

Dr He-63/1

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO - MATEMATIČKI FAKULTET

Marija N. Sakač

Modifikovani B- i D-estranski derivati
i njihova antiestrogena aktivnost

Doktorska disertacija

NOVI SAD, 1997.

Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet

Природно-математички факултет
Радна заједница заједничких послова
НОВИ САД

Примљено: - 8. sept. 1997			
Орг. јед.	Број	Лист	Вредност
0603	83/2		

Marija N. Sakač

**Modifikovani B- i D-estranski derivati
i njihova antiestrogena aktivnost**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 1997.

104



*O*va doktorska disertacija je rađena u Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, pod rukovodstvom dr Dušana Miljkovića, redovnog profesora PMF-a u Novom Sadu.

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru prof. dr Dušanu Miljkoviću na predloženoj temi, kao i na savetima, sugestijama i podršci koju mi je ukazivao tokom izrade ove disertacije.

Za pažnju koju mi je ukazala tokom izrade, a posebno tokom pisanja ove disertacije, najiskrenije se zahvaljujem prof. dr Julijani Petrović.

Prof. dr Katarini Penov Gaši dugujem veliku zahvalnost ne samo za pomoć koju mi je pružila tokom izrade ove disertacije, već i za njenu spremnost da u svakom trenutku prenese svoje znanje i iskustvo od prvog dana naše dugogodišnje saradnje.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Radmili Kovačević za određivanje biološke aktivnosti, kao i za korisne sugestije pri interpretaciji dobijenih rezultata.

Zahvaljujem se dr Ivanu Mićoviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, na pokazanom interesovanju.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem dr Mirjani Popsavin, docentu PMF-a u Novom Sadu, na pomoći pri snimanju i tumačenju NMR spektara, kao i dr Janošu Čanadiju, vanrednom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na snimanju NMR spektara.

Zahvaljujem se mr Silvani Andrić, asistentu PMF-a u Novom Sadu, na velikoj pomoći i požrtvovanju u toku određivanja biološke aktivnosti.

Zahvalnost dugujem i dipl. ing. Otu Arčonu, kao i Ester Foro na ukazanoj tehničkoj pomoći, kao i svima onima koji su na bilo koji drugi način pomogli pri izradi ove disertacije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. ESTROGENI HORMONI	3
2.1.1. <i>Sinteze ekvilenina</i>	4
2.1.1.1. Totalne sinteze ekvilenina	4
2.1.1.2. Totalne sinteze derivata ekvilenina	15
2.1.1.3. Parcijalne sinteze ekvilenina	22
2.1.2. <i>Biosinteza estrogena</i>	24
2.1.3. <i>Transport i delovanje estrogena</i>	26
2.1.3.1. Transport estrogena	27
2.1.3.2. Estrogeni receptori	27
2.1.3.3. Aktivirani estrogen-receptor kompleks i njegovo vezivanje za DNK	28
2.2. ANTIESTROGENI	29
3. NAŠI RADOVI	33
3.1. MODIFIKOVANI B-ESTRANSKI DERIVATI I NJIHOVA ANTIESTROGENA AKTIVNOST	33
3.1.1. <i>Sinteza B-estranskih derivata</i>	33
3.1.2. <i>Određivanje estrogene i antiestrogene aktivnosti odabranih sintetizovanih jedinjenja</i>	48
3.2. MODIFIKOVANI D-ESTRANSKI DERIVATI I NJIHOVA ANTIESTROGENA AKTIVNOST	53
3.2.1. <i>Sinteza D-sekoestranskih derivata</i>	53
3.2.2. <i>Određivanje estrogene i antiestrogene aktivnosti jedinjenja 29-34</i>	66
4. EKSPERIMENTALNI DEO	69
4.1. POSTUPCI SINTEZE B-ESTRANSKIH DERIVATA	69
4.1.1. <i>3,17β-Dipropionoksi-9α-hidroksiestra-1,3,5(10)-trien-6-on (2)</i>	69
4.1.2. <i>3,6β,9α-Trihidroksi-17β-propionoksiestra-1,3,5(10)-trien (4)</i>	70
4.1.3. <i>3,17β-Dipropionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-6-on (5)</i>	71
4.1.4. <i>3,6β-Dihidroksi-17β-propionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen (6)</i>	72
4.1.5. <i>3,17β-Dipropionoksi-6-hidroksiestra-1,3,5(10),6,8-pentaen (7)</i>	72
4.1.6. <i>N-n-Butil-N-metil-11-bromoundekankarboksamid (11)</i>	74
4.1.7. <i>3,17β-Dipropionoksiestra-1,3,5(10),7,9(11)-pentaen-6-on (12)</i>	74
4.1.8. <i>3-Hidroksi-17β-acetoksiestra-1,3,5(10)-trien (13)</i>	75

4.1.9. 3-O-(10'-Karbo-N-n-butyl-N-metilamino)decil-17β-acetoksiestra-1,3,5(10)-trien (14)	75
4.1.10. 3,17β-Dipropionoksi-6-O-[(10'-karbo-N-n-butyl-N-metilamino)decil]estra-1,3,5(10),6,8-pentaen (15)	76
4.2. POSTUPCI SINTEZE D-ESTRANSKIH DERIVATA	77
4.2.1. 3-Benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-17-on (16)	77
4.2.2. 3-Benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-16,17-dion-16-oksim (17)	77
4.2.3. 1-Bromo-4-(2-hloroetoksi)benzen (18)	78
4.2.4. 1-Bromo-4-[2-(dimetilamino)etoksi]benzen (19)	78
4.2.5. 3-Benziloksi-17β-hidroksi-17α-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]estra-1,3,5(10)-trien-16-on oksim (20)	79
4.2.6. 3-Benziloksi-17β-hidroksi-17α-metilestra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksim (21)	80
4.2.7. 3-Benziloksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (22)	81
4.2.8. 3-Benziloksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (23)	81
4.2.9. 3-Benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (24)	82
4.2.10. 3-Benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (25)	82
4.2.11. 3-Benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (27)	83
4.2.12. 3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (29)	85
4.2.13. 3-Hidroksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (30)	85
4.2.14. 3-Hidroksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (31)	86
4.2.15. 3,17-Dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (32)	87
4.2.16. 3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (33)	87
4.2.17. 3,17-Dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (34)	88
5. ZAKLJUČAK	89
6. SUMMARY	95
7. LITERATURA	101
8. PRILOG	109
8.1. ¹ H i ¹³ C NMR SPEKTRI	109
3,6β,9α-Trihidroksi-17β-propionoksiestra-1,3,5(10)-trien	111
3,17β-Dipropionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-6-on	112
3,6β-Dihidroksi-17β-propionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen	113

3,17β-Dipropionoksi-6-hidroksiestra-1,3,5(10),6,8-pentaen	114
3,17β-dipropionoksi-9ξ-hloroestra-1,3,5(10)-trien-6-on	115
N-n-Butyl-N-metil-11-bromoundekankarboksamid	116
3,17β-Dipropionoksiestra-1,3,5(10),7,9(11)-pentaen-6-on	117
3-Hidroksi-17β-acetoksiestra-1,3,5(10)-trien	118
3-O-(10'-karbo-N-n-butyl-N-metilamino)decil-17β-acetoksiestra-1,3,5(10)-trien	119
3,17β-Dipropionoksi-6-O-[(10'-karbo-N-n-butyl-N-metilamino)decil]estra-1,3,5(10),6,8-pentaen	120
1-Bromo-4-(2-hloroetoksi)benzen	121
1-Bromo-4-[2-(dimetilamino)etoksi]benzen	122
3-Benziloksi-17β-hidroksi-17α-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]estra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksim	123
3-Benziloksi-17β-hidroksi-17α-metilestra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksim	124
3-Benziloksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril	125
3-Benziloksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril	126
3-Benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril	127
3-Benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril	128
3-Benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin	129
3-Benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin	130
3-Benziloksi-17-aza-17α-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-D-homoestra-1,3,5(10),17(17a)-tetraen	131
3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin	132
3-Hidroksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril	133
3-Hidroksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril	134
3,17-Dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril	135
3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril	136
3,17-Dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin	137
8.2. SKRAĆENICE	138
9. BIOGRAFIJA	139

1. UVOD

Estrogeni hormoni spadaju u grupu polnih hormona i u prvom redu su odgovorni za normalan tok genitalnih ciklusa, kao što je npr. menstrualni ciklus kod žena, zatim utiču na proliferaciju sluzokože uterusa, kao i razvoj sekundarnih polnih karakteristika kod žena u pubertetu.

S druge strane, pored svoje normalne fiziološke funkcije, estrogeni su najčešći uzročnici nastanka kancera dojke i uterusa, jer je dokazano da podstiču rast i razmnožavanje maligne ćelije¹.

Osnova lečenja estrogen-zavisnih tumora sastoji se u primeni tzv. antiestrogena, lekova koji inhibiraju delovanje estrogena^{2,3,4,5}. Već više od deset godina u kliničkoj upotrebi je nesteroidni antiestrogen - Tamoksifen⁵, koji pored antiestrogenog delovanja pokazuje i znatan estrogeni efekat.

Wakeling i saradnici su sintetizovali čiste antiestrogene vezivanjem za 7 α -položaj estradiola dugačak alkilamidni niz⁶, tj. alkilsulfoksidni niz⁷, dok je Van de Velde sa saradnicima⁸ pogodnom derivatizacijom položaja 11 β dobio takođe čiste antiestrogene.

U našoj laboratoriji sintetizovani su 7-ekvileninski derivati⁹ i D-sekoestranski derivati¹⁰, koji su pokazali znatno smanjeno estrogeno, a izvesno antiestrogeno delovanje. Polazeći od navedenih činjenica, naša istraživanja smo usmerili na dobijanje novih B- i D- estranskih derivata, koji bi imali smanjenu, ili nikakvu estrogenu aktivnost, a koji bi pokazali povećanu antiestrogenu aktivnost.



S obzirom na postavljene ciljeve naših istraživanja, u Opštem delu ovog rada dat je pregled literature koja se odnosi na totalne i parcijalne sinteze ekvilena i njegovih derivata. Pored toga, dat je i kratak pregled struktura antiestrogenih molekula opisanih u literaturi, kao i biosinteza i aktivnost estrogenih hormona.

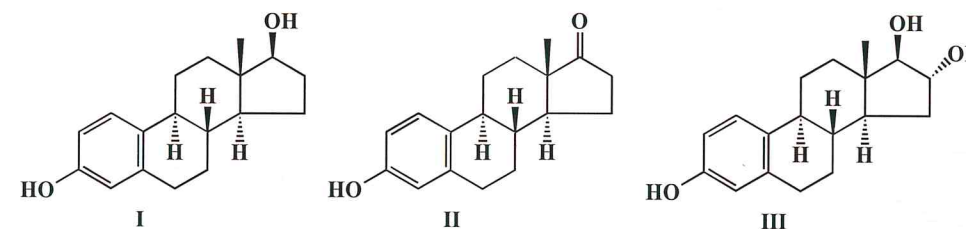
U delu Naši radovi detaljno su izloženi i diskutovani dobijeni rezultati, kako sinteze i dokazivanja strukture nosintetizovanih jedinjenja, tako i ispitivanja njihove biološke aktivnosti.

U Eksperimentalnom delu rada detaljno su opisani postupci dobijanja svih nosintetizovanih jedinjenja.

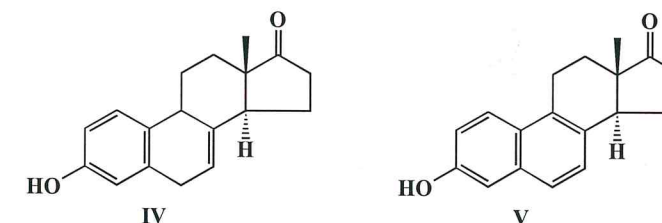
2. OPŠTI DEO

2.1. ESTROGENI HORMONI

Prirodni estrogeni po svojoj strukturi pripadaju velikoj grupi steroidnih jedinjenja. Sintetizuju se u ovarijumu kičmenjaka, placenti i, u manjoj meri, u kori nadbubrežne žlezde. Odgovorni su za regulaciju niza fizioloških procesa¹¹. Najpotentniji estrogeni su estradiol (I) (devet puta aktivniji od estrona), estron (II) (glavni estrogen kod žena u postmenopauzi) i estriol (III) (metabolit estradiola).



Nešto manje aktivni estrogeni hormoni su ekvilin (IV) i ekvilenin (V), koji predstavljaju metabolite estradiola, a u literaturi se često javljaju pod nazivom ekvinski estrogeni.

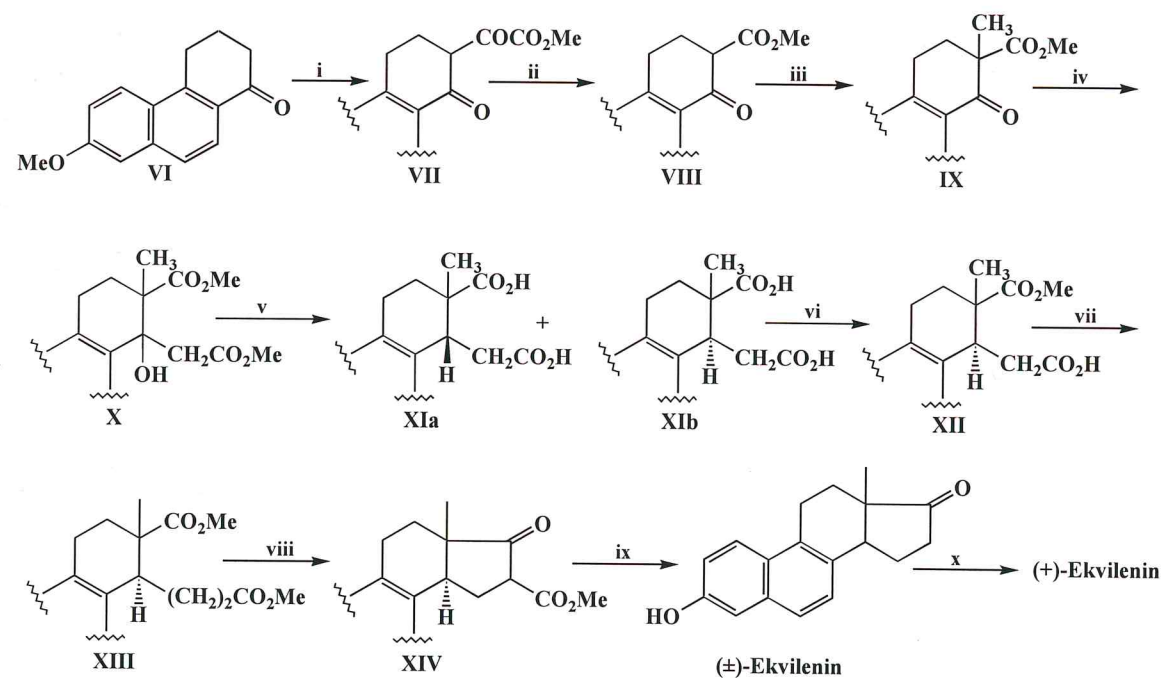


2.1.1. Sinteze ekvilenina

2.1.1.1. Totalne sinteze ekvilenina

Ekvilenin ima dva asimetrična centra, C-13 i C-14, te predstavlja jedan od četiri moguća geometrijska izomera. S obzirom na ove relativno proste stereohemijske odnose, on je ubrzo nakon izolovanja¹² i određivanja strukture¹³ dobijen i totalnom sintezom.

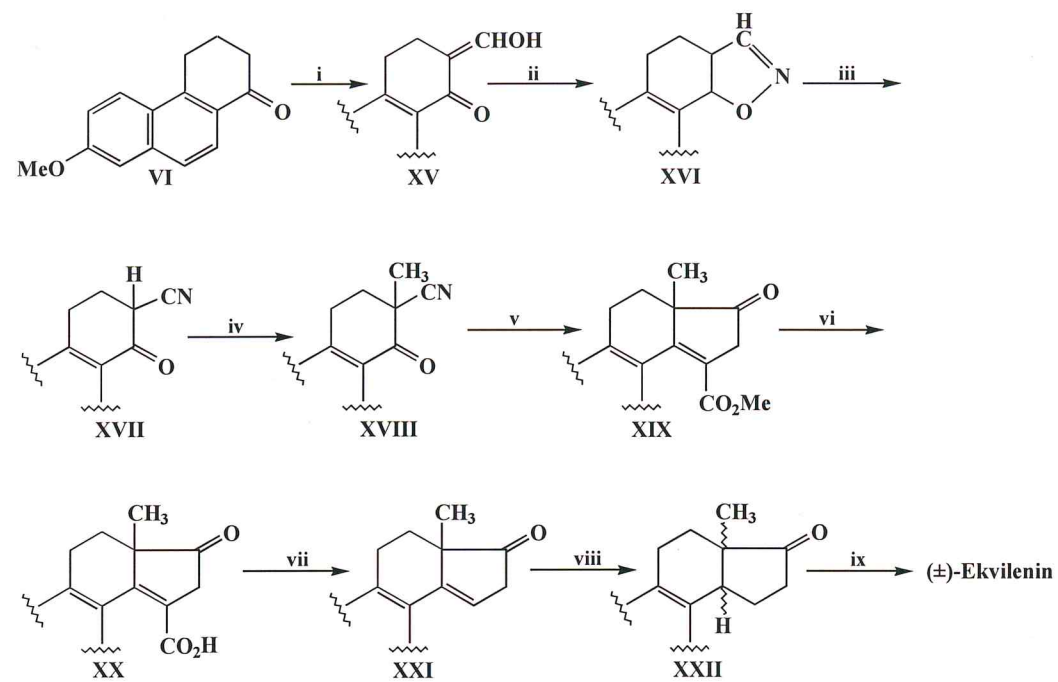
Prvu totalnu sintezu ostvarili su Bachmann, Cole i Wilds¹⁴ 1939. godine. Kao polazno jedinjenje poslužio je 7-metoksi-1-keto-1,2,3,4-tetrahidrofenantren (VI), koji je bio sintetizovan od strane Butenandt-a i saradnika¹⁵ (Shema 2.1.).



Shema 2.1. *i*, $(\text{CO}_2\text{Me})_2$, MeONa; *ii*, 180°C ; *iii*, Na, zatim MeI; *iv*, $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$, Zn; *v*, SOCl_2 , zatim KOH, pa Na-Hg; *vi*, CH_2N_2 , zatim KOH; *vii*, SOCl_2 , zatim CH_2N_2 ; *viii*, NaOMe; *ix*, HCl-AcOH; *x*, (-)-mentoksi-acetat.

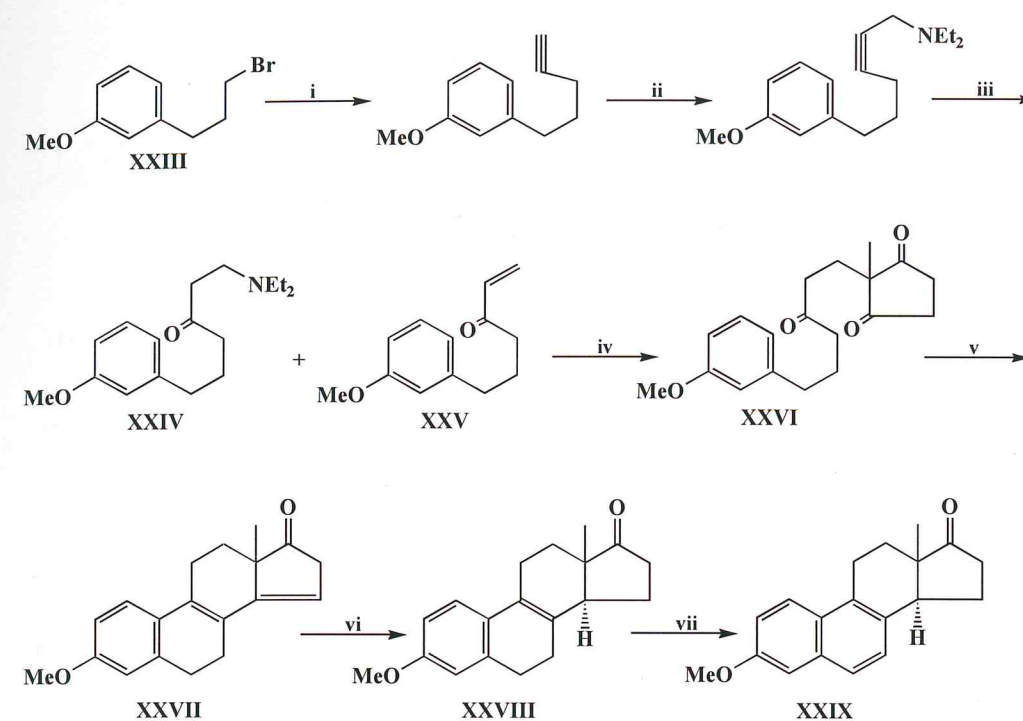
Claisen-ova kondenzacija jedinjenja VI sa dimetil-oksalatom, u prisustvu natrijum-metoksida, daje glioksalat VII, a ovaj zagrevanjem na 180°C gubi ugljen-monoksid i prelazi u keto-estar VIII. Keto-estar VIII se metiluje, pa se metilketo-estar IX kondenzuje sa metil-bromo-acetatom. Nastali hidroksi-estar X prevodi se, preko hlorosulfita i nezasićenog estra, redukcijom i hidrolizom, u dve stereoisomerne (\pm)-*cis*- i (\pm)-*trans*-7-metil-bis-dehidromarianolne kiseline (XI). *Trans*-kiselina XIb, preko dimetil-estra, parcijalnom hidrolizom daje poluestar XII, koji se Arndt-Eistert-ovom reakcijom transformiše u dimetil-homoestar XIII, a zatim se vrši ciklizacija zagrevanjem sa natrijum-metoksidom u struji azota. Dobija se (\pm)-16-karbometoksiekvilenin (XIV), koji hidrolizom, dekarboksilovanjem i demetilovanjem daje (\pm)-ekvilenin. Ovaj racemat se pomoću (-)-mentoksi-acetata može razložiti na (+)-ekvilenin (prirodni hormon) i (-)-ekvilenin (koji ima trinaesti deo estrogene aktivnosti prirodnog ekvilenina).

Druga totalna sinteza potiče od Johnson-a i saradnika¹⁶ i objavljena je 1945. godine. (Shema 2.2.). Ova sinteza takođe polazi od 7-metoksi-1-keto-1,2,3,4-tetrahidrofenantrena (VI), koji se kondenzuje sa etil-formijatom dajući formil derivat XV. Jedinjenje XV se pomoću hidroksilamina prevodi u izoksazol XVI, koji sa kalijum-*t*-butoksidom daje kalijumov derivat oksonitrila XVII. Metilovanjem jedinjenja XVII gradi se jedinjenje XVIII. Kondenzacijom sa dimetil-sukcinatom jedinjenje XVIII daje derivat XIX, a ovaj hidrolizom prelazi u molekul XX. Dekarboksilovanjem nastaje enon XXI, koji katalitičkom hidrogenacijom daje smešu metil-etara (\pm)-ekvilenina i (\pm)-14-izekvilenina (XXII), koja se razdvaja kristalizacijom.



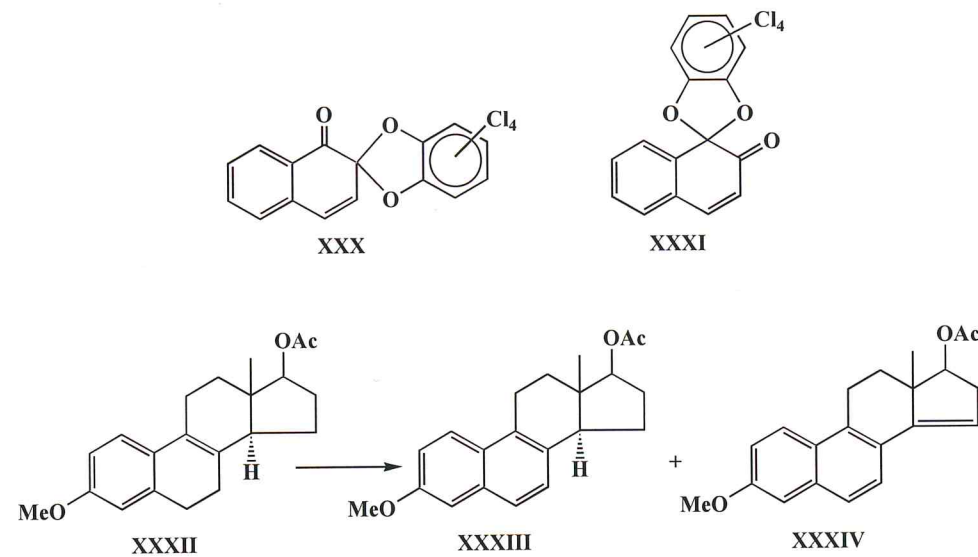
Shema 2.2. *i*, HCO₂Et, MeONa; *ii*, NH₂OH · HCl, AcOH; *iii*, *t*-BuOK; *iv*, MeI; *v*, (CH₂CO₂Me)₂, *t*-BuOK; *vi*, Ba(OH)₂; *vii*, Py · HCl, HCl; *viii*, Pd/C, H₂; *ix*, HCl-AcOH.

Smith i saradnici¹⁷ su u sintezi ekvileninskog sistema prstenova krenuli od 3-*m*-metoksifenilpropil-bromida (XXIII), koji je u tri faze preveden u smešu jedinjenja XXIV i XXV, ključne intermedijere u opisanoj totalnoj sintezi estrogenih hormona (Shema 2.3.). Kondenzacijom smeše ketona XXIV i XXV sa 2-metilciklopentan-1,3-dionom nastaje trion XXVI, koji zagrevanjem sa kiselinama (TsOH, HCl ili polifosforna kiselina) podleže ciklizaciji i građenju B i C steroidnih prstenova, dajući derivat XXVII. Katalitičkom hidrogenacijom Δ¹⁴-dvostruke veze jedinjenja XXVII, a zatim dehidrogenacijom nastalog proizvoda XXVIII pomoću SeO₂, nastaje metiletar ekvilenina (XXIX), koji je dalje preveden u (+)-ekvilenin. Reakcija dehidrogenacije jedinjenja XXVIII pomoću SeO₂, međutim, protiče u prinosu od svega 20%.



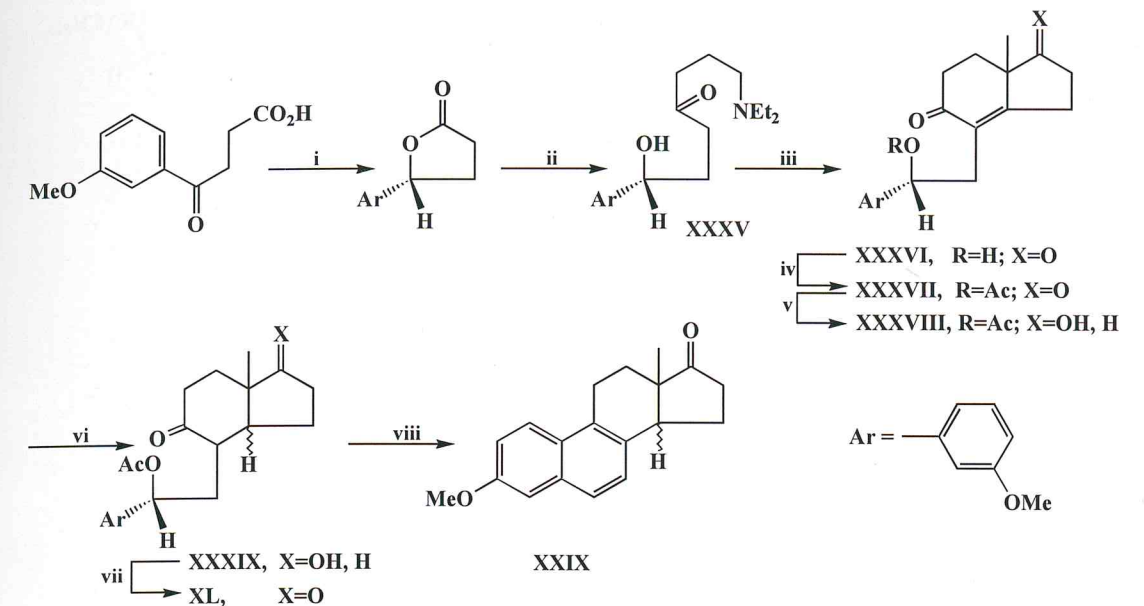
Shema 2.3. *i*, Na-acetilid, tečni NH₃, THF; *ii*, Et₂NH, 30% formalin, trioksan, AcOH, CuCl, D_x, H₂O; *iii*, HgSO₄, 10% H₂SO₄; *iv*, 2-metilciklopentan-1,3-dion, MeOH, NaOH; *v*, TsOH, benzen; *vi*, 2% Pd/CaCO₃, benzen; *vii*, SeO₂, *t*-BuOH, Py.

S druge strane, indijski autori¹⁸ su dehidrogenaciju 3-metoksi-17β-acetoksiestra-1,3,5(10),8-tetraena (XXXII), koji se dobija iz jedinjenja XXVIII, izveli pomoću reagensa čiju su sintezu opisali ranije¹⁹, a koji predstavlja smešu spiro jedinjenja XXX i XXXI (Shema 2.4.). Korišćenjem ovog reagensa nastaje smeša proizvoda XXXIII i XXXIV, u ukupnom prinosu od 65% (Shema 2.4.).



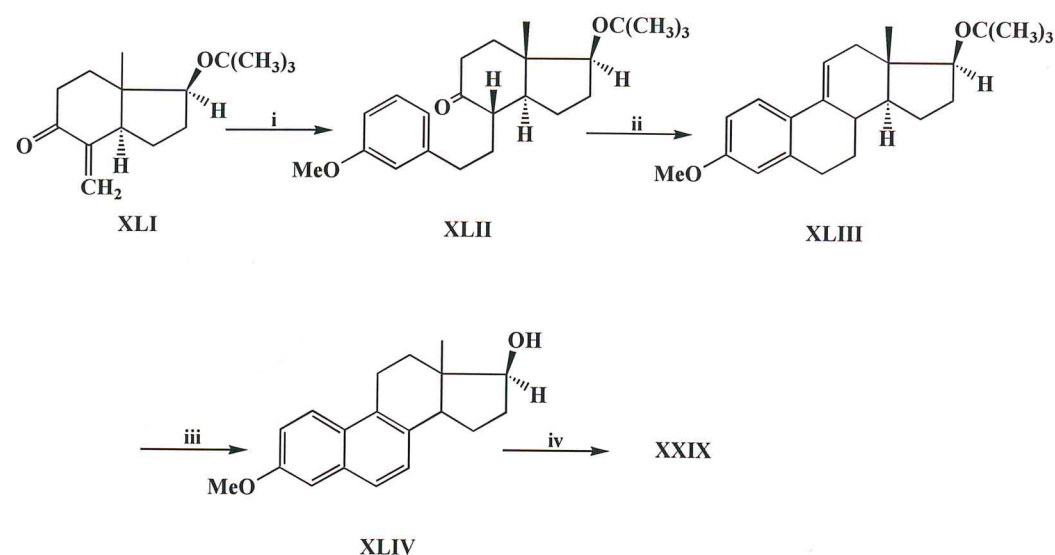
Shema 2.4.

Cohen i saradnici^{20,21} su u prvoj polovini sedamdesetih godina objavili dve totalne sinteze ekvilena. U prvoj sintezi²⁰ (Shema 2.5.) dobijena je racemska smeša stereoizomernih metil-etara ekvilena (**XXIX**). Ključnu fazu u ovoj sintezi predstavlja kondenzacija racemske Mannich-ove baze **XXXV** sa 2-metilciklopentan-1,3-dionom, pri čemu nastaje ketol **XXXVI**. Acetilovanjem hidroksilne grupe, a zatim selektivnom redukcijom 17-keto grupe nastaje proizvod **XXXVIII**, koji katalitičkom hidrogenacijom daje smešu izomera **XXXIX**. Ciklizacija, koja vodi građenju prstena B, ostvarena je prvo oksidacijom hidroksilne grupe u položaju C-17, a zatim tretiranjem nastalog jedinjenja **XL** prvo sa metanolnim rastvorom HCl, a zatim sa *p*-toluensulfonskom kiselinom.



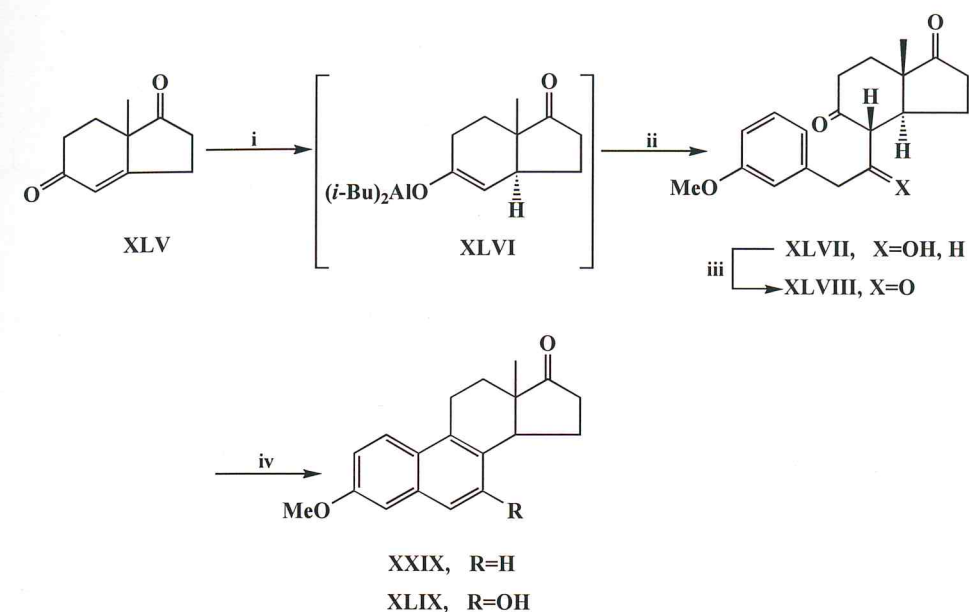
Shema 2.5. *i*, NaBH₄, NaOH; *ii*, vinil-magnezijum-hlorid, THF, zatim Et₂NH; *iii*, 2-metilciklopentan-1,3-dion, AcOH, toluen; *iv*, Ac₂O, Py; *v*, NaBH₄, EtOH; *vi*, H₂, 5% Pd/BaSO₄, EtOH; *vii*, Jones-ov reagens, aceton; *viii*, 10M HCl, MeOH, zatim TsOH, benzen.

U drugoj sintezi Cohen-a i saradnika²¹, u kojoj je dobijen (+)-ekvilen, kao polazno jedinjenje poslužio je optički aktivni α -metilen-keton **XLI**, koji je adicijom *m*-metoksibenzil-magnezijum-hlorida, u prisustvu kupro soli, dao triciklični keton **XLII** (Shema 2.6.). Ciklizacijom ketona **XLII**, pri uslovima koje su opisali Smith i saradnici¹⁷, a zatim tretiranjem nastalog tetraena **XLIII** sa trifluorosirćetnom kiselinom i oksidacijom nastalog alkohola **XLIV** dobijen je metil-etar ekvilena (**XXIX**). Polazno jedinjenje, optički aktivan enon **XLI**, čija je sinteza opisana ranije²², predstavlja pogodan polazni molekul i u totalnim sintezama drugih 19-norsteroida²², kao i androstan²³.



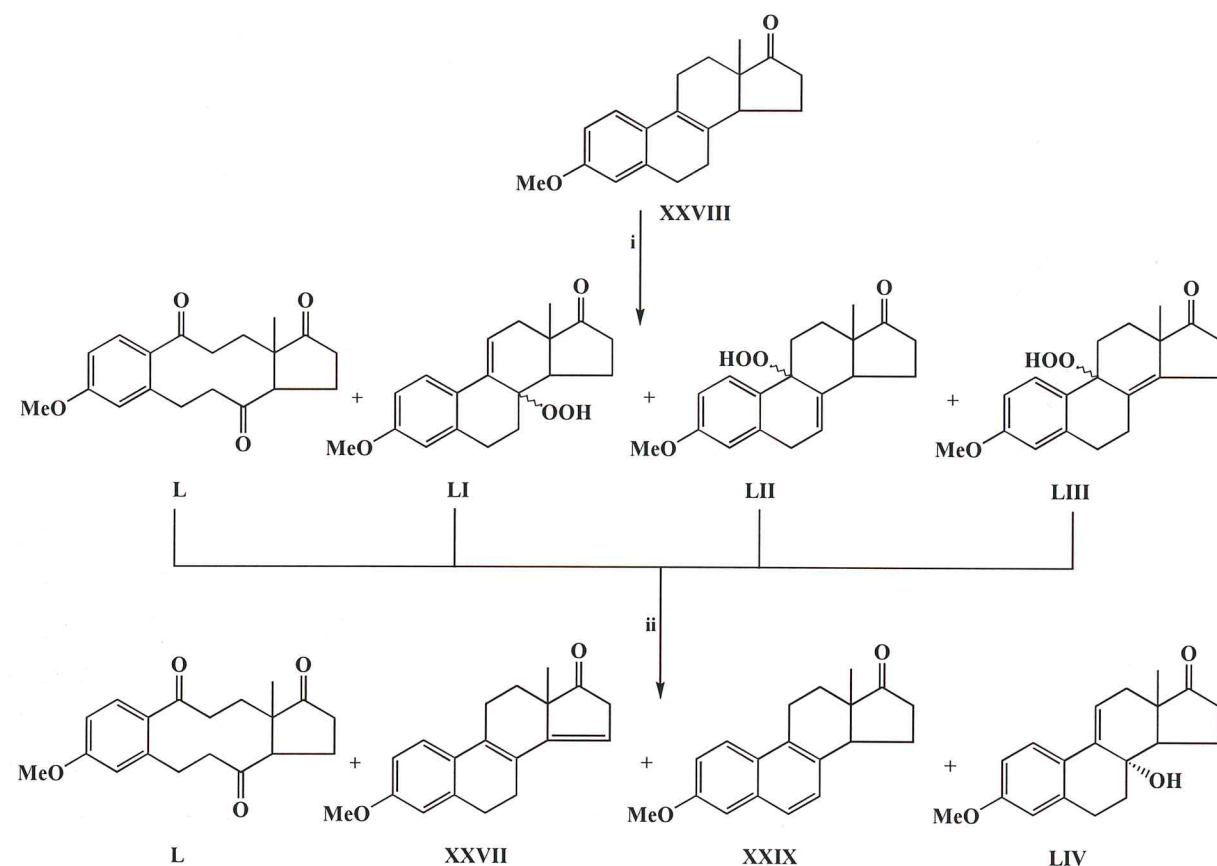
Shema 2.6. *i*, *m*-metoksibenzil-magnezijum-hlorid, CuI, THF; *ii*, MeOH, HCl; *iii*, CF₃CO₂H, zatim 10% NaOH, MeOH; *iv*, Jones-ov reagens.

Osamdesetih godina su Daniewski i saradnici objavili dve totalne sinteze ekvilenina^{24,25}. U novijoj sintezi²⁵ oni su krenuli od indandiona **XLV** (Shema 2.7.). Naime, nakon objavljivanja efikasnih hiralnih sinteza 5,6,7,7a-tetrahidro-7a-metil-1,5-indandiona (**XLV**) od strane kompanija Schering A.G.²⁶ i Hoffmann-La Roche Inc.²⁷, ovo jedinjenje je postalo atraktivan supstrat za sinteze steroida i drugih prirodnih proizvoda. Jedinjenje **XLV** stereoselektivnom redukcijom pomoću diizobutil-aluminijum-hidrida, u prisustvu *t*-BuCu, daje enolat **XLVI**, koji kondenzacijom sa *m*-metoksifenilacetaldehidom daje jedinjenje **XLVII** (kao epimernu smešu na C-7), ili pak kondenzacijom sa *m*-metoksifenilacetil-hloridom daje triketon **XLVIII**. Seko jedinjenja **XLVII** i **XLVIII** ciklizacijom u prisustvu perhlorne kiseline daju metil-etar ekvilenina (**XXIX**), odnosno metil-etar 7-hidroksi-ekvilenina (**XLIX**).



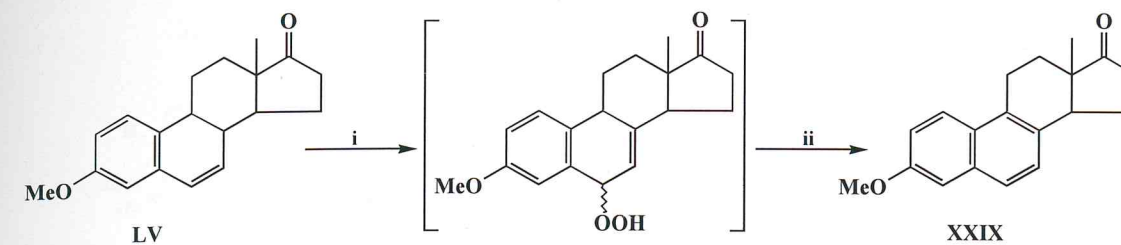
Shema 2.7. *i*, *t*-BuCu, DIBAL, HMPA; *ii*, *m*-MeOC₆H₄CH₂CHO ili *m*-MeOC₆H₄CH₂COCl; *iii*, Jones-ov reagens; *iv*, HClO₄, AcOH.

Španski autori²⁸ su dobili metil-etar ekvilenina (**XXIX**) kao jedan od proizvoda foto-oksidacije 8,9- i 6,7-didehidroestrona (**XXVIII** i **LV**; Sheme 2.8. i 2.9.). Naime, (±)-3-metoksiestra-1,3,5(10),8-tetraen-17-on (**XXVIII**), čija je sinteza bila opisana ranije^{17,29}, u reakciji sa singlet kiseonikom daje četiri proizvoda: **L** (14%), **LI** (21%), **LII** (19%) i **LIII** (18%) (Shema 2.8.). Kada se sirova reakciona smeša tretira pomoću NH₄I dobija se nova smeša koja se sastoji od **L** (14%), **XXVII** (11%), **XXIX** (18%) i **LIV** (19%).



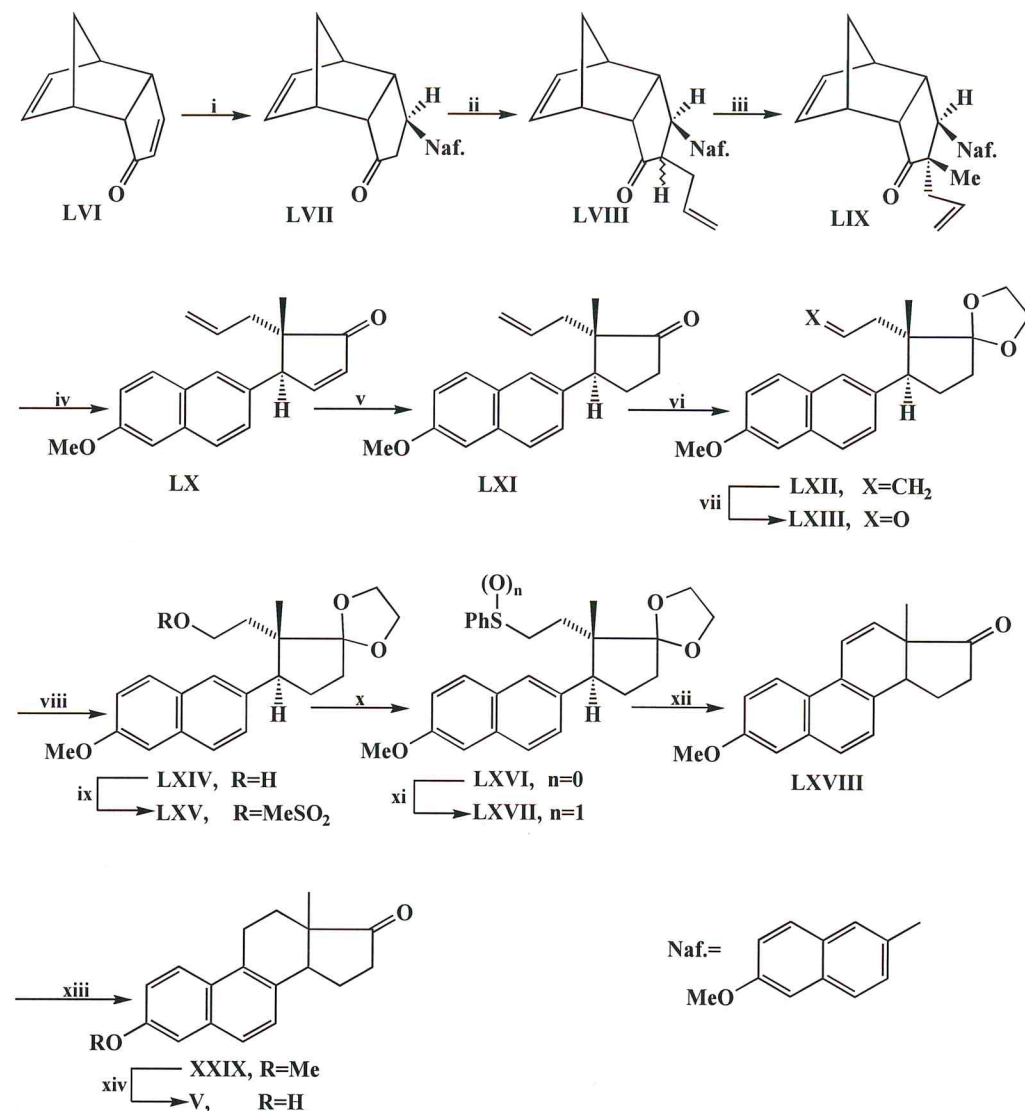
Shema 2.8. *i*, $^1\text{O}_2$; *ii*, NH_4I , MeOH.

S druge strane, 6,7-didehidro derivat LV, koji je dobijen iz 17-hidroksiestra-4,6-dien-3-ona, selektivnom mikrobiološkom aromatizacijom³⁰, ozračivanjem, a zatim tretiranjem sirove reakcione smeše pomoću NH_4I daje metil-etar ekvilenina (XXIX), u prinosu od 25%. (Shema 2.9.).



Shema 2.9. *i*, $^1\text{O}_2$; *ii*, NH_4I , MeOH.

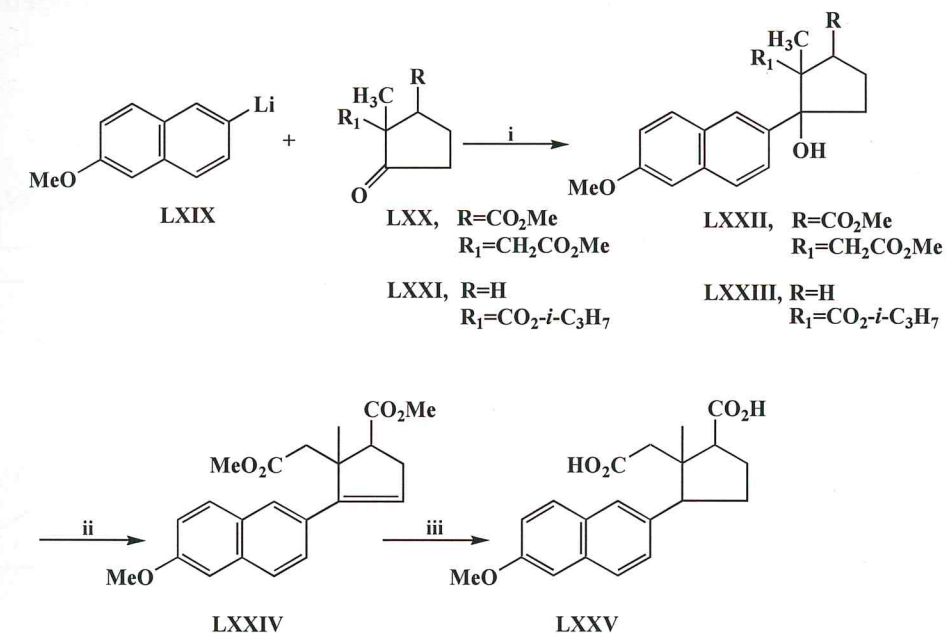
Takano i saradnici³¹ su objavili enantio- i stereo-kontrolisanu sintezu (+)-ekvilenina korišćenjem hiralnog ciklopentadienonskog sintona LVI (Shema 2.10.). Naime, u reakciji (-)-dienona LVI sa Grignard-ovim reagensom, koji je dobijen iz 6-metoksi-2-bromonaftalena, dobija se isključivo *exo*-produkt LVII. Jedinjenje LVII je zatim preko enamina prevedeno u odgovarajući alil-keton LVIII, koji je dobijen u obliku smeše dva epimera. Ponovno alkilovanje jedinjenja LVIII sa metil-jodidom, u prisustvu kalijum-*t*-butoksida, protiče stereoselektivno i dobija se *exo*-metil-keton LIX. Retro-Diels-Alder-ovom reakcijom nastaje ciklopentenon LX. Hidrogenacijom enonske dvostruke veze, a zatim prevođenjem karbonilne grupe u ketal dobijeno je jedinjenje LXII, koje je zatim transformisano u primarni alkohol LXIV preko aldehyda LXIII. Alkoholna funkcija je prevedena u bolje odlazeću meziloksi grupu (LXV), a ova je supstituisana fenilsulfidnom grupom (LXVI), koja je zatim oksidovana do sulfoksidne (LXVII). Nakon zagrevanja jedinjenja LXVII sa smešom trifluoroacetanhidrida i trifluorosirćetne kiseline dolazi do ciklizacije i građenja prstena C (jedinjenje LXVIII). Katalitičkom hidrogenacijom Δ^{11} -dvostruke veze, a zatim uklanjanjem metil-etarске zaštite dobijen je (+)-ekvilenina (V).



Shema 2.10. *i*, 6-metoksi-2-naftil-magnezijum-bromid, CuI, THF; *ii*, cikloheksilamin, benzen, zatim *n*-BuLi, alil-bromid, THF, zatim AcOH-AcONa-H₂O (1:1:2); *iii*, *t*-BuOK, MeI, THF; *iv*, *o*-dihlorobenzen; *v*, LiAlH₄, CuI, THF-HMPA (4:1); *vi*, (CH₂OH)₂, TsOH, toluen; *vii*, OsO₄, NaIO₄, NaHCO₃, THF; *viii*, NaBH₄, NaHCO₃, MeOH; *ix*, MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; *x*, PhSH, K₂CO₃, DMF; *xi*, *m*-CPBA, NaHCO₃, CH₂Cl₂; *xii*, TFAA, TFA, toluen, zatim H₂O; *xiii*, H₂, Pd/C, THF-MeOH (1:1); *xiv*, BBr₃, CH₂Cl₂.

2.1.1.2. Totalne sinteze derivata ekvilenina

Od totalnih sinteza derivata ekvilenina u literaturi su najviše opisane sinteze 9,11-sekoekvileninskih derivata, koji, između ostalog, predstavljaju pogodne intermedijere za sintezu 11-oksoekvilenina. Tako su izraelski autori³² 1967. godine objavili sintezu dimetil-estra (±)-3-metoksi-14β-hidroksi-9,11-sekoestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-11,17β-dikarboksilne kiseline (LXXII) i njenog dehidratacionog proizvoda LXXIV. Pomenuta racemska smeša LXXII dobijena je kondenzacijom 2-metoksi-6-litijum-naftalena (LXIX) sa dimetil-estrom 2-metil-2-karboksimetil-3-oksociklopentanokarboksilnom kiselinom (LXXI) (Shema 2.11.).

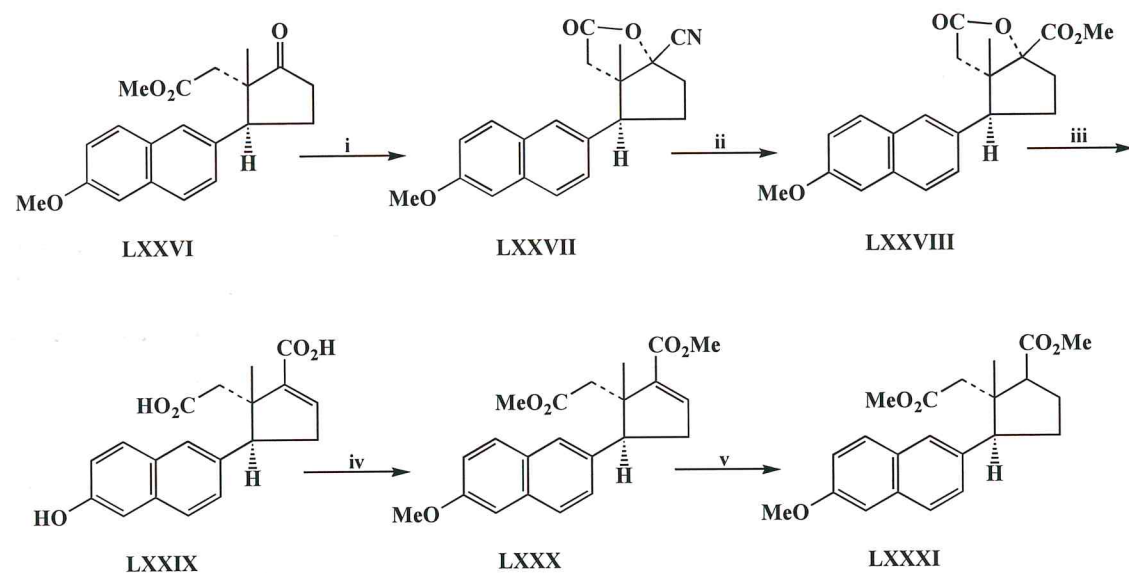


Shema 2.11. *i*, etar, zatim HCl, pa KOH, EtOH; *ii*, TsOH, benzen; *iii*, H₂, 5% Pd/C, EtOAc, CaCO₃.

Sličnu kondenzaciju su pre ovih autora opisali Newman i saradnici³³, s tim što su oni 6-litijum derivat 2-metoksinaftalena (LXIX) kondenzovali sa 2-metil-2-karbo-izopropoksiciklopentanonom (LXXI) (Shema 2.11.), pri čemu su dobili racemsku smešu hidroksi-estara LXXIII, koju su dalje preveli u (±)-17-deoksiekvilenin.

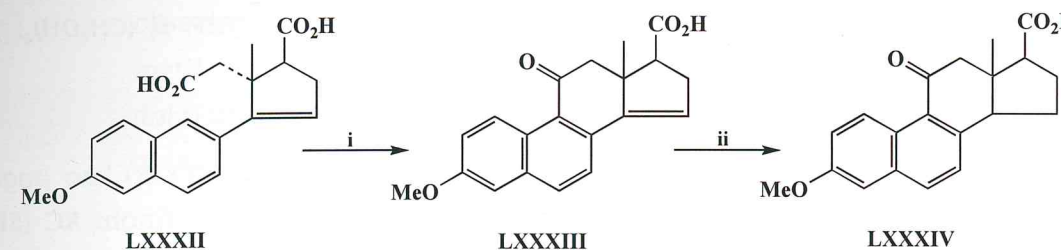
Katalitičkom hidrogenacijom sekoestra **LXXIV**, uz kasniju saponifikaciju, Harnik i saradnici³⁴ su dobili (\pm)-3-metoksi-9,11-sekoestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-11,17 β -dikarboksilnu kiselinu (**LXXV**) (Shema 2.11.).

U istom radu³⁴ opisano je i dobijanje dimetil-estra (+)-3-metoksi-9,11-sekoestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-11,17 β -dikarboksilne kiseline (**LXXXI**) (Shema 2.12.). Kao polazno jedinjenje poslužio je metil-estar optički aktivne keto-kiseline **LXXVI**, čija je sinteza bila opisana od strane Dygos-a i Chinn-a³⁵. Keto-estar **LXXVI** je cijanhidrijskom reakcijom preveden u cijanolakton **LXXVII**, a ovaj je zagrevanjem u smeši metanol - sumporna kiselina dao lakton-estar **LXXVIII**. Bazno-katalizovanom eliminacijom na visokoj temperaturi iz jedinjenja **LXXVIII** dobijena je Δ^{16} -dikarboksilna kiselina **LXXIX**, koja je nakon esterifikacije i katalitičke hidrogenacije dala optički čist proizvod **LXXXI**.



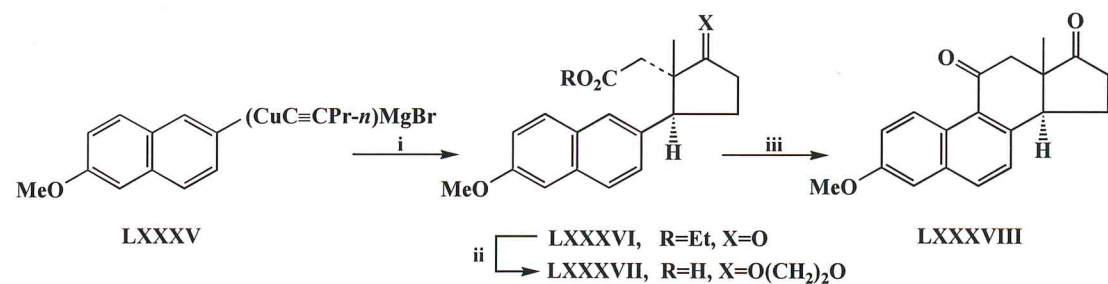
Shema 2.12. *i*, KCN, AcOH, EtOH; *ii*, MeOH, H₂SO₄; *iii* (CH₂OH)₂, KOH; *iv*, Me₂SO₄, zatim CH₂N₂; *v*, H₂, 5% Pd/C, CaCO₃, MeOH.

11-Oksokvileninski derivati se relativno lako dobijaju iz odgovarajućih 9,11-sekokarboksilnih kiselina, ciklizacijom u prisustvu kiselih^{36,39} ili baznih⁴⁰ katalizatora. Tako su Banerjee i saradnici³⁶ sintetizovali 3-metoksi-17-karboksiestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-11-on (**LXXXIV**) (Shema 2.13.) ciklizacijom dikarboksilne kiseline **LXXXII**, u prisustvu polifosforne kiseline, pri čemu su dobili nezasićenu keto-kiselinu **LXXXIII**, iz koje su, nakon katalitičke hidrogenacije u prisustvu 30% Pd/C, dobili jedinjenje **LXXXIV**.



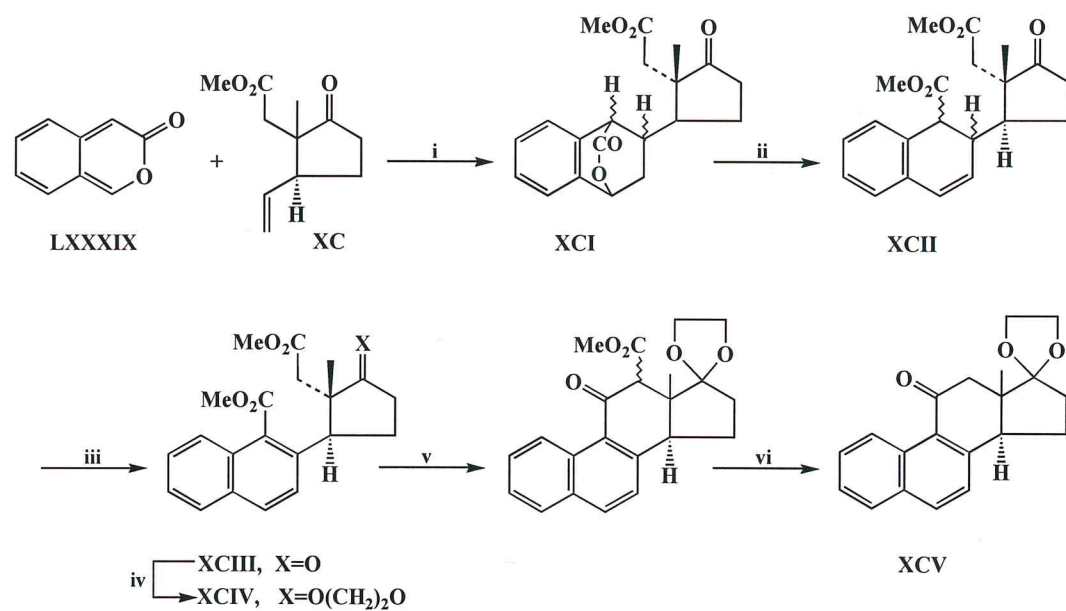
Shema 2.13. *i*, polifosforna kiselina; *ii*, H₂, 30% Pd/C.

Dva najveća problema u totalnim sintezama steroida uopšte, pa i u sintezi ekvilenina i njegovih derivata, jeste kontrola stereochemije, kao i efikasnost u građenju tetracikličnog ugljenikovog skeleta³⁷. Ove probleme su dosta uspešno rešili Posner i saradnici^{38,39} u jednostavnoj, stereokontrolisanoj, totalnoj sintezi metil-etra (\pm)-11-oksoekvilenina. Sintaza se zasniva na β -adiciji organobakarnog jedinjenja **LXXXV** na 2-metil-ciklopent-2-en-1-on, a zatim α -alkilovanju nastalog adukta, pri čemu se dobija 9,11-sekosteroid **LXXXVI**, u gotovo kvantitativnom prinosu, i sa hemijskom čistoćom >99% (Shema 2.14.). Kao organobakarno jedinjenje poslužio je (6-metoksi-2-naftil)(1-pentini)l)bakar-magnezijum-bromid (**LXXXV**), koji se pokazao znatno efikasnijim³⁹ nego ranije korišćen (6-metoksi-2-naftil)(1-pentini)l)bakar-litijum³⁸. Osim toga, pomenuti autori³⁹ su zapazili da se pri ciklizaciji seko-kiseline pomoću anhidrovane fluorovodonične kiseline mnogo bolji prinos (75%) dobija ako se u položaju C-17 nalazi ketalna funkcija (jedinjenje **LXXXVII**) umesto keto grupe (prinos jedinjenja **LXXXVIII** u ovom drugom slučaju iznosi svega 10%).



Shema 2.14. *i*, 2-metilciklopent-2-en-1-on, zatim $\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, HMPT, THF; *ii*, $(\text{CH}_2\text{OH})_2$, TsOH, benzen; *iii*, HF.

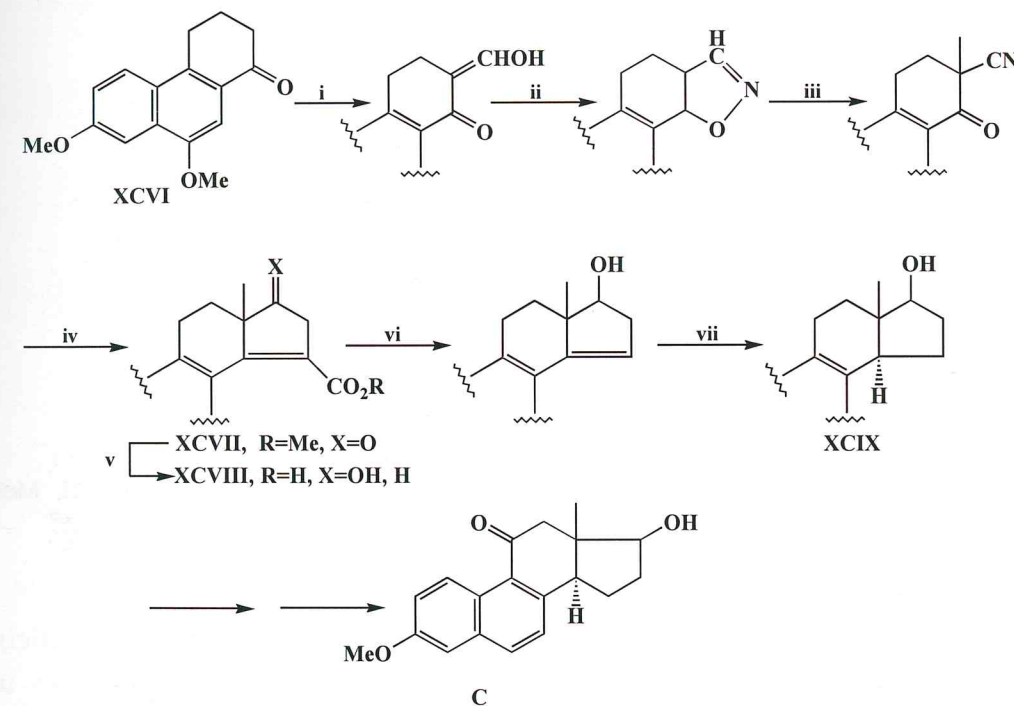
Engleski autori⁴⁰ su upotrebili 2-benzopiran-3-on (**LXXXIX**) kao pogodan dien u intermolekularnoj Diels-Alder-ovoj reakciji sa olefinom **XC** (Shema 2.15.).



Shema 2.15. *i*, Ac_2O ; *ii*, MeOH, HCl; *iii*, DDQ, hlorobenzen; *iv*, bis-trimetil-silil-etar, $(\text{CH}_2\text{OH})_2$, TMSOTf, CH_2Cl_2 ; *v*, NaH, THE, MeOH; *vi*, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DMSO.

Lakton **LXXXIX** nastaje veoma lako pri zagrevanju *o*-formilfenilsirćetne kiseline sa anhidridom sirćetne kiseline⁴¹. U prvoj fazi sinteze, regioselektivnom Diels-Alder-ovom adicijom jedinjenja **LXXXIX** na olefin **XC** nastaje smeša stereoizomernih adukata **XCI**, koja pri zagrevanju sa metanolom, prethodno zasićenim sa hlorovodonikom, daje stereoizomerne dihidronaftalene **XCII**. Refluksovanjem smeše **XCII** sa DDQ, nastaje derivat naftalena **XCIII**, koji Dieckmann-ovom ciklizacijom, a zatim eliminacijom estarske funkcije sa C-12 daje derivat ekvilenina **XCV**.

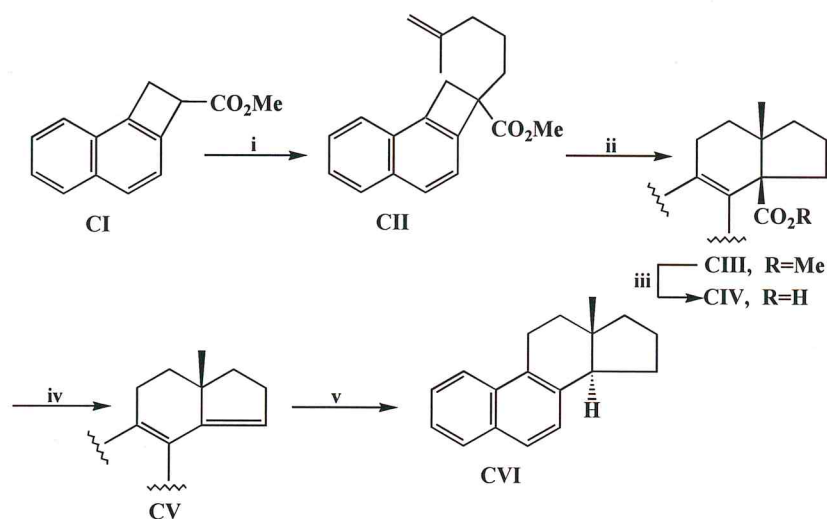
Indijski autori⁴² su 1993. godine objavili novu strategiju u dobijanju 11-oksoekvilenina. Ključni intermedijer u pomenutoj sintezi predstavlja metil-etar (\pm) -17 β -hidroksi-6-metoksiekvilenina (**XCIX**). Za njegovo dobijanje iz ketona **XCVI**, kao polaznog jedinjenja, iskorišćene su ranije opisane sinteze^{44,15}, koje su prikazane na shemi 2.16.



Shema 2.16. *i*, NaH, HCO_2Et , benzen; *ii*, $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, AcOH; *iii*, *t*-BuOK, MeI, benzen; *iv*, *t*-BuOK, *t*-BuOH, $(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me})_2$; *v*, NaBH_4 , EtOH, zatim Ba(OH)_2 , H_2O , EtOH; *vi*, stakleni prah, N_2 , 300°C ; *vii*, H_2 , 10% Pd/C, EtOH.

Triciklični keton **XCVI**, dobijen iz 1,7-dimetoksinaftalena⁴³, preveden je u tetraciklično jedinjenje **XCVII** prema postupku Johnson-a i saradnika¹⁵, a transformacije jedinjenja **XCVII** u pomenuti ključni intermedijer **XCIX** izvedene su po postupku Banerjee-a i saradnika⁴⁴. Regioselektivnom benzilnom oksidacijom jedinjenja **XCIX** može se dobiti željeni 11-oksoekvileninski derivat **C**

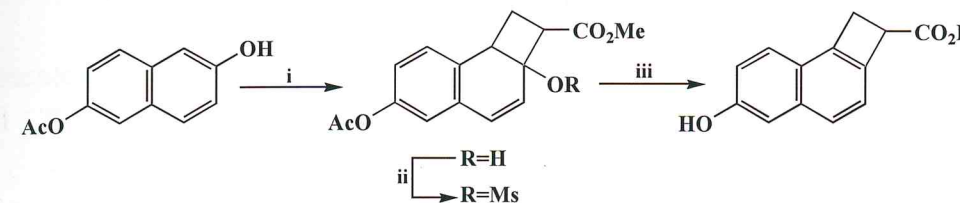
Grupa japanskih autora⁴⁵, koja je objavila znatan broj radova iz oblasti primene reakcija cikloadicije u sintezi, deo svojih istraživanja iz ove oblasti posvetila je i sintezi steroidnog tetracikličnog sistema sa aromatičnim A i B prstenovima (jedinjenje **CVI**; shema 2.17.).



Shema 2.17. *i*, 4-metil-4-pentenil-jodid, NaH, DMF; *ii*, *o*-dihlorobenzen; *iii*, KOH, MeOH; *iv*, Pb(OAc)₄, benzen; *v*, H₂, 10% Pd/C, MeOH.

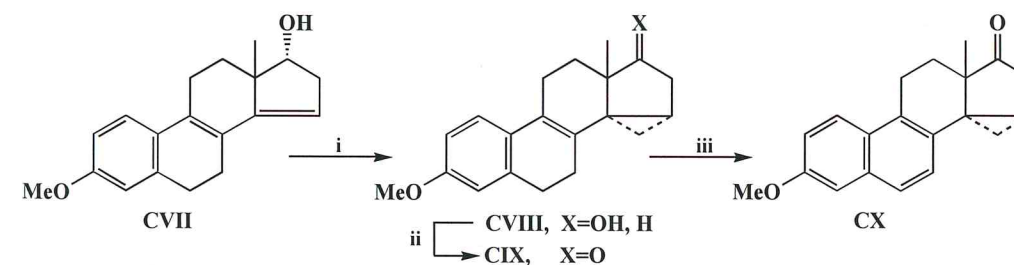
Polazni molekul u ovoj sintezi (jedinjenje **CI**) dobijen je fotoadacijom 2-metoksinaftalena na akrilonitril⁴⁶. Jedinjenje **CI** je prevedeno u 2-(4-metilpent-4-enil) derivat **CII**, koji je zagrevanjem u *o*-dihlorobenzenu dao gotovo isključivo C/D-*cis* tetraciklično jedinjenje **CIII**. Hidrolizom estarske funkcije, a zatim dekarboksilovanjem dobijen je olefin **CV**, koji je katalitičkom hidrogenacijom dao proizvod **CVI**, sa C/D-*trans* povezanim prstenovima.

U istom radu⁴⁵ opisana je i sinteza 6-hidroksi derivata jedinjenja **CI** (Shema 2.18.), koji bi mogao da posluži kao pogodan sinton u sintezi A,B-aromatičnih 3-hidroksisteroida.



Shema 2.18. *i*, akrilonitril, MeOH, hv; *ii*, MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; *iii*, NaOH.

Noviju sintezu derivata ekvilenina opisali su nemački autori⁴⁷. Na osnovu ranijih saznanja da 14 α ,15 α -metilen premošćeni derivati estrona pokazuju značajnu estrogenu aktivnost pri oralnoj primeni⁴⁸, Künzer i Thiel⁴⁷ su sintetizovali 14 α ,15 α -metilen derivat ekvileninskog tipa (Shema 2.19.). Kao polazno jedinjenje u pomenutoj sintezi poslužio je 3-metoksi-17 α -hidroksiestra-1,3,5(10),8,14-pentaen (**CVII**), čija je sinteza bila opisana u ranijim radovima⁴⁹. Za građenje ciklopropanovog prstena korišćen je Simmons-Smith-ov reagens, pri čemu je dobijen pentaciklični molekul **CVIII**. Oksidacijom hidroksilne grupe u položaju C-17, koja je izvedena po metodi Parikh-a i Doering-a⁵⁰, a zatim aromatizacijom prstena B dobijen je 3-metoksi-14 α ,15 α -metilenestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-17-on (**CX**).



Shema 2.19. *i*, ICH₂ZnI, (MeO)₂Et; *ii*, Et₃N, Py·SO₃, DMSO; *iii*, DDQ, toluen.

2.1.1.3. Parcijalne sinteze ekvilena

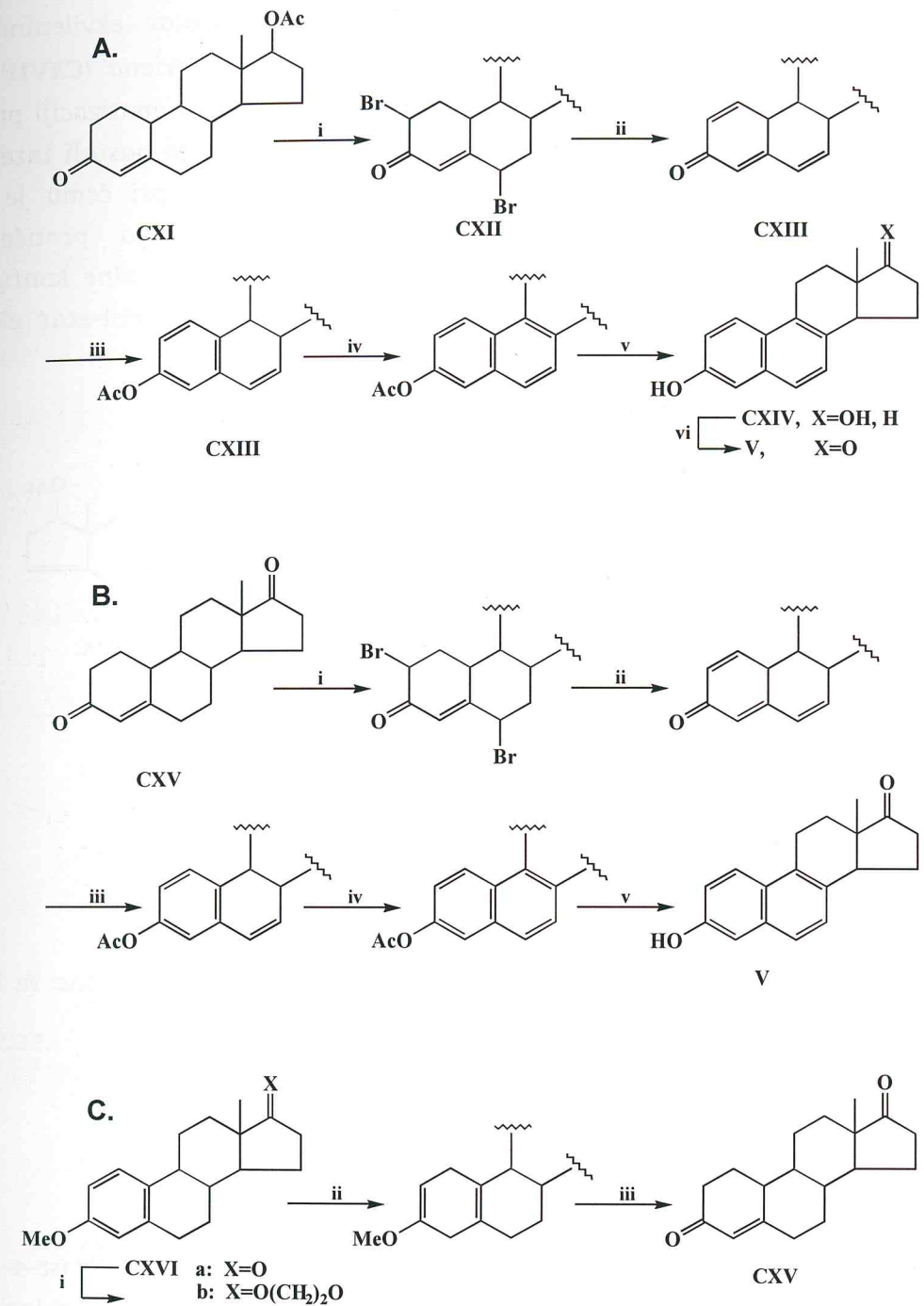
Iako je ekvilen bio jedan od prvih steroidnih hormona koji je dobijen totalnom sintezom, u literaturi je opisan relativno mali broj parcijalnih sinteza.

Tako su Corbellini i saradnici⁵¹ sintetizovali ekvilen polazeći od tri različita supstrata: **A.** 19-nortestosteron acetata (**CXI**); **B.** 19-nor-4-androsten-3,17-diona (**CXV**) i **C.** metil-etra estrona (**CXVI**).

Prema postupku **A.** (Shema 2.20.) bromovanjem 19-nortestosteron acetata (**CXI**), a zatim dehidrobromovanjem nastalog jedinjenja **CXII** dobijen je trienon **CXIII**, koji je potom u četiri sintetske faze preveden u ekvilen.

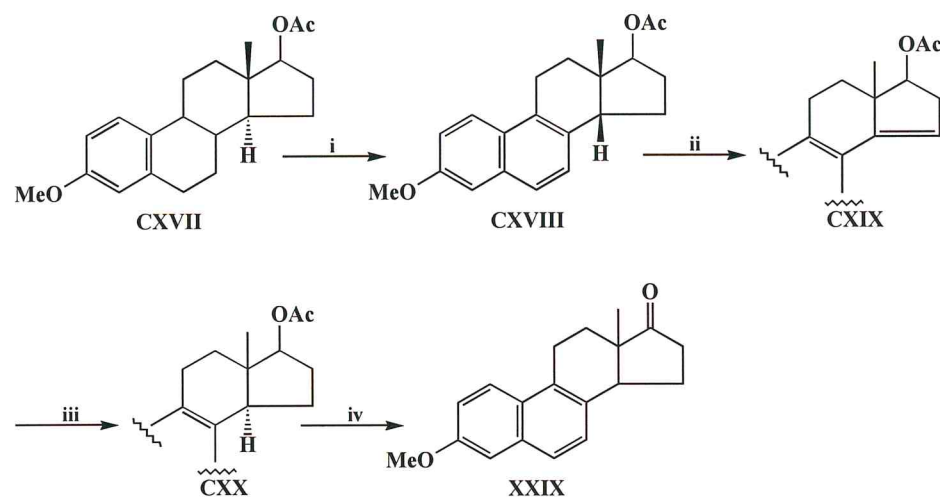
U postupku **B.** (Shema 2.20.) je izbegnuta faza oksidacije u položaju C-17, jer je upotrebljen 19-nor-4-androsten-3,17-dion (**CXV**), kao polazno jedinjenje. Njegove transformacije do ekvilena obuhvataju analogan tok reakcija koje su opisane u postupku **A.**

U trećem postupku (Shema 2.20., **C.**), metil-etar estrona (**CXVI**) je u tri faze preveden u 19-nor-4-androsten-3,17-dion (**CXV**), a ovaj je dalje transformisan u ekvilen na gore opisani način (postupak **B.**).



Shema 2.20. **A.** i **B.** *i*, Br₂, AcOH, HBr, Et₂O; *ii*, kolidin; *iii*, TsOH, Ac₂O; *iv*, SeO₂, DX; *v*, MeOH, NaOH, H₂O; *vi*, (*i*-PrO)₃Al, cikloheksanon, toluen; **C.** *i*, (CH₂OH)₂, TsOH, benzen, zatim P₂O₅; *ii*, Li, NH₃, Et₂O; *iii*, HCl, MeOH.

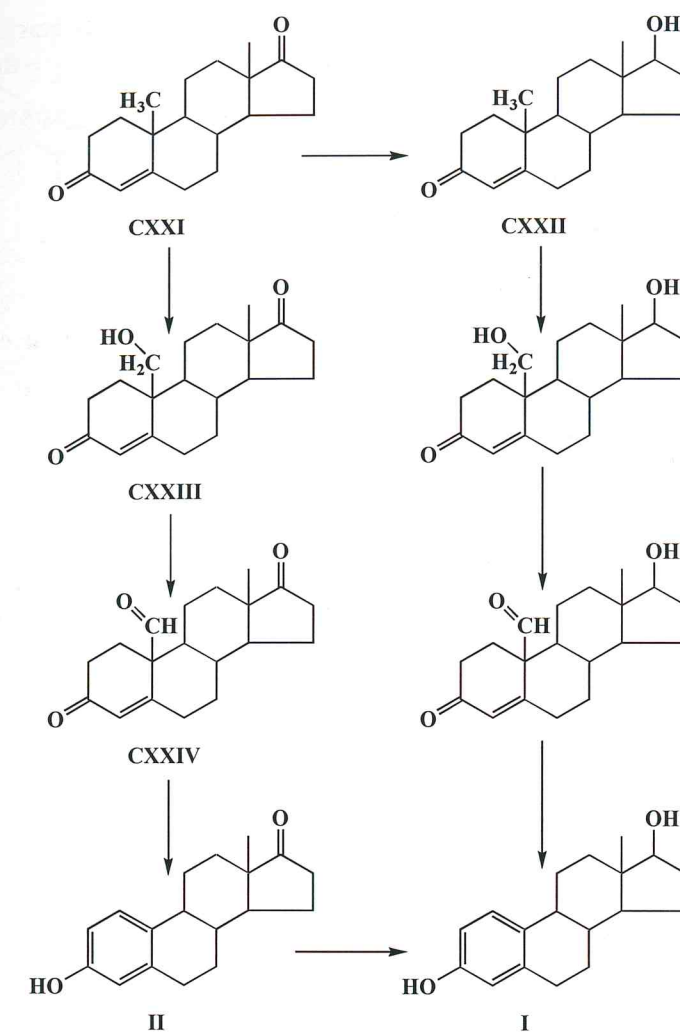
Minailova i saradnici⁵² su sintetizovali metil-etar ekvilenina (**XXIX**) polazeći od 3-metoksi-17 β -acetoksiestra-1,3,5(10)-triena (**CXVII**) (Shema 2.21.). U prvoj fazi, pri dehidrogenaciji, odnosno aromatizaciji prstena B, dolazi i do inverzije konfiguracije na C-14. Zato je nastali intermedijer **CXVIII** podvrgnut dehidrogenaciji pomoću DDQ, pri čemu je dobijen proizvod **CXIX**. Katalitičkom hidrogenacijom, koja protiče visoko stereoselektivno, nastaje derivat ekvilenina **CXX** prirodne konfiguracije, koji je saponifikacijom, a zatim oksidacijom dao metil-etar ekvilenina (**XXIX**).



Shema 2.21. *i*, 10% Pd/C, 210-220°C; *ii*, DDQ, D_x; *iii*, H₂, 10% Pd/C, AcOH, EtOAc; *iv*, hidroliza, zatim CrO₃, aceton.

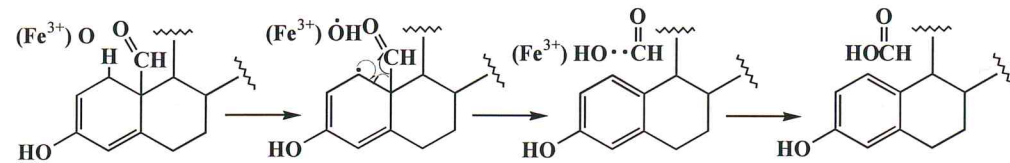
2.1.2. Biosinteza estrogena

Estron (**II**) se u najvećoj meri sintetiše u ovarijumu iz androst-4-en-3,17-diona (**CXXI**; Shema 2.22.). Reakcioni put se sastoji iz tri oksidativne faze koje su katalizovane enzimima iz grupe citohroma P-450. Biosinteza započinje hidroksilovanjem C-19 metil grupe⁵³, pri čemu se dobija alkohol **CXXIII**, koji se dalje oksiduje do aldehida **CXXIV**.



Shema 2.22.

Aromatizacija prstena A ostvaruje se enolizacijom keto grupe u položaju C-3, čime se olakšava odvajanje β -vodonikovog atoma u položaju C-1 i nastajanje odgovarajućeg radikala⁵⁴ (Shema 2.23.) Homolitičko raskidanje C₁₀-C₁₉ veze rezultira građenjem $\Delta^{1(10)}$ dvostruke veze i formil radikala, koji sa hidroksi radikalom daje mravlju kiselinu.

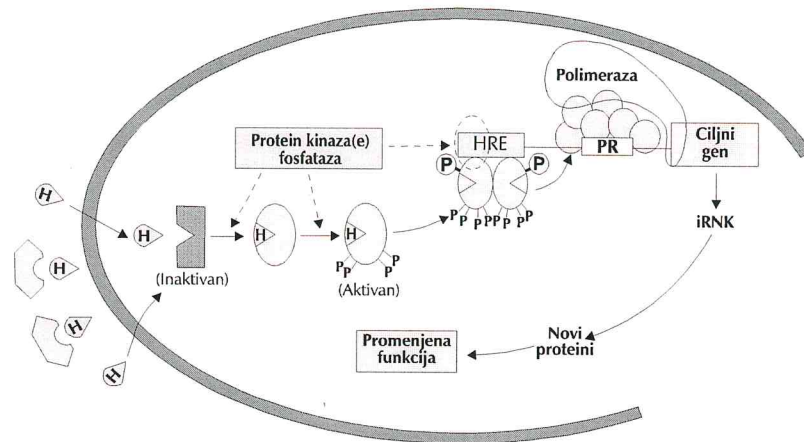


Shema 2.23.

Po istom mehanizmu se testosteron (CXXII) prevodi u estradiol (I) (Shema 2.22.), koji se dobija i enzimatskom redukcijom estrona.

2.1.3. Transport i delovanje estrogena

Velikim zamahom naučnog istraživanja, posebno u molekularnoj biologiji, došlo se do saznanja o funkciji steroidnih hormona i njihovom molekularnom mehanizmu delovanja.



Slika 2.1. Šematski prikaz mehanizma delovanja steroidnih hormona u ciljnoj ćeliji. H - hormon, PR - promotorski region, HRE - "hormone response element", P - fosfat.

Estrogeni, kao i uopšte svi steroidni hormoni, deluju samo u određenim organima, koji se nazivaju ciljni ili "target" organi, a odgovarajuće ćelije ciljne ili "target" ćelije. Ciljne ćelije sadrže specifične proteine, koji se zovu receptori, za koje se vezuju estrogeni. Tek vezivanjem za receptor, pri čemu se gradi hormon-receptor kompleks, estrogeni ispoljavaju svoju aktivnost

u ciljnoj ćeliji, među kojima je najznačajnija genska ekspresija^{55,56,57}. Na slici 2.1. dat je šematski prikaz mehanizma delovanja steroidnih hormona⁵⁸.

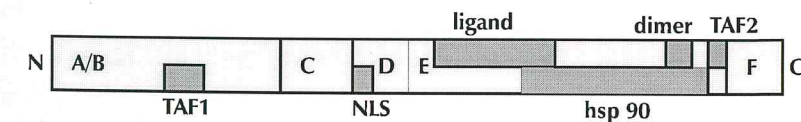
2.1.3.1. Transport estrogena

S obzirom da su estrogeni hidrofobni to se oni iz ovarijuma, gde se sintetišu, transportuju kroz krvotok do ciljne ćelije pomoću serumskih protein-nosača. Najznačajniji protein-nosač je globulin ("testosteron-estrogen binding globulin", TEBG), koji ima visok afinitet vezivanja za estradiol, ali ograničeni kapacitet⁵⁹. Drugi protein-nosač je albumin, koji, pak, ima mali afinitet vezivanja za hormon, ali je u serumu prisutan u znatno većoj koncentraciji, tako da je za njega vezano oko 60% ukupnog estradiola u cirkulaciji. Svega 2% estradiola se nalazi kao slobodan u serumu⁵⁹.

2.1.3.2. Estrogeni receptori

Ključni momenat u delovanju estrogenih hormona jeste njihovo vezivanje za receptore⁶⁰. Poznavanje tačne strukture estrogenih receptora, kao i načina njihovog delovanja u jedru, od važnosti je za dizajniranje sintetskih estrogena, kao i antiestrogena, tj. molekula koji će sprečiti funkcionisanje receptora u ciljnim ćelijama. O tome svedoči veliki broj radova koji se svake godine publikuje u svetu^{61,62,63}.

Estrogeni receptori (ER) spadaju u grupu nuklearnih receptora. To su proteini koji se sastoje od 595 aminokiselina. Svoju aktivnost ispoljavaju preko pet funkcionalno odvojenih regiona (Slika 2.2.)⁶⁴:

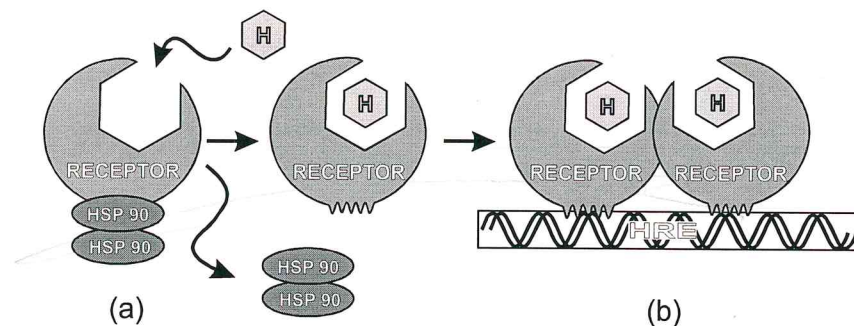


Slika 2.2. Šematski prikaz strukturne i funkcionalne organizacije steroidnog receptora

1. Amino-kraj, A/B region: Glavna funkcija mu je aktivacija transkripcije⁶⁵ (TAF- transkripciono-aktivacioni domen). Kod većine nuklearnih receptora, među koje spadaju i ER postoje dva domena za aktivaciju transkripcije: jedan u A/B regionu (TAF1) i drugi u E regionu (TAF2)⁶⁶.
2. DNK-vezujući (C) region je centralni region, koji je odgovoran za vezivanje receptora za DNK⁶⁷.
3. D region (poznat i pod nazivom "HINGE") nalazi se između DNK-vezujućeg domena (C region) i ligand vezujućeg domena (E region). Odgovoran je za lokalizaciju u jedru⁶⁸ (NLS - nuklearni lokalizacioni signal).
4. E region je najkompleksniji i ima četiri važne funkcije:
 - a) vezivanje liganda (tj. hormona);
 - b) aktivacija transkripcije (TAF2);
 - c) dimerizacija i
 - d) vezivanje "heat shock protein"-a (hsp 90)*, ^{69,70}.
5. F region predstavlja produžetak E regiona.

2.1.3.3. Aktivirani estrogen-receptor kompleks i njegovo vezivanje za DNK

Nakon ulaska u ćeliju hormon se veže za odgovarajuće mesto na receptoru, uz istovremeno odvajanje hsp 90 (Slika 2.3.)⁶¹.



Slika 2.3. Model interakcije steroidnog receptora sa hsp 90 pre aktivacije (a), i sa HRE nakon aktivacije (b).

* "Heat shock protein"-i su citozolski proteini koji se indukuju tokom toplotnog šoka ili nekih drugih stresova. Pošto u tim uslovima dolazi do denaturacije proteina, to se pretpostavlja da su hsp uključeni u renaturaciju proteina. Dva molekula hsp 90 interaguju sa jednim molekulom ER. Ovakav kompleks ne može da se veže za DNK.

Aktivirani hormon-receptor kompleks migrira u jedro ćelije, gde se u obliku dimera veže za specifičnu DNK sekvencu, tzv. "hormone response element" (HRE)⁷¹. Ovim vezivanjem započinje proces transkripcije specifičnih gena. Ustvari, nuklearni receptori su inducibilni transkripcioni faktori, koji se aktiviraju vezivanjem liganda (hormona) za odgovarajuće mesto na receptoru, a rezultat transkripcione aktivnosti kompleksa ligand - receptor je sinteza iRNK (Slika 2.1.). Produkovana iRNK se zatim transportuje u citoplazmu, gde na ribozomima služi kao matrica za biosintezu specifičnih proteina⁷². Novosintetizovani proteini regulišu biološke procese, specifične za estrogene i njihove metabolite.

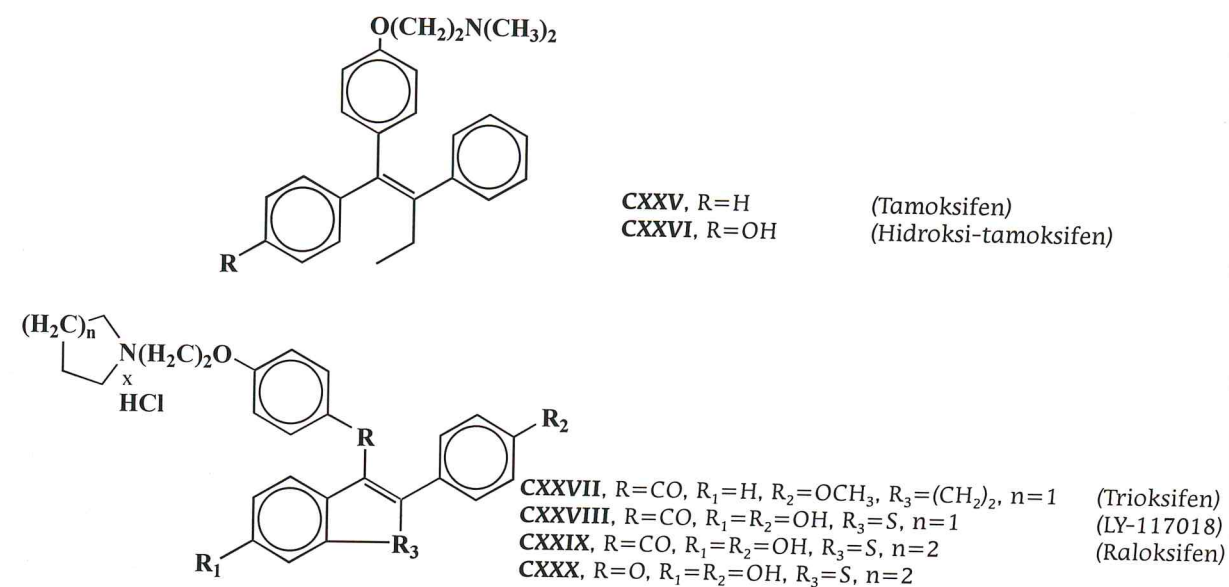
2.2. Antiestrogeni

Pod pojmom "antiestrogeni" podrazumevaju se jedinjenja koja inhibiraju delovanje estrogena. S obzirom da estrogeni stimulišu rast i razvoj kancera dojke, to antiestrogeni predstavljaju važne lekove u terapiji estrogen-zavisnih kancera^{2,3,4,5}.

Antiestrogeni mogu imati nesteroidnu (Slika 2.4.) i steroidnu (Slika 2.5.) strukturu. Od nesteroidnih antiestrogena najpoznatiji je tamoksifen (CXXV), koji se već više od deset godina koristi u medicini i predstavlja prvi nivo hormonskog terapijskog postupka u lečenju metastatskog raka dojke⁵. Osnovni nedostatak ovog leka je što ima znatan procenat estrogene aktivnosti^{73,74,75,76}, pa se ne može smatrati čistim antiestrogenom. Njegov analog i metabolit, hidroksi-tamoksifen⁷⁷ (CXXVI) ima znatno povećan antagonistički efekat i smanjen agonistički efekat.

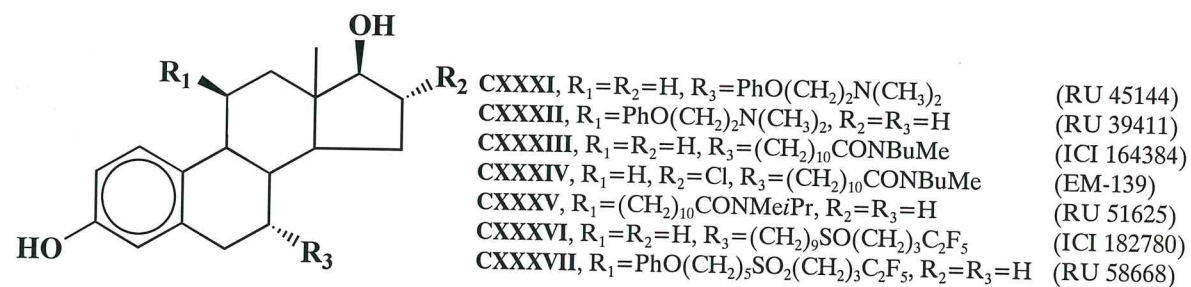
Jones i saradnici⁷⁸ su sintetizovali trioksifen (CXXVII) i utvrdili da je on bolji antiestrogen od tamoksifena, jer ima manji agonistički efekat, ali ovo jedinjenje još uvek nema kliničku primenu. LY-117018 (CXXVIII)⁷⁹ i raloksifen (CXXIX)⁸⁰ po strukturi pripadaju istoj seriji sa trioksifenom, koji u molekulu umesto kiseonika sadrže novi heteroatom - sumpor. Ova jedinjenja se u organizmu brzo metabolizuju i izlučuju, tako da su na testovima kod životinja pokazali slabu potentnost kao antitumorni

agensi^{81,82,83}. Kada se u molekulu **CXXXIX** karbonilna grupa zameni kiseonikom dobija se jedinjenje **CXXX**, koje, prema prvim *in vitro* testovima⁸⁴, pokazuje desetostruko povećanje estrogenog antagonizma u odnosu na raloksifen (**CXXXIX**).



Slika 2.4. Molekulske strukture nekih nesteroidnih antiestrogena

U poslednjih deset godina u literaturi je opisana nova generacija steroidnih antiestrogena, koji su u biološkim testovima pokazali značajan, kao i potpuni estrogeni antagonizam^{6,7,8,85,86,87,88}. Svi oni predstavljaju 7- ili 11- supstituisane derivate estradiola (Slika 2.5.).



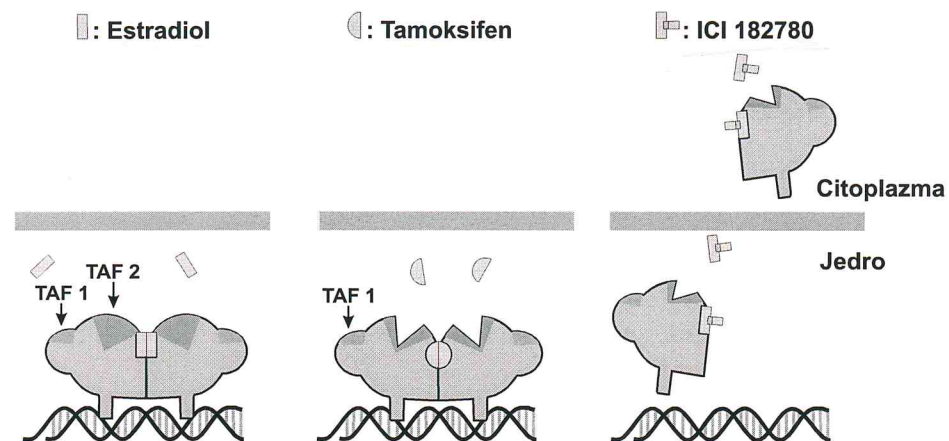
Slika 2.5. Molekulske strukture nekih steroidnih antiestrogena

Nedelec i saradnici^{8,85} su u položaj 7α (**CXXXI**, RU 45144)⁸⁵ i 11β (**CXXXII**, RU 39411)⁸ uveli dimetilaminoetoksifenil bočni niz (koji odgovara inkrementu tamoksifena, **CXXV**). Ova jedinjenja imaju značajnu antiestrogenu i antiproliferativnu aktivnost, ali, slično tamoksifenu, ispoljavaju parcijalno estrogeno delovanje.

S druge strane, jedinjenja ICI 164384 (**CXXXIII**)⁶ i EM-139 (**CXXXIV**)⁸⁶ sadrže dugačak *n*-butilmetilalkilamidni bočni niz u položaju 7α, dok jedinjenje RU 51625 (**CXXXV**)⁸⁷ ima u položaju 11β *i*-propilmetilalkilamidni bočni niz. Ova jedinjenja pokazuju potpuni gubitak uterotrofne aktivnosti kada se daju subkutano, dok pri oralnoj primeni pokazuju slab agonistički efekat.

Wakeling i saradnici su pored ICI 164384 (**CXXXIII**) sintetizovali i drugi "čisti" antiestrogen, ICI 182780 (**CXXXVI**)⁷. Ovo jedinjenje ima u 7α položaju dugačak pentafluoro-pentilsulfinil bočni niz i pokazuje deset puta veću potentnost od ICI 164384⁷. Sličnu aktivnost kao i **CXXXVI** pokazuje i jedinjenje **CXXXVII** (RU 58668)⁸⁸, koje u 11β položaju sadrži pentafluoro-pentilsulfonyl bočni niz. Pomenuto jedinjenje je prema rezultatima testiranja⁸⁹ na MCF-7 ćelijama tumora pokazalo izuzetno visoku potentnost.

Na osnovu rezultata ispitivanja veze između strukture i biološke aktivnosti došlo se do zaključka da trifeniletilenski antiestrogeni (kao što je npr. tamoksifen, **CXXV**) svoje delovanje ispoljavaju tako što sa receptorima grade antihormon-ER komplekse. Takvi kompleksi se kao dimeri vezuju za specifičnu DNK sekvencu (Slika 2.6.), ali blokiraju hormon-zavisnu aktivaciju transkripcije, koja je dirigovana regionom E receptora (TAF2, slika 2.2.)⁹⁰. Međutim, pretpostavlja se da oni imaju mali, ili nikakav, efekat na hormon-nezavisnu funkciju aktivacije transkripcije, lociranu u A/B regionu receptora (TAF1), zbog čega su oni parcijalni antagonisti.



Slika 2.6. Model delovanja estradiola, tamoksifena i ICI 182780 na estrogene receptore.

S druge strane, jedinjenja sa dugačkim alkil bočnim nizom sprečavaju dimerizaciju receptora⁹¹, a time i vezivanje za DNK (Slika 2.6.).

3. NAŠI RADOVI

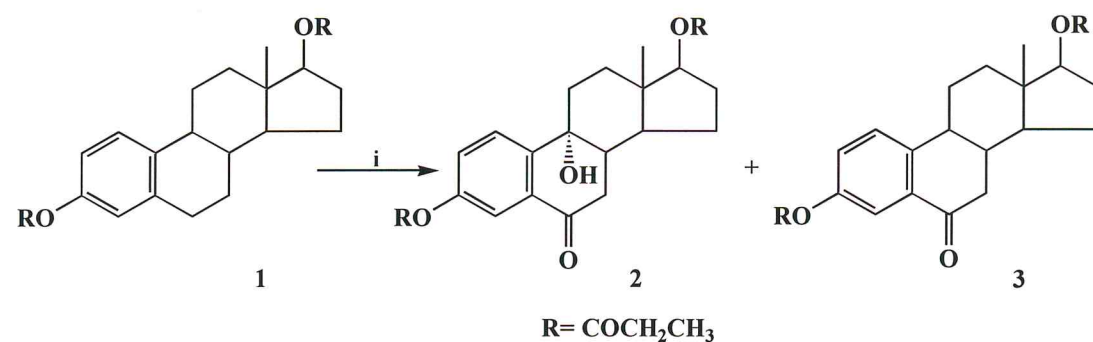
3.1. Modifikovani B-estranski derivati i njihova antiestrogena aktivnost

U okviru ovog pravca istraživanja planirana je funkcionalizacija B-prstena dipropionata estradiola (**1**) u položaju C-6 i C-9, kao i aromatizacija B-prstena, koja bi vodila dobijanju 6-hidroksiekvileninskih derivata i *in vivo* testiranje biološke aktivnosti odabranih sintetizovanih jedinjenja.

3.1.1. Sinteza B-estranskih derivata

Kao polazno jedinjenje u sintezi B-estranskih derivata poslužio je 6-keto-9 α -hidroksi derivat estradiol dipropionata (**2**). U ranijem radu⁹ je opisano da se oksidacijom estradiol dipropionata (**1**) pomoću hrom-trioksid-3,5-dimetilpirazolovog kompleksa, na temperaturi od -25°C, kao glavni proizvod reakcije dobija 6-keto derivat (**3**, prinos 35%), dok se 6-keto-9 α -hidroksi derivat (**2**) dobija u prinosu od 21% (Shema 3.1.1.). S obzirom da je u planiranim sintezama jedinjenje **2** predstavljalo ključni molekul, to smo najpre pristupili variranju reakcionih uslova oksidacije (temperature, vremena reakcije i molskog odnosa supstrat - oksidacioni agens). Najveći prinos željenog jedinjenja **2** (45%) postignut je pri molskom odnosu CrO₃-DMP kompleksa prema jedinjenju **1** 20:1, izvođenjem reakcije na 0°C u

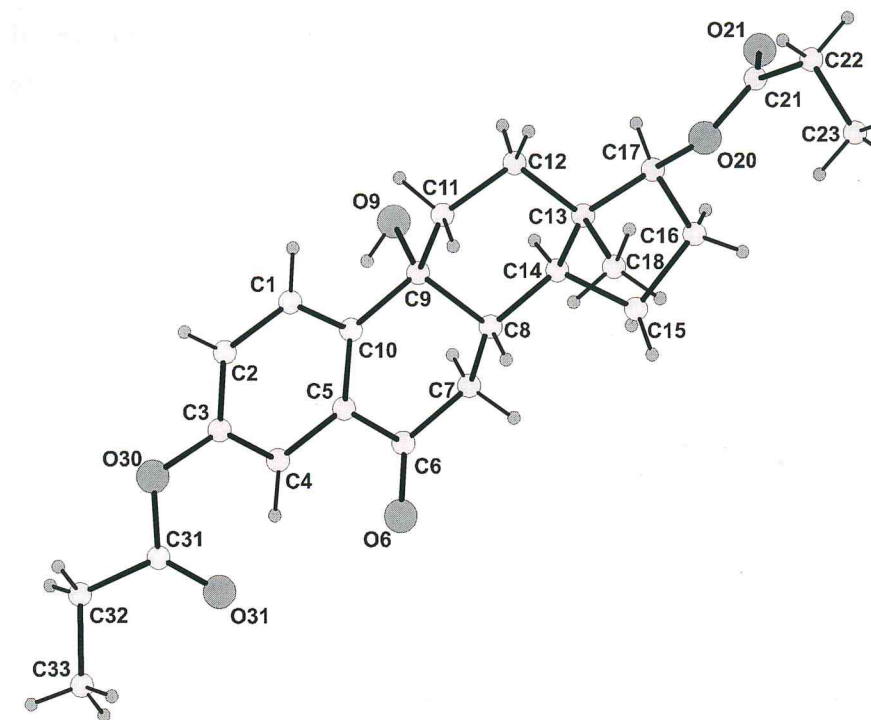
prvih 5 sati, a zatim na sobnoj temperaturi u naredna dva dana. Pri ovim uslovima nastaje i jedinjenje **3** u prinosu od 10%.



Shema 3.1.1. *i*, CrO_3 -DMP, CH_2Cl_2 .

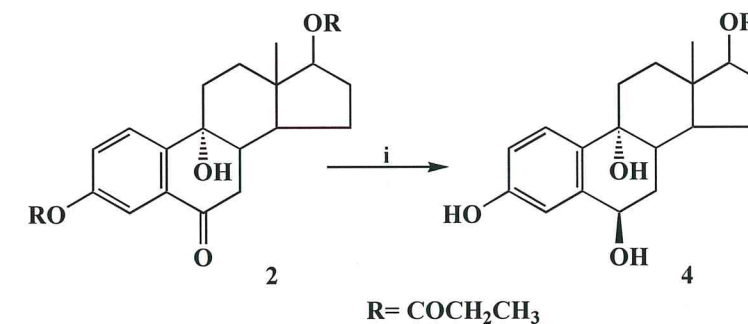
Iako je jedinjenje **2** opisano u literaturi⁹, stereochemija na C-9 atomu nije bila poznata, te smo ga stoga podvrgli rendgeno-strukturnoj analizi, koja je nedvosmisleno dokazala da je hidroksilna grupa α -orijentisana⁹², što se može videti i na slici 3.1.1.

Ispitivanjem estrogene aktivnosti jedinjenja **2** i **3**, čiji su rezultati opisani u poglavlju 3.1.2., utvrđeno je da 6-keto derivat **3** ima jako estrogenu delovanje, a da uvođenje hidroksilne grupe u položaj 9α (jedinjenje **2**) rezultuje u znatnom smanjenju estrogene aktivnosti. To nas je podstaklo na dalje transformacije jedinjenja **2**, u cilju dobijanja derivata sa različitim funkcionalnim grupama na C-6 i C-9, i ispitivanje njihovog uticaja na biološku aktivnost.



Slika 3.1.1. Rendgeno-strukturna analiza jedinjenja **2**

U tu svrhu smo najpre redukovali karbonilnu grupu jedinjenja **2** do hidroksilne, primenom klasične metode redukcije sa NaBH_4 u metanolu. Reakcija protiče stereospecifično, uz istovremenu saponifikaciju estarske funkcije na C-3, pri čemu se dobija isključivo 3,6 β ,9 α -trihidroksi-17 β -propionoksiestra-1,3,5(10)-trien (**4**), u prinosu od 83.4% (Shema 3.1.2.).



Shema 3.1.2. *i*, NaBH_4 , MeOH.

Struktura jedinjenja **4** utvrđena je na osnovu detaljne analize spektroskopskih podataka*, kao i elementarnom mikroanalizom. U protonskom NMR spektru odsustvo tripleta na 1.12 ppm i kvarteta na 2.60 ppm, koji su prisutni u spektru jedinjenja **2**, ukazuje na odsustvo propionoksi grupe u položaju C-3. To isto potvrđuje i ^{13}C NMR spektar, u kojem izostaju signali za ugljenikove atome pomenute grupe, a signal za C-3 atom je pomeren sa 150.51 ppm (gde se javlja kod jedinjenja **2**) na 156.34 ppm. Takođe, u ^{13}C NMR spektru odsutan je signal za karbonilni ugljenikov atom, koji se u jedinjenju **2** nalazi na 197.21 ppm, a javlja se signal na 68.34 ppm, koji odgovara C-atomu vezanom za OH grupu, što je potvrda da je došlo do redukcije karbonilne grupe. U protonskom NMR spektru prisutni su signali za vodonikove atome iz tri hidroksilne grupe [δ_{H} 4.24 (s, 1H, C₉-OH); 5.20 (d, 1H, J = 7.8 Hz, C₆-OH); 9.23 (bs, 1H, C₃-OH)]. Maseni spektar nema pik molekulskog jona, ali fragmenti masa na *m/e* 342 (M⁺-H₂O) i 324 (M⁺-2H₂O), zajedno sa podacima elementarne mikroanalize, potvrđuju pretpostavljenu strukturu.

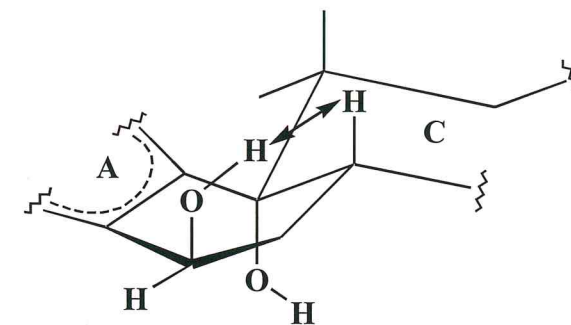
Tabela 3.1.1. ^1H i ^{13}C hemijska pomeranja (ppm) jedinjenja **4** u DMSO-d₆.

^1H	0.73 (s, 3H, H-18); 1.02 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH ₃ iz propionata); 1.2-1.85 (grupa signala, 10H, H-16, H-12, H-11 β , H-8, H-7); 2.0 (m, 1H, H-14); 2.16-2.35 (grupa signala, 3H, H-11 α , CH ₂ iz propionata); 4.24 (s, 1H, C ₉ -OH); 4.44 (m, 1H, H-6); 4.61 (t, 1H, J _{17,16a} =8.2 Hz, J _{17,16b} =8.5 Hz, H-17); 5.20 (d, 1H, J=7.8 Hz, C ₆ -OH); 6.57 (dd, 1H, J _{2,4} =2.4 Hz, J _{1,2} =8.5 Hz, H-2); 6.91 (d, 1H, H-4); 7.20 (d, 1H, H-1); 9.23 (bs, 1H, C ₃ -OH).
^{13}C	9.38 (CH ₃ iz propionata); 11.37 (C-18); 22.83 (C-15); 27.29 (CH ₂ iz propionata); 27.43 (C-16); 30.98 (C-7); 32.33 (C-11); 32.73 (C-12); 40.34 (C-8); 41.81 (C-14); 42.68 (C-13); 68.34 (C-6); 68.84 (C-9); 81.95 (C-17); 113.42 (C-4); 114.00 (C-2); 126.34 (C-1); 133.44 (C-10); 142.34 (C-5); 156.34 (C-3); 173.89 (CO iz propionata).

* ^1H i ^{13}C NMR spektri svih nosintetizovanih jedinjenja dati su u Prilogu

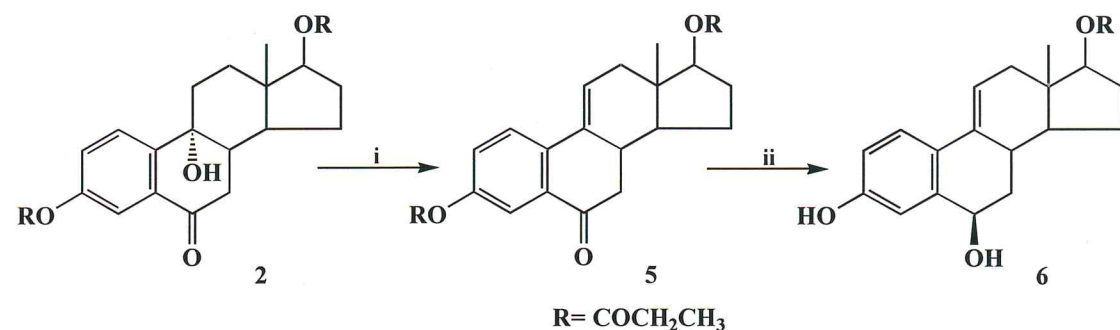
Primenom 2D ^1H - ^{13}C heteronuklearne korelacije (HETCOR) i 2D ^1H - ^{13}C heteronuklearne korelacije preko više veza (COLOC) urađena je asignacija svih vodonikovih i ugljenikovih atoma u molekulu **4**. Podaci dobijeni iz ovih eksperimenata dati su u tabeli 3.1.1.

Konfiguracija novonastalog hiralnog centra C-6 utvrđena je diferencijalnom NOE ^1H NMR spektroskopijom. Naime, pri ozračivanju protona hidroksilne grupe u položaju C-6 (5.20 ppm) povećava se intenzitet signala na 1.58 ppm (H-8). Povećanje intenziteta signala za H-8 atom, koji je β -orijentisan, znači da su C₆-OH grupa i pomenuti atom prostorno bliski i međusobno *cis*-orijentisani (Slika 3.1.2.). To dalje znači da je i pomenuta OH grupa β -orijentisana.



Slika 3.1.2. Stereohemijski odnosi u B prstenu molekula **4**. Protoni označeni strelicama pokazuju Nuklearni Overhauserov efekat (NOE).

S druge strane, izvedena je dehidratacija jedinjenja **2** dejstvom fosforpentoksida u benzenu, na sobnoj temperaturi, u toku dva sata, ili zagrevanjem sa anhidridom sirčetne kiseline na temperaturi ključanja u toku 20 sati, pri čemu je dobijen 3,17 β -dipropionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-6-on (**5**), u prinosu od 87.4%, odnosno 63% (Shema 3.1.3.).



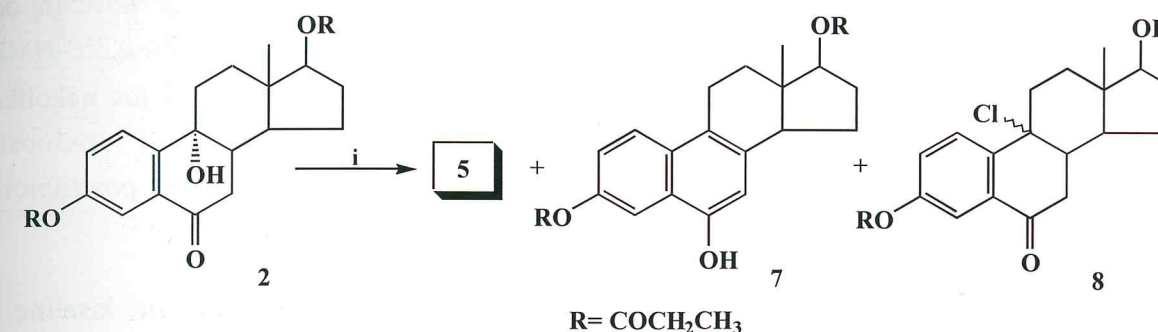
Shema 3.1.3. *i*, P₂O₅, benzen ili Ac₂O; *ii*, NaBH₄, MeOH.

Prisustvo $\Delta^{9(11)}$ -dvostruke veze u jedinjenju **5** potvrđeno je na osnovu spektroskopskih podataka, kao i elementarnom mikroanalizom. U protonskom NMR spektru zapaža se odsustvo signala za 9 α -hidroksilnu grupu, a prisustvo novog signala na 6.45 ppm [t, 1H, J = 5.1 Hz, H-11] ukazuje da je u molekulu prisutna nova dvostruka veza. U ¹³C NMR spektru, u oblasti od 119-127 ppm, prisutna su četiri signala [δ_c 119.28, 125.31, 125.95 i 127.29] umesto tri, koliko ih je bilo u jedinjenju **2** [δ_c 120.40, 125.59 i 126.99 (Ar CH)]. Isto tako, u oblasti od 131-150 ppm uočavaju se četiri signala [δ_c 131.55, 132.75, 138.25 i 150.06] umesto tri [δ_c 132.96, 144.79 i 150.51 (Ar C)]. Prisustvo molekulskog jona na 396 masenih jedinica u M spektru jedinjenja **5**, kao i rezultati elementarne mikroanalize potvrđuju molekulsku formulu datog jedinjenja (C₂₄H₂₈O₅).

Redukcijom karbonilne grupe jedinjenja **5** pomoću NaBH₄ dobijen je 3,6 β -dihidroksi-17 β -propionoksi-1,3,5(10),9(11)-tetraen (**6**), u prinosu od 90.7% (Shema 3.1.3.). Redukciju karbonilne grupe, uz istovremenu hidrolizu estarske funkcije u položaju C-3, potvrđuju spektroskopski podaci i elementarna mikroanaliza. U ¹H NMR spektru izostaju signali za protone iz jedne propionoksi grupe, a pojavljuje se singlet na 7.37 ppm, koji potiče od fenolnog protona. Prošireni signal na 3.20 ppm (koji se zajedno sa signalom na 7.37 ppm gubi nakon dodatka D₂O) ukazuje na prisustvo hidroksilne grupe u položaju C-6. U ¹³C NMR spektru izostaje signal za karbonilni C-atom, a javlja se signal na 68.99 ppm, koji pripada C-6 atomu vezanom za hidroksilnu grupu. Isto tako, izostaju signali za

ugljenikove atome iz propionoksi grupe u položaju C-3. U M spektru prisutan je pik molekulskog jona na 342 masene jedinice, što odgovara molekulskoj masi jedinjenja **6**. Rezultati elementarne mikroanalize potvrđuju molekulsku formulu jedinjenja **6** (C₂₁H₂₆O₄).

Ukoliko se, međutim, za dehidrataciju jedinjenja **2** kao reagens upotrebi tionil-hlorid u piridinu, reakcija je na sobnoj temperaturi gotovo trenutna i neselektivna. Pri ovim reakcionim uslovima nastaju tri proizvoda: jedinjenje **5**, 3,17 β -dipropionoksi-6-hidroksiestra-1,3,5(10),6,8-pentaen (**7**) i 3,17 β -dipropionoksi-9 ξ -hloroestra-1,3,5(10)-trien-6-on (**8**) (Shema 3.1.4.).



Shema 3.1.4. *i*, SOCl₂, Py

Jedinjenje **5** nastaje u prinosu od 34.6% i njegova tačka topljenja i spektroskopski podaci su identični sa ranije navedenim.

Jedinjenje **7** je dobijeno u prinosu od 34.4%. U protonskom NMR spektru ovog jedinjenja karakteristični su signali u oblasti niske vrednosti magnetnog polja [δ_H 6.50 (s, 1H, H-7); 7.25 (dd, 1H, H-2); 7.85 (m, 2H, H-1 i H-4)], kao i signal na 5.60 ppm, koji potiče od hidroksilne grupe na C-6 (nakon izmene sa D₂O signal se gubi). I ¹³C NMR spektar potvrđuje da je u molekulu **7** prisutan ekvileninski sistem prstenova. Grupa signala u oblasti 108-150 ppm [δ_c 108.05, 113.60, 121.34 i 124.82 (Ar CH); 122.50, 123.68, 131.06, 135.54, 147.14 i 149.75 (Ar C)] odgovara ugljenikovim atomima aromatičnih A i B prstenova. Takođe, u M spektru je prisutan pik

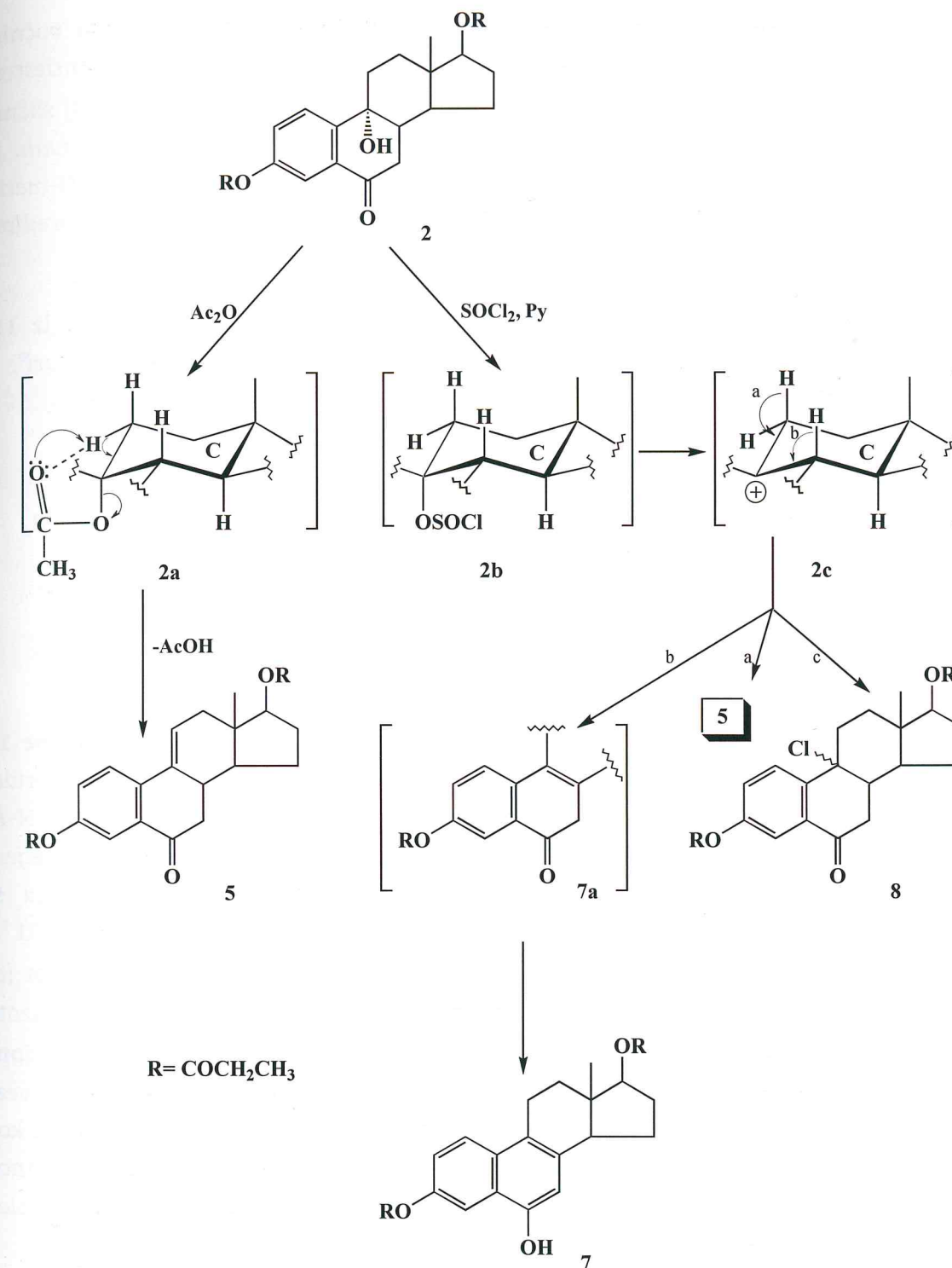
molekulskog jona (m/e 396), koji zajedno sa podacima elementarne mikroanalize potvrđuje molekulsku formulu pomenutog jedinjenja ($C_{24}H_{28}O_5$).

3,17 β -Dipropionoksi-9 ξ -hloroestra-1,3,5(10)-trien-6-on (**8**) dobijen je u prinosu od 25.5%. Jedinjenje je veoma nestabilno i dužim stajanjem, kako u rastvoru, tako i u kristalnom obliku, dolazi do eliminacije hlorovodonika, koji dalje prouzrokuje hidrolizu estarske grupe u položaju C-3, što je utvrđeno na osnovu 1H i ^{13}C NMR spektara. Zbog toga nije bilo moguće odrediti njegovu elementarnu mikroanalizu, a njegova struktura je pretpostavljena na osnovu NMR spektroskopije. 1H i ^{13}C NMR spektri ovog jedinjenja gotovo da su identični sa odgovarajućim spektrima za jedinjenje **2**, izuzev izostanka signala na δ_H 5.10, koji je poticao od protona hidroksilne grupe, kao i različitih pomeranja signala u ^{13}C NMR spektru za C-9 atom [δ_C 69.02 ppm (**2**) \rightarrow 72.19 ppm (**8**)], i još nekoliko manjih razlika u pomeranjima signala u oblasti niskih vrednosti magnetnog polja. Prisustvo hlora u molekulu dokazano je pozitivnom Beilstein-ovom reakcijom.

Različita reaktivnost jedinjenja **2** prema anhidridu sirćetne kiseline i tionil-hloridu mogla bi se objasniti na sledeći način:

Pri reakciji jedinjenja **2** sa anhidridom sirćetne kiseline, na temperaturi ključanja, intermedijerno se gradi C₉-acetat (**2a**) (Shema 3.1.5.) (koji je registrovan tankoslojnom hromatografijom). Daljim zagrevanjem intermedijer **2a** podleže *cis*-eliminaciji, preko šestočlanog prelaznog stanja, i rezultat toga je nastajanje isključivo $\Delta^{9(11)}$ -olefina **5**.

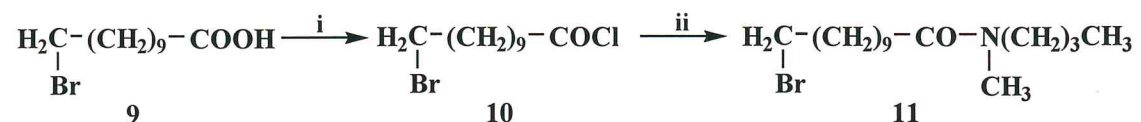
Kod dehidratacije jedinjenja **2** sa tionil-hloridom u piridinu, hlorosulfit **2b**, koji nastaje u prvoj fazi, najverovatnije daje karbonijum jon **2c**, iz koga eliminacijom aksijalnog vodonikovog atoma sa C-11 (put a) nastaje proizvod **5**, dok se eliminacijom vodonikovog atoma sa C-8 gradi intermedijerni Δ^8 -derivat **7a** (put b), koji bazno-katalizovanom enolizacijom karbonilne grupe na C-6 daje proizvod **7**. Najzad, hlorni derivat **8** nastaje adicijom hlornog anjona na **2c** (put c).



Shema 3.1.5. Mehanizam nastajanja jedinjenja **5**, **7** i **8**.

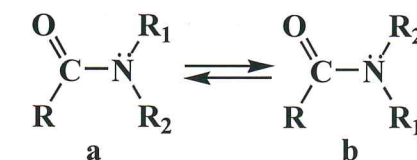
U ranijem radu⁹ je pokazano da ekvileninski derivat sa dugim bočnim nizom vezanim za C₇-hidroksilnu funkciju, pokazuje zapaženi antiestrogeni efekat, slično kao i 7 α -alkilamidni derivati estradiola⁶. Uticaj sličnih supstituenata na C-6 estradiola i ekvilenina nije do sada proučavan, te smo stoga jedinjenje **7** podvrgli reakciji alkilovanja sa *N*-*n*-butil-*N*-metil-11-bromoundekankarboksamidom (**11**), sa željom da kasnije uporedimo biološku aktivnost C-6 i C-7 supstituisanih ekvileninskih derivata.

N-*n*-Butil-*N*-metil-11-bromoundekankarboksamid (**11**) je dobijen iz 11-bromoundekanske kiseline (**9**), po postupku opisanom u literaturi⁹, a prema shemi 3.1.6.



Shema 3.1.6. *i*, SOCl₂; *ii*, *n*-BuMeNH, Py, benzen.

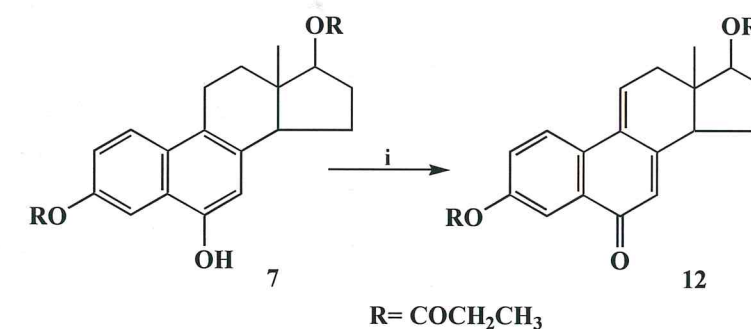
11-Bromoundekanska kiselina (**9**) je prvo prevedena u hlorid kiseline **10** pomoću tionil-hlorida, a zatim, nakon uklanjanja viška tionil-hlorida, sirovo uljasto jedinjenje **10** je tretirano sa ekvimolarnom količinom *N*-*n*-butil-*N*-metilamina i piridina u benzenu, pri čemu je dobijen željeni proizvod **11**, u prinosu od 81.7% u odnosu na polaznu kiselinu **9**. Struktura jedinjenja **11** je potvrđena na osnovu NMR spektroskopije. U ¹H NMR spektru zapažaju se dva singleta za metil grupu vezanu za azot [δ_{H} 2.88 i 2.94 (2s, 3H, NCH₃)], kao i dva tripleta za metilensku grupu do azota [δ_{H} 3.22 i 3.33 (2t, 2H, J = 7.4 Hz, NCH₂)], koji nastaju usled torzione diastereoizomerije. Naime, poznato je da otežana rotacija oko proste veze raste sa povećanjem njenog karaktera dvostruke veze. Tako, C-N veza kod amida, zbog konjugacije između karbonilne grupe i slobodnog elektronskog para na azotu, ima parcijalan karakter dvostruke veze, usled čega se javljaju tzv. torzioni diastereoizomeri tipa **a** i **b**⁹³.



NMR spektar takvog amida sastoji se od superponiranih spektara oba diastereoizomera.

¹³C NMR spektar takođe dokazuje da amid **11** predstavlja smešu diastereoizomera [δ_{C} 13.74 i 13.76 (CH₃); 33.22 i 35.21 (NCH₃); 32.86 i 33.52 (CH₂CON); 47.28 i 49.65 (CH₂NCO); 172.73 i 172.85 (CO)].

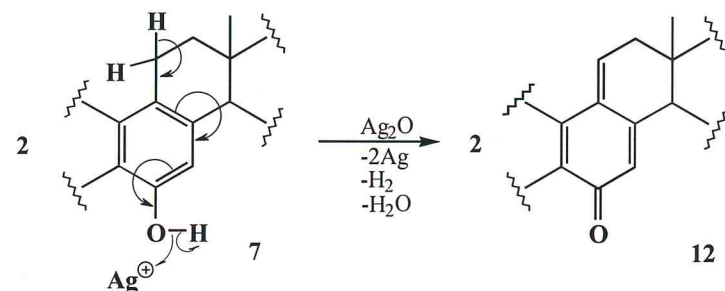
Sledeća faza je predstavljala alkilovanje 6-hidroksi grupe jedinjenja **7** sa alkil-bromidom **11**. Klasične metode alkilovanja, koje podrazumevaju korišćenje K₂CO₃, NaH ili drugih jakih baza kao katalizatora, pokazale su se u ovom slučaju neprimenljivim, s obzirom da je u ranijem radu⁹ u sličnoj reakciji izolovan isključivo polazni molekul. Zbog toga smo najpre pokušali da primenimo srebro-oksidi kao katalizator, koji je znatno slabija baza, ali omogućava elektrofilno katalizovanu jonizaciju C-X veze alkil-halogenida. Međutim, u reakciji jedinjenja **7** sa alkil-bromidom **11**, u prisustvu Ag₂O, nije došlo do očekivane nukleofilne supstitucije, već je nastao dienon **12**, kao proizvod oksido-redukcije. Ista reakcija je ponovljena i bez prisustva alkil-bromida **11**, zagrevanjem jedinjenja **7** sa Ag₂O na temperaturi ključanja etarskog rastvora, u toku 8 sati, pri čemu je 3,17 β -dipropionoksiestra-1,3,5(10),7,9(11)-pentaen-6-on (**12**) dobijen u prinosu od 68.0% (Shema 3.1.7.).



Shema 3.1.7. *i*, Ag₂O, etar.

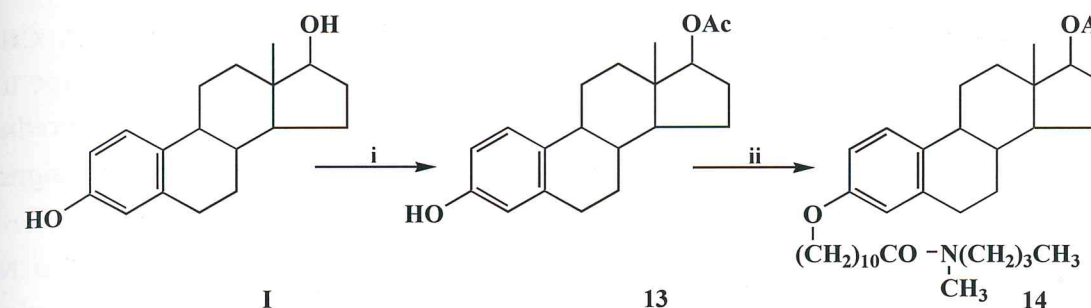
Struktura jedinjenja **12** je utvrđena na osnovu spektroskopskih podataka. Najveće promene u pomeranjima signala u protonskom i ^{13}C NMR spektru jedinjenja **12**, u odnosu na polazni molekul **7**, nalaze se u oblasti niskih vrednosti magnetnog polja. U ^1H NMR spektru javlja se multiplet za H-11 na 7.20 ppm, a izostaje signal na 5.60 ppm, koji je odgovarao protonu OH grupe u jedinjenju **7**. U ^{13}C NMR spektru signal koji je pripadao C-atomu za koji je vezana OH grupa (147.14 ppm) izostaje, a javlja se signal na 183.84 ppm ($\text{C}_6=\text{O}$). Evidentne su i značajne promene u hemijskim pomeranjima aromatičnih ugljenika.

Može se pretpostaviti da se nastajanje jedinjenja **12** odvija po jonsko-radikalском mehanizmu (shemi 3.1.8.).



Shema 3.1.8. Mehanizam nastajanja jedinjenja **12**.

S obzirom da opisani postupak nije dao željene rezultate, odlučili smo da dalje pomenutu reakciju O-alkilovanja proučavamo na model-supstanci. Kao model-supstanca poslužio je 3-hidroksi-17 β -acetoksiestra-1,3,5(10)-trien (**13**), koji je dobijen selektivnim acetilovanjem 17 β -hidroksilne grupe estradiola prema poznatom postupku transesterifikacije⁹⁴ pomoću etilacetata, u prisustvu *p*-toluensulfonske kiseline (Shema 3.1.9.).



Shema 3.1.9. *i*, EtOAc, TsOH, zatim H_2SO_4 ; *ii*, jedinjenje **11**, TBAB, NaOH, CH_2Cl_2 , H_2O .

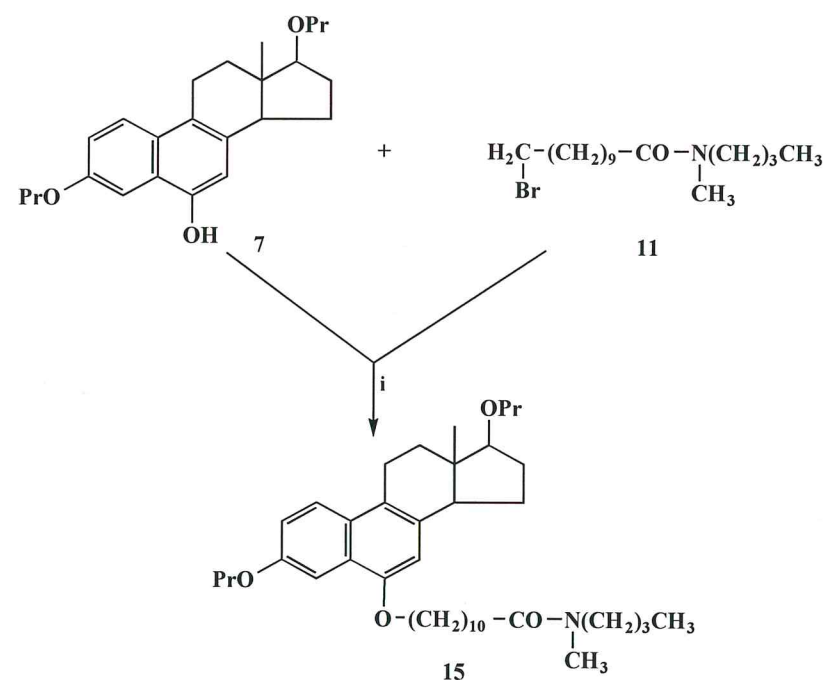
Reakcija se izvodi na tački ključanja reakcione smeše, u toku 2.5 sata, nakon čega se doda koncentrovana sumporna kiselina i nastavi zagrevanje u toku naredna dva sata. Nastali proizvod **13** dobijen je u prinosu od 96.2%, a njegova struktura je potvrđena na osnovu IR i ^1H NMR spektroskopije. IR spektar sadrži oštru traku na 3420 cm^{-1} , koja potiče od fenolne OH grupe, kao i intenzivnu traku na 1710 cm^{-1} , koja potiče od $\text{C}=\text{O}$ grupe acetata. Protonski NMR spektar potvrđuje prisustvo samo jedne acetatne grupe u molekulu **13** i to u položaju C-17 [δ_{H} 2.05 (s, 3H, OAc)], kao i prisustvo fenolnog protona [δ_{H} 9.05 (s, 1H, OH)].

Reakcija alkilovanja jedinjenja **13** sa alkil-bromidom **11** izvedena je primenom metode međufazne katalize. Ova metoda podrazumeva postojanje dve faze koje se ne mešaju. U našem slučaju to su bili vodeni rastvor NaOH i metilen-hloridni rastvor. Kao katalizator za fazni prenos upotrebljen je tetrabutilamonijum-bromid, koji je prethodno rastvoren u alkalnom vodenom rastvoru. U metilen-hloridu su rastvoreni fenol **13** i alkilujući agens **11**. Nakon intenzivnog mešanja na sobnoj temperaturi u toku dvanaest sati i obrade reakcione smeše dobijen je 3-O-(10'-karbo-N-n-butil-N-metilamino)decil-17 β -acetoksiestra-1,3,5(10)-trien (**14**) u obliku bezbojnog ulja, u prinosu od 53.4% (Shema 3.1.9.).

Struktura jedinjenja **14** potvrđena je na osnovu NMR i M spektroskopije. U ^1H NMR spektru odsutan je signal za fenolni proton, a signal koji je pripadao protonima metilenske grupe vezane za brom u jedinjenju **11** [δ_{H} 3.37 (t, 2H, $J = 6.8\text{ Hz}$, CH_2Br)], pomeren je u oblast nižih vrednosti

magnetnog polja u molekulu **14** [δ_H 3.92 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, CH_2O). Pomeranje signala za ugljenikov atom pomenute metilenske grupe u ^{13}C NMR spektru sintetizovanog jedinjenja **14** u oblast nižih vrednosti magnetnog polja [δ_C 67.83 (CH_2O)] u odnosu na odgovarajući signal u spektru polaznog molekula **11** [δ_C 33.90 (CH_2Br)] nedvosmisleno potvrđuje da je došlo do vezivanja alkil grupe i građenja jedinjenja **14**. I u NMR spektrima novosintetizovanog jedinjenja **14** prisutni su udvojeni signali za iste atome kao kod polaznog amida **11**, što znači da i ovde postoji torziona diastereoizomerija.

Reakcioni uslovi alkilovanja koji su primenjeni na model-supstanci **13**, upotrebljeni su i za alkilovanje 6-hidroksiekvilenskog derivata **7** (dvofazni sistem $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{H}_2\text{O}$, NaOH, tetrabutilamonijum-bromid, intenzivno mešanje na sobnoj temperaturi u toku 10 sati). Dobijena je kompleksna smeša proizvoda iz koje je nakon razdvajanja na stubu silikagela izolovan željeni proizvod, 3,17 β -dipropionoksi-6-O-[(10'-karbon-*n*-butil-N-metilamino)decil]estra-1,3,5(10),6,8-pentaen (**15**), u prinosu od 23.2% (Shema 3.1.10.).



Shema 3.1.10. *i*, TBAB, NaOH, CH_2Cl_2 , H_2O .

Struktura jedinjenja **15** potvrđena je NMR spektroskopijom. Tako, u protonskom NMR spektru novosintetizovanog jedinjenja **15** izostaje signal za fenolni proton, koji se u polaznom molekulu **7** nalazio na 5.60 ppm. I ovde se zapaža pomeranje signala za protone metilenske grupe, koja je u jedinjenju **11** vezana za brom [δ_H 3.37 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2Br)], u oblast nižih vrednosti magnetnog polja [δ_H 4.07 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, OCH_2)], što zajedno sa pomerenim signalima za ugljenikov atom iste metilenske grupe u ^{13}C NMR spektru [δ_C 33.90 (CH_2Br) \rightarrow δ_C 68.19 (OCH_2)], dokazuje da je došlo do supstitucije broma u alkil-bromidu **11** ariloksi grupom. Isto tako, udvojeni signali u NMR spektrima za pojedine atome u molekulu jedinjenja **15** [δ_H 2.91 i 2.97 (2s, 3H, NCH_3); 3.25 i 3.36 (2t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH_2NCO); δ_C 172.94 i 173.06 (NC=O)] govore da je i ovaj molekul prisutan u obliku dva rotamera.

Polazeći od jedinjenja **7**, primenom razrađenog postupka alkilovanja, moguće je sintetizovati i druge derivate sa dugim bočnim nizom, pri čemu bi se dobili potencijalni hapteni. Naime, poznato je da se za određivanje tragova ekvilena, kao uostalom i drugih steroidnih hormona, u biološkom materijalu koristi dobro poznata radioimunološka metoda ("radioimmunoassay")^{95,96}. Ova metoda podrazumeva korišćenje antitela, koja treba da budu visoko specifična i da za sebe vezuju isključivo one molekule čija se količina u datom biološkom materijalu određuje. Steroidni molekul može da bude antigen, odnosno može da se vezuje za antitelo, ali ne može da da imuno odgovor, odnosno ne može da stvara antitela. Imunogeni mogu da budu samo molekuli velikih molekulskih masa, kao što su npr. proteini, glikoproteini, oligosaharidi i dr. Zato se mali molekuli, kao što su steroidni hormoni, preko pogodnog "linkera"⁹⁷ vezuju najčešće za serumski albumin govečeta⁹⁸ i tako nastali kompleksi mogu da budu imunogeni. U tom smislu, derivati jedinjenja **7** sa slobodnom amino ili karboksilnom grupom u dugom bočnom nizu ("linkeru") lako bi mogli da se vežu za albumin, reakcijom sa odgovarajućim ostacima njegovih aminokiselina.

3.1.2. Određivanje estrogene i antiestrogene aktivnosti odabranih sintetizovanih jedinjenja

Za određivanje estrogene i antiestrogene aktivnosti ispitivanih jedinjenja mogu se koristiti *in vivo*⁹⁹⁻¹⁰² i *in vitro*¹⁰³⁻¹⁰⁵ metode. U ovom radu korišćene su *in vivo* metode i to tzv. uterotrofna¹⁰⁰ i antiuterotrofna¹⁰² metoda. Uterotrofna metoda se koristi za određivanje estrogene aktivnosti i bazira se na povećanju mase uterusa pod dejstvom estrogenih supstanci. U tu svrhu koriste se ženke pacova rase Wistar, starosti 21 dan (grupe od 6-8 ženki), kojima se u toku tri dana aplicira rastvor ispitivane supstance u maslinovom ulju, a zatim se četvrtog dana žrtvuju i meri masa uterusa. Pored ispitivane grupe uzima se i kontrolna grupa, kojoj se daje samo maslinovo ulje.

Na uterotrofnoj metodi bazirana je i metoda za određivanje antiestrogene aktivnosti ispitivanog jedinjenja, tzv. antiuterotrofna metoda. Kod ove metode pored kontrolne grupe postoji grupa kojoj se aplicira estradiol benzoat, dok se trećoj grupi aplicira smeša estradiol benzoata i ispitivane supstance. I u ovom slučaju se, slično kao kod uterotrofne metode, dan nakon poslednjeg apliciranja životinje žrtvuju i određuje razlika u prosečnoj masi uterusa kontrolne i ogleđne grupe, odnosno utvrđuje se u kojoj meri ispitivana supstanca smanjuje dejstvo estradiol benzoata.

Iz parametara dobijenih uterotrofnom i antiuterotrofnom metodom izračunava se agonistički, odnosno antagonistički efekat ispitivanog jedinjenja pomoću izraza:

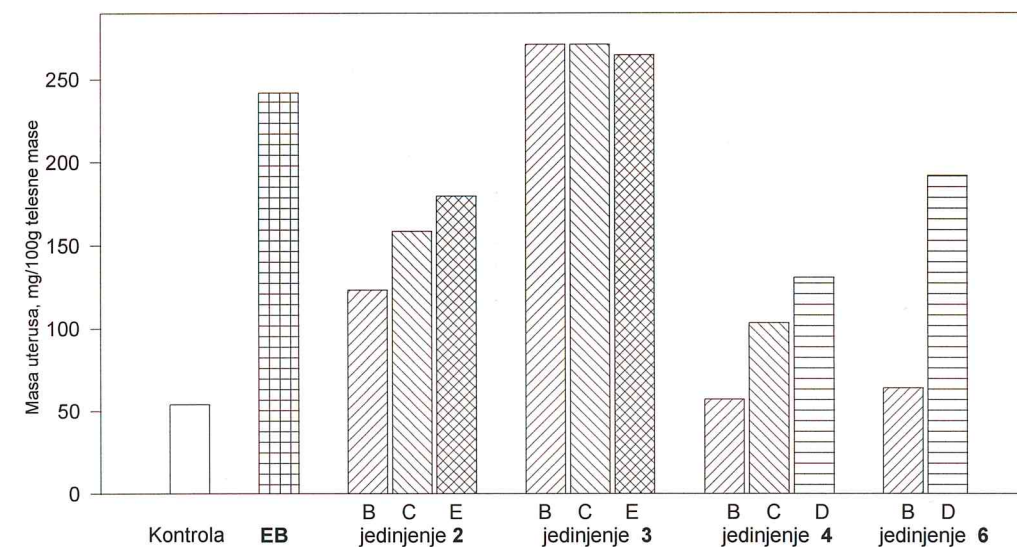
$$\text{Agonistički efekat (\%)} = \frac{C - A}{B - A} \times 100$$

$$\text{Antagonistički efekat (\%)} = \frac{B - D}{B - A} \times 100,$$

gde su simbolima A do D iskazane srednje mase uterusa ogleđnih životinja, izražene u mg/100 g telesne mase, i to:

- A - kod životinja kontrolne grupe,
- B - kod životinja tretiranih estradiol benzoatom,
- C - kod životinja tretiranih ispitivanom supstancom i
- D - kod životinja tretiranih ispitivanom supstancom i estradiol benzoatom.

Ispitivanju estrogene aktivnosti podvrgnuta su jedinjenja **2**, **3**, **4**, **6**, **7**, **15**, kao i ekvilenin dipropionat (**EQ**)^{*}. Dobijeni rezultati za jedinjenja **2**, **3**, **4** i **6** prikazani su na slici 3.1.3.



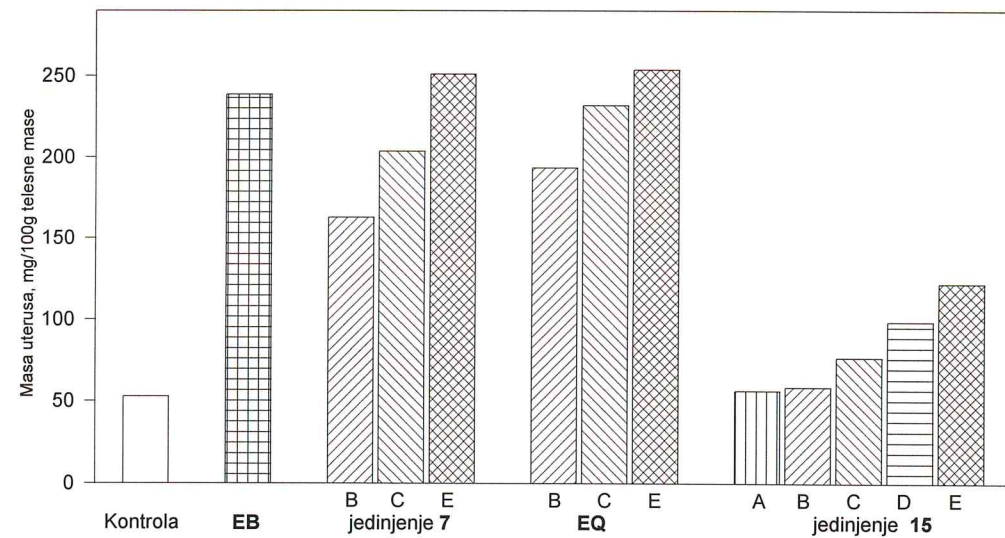
Slika 3.1.3. Zavisnost mase uterusa tretiranih životinja od primenjenih doza ispitivane supstance. Ukupna doza: B - 24 µg; C - 240 µg; D - 720 µg; E - 1200 µg; EB - estradiol benzoat, 1.5 µg.

Iz gore prikazanog histograma mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Uvođenje karbonilne grupe u položaj C-6 estradiola (jedinjenje **3**) ne menja bitno aktivnost u odnosu na sam estradiol;

- Ukoliko se u molekul uvede dodatna 9α -hidroksilna grupa (jedinjenje **2**) dobijeni derivat ima smanjeno estrogeno delovanje, naročito kod manje doze;
- Redukcijom karbonilne grupe jedinjenja **2** nastaje molekul sa $3,6\beta,9\alpha$ -hidroksilnim grupama (jedinjenje **4**), koji kod manje doze gotovo da i ne pokazuje estrogenu aktivnost.

Rezultati određivanja uterotrofne aktivnosti jedinjenja **7**, **15** i **EQ** prikazani su na slici 3.1.4.



Slika 3.1.4. Zavisnost mase uterusa tretiranih životinja od primenjenih doza ispitivane supstance. Ukupna doza: A - 2.4 µg; B - 24 µg; C - 240 µg; D - 720 µg; E - 1200 µg; **EB** - estradiol benzoat, 1.5 µg; **EQ** - ekvilenin dipropionat.

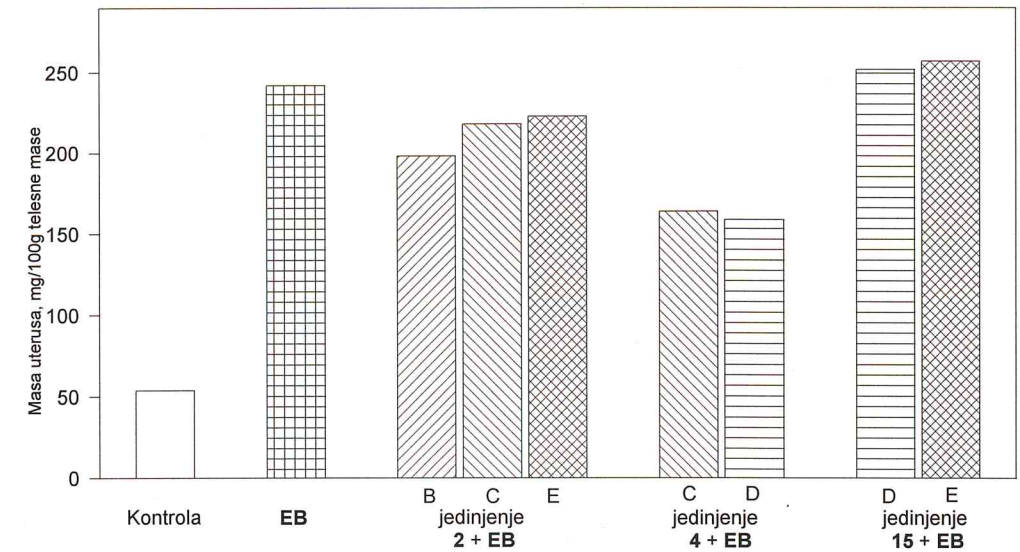
Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti sledeće:

- 6-Hidroksiekvilenin dipropionat (jedinjenje **7**) ima estrogenu aktivnost, koja je u granicama eksperimentalne greške gotovo jednaka sa istom aktivnošću kod ekvilenin dipropionata (jedinjenje **EQ**).

* Ekvilenin dipropionat je dobijen iz ekvilenina uobičajenom metodom esterifikacije.

- Uvođenje dugačkog alkilamidnog niza u položaj C-6 (jedinjenje **15**) rezultuje u gotovo potpunom gubitku estrogenog delovanja kod manjih doza.

Pošto su jedinjenja **2**, **4** i **15** pokazala smanjenu (jedinjenje **2**), ili gotovo nikakvu (jedinjenja **4** i **15**) estrogenu aktivnost, ona su podvrgnuta antiuterotrofnom testu. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 3.1.5.



Slika 3.1.5. Zavisnost mase uterusa tretiranih životinja od primenjenih kombinacija ispitivane supstance i estradiol benzoata. Ukupna doza: B - 24 µg; C - 240 µg; D - 720 µg; E - 1200 µg; **EB** - estradiol benzoat, 1.5 µg.

Kao što se iz datog histograma može videti, jedinjenje **2** neznatno smanjuje delovanje estradiol benzoata, dok jedinjenje **4** u kombinaciji sa estradiol benzoatom redukuje njegovo delovanje za trećinu. S druge strane, jedinjenje **15** ne ispoljava antiestrogena svojstva, već se čak ponaša kao estrogeni sinergista, što je u suprotnosti sa ponašanjem njegovog C-7 analoga, za koji je ranije⁹ pokazano da ispoljava zapažen antiestrogeni efekat. Pošto jedinjenje **15** pokazuje zanemarljivo estrogeno delovanje, može se pretpostaviti da bočni niz na C-6 svojim uvijanjem na neki način blokira fenolnu grupu na C-3, sprečavajući na taj način

njegovo vezivanje za estrogene receptore i kompeticiju sa estradiol benzoatom.

Iz podataka koji su dobijeni nakon uterotrofnog i antiuterotrofnog ispitivanja izračunat je procenat agonizma, odnosno antagonizma ispitivanih jedinjenja, a rezultati tih izračunavanja prikazani su u tabeli 3.1.2.

Tabela 3.1.2. Agonistički i antagonistički efekat ispitivanih jedinjenja.

Jedinjenje	Doza mg/kg	Agonistički efekat, %	Antagonistički efekat, %
2	0.5	36.9	23.2
	5	55.7	12.7
	25	66.9	10.2
3	0.5	115.6	-
	5	115.6	-
	25	112.2	-
4	0.5	1.7	-
	5	26.3	41.6
	15	40.9	44.3
6	0.5	5.3	-
	15	73.4	3.2
7	0.5	59.1	-
	5	81.1	-
	25	106.7	-
EQ	0.5	75.7	-
	5	96.4	-
	25	108.2	-
15	0.05	1.8	-
	0.5	3.0	-
	5	12.7	-
	15	24.6	-5.3
	25	37.2	-8.0

Iz tabele se može videti da jedinjenje 4 pokazuje najveći procenat antagonizma (44.3%). Jedinjenje 2 pri manjoj dozi ima izvesno

antagonističko delovanje (23.2%), dok jedinjenje 15 u kombinaciji sa estradiol benzoatom pojačava njegovo hormonsko delovanje.

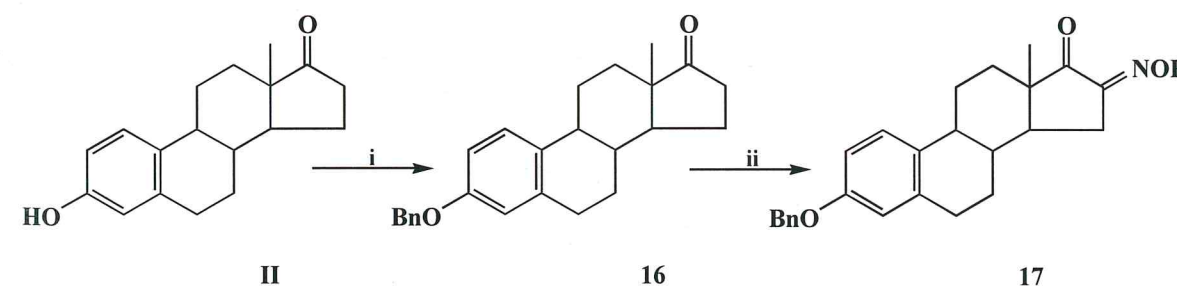
Na osnovu gore izloženih rezultata može se pretpostaviti da bi molekuli sa α -orijentisanom hidroksilnom grupom u položaju C-9 (jedinjenja 2 i 4) mogli poslužiti kao pogodna polazna jedinjenja za sintezu novih derivata sa povećanim antiestrogenim delovanjem.

3.2. Modifikovani D-estranski derivati i njihova antiestrogena aktivnost

Iz literature¹⁰⁶ je poznato da neki D-sekoestranski derivati pokazuju zapaženu antiestrogenu aktivnost. Zbog toga smo u ovom delu rada našu pažnju posvetili sintezi novih 17-supstituisanih-16,17-seko derivata estrona sa ciljem ispitivanja njihove potencijalne agonističke i/ili antagonističke aktivnosti.

3.2.1. Sintaza D-sekoestranskih derivata

Kao polazno jedinjenje u planiranim sintezama 17-supstituisanih-16,17-sekoestranskih derivata upotrebljen je estron (II), koji je u dve sintetske faze preveden u 3-benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-16,17-dion-16-oksimum (17), prema postupku opisanom u literaturi¹⁰⁷ (Shema 3.2.1.).

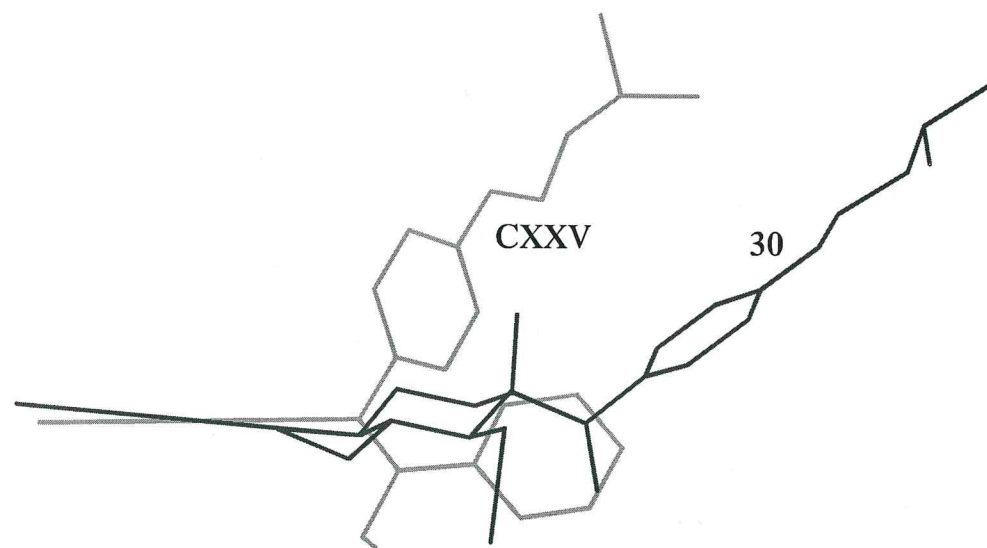


Shema 3.2.1. i, BnCl, K₂CO₃, MeOH, aceton; ii, *t*-BuOK, *t*-BuOH, *i*-AmONO.

Iako se za zaštitu C-3 hidroksilne grupe estrona najčešće koristi metil-etarska funkcija, u radu smo se opredelili za benzil-etarsku zaštitu. Osnovni razlog leži u činjenici da je za većinu bioloških ispitivanja neophodno prisustvo slobodne hidroksilne grupe na C-3. Uklanjanje metil-etarske zaštite, međutim, zahteva energične reakcije uslove i protiče uz građenje sporednih proizvoda⁹. S druge strane, benzil-etarska zaštita se može lako ukloniti pri uslovima katalitičke hidrogenacije.

Kao pogodne nukleofile za adiciju na karbonilnu grupu keto-oksima **17** odabrali smo metil i 4-[(2-dimetilamino)etoksi]fenil grupe, koje su preko odgovarajućih metil- odnosno aril-halogenida prevedene u Grignard-ove reagense.

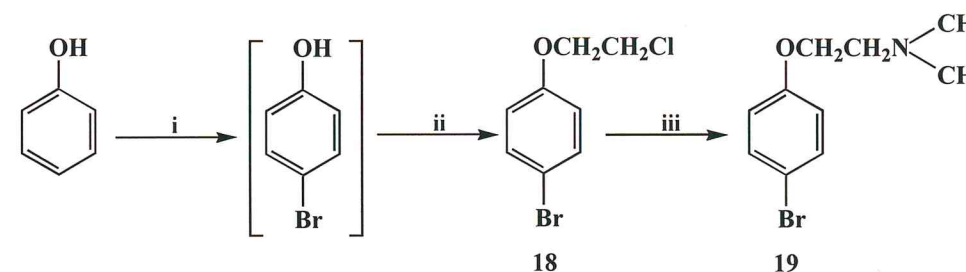
Metil grupa je odabrana iz razloga što je u ranijem radu¹⁰ sličan 17-metil-16,17-sekoestranski derivat pokazao izvestan antiestrogeni efekat. S druge strane, ideja za uvođenje 4-[(2-dimetilamino)etoksi]fenil grupe u položaj C-17 proistekla je na osnovu molekulskog modelovanja¹⁰⁸ u odnosu na molekul tamoksifena (CXXV), a bazirana je na pretpostavci da molekuli sličnog prostornog rasporeda imaju i sličnu biološku aktivnost. Prostorno superponiranje tamoksifena i planiranog jedinjenja sa tamoksifenskim inkrementom (jedinjenje **30**) prikazano je na slici 3.2.1.



Slika 3.2.1. Fitovani tamoksifen (CXXV) i molekul **30** u projekciji normalnoj na uzdužnu osu molekula **30** i vezu C₁₃-C₁₈.

Iz slike se može videti da se prsten A jedinjenja **30** preklapa sa jednim fenilnim prstenom tamoksifena, dok se fenilne grupe sa svojim dimetilaminoetoksi bočnim nizom pružaju u istom pravcu.

1-Bromo-4-[2-(dimetilamino)etoksi]benzen (**19**) je sintetizovan iz fenola u tri faze. U prvoj fazi je izvedeno bromovanje fenola u 1,2-dihloroetanu, na 0°C u toku 4 sata, pri čemu je dobijen 4-bromofenol (Shema 3.2.2.). Zatim je, bez izolovanja bromofenola, u reakcionu smešu dodat vodeni rastvor NaOH i trimetilbenzilamonijum-hlorida i nastavljeno je sa intenzivnim mešanjem na temperaturi ključanja reakcione smeše u toku 48 sati. Pri ovim uslovima došlo je do alkilovanja fenolne OH grupe uz nastajanje 1-bromo-4-(2-hloroetoksi)benzena (**18**), u prinosu od 79.8%.



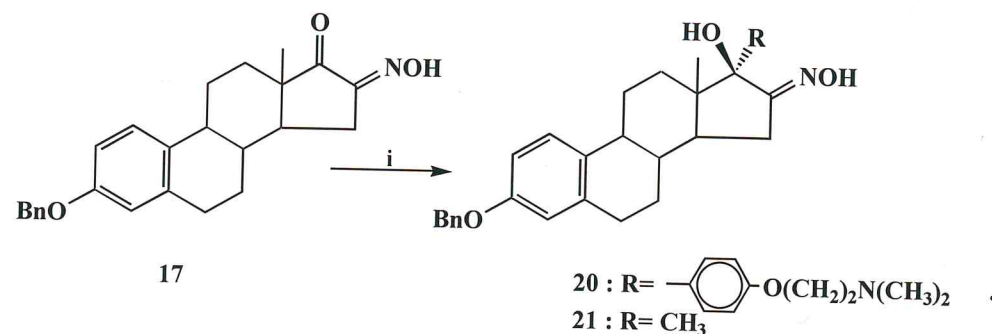
Shema 3.2.2. *i*, Br₂, 1,2-dihloroetan; *ii*, TMBA-Cl, NaOH, 1,2-dihloroetan, H₂O; *iii*, Me₂NH, EtOH.

Struktura jedinjenja **18** potvrđena je analizom ¹H NMR spektra, u kojem su prisutna četiri signala: tripleti na 3.83 ppm i 4.21 ppm, koji odgovaraju protonima metilenskih grupa vezanih za hlor, odnosno kiseonik, dok dvostruki dubleti na 6.81 ppm i 7.40 ppm odgovaraju protonima iz aromatičnog jezgra, koji su u *orto* položaju u odnosu na 2-hloroetoksi grupu, odnosno brom.

U sledećoj fazi je jedinjenje **18** zagrevano u autoklavu sa 20%-nim etanolnim rastvorom dimetilamina na 100°C, u toku 20 sati (Shema 3.2.2.). Pri tome dolazi do nukleofilne supstitucije hlora dimetilamino grupom i nastajanja 1-bromo-4-[2-(dimetilamino)etoksi]benzena (**19**), koji se, nakon prečišćavanja vakuum destilacijom, dobija u obliku bezbojnog

ulja, u prinosu od 73.7%. Struktura jedinjenja **19** potvrđena je poređenjem spektroskopskih podataka sa podacima iz literature¹⁰⁹.

Regioselektivnom adicijom 4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil-magnezijum-bromida, odnosno metil-magnezijum-jodida na C₁₇=O grupu jedinjenja **17** nastaju 3-benziloksi-17β-hidroksi-17α-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]estra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksim (**20**), odnosno 3-benziloksi-17β-hidroksi-17α-metilestra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksim (**21**) (Shema 3.2.3.).



Shema 3.2.3. *i*, 4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil-magnezijum-bromid, THF ili CH₃MgI, etar, THF, zatim NH₄Cl, H₂O.

U Grignard-ov reagens, koji je dobijen iz jedinjenja **19** i magnezijuma u tetrahidrofuranu, dodavan je na sobnoj temperaturi rastvor jedinjenja **17** u tetrahidrofuranu. Dodavanje je trajalo 30 minuta, a zatim je reakciona smeša mešana na istoj temperaturi još jedan sat. Po završetku reakcije nastala magnezijumova so je razorena dodatkom vodenog rastvora amonijum-hlorida. Nakon obrade i prečišćavanja sirove reakcione smeše dobijen je proizvod **20** u obliku čvrstog ulja, u prinosu od 56.3%. Njegova struktura je potvrđena spektroskopskim podacima, kao i elementarnom mikroanalizom.

U protonskom NMR spektru jedinjenja **20** prisutni su signali na 2.37 ppm (s, 6H, (CH₃)₂N), 2.78 ppm (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH₂N) i 4.13 ppm (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH₂O). Grupa signala od δ_H 6.75-7.45 (m, 12H, Ar H) odgovara protonima iz tri aromatična prstena. Ovaj spektar zajedno sa ¹³C NMR

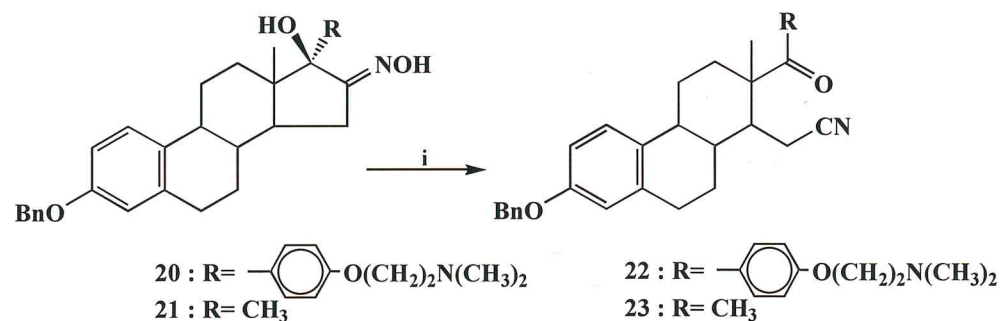
spektrum [karakteristični signali su na δ_C 45.76 ((CH₃)₂N); 58.11 (CH₂N); 65.54 (CH₂O); 85.74 (C-17); 168.21 (C=NOH) i četrnaest signala za aromatične C-atome] potvrđuju da je u položaju C-17 jedinjenja **20** prisutna etoksifenil grupa. Tome se pridružuje i M spektar, u kome je prisutan pik molekuskog jona na 554 masenih jedinica, kao i rezultati elementarne mikroanalize hidrohlorida jedinjenja **20**.

Adicija metil grupe na C₁₇-keto funkciju jedinjenja **17** izvedena je na standardan način pomoću metil-magnezijum-jodida. Naime, u suspenziju metil-magnezijum-jodida u etru dodavan je na sobnoj temperaturi, u toku 1.5 sata, rastvor jedinjenja **17** u tetrahidrofuranu (Shema 3.2.3.). Reakciona smeša je na istoj temperaturi mešana još dva sata. Nakon obrade i prečišćavanja sirove reakcione smeše dobijen je proizvod **21** u prinosu od 69.7%. Njegova struktura potvrđena je spektroskopskim podacima, kao i elementarnom mikroanalizom.

U protonskom NMR spektru pored signala za angularnu metil grupu [δ_H 0.91 (s, 3H, H-18)] prisutan je i signal na 1.42 ppm (s, 3H, CH₃-C₁₇), koji potvrđuje da je u molekul **21** uvedena metil grupa. Široki signal na 5.42 ppm upućuje na prisustvo dve hidroksilne grupe (2H, NOH i C₁₇-OH). U ¹³C NMR spektru je pored signala za ugljenikov atom angularne metil grupe [δ_C 13.72 (C-18)] prisutan i signal na 22.96 ppm, koji odgovara ugljenikovom atomu metil grupe vezane za C-17 atom. Evidentno je i odsustvo signala za karbonilni ugljenikov atom, a signal za C-17 atom nalazi se na 81.41 ppm, što odgovara C₁₇-OH grupi. U masenom spektru nije prisutan pik molekuskog jona, već fragment na 387 masenih jedinica, koji je nastao eliminacijom vode iz molekula **21**. Svi ovi podaci zajedno sa podacima elementarne mikroanalize potvrđuju strukturu jedinjenja **21**.

U cilju dobijanja odgovarajućih D-seko jedinjenja adukti **20** i **21** su podvrgnuti Beckmann-ovoj fragmentaciji. Iz literature je poznato da se za Beckmann-ovu fragmentaciju mogu upotrebiti različiti hemijski agensi, kao što su dimetilsulfoksid¹¹⁰, tionil-hlorid¹¹¹, fosfor-pentahlorid¹¹², *p*-toluensulfonil-hlorid¹¹³, anhidrid sirćetne kiseline¹⁰, titan-hlorid¹¹⁴ ili fotohemijским putem¹¹⁵. U ovom radu smo kao reagense za dobijanje C₁₆-

C₁₇ seko jedinjenja odabrali *p*-toluensulfonil-hlorid i anhidrid sirćetne kiseline. Tako smo u reakciji jedinjenja **20** sa *p*-toluensulfonil-hloridom u piridinu, stajanjem na sobnoj temperaturi preko noći, dobili 3-benziloksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]-fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**22**) u obliku amorfnе mase, u prinosu od 83.5% (Shema 3.2.4.).



Shema 3.2.4. *i*, TsCl, Py ili Ac₂O, Py.

Struktura jedinjenja **22** potvrđena je spektroskopskim podacima. U protonskom NMR spektru uočava se pomeranje signala za angularnu metil grupu u oblast nižih vrednosti magnetnog polja [δ_H 1.00 (s, 3H, H-18) za jedinjenje **20** → δ_H 1.49 za jedinjenje **22**], što ukazuje da je došlo do strukturalnih promena u njenoj okolini. Isto tako odsutan je signal za protone hidroksilnih grupa. U oblasti nižih vrednosti magnetnog polja, u kome se nalaze protoni iz aromatičnih jezgara, zapaža se izdvajanje dubleta [δ_H 7.80 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-2" i H-6")], koji odgovara protonima koji su u *orto* položaju u odnosu na C=O grupu. I u ¹³C NMR spektru pomeren je signal za angularnu metil grupu u oblast nižih vrednosti magnetnog polja [δ_C 14.46 (C-18) za jedinjenje **20** → 17.15 za jedinjenje **22**]. Signal za C-15 atom, koji se u jedinjenju **20** nalazi na 47.76 ppm, pomeren je u oblast viših vrednosti magnetnog polja i nalazi se na δ_C 18.48, što je zajedno sa novim signalom na 119.39 ppm (C≡N) dokaz da je u položaju C-16 došlo do očekivanih transformacija. Svi navedeni podaci, zajedno sa signalom na δ_C 206.29 (C=O), potvrđuju da je došlo do

raskidanja C₁₆-C₁₇ veze i građenja seko jedinjenja **22**. Uz ovu tvrdnju ide i podatak M spektra u kojem je prisutan pik molekulskog jona na *m/e* 536, koji odgovara molekulskoj masi jedinjenja **22**.

Za Beckmann-ovu fragmentaciju jedinjenja **21** upotrebljen je anhidrid sirćetne kiseline u piridinu. Rastvor jedinjenja **21** i anhidrida sirćetne kiseline u piridinu zagrevan je na 100°C, u toku dva sata. Nakon obrade reakcione smeše i prekrizalizacije sirovog proizvoda iz metanola dobijen je 3-benziloksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**23**), u prinosu od 81.0% (Shema 3.2.4.).

Potvrda strukture nosintetizovanog jedinjenja dobijena je na osnovu spektroskopskih podataka, kao i podataka elementarne mikroanalize. U ¹H i ¹³C NMR spektrima došlo je, slično kao kod jedinjenja **22**, do promena hemijskih pomeranja u blizini C-16 i C-17 atoma u odnosu na polazni molekul, što je prikazano u tabeli 3.2.1.

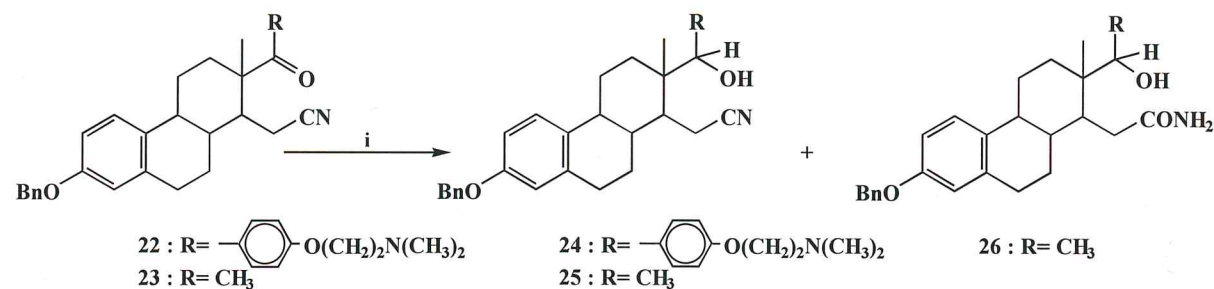
Tabela 3.2.1. Hemijska pomeranja u ¹H i ¹³C NMR spektrima za jedinjenja **21** i **23**

Jed.	¹ H NMR			¹³ C NMR					
	H-18	CH ₃ -C ₁₇	H-15a	C-18	CH ₃	C-15	C-17	C-16	C-13
21	0.91	1.42	2.68	13.72	22.96	46.23	81.41	169.51	46.23
23	1.33	2.23	2.53	15.49	25.36	18.09	213.23	119.11	52.01

U M spektru jedinjenja **23** prisutan je pik molekulskog jona na 387 masenih jedinica, što odgovara molekulskoj masi datog jedinjenja, a rezultati elementarne mikroanalize potvrđuju njegovu molekulsku formulu (C₂₆H₂₉NO₂).

Dalji pravac naših istraživanja obuhvatao je transformacije primarnih fragmentacionih proizvoda u cilju proučavanja uticaja funkcionalnih grupa u položajima C-16 i C-17 na biološke odgovore molekula. U tu svrhu smo najpre redukovali karbonilnu grupu do hidroksilne, a zatim i nitrilnu grupu do amino.

Za selektivnu redukciju karbonilne grupe u prisustvu nitrilne u jedinjenjima **22** i **23** izabran je NaBH_4 u metanolu. Dobijeni su odgovarajući cijano-alkoholi: 3-benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[(2-dimetil-amino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**24**, prinos 60.3%) i 3-benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**25**, prinos 63.8%) (Shema 3.2.5.). Keton **23** je pored alkohola **25** u malom procentu (9.2%) dao i 3-benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amid (**26**).



Shema 3.2.5. *i*, NaBH_4 , MeOH .

Strukture novosintetizovanih jedinjenja **24-26** potvrđene su spektroskopskim podacima, a kod jedinjenja **25** i elementarnom mikroanalizom.

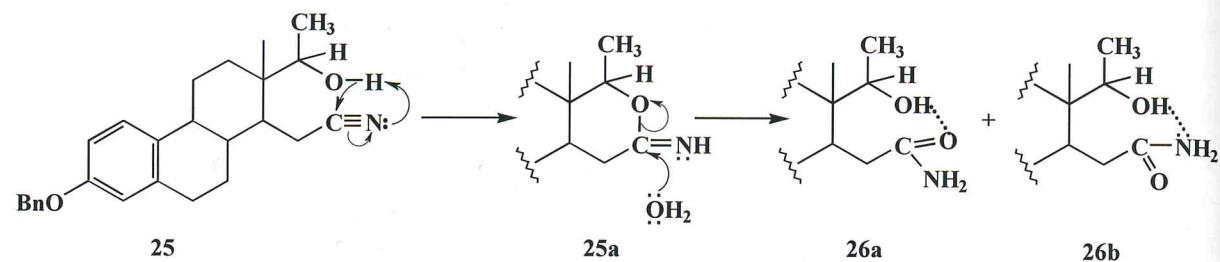
U protonskom NMR spektru jedinjenja **24** pojavljuje se signal na 4.55 ppm, koji odgovara protonu hidroksilne grupe. U ^{13}C NMR spektru signal za C-17 atom znatno je pomeren u oblast jačeg magnetnog polja [δ_{C} 206.29 ($\text{C}_{17}=\text{O}$) za jedinjenje **22** \rightarrow 78.78 ($\text{C}_{17}-\text{OH}$) za jedinjenje **24**]. Isto tako je uočljivo i pomeranje signala za angularnu metil grupu [δ_{H} 1.49 (s, 3H, H-18) i δ_{C} 17.15 (C-18) za jedinjenje **22** \rightarrow δ_{H} 0.92 (s, 3H, H-18) i δ_{C} 17.00 (C-18) za jedinjenje **24**], kao i pomeranja signala u ^{13}C NMR spektru u oblast većih vrednosti magnetnog polja za ugljenike C-15, C-12 i C-13 [δ_{C} 18.48 (C-15), 37.69 (C-12) i 52.15 (C-13) za jedinjenje **22** \rightarrow δ_{C} 15.24 (C-15), 31.86 (C-12) i 41.01 (C-13) za jedinjenje **24**].

I u NMR spektrima jedinjenja **25** došlo je do sličnih pomeranja. Tako je signal za angularnu metil grupu pomeren na 0.97 ppm (u jedinjenju **23**

on se nalazio na 1.33 ppm), dok je signal za metil grupu vezanu za C-17 atom [δ_{H} 2.23 (s, 3H, CH_3) u jedinjenju **23**] pomeren na 1.26 ppm i javlja se u obliku dubleta. Novi signal na δ_{H} 3.80, koji se javlja u obliku kvarteta, potiče od H-17 atoma. U ^{13}C NMR spektru nema signala u niskoj oblasti magnetnog polja, koji je u jedinjenju **23** poticao od $\text{C}_{17}=\text{O}$, već se signal za isti ugljenikov atom nalazi na 72.41 ppm, što odgovara činjenici da je za njega vezana hidroksilna grupa. I signali za ostale ugljenikove atome koji se nalaze u blizini reakcionog centra takođe imaju različita pomeranja u odnosu na iste signale u jedinjenju **23** [δ_{C} 15.49 (C-18), 18.09 (C-15), 25.36 ($\text{CH}_3-\text{C}_{17}$), 52.01 (C-13), 119.11 ($\text{C}_{16}=\text{N}$) za jedinjenje **23** \rightarrow δ_{C} 16.99 (C-18), 14.92 (C-15), 17.76 ($\text{CH}_3-\text{C}_{17}$), 40.50 (C-13), 120.04 ($\text{C}_{16}=\text{N}$) za jedinjenje **25**].

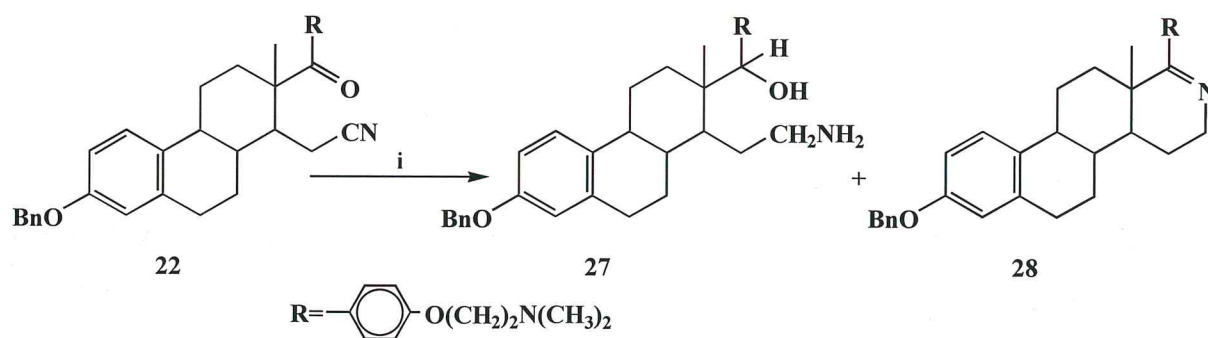
U ^1H i ^{13}C NMR spektrima jedinjenja **26** javljaju se udvojeni signali za pojedine atome [δ_{H} 0.91 i 1.10 (2s, 3H, H-18); 1.29 i 1.40 (2d, 3H, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_3-\text{C}_{17}$); 4.20 i 4.30 (2q, 1H, $J = 6.4$ Hz, H-17); δ_{C} 10.60 i 14.80 (C-18); 16.85 i 17.86 ($\text{CH}_3-\text{C}_{17}$); 85.74 i 86.24 (C-17); 170.90 i 170.97 ($\text{C}_{16}=\text{O}$)]. U M spektru pomenutog jedinjenja nije prisutan pik molekulskog jona, ali je prisutan fragment na 390 masenih jedinica, koji nastaje uklanjanjem metil grupe iz molekula **26**, kao i fragment mase na 256 ($\text{M}^+-\text{C}_7\text{H}_7-\text{CO}-\text{NH}_3$).

Pretpostavljamo da hidroksi-amid **26** nastaje prema mehanizmu prikazanom na shemi 3.2.6. Hidroksilna grupa u položaju C-17 vrši intramolekulski napad na ugljenikov atom nitrilne grupe uz nastajanje cikličnog intermedijera **25a**, a ovaj dalje podleže nukleofilnom napadu vode, pri čemu nastaje amid **26**. Amid **26** se najverovatnije javlja u obliku struktura **26a** i **26b**, čime se može objasniti prisustvo udvojenih signala u NMR spektrima pomenutog jedinjenja.



Shema 3.2.6. Mehanizam nastajanja jedinjenja 26.

Redukcijom jedinjenja **22** sa NaBH_4 , u prisustvu kobaltne soli, nastaje 3-benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-seko-estra-1,3,5(10)-trien-16-amin (**27**), u prinosu od 33%. Pored jedinjenja **27** dobijen je još jedan proizvod, za koji pretpostavljamo da predstavlja 3-benziloksi-17-aza-17a-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-D-homoestra-1,3,5(10),17(17a)-tetraen (**28**, prinos 23.6%) (Shema 3.2.7.).



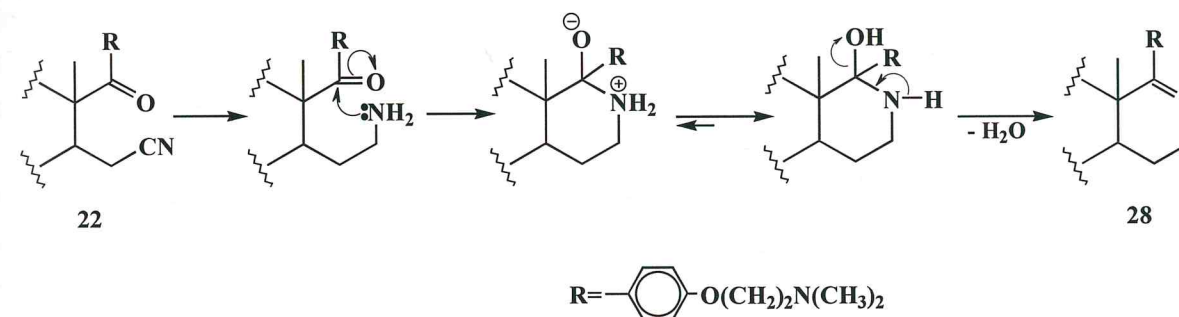
Shema 3.2.7. *i*, NaBH_4 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MeOH, zatim H_2O , 6M HCl.

U protonskom NMR spektru jedinjenja **27** zapaža se isto pomeranje signala za angularnu metil grupu kao kod jedinjenja **24** [δ_{H} 0.93 (s, 3H, H-18)]. Prošireni signal na 3.40 ppm odgovara protonima OH i NH_2 grupe. U ^{13}C NMR spektru karakteristično je odsustvo signala za ugljenikov atom nitrilne grupe (u ^{13}C NMR spektru jedinjenja **22** ovaj signal se javlja na 119.39 ppm), a signal za isti ugljenikov atom se javlja na 48.31 ppm, što zajedno sa signalom za C-17 atom, koji se u jedinjenju **22** nalazio na

206.29 ppm, a u jedinjenju **27** je znatno pomeren u oblast jačeg magnetnog polja i nalazi se na 72.49 ppm, potvrđuje da su u molekulu **27** prisutne OH i NH_2 grupa. U M spektru jedinjenja **27** nije prisutan pik molekulskog jona, ali je prisutan fragment na m/e 524, koji nastaje nakon eliminacije molekula vode. Rezultati elementarne mikroanalize potvrđuju molekulsku formulu jedinjenja **27** ($\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_3$).

Struktura jedinjenja **28** je pretpostavljena na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije. U protonskom NMR spektru zapaža se različito pomeranje signala za angularnu metil grupu u odnosu na polazni molekul **22** [δ_{H} 1.49 za jedinjenje **22** → 1.28 za jedinjenje **28**]. U ^{13}C NMR spektru odsutni su signali za ugljenikove atome nitrilne i karbonilne grupe, a javljaju se signali na 50.15 ppm (C-16) i 176.94 ppm (C_{17a}=N).

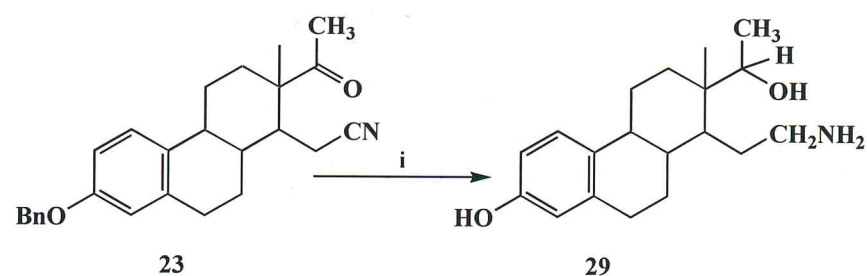
Pretpostavljeni mehanizam nastajanja D-homo derivata **28** prikazan je na shemi 3.2.8. Najverovatnije prvo dolazi do redukcije nitrilne grupe do amino, koja zatim nukleofilnim napadom na karbonilnu grupu dovodi do građenja 17-aza-D-homo jedinjenja **28**.



Shema 3.2.8. Mehanizam nastajanja jedinjenja 28.

Odgovarajući hidroksiamin sa metil grupom na C-17 dobijen je katalitičkom hidrogenacijom jedinjenja **23**, u prisustvu 10% Pd/C kao katalizatora. Reakcija je izvedena pri atmosferskom pritisku vodonika, u toku 24 sata, uz korišćenje 25% katalizatora u odnosu na jedinjenje **23**.

3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (29) dobijen je u prinosu od 89.4% (Shema 3.2.9.).



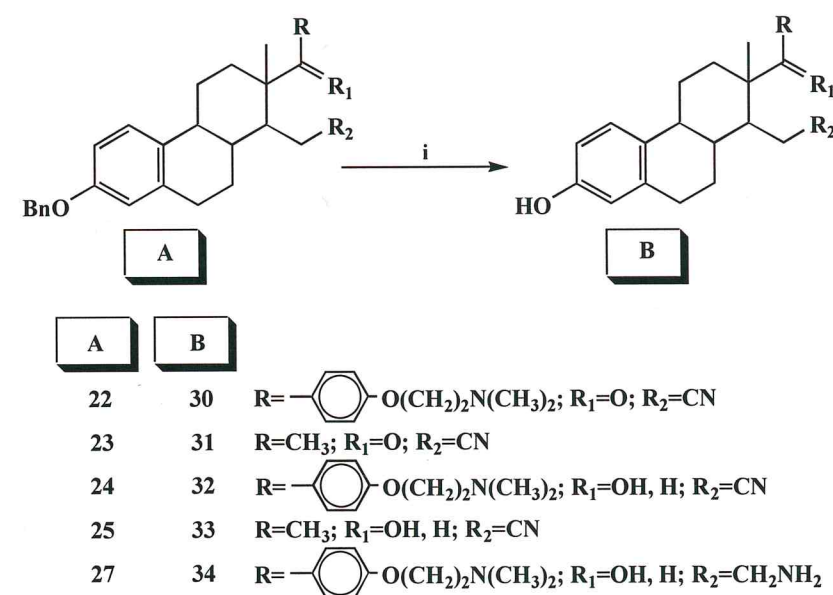
Shema 3.2.9. *i*, H₂, 10% Pd/C, MeOH, CH₂Cl₂.

Struktura jedinjenja 29 potvrđena je spektroskopskim podacima i elementarnom mikroanalizom. U protonskom NMR spektru zapaža se različito pomeranje signala za metil grupu vezanu za C-17 atom u odnosu na polazni molekul 23 [δ_{H} 2.23 (s, 3H, CH₃-C₁₇) za jedinjenje 23 → 0.90 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, CH₃-C₁₇) za jedinjenje 29]. Takođe, pojavljuje se novi signal na 2.37 ppm, koji potiče od H-17 atoma, kao i signal na 3.16 ppm, koji potiče od dva protona amino grupe. ¹³C NMR spektar potvrđuje odsustvo nitrilne i karbonilne grupe, kao i prisustvo amino i hidroksilne grupe u molekulu 29, signalima na 46.12 ppm (C₁₆-NH₂) i 61.49 ppm (C₁₇-OH). U spektrima je evidentan i izostanak signala za protone, odnosno ugljenikove atome benzilne grupe. U M spektru nije prisutan pik molekuskog jona, već su prisutni fragmenti na 285 (M⁺-H₂O) i 270 (M⁺-H₂O-CH₃) masenih jedinica. Elementarna mikroanaliza je u saglasnosti sa molekulskom formulom jedinjenja 29 (C₁₉H₂₉NO₂).

S obzirom da su odabrana novosintetizovana jedinjenja planirana za kasnija biološka *in vitro* testiranja, to se završna faza sinteze sastojala u uklanjanju benzil-etarske zaštite u položaju C-3, a sa ciljem dobijanja slobodne fenolne OH grupe. U tu svrhu primenjena je reakcija hidrogenolize, koja je izvedena u prisustvu 10% Pd/C. Količina katalizatora je iznosila 10% u odnosu na masu polaznog jedinjenja. Reakcione smeše su

intenzivno mešane preko noći u atmosferi vodonika, na sobnoj temperaturi.

Iz jedinjenja 22 pri gore opisanim uslovima dobijen je 3-hidroksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (30), u prinosu od 93.8%, a iz jedinjenja 23 je dobijen 3-hidroksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (31), u prinosu od 83.2% (Shema 3.2.10.). Jedinjenje 24 je u reakciji hidrogenolize dalo 3,17-dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (32), u prinosu od 80.0%, a jedinjenje 25 je dalo 3,17-dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (33), u prinosu od 62.4% (Shema 3.2.10.). Iz jedinjenja 25 je pored proizvoda 33 dobijeno i jedinjenje 29, u prinosu od 36.7%. Konačno, iz jedinjenja 27 je dobijen 3,17-dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (34), u prinosu od 92.6%.



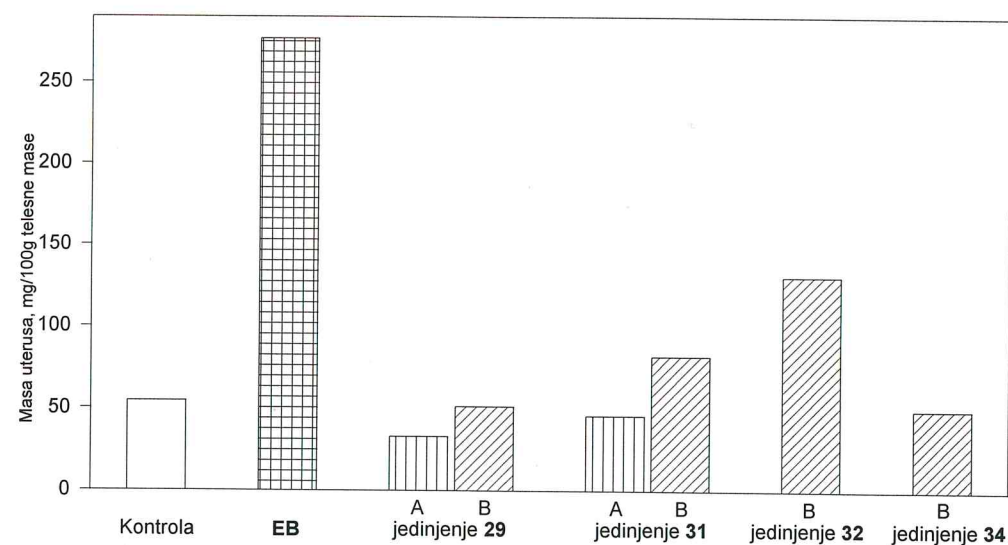
Shema 3.2.10. *i*, H₂, 10% Pd/C.

Da je došlo do uklanjanja benzil-etarske zaštite i građenja fenolne grupe u položaju C-3 kod jedinjenja 30-34 nedvosmisleno potvrđuju spektroskopski podaci, a kod jedinjenja 30, 31, 33 i 34 i podaci

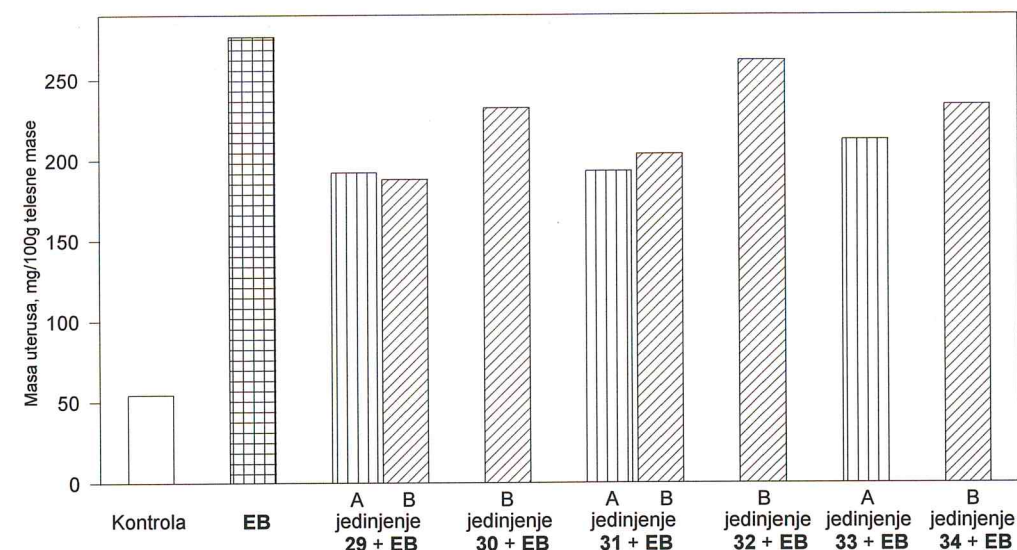
elementarne mikroanalize. U protonskim NMR spektrima kod svih nosintetizovanih jedinjenja zapaža se odsustvo signala na oko 5 ppm, koji su poticali od metilenskih protona benzilne funkcije, kao i odsustvo signala za pet protona u oblasti niskih vrednosti magnetnog polja, koji su poticali od aromatičnog jezgra benzilne funkcije. U ^{13}C NMR spektrima je evidentno odsustvo signala za ugljenikove atome benzilne grupe, kao i izvesna pomeranja signala za C-3 atome u oblast viših vrednosti magnetnog polja u odnosu na polazne molekule. Maseni spektri jedinjenja **30**, **31**, **33** i **34** sadrže pik molekuskog jona, koji odgovara molekulskim masama datih jedinjenja, dok je kod jedinjenja **32** prisutan fragment mase na m/e 285 ($\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}$).

3.2.2. Određivanje estrogene i antiestrogene aktivnosti jedinjenja 29-34

Testovima za ispitivanje estrogene aktivnosti podvrgnuta su jedinjenja **29**, **31**, **32** i **34**, a korišćena je ranije opisana uterotrofna metoda (str. 48). Antiestrogena aktivnost određivana je kod jedinjenja **29-34**. Rezultati uterotrofnih testova prikazani su na slici 3.2.2., a antiuterotrofnih na slici 3.2.3.



Slika 3.2.2. Zavisnost mase uterusa tretiranih životinja od primenjenih doza ispitivanih supstanci. Ukupna doza: A - 240 µg; B - 1200 µg; EB - estradiol benzoat, 1.5 µg.



Slika 3.2.3. Zavisnost mase uterusa tretiranih životinja od primenjenih kombinacija ispitivane supstance i estradiol benzoata. Ukupna doza: A - 240 µg; B - 1200 µg; EB - estradiol benzoat, 1.5 µg.

Iz podataka dobijenih nakon uterotrofnog i antiuterotrofnog testiranja izračunati su agonistički i antagonistički efekti ispitivanih jedinjenja i oni su dati u tabeli 3.2.2.

Tabela 3.2.2. Agonistički i antagonistički efekti jedinjenja 29-34.

Jedinjenje	Doza, mg/kg	Agonistički efekat, %	Antagonistički efekat, %
29	5	-9.7	38.0
	25	-1.5	39.8
30	25	-	20.1
31	5	-4.0	37.6
	25	12.3	32.9
32	25	34.3	6.7
33	5	-	29.0
34	25	-2.3	19.2

Iz histograma prikazanog na slici 3.2.2. i podataka iz tabele 3.2.2. može se uočiti da jedinjenja **29**, **31** i **34** pokazuju potpuno odsustvo estrogenog delovanja; kod jedinjenja **29** i **34** čak i velike doze (1200 µg) pokazuju negativan estrogeni agonizam, što znači da smanjuju i delovanje endogenog estradiola. S druge strane, jedinjenja **29** i **31** imaju značajno antiestrogeno delovanje (npr. pri dozi od 5 mg/kg ispoljavaju oko 38% antagonizma; međutim, primena petostruko veće doze ne dovodi do većeg stepena antagonizma).

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Opšte metode. - Tačke topljenja su određene na aparatu Büchi SMP 20 i nisu korigovane. NMR spektri su snimljeni na instrumentu Bruker AC 250 E, a hemijska pomeranja (δ -skala) su izražena u *ppm* vrednostima, uz tetrametilsilan kao interni standard. Maseni spektri su snimljeni na instrumentu Finnigan MAT 8230. Za hromatografiju na koloni korišćen je Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm; Merck) i Al₂O₃ 90 (neutralni, 0.063-0.2 mm; Merck). Fleš fromatografija je rađena na kolonama Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm; Merck). Ekstrakti su sušeni anhidrovanim Na₂SO₄, a rastvarači su uparavani na rotacionom vakuum uparivaču.

4.1. Postupci sinteze B-estranskih derivata

4.1.1. 3,17 β -Dipropionoksi-9 α -hidroksiestra-1,3,5(10)-trien-6-on (2)

U suvi metilen-hlorid (160 ml) doda se hrom-trioksid (19.3 g, 0.19 mola) i suspenzija se ohladi na 0°C. U ohlađenu suspenziju se, uz mešanje, doda 3,5-dimetilpirazol (18.3 g, 0.19 mola), a nakon petnaest minuta i estradiol dipropionat (**1**; 3.71 g, 9.7 mmola). Reakciona smeša se meša 5 sati na temperaturi od 0°C, a zatim se ostavi da stoji na sobnoj temperaturi u naredna dva dana. Po isteku ovog vremena, u reakcionu smešu, prethodno ohlađenu na 0°C, doda se 5M NaOH (80 ml, 0.4 mola) i meša jedan sat na istoj temperaturi. Metilen-hloridni sloj se odvoji i ekstrahuje sa 2M HCl

radi odstranjanja 3,5-dimetilpirazola, koji se regeneriše podešavanjem pH rastvora na 12 i ekstrahovanjem etrom (4 x 50 ml).

Metilen-hloridni sloj se ispere vodom i zasićenim rastvorom NaCl. Nakon sušenja i uklanjanja sušila i rastvarača, dobija se mrki uljasti ostatak (3.28 g). Smeša proizvoda oksidacije razdvaja se na stubu silikagela (65 g, toluen - EtOAc, 9:1), pri čemu se dobija 0.32 g (10%) 3,17β-dipropionoksiestra-1,3,5(10)-trien-6-ona (**3**), t.t. 109-111°C (lit.⁹ t.t. 110-111°C) i 1.80 g (45%) proizvoda **2**, t.t. 149-150°C (lit.⁹ t.t. 149-150°C).

4.1.2. 3,6β,9α-Trihidroksi-17β-propionoksiestra-1,3,5(10)-trien (**4**)

U rastvor jedinjenja **2** (0.1 g, 0.24 mmola) u metanolu (8 ml) doda se natrijum-bor-hidrid (0.1 g, 2.65 mmola). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku jednog sata, a zatim se izlije u vodu (10 ml) i ekstrahuje etrom. Ekstrakt se suši i upari, a sirova smeša se razdvoji "fleš" hromatografijom (benzen - EtOAc, 1:1). Dobija se jedinjenje **4** (0.073 g, 83.4%) u obliku belih kristala, koji se nakon prekrizalizacije iz sistema *n*-heksan - aceton tope na 177°C.

¹H NMR spektar (DMSO-d₆): 0.73 (s, 3H, H-18); 1.02 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO); 1.2-1.85 (grupa signala, 10H, H-16, H-12, H-11β, H-8, H-7); 2.0 (m, 1H, H-14); 2.16-2.35 (grupa signala, 3H, H-11α, CH₃CH₂CO); 4.24 (s, 1H, C₉-OH); 4.44 (m, 1H, H-6); 4.61 (t, 1H, J_{17,16a} = 8.2 Hz, J_{17,16b} = 8.5 Hz, H-17); 5.20 (d, 1H, J = 7.8 Hz, C₆-OH); 6.57 (dd, 1H, J_{2,4} = 2.4 Hz, J_{1,2} = 8.5 Hz, H-2); 6.91 (d, 1H, H-4); 7.20 (d, 1H, H-1); 9.23 (bs, 1H, C₃-OH).

¹³C NMR spektar (DMSO-d₆): 9.38 (CH₃CH₂CO); 11.37 (C-18); 22.83 (C-15); 27.29 (CH₃CH₂CO); 27.43 (C-16); 30.98 (C-7); 32.33 (C-11); 32.73 (C-12); 40.34 (C-8); 41.81 (C-14); 42.68 (C-13); 68.34 (C-6); 68.84 (C-9); 81.95 (C-17); 113.42 (C-4); 114.00 (C-2), 126.34 (C-1); 133.44 (C-10); 142.34 (C-5); 156.34 (C-3); 173.89 (OCOC₂H₅).

M spektar (*m/e*): 342 (M⁺-H₂O, 33); 324 (M⁺-2H₂O, 26); 235 (43); 208 (44).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za C₂₁H₂₈O₅ (360.43): C, 69.97; H, 7.83. Nađeno: C, 69.72; H, 7.78.

4.1.3. 3,17β-Dipropionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-6-on (**5**)

A. U rastvor fosfor-pentoksida (0.45 g, 3 mmola) u benzenu (30 ml) doda se jedinjenje **2** (0.108, 0.26 mmola) i reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku dva sata. Nakon toga se izlije u vodu (30 ml), odvoje se vodeni i organski sloj i organski sloj se ispere sa zasićenim rastvorom NaHCO₃, osuši i rastvarač upari. Dobija se sirovi proizvod (0.09 g, 87.4%) u obliku svetložutih kristala, koji nakon prekrizalizacije iz *n*-heksana daje čisto jedinjenje **5**, t.t. 102-103°C.

B. Rastvor jedinjenja **2** (0.10 g, 0.24 mmola) u anhidridu sirćetne kiseline (5 ml) zagreva se na temperaturi ključanja, u toku 20 sati. Po isteku ovog vremena, reakciona smeša se ohladi do sobne temperature, a zatim se izlije u vodu (50 ml). Nakon neutralizacije vodenog rastvora pažljivim dodavanjem čvrstog NaHCO₃, smeša se ekstrahuje pomoću CH₂Cl₂ (3 x 20 ml). Spojeni organski ekstrakti se isperu vodom, osuše i upare. Sirovi uljasti proizvod se prečisti "fleš" hromatografijom (toluen - EtOAc, 12:1), pri čemu se dobija čist proizvod **5** (0.06 g, 63%).

¹H NMR spektar (CDCl₃): 0.85 (s, 3H, H-18); 1.15 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-3); 1.25 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-17); 2.35 (q, 2H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-3); 2.60 (q, 2H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-17); 2.90 (dd, 1H, J₁ = 16.8 Hz, J₂ = 5.3 Hz, H-12a); 4.85 (t, 1H, J = 7.5 Hz, H-17); 6.45 (t, 1H, J = 5.1 Hz, H-11); 7.25 (dd, 1H, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 2.5 Hz, H-2); 7.70 (m, 2H, H-1 i H-4).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 8.99 i 9.21 (CH₃CH₂CO); 11.81 (C-18); 27.63 i 27.70 (CH₃CH₂CO); 81.87 (C-17); 119.28 (C-11); 131.55 (C-9); 150.06 (C-3); 172.75 (OCOC₂H₅, C-17); 174.40 (OCOC₂H₅, C-3); 196.50 (C₆=O).

M spektar (*m/e*): 396 (M⁺, 18); 341 (15); 340 (45); 266 (100).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $C_{24}H_{28}O_5$ (396.46): C, 72.70; H, 7.12; Nađeno: C, 72.55; H, 6.98.

4.1.4. 3,6 β -Dihidroksi-17 β -propionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen (6)

Rastvoru jedinjenja 5 (0.1 g, 0.25 mmola) u metanolu (10 ml) doda se, u porcijama, natrijum-bor-hidrid (0.1 g, 2.65 mmola). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku jednog sata, a zatim se izlije u vodu (70 ml), pri čemu se izdvaja beo talog. Talog se cedi, ispere vodom i osuši. Dobija se 0.078 g (90.7%) proizvoda 6, u obliku belih kristala. Analitički čist proizvod se dobija prekrizacijom iz sistema *n*-heksan - aceton i ima t.t. 164-165°C.

1H NMR spektar ($CDCl_3$): 0.78 (s, 3H, H-18); 1.16 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO); 2.35 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO); 3.20 (široki signal, 1H, C_6-OH); 4.75 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz, H-6 i H-17); 6.08 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-11); 6.70 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.2$ Hz, H-2); 7.10 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-4); 7.37 (s, 1H, C_3-OH); 7.40 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1).

^{13}C NMR spektar ($CDCl_3$): 9.25 (CH_3CH_2CO); 12.00 (C-18); 68.99 (C-6); 82.49 (C-17); 112.54 (Ar CH); 115.36 (Ar CH); 118.22 (C-11); 125.21 (Ar CH); 126.58 (C-9); 133.86 (Ar C); 140.10 (Ar C); 155.33 (C-3); 174.74 ($OCOC_2H_5$).

M spektar (m/e): 342 (M^+ , 30); 324 ($M^+ - H_2O$, 18), 235 (45), 208 (45).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za: $C_{21}H_{26}O_4$ (342.41): C, 73.66; H, 7.65. Nađeno: C, 73.31; H, 7.52.

4.1.5. 3,17 β -Dipropionoksi-6-hidroksiestra-1,3,5(10),6,8-pentaen (7)

Jedinjenje 2 (0.95 g, 2.3 mmola) rastvori se u suvom piridinu (5 ml), a zatim se, uz mešanje, doda rastvor tionil-hlorida (0.7 ml, 9.2 mmol) u piridinu (3 ml). Nakon mešanja na sobnoj temperaturi u toku 10 minuta, reakciona smeša se izlije u vodu (50 ml) i ekstrahuje benzenom (4 x 20 ml). Ekstrakti se osuše i benzen upari, a zaostali piridin se ukloni ko-

destilacijom sa benzenom. Dobijeno žuto ulje se razdvoji "fleš" hromatografijom (toluen - EtOAc, 12:1). Prema redosledu eluiranja dobija se 3,17 β -dipropionoksi-9 ξ -hloroestra-1,3,5(10)-trien-6-on (8, 0.23 g, 25.5%), t.t. 115°C, jedinjenje 5 (0.31 g, 34.6%), t.t. 103-104°C i jedinjenje 7 (0.30 g, 34.4%), t.t. 201°C.

Jedinjenje 7:

1H NMR spektar ($CDCl_3$): 0.85 (s, 3H, H-18); 1.15 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO , C-3); 1.25 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO , C-17); 2.40 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO , C-3); 2.65 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO , C-17); 4.90 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-17); 5.60 (s, 1H, OH); 6.50 (s, 1H, H-7); 7.25 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, H-2); 7.85 (m, 2H, H-1 i H-4).

^{13}C NMR spektar ($CDCl_3$): 9.21 i 9.37 (CH_3CH_2CO); 11.33 (C-18); 27.91 i 28.34 (CH_3CH_2CO); 81.65 (C-17); 108.05 (Ar CH); 113.60 (Ar CH); 121.34 (Ar CH); 122.50 (Ar C); 123.68 (Ar C); 124.82 (Ar CH); 131.06 (Ar C); 135.54 (Ar C); 147.14 (C-6); 149.75 (C-3); 173.75 ($OCOC_2H_5$, C-17); 174.87 ($OCOC_2H_5$, C-3).

M spektar (m/e): 396 (M^+ , 39); 341 (26); 340 (100).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $C_{24}H_{28}O_5$ (396.46): C, 72.70; H, 7.12; Nađeno: C, 72.44; H, 7.15.

Jedinjenje 8

1H NMR spektar ($CDCl_3$): 0.85 (s, 3H, H-18); 1.15 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO , C-3); 1.27 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO , C-17); 2.33 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO , C-3); 2.60 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz, CH_3CH_2CO , C-17); 4.85 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-17); 7.30 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, H-2); 7.63 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1); 7.75 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, H-4).

^{13}C NMR spektar ($CDCl_3$): 8.90 i 9.15 (CH_3CH_2CO); 11.87 (C-18); 27.33 i 27.65 (CH_3CH_2CO); 72.19 (C-9); 81.31 (C-17); 120.52 (Ar CH); 125.63 (Ar CH); 127.31 (Ar CH); 132.00 (Ar C); 143.65 (Ar C); 150.83 (C-3); 172.52 ($OCOC_2H_5$, C-17); 174.26 ($OCOC_2H_5$, C-3); 195.43 ($C_6=O$).

4.1.6. *N-n*-Butil-*N*-metil-11-bromoundekankarboksamid (11)

U sveže predestilisani tionil-hlorid (1 ml) dodaje se, u porcijama, 11-bromoundekanska kiselina (1 g, 3.8 mmola). Reakciona smeša se meša dva sata na sobnoj temperaturi, a zatim se višak tionil-hlorida ukloni uparavanjem u visokom vakuumu. Zaostalo ulje se rastvori u benzenu (2.5 ml) i u rastvor se, u toku jednog sata, dokapava smeša *N-n*-butil-*N*-metilamina (0.42 g, 3.6 mmol), piridina (0.3 ml) i benzena (1.5 ml). Reakciona smeša se meša još jedan sat na sobnoj temperaturi, a zatim se izlije u ledenu HCl (2M, 10 ml) i ekstrahuje benzenom. Benzenski ekstrakt se ispere sa zasićenim rastvorom Na₂CO₃, vodom i na kraju sa zasićenim rastvorom NaCl. Nakon sušenja i uparavanja, zaostaje 1.03 g (81.7%) jedinjenja **11**, u obliku svetložutog ulja.

¹H NMR spektar (CDCl₃): 0.91 (m, 3H, J = 7.7 Hz, CH₃CH₂); 2.26 (m, 2H, CH₂CON); 2.88 i 2.94 (2s, 3H, NCH₃); 3.22 i 3.33 (2t, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂NCO); 3.37 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂Br).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 13.74 i 13.76 (CH₃); 33.22 i 35.21 (NCH₃); 32.86 i 33.52 (CH₂CON); 33.90 (CH₂Br); 47.28 i 49.65 (CH₂NCO); 172.73 i 172.85 (CO).

4.1.7. 3,17β-Dipropionoksiestra-1,3,5(10),7,9(11)-pentaen-6-on (12)

U rastvor jedinjenja **7** (0.1 g, 0.25 mmola) u apsolutnom etru (10 ml) doda se srebro-oksidi (0.09 g, 0.4 mmola) i nastala suspenzija se meša na temperaturi ključanja, u toku 8 sati. Izdvojeno srebro se odvoji ceđenjem i etar upari. Zaostalo žuto ulje (0.101 g) se prekrystalise iz smeše dietil-etar - aceton, pri čemu se dobijaju žuti kristali jedinjenja **12** (67.7 mg, 68.0%), t.t. 150-153°C.

¹H NMR spektar (CDCl₃): 0.77 (s, 3H, H-18); 1.17 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-3); 1.28 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-17); 2.36 (q, 2H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-3); 2.62 (q, 2H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-17); 5.00

(dd, 1H, J₁ = 9.1 Hz, J₂ = 7.4 Hz, H-17); 6.32 (bs, 1H, H-7); 7.20 (m, 1H, H-11); 7.34 (dd, 1H, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 2.5 Hz, H-2); 7.89 (m, 2H, H-1 i H-4).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 9.00 i 9.15 (CH₃CH₂CO); 12.12 (C-18); 27.47 i 27.62 (CH₃CH₂CO); 81.43 (C-17); 118.71 (Ar CH); 123.07 (Ar CH); 123.53 (C-11); 125.64 (Ar CH); 128.80 (Ar C); 131.44 (C-9); 132.52 (Ar C); 136.39 (C-7); 150.44 (Ar C); 151.87 (C-8); 172.73 (OCOC₂H₅, C-17); 174.40 (OCOC₂H₅, C-3); 183.84 (C₆=O).

4.1.8. 3-Hidroksi-17β-acetoksiestra-1,3,5(10)-trien (13)

U rastvor estradiola (**I**; 3 g, 11 mmola) u etil-acetatu (500 ml) doda se *p*-toluensulfonska kiselina (3.8 g, 20 mmola). Reakciona smeša se zagreva uz refluks, u toku 2.5 sata, a zatim se doda koncentrovana sumporna kiselina (2.1 ml, 38 mmola) i nastavi sa zagrevanjem u naredna dva sata. Po isteku ovog vremena, reakciona smeša se ohladi i neutrališe zasićenim rastvorom NaHCO₃. Organski sloj se ispere vodom, osuši i rastvarač upari. Dobija se proizvod **13** u obliku belih kristala (3.33 g, 96.2%), koji nakon prekrystalizacije iz metanola imaju t.t. 223-224°C (lit.¹¹⁴ t.t. 217-219°C).

¹H NMR spektar (DMSO-*d*₆): 0.85 (s, 3H, H-18); 2.05 (s, 3H, CH₃CO); 4.60 (t, 1H, J = 7.6 Hz, H-17); 6.40 (d, 1H, J = 2.6 Hz, H-4); 6.50 (dd, 1H, J₁ = 8.6 Hz, J₂ = 2.6 Hz, H-2); 7.05 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H-1); 9.05 (s, 1H, OH).

4.1.9. 3-O-(10'-Karbo-*N-n*-butil-*N*-metilamino)decil-17β-acetoksiestra-1,3,5(10)-trien (14)

Jedinjenja **13** (0.175 g, 0.5 mmola) i **11** (0.335 g, 1 mmol) rastvore se u metilen-hloridu (2.5 ml). Rastvoru se na sobnoj temperaturi doda rastvor tetrabutylamonijum-bromida (0.16 g, 0.5 mmol) i natrijum-hidroksida (0.03 g, 0.75 mmola) u vodi (2.5 ml). Dvofazna smeša se intenzivno meša na istoj temperaturi u toku dvanaest sati, a zatim se organski i vodeni sloj odvoje. Organski sloj se ispere vodom do neutralne reakcije i nakon sušenja i uklanjanja sušila i rastvarača, dobijeno ulje se prečisti

hromatografijom na stubu silikagela (12 g, toluen - EtOAc, 12:1). Dobija se proizvod **14** (0.15 g, 53.4%), u obliku bezbojnog ulja.

¹H NMR spektar (CDCl₃): 0.83 (s, 3H, H-18); 0.94 (m, 3H, CH₃CH₂); 2.06 (s, 3H, CH₃CO); 2.91 i 2.97 (2s, 3H, NCH₃); 3.22 i 3.35 (2t, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂NCO); 3.92 (t, 2H, J = 6.5 Hz, OCH₂); 4.69 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-17); 6.63 (d, 1H, J = 2.6 Hz, H-4); 6.70 (dd, 1H, J₁ = 8.6 Hz, J₂ = 2.6 Hz, H-2); 7.19 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H-1).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 12.03 (C-18); 13.84 i 13.87 (CH₃CH₂); 67.83 (OCH₂); 82.70 (C-17); 111.97 (Ar CH); 114.40 (Ar CH); 126.24 (Ar CH); 132.22 (Ar C); 137.77 (Ar C); 156.97 (C-3); 171.21 (OCOC₂H₅); 172.83 i 172.96 (NC=O).

4.1.10. 3,17β-Dipropionoksi-6-O-[(10'-karbo-N-*n*-butil-N-metilamino)decil]estra-1,3,5(10),6,8-pentaen (15)

Jedinjenja **7** (0.567 g, 1.4 mmola) i **11** (0.935 g, 2.8 mmola) rastvore se u metilen-hloridu (13 ml). Tom rastvoru se doda rastvor tetrabutil-amonijum-bromida (0.45 g, 1.4 mmola) i natrijum-hidroksida (0.085 g, 2.12 mmola) u vodi (13 ml). Dvofazna smeša se intenzivno meša na sobnoj temperaturi u toku deset sati, a potom se organski i vodeni sloj odvoje i organski sloj se ispere vodom do neutralne reakcije. Nakon sušenja i uklanjanja sušila i rastvarača, dobija se mrko ulje koje se prečisti hromatografijom na stubu silikagela (50 g, petrol-etar - aceton, 9:1). Dobija se proizvod **15** (0.215 g, 23.2%), u obliku bezbojnog ulja.

¹H NMR spektar (CDCl₃): 0.77 (s, 3H, H-18); 0.95 (m, 3H, CH₃CH₂); 1.19 (t, 3H, J = 7.6 Hz, CH₃CH₂CO, C-3); 2.39 (q, 2H, J = 7.6 Hz, CH₃CH₂CO, C-3); 2.67 (q, 2H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CO, C-17); 2.91 i 2.97 (2s, 3H, NCH₃); 3.25 i 3.36 (2t, 2H, J = 7.3 Hz, CH₂NCO); 4.07 (t, 2H, J = 6.5 Hz, OCH₂); 4.90 (t, 1H, J = 7.2 Hz, H-17); 6.54 (s, 1H, H-7); 7.24 (dd, 1H, J₁ = 9.1 Hz, J₂ = 2.5 Hz, H-2); 7.89 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H-1); 7.92 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H-4).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 9.19 i 9.36 (CH₃CH₂CO); 11.36 (C-18); 13.94 (CH₃CH₂); 68.19 (OCH₂); 81.63 (C-17); 172.94 i 173.06 (NC=O); 173.40 i 174.71 (OCOC₂H₅).

4.2. Postupci sinteze D-estranskih derivata

4.2.1. 3-Benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-17-on (16)

Estron (**II**; 5 g, 18.5 mmola) rastvori se u smeši acetona i metanola (1:1, 250 ml). Rastvoru se doda kalijum-karbonat (5 g, 36.2 mmola) i benzil-hlorid (38.6 ml, 0.33 mola) i nastala suspenzija se meša na temperaturi ključanja, u toku 8 sati. Reakciona smeša se zatim cedi i talog ispere acetonom. Filtrat se upari, a višak benzil-hlorida se ukloni destilacijom sa vodenom parom. Čvrsti ostatak, koji predstavlja sirovi benzil-etar estrona, prekrstališe se iz metanola (250 ml), pri čemu se dobijaju beli kristali proizvoda **16** (5.71 g, 85.6%), t.t. 129-130°C (lit.¹⁰⁷ t.t. 129-130°C). Uparavanjem matičnog luga na polovinu zapremine, dobija se još 0.42 g (6.3 %) proizvoda zadovoljavajuće čistoće.

4.2.2. 3-Benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-16,17-dion-16-oksim (17)

U 0.65 M rastvor kalijum-*t*-butoksida u *t*-butanolu (140 ml, 0.09 mola) doda se jedinjenje **16** (10.8 g, 0.03 mola) i nastala suspenzija se meša 20 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenziji se zatim doda *i*-amil-nitrit (17 ml, 14.8 g, 0.12 mola) i nastavi sa mešanjem u narednih 30 minuta, nakon čega se ostavi da stoji na sobnoj temperaturi, u toku 24 sata. Po isteku ovog vremena, gusta crvenkasta suspenzija se izlije u vodu (1000 ml) i pH se podesi na 4 pomoću koncentrovane HCl, pri čemu se izdvaja talog. Talog se cedi, ispere vodom i suši. Sirovi proizvod, koji je u obliku žutih kristala, prečisti se dvostrukim digerovanjem sa vrelin EtOAc. Dobijaju se

sitni beli kristali proizvoda **17** (7.15 g, 61.3%), t.t. 210-212°C (lit.¹⁰⁷ t.t. 171-172°C).

4.2.3. 1-Bromo-4-(2-hloroetoksi)benzen (**18**)

U rastvor fenola (25 g, 0.27 mola) u 1,2-dihloroetanu (50 ml), koji je ohlađen na 0°C, dokapava se u toku 2.5 sata, uz intenzivno mešanje, rastvor broma (13.5 ml, 0.27 mola) u 1,2-dihloroetanu (20 ml). Reakciona smeša se meša na istoj temperaturi još 1.5 sat, a zatim se zagreje do sobne temperature i doda rastvor natrijum-hidroksida (24 g, 0.6 mola) i trimetilbenzilamonijum-hlorida (4 g, 0.02 mola) u vodi (70 ml). Nastala dvofazna smeša se zagreva na temperaturi ključanja, uz intenzivno mešanje, u toku 48 sati, a zatim se, nakon hlađenja do sobne temperature, vodeni i organski sloj odvoje. Vodeni sloj se ispere sa 1,2-dihloroetanom (25 ml), a spojeni dihaloroetanski rastvori se isperu sa 10%-nim NaOH (100 ml), zatim sa vodom (3 x 150 ml) i na kraju sa zasićenim rastvorom NaCl (150 ml). Nakon sušenja i uparavanja rastvarača, dobija se proizvod **18** (25 g, 79.8%), u obliku belih kristala, t.t. 57-59°C (lit.¹¹⁷ t.t. 59°C).

¹H NMR spektar (CDCl₃): 3.83 (t, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂Cl); 4.21 (t, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂O); 6.81 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar H); 7.40 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar H).

4.2.4. 1-Bromo-4-[2-(dimetilamino)etoksi]benzen (**19**)

U sud autoklava se stavi jedinjenje **18** (20 g, 0.08 mola) i 20%-ni etanolni rastvor dimetilamina (100 ml). Autoklav se zagreva na 100°C u toku 20 sati, nakon čega se reakciona smeša iz autoklava prebaci u balon i etanol upari. U zaostalo viskozno ulje se doda voda (50 ml) i 10%-ni KOH (10 ml). Vodeni i organski sloj se razdvoje. Vodeni sloj se ekstrahuje pomoću CH₂Cl₂ (2 x 50 ml). Spojeni CH₂Cl₂ ekstrakti i organski sloj se osuše, i rastvarač upari. Zaostalo ulje se prečisti vakuum destilacijom. Temperatura destilacije iznosi 143-150°C, pri p = 38 mbara. Dobija se 15.26 g (73.7%) proizvoda **19** u obliku bezbojnog ulja.

¹H NMR spektar (CDCl₃): 2.25 (s, 6H, (CH₃)₂N); 2.68 (t, 2H, J = 6.1 Hz, CH₂N); 3.98 (t, 2H, J = 6.1 Hz, CH₂O); 6.73 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar H); 7.30 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar H).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 45.67 ((CH₃)₂N); 57.94 (CH₂N); 65.96 (CH₂O); 112.60 (C-Br); 116.12 (Ar CH); 131.94 (Ar CH); 157.70 (C-O).

4.2.5. 3-Benziloksi-17β-hidroksi-17α-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]estra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksimum (**20**)

U sveže pripremljenu suspenziju 4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil-magnezijum-bromida u tetrahidrofuranu, koja je dobijena iz jedinjenja **19** (14.64 g, 0.06 mola) i magnezijumovih opiljaka (1.44 g, 0.06 mola) u apsolutnom tetrahidrofuranu (40 ml), dokapava se na sobnoj temperaturi, u toku 30 minuta, rastvor jedinjenja **17** (1 g, 2.5 mmola) u apsolutnom tetrahidrofuranu (60 ml). Suspenzija se meša još jedan sat na istoj temperaturi, a zatim se reakcija prekida dodatkom rastvora NH₄Cl (16 g, 0.3 mola) u vodi (120 ml). Organski i vodeni sloj se odvoje, organski sloj se upari, a zaostalo ulje se rastvori u CH₂Cl₂ (60 ml). Rastvoru se doda 2M HCl (60 ml) i dvofazna smeša se meša 30 minuta, na sobnoj temperaturi. Dobijeni talog se cedi, a zatim tretira sa 2M NaOH (40 ml). Nastala suspenzija se ekstrahuje pomoću CH₂Cl₂ (3 x 30 ml). Spojeni ekstrakti se isperu vodom i zasićenim rastvorom NaCl. Nakon sušenja i uparavanja, dobija se ulje, koje se prečisti "fleş" hromatografijom (MeOH - CH₂Cl₂, 1:1). Dobija se 0.8 g (56.3 %) proizvoda **20**, u obliku čvrstog ulja.

¹H NMR spektar (CDCl₃): 1.00 (s, 3H, H-18); 2.37 (s, 6H, (CH₃)₂N); 2.78 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH₂N); 4.13 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH₂O); 5.05 (s, 2H, CH₂Ph); 6.75-7.45 (m, 12H, Ar H).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 14.46 (C-18); 45.76 ((CH₃)₂N); 47.76 (C-15); 58.11 (CH₂N); 65.54 (CH₂O); 69.98 (CH₂Ph); 85.74 (C-17); 112.31, 113.29, 114.80, 126.24, 127.53, 127.93, 128.62 i 129.26 (Ar CH); 132.71, 135.51, 137.33, 137.85, 156.78 i 157.83 (Ar C); 168.21 (C=NOH).

M spektar (m/e): 554 (M^+ ; 2); 536 ($M^+ - H_2O$; 2); 463 ($M^+ - Bn$; 0.3); 58 ($(CH_3)_2N^+ = CH_2$; 100).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $C_{35}H_{42}N_2O_4 \times HCl$ (591.17): C, 71.10; H, 7.33; N, 4.74. Nađeno: C, 71.54; H, 7.40; N, 5.37.

4.2.6. 3-Benziloksi-17 β -hidroksi-17 α -metilestra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksim (21)

U suspenziju metil-magnezijum-jodida u etru, koja je pripremljena iz metil-jodida (4.8 ml, 77 mmola) i opiljaka magnezijuma (1.25 g, 51.3 mmola) u apsolutnom etru (80 ml), dokapava se, na sobnoj temperaturi, u toku 1.5 sata, rastvor jedinjenja **17** (2 g, 5.13 mmola) u apsolutnom tetrahidrofuranu (80 ml). Reakciona smeša se intenzivno meša još dva sata na istoj temperaturi, a potom se izlije u vodu (500 ml) i ostavi da stoji dok organski rastvarač ne otpari (što traje 2-3 dana). Na površini vode se stvara "pogača", koja se filtrira i ispere sa malo EtOAc. Nakon sušenja, sirovi proizvod se prečisti "fleš" hromatografijom (benzen - EtOAc, 1:1), pri čemu se dobija čist proizvod **21** (1.45 g, 69.7%), koji nakon prekrystalizacije iz metanola ima t.t. 179-180°C.

1H NMR spektar ($CDCl_3$): 0.91 (s, 3H, H-18); 1.42 (s, 3H, $CH_3 - C_{17}$); 2.68 (dd, 1H, $J_1 = 18.9$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, H-15a); 5.06 (s, 2H, CH_2Ph); 5.42 (široki signal, 2H, NOH i $C_{17}-OH$); 6.72 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, H-4); 6.80 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, H-2); 7.25 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1); 7.40 (m, 5H, Ar H).

^{13}C NMR spektar ($CDCl_3$): 13.72 (C-18); 22.96 ($CH_3 - C_{17}$); 46.23 (C-15); 69.84 ($CH_2 - Ph$); 81.41 (C-17); 112.21, 114.78, 126.10, 127.35, 127.77 i 128.45 (Ar CH); 132.40, 137.17 i 137.69 (Ar C); 156.73 (C-3); 169.51 (C=NOH).

M spektar (m/e): 387 ($M^+ - H_2O$, 3); 303 (2).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $C_{26}H_{31}NO_3 \times MeOH$ (437.57): C, 74.14; H, 8.01; N, 3.20. Nađeno: C, 74.38; H, 7.91; N, 3.12.

4.2.7. 3-Benziloksi-17-keto-17-[4-[(2-dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (22)

U rastvor jedinjenja **20** (0.82 g, 1.48 mmola) u apsolutnom piridinu (16 ml, 0.2 mola) doda se *p*-toluensulfonil-hlorid (2.8 g, 5.3 mmola). Reakciona smeša se ostavi preko noći na sobnoj temperaturi, a potom se izlije u ledenu 2M HCl (100 ml). Emulzija se ekstrahuje sa CH_2Cl_2 (2 x 30 ml). Spojeni ekstrakti se isperu vodom, osuše i rastvarač upari. Zaostalo ulje se prečisti "fleš" hromatografijom ($CH_2Cl_2 - MeOH$, 1:1). Dobija se čist proizvod **22** (0.66 g, 83.5%), u obliku belih amorfnih kristala.

1H NMR spektar ($CDCl_3$): 1.49 (s, 3H, H-18); 2.37 (s, 6H, $(CH_3)_2N$); 2.78 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, CH_2N); 4.13 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, CH_2O); 5.05 (s, 2H, CH_2Ph); 6.80-7.45 (m, 10H, Ar H); 7.80 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H-2" i H-6").

^{13}C NMR spektar ($CDCl_3$): 17.15 (C-18); 18.48 (C-15); 37.69 (C-12); 45.88 ($(CH_3)_2N$); 52.15 (C-13); 58.07 (CH_2N); 66.14 (CH_2O); 69.92 (CH_2Ph); 119.39 (C \equiv N); 156.99 (C-3); 161.49 (C-1"); 206.29 (C=O).

M spektar (m/e): 536 (M^+ ; 5); 58 ($(CH_3)_2N^+ = CH_2$; 100).

4.2.8. 3-Benziloksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (23)

Rastvor jedinjenja **21** (0.98 g, 2.42 mmola) i anhidrida sirćetne kiseline (12 ml, 0.13 mola) u apsolutnom piridinu (24 ml) meša se na 100°C, u toku dva sata. Reakciona smeša se zatim izlije u vodu (100 ml) i pomoću 6M HCl podesi pH na 1. Nagrađeni talog se cedi i ispere vodom. Nakon sušenja dobija se 0.83 g (88.5%) proizvoda **23**. Prekrystalizacijom iz metanola dobija se 0.76 g (81.0%) belih igličastih kristala, t.t. 128-129°C.

1H NMR spektar ($CDCl_3$): 1.33 (s, 3H, H-18); 2.23 (s, 3H, $CH_3 - C_{17}$); 2.53 (dd, 1H, $J_1 = 17.8$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, H-15a); 5.06 (s, 2H, CH_2Ph); 6.76 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, H-4); 6.82 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, H-2); 7.20 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1); 7.30-7.48 (m, 5H, Ar H).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3): 15.49 (C-18); 18.09 (C-15); 25.36 ($\text{CH}_3\text{-C}_{17}$); 52.01 (C-13); 69.91 (CH_2Ph); 119.11 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 156.99 (C-3); 213.23 (C=O).

M spektar (m/e): 387 (M^+ , 7); 91 (75).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_2$ (387.50): C, 80.58; H, 7.54; N, 3.61. Nađeno: C, 80.50; H, 7.49; N, 4.28.

4.2.9. 3-Benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (24)

U rastvor jedinjenja 22 (0.218 g, 0.4 mmola) u metanolu (2 ml) dodaje se, uz mešanje u toku 30 minuta, na sobnoj temperaturi, natrijum-bor-hidrid (0.25 g, 6.6 mmola). Reakciona smeša se meša još jedan sat na istoj temperaturi, a zatim se izlije u vodu (10 ml) i ekstrahuje sa CH_2Cl_2 (3 x 10 ml). Ekstrakti se isperu sa zasićenim rastvorom NaCl, osuše i rastvarač upari. Zaostali sirovi proizvod se prečisti "fleš" hromatografijom (CH_2Cl_2 - MeOH, 1:1). Dobija se 0.132 g (60.3%) belih amorfnih kristala jedinjenja 24.

^1H NMR spektar (CDCl_3): 0.92 (s, 3H, H-18); 2.32 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$); 2.72 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH_2N); 4.00 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH_2O); 4.55 (s, 1H, OH); 5.04 (s, 2H, CH_2Ph); 6.75-7.45 (m, 12H, Ar H).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3): 15.24 (C-15); 17.00 (C-18); 31.86 (C-12); 41.01 (C-13); 45.63 ($(\text{CH}_3)_2\text{N}$); 57.96 (CH_2N); 65.65 (CH_2O); 69.77 (CH_2Ph); 78.78 (C-17); 120.17 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 156.68 (C-3); 157.95 (C-1").

4.2.10. 3-Benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (25)

U rastvor jedinjenja 23 (0.22 g, 0.57 mmola) u metanolu (12 ml) dodaje se, u porcijama, na sobnoj temperaturi, natrijum-bor-hidrid (0.25 g, 6.61 mmol). Reakciona smeša se meša na temperaturi ključanja, u toku 1.5 sata, a nakon toga se izlije u vodu (50 ml) i ekstrahuje sa CH_2Cl_2 (3 x 20 ml). Spojeni ekstrakti se isperu vodom, osuše i rastvarač upari. Zaostala

sirova smeša proizvoda se razdvoji "fleš" hromatografijom (benzen - EtOAc, 6:1). Dobija se 0.141 g (63.8%) proizvoda 25, t.t. 113-114°C, i 0.021 g (9.2%) 3-benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amid (26), t.t. 177-179°C.

Jedinjenje 25:

^1H NMR spektar (CDCl_3): 0.97 (s, 3H, H-18); 1.26 (d, 3H, J = 6.3 Hz, $\text{CH}_3\text{-C}_{17}$); 2.46 (dd, 1H, $J_1 = 17.8$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, H-15b); 2.66 (dd, 1H, $J_1 = 17.8$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, H-15a); 3.80 (q, 1H, J = 6.3 Hz, H-17); 5.06 (s, 2H, CH_2Ph); 6.76 (d, 1H, J = 2.7 Hz, H-4); 6.82 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, H-2); 7.20 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H-1); 7.30-7.48 (m, 5H, Ar H).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3): 14.92 (C-15); 16.99 (C-18); 17.76 ($\text{CH}_3\text{-C}_{17}$); 40.50 (C-13); 69.88 (CH_2Ph); 72.41 (C-17); 120.04 ($\text{C}\equiv\text{N}$).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{NO}_2$ (389.55): C, 80.17; H, 8.02; N, 3.59. Nađeno: C, 80.19; H, 8.28; N, 3.88.

Jedinjenje 26

^1H NMR spektar (CDCl_3): 0.91 i 1.10 (2s, 3H, H-18); 1.29 i 1.40 (2d, 2H, J = 6.4 Hz, $\text{CH}_3\text{-C}_{17}$); 4.20 i 4.30 (2q, 1H, J = 6.4 Hz, H-17); 5.05 (s, 2H, CH_2Ph); 6.76 (d, 1H, J = 2.7 Hz, H-4); 6.82 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, H-2); 7.20 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H-1); 7.30-7.50 (m, 5H, Ar H).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3): 10.60 i 14.80 (C-18); 16.85 i 17.86 ($\text{CH}_3\text{-C}_{17}$); 69.92 (CH_2Ph); 85.74 i 86.24 (C-17); 170.90 i 170.97 (C=O).

M spektar (m/e): 390 ($\text{M}^+\text{-CH}_3$, 20); 297 (12); 256 ($\text{M}^+\text{-C}_7\text{H}_7\text{-CO-NH}_3$, 5).

4.2.11. 3-Benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (27)

U rastvor jedinjenja 22 (0.3 g, 0.56 mmola) u metanolu (6 ml) doda se, najpre, kobalt-hlorid heksahidrat (0.27 g, 1.12 mmola), a zatim natrijum-bor-hidrid (0.242 g, 6.37 mmola). Dobijena crna suspenzija se meša na temperaturi ključanja, u toku dva sata. U reakcionu smešu se zatim doda

voda (20 ml) i toliko 6M HCl da se dobije bistar rastvor. Rastvor se ekstrahuje etrom (3 x 10 ml), zatim se zaalkališe sa amonijakom i ekstrahuje sa CH₂Cl₂ (3 x 10 ml). Spojeni CH₂Cl₂ ekstrakti se isperu sa zasićenim rastvorom NaCl, osuše i rastvarač upari. Dobijena smeša se razdvoji "fleš" hromatografijom (CH₂Cl₂ - MeOH, 1:1), pri čemu se dobija proizvod **27** (0.10 g, 33%) i 3-benziloksi-17-aza-17a-[4-[2-(dimetilamino)-etoksi]fenil]-D-homoestra-1,3,5(10),17(17a)-tetraen (**28**), u prinosu od 0.069 g (23.6 %). Nakon prekrizalizacije iz metanola proizvod **27** ima t.t. 138°C, a proizvod **28** se topi na 157-158°C.

Jedinjenje 27

¹H NMR spektar (CDCl₃): 0.93 (s, 3H, H-18); 2.37 (s, 6H, (CH₃)₂N); 2.75 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH₂N); 3.40 (prošireni signal, 3H, OH i NH₂); 4.05 (t, 2H, CH₂O); 5.05 (s, 2H, CH₂Ph); 6.75-7.45 (m, 12H, Ar H).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 12.64 (C-18); 45.82 ((CH₃)₂N); 48.31 (C-16); 58.25 (CH₂N); 65.80 (CH₂O); 69.80 (CH₂Ph); 72.49 (C-17); 156.60 (C-3); 157.77 (C-1').

M spektar (*m/e*): 524 (M⁺-H₂O).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za C₃₅H₄₆N₂O₃ (542.74): C, 77.45; H, 8.54; N, 5.16. Nađeno: C, 77.52; H, 8.83; N, 5.22.

Jedinjenje 28

¹H NMR spektar (CDCl₃): 1.28 (s, 3H, H-18); 2.37 (s, 6H, (CH₃)₂N); 2.78 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH₂N); 4.10 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH₂O); 5.04 (s, 2H, CH₂Ph); 6.70-7.40 (m, 12H, Ar H).

¹³C NMR spektar (CDCl₃): 18.30 (C-18); 45.82 ((CH₃)₂N); 50.15 (C-16); 58.17 (CH₂N); 65.84 (CH₂O); 69.93 (CH₂Ph); 156.82 (C-3); 158.39 (C-1''); 176.94 (C=N).

4.2.12. 3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (29)

Jedinjenje **23** (0.2 g, 0.52 mmola) rastvori se u smeši metanola i metilenhlorida (1:1, 4 ml). Rastvoru se doda 10%-ni Pd/C (0.05 g) i suspenzija se meša u atmosferi vodonika, na sobnoj temperaturi, u toku 24 sata. Nakon toga se reakciona smeša cedi, talog ispere sa CH₂Cl₂ i filtrat upari. Sirova smeša se prečisti "fleš" hromatografijom (CH₂Cl₂ - MeOH, 1:1), pri čemu se dobija čist proizvod **29** (0.14 g, 89.4%), u obliku belih kristala, t.t. 265°C.

¹H NMR spektar (DMSO-d₆): 0.80 (s, 3H, H-18); 0.90 (d, 3H, J = 6.4 Hz, CH₃-C₁₇); 1.82 (s, 1H, OH); 2.37 (q, 1H, J = 6.4 Hz, H-17); 3.16 (s, 2H, NH₂); 6.42 (d, 1H, J = 2.7 Hz, H-4); 6.50 (dd, 1H, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 2.7 Hz, H-2); 7.03 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H-1).

¹³C NMR spektar (DMSO-d₆): 11.88 (C-18); 14.53 (CH₃-C₁₇); 46.12 (C-16); 61.49 (C-17); 112.79 (Ar CH); 114.65 (Ar CH); 125.89 (Ar CH); 130.53 (C-10); 137.07 (C-5); 154.97 (C-3).

M spektar (*m/e*): 285 (M⁺-H₂O, 23); 270 (M⁺-H₂O-CH₃, 37).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za C₁₉H₂₉NO₂ (303.42): C, 75.15; H, 9.63; N, 4.61. Nađeno: C, 75.56; H, 9.77; N, 4.95.

4.2.13. 3-Hidroksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (30)

U rastvor jedinjenja **22** (0.41 g, 0.76 mmola) u etanolu (30 ml) doda se 10%-ni Pd/C (0.04 g) i suspenzija se meša na sobnoj temperaturi, u atmosferi vodonika, preko noći. Nakon uklanjanja katalizatora i rastvarača dobijaju se beli amorfn kristali proizvoda **30** (0.32 g, 93.8%), koji se prečiste hromatografijom na stubu Al₂O₃ (neutralni, 10 g, eluent: prvo CH₂Cl₂, a zatim CH₂Cl₂ - MeOH, 100:1).

¹H NMR spektar (CDCl₃): 1.49 (s, 3H, H-18); 2.37 (s, 6H, (CH₃)₂N); 2.78 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH₂N); 4.13 (t, 2H, J = 6.3 Hz, CH₂O); 6.59 (d, 1H, J = 2.6

Hz, H-4); 6.65 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, H-2); 6.92 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar H); 7.13 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1); 7.77 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar H).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3): 17.21 (C-18); 18.52 (C-15); 45.86 ($(\text{CH}_3)_2\text{N}$); 58.05 (CH_2N); 66.05 (CH_2O); 113.09 (Ar CH); 114.02 (Ar CH); 115.23 (Ar CH); 119.41 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 126.49 (Ar CH); 130.43 (Ar C); 130.72 (Ar CH); 131.03 (Ar C); 137.80 (Ar C); 153.93 (C-3); 161.45 (C-1"); 206.37 (C=O).

M spektar (m/e): 446 (M^+ , 6); 58 ($(\text{CH}_3)_2\text{N}^+=\text{CH}_2$, 100).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3 \times 1/2\text{H}_2\text{O}$ (455.60): C, 73.82; H, 7.74; N, 6.15. Nađeno: C, 74.37; H, 7.49; N, 6.16.

4.2.14. 3-Hidroksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (31)

Jedinjenje **23** (0.15 g, 0.39 mmola) rastvori se u smeši metanola i metilenhlorida (1:1, 4 ml). Rastvoru se doda 10%-ni Pd/C (0.015 g) i suspenzija se meša u atmosferi vodonika, na sobnoj temperaturi, preko noći. Reakciona smeša se zatim cedi, talog ispere sa CH_2Cl_2 i metilenhloridni rastvor upari do suva. Sirova smeša proizvoda se prečisti "fleš" hromatografijom (benzen - EtOAc, 6:1), pri čemu se dobija 0.97 g (83.2%) proizvoda **31**, u obliku belih kristala, koji se nakon prekrystalizacije iz EtOAc tope na 186-187°C.

^1H NMR spektar (CDCl_3): 1.33 (s, 3H, H-18); 2.23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}_{17}$); 6.59 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, H-4); 6.67 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, H-2); 7.13 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3): 15.51 (C-18); 18.10 (C-15); 25.40 ($\text{CH}_3\text{-C}_{17}$); 113.07 (Ar CH); 115.10 (Ar CH); 119.13 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 126.45 (Ar CH); 130.88 (C-10); 137.65 (C-5); 153.87 (C-3); 213.60 (C=O).

M spektar (m/e): 299 (M^+ , 9); 284 ($\text{M}^+\text{-CH}_3$, 5); 270 (5); 256 (4).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ (297.38): C, 76.73; H, 7.79; N, 4.71. Nađeno: C, 77.38; H, 7.35; N, 5.19.

4.2.15. 3,17-Dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (32)

Iz jedinjenja **24** (0.089 g, 0.16 mmola), u prisustvu 10%-nog Pd/C (0.01 g), pri reakcionim uslovima opisanim u postupku 4.2.13., dobija se sirovi proizvod **32**. Nakon prečišćavanja "fleš" hromatografijom (CH_2Cl_2 - MeOH, 1:1) dobija se čist proizvod **32** (0.059 g, 80.0%), u obliku bezbojnog čvrstog ulja.

^1H NMR spektar (CDCl_3): 0.89 (s, 3H, H-18); 2.35 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$); 4.05 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, CH_2O); 4.55 (s, 1H, OH); 6.52 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, H-4); 6.61 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, H-2); 6.80 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ar H); 7.06 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1); 7.21 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ar H).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3): 15.32 (C-15); 17.10 (C-18); 45.58 ($(\text{CH}_3)_2\text{N}$); 57.96 (CH_2N); 65.47 (CH_2O); 78.98 (C-17); 120.21 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 154.42 (C-3); 157.98 (C-1").

M spektar (m/e): 285 ($\text{M}^+\text{-C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}$, 7); 256 ($\text{M}^+\text{-C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$, 3).

4.2.16. 3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (33)

Iz jedinjenja **25** (0.14 g, 0.36 mmola), u prisustvu 10%-nog Pd/C (0.014 g), pri reakcionim uslovima opisanim u postupku 4.2.14., dobija se sirova reakciona smeša (0.113 g), u obliku bezbojnog ulja. Tretiranjem smeše pomoću benzen - EtOAc, 4:1, izdvaja se talog, koji predstavlja čisto jedinjenje **29** (0.04 g, 36.7%), dok se u rastvoru nalazi proizvod **33**. Prečišćavanjem sirovog jedinjenja **33** "fleš" hromatografijom (benzen - EtOAc, 4:1), dobija se 0.067 g (62.4%) belih kristala, t.t. 183°C.

^1H NMR spektar (acetone- d_6): 0.92 (s, 3H, H-18); 1.16 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C}_{17}$); 2.58 (dd, 1H, $J_1 = 17.8$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz, H-15a); 2.75 (dd, 1H, $J_1 = 17.8$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, H-15b); 3.73 (dq, 1H, $J = 6.2$ Hz, H-17); 3.88 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz, $\text{C}_{17}\text{-OH}$); 6.55 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, H-4); 6.61 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, H-2); 7.11 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1); 8.13 (s, 1H, $\text{C}_3\text{-OH}$).

^{13}C NMR spektar (acetone- d_6): 15.25 (C-15); 17.35 (C-18); 17.87 (CH_3 -C $_{17}$); 72.28 (C-17); 113.75 (Ar CH); 115.58 (Ar CH); 121.00 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 127.14 (Ar CH); 131.55 (C-10); 138.10 (C-5); 156.00 (C-3).

M spektar (m/e): 299 (M^+ , 9); 284 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 5); 214 (20).

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_2 \times 1/2\text{H}_2\text{O}$ (308.43): C, 73.99; H, 8.50; N, 4.54; Nađeno: C, 73.59; H, 8.70; N, 5.05.

4.2.17. 3,17-Dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (34)

Uklanjanje benzilne grupe u položaju C-3 jedinjenja **27** vrši se prema postupku 4.2.13. Iz 0.065 g (0.12 mmola) jedinjenja **27** dobija se proizvod **34**, koji se prečisti hromatografijom na stubu silikagela (5 g, prvo CH_2Cl_2 , zatim CH_2Cl_2 - MeOH, 1:1). Dobija se 0.05g (92.6%) proizvoda **34**, u obliku belih kristala, t.t. 199-201°C.

^1H NMR spektar (CDCl_3): 0.89 (s, 3H, H-18); 2.37 (s, 6H, (CH_3) $_2\text{N}$); 3.35 (prošireni signal, 3H, NH_2 i C $_{17}$ -OH); 4.05 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, CH_2O); 6.55 (m, 2H, H-2 i H-4); 6.80 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ar H); 7.06 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-1); 7.20 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ar H); 7.40 (s, 1H, C $_3$ -OH).

^{13}C NMR spektar (CDCl_3): 12.54 (C-18); 45.65 ((CH_3) $_2\text{N}$); 47.69 (C-16); 58.08 (CH_2N); 65.55 (CH_2O); 71.99 (C-17); 154.38 (C-3); 157.85 (C-1").

Elementarna mikroanaliza: Izračunato za $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ (470.66): C, 71.45; H, 9.00; N, 5.95; Nađeno: C, 71.28; H, 9.12; N, 6.28.

5. ZAKLJUČAK

U radu su opisane sinteze novih B- i D-estranskih derivata, koje su bile izvedene u cilju dobijanja jedinjenja sa izmenjenim biološkim delovanjem u odnosu na izvornu hormonsku aktivnost polaznog estradiola, odnosno estrona. Rad obuhvata dve nezavisne celine.

Kao polazno jedinjenje u prvom delu rada poslužio je 6-keto-9 α -hidroksi derivat estradiol dipropionata (**2**), koji je dobijen u ranijem radu oksidacijom estradiol dipropionata (**1**) pomoću hrom-trioksid - 3,5-dimetilpirazolovog kompleksa, u prinosu od 21%. Variranjem reakcionih uslova oksidacije (temperature, vremena reakcije i molskog odnosa supstrat - oksidacioni agens) taj prinos je poboljšan na 45%. Takođe, rendgenostrukturalnom analizom je utvrđeno da je hidroksilna grupa na C-9 α -orijentisana, čime je nepobitno dokazana stereochemija na tom atomu. Kako je 6-keto-9 α -hidroksi derivat **2** pokazao znatno manje estrogeno delovanje u odnosu na 6-keto derivat **3**, to su dalje izvedene hemijske transformacije jedinjenja **2** radi dobijanja molekula sa različitim funkcionalnim grupama na C-6 i C-9, a u cilju ispitivanja njihovog uticaja na biološku aktivnost. U tom smislu, prvo je redukcijom karbonilne grupe jedinjenja **2** pomoću natrijum-bor-hidrida u metanolu, uz istovremenu saponifikaciju estarske funkcije na C-3, dobijen 3,6 β ,9 α -trihidroksi-17 β -propionoksiestra-1,3,5(10)-trien (**4**), u prinosu od 83.4%. Konfiguracija novonastalog hiralnog centra C-6 utvrđena je diferencijalnom NOE^1H NMR spektroskopijom.

Dehidratacijom jedinjenja **2** pomoću fosfor-pentoksida u benzenu, na sobnoj temperaturi, ili zagrevanjem sa anhidridom sirćetne kiseline na

temperaturi ključanja nastao je 3,17 β -dipropionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-6-on (**5**), u prinosu od 87.4%, odnosno 63.0%. Redukcijom karbonilne grupe jedinjenja **5** sa natrijum-bor-hidridom u metanolu dobijen je 3,6 β -dihidroksi-17 β -propionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen (**6**), u prinosu od 90.7%.

U reakciji jedinjenja **2** sa tionil-hloridom u piridinu dobijena su tri proizvoda: jedinjenje **5** (34.6%), 3,17 β -dipropionoksi-6-hidroksiestra-1,3,5(10),6,8-pentaen (**7**, 34.4%) i 3,17 β -dipropionoksi-9 ξ -hloroestra-1,3,5(10)-trien-6-on (**8**, 25.5%).

Različita reaktivnost jedinjenja **2** prema anhidridu sirćetne kiseline i tionil-hloridu objašnjena je time da u prvom slučaju dolazi do *cis* eliminacije intermedijerno nagrađenog C₉-acetata **2a** preko šestočlanog prelaznog stanja, što rezultira u građenju isključivo $\Delta^{9(11)}$ -olefina **5**. U drugom slučaju, hlorosulfit **2b**, koji nastaje u prvoj fazi, daje karbonijum jon **2c**, iz koga eliminacijom aksijalnog vodonikovog atoma sa C-11 nastaje proizvod **5**, a eliminacijom vodonikovog atoma sa C-8 gradi se intermedijerni Δ^8 -derivat **7a**, koji bazno katalizovanom enolizacijom karbonilne grupe na C-6 daje proizvod **7**. Hlorni derivat **8** nastaje adicijom hloridnog anjona na **2c**.

Dobijeni 6-hidroksiekvileninski derivat **7** podvrgnut je reakciji alkilovanja sa N-*n*-butil-N-metil-11-bromoundekankarboksamidom (**11**) u cilju dobijanja odgovarajućeg 6-alkoksiamidnog derivata i proučavanja njegove biološke aktivnosti, kao i komparacije sa podacima bioloških testova analognog derivata C₇-hidroksiekvilenina. Jedinjenje **11** je dobijeno iz 11-bromoundekanske kiseline (**9**), koja je prvo prevedena u hlorid **10**, a ovaj je dejstvom ekvimolarne količine N-*n*-butil-N-metilamina u piridinu dao amid **11**, za koji je na osnovu analize NMR spektara utvrđeno da se javlja u obliku dva torziona diastereoizomera. Pokušaj alkilovanja jedinjenja **7** sa molekulom **11** prema klasičnoj metodi, u prisustvu srebro-oksida, nije doveo do očekivane nukleofilne supstitucije, već do građenja dienona **12**, koji je nastao kao posledica reakcije oksido-redukcije. Pri istim reakcionim uslovima, bez prisustva

alkil-bromida **11** takođe je dobijen 3,17 β -dipropionoksiestra-1,3,5(10),7,9(11)-pentaen-6-on (**12**), u prinosu od 68%.

U cilju iznalaženja najpogodnijeg načina za alkilovanje C₆-OH grupe jedinjenja **7** sa derivatom undekanske kiseline **11**, razrađena je model sinteza 3-O-(10'-karbo-N-*n*-butil-N-metilamino)decil-17 β -acetoksiestra-1,3,5(10)-triena (**14**). U tu svrhu, kao polazno jedinjenje poslužio je 3-hidroksi-17 β -acetoksiestra-1,3,5(10)-trien (**13**), koji je dobijen selektivnim acetilovanjem 17 β -hidroksilne grupe estradiola prema poznatom postupku, u prinosu od 96.2%. Reakcija alkilovanja jedinjenja **13** sa alkil-bromidom **11** uspešno je izvedena primenom metode međufazne katalize, u sistemu metilen-hlorid - voda, sa tetrabutilamonijum-bromidom kao katalizatorom za fazni prenos. Na ovaj način je dobijen proizvod **14**, u prinosu od 53.4%.

Primenom opisanih reakcionih uslova u reakciji jedinjenja **7** i **11** dobijen je 3,17 β -dipropionoksi-6-O-[(10'-karbo-N-*n*-butil-N-metilamino)decil]-estra-1,3,5(10),6,8-pentaen (**15**), u prinosu od 23.2%. Može se generalno zaključiti da bi se, polazeći od jedinjenja **7**, primenom opisanog postupka alkilovanja, mogli dobiti i drugi derivati ekvilenina, sa npr. amino ili karboksilnom grupom u dugačkom bočnom nizu ("linkeru"), koji bi mogli da posluže kao potencijalni hapteni.

Jedinjenja **2**, **3**, **4**, **6**, **7**, **15**, kao i ekvilenin dipropionat (**EQ**) podvrgnuta su ispitivanju estrogene aktivnosti primenom uterotrofne metode. Iz dobijenih rezultata zaključeno je da uvođenje karbonilne grupe u položaj C-6 estradiola (jedinjenje **3**) ne menja bitno aktivnost u odnosu na sam estradiol. 9 α -Hidroksilna grupa (jedinjenje **2**) znatno smanjuje estrogenu delovanje, koje se gotovo potpuno gubi nakon redukcije karbonilne grupe i nastajanja 3,6 β ,9 α -trihidroksi derivata **4**. 6-Hidroksiekvilenin dipropionat (**7**) ima gotovo identičnu estrogenu aktivnost kao ekvilenin dipropionat. Najzad, uvođenje dugačkog alkoksiamidnog niza u položaj C-6 (jedinjenje **15**) dovodi do potpunog gubitka estrogenog delovanja kod manjih doza.

Antiuterotrofnom testu su podvrgnuta jedinjenja **2**, **4** i **15**. Izuzev jedinjenja **4**, koje u kombinaciji sa estradiol benzoatom redukuje njegovo delovanje za trećinu, druga dva jedinjenja su slabi (jedinjenje **2**) ili nikakvi (jedinjenje **15**) estrogeni antagonisti.

U okviru drugog dela rada, u kojem su sintetizovani novi D-sekoestranski derivati, kao polazno jedinjenje upotrebljen je estron (**II**), koji je u dve sintetske faze preveden u 3-benziloksiestra-1,3,5(10)-trien-16,17-dion-17-oksimum (**17**), prema poznatom postupku. Za nukleofilnu adiciju na keto grupu jedinjenja **17** odabrani su 1-bromo-4-[(2-dimetilamino)etoksi]benzen i metil-jodid, koji su prevedeni u odgovarajuće Grignard-ove reagense. 1-Bromo-4-[(2-dimetilamino)etoksi]benzen (**19**) sintetizovan je iz fenola, u tri faze. Naime, najpre je izvedeno bromovanje fenola u 1,2-dihloroetanu, a zatim je u nagrađeni dihloroetanski rastvor 4-bromofenola dodat vodeni rastvor trimetilbenzil-amonijum-hlorida i natrijum-hidroksida, pri čemu je nastao 1-bromo-4-(2-hloroetoksi)benzen (**18**), u prinosu od 79.8%. U trećoj fazi je nukleofilnom supstitucijom hlora u jedinjenju **18** dimetilamino grupom dobijen proizvod **19**, u prinosu od 73.7%. Regioselektivnom adicijom 4-[(2-dimetilamino)etoksi]fenil-magnezijum-bromida i metil-magnezijum-jodida na C₁₇-keto grupu jedinjenja **17** dobijeni su 3-benziloksi-17β-hidroksi-17α-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]estra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksimum (**20**, 56.3%), odnosno 3-benziloksi-17β-hidroksi-17α-metilestra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksimum (**21**, 67.7%).

Beckmann-ova fragmentacija jedinjenja **20** izvedena je pomoću *p*-toluensulfonil-hlorida u piridinu. Dobijen je 3-benziloksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**22**), u prinosu od 83.5%. Za odgovarajuću fragmentaciju C₁₇-metil derivata **21** upotrebljen je anhidrid sirćetne kiseline u piridinu. Dobijen je 3-benziloksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**23**), u prinosu od 81.0%.

U cilju proučavanja uticaja funkcionalnih grupa u položajima C-16 i C-17 na biološke odgovore molekula, najpre je u sintetizovanim D-seko derivatima redukovana karbonilna grupa do hidrosilne, a zatim i

nitrilna grupa do amino funkcije. Za selektivnu redukciju C₁₇=O, u prisustvu C₁₆=N, u jedinjenjima **22** i **23**, upotrebljen je natrijum-borhidrid u metanolu. Dobijeni su odgovarajući seko-cijano-alkoholi: 3-benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[(2-dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**24**, 60.3%) i 3-benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**25**, 63.8%). Keton **23** je pored alkohola **25** dao i 3-benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amid (**26**), u prinosu od 9.2%. U reakciji jedinjenja **22** sa natrijum-borhidridom u prisustvu kobalt-hlorida heksahidrata dolazi do redukcije i karbonilne i nitrilne grupe, uz nastajanje 3-benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amina (**27**), u prinosu od 33%. Pored ovog proizvoda izolovan je još jedan, za koga je, na osnovu analize NMR spektara, pretpostavljeno da predstavlja 3-benziloksi-17-aza-17a-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-D-homo-estra-1,3,5(10),17(17a)-tetraen (**28**, prinos 23.6%).

Odgovarajući D-seko-17-hidroksi-16-amin sa metil grupom na C-17, 3,17-dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (**29**) dobijen je katalitičkom hidrogenacijom jedinjenja **23**, u prisustvu 10%-nog Pd/C (**23** : 10% Pd/C = 4 : 1), u prinosu od 89.4%.

Uklanjanje benzil-etarske zaštite u položaju C-3 kod jedinjenja **22-25** i **27** izvedeno je reakcijom hidrogenolize (10%-ni Pd/C), a količina katalizatora iznosila je 10% u odnosu na masu polaznog jedinjenja. Dobijeni su 3-hidroksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**30**, 93.8%), 3-hidroksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**31**, 83.2%), 3,17-dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**32**, 80.0%), 3,17-dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril (**33**, 62.4%) i 3,17-dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin (**34**, 92.6%).

Ispitana je uterotrofna aktivnost jedinjenja **29**, **31**, **32** i **34**. Jedinjenja **29**, **31** i **34** pokazuju potpuno odsustvo estrogenog delovanja. S druge strane, jedinjenja **29** i **31** imaju značajno antiestrogeno delovanje (39.8%

antagonizma za jedinjenje **29**, odnosno 37.6% za jedinjenje **31**). Ovi rezultati otvaraju mogućnosti za sintezu novih D-sekoestranskih derivata koji bi imali još veću antiestrogenu aktivnost.

6. SUMMARY

Pathways of synthesis of new B- and D-estrane derivatives were developed in order to get compounds with altered biological functions compared to hormone activity of the starting estradiol, i.e. estrone. The results can be divided in two independent parts. In the first part the starting compound was 6-oxo-9 α -hydroxy derivative of estradiol dipropionate, which was obtained earlier, by oxidation of estradiol dipropionate (**1**) with a complex of chromium trioxide and 3,5-dimethylpyrazole. The yield of the reaction was 21%. The change in conditions of oxidation (temperature, duration of reaction, the molar ratio of substrate - oxidation agent) increased the reaction yield to 45%. α -Orientation of hydroxyl group at C-9 was determined by x-ray analysis, which proved the stereochemistry at this atom. As 6-oxo-9 α -hydroxy derivative **2** showed much lower estrogenic activity compared to 6-oxo-derivative **3**, further chemical transformations of compound **2** were performed to get the molecules with different functional groups at C-6 and C-9 and to determine their biological activity. Firstly, carbonyl group of **2** was reduced by sodium borohydride in methanol, with simultaneous saponification of ester function at C-3, whereby 3,6 β ,9 α -trihydroxy-17 β -propionoxyestra-1,3,5(10)-triene (**4**) was obtained in a yield of 83.4 %. The configuration of obtained chiral centre at C-6 was determined by differential NOE ^1H NMR spectroscopy.

By dehydration of the compound **2** with phosphorus pentoxide in benzene at room temperature, or by heating with acetic anhydride, 3,17 β -dipropionoxyestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-6-one (**5**) was obtained in a yield of 87.4% and 63% respectively. By reduction of the carbonyl group of

compound **5** with sodium borohydride in methanol, 3,6 β -dihydroxy-17 β -propionoxyestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen (**6**) was obtained in a yield of 90.7%. Three products were obtained in reaction of **2** with thionyl chloride: compound **5** (34.6%), 3,17 β -dipropionoxy-6-hydroxyestra-1,3,5(10),6,8-pentaen (**7**, 34.4%) and 3,17 β -dipropionoxy-9 ξ -chloroestra-1,3,5(10)-trien-6-one (**8**, 25.5%).

Different reactivity of the compound **2** towards acetic anhydride and thionyl chloride is explained in the first case by the *cis* elimination of intermediary C₉-acetate **2a** *via* six-membered transition state and resulting $\Delta^{9(11)}$ -olefine **5**. In the second case, chlorosulfite **2b** which originates in the first phase, gives carbonic ion and after elimination of axial hydrogen atom at C-11 compound **5** is produced. On the other hand, elimination of hydrogen atom at C-8 afforded intermediary Δ^8 -derivative **7a**, which after base catalysed enolization of carbonyl group at C-6 gives **7**. Chloro derivative **8** was a result of the addition of chloride anion at **2c**.

The obtained 6-hydroxyequilenin **7** was alkylated with N-*n*-butyl-N-methyl-11-bromoundecancarboxamide (**11**) in order to get the corresponding C₆-alcoxyamide derivative and to investigate its biological activity, as well as to compare these results with those obtained in biological tests of the analogous C₇-hydroxyequilenin derivative. Compound **11** was obtained from 11-bromoundecanoic acid (**9**), *via* the intermediate acyl chloride **10**, which was transformed to amide **11** with equimolar amount of N-*n*-butyl-N-methylamine in pyridine. NMR spectra indicate that **11** appears in two torsion diastereoisomers. The attempt of alkylation of **7** with **11**, according to the classical method in the presence of silver oxide as a catalyst, did not lead to nucleophilic substitution, but as a consequence of oxido-reduction dienone **12** was synthesized. At the same reaction conditions, but without alkyl bromide **11**, the same 3,17 β -dipropionoxyestra-1,3,5(10),7,9(11)-pentaen-6-one (**12**) was obtained, in a yield of 68.0%.

In order to find the best way for alkylation of C₆-OH group of the compound **7**, the model synthesis of the 3-O-(10'-carbo-N-*n*-butyl-N-methylamino)decyl-17 β -acetoxyestra-1,3,5(10)-triene (**14**) was developed.

3-Hydroxy-17 β -acetoxyestra-1,3,5(10)-triene (**13**), obtained by selective acetylation of 17 β -hydroxy group of estradiol according to the known procedure, in a yield of 96.2%, was a starting compound. The alkylation of the compound **13** with alkyl bromide **11** was successfully conducted by the method of phase-transfer catalysis, in the system methylen chloride - water, with tetrabutylammonium bromide as a catalyst for the phase transfer. Applying the developed procedure, finally compound **14** was obtained in a yield of 53.4%.

By the application of described reaction conditions in the reaction of compounds **7** and **11**, 3,17 β -dipropionoxy-6-O-[(10'-carbo-N-*n*-butyl-N-methylamino)decyl]estra-1,3,5(10),6,8-pentaen (**15**) was obtained in a yield of 23.2%. It can be concluded that, starting from the compound **7** and with the application of described procedure of alkylation, other derivatives of equilenine can be obtained, with amino or carboxylic group in the long side chain (linkers), which could be used as potential haptens.

The compounds **2**, **3**, **4**, **6**, **7**, **15**, as well as equilenin dipropionate (**EQ**) were investigated for their estrogenic activity using the uterotrophic method. Obtained results indicate that introduction of carbonyl group at the C-6 of estradiol does not change its activity significantly. 9 α -Hydroxy group (compound **2**) significantly decreases estrogenic activity, which is completely lost after reduction of the carbonyl group and the production of **4**. Compound **7** has almost the same estrogenic activity as the equilenin dipropionate. Finally, the introduction of the long alcoxyamide chain at the C-6 (compound **15**) leads to the complete loss of the estrogenic function at lower doses.

Compounds **2**, **4** and **15** were investigated in the antiuterotrophic test. Compound **4** when applied with estradiol benzoate reduced its activity by 30%. However, compound **2** was found to be a weak estrogen antagonist, while compound **15** showed no estrogen antagonism.

The other part of our investigations concerned the synthesis of new D-secoestrane derivatives. The starting compound was estrone, which was transformed in two synthetic steps to 3-benzyloxyestra-1,3,5(10)-trien-

16,17-dione 17-oxime (**17**), according to the known procedure. 1-Bromo-4-[(2-dimethylamino)etoxy]benzene (**19**) and methyl iodide were converted to corresponding Grignard reagents and used for nucleophilic addition to keto group of compound **17**. Compound **19** was synthesized from phenol in three phases. Namely, bromination of phenol in 1,2-dichloroethane, followed by action of trimethylbenzylammonium chloride and sodium hydroxide upon the formed 4-bromophenol afforded 1-bromo-4-(2-chloroetoxy)benzene (**18**) (yield 79.8%). In the third phase, **19** was obtained by nucleophilic substitution of chlorine in the compound **18** with the dimethylamino group (yield 73.7%). By regioselective addition of 4-[(2-dimethylamino)etoxy]phenylmagnesium bromide and methylmagnesium iodide to C₁₇-keto group of compound **17**, 3-benzyloxy-17β-hydroxy-17α-[4-[2-(dimethylamino)etoxy]phenyl]estra-1,3,5(10)-trien-16-one oxime (**20**) and 3-benzyloxy-17β-hydroxy-17α-methylestra-1,3,5(10)-trien-16-one oxime (**21**) were obtained in a yield of 56.3% and 67.7% respectively.

Beckmann fragmentation of compound **20** was performed by action of the *p*-toluenesulfonyl chloride in pyridine. 3-Benzyloxy-17-keto-17-[4-[2-(dimethylamino)etoxy]phenyl]-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile (**22**) was obtained in a yield of 83.5%. For corresponding fragmentation of C₁₇-methyl derivative **21** acetic anhydride in pyridine was used. 3-Benzyl-oxy-17-keto-17-methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile (**23**) was obtained in a yield of 81.0%.

In order to investigate the influence of functional groups at positions C-16 and C-17 on biological responses, in the synthesized D-seko derivatives carbonyl group was first reduced to hydroxyl, and after that the nitril group was reduced to amino function. For selective reduction of C₁₇=O in the presence of C₁₆=N in compounds **22** and **23** sodium borohydride in methanol was used. Corresponding seko-cyano-alcohols were obtained: 3-benzyloxy-17-hydroxy-17-[4-[2-(dimethylamino)etoxy]-phenyl]-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile (**24**, 60.3%) and 3-benzyloxy-17-hydroxy-17-methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile (**25**, 63.8%). Beside alcohol **25** ketone **23** gave 3-benzyloxy-17-hydroxy-17-methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-amide (**26**) in a yield of 9.2%. Reaction

of compound **22** with sodium borohydride in the presence of cobalt chloride heksahydrate led to the reduction of both carbonyl and nitril group and to the formation of 3-benzyloxy-17-hydroxy-17-[4-[2-(dimethylamino)etoxy]phenyl]-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-amine (**27**), in a yield of 33%. Beside this, another product was isolated that, based on the NMR spectra, is supposed to be 3-benzyloxy-17-aza-17a-[4-[2-(dimethylamino)etoxy]phenyl]-D-homoestra-1,3,5(10),17(17a)-tetraen (**28**). Compound **28** was obtained in a yield of 23.6%.

Corresponding D-seko-17-hydroxy-16-amine with methyl group at C-17, 3,17-dihydroxy-17-methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-amine (**29**), was obtained by catalytic hydrogenation of compound **23** in the presence of 10% Pd/C (**23** : 10% Pd/C = 4 : 1), in a yield of 89.4%. The elimination of benzyl-ether protection at position C-3 in compounds **22-25** and **27** was performed by reaction of hydrogenolysis (10% Pd/C), using 10% of catalyst in respect to the mass of the corresponding starting compound. The compounds obtained were: 3-hydroxy-17-keto-17-[4-[2-(dimethylamino)etoxy]phenyl]-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile (**30**, 93.8%), 3-hydroxy-17-keto-17-methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile (**31**, 83.2%), 3,17-dihydroxy-17-[4-[2-(dimethylamino)etoxy]phenyl]-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile (**32**, 80.0%), 3,17-dihydroxy-17-methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile (**33**, 62.4%) and 3,17-dihydroxy-17-[4-[2-(dimethylamino)etoxy]phenyl]-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-amine (**34**, 92.6%).

Uterotrophic activities of compounds **29**, **31**, **32** and **34** were investigated. Compounds **29**, **31** and **34** showed a complete loss of estrogenic activity. On the other hand, compounds **29** and **31** have significant antiestrogenic effect (39.8% of antagonism for the compound **29**, and 37.6% for the compound **31**). These results indicate possibilities for synthesis of other new D-secoestrane derivatives which could have even higher antiestrogenic activity.

7. LITERATURA

1. H. Mouridsen, T. Palshof, J. Patterson, L. Battersby, *Cancer Treat. Rev.*, **5**, 131, 1978; R. B. Dickson, M. E. Lippman, *Endocr. Rev.*, **8**, 29, 1987; K. B. Horwitz, W. L. McGuire, *J. Biol. Chem.*, **253**, 8185, 1987.
2. L. J. Lerner, V. C. Jordan, *Cancer Res.*, **50**, 4177, 1990.
3. B. Fisher, C. Redmond, A. Brown, E. R. Fisher, N. Wolmark, D. Bowman, D. Plotkin, J. Wolter, R. Barnstein, S. Legault-Poisson, E. A. Soffer, *J. Clin. Oncol.*, **4**, 459, 1986.
4. V. C. Jordan, *Br. J. Pharmac.*, **110**, 507, 1993.
5. V. C. Jordan, "Long-term Tamoxifen Treatment for Breast Cancer". The University of Wisconsin Press, Madison, **1994**.
6. J. Bowler, T. J. Lilley, J. D. Pittam, A. E. Wakeling, *Steroids*, **54**, 71, 1989.
7. A. E. Wakeling, M. Dukes, J. Bowler, *Cancer Res.*, **51**, 3867, 1991.
8. L. Nédelec, M. M. Bouton, F. Nique, G. Teutsch, P. Van De Velde, D. Philibert, *9th Int. Symp. J. Steroid Biochem.*, Apst. br. 34P, **1989**.
9. V. Pejanović, "Sinteza novih estranskih derivata i proučavanje njihove biološke aktivnosti", Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1991.
10. Lj. Medić-Mijačević, "Sinteza i osobine 16,17-disupstituisanih steroidnih derivata", Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1992.
11. B. S. Katzenellenbogen, *Biology of Reproduction*, **54**, 287, 1996.

12. A. Girard, G. Sandulesco, A. Fridenson, J. J. Rutgers, *Compt.rend.*, **194**, 909, 1932; **195**, 981, 1932; A. Girard, G. Sandulesco, A. Fridenson, C. Guaderfroy, J. J. Rutgers, *ibid.*, **194**, 1021, 1932; G. Sandulesco, W. W. Tchung, A. Girard, *ibid.*, **196**, 137, 1933; A. Girard, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **15**, 562, 1933.
13. L. F. Fieser, M. Fieser, *Steroids*, Reinhold, New York, **1959**, 460.
14. W. E. Bachmann, W. Cole, A. L. Wilds, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 974, 1939; **62**, 824, 1940.
15. A. Butenandh, G. Schramm, *Ber.*, **68**, 2083, 1935.
16. W. S. Johnson, J. W. Petersen, C. D. Gutsche, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 2274, 1945; **69**, 2942, 1947.
17. G. H. Douglas, J. M. H. Graves, D. Hartley, G. A. Hughes, B. J. McLoughlin, J. Siddall H. Smith, *J. Chem. Soc.*, 5072, **1963**.
18. T. R. Kasturi, J. A. Sattigeri, *Tetrahedron*, **48**, 6439, 1992.
19. T. R. Kasturi, B. Rajashekhar, G. J. Raju, G. M. Reddy, R. Sivaramakrishnan, N. Ramasubbu, K. Venkatesan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2375, **1984**.
20. N. Cohen, B. L. Banner, J. F. Blount, M. Tsai, G. Saucy, *J. Org. Chem.*, **38**, 3229, 1973.
21. N. Cohen, B. L. Banner, W. F. Eichel, D. R. Parrish, G. Saucy, *J. Org. Chem.*, **40**, 681, 1975.
22. R. A. Micheli, Z. G. Hajos, N. Cohen, D. R. Parrish, L. A. Portland, W. Sciammanna, M. Scott, P. A. Wehrli, *J. Org. Chem.*, **40**, 675, 1975; Z. G. Hajos, D. R. Parrish, *ibid.*, **38**, 3244, 1973.
23. J. W. Scott, P. Buchschacher, L. Labler, W. Meier, A. Fürst, *Helv. Chim. Acta*, **57**, 1217, 1974.
24. A. R. Daniewski, T. Kowalczyk-Przewloka, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 2411, 1982.
25. A. R. Daniewski, J. Kiegiel, *J. Org. Chem.*, **53**, 5535, 1988.
26. U. Eder, G. Sauer, R. Wiechert, *Angew. Chem.*, **83**, 492, 1971.

27. Z. G. Hajos, D. R. Parrish, *J. Org. Chem.*, **39**, 1615, 1974.
28. C. Malet, A. Planas, C. Brosa, J. F. Piniella, J. Rius, *Helv. Chim. Acta*, **74**, 1412, 1991.
29. S. N. Ananchenko, I. V. Torgov, *Tetrahedron Lett.*, 1553, **1963**; T. A. Serebryakova, A. V. Zakharychev, M. A. Nekrasova, S. N. Ananchenko, I. V. Torgov, *London Patent Office*, 1308121, **1971**.
30. C. Brosa, J. C. Ferrer, C. Malet, J. M. Amézaga, *J. Org. Chem.*, **54**, 3984, 1989.
31. S. Takano, K. Inomata, K. Ogasawara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1544, **1990**.
32. M. Harnik, Y. Lederman, H. Frumkis, N. Danieli, *Tetrahedron*, **23**, 3183, 1967.
33. G. Eglinton, J. C. Nevenzel, A. I. Scott, M. S. Newman, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2331, 1956.
34. M. Harnik, R. Szpigielman, Y. Lederman, J. Herling, E. Abramovici, *Tetrahedron*, **32**, 79, 1976.
35. J. H. Dygos, L. J. Chinn, *J. Org. Chem.*, **38**, 4319, 1973.
36. D. K. Banerjee, N. Mahishi, D. Devaprabhakara, *Tetrahedron Lett.*, **4**, 479, 1968.
37. P. T. Lansbury, *Accts. Chem. Res.*, **5**, 311, 1972; W. S. Johnson, R. S. Brinkmeyer, V. M. Kapoor, T. M. Yarnell, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8341, 1977.
38. C. M. Lentz, G. H. Posner, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 3769, 1978.
39. G. H. Posner, M. J. Chapdelaine, C. M. Lentz, *J. Org. Chem.*, **21**, 3661, 1979.
40. D. A. Bleasdale, D. W. Jones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1683, **1991**.
41. D. A. Bleasdale, D. W. Jones, G. Maier, H. P. Reisenauer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1095, **1983**.
42. R. Mallik, A. Chatterjee, *Indian J. Chem.*, **32B**, 811, 1993.

43. R. A. Barnes, W. M. Bush, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4714, 1958.
44. D. K. Banerjee, S. Chatterjee, C. N. Pillai, M. V. Bhatt, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3769, 1956.
45. M. Sato, K. Kawakami, T. Suzuki, H. Morisawa, S. Nishimura, C. Kaneko, *Steroids*, **53**, 739, 1989.
46. M. Sato, T. Suzuki, H. Morisawa, S. Fujita, N. Inukai, C. Kaneko, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3647, 1987.
47. H. Künzer, M. Thiel, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 2329, 1994.
48. R. Prousa, B. Schönecker, D. Tresselt, K. Ponsold, *J. Prakt. Chem.*, **328**, 55, 1986.
49. H. Kosmol, K. Kieslich, R. Vössing, H.-J. Koch, K. Petzoldt, H. Gibian, *Liebigs Ann. Chem.*, **701**, 198, 1967; C. Rufer, E. Schröder, H. Gibian, *Liebigs Ann. Chem.*, **701**, 206, 1967; C. H. Kuo, D. Taub, N. L. Wendler, *J. Org. Chem.*, **33**, 3126, 1968.
50. J. R. Parikh, von E. W. Doering, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5505, 1967.
51. A. Corbellini, G. Gerali, G. Ferrara, G. Lugaro, *Farmaco (Pavia) Ed. Sci.*, **19**, 913, 1964.
52. O. N. Minailova, V. M. Ržeznikov, K. K. Pivnickii, *Zhur. Obschi Khim.*, **49**, 2633, 1979.
53. E. Caspi, T. Arunachalam, P. A. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 1847, 1986.
54. F. J. Zeelen, *Medicinal Chemistry of Steroids*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, **1990**, 202.
55. M. Beato, *Cell*, **56**, 335, 1989.
56. K. Yamamoto, *Annu. Rev. Genet.*, **19**, 209, 1986.
57. B. W. O'Malley, S. Y. Tsai, M. K. Bagchi, N. L. Weigel, W. T. Schrader, M.-J. Tsai, *Recent Prog. Horm. Res.*, **47**, 1, 1991.
58. B. W. O'Malley, *Steroids*, **60**, 490, 1995.

59. E. F. Bolander, *Molecular Endocrinology*, Academic Press Inc., **1994**, 34.
60. S. Green, P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos, P. Chambon, *Nature*, **320**, 134, 1987.
61. M. A. Carson-Jurica, W. T. Schrader, B. W. O'Malley, *Endocrine Rev.*, **11**, 201, 1990.
62. M. Fritsch, C. M. Leary, J. D. Furlow, H. Ahrens, T. J. Schuh, G. C. Mueller, J. Gorski, *Biochemistry*, **31**, 5303, 1992.
63. G. M. Anstead, K. E. Carlson, J. A. Katzenellenbogen, *Steroids*, **62**, 268, 1997.
64. B. Pierrat, D. M. Heery, Y. Lemoine, R. Losson, *Gene*, **119**, 237, 1992.
65. H. Gronemeyer, *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 89, 1991.
66. D. Metzger, R. Losson, J. M. Bornert, Y. Lemoine, P. Chambon, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2813, 1992.
67. J. W. R. Schwabe, D. Neuhaus, D. Rhodes, *Nature*, **348**, 458, 1990.
68. Y. Lee, V. Mahdavi, *J. Biol. Chem.*, **268**, 2021, 1993.
69. W. B. Pratt, K. A. Hutchison, L. C. Scherrer, *Trends Endocrinol. Metab.*, **3**, 326, 1992.
70. D. F. Smith, D. O. Toft, *Mol. Endocrinol.*, **7**, 4, 1993.
71. M. S. Gordon, A. C. Notides, *J. Steroid Biochem.*, **25**, 177, 1986.
72. T. C. Spelsberg, T. Ruh, A. Goldberger, M. Horton, J. Hora, R. Singh, *J. Steroid Biochem.*, **31**, 579, 1983.
73. R. L. Sutherland, L. C. Murphy, *Molec. Cell. Endocr.*, **25**, 5, 1982.
74. M. M. Gotardis, S. P. Robinson, P. G. Satyaswaroop, V. C. Jordan, *Cancer Res.*, **48**, 812, 1988.
75. R. Poulin, Y. Mérand, D. Poirier, C. Lévesque, J. M. Dufour, F. Labrie, *Breast Cancer Res. Treat.*, **14**, 65, 1989.
76. A. E. Wakeling, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **37**, 771, 1990.

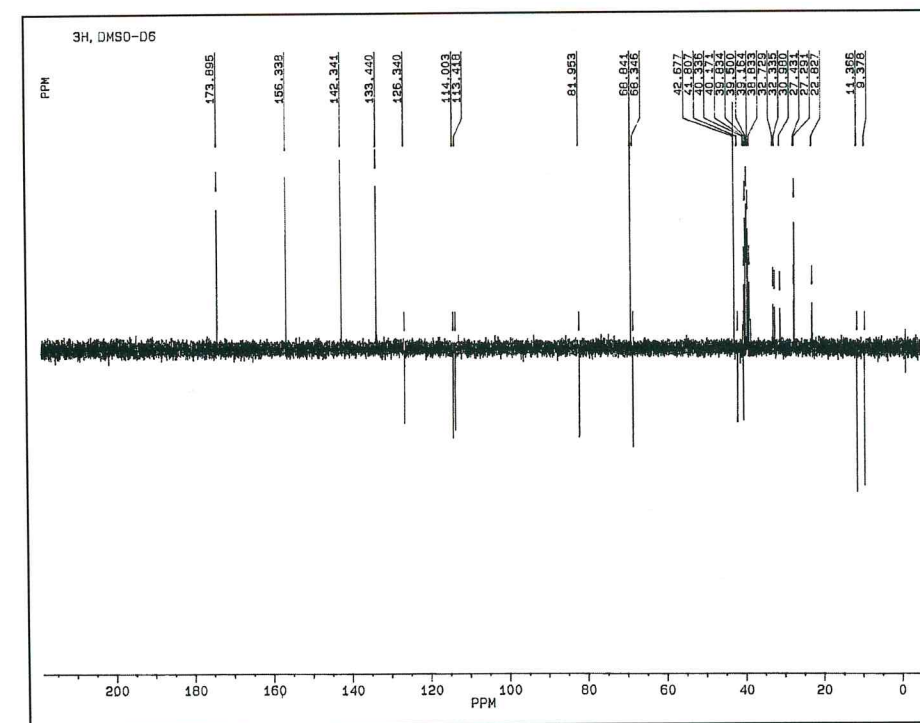
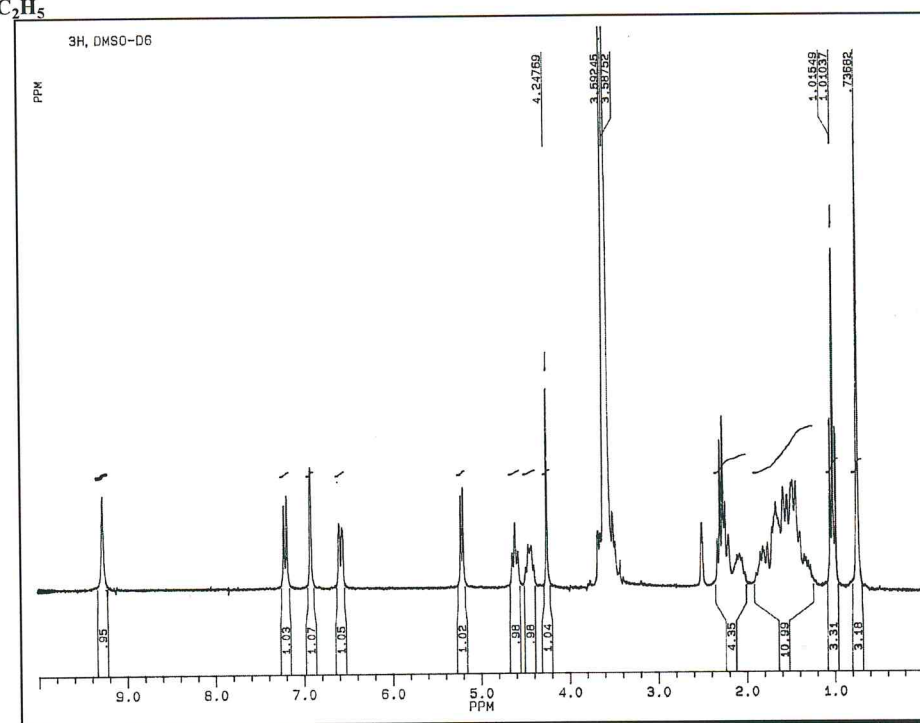
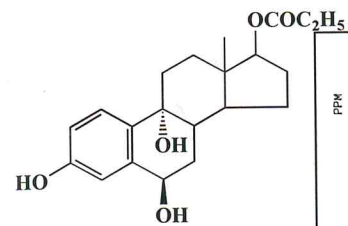
77. C. S. Murphy, C. J. Parker, R. McCague, V. C. Jordan, *Molec. Pharmac.*, **39**, 421, 1991.
78. C. D. Jones, T. Suarez, E. H. Massey, L. J. Black, C. Tinsley, *J. Med. Chem.*, **22**, 962, 1979.
79. L. J. Black, R. L. Goode, *Life Sci.*, **26**, 1453, 1980.
80. C. D. Jones, M. G. Jevniker, A. J. Pike, M. K. Peters, L. J. Black, A. R. Thompson, T. F. Falcone, J. A. Clemens, *J. Med. Chem.*, **27**, 1057, 1984.
81. V. C. Jordan, B. Gosden, *Endocrinology*, **113**, 463, 1983.
82. J. A. Clemens, D. R. Bennett, L. J. Black, C. D. Jones, *Life Sci.*, **32**, 2869, 1983.
83. M. M. Gottardis, V. C. Jordan, *Cancer Res.*, **47**, 4020, 1987.
84. A. D. Palkowitz, A. L. Glasebrook, K. J. Thrasher, K. L. Hauser, L. L. Short, D. L. Phillips, B. S. Muehl, M. Sato, P. K. Shetler, G. J. Cullinan, T. R. Pell, H. U. Bryant, *J. Med. Chem.*, **40**, 1407, 1997.
85. L. Nédelec, F. Nique, M. M. Bouton, P. Van De Velde, *Proc. 8th Int. Congress on Hormonal Steroids*, Apst. br. 302, **1990**.
86. C. Lévesque, Y. Mérand, J. M. Dufour, C. Labrie, F. Labrie, *J. Med. Chem.*, **34**, 1624, 1991.
87. A. Claussne, L. Nédelec, F. Nique, D. Philibert, G. Teutsch, P. Van De Velde, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **41**, 609, 1992.
88. P. Van De Velde, F. Nique, F. Bouchoux, J. Brémaud, M. C. Hameau, D. Lucas, C. Moratille, S. Viet, D. Philibert, G. Teutsch, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **48**, 187, 1994.
89. L. Jin, M. Borrás, M. Lacroix, N. Legros, G. Leclercq, *Steroids*, **60**, 512, 1995.
90. M. Berry, D. Metzger, P. Chambon, *EMBO J*, **9**, 2811, 1990.
91. M. G. Parker, *Breast Cancer Res. Treat.*, **26**, 131, 1993.
92. Gy. Argay, A. Kálmán, B. Ribár, M. Sakač, D. Miljković, *Zeitschrift für Kristallographie*, **210**, 785, 1995.

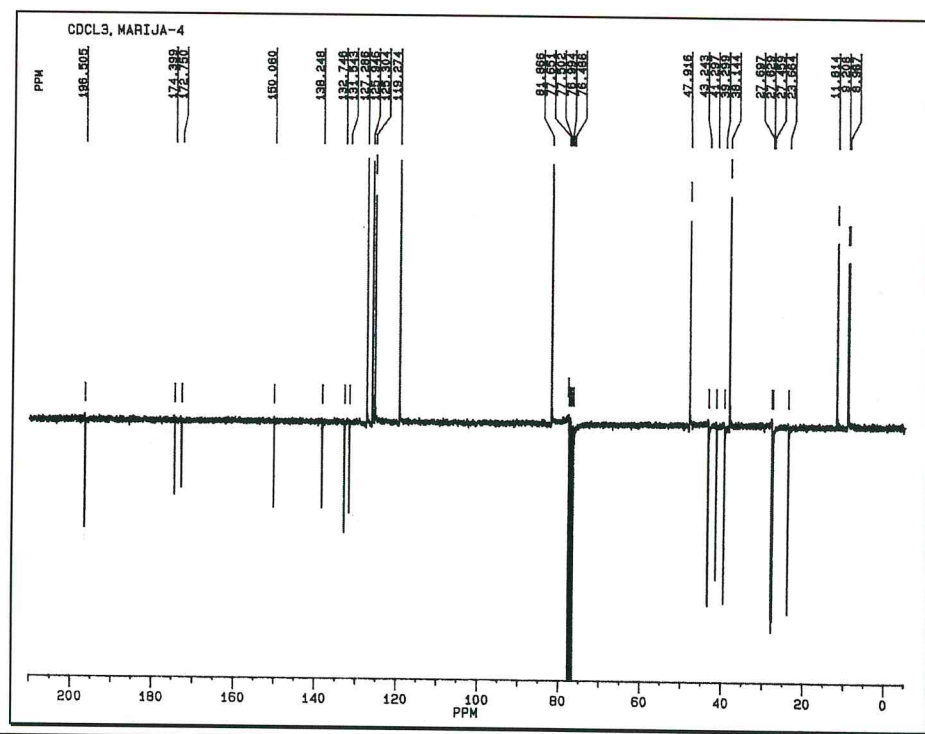
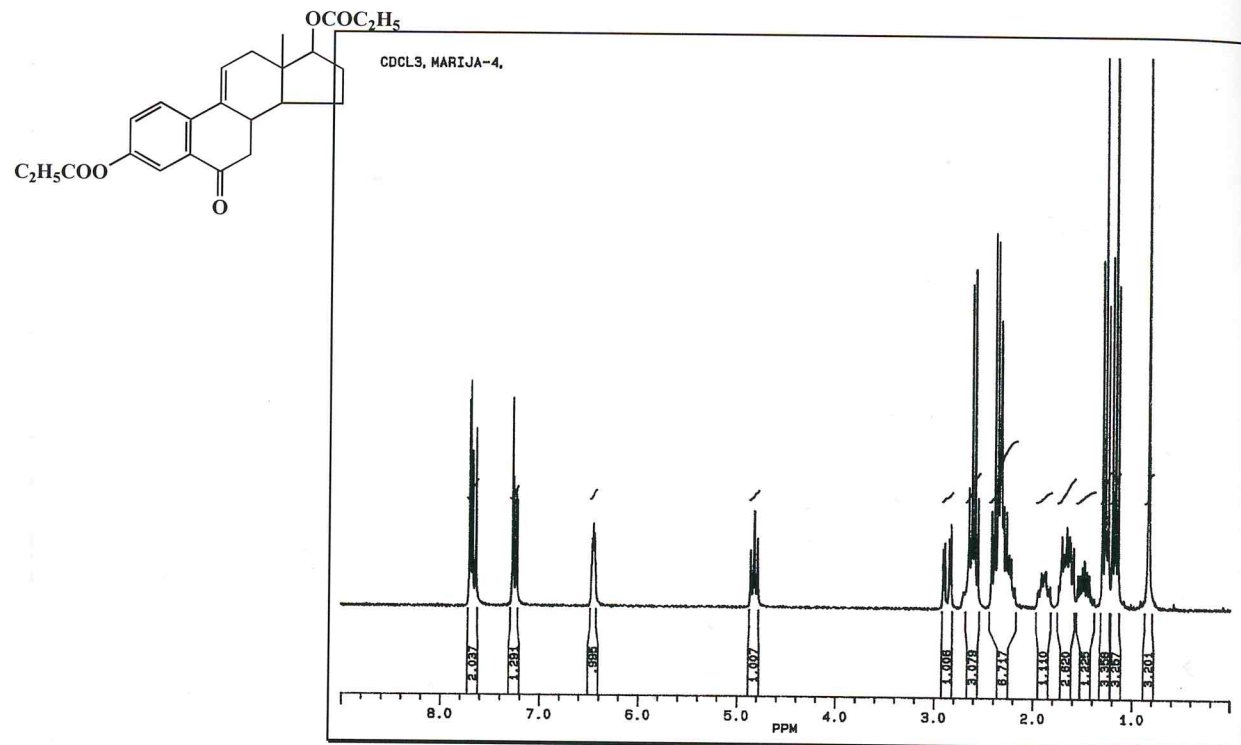
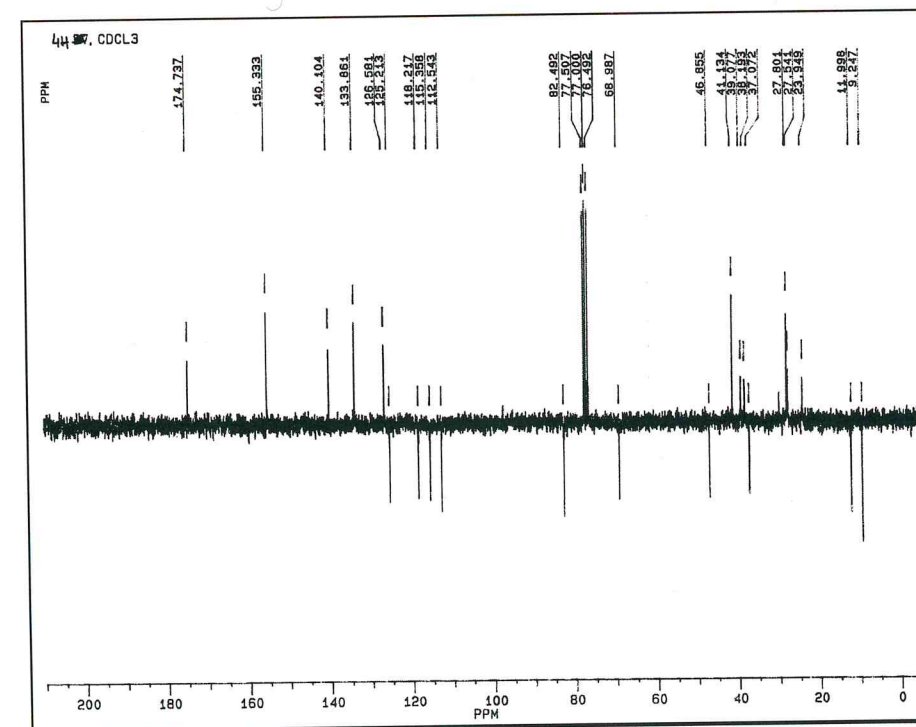
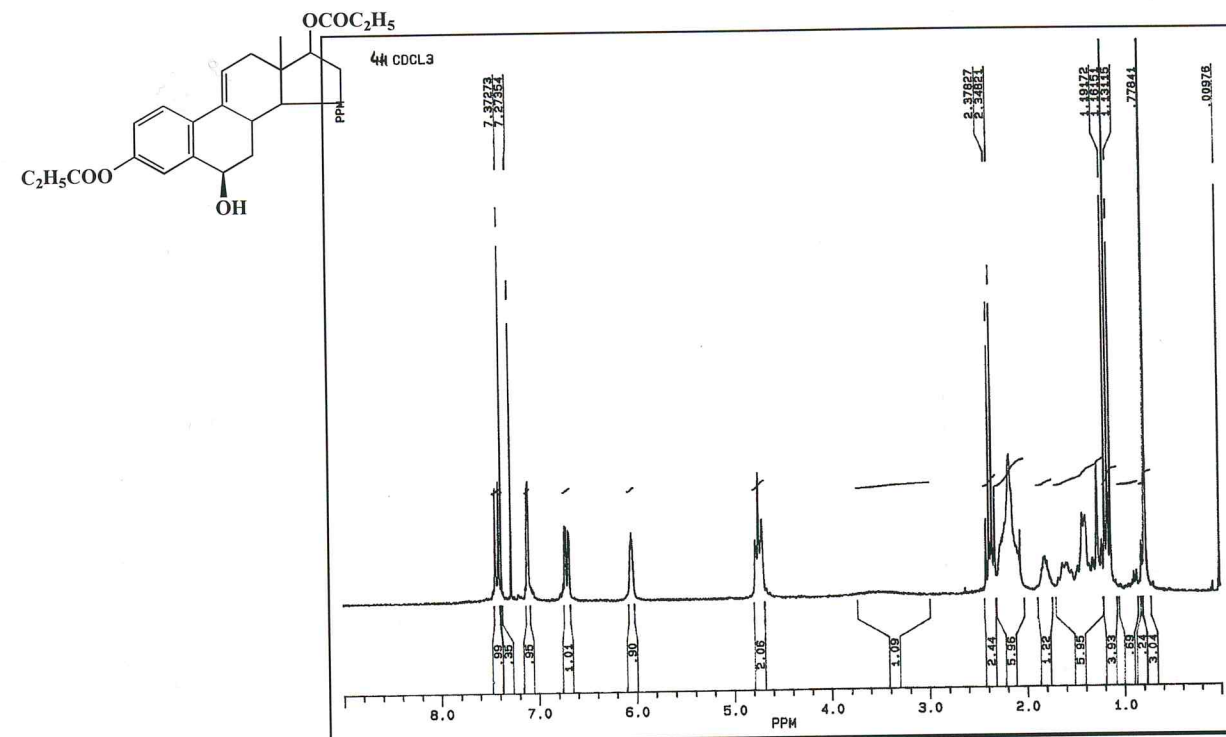
93. H. B. Kagan, *Organska stereohemija*, (prevod sa nemačkog), Hemijski fakultet, Beograd, **1995**, 103.
94. W. S. Johnson, E. R. Rogier, J. Ackerman, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6322, 1956.
95. S. L. Jeffcoate, *Radioimmunoassay Methods*, Editors K. E. Kirkham, W. M. Hunter, Churchill Livingstone, Edinburgh, **1971**, 151.
96. B. Cook, G. H. Beastall, *Steroid Hormones and Practical Approach*, IRL Press, Oxford and Washington DC, **1987**, 13-15.
97. S. L. Jeffcoate, J. E. Searle, *Steroids* **19**, 181, 1972; V. Pouzar, J. Černý, *Steroids*, **61**, 89, 1996; H. J. Siemann, P. Droescher, B. Undeutsch, S. Schwarz, *Steroids*, **60**, 308, 1995.
98. B. F. Erlanger, F. Borek, S. M. Beiser, S. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, **228**, 713, 1957; B. F. Erlanger, F. Borek, S. M. Beiser, S. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1090, 1959.
99. E. Bülbring, J. H. Burn, *J. Physiol.*, **85**, 320, 1935.
100. H. D. Lawson, C. G. Heller, J. B. Golden, E. L. Severinghaus, *Endocrinology*, **24**, 35, 1939.
101. M. R. Berger, J. Floride, D. Schmöhl, J. Schreiber, G. Bisenbraud, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **22**, 1179, 1986.
102. A. E. Wakeling, B. Valcaccia, E. Newbould, L. R. Green, *J. Steroid Biochem.*, **20**, 111, 1984.
103. S. G. Korenman, *Steroids*, **13**, 163, 1969; J. A. Katzenellenbogen, H. J. Johnson, H. N. Myers, *Biochemistry*, **12**, 4085, 1973; S. Stoessel, G. Leclercq, *J. Steroid Biochem.*, **25**, 677, 1986.
104. A. E. Wakeling, S. R. Slotter, *Cancer Treat. Rep.*, **64**, 741, 1980.
105. C. Jordan, R. Koch, *Endocrinology*, **124**, 1717, 1989.
106. J. A. Petrović, V. M. Pejanović, D. A. Miljković, J. T. Hranisavljević, *Steroids*, **55**, 276, 1990.
107. T. Stepić, "Sinteza D-seko estronskih derivata", Specijalistički rad, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1994.

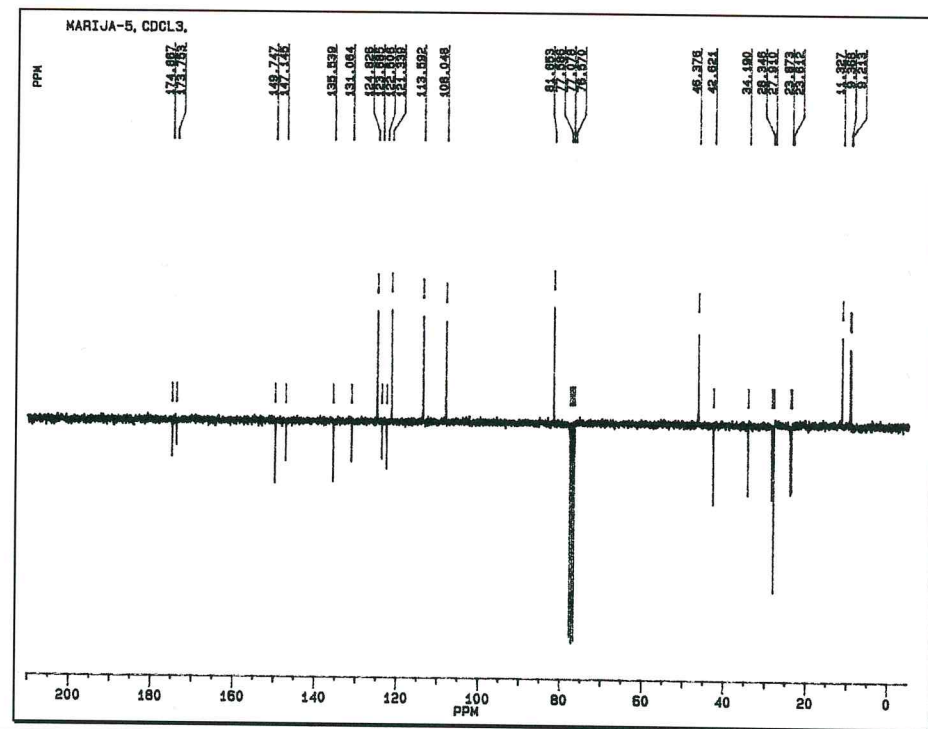
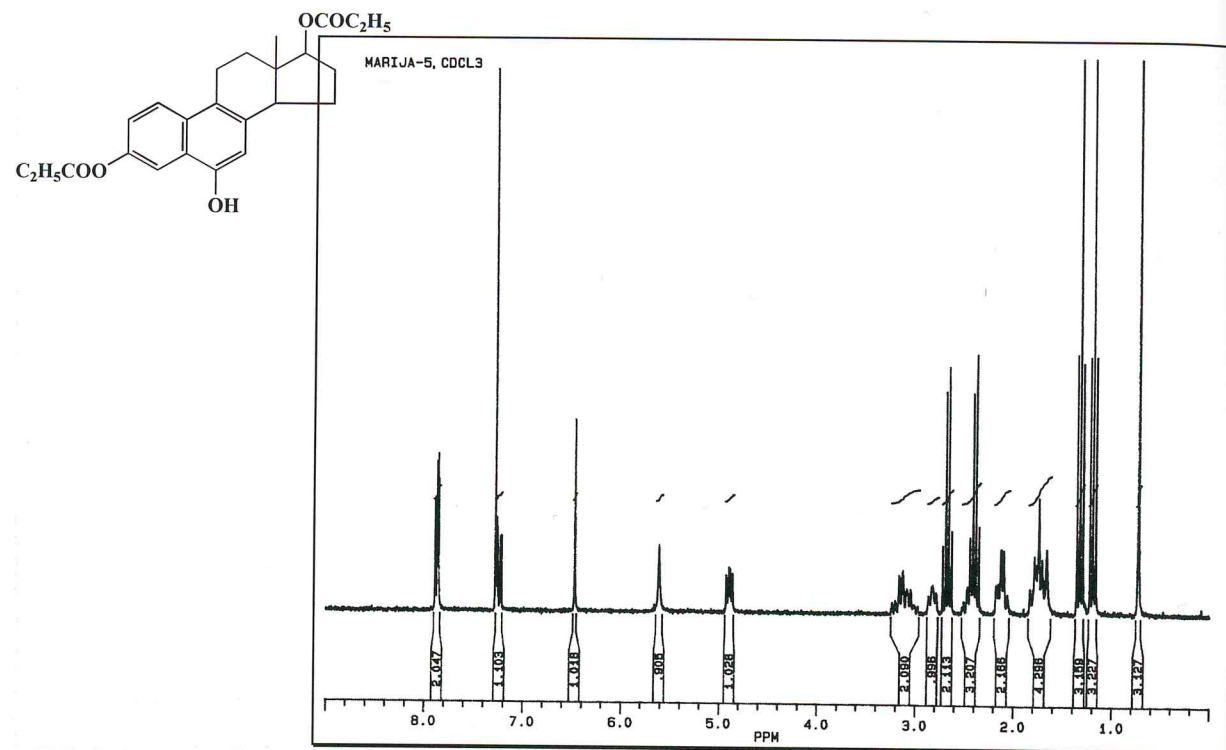
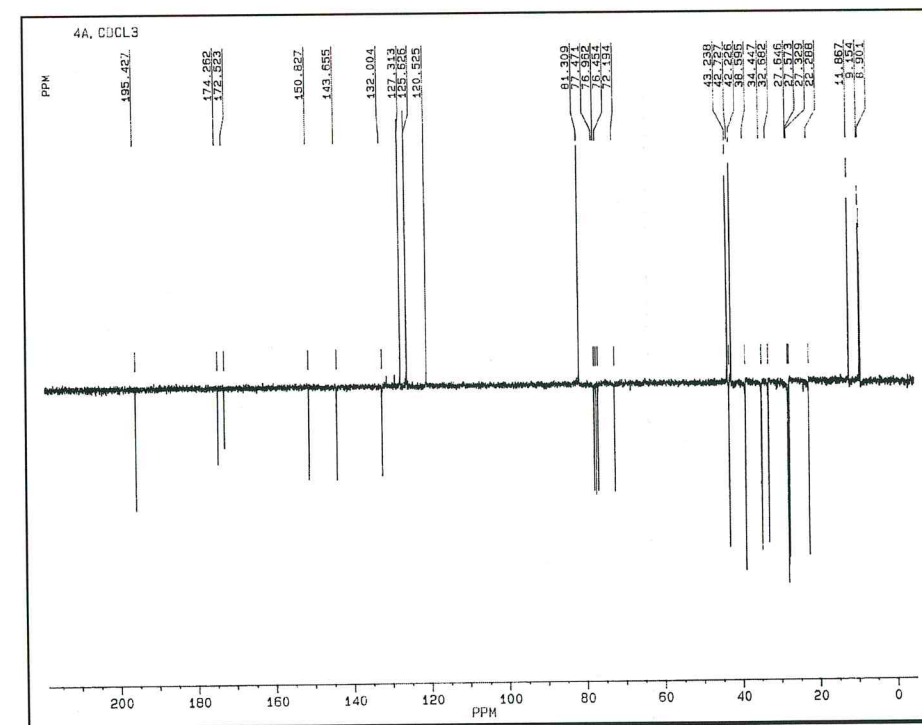
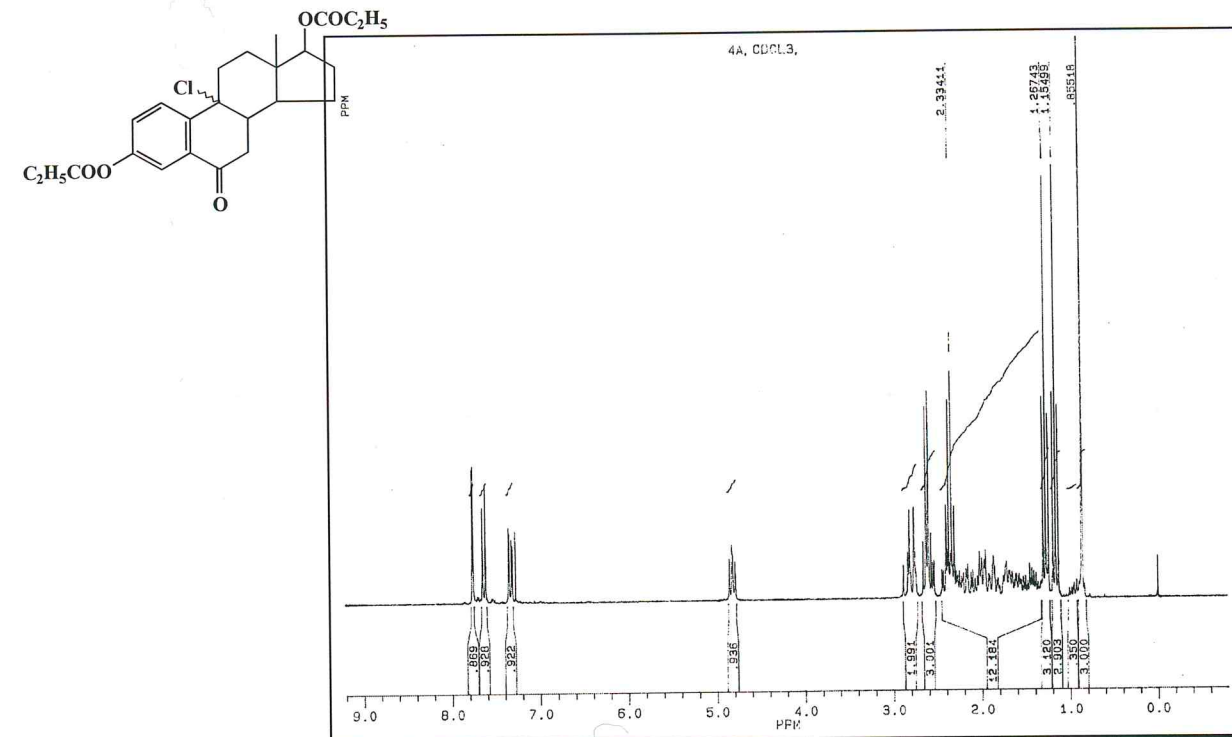
108. D. Lazar, "Strukturna i energijska istraživanja nekih potencijalnih antiestrogena: Međuzavisnost strukture i aktivnosti", Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1993.
109. D. W. Robertson, J. A. Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.*, **47**, 2387, 1982.
110. A. H. Fenselau, E. H. Hamamura, J. G. Moffat, *J. Org. Chem.*, **35**, 3546, 1970.
111. C. W. Shoppee, S. K. Roy, *J. Chem. Soc. (C)*, 3774, **1963**; C. W. Shoppee, R. W. Killick, *J. Chem. Soc. (C)*, 1513, **1970**.
112. F. Litvan, R. Robinson, *J. Chem. Soc.*, 1997, **1938**.
113. D. A. Miljković, J. A. Petrović, *J. Org. Chem.*, **42**, 2102, 1977.
114. D. A. Miljković, K. M. Gaši, *Bull. Soc. Chim., Beograd*, **46**, 263, 1981.
115. C. H. Robinson, O. Gnoj, A. Mitchell, E. P. Oliveto, D. H. R. Barton, *Tetrahedron*, **21**, 743, 1965; H. Sugimoto, T. Mizuguchi, S. Honda, T. Masamune, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 927, **1977**; H. Sugimoto, T. Masamune, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1312, **1976**.
116. C. Djerassi, G. Rosenkraud, J. Romo, St. Kaufmann, J. Pataki, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4534, 1950.
117. B. A. Arbuzov, V. E. Kataev, S. N. Valitova, A. N. Vereščagin, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, **11**, 804, 1985.

8. PRILOG

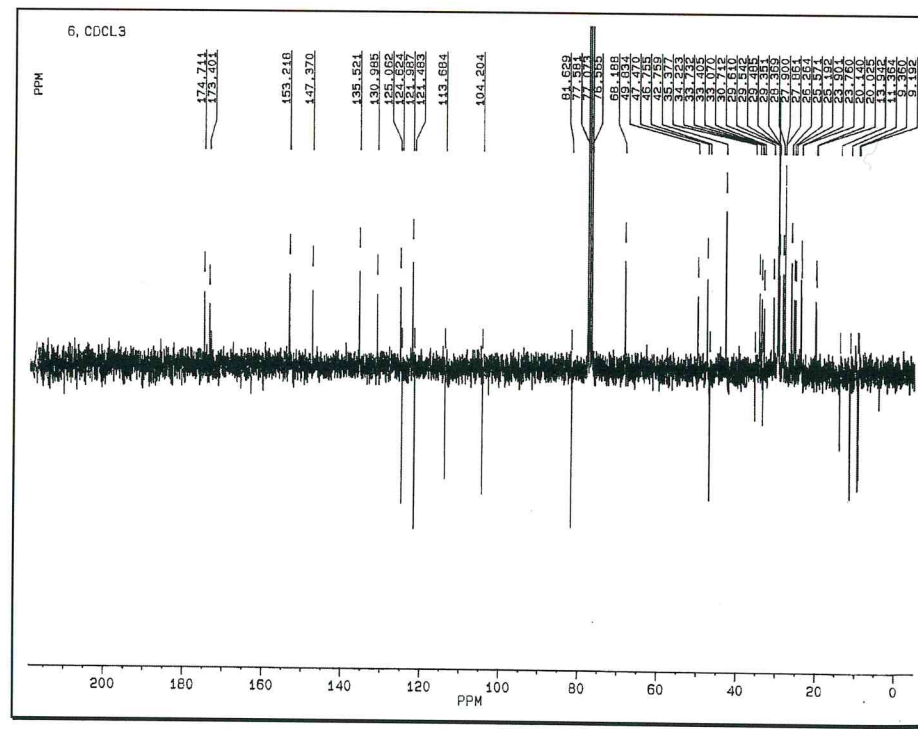
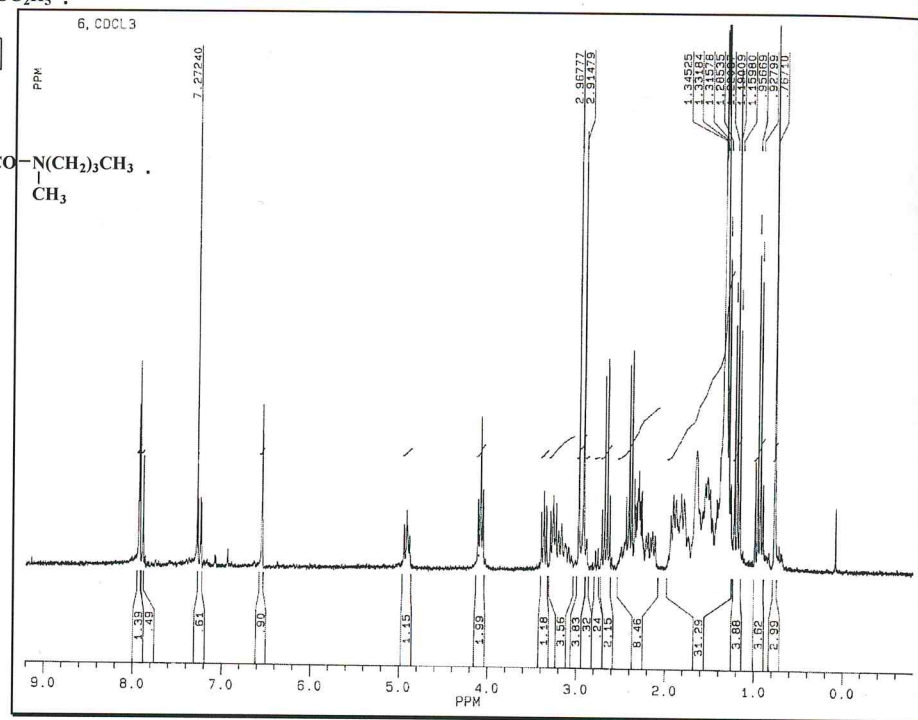
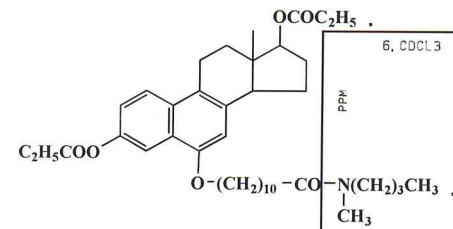
8.1. ^1H i ^{13}C NMR spektri

3,6 β ,9 α -Trihidroksi-17 β -propionoksiestra-1,3,5(10)-trien

3,17 β -Dipropionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-6-on3,6 β -Dihidroksi-17 β -propionoksiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen

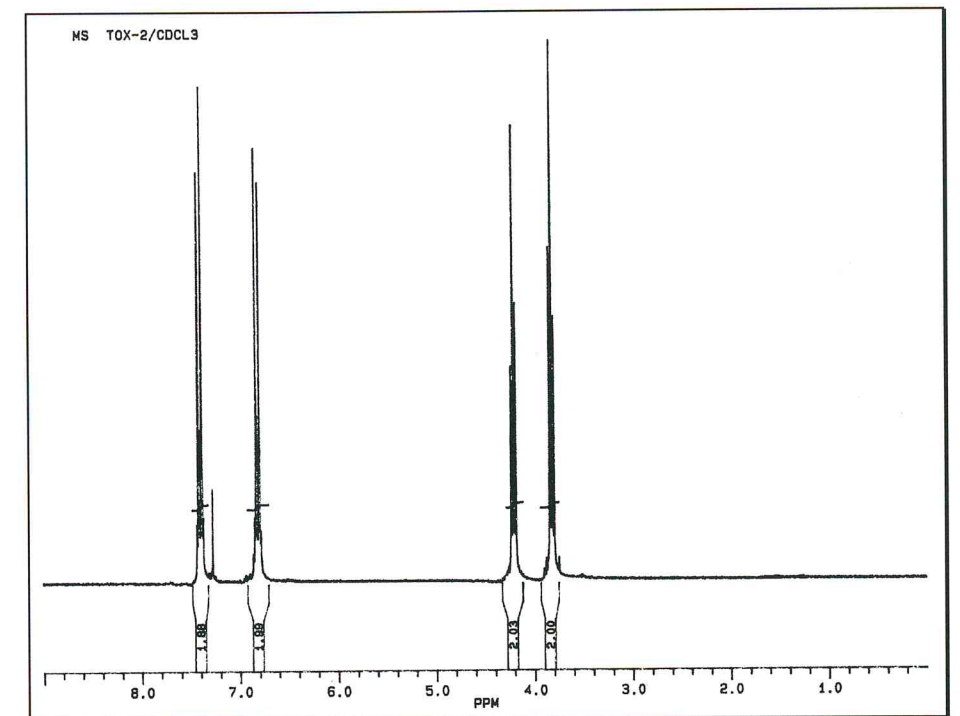
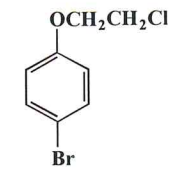
3,17 β -Dipropionoksi-6-hidroksiestra-1,3,5(10),6,8(9)-pentaen3,17 β -dipropionoksi-9 ξ -hloroestra-1,3,5(10)-trien-6-on

3,17 β -Dipropionoksi-6-O-[(10'-karbo-N-n-butil-N-metilamino)decil]estra-1,3,5(10),6,8(9)-pentaen



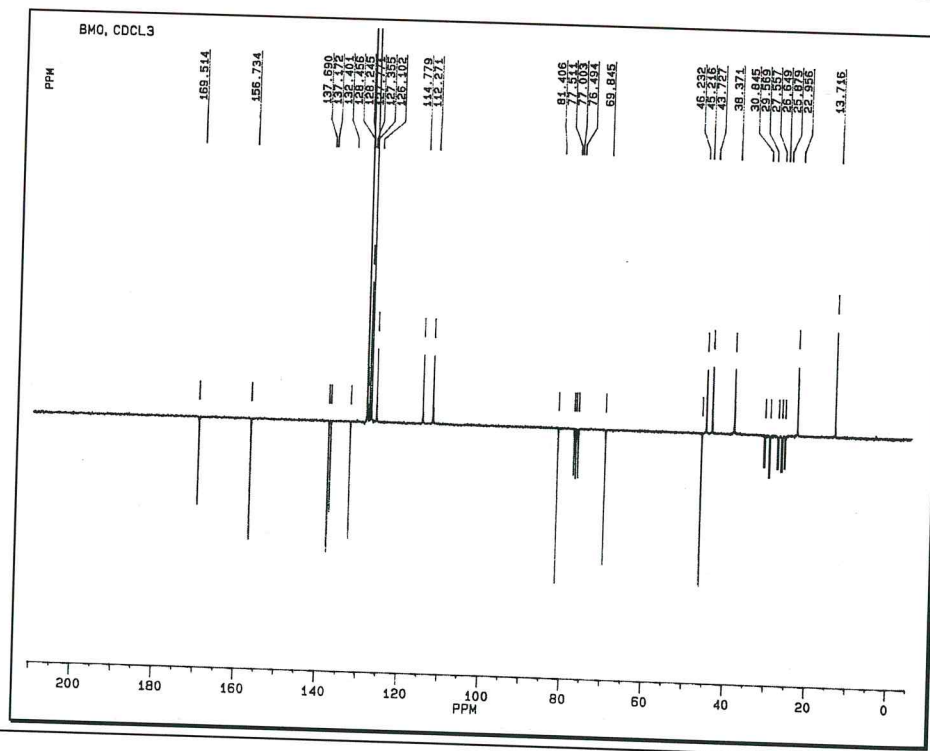
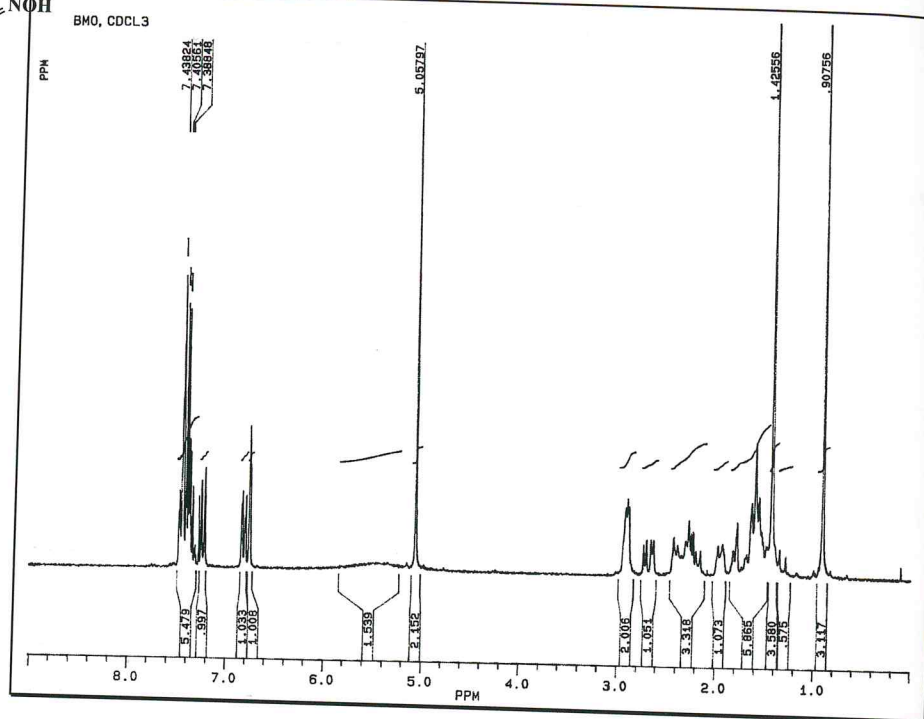
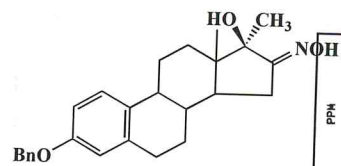
15

1-Bromo-4-(2-hloroetoksi)benzen

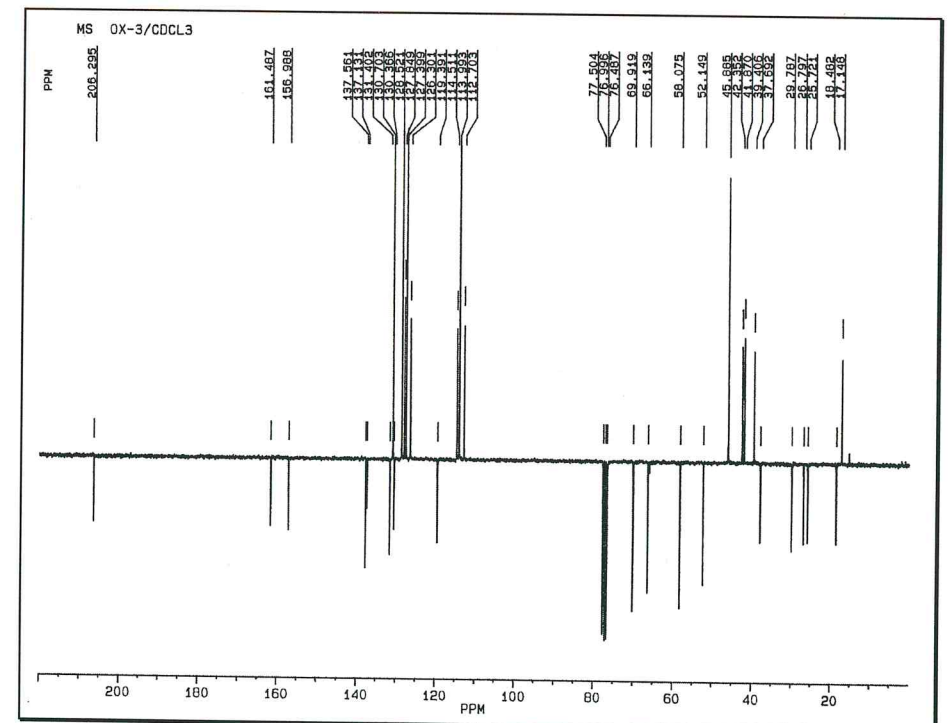
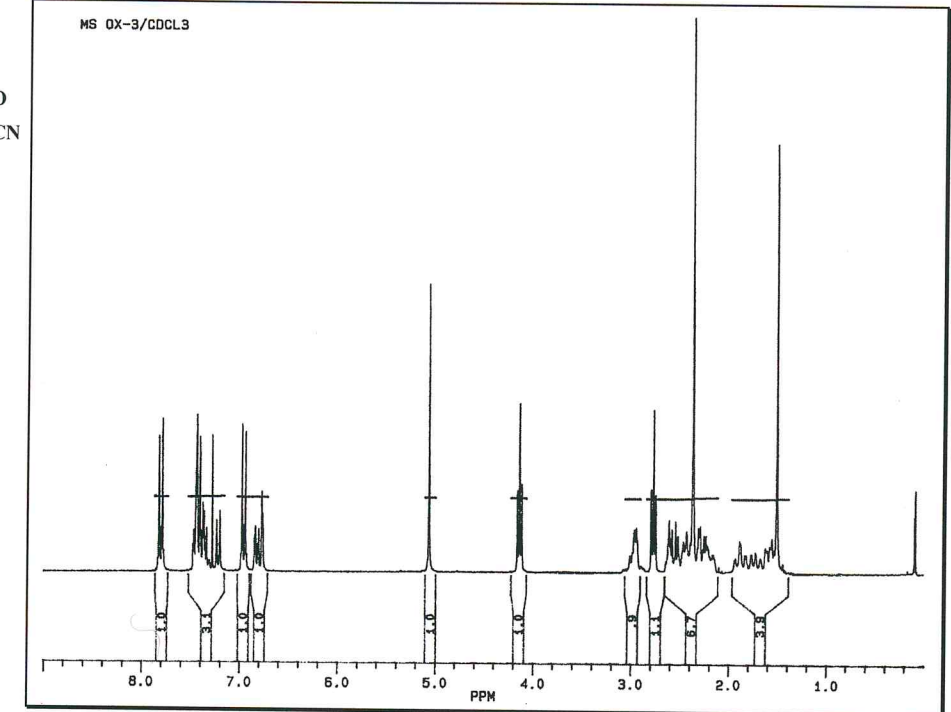
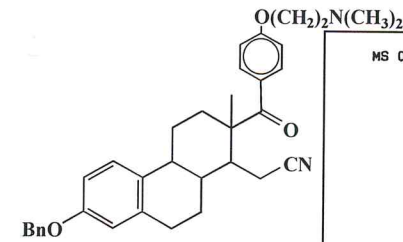


18

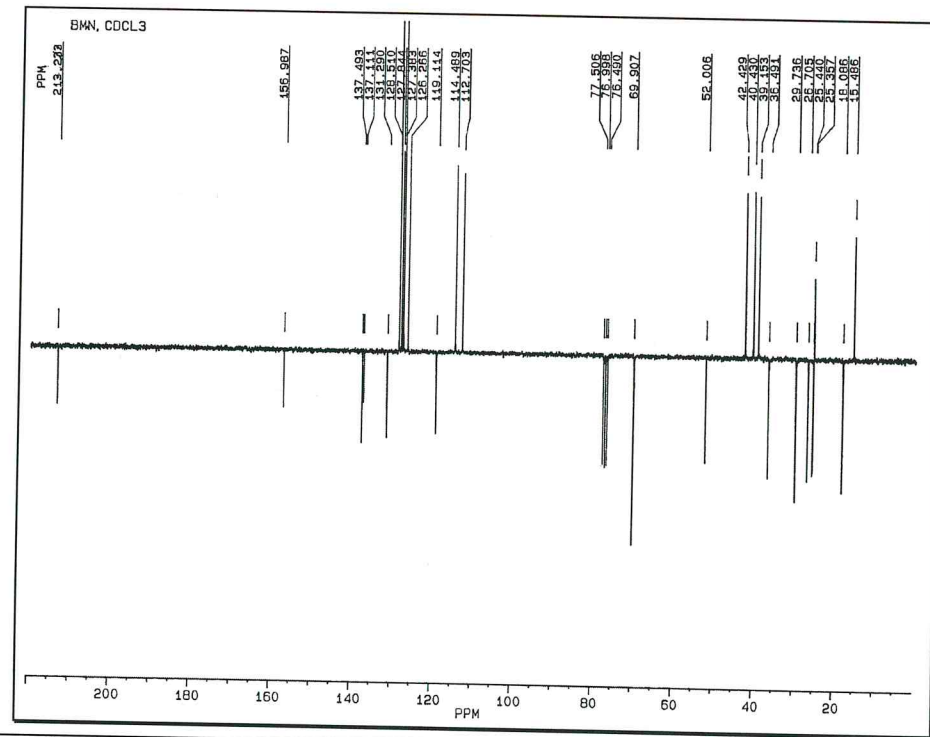
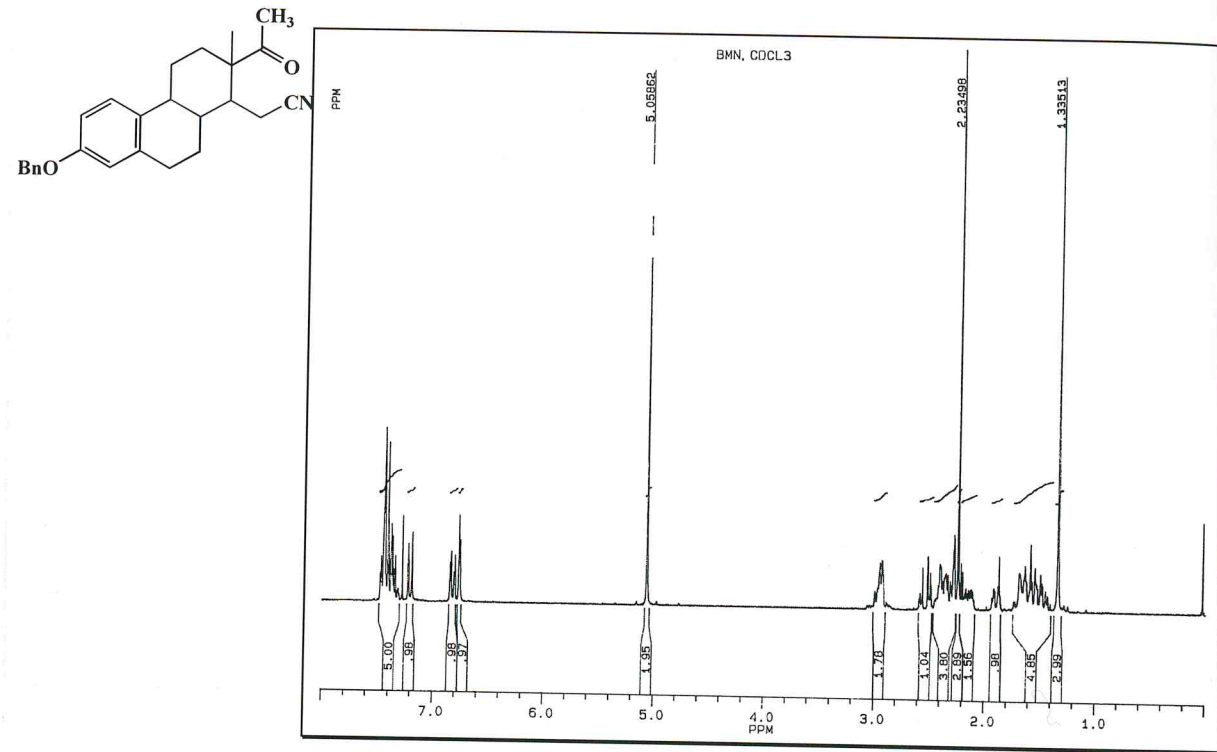
3-Benziloksi-17 β -hidroksi-17 α -metilestra-1,3,5(10)-trien-16-on-oksim



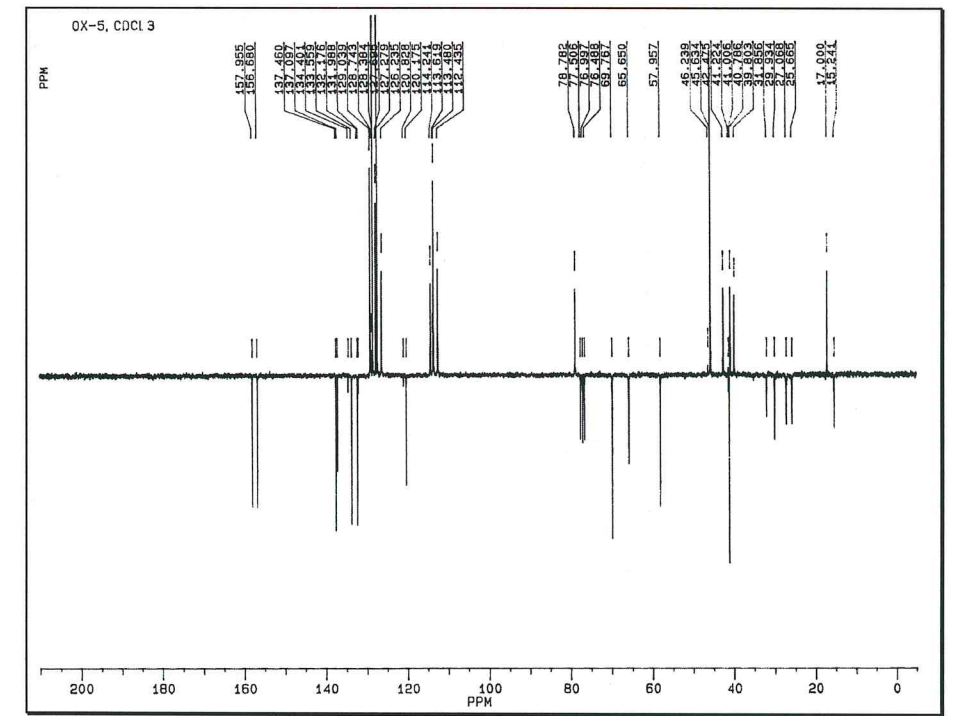
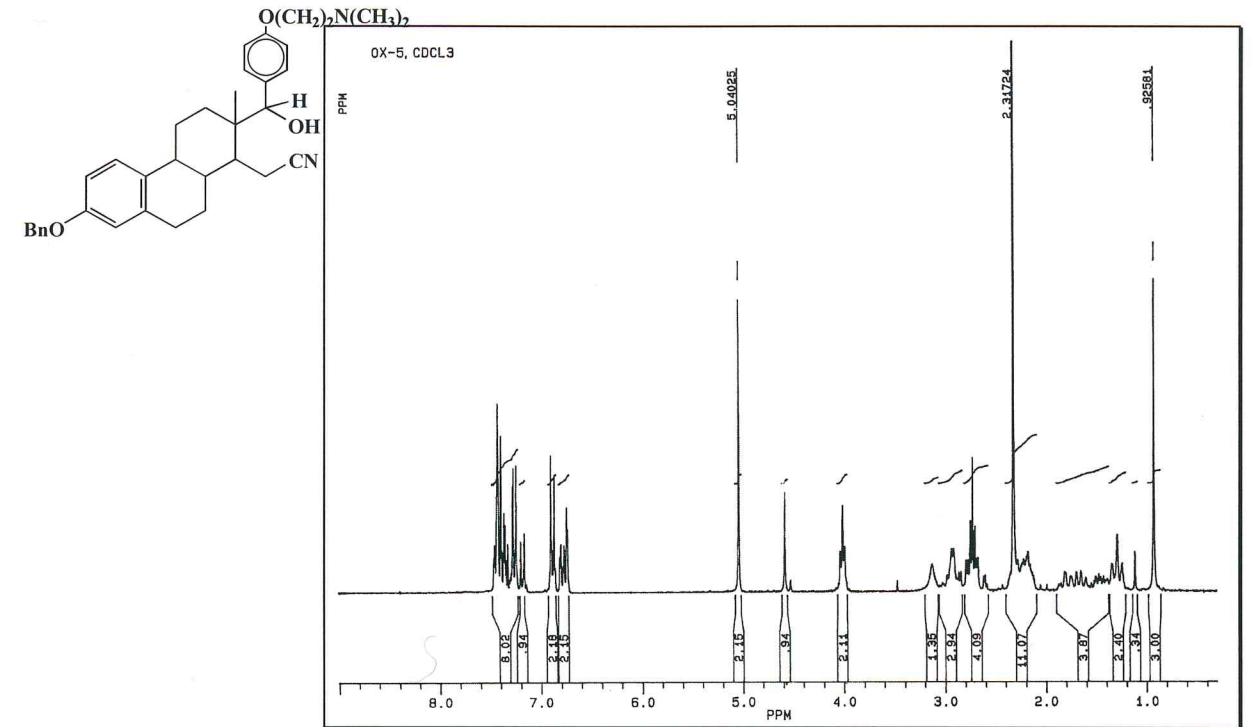
3-Benziloksi-17-keto-17-[4-[(2-dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril



3-Benziloksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril



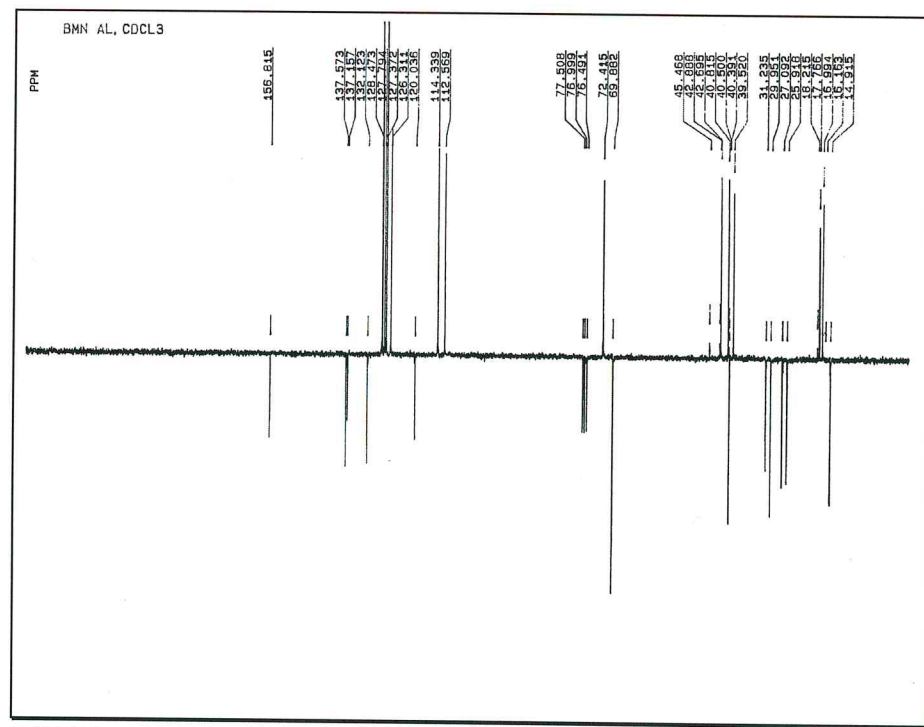
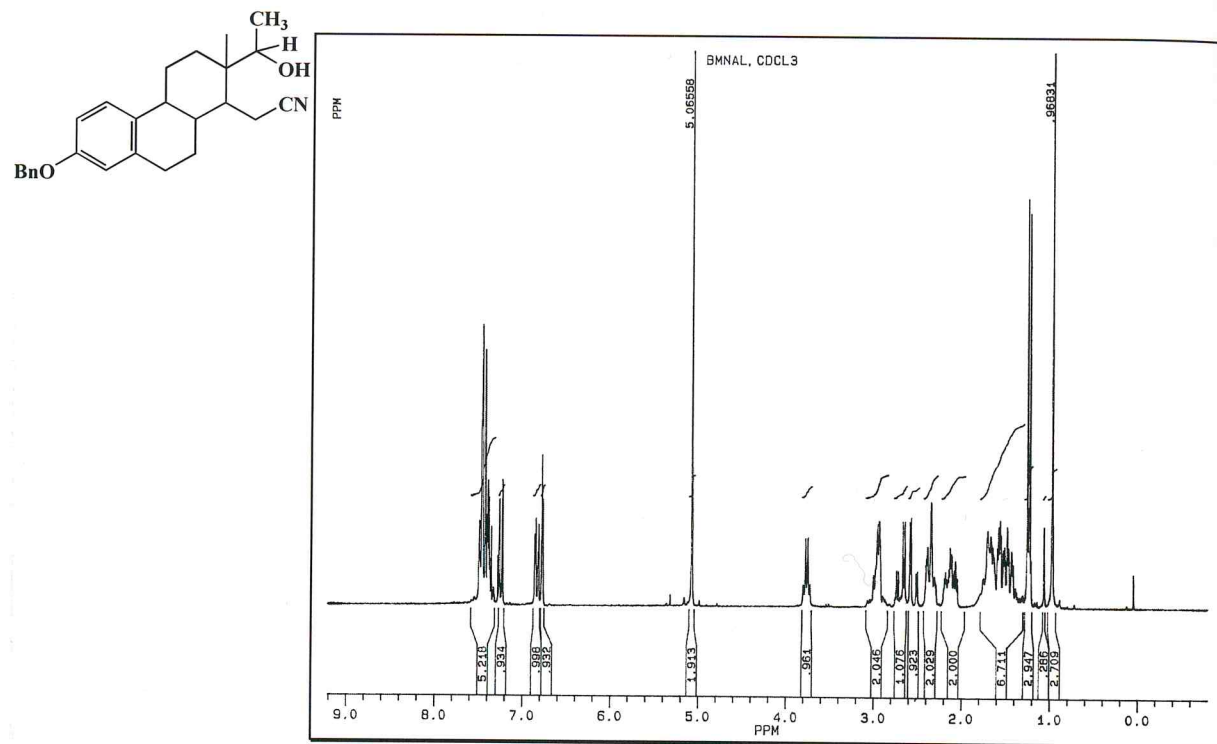
3-Benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril



23

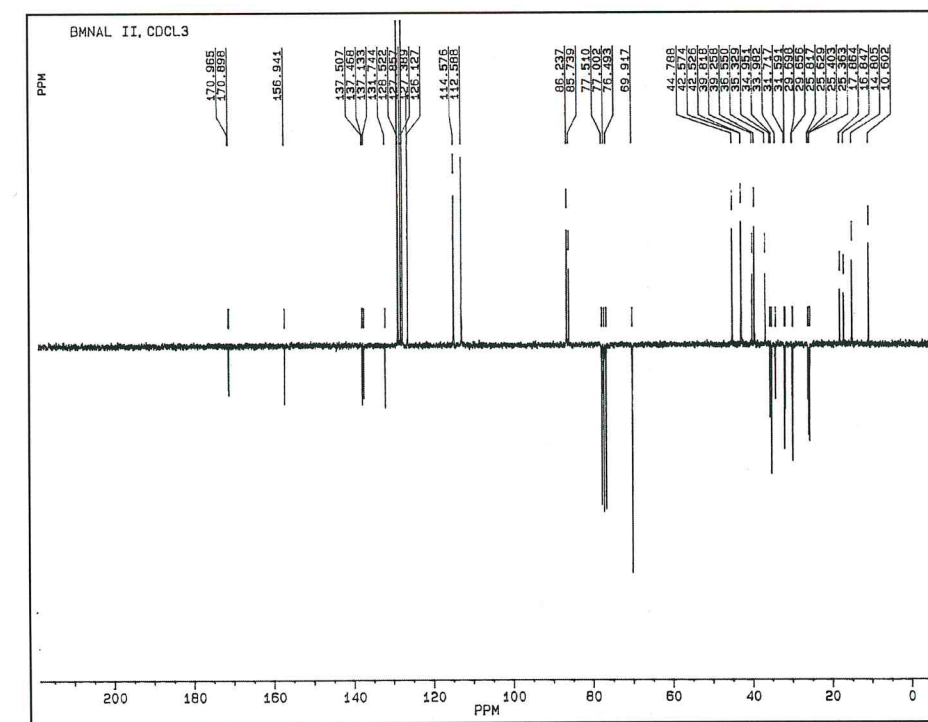
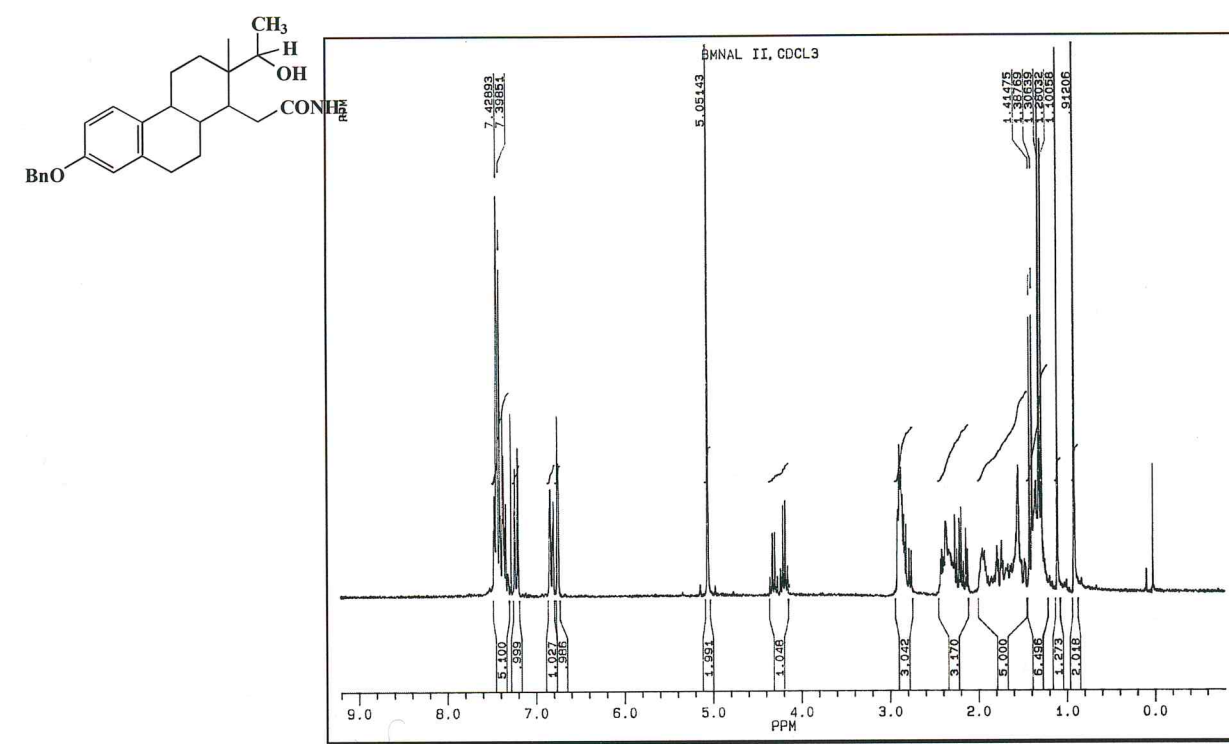
24

3-Benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril



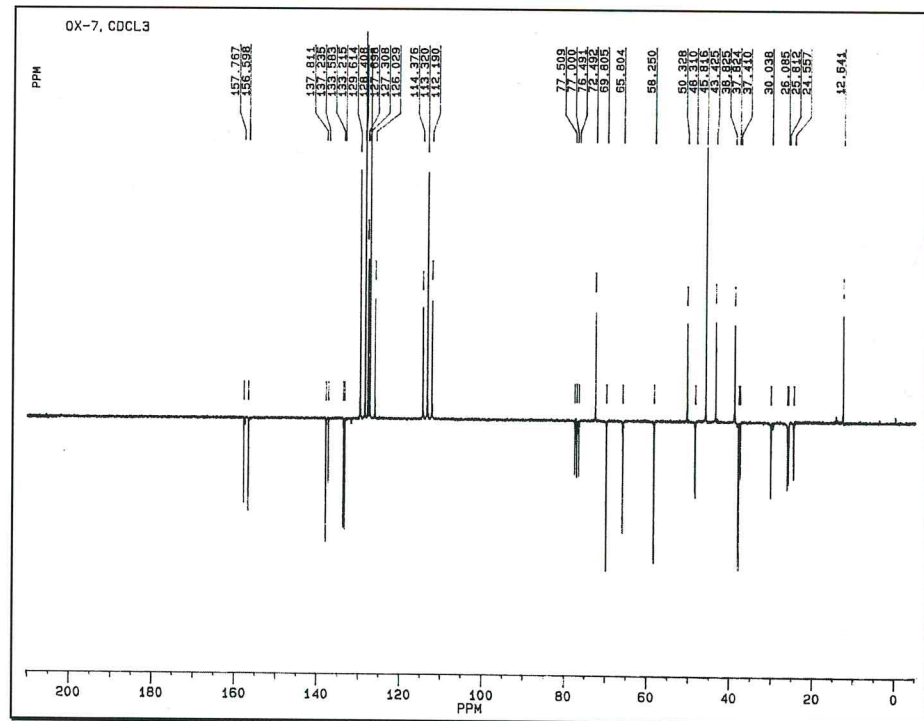
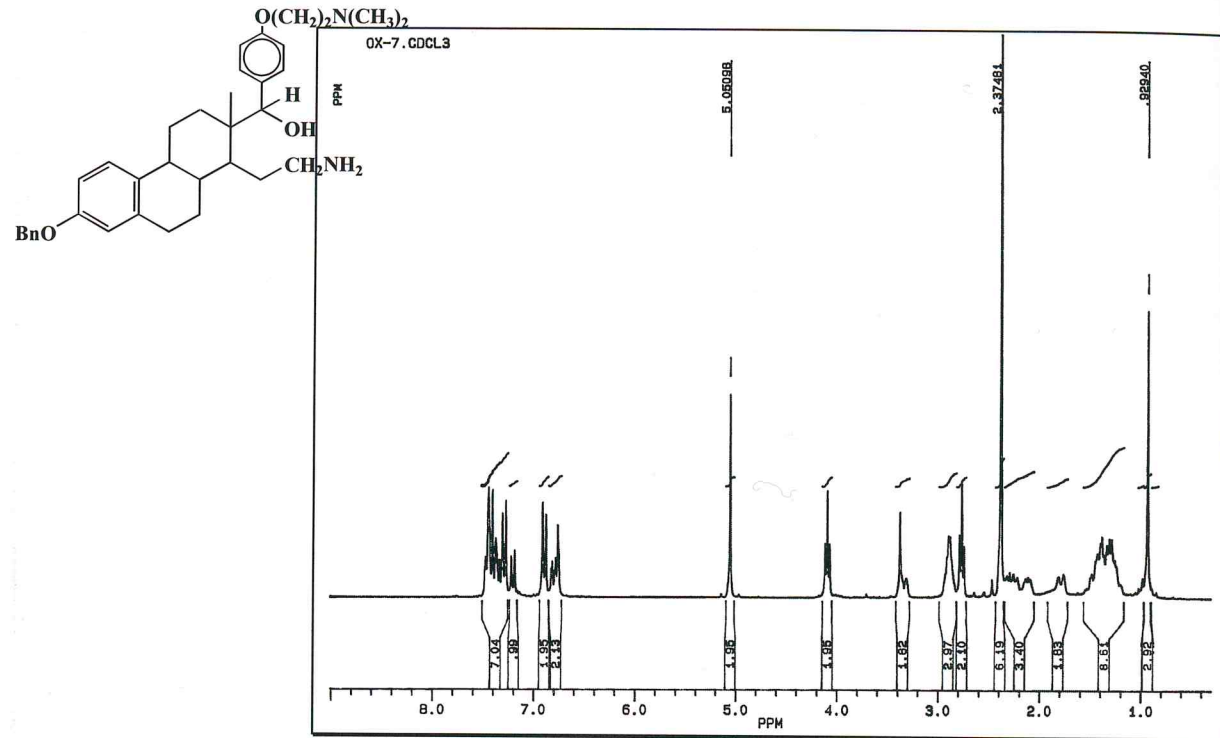
25

3-Benziloksi-17-hidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amid

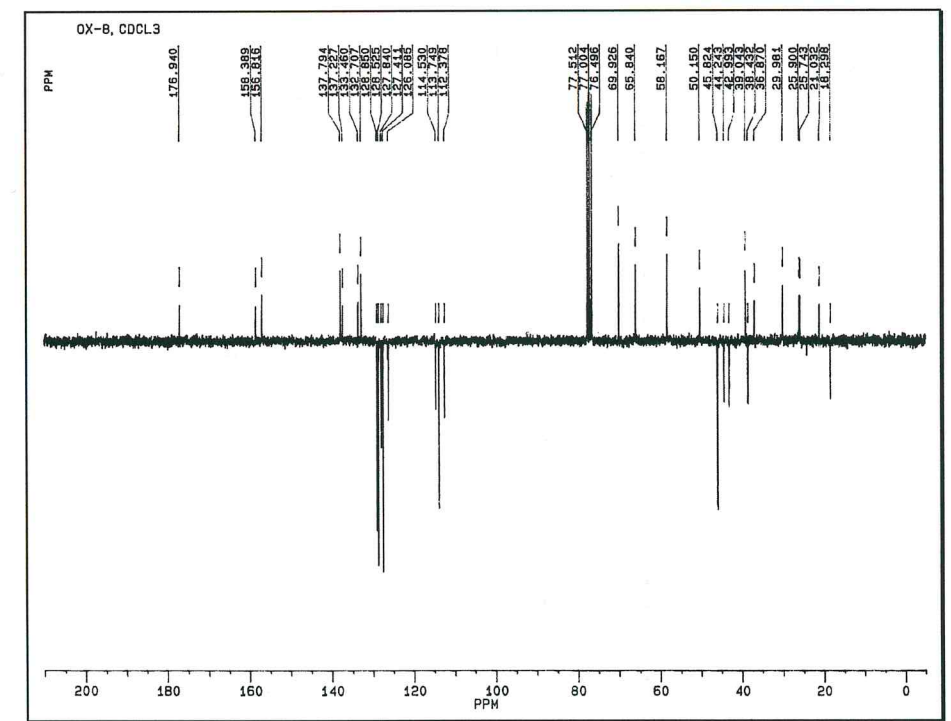
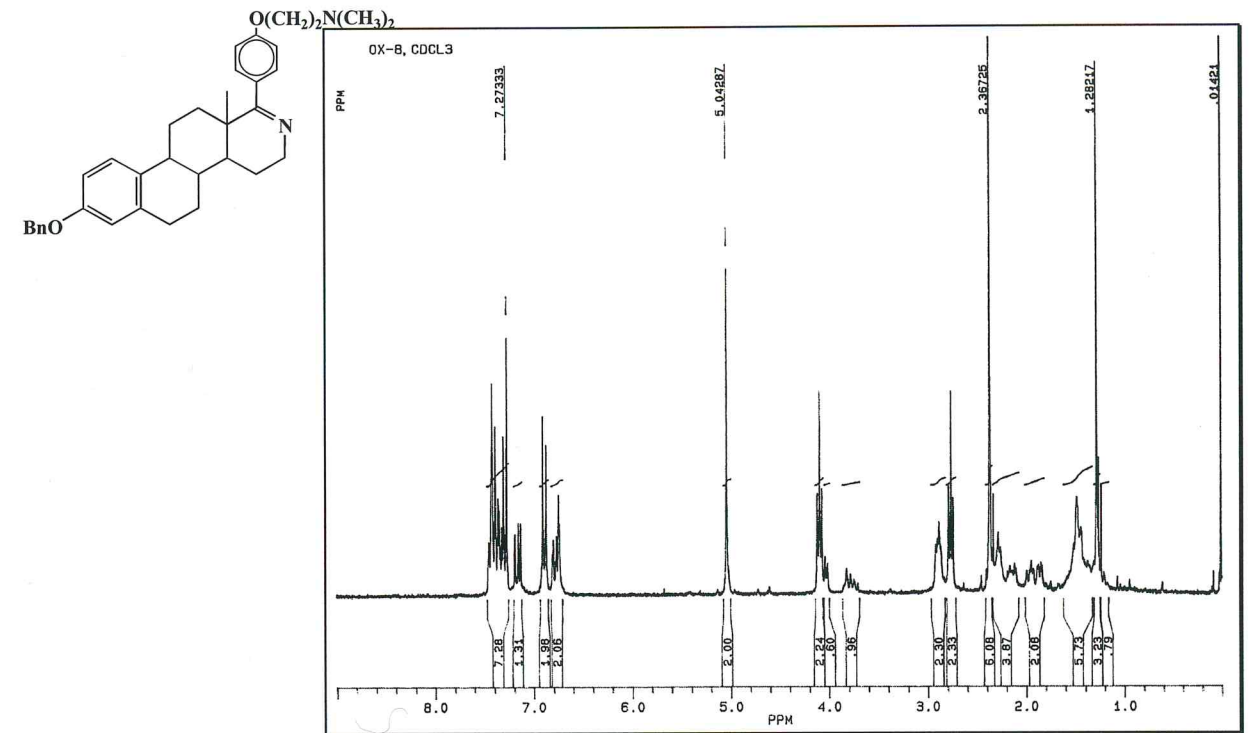


26

3-Benziloksi-17-hidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin



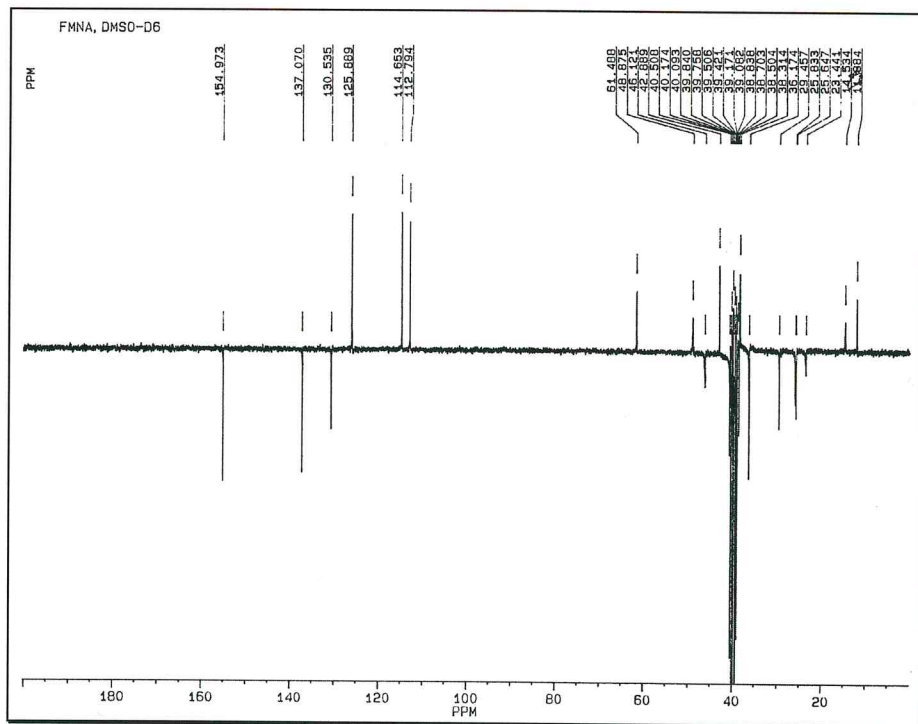
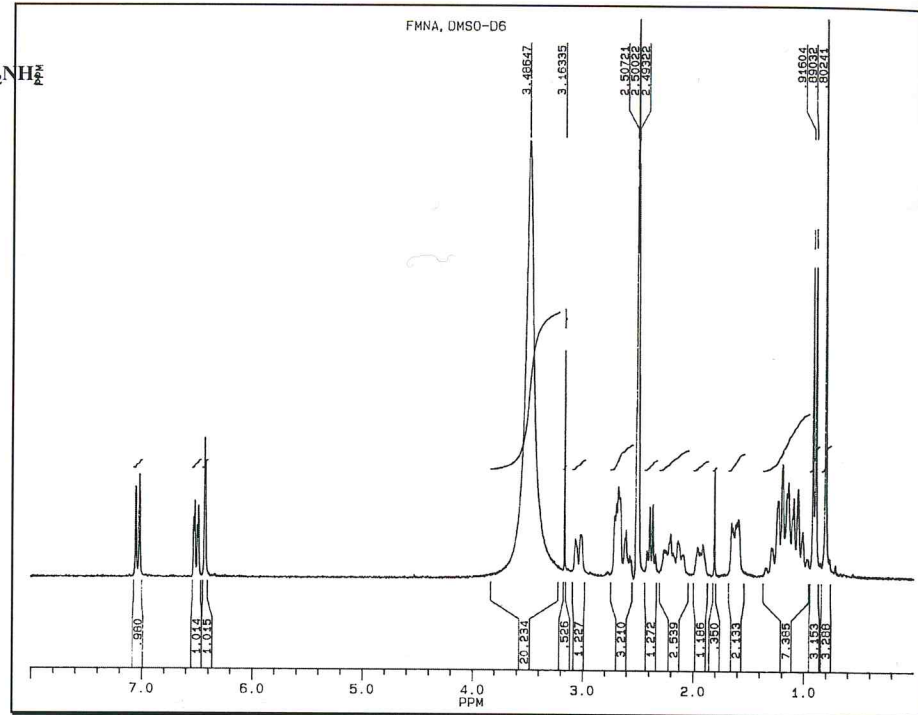
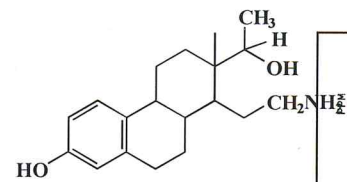
3-Benziloksi-17-aza-17a-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-D-homoestra-1,3,5(10),17(17a)-tetraen



27

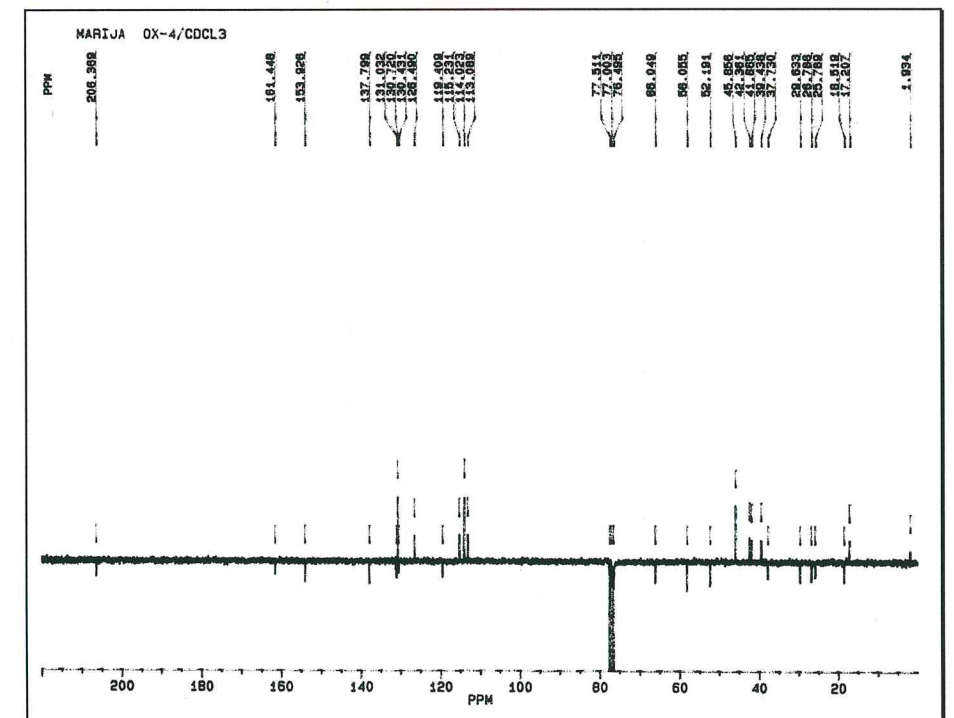
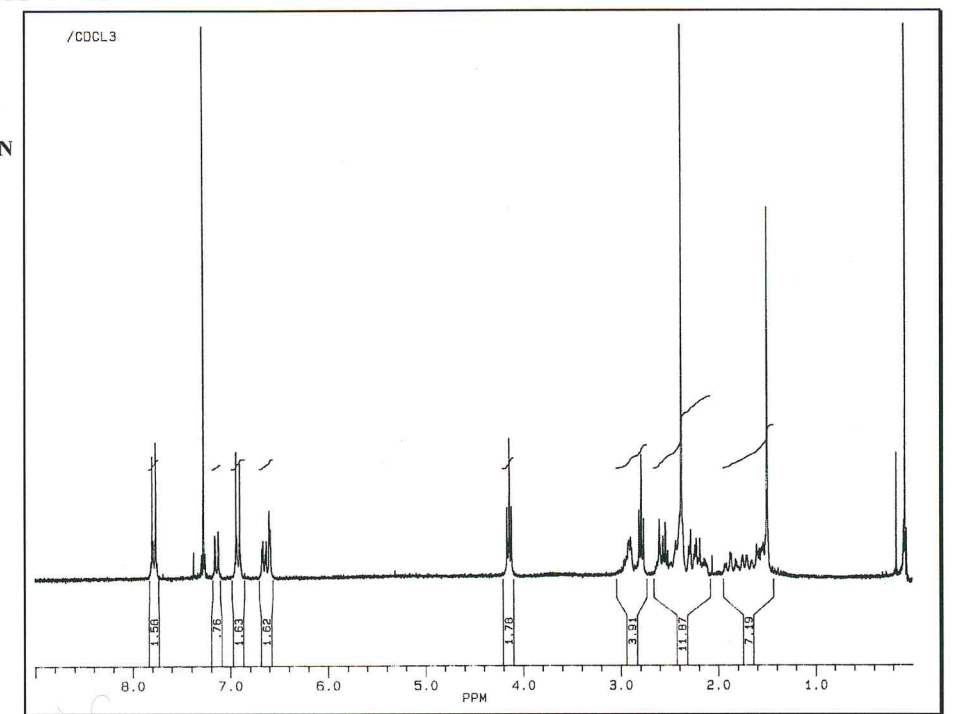
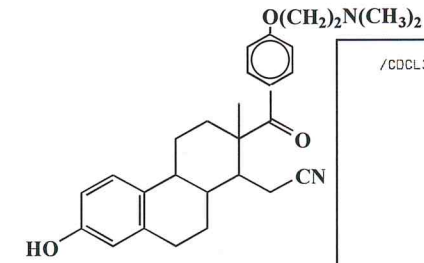
28

3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin



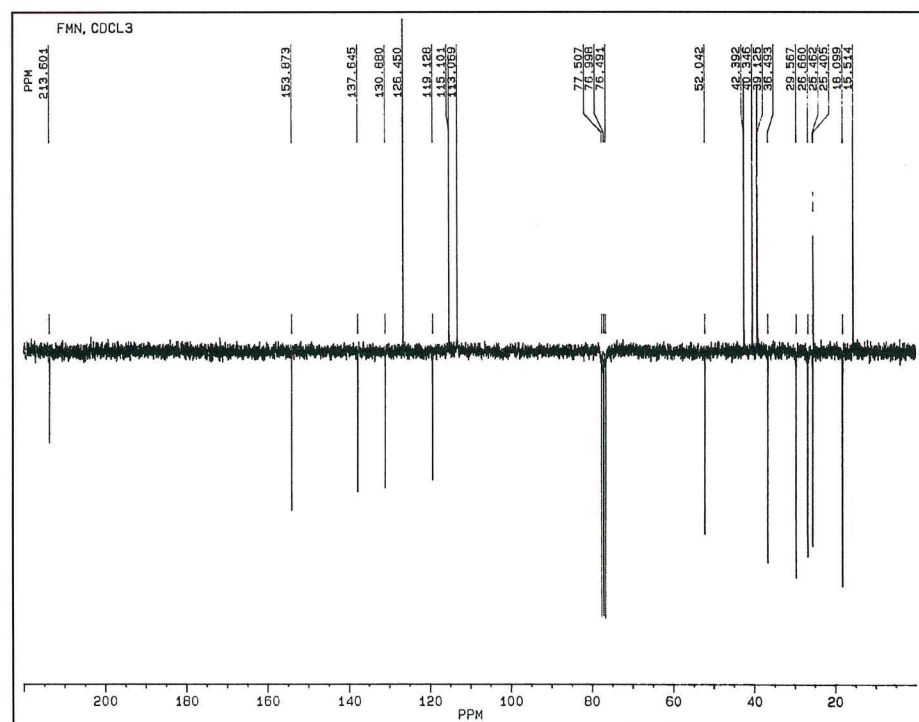
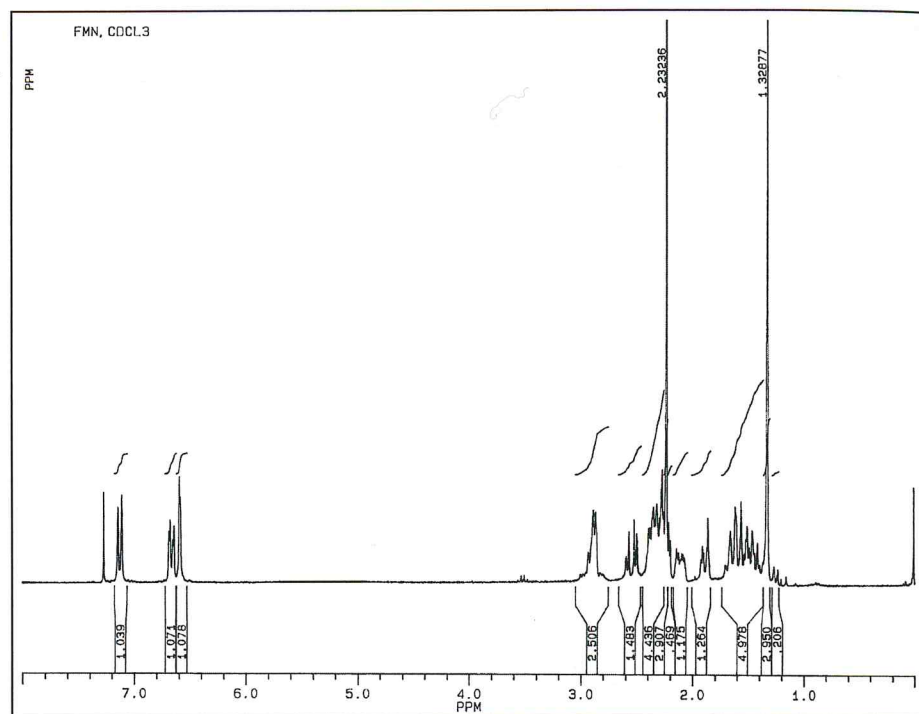
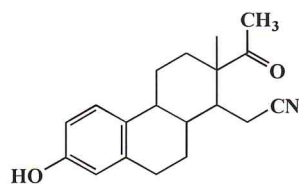
29

3-Hidroksi-17-keto-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril

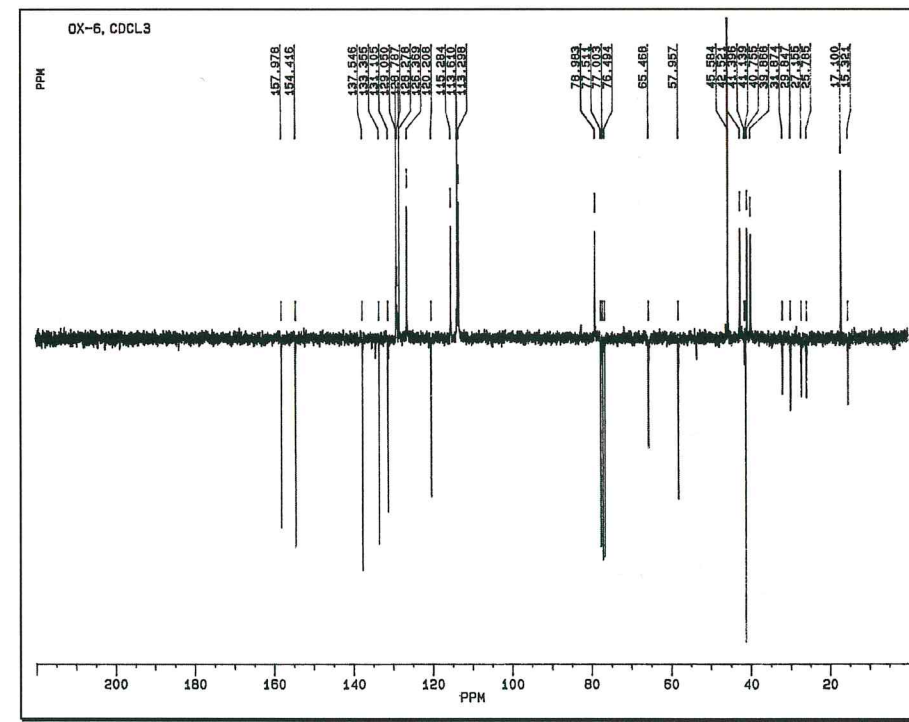
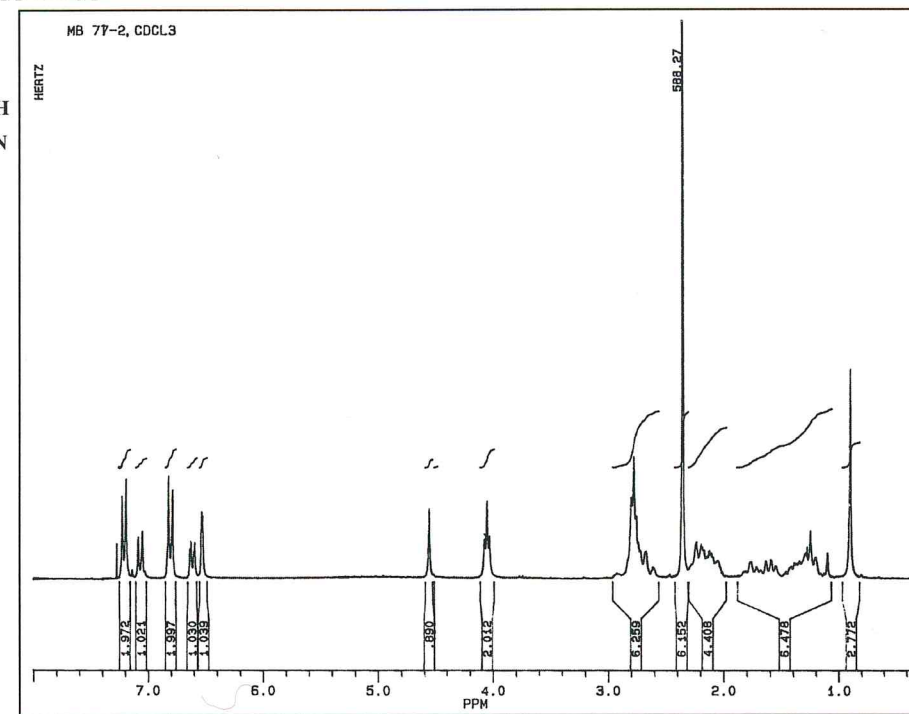
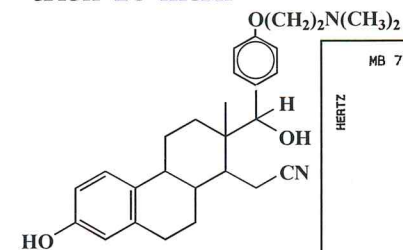


30

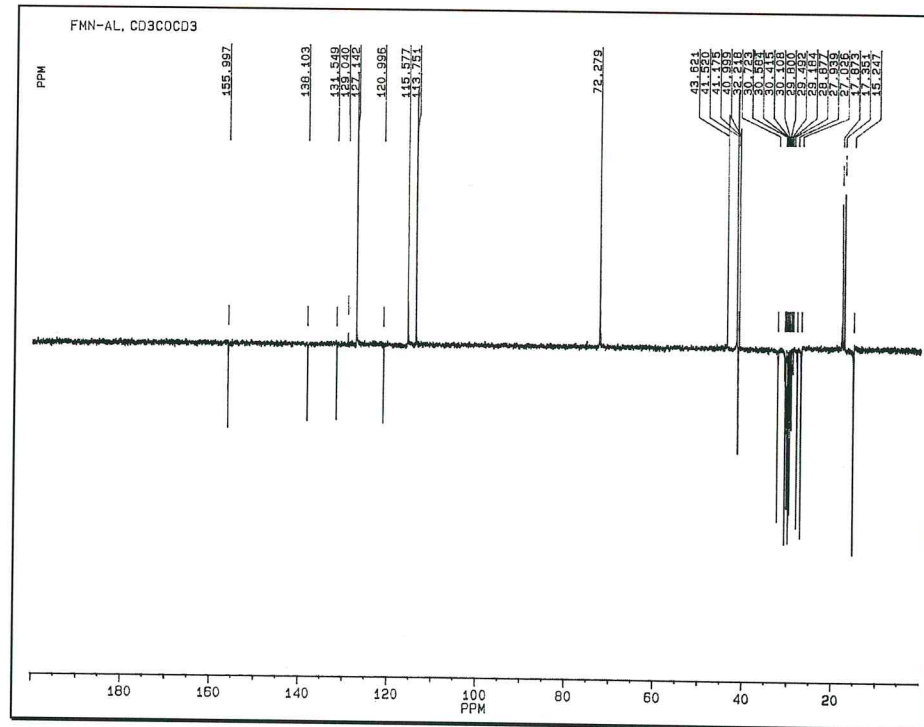
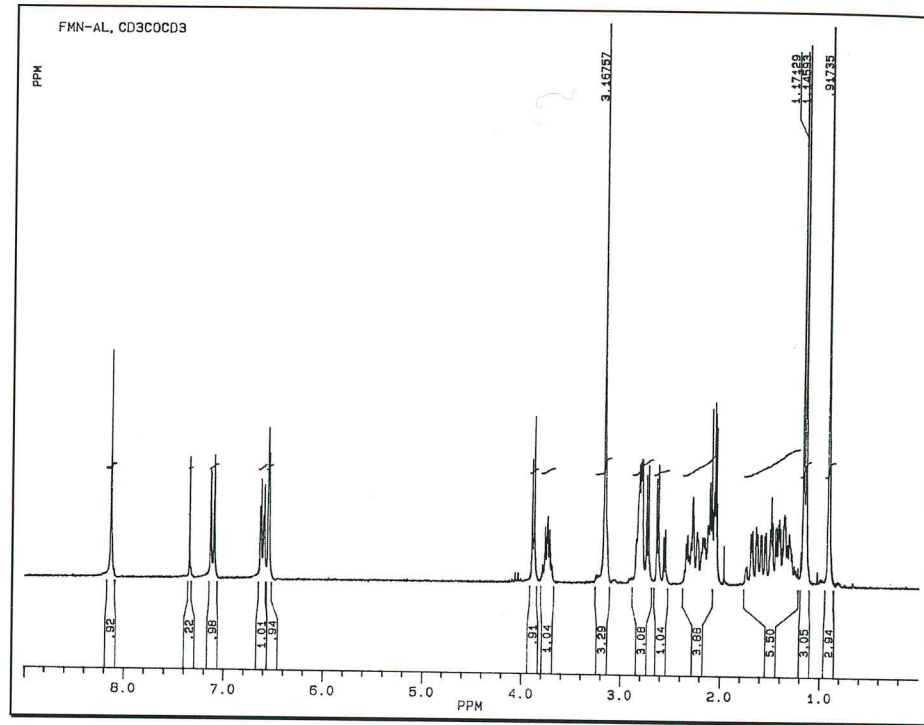
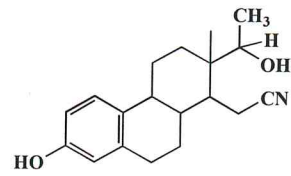
3-Hidroksi-17-keto-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril



3,17-Dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksijfenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril

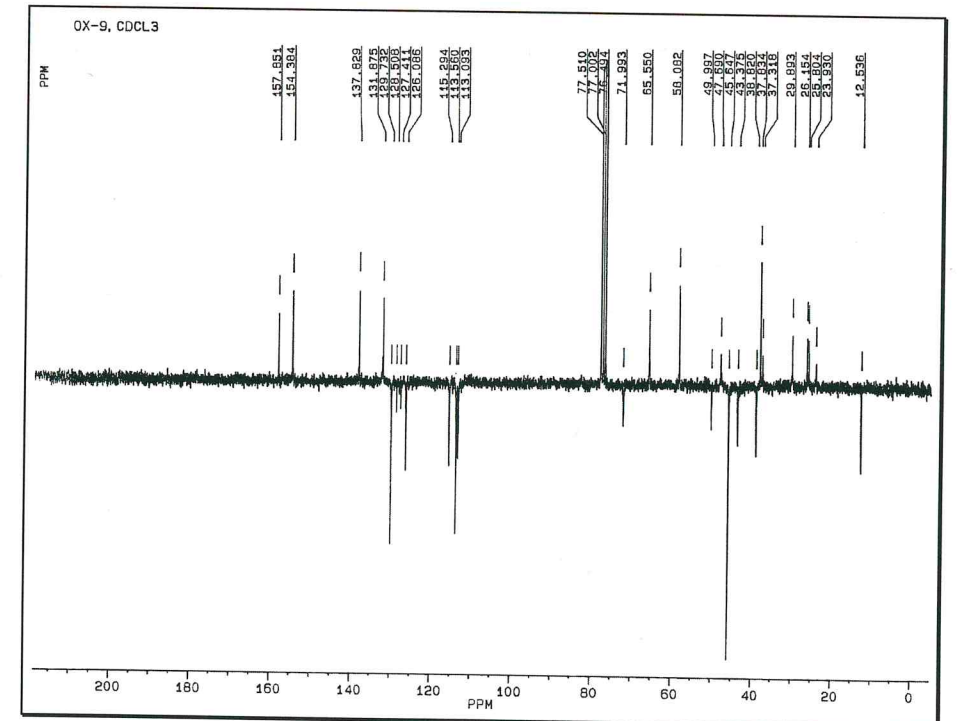
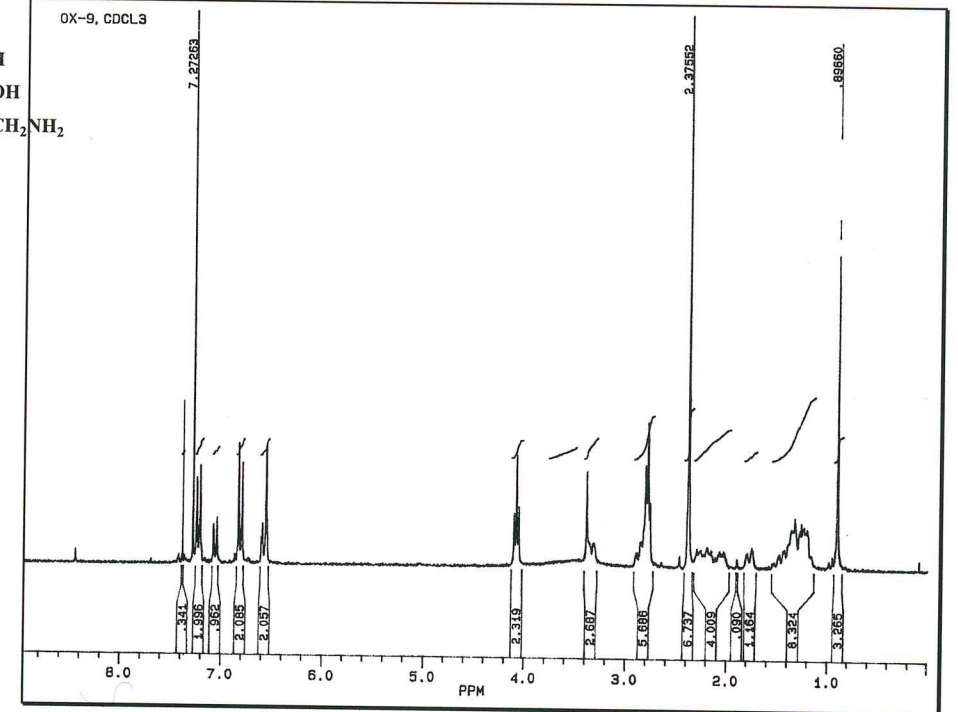
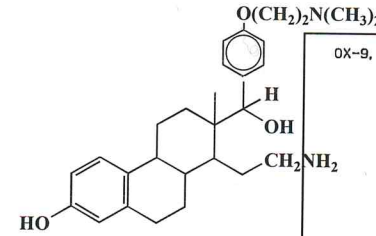


3,17-Dihidroksi-17-metil-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril



33

3,17-Dihidroksi-17-[4-[2-(dimetilamino)etoksi]fenil]-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-amin



34

8.2. Skraćenice

Ac	acetil
Am	amil
Bn	benzil
Bu	butil
CPBA	m-hloroperbenzoeva kiselina
DIBAH	diizobutilaluminijum-hidrid
DDQ	2,3-dihloro-5,6-dicijanobenzohinon
DMF	dimetilformamid
DMP	3,5-dimetilpirazol
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
Dx	dioksan
Et	etil
HMPA	heksametilfosforilamid
HMPT	heksametilfosforil-triamid
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
Me	metil
Ms	metansulfonil (mezil)
Ph	fenil
Pr	propil
Py	piridin
TBAB	tetrabutilamonijum-bromid
Tf	trifluorometansulfonil
TFA	trifluorosirćetna kiselina
TFAA	anhidrid trifluorosirćetne kiseline
THF	tetrahidrofuran
TMBA	trimetilbenzilamonijum
TMS	trimetilsilil
Ts	<i>p</i> -toluensulfonil (tozil)

9. BIOGRAFIJA

Mr Marija N. Sakač (rođ. Kinder) rođena je 28. februara 1959. godine u Vrbasu. Osnovnu, kao i Hemijsko-tehnološko-tehničku školu završila je u Vrbasu.

Prirodno-matematički fakultet (grupa Hemija) upisala je školske 1977/78. godine, a diplomirala je 1981. godine, sa prosečnom ocenom 9,00.

Poslediplomske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu (grupa Hemija) upisala je 1981. godine. Magistarski rad pod nazivom "Proučavanje hemijske reaktivnosti intermedijera u sintezi 21,27-bisnorsolanidinskih derivata" odbranila je 1985. godine.

U periodu od 13. novembra 1984. godine do 6. juna 1985. godine radila je u Obrazovnom centru "4. juli" u Vrbasu kao profesor hemije na određeno vreme.

U Institutu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, izabrana je 25. decembra 1985. godine za asistenta u naučno-istraživačkom radu iz oblasti Organska hemija. Za asistenta u vaspitno-obrazovnom radu, za naučnu oblast Organska hemija (Organska hemija II) izabrana je 12. novembra 1991. godine i na toj dužnosti se i danas nalazi.

Objavila je 19 naučnih radova i učestvovala sa 16 saopštenja na inostranim i domaćim naučnim skupovima. Koautor je 2 zaštićena patenta.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO - MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR
Identifikacioni broj:
IBR
Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD
Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ
Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR
Autor: Mr Marija N. Sakač
AU
Mentor: Dr Dušan Miljković, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu
MN

Naslov rada: Modifikovani B- i D-estranski derivati i njihova antiestrogena aktivnost
NR

Jezik publikacije: srpski (latinica)
JP
Jezik izvoda: s/en
JI
Zemlja publikovanja: SR Jugoslavija
ZP
Uže geogr. područje: AP Vojvodina
UGP
Godina: 1997.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ
Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3.
MA
Fizički opis rada: Broj poglavlja: 9. Strana: 139. Lit. citata: 117. Tabela: 4. Shema: 43. Slika: 14.
FO

Naučna oblast: Hemija
NO
Naučna disciplina: Organska hemija
ND

Predmetna odrednica/

Ključne reči: Derivati estradiola, D-sekoestranski derivati, antiestrogeni
PO

UDK:

Čuva se: Biblioteka Instituta za hemiju, PMF-a u Novom Sadu
ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

U radu su opisane sinteze novih B- i D-estranskih derivata u cilju dobijanja jedinjenja sa izmenjenim biološkim delovanjem u odnosu na izvornu hormonsku aktivnost polaznog estradiola, odnosno estrona. Odabrani predstavnici pomenutih klasa derivata podvrgnuti su odgovarajućim biološkim testovima.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 21. 11. 1996.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik:

Dr Julijana Petrović, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Član:

Dr Radmila Kovačević, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Član:

Dr Katarina Penov Gaši, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Član:

Dr Ivan Mićović, red. prof. Hemijskog fakulteta u Beogradu

Član:

Dr Dušan Miljković, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF NATURAL SCIENCES &
MATHEMATICS
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monography document

DT

Type of record:

Printed text

TR

Contents code:

PhD Thesis

CC

Author:

Marija N. Sakač, MSc

AU

Mentor:

Prof. Dr. Dušan Miljković, Faculty of Sciences, Novi Sad

MN

Title:

Modified B- and D-estrane derivatives and their antiestrogenic activity

TI

Language of text:

Serbian

LT

Language of abstract:

Ser./Engl.

LA

Country of publication:

Yugoslavia

CP

Locality of publication

Vojvodina

LP

Publication year:

1997.

PY

Publisher:

Autor's reprint

PU

Publ.place:

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

PP

Physical description:

Chapters: 9. Pages: 139. Literature: 117. Tables: 4. Schemes: 43. Pictures: 14.

PD

Scientific field:

Chemistry

SF

Scientific discipline:

Organic chemistry

SD

Subject/ key words: Estradiol derivatives, D-secoestrane derivatives, antiestrogens
SKW

UC:
Holding data: Institute of Chemistry (Library)
HD

Note:
N

Abstract: Pathways of synthesis of new B- and D-estrane derivatives were developed in order to get compounds with altered biological functions compared to hormone activity of the starting estradiol, i.e. estrone. The selected representatives of the afore-said classes of derivatives were subjected to biological tests.

AB

Accepted by the Scientific Board on: 21. 11. 1996.
Asb

Defended:
DE

Thesis defend board:
(Degree/name/surname/title/faculty)
DB

President: Prof. Dr. Julijana Petrović, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Member: Prof. Dr. Radmila Kovačević, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Member: Prof. Dr. Katarina Penov Gaši, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Member: Prof. Dr. Ivan Mićović, Faculty of Chemistry, University of Belgrade
Member: Prof. Dr. Dušan Miljković, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

