoandrosta-1,4-diena-16,17a-dinitril (**18**).

Za dobijanje 4-en-3,6-dionskog sistema izvršena je modifikovana *Jones*-ova oksidacija 5-en-3 β -ola **12**, pri čemu je dobijen 3,6-diokso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**19**) u prinosu od 65%. *Jones*-ovom oksidacijom jedinjenja **12** u koncentrovanijem acetonskom na višoj temperaturi i dužim reakcionim vremenom nastao je B-seko derivat **20**. U reakciji jedinjenja **19** sa DDQ, u prisustvu TFA i BSTFA dobijen je 3,6-diokso-16,17-sekoandrosta-1,4-diena-16,17a-dinitril (**21**) u prinosu od 11%.

Kao pogodan intermedijer za sintezu 16,17-seko-16,17a-dinitrila sa oksimino funkcijom u položaju C-6 poslužio je 3 β -acetoksi-5 α -hidroksi-6-okso-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitril (**23**), koji je dobijen iz jedinjenja **10**, na dva načina. Prvi način se sastojao iz dve sintetske faze. U prvoj fazi je oksidovana dvostruka veza u jedinjenju **10** sa *m*-hlorperbenzoevom kiselinom, u baznoj sredini, pri čemu je dobijena smeša 5 α ,6 α - (**22a**) i 5 β ,6 β -epoksida (**22b**), u prinosu od 70%. Smeša jedinjenja **22a** i **22b** je zatim podvrgnuta oksidativnom otvaranju oksiranskog prstena. Reakcija je izvedena na dva načina. Prvi način je podrazumevao dodavanje vodenog rastvora CrO₃ u acetonski rastvor polaznog jedinjenja, do postojeane narandžaste boje, pri čemu je dobijen 3 β -acetoksi-5 α -hidroksi-6-okso-16,17-

sekoandrostan-16,17a-dinitril (**23**) u prinosu od 87%. Kada je u acetonski rastvor smeše jedinjenja **22a** i **22b** odjednom dodat veliki višak aq CrO_3 , kao glavni proizvod reakcije dobijena je 5,6-seko-5-keto-6-kiselina **24**, dok je jedinjenje **23** dobijeno u prinosu od 26%. Jedinjenje **23** je dobijeno i bržim i jednostavnijim „one-pot“ postupkom. Naime, jedinjenje **10** je sa *m*-hlorperbenzoevom kiselinom dalo smešu $5\alpha,6\alpha$ - (**22a**) i $5\beta,6\beta$ -epoksida (**22b**), u koju je bez izolovanja proizvoda reakcije dodat aceton i vodeni rastvor hrom(VI)-oksida, pri čemu je dobijen 5α -hidroksi-6-keto derivat **23** u visokom prinosu od 97%. Dehidratacijom jedinjenja **23** sa tionil-hloridom dobijen je 3β -acetoksi-6-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**25**) u prinosu od 80%. Jedinjenje **25** je sa hidroksilaminom-hidrohloridom dalo 3β -acetoksi-(6*E*)-hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**26**) u prinosu od 99%. Zatim je jedinjenje **26** podvrgnuto reakciji uklanjanja acetatne zaštite. Kada je izvedena reakcija jedinjenja **26** sa natrijum-etoksidom u etanolu, na 50-57°C, nakon 2,5 sata dobijen je 3β -hidroksi-(6*E*)-hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**27**), u prinosu od 63%. Pored oksimino derivata **27** koji je dobijen kao glavni proizvod reakcije, pri ovim reakcionim uslovima je nastao i 6-keto derivata **28**, u prinosu od 25%. Istom reakcijom, ali na sobnoj temperaturi, u toku jednog sata, jedinjenje **27** je dobijeno u nešto nižem prinosu (53%). Uklanjanjem zaštite kod jedinjenja **26** sa kalijum-hidroksidom u metanolu, nakon jednog sata na sobnoj temperaturi, nastalo je jedinjenje **27** u prinosu od 49%. U cilju dobijanja 4-en-3-onkog sistema kod jedinjenja **27** je izvršena oksidacija hidroksilne grupe u položaju C-3 sa hrom(VI)-oksid-piridinskim kompleksom. Dobijen je (6*E*)-hidroksiimino-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**29**) u prinosu od 80%.

Polazeći od jedinjenja **14** sintetisani su i (3*E*)- i (3*Z*)-hidroksiimino-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitrili (**30a** i **30b**) u prinosu od 90%.

U cilju dobijanja 4-hidroksi-4-en-3-on sistema kod androstanskog 16,17-seko-16,17a-dinitrila, jedinjenje **14** je podvrgnuto reakciji sa 30%-nim vodonik-peroksidom, u prisustvu natrijum-hidroksida, na temperaturi od -14°C. Dobijena je smeša $4\alpha,5\alpha$ - i $4\beta,5\beta$ -epoksi-3-okso-16,17-sekoandrostan-16,17a-dinitrila (**31a** i **31b**), u prinosu od 30%. Kada je reakcija rađena na sobnoj temperaturi u toku 5 minuta, a zatim na 4°C u toku 25 minuta, smeša jedinjenja **31a** i **31b** je dobijena u prinosu od 23%, dok je kao glavni proizvod (38%) dobijena smeša jedinjenja **32a** i **32b**. Otvaranje oksiranskog prstena smeše epoksida **31a** i **31b** izvršeno je sa mravljom kiselinom pri čemu je dobijen 3-okso-4-hidroksi-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**33**) u prinosu od 41%.

U cilju ispitivanja uticaja strukture A prstena na biološku aktivnost, sintetisan je i 16,17-seko-16,17a-dinitril u estranskoj seriji. Kao polazno jedinjenje poslužio je 3-benziloksi-17-hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**39**) koji je dobijen transformacijom estrona (**34**) u pet sintetskih faza. Fenolna OH grupa jedinjenja **34** je zaštićena prevođenjem u benziletarsku zaštitu dejstvom benzil-hlorida, u prisustvu kalijum-karbonata i dobijen je 3-benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-17-on (**35**) u prinosu od 92%. Zatim je jedinjenje **35** podvrgnuto reakciji oksiminovanja pri čemu je nagrađen 3-benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-16,17-dion 16-oksim (**36**) u prinosu od 93%. Dobijeni oksimino-keton **36** je zatim redukovan

pomoću natrijum-borhidrida, uz dodatak 1%-nog vodenog rastvora kalijum-hidroksida i 3-benziloksi-17 β -hidroksiestra-1,3,5(10)-trien-16-on oksim (**37**) je dobijen u prinosu od 93%. Beckmann-ovom fragmentacijom D-prstena oksimino-alkohola **37** sa *p*-toluensulfonil-hloridom dobijen je 3-benziloksi-17-okso-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**38**) u prinosu od 43%. Zatim je redukcijom aldehidne grupe kod jedinjenja **38** sa natrijum-borhidridom sintetizovan 3-benziloksi-17-hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**39**) u prinosu od 99%. Jedinjenje **39** je mezilovano sa metansulfonil-hloridom i dobijen je 3-benziloksi-17-metansulfoniloksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**40**) u prinosu od 48%. Jedinjenje **40** je podvrgnuto reakciji supstitucije meziloksi grupe sa natrijum-cijanidom u dimetilsulfoksidu, pri čemu je dobijen 3-benziloksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16,17a-dinitril (**41**) u prinosu od 34%. U završnoj fazi kod jedinjenja **41** je uklonjena benziletarska zaštita i ciljni 3-hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16,17a-dinitril (**42**) je dobijen u prinosu od 98%.

U radu je takođe proučavan je uticaj odabranih nosintetizovanih jedinjenja na proliferaciju sedam ćelijskih linija humanih tumora (MCF-7, MDA-MB-231, PC3, HeLa, HT-29, K562 i A549), dok je kao kontrola služila jedna zdrava humana ćelijska linija (MCR-5).

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da je najveći broj sintetizovanih jedinjenja pokazao jaku antiproliferativnu aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji, od kojih su jedinjenja **12**, **19**, **27** i **29** potentnija od referentnog jedinjenja, Formestana. Jedinjenja **15**, **19**, **29** i **42** su ispoljila jaku citotoksičnu aktivnost prema malignim ćelijama MDA-MB-231 linije, dok su snažnu aktivnost prema PC3 ćelijskoj liniji, kao i veću aktivnost od referentne supstance pokazala jedinjenja **14**, **19**, **27** i **33**. Jedinjenja **27** i **29** su pokazala značajnu antiproliferativnu aktivnost prema HT-29, a jedinjenje **14** prema MCF-7 ćelijskoj liniji. Testirana jedinjenja i Formestan nisu uticali na proliferaciju malignih ćelija K562 i A549. Ispitivanjem uticaja supstituenata u položaju C-4 i C-6 i prisustva dvostrukih veza u A prstenu na antiproliferativnu aktivnost zaključeno je da uvođenje Δ^1 dvostruke veze i aromatizacija A prstena jedinjenja **14** dovode do povećanja antiproliferativne aktivnosti samo prema MDA-MB-231 ćelijskoj liniji, dok prisustvo samo 4-en-3-on sistema u jedinjenju **14** povećava potentnost prema ćelijskim linijama HeLa, PC3 i MCF-7. Uvođenje metilenske, keto ili oksimino grupe u položaj C-6 kod jedinjenja **14** dovodi do različitih promena u antiproliferativnoj aktivnosti. C-6 metilenska grupa (jedinjenje **17**) utiče na potpuni gubitak antiproliferativne aktivnosti, dok prisustvo C-6 keto grupe (jedinjenje **19**) povećava antiproliferativnu aktivnost prema MDA-MB-231 i nešto malo prema HeLa ćelijama. Prisustvo oksimino grupe u istom položaju (jedinjenje **29**) povećava citotoksičnost prema MDA-MB-231, HeLa, HT-29 i A549 ćelijama. Prisustvo hidroksilne grupe u položaju C-4 jedinjenja **14** (jedinjenje **33**) povezano je sa smanjenjem antiproliferativne aktivnosti. Radi ispitivanja uticaja D-prstena na antiproliferativnu aktivnost upoređene su citotoksičnosti jedinjenja **33** i Formestana, pri čemu je zaključeno da modifikacija D-prstena, otvaranje i uvođenje nitrilnih funkcija, dovodi do povećanja citotoksičnosti prema PC3, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijskim linijama. Poređenjem citotoksične aktivnosti jedinjenja **19** i **29** zaključeno je da prisustvo proton akceptorske keto grupe u položaju C-6 doprinosi povećanju citotoksičnosti jedino

prema PC3 ćelijskoj liniji, dok proton donorska oksimino grupa dovodi do veće potentnosti prema A459, HT-29, HeLa i MDA-MB-231 ćelijskim linijama. Prisutvo 3 β -hidroksilne grupa u položaju C-3 umesto keto grupe u molekulu 6-keto derivata **19** (jedinjenje **28**) dovodi do povećanja antiproliferativne aktivnosti samo prema HT-29 ćelijskoj liniji, a u molekulu 6-oksmino derivata **29** (jedinjenje **27**) prema HeLa i PC3 ćelijskim linijama.

6. SKRAĆENICE

Skraćenica	Značenje
Ac	acetil
Am	amil
BPO	benzoil-peroksid
BSTFA	bis(trimetilsilil)-trifluoracetamid
Bz	benzoil
CPBA	hlorperbenzoeva kiselina
CSA	kamforsulfonska kiselina
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DDQ	2,3-dihloro-5,6-dicijano-1,4-benzohinon
DEG	dietilen-glikol
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
Et	etil
Me	metil
MMPP	magnezijum bis(monoperoksifalat) heksahidrat
Ms	Metansulfonil (mezil)
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NMO	<i>N</i> -metilmorfolin <i>N</i> -oksid
PCC	piridinium-hlorhromat
PDC	piridinium-dihromat
Ph	fenil

Py	piridin
Rh₂(cap)₄	dirodijum-kaprolaktam
TBDMS	<i>t</i> -butildimetilsilil etar
TBDMSCI	<i>t</i> -butildimetilhlorsilan
TBHP	<i>t</i> -butil-hidroperoksid
TEOF	trietilortoformijat
Tf	trifluormetansulfonil
TFA	trifluorsirćetna kiselina
TFAA	trifluoracetanhidrid
THF	tetrahidrofuran
Ts	toluensulfonil (tozil)

7. LITERATURA

1. F.F. Parl, Estrogens, estrogen receptors and breast cancer, IOS Press, The Netherlands, 2002
2. M. Oettel, E. Schillinger, Estrogens and antiestrogens I, Springer, Germany, 1999
3. C. Chang, G. Whipple, Androgens and androgen receptor, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2002
4. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
5. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije 2011., Beograd, 2012, www.batut.org.rs
6. <http://globocan.iarc.fr>
7. <http://www.cdc.gov/cancer/dcpc/data/men.htm>
8. C. Avendaño, J.C. Menéndez, Medicinal chemistry of anticancer drugs, Elsevier, UK, 2008
9. J. Hoffmann, A. Sommer, Anti-hormone Therapy: Principles of Endocrine Therapy of Cancer in Top Med Chem, 2007, 19-82
10. E. di Salle, G. Ornati, D. Giudici, M. Lassus, T.R.J. Evans, R.C. Coombes, *J Steroid Biochem* **43**, 137, 1992
11. P.E. Lonning, R. Paradens, B. Thurlimann, G. Picitelli, E. di Salle, *J Steroid Biochem* **61**, 151, 1997
12. W. Jonat, *Oncology* **54**, 15, 1997
13. D. Simpson, M.P. Curran, C.M. Perry, *Drugs* **64**, 1213, 2004
14. M. Tischler, S.W. Ayer, R.J. Andersen, J.F. Mitchell, J. Clardy, *Can J Chem* **66**, 1173, 1988
15. A. Aello, E. Fattorusso, S. Magno, M. Menna, M. Pansini, *J Nat Prod* **54**, 281, 1991
16. S. H. Li, T. S. Li, *Steroids* **63**, 76, 1998
17. V. Pérez-Ornelas, M. Cabenza, E. Bratoeff, I. Heuze, M. Sánchez, E. Ramirez, E. Naranjo-Rodriguez, *Steroids* **70**, 217, 2005
18. G.-E. Séralini, S. Moslemi, *Cell Endocrinol* **178**, 117, 2001
19. M. Nagaoka, M. Numazawa, *Chem Pharm Bull* **52**, 983, 2004

20. M. Numazawa, M. Tachibana, *Steroids* **59**, 579, 1994
21. M. Numazawa, M. Tsuji, A. Mutsumi, *J Steroid Biochem* **28**, 337, 1987
22. D.F. Covey, W.F. Hood, *Endocrinology* **108**, 1597, 1981
23. A.J. Hsueh, G.F. Erickson, *Steroids* **32**, 639, 1978
24. J. Cui, L. Huang, L. Fan, A. Zhou, *Steroids* **73**, 252, 2008
25. J. Rodriguez, L. Nuñez, S. Pexinho, C. Jimenez, *Tetrahedron Lett* **38**, 1833, 1997
26. D.J. Xiao, X. D. Peng, S.Z. Deng, W. Z. Ma, H. M. Wu, *Chin J Org Chem* **25**, 1606, 2005
27. N. Deive, J. Rodriguez, C. Jimenez, *J Med Chem* **44**, 2612, 2001
28. D.P. Jindal, R. Chattopadhyaya, S. Guleria, R. Gupta, *Euro J Med Chem* **38**, 1025, 2003
29. N.M. Krstić, M.S. Bjelaković, Ž. Žižak, M.D. Pavlović, Z.D. Juranić, V.D. Pavlović, *Steroids* **72**, 406, 2007
30. Poza, M. Rega, V. Paz, B. Alonso, J. Rodriguez, N. Salvador, A. Fernandez, C. Jimenez, *Bioorg Med Chem* **15**, 4722, 2007
31. J.-G. Cui, L. Fan, L.-L. Huang, H.-L. Liu, A.-M. Zhou, *Steroids* **74**, 62, 2009
32. J.-G. Cui, L. Fan, Y. Huang, Y. Xin, A. Zhou, *Steroids* **74**, 989, 2009
33. R. Bansal, S. Guleria, C. Ries, R.W. Hartmann, *Arch Pharm Life Sci* **343**, 377, 2010
34. S. Paget, *Lancet* **1**, 571, 1889
35. <http://www.bayerhealthcare.rs>
36. http://sh.wikipedia.org/wiki/Ne%C5%BEeljena_dejstva_hemoterapije
37. R.H. Shoemaker, *Nat Rev Cancer* **6**, 813, 2006
38. Y. Lu, R.I. Mahato (eds.), *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, Springer Science+Business Media, LLC 2009, 49-92
39. S.V. Sharma, D.A. Haber, J. Settleman, *Nat Rev Cancer* **10**, 241, 2010
40. G. Schwartzmann, B. Winograd, H.M. Pinedo, *Radiother Oncol* **12**, 301, 1988
41. J.S. Lewis-Wambi, V.C. Jordan, *Breast Cancer Res* **11**, 206, 2009
42. L.J. Denis, K. Griffiths, *Semin Surg Oncol* **18**, 52, 2000
43. K.M. Scarpin, J.D. Graham, P.A. Mote, C.L. Clarke, *Nucl Recept Signal* **7**, e009, 2009
44. H. Abdel-Hafiz, M.L. Dudevoir, K.B. Horwitz, *J Biol Chem* **284**, 9099, 2009
45. W. Fan, T. Yanase, Y. Nishi, S. Chiba, T. Okabe, M. Nomura, H. Yoshimatsu, S. Kato, R. Takayanagi, H. Nawata, *Endocrinology* **149**, 6028, 2008
46. S.K. Das, J. Tan, S. Raja, J. Halder, B.C. Paria, S.K. Dey, *J Biol Chem* **275**, 28834, 2000
47. P. Huang, V. Chandra, F. Rastinejad, *Annu Rev Physiol* **72**, 247, 2010

48. J. Yang, M.J. Young, *J Mol Endocrinol* **43**, 53, 2009
49. N. Ahmad, R. Kumar, *Cancer Lett* **300**, 1, 2011
50. G.G. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, J.A. Gustafsson, *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12, 1996
51. K.P. McNatty, A. Makris, C. De Grazia, R. Osathanondh, K.J. Ryan, *J Clin Endocrinol Metab* **49**, 687, 1979
52. S. Chumsria, T. Howesb, T. Baoa, G. Sabnisc, A. Brodie, *J Steroid Biochem Mol Biol* **125**, 1617, 2011
53. L.R. Nelson, S.E. Bulun, *J Am Acad Dermatol* **45**, S116, 2001
54. P. Lombardi, *Biochim Biophys Acta* **1587**, 326, 2002
55. N. Heldring, A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Ström, E. Treuter, M. Warner, J.A. Gustafsson, *Physiol Rev* **87**, 905, 2007
56. E.V. Jensen, H.I. Jacobson, *Recent Prog Horm Res* **18**, 387, 1962
57. J. Hartman, A. Strom, J.A. Gustafsson, *Steroids* **74**, 635, 2009
58. E. Enmark, M. Peltö-Huikko, K. Grandien, S. Lagercrantz, J. Lagercrantz, G. Fried, M. Nordenskjöld, J.A. Gustafsson, *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4258, 1997
59. E.R. Levin, *Steroids* **67**, 471, 2002
60. C.J. Gruber, W. Tschugguel, C. Schneeberger, J.C. Huber, *N Engl J Med* **346**, 340, 2002
61. C.I. Herold, K.L. Blackwell, *Clin Breast Cancer* **8**, 50, 2008
62. V.C. Jordan, *Cancer Res* **61**, 5683, 2001
63. R.F. Swaby, C.G.N. Sharma, V. Craig Jordan, *Rev Endocr Metab Disord* **8**, 229, 2007
64. M.P. Cole, C.T. Jones, I.D. Todd, *Br J Cancer* **25**, 270, 1971
65. Z. Desta, B.A. Ward, N.V. Soukhova, D.A. Flockhart, *J Pharmacol Exp Ther* **310**, 1062, 2004
66. D.Y. Wang, R. Fulthorpe, S.N. Liss, E.A. Edwards, *Mol Endocrinol* **18**, 402, 2004
67. The BIG 1-98 Collaborative Group, *N Engl J Med* **361**, 766, 2009
68. B. Fisher, *Eur J Cancer* **35**, 1963, 1999
69. S.R.D. Johnston, M. Dowsett, *Cancer* **3**, 821, 2003.
70. A. Friedl, V.C. Jordan, *Breast Cancer Res Treat* **31**, 27, 1994
71. J. Bonnetterre, B. Thürlimann, J.F. Robertson, M. Krzakowski, L. Mauriac, P. Koralewski, I. Vergote, A. Webster, M. Steinberg, M. von Euler, *J Clin Oncol* **18**, 3748, 2000
72. J.M. Nabholz, A. Buzdar, M. Pollak, *J Clin Oncol* **18**, 3758, 2000
73. P.E. Goss, K. Strasser, *J Clin Oncol* **19**, 881, 2001

74. The ATAC Trialists' Group, *Lancet* **359**, 2131, 2002
75. A.U. Buzdar, C. Marcus, F. Holmes, *Oncology* **45**, 344, 1998
76. B.L. Riggs, L.C. Hartmann, *N Engl J Med* **348**, 618, 2003
77. S.R. Cummings, S. Eckert, K.A. Krueger, *JAMA* **281**, 2189, 1999
78. A.E. Wakeling, M. Dukes, J. Bowler, *Cancer Res* **51**, 3867, 1991
79. D.J. DeFriend, A. Howell, R.I. Nicholson, *Cancer Res* **54**, 408, 1994
80. E.A. Thompson Jr., P.K. Siiteri, *J Biol Chem* **249**, 5364, 1974
81. S.A. Chen, M.J. Besman, R.S. Sparkes, S. Zollman, I. Klisak, T. Mohandas, P.F. Hall, J.E. Shively, *DNA* **7**(1), 27, 1988
82. O. Shimosawa, M. Sakaguchi, H. Ogawa, N. Harada, K. Mihara, T. Omura, *J Biol Chem* **268**, 21399, 1993
83. B. Amarneh, C.J. Corbin, J.A. Peterson, E.R. Simpson, S. Graham-Lorence, *Mol Endocrinol* **7**, 1617, 1993
84. D. Ghosh, J. Griswold, M. Erman, W. Pangborn, *Nature* **457**, 219, 2009
85. W. Jiang, D. Ghosh, *PLoS One* **7**, e32565, 2012
86. S. Chumsri, T. Howes, T. Bao, G. Sabnis, A. Brodie, *J Steroid Biochem* **125**, 13, 2011
87. C. Longcope, J.H. Pratt, S.H. Schneider, S.E. Fineberg, *J Clin Endocrinol Metab* **46**, 146, 1978
88. H. Sasano, M. Uzuki, T. Sawai, H. Nagura, G. Matsunaga, O. Kashimoto, N. Harada, *J Bone Miner Res* **12**, 1416, 1997
89. F.L. Bellino, Y. Osawa, *J Clin Endocrinol Metab* **44**, 699, 1977
90. G.E. Ackerman, M.E. Smith, C.R. Mendelson, P.C. MacDonald, E.R. Simpson, *J Clin Endocrinol Metab* **53**, 412, 1981
91. J.P. Forney, L. Milewich, G.T. Chen, J.L. Garlock, B.E. Schwarz, C.D. Edman, P.C. Macdonald, *J Clin Endocrinol Metab* **53**, 192, 1981
92. J.S. O'Neill, R.A. Elton, W.R. Miller, *Brit Med J* **296**, 741, 1988
93. T. Price, J. Aitken, J. Head, M.S. Mahendroo, G.D. Means, E.R. Simpson, *J Clin Endocrinol Metab* **74**, 1247, 1992
94. E. Perel, D. Wilkins, D.W. Killinger, *J Steroid Biochem* **13**, 89, 1980
95. D.W. Killinger, E. Perel, D. Daniilescu, L. Kharlip, M.A. Blankenstein, *Steroids* **50**, 523, 1987
96. A. Lipton, R.J. Santen, S.J. Santner, H.A. Harvey, S.I. Sanders, Y.L. Matthews, *Cancer* **70**, 1951, 1992
97. S.E. Bulun, E.R. Simpson, *Breast Cancer Res Treat* **30**, 19, 1994

98. Z. Desta, A. Nguyen, D. Flockhart, T. Skaar, R. Fletcher, R. Weinshilboum, D.S. Berlin, T.E. Klein, R.B. Altman, *Pharmacogenet Genom* **19**, 554, 2009
99. H. Sasano, N. Harada, *Endocr Rev*, **19**, 593, 1998
100. S.E. Bulun, L.S. Noble, K. Takayama, M.D. Michael, V. Agarwal, C. Fisher, Y. Zhao, M.M. Hinshelwood, Y. Ito, E.R. Simpson, *J Steroid Biochem Mol Biol* **61**, 133, 1997
101. S.E. Bulun, Z. Lin, G. Imir, S. Amin, M. Demura, B. Yilmaz, R. Martin, H. Utsunomiya, S. Thung, B. Gurates, M. Tamura, D. Langoi, S. Deb, *Pharmacol Rev* **57**, 359, 2005
102. R.J. Santen, H. Brodie, E.R. Simpson, P.K. Siiteri, A. Brodie, *Endocr Rev* **30**, 343, 2009
103. A.M. Brodie, W.M. Garrett, J.R. Hendrickson, C.H. Tsai-Morris, P.A. Marcotte, C.H. Robinson, *Steroids* **38**, 693, 1981
104. J.M. Dixon, *Anti-Cancer Ther* **2**, 267, 2002
105. R.J. Santen, R.I. Misbin, *Pharmacotherapy* **1**, 95, 1981
106. H.V. Vandenbossche, H. Moereels, L.M. Koymans, *Breast Cancer Res Treat* **30**, 43, 1994
107. D.P. McDonnell, *Trends Endocrinol Metab* **10**, 301, 1999
108. H.J. Burstein, A.A. Prestrud, J. Seidenfeld, H. Anderson, T.A. Buchholz, N.E. Davidson, K.E. Gelmon, S.H. Giordano, C.A. Hudis, J. Malin, E.P. Mamounas, D. Rowden, A.J. Solky, M.R. Sowers, V. Stearns, E.P. Winer, M.R. Somerfield, J.J. Griggs, *J Clin Oncol* **28**, 3784, 2010
109. I.E. Smith, M. Dowsett, *N Engl J Med* **348**, 2431, 2003
110. P.E. Lonning, *The Breast* **5**, 202, 1996
111. J. Geisler, *Brit J Cancer* **104**, 1059, 2011
112. S.M. Campos, *The Oncologist* **9**, 126, 2004
113. N. Zilembo, C. Noberasco, E. Bajettal, A. Martinetti, L. Mariani, S. Orefice, R. Buzzonil, M. Di Bartolomeo, A. Di Leo, A. Laffranchil, E. di Salle, *Brit J Cancer* **72**, 1007, 1995
114. E.D. Deeks, L.J. Scott, *Drugs* **69**, 889, 2009
115. D. Burn, G. Cooley, M.T. Davies, J.W. Ducker, B. Ellis, P. Feather, A.K. Hiscock, D.N. Kirk, A.P. Leftwick, V. Petrow, D.M. Williamson, *Tetrahedron* **20**, 597, 1964
116. F. Buzzetti, N. Barbugian, P. Lombardi, E. Di Salle, US Pat., 4,808,616; *Chem Abstr* **108**, 221966v, 1988
117. K. Annen, H. Hofmeister, H. Laurent, R. Wiechert, *Synthesis*, 34, 1982
118. K. Chen, C. Liu, L. Deng, G. Xu, *Steroids* **75**, 513, 2010
119. A. Marcos-Escribano, F.A. Bermejo, A.L. Bonde-Larsen, J.I. Retuerto, I.H. Sierra, *Tetrahedron* **65**, 7587, 2009
120. M.K. Krook, B.D. Hewitt, Patent WO 04342A1, 2001; *Chem Abstr* **134**, 99682u, 2001

121. K. Kunnen, N.W. Stehle, J.M. Pascone, R.J. Pariza, S.G. Van Ornum, P. Zizelman, US Pat 0234505 A1, 2008
122. K. Görlitzer, C. Bonnekesel, P.G. Jones, G. Kaufmann, *Pharmazie* **57**, 808, 2002
123. J. Dube, US 3274176, 1964, *Chem Abstr* **62**, 9204f, 1965
124. H. Wagner, K. Ponsold, G. Schumann, DD Pat 258820, 1986, *Chem Abstr* **111**, 7672q, 1989
125. V. Cenacchi, S. Barattè, P. Cicioni, E. Frigerio, J. Long, C. James, *J Pharm Biomed Anal* **22**, 451, 2000
126. N. Mauras, J. Lima, D. Patel, A. Rini, E. di Salle, A. Kwok, B. Lippe, *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5951, 2003
127. E. Rivera, V. Valero, D. Francis, A.G. Asnis, L.J. Schaaf, B. Duncan, G.N. Hortobagyi, *Clin Cancer Res* **10**, 1943, 2004
128. P.R. Hutson, R.R. Love, T.C. Havighurst, E. Rogers, J.F. Cleary, *Clin Cancer Res* **11**, 8722, 2005
129. T.A. Traiana, I. Poggesi, M. Robson, A. Asnis, B.A. Duncan, A. Heerdt, C. Dang, D. Lake, M. Moasser, K. Panageas, P. Borgen, L. Norton, C. Hudis, M.N. Dickler, *Breast Cancer Res Treat* **111**, 377, 2008
130. E. Fontana, A. Pignatti, D. Giribone, E. Di Salle, *Steroids* **73**, 760, 2008
131. A.C. Hunter, S.-M. Priest, *Steroids* **71**, 30, 2006
132. A.C. Neves, M.L. Sáe Melo, M.J.S.M. Moreno, E.J.T. da Silva, J.A.R. Salvador, S.P. da Costa, R.M.L.M. Martins, *Tetrahedron* **55**, 3255, 1999
133. J. Muzart, *Tetrahedron Lett* **28**, 4665, 1987
134. J.A.R. Salvador, S.M. Silvestre, V.M. Moreira, *Curr Org Chem* **16**, 1243, 2012
135. E.A. Djurendić, J.J. Ajduković, M.N. Sakač, J.J. Csanádi, V.V. Kojić, G.M. Bogdanović, K.M. Penov-Gaši, *Eur J Med Chem* **54**, 784, 2012
136. A. Thalen, L.-I. Wicksrom, *Steroids* **65**, 16, 2000
137. R. Gardi, A. Lusignani, *J Org Chem* **32**, 2647, 1967
138. V. Perez-Ornelas, M. Cabeza, E. Bratoeff, I. Heuze, M. Sánchez, E. Ramírez, E. N. Rodríguez, *Steroids* **70**, 217, 2005
139. H. Seto, S. Fujioka, S. Takatsuto, H. Koshino, T. Shimizu, S. Yoshida, *Steroids* **65**, 443, 2000
140. J.A. Ramirez, O.M. Teme-Centurión, E.G. Gros, L.R. Galagovsky, *Steroids* **65**, 329, 2000
141. C. Brosa, L. Soca, E. Terricabras J.C. Ferrer, A. Alsina, *Tetrahedron* **54**, 12337, 1998

142. M. Romero-Avila, G. de Dios-Bravo, J.M. Mendez-Stivalet, R. Rodríguez-Sotres, M.A. Iglesias-Arteaga, *Steroids* **72**, 955, 2007
143. E. Bratoeff, M. Cabeza, V. Perez-Ornelas, S. Recillas, I. Heuze, *J Steroid Biochem* **111**, 275, 2008
144. M. Cabeza, E. Bratoeff, E. Ramírez, I. Heuze, S. Recillas, H. Berrios, A. Cruz, O. Cabrera, V. Pérez, *Steroids* **73**, 838, 2008
145. D.G. Rivera, F. León, F. Coll, G.P. Davison, *Steroids* **71**, 1, 2006
146. E.A. Djurendić, M.P. Savić, O.R. Klisurić, M.N. Savić, G.M. Bogdanović, D.S. Jakimov, K.M. Penov Gaši, *Struct Chem* **23**, 1761, 2012
147. J.A.R. Salvador, V.M. Moreira, J.R. Hanson, R.A. Carvalho, *Steroids* **71**, 266, 2006
148. A. Rosado-Abón, M. Romero-Ávila, A. Martin, Iglesias-Arteaga, *ARKIVOC*, 110, 2010
149. J.W. Blunt, B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote, M.P. Prinsep, *Nat Prod Rep* **24**, 31, 2007.
150. J.W. Blunt, B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote, M.P. Prinsep, *Nat Prod Rep* **22**, 15, 2005.
151. D.J. Faulkner, *Nat Prod Rep* **18**, 1, 2001
152. N.M. Krstić, M.S. Bjelaković, M.M. Dabović, Lj.B. Lorenc, V.D. Pavlović, *J Serb Chem Soc* **69**, 413, 2004
153. H. Suginome, K. Ohshima, Y. Ohue, T. Ohki, H. Senboku, *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 3239, 1994
154. M. S. Ahmad, N. Z. Kahn, Z. Alan, *J Chem Res (S)*, 191, 1985
155. K. Gaši, Z. Sakač, O. Arcson, S. Stanković, B. Ribar, L. Szilagy, D. Miljković, *J Serb Chem Soc* **56**, 699, 1991
156. H.L. Holland, S. Kumaresan, L. Tan, V.C.O. Njar, *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 585, **1992**
157. J.F. Carvalho, M.M. Silva, J.N. Moreira, S. Simões, M.L. Sá E Melo, *J Med Chem* **54**, 6375, 2011
158. A. Fürst, L. Ludvik, W. Meier, *Helv Chim Acta* **64**, 1870, 1981
159. J.F.S. Carvalho, M.M.C. Silva, M.L. Sá e Melo, *Tetrahedron* **66**, 2455, 2010.
160. J.F.S. Carvalho, M.M.C. Silva, J.N. Moreira, S. Simões, M.L. Sá e Melo, *J Med Chem* **53**, 7632, 2010.
161. A.B. Zaitsev, A.M. Vasil'tsov, E.Y. Shmidt, A.I. Mikhaleva, A.V. Afonin, L.N. Il'icheva, *Russ J Org Chem* **39**, 1406, 2003
162. J. Ramirez, E. Gros, L. Galagovsky, *Tetrahedron* **56**, 6171, 2000
163. D. A. Miljković, K. M. Gaši, *Bull Soc Chim* **46**, 263, 1981

164. D. Miljković, J. Petrović, M. Stajić, M. Miljković, *J Org Chem* **38**, 3585, 1973
165. K. Penov-Gaši, S. Stojanović, M. Sakač, E. Djurendić, S. Jovanović-Šanta, S. Stanković, N. Andrić, M. Popsavin, *J Serb Chem Soc* **68**, 707, 2003
166. A. Gaković, M. Djurendić Brenesel, E. Djurendić, K. Penov-Gaši, M. Sakač, *Hem ind* **64**, 81, 2010
167. S. Marczak, J. Wicha, *Synthesis* **7**, 1049, 2003
168. M. Sakač, A. Gaković, J. Čanadi, E. Djurendić, O. Klisurić, V. Kojić, G. Bogdanović. K. Penov Gaši, *Tetrahedron Lett* **50**, 4107, 2009
169. B. Camerino, B. Patelli, R. Sciaky, *Gazz Chim Ital* **92**, 709, 1962
170. E.J. Tavares de Silva, M.L. Sá e Melo, A.S. Campos Noves, *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1649, 1996
171. S. Jovanovic-Šanta, S. Andrić, R. Kovačević, V. Pejanović, *Collect Czech Commun* **65**, 77, 2000
172. D Schulster, J.K. Whitehead, A. Kellie, *Biochem J* **93**, 512, 1964
173. M.N.Huffman, M.H. Lott, *J Biol Chem* **172**, 325, 1948
174. K. Penov Gaši, A. Oklješa, E. Petri, A. Ćelić, E. Djurendić, O. Klisurić, J. Csanadi, G. Batta, A. Nikolić, D. Jakimov, M. Sakač, *Med Chem Comm* **4**, 317, 2013
175. T. Mosmann. *J. Immunol Meth.* **65**, 55, 1983

8. BIOGRAFIJA



Andrea Nikolić je rođena 25.11.1979. godine u Odžacima. Osnovnu školu, kao i Gimnaziju “Jovan Jovanović Zmaj” je završila u Odžacima.

Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, Departman za hemiju je upisala 1998. godine i diplomirala 2003. godine.

Magistarske studije, smer Hemija, je upisala na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu 2003. godine, a magistrirala 2008. godine.

Školske 2003/04. godine je radila kao profesor hemije u Osnovnoj školi, Gimnaziji i Tehničkoj školi u Odžacima.

U zvanje istraživača-pripravnika u naučnoj oblasti Hemija je imenovana 2004. godine. Od 1.02.2005. godine je bila zaposlena kao asistent-pripravnik, a od 01.02.2009. godine kao asistent na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, na Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. Na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu, osek Farmacija je bila angažovana na vežbama školske 2004/05 i 2005/06. godine.

Učestvovala je na projektu „Sinteza i fizičko-hemijska ispitivanja odabranih organskih jedinjenja od potencijalnog farmakološkog značaja“ (2006-2010 god), koji je finansiralo Ministarstvo nauke Republike Srbije. Trenutno učestvuje na projektu Ministarstva obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Sinteza, karakterizacija i biološka ispitivanja steroidnih derivata i njihovih molekulskih agregata“ (2011-2014 god), projektu Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj pod nazivom „Sinteza steroidnih i nesteroidnih jedinjenja i ispitivanje njihove biološke aktivnosti“ (2011-2014 god), kao i na jednom međunarodnom projektu IPA prekograničnog programa Mađarska-Srbija pod nazivom „Research Cooperation of the University of Szeged and the University of Novi Sad in Development of Anticancer Drug Compounds“ (2012-2014 god).

Autor i koautor je sedam radova u međunarodnim časopisima, jednog rada u časopisu nacionalnog značaja, šest saopštenja na skupovima međunarodnog i šesnaest saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Koautor je jedne zbirke zadataka.

Član je Srpskog hemijskog društva.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Andrea R. Nikolić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje) MN	Dr Marija Sakač, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Sinteza novih steroidnih jedinjenja od potencijalnog biomedicinskog značaja
Jezik publikacije: JP	srp.
Jezik izvoda: JI	Srpski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 9 (uključujući Prilog)/ Stranica: 140 (28 strana poglavlja Prilog)/ Slika: 91 (79 slika spektara u Prilogu)/ Tabela: 6/ Sheme: 74/Referenci: 175
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Organska hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Sinteza, steroidi, androgeni, D-seko derivati, dinitrili, citotoksičnost
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Trg D. Obradovića 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	Cilj ove doktorske disertacije je bila sinteza novih steroidnih 16,17-seko-16,17a-dinitrila polazeći od dehidroepiandrosterona (1), odnosno estrona (14). U androstanskoj seriji su izvršene modifikacije 16,17-seko-16,17a-dinitrila 12 u A i/ili B prstenu steroidnog jezgra, pri čemu novosintetizovana jedinjenja sadrže 4-en-3-on, 1,4-dien-3-on ili 1,4,6-trien-3-on sistem, kao i supstituente u položajima C-4, odnosno C-6 (6-metilen, 6-keto i 6-oksmino). U radu je takođe proučavan uticaj odabranih novosintetizovanih jedinjenja na proliferaciju sedam ćelijskih linija humanih tumora, dok je kao kontrola služila jedna zdrava humana ćelijska linija
Datum prihvatanja teme od strane NN veća DP	15.03.2012.
Datum odbrane: DO	2014. god
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	dr Evgenija Đurendić, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu, predsednik dr Marija Sakač, , redovni profesor PMF-a u Novom Sadu, mentor dr Katarina Penov Gaši, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu, član dr Suzana Jovanović-Šanta, docent PMF-a u Novom Sadu, član dr Sonja Đilas, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, član

UNIVERSITY OF NOVI SAD FACULTY

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Andrea R. Nikolić
Mentor: MN	Professor Marija Sakač, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Title: TI	Synthesis of new steroidal compounds of potential biomedical importance
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositaja Obradovića 3

Physical description: PD	Chapters: 9 (including the chapter Appendix)/ Pages: 140 (28 pages in the chapter Appendix)/. Figures: 91 (79 figures of spectras in the chapter Appendix)/ Tables: 6/ Schemes: 74/ References: 175
Scientific field SF	Chemistry
Scientific discipline SD	Organic Chemistry
Subject, Key words SKW	Synthesis, steroids, androgen, D-seco derivatives, dinitrile, cytotoxicity
UC	
Holding data: HD	Library of the Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental protection, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Note: N	-
Abstract: AB	Starting from dehydroepiandrosterone (1) or estrone (14) new steroidal 16,17-seco-16,17a-dinitriles were synthesized. Modification of 16,17-seco-16,17a-dinitrile 12 afforded androstane derivatives containing 4-en-3-on, 1,4-dien-3-on or 1,4,6-trien-3-on system, with different substituents on position C-4 or C-6 (6-methylene, 6-keto i 6-oximino). Antiproliferative activity of some newly synthesized compounds were examined against seven human tumor cell lines, while healthy cells served as control.
Accepted on Scientific Board on: AS	15.03.2012.
Defended: DE	2014.
Thesis Defend Board: DB	Professor Evgenija Đurendić, Phd, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, retired Professor Marija Sakač, Phd, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Professor Kataina Penov Gaši, Phd, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Assistant professor Suzana Jovanović-Šanta, Phd, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Professor Sonja Đilas, Phd, Faculty of Technology, University of Novi Sad

Mr Andrea Nikolić

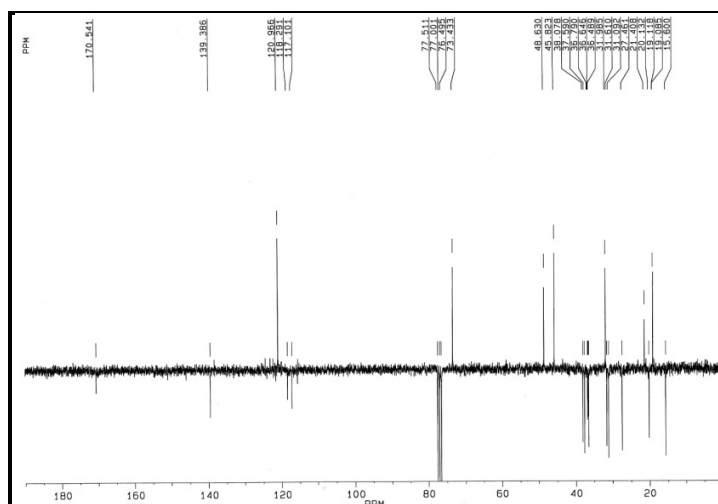
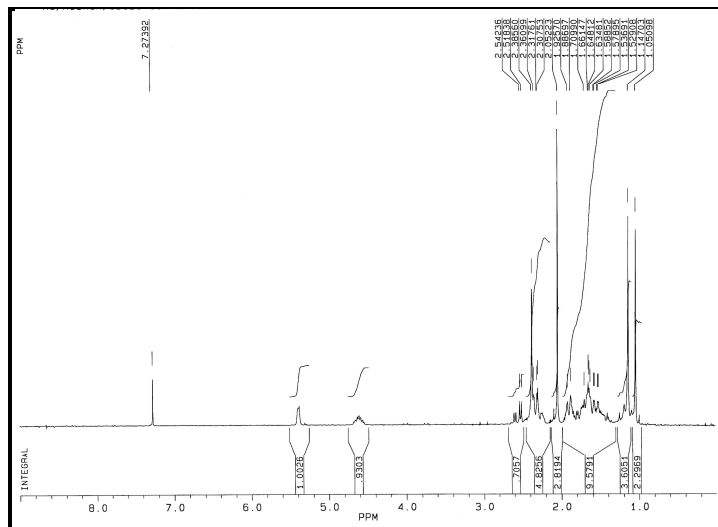
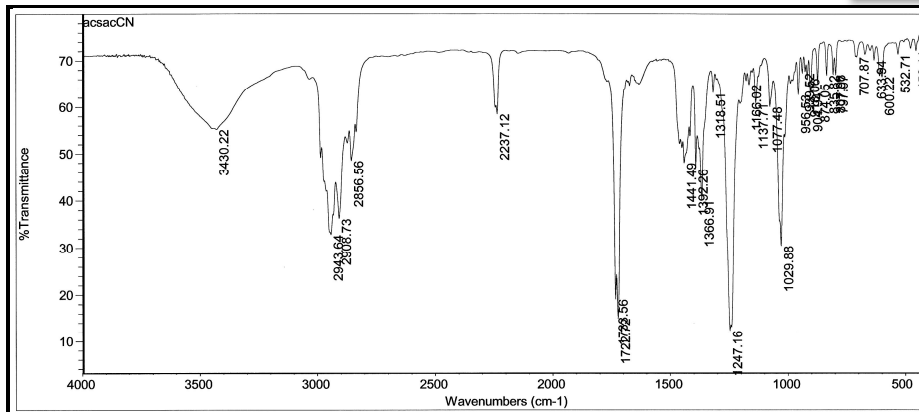
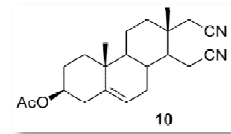
**SINTEZA NOVIH STEROIDNIH JEDINJENJA OD POTENCIJALNOG
BIOMEDICINSKOG ZNAČAJA**

Doktorska disertacija

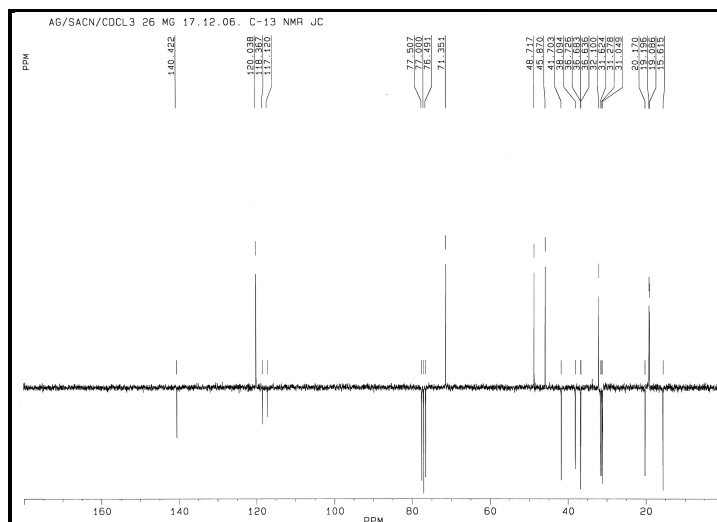
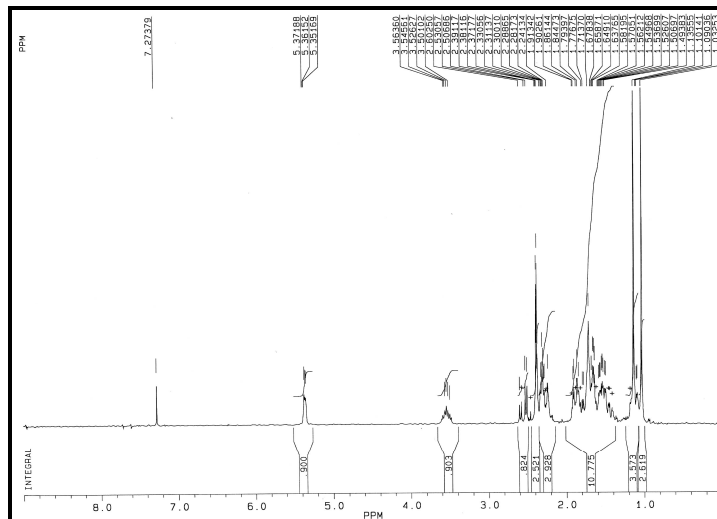
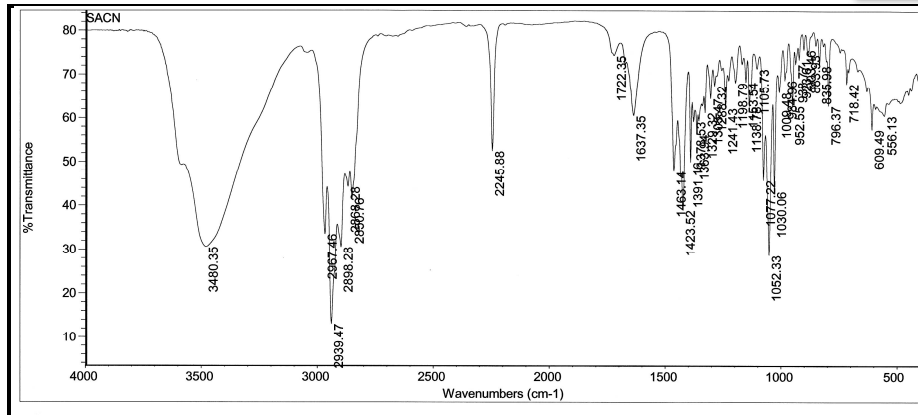
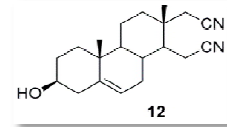
PRILOG

(IR, ^1H i ^{13}C NMR SPEKTRI NOVOSINTETIZOVANIH JEDINJENJA)

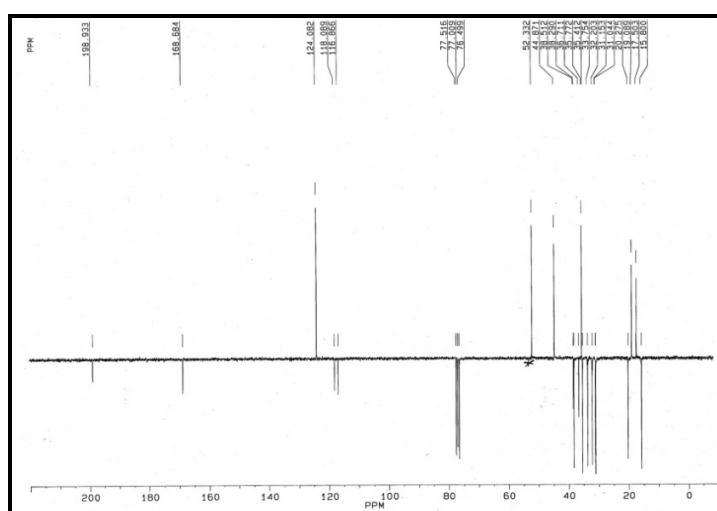
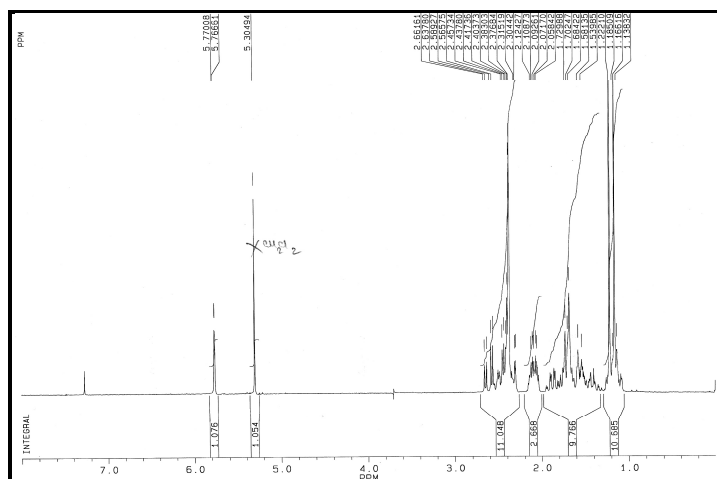
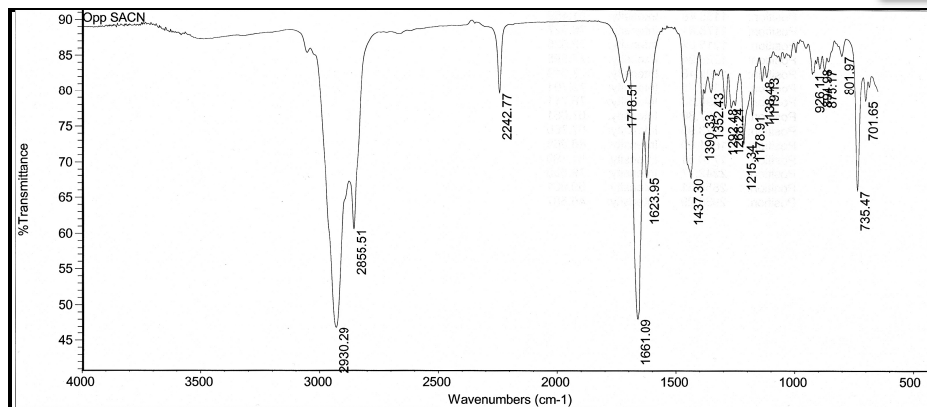
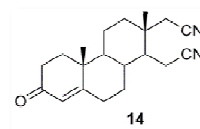
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 10



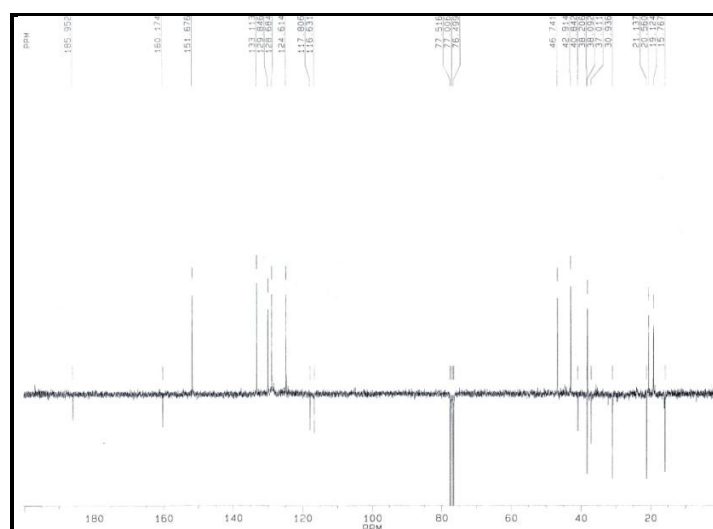
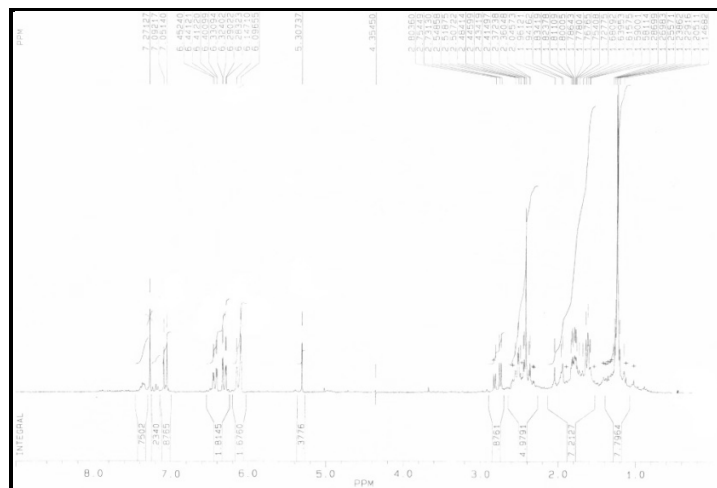
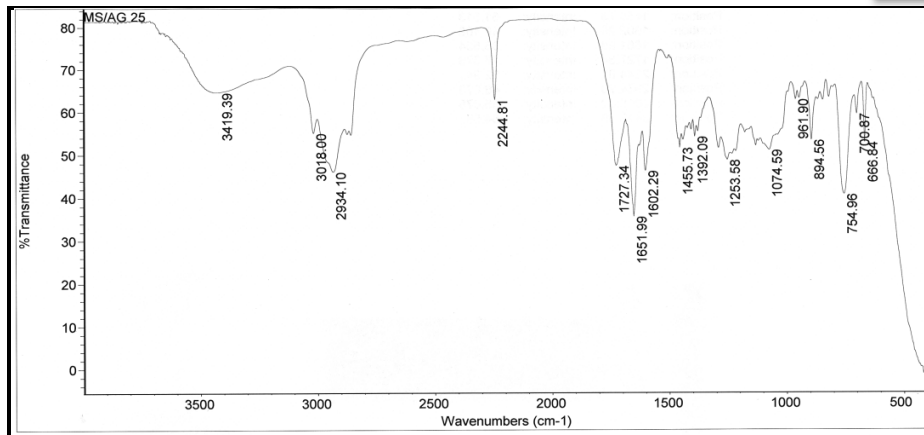
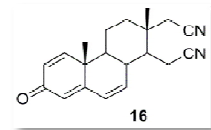
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 12



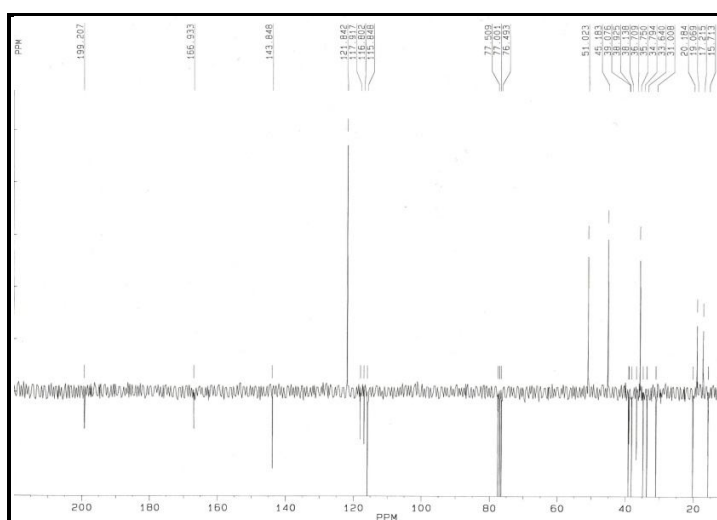
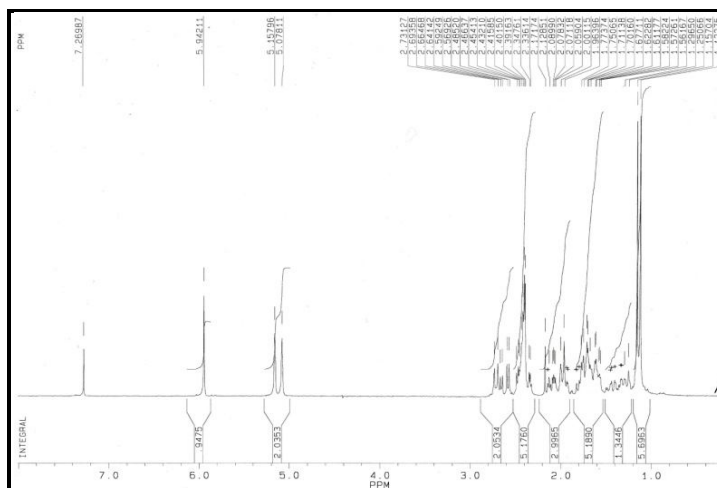
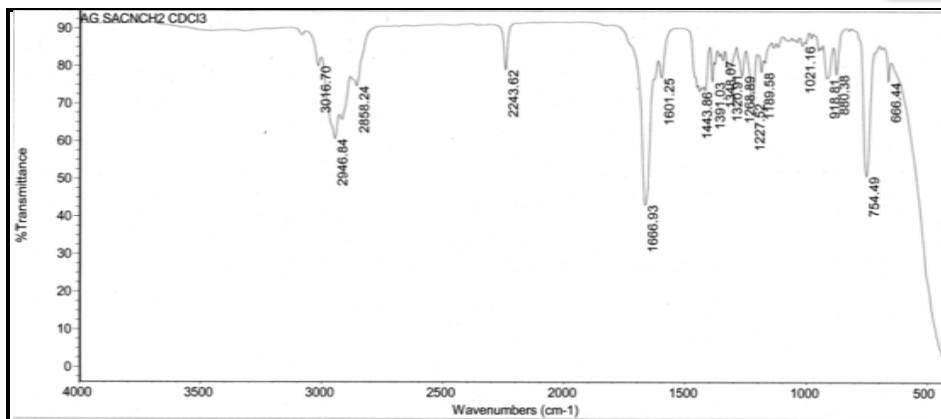
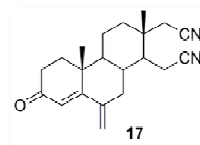
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 14



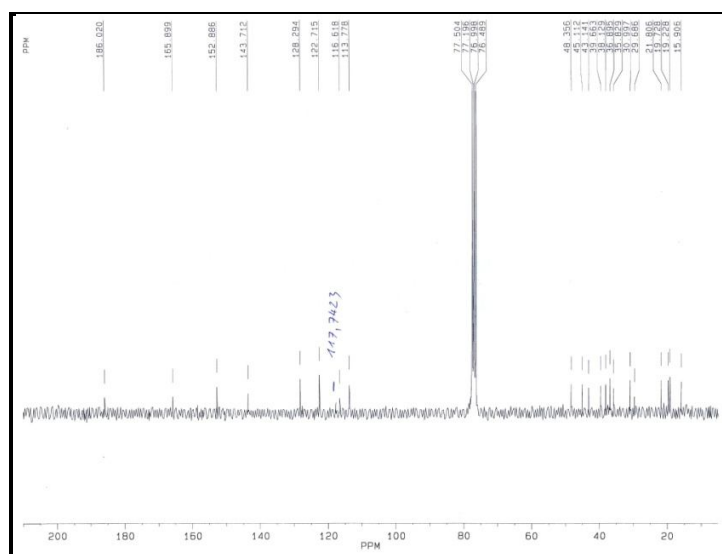
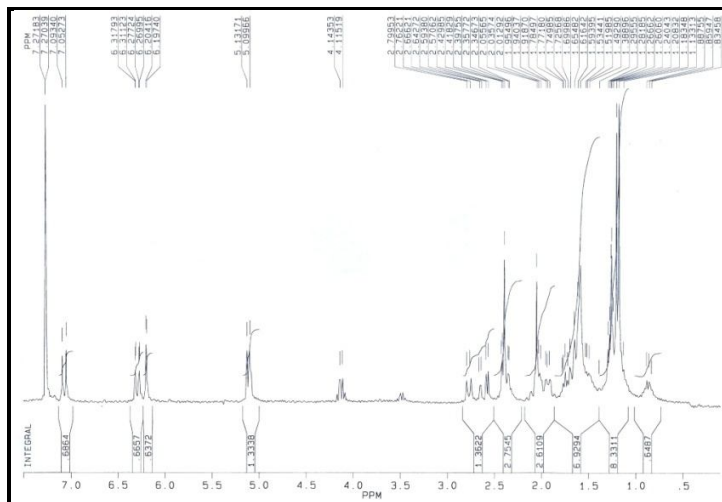
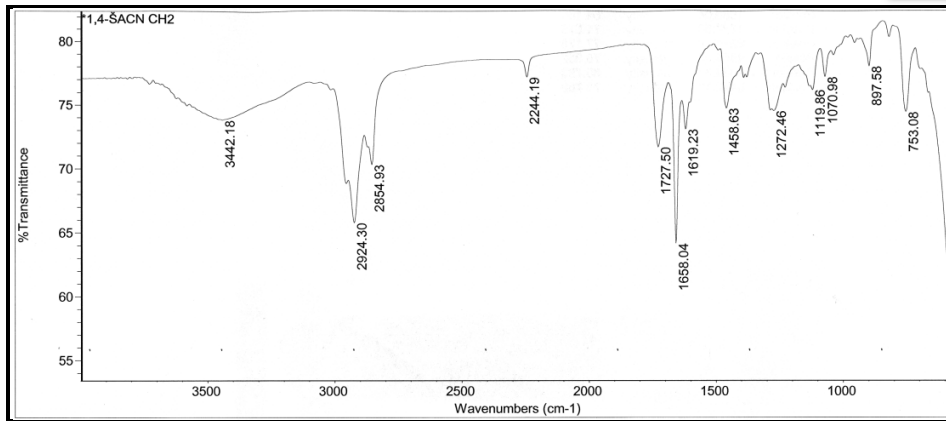
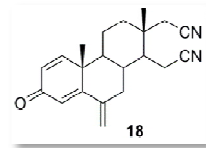
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 16



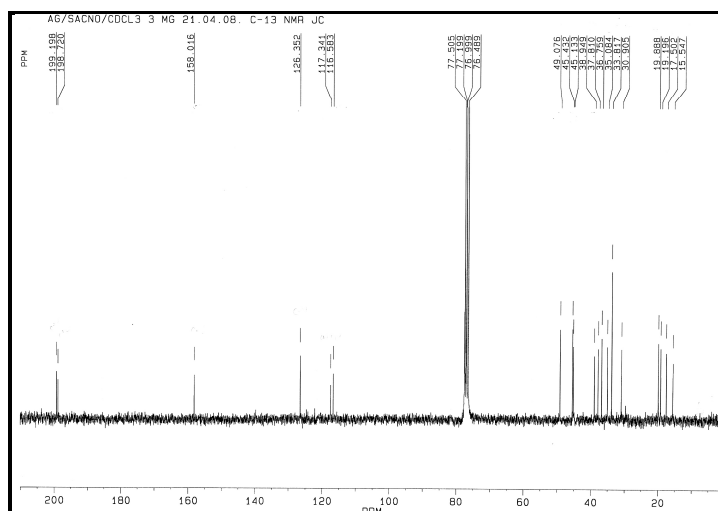
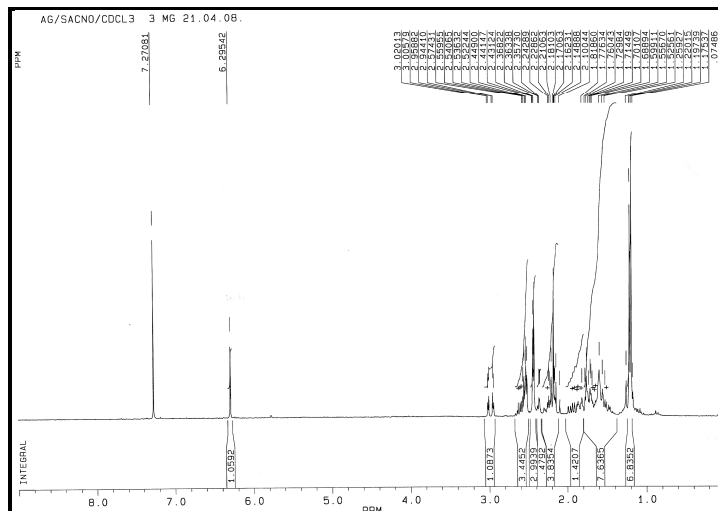
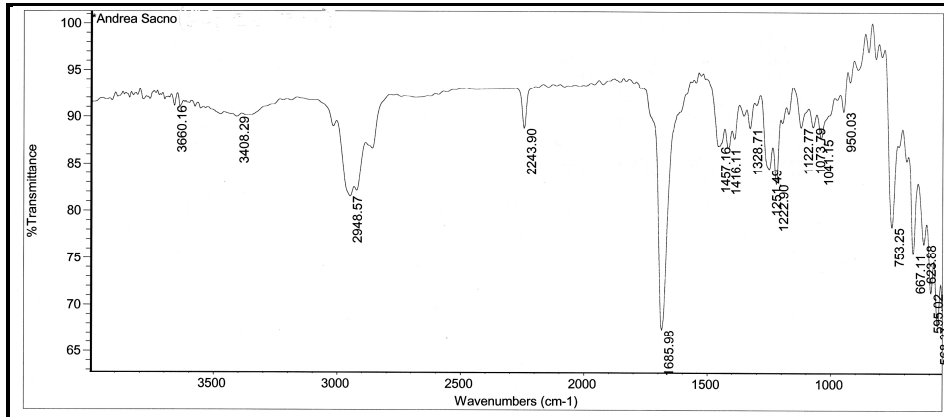
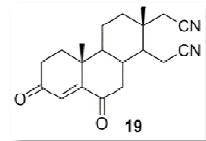
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 17



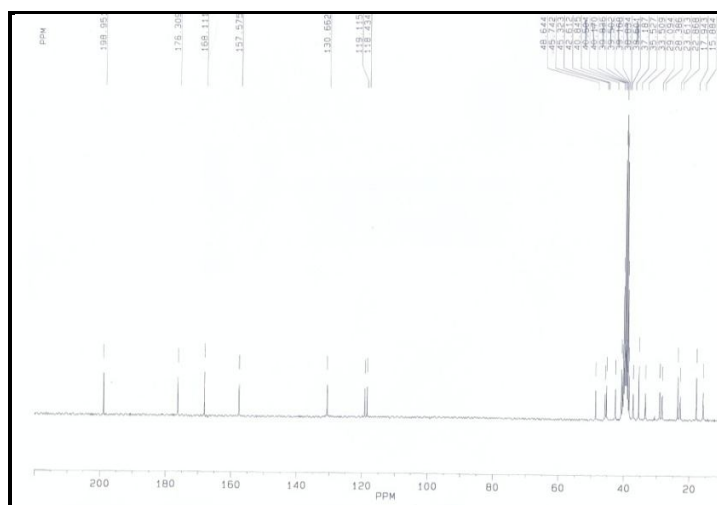
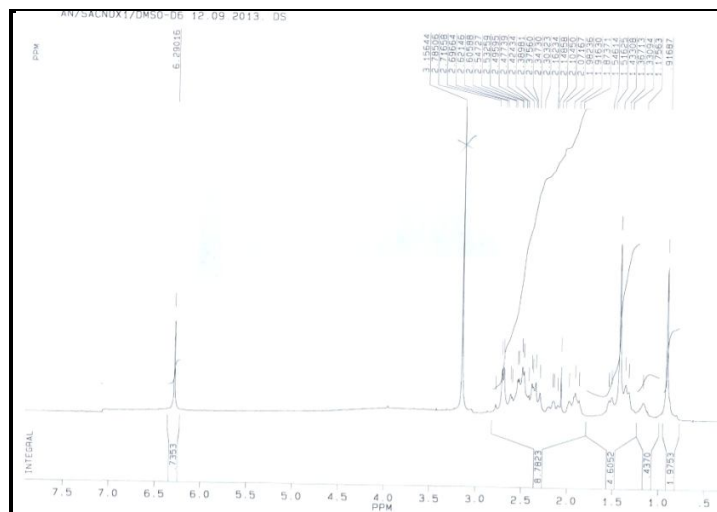
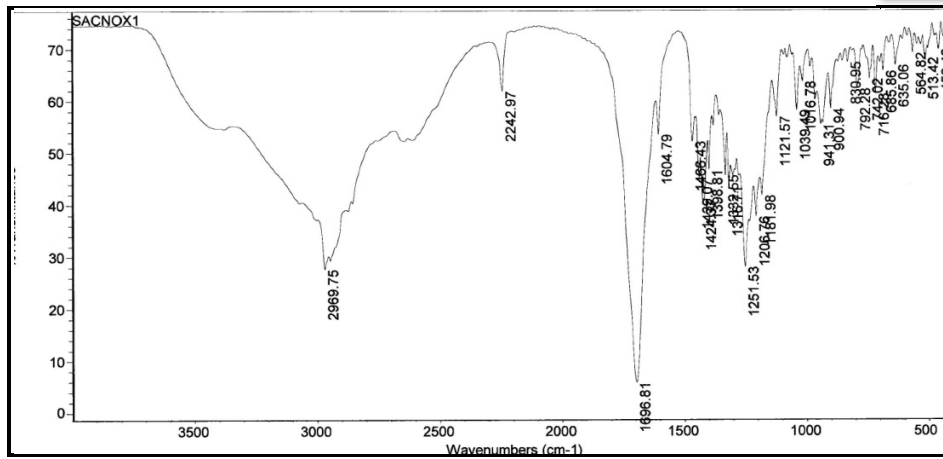
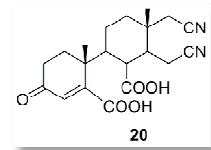
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 18



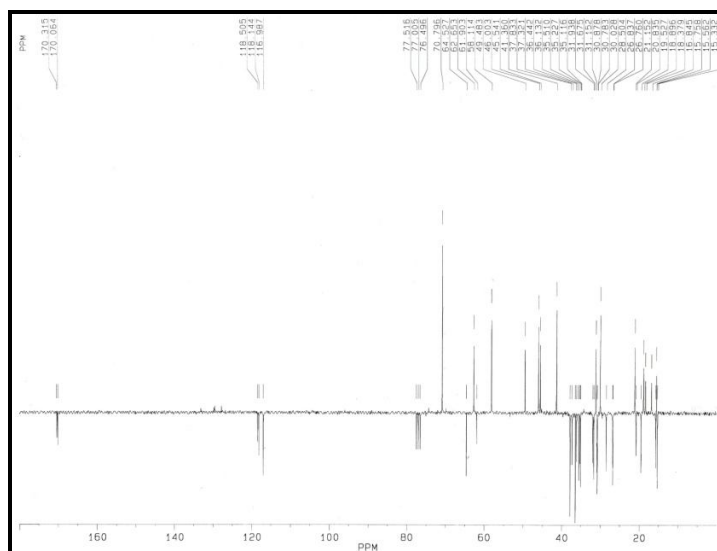
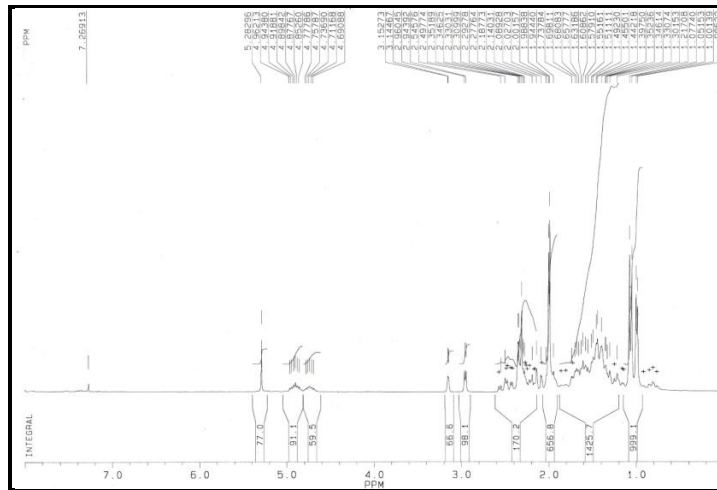
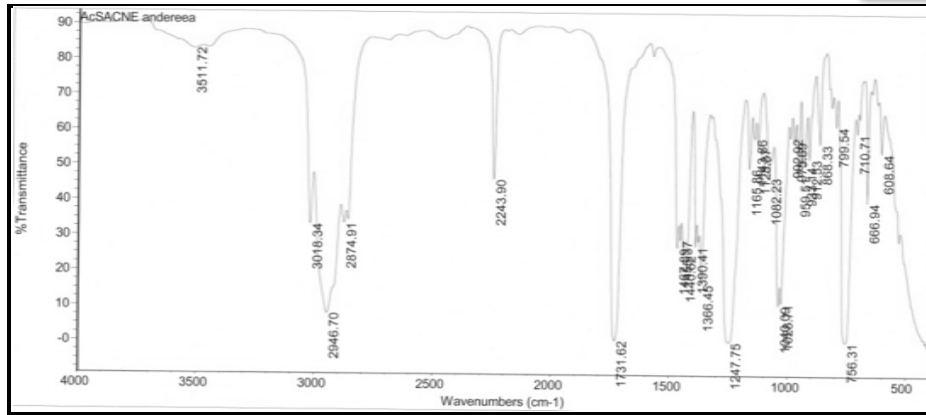
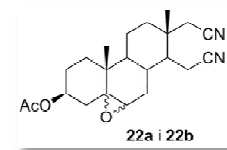
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 19



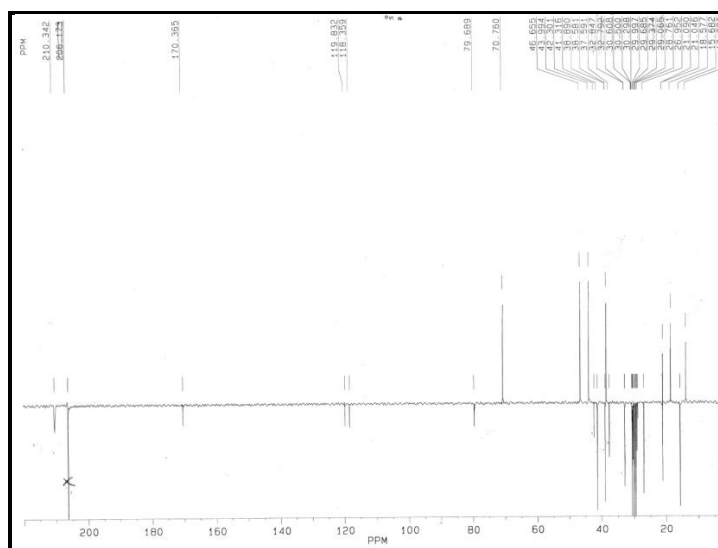
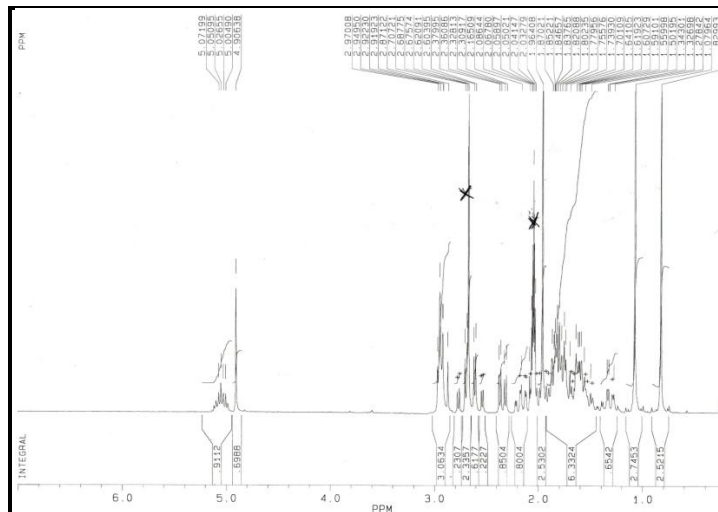
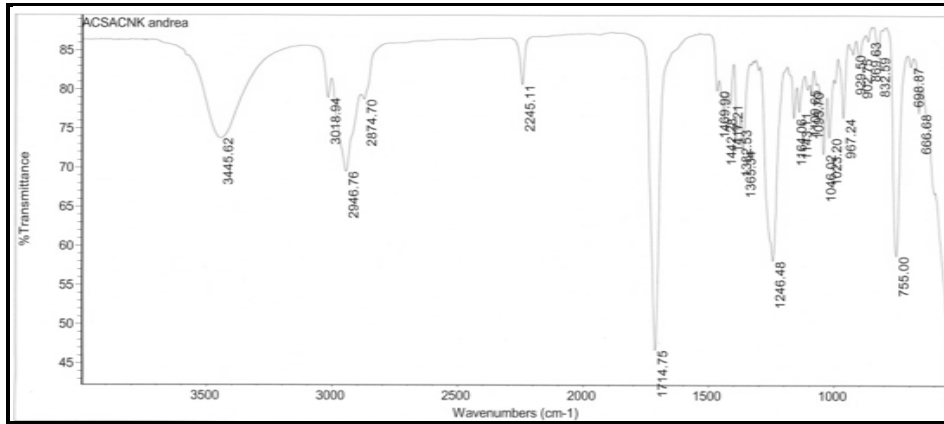
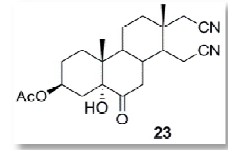
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 20



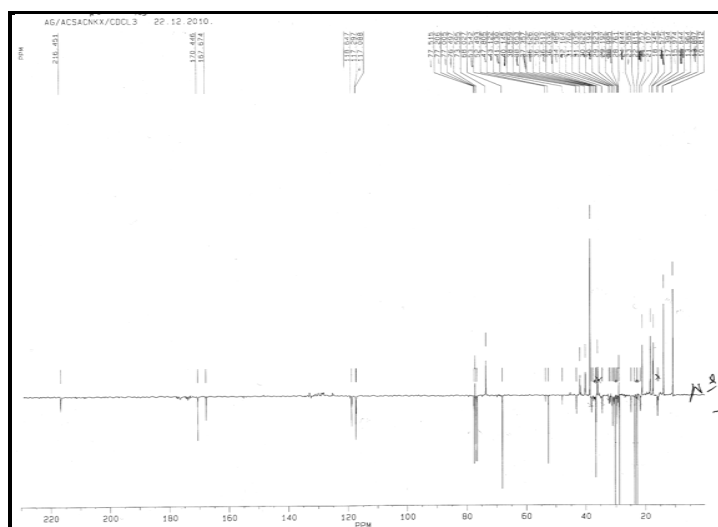
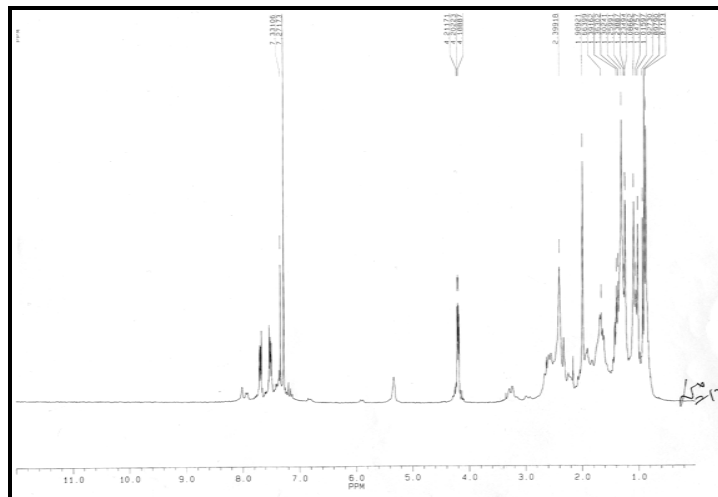
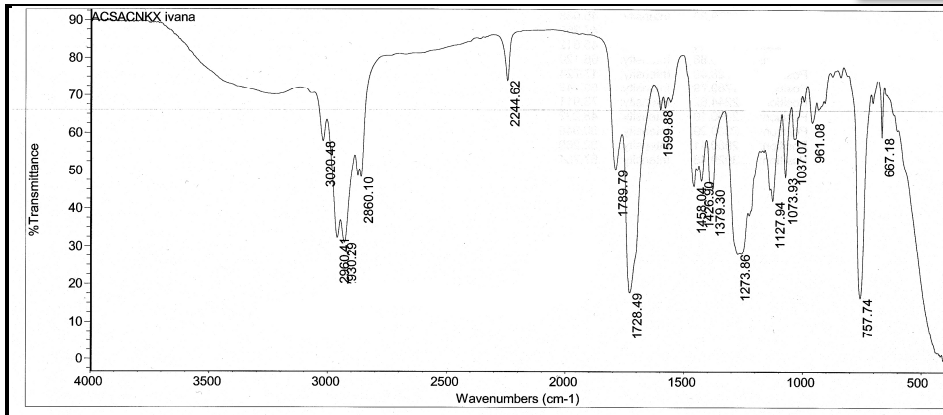
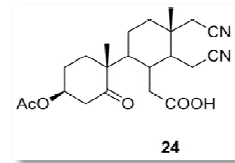
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI SMEŠE JEDINJENJA 22a i 22b



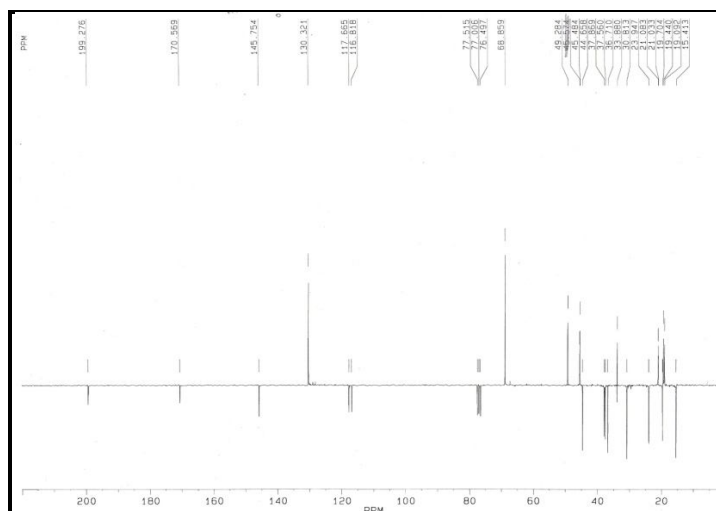
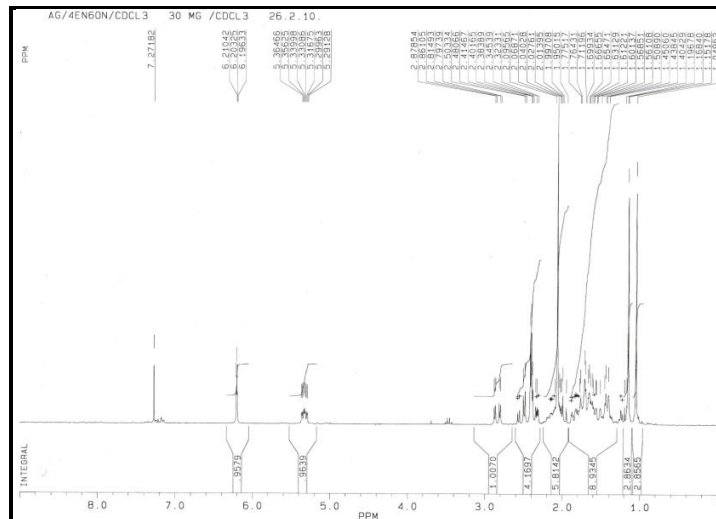
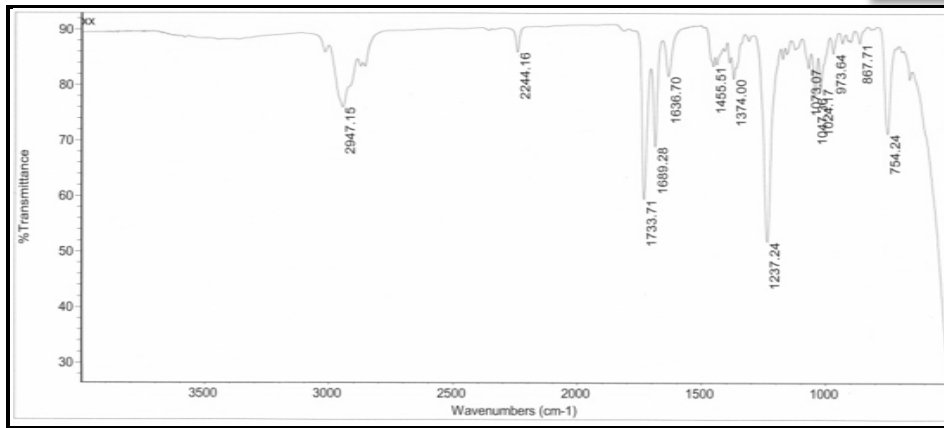
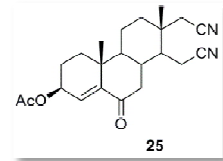
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 23



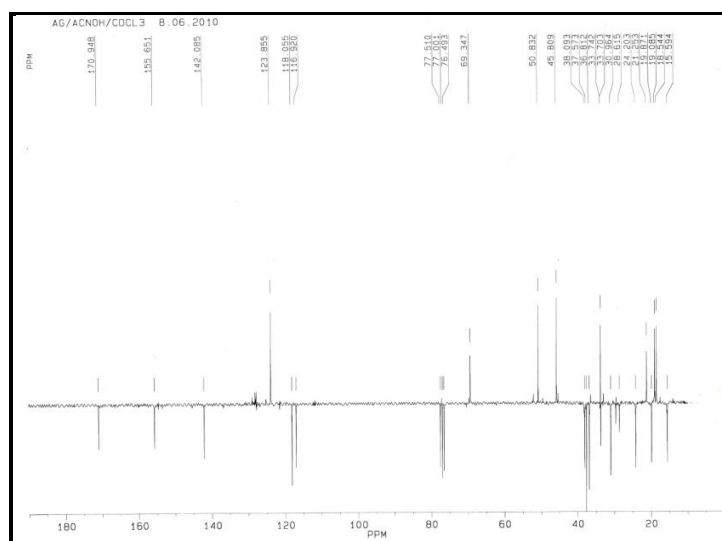
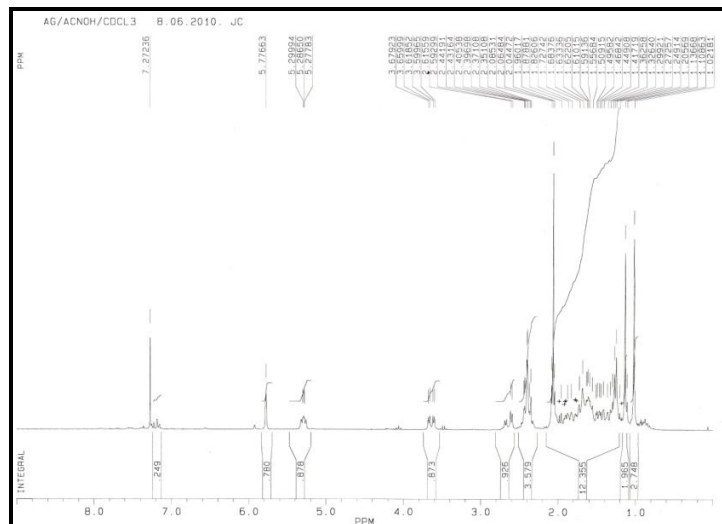
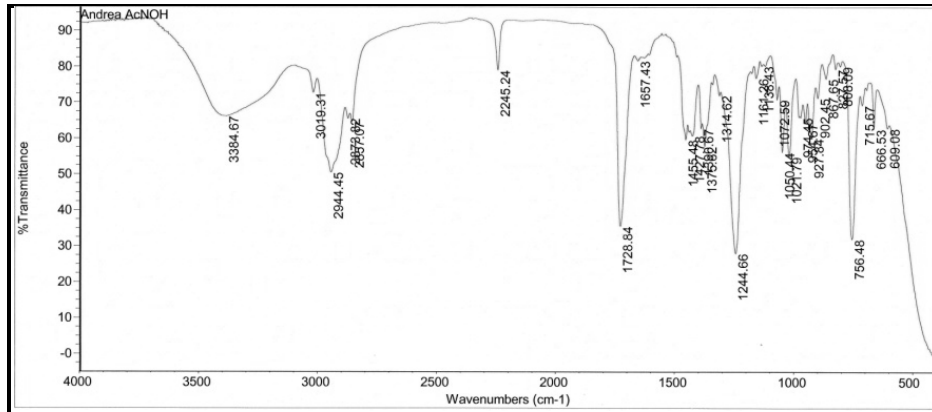
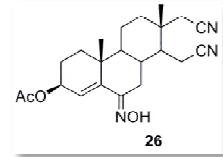
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 24



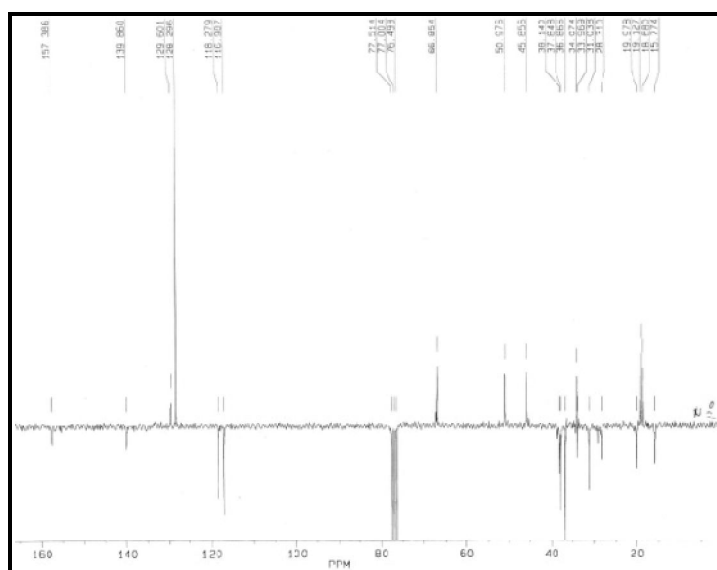
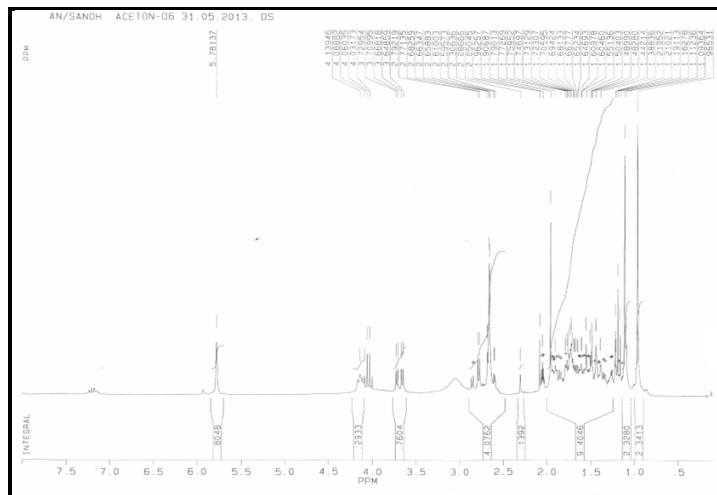
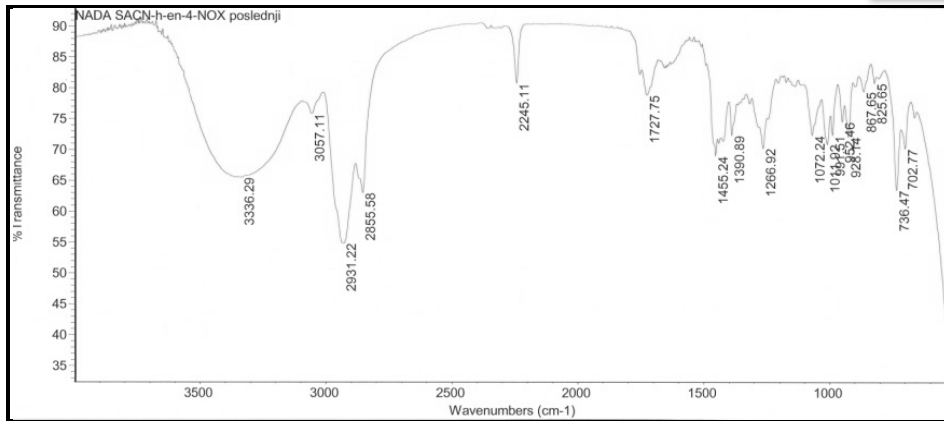
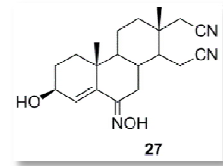
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 25



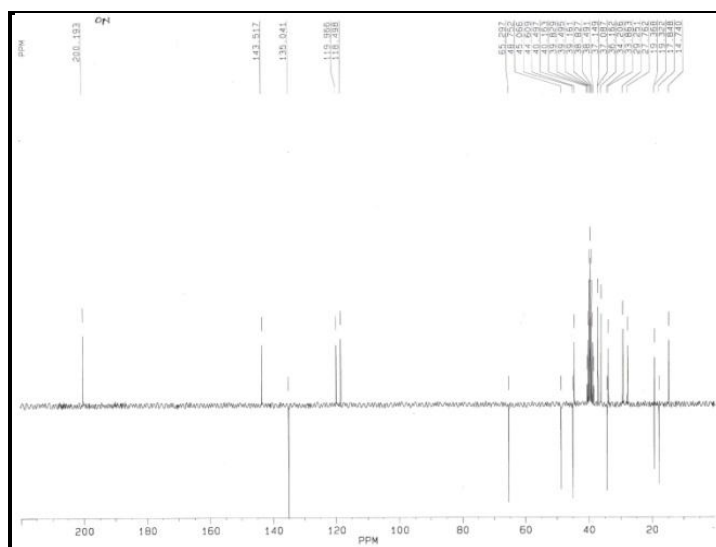
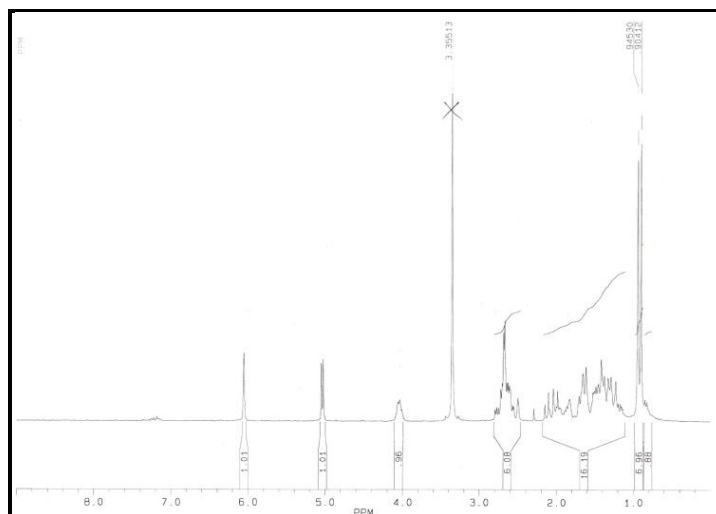
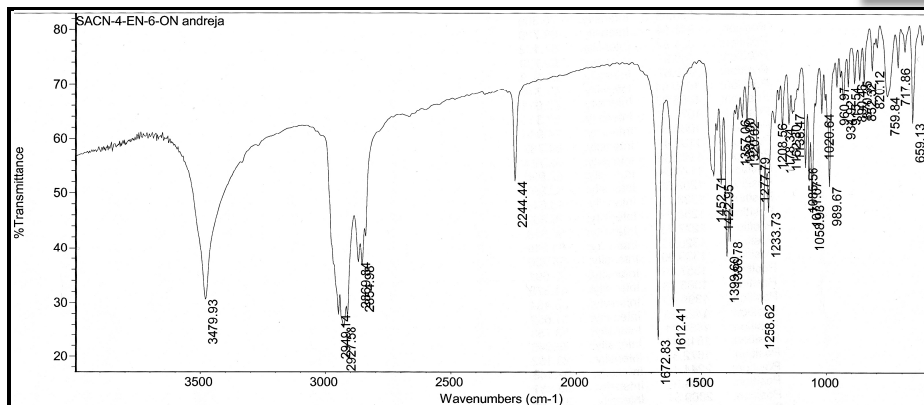
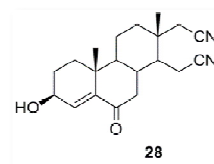
IR, ¹H | ¹³C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 26



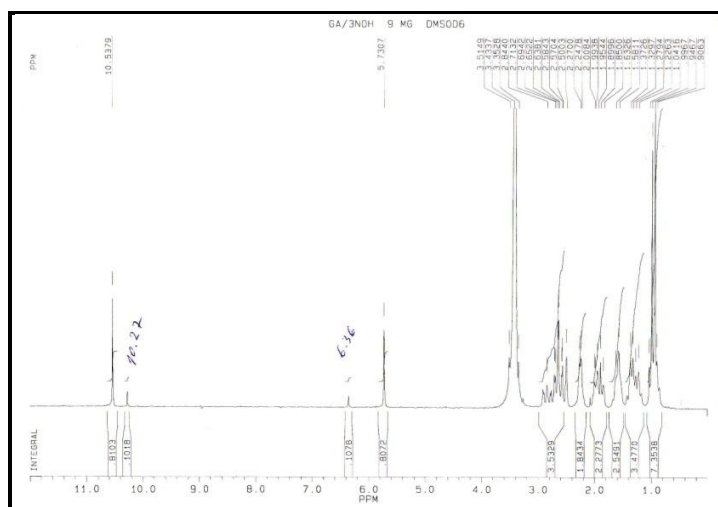
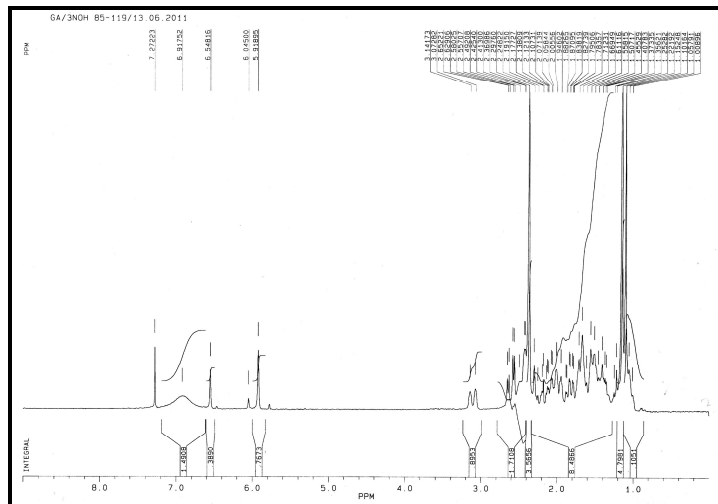
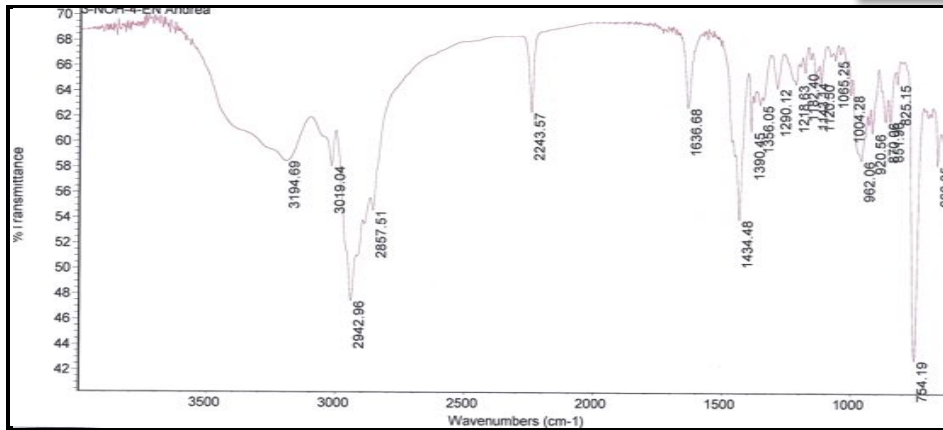
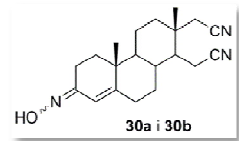
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 27

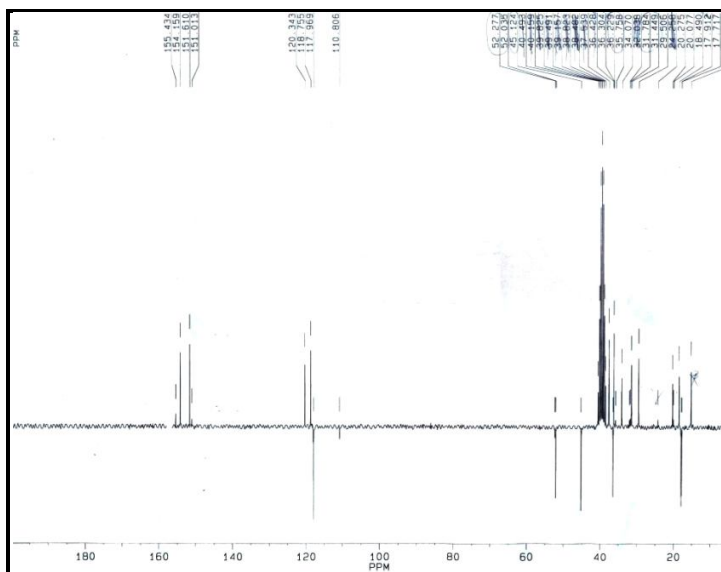


IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 28

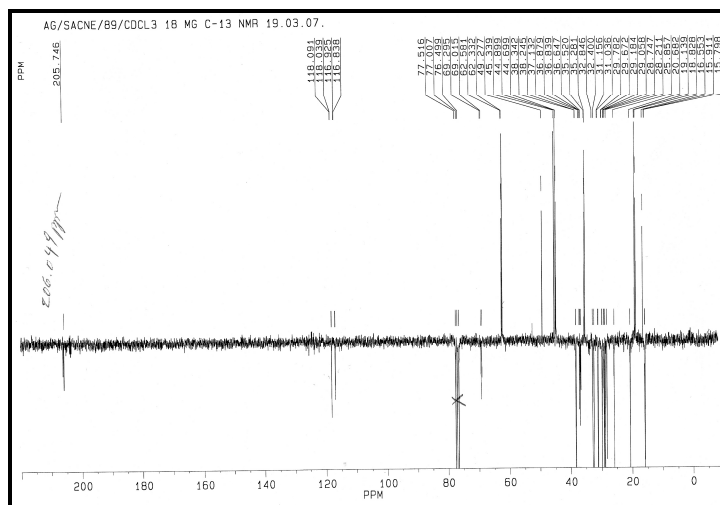
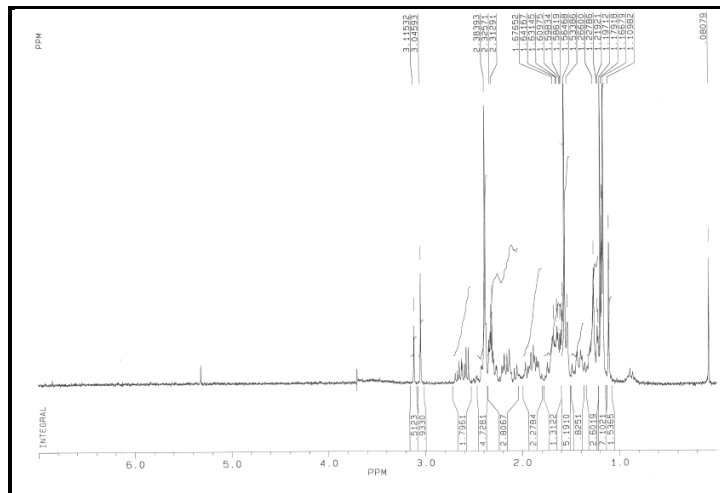
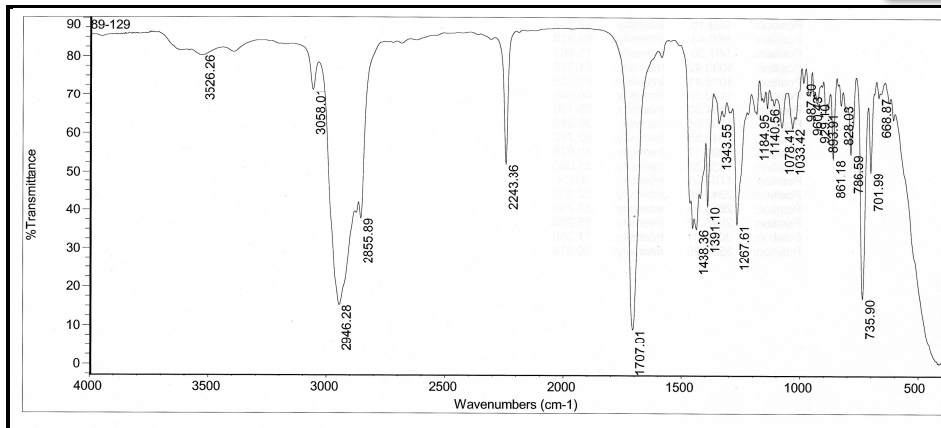
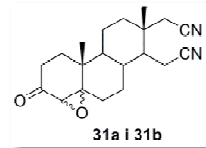


IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI SMEŠE JEDINJENJA 30a i 30b

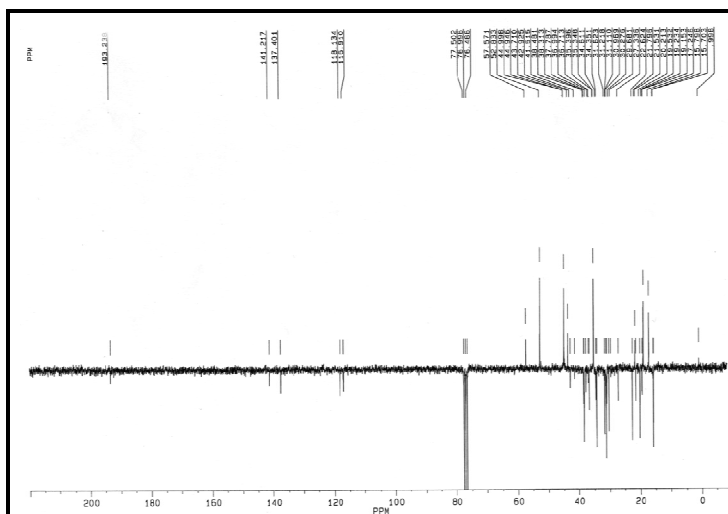
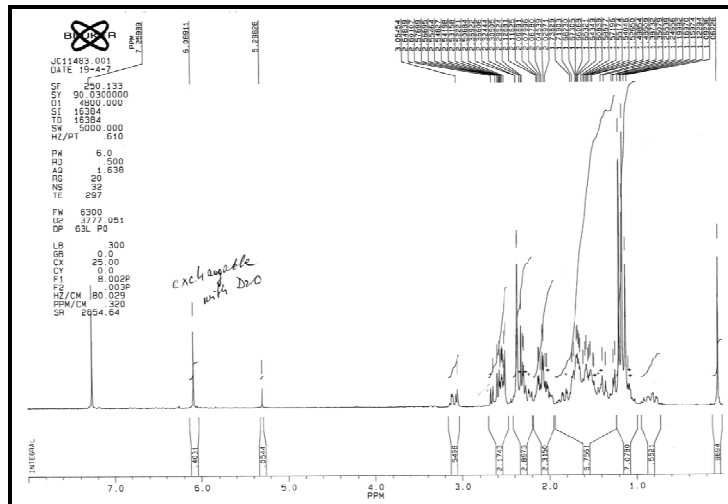
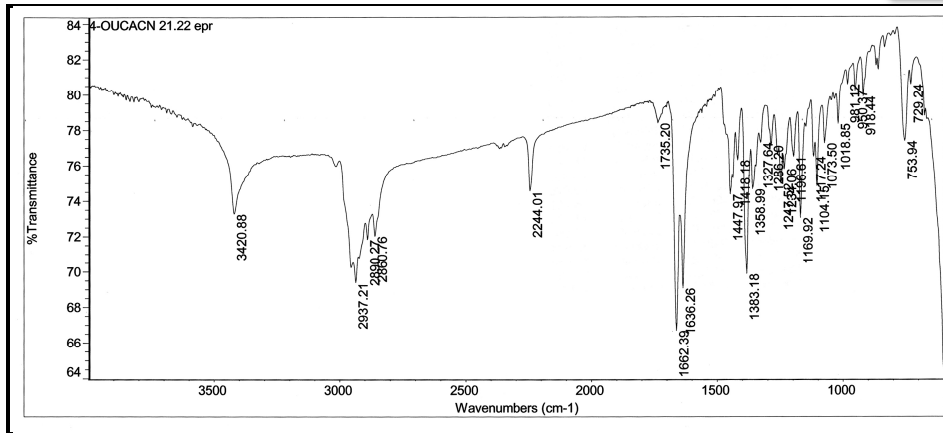
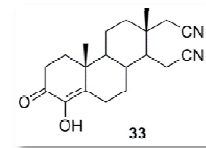




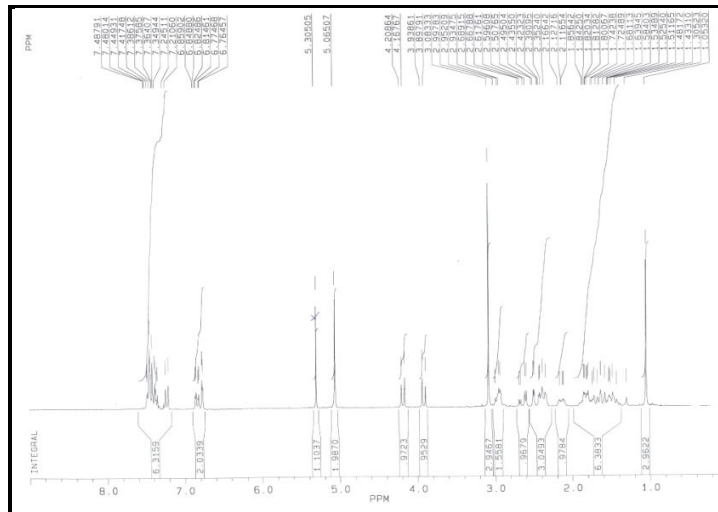
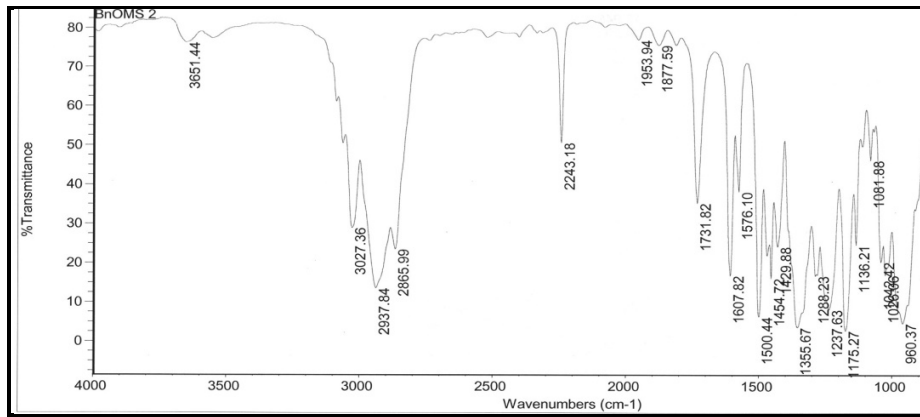
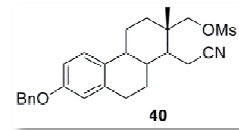
IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI SMEŠE JEDINJENJA 31a i 31b



IR, ^1H i ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 33



IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 40



IR, ^1H | ^{13}C NMR SPEKTRI JEDINJENJA 41

