



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



**Srđan Bjedov**

**Sinteza i biološka ispitivanja novih derivata žučnih  
kiselina**

**Doktorska disertacija**

**Novi Sad, 2016.**

## Predgovor

*Ova 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.*

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj profesorki dr Mariji Sakač na znanju, pomoći i brižnosti koje mi je pružila. Takav primer odgovornosti, marljivosti, etičnosti i čovečnosti je referent koji pruža spokojstvo.*

*Veliko hvala dugujem profesoru dr Janošu Čanadiju, redovnom profesoru PMF-a, na interesovanju za rad, pomoći pri tumačenju NMR spektara, kao i raznim praktičnim savetima.*

*Naročito se zahvaljujem dragoj profesorki dr Mirjani Popsavin, redovnom profesoru PMF-a, na velikom i temeljnom radu kojim mi je mnogo pomogla u rešavanju struktura mnogih jedinjenja kao i na interesovanju za rad.*

*Zahvaljujem se dr Siniši Markovu, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na saradnji u oblasti mikrobioloških ispitivanja, savetima i interesovanju za rad.*

*Zahvaljujem se profesoru dr Mihalju Poši, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, na veoma uspešnoj saradnji, planiranju i analizi rada.*

*Dr Dimitru Jakimovu, dr Vesni Kojić, iz Instituta za onkologiju Vojvodine, i dr Suzani Jovanović-Šanti srdačno se zahvaljujem na pomoći pri određivanju antitumorske aktivnosti. Takođe, hvala dr Oliveri Klisurić, vanrednom profesoru PMF-a, na urađenoj rendgeno-strukturnoj analizi.*

*Zahvaljujem se msc Dušanu Škoriću na snimanju i pomoći oko tumačenja NMR spektara, kao i dr Branislavu Joviću i msc Branku Kordiću na snimanju IR spektara. Zahvaljujem se i dr Milki Jadranin (IHTM-Centar za hemiju, Beograd) na snimanju masenih spektara visoke rezolucije kao i dr Nini Todorović (IHTM-Centar za hemiju, Beograd) i dr Niku Raduloviću (PMF u Nišu) na snimanju NMR spektara, kao i dr Ani Pilipović na uspešnoj saradnji.*

*Veliko hvala dragoj kolegini sa kojom delim laboratoriju, msc Ivani Kuzminac, na velikoj toleranciji pre sveg mog muzičkog izbora, i što je doprinela da radno mesto bude prijatan drugarski ambijent, kao i za pomoć prilikom rada. Takođe, veliko hvala i dragoj kolegini dr Andrei Nikolić na korisnim savetima, pomoći i drugarskoj atmosferi.*

*Posebnu zahvalnost dugujem kolegama sa Katedre:*

*dr Ljubici Grbović, dr Jovani Ajduković, dr Marini Savić, dr Kseniji Pavlović, dr Bojani Vasiljević, msc Jeleni Marković, msc Ester Foro, Sivlii Kantardžić, dr Aleksandru Oklješi, Otu Arčonu, Nemanji Nikoliću kao i profesorkama dr Katarini Penov-Gaši, dr Evgeniji Đurendić i dr Veri Ćirin-Novti. Veliko hvala i kolegama sa Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda posebno ekipi iz 17-ice, dr Jovani Francuz, dr Goranu Benedekoviću i dr Bojani Srećo Zelenović.*

*Zahvaljujem se mojim diplomcima i master studetima na eksperimentalnoj pomoći.*

*Zahvaljujem svim prijateljima i Tizzies-ima, Attic Groove Proje-u, Gereckima i VIS Izomerima.*

*Posebno se zahvaljujem drugarima Emi i Milošu Svirčevu na divnom prijateljstvu.*

*Veliko hvala mojim roditeljima, Tetki, Dadi, Danilu, Vladi, Branetu i baki na ljubavi, podršci kao i na strpljenju.*

*Najviše hvala Ivani.*

## Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Opšti deo.....	3
2.1.	Struktura žučnih kiselina .....	3
2.2.	Medicinska hemija žučnih kiselina .....	6
2.3.	Agonisti nuklearnih receptora zasnovani na žučnim kiselinama.....	8
2.3.1.	Agonisti FXR receptora zasnovani na žučnim kiselinama.....	8
2.3.2.	Agonisti vitamin D receptora zasnovani na žučnim kiselinama .....	10
2.3.3.	Agonisti glukokortikoidnih receptora zasnovani na žučnim kiselinama.....	12
2.4.	Površinski ćelijski receptori kao mete žučnih kiselina-TGR5 .....	14
2.4.1.	Žučne kiseline kao modulatori TGR5 .....	15
2.5.	Citotoksična aktivnost žučnih kiselina i derivata .....	17
2.6.	Antimikrobna aktivnost žučnih kiselina i derivata.....	20
2.6.1.	Eksploatacija amfifilnosti žučnih kiselina .....	20
2.6.2.	Drugi antimikrobni agensi .....	22
2.7.	Konjugati žučnih kiselina sa antitumorskim lekovima.....	25
2.8.	Sinteze odabranih biološki aktivnih alkil derivata žučnih kiselina.....	27
3.	Naši radovi .....	32
3.1.	Sinteza okso derivata žučnih kiselina .....	32
3.2.	Sinteza oksazolin derivata žučnih kiselina .....	35
3.3.	3.3. Sinteza alkil derivata žučnih kiselina Grignard-ovim reakcijama .....	40
3.4.	Uklanjanje oksazolinске zaštite i eliminacija 7-hidroksilne grupe kod 7β-butil i 7β-oktil derivata holne kiseline.....	48
3.5.	Sinteza alkilidenskih derivata žučnih kiselina u uslovima Wittig-ovih reakcija .....	50
3.5.1.	Stereohemijaska analiza Wittig-ovih reakcija .....	55
3.6.	Ispitivanje reaktivnosti derivata žučnih kiselina u uslovima HWE reakcija .....	58
3.7.	Sinteza odabranih 24-amidnih derivata žučnih kiselina.....	60
3.8.	Hidrogenacija odabranih derivata žučnih kiselina.....	62
3.9.	Ispitivanje biološke aktivnosti odabranih sintetizovanih jedinjenja .....	64
3.9.1.	Ispitivanje antitumorske aktivnosti odabranih derivata žučnih kiselina .....	64
3.10.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti derivata žučnih kiselina .....	66
4.	Eksperimentalni deo .....	69

4.1.	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Triformiloksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1) .....	69
4.2.	7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (2).....	69
4.3.	7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-3-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (3) .....	69
4.4.	7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-3-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (4).....	70
4.5.	3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-7-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (5).....	70
4.6.	Metil-holat (6) .....	70
4.7.	Metil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holat (7) .....	70
4.8.	Metil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetoksi-12-okso-5 $\beta$ -holat (8).....	70
4.9.	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-12-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (9).....	70
4.10.	3 $\alpha$ -Hidroksi-7,12-diokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (12).....	71
4.11.	7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-3-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (14) .....	71
4.12.	3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-7-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (15) .....	71
4.13.	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Diformiloksi-12-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (16) .....	72
4.14.	2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Triformiloksi-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (17) .....	72
4.15.	2-(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-3-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (18) .....	73
4.16.	2-(3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-7-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (19) .....	73
4.17.	2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Diformiloksi-12-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (20) .....	73
4.18.	2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Triformiloksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (21).....	74
4.19.	2-(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-3-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (22).....	74
4.20.	2-(3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-7-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (23).....	74
4.21.	2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Diformiloksi-12-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (24).....	75
4.22.	2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (25).....	75
4.23.	2-(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-3-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (26).....	76
4.24.	2-(3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-7-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (27).....	76
4.25.	2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-12-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (28).....	77
4.26.	2-(3 $\alpha$ -hidroksi-7,12-diokso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (29) .....	77
4.27.	2-(3,7,12-Triokso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (30) .....	77
4.28.	2-(3 $\alpha$ -Hidroksi-7,12-diokso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (31) .....	78
4.29.	2-(3,7,12-Triokso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (32).....	78
4.30.	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-7 $\beta$ -metil-5 $\beta$ -holanska kiselina (33) .....	79
4.31.	7 $\beta$ -Etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (34) .....	79
4.32.	7 $\beta$ -Butil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (35) .....	80
4.33.	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-7 $\beta$ -oktil-5 $\beta$ -holanska kiselina (36).....	80
4.34.	2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-7 $\beta$ -metil-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (37) ....	80

4.35.	2-(7β-Etil-3α,7α,12α-trihidroksi-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin ( <b>38</b> ).....	81
4.36.	2-(7β-Butil-3α,7α,12α-trihidroksi-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin ( <b>39</b> ), 2-(7β-butil-3α,7α,12α-trihidroksi-5β-holan-24-amido)-2-metil-1-propanol ( <b>41</b> ).....	81
4.37.	2-(3α,7α,12α-Trihidroksi-7β-oktil-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin ( <b>40</b> ), 2-(3α,7α,12α-trihidroksi-7β-oktil-5β-holan-24-amido)-2-metil-1-propanol ( <b>42</b> ).....	82
4.38.	3α,7α,12α-Trihidroksi-12β-metil-5β-holanska kiselina ( <b>43</b> ) .....	83
4.39.	2-(3α,7α,12α-Trihidroksi-12β-metil-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin ( <b>44</b> )..	84
4.40.	2-(12β-Etil-3α,7α,12α-trihidroksi-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin ( <b>45</b> ).....	84
4.41.	2-(12β-Butil-3α,7α,12α-trihidroksi-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin ( <b>46</b> ) ...	85
4.42.	2-(3α,7α,12α-Trihidroksi-12β-oktil-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin ( <b>47</b> ) ...	85
4.43.	7α,12α-Dihidroksi-3-okso[4- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> ]-5β-holanska kiselina ( <b>4D</b> ) .....	86
4.44.	2-(7α,12α-Dihidroksi-3-okso-5β-holan-24-amido)-2-metil-1-propanol ( <b>48</b> ) .....	86
4.45.	7-Butil-3α,12α-dihidroksi-5β-hol-6-en-24-ska kiselina ( <b>49</b> ) i (E)-7-butiliden-3α,12α-dihidroksi-5β-holanska kiselina ( <b>50</b> ) .....	86
4.46.	3α,12α-Dihidroksi-7-oktil-5β-hol-6-en-24-ska kiselina ( <b>51</b> ) i (E)-3α,12α-dihidroksi-7-oktiliden-5β-holanska kiselina ( <b>52</b> ) .....	87
4.47.	(E)-7-Etiliden-3α,12α-dihidroksi-5β-holanska kiselina ( <b>53</b> ).....	88
4.48.	2-((E)-7-Etiliden-3α,12α-dihidroksi-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin ( <b>54</b> ) ...	88
4.49.	(E)-7-Etiliden-3α-hidroksi-12-okso-5β-holanska kiselina ( <b>55</b> ).....	89
4.50.	2-[(E)-7-Etiliden-3α-hidroksi-12-okso-24-nor-5β-holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolin ( <b>56</b> )	89
4.51.	(E/Z)-3-Etiliden-7,12-diokso-5β-holanska kiselina ( <b>57a</b> i <b>57b</b> ) i (3E/Z,7E)-3,7-dietiliden-12-okso-5β-holanska kiselina ( <b>58a</b> i <b>58b</b> ) .....	90
4.52.	2-[(E/Z)-3-Etiliden-7,12-diokso-24-nor-5β-holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolin ( <b>59a</b> i <b>59b</b> ) i 2-[(3E/Z,7E)-3,7-dietiliden-12-okso-24-nor-5β-holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolin ( <b>60a</b> i <b>60b</b> ).....	90
4.53.	(E)-7-Etiliden-3,12-diokso-5β-holanska kiselina ( <b>61</b> ) .....	91
4.54.	2-[(E/Z)-3-(2-Metoksi-2-oksoetiliden)-7,12-diokso-24-nor-5β-holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolin ( <b>62a</b> i <b>62b</b> ).....	92
4.55.	(E/Z)-7α,12α-Dihidroksi-3-(2-metoksi-2-oksoetiliden)-5β-holanska kiselina ( <b>63a</b> i <b>63b</b> ) .	92
4.56.	(E)-7α,12α-Dihidroksi-3-(karboksimetilen)-5β-holanska kiselina ( <b>64</b> ) .....	93
4.57.	2-[(E)-7-Etiliden-3α,12α-dihidroksi-5β-holan-24-amido]-2-metil-1-propanol ( <b>65</b> ).....	93
4.58.	2-[(E)-7-Etiliden-3α-hidroksi-12-okso-5β-holan-24-amido)-2-metil-1-propanol ( <b>66</b> ).....	94
4.59.	2-(3α,7α,12α-Trihidroksi-5β-holan-24-amido)-2-metil-1-propanol ( <b>67</b> ) .....	94
4.60.	2-(3α,12α-Dihidroksi-7-okso-5β-holan-24-amido)-2-metil-1-propanol ( <b>68</b> ) .....	94
4.61.	3α-Acetoksi-12α-hidroksi-7ξ-etil-5β-holanska kiselina ( <b>69</b> ).....	95
4.62.	7ξ-Etil-3α,12α-dihidroksi-5β-holanska kiselina ( <b>70</b> ).....	95

4.63.	7ξ-Butil-3α,12α-dihidroksi-5β-holanska kiselina ( <b>71</b> ).....	96
5.	Zaključak .....	97
6.	Summary.....	101
7.	Skraćenice .....	104
8.	Literatura .....	105
9.	Biografija.....	116

## 1. Uvod

Žučne kiseline (ŽK) su steroidni amfifilni molekuli koji nastaju kao proizvod katabolizma holesterola serijom enzimskih reakcija koje se uglavnom odigravaju u hepatocitima jetre.<sup>1</sup> Žučne kiseline nastale klasičnim (neutralnim) ili kiselim metaboličkim putem su holna kiselina i henodeoksiholna kiselina. Ove dve kiseline spadaju u primarne žučne kiseline i one se konjugacijom sa amino-grupama glicina i taurina, prevode u hidrofilnije konjugate. Konjugati žučnih kiselina se iz jetre izlučuju i skladište u žučnoj kesi gde formiraju mešovite micelle sa fosfolipidima i holesterolom. Nakon ingestije hrane sadržaj žučne kese se zajedno sa pankreasnim sokom sekretuje u intestinalni trakt gde dolazi do digestije lipida. Milimolarne koncentracije žučnih kiselina emulguju masti što omogućava pankreasnim lipazama da razlože masti na monogliceride i masne kiseline koje se zajedno sa lipofilnim vitaminima i holesterolom apsorbuju u duodenumu. Mikroorganizmi intestinalnog trakta delimično transformišu primarne žučne kiseline u sekundarne, deoksiholnu i litholnu kiselinu. Najveći deo žučnih kiselina se reapsorbuje preko enterocita i vraća nazad u jetru preko portalne krvi. Ovim se završava proces koji se naziva enterohepatska cirkulacija. Žučne kiseline vraćene u jetru se reapsorbuju u hepatocite gde mogu biti dalje metabolisane pre nego što se rekonjuguju i ponovo izluče u žuč.<sup>2,3</sup>

Enterohepatska cirkulacija kod ljudi je veoma efikasan i značajan fiziološki sistem ne samo zbog apsorpcije nutrijenata i eliminacije ksenobiotika već i zbog održavanja metaboličke homeostaze. Pored uloge deterdženta, ŽK su važni signalni molekuli koji aktiviraju različite receptore. Najviše izučavan receptor žučnih kiselina je nuklearni receptor farnezoid X receptor (FXR). FXR posredno utiče na transkripciju gena koji kodira enzim ključan u konverziji holesterola u žučne kiseline i time negativnom povratnom spregom kontroliše biosintezu žučnih kiselina.<sup>4</sup> Pored regulacije homeostaze žučnih kiselina,<sup>5-8</sup> FXR utiče i na: I i II fazu metabolizma,<sup>9</sup> liponeogenezu,<sup>10</sup> glukoneogenezu,<sup>10</sup> supresiju tumora,<sup>11,12</sup> regeneraciju i inflamaciju jetre,<sup>13,14</sup> fibrozu jetre,<sup>15,16</sup> a ima i funkciju intestinalne barijere.<sup>17</sup>

Nuklearni receptori koji se aktiviraju žučnim kiselinama su pored već navedenog FXR receptora i pregnan X receptor (PXR) i vitamin D receptor (VDR). Pored intracelularnih receptora, žučne kiseline se vežu i aktiviraju G protein kuplovani receptor, TGR5 i sfingozin-1-fosfat receptor 2 (S1PR2). Vezivanje liganda za TGR5 rezultuje stimulacijom adenilat ciklaze koja povećanjem nivoa cAMP aktivira protein kinazu A i dalje signalne događaje. TGR5 receptor utiče na homeostazu glukoze,<sup>18</sup> potrošnju energije,<sup>19</sup> relaksaciju žučne kese<sup>20</sup> i antiinflamatorne procese.<sup>21</sup>

Raznovrsnost fizioloških uticaja receptora žučnih kiselina čini ove receptore obećavajućim terapijskim ciljevima u tretmanu nekoliko humanih bolesti.<sup>3</sup> Pojedine žučne kiseline već imaju medicinsku primenu. Terapija primarnim žučnim kiselinama je od životne važnosti za pacijente sa urođenim problemima u biosintezi žučnih kiselina,<sup>22</sup> dok se cerebralni holesterozis tretira henodeoksiholnom kiselinom.<sup>23</sup> Ursodeoksiholna kiselina se koristi u tretmanu žučnog kamena<sup>24</sup> i primarne bilijarne ciroze,<sup>22</sup> dok je 6-etil derivat henodeoksiholne kiseline trenutno u fazama II i III kliničkih ispitivanja za specifične gastrointestinalne poremećaje i bolesti jetre.<sup>25</sup>

Osnovni cilj ovog rada je sinteza novih derivata i analoga prirodnih žučnih kiselina, koji u svojoj strukturi poseduju alkil ili alkilidenski niz vezan za steroidno jezgro i karboksilnu ili oksazolinsku grupu u C-17 bočnom nizu. Sinteze opisane u ovom radu daju uvid u specifičnost hemijskog ponašanja steroidnog

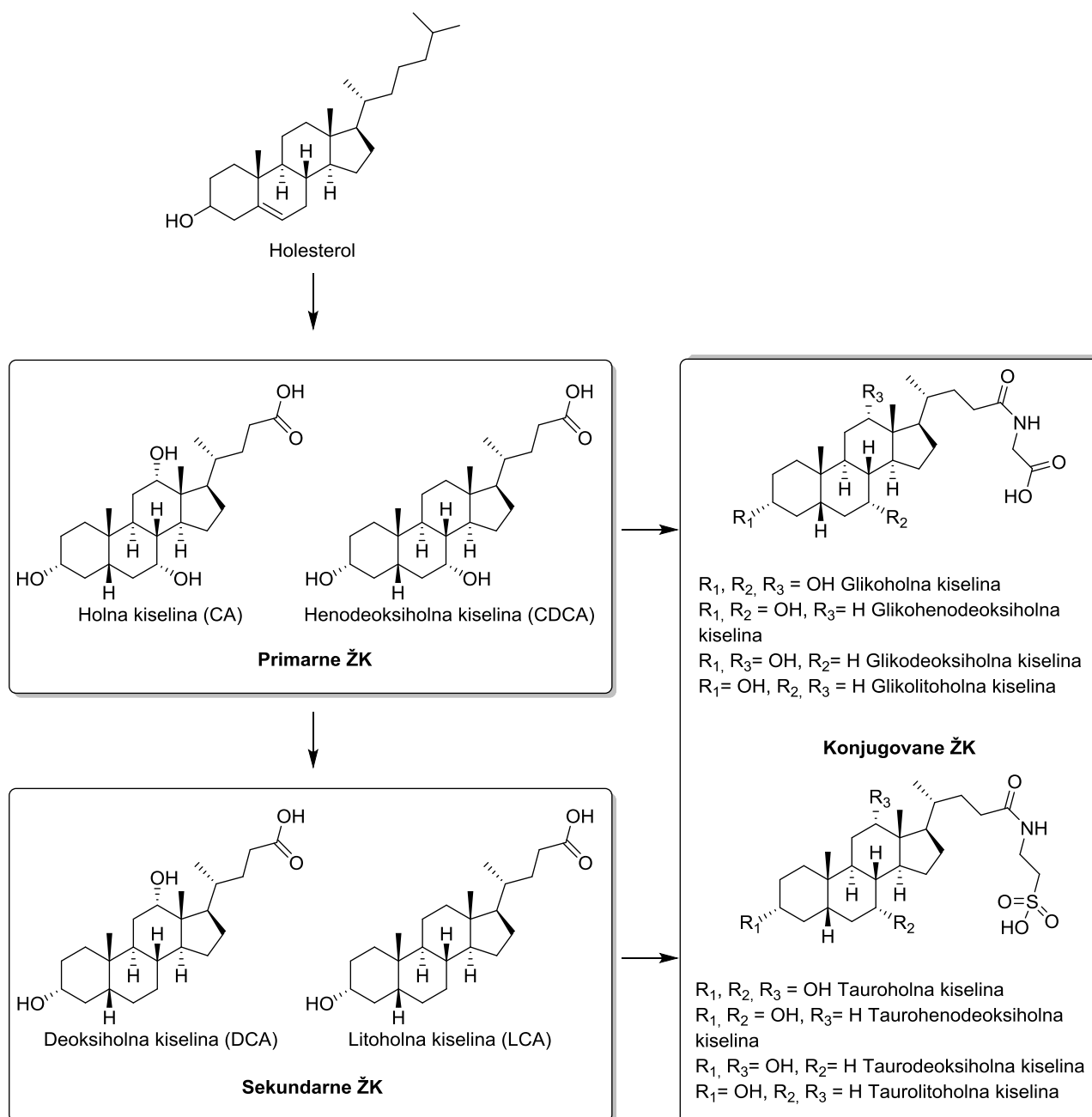
skeleta 5 $\beta$ -žučnih kiselina u reakcijama alkilovanja sa Grignard-ovim reagensima i reakcijama olefinacije sa Wittig-ovim ili Horner-Wadsworth-Emmons-ovim reagensima. Pored sinteze, dodatni zadatak ovog rada predstavlja i *in vitro* ispitivanje antiproliferativne aktivnosti novosintetizovanih jedinjenja prema odabranim ćelijskim linijama humanih tumora, kao i ispitivanje antimikrobne aktivnosti novosintetisanih derivata prema odabranim bakterijskim kulturama.



## 2. Opšti deo

### 2.1. Struktura žučnih kiselina

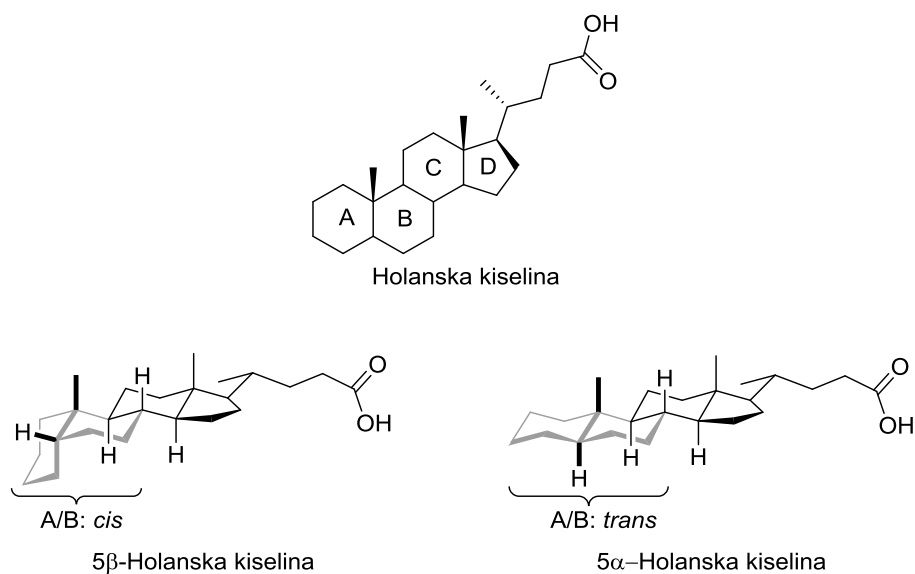
Žučne kiseline (ŽK) nastaju kompleksnim biosintetskim transformacijama holesterola. Klasičnim ili neutralnim biosintetskim putem u hepatocitima nastaje oko 75% ŽK, dok kiselim biosintetskim putem nastaju preostale količine ŽK.<sup>26</sup>



Shema 2.1.

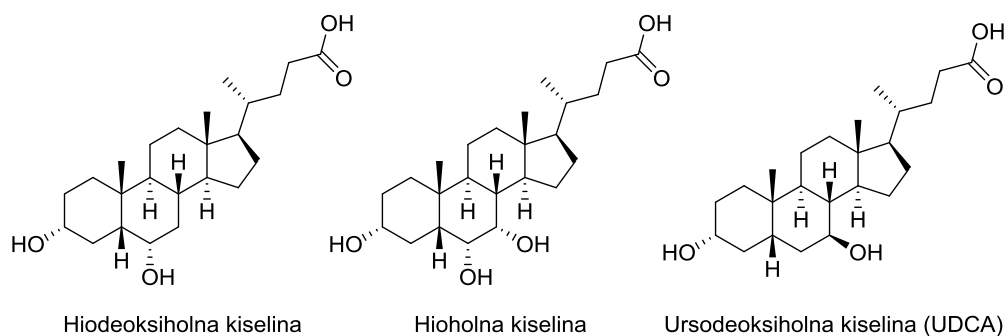
Svi esencijalni enzimi odgovorni za konverziju holesterola u ŽK se nalaze u jetri, koja je i glavno mesto biosinteze ŽK. Žučne kiseline koje nastaju u jetri se nazivaju primarne ŽK i to su holna (CA) i henodeoksiholna kiselina (CDCA, *Shema 2.1.*). Primarne ŽK se u jetri, pre sekrecije, konjuguju sa glicinom ili taurinom. Konjugacija sa ovim amino-kiselinama menja kiselo-bazne osobine žučnih kiselina i omogućava da na pH duodenuma budu jonizovane, pa se konjugovane žučne kiseline nazivaju i žučnim solima. Nakon što dospeju u debelo crevo dejstvom bakterija crevne flore, konjugati ŽK, podležu dekonjugaciji i dehidroksilaciji, pri čemu nastaju sekundarne žučne kiseline, deoksiholna kiselina (DCA) i litholna kiselina (LCA).

Kako primarne tako i sekundarne kiseline su većinom derivati 5 $\beta$ -holanske kiseline, samo su kod nekih guštera nađene žučne kiseline koje su derivati 5 $\alpha$ -holanske kiseline. Ove dve kiseline međusobno se razlikuju po geometriji povezivanja A i B prstenova steroidnog skeleta. Kod žučnih kiselina 5 $\beta$  serije, A i B prstenovi su *cis* povezani, dok su u 5 $\alpha$  seriji *trans* povezani (*Shema 2.2.*).<sup>1</sup>



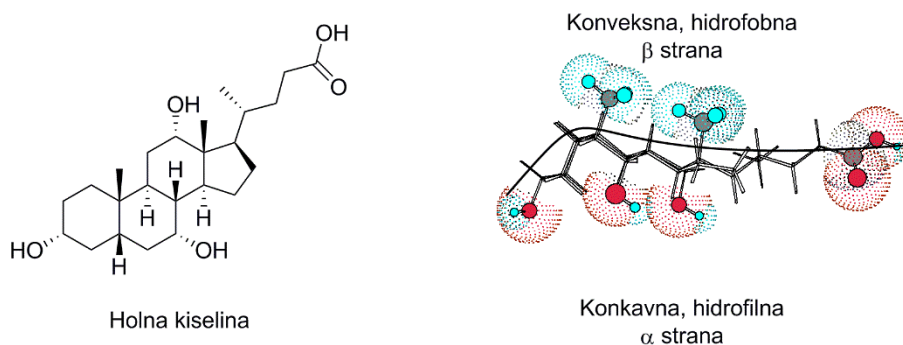
*Shema 2.2.*

Pored navedenih, među najrasprostranjenije žučne kiseline spadaju i hiodeoksiholna, hiolna, ursodeoksiholna kiselina (UDCA, *Shema 2.3.*).



Shema 2.3.

Osobine žučnih kiselina usko su povezane sa geometrijom molekula. Na steroidnom skeletu molekula 5 $\beta$ -holanske kiseline može se razlikovati konveksna  $\beta$  i konkavna  $\alpha$  površina. Hidroksilne grupe žučnih kiselina najčešće su orijentisane prema  $\alpha$  strani steroidnog skeleta, dok angularne, aksijalne metil grupe na C-10 i C-13 imaju  $\beta$  orijentaciju. Usled konformacione fleksibilnosti bočnog niza, karboksilna grupa se takođe može nalaziti sa  $\alpha$  strane steroidnog sistema prstenova. Stoga je konkavna površina ( $\alpha$  strana) steroidnog skeleta žučnih kiselina polarna – hidrofilna, dok je konveksna površina ( $\beta$  strana) nepolarna – hidrofobna (Shema 2.4.). Istovremeno prisustvo hidrofobne i hidrofilne regije u molekulu žučnih kiselina označava se kao amfifilnost.



Shema 2.4.

Odnos hidrofilne i hidrofobne površine molekula žučnih soli ima uticaj na samoasocijaciju ovih molekula i formiranje micelarnih agregata. Koncentracioni opseg na kom anjoni ŽK formiraju micle se naziva kritična micelarna koncentracija (CMC). Konjugacija sa glicinom ili taurinom smanjuje CMC.<sup>27</sup> Osobina ŽK da formiraju micle je osnova njihove uloge u digestiji i transportu nutrijenata.

## 2.2. Medicinska hemija žučnih kiselina

Pojava velikog broja publikacija o dizajnu, sintezi i biološkoj aktivnosti derivata ŽK je dovela do potrebe za postojanjem pregleda literature iz navedene oblasti na jednom mestu. Iscrpan pregled literature u oblasti medicinske hemije žučnih kiselina su uradili Sharma *et al.*<sup>28</sup>

Protein, otkriven 1995. godine, koji inteeaguje sa ligand-vezujućim domenom retinoidnog X receptora nazvan je farnezoid X receptor (FXR) po farnezolu, seskviterpenskome metabolitu, koji ga slabo aktivira.<sup>29,30</sup> Tri nezavisne istraživačke grupe su otkrile da su ŽK fiziološki ligandi ovog receptora.<sup>31–33</sup>

Ispostavilo se da je FXR glavni regulator sinteze i metabolizma ŽK, kao i da preko njega ŽK utiču na metabolizam lipida i glukoze što ga je učinilo privlačnim terapeutskim ciljem za metaboličke poremećaje.<sup>5,10,34–37</sup>

Kristalna struktura ligand-vezujućeg domena FXR-a rešena je sa 6 $\alpha$ -etil henodeoksiholnom kiselinom (6-ECDCA, obetiholna kiselina) u aktivnom centru. Obetiholna kiselina se pokazala uspešnom u II fazi kliničkih ispitivanja za primarnu bilijarnu cirozu (primary biliary cirrhosis, PBC), takođe se vrše ispitivanja njene primene i kao terapijika za bolest nealkoholne masne jetre (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) kao i za nealkoholni stetohepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH).<sup>38,39</sup> NASH je jedan od najčešćih uzroka napredne bolesti jetre koja može dovesti do ciroze i hepatocelularnog karcinoma.<sup>40</sup>

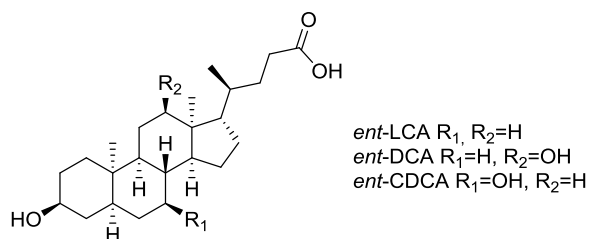
Otkriće povezanosti FXR-ŽK je duboko uticalo na polje istraživanja ŽK. Molekuli koji su do tada bili poznati uglavnom zbog deterdžentskih osobina, mogu da deluju i kao signalni molekuli što je nagovestilo postojanje drugih fizioloških interakcija. Nakon ovog otkrića je pronađeno da ŽK aktiviraju receptor X jetre (liver X receptor, LXR), vitamin D receptor (VDR) i glukokortikoidni receptor (GR).<sup>41–43</sup> Ovim je skelet ŽK postao „privilegovana struktura“ za interakcije sa različitim receptorima povezanim sa velikim brojem metaboličkih procesa.

Drugi bitan događaj bio je pronalazak liganda TGR5, G protein kuplovanog receptora ŽK, 2002–2003. godine.<sup>44,45</sup> Naime, aktivacija TGR5 utiče na homeostazu glukoze i potrošnju energije što ga čini značajnom novom metom u tretmanu metaboličkih poremećaja i gojaznosti.

Otkriće receptora ŽK, FXR i TGR5, otvorilo je nove mogućnosti u pronalaženju lekova, a tome su doprinela i zanimljiva otkrića nekoliko povezanih oblasti. U prošloj deceniji je razjašnjena uloga hepatičkih i intestinalnih transportera u regulaciji enterohepatičke cirkulacije ŽK.<sup>46</sup> Serijom uticajnih studija na *knockout* miševima heteromerni transporter organskih rastvoraka Ost $\alpha$ -Ost $\beta$  je identifikovan kao protein odgovoran za eksport ŽK iz bazolateralne membrane ilealnih enterocita.<sup>47–49</sup> Transporteri ŽK kao Ost $\alpha$ -Ost $\beta$  i transporter ŽK zavistan od apikalnog natrijuma (ASBT), koji je odgovoran za preuzimanje ŽK u ilealnim enterocitima su postali mete lekova za oslobađanje hepatičkog tereta ŽK jetre i za tretman hiperholesterolemije.<sup>46,50,51</sup>

Dosta pažnje je posvećeno razjašnjenju uticaja ŽK na ćelijsku vijabilnost, diferencijaciju i proliferaciju. Deoksiholna kiselina (DCA), litholna kiselina (LCA) i henodeoksiholna kiselina (CDCA) mogu da indukuju apoptozu u različitim ćelijama unutrašnjim i spoljašnjim putem, kao i putevima koji vode preko endoplazmatičnog retikuluma.<sup>52–56</sup> Posrednik u ovim efektima još nije detektovan i često se u

objašnjavanju koristi nespecifično ponašanje ćelijske membrane.<sup>52,57</sup> Značajan momenat u istraživanju žučnih kiselina bila je sinteza enantiomera DCA, CDCA i LCA (*Shema 2.5.*) koji su pružili novu perspektivu u ispitivanju specifičnosti efekta ŽK na ćelijsku vijabilnost.<sup>58,59</sup> Sintetičke *ent*-DCA, *ent*-LCA i *ent*-CDCA su manje citotoksične od njihovih prirodnih analoga i manje aktivne na nivou FXR, VDR i TGR5.<sup>59,60</sup> Ispitivanja koja su izveli Sharma i saradnici<sup>61</sup> ukazuju da postoje specifični strukturni zahtevi za toksičnost ŽK, što je u skladu sa prethodno navedenim.



*Shema 2.5.*

Sekundarne ŽK su povezane sa razvojem gastrointestinalnih kancera uključujući i kancer jetre, pankreasa i debelog creva.<sup>62–66</sup> Takođe, ŽK su označene kao potencijalni kontributori patogeneze Barrett-ovog oesofagusa (jednjaka), prekarcinomskog stanja i dominantnog faktora rizika za razvoj adenokarcinoma jednjaka.<sup>67–69</sup> Uloga ŽK u razvoju kancera je kompleksna i analiza signalnih puteva sugerše umešanost oksidativnog stresa, oštećenja DNK i drugih signalnih molekula iz familije protein kinaze C i transkripcionih faktora AP-1 i NF-κB, za koje se zna da su deregulisani tokom tumorogeneze.<sup>70–78</sup> Drugi mehanizmi uključuju i proteine endoplazmatičnog retikuluma, grp78 i CHOP.<sup>54,72</sup> Nedavno je otkriveno da DCA uzrokuje fragmentaciju goldžijevog aparata i fragmenti ove organele su nađeni u biopsijama tkiva pacijenata koji boluju od ulcerativnog kolitisa i raka debelog creva.<sup>76</sup> Žučne kiseline, takođe, pokreću izlučivanje soli i vode iz debelog creva po za sad nepoznatom mehanizmu.<sup>79,80</sup>

Za razliku od DCA i LCA, UDCA se koristi za tretman inflamatornih bolesti jetre kao što su PBC i primarni sklerozing kolangitis (primary sclerosing cholangitis, PSC). Ursodeoksiholna kiselina ima potencijal i kao hemoprotektivni agens.<sup>81–83</sup> Oralno uneta UDCA se brzo apsorbuje u tankom crevu što rezultuje malom koncentracijom ove kiseline koja stiže do debelog creva. Disulfatni C-7 i C-3,7 derivati UDCA sprečavaju intestinalnu apsorpciju čime poboljšavaju raspoloživost ove kiseline u debelom crevu. Za razliku od prirodne kiseline, ovi derivati se uglavnom putem fecesa izlučuju u nepromenjenom obliku i podležu minimalnoj konverziji u toksičnu LCA. Ove osobine čine sulfatne derivate UDCA efektivnijim hemoprotektivnim agensima od prirodne UDCA.<sup>84</sup> Nedavno je publikovano da glutamatski derivat UDCA specifično oslobađa UDCA u kolonu.<sup>85</sup>

Žučne kiseline se više ne mogu smatrati molekulima isključivo vezanim za gastrointestinalnu fiziologiju i patologiju. Žučne kiseline se mogu naći u čitavom organizmu. One mogu da izazovu fatalnu srčanu aritmiju u toku intrahepatičke holestaze tokom trudnoće, efekat koji je neočekivano posredovan muskarinskim receptorima.<sup>86</sup> Biosintetski C-24 i C-27 intermedijeri ŽK su nedavno otkriveni u ljudskoj cerebrospinalnoj tečnosti.<sup>87</sup> Za neke od detektovanih derivata se pokazalo da su ligandi LXR-a. Biološke implikacije ovih izuzetnih otkrića su daleko od jasnih. Sugerisana je moguća uloga u etiologiji

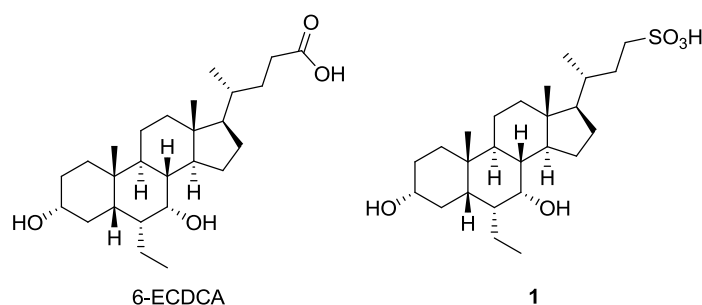
Alchajmerove bolesti, dok u drugim studijama, aktiviranje LXR-a je povezano sa smanjenjem simptoma ove bolesti.<sup>87</sup> Zanimljivo je da taurinski konjugati UDCA imaju potencijalnu ulogu kao neuroprotektanti u Alchajmerovoj i Huntingtonovoj bolesti iako mehanizam delovanja nije poznat.<sup>88,89</sup>

## 2.3. Agonisti nuklearnih receptora zasnovani na žučnim kiselinama

### 2.3.1. Agonisti FXR receptora zasnovani na žučnim kiselinama

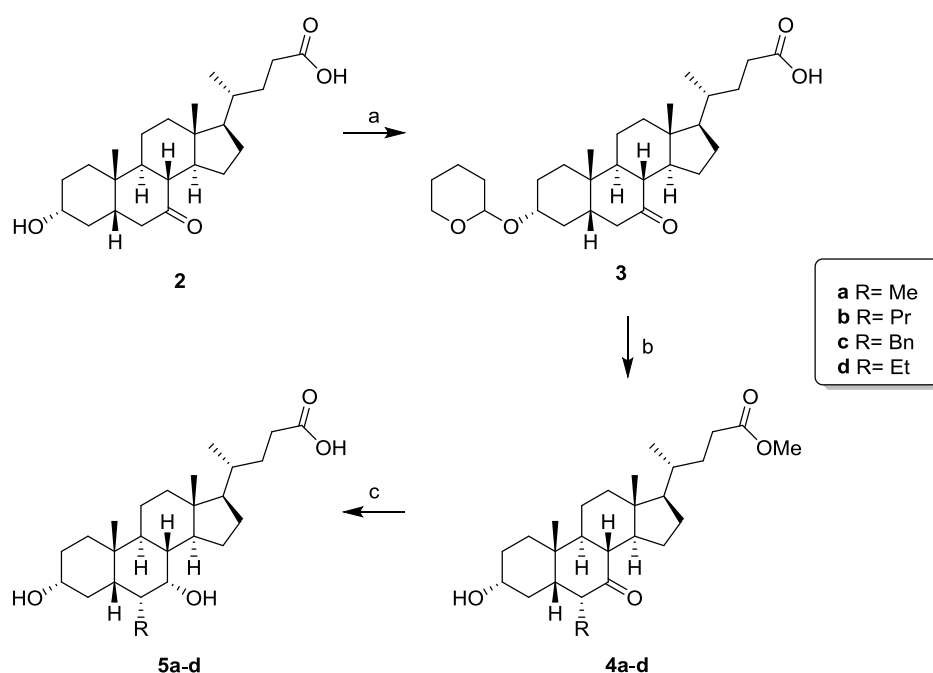
Receptor FXR je glavni regulator homeostaze ŽK. Vezivanje ŽK za ligand vezujući domen FXR indukuje konformacione promene koje dovode do dimerizacije sa RXR i naknadno do transaktivacije ili represije gena.<sup>90</sup> Važan FXR ciljani gen je mali heterodimerni partner (small heterodimer partner, SHP) koji može da deaktivira LXR što dovodi do smanjenja sinteze ŽK neutralnim putem.<sup>5,90</sup> Aktivacija FXR žučnim kiselinama takođe rezultuje represijom Na-tauroholat polipeptidnog kotransportera (NTCP) i ASBT dok u isto vreme stimuliše eksportnu pumpu žučnih soli, OST $\alpha/\beta$ , citohrom P450 3A4, UDP-glukuronoziltransferazu-2Bs i sulfotransferazu 2A1. Većina ovih efekata je posredovana preko SHP i zajedno povećavaju eliminaciju ŽK.<sup>90-94</sup> Ispitivanja *in vitro* i *in vivo* su pokazala da aktivacija FXR-a menja transkripcione gene koji učestvuju u sintezi masnih kiselina, triglicerida i holesterola i metabolizmu lipoproteina.<sup>95-97</sup> Takođe ŽK aktivirani FXR reguliše glukoneogenezu u jetri, sintezu glikogena i osetljivost na insulin.<sup>98,99</sup>

Najpotentniji prirodni agonist FXR-a je CDCA ( $EC_{50}=8.6 \mu M$ ). Jednostavnom derivatizacijom CDCA u 6-ECDCA (obetiholna kiselina, *Shema 2.6.*) urađenoj u laboratoriji Pellicciari-ja, dobija se značajno povećanje potentnosti do  $EC_{50}$  vrednosti od 99 nM. Uvođenje veće alkil grupe u položaj 6 $\alpha$  smanjuje aktivnost što ukazuje na prisustvo malog hidrofobnog džepa u strukturi receptora.<sup>100</sup> Ovo je i dokazano doking eksperimentima u kojima je pokazano da etil grupa staje u hidrofobni džep zapremine 7 Å<sup>3</sup> koji je premali da se u njega smeste veći alkil supstituenti, kao što je *n*-propil.<sup>100</sup> Obetiholna kiselina je najnapredniji klinički kandidat nove generacije metaboličkih modulatora zasnovanih na ŽK. Istraživanja su pokazala da obetiholna kiselina poseduje zaštitne efekte od kolitisa, da reguliše ekspresiju ključnih proinflamatornih citokina u ljudskim intestinalnim i imunim ćelijama i da može da ima ulogu u lečenju inflamatornih bolesti creva.<sup>101</sup> Zamena karboksilne funkcije obetiholne kiseline sa sulfonskom kiselinskom grupom (**1**) je povećala potentnost agonističkog efekta na 14 nM.<sup>102</sup>



Shema 2.6.

Prva faza u sintezi 6-ECDCa (**5d**) (Shema 2.7.), kao i njegovih metil- (**5a**), propil- (**5b**) i benzil- (**5c**) analoga je zaštita C-3 hidroksilne grupe 7-okso derivata litoholne kiseline **2**.<sup>103</sup> Tretmanom 3-tetrahidropiraniloksi derivata 7-okso litoholne kiseline **3**, sa metil-jodidom, propil-, benzil- i etil-bromidom, respektivno, na  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz korišćenje litijum-diizopropilamida (LDA) kao baze, u smeši rastvarača HMPA/THF i naknadnim uklanjanjem tetrahidropiranil zaštite, dobijeni su odgovarajući 6 $\alpha$ -alkil derivati: **4a–d** u prinosima od 22, 13, 5 i 12% respektivno. Redukcijom keto grupe u položaju C-7 kod 6 $\alpha$ -alkil derivata **4a–d** sa natrijum-borhidridom uz naknadnu baznu hidrolizu metil-estra i kiselu obradu, dobijeni su 6 $\alpha$ -alkil derivati henodeoksiholne kiseline **5a–d**. Reakcija alkilovanja je išla stereospecifično i dobijeni su jedino 6 $\alpha$ -alkil derivati. Ovu selektivnost autori objašnjavaju repulzivnim 1,3-diaksijalnim interakcijama koje bi postojale između 6 $\beta$ -alkil i C-19 metil grupe.



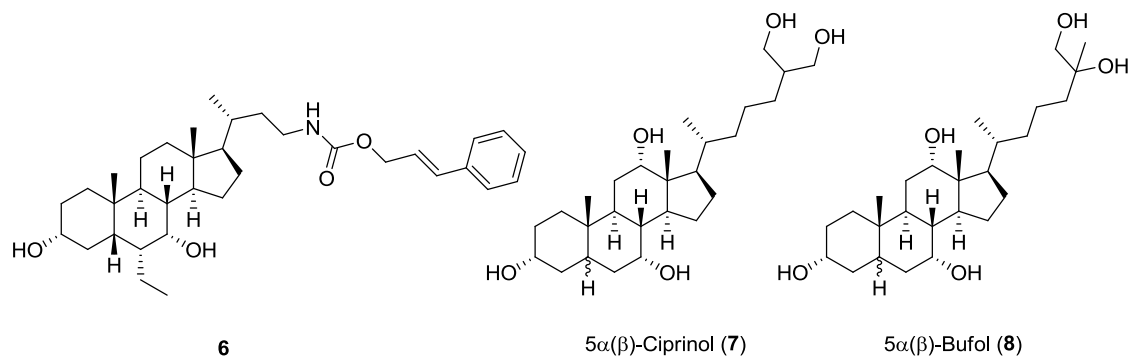
Shema 2.7. (a) *p*-TsOH, 3,4-dihidro-2*H*-piran, dioksan,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; (b) i) LDA, R-Br ili Me-I, THF, HMPA,  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; ii) 10% HCl, MeOH, refluks; (c) i) NaBH<sub>4</sub>; ii) NaOH, MeOH.

Yu i saradnici<sup>104</sup> su u sintezi 6-ECDCa koristili etil-jodid, koji poseduje jod kao bolju odlazeću grupu u odnosu na originalni postupak u kom je korišćen etil-bromid. Prinos nukleofilne supstitucije je povećan na 37%, dok je u prvoj sintezi prinos bio svega 12%.

Cinamil karbamatni derivat **6** (Shema 2.8.) pokazuje EC<sub>50</sub>=590 nM za aktivaciju FXR-a, ali samo delimičnu agonističku aktivnost. Regulacija gena FXR-om ima kompleksan odgovor i može da ima poželjan i nepoželjan efekat. Aktivacija FXR-a može da dovede do inhibicije sinteze ŽK, inhibicije bazolateralnih ŽK transportera i do smanjenja nivoa HDL u cirkulaciji.<sup>105,106</sup> Parcijalni FXR agonisti bi mogli da omoguće selektivnu aktivaciju genskih klastera i da ispoljavaju samo željene efekte.

Sinteza serije žučnih alkohola je pružila zanimljiva SAR zapažanja iako su alkoholi imali tek približnu aktivnost CDCA.<sup>107</sup> Alkohol (22*S*)-5 $\beta$ -holestan-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,22-tetrol je pokazivao slabu agonističku aktivnost dok je (22*R*)-izomer imao aktivnost sličnu CDCA. Skraćivanje bočnog lanca je značajno

manjivalo aktivnost. Zanimljivo je da su 5 $\alpha$ -izomer CDCA, 5 $\alpha$ -holestan-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26-triol, pa čak i 5 $\alpha$ -holestan-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26,27-tetrol, aktivirali FXR sa sličnom efikasnošću kao i njihovi 5 $\beta$  analozi. Nasuprot ovome, 5 $\alpha$  derivati ciprinola (**7**) i bufola (**8**) su antagonisti FXR dok 5 $\beta$  analozi imaju slično agonistično dejstvo kao i CDCA.<sup>108</sup>



Shema 2.8.

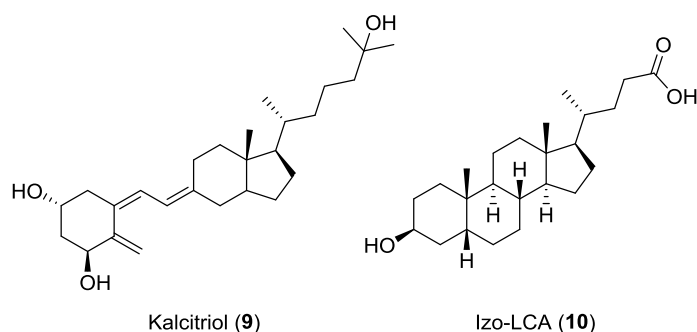
### 2.3.2. Agonisti vitamin D receptora zasnovani na žučnim kiselinama

Endogeni ligand vitamin D receptora (VDR) je kalcitriol (1 $\alpha$ ,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> ili 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, **9**, Shema 2.9.) i odgovoran je za homeostazu kalcijuma i fosfata.<sup>43</sup> Aktivacija VDR je praćena promenama koje se dešavaju na sličan način kao i kod drugih nuklearnih receptora.

Makishima i saradnici<sup>42</sup> su 2002. godine objavili da se sekundarna ŽK, LCA i njen 3-keto derivat mogu vezati i aktivirati VDR i indukovati *in vivo* ekspresiju CYP3A, koji je poznat i po tome što detoksifikuje jetru od LCA. Aktivacija VDR dovodi i do smanjenja sinteze ŽK.<sup>109</sup> Autori ovih studija sugerišu da aktivacija VDR sa LCA može biti adaptivni odgovor u cilju smanjenja toksičnosti i karcinogenosti ove kiseline.<sup>42,43,109</sup> Smanjena sinteza ŽK bi mogla objasniti protektivni efekat vitamina D i VDR kod kancera debelog creva,<sup>42</sup> iako su se nedavno pojavili dokazi da se to možda dešava zbog sposobnosti VDR liganada da inhibiraju  $\beta$ -katenin i DDK-4 transkripcionu aktivnost.<sup>110</sup> S druge strane, Gaspa *et al.*<sup>111</sup> sugerišu da je LCA samo parcijalni agonist VDR jer može smanjiti stimulatorni efekat vitamina D na ekspresiju u humanim osteoblastima.

Ispitivanje strukturnih interakcija LCA i kalcitriola sa VDR je ukazalo da vezivanje ovih liganada dovodi do različitih promena u konformaciji VDR.<sup>112,113</sup> Endogeni ligand, kalcitriol (**9**) (Shema 2.9.), ima važnu funkciju u homeostazi kalcijuma i utiče na imunitet i diferencijaciju ćelija što ga čini potencijalnim terapeutikom.<sup>114</sup> Međutim, vitamin D i njegovi analozi izazivaju ozbiljnu hiperkalcemiju što im značajno ograničava kliničku eksploataciju.<sup>114</sup> Drugačija priroda vezivanja LCA i sličnih derivata bi mogla uticati na spektar različitih fizioloških funkcija.

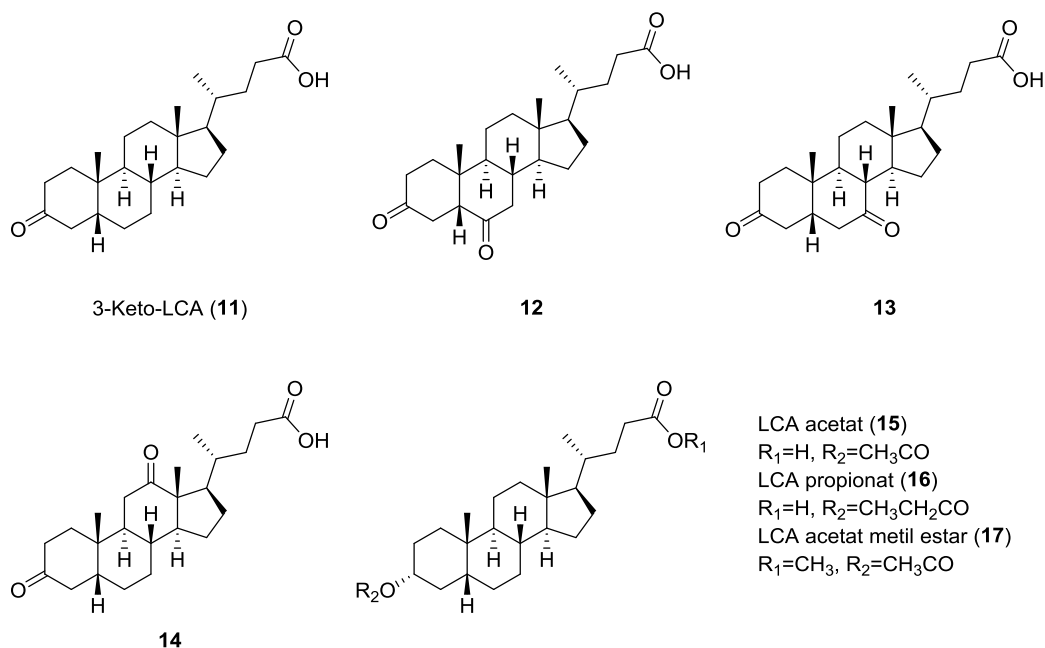




Shema 2.9.

Ispitivana je sposobnost nekoliko jednostavnih analoga LCA da transaktiviraju VDR u HEK293 ćelijama. Nađeno je da je hidroksilna grupa u položaju 3 $\alpha$  neophodna za aktivnost. Izomerizacijom (**10**) ili njenim uklanjanjem aktivnost se gubi. Zanimljivo je da je 3-keto LCA (**11**) potentan aktivator VDR, dok uvođenje keto grupe u položaj 6 (**12**), 7 (**13**) ili 12 (**14**) kod 3-keto LCA dovodi do smanjenja transaktivacione sposobnosti derivata (*Shema 2.10*).<sup>115</sup> Serija od 24 estra je pokazala smanjenu aktivnost u odnosu na osnovni molekul, dok esterifikacija 3 $\alpha$ -hidroksilne grupe daje derivate slične aktivnosti kao i LCA. Acetat LCA (**15**) aktivira VDR u meri sličnoj kao i LCA, ali je EC<sub>50</sub> vrednost za transaktivaciju 30 puta niža od EC<sub>50</sub> vrednosti LCA.<sup>115</sup> Acetat (**15**) i propionat (**16**) LCA aktiviraju VDR ciljane gene kod nekoliko ćelijskih linija i indukuju diferencijaciju ćelija mijeloidne leukemije u 10  $\mu$ M i 30  $\mu$ M koncentracijama, respektivno. Štaviše, ovi derivati ne uzrokuju promenu nivoa kalcijuma u plazmi i ekspresiju proteina značajnih za apsorpciju kalcijuma iz creva.<sup>114</sup> Navedene osobine čine ove derivate selektivnim aktivatorima VDR bez izazivanja hiperkalcemije.

Nekalcemični ligandi VDR, gde spadaju LCA, LCA acetat (**15**), LCA propionat (**16**) i metil-estar LCA acetata (**17**) su patentirani zbog njihovih promotornih uticaja na sazrevanje ćelija koji imaju primenu u ortopediji, naročito u slučajevima gde sazrevanje ćelije vodi do ubrzavanja regeneracije i zaceljivanja kostiju.<sup>116,117</sup> Nedavno je otkriveno da tretman ljudskih primarnih keratinocita sa LCA rezultuje indukcijom katelicidina, anti-mikrobnog peptida, što može da bude od značaja u tretmanu kožnih bolesti koje se odlikuju neregulisanim ekspresijom katelicidina.<sup>118</sup> Acetatni (**15**) i propionatni (**16**) estri LCA takođe povećavaju ekspresiju katelicidina.<sup>114</sup> U cilju iskorišćavanja intrigantnih, VDR posredovanih efekata LCA medicinski hemičari će morati da prevaziđu značajne nedostatke ovog molekula. LCA je najcitotoksičnija i jedna od najmanje vodorastvornih ŽK. Postoje značajni i zanimljivi izazovi u poboljšanju korisnih, a smanjenju negativnih osobina ovog molekula.



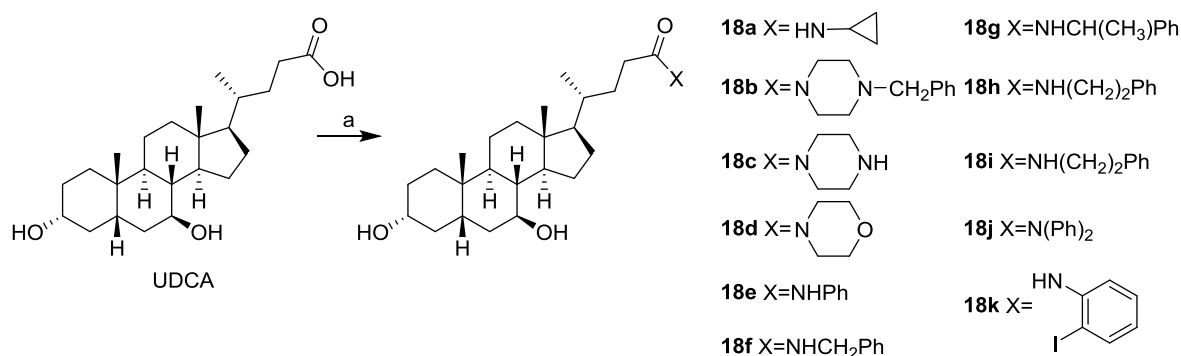
Shema 2.10.

### 2.3.3. Agonisti glukokortikoidnih receptora zasnovani na žučnim kiselinama

Ursodeoksiholna kiselina je efikasna u tretmanu hepatičkih inflamatornih bolesti kao što je PBC.<sup>119</sup> Takođe, supresuje produkciju interleukina-2<sup>120</sup> i gama interferona,<sup>121</sup> a može da smanji hepatocelularnu i bilijarnu ekspresiju oba, bitna, histokompatibilna kompleksa molekula klase I i klase II kod pacijenata sa PBC.<sup>122,123</sup> Ova ŽK može da inhibira proizvodnju prostaglandina  $E_2$  kod PBC pacijenata,<sup>124</sup> a pokazano je i da pokazuje supresivni efekat na transkripcionom nivou na proizvodnju fosfolipaze  $A_2$  IIA u hepatocitima. Postoji velika verovatnoća da su ovi i drugi fiziološki i biološki efekti UDCA posledica agonističkog efekta na glukokortikoidni receptor (GR).<sup>125</sup>

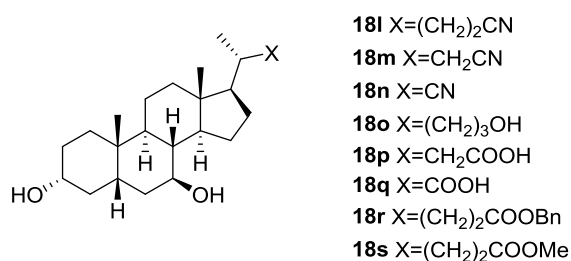
Glukokortikoidni receptor spada u grupu nuklearnih receptora eukariotskih transkripcionih regulatora.<sup>126</sup> U neaktivnom stanju je vezan sa citoplazmatske strane za šaperon proteine hsp90 i imunofiline FKBP52, FKBP51 Cyp40 i PP5.<sup>127</sup> Vezivanje liganda uzrokuje disocijaciju proteina i translokaciju receptora na stranu nukleusa što dovodi do aktivacije transkripcije i represije gena.<sup>128</sup>

Sharma i saradnici<sup>28</sup> su objavili sintezu serije C-24 derivata UDCA koji uzrokuju GR translokaciju sa većom potentnošću i biohemijskom efikasnošću. Sinteza amidnih derivata **18a–18k** je prikazana na *Shemi 2.11*. Slobodne hidroksilne grupe UDCA su prvo zaštićene formijatnim estrom a potom je karboksilna kiselina prevedena u hlorid kiseline (SOCl<sub>2</sub>, refluks). Nakon tretmana sa odgovarajućim aminima u prisustvu Et<sub>3</sub>N i uklanjanja zaštitivnih grupa sa NaOMe u metanolu dobijeni su odgovarajući amidi **18a–18k**.



*Shema 2.11.* (a) i) mravlja kiselina/perchlorna kiselina, 47 °C, 3 h; ii) SOCl<sub>2</sub>, refluks, 2 h; iii) RNH<sub>2</sub>, NEt<sub>3</sub>, st; iv) NaOMe/MeOH, 70 °C, 2 h.

Sharma i saradnici<sup>28</sup> su takođe sintetizovali derivate UDCA **18l–s** (*Shema 2.12.*) kod kojih je karboksilna grupa uklonjena ili premeštena primenom klasičnih hemijskih transformacija žučnih kiselina.<sup>129,130</sup>



*Shema 2.12.*

Ispitivanje biološke aktivnosti ovih derivata je pokazalo da derivati sa skraćenim bočnim lancem povećavaju potentnost u odnosu na UDCA. Benzil (**18r**) i metil (**18s**) estri nisu indukovali translokaciju GR. Amidni derivati UDCA, *N*-ciklopropil (**18a**) i benzilpiperazin (**18b**) imaju biohemijsku efikasnost kao deksametazon (potentan sintetički glukokortikoid) i 100 puta veću potentnost od UDCA. Međutim, odgovarajući CDCA i DCA analozi ne izazivaju translokaciju GR, što naglašava značaj 7β-hidroksilne grupe za aktivnost. Kompeticionim eksperimentima pokazano je da jedinjenje **18a** ne izbacuje deksametazon iz ligand-vezujućeg domena već regrutuje koaktivator što je indicacija konformacionih

promena u ligand-vezujućem domenu. Aktivnost ovih jedinjenja ukazuje na potencijal skeleta žučnih kiselina u dizajnu agenasa sposobnih da dovedu do supresije inflamatornog signalinga.

Yasukawa i saradnici<sup>131</sup> su ispitivali antiinflamatorne efekte prirodnih i sintetičkih ŽK kod upale uha na modelu miša. Zanimljivo je da je CDCA posedovala veći antiinflamatorni efekat u odnosu na LCA, DCA, CA i UDCA. Generalno su derivati sa 7 $\alpha$ -hidroksilnom grupom bili efektivniji u odnosu na  $\beta$ -izomere. Takođe C<sub>24</sub> metil estri su bili aktivniji od odgovarajućih slobodnih kiselina UDCA, CA i DCA što nije slučaj kod CDCA i LCA. Hidroksilovanje CDCA na C-5, 12, 15 ili 16 je smanjilo aktivnost u odnosu na CDCA, dok je uvođenje OH grupe na C-15 kod metil-CDCA značajno povećalo aktivnost. Istraživanje pokazuje da antiinflamatorno dejstvo ŽK model specifično i da se ne može pripisati specifičnom uticaju na adheziju leukocita na endotelne ćelije.<sup>119</sup>

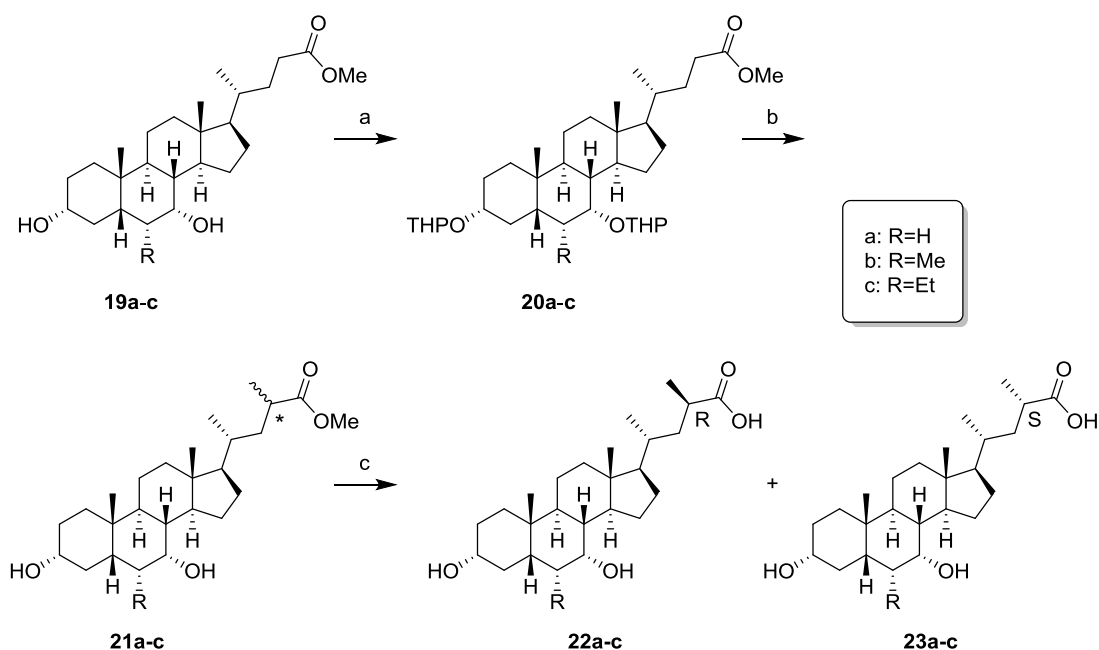
## 2.4. Površinski ćelijski receptori kao mete žučnih kiselina-TGR5

Žučne kiseline svoje metaboličke efekte ispoljavaju kroz aktivaciju specifičnog G-protein kuplovanog receptora TGR5.<sup>44</sup> Ovaj receptor je ekspresovan u placenti, slezini, plućima, mlečnim žlezdama, želucu, tankom i debelom crevu, jetri, nadbubrežnoj žlezdi, bubrezima, skeletnim mišićima i hipofizi.<sup>132</sup> Aktivacija TGR5 je praćena oslobađanjem G $\alpha_s$  podjedinice i aktivacijom adenilat ciklaze. Povećanje intracelularne koncentracije sekundarnog glasnika cAMP aktivira protein kinazu A, koja fosforiluje transkripcioni faktor CREB, što zauzvrat povećava transkripcionu aktivnost ciljanog gena. U termogenim tkivima kao što su braon adipozno tkivo i mišići, aktivacija TGR5 vodi lokalnoj produkciji tiroidnog hormona koji ubrzava bazalni metabolizam.<sup>92</sup> Ovaj efekat je povezan sa sprečavanjem gojaznosti uzrokovane ishranom i tolerancije na insulin kod miševa hranjenih hranom sa visokim sadržajem masti.<sup>19</sup> Postoje dokazi da je TGR5, kao i FXR, uključen u homeostazu glukoze. Aktivacija TGR5 vodi lučenju inkretina, peptida sličnog glukagonu (glucagon like peptid 1, GLP-1), koji stimuliše proizvodnju i sekreciju insulina u beta ćelijama pankreasa i inhibira lučenje glukagona.<sup>132,133</sup> Primenom agonista TGR5, oleanolne kiseline, Sato je sa saradnicima pokazao da aktivacija ovog receptora može dovesti do smanjenja nivoa glukoze u krvi i zaštititi od gojenja miševa hranjenih hranom sa visokim sadržajem masti.<sup>134</sup> Sugerisano je i da TGR5 može da posreduje imunomodulatornim osobinama ŽK. Tako u makrofazima, monocitima i Kupffer-ovim ćelijama, aktivacija TGR5 inhibira otpuštanje citokina.<sup>135</sup> Novija istraživanja su pokazala da je TGR5 ekspresovan u 50% mienteričnih neurona u crevima i da DCA uzrokuje inhibiciju spontane kontrakcije u tankom crevu i glatkom tkivu kolona, što ukazuje da je aktivacija TGR5 žučnim kiselinama verovatno uključena u regulaciju pokretljivosti creva.<sup>136,137</sup>

### 2.4.1. Žučne kiseline kao modulatori TGR5

U tretmanu gojaznosti TGR5 se pojavio kao značajna meta, a taurolitoholna kiselina (TLCA), LCA, DCA, CDCA i CA su najsnažniji i najefektivniji aktivatori ovog liganda. Ove žučne kiseline su poslužile kao osnov za razvoj sintetskih liganada TGR5.<sup>92</sup>

Serijski analoga CDCA, razvijena u laboratoriji Pellicciari-ja i saradnika je patentirana kao modulatori TGR5. Jedno od najpotentnijih jedinjenja je natrijumova so 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -trihidroksi-6 $\alpha$ -etil-5 $\beta$ -holanske kiseline sa EC<sub>50</sub> 650 nM.<sup>138</sup> Slična aktivnost je dobijena i kod sulfatnih i sulfonatnih derivata CA i CDCA.<sup>139</sup> Pellicciari-jeva grupa je sintetizovala i derivate sa metil grupom u položaju C-23 **22a** i **23a** kao i 6,23 dimetil derivate **22b** i **23b** i 6-etil-23-metil derivate **22c** i **23c** (Shema 2.13.). Neki od njih su se pokazali kao dobri agonisti TGR5.<sup>140</sup> Uvođenje metil grupe u položaj C-23 je urađeno na način koji su ovi istraživači ranije koristili kod sinteze 6-ECDCA.<sup>103</sup> Naime, metil holanoati **19a-c** su tretirani sa 3,4-dihidro-2H-piranom u dioksanu u prisustvu katalitičkih količina *p*-TsOH pri čemu su dobijeni derivati sa zaštićenim hidrosilnim grupama **20a-c**. Reakcija jedinjenja **20a-c** sa MeI uz prisustvo LDA kao baze, praćena tretmanom sa metanolnim rastvorom HCl daje odgovarajuću stereoisomernu smešu C-23 metilovanih derivata **21a-c**. Nakon uklanjanja metil estarske zaštite dobijena smeša 23R (**22a-c**) i 23S (**23a-c**) metil derivata je razdvojena fleš hromatografijom.



Shema 2.13. (a) 3,4-dihidro-2H-piran, *p*-TsOH, dioksan, 25 °C; (b) i) LDA, CH<sub>3</sub>I, THF, -78 °C; ii) 10% HCl, MeOH, 25 °C; (c) NaOH, MeOH, refluks.

Zanimljivo je da C-23(R) izomer **22a** umereno aktivira i TGR5 i FXR sa TGR5/FXR EC<sub>50</sub> odnosom 2.5. Odgovarajući S epimer **23a** ne aktivira FXR sve do koncentracije od 100 μM, dok je i dalje aktivan prema

TGR5 ( $EC_{50}$  3.58  $\mu$ M). Uvođenjem etil grupe u 6 $\alpha$  položaj dobija se **23c**, selektivni i potentni TGR5 agonist sa 95 nM  $EC_{50}$  vrednošću.

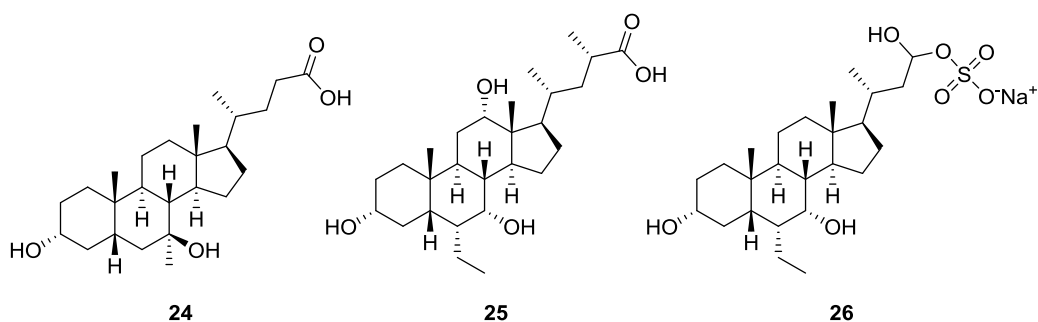
Pomenuta istraživačka grupa je nastavila sa skriningom serije 68 jedinjenja koja se sastojala od prirodnih ŽK, sintetičkih derivata ŽK kao i steroidnih hormona i dobili su zanimljive SAR rezultate. Skraćivanje bočnog niza smanjuje aktivnost, što se vidi kod *nor* i *dinor* derivata LCA i CDCA. Metil estar CDCA je zadržao svoju potentnost dok zamena karboksilne grupe sa hidroksilnom ili sulfatnom grupom kod CDCA, CA i UDCA povećava aktivnost za deset puta. Sulfatni derivat CDCA poseduje  $EC_{50}$  od 440 nM.<sup>141</sup> Ovi rezultati su potvrđeni u studiji Iguchi-ja i saradnika<sup>142</sup> koji su publikovali da su žučni alkoholi sa hidroksilnim grupama u bočnom nizu potentni kao i LCA u aktiviranju TGR5.

LCA i njen taurinski derivat, TLCA, su najpotentniji prirodni ligandi TGR5, sa  $EC_{50}$  vrednošću TLCA od 285 nM, što je skoro duplo potentnije u odnosu na LCA ( $EC_{50}$ =530 nM). Kiseonik u položaju C-3 $\alpha$  je važan za aktivnost pošto uklanjanje C-3 hidroksilne grupe ili izomerizacija u  $\beta$  položaj poništava aktivnost. Takođe, okso grupa na istom C atomu povećava aktivnost. Uvođenje fluora u položaj 7 $\alpha$  povećava aktivnost LCA dva puta, dok se najpotentniji derivat ( $EC_{50}$ =76 nM) dobija uvođenjem metil grupe kako u 7 $\alpha$ , tako i u 7 $\beta$  položaj LCA. 7-Metil derivati su i veoma selektivni za TGR5 u odnosu na FXR sa TGR5/FXR  $EC_{50}$  odnosom od 0.0047.<sup>141</sup> Međutim zbog poznate toksičnosti LCA ograničen je potencijal za razvijanje ovih liganada u kliničke svrhe pa su druge ŽK atraktivnije kao polazna jedinjenja.

Ispitani su sintetski derivati UDCA kao agonisti TGR5 i kao najaktivniji se pokazao 7 $\alpha$ -metil derivat UDCA (**24**, *Shema 2.14.*) sa aktivnošću sličnoj LCA. Ovaj derivat pokazuje i selektivnost za TGR5 u odnosu na FXR (TGR5/FXR  $EC_{50}$  odnos od 0.1).<sup>143</sup>

Istraživačka grupa Pellicciari-ja je pažnju usmerila na 6 $\alpha$ -etil-23(S)-metilholnu kiselinu (INT-777, **25**) zbog odsustva toksičnosti polaznog molekula, CA, u odnosu na CDCA i LCA i zbog bolje rastvorljivosti u vodi usled prisustva tri hidroksilne grupe. Ovaj molekul je selektivan i potentan TGR5 agonist ( $EC_{50}$  820 nM) sa povećanom metaboličkom stabilnošću u odnosu na CA zbog prisustva alkil grupe u položaju C-6 koja inhibira bakterijsku 7 $\alpha$ -dehidroksilaciju. Takođe, poseduje snažan holeretski efekat i pokazano je da *in vivo* povećava sekreciju GLP-1 kao i potrošnju energije kod miševa sa ishranom uzrokovanom gojaznošću, što je rezultovalo smanjenjem telesne težine, stetoze i fibroze.<sup>144,145</sup> Ovi rezultati imaju veliki terapijski potencijal, s obzirom da ljudi poseduju značajne količine braon adipoznog tkiva, isto tkivo koje je ispoljavalo efekte aktiviranja TGR5 kod miševa. Jedinjenje INT-777 (**25**) i drugi derivati CA su patentirani kao TGR5 modulatori za lečenje: metaboličke bolesti, inflamatorne bolesti, bolesti jetre i srca, autoimunih i bolesti bubrega, kancera i gastrointestinalnih bolesti.<sup>138</sup>

Rizzo i saradnici<sup>146</sup> su našli da je natrijumova so 6 $\alpha$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,23-trihidroksi-24-nor-5 $\beta$ -holan-23-sulfata (INT-767, **26**) agonist i TGR5 i FXR (*Shema 2.14.*). Ovo jedinjenje sadrži strukturne elemente potentnih FXR (6 $\alpha$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina) i TGR5 agonista (INT-777, **25**) i pokazuje  $EC_{50}$ =30 nM za aktivaciju FXR i 630 nM za TGR5 aktivaciju, poseduje dobru stabilnost u fazama I i II enzimskih modifikacija i ne pokazuje toksičnost u HepG2 ćelijama. Indukuje FXR-zavisnu apsorpciju lipida u adipocitima i TGR5 zavisnu GLP-1 sekreciju. Istraživanja *in vivo* pokazuju smanjenje nivoa holesterola i triglicerida kod dijabetičnih miševa što ukazuje na farmakološki potencijal ovog jedinjenja.<sup>146</sup>

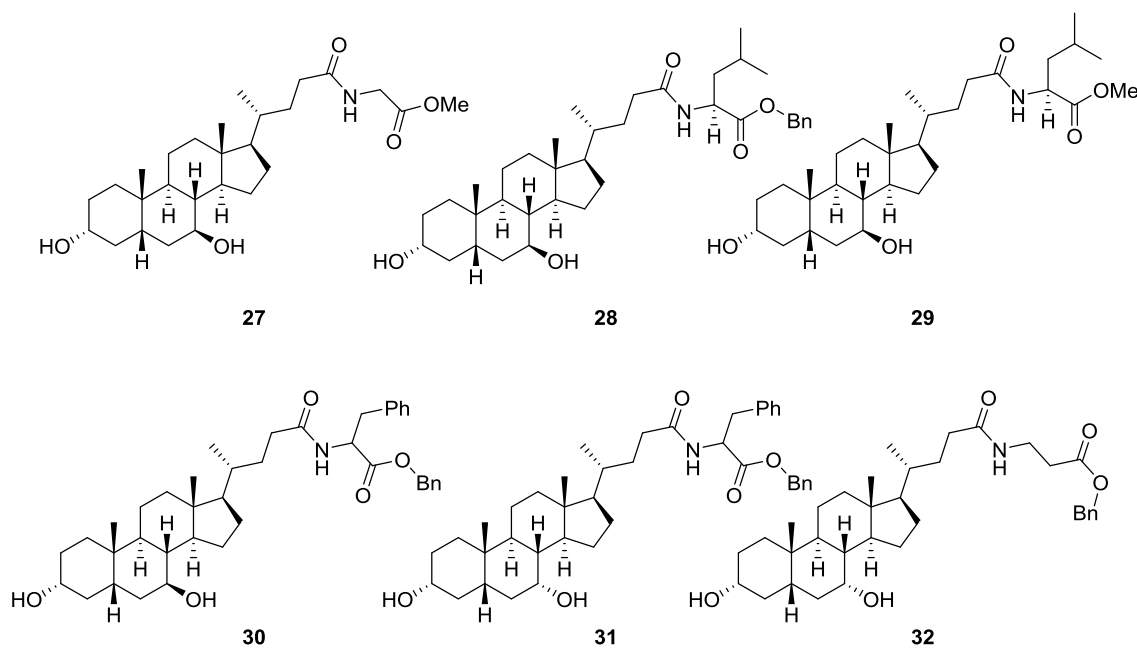


Shema 2.14.

## 2.5. Citotoksična aktivnost žučnih kiselina i derivata

Dokazano je da DCA, CDCA i LCA izazivaju apoptozu u ćelijskim linijama debelog creva i jednjaka.<sup>52–56</sup> Zanimljivo je da je česta izloženost visokim koncentracijama ŽK povezana sa rezistencijom ćelija na apoptozu.<sup>63,147,148</sup> Ćelije epitela sluzokože debelog creva kod osoba sa rakom debelog creva imaju povećanu otpornost na DCA-indukovanu apoptozu.<sup>149,150</sup> Gubitak apoptoznog odgovora je povezan sa povećanom stopom mutacija što povećava rizik od malignosti.<sup>63</sup> Ovo je jedan od razloga zbog čega je puno pažnje usmereno na ispitivanje uticaja ŽK na vijabilnost ćelija. Iako je pokazano da ŽK izazivaju apoptozu različitim apoptotičkim putevima,<sup>151</sup> razumevanje strukturne osnove toksičnosti ŽK je još uvek ograničeno. Hemičari su modifikovali steroidni skelet ŽK u cilju razvijanja potentnijih citotoksičnih agenasa i razumevanja njihovog mehanizma delovanja. Kako ŽK mogu da smanje vijabilnost različitih tipova ćelija, one mogu da predstavljaju racionalnu terapiju za različite tumore.<sup>152</sup> Pleiotropan mehanizam delovanja može da bude prednost usled dejstava na različite proteine povezane sa apoptozom.

Istraživanja sintetičkih derivata ŽK kao apoptoznih agenasa je do sad uključivalo relativno mali broj jedinjenja. Citotoksičnost sintetičkih konjugata UDCA **27–30** i amino-kiselinskih derivata CDCA **31, 32** (Shema 2.15.) je detaljno ispitivana. Derivati CDCA **31** i **32** pokazuju antitumorsku aktivnost prema ćelijskim linijama glioblastoma U-118MG, U-87MG, T98G i U-373M. Takođe inhibiraju rast tumora i produžuju život na životinjskim modelima ne-gojaznih dijabetičnih i imunodeficientnih miševa.<sup>153</sup> Navedeni derivati izazivaju klasične oblike apoptoze koji uključuju fragmentaciju DNK, kondenzaciju nukleusa, oštećenje mitohondrija i otpuštanje citohroma c.<sup>153,154</sup> Mehanizam apoptoze je varirao u različitim ćelijskim linijama. U ćelijama raka dojke i prostate, inhibicija rasta i apoptoza je povezana sa povećanjem ekspresije Bax, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i p53. U Jurkat ćelijama apoptoza se dešava aktivacijom kaspaza, dok su kod SiHa ćelija raka grlića materice uključeni i c-Jun N-terminal kinaza-zavisani i NF-κB-zavisani procesi.<sup>152,155</sup> Derivat UDCA **27** pokazuje anti-angiogeni efekat u CAM testu (chicken embryo chorioallantoic membrane assay). Prirodna UDCA pokazuje IC<sub>50</sub> od 4 µg/CAM u ovom testu dok derivati **27, 28** i **29** pokazuju IC<sub>50</sub> vrednosti od 0.09, 0.08 i 0.6 µg/CAM, respektivno.<sup>156</sup>

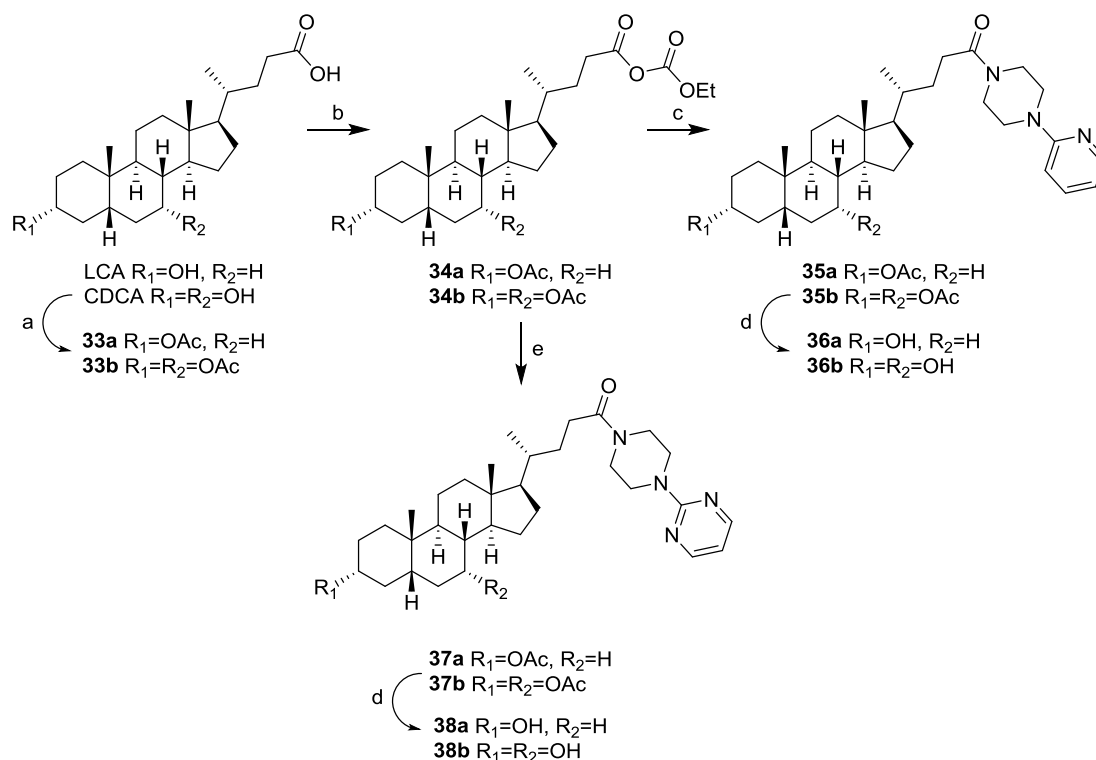


Shema 2.15.

El Kihel i saradnici<sup>157</sup> su objavili sintezu serije piperazinilkarboksiamidnih derivata LCA i CDCA i ispitivanje njihove aktivnosti prema ćelijskim linijama glioblastoma multiforme (GBM-12), multiplog mijeloma (KMS-11) i kancera debelog creva (HCT-116). Sintaza jedinjenja **36b** i **38a** koja pokazuju niske LD<sub>50</sub> vrednosti (8.5  $\mu$ M) i uzrokuju cepanje Mcl-1 i PARP-a, kao i inhibiciju NF- $\kappa$ B signalinga i DNA fragmentaciju, je prikazana na *Shemi* 2.16.

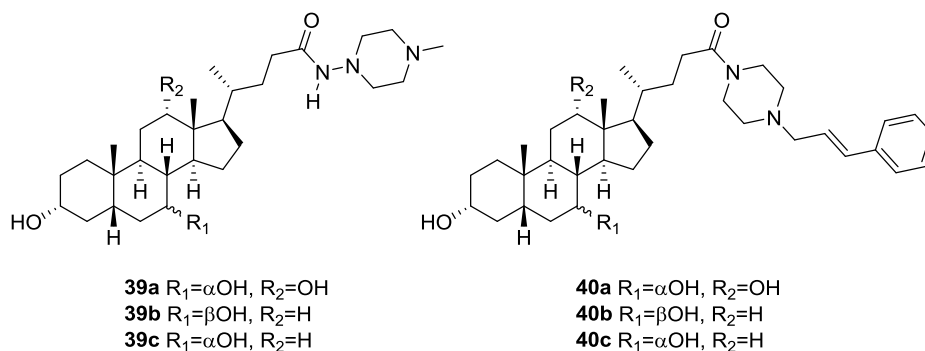


Hidroksilne grupe LCA i CDCA su acetilovane, a karboksilne grupe prevedene u mešovite anhidride **34a** i **34b** tretmanom sa Et<sub>3</sub>N i etil-hloroformijatom. Dejstvom odgovarajućih piperazina i uklanjanjem acetatne zaštite dobijeni su finalni proizvodi **36a,b** i **38a,b**.



Shema 2.16. (a) Ac<sub>2</sub>O, Py, st, 15 h; (b) EtOCOCl, Et<sub>3</sub>N, CHCl<sub>3</sub>, st, 50 min; (c) 1-(2-piridil)piperazin, Et<sub>3</sub>N, CHCl<sub>3</sub>, st, 16 h; (d) KOH, EtOH, reflux, 24 h; (e) 1-(2-pirimidil)piperazin, Et<sub>3</sub>N, CHCl<sub>3</sub>, st, 16 h.

Primenjujući sličnu metodologiju ova istraživačka grupa je nedavno objavila sintezu 1-amino-4-metilpiperazin i trans-1-cinamilpiperazinskih derivata CA, UDCA i CDCA (**39** i **40**, Shema 2.17.).<sup>158</sup> Cinamilni derivati UDCA i CDCA (**40b,c**) su bila jedina jedinjenja iz ove serije koja su imala IC<sub>50</sub><50 μM aktivnost prema GBM-12, KMS-11 i HCT-116 ćelijskim linijama, dok je cinamilpiperazinski derivat CDCA (**40c**) imao najveću aktivnost, IC<sub>50</sub>=8.5 μM.<sup>158</sup>



Shema 2.17.

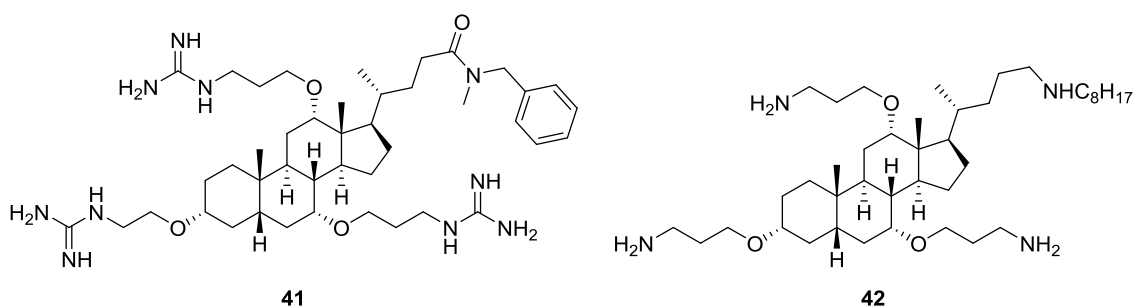
Interakcije ŽK sa različitim tipovima ćelija izgleda da nude nov mehanizam hemijski indukovane ćelijske smrti. Postoji potreba za biohemijskom karakterizacijom ovih događaja u cilju povećanja specifičnih apoptotičkih procesa u odnosu na univerzalne, deterdžentske, procese.

## 2.6. Antimikrobna aktivnost žučnih kiselina i derivata

### 2.6.1. Eksploatacija amfifilnosti žučnih kiselina

Citotoksične osobine ŽK i njihovih derivata su najviše korišćene u dizajnu antimikrobnih i antifungalnih agenasa. Iako same ŽK pokazuju slabo antimikrobno dejstvo, one povećavaju osetljivost, obično rezistentnih, *Lactobacillus* sojeva prema aminoglikozidnim antibioticima streptomycinu, kanamicinu i gentamicinu.<sup>159–162</sup> Istraživanja Elkinsa i saradnika<sup>163</sup> su pokazala da ŽK povećavaju apsorpciju gentamicina. Amifilnost ŽK im omogućava da poremete integritet prokariotskih membrana pri koncentracijama manjim od CMC, što rezultuje u propuštanju protona, kalijuma i drugih ćelijskih komponenata.<sup>164</sup> Ovakav tip amfifilnosti podseća na ponašanje lekova poput amfotericina-B i polimiksina.<sup>165</sup>

Spoljašnja membrana gram negativnih bakterija poseduje zaštitnu barijeru koja sprečava prolazak proteaza, lizozima i antibiotika. Supstance koje se vezuju sa LipidA-om, glavnom komponentom spoljašnje membrane, ometaju uređenje ćelijske membrane i čine gram-negativne bakterije osetljivijim na antibiotike. Bakterije retko razvijaju rezistenciju na membrano-aktivna jedinjenja jer to zahteva velike promene u celokupnoj strukturi membrane organizma.<sup>166</sup>



Shema 2.18.

Za nekoliko derivata ŽK je dokazano da povećavaju permeabilnost bakterijskog ćelijskog zida za antibiotike.<sup>167,168</sup> Ovi katjonski steroidni antibiotici su nazvani keragenini.<sup>169</sup> Razvoj ovih jedinjenja je počeo 1998. godine sintezom jedinjenja sličnih **41** (Shema 2.18.) koji poseduje minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) od 2 µg/mL za *Escherichia coli* (*E. coli*). Sva jedinjenja u ovoj seriji u koncentracijama 1–2 µg/mL su spustila MIC eritromicina sa 70 µg/mL na 1 µg/mL protiv *E. Coli* i na 5 µg/mL za *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Zbog otežanog prolaska kroz spoljašnju membranu eritromicin ima smanjenu aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama u odnosu na Gram-

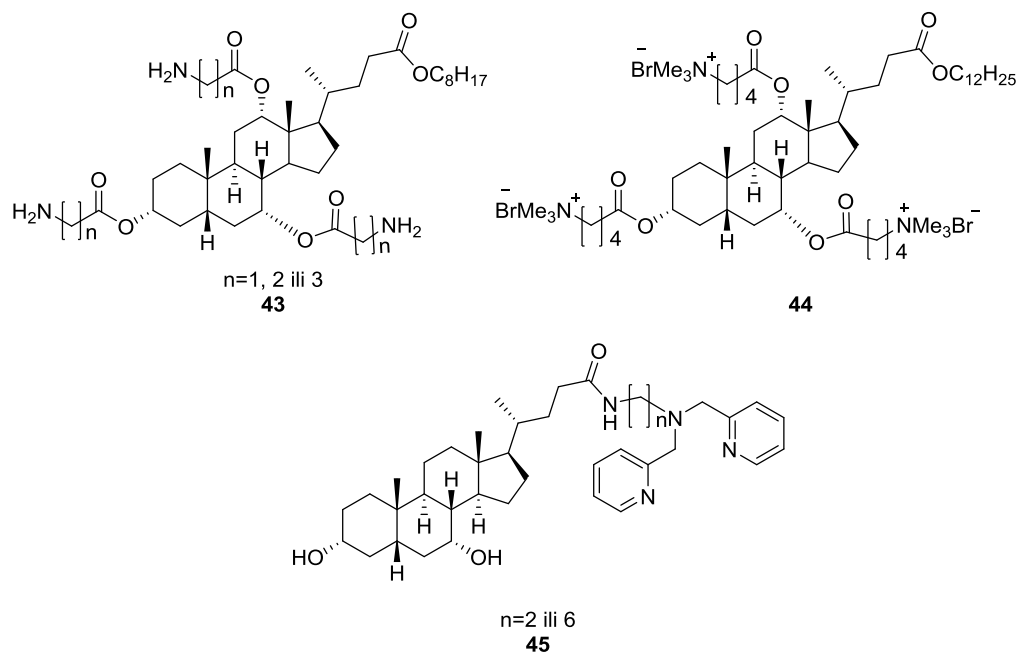
pozitivne.<sup>170</sup> Slično je i kod upotrebe antibiotika novobiocina protiv *E. coli*, kome se pri upotrebi sa kerageninom MIC smanjuje sa 500 µg/mL na 1 µg/mL. Zanimljivo je da se manipulacijom bočnog niza derivata ŽK mogu razdvojiti njihove unutrašnje bakteriostatske i baktericidne karakteristike od efekta senzitivizacije. Jedinjenja sa kraćim bočnim nizom su dobri permeabilizeri spoljašnje membrane i senzitiviraju *E. coli* i *P. aeruginosa* prema eritromicinu i novobiocinu, ali ne mogu samostalno da ubiju ove bakterije. S druge strane, jedinjenja sa primarnom amino i guanadino grupom imaju minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBC) od 1 µg/mL prema *E. coli*, što je slično polimiksinu B. Autori ukazuju da se duži bočni niz ubacuje u ćelijsku membranu posle inicijalnog vezivanja sa spoljašnjom membranom.<sup>171</sup>

Jedan od najaktivnijih keragenina je **42** sa MIC od 0.3–3 µg/mL i MBC od 0.4–6 µg/mL protiv gram pozitivnih koka i gram negativnih štapića (*Shema 2.18.*).<sup>172</sup> Posедуje i antimikrobnu aktivnost protiv *Helicobacter pylori*, *P. aeruginosa* i virusa vakcinije.<sup>173–175</sup> Takođe je aktivan i protiv vankomicin-rezistentnih *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) i meticilin-rezistentnih *S. aureus* (MRSA) sojeva.<sup>169,173</sup> Neželjena osobina jedinjenja **42** je ispoljavanje hemolitičke aktivnosti prema eritrocitima.<sup>172</sup> Dodatkom nejonskog surfaktanta poloksamera 407, hemolitička aktivnost se skoro potpuno uklanja. Ova kombinacija može se može primenjivati u antibakterijskoj terapiji topikalnih infekcija.<sup>173</sup>

Grupa Savage-a i saradnika<sup>166</sup> je sintetizovala derivate ŽK koji bi se *in vivo* mogli razložiti u netoksične metabolite. Takva jedinjenja mogu poslužiti kao antibakterijski agensi u hrani. Esterifikacijom 3, 7 i 12 hidroksilnih grupa dobijaju se jedinjenja sa dobrom antibakterijskom aktivnošću koja hidrolizuju pod blago baznim uslovima (**43**, *Shema 2.19.*) čime bi postala neaktivna nakon ingestije i ne bi imala uticaja na crevnu floru.<sup>166</sup>

Amfifile bazirane na ŽK sintetisali su Willemen *et al.*<sup>176</sup> Uvođenjem trimetilamonijum grupa u položaje 3, 7 i 12. Esterifikacijom karboksilne grupe dobija se surfaktant sa tri permanentne jonske grupe, koje interreaguju sa negativno naelektrisanom membranom, i hidrofobnim nizom koji olakšava apsorpciju. Jedinjenje **44** pokazuje MIC vrednosti za *E. coli* i *Enterococcus faecalis* (*E. Faecalis*) od 25 i 12.5 µg/mL respektivno.

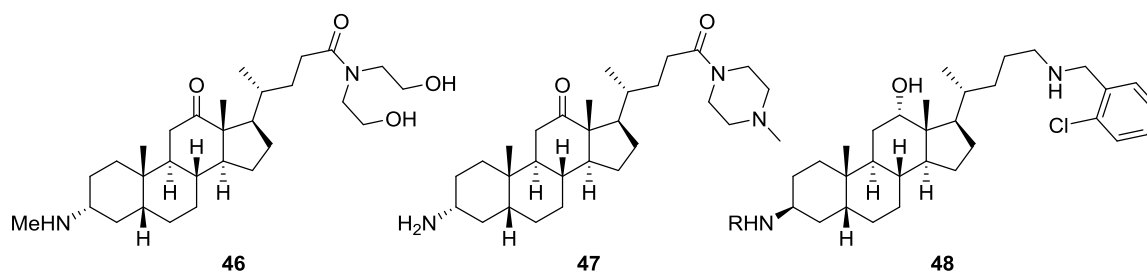
Huang i saradnici<sup>177</sup> su ispitivali efekte tridentatnih konjugata CA, CDCA, UDCA i hioDCA na gljivicu *Aspergillus niger*, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao i na bakterije *E. coli* (gram negativna) i *S. aureus* (gram pozitivna). Antifungalna aktivnost derivata CA i CDCA (**45**) je slična amfotericinu B prema soju *Saccharomyces cerevisiae*, ali pokazuje skroman efekat ka *E. coli* i *S. aureus*. Postojanje 7α-hidroksilne grupe značajno utiče na aktivnost, s obzirom da je derivat CDCA znatno aktivniji u odnosu na odgovarajući UDCA analog.



Shema 2.19.

### 2.6.2. Drugi antimikrobni agensi

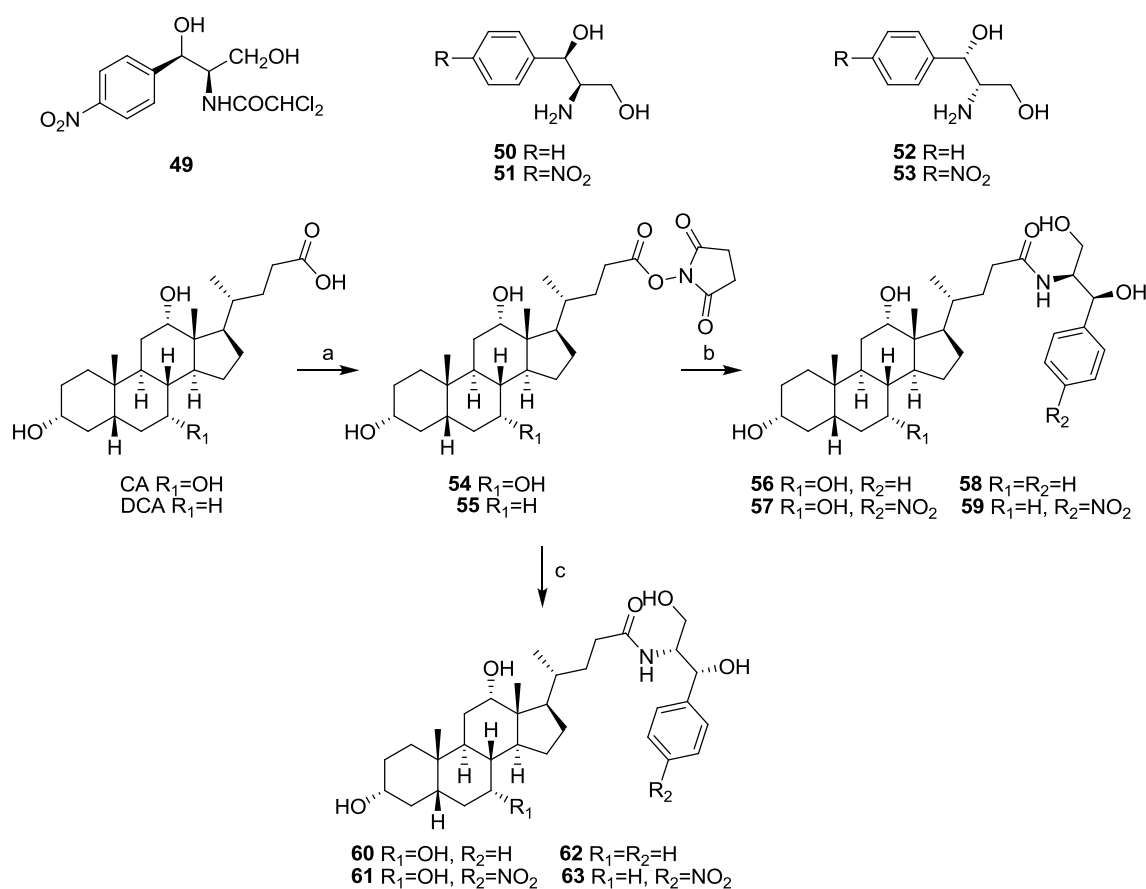
Sintetizovani su i antimikrobni derivati ŽK čija aktivnost nije zavisna od amfilnosti. Bellini-jeva grupa je publikovala seriju istraživanja o antimikrobnim efektima analoga ŽK.<sup>178–186</sup> Fokus grupe bio je na dizajnu 24-*N* supstutuisanih amida i amina i njihovih 3 $\alpha$  i 3 $\beta$  *N*-alkilamino derivata (Shema 2.20.). Uvođenje 3 $\beta$  amino grupe u 24-amino derivat **48** je povezano sa dobrom antimikrobnom aktivnošću protiv gram pozitivnih i gram negativnih sojeva kao i protiv kvasaca i gljivica (MIC 0.9–31  $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>180,182</sup>



Shema 2.20.

Hazra i saradnici su sintetizovali amide **56–63** (Shema 2.21.) iz hiralnih amino-alkohola **50–53** i CA i DCA.<sup>187</sup> Naime oni su dihaloroacetamido ostatak hloramfenikola (**49**) zamenili amidom CA i DCA. Karboksilna grupa CA i DCA je prevedna u *N*-sukcinimidil estre **54** i **55**, koji su u reakcijama sa aminima **50–53** dali odgovarajuće amide **56–63**. Sintetizovani derivati **56**, **58–63** su aktivni prema gram pozitivnim bakterijama *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Sterptococcus mutans*. Ispitana je

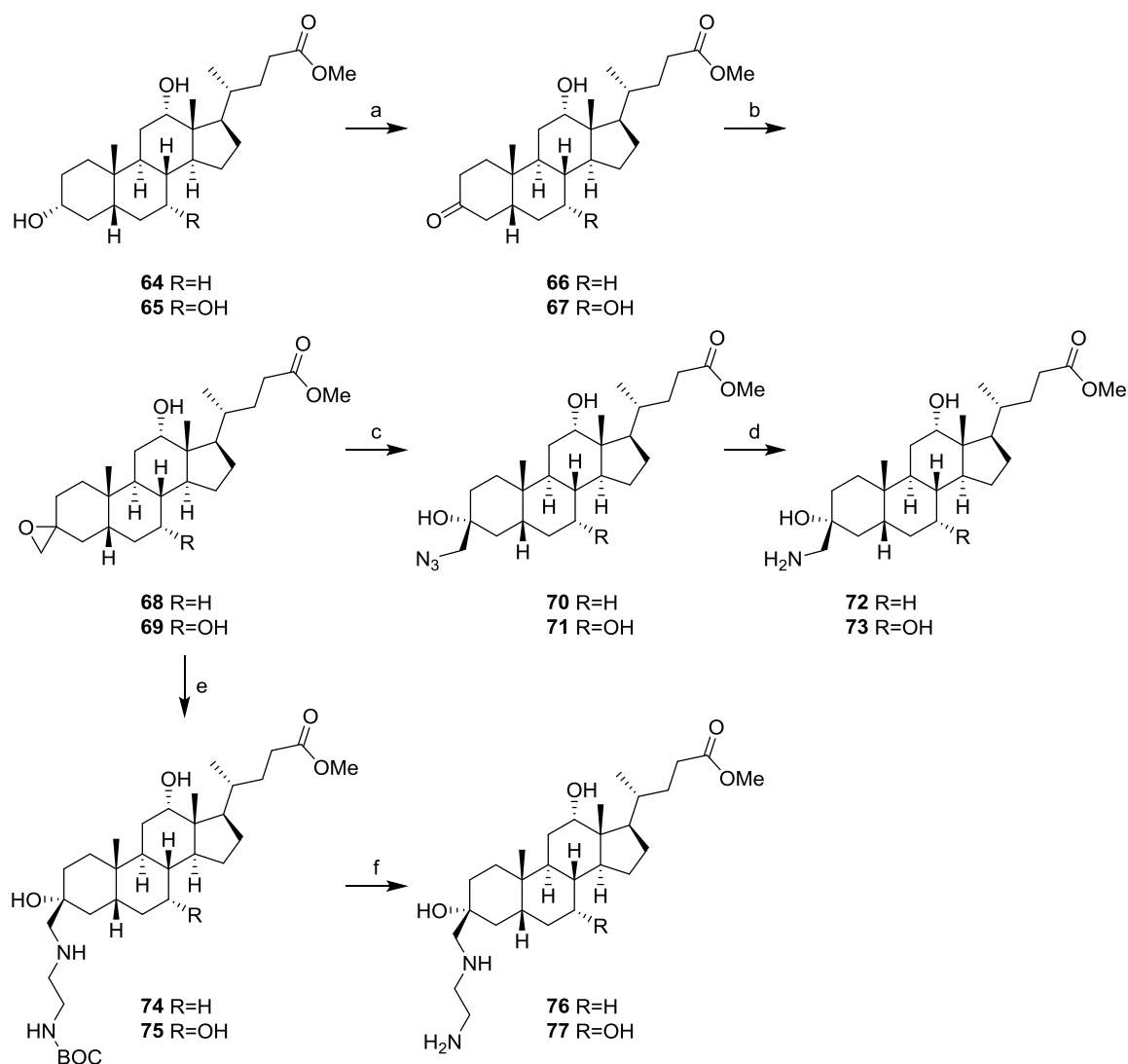
antifungalna aktivnost ovih jedinjenja ali je samo **58** bio aktivan ( $IC_{50}$  62.5 mg/mL) prema *Cryptococcus neoformans*.



Shema 2.21. (a) *N*-hidroksi-sukcinimid, DCC, THF/CH<sub>3</sub>CN, 25 °C, 18 h; (b) **50** ili **51**, DMF, 25 °C, 1.5 h; (c) **52** ili **53**, DMF, 25 °C, 1.5 h.

Grupa indijskih autora<sup>188</sup> je publikovala sintezu i ispitivanje antimikrobne aktivnosti metilaminskih i etilendiaminskih konjugata žučnih kiselina (Shema 2.22.). Regio i hemoselektivnom oksidacijom C-3 hidroksilne grupe jedinjenja **64** i **65** sa Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na celitu dobijeni su keto derivati **66** i **67** koji su u reakciji sa sumpornim ilidom (trimetilsulfoksonijum jodid, NaH) transformisani u oksirane **68** i **69**. Nukleofilno otvaranje oksirana sa azidnim anjonom dalo je azido alkohole **70** i **71**, koji su hidrogenovanjem prevedeni u odgovarajuće amine **72** i **73**. Slično, nukleofilnim otvaranjem oksirana sa *N*1-Boc-1,2-diaminoetanom i potom *N*-Boc deprotekcijom dobijeni su etilendiamino konjugati **76** i **77**.

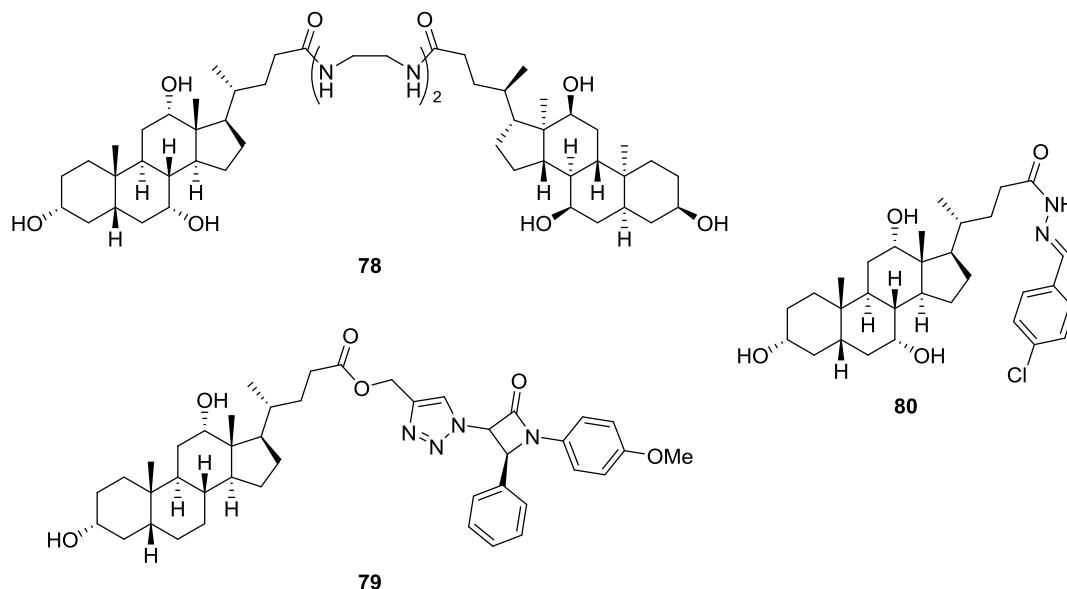
Jedinjenja **76** i **77** su pokazala snažnu antifungalnu i antibakterijsku aktivnost sličnu gentamicinu prema *S. aureus* a bila su aktivnija od aminometil konjugata **72** i **73**, pa se na osnovu ovoga može pretpostaviti da aktivnost zavisi od dužine niza na C-3.<sup>188</sup>



Shema 2.22. (a)  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ , toluen, refluks, 5 h; (b) trimetilsulfoksonijum jodid, NaH, DMSO/THF, st, 2 h; (c)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 60–65 °C, 12 h; (d)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, 45 psi, 3 h; (e) *N*1-Boc-1,2-diaminoetan, MeOH, refluks, 2 h; (f) i) 50% TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; ii) 50% DIPEA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Zanimljivi sintetski derivati su i steroidni dimeri. Jedinjenje **78** (Shema 2.23.) pokazuje selektivnu toksičnost prema ćelijama gljivica u nanomolarnim koncentracijama dok ne utiče na proliferaciju ćelija sisara.<sup>165</sup> Sintetisani su laktam-triazolski konjugati ŽK.<sup>167,189</sup> Beta laktami su jedna od najvećih grupa antibiotika u kliničkoj upotrebi, dok 1,2,3-triazoli pokazuju antibakterijsko, fungicidno i antialergijsko dejstvo, pa je dizajn agenasa u kojima su kombinovane ove tri strukture opravdan. Ovi konjugati pokazuju veoma dobro antimikotičko delovanje sa MIC vrednostima od 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protiv *Candida albicans* i 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protiv *Benjaminella poitrasii*. Jedinjenje **79** pokazuje najveću aktivnost, sa MIC od 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protiv *Yarrowia lipolytica*.<sup>167</sup> Antimikrobnu aktivnost prema gram pozitivnim bakterijama poseduju i fenilhidrazonski analozi ŽK (**80**), dok je antimikrobna aktivnost izostala u slučaju *Enterobacter aerogens* i *P. aeruginosa*. Jedinjenja sa bromom i hlorom u para položaju benzenovog jezgra fenilhidrazona su pokazivala najbolju antimikrobnu aktivnost dok su nesupstituisani i cijano

supstituisani fenilhidrazoni bili neaktivni. Neka od jedinjenja imaju MIC vrednosti od 1.96  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , što je 15 puta potentnije od cefalosporinskih antibiotika kefaklora i kefiksima koji služe kao pozitivna kontrola.<sup>190</sup>



Shema 2.23.

## 2.7. Konjugati žučnih kiselina sa antitumorskim lekovima

Žučne kiseline su iz više razloga korisne u dizajnu hibridnih molekula koji predstavljaju prolekovne, relativno su jeftine i enantiomerno čiste.<sup>191</sup> Konjugati ŽK sa lekovima su korišćeni za poboljšanje intestinalne apsorpcije lekova ili poboljšanje njihove metaboličke stabilnosti.<sup>191</sup> Enterohepatička cirkulacija ŽK i različitih transportnih proteina ŽK uzrokuje akumulaciju u jetri i GIT pa se shodno tome takvi konjugati ŽK mogu koristiti za redukciju sistemskih sporednih efekata.<sup>192</sup> Žučne kiseline se mogu povezati sa molekulima leka ili molekulima lek/spejsera preko položaja 3, 6, 7, 12 ili 24, putem estarske, amidne ili etarske funkcije.

Veliki broj antitumorskih jedinjenja je konjugovan sa ŽK da bi im se poboljšalo usmeravanje ka hepatobilijarnom sistemu. Na primer, Kramer i Wess<sup>192</sup> su povezali hlorambucil sa položajem 3 $\beta$  preko spejser grupe. Ovo su potvrdile i SAR studije transportera ŽK koje su ukazale da 3 $\alpha$ -OH grupa nije esencijalna za specifičnost supstrata.<sup>193</sup> Hlorambucil je alkilujućii citostatik koji se koristi u tretmanu različitih tumora. Izlučivanje hlorambucila i njegovih metabolita se odvija uglavnom preko bubrega. Međutim, njegovom konjugacijom na CA, GCA i TCA (**81**, Shema 2.24.) put eliminacije je promenjen od renalnog do hepatobilijarnog.<sup>194</sup>

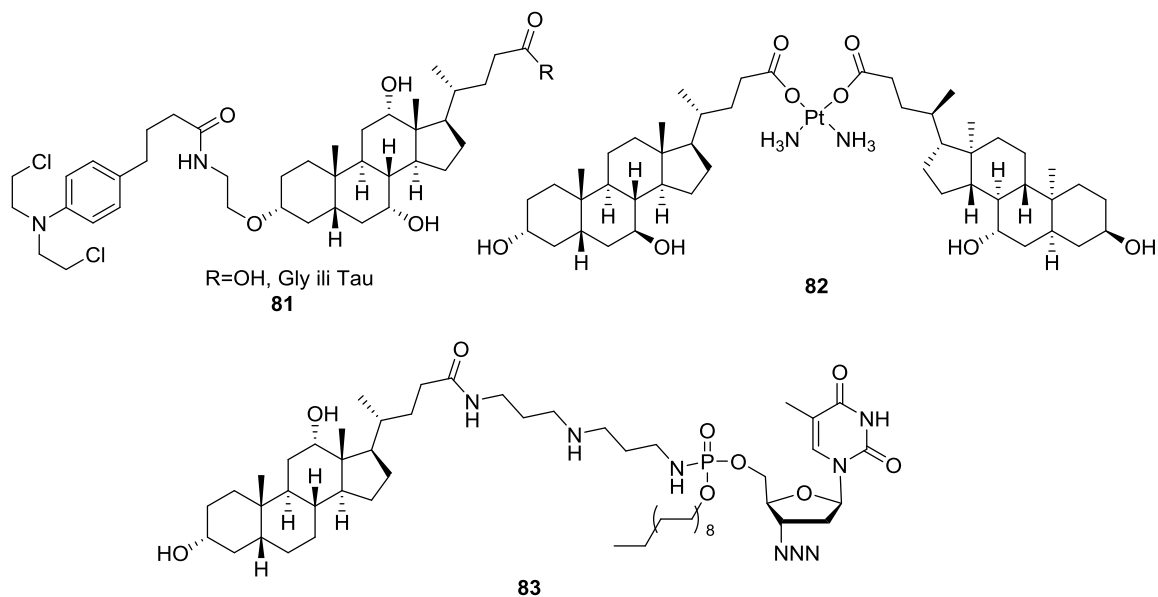
Osnovni molekul pokazuje mali efekat na Na<sup>+</sup>-zavisni unos ŽK u sveže izolovanim hepatocitima pacova, dok odgovarajući konjugat sa ŽK snažno inhibira hepatski transport tauroholata. Vrednost IC<sub>50</sub> za hlorambucil je 100 µg/mL, a za taurinski konjugat 3–5 µM. Konjugat je zadržao i farmakološku aktivnost što je potvrđeno njegovom sposobnošću da alkiluje proteine nakon inkubacije sa hepatocitima.<sup>194</sup>

Sličan pristup je primenjen kod 5-fluorouracila. Oralna administracija 5-fluorouracil-CA konjugata je povećala koncentraciju 5-fluorouracila u jetri miševa u poređenju sa oralnom administracijom osnovnog molekula bez ŽK.<sup>195</sup>

ŽK su takodje korišćene za dostavljanje citostatika na bazi platinom koji se primenjuju za tretman tumora jetre. Derivatima ŽK sa atomom platine kao DNK-reaktivnim delom, je određena citotoksičnost i hepatobilijarni organotropizam.<sup>196–206</sup> Ovakva jedinjenja su nazvana Bamets, gde „Ba“ potiče od Bile acid, a „met“ od metal. U jednom istraživanju je vršeno poređenje antitumorskog efekta Bamet-UDCA derivata **82** (*Shema 2.24.*) sa cisplatinom na hepatoma modelu u jetri miševa. Životni vek miševa tretiranih sa Bamet-UDCA je bio znatno duži u poređenju sa životinjama tretiranim sa cisplatinom. Količina Bamet-a u tkivu jetre je bila nekoliko puta veća od cisplatine, dok su manje količine cisplatine pronađene u nervnom tkivu i bubrezima. Znaci neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti i toksičnosti koštane srži su pronađeni kod životinja tretiranih cisplatinom, dok su životinje tretirane Bamet-om bile bez nuspojava, sa minimalnom koncentracijom leka u plućima, srcu, mišićima, mozgu i koštanoj srži.<sup>198</sup> Istraživanjem načina povezivanja ovih jedinjenja sa DNK je utvrđeno da su nastali adukti sa DNK povezani drugačije od adukta nastalog sa cisplatinom, čime se objašnjava veća aktivnost i odsustvo nuspojava kod Bamet-a.<sup>207</sup>

Wu i saradnici<sup>208</sup> su sintetisali konjugat 3'-azido-3'-deoksitimidina (AZT) sa poliaminskim derivatima DCA. Jedinjenje AZT je klinički odobreno za tretman HIV-a, a može se upotrebiti i u kombinaciji sa lekovima poput cisplatine i 5-fluorouracila za tretman kancera. Takođe, uzrokuje apoptozu i inhibira rast paratiroidnih ćelija. Međutim, klinička ograničenja AZT-a uključuju kratko vreme poluživota u plazmi, indukciju supresije koštane srži i mijopatiju. Ispitana je aktivnost konjugata ŽK-AZT (**83**) prema HeLa ćelijama i ćelijskim linijama tumora bubrega. Jedinjenje **83** pokazuje IC<sub>50</sub> vrednost od 6.8 µM protiv HeLa ćelijama u poređenju sa 125 µM koju poseduje sam molekul AZT-a. Povećana bioaktivnost je pripisana osobini ŽK-poliaminskog konjugata da prolazi kroz fosfolipidne slojeve.

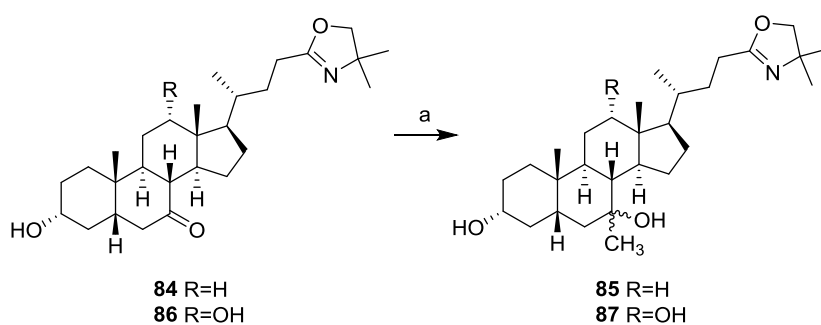




Shema 2.24.

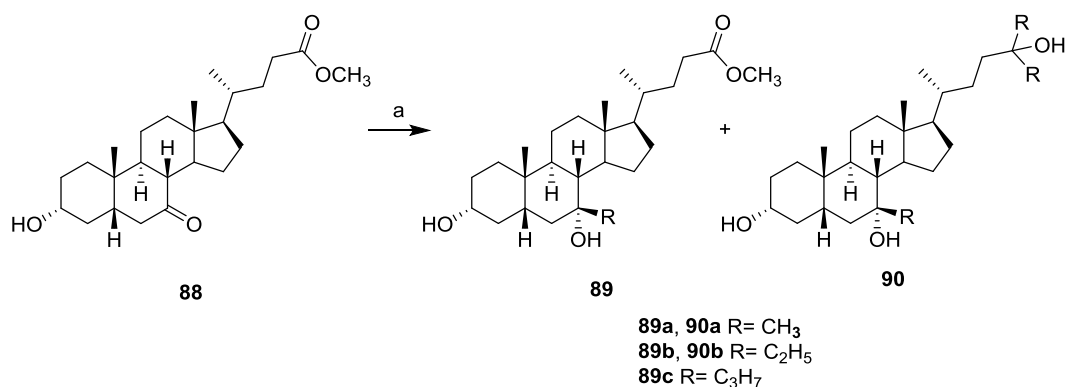
## 2.8. Sinteze odabranih biološki aktivnih alkil derivata žučnih kiselina

Prvu sintezu alkil derivata žučnih kiselina izveli su McSherry i saradnici<sup>209</sup> na 7-okso oksazolinskom derivatu litoholne kiseline **84** (Shema 2.25.). Tri godine kasnije, ista istraživačka grupa je ponovila ovu sintezu i proširili je uklañanjem oksazolinske zaštite,<sup>210</sup> a naredne godine su metilovali 7-okso derivat deoksiholne kiseline **86**.<sup>211</sup> Sinteze su rađene sa ciljem dobijanja jedinjenja sposobnih da rastvaraju žučni kamen, a da budu otporna na bakterijsku 7-dehidroksilaciju.

Shema 2.25. (a) MeMgI, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 6 h, refluks, 90%.

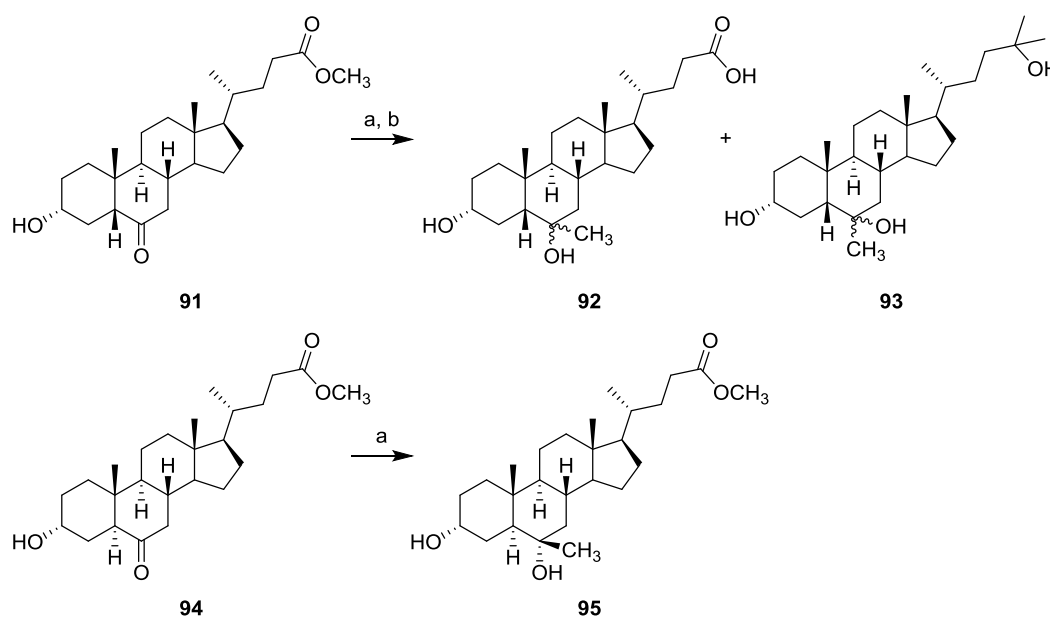
Sinteza derivata **85** i **87** izvedena je tretmanom **84** i **86** sa metil-magnezijum-jodidom na temperaturi ključanja reakcione smeše. Adicija metil grupe na C-7 karbonilni ugljenik nije bila stereoselektivna već je dobijena smeša  $\alpha$  i  $\beta$  epimera. Dobijene epimerne smeše, kako u slučaju **85** tako i **87**, pomenuti autori su razdvojili tek nakon regeneracije karboksilne grupe i njenog prevođenja u metil ester. U slučaju jedinjenja **85**, dobili su 2.3 puta više, dok u slučaju **87** 1.25 puta više 7 $\beta$ -metil izomera.

Iako se sinteza oksazolina izvodi uz relativno visoke prinose, njegova hidroliza predstavlja problem. Kako bi se regenerisala karboksilna funkcija, oksazolin je potrebno tretirati kiselinom. Adukti Grignard-ove reakcije na keton poseduju tercijarnu hidroksilnu grupu koja se lako eliminiše u procesu hidrolize, pa ukupan prinos 7-metil derivata sa slobodnom kiselinom nije prelazio 10%. Rešenje problema malog prinosa 7-alkil derivata sa slobodnom karboksilnom funkcijom je bilo korišćenje metil estra okso derivata žučne kiseline. Na ovaj način sintetisana su jedinjenja sa metil (**89a**, 50%), etil (**89b**, 40%) i propil (**89c**, 52%) grupom u položaju 7 steroidnog skeleta (*Shema 2.26.*).<sup>212</sup> Metil-magnezijum-jodid, na sobnoj temperaturi, preferencijalno reaguje sa 7-keto grupom iako nastaju manje količine Grignard-ovog adukta na metil estar (**90a**, 18% i **90b**, 10%). Alkilovanje se odvijalo stereospecifično pošto su izolovana jedinjenja samo sa alkil grupom u  $\beta$  položaju, osim kod metil derivata gde je izolovana i zanemarljiva količina  $\alpha$  epimera. Do Grignard-ove adicije na metil estar je došlo samo u slučaju metil- i etil-magnezijum-halida, i dobijeni su trialkil derivati **90a** i **90b**. Propil reagens nije reagovao sa metil estrom, ali su izolovane značajne količine (45%) metil-henodeoksiholata koji je nastao kao rezultat redukcije sa Grignard-ovim reagensom. Formiranje skoro isključivo  $\beta$ -epimera autori objašnjavaju zaklanjanjem  $\alpha$  strane A steroidnim prstenom pa Grignard-ov reagens prilazi 7-keto grupi pretežno sa  $\beta$  strane.



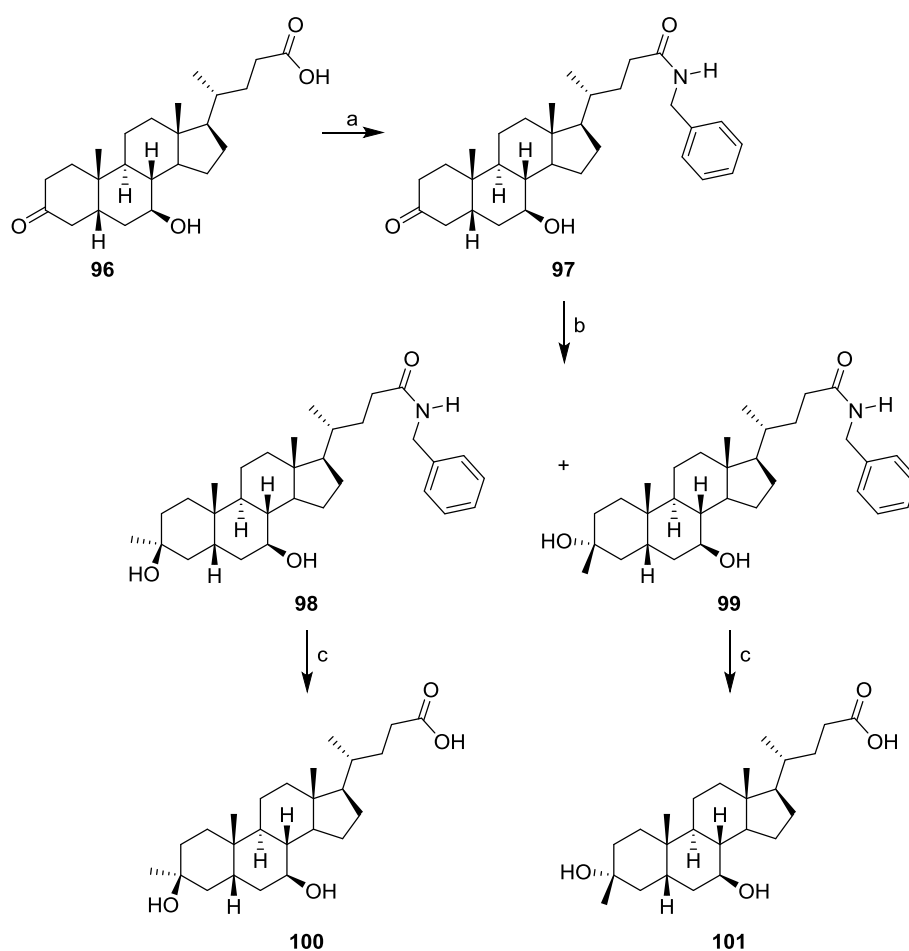
*Shema 2.26.* (a) MeMgI, Et<sub>2</sub>O, 2 h, st.

Sličan postupak je korišćen prilikom alkilovanja 6-okso metil-litoholata **91** u sintezi 6-metil derivata hiodeoksiholne kiseline **92** (Shema 2.27.).<sup>213</sup> Okso derivat **91** je podvrgnut reakciji sa metil-magnezijum-jodidom na sobnoj temperaturi u toku jednog minuta. Za razliku od 7-okso derivata **88** gde je keto grupa bila značajno reaktivnija od estarske funkcije i gde se adicioni proizvod na estarsku funkciju dobijao u malom prinosu, u slučaju Grignard-ove reakcije na 6-okso derivat kao glavni proizvod se dobijaju 3,6,24-trioli **93** u duplo većem prinosu u odnosu na 6-metil derivate sa zadržanom C-24 karbonilnom funkcijom (**92**). Reakcija nije bila stereospecifična, ali je bila izražena selektivnost za  $\beta$ -metil proizvod koji se dobio u 1.4 puta većem prinosu u odnosu na  $6\alpha$  epimer. U slučaju *allo* analoga **94** sa *trans* povezanim A i B prstenima reakcija se odvija stereoselektivno i dobija se isključivo  $\beta$ -metil derivat **95**, a autori ne pominju proizvode nastale adicijom na C-24.



Shema 2.27. (a) MeMgI, THF, 1 min, st; (b) i) KOH, MeOH, 2 h refluks; ii) 1 M HCl.

Alkilovanje u položaju C-3 su prvi izveli Une *et al.*<sup>143</sup> u cilju sinteze potencijalnih TGR5 agonista. Polazni okso derivat **96** (Shema 2.28.) dobijen je selektivnom oksidacijom henodeoksiholne kiseline pomoću aluminijum-*t*-butoksida. Karboksilna funkcionalna grupa je zaštićena u obliku *N*-benzilamida pri čemu je dobijen **97**. Adicija metil grupe je izvršena dodavanjem 0.93 M tetrahidrofuranskog rastvora metil-magnezijum bromida u benzenski rastvor **97** na temperaturi ključanja. Dobijena je gotovo ekvimolarna smeša  $\alpha$  i  $\beta$  epimera **98** i **99**. Nakon uklanjanja zaštitne grupe 2M etanolnim NaOH dobijena su finalna jedinjenja **100** i **101**.

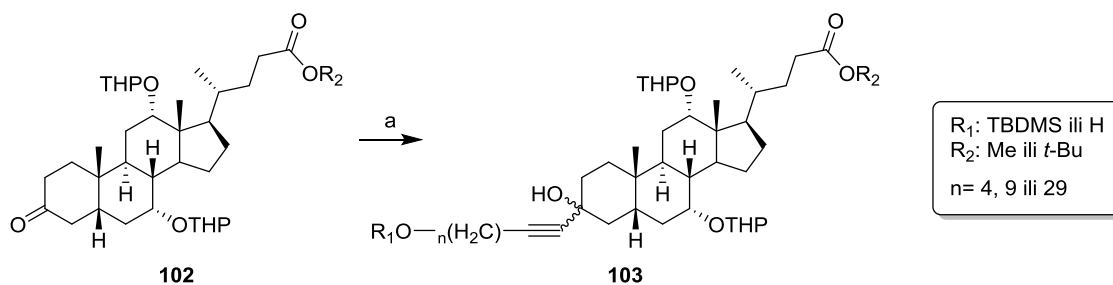


Shema 2.28.(a) BnNH<sub>2</sub>, EDCA, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C→st, 2 h; (b) MeMgBr, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, refluks, 2 h; (c) 2M NaOH u EtOH.

Konfiguracije pojedinačnih C-7 epimera kod jedinjenja **85** i **87** su određene na osnovu hemijskog pomeranja singletnog signala u <sup>1</sup>H NMR spektru metil grupe vezane za C-7. Naime metil grupa u položaju 7 $\alpha$  ima veće hemijsko pomeranje u odnosu na metil grupu 7 $\beta$  orijentacije.<sup>210</sup> Konfiguracija na C-7, odnosno C-6 kod jedinjenja **89** i **92** respektivno, je određena poređenjem položaja signala u <sup>1</sup>H NMR spektru C-19 metil grupe  $\alpha$  i  $\beta$  metil epimera.<sup>213</sup> Angularna C-19 metil grupa u slučaju  $\alpha$  metil grupe (i na C-6 i na C-7) ima veće hemijsko pomeranje u odnosu na odgovarajuće  $\beta$  metil epimere. Kod jedinjenja **98** i **99** konfiguracija na C-3 je određena na osnovu različitog hemijskog pomeranja signala metil grupe u <sup>13</sup>C NMR spektru, tako da ekvatorijalni,  $\alpha$  epimer ima manje hemijsko pomeranje od aksijalnog,  $\beta$  epimera.<sup>143</sup>

Sa ciljem ispitivanja potencijalnih semi-sintetskih TGR5 agonista, 2015. godine je sintetisana 3 $\beta$ -etilitolna kiselina u prinosu od 71% reakcijom 3-oksoholanske kiseline sa etil-magnezijum-bromidom u THF-u na temperaturi koja se kretala od -78 °C do sobne u toku noći.<sup>214</sup>

Patent iz 1997. godine opisuje sintezu serije alkinil derivata različitih dužina ugljovodoničnog niza sa primarnom hidroksilnom grupom i terminalnom trostrukom vezom (*Shema 2.29.*).<sup>215</sup> Dužina ugljovodoničnog lanca je varirala od 6 do 31 atoma ugljenika i na jedinjenjima sa više od šest ugljenikovih atoma hidroksilna grupa je bila zaštićena u obliku *tert*-butildimetilsilil-etra (TBDMS). Hidroksi-alkini ili silil-etarski-alkini su prevedeni u odgovarajuće acetilide u reakciji sa *n*-butil-litijumom na temperaturi ključanja THF-heksanskog rastvora u toku jednog sata. U rastvor acetilida, ohlađenog na sobnu temperaturu je dodat tetrahidrofuranski rastvor okso-metil-estra žučne kiseline **102** i reakcija se mešala sat vremena na sobnoj temepraturi. Reakcija je prekinuta dodatkom 25% vodenog rastvora natrijum-dihidrogenfosfata.



*Shema 2.29.* (a) R<sub>1</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C≡CH, BuLi, THF, heksan, refluks, 1 h.

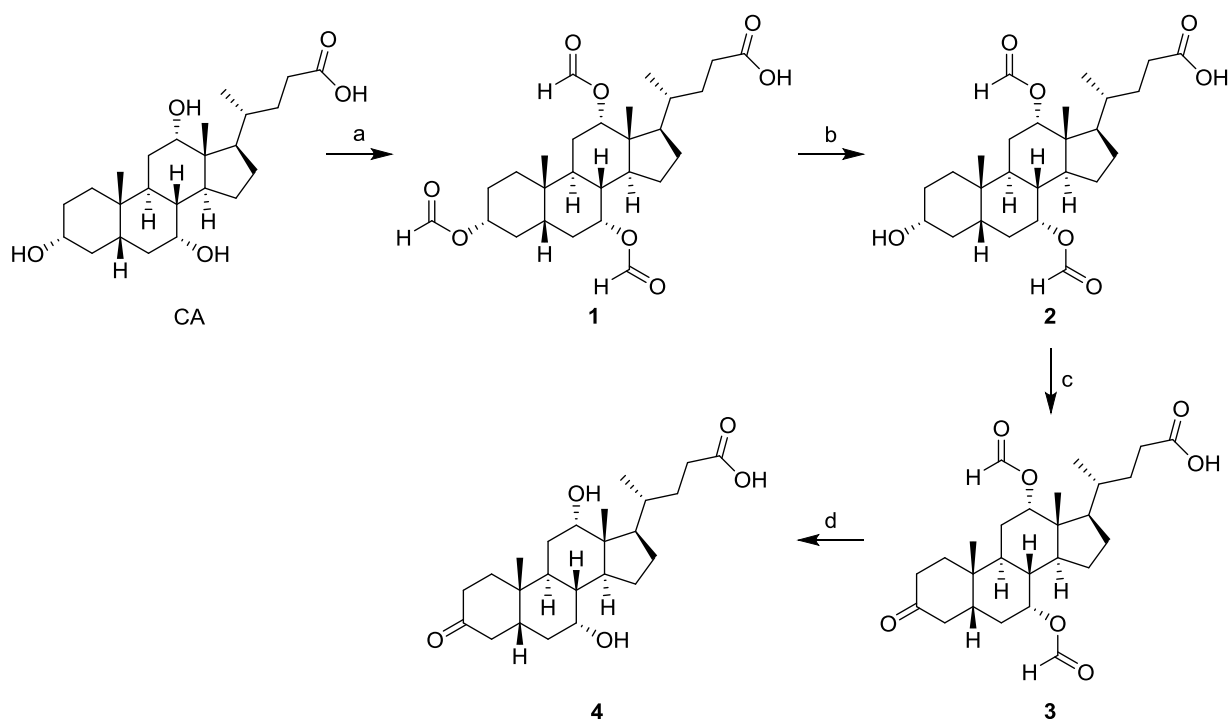
Adicioni proizvodi **103** se dobijaju u prinosu 72–88%, a 3β-hidroksi derivati se dobijaju u 3.5 puta većem prinosu u odnosu na 3α-hidroksi derivate.

### 3. Naši radovi

#### 3.1. Sinteza okso derivata žučnih kiselina

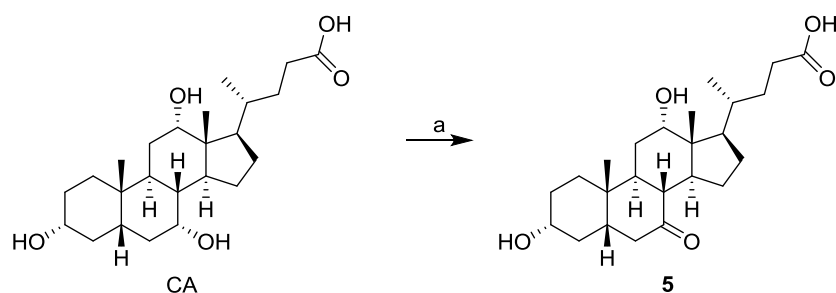
U cilju dobijanja trigonalnog elektrofilnog centra na steroidnom skeletu, holna kiselina (CA) je prevedena u odgovarajuće 3-okso, 7-okso, 12-okso i 7,12-diokso derivate **4**, **5**, **9** i **12** respektivno. 3,7,12-Triokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (dehidroholna kiselina, **13**) je kupljena od Sigma-Aldrich-a.

Sinteza 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-3-okso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**4**) je izvedena u četiri sintetske faze (*Shema 3.1.*). Nakon esterifikacije hidroksilnih grupa u položajima C-3, C-7 i C-12, regioselektivno je uklonjena zaštita samo sa C-3 metanolnim rastvorom amonijaka,<sup>216</sup> pri čemu je dobijeno jedinjenje **2**. Oksidacija hidroksilne grupe na C-3 Jones-ovim reagensom i potom uklanjanje zaštitnih grupa u baznim uslovima (KOH u MeOH) daje dihidroksi-okso kiselinu **4** u prinosu od 81% (računato u odnosu na CA). Struktura jedinjenja **4** je potvrđena na osnovu slaganja dobijenih spektroskopskih podataka sa podacima iz literature.<sup>217</sup>



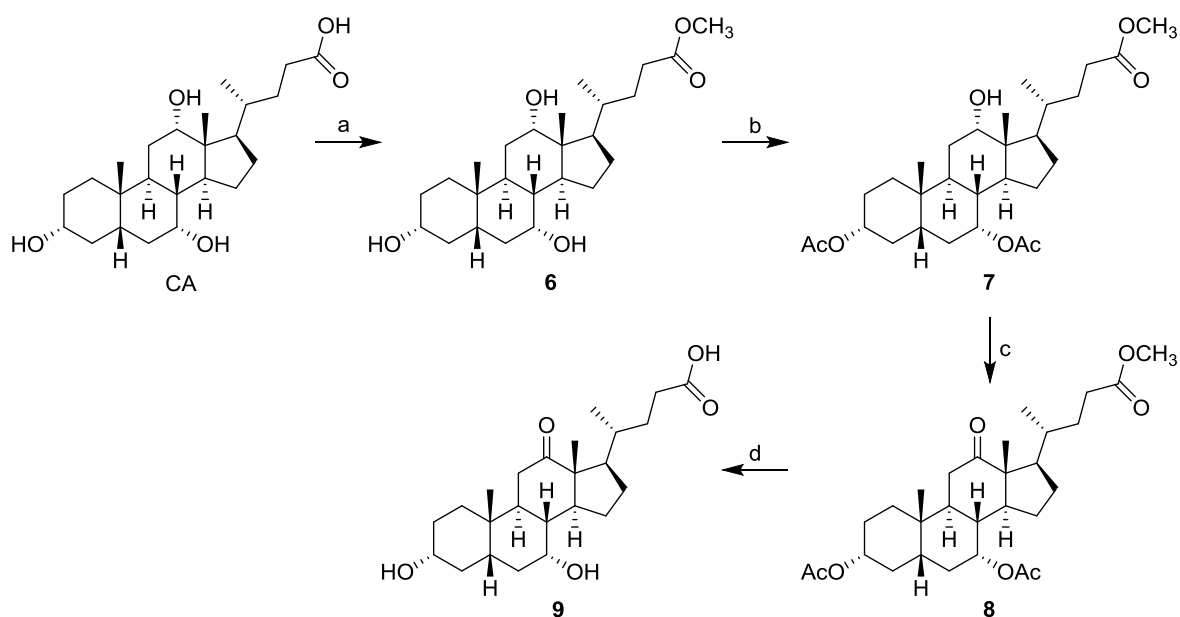
*Shema 3.1.* (a) HCOOH, HClO<sub>4</sub>, 50–55 °C, 30 min; (b) NH<sub>3</sub>, MeOH, st, 1.5 h; (c) CrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, acetone, 0 °C, 10 min; (d) KOH, MeOH, reflux, 30 min, 81% (računato na CA).

Za dobijanje 7-okso derivata **5**, CA je podvrgnuta regioselektivnoj oksidaciji sa *N*-bromosukcinimidom,<sup>218</sup> u vodenom rastvoru natrijum-hidrogenkarbonata, na sobnoj temperaturi u toku 20 h (*Shema 3.2.*). Struktura 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-7-okso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**5**) je potvrđena poređenjem dobijenih spektroskopskih podataka sa literaturnim podacima.<sup>219</sup>



Shema 3.2. (a) NBS, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, st, 20 h, 86%.

Sinteza 12-okso derivata **9** je ostvarena u četiri sintetska koraka.<sup>220</sup> U prvom koraku je karboksilna grupa CA prevedena u metil ester **6** zagrevanjem na tački ključanja metanola u toku jednog sata uz dodatak katalitičke količine hlorovodonične kiseline (Shema 3.3).

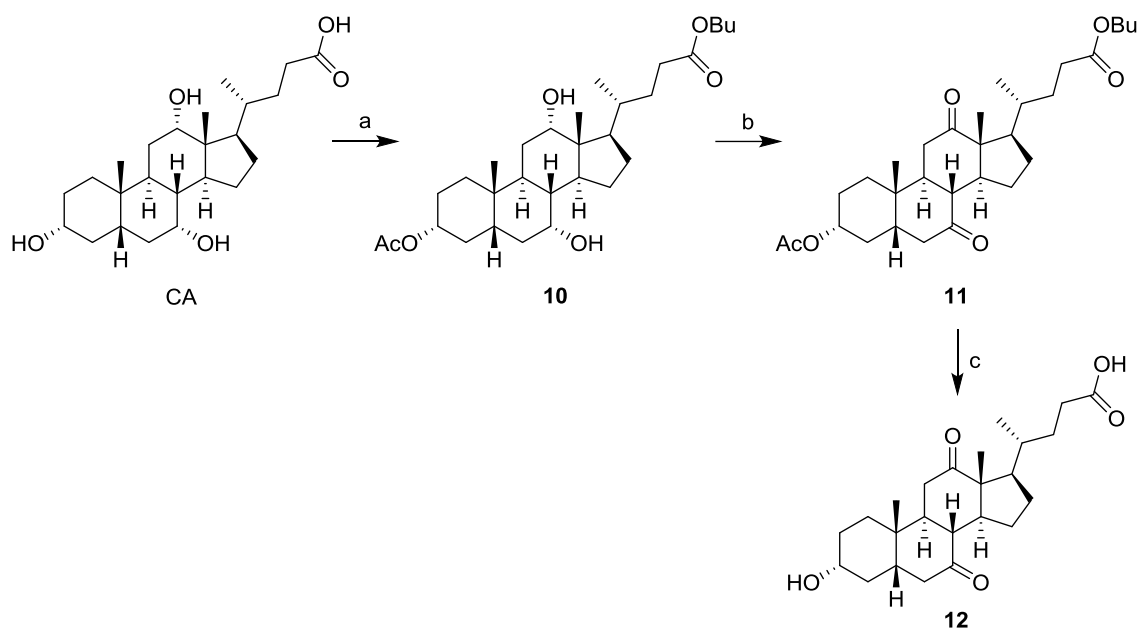


Shema 3.3. (a) MeOH, HCl, refluks, 1 h; (b) Ac<sub>2</sub>O, piridin, CHCl<sub>3</sub>, st, 24 h; (c) CrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, aceton, 0 °C, 10 min; (d) KOH, MeOH, refluks, 3 h, 49% (računato na CA).

Hidroksilne grupe u položaju C-3 i C-7 metil-holata **6** su selektivno zaštićene u reakciji sa acetanhidridom u prisustvu piridina na sobnoj temperaturi u toku jednog dana, pri čemu je dobijen diacetat **7**. Hidroksilna grupa u položaju C-12 je oksidovana primenom Jones-ovog reagensa, u acetonu

ohlađenom na 0 °C. Baznom hidrolizom jedinjenja **8**, u ključalom metanolnom rastvoru kalijum-hidroksida, u toku tri sata, i naknadnom obradom reakcione smeše rastvorom hlorovodonične kiseline, dobijena je 12-okso kiselina **9** u prinosu od 49% (računato u odnosu na CA, četiri faze). Struktura jedinjenja **9** je u skladu sa literaturnim podacima.<sup>220\*</sup>

7,12-Dioksolitoholna kiselina **12** dobijena je *one-pot* sintezom koja se sastojala od transesterifikacije CA sa butil-acetatom u prisustvu katalitičkih količina p-toluensulfonske kiseline (pri čemu je istovremeno zaštićena hidroksilna grupa na C-3 i esterifikovana karboksilna grupa), oksidacije sa NBS-om u *t*-BuOH i bazne hidrolize sa KOH u toku 5 h (*Shema 3.4.*).<sup>221</sup> Nakon obrade i prečišćavanja 3 $\alpha$ -hidroksi-7,12-diokso-5 $\beta$ -holanska kiselina se dobija u prinosu od 71% (u odnosu na CA). Struktura jedinjenja **12** je u skladu sa literaturnim podacima.<sup>219</sup>



*Shema 3.4.* (a) BuOAc, PTSA, refluks, 5 h; (b) NBS, *t*-BuOH, st, 2 h; (c) KOH, MeOH, refluks, 5 h, 71% (računato na CA)

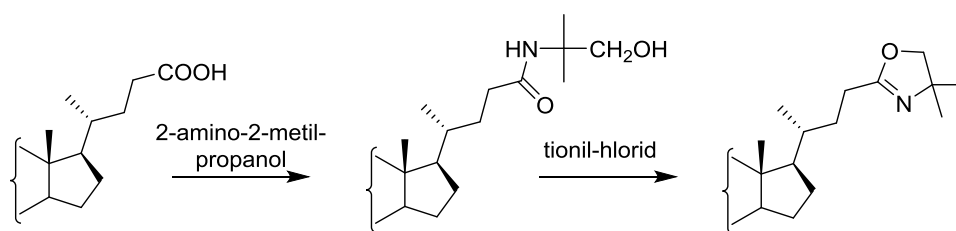
\* Slike <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara sintetizovanih jedinjenja date su u prilogu



### 3.2. Sinteza oksazolin derivata žučnih kiselina

Kako je za neke od planiranih sinteza bilo neophodno zaštititi karboksilnu grupu kao pogodna zaštita odabran je oksazolin zbog mnogih povoljnih osobina. Na primer, prevođenjem karboksilne kiseline u oksazolin sprečava se uticaj kiselog karboksilnog protona na bazne reagense i onemogućava nukleofilna adicija na karbonilni ugljenik karboksilne grupe. Oksazolinski derivat može da ima bolju rastvorljivost u organskim rastvaračima, naročito u baznoj sredini gde bi se kiseliniski ekvivalent nalazio u obliku soli. Oksazolinska grupa je stabilna u uslovima Grignard-ove reakcije.<sup>222</sup> Takođe, ispitaće se i uticaj odabranih oksazolina ŽK, kao i njihovih amidnih prekursora na antitumorsku i antimikrobnu aktivnost.

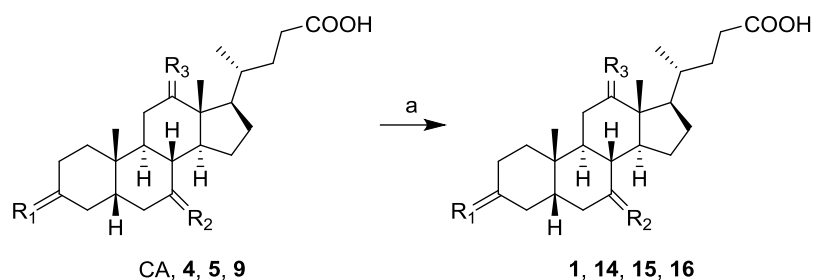
Karboksilna grupa okso derivata žučnih kiselina je prevedena u oksazolinsku funkcionalnu grupu primenom postojeće metodologije,<sup>223</sup> koja se sastoji u sintezi amida sa 2-amino-2-metil-propanolom praćenom ciklizacijom sa tionil-hloridom (*Shema 3.5.*).



*Shema 3.5.*

Kod holne kiseline i njenih 3-, 7- i 12-okso derivata **4**, **5** i **9** pre uvođenja oksazolinske zaštite bilo je neophodno zaštititi hidroksilne grupe. One su zaštićene prevođenjem u formil-estre (*Shema 3.6.*) po Klein-ovoj metodi ( $\text{HCOOH}$ ,  $\text{HClO}_4$ ).<sup>216</sup> Uvođenje estarske zaštite hidroksilnih grupa je potrebno da bi se izbegla potencijalna eliminaciona reakcija sa tionil-hloridom kojoj odgovara *trans*-diaksijalna stereochemija aksijalnih hidroksilnih grupa na C7 i C12 i vicinalnih vodonika.

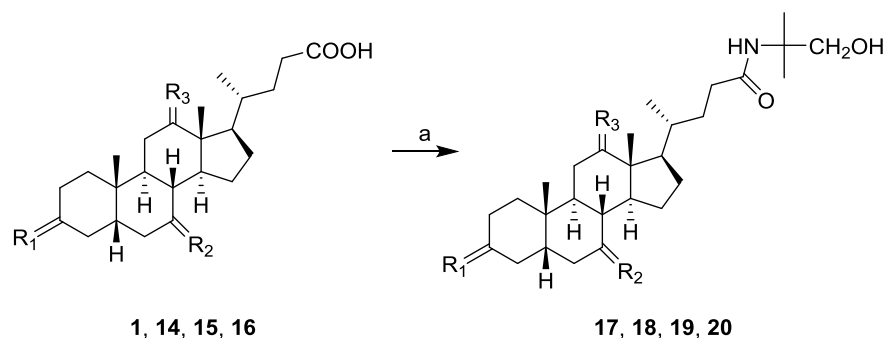
Formiloksi derivati **1**, **14**, **15** i **16** su dobijeni u visokim prinosima (82–99%), a njihove strukture su potvrđene NMR spektroskopijom. NMR spektri jedinjenja **1**<sup>224</sup>, **14**<sup>217</sup> i **15**<sup>211</sup> su u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima. U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **16** karakteristični su signali na 8.17 i 8.22 ppm koji potiču od vodonikovih atoma formil grupa na C-3 i C-7. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru **16**, dve formil grupe imaju isti položaj signala koji se nalazi na 162.14 ppm, dok se signal C-12 karbnilne grupe nalazi na 213.48 ppm.



Polazno jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Vreme, prinos (%)	Proizvod	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
CA	αOH, βH	αOH, βH	αOH, βH	30 min, 99	<b>1</b>	αOOCH, βH	αOOCH, βH	αOOCH, βH
<b>4</b>	O	αOH, βH	αOH, βH	100 min, 96	<b>14</b>	O	αOOCH, βH	αOOCH, βH
<b>5</b>	αOH, βH	O	αOH, βH	1.5 h, 82	<b>15</b>	αOOCH, βH	O	αOOCH, βH
<b>9</b>	αOH, βH	αOH, βH	O	1 h, 96	<b>16</b>	αOOCH, βH	αOOCH, βH	O

Shema 3.6. (a) HCOOH, HClO<sub>4</sub>, 50–55 °C.

U narednom koraku je karboksilna grupa jedinjenja **1**, **14**, **15** i **16** prevedena u amid sa 2-amino-2-metilpropanolom uz korišćenje *N*-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrohinolina kao aktivatora karboksilne funkcije (Shema 3.7.). Reakcije su tekle na temperaturi ključanja reakcione smeše u toku 4–8 h, pri čemu su dobijeni amidi **17**, **18**, **19** i **20**.



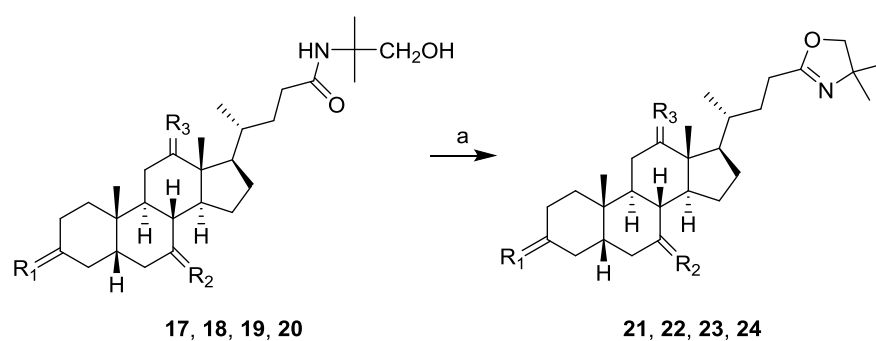
Polazno jedinjenje	Vreme, prinos (%)	Proizvod	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>1</b>	5 h, 90	<b>17</b>	αOOCH, βH	αOOCH, βH	αOOCH, βH
<b>14</b>	*, 76	<b>18</b>	O	αOOCH, βH	αOOCH, βH
<b>15</b>	5 h, 92	<b>19</b>	αOOCH, βH	O	αOOCH, βH
<b>16</b>	4 h, 60	<b>20</b>	αOOCH, βH	αOOCH, βH	O

\* 3 h refluks i 12 h na st

Shema 3.7. (a) 2-amino-2-metilpropanol, EEDQ, TEA, EtOAc, refluks.

Prisustvo 2-hidroksi-1,1-dimetiletilamidne funkcije u molekulima **17-20** dokazano je na osnovu karakterističnih signala u  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima pomenutih jedinjenja. Karakteristični signali u NMR spektrima za **17** su:  $\delta_{\text{H}}$  1.22 singlet 2×Me amida,  $\delta_{\text{H}}$  3.49  $\text{CH}_2$  grupa amida,  $\delta_{\text{C}}$  174.24 C-24. Karakteristični signali u NMR spektrima za **18** su:  $\delta_{\text{H}}$  1.29 singlet 2×Me amida,  $\delta_{\text{H}}$  3.58  $\text{CH}_2$  amida,  $\delta_{\text{H}}$  4.84 OH amida,  $\delta_{\text{C}}$  174.27 C-24. Karakteristični signali u NMR spektrima jedinjenja **19** su:  $\delta_{\text{H}}$  1.28 singlet 2×Me amida,  $\delta_{\text{C}}$  174.32 C-24. Karakteristični signali u NMR spektrima jedinjenja **20** su:  $\delta_{\text{H}}$  1.29 singlet 2×Me amida,  $\delta_{\text{H}}$  5.56 NH amida,  $\delta_{\text{C}}$  174.47 C-24.

Amidi **17**, **18**, **19** i **20** su u reakciji sa tionil-hloridom na 0 °C u THF-u prevedeni u odgovarajuće oksazoline **21**, **22**, **23** i **24** (Shema 3.8.).



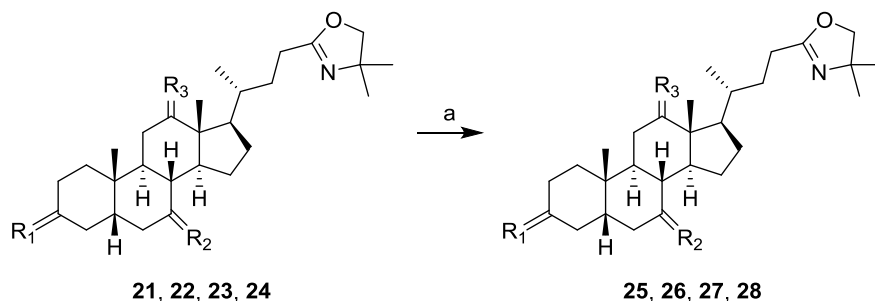
Polazno jedinjenje	Vreme, prinos (%)	Proizvod	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>17</b>	5 h, 95	<b>21</b>	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$
<b>18</b>	1 h, 69	<b>22</b>	O	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$
<b>19</b>	1 h, 94	<b>23</b>	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$	O	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$
<b>20</b>	40 min, 94	<b>24</b>	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$	$\alpha\text{OOCH}$ , $\beta\text{H}$	O

Shema 3.8. (a)  $\text{SOCl}_2$ , THF, 0 °C.

Analizom NMR spektara potvrđeno je prisustvo oksazolinog prstena u jedinjenjima **22**, **23** i **24**, dok su NMR spektri jedinjenja **21** u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima<sup>223</sup>. Karakteristični signali u NMR spektrima jedinjenja **22** su:  $\delta_{\text{H}}$  1.25 singlet 2×Me na C-4',  $\delta_{\text{H}}$  3.89 H-5',  $\delta_{\text{C}}$  66.84 C-4',  $\delta_{\text{C}}$  78.93 C-5',  $\delta_{\text{C}}$  166.27 C-2'. Za jedinjenje **23** u NMR spektrima su karakteristični signali:  $\delta_{\text{H}}$  1.25 singlet 2×Me na H-4',  $\delta_{\text{H}}$  3.88 H-5',  $\delta_{\text{C}}$  66.80 C-4',  $\delta_{\text{C}}$  78.87 C-5',  $\delta_{\text{C}}$  166.21 C-2'. Za jedinjenje **24** u NMR spektrima su karakteristični signali:  $\delta_{\text{H}}$  1.25 2×Me na C-4',  $\delta_{\text{H}}$  3.89 H-5',  $\delta_{\text{C}}$  66.78 C-4',  $\delta_{\text{C}}$  78.85 C-5',  $\delta_{\text{C}}$  166.34 C-2'. Signal ugljenika C-2' u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima oksazolina javlja se na  $\delta_{\text{C}}$  166 dok je kod polaznih amida bio na višim vrednostima (174 ppm).

U poslednjoj fazi je rađena deprotekcija hidrosilnih grupa oksazolinских derivata **21**, **22**, **23** i **24**. Formiloksi estarska zaštita je uklonjena baznom hidrolizom u ključalom rastvoru KOH u metanolu (Shema 3.9.). Na ovaj način sintetizovani su oksazolinски derivati **25**, **26**, **27** i **28**. Kako u  $^1\text{H}$ , tako i u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima sintetizovanih jedinjenja uočava se izostanak signala formil grupa, a karakteristični signali za jedinjenje **25** su:  $\delta_{\text{H}}$  1.14 2×Me na C-4',  $\delta_{\text{H}}$  3.83 H-5',  $\delta_{\text{C}}$  67.12 C-4',  $\delta_{\text{C}}$  78.39 C-5',  $\delta_{\text{C}}$  165.24 C-2'. Karakteristični signali za **26** su:  $\delta_{\text{H}}$  1.26 i 1.26 dve Me grupe na C-4',  $\delta_{\text{H}}$  3.92 H-5',  $\delta_{\text{C}}$  66.67 C-4',  $\delta_{\text{C}}$

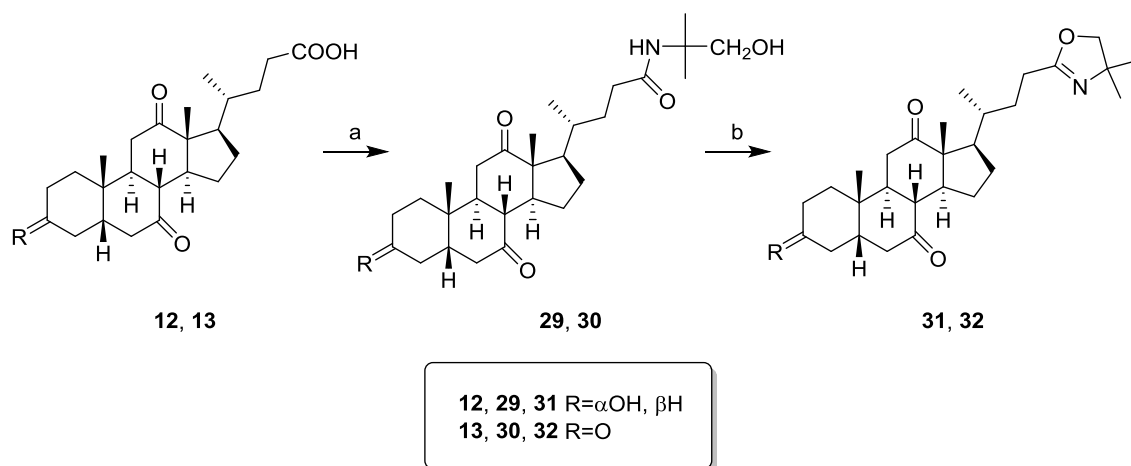
79.04 C-5',  $\delta_c$  167.35 C-2'. Karakteristični signali za **27** su:  $\delta_H$  1.24 2×Me na C-4',  $\delta_H$  3.89 H-5',  $\delta_c$  66.76 C-4',  $\delta_c$  78.92 C-5',  $\delta_c$  166.61 C-2'. Za jedinjenje **28** su karakteristični signali:  $\delta_H$  1.25 2×Me na C-4',  $\delta_H$  3.86 H-5',  $\delta_c$  66.64 C-4',  $\delta_c$  78.79 C-5',  $\delta_c$  166.66 C-2'.



Polazno jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Vreme, prinos (%)	Proizvod	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>21</b>	αOOCH, βH	αOOCH, βH	αOOCH, βH	1 h, 90	<b>25</b>	αOH, βH	αOH, βH	αOH, βH
<b>22</b>	O	αOOCH, βH	αOOCH, βH	20 min, 77	<b>26</b>	O	αOH, βH	αOH, βH
<b>23</b>	αOOCH, βH	O	αOOCH, βH	30 min, 78	<b>27</b>	αOH, βH	O	αOH, βH
<b>24</b>	αOOCH, βH	αOOCH, βH	O	20 min, 95	<b>28</b>	αOH, βH	αOH, βH	O

Shema 3.9. (a) KOH, MeOH, refluks.

7,12-Diokso-litoholna kiselina (**12**) i dehidroholska kiselina (**13**) su prevedene u oksazoline **31** i **32** na sličan način kao u slučaju sinteze oksazolina **21-24** (Shema 3.10.).



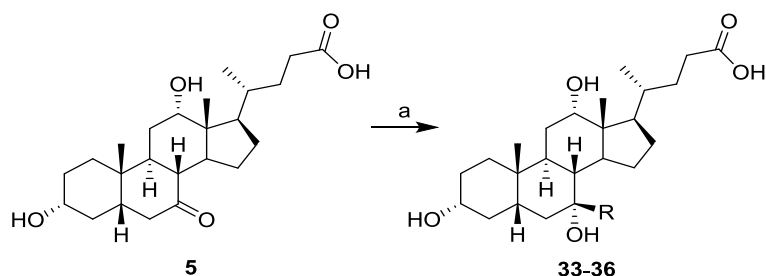
Shema 3.10. (a) 2-amino-2-metilpropanol, EEDQ, TEA, EtOAc, refluks; (b) SOCl<sub>2</sub>, THF, 0 °C.

Naime, karboksilna grupa jedinjenja **12** i **13** je najpre prevedena u amid **29**, tj. **30**. Reakcije su trajale 8 h u slučaju jedinjenja **12**, i 5 h kod jedinjenja **13**, pri čemu su dobijeni amidi **29** i **30** u prinosu od 60% (za **29**), odnosno 68% (za **30**). Amidi **29** i **30** su zatim podvrgnuti reakciji sa tionil-hloridom. Reakcije su trajale 90 minuta u slučaju jedinjenja **29**, i 75 minuta u slučaju jedinjenja **30**. Dobijeni su odgovarajući oksazolini **31** i **32** u prinosu 83% i 77% respektivno.

Strukture amida **29** i **30**, kao i oksazolina **31** i **32** su utvrđene na osnovu analize IR i NMR spektara. Signali u  $^1\text{H}$  NMR spektrima koji potvrđuju prisustvo amidne funkcije kod jedinjenja **29** i **30** se nalaze na hemijskim pomeranjima od 1.16 ppm (za **29**) i 1.28 ppm (za **30**) i potiču od metil grupa amidnog ostatka. Signali metilenskih grupa u  $^1\text{H}$  NMR spektru amidnog ostatka imaju hemijsko pomeranje od 3.36 ppm kod jedinjenja **29**, i 3.56 ppm kod amida **30**. Iste grupe u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru imaju signal na 68.12 ppm kod **29**, i 70.89 ppm kod **30**. Signali ugljenika C-24 u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru se nalaze na hemijskom pomeranju od 174.14 ppm kod **29**, i na 174.46 ppm kod **30**. U  $^1\text{H}$  NMR spektrima oksazolina **31** i **32** je prisutan singletni signal od metil grupa na C-4' (1.14 ppm za **31** i 1.26 ppm za **32**) i signal C-5' metilenske grupe na 3.84 ppm za **31** i 3.89 ppm za **32**. Kod oksazolina u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima signali ugljenika C-2' imaju niže vrednosti hemijskih pomeranja u odnosu na signal C-24 ugljenika odgovarajućih amida [ $\delta_{\text{C}}$  174.70 za C-24 kod **29**  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  165.12 za C-2' kod **31**;  $\delta_{\text{C}}$  174.46 za C-24 kod **30**  $\rightarrow$   $\delta_{\text{C}}$  166.31 za C-2' kod **32**].

### 3.3. Sinteza alkil derivata žučnih kiselina Grignard-ovim reakcijama

7-Okso-deoksiholna kiselina (**5**) je alkilovana u položaju C-7 u uslovima Grignard-ovih reakcija (*Shema 3.11.*).



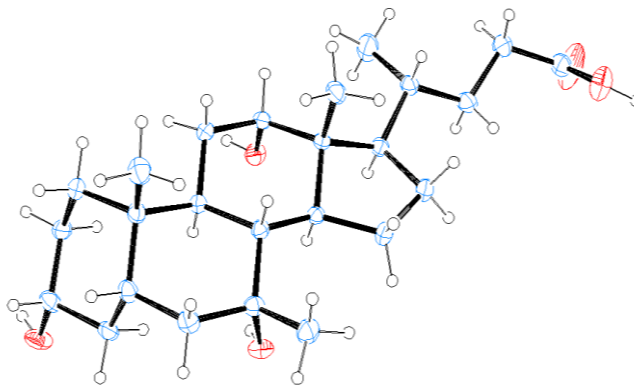
Reagensi*, vreme (min)	Proizvod	Prinos (%)
MeMgI, 30	<b>33</b> , R=Me	83
EtMgBr, 90	<b>34</b> , R=Et	88
BuMgCl, 30	<b>35</b> , R=Bu	94
OctMgBr, 135	<b>36</b> , R=Oct	83

\*MeMgI, BuMgCl i OctMgBr su 2 M rastvori u Et<sub>2</sub>O, a EtMgBr je 3 M rastvor u Et<sub>2</sub>O

*Shema 3.11.* (a) RMgX, anh. THF, -20 °C.

Okso derivat **5** je izložen dejstvu metilmagnezijum-jodida, pri čemu je nakon 30 minuta na -20 °C dobijeno jedinjenje **33** u prinosu od 83%. U reakciji je dobijen samo jedan stereoizomer, a njegova struktura je utvrđena NMR spektroskopijom. U <sup>1</sup>H NMR spektru se uočava singlet na 1.10 ppm koji potiče od metil grupe u položaju C-7 i singlet na 3.56 ppm koji potiče od hidroksilne grupe na C-7. Signal novouvedene metil grupe u <sup>13</sup>C NMR spektru ima hemijsko pomeranje od 33.75 ppm, dok se signal za C-7 atom nalazi na 71.43 ppm.

Nakon kristalizacije, rendgenostrukturalnom analizom određena je struktura jedinjenja **33** što je dodatno omogućilo potvrdu β-orientacije metil grupe u položaju C-7 (*Slika 3.1.*).



Slika 3.1. ORTEP prikaz trodimenzionalne strukture proizvoda **33**.

Stereoselektivnost reakcije može se objasniti lakšim prilazom Grignard-ovog reagensa karbonilnoj grupi sa  $\beta$ -strane (prilaz sa  $\alpha$  strane je otežan od strane A prstena) kao i da u tom slučaju nastaje termodinamički povoljniji proizvod sa voluminoznom metil grupom u ekvatorijalnom položaju.

Reakcijom ketona **5** sa EtMgBr na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u toku 90 minuta dobijena je 7 $\beta$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (**34**) u prinosu od 88% (Shema 3.11.). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jedinjenja **34** uočava se izostanak signala kvaternernog ugljenika keto grupe (u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru polaznog jedinjenja **5** on se javlja na 212.24 ppm) kao i prisustvo tri signala u oblasti manjeg hemijskog pomeranja (70.86, 70.91 i 73.78 ppm) koja potiču od  $\text{sp}^3$  ugljenikovih atoma za koji su vezani atomi kiseonika. U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **34**, lako je uočljiv singlet na 0.63 ppm koji potiče od C-18 angularne metil grupe. Signal koji potiče od C-19 angularne metil grupe se delimično preklapa sa tripletom metil grupe novouvedene etil grupe na C-7. Pored signala vodonika hidroksilnih grupa na C-3 (4.34 ppm) i C-12 (4.10 ppm) prisutan je i signal na 3.41 ppm koji potiče od novonastale hidroksilne grupe na C-7.

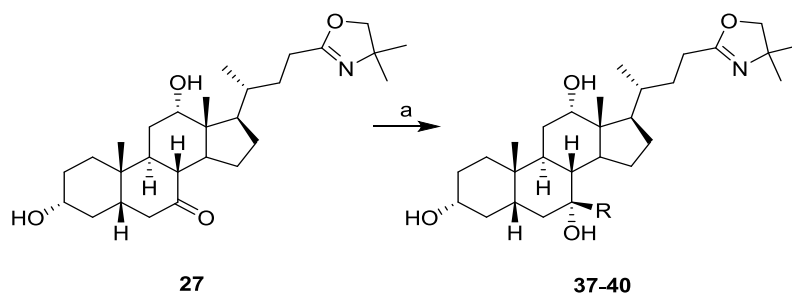
7 $\beta$ -Butil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (**35**) je dobijena u reakciji ketokiseline **5** sa butil-magnezijum-hloridom na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u toku 30 minuta. Nakon obrade reakcione smeše i hromatografskog prečišćavanja jedinjenje **35** je dobijeno u veoma visokom prinosu od 94% (računato u odnosu na izreagovanu kiselinu **5**). U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **35** pored jasnih singleta angularnih metil grupa (C-18 na 0.75 ppm i C-19 na 0.85 ppm) nalazi se i tripletni signal na 0.92 ppm koji potiče od metil grupe novouvedenog butil niza na C-7. Signal na 14.18 ppm u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jedinjenja **35** takođe potiče od metil grupe butil niza.

Tretmanom sa 2M dietil-etarskim rastvorom oktil-magnezijum-bromida u toku 135 minuta na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jedinjenje **5** je transformisano u 7-oktil derivat holne kiseline **36** (Shema 3.11.). Tripletni signal u  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **36** na  $\delta_{\text{H}}$  0.85 i signal na 14.40 ppm u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru potiču od metil grupe novouvedenog oktil niza. Na hemijskom pomeranju od 3.41 ppm u  $^1\text{H}$  NMR spektru se nalazi signal hidroksilne grupe na C-7.

U sve četiri gore pomenute reakcije dobija se samo jedan izomer, odnosno pod primenjenim uslovima nukleofilna adicija Grignard-ovog reagensa na C-7 karbonilnu grupu se dešava stereoselektivno. Osim jedinjenja **33** koji je dobijen u kristalnom obliku, drugi alkil derivati su dobijeni u obliku ulja te nisu bili

pogodni za rendgenostrukturnu analiz. U NMR spektrima jedinjenja **34**, **35** i **36** dolazi do značajnog preklapanja signala novouvedenih alkil grupa što onemogućava da se sa velikom sigurnošću odredi apsolutna konfiguracija na ugljeniku C-7. Ipak, u odnosu na 7 $\beta$ -metil stereohemiju kod **33**, derivata sa najmanjom novouvedenom alkil grupom, pretpostavljeno je da su i kod derivata sa voluminoznijim alkil grupama **34**, **35** i **36** one takođe  $\beta$ -orijentisane.

Oksazolinski 7-okso derivat **27** je takođe podvrgnut reakcijama sa Grignard-ovim reagensima pod uslovima prikazanim na *Shemi 3.12*.



Reagensi*, vreme (min)	Proizvod	Prinos (%)
MeMgI, 20	<b>37</b> , R=Me	63
EtMgBr, 15	<b>38</b> , R=Et	74
BuMgCl, 60	<b>39</b> , R=Bu	79
OctMgBr, 60	<b>40</b> , R=Oct	69

\*MeMgI, BuMgCl i OctMgBr su 2 M rastvori u Et<sub>2</sub>O, a EtMgBr je 3 M rastvor u Et<sub>2</sub>O

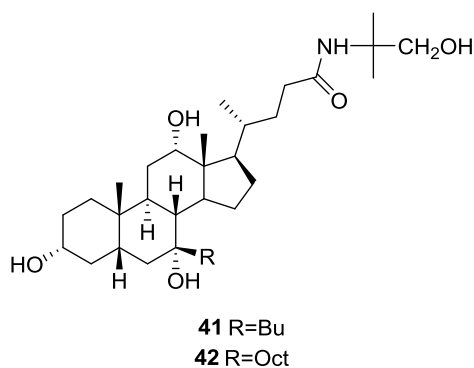
*Shema 3.12.* (a) RMgX, anh. THF, -20 °C.

Nukleofilnom adicijom MeMgI na **27** dobijen je metil derivat **37** u prinosu od 63%. U <sup>1</sup>H NMR spektru **37** uočava se singlet koji potiče od metil grupe u položaju C-7 sa hemijskim pomeranjem od 1.09 ppm. U istom spektru, signal hidroksilne grupe na ugljeniku C-7 se pojavljuje kao singlet na 3.57 ppm. Pored izostanka signala karbonilne grupe na 211.70 ppm, u <sup>13</sup>C NMR spektru **37** se pojavljuje signal na 71.42 ppm od C-7, kao i signal metil grupe na C-7 sa hemijskim pomeranjem 33.74 ppm.

Reakcija jedinjenja **27** sa EtMgBr je trajala samo 15 minuta, pri čemu je dobijen 2-(7 $\beta$ -etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (**38**) u dobrom prinosu (74%). Spektroskopski podaci pružaju dokaz o strukturi adicionog proizvoda. U <sup>1</sup>H NMR spektru se primećuje tripletni signal na 0.87 ppm od metil grupe novouvedenog etil niza na C-7. Signal za ugljenikov atom pomenute metil grupe se u <sup>13</sup>C NMR spektru javlja na 9.54 ppm.

U reakciji 7-okso-oksazolina **27** sa BuMgCl na -20 °C u toku 60 minuta dobijen je 2-(7 $\beta$ -butil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (**39**) u prinosu od 79% (računato na izreagovalo **27**). Kao sporedni proizvod (8%, računato na izreagovalo **27**) dobijen je 2-(7 $\beta$ -butil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (**41**) (*Shema 3.13.*).





Shema 3.13.

Produženjem reakcionog vremena i izvođenjem reakcija na višim temperaturama, očekivano vodi većem nastanku alkil-amida **41**. Tako se u toku 2 h na temperaturi ključanja reakcione smeše jedinjenje **39** dobija u prinosu od samo 33%, dok amid **41** nastaje u prinosu od 25%.

U  $^1\text{H}$  NMR spektru 7-butil oksazolina **39** vidi se tripletni signal ( $\delta_{\text{H}}$  0.83) metil grupe na kraju butil niza na C-7, dok se signal te grupe u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru javlja na  $\delta_{\text{C}}$  14.05. Razlika u NMR spektrima između oksazolina **39** i amida **41** se najviše uočava po položaju signala ugljenika C-24 u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima koji se kod oksazolina **39** javlja na 164.83 ppm, a kod amida **41** na 175.09 ppm. Strukture potvrđuju i maseni spektri visoke rezolucije koji pokazuju pseudomolekulske jone:  $m/z$  518.41963  $[\text{M}+\text{H}]^+$  za **39** (izračunato  $m/z$  518.42039) i  $m/z$  558.41193  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  za **41** (izračunato  $m/z$  518.42039).

Alkilovanje **27** sa OctMgBr je takođe rađeno na dve temperature. Kada je reakcija rađena na temperaturi od  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  oksazolin **40** je dobijen u prinosu od 69% (računato na izreagovalo **27**), a **42** nije izolovan. Na temperaturi ključanja reakcione smeše u toku dva sata, kao glavni proizvod reakcije je dobijen amid **42** (Shema 3.13.) u prinosu od 26%, dok je oksazolin **40** dobijen u prinosu od 18%.

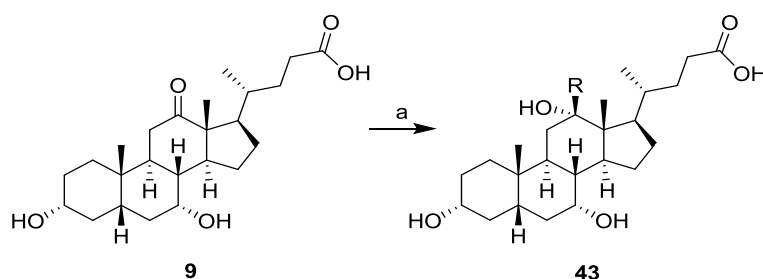
U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **40** je uočljiv triplet na 0.86 ppm, koji potiče od metil grupe oktil niza, i singlet na 3.41 ppm od OH grupe na C-7. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru se pojavljuju signali četiri metil grupe na: 13.10 ppm C-18, 14.41 ppm metil grupa iz oktil niza, 17.57 ppm C-21 i na 23.05 ppm C-19. Ugljenik u položaju C-24 ima hemijsko pomeranje od 165.31 ppm.

Karakteristični signali u protonskom spektru amida **42** su: triplet na 0.86 ppm koji potiče od metil grupe oktil niza, singlet na 1.16 ppm od dve metil grupe amida, na 3.37 ppm dublet od metilenske grupe amida, 3.40 ppm singlet od hidroksilne grupe na C-7, triplet na 3.91 ppm od hidroksilne grupe amidnog ostatka i na 7.23 ppm singlet od vodonika vezanog za azot amida. Položaj signala metil grupe iz oktil niza se nalazi na hemijskom pomeranju od 14.41 ppm u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru, dok se signal ugljenika C-24 nalazi na 173.37 ppm.

Čistoću i strukturu jedinjenja **40** i **42** potvrđuju i karakteristični fragmenti koji su u njihovim masenim spektrima locirani na  $m/z$  574.4837  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Izračunato  $m/z$  574.48370) za **40** i  $m/z$  592.49248  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Izračunato  $m/z$  592.49355) za **42**.

Kiselina i oksazolin sa karbonilnom grupom u položaju C-12, **9** i **28** respektivno, su podvrgnuti reakciji sa MeMgI, EtMgBr i BuMgCl. Detalji reakcija okso-kiseline **9** sa alkil-magnezijum-halidnim reagensima su prikazani na *Shemi 3.14*.

Reakcijom jedinjenja **9** sa metil-magnezijum-jodidom u THF-u na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u toku 90 minuta dobijen je metil derivat **43** u prinosu od 27%. Reakcija se odvijala stereoselektivno i izolovan je samo jedan stereoizomer. Struktura jedinjenja **43** određena je analizom NMR spektara. Dokaz o odigranom alkilovanju potvrđuje singletni signal na hemijskom pomeranju od 1.13 ppm u  $^1\text{H}$  NMR spektru i signal na 27.55 ppm u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru. Pomenuti signali potiču od metil grupe koja je Grignard-ovom reakcijom uvedena u položaj C-12 steroidnog skeleta. Signal od hidroksilne grupe na C-12 se nalazi na 4.00 ppm protonskog NMR spektra. Apsolutna konfiguracija na novonastalom stereocentru (C-12) je određena na osnovu tumačenja ROESY NMR. Beta orijentaciju metil grupe na ugljeniku C-12 potvrđuje *cross peak* metil grupa na C-12 i C-13 koji jasno ukazuje njihovu prostornu bliskost.



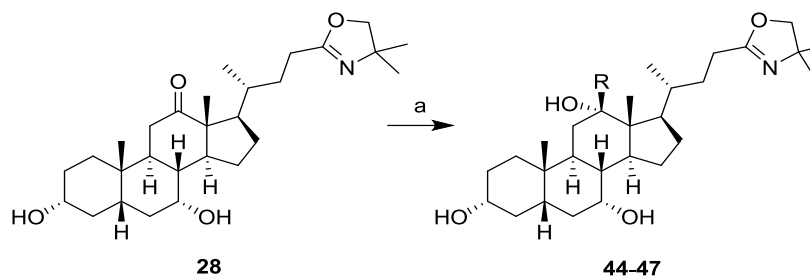
Reagensi*, uslovi	Proizvod	Prinos (%)
MeMgI, 1.5 h, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	<b>43</b> R=Me	27
EtMgBr, 5 h, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili 1 h st	CA	/
BuMgCl, 5 h, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili 1 h st	CA	10

\*MeMgI i BuMgCl su bili 2 M rastvori u  $\text{Et}_2\text{O}$ , a EtMgBr je bio 3 M rastvor u  $\text{Et}_2\text{O}$

*Shema 3.14.* (a)  $\text{RMgX}$ , anh. THF.

U reakcijama EtMgBr i BuMgCl sa **9** nije došlo do očekivane nukleofilne adicije Grignard-ovog reagensa na keto grupu. Reakcije jedinjenja **9**, kako sa EtMgBr, tako i sa BuMgCl, su rađene na tri temperature:  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  i sobnoj temperaturi. Na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nije dolazilo do reakcije. Mešanjem na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  u toku pet sati, kao i na sobnoj temperaturi u toku jednog sata, nastaje kompleksna smeša proizvoda, a na osnovu TLC-a je utvrđeno da je CA dominantni proizvod (10% u slučaju reakcije sa BuMgCl).

Reakcije 12-okso oksazolinskog derivata **28** sa Grignard-ovim reagensima su prikazane na *Shemi 3.15*. Jedinjenje **28** je u reakciji sa MeMgI u toku 30 minuta na temperaturi od  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  prevedeno u metil derivat **44** u prinosu od 53%. Reakcija keto oksazolina **28** sa EtMgBr i BuMgCl daje odgovarajuće 12-alkil proizvode **45** (48%) i **46** (49%), respektivno. Reakcije su tekle dva sata na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a zatim tri sata na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U obe reakcije je pored adicionog proizvoda dobijeno i jedinjenje **25** (17% i 19% respektivno) koje je nastalo kao rezultat redukcije keto grupe sa Grignard-ovim reagensom. Reakcija sa oktil-magnezijum-bromidom je vršena na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri čemu je nakon 3 h izolovan jedino adicioni proizvod **47** u prinosu od 67%.



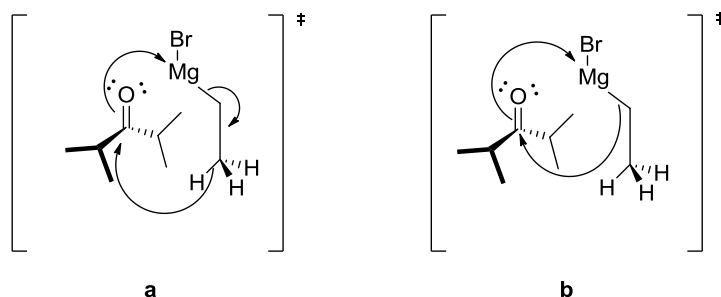
Reagensi*, uslovi	Proizvodi	Prinos (%)
MeMgI, 30 min 0 °C	<b>44</b> R=Me	53
EtMgBr, 2 h -20 °C, 3 h 0 °C	<b>45</b> R=Et, <b>25</b> R=H	48 <b>45</b> , 17 <b>25</b>
BuMgCl, 2 h -20 °C, 3 h 0 °C	<b>46</b> R=Bu, <b>25</b> R=H	49 <b>46</b> , 19 <b>25</b>
OctMgBr, 3 h 0 °C	<b>47</b> R=Oct	67

\*MeMgI, BuMgCl i OctMgBr su 2 M rastvori u Et<sub>2</sub>O, a EtMgBr je 3 M rastvor u Et<sub>2</sub>O

Shema 3.15. (a) RMgX, anh. THF.

Razlika u hemijskom ponašanju između 7-okso derivata i 12-okso derivata se pripisuje manjoj sternoj pristupačnosti C-12 karbonilnog ugljenika. Na ovaj način se može objasniti i različita reaktivnost keto grupe sa Grignard-ovim reagensima kod 7 i 12-okso kiselina **5** i **9**. Grignard-ov reagens reaguje relativno brzo sa C-7 karbonilnom grupom, pri čemu se dobijaju odgovarajući adicioni proizvodi. Kod 12-keto kiseline **9** prilaz alkil-magnezijum-halidnog reagensa C-12 reakcionom centru je znatno otežan. Stoga je do reakcije dolazilo samo na višoj temperaturi (st), i to samo do adicije hidridnog anjona na keto grupu, uz nastajanje redukcionog proizvoda (CA). Međutim, na sobnoj temperaturi je do reakcije dolazilo i na ugljeniku slabo reaktivnog karboksilatnog anjona, uz nastajanje kompleksne smeše proizvoda.

Nastajanje redukcionog proizvoda se takođe može objasniti sternim razlozima. Kod 12-keto grupe, kod koje je usled sternih smetnji otežana adicija karbanjona, preferencijalno nastaje redukcionni proizvod.<sup>225</sup> Neophodan uslov za redukcione osobine Grignard-ovog reagensa je postojanje bar jednog β-vodonika, koji će se ponašati kao kovalentno vezan hidrid. Po pretpostavljenom šestočlanom prelaznom stanju, manji β-vodonik lakše prilazi C-12 karbonilnom ugljeniku (Shema 3.16.a), uz nastajanje redukcionog proizvoda, nego veći, ugljenikov atom, koji vodi nastajanju adicionog proizvoda u mehanizmu adicije (Shema 3.16.b).

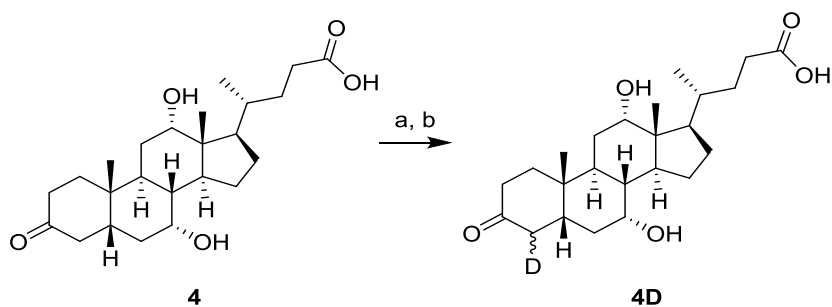


Shema 3.16.

Reakcije sa MeMgI kod sva četiri ketona (**5**, **27**, **9**, **28**) su davale adicioni proizvod. Kod 12-keto kiseline **9** reakcija je trajala tri puta duže (90 minuta) nego kod 7-keto kiseline **5**. Kod 12-keto oksazolina **28** reakcija je išla na višoj temperaturi (0 °C) nego kod ostala tri keto derivata gde se reakcija odigravala na -20 °C.

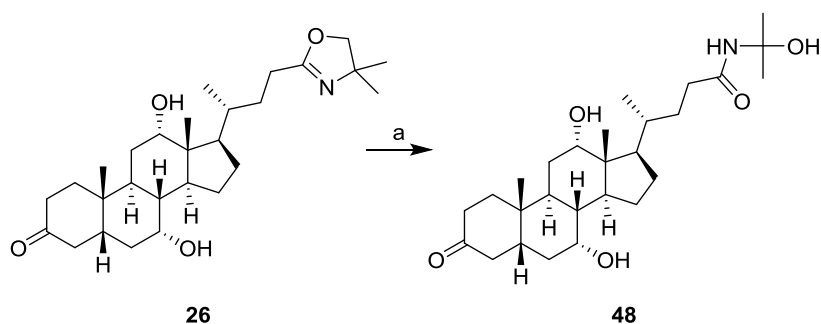
Kod Et-, Bu- i Oct- Mg-halida reakcije sa 7-keto derivatima kako sa C-24 karboksilnom kiselinom, tako i u oksazolinskoj seriji su se odigravale na -20 °C. Sa produžetkom reakcionog vremena u oksazolinskoj seriji dolazi i do delimične parcijalne hidrolize oksazolina i nastajanja amida. Kod 12-okso kiseline **9** Et- i Bu- Mg-halid na 0 °C i na st daju kompleksnu smešu sa CA kao glavnim proizvodom, dok kod 12-keto oksazolina **28** na -20 °C nastaje redukcionni proizvod, a na 0 °C dolazi do adicije.

Ispitivane su i mogućnosti alkilovanja 3-keto derivata **4** u uslovima Grignard-ove reakcije. Jedinjenje **4** je podvrgnuto reakciji sa MeMgI (THF, 1 h st; benzen, 3 h refluks), EtMgBr (THF, 100 minuta 0 °C) i BuMgCl (THF, 4 h st), ali nisu dobijeni očekivani rezultati. Naime, izolovano je samo polazno jedinjenje **4**. Ovakvo hemijsko ponašanje je bilo neočekivano s obzirom na to da je karbonilna grupa u položaju C-3 najmanje zaklonjena u poređenju sa C-7 i C-12 karbonilnim grupama. Objašnjenje ovog rezultata je nastajanje nukleofilnog enolatnog anjona usled apstrakcije  $\alpha$ -protona Grignard-ovim reagensom. Ovo je potvrđeno u reakciji **4** sa EtMgBr koja je prekinuta dodatkom deutero vode, pri čemu je dobijeno jedinjenje **4D** (Shema 3.17.).

Shema 3.17.(a) EtMgBr, THF, -20 °C, 2.5 h; (b) i) D<sub>2</sub>O; ii) AcOH.

U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru deuterio jedinjenja **4D** se na mestu na kome se kod **4** nalazio singletni signal metilenske grupe nalazi multiplet, što je posledica  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{D}$  kuplovanja, dok se u masenom spektru visoke rezolucije na  $m/z$  446.24155  $[\text{M}+\text{K}]^+$  javlja pik koji potvrđuje molekulsku formulu jedinjenja **4D**, ( $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{DO}_5$ ) (izračunato  $m/z$  446.24136).

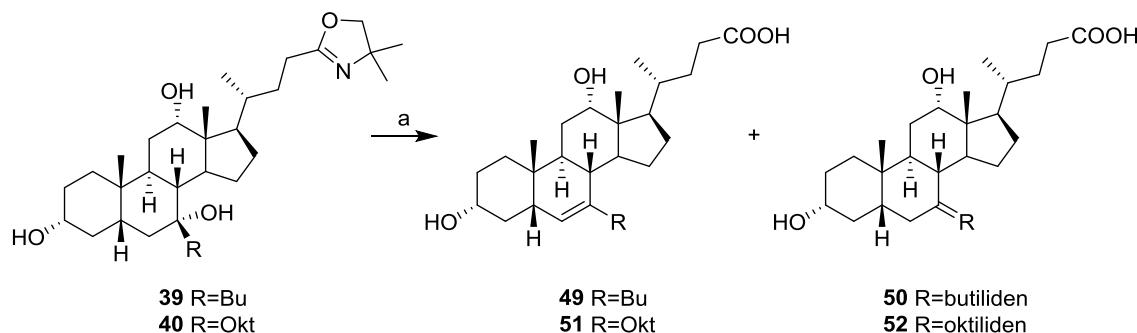
Reakcija alkilovanja u položaju C-3 je pokušana i sa oksazolinskim derivatom **26**. Reakcija je rađena sa  $\text{BuMgCl}$  i to najpre na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  u toku 4 h i kako je na osnovu TLC utvrđeno da je u reakcionoj smeši prisutno samo polazno jedinjenje **26**, reakciona temperatura je podignuta do sobne temperature. Međutim, mešanjem na sobnoj temperaturi u toku 18 sati došlo je samo do parcijalne hidrolize oksazolinskog prstena i nastajanja amida **48** u prinosu od 8% (*Shema 3.18.*). Pored  $\text{BuMgCl}$ , **26** je podvrgnut i reakcijama sa  $\text{EtMgBr}$  (THF, 96 h st; THF, 2.5 h  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) i  $\text{OctMgBr}$  (THF, 2 h  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ; THF, 50 minuta  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 h reflux), pri čemu su dobijeni slični rezultati kao i u slučaju  $\text{BuMgCl}$ . Na temperaturi od  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  nije dolazilo ni do kakvih reakcija, dok je na višim temperaturama (st, reflux) i uz duže reakciono vreme, dolazi sam do nastajanja amida **48**.



*Shema 3.18.* (a)  $\text{BuMgCl}$ , THF,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  4 h, st 18 h, 8%.

### 3.4. Uklanjanje oksazolinske zaštite i eliminacija 7-hidroksilne grupe kod 7 $\beta$ -butil i 7 $\beta$ -oktil derivata holne kiseline

7 $\beta$ -Butil derivat **39** i 7 $\beta$ -oktil derivat **40** su podvrgnuti reakciji uklanjanja oksazolinske zaštite. Reakcije su rađene sa 2.5 M vodenim rastvorom hlorovodonične kiseline na temperaturi ključanja reakcione smeše u toku 10 minuta (*Shema 3.19.*).

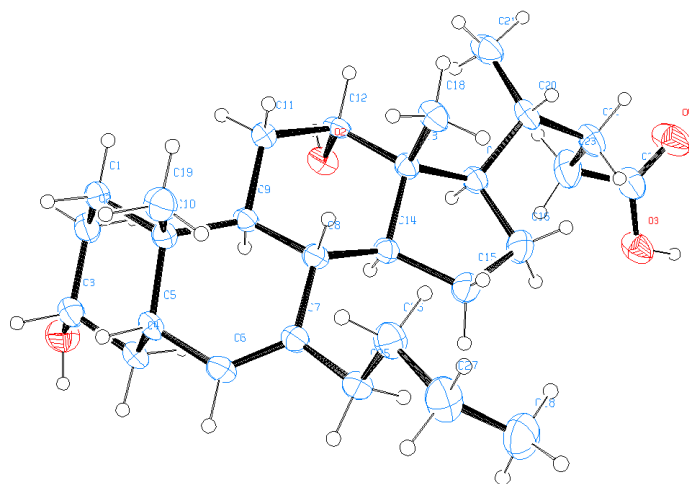


*Shema 3.19.* (a) 2.5 M HCl, refluks, 10 min, 43% **49**, 30% **50**, 44% **51**, 21% **52**.

Alkil-oksazolini se lako rastvaraju u vodenom rastvoru kiseline, ali se nakon par minuta zagrevanja na temperaturi ključanja, reakciona smeša zamutila. Pojava zamućenja znači da je dobro rastvorna hidrohloridna so oksazolina hidrolizovala do slabo rastvorne karboksilne kiseline. Pri ovim reakcionim uslovima hidroksilna grupa koja je vezana za tercijarni ugljenikov atom podleže eliminaciji. Kao rezultat eliminacije nastala je smeša proizvoda. Kao glavni proizvodi dobijaju se  $\Delta^6$  alkeni **49** iz **39** (43%) i **51** iz **40** (44%), dok se alkiliden derivati **50**, tj. **52** dobijaju u nešto manjem procentu (30%, tj. 21% respektivno). U obe reakcije je izolovana i smeša čiji sastav nije utvrđen, a pretpostavlja se da se sastoji od  $\Delta^7$  i  $\Delta^{8,14}$  alkena.<sup>210</sup>

Strukture dobijenih proizvoda su dokazane NMR spektroskopijom gde se kako u protonskim, tako i u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima jedinjenja **49–52** uočava izostanak signala karakterističnih za oksazolin, a prisutni su signali karboksilnog C-atoma u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru na oko 178 ppm. Kod  $\Delta^6$  alkena **49** i **51** u  $^1\text{H}$  NMR spektru javljaju se dubleti na 5.39 ppm kod **49** i 5.38 ppm kod **51** koji potiču od H-6. Prisustvo dvostruke veze u položaju  $\Delta^6$  kod pomenutih jedinjenja potvrđuju i signali na 127.2 ppm (C-6) i 139.4 ppm (C-7) u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima. Proizvod **50** sa egzocikličnom dvostrukom vezom u  $^1\text{H}$  NMR spektru daje signal u obliku tripleta na 5.24 ppm koji potiče od vinilnog vodonika. Isti signal kod jedinjenja **52** se javlja na 5.20 ppm. Signal za C-7 u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima jedinjenja **50** i **52** se javlja na oko 137 ppm, dok se signal za egzociklični CH javlja na 121.84, tj. 121.93 ppm respektivno. Dodatna potvrda strukture i čistoće jedinjenja **49–52** je dobijena masenom spektroskopijom visoke rezolucije [za **49**,  $m/z$ :  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  izračunato 469.32883, nađeno 469.32841; za **50**,  $m/z$ :  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  izračunato 464.37344, nađeno 464.37258; za **51**,  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  izračunato 525.39143, nađeno 525.39052; za **52**,  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 503.40949, nađeno 503.40854.

Struktura i stereochemija jedinjenja **49** je potvrđena i rendgenostrukturnom analizom (*Slika 3.2.*).

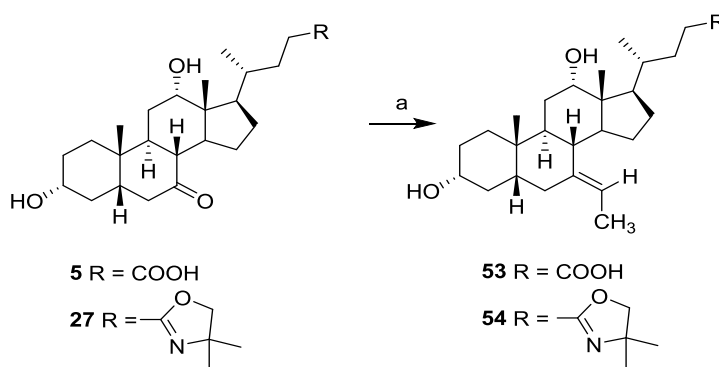


*Slika 3.2.* ORTEP prikaz trodimenzionalne strukture proizvoda **49**.

### 3.5. Sinteza alkilidenskih derivata žučnih kiselina u uslovima Wittig-ovih reakcija

7-Okso, 7,12-dioekso i 3,7,12-trioekso derivati ŽK su podvrgnuti reakcijama olefinacije sa Wittig-ovim reagensima. Reakcije su rađene kako kod ŽK sa karboksilnom grupom u položaju C-24, tako i kod njihovih oksazolinskih analoga.

Reakcijom 7-keto kiseline **5** sa etil-trifenilfosfonijum-bromidom u prisustvu kalijum-*terc*-butoksida, na temperaturi ključanja reakcione smeše u toku 5 h dobijen je 7-etiliden derivat **53** u skromnom prinosu od 8% (*Shema 3.20.*).



*Shema 3.20.* (a)  $[\text{Ph}_3\text{PET}]^+\text{Br}^-$ , *t*-BuOK, THF, refluks, 5 h za **5**, 8%; 7.5 h za **27**, 49%.

Istom reakcijom 7-keto oksazolinski derivat **27** ( $[\text{Ph}_3\text{PET}]^+\text{Br}^-$ , *t*-BuOK) pri nešto dužem reakcionom vremenu (7.5 h) je dao 2-((*E*)-7-etiliden-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (**54**) u značajno većem prinosu od 49% (*Shema 3.20*).

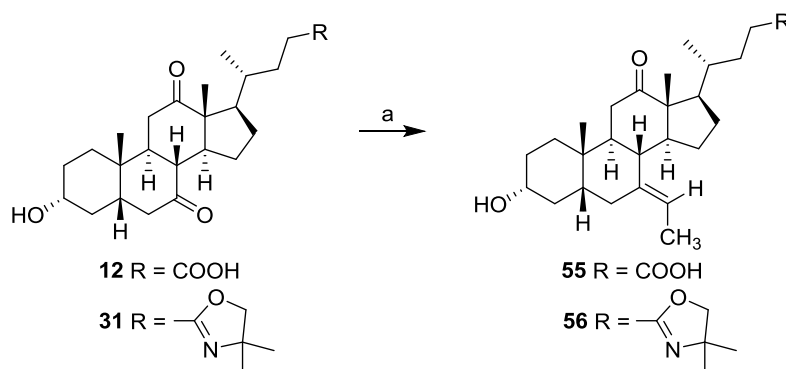
Razlika u prinosima reakcija olefinacije bi se mogla objasniti različitom rastvorljivošću supstrata u THF. U baznim uslovima Wittig-ove reakcije kiselina se nalazi u obliku soli koja ima verovatno ograničenu rastvorljivost dok se oksazolin nalazi u nejonizovanoj formi koja se dobro rastvara u primenjenom etarskom rastvaraču.

Obe reakcije su stereoselektivne i nastaju samo *E* etilideni. Strukture olefina **53** i **54** su utvrđene na osnovu analize NMR spektara. U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **53** uočavaju se dva signala koja potvrđuju prisustvo etilidenske grupe u molekulu. To su signali na 1.52 ppm (d, 3H,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$  iz etilidena) i 5.23 ppm (q, 1H,  $J=6.5$  Hz, CH iz etilidena). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jedinjenja **53** prisutni su signali na 12.88 ppm ( $\text{CH}_3$  iz etilidena), 113.63 ppm (CH iz etilidena) i 139.63 ppm (C-7). Da je u molekulu prisutna karboksilna grupa svedoči signal na 175.32 ppm. Stereohemija na novouvedenoj egzocikličnoj dvostrukoj vezi je određena ROESY eksperimentima, a dobijeni rezultati su opisani u poglavlju 3.5.1. HRMS (TOF) dodatno potvrđuje strukturu jedinjenja **53** pikom na  $m/z$  837.62277 za  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ , izračunato 837.62390.



Isto tako,  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **54** dublet na 1.56 ppm i kvartet na 5.31 ppm dokazuju prisustvo etilidenske grupe u molekulu. Oksazolinska funkcija je ostala u molekulu, na šta ukazuje signal od dve metil grupe na C-4' (1.25 ppm) i signal metilenske grupe C-5' (3.88 ppm) u  $^1\text{H}$  NMR spektru. Signali koji potvrđuju prisustvo etilidenske funkcije u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru nalaze se na 13.02 ppm ( $\text{CH}_3$  etilidena), 115.17 ppm (CH etilidena) i 138.83 (C-7). Pik na 472.37813  $m/z$  u masenom spektru visoke rezolucije (TOF) koji odgovara  $[\text{M}+\text{H}]^+$  fragmentu dodatno potvrđuje strukturu molekula **54**.

Ispitane su i reakcije 7,12-diokso derivata sa karboksilnom grupom u položaju C-24 (**12**), kao i oksazolinskom grupom (**31**) u bočnom nizu, sa etilidentrifetilfosforanom. Reakcije jedinjenja **12** i **31** sa pomenutim ilidom su izvedene na temperaturi ključanja tetrahidrofurforskog rastvora, a kao baza za dobijanje ilida je korišćen *t*-BuOK (*Shema 3.21.*). Dobijeni su 7*E*-etilidenski derivati **55** i **56** u prinosima od 11% i 48%, respektivno.



*Shema 3.21.* (a)  $[\text{Ph}_3\text{PET}]^+\text{Br}^-$ , *t*-BuOK, THF, refluks, 8.5 h za **12**, 11% **55**; 105 min za **31**, 48% **56**.

U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **55** uočavaju se dva signala koja potvrđuju prisustvo etilidenske grupe i to na 1.50 ppm (d, 3H,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ) i 5.19 ppm (q, 1H,  $J=6.8$  Hz, CH). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jedinjenja **55** prisutni su signali na 13.18 ppm ( $\text{CH}_3$ ), 115.09 ppm (CH) i 138.40 ppm (C-7) koji takođe dokazuju da je u molekulu u položaju C-7 prisutna etilidenska grupa. Molekulska formulu jedinjenja **55** potvrđuje i maseni spektar visoke rezolucije (TOF) pikom na  $m/z$  434.32439, koji odgovara  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  fragmentu (izračunato  $m/z$  434.32649).

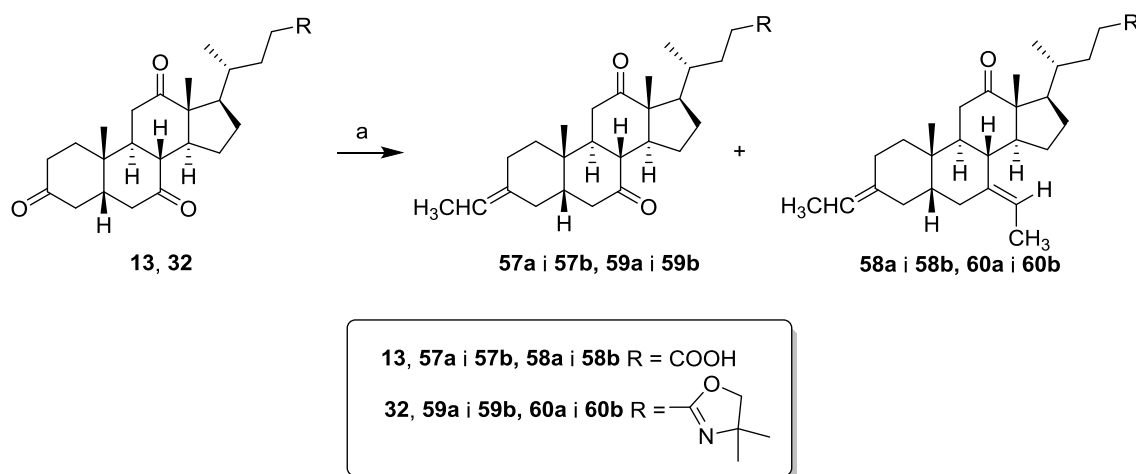
U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **56** se takođe uočavaju dva signala koja potvrđuju prisustvo etilidenske grupe u molekulu. To su signali na 1.56 ppm (d, 3H,  $J=7.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ) i 5.22 ppm (q, 1H,  $J=7.5$  Hz, CH). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisutni su signali na 115.96 ppm (CH iz etilidena) i 137.53 ppm (C-7). Molekulska formulu jedinjenja **56** potvrđuje i maseni spektar visoke rezolucije (TOF) pikom na  $m/z$  470.36286, izračunato za  $[\text{M}+\text{H}]^+$  470.36287.

Na osnovu protonskih i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara jedinjenja **55** i **56** se može zaključiti da reakcija olefinacije kod 7,12-diokso derivata **12** i **31** protiče kako regioselektivno, tako i stereoselektivno. Naime, u molekulima **55** i **56** je prisutna samo jedna etilidenska grupa i to u položaju C-7. To nam potvrđuju,

pored gore pomenutih signala, i signali na 214.71 ppm (C-12) u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jedinjenja **55**, tj. 214.78 ppm (C-12) u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jedinjenja **56**.

Za razliku od 7-okso (**5** i **27**) i 7,12-dioekso (**12** i **31**) derivata koji su pokazivali potpunu stereo- i regioselektivnost u reakcijama sa etilidientrifetilfosforanskim ilidom, 3,7,12-trioekso derivati **13** i **32** daju smešu proizvoda. Naime, karbonilne grupe u položajima C-7 i C-12 kod triokso derivata **13** i **32** zadržavaju hemijsko ponašanje u Wittig-ovoj reakciji kao kod mono- i dioekso derivata **5**, **27**, **12** i **31**, gde je C-12 keto grupa nereaktivna, a keto grupa u položaju C-7 stereoselektivno daje *E*-olefin. Međutim, reakcija karbonilne grupe u položaju C-3 sa Wittig-ovim reagensom ne protiče stereoselektivno, već se dobija smeša *E* i *Z* geometrijskih izomera.

U Wittig-ovoj reakciji dehidrohodne kiseline (**13**) sa ilidom nastalim u reakciji etiltrifenilfosfonijumbromida sa *t*-BuOK, dobija se *E/Z* smeša 3-etiliden-7,12-dioekso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**57a** i **57b**), u prinosu od 15% i (*3E/Z,7E*)-3,7-dietiliden-12-okso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**58a** i **58b**), u prinosu od 39% (Shema 3.22.). Pri sličnim reakcionim uslovima, s tim što je ovde kao baza korišćen NaH, 3,7,12-trioekso-oksazolin **32** je dao slične rezultate. Dobijena je stereoizomerna smeša 2-[(*E/Z*)-3-etiliden-7,12-dioekso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolina (**59a** i **59b**) u prinosu od 14% i stereoizomerna smeša 2-[(*3E/Z,7E*)-3,7-dietiliden-12-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolina (**60a** i **60b**) u prinosu od 69%.



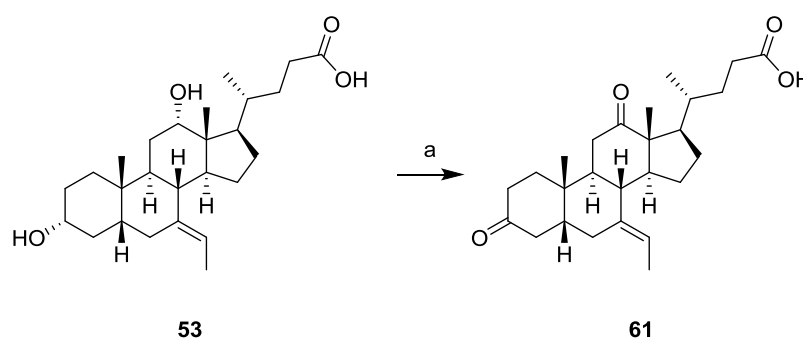
Shema 3.22. (a)  $[\text{Ph}_3\text{PEt}]^+\text{Br}^-$ , THF, *t*-BuOK, refluks, 3.5 h za **13**, 15% **57a** i **57b**, 39% **58a** i **58b**; NaH, 3 h za **32**, 14% **59a** i **59b**, 69% **60a** i **60b**.

Pomeranje signala za C-3 ka manjim vrednostima  $\delta$  u odnosu na polazno jedinjenje **13**, tj. **32**, a prisustvo signala za C-7 i C-12 karbonilne grupe u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima smeše jedinjenja **57a** i **57b**, tj. **59a** i **59b** potvrđuje da je C-3 karbonilna grupa najreaktivnija pod primenjenim reakcionim uslovima. Po dva signala sa veoma sličnim vrednostima hemijskog pomeranja u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima smeše jedinjenja **57a** i **57b** na 115.75 ppm i 115.86 ppm i na 116.82 ppm i 116.89 za smešu jedinjenja **59a** i **59b** (CH iz etilidena), govore da olefinacija, kako kod kiseline **13**, tako i kod oksazolina **32**, nije

stereoselektivna i da se dobija smeša *E* i *Z* izomera. Molekulsku formulu diastereoizomerne smeše jedinjenja **57a** i **57b** potvrđuje maseni spektar visoke rezolucije pikom na 415.28292 *m/z*, koji odgovara  $[M+H]^+$  fragmentu (izračunato *m/z* 425.28429), a kod jedinjenja **59** pik na 468.3471 *m/z*,  $[M+H]^+$  fragmenta (izračunato *m/z* 468.34722).

U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru smeše **58a** i **58b** prisutan je signal C-12 keto grupe na 213.68 ppm, što govori da su keto grupe u položajima C-3 i C-7 učestvovala u reakciji. Slično kao u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru smeše jedinjenja **57a** i **57b**, i ovde se primećuju dva bliska signala izomera na dvostrukoj vezi etilidenske grupe na C-3 (114.76 i 114.89 ppm), dok se signal od CH iz etilidena u položaju C-7 javlja na 115.10 ppm i 115.19 ppm. Signali sa sličnim hemijskim pomeranjem su prisutni i u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru smeše jedinjenja **60a** i **60b**. Molekulsku formulu diastereoizomerne smeše jedinjenja **58a** i **58b** potvrđuje maseni spektar visoke rezolucije pikom na 853.63382 *m/z*, koji odgovara  $[2M+H]^+$  fragmentu (izračunato *m/z* 853.63407), a smeše jedinjenja **60a** i **60b** *m/z* 480.38207  $[M+H]^+$  (izračunato *m/z* 480.38361).

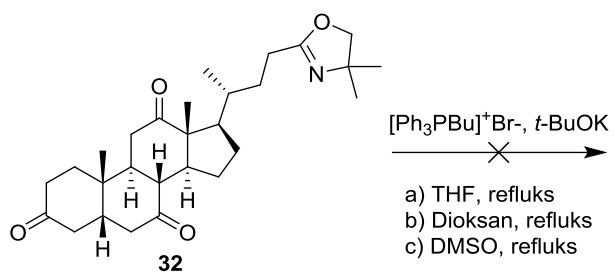
U cilju dobijanja derivata sa etilidenskim supstituentom u položaju C-7 i keto grupama u položajima 3 i 12 (**61**), dihidroksi etiliden **53** je podvrgnut oksidaciji sa Jones-ovim reagensom (*Shema 3.23.*). Reakcija je izvedena na 0 °C u toku 20 minuta. Dobijen je 3,12-diokso derivat **61** u prinosu od 85%.



*Shema 3.23.* (a) Jones-ov reagens, aceton, 0 °C, 20 min, 85%.

U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jedinjenja **61** su prisutni signali na hemijskom pomeranju od 212.33 i 214.35 ppm koji potiču od karbonilnih ugljenika u položajima C-3 i C-12, dok u IR spektru izostaju trake karakteristične za vibracije alkoholnih hidroksilnih grupa. Da je dobijen diketo derivat **61** potvrđuje i HRMS pikom na *m/z* 415.28309  $[M+H]^+$  (izračunato 415.28429).

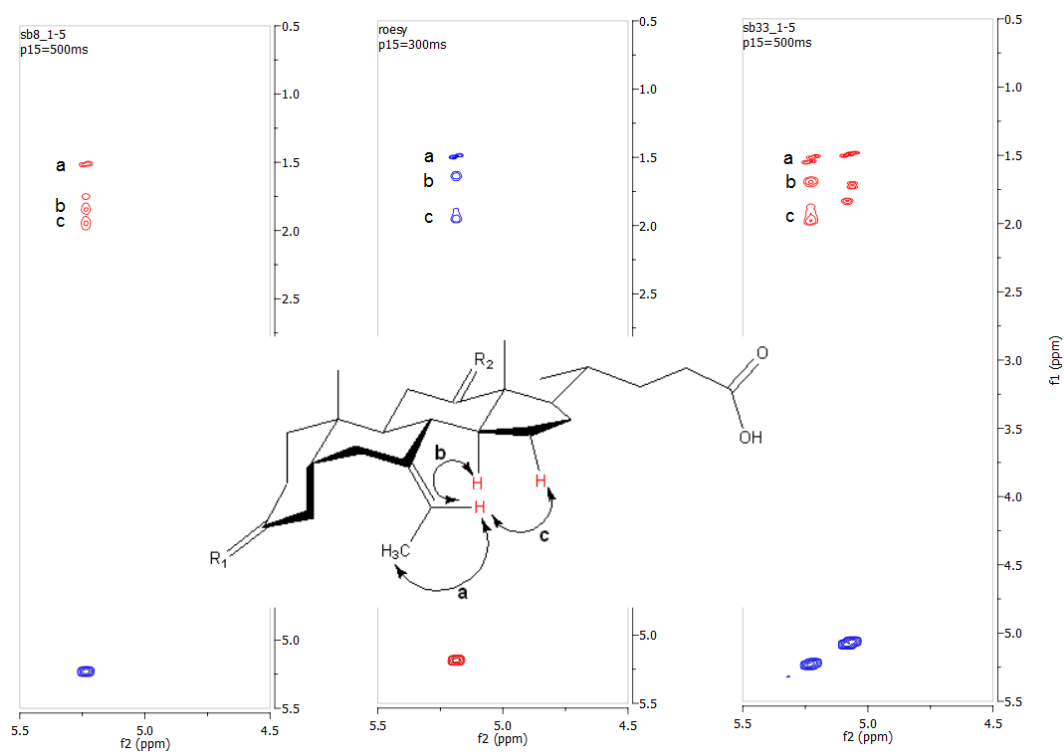
Rađene su i reakcije 7-okso (**27**), 7,12-diokso (**31**) i 3,7,12-triokso oksazolina **32** sa butilidenskim ilidom dobijenim u reakciji *t*-BuOK sa butiltrifenilfosfonijum-bromidom. Sve reakcije su rađene u THF-u na temperaturi ključanja reakcione smeše. Međutim, pri primenjenim reakcionim uslovima nije dolazilo do olefinacije. Kod triokso jedinjenja **32** (*Shema 3.24.*), koje ima najpristupačniju C-3 karbonilnu grupu reakcije su rađene i na temperaturama ključanja dioksana i DMSO, rastvarača koji imaju značajno veću temperaturu ključanja od THF, 101 °C i 189 °C, respektivno. Kako ni povećanjem temperature nije došlo do reakcije, verovatno je butil grupa suviše voluminozna i da repulzivne interakcije oksafosfetanskog intermedijera sa steroidnim skeletom sprečavaju odigravanje reakcije.



Shema 3.24.

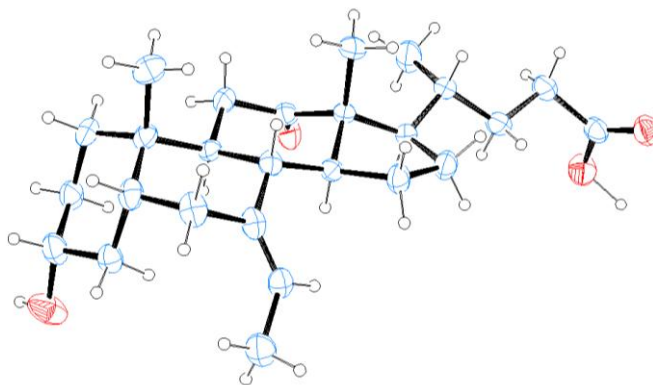
### 3.5.1. Stereohemijska analiza Wittig-ovih reakcija

Olefinacija u položaju C-7 je stereoselektivna, pri čemu nastaje samo *E* etiliden. Stereohemija na dvostrukoj vezi etilidenskih derivata sa C-24 karboksilnom grupom (**53**, **55**, **58**) je određena ROESY eksperimentom. U ROESY spektrima vinilni vodonik etilidenske grupe na C-7 daje *cross peak*-ove koji potiču od interakcija sa CH<sub>3</sub> (a), αH na C-14 (b) i αH na C-15 (c) (Slika 3.3.).



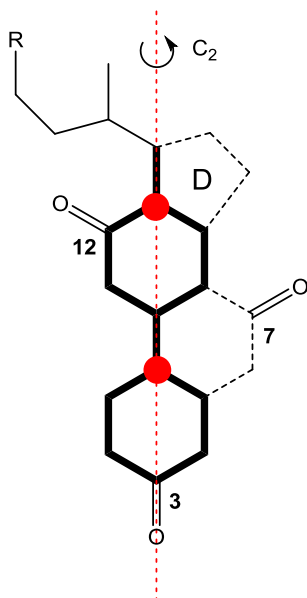
Slika 3.3. ROESY spektri **53** (R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=αOH, βH), **55** (R<sub>1</sub>= αOH, βH; R<sub>2</sub>=O) i **58** (R<sub>1</sub>= CH-CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=O)

Dodatnu potvrdu *E* konfiguracije alkena na C-7 dala je rendgenostrukturalna analiza monokristala jedinjenja **55** (Slika 3.4.).



Slika 3.4. ORTEP prikaz trodimenzionalne strukture proizvoda **55**.

Na osnovu informacija dobijenih NMR i X-ray analizom može se sa velikom sigurnošću zaključiti da i etilidenski derivati sa oksazolinskom zaštitom (**54**, **56**, **60**) takođe poseduju *E* konfiguraciju na egzocikličnoj dvostrukoj vezi. Dobijeni rezultati su već publikovani i u radu je dato detaljno objašnjenje stereohemijskog ishoda Wittig-ovih reakcija keto derivata ŽK sa etilidentrifenilfosforanom.<sup>226</sup> Na *Slici* 3.5. je prikazan molekulski graf 3,7,12-triokso derivata ŽK ili oksazolina. Pomoću  $C_2$  ose simetrije definisani su relativni odnosi između okso grupa i steroidnog skeleta. Karbonilna grupa C-7 se nalazi sa iste strane  $C_2$  ose kao i steroidni D prsten, što je slučaj i kod ketona na C-12 i bočnog niza na C-17. Za razliku od C-7 i C-12 asimetričnih keto grupa, keto grupa na C-3 se poklapa sa  $C_2$  osom simetrije i može se posmatrati kao simetričan keton.



Slika 3.5. Molekulski graf 3,7,12-triokso derivata ŽK.

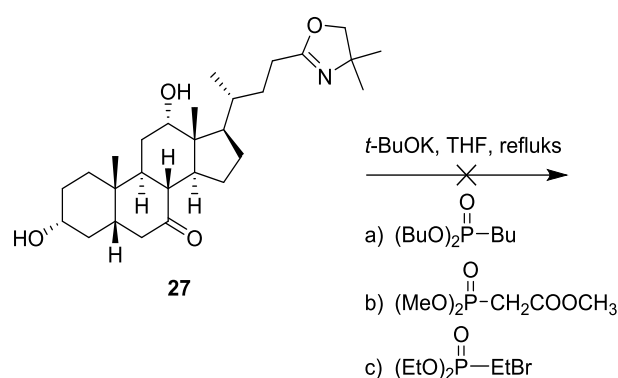
Da bi se postigao Bürgi-Dunitz-ov ugao napada nukleofila, zbog sternih razloga ilid može da napadne C-7 keto grupom samo sa  $\beta$  strane steroidnog skeleta. Ovo rezultuje uvijenim cikličnim prelaznim stanjem oksofosfetana sa minimalnim repulzivnim interakcijama što vodi do proizvoda *E* konfiguracije. Drugim rečima, stereoselektivnost Wittig-ove reakcije na karbonilnu grupu u položaju C-7 je uslovljena relativnom blizinom steroidnog D prstena. Formiranje, hipotetičkog, *Z* olefina bi bilo oteženo zbog preklapanja van der Waals-ovih radijusa etilidenske metil grupe i C-15 metilenske grupe. Kod *E* proizvoda nema preklapanja van der Waals-ovih radijusa etilidenske metil grupe i C-6 metilenske grupe.

Regioselektivnost kod 7,12-diokso derivata **12** i **31** se objašnjava sternim smetnjama bočnog niza na C-17. Kao i kod 7-keto derivata, prilaz nukleofila C-12 keto grupi moguć je samo sa  $\beta$  strane steroidnog skeleta, međutim ta površina je manja u odnosu na keto grupu u položaju C-7 zbog C-18 angularne metil grupe. Dodatni otežavajući sterni faktor je blizina bočnog niza na C-17 koji može da blokira preostalu prilaznu površinu nukleofila.

Kako se karbonilna grupa u položaju C-3 nalazi u pravcu  $C_2$  ose simetrije i može se posmatrati kao simetričan keton, verovatnoća formiranja *E* ili *Z* izomera je ista, što potvrđuju i eksperimenti u kojima se dobija ekvimolarna smeša oba izomera.

### 3.6. Ispitivanje reaktivnosti derivata žučnih kiselina u uslovima HWE reakcija

Pored navedenih Wittig-ovih reakcija, u kojima su steroidni ketoni podvrgnuti reakcijama sa fosforanima, pokušane su i Horner–Wadsworth–Emmons-ove (HWE) reakcije, u kojima je fosfonatni ilid reaktivna vrsta. Reakcije 7-keto oksazolina **27** su rađene sa tri HWE reagensa: dibutil-butilfosfonatom, trimetilfosfonoacetatom i dietil-2-brometilfosfonatom (*Shemi 3.25.*). Sve tri reakcije su rađene na tački ključanja tetrahidrofurana, a kao baza je korišćen *t*-BuOK. Međutim, ni jedna reakcija nije vodila do formiranja proizvoda.



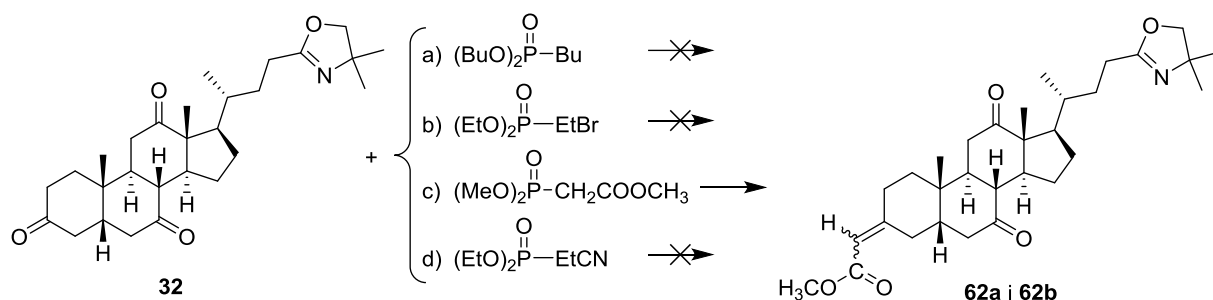
*Shema 3.25.*

7,12-Diketo oksazolin **31** je bio podvrgnut delovanju dibutil-butilfosfonata u prisustvu *t*-BuOK u THF. Reakcije su probane na dve temperature:  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  i temperaturi ključanja reakcione smeše. Međutim, pri ovim reakcionim uslovima nije dolazilo do reakcija.

3,7,12-Triketo derivat **32** je podvrgnut reakcijama sa četiri HWE reagensa (*Shema 3.26.*). Pored tri gore pomenuta reagensa, reakcija je probana i sa dietil-(2-cijanoetil)fosfonatom. Sve reakcije su rađene na tački ključanja THF-a. Sa dibutil-butilfosfonatom reakcija je rađena i na  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , a sa dietil-(2-cijanoetil)fosfonatom na  $-19\text{ }^\circ\text{C}$ . U svim slučajevima *t*-BuOK je korišćen kao baza. Od primenjena četiri HWE reagensa, jedino je trimetilfosfonoacetat reagovao, pri čemu je dobijena smeša *E* i *Z* izomera, **62a** i **62b**. Diastereoizomeri nisu razdvojeni, već je njihova struktura utvrđena NMR, IR i HRMS spektrima.

Signali metil grupe na 3.66 ppm i CH grupe na 5.59 i 5.62 ppm u  $^1\text{H}$  NMR spektru smeše **62a** i **62b** potiču od novouvedene metoksi-2-oksoetilidenske grupe. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru signali iste grupe se nalaze na hemijskim pomeranjima od 113.91 ppm (CH), 160.20 i 160.26 ppm (C-3) i 166.69 i 166.76 ppm (C=O). Dodatnu potvrdu strukture daje maseni spektar visoke rezolucije pikom na 512.33595 *m/z*, koji odgovara  $[\text{M}+\text{H}]^+$  fragmentu (izračunato *m/z* 512.33705).

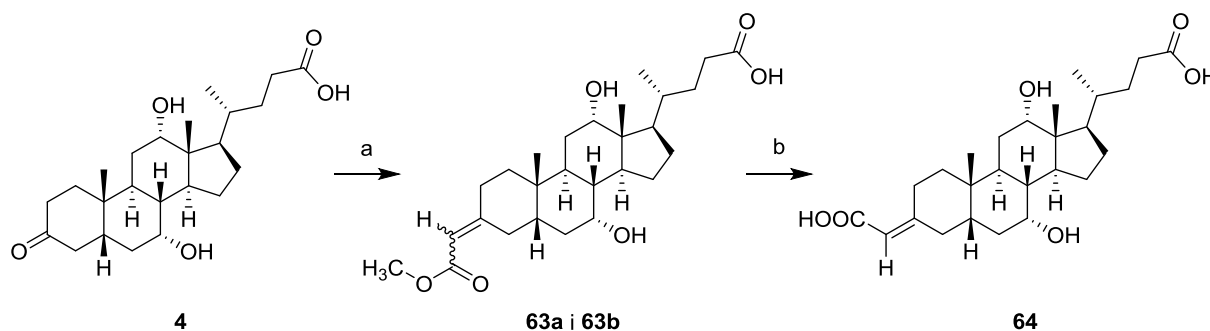




Shema 3.26. (a) *t*-BuOK, THF,  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  ili refluks; (b) *t*-BuOK, THF, refluks; (c) *t*-BuOK, THF, refluks, 55%; (d) *t*-BuOK, THF,  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$  ili refluks.

Kako je već kod Wittig-ovih reakcija objašnjeno da je keto grupa u položaju C-3 najreaktivnija, nije iznenađujuće da je kod upotrebe HWE reagenasa upravo ona bila jedino reaktivna. Moguće je da dodatna stabilizacija rezonancijom sa estarskom funkcijom trimetilfosfonoacetata čini ovaj ilid manje baznim, pa lakše dolazi do nukleofilnog napada od građenja enolata. Drugim korišćenim HWE reagensima nedostaje ova vrsta stabilizacije.

Reakcijom 3-keto kiseline **4** sa trimetilfosfonoacetatom, u prisustvu *t*-BuOK i THF kao rastvarača, na temperaturi ključanja reakcione smeše, u toku 50 minuta dobijena je *E* i *Z* smeša **63a** i **63b** koja je nakon saponifikacije sa KOH u metanolu i kisele obrade dala samo *E*-dikiselinu **64** (Shema 3.27.).



Shema 3.27. (a) trimetilfosfonoacetat, *t*-BuOK, anh. THF, refluks, 50 min, 36%; (b) i) KOH, MeOH, refluks 1 h; ii)  $\text{H}_2\text{O}$ , HCl, st, 10 min, 72%.

Struktura diastereoizomerne smeše **63a** i **63b** je utvrđena na osnovu analize NMR spektara. Signal estarske metil grupe metoksi-oksoetilidenskog ostatka **63a** i **63b** ima hemijsko pomeranje od  $\delta_{\text{H}}$  3.69 ppm i  $\delta_{\text{C}}$  50.78 i 50.79 ppm. Signali na 5.59 ppm ( $^1\text{H}$  NMR) i na 111.49 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR) potiču od CH grupe. Dokaz da se u reakciji dobija smeša geometrijskih izomera, **63a** i **63b**, je pojava dupliranih signala u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru [50.78 i 50.79 (MeO), 68.44 i 68.47 (C-7), 72.92 i 73.11 (C-12), 167.44 i 167.48 (CO iz metoksi-2-oksoetilidena)].

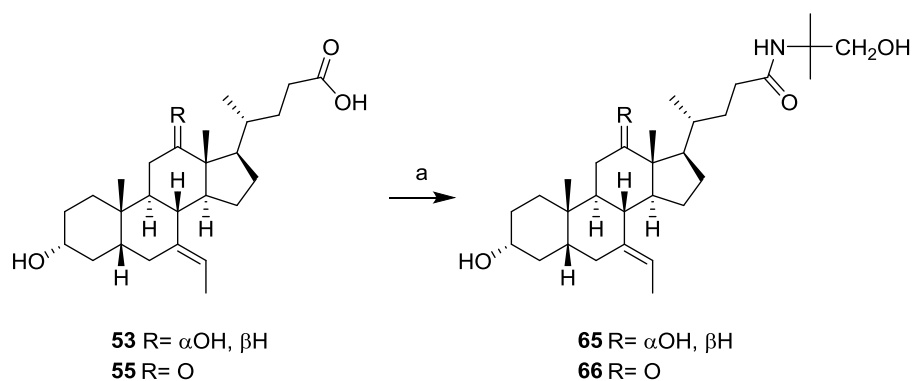
U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru dikiseline **64** nema dupliranih signala kao što je to bio slučaj kod estra **63** što govori da je tokom saponifikacije došlo do izomerizacije na dvostrukoj vezi i nastajanja samo jednog izomera. U protonskom NMR spektru jedinjenja **64** signal CH iz karboksimetilenske grupe se nalazi na 5.40 ppm. NOE interakcija CH iz karboksimetilenske grupe i  $\text{CH}_2$  grupe na C-4 dokazuje da olefin poseduje *E* stereochemiju. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisutna su dva signala karboksilnih ugljenika: na 173.34 ppm od karboksimetilenske grupe i na 175.45 ppm od C-24, dok se signal CH iz karboksimetilenske grupe nalazi na 132.19 ppm, a C-3 na 127.99 ppm.

Maseni spektri visoke rezolucije potvrđuju molekulske formule jedinjenja **63** i **64**, i to kod jedinjenja **63** pikom na 501.26142  $m/z$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  (izračunato  $m/z$  501.26130), a kod jedinjenja **64** pikom na 561.26679  $m/z$   $[\text{M}+\text{CF}_3\text{COO}]^-$  (izračunato  $m/z$  561.26808).

Nastanak samo jednog izomera jedinjenja **64** prilikom hidrolize smeše **63a** i **63b** može se objasniti kiselo katalizovanom izomerizacijom prilikom obrade reakcione smeše nakon bazne hidrolize.

### 3.7. Sinteza odabranih 24-amidnih derivata žučnih kiselina

Kako bi se ispitao uticaj različito supstituisanog C-17 bočnog niza na biološku aktivnost, sintetizovani su i amidi **65-68**. Pomenuti amidi su dobijeni reakcijom etilidenskih derivata **53** i **55** sa 2-amino-2-metilpropanolom i EEDQ u prisustvu  $\text{Et}_3\text{N}$  u etil-acetatu (*Shema 3.28*). Reakcije su rađene na tački ključanja reakcione smeše u toku 5 h. Amid **65** je dobijen u prinosu od 76%, dok je prinos jedinjenja **66** bio 62%.

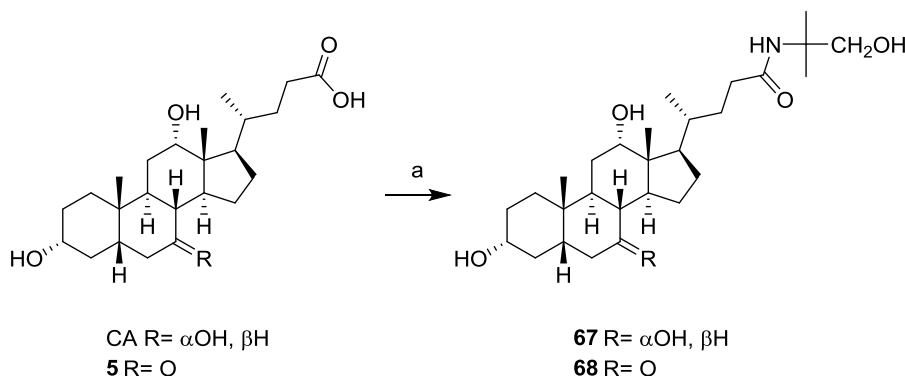


*Shema 3.28.* (a) 2-amino-2-metilpropanol, EEDQ, TEA, EtOAc, refluks, 5 h, 76% **65**, 62% **66**.

Pored odgovarajućih masenih spektara visoke rezolucije ( $[\text{M}+\text{K}]^+$  nađeno 528.34503, izračunato  $m/z$  528.34497, za **65** i  $[\text{M}+\text{H}]^+$  nađeno 488.3732, izračunato  $m/z$  488.37344, za **66**), strukturu dobijenih amida potvrđuju i NMR spektri. Karakteristični signali u  $^1\text{H}$  NMR spektrima su singleti (1.24 ppm za **65** i 1.23 ppm za **66**) od dve metil grupe amidnog ostatka, singleti od metilenske grupe (3.47 ppm za **65** i 3.48 ppm za **66**) i singleti vodonika sekundarnog amida (7.23 ppm **65** i 6.08 ppm za **66**). U  $^{13}\text{C}$  NMR

spektru signal koji potvrđuje prisustvo amida u jedinjenju **65** nalazi se na 174.49 ppm, dok se kod jedinjenja **66** taj signal nalazi na 174.64 ppm.

Koristeći sličnu proceduru kao kod dobijanja amida **65** i **66** sintetisani su i amidi CA i 7-okso-deoksiholne kiseline (**5**) (Shema 3.29.). Odgovarajući amidi su dobijeni u prinosima od 71% i 47% respektivno.



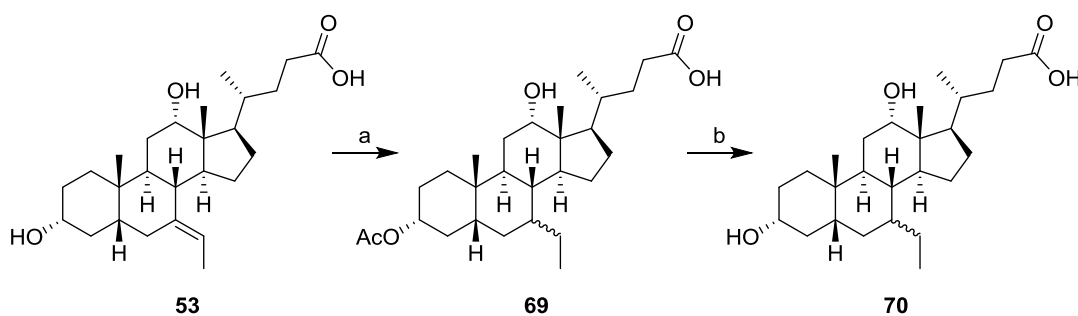
Shema 3.29. (a) 2-amino-2-metilpropanol, EEDQ, TEA, EtOAc, refluks; MeOH, 6 h za CA, 71%; H<sub>2</sub>O, 8 h za **5**, 47%.

U <sup>1</sup>H NMR spektrima jedinjenja **67** i **68** singletni signali na 1.16 ppm (za **67**) i 1.14 ppm (za **68**), potiču od dveju metil grupa amidnog ostatka. Tripletne signali na 4.90 ppm (za **67**) i na 4.91 ppm (za **68**) potiču od OH grupe amidnog ostatka, dok signali na 7.23 ppm (za **67**) i 7.24 ppm (za **68**) potiču od vodonika vezanog za azot. I <sup>13</sup>C NMR spektri pomenutih jedinjenja potvrđuju njihovu strukturu signalima na 24.19 (2×CH<sub>3</sub> amidnog ostatka), 173.38 (C-24) za **67** i 23.71 (2× CH<sub>3</sub> amidnog ostatka) i 172.90 (C-90) za **68**.

### 3.8. Hidrogenacija odabranih derivata žučnih kiselina

Kod 7-etiliden derivata **53** i  $\Delta^6$ -7-butil derivata **49** katalitičkom hidrogenacijom su redukovane dvostruke veze u cilju dobijanja odgovarajućeg 7-etil, tj. 7-butil derivata. Hidrogenacije su rađene pri atmosferskom pritisku vodonika, na sobnoj temperaturi, u prisustvu Adams-ovog katalizatora.

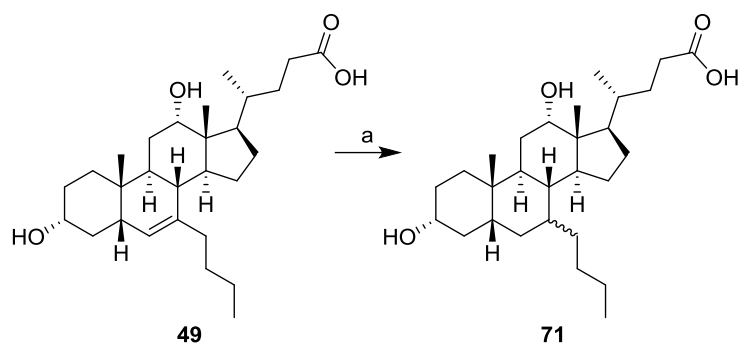
U slučaju etilidenskog derivata **53**, kao rastvarač je upotrebljena glacijalna sirćetna kiselina, uz dodatak katalitičkih količina konc. HCl (*Shema 3.30.*).<sup>227</sup> Reakcija je rađena na sobnoj temperaturi u toku 4 h. Pri ovim reakcionim uslovima je pored hidrogenacije dvostruke veze došlo i do acetilovanja hidroksilne grupe u položaju C-3, pri čemu je dobijeno jedinjenje **69** u prinosu od 73%. Kako bi se uklonila acetoksi grupa u sledećoj fazi je jedinjenje **69** podvrgnuto baznoj hidrolizi. Dobijena je 7-etil-deoksiholna kiselina (**70**) u prinosu od 98%. U <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **69** zapaža se odsustvo signala na 5.23 ppm koji potiče od vinilnog vodonika etilidenske grupe prisutne kod **53**, dok u <sup>13</sup>C NMR spektru izostaju signali ugljenikovih atoma egzociklične dvostruke veze. Prisustvo acetoksi grupe u položaju C-3 kod jedinjenja **69** dokazuju signali na 2.02 ppm u <sup>1</sup>H NMR spektru i 170.78 ppm u <sup>13</sup>C NMR spektru. Ovi signali izostaju u <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektrima jedinjenja **70**.



*Shema 3.30.* (a) AcOH, HCl, PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, 1 atm, st, 4 h, 73%; (b) KOH, MeOH, refluks, 1 h, 98%.

U reakciji hidrogenacije nastao je samo jedan od dva diastereoizomera što govori o stereoselektivnosti ove reakcije. Konfiguracija na ugljeniku C-7 za sada nije određena zbog značajnog preklapanja signala u NMR spektrima.

Hidrogenacija  $\Delta^6$  dvostruke veze butil derivata **49** je rađena u metanolu i trajala je 7 dana (*Shema 3.31.*). Dobijen je 7-butil derivat **71** u prinosu od 42%. Na osnovu <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara je utvrđeno da je reakcija tekla stereoselektivno, jer je dobijen samo jedan stereoizomer. Međutim konfiguracija na novonastalom hiralnem centru za sada nije utvrđena. Naime, u <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **71** zbog male razlike u hemijskim pomeranjima signala vodonika u okruženju butil niza, nije bilo moguće NMR metodama odrediti konfiguraciju na C-7. Da je došlo do zasićenja  $\Delta^6$  dvostruke veze vidi se po izostanku signala na 5.39 ppm u <sup>1</sup>H NMR spektru, kao i signala na 127.25 ppm i 139.46 ppm u <sup>13</sup>C NMR spektru jedinjenja **71**, koji kod polaznog jedinjenja **49** potiču od H-6, tj. C-6 i C-7, respektivno.



Shema 3.31. (a) MeOH, PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, 1 atm, st, 7 dana, 42%.

Pored navedenih, probane su i reakcije hidrogenizacije pri drugačijim reakcionim uslovima. Tako je hidrogenacija **53** probana na atmosferskom pritisku vodonika, sa Pd/C kao katalizatorom pri sledećim uslovima: MeOH, sobna temperatura, 2 h; MeOH, sobna temperatura, šest dana; MeOH, refluks, 7.5 h; EtOAc, sobna temperatura, 17 h; EtOAc, 60 °C, 8 h; EtOH, sobna temperatura, 24 h. Pokušana je i hidrogenizacija smeše alkena **49** i **50** sa Adamsovim katalizatorom, pri pritisku vodonika od jedne atmosfere i: AcOH i HCl, sobna temperatura, u toku 1 h i u toku 12 dana; EtOAc i MeOH, sobna temperatura, u toku pet dana; MeOH, sobna temperatura, uz ultrazvuke u toku 3 h i mešanje u toku 48 h. Hidrogenizacija smeše **49** i **50** je isproba sa Adamsovim katalizatorom u dioksanu pod pritiskom vodonika od pet bara u toku 24 h. Međutim, ni u jednoj od pomenutih reakcija nije dolazilo do redukcije dvostruke veze.

### 3.9. Ispitivanje biološke aktivnosti odabranih sintetizovanih jedinjenja

U završnoj fazi rada ispitana je antitumorska i antimikrobna aktivnost odabranih sintetizovanih derivata žučnih kiselina.

#### 3.9.1. Ispitivanje antitumorske aktivnosti odabranih derivata žučnih kiselina

Imajući uvid u pleiotropnu aktivnost ŽK i njihov uticaj na vijabilnost ćelija može se zaključiti da su ŽK važna polazna tačka u sintezi novih selektivnih citotoksičnih agenasa. Odabranim jedinjenjima iz ovog rada je ispitana aktivnost prema pet tumorskih ćelijskih linija: estrogen receptor pozitivan adenokarcinom dojke – MCF-7, estrogen receptor negativan adenokarcinom dojke – MDA-MB-231, androgen receptor negativan karcinom prostate – PC3, karcinom grlića materice – HeLa i karcinom debelog creva – HT-29. Pored tumorskih ćelija, ispitana je i antiproliferativna aktivnost sintetizovanih derivata i prema normalnim ćelijama fetalnih fibroblasta pluća – MRC-5.

Citotoksičnost se kvantitativno izražava kao  $IC_{50}$  vrednost, koja predstavlja koncentraciju ispitivane supstance pri kojoj se broj tretiranih ćelija smanjuje za polovinu u odnosu na kontrolu. Prema opšte prihvaćenim kriterijumima, neko jedinjenje pokazuje zadovoljavajuću antiproliferativnu aktivnost ukoliko je njegova  $IC_{50}$  vrednost niža od 20  $\mu M$ . Ako je  $IC_{50}$  u intervalu 20–100  $\mu M$  supstanca pokazuje umerenu, odnosno slabu aktivnost, dok se jedinjenja čija vrednost  $IC_{50}$  prelazi 100  $\mu M$  smatraju neaktivnim.

Citotoksičnost je određena *in vitro* kolorimetrijskim MTT testom.<sup>228</sup> Test se zasniva na spektrofotometrijskoj detekciji živih ćelija u proliferaciji koje, za razliku od mrtvih ili ćelija u mirovanju, imaju aktivan enzim koji redukuje žutu tetrazolijumovu so (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum-bromid, MTT) do ljubičasto obojenog formazana. Količina nastalog formazana je direktno srazmerna broju živih ćelija. Apsorbanca je određena na test talasnoj dužini (540 nm) i referentnoj talasnoj dužini (690 nm). Eksperimenti su izvedeni tako što su kulture ćelija izlagane dejstvu rastućih koncentracija ispitivanih jedinjenja u toku 72 h. Kao referentno jedinjenje upotrebljen je komercijalni antitumorski agens doksorubicin (DOX).

Rezultati navedenih ispitivanja su prikazani u *Tabeli 3.1*. Kao što se iz tabele može videti, od svih testiranih jedinjenja samo su 7-etiliden **54** ( $IC_{50}$  14.31  $\mu M$ ), 7,12-diokso amid **29** ( $IC_{50}$  16.46  $\mu M$ ) i oksazolin **27** ( $IC_{50}$  22.52  $\mu M$ ) pokazali zadovoljavajuću do umerenu antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskoj liniji estrogen receptor pozitivnog adenokarcinoma dojke (MCF-7). Jedinjenja sa etilidenskom grupom u položaju C-7 i keto grupom na C-12 ugljeniku sa različitim supstituentima u bočnom nizu [kiselina **55** ( $IC_{50}$  1.07  $\mu M$ ), amid **66** ( $IC_{50}$  1.79  $\mu M$ ) i oksazolin **56** ( $IC_{50}$  5.85  $\mu M$ )] su pokazala veoma potentnu antiproliferativnu aktivnost prema MDA-MB-231 ćelijskoj liniji, dok je dehidroholna kiselina (**13**) pokazala zadovoljavajuću aktivnost prema pomenutoj ćelijskoj liniji ( $IC_{50}$  12.18  $\mu M$ ). Zadovoljavajuću antiproliferativnu aktivnost prema androgen receptor negativnom karcinomu prostate (PC3) pokazalo je osam jedinjenja [**68** ( $IC_{50}$  6.99  $\mu M$ ), **29** ( $IC_{50}$  8.58  $\mu M$ ), **65** ( $IC_{50}$  10.07  $\mu M$ ), **31** ( $IC_{50}$  10.62  $\mu M$ ), **27** ( $IC_{50}$  11.68  $\mu M$ ), **66** ( $IC_{50}$  11.90  $\mu M$ ), **56** ( $IC_{50}$  20.48  $\mu M$ ) i **61** ( $IC_{50}$  20.70  $\mu M$ )] dok su

oksazolin **25** ( $IC_{50}$  26.77  $\mu$ M), i amid **30** ( $IC_{50}$  41.87  $\mu$ M), pokazali umerenu aktivnost. Najveću citotoksičnu aktivnost pokazali su amidi **68** i **29**, koji su 12 i 10 puta aktivniji od DOX ( $IC_{50}$  84.23  $\mu$ M) i CA ( $IC_{50}$  88.46  $\mu$ M). Amidi **30**, **65** i **66**, oksazolini **25**, **27**, **31** i **56** i kiselina **61**, su pokazali 2–9 puta veću aktivnost od DOX i CA. Prema HeLa ćelijama jedinjenja **27** ( $IC_{50}$  10.00  $\mu$ M), **31** ( $IC_{50}$  12.89  $\mu$ M) i **56** ( $IC_{50}$  17.15  $\mu$ M) su pokazala zadovoljavajuću antitumorsku aktivnost i bila su 2–3 puta aktivnija od CA ( $IC_{50}$  29.24  $\mu$ M), dok su amid **66** i kiselina **61** sa C-7 etilidenskom funkcijom pokazala snažnu antitumorsku aktivnost sa  $IC_{50}$  vrednostima od 4.07 i 5.19  $\mu$ M, respektivno. Četiri testirana jedinjenja su pokazala slabu antitumorsku aktivnost prema ćelijama karcinoma debelog creva (HT-29) [**55** ( $IC_{50}$  43.91  $\mu$ M), **67** ( $IC_{50}$  43.59  $\mu$ M), **12** ( $IC_{50}$  63.76  $\mu$ M), **27** ( $IC_{50}$  66.87  $\mu$ M)]. Važno je napomenuti da je većina testiranih jedinjenja bila potpuno neaktivna prema normalnim ćelijama fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5), sa izuzetkom **66** i **56** koja su pokazivala slabu citotoksičnost ( $IC_{50}$  30.08 i 32.8  $\mu$ M, respektivno).

Tabela 3.1. Antitumorska aktivnost odabranih derivata žučnih kiselina.

Jedinjenje	$IC_{50}$ ( $\mu$ M), 72 h					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC3	HeLa	HT-29	MRC-5
CA	*	*	88.46	29.24	*	*
<b>5</b>	*	*	*	*	*	*
<b>12</b>	*	*	*	*	63.76	*
<b>13</b>	*	12.18	*	*	*	*
<b>25</b>	82.04	*	26.77	*	*	*
<b>27</b>	22.52	*	11.68	<b>10.00</b>	66.87	*
<b>29</b>	16.46	*	<b>8.58</b>	*	*	*
<b>30</b>	*	*	41.87	*	*	*
<b>31</b>	78.92	*	10.62	12.89	*	*
<b>32</b>	*	*	*	*	*	*
<b>53</b>	84.06	*	*	*	*	*
<b>54</b>	14.31	84.22	*	*	*	*
<b>55</b>	72.15	<b>1.07</b>	*	*	43.91	*
<b>56</b>	85.65	<b>5.85</b>	20.48	17.15	*	32.80
<b>61</b>	*	*	20.70	<b>5.19</b>	*	*
<b>65</b>	*	43.63	10.07	*	*	*
<b>66</b>	63.81	<b>1.79</b>	11.90	<b>4.07</b>	*	30.08
<b>67</b>	*	*	*	*	43.59	*
<b>68</b>	*	*	<b>6.99</b>	*	*	*
DOX	0.20	0.09	84.23	0.07	0.15	0.10

\* $IC_{50}$ >100  $\mu$ M

Analizom podataka iz *Tabele 3.1.* mogu se primetiti zanimljivi struktura-aktivnost odnosi. Naime jedinjenja sa etilidenskom grupom u položaju C-7 i keto grupom u položaju C-12 su aktivnija od jedinjenja koja poseduju samo etilidensku grupu na C-7 ili samo karbonilnu grupu na C-12. Takođe, zamena karboksilne grupe amidnom ili oksazolinskom funkcijom povoljno utiče na aktivnosti. Ovi rezultati bi bili od velike važnosti prilikom dizajna novih antiproliferativnih agenasa baziranih na žučnim kiselinama.

### 3.10. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti derivata žučnih kiselina

Odabranim derivatima ŽK je određena antimikrobna aktivnost prema četiri soja bakterija od kojih su dve Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) i dve Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*).

Antimikrobna aktivnost je određena disk-difuzionom metodom (Kirby-Bauer metodom).<sup>229</sup> U ovoj metodi se papirni diskovi prečnika 6 mm natopljeni sa 15 µL rastvorakoncentracije 10 mg/mL ispitivanog jedinjenja postavljaju na površinu MH (Mueller-Hinton) agara (HiMedia, Mumbai, India) koja je prethodno inokulisana definisanim brojem bakterija. U toku inkubacije 24 h i na odgovarajućoj temperaturi (37 °C za *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* i 30 °C za *B. cereus*) rastvor jedinjenja difunduje u agar podlogu i eventualno inhibira ili ubija bakterije u tom delu prostora. Zona u kojoj nema bakterijskih kolonija, odnosno zona inhibicije, se jasno razlikuje na osnovu odsustva bakterijskog rasta, a antimikrobna aktivnost se kvantitativno izražava u mm prečnika zone inhibicije. Prilikom ovih testova, radi upoređivanja, stavlja se i dodatni disk sa odgovarajućim, komercijalnim, antibiotikom. Rezultati antimikrobne aktivnosti su predstavljeni u *Tabeli 3.2, 3.3 i 3.4* zavisno od rastvarača u kom su testirana jedinjenja rastvorena.

*Tabela 3.2* Antimikrobna aktivnost odabranih jedinjenja rastvorenih u smeši DMSO:H<sub>2</sub>O=8:2.

Jedinjenje	Prečnik zone inhibicije u mm za određenu bakteriju			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
<b>CA</b>	12.34	10.33	10.33	-
<b>5</b>	-	9.33	-	-
<b>27</b>	13.25	12.60	11.00	10.00
<b>53</b>	-	13.00	25.67	14.67
<b>54</b>	-	-	14.67	13.33
<b>65</b>	-	-	12.00	13.33
<b>67</b>	-	11.00	12.00	28.33
<b>68</b>	-	11.67	-	30.00
Odgovarajući antibiotik*	16.50	25.13	12.67	15.67

\*Odgovarajući antibiotik: CTC40 (cefotaksim 30 µg po disku i klavulanska kiselina 10 µg po disku) za *E. coli*, *S. aureus* i *B. cereus*; 15 µL 1.25 mg/mL rastvora vankomicina i cefsulodina za *P. aeruginosa*.

U *Tabeli 3.2* su prikazani rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti odabranih derivata ŽK koji su mogli da se rastvore u smeši rastvarača DMSO:H<sub>2</sub>O=8:2 koja nije ispoljavala antibakterijsku aktivnost prema test mikroorganizmima. U slučaju bakterije *E. coli* samo su **CA** i oksazolin **27** ispoljili antibakterijsku aktivnost, dok su prema *P. aeruginosa*, antibakterijsku aktivnost ispoljavali **CA**, **68**, **67**, **5**, **27** i **53**. Za bakteriju *B. cereus* jedinjenja **68** i **5** nisu bila aktivna dok su ostala ispitivana jedinjenja pokazivala antimikrobnu aktivnost, s tim da je etilidenski derivat **53** pokazivao dva puta veću aktivnost



u odnosu na odgovarajući antibiotik. Amidi **68** i **67** su ispoljavali skoro duplo veću antibakterijsku aktivnost prema soju *S. aureus* u odnosu na odgovarajući antibiotik.

Jedinjenja rastvorena u smeši DMSO:H<sub>2</sub>O=95:5 (Tabela 3.3.) nisu pokazivala značajnu antibakterijsku aktivnost, osim mono- i diokso etilidena **55** i **61**, respektivno, koji su bili skoro dva puta više aktivniji u odnosu na odgovarajući antibiotik prema *B. cereus* bakteriji. Prema *S. aureus* soju tri jedinjenja su imala antibakterijsku aktivnost sličnu primenjenom antibiotiku, a jedno jedinjenje (**30**) je 1.5 puta aktivnije od odgovarajućeg antibiotika.

Tabela 3.3. Antimikrobna aktivnost odabranih jedinjenja rastvorenih u smeši DMSO:H<sub>2</sub>O=95:5.

Jedinjenje	Prečnik zone inhibicije u mm za određenu bakteriju			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
<b>12</b>	-	9.00	-	-
<b>13</b>	12.75	-	-	-
<b>29</b>	-	9.67	-	-
<b>30</b>	-	-	-	26.00
<b>31</b>	-	9.20	-	-
<b>32</b>	-	-	-	-
<b>55</b>	-	9.83	22.23	15.00
<b>56</b>	--	-	10	12.33
<b>61</b>	-	-	18.00	15.67
<b>66</b>	-	-	-	-
DMSO:H <sub>2</sub> O=95:5	-	9.00	-	-
Odgovarajući antibiotik*	16.33	28.73	10.00	16.78

\*Odgovarajući antibiotik: CTC40 (cefotaksim 30 µg po disku i klavulanska kiselina 10 µg po disku) za *E. coli*, *S. aureus* i *B. cereus*; 15 µL 1.25 mg/mL rastvora vankomicina i cefsulodina za *P. aeruginosa*.

Tabela 3.4. Antimikrobna aktivnost jedinjenja rastvorenog u čistom DMSO.

Jedinjenje	Prečnik zone inhibicije u mm za određenu bakteriju			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
<b>25</b>	-	-	13.67	14.00

Rastvor trihidroksi oksazolina **25** u DMSO-u je bio aktivan prema Gram-pozitivnim bakterijama *B. cereus* i *S. aureus* sojevima. Mada su slični prečnici inhibitornih zona, aktivnost prema *B. cereus* se može označiti kao izrazita jer sam rastvarač ne inhibira rast ove bakterije. Nasuprot toga, postoji aktivnost samog rastvarača prema *S. aureus* i zona iznosi 9.00 mm.

Rezultati antimikrobne aktivnosti testiranih derivata ŽK predstavljeni u gore prikazanim tabelama daju legitimitet dodatnim ispitivanjima antimikrobne aktivnosti navedinih jedinjenja kao i sintezi novih potencijalnih antimikrobnih agenasa baziranih na ŽK.

Pored antibakterijske aktivnosti ispitana je i antifungalna aktivnost prema kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, međutim, nijedno od jedinjenja nije pokazivalo aktivnost veću od aktivnosti rastvarača u kom su bili rastvoreni.

## 4. Eksperimentalni deo

**Opšte metode:** NMR spektri su snimljeni na instrumentima: BRUKER AC-250 E, BRUKER Avance III HD 400 i 500 a hemijska pomeranja ( $\delta$  skala) su izražena u ppm, uz tetrametilsilan (TMS) kao interni standard. Protonski NMR spektri su asignirani metodom *homo*-dekuplovanja ili 2D COSY tehnikom.  $^{13}\text{C}$  NMR spektri su asignirani metodom selektivnog dekuplovanja. IR spektri su snimljeni na FT spektrofotometru Thermo Scientific Thermo Nicolet NEXUS 670 FTIR i Perkin Elmer Spectrum Two, a položaj traka je dat u  $\text{cm}^{-1}$ . Maseni spektar visoke rezolucije (HRMS) je snimljen na aparatu Agilent 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. Fleš hromatografija je uradjena na kolonama Kieselgel 60 (0.040–0.063, E. Merck). Tok reakcije je praćen tankoslojnom hromatografijom na aluminijumskim folijama Kieselgel 60 F254 (Merck). Hromatogrami su izazivani sa 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , uz naknadno zagrevanje na  $120^\circ\text{C}$ . Rastvori su sušeni sa anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , a rastvarači su uklanjani na rotacionom vakuum uparivaču.

### 4.1. $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Triformiloksi- $5\beta$ -holanska kiselina (1)

Rastvoru holne kiseline (1.17 g, 2.87 mmol) u 98% mravljoj kiselini (5 mL) doda se  $\text{HClO}_4$  (98%, 0.05 mL) i smeša zagreva 30 minuta na  $50\text{--}55^\circ\text{C}$ . Reakciona smeša se potom ohladi na sobnu temperaturu i lagano ukapava acetanhidrid uz hlađenje do pojave veće količine mehurića (2 mL) pa se izlije u vodu (200 mL), pri čemu pada beli talog **1** koji se procedi, ispira vodom do neutralnog pH i suši na vazduhu.  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Triformiloksi- $5\beta$ -holanska kiselina (**1**) se dobija u obliku kristala u prinosu od 1.40 g (99%, t. t.  $201\text{--}203^\circ\text{C}$  nakon prekrystalizacije iz smeše voda-MeOH, lit.<sup>224</sup> t. t.  $202\text{--}204^\circ\text{C}$ ).

### 4.2. $7\alpha,12\alpha$ -Diformiloksi- $3\alpha$ -hidroksi- $5\beta$ -holanska kiselina (2)

Jedinjenje **1** (1.24 g, 2.52 mmol) se rastvori u metanolu zasićenom sa amonijakom (15 mL) i meša na sobnoj temperaturi u toku 1.5 h, nakon čega se smeša izlije u vodu (100 mL) i zakiseli rastvorom HCl (1:1). Nastali talog se procedi, ispira vodom do neutralnog pH i suši na vazduhu. Dobija se jedinjenje **2** kao amorfni kristali u prinosu od 1.12 g (96%).

### 4.3. $7\alpha,12\alpha$ -Diformiloksi- $3$ -okso- $5\beta$ -holanska kiselina (3)

U ohlađen ( $0^\circ\text{C}$ ) rastvor **2** (1.12 g, 2.41 mmol) u acetonu (200 mL) ukapava se Jones-ov reagens (1 g  $\text{CrO}_3$  u 0.9 mL  $\text{ccH}_2\text{SO}_4$  i 3.5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 mL) do pojave stabilne narandžaste boje smeše i meša 20 minuta, nakon čega se višak Jones-ovog reagensa neutrališe dodatkom izopropanola (10 mL) do zelene boje smeše. Sirova reakciona smeša se upari na 10% početne zapremine. Nakon ekstrakcije sa EtOAc ( $3\times 30$  mL) organske faze se suše i upare pri čemu se dobija jedinjenje **3** kao amorfni kristali u prinosu od 0.98 g (88%).

#### 4.4. **7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-3-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (4)**

Jedinjenje **3** (0.98 g, 2.12 mmol) se rastvori u metanolu (50 mL), u rastvor se doda KOH (1.29 g, 23 mmol) i smeša zagreva uz refluks. Nakon 40 minuta smeša se ohladi na sobnu temperaturu, izlije u vodu (200 mL) i potom zakiseli sa HCl (1:1, 5 mL). Nastali talog se filtrira, ispira vodom do neutralne sredine i suši na vazduhu. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (acetone:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:3 uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta), pri čemu se dobija 0.8423 g (81% računato na CA) čistog proizvoda **4** u obliku kristala (t. t. 174 °C nakon prekrizalizacije iz acetona, lit.<sup>217</sup> t. t. 174–175 °C).

#### 4.5. **3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-7-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (5)**

Rastvoru holne kiseline (5.00 g, 12.24 mmol) u 3% NaHCO<sub>3</sub> (100 mL) se doda NBS (3.75 g, 21.09 mmol). Reakciona smeša se meša 20 h na sobnoj temperaturi nakon čega se izlije u ledenu vodu (250 mL) i zakiseli sa HCl (1:1) do pH 1, pri čemu pada beli talog koji se procedi, ispira vodom do pH 7 i suši na vazduhu. Dobija se kiselina **5** u prinosu od 2.97 g (86% u odnosu na izreagovalu CA, t. t. 193–194 °C, nakon prekrizalizacije iz smeše voda-MeOH, lit.<sup>219</sup> t. t. 195–198 °C). Regenerisano je i 3.46 g CA.

#### 4.6. **Metil-holat (6)**

Holna kiselina (1.01 g, 2.47 mmol) se rastvori u MeOH (20 mL) uz dodatak koncentrovane HCl (0.18 mL). Reakciona smeša se zagreva uz refluks u toku 1 h, nakon čega se upari na 1/3 početne zapremine, izlije u vodu (30 mL) i ekstrahuje etil-acetatom (5×10 mL). Organska faza se suši i upari. Dobija se metil-holat (**6**, 1.03 g, 99%), koji se bez prečišćavanja koristi u narednoj fazi.

#### 4.7. **Metil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holat (7)**

Metil-holat (**6**, 1.03 g, 2.44 mmol) se rastvori u smeši CHCl<sub>3</sub> (4 mL), Ac<sub>2</sub>O (1.30 mL) i piridina (0.7 mL). Nakon mešanja na sobnoj temperaturi u toku 24 h reakciona smeša se ispira sa 10% HCl (2×5 mL) i vodom do neutralnog pH. Organski sloj se suši i upari pri čemu se dobija jedinjenje **7** (1.20 g, 97%), koje se bez prečišćavanja koristi u narednoj fazi.

#### 4.8. **Metil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetoksi-12-okso-5 $\beta$ -holat (8)**

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **7** (1.20 g, 2.34 mmol) u acetonu (100 mL) se dodaje Jones-ov reagens (1 g CrO<sub>3</sub> u 0.9 mL cH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 3.5 mL H<sub>2</sub>O, 5 mL) do pojave stabilne narandžaste boje smeše. Nakon mešanja u toku 20 minuta na 0 °C višak Jones-ovog reagensa se neutrališe izopropanolom (10 mL), i smeša upari do suva, pri čemu se dobija jedinjenje **8** (0.86 g, 73%), koje se bez prethodnog prečišćavanja koristi u daljoj fazi.

#### 4.9. **3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-12-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (9)**

Jedinjenje **8** (0.86 g, 1.70 mmol) se rastvori u 10% metanolnom rastvoru KOH (70 mL). Smeša se zagreva uz refluks u toku 3 h, nakon čega se izlije u vodu (100 mL) i zakiseli sa HCl (1:1) do pH 1. Nastali talog

se procedi, ispere vodom do neutralne sredine, suši i prečisti fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:1, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta), pri čemu se dobija kiselina **9**, u prinosu od 0.4871 g (49% računato u odnosu na CA; t. t. 218 °C, nakon prekrizalizacije iz acetona, lit.<sup>220</sup> t. t. 219–221 °C).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3422, 2933, 2881, 1700.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.76 (d, *J*=5.6, 3H, H-21), 0.94 (s, 3H, H-19), 0.97 (s, 3H, H-18), 3.18 (bs, 1H, H-3), 3.72 (bs, 1H, H-7), 4.34 – 4.36 (2H, 2OH na C-3 i C-7), 11.96 (bs, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 11.66 (C-18), 19.03 (C-21), 22.48 (C-19), 23.73, 27.54, 30.82, 30.85, 31.58, 35.10, 35.56, 35.63, 35.95 (C-10), 37.12, 37.90, 39.33, 40.02, 41.37, 46.64, 53.89, 56.77 (C-13), 66.49 (C-7), 70.43 (C-3), 175.28 (C-24), 214.47 (C-12).

#### 4.10. 3α-Hidroksi-7,12-diokso-5β-holanska kiselina (12)

Holna kiselina (5.0 g, 12.2 mmol) se rastvori u butil-acetatu (150 mL), doda se voda (1.5 mL) i PTSA (0.5 g, 2.9 mmol) i zagreva uz refluks u toku 5 h. Reakciona smeša se potom ohladi na sobnu temperaturu i upari do ulja. Dobijeno sirovo jedinjenje **10** se rastvori u *t*-BuOH (100 mL), a zatim doda NBS (6.50 g, 36.5 mmol). Smeša se meša u toku 2 h na sobnoj temperaturi, pri čemu nastaje jedinjenje **11**. U reakcionu smešu se zatim doda KOH (5.73 g, 102.1 mmol) i zagreva uz refluks u toku 5 h. Reakciona smeša se upari do polovine zapremine, izlije u vodu (300 mL) i zakiseli sa HCl (1:1) do pH 1, pri čemu pada beli talog sirovog jedinjenja **12**, koji se filtrira, suši i prečisti fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:3, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta). Dobija se čisto jedinjenje **12**, u prinosu od 3.53 g (71% računato u odnosu na holnu kiselinu; t. t. 188–189 °C, nakon prekrizalizacije iz acetona, lit.<sup>219</sup> t. t. 188–190 °C).

#### 4.11. 7α,12α-Diformiloksi-3-okso-5β-holanska kiselina (14)

Rastvoru jedinjenja **4** (0.7440 g, 1.83 mmol) u mravljoj kiselini (5.3 mL) doda se HClO<sub>4</sub> (0.05 mL) i smeša zagreva 100 minuta na 50–55 °C. Reakciona smeša se potom ohladi na sobnu temperaturu i lagano ukapava acetanhidrid (2 mL) uz hlađenje do pojave veće količine mehurića nakon čega se izlije u vodu (200 mL), pri čemu pada beli talog **14** koji se procedi, ispira vodom do neutralnog pH i suši na vazduhu. Jedinjenje **14** se dobija u prinosu od 0.8105 g (96%, u obliku belih kristala, t. t. 160 °C, nakon prekrizalizacije iz smeše voda-MeOH, lit.<sup>217</sup> t. t. 160–162 °C).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.82 (s, 3H, H-18), 0.88 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, H-21), 1.06 (s, 3H, H-19), 5.17–5.18 (m, 1H, H-7), 5.32–5.33 (m, 1H, H-12), 8.11 (s, 1H, CHO), 8.17 (s, 1H, CHO).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 12.21 (C-18), 17.47, 21.57, 22.79, 25.90, 27.14, 29.55, 30.40, 30.73, 31.06, 34.45, 34.72, 36.16, 36.53, 37.77, 42.17, 42.90, 44.56, 45.09, 47.24, 70.59 (C-7), 75.14 (C-12), 160.36 (CHO), 160.46 (CHO), 179.11 (C-24), 211.75 (C-3).

#### 4.12. 3α,12α-Diformiloksi-7-okso-5β-holanska kiselina (15)

Rastvoru jedinjenja **5** (0.4875g, 1.20 mmol) u mravljoj kiselini (3.5 mL) doda se HClO<sub>4</sub> (0.02 mL) i smeša zagreva na 50–55 °C u toku 1.5 h. Reakciona smeša se potom ohladi na sobnu temperaturu i lagano

ukapava acetanhidrid (1 mL) do pojave veće količine mehurića nakon čega se izlije u vodu (50 mL), pri čemu pada beli talog koji se procedi, ispere vodom do neutralnog pH i osuši na vazduhu. Dobija se jedinjenje **15** u prinosu od 0.4508 g (82%) u obliku belih kristal, koji se nakon prekrizalizacije iz smeše voda-MeOH, tope na 207–209 °C, lit.<sup>211</sup> t. t. 208–211 °C.

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3436, 2937, 1714, 1181.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.76 (s, 3H, H-18), 0.86 (d, 3H, *J*= 5.92 Hz, H-21), 1.22 (s, 3H, H-19), 4.81 (m, 1H, H-3), 5.28 (s, 1H, H-12), 8.00 (s, 1H, CHO na C-3), 8.12 (s, 1H, CHO na C-12).

#### 4.13. 3α,7α-Diformiloksi-12-okso-5β-holanska kiselina (16)

Rastvoru jedinjenja **9** (0.4871 g, 1.20 mmol) u mravljoj kiselini (3.5 mL) doda se HClO<sub>4</sub> (0.05 mL) i zagreva 1 h na 50–55 °C. Reakciona smeša se potom ohladi na sobnu temperaturu i lagano ukapava acetanhidrid (1 mL) uz hlađenje, do pojave veće količine mehurića, nakon čega se izlije u vodu (100 mL). Beli talog koji se pri tome formira se procedi, ispere vodom do neutralnog pH i suši na vazduhu. Jedinjenje **16** se dobija u prinosu od 0.5301 g (96%).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 2941, 2874, 1717, 1182.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.76 (d, *J*=6.2 Hz, 3H, H-21), 0.99 (s, 3H, H-18) i 1.03 (s, 3H, H-19), 4.60 (m, 1H, H-3), 5.00 (s, 1H, H-7), 8.17 i 8.22 (2s, 2×1H, 2CHO), 11.94 (s, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 11.61 (C-18), 19.00 (C-21), 22.08 (C-19), 23.47, 26.88, 27.33, 30.72, 31.40, 31.46, 34.47, 34.74, 35.41, 35.53, 37.12, 37.65, 37.76, 40.13, 46.55, 53.14, 56.89, 70.64 (C-7), 73.41 (C-3), 162.14 (2CHO), 175.25 (C-24), 213.48 (C-12).

#### 4.14. 2-(3α,7α,12α-Triformiloksi-5β-holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (17)

Rastvoru jedinjenja **1** (1.3970 g, 2.84 mmol) u EtOAc (28 mL) doda se TEA (0.6 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.5 mL, 5.13 mmol) i EEDQ (1.16 g, 4.69 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 5 h nakon čega se prenese u levak za odvajanje i ispere sa HCl (10%, 1×6 mL), H<sub>2</sub>O (1×6 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4×6 mL) i vodom do pH 7. Organska faza se suši i upari, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=4:1). Jedinjenje **17** se dobija u prinosu od 1.4396 g (90%) u obliku čvrstog ulja.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.70 (s, 3H, H-18), 0.79 (d, *J*=5.3 Hz, 3H, H-21), 0.90 (s, 3H, H-19), 1.22 (s, 6H, 2×CH<sub>3</sub> amida), 3.49 (s, 2H, CH<sub>2</sub> amida), 4.66 (m, 1H, H-3), 5.01 (s, 1H, H-7), 5.21 (s, 1H, H-12), 7.97 (s, 1H, CHO na C-3), 8.05 (s, 1H, CHO na C-7), 8.11 (s, 1H, CHO na C-12).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 11.98, 17.46, 22.16, 22.59, 24.44, 24.49, 25.70, 26.41, 27.02, 29.50, 31.28, 33.73, 34.11, 34.27, 34.34, 37.53, 37.85, 40.62, 42.78, 47.10, 55.83, 60.23, 70.56, 73.60, 74.82, 75.15, 77.20, 160.39 (CHO), 160.45 (2×CHO), 174.24 (C-24).

#### 4.15. 2-(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-3-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (18)

Rastvoru jedinjenja **14** (0.7990 g, 1.73 mmol) u EtOAc (17 mL) doda se TEA (0.35 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.3 mL, 3.08 mmol) i EEDQ (0.74 g, 2.99 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 3 h i potom meša na sobnoj temperaturi 12 h nakon čega se ispere sa HCl (10%, 1×4 mL), H<sub>2</sub>O (1×4 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4×4 mL) i vodom do pH 7. Organska faza se osuši i upari, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=5:1). Jedinjenje **18** se dobija u prinosu od 0.7030 g (76%) u obliku čvrstog ulja.

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3391, 2963, 2919, 1715, 1261, 1095, 1021.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.87 (d,  $J$ =6.5 Hz, 3H, H-21), 1.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.29 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> amida), 3.58 (s, 2H amida), 4.84 (bs, 1H, OH amida), 5.17 (d,  $J$ =2.5 Hz, 1H, H-12), 5.51 (s, 1H, H-7), 8.10 (s, 1H, CHO), 8.17 (s, 1H, CHO).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 12.21, 17.65, 21.56, 22.78, 24.77, 24.85, 25.92, 27.16, 29.55, 31.06, 31.39, 33.95, 34.45, 34.74, 36.16, 36.54, 37.76, 42.17, 42.88, 44.57, 45.11, 47.28, 56.20, 70.60, 70.86, 75.17, 160.33, 160.45, 174.27 (C-24), 211.63 (C-3).

HRMS (TOF)  $m/z$ : C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>7</sub>[M+Na]<sup>+</sup> izračunato 556.32447, nađeno 556.32315.

#### 4.16. 2-(3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-7-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (19)

Rastvoru jedinjenja **15** (2.7609 g, 5.97 mmol) u EtOAc (57 mL) doda se TEA (1.14 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.86 mL, 8.83 mmol) i EEDQ (2.1241 g, 8.59 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 5 h, nakon čega se ispere sa HCl (10%, 1×10 mL), H<sub>2</sub>O (1×10 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4×10 mL) i vodom do pH 7. Organska faza se osuši i upari, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=5:1). Jedinjenje **19** se dobija u prinosu od 2.8668 g (92%) u obliku ulja.

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3378, 2935, 2874, 1713, 1643, 1180.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.75 (s, 3H, H-18), 0.84 (d,  $J$ =6.18 Hz, 3H, H-21), 1.21 (s, 3H, H-19), 1.28 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> amida), 3.57 (s, 2H, CH<sub>2</sub> amida), 4.81 (m, 1H, H-3), 5.27 (s, 1H, H-12), 5.53 (s, 1H, NH), 7.99 (s, 1H, CHO na C-3), 8.11 (s, 1H, CHO na C-12).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 12.47 (C-18), 17.70 (C-21), 22.65 (C-19), 24.74 (CH<sub>3</sub>), 24.82 (CH<sub>3</sub>), 25.88, 27.45, 29.60, 31.46, 32.94, 34.61, 36.54, 37.17, 37.72, 40.41, 41.81, 44.97, 45.55, 45.76, 46.26, 46.52, 48.99, 56.16, 70.82 (CH<sub>2</sub> amida), 72.53 (C-3), 74.58 (C-12), 160.40 (2xCHO), 174.32 (C-24), 210.50 (C-7).

#### 4.17. 2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Diformiloksi-12-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (20)

Rastvoru jedinjenja **16** (0.5301 g, 1.15 mmol) u EtOAc (13 mL) doda se TEA (0.3 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.2 mL, 2.1 mmol), H<sub>2</sub>O (1 mL) i EEDQ (0.42 g, 1.70 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 4 h, nakon čega se ispere sa HCl (10%, 1×4 mL), H<sub>2</sub>O (1×4 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4×4 mL) i vodom do pH 7. Organska faza se osuši i upari, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=8:1). Jedinjenje **20** se dobija u prinosu od 0.3659 g (60%) u obliku čvrstog ulja.

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3393, 2936, 2873, 2249, 1717, 1643, 1184.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.86 (d,  $J=6.3$  Hz, 3H, H-21), 1.04 i 1.06 (2s,  $2\times 3\text{H}$ , H-18 i H-19), 1.29 (s, 6H,  $2\times \text{CH}_3$  amida), 3.57 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  amida), 4.72 (m, 1H, H-3), 5.15 (s, 1H, H-7), 5.56 (s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, CHO), 8.04 (s, 1H, CHO).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 11.50, 18.67, 22.05, 23.66, 24.78, 25.89, 26.46, 27.30, 31.08, 33.49, 34.11, 34.43, 34.71, 35.42, 35.48, 37.49, 37.67, 37.74, 44.98, 49.00, 52.74, 56.19, 56.99, 70.40, 70.87, 72.55, 160.27 (CHO), 160.61 (CHO), 174.47 (C-24), 213.59 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{NO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 534.34253, nađeno 534.34165.

#### 4.18. 2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Triformiloksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (21)

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **17** (1.2318 g, 2.19 mmol) u THF (12 mL) se ukapava sveže predestilisan  $\text{SOCl}_2$  (0.8 mL, 11.03 mmol) u toku 3 minute. Reakciona smeša se meša na 0 °C u toku 1 h. Reakcija se prekida dodavanjem zasićenog rastvora  $\text{NaHCO}_3$  do prestanka izdvajanja  $\text{CO}_2$  (20 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc ( $4\times 20$  mL) organske faze se spoje, suše i upare, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (EtOAc: $\text{CH}_2\text{Cl}_2=5:1$ ). Dobija se jedinjenje **21** kao čvrsto ulje u prinosu od 1.1375 g (95%).

#### 4.19. 2-(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-3-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (22)

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **18** (0.1680 g, 0.31 mmol) u THF (3 mL) se ukapava sveže predestilisan  $\text{SOCl}_2$  (0.1 mL, 1.37 mmol). Reakciona smeša se meša na 0 °C u toku 1 h. Reakcija se prekida dodavanjem zasićenog rastvora  $\text{NaHCO}_3$  do prestanka izdvajanja  $\text{CO}_2$  (5 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc ( $4\times 20$  mL) organske faze se spoje, suše i upare, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (aceton: $\text{CH}_2\text{Cl}_2=1:8$ ). Dobija se **22** u obliku čvrstog ulja u prinosu od 0.1120 g (69%).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3416, 2961, 2927, 2872, 1722, 1415, 1667, 1176.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.79 (s, 3H, H-18), 0.88 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H, H-21), 1.04 (s, 3H, H-19), 1.25 (s, 6H,  $2\times \text{CH}_3$  na C-4'), 3.01 (t,  $J=14.6$  Hz, H-4 $\alpha$ ) 1H, 3.89 (s, 2H, H-5'), 5.15 (d,  $J=2.3$  Hz, 1H, H-7), 5.31 (s, 1H, H-12), 8.09 (s, 1H, CHO), 8.15 (s, 1H, CHO).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.13 (C-18), 17.58 (C-21), 21.56 (C-19), 22.78, 24.95, 25.88, 27.22, 28.37 ( $\text{CH}_3$  na C-4'), 28.42 ( $\text{CH}_3$  na C-4'), 29.53, 31.06, 31.83, 34.44, 34.85, 36.17, 36.53, 37.75, 42.19, 42.89, 44.56 (C-4), 45.06, 47.02, 66.84 (C-4'), 70.58 (C-7), 75.14 (C-12), 78.93 (C-5'), 160.34 (CHO), 160.43 (CHO), 166.27 (C-2'), 211.62 (C-3).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{NO}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 516.33196, nađeno 516.33071.

#### 4.20. 2-(3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-7-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (23)

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **19** (0.0923 g, 0.17 mmol) u THF (0.5 mL) se doda sveže predestilisan  $\text{SOCl}_2$  (0.06 mL, 0.83 mmol). Reakciona smeša se meša na 0 °C u toku 1 h. Reakcija se prekida



dodavanjem zasićenog rastvora NaHCO<sub>3</sub> do prestanka izdvajanja CO<sub>2</sub> (2 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (4×20 mL) organske faze se spoje, suše, upare, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>= 2:1). Dobija se jedinjenje **23**, u obliku čvrstg ulja, u prinosu od 0.0864 g (94%).

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.74 (s, 3H, H-18), 0.86 (d, *J*=5.9 Hz, 3H, H-21), 1.20 (s, 3H, H-19), 1.25 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.88 (s, 2H, H-5'), 4.81 (m, 1H, H-3), 5.27 (s, 1H, H-12), 7.98 (s, 1H, CHO na C-3), 8.10 (s, 1H, CHO na C-12).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 12.39 (C-18), 17.61 (C-21), 22.64 (C-19), 24.03, 25.08, 25.87, 26.33, 27.55, 28.34 (CH<sub>3</sub>), 28.40 (CH<sub>3</sub>), 31.89, 32.94, 33.47, 34.57, 34.83, 36.53, 41.83, 44.95, 45.56, 46.35, 49.01, 66.80 (C-4'), 72.52 (C-3), 74.57 (C-12), 78.87 (C-5'), 160.35 i 160.38 (2xCHO), 166.21 (C-2'), 210.46 (C-7).

#### 4.21. 2-(3α,7α-Diformiloksi-12-okso-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (24)

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **20** (0.3541 g, 0.66 mmol) u THF (2 mL) doda se sveže predestilisan SOCl<sub>2</sub> (0.22 mL, 3.03 mmol). Reakciona smeša se meša na 0 °C u toku 40 minuta. Reakcija se prekida dodavanjem zasićenog rastvora NaHCO<sub>3</sub> do prestanka izdvajanja CO<sub>2</sub> (2 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (4×20 mL) organske faze se spoje, suše i upare, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>= 1:8). Dobija se jedinjenje **24** kao čvrsto ulje u prinosu od 0.3224 g (94%).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 2964, 2873, 1719, 1666, 1183.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.87 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, H-21), 1.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.25 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.89 (s, 2H, H-5'), 4.71 (m, 1H, H-3), 5.14 (s, 1H, H-7), 8.00 (s, 1H, CHO), 8.04 (s, 1H, CHO).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 11.44, 18.60, 22.02, 23.65, 25.40, 26.43, 27.35, 28.33, 28.40, 31.39, 31.59, 34.41, 34.70, 35.44, 35.68, 37.46, 37.60, 37.74, 40.44, 46.19, 52.66, 56.95, 66.78 (C-4'), 70.37, 73.28, 78.85 (C-5'), 160.26 i 160.57 (2xCHO), 166.34 (C-2'), 213.31 (C-12).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 516.33196, nađeno 516.33113.

#### 4.22. 2-(3α,7α,12α-Trihidroksi-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (25)

Rastvoru jedinjenja **21** (1.14 g, 2.08 mmol) u metanolu (18 mL) doda se KOH (0.63 g, 11.23 mmol) i zagreva 1 h na temperaturi ključanja reakcione smeše. Sirova reakciona smeša se potom izlije u ledenu vodu (150 mL) pri čemu pada talog koji se filtrira i ispira ledenom vodom do neutralnog pH. Sirova supstanca se prečišćava fleš hromatografijom (EtOAc:izopropanol=5:1), pri čemu se dobija jedinjenje **25** u prinosu od 0.87 g (90%), u obliku kristala koji se nakon prekristalizacije iz acetona tope na 104 °C (lit.<sup>223</sup> t. t. 104 °C).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3370, 2931, 2867, 1727, 1662, 1463, 1366, 1276, 1195, 1119, 1078, 1046, 981, 950, 914, 754.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, H-18), 0.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, H-19), 0.94 (d, *J*=6.2 Hz, 3H, H-21), 1.14 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.18 (m, 1H, H-3), 3.61 (s, 1H, H-7), 3.78 (s, 1H, H-12), 3.83 (s, 2H, H-

5'), 4.02 (d,  $J=3.1$  Hz, 1H, OH na C-7), 4.12 (d,  $J=3.3$  Hz, 1H, OH na C-12), 4.34 (d,  $J=3.7$  Hz, 1H, OH na C-3).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 12.75 (C-18), 17.47 (C-21), 23.08 (C-19), 23.28, 24.87, 26.67, 27.79, 28.68 i 28.76 (2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 28.98, 30.85, 32.30, 34.84, 35.33, 35.38, 35.76, 39.94, 40.01, 41.83 (C-17), 41.97, 46.25 (C-13), 46.49, 66.71 (C-7), 67.12 (C-4'), 70.90 (C-3), 71.46 (C-12), 78.39 (C-5'), 165.38 (C-2').

HRMS (TOF)  $m/z$ : C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 462.35779, nađeno 462.35760.

#### 4.23. 2-(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-3-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (26)

Rastvoru jedinjenja **22** (0.6022 g, 1.17 mmol) u metanolu (15 mL) doda se KOH (0.60 g, 10.69 mmol) i zagreva 20 minuta na temperaturi ključanja reakcione smeše. U reakcionu smešu se zatim doda NH<sub>4</sub>Cl do pH 7. Nakon ekstrakcije sa EtOAc (4x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:1), pri čemu se dobija jedinjenje **26** u obliku kristala, u prinosu od 0.4160 g (77%, t. t. 148 °C nakon prekrizalizacije iz acetona).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3428, 2941, 2868, 1708, 1663.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.01 (d,  $J=2.9$  Hz, 3H, H-21), 1.26 (2s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.90 (d,  $J=2.6$ , 1H, H-7), 3.92 (s, 2H, H-5'), 4.00 (s, 1H, H-12).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 12.41, 17.67, 21.54, 23.33, 24.37, 26.85, 27.78, 28.16, 28.40, 28.43, 31.34, 34.15, 34.94, 35.61, 36.77, 36.84, 39.32, 41.90, 43.39, 45.47, 46.16, 46.62, 66.67 (C-4'), 67.87 (C-7), 73.07 (C-12), 79.04 (C-5'), 167.35 (C-2'), 213.48 (C-3).

HRMS (TOF)  $m/z$ : C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 460.34214, nađeno 460.34053.

#### 4.24. 2-(3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-7-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (27)

Rastvoru jedinjenja **23** (0.3407 g, 0.66 mmol) u metanolu (6 mL) doda se KOH (0.34 g, 6.06 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks u toku 30 minuta i potom ohladi na sobnu temperaturu. Reakcija se prekida dodavanjem ledene vode (5 mL), pri čemu pada beli talog, koji se cedi, ispira vodom do pH 7 i potom prečisti fleš hromatografijom (EtOAc:aceton=7:3). Dobija se čisto jedinjenje **27** u obliku kristala, koji se nakon prekrizalizacije iz EtOAc tope na 175 °C (lit.<sup>211</sup> t. t. 174–175 °C) u prinosu od 0.2359 g (78%).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3390, 2935, 2871, 1706, 1662.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.67 (s, 3H, H-18), 0.96 (d,  $J=5.8$  Hz, 3H, H-21), 1.17 (s, 3H, H-19), 1.24 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.56 (m, 1H, H-3), 3.89 (s, 2H, H-5'), 3.99 (m, 1H, H-12).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 12.79 (C-18), 17.53 (C-21), 22.79 (C-19), 24.30, 25.07, 27.72, 28.34 (CH<sub>3</sub>), 28.39 (CH<sub>3</sub>), 29.17, 29.75, 31.94, 34.15, 34.70, 35.15, 35.87, 37.40, 40.57, 45.35, 46.07, 46.11, 46.55, 49.53, 66.76 (C-4'), 70.81 (C-3), 71.93 (C-12), 78.92 (C-5'), 166.61 (C-2'), 211.70 (C-7).

#### 4.25. 2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-12-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (28)

Rastvoru jedinjenja **24** (0.3224 g, 0.63 mmol) u metanolu (6 mL) se doda KOH (0.28 g, 4.99 mmol) i zagreva 20 minuta na temperaturi ključanja reakcione smeše. U reakcionu smešu se potom dodaje voda (30 mL) i NH<sub>4</sub>Cl do pH 7, nakon čega se ekstrahuje sa EtOAc (4×10 mL). Organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:1). Dobija se jedinjenje **28** u obliku kristala (t. t. 193 °C nakon prekrizacije iz acetona) u prinosu od 0.2735 g (90%).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3386, 2965, 2930, 2870, 1701, 1664.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.78 (d, *J*=5.5 Hz, 3H, H-21), 0.94 (s, 3H, H-19), 0.96 (s, 3H, H-18), 1.15 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.18 (m, 1H, H-3), 3.72 (s, 1H, H-7), 3.84 (s, 2H, H-5'), 4.33–4.36 (više signala, 2H, OH na C-3 i C-7).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 11.62 (C-18), 19.08 (C-21), 22.48 (C-19), 23.74, 25.18, 27.59, 28.70 i 28.78 (2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 30.85, 31.87, 35.11, 35.47, 35.62, 35.95, 37.11, 37.91, 41.37, 46.56 (C-17), 53.86, 56.78, 66.48 (C-7), 67.16 (C-4'), 70.43 (C-3), 78.38 (C-5'), 165.14 (C-2'), 214.42 (C-12).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 460.34214, nađeno 460.34070.

#### 4.26. 2-(3 $\alpha$ -hidroksi-7,12-diokso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (29)

U suspenziju jedinjenja **12** (1.7121 g, 4.23 mmol) u EtOAc (60 mL) doda se TEA (1 mL), 50% rastvor 2-amino-2-metil propanola u EtOAc (5 mL, 13.10 mmol), EEDQ (2.08 g, 8.41 mmol) i voda (7 mL). Reakciona smeša se zagreva uz refluks u toku 8 h, nakon čega se ohladi na sobnu temperaturu i ispere sa HCl (10%, 1×10 mL), H<sub>2</sub>O (1×10 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4×10 mL) i vodom do pH 7. Organske faze se spoje, suše i upare, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (aceton:CHCl<sub>3</sub>=1:4). Jedinjenje **29** se dobija u prinosu od 1.2100 g (60%) u obliku čvrstog ulja.

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3366, 2932, 2874, 1705, 1648, 1545, 1461, 1389, 1272, 1066, 734.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.75 (d, *J*=6.1, 3H, H-21), 0.98 (s, 3H, H-18), 1.16 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> na amidu), 1.25 (s, 3H, H-19), 2.75 (t, *J*=12.7, 1H, H-11), 2.98 (m, 2H, H-8 i CH<sub>2</sub>), 3.36 (m, 3H, CH<sub>2</sub> amida i H-3), 4.47 (d, *J*=4.5, 1H, OH amida), 4.89 (s, 1H, OH na C-3), 7.24 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 11.86 (C-18), 19.11 (C-21), 19.32 (C-19), 22.54 (2CH<sub>3</sub> na amidu), 24.17, 25.11, 27.71, 30.11, 31.66, 33.71, 34.10, 35.48, 35.90, 37.88, 38.55 (C-11), 44.95, 45.51, 45.62, 45.71 (C-17), 48.40 (C-8), 52.50 (C-14), 54.59, 56.72 (C-13), 68.12 (CH<sub>2</sub> amida), 69.23 (C-3), 173.14 (C-24), 210.49 (C-7), 213.03 (C-12).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 476.33705, nađeno 476.33702.

#### 4.27. 2-(3,7,12-Triokso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (30)

U rastvor dehidroholne kiseline (**13**, 0.5275 g, 1.31 mmol) u EtOAc (13 mL) doda se TEA (0.3 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.5 mL, 5.24 mmol), EEDQ (0.60 g, 2.43 mmol) i voda (8 mL). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 5 h, nakon čega se reakcija prekida hlađenjem na sobnu temperaturu i ispiranjem sa HCl (1:3, 1×3 mL), H<sub>2</sub>O (1×3 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (3×3 mL) i H<sub>2</sub>O do neutralnog pH.

Organski sloj se osuši, upari i prečišćava fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:5). Dobija se jedinjenje **30** u prinosu od 0.4814 g (78%), u obliku belih kristala, t.t. 252 °C nakon prekrizacije iz acetona.

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3307, 2927, 1705, 1652, 1557, 1471, 1387.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.84 (d, *J*=5.8 Hz, 3H, H-21), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.28 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> amida), 1.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub> amida), 5.01 (m, 1H, OH amida), 5.62 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 11.81, 18.74, 21.85, 24.74, 24.84, 25.07, 27.56, 31.06, 34.00, 35.21, 35.33, 35.97, 36.44, 38.60, 42.74, 44.94, 45.42, 45.44, 46.78, 48.93, 51.72, 56.16, 56.85, 70.89, 174.46 (C-24), 208.74 (C-7), 209.10 (C-3), 212.04 (C-12).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>5</sub> [2M+H]<sup>+</sup> izračunato 947.63552, nađeno 947.63476.

#### 4.28. 2-(3α-Hidroksi-7,12-diokso-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (31)

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **29** (2.1550 g, 4.53 mmol) u THF (30 mL) se ukapava sveže predestilisan SOCl<sub>2</sub> (1.4 mL, 19.28 mmol). Reakciona smeša se meša na 0 °C u toku 90 minuta, a zatim se reakcija prekine dodavanjem zasićenog rastvora NaHCO<sub>3</sub> (50 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (4×15 mL), organske faze se spoje, isperu vodom (2×10 mL), osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>= 1:3), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **31** u prinosu od 1.73 g (83%, beli kristali, t. t. 185 °C nakon prekrizacije iz acetona).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3365, 2928, 1709, 1666, 1463, 1384, 1262, 1071, 752.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.77 (d, *J*=5.8, 3H, H-21), 0.98 (s, 3H, H-18), 1.14 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> na C-4'), 1.25 (s, 3H, H-19), 2.74 (t, *J*=12.7, 1H, H-11), 2.97 (m, 2H), 3.35 (m, 1H, H-3), 3.84 (s, 2H, H-5'), 4.47 (d, *J*=5.4, 1H, OH na C-3).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 11.83 (C-18), 19.14 (C-21), 22.54 (C-19), 24.17, 25.15, 27.72, 28.70 (CH<sub>3</sub> na C-4'), 28.78 (CH<sub>3</sub> na C-4'), 30.11, 31.88, 34.10, 35.36, 35.89, 37.88, 38.55 (C-11), 44.95, 45.50, 45.58 (C-17), 45.70, 48.38 (C-8), 52.43 (C-14), 56.73 (C-13), 67.16 (C-4'), 69.23 (C-3), 78.38 (C-5'), 165.12 (C-2'), 210.47 (C-7), 212.97 (C-12).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 458.32649, nađeno 458.32665.

#### 4.29. 2-(3,7,12-Triokso-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (32)

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **30** (0.30 g, 0.63 mmol) u THF (13 mL) se doda sveže predestilisan SOCl<sub>2</sub> (0.21 mL, 2.89 mmol). Reakcija se prekida nakon 75 minuta dodavanjem 10% NaHCO<sub>3</sub> (10 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (4×10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečišćava fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:6). Dobija se jedinjenje **32** u obliku belih kristala u prinosu od 0.2232 g (77%, t.t. 220 – 222 °C nakon prekrizacije iz acetona).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 2963, 1707, 1665, 1464, 1384.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.87 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, H-21), 1.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.26 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 1.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 2H, H-5').

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 11.79, 18.72, 21.88, 25.12, 25.55, 27.70, 28.36, 28.44, 31.65, 35.26, 35.76, 35.98, 36.46, 38.61, 42.77, 44.96, 45.51, 45.54, 46.83, 48.99, 51.71, 56.88, 66.83 (C-4'), 78.88 (C-5'), 166.31 (C-2'), 208.69 (C-7), 209.00 (C-3), 211.83 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 456.31084, nađeno 456.31084.

#### 4.30. $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Trihidroksi-7 $\beta$ -metil-5 $\beta$ -holanska kiselina (33)

U ohlađen ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) rastvor jedinjenja **5** (0.1730 g, 0.43 mmol) u anh. THF (12.5 mL) u toku 3 minute se ukapava rastvor  $\text{MeMgI}$  u  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 M, 7.4 mL, 14.8 mmol). Nakon 30 minuta mešanja na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  reakcija se prekida dodavanjem najpre zasićenog rastvora  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL), a potom glacijalne sirćetne kiseline (3 mL). Nakon ekstrakcije sa  $\text{EtOAc}$  (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ , uz dodatak  $\text{AcOH}$ , 5 mL na 1L eluenta). Dobija se jedinjenje **33** u obliku kristala (t. t.  $224\text{ }^\circ\text{C}$ , nakon prekristalizacije iz acetona, lit.<sup>211</sup> t. t.  $221\text{--}223\text{ }^\circ\text{C}$ ) u prinosu od 0.1535 g (83%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 0.62 (s, 3H, H-18), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.94 (d,  $J=6.3$  Hz, 3H, H-21), 1.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  na C-7), 3.22 (m, 1H, H-3), 3.56 (s, 1H, OH na C-7), 3.76 (s, 1H, H-12), 4.09 (d,  $J=3.5$  Hz, 1H, OH na C-12), 4.31 (d,  $J=4.0$  Hz, 1H, OH na C-3), 11.92 (bs, 1H, COOH).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 13.18 (C-18), 17.54 (C-21), 23.15 (C-19), 27.44, 28.00, 28.90, 29.48, 30.69, 31.16, 31.31, 33.75 ( $\text{CH}_3$  na C-7), 34.46, 35.41, 36.09, 38.62, 42.46, 42.73, 43.63, 44.99, 45.10, 47.50, 70.85 (C-3), 70.93 (C-12), 71.43 (C-7), 175.57 (C-24).

#### 4.31. 7 $\beta$ -Etil- $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (34)

U ohlađen ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) rastvor jedinjenja **5**<sub>SB1</sub> (0.1537 g, 0.38 mmol) u anh. THF (6.4 mL) ukapava se u toku 3 minute rastvor  $\text{EtMgBr}$  u  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 M, 3 mL, 9 mmol) i meša u toku 90 minuta na istoj temperaturi, nakon čega se prekida dodavanjem, najpre zasićenog rastvora  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL), a potom glacijalne sirćetne kiseline (3 mL). Nakon ekstrakcije sa  $\text{EtOAc}$  (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ , uz dodatak  $\text{AcOH}$ , 5 mL na 1L eluenta). Dobija se jedinjenje **34** u obliku ulja u prinosu od 0.1459 g (88%).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3401, 2930, 1713, 1377, 1097, 1034.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 0.64 (s, 3H, H-18), 0.76 (s, 3H, H-19), 0.79 (d,  $J=7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  etil niza), 0.94 (d,  $J=6.3$  Hz, 3H, H-21), 3.22 (m, 1H, H-3), 3.41 (s, 1H, OH na H-7), 3.75 (s, 1H), 4.10 (s, 1H, OH na C-12), 4.33 (s, 1H, OH na C-3),

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DSMO}$ )  $\delta$  = 10.01 ( $\text{CH}_3$  etil niza), 13.19 (C-18), 17.52 (C-21), 21.52, 23.01 (C-19), 26.21, 27.84, 28.85, 29.68, 30.65, 31.33, 31.47, 34.22, 35.46, 36.08, 36.99, 38.89, 38.97, 42.05, 42.97, 44.95, 47.66, 70.85, 70.90, 73.77 (C-7), 175.59 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  izračunato 475.28203, nađeno 475.28151.

#### 4.32. 7β-Butil-3α,7α,12α-trihidroksi-5β-holanska kiselina (35)

U ohlađen (-20 °C) rastvor jedinjenja **5**<sub>SB1</sub> (0.1113 g, 0.27 mmol) u anh. THF (4.25 mL) ukapava se u toku 3 minute rastvor BuMgCl u Et<sub>2</sub>O (2 M, 3.4 mL, 6.8 mmol). Reakciona smeša se meša u toku 30 minuta na -20 °C, nakon čega se reakcija prekida dodavanjem, najpre, zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (10 mL), a potom glacijalne sirćetne kiseline (3 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1, uz dodatak AcOH, 5 mL na 1L eluenta). Dobija se jedinjenje **35** u obliku ulja u prinosu od 0.0797 g (94% u odnosu na izreagovalo **5**), i regenerisano polazno jedinjenje **5**, 0.0371 g.

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3401, 2932, 2871, 1709, 1379, 1078, 1033, 736.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.75 (s, 3H, H-18), 0.85 (s, 3H, H-19), 0.92 (t, *J*=6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> butil niza), 1.03 (d, *J*=5.9 Hz, 3H, H-21), 3.54 (m, 1H, H-3), 3.95 (s, 1H, H-12).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 12.96 (C-18), 14.18 (CH<sub>3</sub> butil niza), 17.31 (C-21), 22.40, 23.30, 26.40, 27.36, 27.80, 28.80, 28.88, 29.71, 30.70, 31.11, 34.00, 35.53, 38.00, 39.35, 40.53, 41.56, 43.11, 44.42, 45.43, 47.98, 72.06 (C-3), 72.65 (C-12), 75.39, 77.23, 178.26 (C-24).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub> [M+K]<sup>+</sup> izračunato 503.31333, nađeno 503.31222.

#### 4.33. 3α,7α,12α-Trihidroksi-7β-oktil-5β-holanska kiselina (36)

U ohlađen (-20 °C) rastvor jedinjenja **5** (0.3110, 0.76 mmol) u anh. THF (15 mL) se ukapava, u toku 3 minute rastvor OctMgBr u Et<sub>2</sub>O (2 M, 11.5 mL, 23 mmol) i na istoj temperaturi meša u toku 135 minuta, nakon čega se reakcija prekida dodavanjem, najpre zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (10 mL), a potom glacijalne sirćetne kiseline (3 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1, uz dodatak AcOH, 5 mL na 1 L eluenta). Dobija se jedinjenje **36** u obliku ulja u prinosu od 0.3296 g (83%).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3400, 2925, 2855, 1711, 1377, 1262, 1081, 1032.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.62 (s, 3H, H-18), 0.75 (s, 3H, H-19), 0.85 (t, *J*=6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> oktil niza), 0.93 (d, *J*=6.1 Hz, 3H, H-21), 3.22 (m, 1H, H-3), 3.41 (s, 1H, OH na C-7), 3.74 (s, 1H, C-12), 4.11 (s, 1H, OH na C-12), 4.33 (s, 1H, OH na C-3).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 13.14 (C-18), 14.40 (CH<sub>3</sub> oktil niza), 17.50 (C-21), 22.59 (C-19), 23.04, 25.15, 26.17, 27.85, 28.89, 29.13, 29.42, 29.67, 30.30, 30.64, 31.24, 31.29, 31.74, 34.19, 35.45, 36.06, 38.90, 40.53, 42.12, 43.03, 44.89, 45.04, 47.65 (C-13), 70.86 (C-3), 70.89 (C-12), 73.57 (C-7), 175.45 (C-24).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>O<sub>5</sub> [M+CHO]<sup>-</sup> izračunato 565.41098, nađeno 565.40997.

#### 4.34. 2-(3α,7α,12α-Trihidroksi-7β-metil-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (37)

U ohlađen (-20 °C) rastvor jedinjenja **27** (0.2887, 0.63 mmol) u anh. THF (13 mL) ukapava se u toku 3 minute rastvor MeMgI u Et<sub>2</sub>O (2 M, 6 mL, 12 mmol) i meša u toku 20 minut na -20 °C, nakon čega se reakcija prekida dodavanjem zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (10 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1).

Dobija se jedinjenje **37** u obliku kristala (t. t. 105 °C nakon prekrizacije iz acetona, lit.<sup>211</sup> t. t. 103–104.5 °C) u prinosu od 0.1927 g (63%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.61 (s, 3H, H-18), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.95 (d, *J*=6.2 Hz, 3H, H-21), 1.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub> na C-7), 1.14 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.21 (m, 1H, H-3), 3.57 (s, 1H, OH na C-7), 3.76 (s, 1H, H-12), 3.83 (s, 2H, H-5'), 4.10 (d, *J*=3.1 Hz, 1H, OH na C-12), 4.33 (d, *J*=3.9 Hz, 1H, OH na C-3).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 13.13 (C-18), 17.61 (C-21), 23.14 (C-19), 24.90, 27.44, 28.05, 28.71 i 28.79 (2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 28.90, 29.47, 30.68, 32.32, 33.74 (CH<sub>3</sub> na C-7), 34.45, 35.27, 36.08, 38.60, 42.45, 42.74, 43.62, 44.98, 45.03, 47.53 (C-13), 67.14 (C-4'), 70.84, 70.92, 71.42 (C-7), 78.38 (C-5'), 165.32 (C-2').

#### 4.35. 2-(7β-Etil-3α,7α,12α-trihidroksi-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (38)

U ohlađen (–20 °C) rastvor jedinjenja **27** (0.0914 g, 0.2 mmol) u anh. THF (2 mL) se ukapava, u toku 3 minute, rastvor EtMgBr u Et<sub>2</sub>O (3 M, 3 mL, 9 mmol) i meša u toku 15 minuta na –20 °C, nakon čega se reakcija prekida dodavanjem zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (8 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (acetone:EtOAc=1:3). Dobija se jedinjenje **38** u obliku ulja u prinosu od 0.0717 g (74%).

IR spekta (film, cm<sup>-1</sup>): 3391, 2964, 2935, 2873, 1724, 1663, 1462, 1366, 1271, 1159, 1086, 1038, 996, 933, 912, 735.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.73 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.87 (t, *J*=7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> etil niza), 1.03 (d, *J*=5.7 Hz, 3H, H-21), 1.26 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.47 (m, 1H, H-3), 3.90 (s, 2H, H-5'), 3.94 (s, 1H, H-12).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 9.54 (CH<sub>3</sub> etil niza), 12.93 (C-18), 17.53 (C-21), 22.43 (C-19), 24.99, 26.38, 27.66, 28.38 i 28.41 (2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 28.84, 29.69, 30.16, 31.98, 34.08, 35.27, 35.67, 36.86, 38.58, 38.75, 39.92, 41.59, 42.76, 45.06, 47.92, 66.76 (C-4'), 71.74 (C-3), 72.38 (C-12), 75.50 (C-7), 78.93 (C-5'), 166.84 (C-2').

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 490.38909, nađeno 490.38929.

#### 4.36. 2-(7β-Butil-3α,7α,12α-trihidroksi-24-nor-5β-holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (39), 2-(7β-butyl-3α,7α,12α-trihidroksi-5β-holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (41)

*Postupak A*: U ohlađen (–20 °C) rastvor jedinjenja **27** (3.00 g, 6.52 mmol) u anh. THF (50 mL) se ukapava, u toku 30 minuta, rastvor BuMgCl u Et<sub>2</sub>O (2 M, 75 mL, 0.15 mol) i meša u toku 1 h, nakon čega se reakcija prekida dodavanjem zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (100 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x30 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (acetone:EtOAc=3:1, pa CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1). Dobija se jedinjenje **39** u obliku ulja u prinosu od 2.41 g (79% u odnosu na izreagovalo **27**) i jedinjenje **41** (0.2627 g, 8% u odnosu na izreagovalo **27**), kao i neizreagovano **27** (0.2897 g).

*Postupak B*: U rastvor jedinjenja **27** (0.0640 g, 0.14 mmol) u anh. THF (1.6 mL), zagrejan na temperaturu ključanja, doda se rastvor BuMgCl u Et<sub>2</sub>O (2 M, 0.2 mL, 0.4 mmol). Nakon 2 h, reakcija se prekida

dodavanjem zasićenog rastvora  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL). Obrada i prečišćavanje reakcione smeše su isti kao u postupku A. Dobija se jedinjenje **39** u obliku ulja u prinosu od 0.0193 g (33% u odnosu na izreagovalo **27**) i jedinjenje **41** (0.0152 g, 20% u odnosu na izreagovalo **27**) i neizreagovani **27** (0.0118 g).

Spektroskopski podaci za jedinjenje **39**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3370, 2957, 2930, 2868, 1663, 1463, 1366, 1081, 908, 734.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 0.62 (s, 3H, H-19), 0.75 (s, 3H, H-18), 0.83 (t,  $J=6.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  butil niza), 0.94 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H, H-21), 1.14 (s, 6H,  $2\times\text{CH}_3$  na C-4'), 3.21 (m, 1H, H-3), 3.40 (s, 1H, OH na C-7), 3.74 (d,  $J=2.8$  Hz, 1H, C-12), 3.83 (s, 2H, H-5'), 4.09 (d,  $J=3.7$  Hz, 1H, OH na C-12), 4.32 (d,  $J=4.2$  Hz, 1H, OH na C-3).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 12.67 (C-18), 14.05 ( $\text{CH}_3$  butil niza), 17.10 (C-21), 22.57 (C-19), 22.96, 24.39, 25.71, 27.03, 27.39, 28.22 i 28.30 ( $2\times\text{CH}_3$  na C-4'), 28.43, 29.18, 30.16, 31.82, 33.72 (C-10), 34.80, 35.59, 38.43, 40.10, 41.63, 42.57, 44.28, 44.41, 47.21 (C-13), 66.65 (C-4'), 70.37 (C-3), 70.41 (C-12), 73.07 (C-7), 77.90 (C-5'), 164.83 (C-2').

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 518.42039, nađeno 518.41963.

Spektroskopski podaci za jedinjenje **41**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 2932, 2869, 1651, 1552, 1456, 1378, 1266, 1181, 1102, 1074, 1035, 994, 738, 703.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.69 i 0.81 (2s,  $2\times 3\text{H}$ , H-18 i H-19), 0.87 (t,  $J=6.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  butil niza), 0.99 (d,  $J=4.9$  Hz, 3H, H-21), 1.27 (s, 6H,  $2\times\text{CH}_3$  amida), 3.42 (bs, 1H, OH na C-7), 3.53 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  amida), 3.88 (s, 1H, H-12), 4.00 (bs, 1H, OH na C-12), 5.45 (bs, 1H, OH na C-3), 6.44 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.82 ( $\text{CH}_3$ ), 14.07 ( $\text{CH}_3$ ), 17.55 ( $\text{CH}_3$ ), 22.40 ( $\text{CH}_3$ ), 23.20, 24.33 ( $\text{CH}_3$  amida), 24.42 ( $\text{CH}_3$  amida), 26.25, 27.33, 27.62, 28.66, 29.59, 30.06, 31.52, 33.02, 34.00, 34.99, 35.61, 38.52, 39.52, 40.33, 41.59, 42.70, 44.38, 44.45, 47.71, 55.65 (qC amida), 70.49 ( $\text{CH}_2$  amida), 71.64, 72.47, 75.33 (C-7), 175.09 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  izračunato 558.41290, nađeno 558.41193.

#### **4.37. 2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-7 $\beta$ -oktil-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (40), 2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-7 $\beta$ -oktil-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (42)**

*Postupak A:* U ohlađen ( $-20$  °C) rastvor jedinjenja **27** (1.0308 g, 2.24 mmol) u anh. THF (17 mL) se ukapava, u toku 1 h, rastvor OctMgBr u  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 M, 32 mL, 64 mmol), a zatim nastavi sa mešanjem na istoj temperaturi u toku 90 minuta. Reakcija se prekida dodavanjem zasićenog rastvora  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc ( $5\times 20$  mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (acetone:EtOAc=2:3, pa  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH=93:7). Dobija se jedinjenje **40** u obliku ulja u prinosu od 0.7202 g (69% u odnosu na izreagovalo **27**) i neizreagovano **27**, 0.1957 g.

*Postupak B:* U rastvor jedinjenja **27** (0.0692 g, 0.15 mmol) u anh. THF (1.7 mL), zagrejanom na temperaturu ključanja se doda 2 M rastvor OctMgBr u  $\text{Et}_2\text{O}$  (0.2 mL, 0.4 mmol). Nakon 2 h mešanja na temperaturi ključanja reakcione smeše, reakcija se prekida dodavanjem zasićenog rastvora  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mL). Obrada i prečišćavanje reakcione smeše su isti kao u postupku A. Dobija se jedinjenje **40** u obliku



ulja u prinosu od 0.0156 g (18% u odnosu na izreagovalo **27**) i jedinjenje **42** (0.0221 g, 26% u odnosu na izreagovalo **27**), kao i neizreagovano **27**, 0.0118 g.

Spektroskopski podaci za jedinjenje **40**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3370, 2925, 2855, 1726, 1653, 1553, 1464, 1378, 1263, 1174, 1082, 1037, 941, 911, 731, 610.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ =0.62 (s, 3H, H-18), 0.75 (s, 3H, H-19), 0.86 (t,  $J$ =6.7 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  oktil niza), 0.95 (d,  $J$ =6.2 Hz, 3H, H-21), 1.14 (s, 6H,  $2\times\text{CH}_3$  na C-4'), 3.21 (m, 1H, H-3), 3.41 (s, 1H, OH na C-7), 3.75 (s, 1H, H-12), 3.83 (s, 2H, H-5'), 4.10 (d,  $J$ =3.5 Hz, 1H, OH na C-12), 4.33 (d,  $J$ =3.3 Hz, 1H, OH na C-3).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 13.10 (C-18), 14.41 ( $\text{CH}_3$  oktil niza), 17.57 (C-21), 22.58, 23.05 (C-19), 24.87, 25.10, 26.18, 27.06, 27.88, 28.69, 28.77, 28.91, 29.08, 29.36, 29.67, 30.25, 30.64, 31.72, 32.29, 34.20, 35.27, 36.06, 38.90, 40.50, 42.12, 43.05, 44.89, 45.02, 47.69 (C-13), 67.13 (C-4'), 70.85 (C-3), 70.88 (C-12), 73.56 (C-7), 78.38 (C-5'), 165.31 (C-2').

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 574.48299, nađeno 574.48370.

Spektroskopski podaci za jedinjenje **42**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 2927, 2857, 1648, 1550, 1465, 1378, 1073, 1035, 758.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 0.62 (s, 3H, H-18), 0.75 (s, 3H, H-19), 0.86 (t,  $J$ =6.7 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  oktil niza), 0.94 (d,  $J$ =6.3 Hz, 3H, H-21), 1.16 (s, 6H,  $2\times\text{CH}_3$  amida), 3.22 (m, 1H, H-3), 3.37 (d,  $J$ =5.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  amida), 3.40 (s, 1H, OH na C-7), 3.74 (s, 1H, H-12), 4.07 (d,  $J$ =3.6 Hz, 1H, OH na C-12), 4.33 (d,  $J$ =4.1 Hz, 1H, OH na C-3), 4.91 (t,  $J$ =5.8 Hz, 1H, OH amida), 7.23 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 13.16 (C-18), 14.41 ( $\text{CH}_3$  oktil niza), 17.76 (C-21), 22.57, 23.06 (C-19), 24.18 ( $2\times\text{CH}_3$  amida), 25.11, 26.18, 27.89, 28.91, 29.07, 29.36, 29.70, 30.25, 30.64, 31.71, 32.20, 33.70, 34.21, 35.54, 36.06, 38.91, 40.49, 42.11, 43.05, 45.04, 47.65, 54.58, 55.37, 68.19 ( $\text{CH}_2$  amida), 70.85 (C-3), 70.91 (C-12), 73.58 (C-7), 173.37 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 592.49355, nađeno 592.49248.

#### 4.38. **3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-12 $\beta$ -metil-5 $\beta$ -holanska kiselina (43)**

U ohlađen ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) rastvor jedinjenja **9** (0.1974 g, 0.49 mmol) u anh. THF (12.5 mL) se ukapava, u toku 1 h, rastvor  $\text{MeMgI}$  u  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 M, 5 mL, 10 mmol). Nakon dodate celokupne količine Grignard-ovog reagensa, reakciona smeša se meša još 30 minuta na istoj temperaturi. Reakcija se prekida dodavanjem zasićenog rastvora  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (30 mL). Nakon ekstrakcije sa  $\text{EtOAc}$  ( $5\times 10$  mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ , uz dodatak  $\text{AcOH}$ , 5 mL na 1 L eluenta). Dobija se jedinjenje **43** u obliku čvrstog ulja u prinosu od 0.0562 g (27%).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3401, 2926, 1707, 1454.

$^1\text{H}$ NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 0.67 (s, 3H, H-18), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.89 (d,  $J$ =6.8 Hz, 3H, H-21), 1.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  na C-12), 3.18 (m, 1H, H-3), 3.62 (s, 1H, H-7), 3.86 (s, 1H, OH na C-12), 4.00 (d,  $J$ =2.9 Hz, 1H, OH na C-7), 4.35 (s, 1H, OH na C-3).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 12.68 (C-18), 21.12, 21.77 (C-21), 23.13, 23.21, 27.55 ( $\text{CH}_3$  na C-12), 28.32, 28.84, 30.88 (C-6), 32.34 (C-20), 33.26, 34.89, 35.37, 35.73, 36.76 (C-11), 38.99 (C-8), 40.03,

41.98 (C-5), 42.52 (C-14), 47.59 (C-17), 49.49 (C-13), 66.72 (C-7), 70.90 (C-3), 73.01 (C-12), 175.34 (C-24).

#### 4.39. 2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-12 $\beta$ -metil-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (44)

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **28** (0.3032 g, 0.66 mmol) u anh. THF (13 mL) se u toku 3 minute ukapava rastvor MeMgI u Et<sub>2</sub>O (2 M, 7 mL, 14 mmol). U reakcionu smešu se posle 30 minuta mešanja na 0 °C doda zasićeni rastvor NH<sub>4</sub>Cl (20 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x7 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=92:8) pri čemu se dobija jedinjenje **44** u obliku čvrstog ulja u prinosu od 0.1656 g (53%).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3391, 2969, 2932, 1662, 1463.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.65 (s, 3H, H-18), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.91 (d, *J*=6.8 Hz, 3H, H-21), 1.14 (s, 9H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4' i CH<sub>3</sub> na C-12), 3.18 (m, 1H, H-3), 3.62 (s, 1H, H-7), 3.82–3.86 (više signala, 3H, H-5' i OH na C-12), 3.96 (d, *J*=3.4 Hz, 1H, OH na C-7), 4.32 (d, *J*=4.2, 1H, OH na C-3).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 12.67 (C-18), 21.18, 21.76, 23.13, 23.26, 24.18, 26.45, 27.59, 28.33, 28.82 (2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 29.79, 30.89, 31.81, 34.90, 35.38, 35.73, 36.73, 39.02, 42.00, 42.47, 47.49, 49.54, 66.74 (C-7), 67.14 (C-4'), 70.91 (C-3), 73.01 (C-12), 78.39 (C-5'), 164.94 (C-2').

#### 4.40. 2-(12 $\beta$ -Etil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (45)

U ohlađen (-20 °C) rastvor jedinjenja **28** (0.1220 g, 0.27 mmol) u anh. THF (4 mL) se u toku 3 minute ukapava rastvor EtMgBr u Et<sub>2</sub>O (3 M, 2.2 mL, 6 mmol). Reakciona smeša se posle 2 h zagreje na 0 °C, i nakon 3 h mešanja na 0 °C, prekida dodavanjem zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (10 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x5 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (EtOAc:aceton=3:2, EtOAc:aceton=3:1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=98:2). Dobija se jedinjenje **45** u obliku ulja u prinosu od 0.0624 g (48%), i jedinjenje **25** u prinosu od 0.0213 g (17%).

Spektroskopski podaci za jedinjenje **45**:

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3392, 2961, 2931, 2871, 1663, 1463, 1366, 1275, 1115, 1079, 1004, 940, 910, 737, 611.

<sup>1</sup>H NMR spektar (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.66 (s, 3H, H-18), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.84 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> etil niza), 0.89 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, H-21), 1.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub> na C-4'), 1.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub> na C-4'), 3.20 (m, 1H, H-3), 3.63 (s, 1H, H-7), 3.69 (s, 1H, OH na C-12), 3.80 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, H-5'), 3.85 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, H-5'), 3.96 (d, *J*=3.1 Hz, 1H, OH na C-7), 4.33 (d, *J*=3.9 Hz, 1H, OH na C-3).

<sup>13</sup>C NMR spektar (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 8.14 (CH<sub>3</sub> etil niza), 13.10 (C-18), 21.34, 21.64 (C-21), 23.05 (C-19), 23.43, 26.41, 27.92, 28.78 (2CH<sub>3</sub> na C-4'), 29.58, 30.32, 30.71, 30.80, 32.34, 35.18, 35.42, 35.74, 39.08, 40.05, 42.05, 42.72, 47.06, 50.34, 66.87 (C-7), 67.12 (C-4'), 70.93 (C-3), 75.05 (C-12), 78.41 (C-5'), 164.92 (C-2').

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 490.38909, nađeno 490.38809.

#### 4.41. 2-(12 $\beta$ -Butil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (46)

U ohlađen ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) rastvor jedinjenja **28** (0.1153 g, 0.25 mmol) u anh. THF (4.25 mL) ukapava se rastvor BuMgCl u Et<sub>2</sub>O (2 M, 6.4 mL, 12.8 mmol). Reakciona smeša se posle 2 h zagreje na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , i nakon 3 h mešanja na istoj temperaturi, reakcija se prekida dodavanjem zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (20 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (aceton:EtOAc=1:2). Dobija se jedinjenje **46** u prinosu od 0.0633 g (49%, čvrsto ulje) i jedinjenje **25**<sub>SB30</sub> u prinosu od 0.0225 g (19%, čvrsto ulje).

Spektroskopski podaci za jedinjenje **46**:

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3391, 2957, 2931, 2870, 1663, 1462, 1365, 1267.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.65 (s, 3H, H-18), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.87–0.91 (više signala, 6H, CH<sub>3</sub> butil niza i H-21), 1.14 i 1.15 (2s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.18 (s, 1H, H-3), 3.62 (s, 1H, H-7), 3.69 (s, 1H, OH na C-12), 3.79–3.86 (više signala, 6H, 2H, H-5'), 3.95 (d, *J*=3.2 Hz, 1H, OH na C-7), 4.31 (d, *J*=3.7 Hz, 1H, OH na C-3).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 13.14 (C-18), 14.75 (CH<sub>3</sub> butil niza), 21.66, 21.71 (C-19), 23.08, 23.54, 23.86, 25.52, 26.48, 28.00, 28.75 i 28.88 (2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 29.83, 30.82, 31.25, 32.40, 35.18, 35.42, 35.74, 38.33, 39.08, 42.05, 42.64, 46.97, 50.38, 55.38 (C-13), 66.90 (C-4'), 67.12 (C-7), 70.93 (C-3), 75.12 (C-12), 78.39 (C-5'), 164.96 (C-2').

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>32</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 518.42039, nađeno 518.41949.

#### 4.42. 2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-12 $\beta$ -oktil-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (47)

U ohlađen ( $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) rastvor jedinjenja **28** (0.1044 g, 0.23 mmol) u anh. THF (6 mL) ukapava se rastvor OctMgCl u Et<sub>2</sub>O (2 M, 6 mL, 12 mmol). Reakcija se posle 3 h prekida dodavanjem zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (20 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=92:8). Dobija se jedinjenje **47** u prinosu od 0.0573 g (67%, beli kristali, t. t.  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  nakon prekrizacije iz smeše acetone-MeOH).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3391, 2927, 2856, 1652, 1549, 1463, 1377.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.65 (s, 3H, H-18), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.85–0.91 (više signala, 6H, CH<sub>3</sub> oktil niza i H-21), 1.14 i 1.15 (2s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 3.18 (m, 1H, H-3), 3.62 (s, 1H, H-7), 3.69 (s, 1H, OH na C-12), 3.80–3.85 (više signala, 6H, 2H, H-5'), 3.95 (d, *J*=3.3 Hz, 1H, OH na C-7), 4.32 (d, *J*=3.9 Hz, 1H, OH na C-3).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 13.13 (C-18), 14.43 (CH<sub>3</sub> iz oktil niza), 21.63, 21.69 (C-21), 22.55, 23.07 (C-19), 23.26, 23.53, 26.47, 28.00, 28.74 i 28.88 (2xCH<sub>3</sub> na C-4'), 29.26, 29.69, 29.77, 30.84, 31.25, 31.75, 32.38, 35.17, 35.41, 35.74, 38.58, 39.08, 40.16, 42.05, 42.64, 46.98, 50.37 (C-13), 66.89 (C-4'), 67.11 (C-7), 70.92 (C-3), 75.14 (C-12), 78.39 (C-5'), 164.95 (C-2').

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>36</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 574.48299, nađeno 574.48158.

**4.43. 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-3-okso[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-5 $\beta$ -holanska kiselina (4D)**

U ohlađen (-20 °C) rastvor jedinjenja **4** (0.1136 g, 0.28 mmol) u anh. THF (3 mL) ukapava se rastvor EtMgBr u Et<sub>2</sub>O (3 M, 2 mL, 6 mmol) i meša u toku 2.5 h. Reakcija se prekida dodavanjem D<sub>2</sub>O (0.5 mL), nakon čega se meša još 10 minuta i potom dodaje glacijalna sirćetna kiselina (3 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (5x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=93:7, uz dodatak AcOH, 5 mL na 1L eluenta). Dobija se jedinjenje **4D** u prinosu od 0.1082 g (95%, beli kristali, t. t. 158 °C nakon prekrizalizacije iz smeše voda-MeOH).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3435, 2938, 2865, 1707, 1268.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.63 (s, 3H, H-18), 0.92-0.94 (više signala, 6H, H-19 i H-21), 3.69 (s, 1H, H-7), 3.83 (s, 1H, H-12), 4.19 (s, 1H, OH), 4.32 (s, 1H, OH).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 12.77 (C-18), 17.43 (C-21), 21.94 (C-19), 23.18, 27.00, 27.69, 29.13, 31.26, 31.31, 34.31, 34.95, 35.47, 36.67, 36.94, 41.78, 43.19, 45.46 (m, C-D), 46.31, 46.61, 55.37, 66.78 (C-7), 71.43 (C-12), 175.45 (C-24), 212.39 (C-3).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>DO<sub>5</sub> [M+K]<sup>+</sup> izračunato 446.24136, nađeno 446.24155.

**4.44. 2-(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-3-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (48)**

U ohlađen (-20 °C) rastvor jedinjenja **26** (0.0713 g, 0.15 mmol) u anh. THF (2 mL) doda se rastvor BuMgCl u Et<sub>2</sub>O (2 M, 2 mL, 4 mmol), i potom još jedna porcija (2 mL, 4 mmol) nakon 2 h mešanja. Reakciona smeša se meša ukupno 4 h na -20 °C, nakon čega se temperatura povisi na sobnu temperaturu i nakon 18 h mešanja reakcija se prekida dodavanjem zasićenog rastvora NH<sub>4</sub>Cl (10 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (4x10 mL), organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečišćava fleš hromatografijom (EtOAc:toluen:MeOH=7:2:1). Dobija se jedinjenje **48** u obliku čvrstog ulja i u prinosu od 0.0059 g (8%).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3401, 2925, 2865, 1705, 1652, 1548.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.62 (s, 3H, H-18), 0.92-0.94 (više signala, 6H, H-19 i H-21), 1.16 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> amida), 3.69 (s, 1H, H-7), 3.82 (s, 2H, H-12), 4.16 (d, *J*=2.8 Hz, 1H, OH), 4.33 (d, *J*=3.2 Hz, 1H, OH), 4.91 (s, 1H, OH amida), 7.24 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 12.77 (C-18), 17.68 (C-21), 21.95, 23.19, 24.18 (2xCH<sub>3</sub> amida), 27.04, 27.72, 29.16, 32.19, 33.64, 34.34, 34.94, 35.56, 36.65, 36.91, 41.78, 43.22, 45.82, 46.30, 46.69, 54.58, 66.77, 68.18, 71.45, 173.36 (C-24), 212.34 (C-3).

**4.45. 7-Butil-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -hol-6-en-24-ska kiselina (49) i (E)-7-butiliden-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (50)**

Jedinjenje **39** (0.3310 g, 0.64 mmol) se rastvori u 2 M HCl (30 mL) i zagreva uz refluks u toku 10 minuta. Reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu i ekstrahuje sa EtOAc (4x20 mL). Ekstrakti se spoje, isperu zasićenim rastvorom NaCl do pH 7, osuše i upare. Sirova reakciona smeša se prečišćava fleš hromatografijom [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc=1:1, zatim CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=95:5, zatim toluen:EtOAc=1:1. U sva tri eluenta se doda AcOH (5 mL po 1 L eluenta)]. Dobija se jedinjenje **49** u obliku kristala (0.1240, 43%, t.

t. 164 °C nakon prekrizacije iz EtOAc) i jedinjenje **50** u prinosu od 0.0855 g (30%) u obliku kristala (t. t. 98 °C nakon prekrizacije iz EtOAc).

Spektroskopski podaci za jedinjenje **49**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3401, 2931, 2870, 1709, 1458, 1378, 1242, 1215, 1031, 758.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.68 (s, 3H, H-18), 0.69 (s, 3H, H-19), 0.85 (t,  $J=6.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  butil niza), 0.95 (d,  $J=6.5$  Hz, 3H, H-21), 3.80 (s, 1H, H-12), 5.31 (d,  $J=5.7$  Hz, 1H, H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 13.06 (C-18), 14.42 ( $\text{CH}_3$  butil niza), 17.51 (C-21), 22.51 (C-19), 22.64, 26.49, 27.85, 29.40, 30.35, 31.35, 31.74, 32.45, 32.96, 34.82, 35.31, 36.77, 40.06, 43.88, 44.95, 47.82, 48.78, 56.29, 69.77 (C-3), 70.83 (C-12), 128.08 (C-6), 139.05 (C-7), 176.09 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  izračunato 469.32883, nađeno 469.32841.

Spektroskopski podaci za jedinjenje **50**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 2870, 1709, 1455, 1379, 1215, 1067, 758, 735, 612.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.73 (s, 3H, H-18), 0.91 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  butilidena), 1.03 (d,  $J=6.0$  Hz, 3H, H-21), 1.06 (s, 3H, H-19), 3.64 (m, 1H, H-3), 4.04 (s, 1H, H-12), 5.24 (t,  $J=6.8$  Hz, 1H, CH butilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 13.04 (C-18), 14.08 ( $\text{CH}_3$  butilidena), 17.43 (C-21), 23.28, 23.38 (C-19), 24.94, 27.62, 28.43, 29.72, 29.97, 30.83, 31.09, 32.07, 34.93, 35.22, 35.52, 35.96 (C-9), 36.05, 41.47, 42.60, 44.80, 46.73 (C-17), 46.77 (C-13), 71.64 (C-3), 72.70 (C-12), 121.84 (CH butilidena), 137.66 (C-7), 178.62 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  izračunato 464.37344, nađeno 464.37258.

#### 4.46. **3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-7-oktil-5 $\beta$ -hol-6-en-24-ska kiselina (51) i (E)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-7-oktiliden-5 $\beta$ -holanska kiselina (52)**

Jedinjenju **40** (0.3468 g, 0.6 mmol) se doda 2 M rastvor HCl (30 mL) i zagreva uz refluks u toku 10 minuta. Nakon toga, reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu i ekstrahuje sa EtOAc (5 $\times$ 20 mL). Ekstrakti se spoje, isperu zasićenim rastvorom NaCl do pH 7, osuše i upare. Sirova reakciona smeša se prečišćava fleš hromatografijom [toluen:EtOAc=1:1, zatim toluen:MeOH=9:1, u oba eluenta se doda AcOH (5 mL po 1 L eluenta)]. Dobija se jedinjenje **51** u obliku čvrstog ulja, u prinosu od 0.1322 g (44%) i jedinjenje **52** u prinosu od 0.0634 g (21%), u obliku čvrstog ulja.

Spektroskopski podaci za jedinjenje **51**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3402, 2926, 2856, 1709, 1458, 1378, 1243, 1215, 1042, 759.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.75 i 0.77 (2s, 2 $\times$ 3H, H-18 i H-19), 0.88 (t,  $J=6.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  oktil niza), 1.02 (d,  $J=5.5$  Hz, H-21), 3.62 (m, 1H, H-3), 3.97 (s, 1H, H-12), 5.38 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H, H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.91 (C-18), 14.09, 17.21, 21.94, 22.66, 26.34, 28.04, 28.90, 29.30, 29.45, 29.56, 30.60, 31.37, 31.85, 32.27, 33.22, 34.42, 35.68, 37.05, 38.74, 40.18, 43.72, 45.88, 48.37, 48.95, 71.53, 72.84, 127.28 (C-6), 139.42 (C-7), 178.21 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  izračunato 525.39143, nađeno 525.39052.

Spektroskopski podaci za jedinjenje **52**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3400, 2926, 2869, 1709, 1456, 1379, 1061, 908, 735, 612.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.71 (s, 3H, H-18), 0.89 (t,  $J=6.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  oktilidena), 1.00–1.03 (6H, H-19 i H-21), 3.62 (m, 1H, H-3), 4.03 (s, 1H, H-12), 5.20 (m, 1H, CH oktilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.94, 14.06, 17.37, 22.61, 23.29, 24.90, 27.57, 28.29, 29.19, 29.43, 29.84, 30.11, 30.78, 31.21, 31.80, 32.01, 34.91, 35.28, 35.47, 35.85, 35, 96, 41.34, 42.54, 44.75, 46.65, 46.71, 71.51, 72.65, 121.93 (CH oktilidena), 137.39 (C-7), 178.65 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 503.40949, nađeno 503.40854.

#### 4.47. (E)-7-Etiliden-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (53)

Rastvoru  $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{CH}_3]^+\text{Br}^-$  (0.7958 g, 2.14 mmol) u anh. THF (12 mL) doda se *t*-BuOK (0.3370 g, 3.00 mmol) i zagreva na temperaturi ključanja u atmosferi argona u toku 15 minuta. Zatim se doda rastvor jedinjenja **5** (0.1743 g, 0.43 mmol) u anh. THF (7 mL) i zagreva 5 h uz refluks. Reakcija se prekida dodavanjem HCl (0.1 M, 6 mL) nakon čega se reakciona smeša ekstrahuje sa EtOAc (4 $\times$ 10 mL). Organske faze se spoje, osuše i upare. Sirova smeša se prečišćava fleš hromatografijom (aceton: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ =1:5, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta). Dobija se jedinjenje **53** u obliku čvrstog ulja u prinosu od 0.0146 g (8%).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 756, 1709, 2869, 2940, 3402.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 0.61 (s, 3H, H-18), 0.92 (d,  $J=6.5$  Hz, 3H, H-21), 0.97 (s, 3H, H-19), 1.52 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  etilidena), 3.35 (m, 1H, H-3), 3.82 (s, 1H, H-12), 5.23 (q,  $J=6.5$  Hz, 1H, CH etilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 12.71 (C-18), 12.88 ( $\text{CH}_3$  etilidena), 17.17 (C-21), 23.37 (C-19), 24.71 (C-15), 27.18, 28.59 (C-11), 30.09, 31.02, 31.41 (C-6), 31.49, 34.76, 34.87, 35.19, 35.81, 36.14, 40.63 (C-14), 42.45, 44.64, 45.65, 46.17 (C-13), 69.54 (C-3), 70.32 (C-12), 113.63 (CH etilidena), 139.63 (C-7), 175.32 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_4$   $[2\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 837.62390, nađeno 837.62277.

#### 4.48. 2-((E)-7-Etiliden-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il)-4,4-dimetiloksazolin (54)

Rastvoru  $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{CH}_3]^+\text{Br}^-$  (18.90 g, 50.91 mmol) u anh. THF (140 mL) doda se *t*-BuOK (5.71 g, 50.89 mmol) i zagreva na temperaturi ključanja u atmosferi argona u toku 45 minuta. Potom se doda rastvor jedinjenja **27**, (4.6620 g, 10.14 mmol) u anh. THF (100 mL) i nastavi sa zagrevanjem uz refluks u narednih 7.5 h. Reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu, a zatim doda zasićen rastvor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (150 mL), pa ekstrahuje sa EtOAc (4 $\times$ 50 mL). Organski slojevi se spoje, osuše i upare. Sirova smeša se prečisti fleš hromatografijom (aceton: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ =1:2). Dobija se jedinjenje **54** u prinosu od 3.1125 g (65%, čvrsto ulje).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 2939, 2867, 1726, 1662, 1458, 1379.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.68 (s, 3H, H-18), 0.99–1.01 (više signala, 6H, H-19 i H-21), 1.25 (s, 6H, 2 $\times$  $\text{CH}_3$  na C-4'), 1.56 (d,  $J=7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  etilidena), 3.58 (m, 1H, H-3), 3.88 (s, 2H, H-5'), 3.99 (s, 1H, H-12), 5.31 (q,  $J=7.5$  Hz, 1H, CH etilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.99 (C-18), 13.02 ( $\text{CH}_3$  etilidena), 17.60 (C-21), 23.49 (C-19), 24.79, 25.09, 27.50, 28.32 i 28.37 ( $2\times\text{CH}_3$  na C-5'), 28.53, 30.30, 31.54, 32.00, 34.88, 35.02, 35.51, 36.18, 36.32, 41.32, 42.72, 45.10, 46.46, 46.71, 66.74, 71.30 (C-3), 72.42 (C-12), 78.89 (C-5'), 115.17 (CH etilidena), 138.83 (C-7), 166.58 (C-2').

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 472.37852, nađeno 472.37813.

#### 4.49. (E)-7-Etiliden-3 $\alpha$ -hidroksi-12-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (55)

Rastvoru  $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{CH}_3]^+\text{Br}^-$  (0.9177 g, 2.47 mmol) u anh. THF-u (10 mL) doda se *t*-BuOK (0.5925 g, 5.28 mmol). Smeša se zagreva na temperaturi ključanja u atmosferi argona u toku 15 minuta. Potom se doda rastvor jedinjenja **12** (0.2136 g, 0.53 mmol) u anh. THF (6 mL) i zagreva 8.5 h. Reakcija se prekida dodatkom HCl (0.1 M, 10 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc ( $3\times 10$  mL) organski slojevi se spoje, osuše i upare. Sirova smeša se prečisti fleš hromatografijom (toluen:EtOAc=1:1, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta). Dobija se čisto jedinjenje **55** u obliku belih, igličastih kristala, u prinosu od 0.0235 g (11%, t. t. 189–191 °C nakon prekrizalizacije iz smeše aceton-heksan).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3376, 2931, 1705, 753.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 0.72 (d,  $J=5.9$  Hz, 3H, H-21), 0.98 (s, 3H, H-18), 1.09 (s, 3H, H-19), 1.50 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  etilidena), 3.35 (m, 1H, H-3), 5.19 (q,  $J=6.8$  Hz, 1H, CH etilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 11.73 (C-18), 13.18 ( $\text{CH}_3$  etilidena), 18.82 (C-21), 23.06 (C-19), 25.77 (C-15), 27.36, 30.12, 30.54, 31.32, 31.59, 34.73, 35.26, 36.17, 36.53, 38.11 (C-11), 42.24, 43.93, 45.70, 47.05 (C-9), 53.83 (C-14), 56.69, 69.41 (C-3), 115.10 (CH etilidena), 138.41 (C-7), 175.21 (C-24), 214.73 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  izračunato 434.32649, nađeno 434.32439.

#### 4.50. 2-[(E)-7-Etiliden-3 $\alpha$ -hidroksi-12-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolin (56)

Rastvoru  $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{CH}_3]^+\text{Br}^-$  (0.6173 g, 1.66 mmol) u anh. THF (10 mL) doda se *t*-BuOK (0.1950 g, 1.74 mmol). Smeša se zagreva u atmosferi argona, uz refluks u toku 45 minuta. Potom se doda rastvor jedinjenja **31** (0.1483 g, 0.32 mmol) u anh. THF (9 mL) i zagreva još 105 minuta. Reakcija se prekida izlivanjem u zasićen rastvor NaCl (100 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc ( $3\times 40$  mL), organski slojevi se spoje, osuše i upare. Sirova smeša se prečisti fleš hromatografijom (aceton:Et<sub>2</sub>O=1:10). Dobija se čisto jedinjenje **56** u prinosu od 0.0737 g (48%, čvrsto ulje).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3356, 2967, 2933, 2868, 1706, 1664, 1462, 1365, 1072, 753.

$^1\text{H}$  NMR spektar (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.85 (d,  $J=6.5$  Hz, 3H, H-21), 1.05 (s, 3H, H-18), 1.17 (s, 3H, H-19), 1.26 (s, 6H,  $2\times\text{CH}_3$  na C-4'), 1.56 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  etilidena), 3.59 (m, 1H, H-3), 3.88 (s, 2H, H-5'), 5.22 (q,  $J=6.6$  Hz, 1H, CH etilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR spektar (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 11.77 ( $\text{CH}_3$ ), 13.03 ( $\text{CH}_3$ ), 18.63 ( $\text{CH}_3$ ), 23.05 ( $\text{CH}_3$ ), 25.49, 25.89, 27.58, 28.31, 28.39, 30.21, 31.61, 34.86, 35.73, 36.08, 36.59, 38.16, 42.55, 44.23, 45.58, 46.82, 53.66, 56.93, 66.75 (C-4'), 70.93 (C-3), 78.85 (C-5'), 115.96 (CH etilidena), 137.53 (C-7), 166.48 (C-2'), 214.78 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $C_{30}H_{47}NO_3$   $[M+H]^+$  izračunato 470.36287, nađeno 470.36286.

#### 4.51. (E/Z)-3-Etiliden-7,12-diokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (57a i 57b) i (3E/Z,7E)-3,7-dietiliden-12-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (58a i 58b)

Rastvoru  $[Ph_3PCH_2CH_3]^+Br^-$  (2.3170 g, 6.24 mmol) u anh. THF (30 mL) doda se *t*-BuOK (0.4636 g, 4.13 mmol). Smeša se zagreva u atmosferi argona, uz refluks u toku 15 minuta. Potom se smeši doda rastvor dehidroholne kiseline (**13**, 0.4995 g, 1.24 mmol) u anh. THF (12 mL) i zagreva još 3.5 h. Reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu i reakcija prekine dodavanjem HCl (1:1, 5 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (4 $\times$ 10 mL) organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečisti fleš hromatografijom (toluen:EtOAc=9:1, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta). Dobija se smeša jedinjenja **57a** i **57b** u obliku belih kristala, u prinosu od 0.0911 g (15%) i smeša jedinjenja **58a** i **58b** u prinosu od 0.2248 g (39%, čvrsto ulje).

Spektroskopski podaci za smešu **57a** i **57b**:

IR spektar (film,  $cm^{-1}$ ): 3446, 1716, 1701, 843.

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 0.75 (d,  $J$ =5.6 Hz, 3H, H-21), 0.99 (s, 3H, H-18), 1.25 (s, 3H, H-19), 1.50 (d,  $J$ =6.5 Hz,  $CH_3$  etilidena), 5.10 (m, 1H, CH etilidena).

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 11.41 (C-18), 12.43 i 12.45 ( $CH_3$  etilidena), 18.65 (C-21), 21.98, 22.26 i 22.34 (C-19), 24.64, 27.21, 29.34, 30.33, 30.37, 31.12, 34.99, 36.05, 36.41, 36.43, 36.87, 37.69, 38.15, 38.17, 44.42, 44.48, 44.92, 45.10, 45.32, 46.46, 47.27, 47.90, 47.94, 51.61, 56.23, 115.75 i 115.86 (CH etilidena), 137.79 i 137.92 (C-3), 174.81 (C-24), 209.90 i 209.94 (C-7), 212.31 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $C_{26}H_{38}O_4$   $[M+H]^+$  izračunato 415.28429, nađeno 415.28292.

Spektroskopski podaci za smešu **58a** i **58b**:

IR spektar (film,  $cm^{-1}$ ): 2931, 1708, 757.

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 0.74 (d,  $J$ =5.6 Hz, 3H, H-21), 1.01 (s, 3H, H-18), 1.12 (s, 3H, H-19), 1.48–1.52 (više signala, 6H,  $2 \times CH_3$  etilidena), 5.07 (m, 1H, CH etilidena na C-3), 5.23 (m, 1H, CH etilidena na C-7).

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 11.46 (C-18), 12.45 i 12.89 i 12.95 ( $CH_3$  etilidena), 18.56 (C-21), 22.22, 22.96 (C-19), 23.05, 25.44, 27.06, 27.90, 30.30, 30.71, 31.11, 31.16, 31.39, 34.99, 36.33, 36.89, 37.26, 37.28, 37.76, 37.89, 39.01, 39.17, 39.34, 39.51, 39.67, 39.84, 40.01, 41.92, 45.43, 45.76, 46.29, 46.34, 46.59, 53.20, 56.31, 114.76 i 114.89 (CH etilidena na C-3), 115.10 i 115.19 (CH etilidena na C-7), 137.89 (C-7), 138.99 i 139.03 (C-3), 174.79 (C-24), 213.68 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $C_{28}H_{42}O_3$   $[2M+H]^+$  izračunato 853.63407, nađeno 853.63382.

#### 4.52. 2-[(E/Z)-3-Etiliden-7,12-diokso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolin (59a i 59b) i 2-[(3E/Z,7E)-3,7-dietiliden-12-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolin (60a i 60b)

U rastvor  $[Ph_3PCH_2CH_3]^+Br^-$  (0.4284 g, 1.15 mmol) u anh. THF (5 mL) doda se NaH (0.0351 g, 1.46 mmol) i zagreva u atmosferi argona uz refluks u toku 45 minuta. Potom se doda rastvor jedinjenja **32** (0.1038 g, 0.23 mmol) u anh. THF (4 mL) i zagreva još 3 h. Reakcija se prekida izlivanjem reakcione smeše u



zasićen rastvor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc ( $3 \times 10$  mL) organske faze se spoje, osuše i upare. Ostatak se prečisti fleš hromatografijom (toluen:EtOAc=7:3), pri čemu se dobija smeša *E* i *Z* izomera, **59a** i **59b** u prinosu od 0.0150 g (14%, čvrsto ulje) i smeša **60a** i **60b** u prinosu od 0.0730 g (69%, čvrsto ulje).

Spektroskopski podaci za smešu **59a** i **59b**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2959, 2926, 1709, 1666, 1276.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.87 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H, H-21), 1.04 (s, 3H, H-18), 1.27 (s, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$  na C-4'), 1.29 (s, 3H, H-19), 1.54 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  etilidena), 3.91 (s, 2H, H-5'), 5.27 (m, 1H, CH etilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 11.76 (C-18), 12.59, 18.72, 22.27, 22.68, 22.76, 25.22, 25.64, 27.76, 28.36 i 28.43 ( $\text{CH}_3$  na C-4'), 29.65, 30.62, 31.67, 35.78, 36.48, 36.80, 37.26, 38.05, 38.44, 45.22, 45.30, 45.42, 45.49, 45.69, 46.99, 47.80, 48.95, 49.01, 51.83, 56.85, 66.79 (C-4'), 78.90 (C-5'), 116.82 i 116.89 (CH etilidena), 137.18 i 137.33 (C-3), 166.46 (C-2'), 209.96 (C-7), 212.79 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 468.34722, nađeno 468.34710.

Spektroskopski podaci za smešu **60a** i **60b**:

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3030, 2991, 2939, 1725, 1635.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.87 (s, 3H, H-18), 1.04 (d,  $J=6.0$  Hz, 3H, H-21), 1.09 (s, 3H, H-19), 1.25 (s, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$  na C-4'), 1.55–1.58 (više signala, 6H,  $\text{CH}_3$  etilidena), 3.89 (s, 2H, H-5'), 5.43 (m, 1H, CH etilidena na C-3), 5.59 (m, 1H, CH etilidena na C-7).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 11.89, 12.65, 19.53, 22.07, 24.84, 25.64, 27.54, 28.31, 28.56, 28.43, 29.97, 31.91, 32.66, 32.85, 33.37, 35.88, 37.02, 38.47, 40.91, 41.47, 42.28, 47.13, 52.12, 54.89, 66.79 (C-4'), 78.86 (C-5'), 116.09 (CH etilidena na C-3), 123.95 (CH etilidena na C-7), 134.23, 137.96, 138.09, 138.18, 166.48 (C-2'), 204.91 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{NO}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 480.38361, nađeno 480.38207.

#### 4.53. (*E*)-7-Etiliden-3,12-diokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (**61**)

U ohlađen (0 °C) rastvor jedinjenja **53** (0.0725 g, 0.17 mmol) u acetonu (16 mL) ukapava se Jones-ov reagens\* (0.7 mL) do pojave stabilne narandžaste boje. Posle 20 minuta reakcija se prekida dodavanjem izopropanola. Reakciona smeša se upari i ostatak rastvori u vodi (15 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc ( $3 \times 10$  mL), organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ =1:6, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta). Dobija se čisto jedinjenje **64** u obliku belih kristala (t. t. 107 °C nakon prekrizalizacije iz acetona) u prinosu od 0.0608 g (85%).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2962, 2875, 1709, 1461, 1433, 1385.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.84 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H, H-21), 1.09 i 1.25 (2s,  $2 \times 3\text{H}$ , H-18 i H-19), 1.53 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  etilidena), 5.34 (q,  $J=6.6$  Hz, 1H, CH etilidena).

---

\* Jones-ov reagens je pripremljen na način kako je opisano u postupku 4.8.

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 11.81 (C-18), 12.94, 18.46, 22.37, 25.75, 27.39, 30.10, 31.21, 31.27, 35.42, 36.21, 36.52, 36.64, 38.17, 41.93, 42.35, 45.66, 46.07, 46.93, 53.57, 56.97, 117.66 (CH etilidena), 136.38 (C-7), 179.68 (C-24), 212.33 (C-3), 214.35 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 415.28429, nađeno 415.28309.

#### 4.54. 2-[(*E/Z*)-3-(2-Metoksi-2-oksoetiliden)-7,12-diokso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolin (62a i 62b)

U rastvor trimetilfosfonoacetata (0.09 mL, 0.56 mmol) u anh. THF (3 mL) doda se *t*-BuOK (0.06 g, 0.53 mmol) i meša 15 minuta uz refluks. Potom se doda rastvor jedinjenja **32** (0.0391 g, 0.09 mmol) u anh. THF (3 mL). Reakciona smeša se zagreva na temperaturi ključanja 45 minuta, a zatim ohladi na sobnu temperaturu, doda zasićen rastvor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL) i ekstrahuje sa EtOAc (3 $\times$ 10 mL). Organske faze se osuše i upare, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:petroletar=1:3). Dobija se smeša *E* i *Z* izomera **62a** i **62b** u obliku ulja u prinosu od 0.0248 g (55%).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2967, 2203, 1713, 1665, 1463, 1275.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.86 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H, H-21), 1.03 (s, 3H, H-18), 1.28 (s, 6H, 2 $\times$  $\text{CH}_3$  na C-4'), 1.36 (s, 3H, H-19), 3.66 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  metoksi-2-oksoetilidena), 3.88 (s, 2H, H-5'), 5.59 i 5.62 (2s, CH metoksi-2-oksoetilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR (62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 11.73 (C-18), 18.69, 22.28, 22.37, 23.82, 25.14, 25.52, 27.70, 28.32 i 28.40 (2 $\times$  $\text{CH}_3$  na C-4'), 30.79, 31.63, 31.73, 35.73, 36.40, 38.44, 38.52, 38.69, 45.16, 45.24, 45.42, 45.49, 47.39, 47.99, 48.86, 48.92, 50.90, 51.70, 51.78, 56.81, 66.77 (C-4'), 78.86 (C-5'), 113.91 (CH metoksi-2-oksoetilidena), 160.20 i 160.26 (C-3), 166.38 (C-2'), 166.69 i 166.76 (C=O metoksi-2-oksoetilidena), 209.16 i 209.34 (C-7), 212.25 i 212.42 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ :  $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato 512.33705, nađeno 512.33595.

#### 4.55. (*E/Z*)-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-3-(2-metoksi-2-oksoetiliden)-5 $\beta$ -holanska kiselina (63a i 63b)

U rastvor trimetilfosfonoacetata (0.24 mL, 1.49 mmol) u anh. THF (4 mL) doda se *t*-BuOK (0.16 g, 1.43 mmol). Smeša se meša 15 minuta uz refluks, nakon čega se doda rastvor jedinjenja **4** (0.0985 g, 0.24 mmol) u anh. THF (4 mL). Reakciona smeša se zagreva na temperaturi ključanja u toku 50 minuta, potom ohladi na sobnu temperaturu i doda zasićen rastvor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL). Nakon ekstrakcije sa EtOAc (3 $\times$ 10 mL) organske faze se osuše i upare. Sirova reakciona smeša se prečisti fleš hromatografijom (aceton: $\text{CH}_2\text{Cl}_2=2:7$ , zatim EtOAc: $\text{CH}_2\text{Cl}_2=1:1$ , uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta), pri čemu se dobija smeša *E* i *Z* izomera **63a** i **63b** u prinosu od 0.0403 g (36%, čvrsto ulje).

IR spektar (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3460, 2945, 2868, 1740, 1717, 1646, 1169.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0.72 i 0.73 (2s, 3H, H-18), 0.93 (s, 3H, H-19), 1.02 (d,  $J=5.9$  Hz, 3H, H-21), 3.69 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  metoksi-2-oksoetilidena), 3.91 (s, 1H, C-7), 4.02 i 4.04 (2m, 1H, H-12), 5.59 (s, 1H, CH metoksi-2-oksoetilidena).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.55 (C-18), 17.30 (C-21), 22.23, 22.32 (C-19), 23.16, 24.65, 26.89, 27.45, 28.50, 28.57, 29.70, 30.71, 30.82, 30.88, 34.11, 35.15, 35.39, 35.45, 37.83, 39.45, 39.58, 41.35, 41.89,

43.92, 44.75, 46.53, 46.56, 47.09, 47.16, 50.78 i 50.79 (CH<sub>3</sub> metoksi-2-oksoetilidena), 68.44 i 68.47 (C-7), 72.92 i 73.11 (C-12), 111.49 (CH metoksi-2-oksoetilidena), 165.11 (C-3), 167.44 i 167.48 (C=O metoksi-2-oksoetilidena), 178.49 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ : C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub> [M+K]<sup>+</sup> izračunato 501.26130, nađeno 501.26142.

#### 4.56. (E)-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-3-(karboksimetilen)-5 $\beta$ -holanska kiselina (64)

Rastvoru jedinjenja **63** (0.0660 g, 0.14 mmol) u metanolu (20 mL) doda se KOH (0.80 g, 14.26 mmol) i zagreva uz refluks u toku 1 h. Reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu i upari do suva. Ostatak se rastvori u vodi (50 mL), zakiseli sa HCl (1:1) do pH 1 i ekstrahuje sa EtOAc (3 $\times$ 10 mL). Ekstrakti se spoje, osuše i upare, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta), pri čemu se dobija jedinjenje **64** u prinosu od 0.0461 g (72%, t. t. 102 °C nakon prekrizalizacija iz acetona).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3428, 2925, 2871, 1714, 168.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.61 (s, 3H, H-18), 0.89 (s, 3H, H-19), 0.92 (d,  $J$ =6.4 Hz, 3H, H-21), 2.81 (s, 2H, H-4), 3.56 (d,  $J$ =2.1 Hz, 1H, H-7), 3.78 (d,  $J$ =2.2 Hz, 1H, H-12), 4.04 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H, OH na C-12), 5.40 (s, 1H, CH karboksimetilena), 11.96 (bs, 2H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 12.80 (C-18), 17.42 (C-21), 22.28 (C-19), 23.25, 24.98, 26.48 (C-5), 27.63, 29.53, 31.26, 33.20, 34.37, 35.19 (C-20), 35.45, 41.99, 42.01, 43.15, 46.25 (C-13), 46.58 (C-17), 67.01 (C-7), 71.47 (C-12), 127.90 (C-3), 132.19 (CH karboksimetilena), 173.34 (COOH karboksimetilena), 175.45 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ : C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub> [M+CF<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup> izračunato 561.26808, nađeno 561.26679.

#### 4.57. 2-[(E)-7-Etiliden-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holan-24-amido]-2-metil-1-propanol (65)

U rastvor jedinjenja **53** (0.7803 g, 1.86 mmol) u EtOAc (16 mL) doda se TEA (0.3 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.25 mL, 2.62 mmol) i EEDQ (0.62 g, 2.55 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 5 h, nakon čega se ispere sa HCl (10%, 1 $\times$ 4 mL), H<sub>2</sub>O (1 $\times$ 4 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4 $\times$ 4 mL) i vodom do pH 7. Organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:CHCl<sub>3</sub>=1:1), pri čemu se dobija čisto jedinjenje **65** u prinosu od 0.6930 g (76%), u obliku ulja.

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3322, 2938, 2867, 1647, 1552, 1455, 1379.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.70 (s, 3H, H-18), 1.01 (d,  $J$ =6.1 Hz, 3H, H-21), 1.04 (s, 3H, H-19), 1.24 (s, 6H, 2 $\times$ CH<sub>3</sub> amida), 1.55 (d,  $J$ =6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> etilidena), 3.47 (s, 2H, CH<sub>2</sub> amida), 5.30 (m, 1H, CH etilidena), 7.02 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 12.65, 12.73, 17.29, 23.42, 23.86 (2 $\times$ CH<sub>3</sub> amida), 25.13, 27.64, 28.64, 30.37, 31.76, 32.16, 33.60, 35.21, 35.43, 35.71, 36.50, 36.54, 41.29, 43.13, 45.48, 46.28, 46.85, 55.31, 69.91, 70.69, 71.70, 114.37 (CH etilidena), 139.91 (C-7), 174.49 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ : C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>4</sub> [M+K]<sup>+</sup> izračunato 528.34497, nađeno 528.34503.

#### 4.58. 2-[(E)-7-Etiliden-3 $\alpha$ -hidroksi-12-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido]-2-metil-1-propanol (66)

Rastvoru jedinjenja **55** (0.1552 g, 0.37 mmol) u EtOAc (3 mL) doda se TEA (0.1 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.1 mL, 1.03 mmol) i EEDQ (0.12 g, 0.49 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 5 h nakon čega se ispere sa HCl (10%, 1×4 mL), H<sub>2</sub>O (1×4 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4×4 mL) i vodom do pH 7. Organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:CHCl<sub>3</sub>=1:4), pri čemu se dobija jedinjenje **66** u prinosu od 0.1135 g (62%).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3324, 2928, 2244, 1704, 1644, 1549, 1453, 1383.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.77 (d,  $J$ =6.1 Hz, 3H, H-21), 0.99 i 1.10 (2s, 2x3H, H-18 i H-19), 1.23 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> amida), 1.50 (d,  $J$ =6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> etilidena), 3.48 (s, 2H, CH<sub>2</sub> amida), 5.15 (m, 1H, CH etilidena), 6.08 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 11.67, 12.92, 18.59, 22.92, 24.39, 24.44, 25.73, 27.39, 29.96, 30.95, 31.49, 33.83, 34.73, 35.35, 35.83, 36.47, 38.04, 42.36, 44.05, 45.30, 46.80, 53.69, 55.76, 56.83, 70.58, 70.64, 115.74 (CH etilidena), 137.41 (C-7), 174.64 (C-24), 215.20 (C-12).

HRMS (TOF)  $m/z$ : C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 488.37344, nađeno 488.37325.

#### 4.59. 2-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (67)

U rastvor holne kiseline (0.7293 g, 1.79 mmol) u EtOAc (20 mL) i MeOH (5 mL) doda se TEA (0.3 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.5 mL, 5.13 mmol) i EEDQ (0.61 g, 2.49 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 6 h nakon čega se prenese u levak za odvajanje i ispere sa HCl (10%, 1×6 mL), H<sub>2</sub>O (1×6 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4×6 mL) i vodom do pH 7. Organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (EtOAc:acetone=3:2), pri čemu se dobija jedinjenje **67** u prinosu od 0.6094 g (71%, beli kristali, t. t. 240 °C nakon prekrizacije iz acetona, lit.<sup>223</sup> t. t. 238–240 °C).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3405, 2934, 2868, 1629, 1552, 1458, 1369, 1078.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.59 (s, 3H, H-18), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.93 (d,  $J$ =6.5 Hz, 3H, H-21), 1.16 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> amida), 3.19 (m, 1H, H-3), 3.62 (s, 1H, H-7), 3.79 (d,  $J$ =2.9 Hz, 1H, H-12), 4.01 (d,  $J$ =3.4 Hz, 1H, OH), 4.09 (d,  $J$ =3.5 Hz, 1H, OH), 4.32 (d,  $J$ =4.3 Hz, 1H, OH), 4.90 (t,  $J$ =5.9 Hz, 1H, OH amida), 7.23 (s, 1H, NH),

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 12.80 (C-18), 17.66 (C-21), 23.10 (C-19), 23.28, 24.19 (2xCH<sub>3</sub> amida), 26.68, 27.78, 29.03, 30.87, 32.19, 33.64, 34.86, 35.36, 35.61, 35.78, 41.83, 41.98, 46.20, 46.63, 54.58, 66.70 (C-7), 68.17 (CH<sub>2</sub> amida), 70.90 (C-3), 71.48 (C-12), 173.38 (C-24).

HRMS (TOF)  $m/z$ : C<sub>28</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> izračunato 480.36835, nađeno 480.36843.

#### 4.60. 2-(3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-7-okso-5 $\beta$ -holan-24-amido)-2-metil-1-propanol (68)

U rastvor jedinjenja **5** (0.7083 g, 1.74 mmol) u EtOAc (15 mL) i vodi (3 mL) doda se TEA (0.3 mL), 2-amino-2-metil propanol (0.6 mL, 6.16 mmol) i EEDQ (0.58 g, 2.34 mmol). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 8 h, nakon čega se prenese u levak za odvajanje i ispere sa HCl (10%, 1×6 mL), H<sub>2</sub>O (1×6 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (4×4 mL) i vodom do pH 7. Organske faze se spoje, osuše i upare, a

ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:CHCl<sub>3</sub>=1:1), pri čemu se dobija jedinjenje **68** u prinosu od 0.3994 g (47%, beli kristali, t. t. 233 °C nakon prekrizalizacije iz acetona, lit.<sup>211</sup> t. t. 229–231 °C).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3392, 2958, 2930, 2871, 1731, 1272.

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.58 (s, 3H), 0.91 (d, *J*=6.0 Hz, 3H, H-21), 1.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> amida), 3.33 (s, 2H, CH<sub>2</sub> amida), 3.79 (s, 1H, C-12), 4.31 (d, *J*=3.8 Hz, 1H, OH), 4.55 (d, *J*=4.4 Hz, 1H, OH), 4.91 (t, *J*=5.7 Hz, 1H, OH amida), 7.24 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 12.51, 17.27, 22.63, 23.71 (2xCH<sub>3</sub>), 24.04, 27.34, 29.26, 29.67, 31.72, 33.13, 34.34, 34.61, 34.88, 35.35, 37.44, 45.09, 45.40, 45.92, 48.83, 54.12, 67.73, 69.18, 70.12, 172.90 (C-24), 211.47 (C-7).

#### 4.61. 3α-Acetoksi-12α-hidroksi-7ξ-etil-5β-holanska kiselina (69)

Rastvoru jedinjenja **53** (0.0184 g, 0.04 mmol) u glacijalnoj AcOH (0.94 mL) doda se koncentrovana HCl (0.05 mL) i PtO<sub>2</sub> (0.021 g). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u atmosferi vodonika na atmosferskom pritisku u toku 4 h. U reakcionu smešu se potom doda voda (20 mL) i metanol (5 mL), procedi, upari do polovine zapremine i ekstrahuje sa EtOAc (2×20 mL). Organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=9:1, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta). Dobija se jedinjenje **69** u obliku čvrstog ulja u prinosu od 0.0149 g (73%).

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.81 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> etil niza), 0.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.00 (d, *J*=5.9 Hz, 3H, H-21), 2.02 (s, 3H, AcO), 3.97 (s, 1H, H-12), 4.71 (m, 1H, H-3).

<sup>13</sup>C NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 10.85 (CH<sub>3</sub> etil niza), 13.13 (C-18), 17.38 (C-19), 21.43 (C-21), 22.95 (CH<sub>3</sub> iz AcO), 26.27, 26.73, 27.58, 28.02, 29.52, 30.66, 30.90, 32.26, 33.44, 33.52, 34.97, 35.02, 36.73, 39.57, 41.70, 45.66, 47.95, 49.88, 72.66 (C-12), 74.12 (C-3), 170.78 (C=O iz AcO), 179.55 (C-24).

#### 4.62. 7ξ-Etil-3α,12α-dihidroksi-5β-holanska kiselina (70)

Rastvor jedinjenja **69** (0.0149, 0.03 mmol) u metanolnom rastvoru KOH (10%, 3 mL) zagreva se uz refluks u toku 1 h. Reakciona smeša se potom upari na 1/3 zapremine, doda se vodeni rastvor HCl (1:2, 20 mL) i ekstrahuje sa EtOAc (3×8 mL). Organske faze se spoje, osuše i upare, a ostatak prečisti fleš hromatografijom (aceton:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:2, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta), pri čemu se dobija jedinjenje **70** u prinosu od 0.0132 g (98%, čvrsto ulje).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3401, 2930, 2870, 1708.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.76–0.81 (više signala, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 0.93 (d, *J*=6.1 Hz, 3H, H-21), 3.75 (s, 1H, H-12), 4.20 (s, 1H, OH), 4.44 (bs, 1H, OH).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 11.16 (CH<sub>3</sub>), 13.28 (CH<sub>3</sub>), 17.49, 23.44, 27.09, 27.83, 28.19, 29.88, 30.50, 31.23, 31.32, 33.14, 33.64, 34.08, 35.39, 35.83, 36.96, 37.22, 39.46, 42.01, 44.91, 47.98, 49.48, 70.34, 70.91, 175.46 (C-24).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> izračunato 443.31318, nađeno 443.31348.

**4.63. 7ξ-Butil-3α,12α-dihidroksi-5β-holanska kiselina (71)**

U rastvor jedinjenja **49** (0.0343 g, 0.08 mmol) u MeOH (1.6 mL) doda se PtO<sub>2</sub> (0.0050 g). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u atmosferi vodonika. Nakon 32 h i 48 h u reakcionu smešu se doda po jedna porcija PtO<sub>2</sub> (0.0010 g), a nakon 5 dana još 1 mL MeOH. Nakon ukupno 7 dana intenzivnog mešanja u atmosferi vodonika, reakciona smeša se procedi, upari i prečisti fleš hromatografijom (toluen:MeOH=88:12, uz dodatak AcOH, 5 mL po 1 L eluenta). Dobija se jedinjenje **71** u prinosu od 0.0144 g (42%, čvrsto ulje).

IR spektar (film, cm<sup>-1</sup>): 3438, 2921, 2851, 1739.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0.59 (s, 3H, H-18), 0.88 (s, 6H, H-19 i CH<sub>3</sub> butil niza), 0.91 (m, 3H, H-21), 3.20 (m, 1H, H-3), 3.78 (s, 1H, H-12), 4.22 (d, *J*=2.5 Hz, 1H, OH na C-12), 4.48 (d, *J*=2.9 Hz, 1H, OH na C-3).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 12.65 (C-18), 14.63, 17.46 (C-21), 22.88, 23.49, 23.85, 27.48, 27.52, 28.12, 28.43, 28.93, 30.16, 30.91, 31.18, 31.25, 35.03, 35.32, 35.39, 35.69, 38.34, 42.04, 42.69, 46.35, 46.40, 49.05, 70.61 (C-3), 71.29 (C-12), 175.47 (C-24).

HRMS (TOF) *m/z*: C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub> [M+Cl]<sup>-</sup> izračunato 483.32466, nađeno 483.32459.

## 5. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije sintetizovani su alkil i alkiliden derivati ŽK, kako sa karboksilnom, tako i sa oksazolinskom grupom u C-17 bočnom nizu. Ispitana je biološka aktivnost odabranih novosintetizovanih derivata ŽK prema nekoliko ćelijskih linija humanih kancera i jednoj zdravoj ćelijskoj liniji, kao i prema četiri bakterijske kulture.

Kao polazna jedinjenja za realizaciju planiranih istraživanja korišćene su komercijalno dostupne žučne kiseline: holna kiselina (CA, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina) i dehidroholna kiselina (**13**, 3,7,12-triokso-5 $\beta$ -holanska kiselina). U prvoj fazi rada, CA je prevedena u 3-okso (**4**), 7-okso (**5**), 12-okso (**9**) i 7,12-diookso (**12**) derivate, radi dobijanja pogodnog, elektrofilnog centra na steroidnom skeletu. Za dobijanje jedinjenja **4**, CA je u reakciji esterifikacije sa mravljom kiselinom prevedena u triformil estar **1**, koji je selektivnom hidrolizom sa metanolnim rastvorom amonijaka preveden u diformil derivat **2** sa hidroksilnom grupom na C-3. Jedinjenje **2** je oksidacijom sa Jones-ovim reagensom prevedeno u keto derivat **3**, da bi se baznom hidrolizom dobio 3-okso derivat **4** (u prinosu od 81% računato u odnosu na CA). Regioselektivnom oksidacijom CA sa NBS-om u vodenom rastvoru NaHCO<sub>3</sub> dobijen je 7-okso derivat **5** u prinosu od 86%. U cilju dobijanja 12-okso derivata **9**, CA je prevedena u metilestar **6**, kome su, u reakciji sa acetanhidridom, selektivno acetilovane hidroksilne grupe u položaju C-3 i C-12, uz nastajanje diacetata **7**. Oksidacijom jedinjenja **7** sa Jones-ovim reagensom dobijen je derivat **8**, koji je saponifikovan do 12-okso derivata **9** (prinos 49% računato u odnosu na CA). U reakciji transesterifikacije sa butil-acetatom, CA je prevedena u dihidroksi derivat **10**, koji je oksidacijom sa NBS-om u *t*-BuOH dao **11**. Uklanjanjem acetoksi i butilestarske zaštite kod jedinjenja **11** dobijen 7,12-diookso derivat **12** u prinosu od 71% (računato u odnosu na CA).

Druga faza rada je obuhvatala dobijanje oksazolinskih derivata ŽK. Holna kiselina, kao i monookso derivati **4**, **5** i **9** su, najpre, u reakciji sa mravljom kiselinom prevedeni u odgovarajuće formiloksi estre **1**, **14**, **15** i **16**, respektivno, u visokim prinosima (82–99%). U narednom koraku je karboksilna grupa jedinjenja **1**, **14**, **15** i **16** prevedena u amid sa 2-amino-2-metilpropanolom uz korišćenje EEDQ-a, pri čemu su dobijeni amidi **17**, **18**, **19** i **20**, u prinosima od 90%, 76%, 92% i 60% respektivno. Amidi **17–20** su u reakciji sa tionil-hloridom na 0 °C u THF-u prevedeni u odgovarajuće oksazoline **21**, **22**, **23** i **24** u visokim prinosima (69–95%). Formiloksi estarska zaštita je uklonjena baznom hidrolizom sa KOH u ključalom metanolu. Na ovaj način sintetizovani su oksazolinski derivati **25**, **26**, **27** i **28** u prinosu od 90%, 77%, 78% i 95%, respektivno. Jedinjenja **12** i **13** su na sličan način prevedeni u amide **29** (60%) i **30** (68%), koji su u reakciji sa tionil-hloridom dali oksazoline **31** (83%) i **32** (77%).

U trećoj fazi rada keto derivati sa C-24 karboksilnom grupom, kao i derivati sa oksazolinskom grupom su podvrgnuti reakcijama sa Grignard-ovim reagensima. 7-Okso derivat **5** je u reakciji sa MeMgI, EtMgBr, BuMgCl i OktMgBr u THF-u na -20 °C dao odgovarajuće metil- **33**, etil- **34**, butil- **35** i oktil- **36** derivate u visokim prinosima od 83%, 88%, 94% i 83% respektivno. Reakcije su se odvijale stereoselektivno, pošto je dobijen samo jedan epimer. Kako je na osnovu rendgenostrukturalne analize derivata **33** utvrđena  $\beta$  konfiguracija metil grupe na C-7, pretpostavljeno je da su i kod derivata sa voluminoznijim alkil grupama, **34–36**, one takođe  $\beta$ -orijentisane. Oksazolinski 7-okso derivat **27** je takođe podvrgnut reakcijama sa navedenim Grignard-ovim reagensima, u THF-u na -20 °C, pri čemu su dobijeni metil- **37**, etil- **38**, butil- **39** i oktil- **40** derivati sa prinosima od 63%, 74%, 79% i 69%, respektivno. Ako se reakcija derivata **27** sa BuMgCl i OctMgBr odigrava na temperaturi ključanja

reakcione smeše, pored alkilovanja u položaju C-7, delimično dolazi i do parcijalne hidrolize oksazolinskog prstena i nastajanja amida **41** (25%) i **42** (26%), respektivno. Reakcijom 12-okso kiseline **9** sa MeMgI u THF-u na -20 °C dobija se 12 $\beta$ -metil-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (**43**) u prinosu od 83%. Reakcija je tekla stereoselektivno, a konfiguracija na C-12 je određena ROESY NMR eksperimentom. U reakcijama EtMgBr i BuMgCl sa **9**, na -20 °C, dobijaju se kompleksne smeše proizvoda sa CA kao dominantnim proizvodom (10% u slučaju reakcije sa BuMgCl). 12-Okso oksazolinski derivat **28** sa pomenutim Grignard-ovim reagensima daje metil- **44**, etil- **45**, butil- **46** i oktil- **47** derivate, u prinosima od 53%, 48%, 49% i 67%, respektivno. U reakciji EtMgBr, tj. BuMgCl, sa jedinjenjem **28**, pored očekivanih alkil derivata **45**, tj. **46**, nastaje i trihidroksi derivat **25** (17%, tj. 19%), kao rezultat redukcije C-12 keto grupe. Nastajanje redukcionog proizvoda se objašnjava sternim razlozima i izraženo je na temperaturi od -20 °C. Reakcije alkilovanja 3-okso-derivata **4** u uslovima Grignard-ove reakcije nisu bile uspešne i izolovano je samo polazno jedinjenje **4**. Objašnjenje ovog rezultata je nastajanje nukleofilnog enolatnog anjona usled apstrakcije  $\alpha$ -protona Grignard-ovim reagensom. Ovo je potvrđeno u reakciji **4** sa EtMgBr koja je prekinuta dodatkom deuterio vode, pri čemu je dobijeno jedinjenje **4D** sa deuterijumom na C-4 ugljeniku. U reakciji alkilovanja 3-okso oksazolinskog derivata **26** sa BuMgCl dolazi samo do delimične hidrolize oksazolinskog prstena i nastajanja amida **48**, bez nastanka proizvoda nukleofilne adicije.

U narednoj fazi je vršeno uklanjanje oksazolinske zaštite kod 7 $\beta$ -butil derivata **39** i 7 $\beta$ -oktil derivata **40** sa vodenim rastvorom hlorovodonične kiseline, pri čemu su kao glavni proizvodi dobijeni  $\Delta^6$  alkeni **49** iz **39** (43%) i **51** iz **40** (44%), i u nešto manjem prinosu alkilidenski derivati **50** iz **39** (30%) i **52** iz **40** (21%).

Sledeća faza rada je podrazumevala reakcije olefinacije 7-okso, 7,12-diokso i 3,7,12-triokso derivata ŽK sa Wittig-ovim reagensima. Reakcijom 7-keto kiseline **5** sa etiltrifenilfosfonijum-bromidom u prisustvu kalijum-*tert*-butoksida dobijen je derivat **53** u prinosu od 8%. U istoj reakciji oksazolinski derivat **27** je dao etiliden **54** u znatno većem prinosu od 49%. Obe reakcije se odigravaju stereoselektivno uz nastajanje samo *E* proizvoda. Reakcije 7,12-diokso derivata sa C-24 karboksilnom grupom (**12**), kao i oksazolinskom grupom u C-17 bočnom nizu (**31**), sa Wittig-ovim reagensom su regio- i stereoselektivne, i dobijaju se (*E*)-7-monoetilidenski derivati **55** i **56** u prinosima od 11% i 48%, respektivno. U reakciji dehidrohlorne kiseline (**13**) sa ilidom nastalim u reakciji etiltrifenilfosfonijum-bromida sa *t*-BuOK dobija se smeša (*E/Z*)-3-etiliden-7,12-diokso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**57a** i **57b**), u prinosu od 15% i (*3E/Z,7E*)-3,7-dietiliden-12-okso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**58a** i **58b**), u prinosu od 39%. Pri sličnim reakcionim uslovima, 3,7,12-triokso-oksazolin **32** daje stereoizomernu smešu 2-[(*E/Z*)-3-etiliden-7,12-diokso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolina (**59a** i **59b**) u prinosu od 14% i stereoizomernu smešu 2-[(*3E/Z,7E*)-3,7-dietiliden-12-okso-24-nor-5 $\beta$ -holano-23-il]-4,4-dimetiloksazolina (**60a** i **60b**) u prinosu od 69%. Stereochemija olefina **53**, **55** i **58** je utvrđena ROESY NMR eksperimentima, a kod jedinjenja **55** i rendgenostrukturnom analizom. U cilju dobijanja derivata sa etilidenskim supstituentom u položaju C-7 i sa okso grupama u položajima 3 i 12 (**61**), dihidroksi etiliden **53** je podvrgnut oksidaciji sa Jones-ovim reagensom, pri čemu je dobijen 3,12-diokso derivat **61** u prinosu od 85%. U reakcijama oksazolina **27**, **31** i **32** sa butilidenskim ilidom dobijenim u reakciji *t*-BuOK sa butiltrifenilfosfonijum-bromidom nije došlo do olefinacije. Stereoselektivnost Wittig-ove reakcije na karbonilnu grupu u položaju C-7 i nastajanje *E* olefina je uslovljena relativnom blizinom steroidnog D prstena koji onemogućava nastajanje *Z* proizvoda zbog preklapanja van der Waals-ovih radijusa etilidenske metil grupe i C-15 metilenske grupe. Nereaktivnost keto grupe u položaju C-12 kod 7,12-diokso derivata **12** i **31** se objašnjava sternim smetnjama bočnog niza na C-17 i angularne C-18 metil grupe. Karbonilna grupa u položaju C-3 se može posmatrati kao simetričan keton, pa je



verovatnoća formiranja *E* ili *Z* izomera ista, što potvrđuju i eksperimenti u kojima se dobija ekvimolarna smeša oba izomera.

Derivati ŽK su u narednoj fazi podvrgnuti reakcijama sa Horner–Wadsworth–Emmons-ovim reagensima. Međutim, jedinjenje **27** nije reagovalo sa dibutil-butilfosfonatom, trimetilfosfonoacetatom, kao ni sa dietil-2-brometilfosfonatom, u prisustvu *t*-BuOK i u ključalom THF-u. 7,12-Diokso-oksazolin **31** u reakcijama sa dibutil-butilfosfonatom u prisustvu *t*-BuOK u THF nije reagovao na temperaturi od  $-78$  °C, a ni na temperaturi ključanja reakcione smeše. 3,7,12-Triketo derivat **32** je takođe podvrgnut reakcijama sa HWE reagensima od kojih je jedino trimetil-fosfonoacetat reagovao, pri čemu se dobila smeša *E* i *Z* izomera **62a** i **62b** u prinosu od 55%. Reakcijom 3-okso derivata **4** sa trimetilfosfonoacetatom dobijena je stereoizomerna smeša olefina **63a** i **63b** u prinosu od 36%, koja je nakon saponifikacije sa KOH u metanolu dala samo *E*-dikiselinu **64** (72%).

U narednoj fazi su sintetizovani odabrani amidni derivati ŽK. Amidi **65** i **66** su dobijeni u reakciji etilidenskih derivata **53** i **55** sa 2-amino-2-metilpropanolom i EEDQ, u prisustvu  $\text{Et}_3\text{N}$  u prinosu od 76% i 62%, respektivno. Koristeći sličnu proceduru, sintetisani su i amidi **67** iz holne kiseline (71%) i **68** iz 7-okso-deoksiholne kiseline (47%).

7-Etilidenski derivat **53** i  $\Delta^6$ -7-butil derivat **49** su u sledećoj fazi podvrgnuti hidrogenaciji sa Adams-ovim katalizatorom, pri atmosferskom pritisku vodonika. Etilidenski derivat **53** je hidrogenovan u smeši glacijalne sirćetne kiseline i koncentrovane HCl, pri čemu je dobijen acetoksi derivat **69** (73%), koji je nakon bazne hidrolize dao jedan epimer 7-etil derivata **70** (98%), čija konfiguracija za sada nije utvrđena. Hidrogenovanje  $\Delta^6$  dvostruke veze butil derivata **49** je rađeno u MeOH i trajalo je 7 dana, pri čemu je dobijen samo jedan stereoizomer 7-butil jedinjenja **71** u prinosu od 42%, čija konfiguracija za sada još nije utvrđena.

U završnoj fazi rada ispitana je antitumorska i antimikrobna aktivnost odabranih sintetizovanih derivata žučnih kiselina. Primenom MTT testa, za jedinjenja **5**, **12**, **13**, **25**, **27**, **29**, **30-32**, **53-56** i **64-68**, kao i za CA, ispitana je aktivnost prema pet tumorskih ćelijskih linija: estrogen receptor pozitivan adenokarcinom dojke – MCF-7, estrogen receptor negativan adenokarcinom dojke – MDA-MB-231, androgen receptor negativan karcinom prostate – PC3, karcinom grlića materice – HeLa i karcinom debelog creva – HT-29. Pored tumorskih ćelija, ispitana je i antiproliferativna aktivnost sintetizovanih derivata i prema normalnim ćelijama fetalnih fibroblasta pluća – MRC-5. Prema ćelijskoj liniji MCF-7 umerenu do zadovoljavajuću antiproliferativnu aktivnost pokazala su jedinjenja **27** ( $\text{IC}_{50}$  22.52  $\mu\text{M}$ ), **29** ( $\text{IC}_{50}$  16.46  $\mu\text{M}$ ) i **54** ( $\text{IC}_{50}$  14.31  $\mu\text{M}$ ). Prema ćelijama MDA-MB-231 veoma potentnu antiproliferativnu aktivnost pokazala su jedinjenja **55** ( $\text{IC}_{50}$  1.07  $\mu\text{M}$ ), **66** ( $\text{IC}_{50}$  1.79  $\mu\text{M}$ ) i **56** ( $\text{IC}_{50}$  5.85  $\mu\text{M}$ ), dok je jedinjenje **13** pokazalo zadovoljavajuću antiproliferativnu aktivnost ( $\text{IC}_{50}$  12.18  $\mu\text{M}$ ). Zadovoljavajuću antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskoj liniji PC3 pokazalo je osam jedinjenja (**27**, **29**, **31**, **56**, **61**, **65**, **66** i **68**), dok su oksazolin **25** i amid **30** pokazali umerenu aktivnost. Snažnu antitumorsku aktivnost prema HeLa ćelijama su pokazala jedinjenja **66** ( $\text{IC}_{50}$  4.07  $\mu\text{M}$ ), **61** ( $\text{IC}_{50}$  5.19  $\mu\text{M}$ ) i **27** ( $\text{IC}_{50}$  10.00  $\mu\text{M}$ ), dok su jedinjenja **31** i **56** pokazala zadovoljavajuću aktivnost. Četiri testirana jedinjenja (**12**, **27**, **55** i **67**) su pokazala slabu antitumorsku aktivnost prema ćelijama karcinoma debelog creva (HT-29). Većina testiranih jedinjenja bila potpuno neaktivna prema normalnim ćelijama fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5), sa izuzetkom **66** i **56** koja su pokazivala slabu citotoksičnost ( $\text{IC}_{50}$  30.08 i 32.8  $\mu\text{M}$ , respektivno).

Odabranim derivatima ŽK je određena antimikrobna aktivnost prema četiri soja bakterija od kojih su dve Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) i dve Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*). U slučaju bakterije *E. coli* jedinjenja **13** i **27** su ispoljili antibakterijsku aktivnost, dok su prema *P. aeruginosa*, antibakterijsku aktivnost ispoljavali CA, **68**, **67**, **5**, **27** i **53**. Prema bakteriji *B. cereus* osam ispitivanih jedinjenja (**27**, **53**, **54**, **55**, **56**, **61**, **65** i **67**) je pokazivalo antimikrobnu aktivnost, s tim da su derivati **53**, **55** i **61** pokazali skoro dva puta veću aktivnost u odnosu na odgovarajući antibiotik.

## 6. Summary

As part of this doctoral thesis BA alkyl and alkylidene derivatives were synthesized. These derivatives contain free carboxyl group or oxazoline group in the side chain. We examined biological activity of the newly synthesized BA derivatives against selected cancer cells lines, normal cell line and against four bacterial cultures.

As a starting compound for the realization of the planned research cholic acid (CA, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid) and dehydrocholic acid (**13**, 3,7,12-trioxo-5 $\beta$ -cholanoic acid) were used. In the first phase, the CA is converted into the 3-oxo **4**, 7-oxo **5**, 12-oxo **9** and 7,12-dioxo derivative **12** in order to obtain a suitable, electrophilic function to the steroid skeleton. For preparation of **4**, CA is esterified with the formic acid into trimethyl **1**, which is selectively hydrolyzed with a methanolic solution of ammonia into derivative **2**, with C-3 free hydroxyl group. Upon oxidation with Jones reagent, derivative **2** is converted to the oxo derivative **3**, and after basic hydrolysis, **3** is converted into **4** with a yield of 81%, calculated with respect to CA. Regioselective oxidation of the CA with NBS in an aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> gave the 7-oxo derivative **5** in yield of 86%. In order to obtain **9**, CA is esterified with MeOH and HCl into ester **6**, which, upon the reaction with acetic anhydride, was selectively acetylated at C-3 and C-12 positions to give compound **7**. Oxidation of **7** with Jones reagent gave **8**, which is saponified to the 12-oxo derivative **9** (49% yield calculated with respect to CA). In the transesterification reaction with butyl acetate, CA was converted into dihydroxy derivative **10**, which was oxidized with NBS in t-BuOH into **11**. Reaction of **11** with KOH in MeOH gave 7,12-dioxo derivative **12** (71% yield calculated with respect to CA).

In the second stage BA oxazoline derivatives were synthesized. CA and monooxo derivatives **4**, **5** and **9** were, first, in reaction with formic acid, converted, in high yields (82-99%), to the corresponding formyloxy esters **1**, **14**, **15** and **16**, respectively. In the next step, the carboxyl group of compounds **1**, **14**, **15** and **16** was converted into an amide with 2-amino-2-methylpropanol and EEDQ, resulting amides **17**, **18**, **19** and **20**, with a yield of 90%, 76%, 92% and 60%, respectively. Amides **17**, **18**, **19** and **20** were converted to the corresponding oxazolines **21**, **22**, **23** and **24** in high yields (69-95%) by the reaction with thionyl chloride at 0 °C in THF, while the formyloxy ester protection is removed by basic hydrolysis in a boiling solution of KOH in methanol. This finally afforded the oxazoline derivatives **25** (90%), **26** (77%), **27** (78%) and **28** (95%). Compounds **12** and **13** were in the same manner converted into amides **29** (60%) and **30** (68%), which after treatment with thionyl chloride gave oxazolines **31** (83%) and **32** (77%).

In the third phase of the work, ketone derivatives with free carboxyl group, as well as derivatives with the oxazoline group were subjected to a reaction with a Grignard reagent. 7-Oxo-derivative **5** is in the reaction with MeMgI, EtMgBr, BuMgCl and OctMgBr in THF at -20 °C gave methyl- **33**, ethyl- **34**, butyl- **35** and octyl- **36** derivatives in yields above 80%. Reactions were stereoselective, since only one epimer was obtained. Based on the XRD analysis of derivative **33** with a  $\beta$  orientation of C-7 methyl group, it was assumed that derivatives with more voluminous alkyl groups, **34**, **35** and **36** also have  $\beta$ -oriented alkyl groups. Oxazoline 7-oxo derivative **27** was also reacted in THF at -20 °C with Grignard reagent previously mentioned to give methyl- **37**, ethyl- **38**, butyl- **39** and octyl- **40** derivatives with a yield of 63%, 74%, 79% and 69%, respectively. If the reaction of derivative of **27** with BuMgCl and OctMgBr is carried out at the boiling temperature of the reaction mixture, beside alkylation in position C-7, the partial hydrolysis of the oxazoline ring also occurs, hence amides **41** (25%) and **42** (26%), were obtained, respectively. In reaction of 12-oxo compound **9** with MeMgI in THF at -20 °C, the 12 $\beta$ -methyl-

3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid (**43**) was obtained in a yield of 83%. The reaction was stereoselective, and the configuration at C-12 was determined by ROESY NMR experiment. In the reactions of **9** with EtMgBr BuMgCl at -20 °C, a complex mixture of products were obtained with CA as main product (10% in the case of a reaction with BuMgCl). In the reactions of a 12-oxo oxazoline derivative **28** with the mentioned Grignard reagents methyl- **44**, ethyl- **45**, butyl- **46** and octyl- **47** derivatives were obtained, in yields of 53%, 48%, 49% and 67%, respectively. Reactions of **28** with EtMgBr and BuMgCl beside alkyl derivatives **45** and **46**, gave also **25** (17%, 19%), compound with hydroxyl function on the C-12. These reactions were first done at a temperature of -20 °C, and at 0 °C, while the reaction with OctMgBr was performed only at 0 °C. Steric reasons could explain formation of reduction product at a temperature of -20 °C. Alkylation reactions of 3-oxo-derivative **4** with Grignard reagent were unsuccessful, and only starting compound **4** were isolated. The explanation of this result is the formation of an enolate anion due to abstraction of  $\alpha$  proton with Grignard reagent. This is confirmed by reaction of **4** with EtMgBr which is quenched by addition of deuterio water, and reaction product **4D** has deuterium attached to  $\alpha$ -carbon. Alkylation of the oxazoline derivative **26** at C-3 with EtMgBr gave only **48**, a product with partially hydrolyzed oxazoline ring to the amide. The next phase was removal oxazoline of ring from 7 $\beta$ -butyl derivative **39** and from the 7 $\beta$ -octyl derivative **40** with aqueous hydrochloric acid whereby the main products were  $\Delta^6$  alkenes, **49** from **39** (43%) and **51** from **40** (44%) and, to a lesser yield alkylidene derivatives **50** from **39** (30%) and **52** from **40** (21%).

The next stage involved the olefination reaction of 7-oxo, 7,12-dioxo and 3,7,12-trioxo BA derivatives with Wittig reagents. Reaction of 7-keto acid **5** with ethyl-triphenylphosphonium bromide in the presence of potassium *tert*-butoxide, derivative **53** was obtained in yield of 8%. In the similar reaction oxazoline derivative **27** gave the ethylidene **54** (49%). Both reactions were stereoselective and only (*E*)-7-ethylidene products were obtained. Stereochemistry on olefin was determined by analysis of NMR spectra. Reactions of 7,12-dioxo derivative with free carboxyl group (**12**) and the oxazoline group (**31**) with Wittig reagent occur regio- and stereoselectively, resulting only (*E*)-7-monoethylidene derivatives **55** and **56** in yields of 11% and 48%, respectively. Treatment of dehydrocholic acid (**13**) with the ylide, created in reaction of ethyl triphenylphosphonium bromide with *t*-BuOK gave the mixture of (*E/Z*)-3-ethylidene-7,12-dioxo-5 $\beta$ -cholanoic acid (**57a** and **57b**), in the yield of 15% and (3*E/Z*,7*E*)-3,7-diethylidene-12-oxo-5 $\beta$ -cholanoic acid (**58a** and **58b**), in a yield of 39%. Applying similar reaction conditions, 3,7,12-trioxo-oxazoline **32** was transformed into stereoisomeric mixture of 2-[(*E/Z*)-3-ethylidene-7,12-dioxo-24-nor-5 $\beta$ -cholan-23-yl]-4,4-dimethyloxazoline (**59**) in a yield of 14% and stereoisomeric mixture of 2-[(3*E/Z*,7*E*)-3,7-diethylidene-12-oxo-24-nor-5 $\beta$ -cholan-23-yl]-4,4-dimethyloxazoline (**60a** and **60b**) in a yield of 69%. In order to obtain a derivative with an ethylidene substituent at C-7 and with an oxo group in position 3 and 12 (**61**) dihydroxy ethylidene **53** was subjected to oxidation with Jones reagent to give a 3,12-dioxo derivative **61** in yield of 85%. Reaction did not occur between oxazolines, **27**, **31** and **32** and butylidene ylide obtained from the reaction of *t*-BuOK with butyltriphenylphosphonium bromide. Proximity of C-7 to the steroidal D ring influence stereochemical outcome of Wittig reaction at C-7 carbonyl group. Due to the van der Waals radius overlap of ethylidene methyl group and of the C-15 methylene group formation of *Z* product is prevented hence *E* olefin is the only product. Non-reactivity of C-12 ketone in 7, 12-dioxo derivatives **12** and **31** can be explained by the steric hindrance of C-12 by the side chain at C-17 and by C-18 angular methyl group. The carbonyl group at the C-3 could be regarded as symmetrical ketone, and the probability of the formation of *E* and *Z* isomers is equal, which is confirmed by experiments in which the equimolar mixture of both isomers is obtained.

In the next stage, BA derivatives were treated with a Horner-Wadsworth-Emmons reagent. Compound **27** did not react with dibutyl butylphosphonate as well as with the dimethyl phosphonoacetate in presence of *t*-BuOK in THF. Reaction between 7,12-dioxo-oxazoline **31** and dibutyl butylphosphonate in the presence of *t*-BuOK in THF did not occur nor  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  nor at boiling temperature of the reaction mixture. 3,7,12-Trioxo derivative **32** was also reacted with HWE reagents of which only methyl diethylphosphonoacetate reacted, giving a mixture of *E* and *Z* isomers of the compound **62a** and **62b**. Reaction of 3-oxo derivative **4** with methyl diethylphosphonoacetate gave **63**, which after saponification with KOH in methanol and acidic workup gave the *E*-diacid **64** (72%).

In the next phase selected BA amide derivatives were synthesized. The amides **65** and **66** were obtained in a yield of 76% and 62%, respectively in the reaction of ethylidene derivatives **53** and **55** with 2-amino-2-methylpropanol and EEDQ in the presence of  $\text{Et}_3\text{N}$ . Using a similar procedure, CA amide **67** (71%) and 7-oxo-deoxycholic acid amid **68** (47%) have been synthesized.

In the next step, selected olefinic derivatives are subjected to a hydrogenation with Adams's catalyst under atmospheric pressure of hydrogen. Ethylidene derivative **53** was hydrogenated in a mixture of glacial acetic acid and concentrated HCl to give a acetoxy derivative **69** (73%), which upon base hydrolysis gave only one epimer of 7-ethyl derivative **70** (98%). The absolute configuration on new stereocenter remains to be determined. Hydrogenation of  $\Delta^6$  double bond of butyl derivative **49** in MeOH took 7 days to give a single stereoisomer of 7-butyl compound **71** in 42% yield, whose absolute configuration has not yet been determined.

In the final phase of the work, we examined the antitumor and antimicrobial activity of selected synthesized bile acid derivatives. Using MTT test, antitumor activity of selected compounds was evaluated against five tumor cell lines, the estrogen receptor positive breast adenocarcinoma – MCF-7, estrogen receptor negative breast adenocarcinoma – MDA-MB-231, an androgen receptor negative prostate cancer – PC3, cervical cancer – HeLa and colon carcinoma – HT-29. In addition to the tumor cells, antiproliferative activity of the synthesized products was tested against normal cells of fetal lung fibroblast - MRC-5. Moderate antiproliferative activity against MCF-7 cell line showed compounds **27** ( $\text{IC}_{50}$  22.52  $\mu\text{M}$ ), **29** ( $\text{IC}_{50}$  16.46  $\mu\text{M}$ ) and **54** ( $\text{IC}_{50}$  14.31  $\mu\text{M}$ ). Very potent inhibitors of MDA-MB-231 cells proliferations were compounds **55** ( $\text{IC}_{50}$  1.07  $\mu\text{M}$ ), **66** ( $\text{IC}_{50}$  1.79  $\mu\text{M}$ ) and **56** ( $\text{IC}_{50}$  5.85  $\mu\text{M}$ ). Satisfactory anti-proliferative activity against PC3 cell line showed eight compounds (**68**, **27**, **29**, **31**, **65**, **66**, **56** and **61**) while oxazoline **25** and amide **30** showed moderate activity. Potent anti-tumor activity against HeLa cells showed compounds **66** ( $\text{IC}_{50}$  4.07  $\mu\text{M}$ ), **61** ( $\text{IC}_{50}$  5.19  $\mu\text{M}$ ) and **27** ( $\text{IC}_{50}$  10.00  $\mu\text{M}$ ), while compounds **31** and **56** showed satisfactory activity. Four tested compounds showed low antitumor activity against colon cancer cells (HT-29). It is important to notice that tested compounds were totally inactive against normal cells of fetal lung fibroblast (MRC-5), with the exception of the **66** and **56** which showed low cytotoxicity ( $\text{IC}_{50}$  30.08 and 32.8  $\mu\text{M}$ , respectively) compared to commercial antitumor agent, DOX, which shows submicromolar activity ( $\text{IC}_{50}$  0.10  $\mu\text{M}$ ).

Anti-microbial activity of selected BA derivatives were tested, using the disc diffusion method, against four strains of bacteria, of which are Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), and two Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*). In the case of *E. coli* of compound **13** and **27** showed antibacterial activity, whereas, against *P. aeruginosa*, antibacterial activity manifested CA, **68**, **67**, **5**, **27** and **53**. Against bacterium *B. cereus* eight of the tested compounds (**27**, **53**, **54**, **55**, **56**, **61**, **65** and **67**) showed antimicrobial activity where derivatives **53**, **55** and **61** showed almost twice the activity compared to the corresponding antibiotic.

## 7. Skraćenice

Ac	acetil
AIBN	azobisisobutironitril
anh.	anhidrovan
aps.	apsolutni
atm.	atmosfera
aq	vodeni rastvor
Bu	butil
bs	široki signal ( <i>engl.</i> broad signal)
CPBA	hlorperoksibenzoeva kiselina
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0.]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
d	dublet
dd	dvostruki dublet
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropilamin
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMP	2,2-dimetoksipropan
Dt	dublet tripleta
Et	etil
m	multiplet
Me	metil
Ms	mezil (metansulfonil)
NBS	<i>N</i> -bromosukcinimid
Oct	oktil
PE	petrol-etar
Ph	fenil
Pr	propil
Py	piridin
st	sobna temperatura
s	singlet
t	triplet
THF	tetrahidrofuran
Tk	temperatura ključanja
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluensulfonska kiselina
t. t.	temperatura topljenja
ŽK	žučne kiseline

## 8. Literatura

1. Hofmann, A. F.; Hagey, L. R. *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2461.
2. Hofmann, A. F. *Ann. Hepatol.* **2007**, *6*, 15.
3. Copple, B. L.; Li, T. *Pharmacol. Res.* **2016**, *104*, 9.
4. Russell, D. W. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 137.
5. Goodwin, B.; Jones, S. A.; Price, R. R.; Watson, M. A.; McKee, D. D.; Moore, L. B.; Galardi, C.; Wilson, J. G.; Lewis, M. C.; Roth, M. E.; Maloney, P R.; Wilson, T. M.; Kliewer, S. A. *Mol. Cell.* **2000**, *6*, 517.
6. Inagaki, T.; Choi, M.; Moschetta, A.; Peng, L.; Cummins, C. L.; McDonald, J. G.; Luo, G.; Jones, S. A.; Goodwin, B.; Richardson, J. A.; Gerard, R. D.; Repa, J. J.; Mangelsdorf, D. J.; Kliewer, S. A. *Cell. Metab.* **2005**, *2*, 217.
7. Boyer, J. L.; Trauner, M.; Mennone, A.; Soroka, C. J.; Cai, S. Y.; Moustafa, T.; Zollner, G.; Lee, J. Y.; Ballatori, N. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *290*, G1124.
8. Ananthanarayanan, M.; Balasubramanian, N.; Makishima, M.; Mangelsdorf, D. J.; Suchy, F. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28857.
9. Pircher, P. C.; Kitto, J. L.; Petrowski, M. L.; Tangirala, R. K.; Bischoff, E. D.; Schulman, I. G.; Westin, S. K. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27703.
10. Claudel, T.; Staels, B.; Kuipers, F. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 2020.
11. Kim, I.; Morimura, K.; Shah, Y.; Yang, Q.; Ward, J. M.; Gonzalez, F. J. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 940.
12. Deuschle, U.; Schüler, J.; Schulz, A.; Schlüter, T.; Kinzel, O.; Abel, U.; Kremoser C. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43044.
13. Chen, W. D.; Wang, Y. D.; Zhang, L.; Shiah, S.; Wang, M.; Yang, F.; Yu, D.; Forman, B. M.; Huang, W. *Hepatology* **2010**, *51*, 953.
14. Hollman, D. A.; Milona, A.; van Erpecum, K. J.; van Mil, S. W. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 1443.
15. Fickert, P.; Fuchsbichler, A.; Moustafa, T.; Wagner, M.; Zollner, G.; Halilbasic, E.; Stöger, U.; Arrese, M.; Pizarro, M.; Solís, N.; Carrasco, G.; Caligiuri, A.; Sombetzki, M.; Reisinger, E.; Tsybrovskyy, O.; Zatloukal, K.; Denk, H.; Jaeschke, H.; Pinzani, M.; Trauner, M. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 2392.
16. Fiorucci, S.; Antonelli, E.; Rizzo, G.; Renga, B.; Mencarelli, A.; Riccardi, L.; Orlandi, S.; Pellicciari, R.; Morelli, A. *Gastroenterology*, **2004**, *127*, 1497.
17. Inagaki, T.; Moschetta, A.; Lee, Y. K.; Peng, L.; Zhao, G.; Downes, M.; Yu, R. T.; Shelton, J. M.; Richardson, J. A.; Repa, J. J.; Mangelsdorf, D. J.; Kliewer, S. A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 3920.
18. Katsuma, S.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329*, 386.

19. Watanabe, M.; Houten, S. M.; Matakai, C.; Christoffolete, M. A.; Kim, B. W.; Sato, H.; Messaddeq, N.; Harney, J. W.; Ezaki, O.; Kodama, T.; Schoonjans, K.; Bianco, A. C.; Auwerx, J. *Nature* **2006**, *439*, 484.
20. Li, T.; Holmstrom, S. R.; Kir, S.; Umetani, M.; Schmidt, D. R.; Kliewer, S. A.; Mangelsdorf, D. J. *Mol. Endocrinol.* **2011**, *25*, 1066.
21. Pols, T. W.; Noriega, L. G.; Nomura, M.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. *J. Hepatol.* **2011**, *54*, 1263.
22. Lindor, K. N. *Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 1524.
23. Heubi, J. E.; Setchell, K. D.; Bove, K. E. *Semin. Liver Dis.* **2007**, *27*, 282.
24. Howard, D. E.; Fromm, H. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **1999**, *28*, 133.
25. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=obeticholic+acid>
26. Hylemon, P. B.; Zhou, H.; Pandak, W. M.; Ren, S.; Gil, G.; Dent, P. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 1509.
27. Roda, A.; Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 6362.
28. Sharma, R.; Long, A.; Gilmer, J. F. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4029.
29. Seol, W.; Choi, H. S.; Moore, D. D. *Mol. Endocrinol.* **1995**, *9*, 72.
30. Forman, B. M.; Goode, E.; Chen, J.; Oro, A. E.; Bradley, D. J.; Perlmann, T.; Noonan, D. J.; Burka, L. T.; McMorris, T.; Lamph, W. W.; Evans, R. M.; Weinberger, C. *Cell*, **1995**, *81*, 687.
31. Makishima, M.; Okamoto, A. Y.; Repa, J. J.; Tu, H.; Learned, R. M.; Luk, A.; Hull, M. V.; Lustig, K. D.; Mangelsdorf, D. J.; Shan, B. *Science* **1999**, *284*, 1362.
32. Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R. K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Kliewer, S. A.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D. D.; Lehmann, J. M. *Science*, **1999**, *284*, 1365.
33. Wang, H.; Chen, J.; Hollister, K.; Sowers, L. C.; Forman, B. M. *Mol. Cell* **1999**, *3*, 543.
34. Lu, T. T.; Makishima, M.; Repa, J. J.; Schoonjans, K.; Kerr, T. A.; Auwerx, J.; Mangelsdorf, D. J. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 507.
35. Sinal, C. J.; Tohkin, M.; Miyata, M.; Ward, J. M.; Lambert, G.; Gonzalez, F. J. *Cell* **2000**, *102*, 731.
36. Ma, K.; Saha, P. K.; Chan, L.; Moore, D. D. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1102.
37. Stedman, C.; Liddle, C.; Coulter, S.; Sonoda, J.; Alvarez, J. G.; Evans, R. M.; Downes, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11323.
38. Mi, L. Z.; Devarakonda, S.; Harp, J. M.; Han, Q.; Pellicciari, R.; Willson, T. M.; Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 1093.
39. Pellicciari, R.; Costantino, G.; Camaioni, E.; Sadeghpour, B. M.; Entrena, A.; Willson, T. M.; Fiorucci, S.; Clerici, C.; Gioiello, A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4559.
40. Vernon, G.; Baranova, A.; Younossi, Z. M. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 274.
41. Sharma, R.; Prichard, D.; Majer, F.; Byrne, A. M.; Kelleher, D.; Long, A.; Gilmer, J. F. *J. Med. Chem.* **2010**, *54*, 122.
42. Makishima, M.; Lu, T. T.; Xie, W.; Whitfield, G. K.; Domoto, H.; Evans, R. M.; Haussler, M. R.; Mangelsdorf, D. J. *Science*, **2002**, *296*, 1313.



43. Krasowski, M. D.; Ni, A.; Hagey, L. R.; Ekins, S. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *334*, 39.
44. Kawamata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Harada, M.; Yoshida, H.; Miwa, M.; Fukusumi, S.; Habata, Y.; Itoh, T.; Shintani, Y.; Hinuma, S.; Fujisawa, Y.; Fujino, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9435.
45. Maruyama, T.; Miyamoto, Y.; Nakamura, T.; Tamai, Y.; Okada, H.; Sugiyama, E.; Itadani, H.; Tanaka, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 714.
46. Dawson, P. A.; Lan, T.; Rao, A. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 2340.
47. Rao, A.; Haywood, J.; Craddock, A. L.; Belinsky, M. G.; Kruh, G. D.; Dawson, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3891.
48. Ballatori, N.; Fang, F.; Christian, W. V.; Li, N.; Hammond, C. L. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *295*, G179.
49. Dawson, P. A.; Hubbert, M.; Haywood, J.; Craddock, A. L.; Zerangue, N.; Christian, W. V.; Ballatori, N. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6960.
50. Geyer, J.; Wilke, T.; Petzinger, E. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2006**, *372*, 413.
51. Alrefai, W. A.; Gill, R. K. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1803.
52. Powell, A. A.; LaRue, J. M.; Batta, A. K.; Martinez, J. D. *Biochem. J.* **2001**, *356*, 481.
53. Martinez, J. D.; Stratagoules, E. D.; LaRue, J. M.; Powell, A. A.; Gause, P. R.; Craven, M. T.; Payne, C. M.; Powell, M. B.; Gerner, E. W.; Earnest, D. L. *Nutr. Cancer* **1998**, *31*, 111.
54. Tsuchiya, S.; Tsuji, M.; Morio, Y.; Oguchi, K. *Toxicol. Lett.* **2006**, *166*, 140.
55. Benz, C.; Angermuller, S.; Otto, G.; Sauer, P.; Stremmel, W.; Stiehl, A. *Eur. J. Clin. Invest.* **2000**, *30*, 203.
56. Faubion, W. A.; Guicciardi, M. E.; Miyoshi, H.; Bronk, S. F.; Roberts, P. J.; Svingen, P. A.; Kaufmann, S. H.; Gores, G. J. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 137.
57. Vyvoda, O. S.; Coleman, R.; Holdsworth, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *465*, 68.
58. Katona, B. W.; Rath, N. P.; Anant, S.; Stenson, W. F.; Covey, D. F. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9298.
59. Katona, B. W.; Cummins, C. L.; Ferguson, A. D.; Li, T.; Schmidt, D. R.; Mangelsdorf, D. J.; Covey, D. F. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6048.
60. Katona, B. W.; Anant, S.; Covey, D. F.; Stenson, W. F. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3354.
61. Sharma, R.; Majer, F.; Peta, V. K.; Wang, J.; Keaveney, R.; Kelleher, D.; Long, A.; Gilmer, J. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6886.
62. Stamp, D. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 271.
63. Bernstein, H.; Bernstein, B. C.; Payne, C. M.; Dvorakova, B. K.; H., G. *Mutation Research/Reviews in Mutat. Res.* **2005**, *589*, 47.
64. Bernstein, H.; Bernstein, C.; Payne, C. M.; Dvorak, K. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 3329.
65. Thompson, M. B. *Toxicol. Pathol.* **1996**, *24*, 62.
66. Soma, T.; Kaganoi, J.; Kawabe, A.; Kondo, K.; Tsunoda, S.; Imamura, M.; Shimada, Y. *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 771.

67. Jankowski, J. A.; Anderson, M. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2004**, *20 Suppl 5*, 71-80; discussion 95-76.
68. Fitzgerald, R. C.; Lascar, R.; Triadafilopoulos, G. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2001**, *15*, 269.
69. Abdel-Latif, M. M.; Duggan, S.; Reynolds, J. V.; Kelleher, D. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 396.
70. Duggan, S. P.; Behan, F. M.; Kirca, M.; Smith, S.; Reynolds, J. V.; Long, A.; Kelleher, D. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 936.
71. Looby, E.; Abdel-Latif, M. M.; Athie-Morales, V.; Duggan, S.; Long, A.; Kelleher, D. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 190.
72. Bernstein, H.; Payne, C. M.; Bernstein, C.; Schneider, J.; Beard, S. E.; Crowley, C. L. *Toxicol. Lett.* **1999**, *108*, 37.
73. Im, E.; Martinez, J. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 483.
74. Abdel-Latif, M. M.; Kelleher, D.; Reynolds, J. V. *J. Surg. Res.* **2009**, *153*, 172.
75. Shah, S. A.; Volkov, Y.; Arfin, Q.; Abdel-Latif, M. M.; Kelleher, D. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 532.
76. Byrne, A. M.; Foran, E.; Sharma, R.; Davies, A.; Mahon, C.; O'Sullivan, J.; O'Donoghue, D.; Kelleher, D.; Long, A. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 737.
77. Hirano, F.; Tanada, H.; Makino, Y.; Okamoto, K.; Hiramoto, M.; Handa, H.; Makino, I. *Carcinogenesis*. **1996**, *17*, 427.
78. Shah, S. A.; Looby, E.; Volkov, Y.; Long, A.; Kelleher, D. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2160.
79. Keely, S. J.; Scharl, M. M.; Bertelsen, L. S.; Hagey, L. R.; Barrett, K. E.; Hofmann, A. F. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2007**, *292*, G290.
80. Keating, N.; Mroz, M. S.; Scharl, M. M.; Marsh, C.; Ferguson, G.; Hofmann, A. F.; Keely, S. J. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 2293.
81. Pardi, D. S.; Loftus, E. V., Jr.; Kremers, W. K.; Keach, J.; Lindor, K. D. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 889.
82. Tung, B. Y.; Emond, M. J.; Haggitt, R. C.; Bronner, M. P.; Kimmey, M. B.; Kowdley, K. V.; Brentnall, T. A. *Ann. Intern. Med.* **2001**, *134*, 89.
83. Alberts, D. S.; Martinez, M. E.; Hess, L. M.; Einspahr, J. G.; Green, S. B.; Bhattacharyya, A. K.; Guillen, J.; Krutzsch, M.; Batta, A. K.; Salen, G.; Fales, L.; Koonce, K.; Parish, D.; Clouser, M.; Roe, D.; Lance, P. *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 846.
84. Rodrigues, C. M.; Kren, B. T.; Steer, C. J.; Setchell, K. D. *Gastroenterology* **1995**, *109*, 1835.
85. Ascitti, S.; Castellani, D.; Nardi, E.; Morelli, O.; Clementi, M.; Chistolini, F.; Gentili, G.; Setchell, K. D.; O'Connell, N.; Pellicciari, R.; Clerici, C. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 4971.
86. Sheikh Abdul Kadir, S. H.; Miragoli, M.; Abu-Hayyeh, S.; Moshkov, A. V.; Xie, Q.; Keitel, V.; Nikolaev, V. O.; Williamson, C.; Gorelik, J. *PLoS One* **2010**, *5*, e9689.
87. Ogundare, M.; Theofilopoulos, S.; Lockhart, A.; Hall, L. J.; Arenas, E.; Sjoval, J.; Brenton, A. G.; Wang, Y.; Griffiths, W. J. *Biol. Chem.* **2010**, *285*, 4666.

88. Keene, C. D.; Rodrigues, C. M.; Eich, T.; Chhabra, M. S.; Steer, C. J.; Low, W. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10671.
89. Keene, C. D.; Rodrigues, C. M.; Eich, T.; Linehan-Stieers, C.; Abt, A.; Kren, B. T.; Steer, C. J.; Low, W. C. *Exp. Neurol.* **2001**, *171*, 351.
90. Gadaleta, R. M.; van Mil, S. W.; Oldenburg, B.; Siersema, P. D.; Klomp, L. W.; van Erpecum, K. *J. Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1801*, 683.
91. Ballatori, N.; Christian, W. V.; Lee, J. Y.; Dawson, P. A.; Soroka, C. J.; Boyer, J. L.; Madejczyk, M. S.; Li, N. *Hepatology* **2005**, *42*, 1270.
92. Fiorucci, S.; Mencarelli, A.; Palladino, G.; Cipriani, S. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 570.
93. Neimark, E.; Chen, F.; Li, X.; Shneider, B. L. *Hepatology* **2004**, *40*, 149.
94. Zollner, G.; Marschall, H. U.; Wagner, M.; Trauner, M. *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 231.
95. Kast, H. R.; Nguyen, C. M.; Sinal, C. J.; Jones, S. A.; Laffitte, B. A.; Reue, K.; Gonzalez, F. J.; Willson, T. M.; Edwards, P. A. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 1720.
96. Lambert, G.; Amar, M. J.; Guo, G.; Brewer, H. B., Jr.; Gonzalez, F. J.; Sinal, C. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2563.
97. Watanabe, M.; Houten, S. M.; Wang, L.; Moschetta, A.; Mangelsdorf, D. J.; Heyman, R. A.; Moore, D. D.; Auwerx, J. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1408.
98. Cao, R.; Cronk, Z. X.; Zha, W.; Sun, L.; Wang, X.; Fang, Y.; Studer, E.; Zhou, H.; Pandak, W. M.; Dent, P.; Gil, G.; Hylemon, P. B. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2234.
99. Trauner, M.; Claudel, T.; Fickert, P.; Moustafa, T.; Wagner, M. *Dig. Dis.* **2010**, *28*, 220.
100. Pellicciari, R.; Fiorucci, S.; Camaioni, E.; Clerici, C.; Costantino, G.; Maloney, P. R.; Morelli, A.; Parks, D. J.; Willson, T. M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3569.
101. Gadaleta, R. M.; van Erpecum, K. J.; Oldenburg, B.; Willemsen, E. C.; Renooij, W.; Murzilli, S.; Klomp, L. W.; Siersema, P. D.; Schipper, M. E.; Danese, S.; Penna, G.; Laverny, G.; Adorini, L.; Moschetta, A.; Mil, S. W. *Gut* **2011**, *60*, 463.
102. Pellicciari, R.; Costantino, G.; Fiorucci, S. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5383.
103. Pellicciari, R.; Fiorucci, S.; Camaioni, E.; Clerici, C.; Costantino, G.; Maloney, P. R.; Morelli, A.; Parks, D. J.; Willson, T. M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 15.
104. Yu, D.; Mattern, D. L.; Forman, B. M. *Steroids* **2012**, *77*, 1335.
105. Fiorucci, S.; Cipriani, S.; Baldelli, F.; Mencarelli, A. *Prog. Lipid Res.* **2010**, *49*, 171.
106. Fiorucci, S.; Mencarelli, A.; Distrutti, E.; Palladino, G.; Cipriani, S. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 139.
107. Iguchi, Y.; Kihira, K.; Nishimaki-Mogami, T.; Une, M. *Steroids*, **2010**, *75*, 95.
108. Nishimaki-Mogami, T.; Kawahara, Y.; Tamehiro, N.; Yoshida, T.; Inoue, K.; Ohno, Y.; Nagao, T.; Une, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *339*, 386.
109. Han, S.; Li, T.; Ellis, E.; Strom, S.; Chiang, J. Y. *Mol. Endocrinol.* **2010**, *24*, 1151.

110. Egan, J. B.; Thompson, P. A.; Vitanov, M. V.; Bartik, L.; Jacobs, E. T.; Haussler, M. R.; Gerner, E. W.; Jurutka, P. W. *Mol. Carcinog.* **2010**, *49*, 337.
111. Ruiz-Gaspa, S.; Guanabens, N.; Enjuanes, A.; Peris, P.; Martinez-Ferrer, A.; de Osaba, M. J.; Gonzalez, B.; Alvarez, L.; Monegal, A.; Combalia, A.; Pares, A. *Eur. J. Clin. Invest.* **2010**, *40*, 25.
112. Choi, M.; Yamamoto, K.; Itoh, T.; Makishima, M.; Mangelsdorf, D. J.; Moras, D.; DeLuca, H. F.; Yamada, S. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 261.
113. Jurutka, P. W.; Thompson, P. D.; Whitfield, G. K.; Eichhorst, K. R.; Hall, N.; Dominguez, C. E.; Hsieh, J. C.; Haussler, C. A.; Haussler, M. R. *J. Cell. Biochem.* **2005**, *94*, 917.
114. Ishizawa, M.; Matsunawa, M.; Adachi, R.; Uno, S.; Ikeda, K.; Masuno, H.; Shimizu, M.; Iwasaki, K.; Yamada, S.; Makishima, M. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 763.
115. Adachi, R.; Honma, Y.; Masuno, H.; Kawana, K.; Shimomura, I.; Yamada, S.; Makishima, M. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 46.
116. Mansell, J. P.; Nowghani, M. Ligands of vitamin D nuclear receptors with cell maturation promotion factors. Patent WO/2010/052508, **2010**.
117. Mansell, J. P.; Shorez, D.; Farrar, D.; Nowghani, M. *Steroids* **2009**, *74*, 963.
118. Peric, M.; Koglin, S.; Dombrowski, Y.; Gross, K.; Bradac, E.; Ruzicka, T.; Schaubert, J. *Mol. Immunol.* **2009**, *46*, 3183.
119. Arndt, H.; Kullmann, F.; Scholmerich, J.; Palitzsch, K. D. *Inflammation* **1997**, *21*, 553.
120. Miyaguchi, S.; Mori, M. *Hepatogastroenterology* **2005**, *52*, 596.
121. Saeki, R.; Ogino, H.; Kaneko, S.; Unoura, M.; Kobayashi, K. *J. Gastroenterol.* **1995**, *30*, 739.
122. Calmus, Y.; Gane, P.; Rouger, P.; Poupon, R. *Hepatology* **1990**, *11*, 12.
123. Terasaki, S.; Nakanuma, Y.; Ogino, H.; Unoura, M.; Kobayashi, K. *Am. J. Gastroenterol.* **1991**, *86*, 1194.
124. Nishigaki, Y.; Ohnishi, H.; Moriwaki, H.; Muto, Y. *Dig. Dis. Sci.* **1996**, *41*, 1487.
125. Ikegami, T.; Matsuzaki, Y.; Fukushima, S.; Shoda, J.; Olivier, J. L.; Bouscarel, B.; Tanaka, N. *Hepatology* **2005**, *41*, 896.
126. Renaud, J. P.; Moras, D. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1748.
127. Heitzer, M. D.; Wolf, I. M.; Sanchez, E. R.; Witchel, S. F.; DeFranco, D. B. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2007**, *8*, 321.
128. Necela, B. M.; Cidlowski, J. A. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2004**, *1*, 239.
129. Schteingart, C. D.; Hofmann, A. F. *J. Lipid Res.* **1988**, *29*, 1387.
130. Liliang, H.; Hua, Z.; Xiaoping, X.; Chunchun, Z.; Yu-Mei, S. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 3247.
131. Yasukawa, K.; Iida, T.; Fujimoto, Y. *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61*, 1051.
132. Jansen, P. L. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 937.
133. Pols, T. W.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **2010**, *34*, 270.

134. Sato, H.; Genet, C.; Strehle, A.; Thomas, C.; Lobstein, A.; Wagner, A.; Mioskowski, C.; Auwerx, J.; Saladin, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *362*, 793.
135. Keitel, V.; Donner, M.; Winandy, S.; Kubitz, R.; Haussinger, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *372*, 78.
136. Poole, D. P.; Godfrey, C.; Cattaruzza, F.; Cottrell, G. S.; Kirkland, J. G.; Pelayo, J. C.; Bunnett, N. W.; Corvera, C. U. *Neurogastroenterol. Motil.* **2010**, *22*, 814, e227.
137. Keely, S. J., *Neurogastroenterol. Motil.* **2010**, *22*, 711.
138. Pellicciari, R. TGR5 modulators and methods of use thereof. Patent WO/2010/059859, **2010**.
139. Pellicciari, R. Preparation of bile acid sulfate and sulfonate derivatives as TGR5 modulators and methods of use thereof. Patent WO/2010/014836, **2010**.
140. Pellicciari, R.; Sato, H.; Gioiello, A.; Costantino, G.; Macchiarulo, a; Sadeghpour, B. M.; Giorgi, G.; Schoonjans, K.; Auwerx, J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4265.
141. Sato, H.; Macchiarulo, A.; Thomas, C.; Gioiello, A.; Une, M.; Hofmann, A. F.; Saladin, R.; Schoonjans, K.; Pellicciari, R.; Auwerx, J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1831.
142. Iguchi, Y.; Yamaguchi, M.; Sato, H.; Kihira, K.; Nishimaki-Mogami, T.; Une, M. *J. Lipid Res.* **2009**, *51*, 1432.
143. Iguchi, Y.; Nishimaki-Mogami, T.; Yamaguchi, M.; Teraoka, F.; Kaneko, T.; Une, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, *34*, 1.
144. Pellicciari, R.; Gioiello, A.; Macchiarulo, A.; Thomas, C.; Rosatelli, E.; Natalini, B.; Sardella, R.; Pruzanski, M.; Roda, A.; Pastorini, E.; Schoonjans, K.; Auwerx, J. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7958.
145. Thomas, C.; Gioiello, A.; Noriega, L.; Strehle, A.; Oury, J.; Rizzo, G.; Macchiarulo, A.; Yamamoto, H.; Matak, C.; Pruzanski, M.; Pellicciari, R.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. *Cell Metab.* **2009**, *10*, 167.
146. Rizzo, G.; Passeri, D.; De Franco, F.; Ciaccioli, G.; Donadio, L.; Orlandi, S.; Sadeghpour, B.; Wang, X.; Jiang, T.; Levi, M.; Pruzanski, M.; Adorini, L. *Mol. Pharmacol.* **2010**.
147. Crowley-Weber, C. L.; Payne, C. M.; Gleason-Guzman, M.; Watts, G. S.; Futscher, B.; Waltmire, C. N.; Crowley, C.; Dvorakova, K.; Bernstein, C.; Craven, M.; Garewal, H.; Bernstein, H. *Carcinogenesis*, **2002**, *23*, 2063.
148. Yui, S.; Kanamoto, R.; Saeki, T. *Nutr. Cancer* **2009**, *61*, 374.
149. Bernstein, H.; Holubec, H.; Warneke, J. A.; Garewal, H.; Earnest, D. L.; Payne, C. M.; Roe, D. J.; Cui, H.; Jacobson, E. L.; Bernstein, C. *Ann. Surg. Oncol.* **2002**, *9*, 505.
150. Magnuson, B. A.; Shirliff, N.; Bird, R. P. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 1459.
151. Perez, M. J.; Briz, O. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 1677.ž
152. Kim, N. D.; Im, E. O.; Choi, Y. H.; Yoo, Y. H. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *35*, 134.
153. Yee, S. B.; Yeo, W. J.; Park, B. S.; Kim, J. Y.; Baek, S. J.; Kim, Y. C.; Seo, S. Y.; Lee, S. H.; Kim, J. H.; Suh, H.; Kim, N. D.; Lim, Y. J.; Yoo, Y. H. *Int. J. Oncol.* **2005**, *27*, 653.
154. Choi, Y. H.; Im, E. O.; Suh, H.; Jin, Y.; Yoo, Y. H.; Kim, N. D. *Cancer Lett*, **2003**, *199*, 157.

155. Kim, N. D.; Im, E.; Yoo, Y. H.; Choi, Y. H. *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 681.
156. Suh, H.; Jung, E.J.; Kim, T. H.; Lee, H. Y.; Park, Y. H.; Kim, K. W. *Cancer Lett.* **1997**, *113*, 117.
157. El Kihel, L.; Clement, M.; Bazin, M. A.; Descamps, G.; Khalid, M.; Rault, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8737.
158. Brossard, D.; El Kihel, L.; Clement, M.; Sebbahi, W.; Khalid, M.; Roussakis, C.; Rault, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2912.
159. James, S. P.; Smith, F.; Stacey, M.; Webb, M. *J. Chem. Soc.* **1946**, 665.
160. Stacey, M.; Webb, M. *Proc. R. Soc. Med.* **1947**, *134*, 538.
161. Sytnik, I. A.; Puzzakova, E. V. *Antibiotki* **1975**, *20*, 1104.
162. Sytnik, I. A. *Microbiologichni. Zhurnal.* **1978**, *40*, 357.
163. Elkins, C. A.; Mullis, L. B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 7200.
164. Kurdi, P.; Kawanishi, K.; Mizutani, K.; Yokota, A. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 1979.
165. Salunke, D. B.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Bhat, M. K.; Nahar, P. B.; Deshpande, M. V. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1591.
166. Guan, Q.; Li, C.; Schmidt, E. J.; Boswell, J. S.; Walsh, J. P.; Allman, G. W.; Savage, P. B. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2837.
167. Vatmurge, N. S.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Shirazi, F.; Chavan, P. S.; Deshpande, M. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2043.
168. Savage, P. B.; Li, C. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2000**, *9*, 263.
169. Lai, X. Z.; Feng, Y.; Pollard, J.; Chin, J. N.; Rybak, M. J.; Bucki, R.; Epand, R. F.; Epand, R. M.; Savage, P. B. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1233.
170. Li, C.; Peters, A. S.; Meredith, E. L.; Allman, G. W.; Savage, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2961.
171. Li, C.; Budge, L. P.; Driscoll, C. D.; Willardson, B. M.; Allman, G. W.; Savage, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 931.
172. Li, C.; Lewis, M. R.; Gilbert, A. B.; Noel, M. D.; Scoville, D. H.; Allman, G. W.; Savage, P. B. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1347.
173. Leszczynska, K.; Namiot, A.; Cruz, K.; Byfield, F. J.; Won, E.; Mendez, G.; Sokolowski, W.; Savage, P. B.; Bucki, R.; Janmey, P. A. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *110*, 229.
174. Leszczynska, K.; Namiot, A.; Fein, D. E.; Wen, Q.; Namiot, Z.; Savage, P. B.; Diamond, S.; Janmey, P. A.; Bucki, R. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 187.
175. Nagant, C.; Tre-Hardy, M.; El-Ouaaliti, M.; Savage, P.; Devleeschouwer, M.; Dehaye, J. P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 251.
176. Willemen, H. M.; de Smet, L. C.; Koudijs, A.; Stuart, M. C.; Heikamp-de Jong, I. G.; Marcelis, A. T.; Sudholter, E. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4275.
177. Huang, L.; Sun, Y.; Zhu, H.; Zhang, Y.; Xu, J.; Shen, Y. M. *Steroids* **2009**, *74*, 701.

178. Bellini, A. M.; Vertuani, G.; Quaglio, M. P.; Cavazzini, G. *Farmaco. Sci.* **1979**, *34*, 967.
179. Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Guarneri, M.; Cavazzini, G. *Eur. J. Med. Chem.* **1983**, *18*, 191.
180. Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Mencini, E.; Guarneri, M.; Cavazzini, G.; Fini, A. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1989**, *322*, 879.
181. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 726.
182. Bellini, A. M.; Mencini, E.; Quaglio, M. P.; Guarneri, M.; Fini, A. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1990**, *323*, 201.
183. Bellini, A. M.; Mencini, E.; Quaglio, M. P.; Guarneri, M.; Fini, A. *Steroids* **1991**, *56*, 395.
184. Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Zaniboni, U.; Cavazzini, G. *Nuovi. Ann. Ig. Microbiol.* **1985**, *36*, 465.
185. Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Cavazzini, G.; Cecchenini, R. *Farmaco. Sci.* **1984**, *39*, 305.
186. Cavazzini, G.; Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Guarneri, M. *Nuovi. Ann. Ig. Microbiol.* **1982**, *33*, 419.
187. Hazra, B.; Pore, V.; Dey, S.; Datta, S.; Darokar, M.; Saikia, D.; Khanuja, S.P.; Thakur, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 773.
188. Aher, N. G.; Pore, V. S.; Mishra, N. N.; Shukla, P. K.; Gonnade, R. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5411.
189. Vatmurge, N. S.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Shirazi, F.; Deshpande, M. V.; Kadreppa, S.; Chattopadhyay, S.; Gonnade, R. G. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3823.
190. Rasras, A. J.; Al-Tel, T. H.; Al-Aboudi, A. F.; Al-Qawasmeh, R. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2307.
191. Sievanen, E. *Molecules* **2007**, *12*, 1859.
192. Kramer, W.; Wess, G. *Eur. J. Clin. Invest.* **1996**, *26*, 715.
193. Baringhaus, K.; Matter, H.; Stengelin, S.; Kramer, W. **1999**, *40*, 2158.
194. Kramer, W.; Wess, G.; Schubert, G.; Bickel, M.; Girbig, F.; Gutjahr, U.; Kowalewski, S.; Baringhaus, K. H.; Enhsen, A.; Glombik, H.; Mullner, S. S.; Necjermann, G. S.; Schulzll, S.; Petzinger, E. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18598.
195. Qian, S.; Wu, J. B.; Wu, X. C.; Li, J.; Wu, Y. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2009**, *342*, 513.
196. Marin, J. J.; Palomero, M. F.; Herrera, M. C.; Macias, R. I.; Criado, J. J.; Serrano, M. A. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 1641.
197. Criado, J. J.; Garcia-Moreno, M. C.; Macias, R. R.; Marin, J. J.; Medarde, M.; Rodriguez-Fernandez, E. *Biometals* **1999**, *12*, 281.
198. Dominguez, M. F.; Macias, R. I.; Izco-Basurko, I.; de La Fuente, A.; Pascual, M. J.; Criado, J. M.; Monte, M. J.; Yajeya, J.; Marin, J. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *297*, 1106.
199. Larena, M. G.; Martinez-Diez, M. C.; Monte, M. J.; Dominguez, M. F.; Pascual, M. J.; Marin, J. J. *J. Drug Target.* **2001**, *9*, 185.

200. Macias, R. I.; El-Mir, M. Y.; Monte, M. J.; Serrano, M. A.; Garcia, M. J.; Marin, J. J. *J. Control Release* **1999**, *57*, 161.
201. Marin, J. J.; Macias, R. I.; Criado, J. J.; Bueno, A.; Monte, M. J.; Serrano, M. A. *Int. J. Cancer* **1998**, *78*, 346.
202. Monte, M. J.; Dominguez, S.; Palomero, M. F.; Macias, R. I.; Marin, J. J. *J. Hepatol.* **1999**, *31*, 521.
203. Criado, J. J.; Herrera, M. C.; Palomero, M. F.; Medarde, M.; Rodriguez, E.; Marin, J. J. *J. Lipid Res.* **1997**, *38*, 1022.
204. Criado, J. J.; Dominguez, M. F.; Medarde, M.; Fernandez, E. R.; Macias, R. I.; Marin, J. J., *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 167.
205. Martinez-Diez, M. C.; Larena, M. G.; Serrano, M. A.; Macias, R. I.; Izco-Basurko, I.; Marin, J. J. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 3315.
206. Criado, J. J.; Manzano, J. L.; Rodriguez-Fernandez, E. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 311.
207. Rodriguez-Fernandez, E.; Manzano, J. L.; Alonso, A.; Almendral, M. J.; Perez-Andres, M.; Orfao, A.; Criado, J. J. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4314.
208. Wu, D.; Ji, S.; Wu, Y.; Ju, Y.; Zhao, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2983.
209. McSherry, K.; Mosbach, E. H.; Israel, B. *Steroids* **1981**, *38*, 333.
210. Une, M.; Cohen, B. I.; Mosbach, E. H. *J. Lipid Res.* **1984**, *25*, 407.
211. Kuroki, S.; Une, M.; Mosbach, E. H. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 1205.
212. Une, M.; Yamanaga, K.; Mosbach, E. H.; Kuroki, S.; Hoshita, T. *Steroids* **1989**, *53*, 97.
213. Matoba, N.; Mosbach, E. H.; Cohen, B. I.; Une, M.; McSherry, C. K. *J. Lipid Res.* **1989**, *30*, 1005.
214. Yu, D. D.; Sousa, K. M.; Mattern, D. L.; Wagner, J.; Fu, X.; Vaidehi, N.; Forman, B. M.; Huang, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1613.
215. Kramer, W.; Chemistry, M. Patent 5,641,767, **1997**.
216. Tsemg, K.; Klein, P. D. *Steroids*, **1977**, *29* (5), 635.
217. Kramer, W.; Schneider, S. *J. Lipid Res.* **1989**, *30*(8), 1281.
218. Fieser, L. F.; Rajagopalan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71* (12), 3935.
219. Giovannini, P. P.; Grandini, A.; Perrone, D.; Pedrini, P.; Fantin, G.; Fogagnolo, M. *Steroids*, **2008**, *3*, 1385.
220. Bertolasi, V.; Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Perrone, D. *Steroids*, **2007**, *72*, 756.
221. Kuhajda, K.; Kandrač, J.; Ćirin-Novta, V.; Miljković, D. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1996**, *61*, 1073.
222. Meyers, A. I.; Temple, D. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 6644.
223. Cohen, B. I.; May, P. S.; McSherry, C. K.; Mosbach, E. H. *Steroids*, **1982**, *40* (6), 701.
224. Babu, P.; Uday Maitra, U. *Steroids* **2005**, *70*(10), 681. 225.
225. Whitmore, F. C.; George, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64* (6), 1239.



226. Poša, M.; Bjedov, S.; Sebenji, A.; Sakač, M. *Steroids*, **2014**, *86*, 16.
227. Gioiello, A.; MacChiarulo, A.; Carotti, A.; Filipponi, P.; Costantino, G.; Rizzo, G.; Adorini, L.; Pellicciari, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (8), 2650.
228. Mosmann, T. J. *Immunol. Methods*, **1983**, *65*, 55.
229. Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *36*, 493.

## 9. Biografija



Srđan Bjedov je rođen 04.09.1984. godine u Novom Sadu. Osnovno obrazovanje je stekao u Bačkoj Palanci, a srednju Tehničku školu „Pavle Savić“ završio u Novom Sadu. Osnovne akademske studije hemije je završio 2011. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sad sa prosečnim uspehom 9.08. U oktobru 2011. godine upisuje doktorske studije (odsek-hemija, obrazovni profil-doktor hemijskih nauka). Sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija hemije položio je sa prosečnom ocenom 10. Za istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Organska hemija izabran je 2011. godine, a za istraživača-saradnika i potom za asistenta 2015. godine.

Od januara 2012. godine zaposlen je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (br. projekta 172021). Bio je saradnik na jednogodišnjem projektu (broj 114-451-1023/2015 ) koji je finansiran od strane Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj.

Angažovan je u izvođenju vežbi iz predmeta: Organska hemija 1, Organska hemija 2, Organska hemija 3, Sinteza biološki aktivnih molekula, Hemijska prerada prirodnih organskih sirovina.

Koautor je tri naučna rada koja su publikovana u međunarodnim časopisima, od kojih je jedan kategorije M21, a dva kategorije M22, kao i osam naučnih saopštenja prezentovanih na međunarodnim naučnim skupovima (M34) kao i sedam saopštenja prezentovanih na domaćim naučnim skupovima (M64).

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	Srđan Bjedov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Marija Sakač, red. prof. PMF-a u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Sinteza i biološka ispitivanja novih derivata žučnih kiselina
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 5 (uključujući poglavlje Prilog)/ stranica 182 (61 strana poglavlja Prilog) / slika 120 (115 slika NMR spektara u Prilogu)/ Tabela 4 / referenci 229/ priloga 1)
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Organska hemija

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Žučne kiseline, alkil derivati, Grignard-ova reakcija, Wittig-ova reakcija, amidi, oksazolini, antitumorska aktivnost, antimikrobna aktivnost
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	U disertaciji je ostvarena sineza amida i oksazolina žučnih kiselina, kao i njihovih alkil i alkilidenskih derivata polazeći od holne kiseline. Ispitano je ponašanje različitih okso derivata žučnih kiselina u uslovima Grignard-ove i Wittig-ove reakcije. Ispitana je biološka aktivnost odabranih sintetizovanih jedinjenja.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	25.02.2016.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: Dr Janoš Čanadi, red. prof. PMF-a u Novom Sadu član: Dr Mirjana Popsavin, red. prof. PMF-a u Novom Sadu član: Dr Siniša Markov, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu član: Dr Mihalj Poša, vanred. prof. Medicinskog fakulteta u Novom Sadu član: Dr Marija Sakač, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES  
KEY WORDS 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	Srđan Bjedov
Mentor: MN	Professor Marija Sakač, PhD, Faculty of Sciences, Novi Sad
Title: TI	Synthesis and biological evaluation of new bile acid derivatives
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
Physical description: PD	
Scientific field SF	Chemistry
Scientific discipline SD	Organic chemistry
Subject, Key words SKW	Bile acid, alkyl derivatives, Grignard reaction, Wittig reaction, amides, oxazolines, antitumor activity, antimicrobial activity

UC	
Holding data: HD	Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection (Library), Trg D. Obradovića 3, 21000 Novi Sad
Note: N	—
Abstract: AB	Synthesis of bile acid amide and oxazoline derivatives, and their alkyl and alkylidene derivatives was accomplished starting from cholic acid. Also, chemical behavior of different bile acid oxo derivatives in Grignard and Wittig reaction was investigated. Biological activity of selected synthesized compounds was evaluated.
Accepted on Senate on: AS	25.02.2016.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB president:  member:  member:  member:  member:	Dr. Janoš Čanadi, Full Prof., Faculty of Sciences, Novi Sad  Dr Mirjana Popsavin, Full Prof., Faculty of Sciences, Novi Sad  Dr Siniša Markov, Full Prof., Faculty of Technology, Novi Sad  Dr Mihalj Poša, Assoc. Prof. Faculty of Medicine, Novi Sad  Dr Marija Sakač, Full Prof., Faculty of Sciences, Novi Sad