

Dimery steroidowe w medycynie, elektrochemii i chemii supramolekularnej

Lista publikacji będących przedmiotem niniejszego autoreferatu:

- H.1 Morzycki J.W., Kalinowski S., Łotowski Z., Rabczko J. „Synthesis of Dimeric Steroids as Components of Lipid Membranes”, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 10579-10590. *Wkład indywidualny – 60%*
- H.2 Morzycki J.W., Gryszkiewicz A., Lotowski Z., Szczepek W.J. „Reduction of 2-Nitro-5 α -cholestan-3-one, Its Enol Tautomer and 2-Nitro-5 α -cholest-2-en-3-amine Derivatives. Synthesis of Bis-Steroidal Pyrazines”, *Collect. Czech Chem. Commun.*, **1998**, 63, 1589-1596. *Wkład indywidualny – 50%*
- H.3 Łotowski Z., Gryszkiewicz A., Borowiecka J.B., Nikitiuk A., Morzycki J.W. „A Facile Synthesis of Symmetrical Dimeric Steroid-pyrazines”, *J. Chem. Res. (S)*, **1999**, 662-663. *Wkład indywidualny – 40%*
- H.4 Łotowski Z., Dubis E.N., Morzycki J.W. „Functionalization of Dimeric Cholestanopyrazines at the quasi-Benzyllic Position”, *Monatsh. Chem.*, **2000**, 131, 65-71. *Wkład indywidualny – 75%*
- H.5 Kalinowski S., Łotowski Z., Morzycki J.W. „The Influence of Bolaamphiphilic Steroid Dimer on the Formation and Structure of Bilayer Lipid Membranes”, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **2000**, 5, 107-118. *Wkład indywidualny – 25%*
- H.6 Łotowski Z., Morzycki J.W., Niewczas I.S., Zdanowicz M. „Synthesis of *cis* and *trans* Isomers of D-Ring Linked Bis-Steroid Pyrazines from 16 α -Bromo-17-oxosteroids”, *Collect. Czech Chem. Commun.*, **2002**, 67, 47-54. *Wkład indywidualny – 60%*
- H.7 Łotowski Z. „Kwasy Żółciowe Jako Komponenty Architektoniczne w Chemii Supramolekularnej”, *Wiad. Chem.*, **2003**, 57, 1093-1132. *Wkład indywidualny – 100%*
- H.8 Łotowski Z., Guzmański D. „New Cyclic Dimers of Cholic Acid”, *Monatsh. Chem.*, **2005**, 136, 153-158. *Wkład indywidualny – 85%*
- H.9 Łotowski Z., Guzmański D. „New Acyclic Dimers of Cholic Acid with Oxamide and Hydrazide Spacers”, *Monatsh. Chem.*, **2006**, 137, 117-124. *Wkład indywidualny – 85%*
- H.10 Łotowski Z., Piechowska J., Jarocki Ł. „Dimeric Cholaphanes with Oxamide Spacers”, *Monatsh. Chem.*, **2008**, 139, 213-222. *Wkład indywidualny – 75%*
- H.11 Kowalski J., Łotowski Z., Morzycki J.W., Płoszyńska J., Sobkowiak A., Wilczewska A.W. „Unusual Electrochemical Oxidation of Cholesterol”, *Steroids*, **2008**, 73, 543-548. *Wkład indywidualny – 20%*
- H.12 Łotowski Z., Kulesza U. „Studies on the Synthesis of Cholane Derivatives Containing a Mercapto Group and Their Dimers with Disulfide Spacers. Part 1. 24-Mercapto-5 β -cholane-3 α ,7 α ,12 α -triol and Its C(24)–C(24') Disulfide Dimer”, *J. Sulfur Chem.*, **2010**, 31, 97-102. *Wkład indywidualny – 85%*
- H.13 Morzycki J.W., Łotowski Z., Siergiejczyk L., Wałejko P., Witkowski S., Kowalski J., Płoszyńska J., Sobkowiak A. „A Selective Electrochemical Method of Glycosylation of 3 β -Hydroxy- Δ^5 -Steroids”, *Carbohydrate Res.*, **2010**, 345, 1051-1055. *Wkład indywidualny – 25%*

- H.14 Łotowski Z., Kulesza U., Tomkiel A.M. „Studies on the Synthesis of Cholane Derivatives Containing a Mercapto Group and Their Dimers with Disulfide Spacers. Part 2. 3 α -Mercapto-5 β -cholane-7 α ,12 α ,24-triol and Its C(3)–C(3') Disulfide Dimer”, *J. Sulfur Chem.*, **2010**, *31*, 525-532. *Wkład indywidualny – 75%*
- H.15 Brzezinski K., Tomkiel A.M., Łotowski Z., Morzycki J., Dauter Z. „Bis[3 α ,7 α ,12 α -tris(4-nitrobenzoxy)-5 β -cholan-24-yl] Disulfide-Ethyl Acetate-*n*-Hexane (4/4/1)”, *Acta Crystallogr. E*, **2011**, *E67*, o74-o75 (+ supplementary materials, sup1-sup45). *Wkład indywidualny – 35%*

Wstęp

Steroidy są grupą związków naturalnych szeroko występujących zarówno w świecie roślin, jak i zwierząt, pełniących ważne funkcje w układach biologicznych. Od czasu poznania prawidłowej budowy cząsteczek najważniejszych związków steroidowych (cholesterolu i kwasu cholowego w latach 20. XX wieku [W.1]) obserwuje się trwający nieprzerwanie do dziś intensywny rozwój tej gałęzi chemii organicznej. Wpływa na to niewątpliwie fakt, iż związki te wykazują silne działanie fizjologiczne: należą do nich tak aktywne substancje jak hormony płciowe, kwasy żółciowe, hormony kory nadnerczy, witaminy z grupy D, glikozydy nasercowe i inne. Natomiast ze względu na swoją budowę (sztywna konformacja oraz ściśle określona konfiguracja na poszczególnych centrach stereogenicznych) steroidy stanowią doskonały układ modelowy, zarówno w analizie konformacyjnej, jak i badaniach przebiegu stereochemicznej reakcji chemicznych. Leki steroidowe, (popularnie nazywane sterydami, przez większość ludzi utożsamiane ze sterydami anabolicznymi stosowanymi przez sportowców w celu zwiększenia masy mięśniowej), zarówno naturalne, jak i syntetyczne, stosuje się szeroko w terapii wielu chorób, m. in. alergicznych, dermatologicznych, endokrynologicznych, układu krwionośnego, kostno-szkieletowego, nowotworowych czy przy przeszczepianiu narządów.

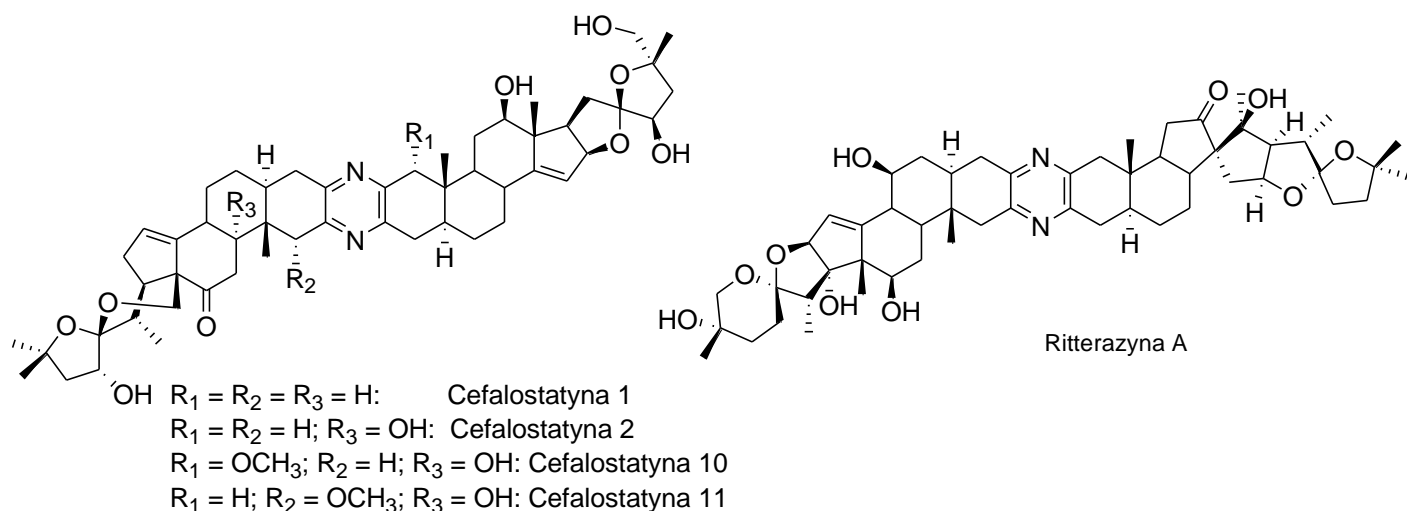
Tworzenie się dimerów steroidowych zaobserwowano po raz pierwszy w trakcie badań fotochemicznych nad ergosterolem [W.2] oraz w syntezie organicznej jako produktów ubocznych niektórych reakcji chemicznych [W.1, W.3]. Wkrótce ich obecność stwierdzono również w naturze [W.4]. Duże zainteresowanie chemików na całym świecie tego typu strukturami ma bez wątpienia związek z tym, iż dimeryzacja szkieletu steroidowego stwarza cały szereg nowych, często unikalnych możliwości zastosowań takich układów w wielu dziedzinach nauki i gospodarki. Dimery steroidowe wykorzystuje się jako detergenty i ciekłe kryształy [W.5], jako katalizatory w niektórych reakcjach organicznych [W.6] oraz w medycynie jako nowa linia farmakologicznie aktywnych steroidów [W.7]. Z tego względu opracowanie wydajnych metod syntezy takich układów wydaje się potrzebne i celowe.

W trakcie wykonywania pracy habilitacyjnej autor miał styczność z różnymi aspektami chemii steroidów, głównie z syntezą dimerów steroidowych o różnorodnej budowie i potencjalnych zastosowaniach, ale również z elektrochemicznymi metodami utleniania i glikozylacji steroidów oraz otrzymywaniem azotowych analogów inhibitorów enzymów. Badania te przeprowadzone zostały w Zakładzie Chemii Produ-

któw Naturalnych Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka W. Morzyckiego, któremu autor pragnie gorąco podziękować za pomoc i wsparcie w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy.

1. Dimery steroidowe w medycynie

Jednym z rezultatów szeroko zakrojonych poszukiwań preparatów przeciwnowotworowych, prowadzonych w USA od lat 50-tych ubiegłego wieku, było odkrycie dwóch rodzin bis-steroidowych pirazyn o niezwykle silnych właściwościach cytostatycznych: cefalostatyn, obecnych w ekstraktach z małych (ok. 5 mm) robaczek morskich *Cephalodiscus gilchristi*, oraz ritterazyn, występujących w osłonicach *Ritterella tokioka* [1.1] (Schemat 1).



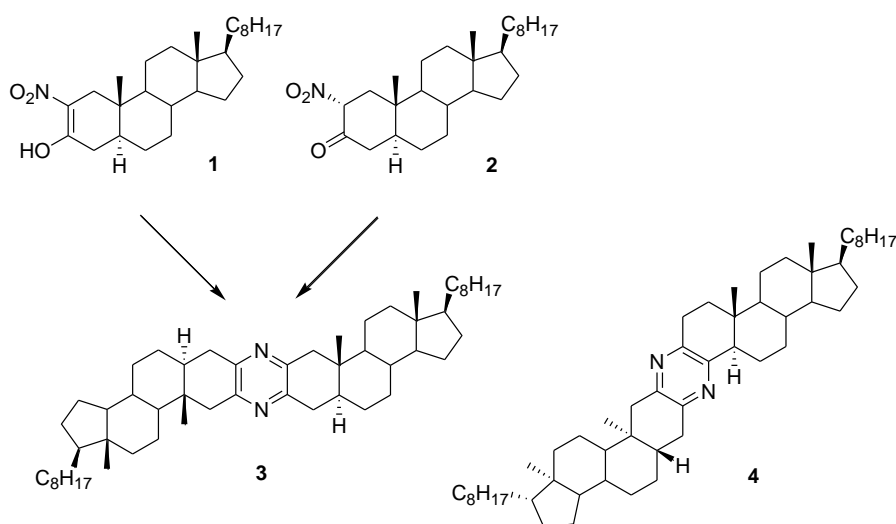
Schemat 1.

Obecnie znanych jest ok. 45 przedstawicieli obu grup związków. Cechą wspólną tych alkaloidów jest bez wątpienia ich budowa steroidowa. Wszystkie cefalostatyny i ritterazyny są związkami trisdekacyklicznymi, w których obie podjednostki steroidowe połączone są w pozycji 2,3 pierścieniem pirazynowym. Większość z nich to związki niesymetryczne, różniące się lewą i prawą częścią steroidową. Wspólnymi elementami strukturalnymi są także: układ spirostanowy, wiązanie podwójne C(14)–C(15) oraz duża liczba grup hydroksylowych.

Wysoka aktywność biologiczna omawianych związków oraz ograniczona dostępność ze źródeł naturalnych (139 mg cefalostatyny 1 wyodrębniono ze 166 kg mokrej masy organizmów), skłoniły chemików organicznych do podjęcia prób ich syntezy. Po raz pierwszy cel ten udało się osiągnąć zespołowi Fuchsa w 1998 roku [1.2].

Kluczowym etapem w syntezie tego typu związków jest konstrukcja centralnego pierścienia pirazynowego. Znanych jest wiele różnych metod, prowadzących do jego otrzymania. Symetryczne bis-steroidowe pirazyny otrzymywane były klasyczną metodą kondensacji α -aminoketonów [1.3]. Mieszanka tworzących się początkowo dihydropirazyn ulega samorzutnemu utlenieniu na powietrzu. Wyjściowe α -aminoketony otrzymuje się zazwyczaj w wyniku redukcji 3-ketonów z podstawnikiem zawierającym azot w pozycji 2, np. grupę azydową lub hydroksyiminową [1.4].

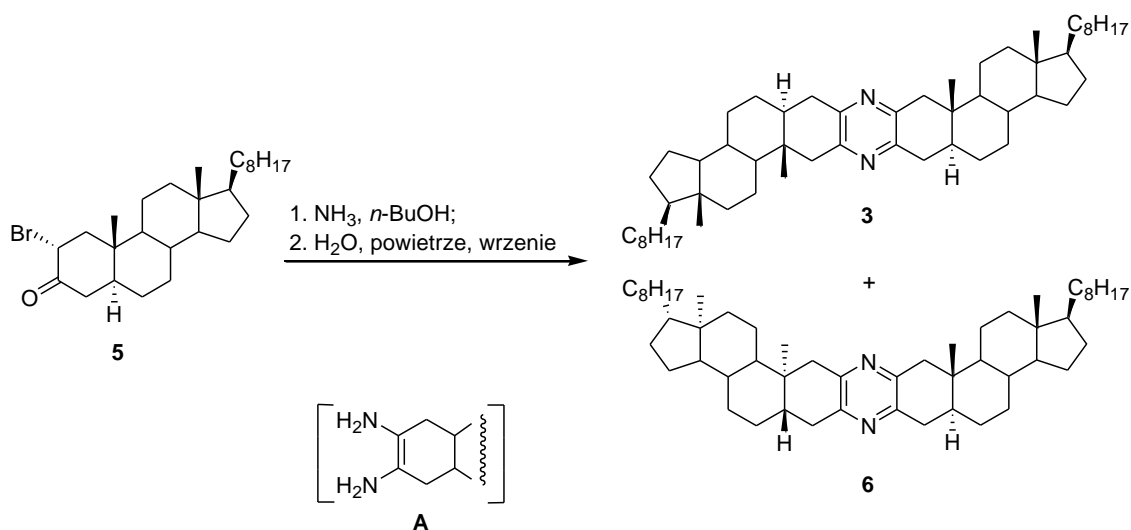
Zachęcające rezultaty prowadzonych przeze mnie wcześniej badań nad nitrowaniem *N*-acetyloenamin, w tym 3-acetyloamino-5 α -cholest-2-enu [1.5], oraz brak doniesień literaturowych na temat syntezy układów pirazynowych z α -nitroketonów, skłoniły mnie do przeprowadzenia eksperymentów nad redukcją tych stosunkowo łatwo dostępnych substratów [1.6], czego rezultatem mogłaby być nowa metoda otrzymywania bis-steroidowych pirazyn. 2-Nitro-5 α -cholestan-3-on istnieje w dwóch względnie trwałych formach tautomerycznych. Preferowaną jest – tworząca się w środowisku kwaśnym bądź zasadowym – forma enolowa **1** z silnym wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym (Schemat 2). Steroidowe 2 α -nitro-3-ketony (np. **2**) są również znane i można je otrzymywać z wysokimi wydajnościami [1.6d]. Redukcji w różnych warunkach zostały poddane różne 2-nitrozwiązki steroidowe, m. in. 2-nitroenol **1** i 2 α -nitro-3-keton **2** (Schemat 2). Bis-cholestanopirazyna **3** utworzyła się z dobrą wydajnością w wyniku redukcji związków **1** i **2** za pomocą cynku w kwasie octowym. Zastąpienie w późniejszych eksperymentach cynku żelazem spowodowało dość znaczny spadek wydajności reakcji (z 51% do 11% w przypadku substratu **1**). Ponieważ w pierwszych próbach poddawałem redukcji surowy 2 α -nitroketon **2**, zawierający ok. 14% izomeru 4 α , dodatkowo powstał izomeryczny dimer **4** jako produkt krzyżowej kondensacji przejściowo tworzących się 2-amino- i 4-amino-3-ketonów.



Schemat 2.

Powyższa dwuetapowa procedura syntezy symetrycznych steroidowych bis-pirazyn z 3-ketonów wydaje się być lepszą od znanych dotychczas metod [H.2].

Jak już wcześniej wspomniałem, jednymi z najbardziej użytecznych prekursorów α -aminoketonów są α -azydoketony, łatwo otrzymywane z odpowiednich α -bromoketonów. Te ostatnie mogą reagować bezpośrednio z amoniakiem, dając α -aminoketony i, ostatecznie, pirazyny. Reakcje takie, jak dotąd, nie były opisane w literaturze. W związku z tym celem kolejnych moich eksperymentów było zbadanie możliwości wykorzystania steroidowych α -bromoketonów w syntezie symetrycznych dimerów bis-pirazykowych. Reakcję 2 α -bromo-5 α -cholestan-3-onu (**5**) z amoniakiem przeprowadziłem w *n*-butanolu pod niewielkim ciśnieniem (4-5 atm) gazowego NH₃ w temperaturze pokojowej (Schemat 3). Synteza dobiegła końca po kilkunastu godzinach, dając bardzo polarny produkt. Obecność grupy aminowej potwierdził pozytywny wynik testu na alkaloidy z odczynnikami Dragendorffa. Najprawdopodobniej w reakcji powstała diamina **A**, która nie może samorzutnie przekształcić się w pirazynę. W celu otrzymania dimeru, związek **A** należało poddać częściowej hydrolizie do 2-amino-3-ketonu lub 3-amino-2-ketonu. Dlatego surowy produkt po reakcji z amoniakiem gotowałem z dodatkiem wody i przy dostępie powietrza przez kolejną dobę. W rezultacie otrzymałem mieszaninę *trans*- i *cis*-di(5 α -cholestan)pirazyń (**3** i **6**).



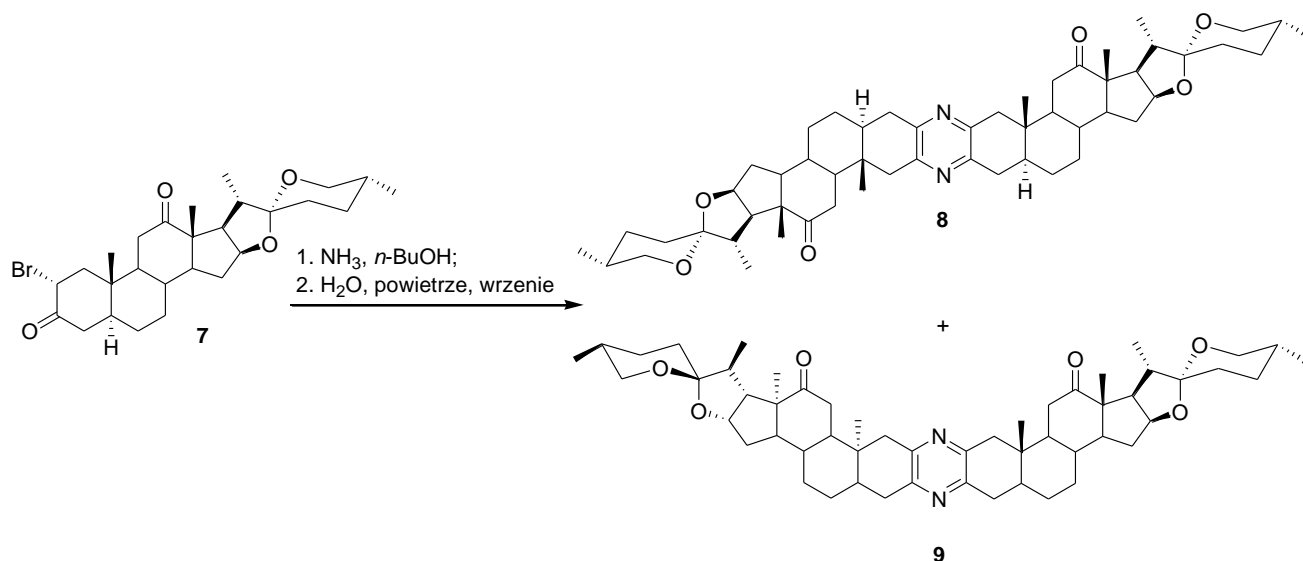
Schemat 3.

Rozpuszczalność obu dimerów w rozpuszczalnikach organicznych różni się znacząco, co pozwala na łatwy ich rozdział. Główny produkt, izomer *trans* **3**, otrzymałem z blisko 40% wydajnością w wyniku krystalizacji z toluenu, zaś izomer *cis* **6** wydzieliłem drogą chromatografii kolumnowej z roztworu macierzystego z wydajnością 23%. Takie same produkty otrzymano wcześniej w reakcji cholestan-2,3-dionu z cholestan-2 α ,3 α -diaminą [1.4a]. Brak selektywności w obu procedurach jest niewątpliwie ich ujemną stroną, jednakże, ze względu na znacznie łatwiejsze przygotowanie substratu (jednego) i prostotę całego procesu, prezentowana metoda wydaje się być bardziej efektywna i tańsza.

Z uwagi na niemal identyczne widma rezonansowe ¹H NMR i ¹³C NMR obu izomerów, rozróżnienie ich tymi metodami jest praktycznie niemożliwe. Niewielkie różnice w przesunięciach sygnałów atomów węgla przy pierścieniu heteroaromatycznym (*trans*: 148.5, 149.0; *cis*: 148.4, 149.1) nie mają wartości dia-

gnostycznych dla układu di(5 α -cholestanopirazyiny. Jednakże istnieje prosta metoda identyfikacji obu izomerów metodą TLC, pod warunkiem posiadania wzorców obu związków (izomer *trans* jest mniej polarny).

Stosując tę procedurę przeprowadziłem syntezę obu izomerów geometrycznych di(25*R*-12-okso-5 α -spirostano)pirazyin (**8** i **9**), stosując jako substrat (25*R*)-2 α -bromo-5 α -spirostano-3,12-dion (**7**; Schemat 4).



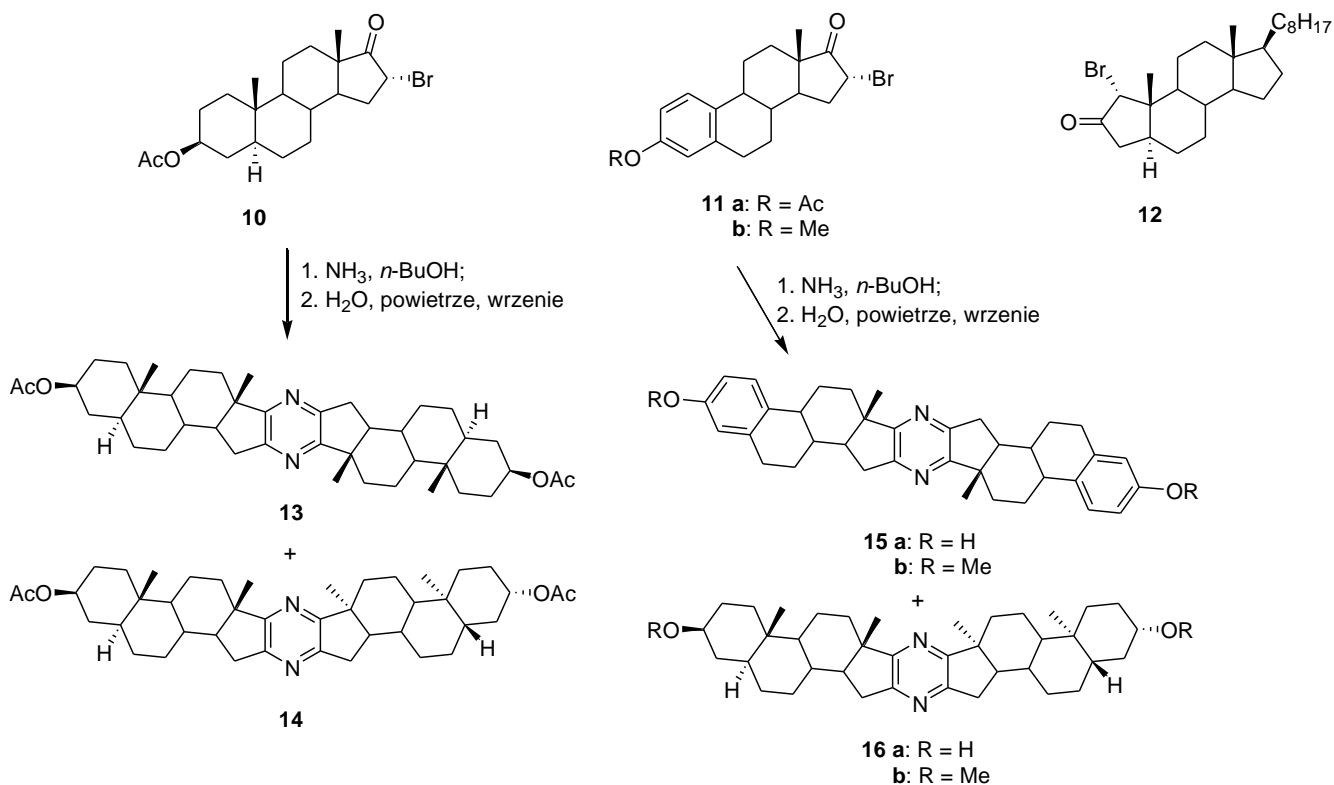
Schemat 4.

Sumaryczna wydajność obu produktów (stosunek ilościowy izomeru *trans* i *cis* wynosił w przybliżeniu 1 : 1) była w tym przypadku niższa (ok. 40%), prawdopodobnie z powodu obecności dodatkowej grupy karbonylowej na atomie węgla C-12 [**H.3**].

W naturalnych układach bis-pirazynowych i ich syntetycznych analogach pierścienie pirazynowy skondensowany jest z jednostkami steroidowymi poprzez sześcioczłonowe pierścienie A. Opisano również syntezę dimerycznych steroidowych pirazyin poprzez pięcioczłonowe pierścienie D [1.7]. Moje kolejne badania były w związku z tym próbą rozszerzenia opisaną powyżej metody dimeryzacji na pięcioczłonowe cykliczne α -bromoketony steroidowe.

Eksperymenty objęły serię czterech α -bromoketonów. Trzy z nich to 16 α -bromo-17-ketony (**10**, **11a** i **11b**), będące pochodnymi androstan-3 β -ol-17-onu i estronu, czwarty zaś to 1 α -bromo-4-nor-5 α -cholestan-2-on **14** (Schemat 5). W wyniku reakcji bromoketon **10** utworzył mieszaninę izomerycznych pirazyin *trans* (**13**) i *cis* (**14**) w stosunku molowym 1 : 1 (określonym na podstawie integracji sygnałów grup 18-metylowych w widmie ¹H NMR) z łączną wydajnością bliską 40%. Jednakże rozdział izomerów okazał się tym razem trudniejszy: metoda krystalizacji zawiodła, a częściowy rozdział osiągnięty został przez powolną chromatografię kolumnową. Podobna transformacja, przeprowadzona z udziałem 3-acetoksy-16 α -bromoestra-1,3,5(10)-trien-17-onu **11a** (Schemat 5) doprowadziła do powstania krystalicznej substancji (prawdopodobnie mieszaniny dimerów **15a** i **16a**), praktycznie nierozpuszczalnej w szeregu powszechnie stosowanych rozpuszczalników. Z tego względu charakterystyka widmowa otrzymanych produktów okazała

się trudna do przeprowadzenia. Wykonane widmo IR w pastylce KBr wykazało zanik pasm karbonylowych zarówno estrowych, jak i ketonowych, oraz obecność pasma absorpcji drgań grupy O-H, co wskazywało jednoznacznie na hydrolizę grup octanowych w czasie reakcji. Z kolei nieobecność ketonowego pasma absorpcji sugerowała powstanie oczekiwanych pirazyn. Niestety, nie powiodły się próby utworzenia pochodnych (np. poprzez alkiłowanie bądź acetylowanie na atomie tlenu), których lepsza rozpuszczalność pozwoliłaby na przeprowadzenie dalszych badań spektroskopowych. Dlatego w kolejnym eksperymencie użyłem jako substratu pochodnej estranu **11b**, zawierającej nie ulegającą hydrolizie grupę metoksy w pozycji 3. Zgodnie z oczekiwaniem, powstała mieszanina *trans*- i *cis*-dimerów (**15b** i **16b**), wyraźnie lepiej rozpuszczalnych niż poprzednio otrzymane, w stosunku molowym 43 : 57 z łączną wydajnością 21%. Konfiguracja *cis* głównego produktu została ustalona przez porównanie wartości przesunięć chemicznych sygnałów grup 18-metylowych w widmie ^1H NMR oraz aromatycznych atomów węgla w widmie ^{13}C NMR z analogicznymi wartościami otrzymanymi dla dimerów z serii androstanu (**13** i **14**).

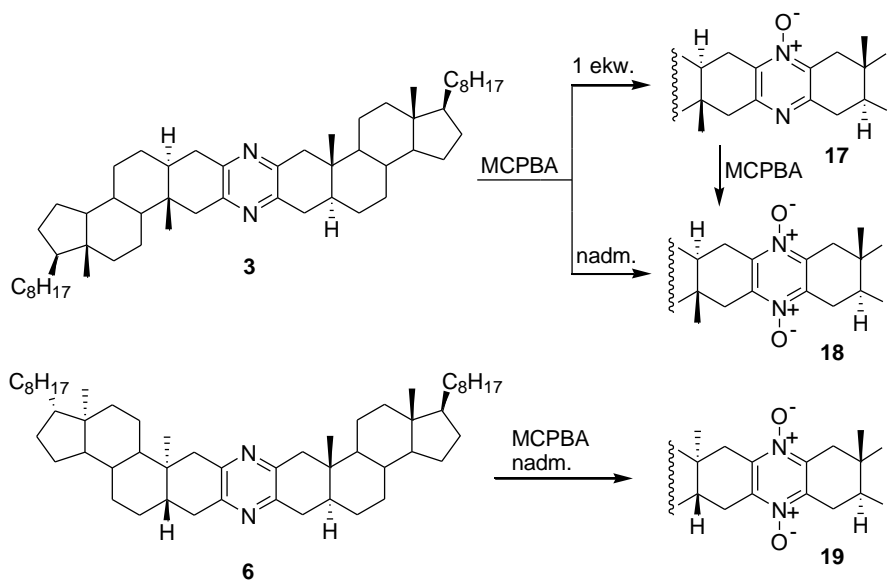


Schemat 5.

Z kolei reakcja bromoketonu **12**, przeprowadzona w identycznych warunkach jak ze związkami **10**, **11a** i **11b**, nieoczekiwanie zakończyła się utworzeniem złożonej mieszaniny produktów, niezawierających atomów azotu w cząsteczkach. Najprawdopodobniej w tym przypadku amoniak reaguje w pierwszym etapie tylko z karbonylowym atomem węgla, a – po dodaniu wody i gotowaniu – mają miejsce inne reakcje, np. eliminacja HBr, hydroliza bromku lub utlenianie produktów eliminacji. Tworzące się początkowo iminy lub enaminy ulegają również hydrolizie z odtworzeniem grupy karbonylowej.

Z przeprowadzonych badań można wysnuć wniosek, iż bezpośrednią metodę syntezy pirazyn z zastosowaniem gazowego NH_3 można rozszerzyć również na pięcioczłonowe cykliczne α -bromoketony, jednakże procedura ta nie jest ogólna i może być stosowana tylko wobec takich α -bromoketonów, które są w stanie reagować z amoniakiem na obu centrach elektrofilowych, tj. karbonylowym atomie węgla i węglu podstawionym atomem bromu. W przypadku, gdy ten drugi atom węgla sąsiaduje z węglem czwartorzędowym (np. C-10 w **12**), amoniak reaguje tylko z karbonylowym atomem węgla, co – przy równoczesnym braku podstawienia jonu bromkowego przez amoniak – nie prowadzi do utworzenia układów bis-pirazynowych [**H.6**].

Jak wspomniałem na wstępie, cefalostatyny należą do najsilniejszych znanych obecnie cytostatyków, przewyższających swą aktywnością standardowe chemioterapeutyki, takie jak taksol, cisplatyna, adriamycyna, czy 5-fluorouracyl. Spośród cefalostatyn największą cytotoksyczność wykazuje cefalostatyna 1, cefalostatyna 2 (hydroksylowana w pozycji C-9'), oraz ich 1α -metoksy- i $1'\alpha$ -metoksy pochodne (cefalostatyna 10 i cefalostatyna 11; Schemat 1). Także syntetyczne analogi cefalostatyn, funkcjonalizowane w pozycji C-1 (*quasi*-benzylowej), wykazują równie silną aktywność [1.3]. Z tego względu podjąłem próby wprowadzenia grup funkcyjnych w tę pozycję. Jako związki modelowe do badań wykorzystałem di-5 α -cholestanopirazyny **3** i **6** (Schemat 3) oraz ich *N*-tlenki **17** – **19**, w łatwy sposób otrzymywane w reakcji z równomolową ilością lub nadmiarem MCPBA (Schemat 6).

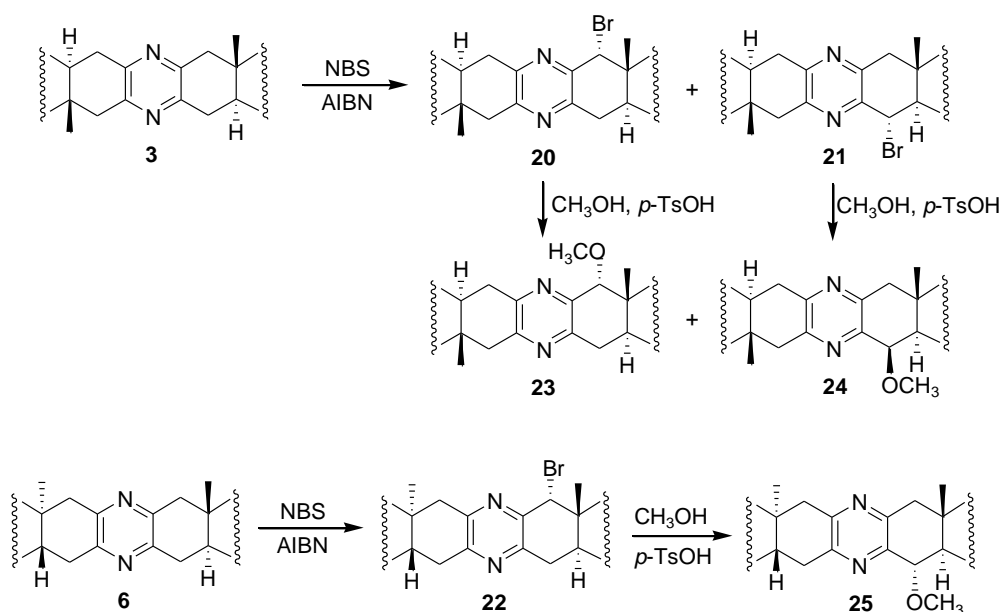


Schemat 6.

Oba izomery **3** i **6** oraz ich di-*N*-tlenki **18** i **19** posiadają dwukrotną oś symetrii (C_2), w przeciwieństwie do mono-*N*-tlenku izomeru *trans* (**17**), który jest C_1 -symetryczny. Izomer *cis* (**6**) tworzy również dwa mono-*N*-tlenki, oba o symetrii C_2 , jednakże – ze względu na to, iż ich rozdzielanie metodą chromatografii kolumnowej jest praktycznie niemożliwe – ich mieszanina została przekształcona w di-*N*-tlenek **19**.

Przeprowadziłem szereg prób utlenienia związków **3**, **6**, **17**, **18** i **19** w różnych warunkach, m. in. za pomocą CrO_3/Py , CrO_3/AcOH , $\text{CrO}_3/\text{Ac}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{KMnO}_4/\text{CuSO}_4$, $\text{SeO}_2/t\text{-BuOOH}$, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, jednakże nie otrzymałem produktu utleniania w pozycji *quasi*-benzylowej. Próby wprowadzenia grupy acetoksyłowej w tę

pozycję poprzez działanie bezwodnikiem octowym na *N*-tlenki [1.8] także nie przyniosły spodziewanego rezultatu. Sukcesem natomiast zakończyły się reakcje rodnikowego bromowania dimerów **3** i **6** z równomolowymi ilościami NBS wobec AIBN (w reakcjach z *N*-tlenkami tworzyły się złożone mieszaniny). Bromowanie zachodziło, zgodnie z oczekiwaniem, selektywnie w pozycji *quasi*-benzylowej (Schemat 7). W przypadku izomeru *trans* (**3**) otrzymałem mieszaninę 1 α - i 4 α -bromopochodnych **20** i **21** w proporcji 2 : 1 z łączną wydajnością 44%. Czysty bromek **20** można wyodrębnić z mieszaniny drogą krystalizacji. Z kolei monobromowanie izomeru *cis* (**6**) prowadziło selektywnie do odpowiedniej 1 α -bromopochodnej **22** z wydajnością 28%. W obu przypadkach atom bromu atakował pirazynę z mniej zatłoczonej strony α . Obserwowana regioselektywność wynika najprawdopodobniej z niższej energii rodnika węglowego C-1. Otrzymane bromki **20** – **22** poddałem metanolizacji wobec *p*-TsOH jako katalizatora (Schemat 7). W tych warunkach preferowany jest mechanizm reakcji typu S_N1, przebiegający z utworzeniem relatywnie trwałego karbokationu *quasi*-benzylowego, a powstawanie produktów odbywa się pod kontrolą termodynamiczną. I tak, metanoliza 1 α -bromków **20** i **22** przebiegała z zachowaniem konfiguracji, dając etery **23** i **25**, natomiast w przypadku 4 α -bromopochodnej (**21**) obserwowałem inwersję konfiguracji i w rezultacie powstanie 4 β -metoksypochodnej **24**. Otrzymane wyniki zgodne są z przeprowadzonymi wcześniej teoretycznymi obliczeniami względnej trwałości (tj. energii sterycznej) dla serii *trans*- i *cis*-di-5 α -cholestanopirazyń w szeregu α i β .



Schemat 7.

Ustalenie konfiguracji grup metoksyowych w związkach **23** – **25** odbyło się w oparciu o ich widma ¹H NMR przy udziale techniki NOE. Wymiana jonu bromkowego na grupę OCH₃ przebiega szybciej w pozycji C-4 niż C-1, w związku z czym możliwe jest także przeprowadzenie rozdziału kinetycznego mieszaniny 1 α - i 4 α -bromków (**20** i **21**) poprzez jej transformację w łatwo ulegającą rozdziałowi mieszaninę bromku **20** i eteru **24** [H.4].

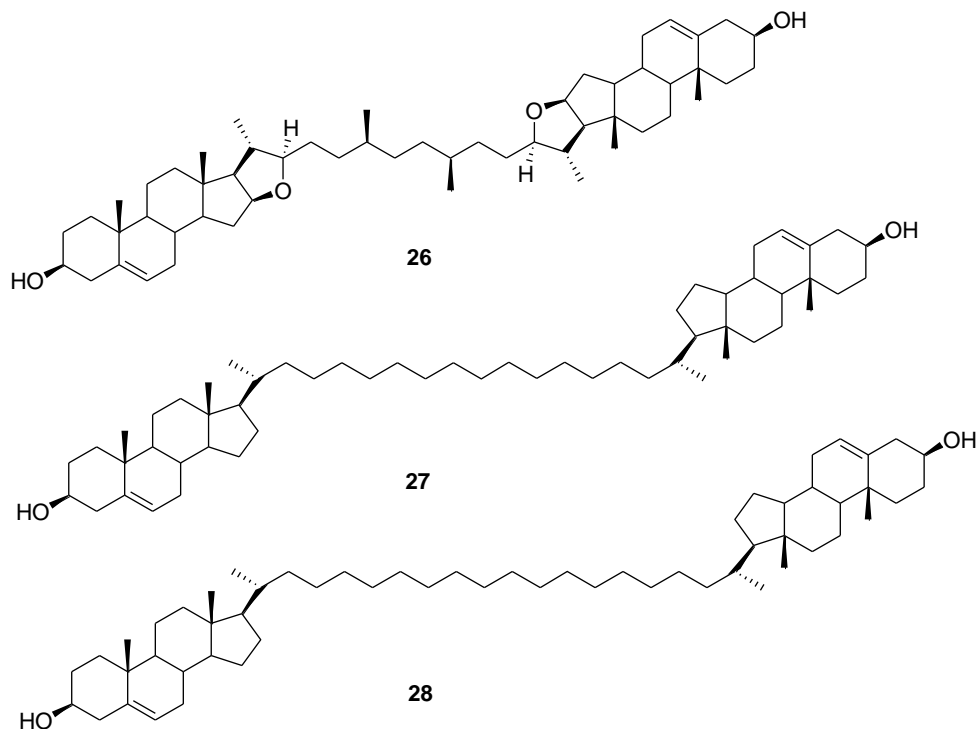
2. Dimery steroidowe w elektrochemii

Podstawową formą, w jakiej występuje większość fosfolipidów i glikolipidów w środowisku wodnym, jest dwucząsteczkowa warstwa, nazywana także dwuwarstwą lipidową [2.1]. Fakt ten ma doniosłe znaczenie biologiczne: fosfolipidy są bowiem kluczowymi elementami strukturalnymi błon biologicznych ze względu na łatwość, z jaką tworzą duże, dwucząsteczkowe warstwy. Ponadto warstwy te pełnią funkcję barier przepuszczalności, pomimo tego, iż są całkowicie płynne.

Tworzenie dwuwarstw lipidowych jest procesem samoorganizacji [2.2], którego podstawową siłą napędową są oddziaływania hydrofobowe [2.3]. Siły Van der Waalsa powodują zwarte ułożenie reszt węglowodorowych. Tworzeniu dwuwarstw sprzyjają także oddziaływania elektrostatyczne oraz typu wiązania wodorowego, zachodzące pomiędzy grupami polarnymi lipidów i cząsteczkami wody. Czynnikiem, regulującym płynność błon u organizmów eukariotycznych, jest cholesterol [2.4]. Związek ten zapobiega procesom krystalizacji poprzez wnikanie pomiędzy acylowe łańcuchy reszt kwasowych, powoduje również swoją obecnością znaczne ograniczenie swobodnej rotacji łańcuchów, zmniejszając w ten sposób płynność membrany.

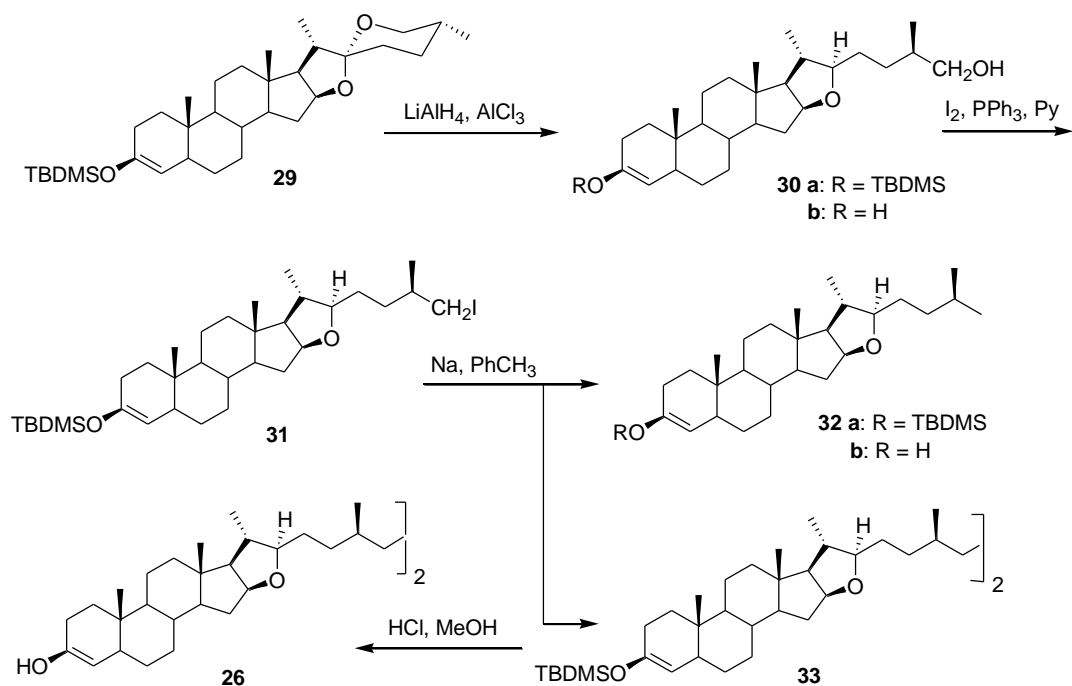
Główną przeszkodą, stojącą na drodze do szerokiego stosowania sztucznych błon lipidowych, jest ich mała stabilność oraz stosunkowo długi czas tworzenia. Podejmowane próby zwiększenia stabilności, (np. poprzez polimeryzację wewnątrz dwuwarstwy), zakończyły się tylko częściowym sukcesem [2.5]. Z drugiej strony Natura wytworzyła wyjątkowo stabilne i trwałe membrany, odporne np. na wysokie temperatury czy działanie kwasów. Niektóre mikroorganizmy, np. *Thermoplasma acidophilum*, przystosowane są do życia we wrzącej wodzie gorących źródeł i gejzerów, gdyż ich błony komórkowe zawierają bolaamfifilowe lipidy, posiadające dwie grupy polarne rozdzielone długim łańcuchem węglowodorowym, „spinające” monowarstwy ze sobą. Syntetyczne lipidy o podobnej budowie opisano w literaturze [2.6]. Należało oczekiwać, że dimer cholesterolu, otrzymany w wyniku połączenia dwóch cząsteczek cholesterolu za pomocą silnego wiązania kowalencyjnego C-C, powinien być doskonałym „łącznikiem” dwuwarstwy lipidowej. Zastosowanie go jako czynnika stabilizującego w procesie formowania membrany lipidowej powinno m. in. zwiększyć mechaniczną stabilność i trwałość oraz zmniejszyć podatność na elektrokompresję i skrócić czas jej tworzenia [2.7].

Trzy steroidowe dimery **26**, **27** i **28** (Schemat 8) zostały zaprojektowane w oparciu o analizę rozmiarów naturalnej błony lipidowej. Wszystkie one są oczywiście chiralne, gdyż jedynym elementem symetrii, jakie posiadają ich cząsteczki, jest dwukrotna oś symetrii (C_2), która jest niewystarczającym warunkiem identyczności związków **26**, **27** i **28** z ich odbiciami lustrzanymi. Najkrótszy z nich, dimer **26**, utrzymywany jest w rozciągniętej konformacji przez mostki tlenowe, które dodatkowo zwiększają jego polarność w stosunku do związków **27** i **28**.



Schemat 8.

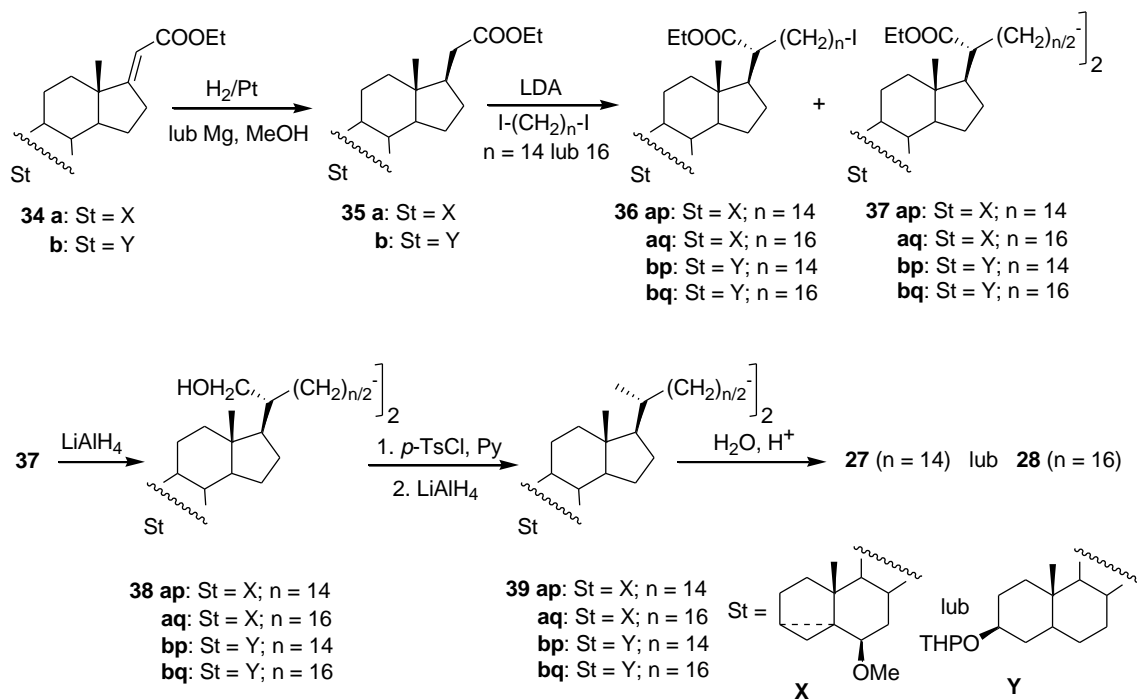
Na Schemacie 9 przedstawiona została synteza difurost-5-en-3β-olu (**26**). Substrat (eter *t*-butylo-dimetylosililowy diosgeniny, **29**) redukowany był w układzie $\text{LiAlH}_4/\text{AlCl}_3$ [2.8]. W wyniku reakcji otrzymałem (22*R*)dihdropochodną **30a**, powstałą przez stereoselektywne otwarcie pierścienia F, oraz niewielką ilość produktu ubocznego – diolu **30b**. Pierwszorzędową grupę hydroksylową alkoholu **30a** przekształciłem następnie z wysoką wydajnością w jodek **31**, stosując układ $\text{I}_2/\text{PPh}_3/\text{Py}$ [2.9]. Kluczowym etapem całej syntezy była reakcja Wurtza. Transformacja ta jest bardzo rzadko stosowana do sprzęgania dużych fragmentów cząsteczek organicznych [2.10]. Jednakże reakcja jodku **31** z sodem, prowadzona w niewielkiej ilości toluenu jako rozpuszczalnika, zakończyła się sukcesem. Otrzymałem dimer **33** z umiarkowaną (16%) wydajnością, zaś głównym produktem okazał się eter *t*-butylo-dimetylosililowy furost-5-en-3β-olu (**32a**; 36%). Nie stwierdziłem natomiast obecności wśród produktów reakcji $\Delta^{26(27)}$ -olefiny, której – w myśl mechanizmu reakcji Wurtza – można było oczekiwać. Produkt końcowy, difurost-5-en-3β-ol (**26**), otrzymany w wyniku odbezpieczenia grupy 3β-hydroksylowej, jest bezbarwną, krystaliczną substancją, słabo rozpuszczalną w rozpuszczalnikach organicznych i bardziej polarną w porównaniu z monomerem **32b**.



Schemat 9.

Dimery **27** i **28** otrzymałem z estru pregnanowego **35**, wykorzystując procedurę „alkilowania-redukcji” Wichy i Bala [2.11] (Schemat 10). W pierwszej serii eksperymentów grupy funkcyjne w pierścieniach A i B ($3\beta\text{-OH}$ i Δ^5) substratu **29** zabezpieczyłem w postaci eteru metylowego *i*-steroidu (St = X). Posunięcie to miało na celu zapobieżenie redukcji wiązania podwójnego Δ^5 w trakcie przygotowywania estru pregnanowego z jego $\Delta^{17(20)}$ prekursora **34**. W trakcie prac nad syntezą dimerów **27** i **28** ukazała się publikacja [2.12], opisująca nową metodę selektywnej redukcji α,β -nienasyconego estru **34b** za pomocą magnezu w metanolu, w której nie jest wymagane zabezpieczenie wiązania podwójnego Δ^5 . Ponieważ następne przekształcenia estru **35** takiego zabezpieczenia również nie wymagały, kolejna seria eksperymentów przeprowadzona była na substracie **35b** (jedynie grupę 3β -hydroksylową zabezpieczyłem w postaci eteru tetrahydropirylowego).

W wyniku reakcji estru **35** z $1,\omega$ -dijodoalkanami otrzymałem mieszaniny jodków steroidowych **36** (30-35%) oraz dimerów **37** (25-30%). Te ostatnie poddałem typowym procedurom, mającym na celu przeprowadzenie grupy COOEt w grupę metylową. I tak, dimeryczne estry **37** zredukowałem za pomocą LiAlH_4 do pierwszorzędowych alkoholi **38**, które przekształciłem w odpowiednie tosylany, a te ponownie zredukowałem za pomocą LiAlH_4 . Całkowita wydajność powyższej procedury była bardzo wysoka (do 85%). Po usunięciu grup zabezpieczających otrzymałem oczekiwane dimery **27** i **28** w postaci bezbarwnych, krystalicznych związków, bardziej polarnych od cholesterolu i znacznie trudniej od niego rozpuszczalnych w chloroformie, benzenie, octanie etylu i acetonie [**H.1**].

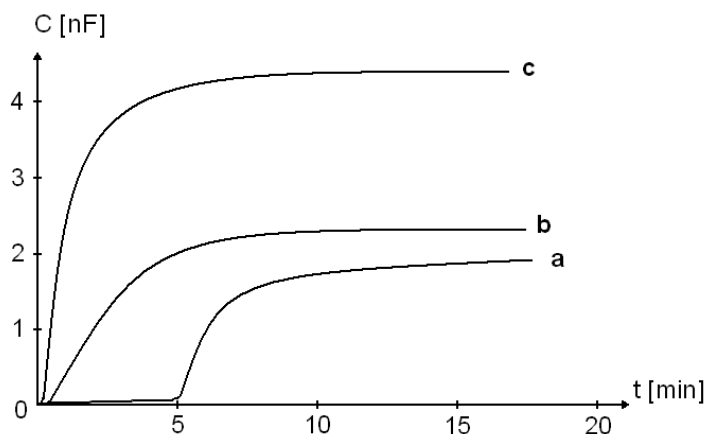


Schemat 10.

Przeprowadzone zostały badania procesu tworzenia się dwuwarstw membran lipidowych z dodatkiem dimeru **26** metodą Muellera-Rudina [2.2]. Na ich podstawie można sformułować następujące wnioski:

- dodatek dimeru do roztworu formującego znacznie przyspiesza proces spontanicznego tworzenia się dwuwarstw lipidowych (Rysunek 1);
- membrany, tworzące się z dodatkiem dimeru, posiadają ponad 2-krotnie większą pojemność elektryczną, a zarazem mniejszą podatność na zmiany tego parametru, co oznacza również większą odporność na zmiany grubości dwuwarstwy;
- cząsteczki dimeru przechodzą w poprzek membrany i „spinają” jej monowarstwy, wymuszając w ten sposób mniejszą jej grubość i pozostawianie mniejszej ilości rozpuszczalnika wewnątrz membrany.

Otrzymane wyniki badań fizykochemicznych membran, zawierających dimery steroli, są na tyle zachęcające, że spowodować mogą wykorzystanie ich do tworzenia nowoczesnych narzędzi w detekcji i diagnostyce, np. konstrukcji biosensorów nowej generacji [H.5].



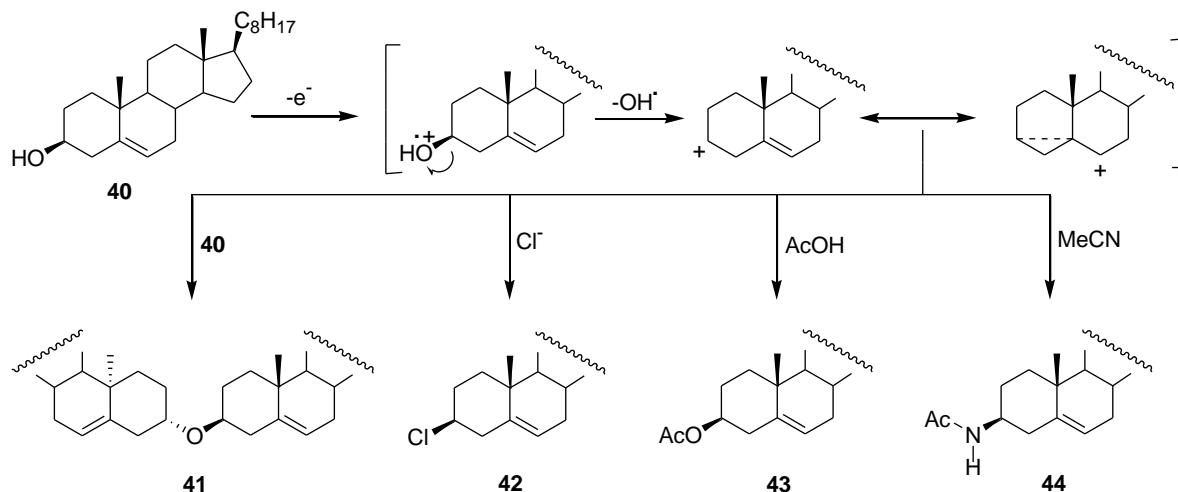
Rysunek 1. Zmiany pojemności elektrycznej podczas tworzenia się dwuwarstw lipidowych. Roztwór formujący: a) bez dimeru, b) nasycony dimerem, c) z zawiesiną dimeru.

* * *

Produkty utleniania cholesterolu (*ang.* COPs – cholesterol oxidation products) są w ostatnich latach intensywnie badane m. in. ze względu na rolę, jaką odgrywają w patogenezie arteriosklerozy [2.13]. Wiele spośród nich wykazuje niepożądane, czy wręcz szkodliwe działanie biologiczne [2.14]. Budzi to uzasadniony niepokój, gdyż związki te powstają w procesach przetwarzania żywności. Pojawiły się również prace, dotyczące elektrochemicznego utleniania cholesterolu (**40**). Większość z nich dotyczyła utleniania pośredniego z zastosowaniem mediatorów [2.15]. Preferowanymi miejscami utleniania cholesterolu są: wiązanie podwójne, pozycja allilowa C-7 oraz grupa 3 β -hydroksylowa. Bezpośrednie elektrochemiczne utlenianie cholesterolu na elektrodzie platynowej w lodowatym kwasie octowym prowadziło do powstania mieszaniny 7 α - i 7 β -acetoksycholesteroli [2.16]. Proponowany mechanizm reakcji zakłada utworzenie w pierwszym etapie kationorodnika na atomie tlenu cholesterolu. Wiadomo jednakże, iż kationorodniki są bardziej stabilne w dichlorometanie, który nie wykazuje właściwości nukleofilowych. Dlatego w dalszych badaniach nad bezpośrednim anodowym utlenianiem cholesterolu został użyty ten właśnie rozpuszczalnik.

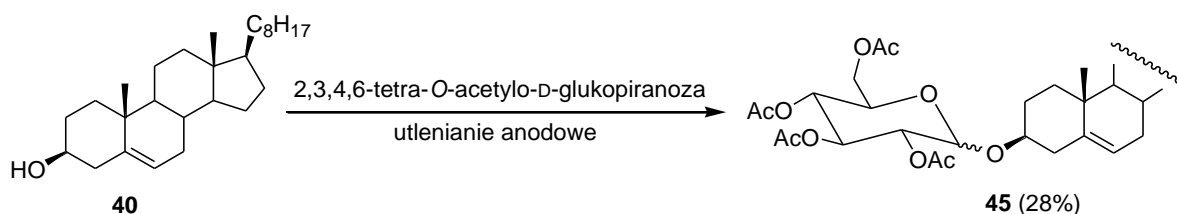
Reakcje elektROUTLENIANIA przeprowadzone zostały na Wydziale Chemii Politechniki Rzeszowskiej. We wszystkich eksperymentach stosowano – jako elektrolit podstawowy – roztwór tetrafluoroboranu tetrabutylamoniowego (TBABF₄) w CH₂Cl₂. W pierwszych próbach nie stosowano rozdzielania przestrzeni katodowej i anodowej. W tych warunkach tworzyły się przede wszystkim produkty niestereoselektywnego chlorowania wiązania podwójnego. Źródłem chloru był oczywiście rozpuszczalnik: jego redukcja na katodzie do jonów Cl⁻, a następnie dyfuzja do przestrzeni anodowej i utlenianie w obecności cholesterolu prowadziły do powstania wymienionych wyżej chloropochodnych. Aby zapobiec temu procesowi, obie przestrzenie rozdzielono membraną i połączono kluczem elektrolitycznym z roztworem TBABF₄ w mieszaninie CH₂Cl₂/CH₃CN. Dodatkowo, do przestrzeni katodowej elektrolizera dodano lodowatego kwasu octowego w celu zapobiegnięcia redukcji dichlorometanu. Tym razem głównym produktem okazał się niespodziewanie dimer steroidowy – eter dicholesterylowy **41** (Schemat 11), powstały ze stosunkowo wysoką, 37% wydajnością.

Wynik eksperymentu był zaskakujący, gdyż drugorzędowe alkohole zazwyczaj utleniają się do ketonów [2.17], jednak zgodny z postulowanym mechanizmem reakcji. Zakłada on, że w pierwszym etapie tworzy się na atomie tlenu, wskutek przeniesienia jednego elektronu na anodę, kationorodnik. W następnym etapie, po rozpadzie heterolitycznym wiązania C – O, powstaje nieklasyczny karbokation homoallilowy, stabilizowany mezomerycznie [2.18]. W warunkach reakcji jedynym partnerem nukleofilowym dla kationu jest atom tlenu drugiej cząsteczki cholesterolu, co ostatecznie prowadzi do utworzenia eteru (**41**). Wyciek nukleofilowych jonów (Cl^-) bądź cząsteczek (kwas octowy, acetonitryl) z przestrzeni katodowej lub klucza elektrolitycznego prowadzi do powstania innych, ubocznych produktów tego procesu (**42 – 44**; Schemat 11) [H.11].



Schemat 11.

Eter dicholesterylowy (**41**) tworzył się także w trakcie prac nad elektrochemiczną metodą glikozylacji 3β -hydroksy- Δ^5 -steroidów. W tym jednak przypadku był on produktem ubocznym. Głównym produktem był glikozyd steroidowy (**45**) (Schemat 12), który tworzył się w wyniku reakcji karbokationu homoallilowego z cukrem jako nukleofilem [H.13].



Schemat 12.

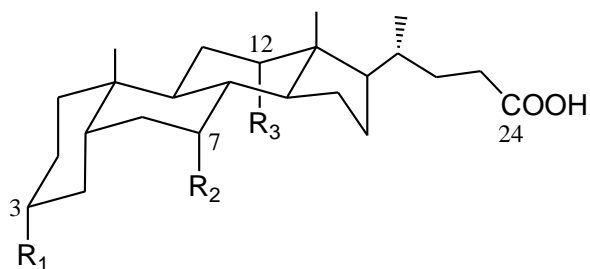
3. Dimery steroidowe w chemii supramolekularnej

Jedną z najbardziej fundamentalnych właściwości żywego organizmu jest przeprowadzanie z dużą szybkością złożonych reakcji chemicznych w temperaturze otoczenia. Czynniki, pełniącymi rolę katalizatorów biologicznych, są szczególnego rodzaju białka, zwane enzymami. Charakteryzują się one przede wszystkim zdolnością do przyspieszania przebiegu reakcji poprzez obniżenie energii aktywacji substratu, bardzo wysoką selektywnością i specyficznością względem katalizowanej reakcji, czy też absolutną swoistością optyczną dla przynajmniej części swoich substratów, wykazywaną przez większość enzymów. Procesy enzymatyczne związane są z jeszcze jedną grupą makrocząsteczek – receptorów, zdolnych do uaktywnienia enzymu, a tym samym zainicjowania reakcji kontrolowanych enzymatycznie. Enzym pełni swą funkcję katalityczną z wykorzystaniem ściśle określonego fragmentu cząsteczki, tzw. centrum aktywnego, którego struktura przestrzenna odpowiada wielkości i kształtowi substratu. Warunkami utworzenia kompleksu enzym – substrat są: obecność, zarówno w cząsteczce substratu, jak i w centrum aktywnym, odpowiednich grup funkcyjnych, zdolnych do reagowania między sobą, oraz idealne dopasowanie energetyczne, elektronowe, geometryczne i sferyczne substratu z enzymem, szczególnie, że w ich wzajemnym wiązaniu biorą udział słabe oddziaływania chemiczne. Zasada ta nazywana jest zazwyczaj rozpoznaniem molekularnym.

Drugim procesem, odgrywającym pierwszoplanową rolę w funkcjonowaniu organizmu żywego, jest transport przez błony. Zarówno komórki od otaczającego ich środowiska, jak i organelle wewnątrzkomórkowe od cytoplazmy, oddzielone są błonami o ściśle określonej przepuszczalności. Układ taki pozwala na utrzymanie łączności pomiędzy procesami, zachodzącymi w poszczególnych strukturach, jak też pomiędzy komórką i środowiskiem. Za utrzymanie tej łączności odpowiadają: dyfuzja, endo- i egzocytoza, oraz transport aktywny, czyli enzymatycznie katalizowane przenikanie substancji niezgodnie ze spadkiem stężeń [3.1].

Badania zjawisk katalizy enzymatycznej, rozpoznania molekularnego, jak też transportu przez błony, są bardzo ważnymi elementami poznawania istoty procesów życiowych. Dziedziną, traktującą o oddziaływaniach międzycząsteczkowych i powstających w ich rezultacie „układach ponadcząsteczkowych”, zajmuje się chemia supramolekularna. Wysokie koszty, związane z wykorzystywaniem substancji, wyizolowanych z układów biologicznych, sprawiają, że syntezuje się i bada układy modelowe, posiadające cechy naturalnie występujących enzymów [3.2]. Wymagania, stawiane tego typu układom, zdają się najlepiej spełniać związki steroidowe: dokładnie zdefiniowana geometria cząsteczki o „zamrożonej”, ściśle określonej przestrzennej konformacji, czystość enancjomeryczna, czy łatwa dostępność, spowodowały liczne i szerokie ich zastosowania w syntezie supramolekularnych gospodarzy [3.3]. Wśród nich, szczególnie wartościową grupę stanowią kwasy żółciowe (Schemat 13), które, poza wymienionymi wyżej, charakteryzują się dodatkowo tak cennymi cechami, jak posiadanie dużej liczby grup hydroksylowych o zróżnicowanej reaktywności chemicznej, oraz wyjątkowa amfifilowość, związana z obecnością dwóch stron cząsteczki: hydrofilowej strony α , zawierającej grupy -OH i -COOH, i hydrofobowej (węglowodorowej) strony β [3.4].

Kwasy żółciowe są steroidowymi polihydroksykwasami, pochodnymi kwasu cholanowego (5 β -cholan-24-owego; **46**), występującymi w układach trawiennych kręgowców. Charakterystyczne dla niemal wszystkich związków z tej rodziny jest połączenie *cis* pierścieni A i B oraz pozycja α grup hydroksylowych, zaś łańcuch boczny, złożony zwykle z 5 atomów węgla, zawiera grupę karboksylową [**H.7**].

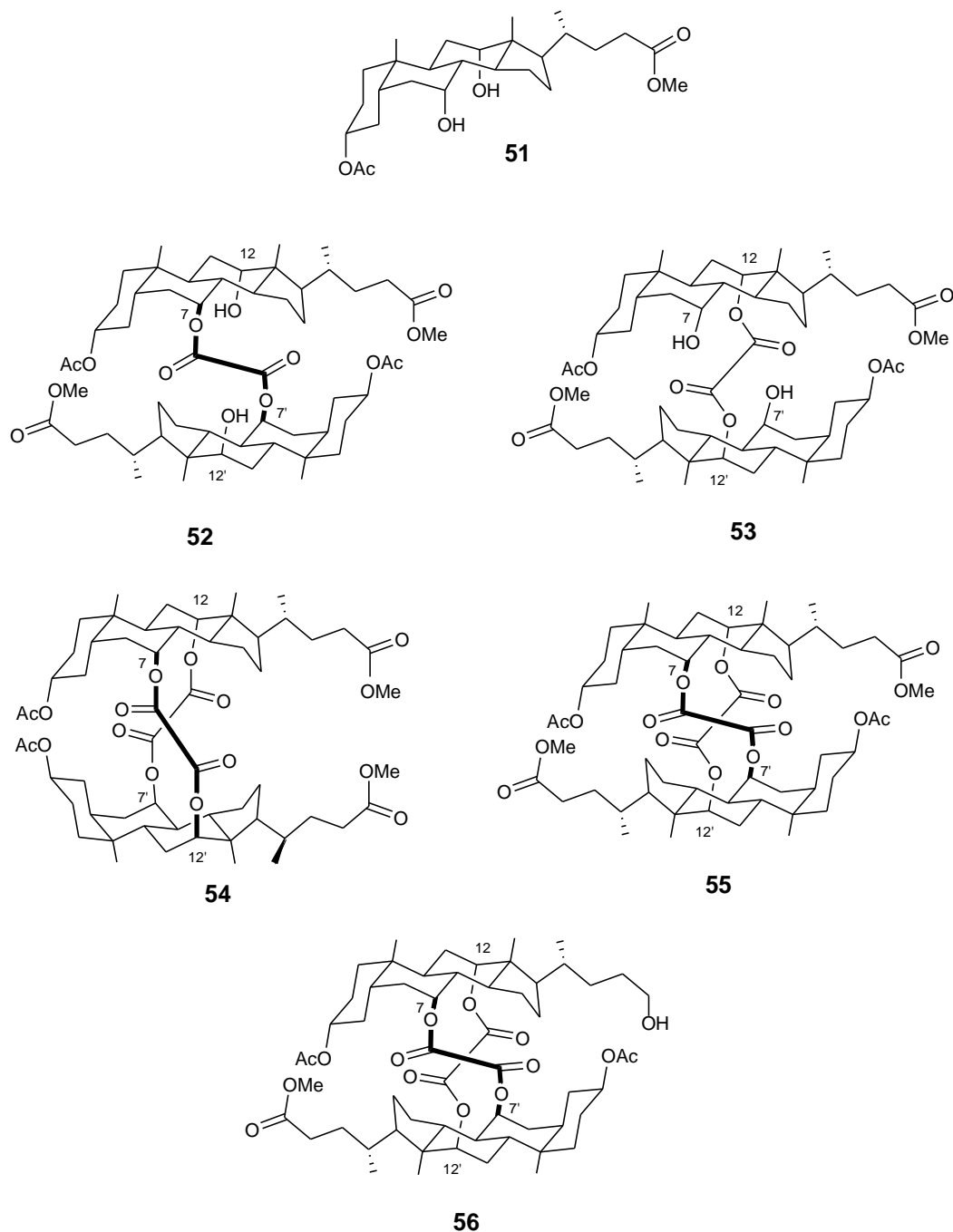


- 46:** R₁ = R₂ = R₃ = H: kwas cholanowy
47: R₁ = R₂ = R₃ = OH: kwas cholowy
48: R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OH: kwas deoksycholowy
49: R₁ = R₂ = OH, R₃ = H: kwas chenodeoksycholowy
50: R₁ = OH, R₂ = R₃ = H: kwas lithocholowy

Schemat 13.

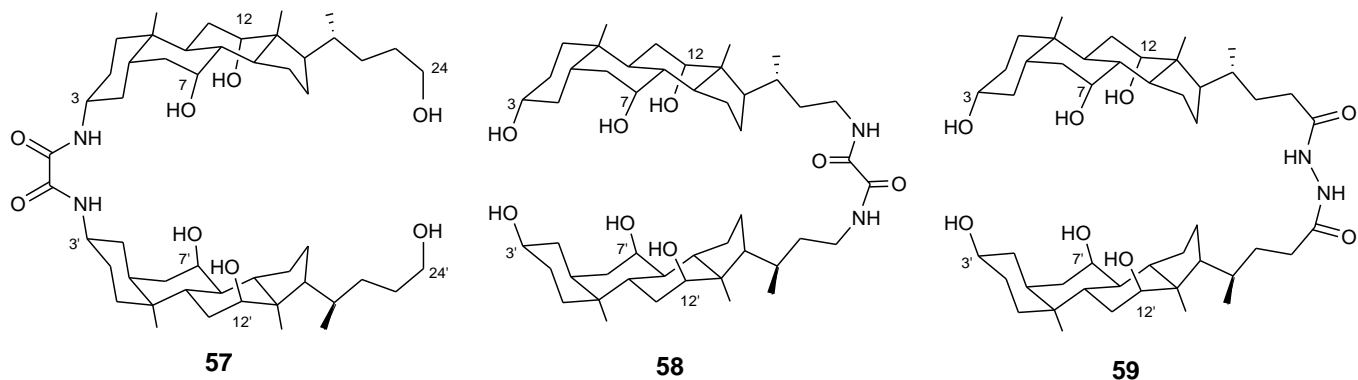
Spośród licznych struktur supramolekularnych, syntezowanych z kwasów żółciowych, należy wymienić dwie podstawowe grupy: układy otwarte (acykliczne) i zamknięte (cykliczne). Do najważniejszych struktur acyklicznych należą: molekularne szczeliny [W.5], molekularne pincety [3.5], dendrony [3.6], molekularne parasole [3.7], itp., natomiast dwiema podstawowymi strukturami cyklicznymi są cyklocholan [3.8] i cholafany [3.9]. Dotychczas prowadzone syntezы układów cyklicznych (zarówno cyklocholanów, jak i cholafanów) opierały się na tworzeniu wiązań pomiędzy jednostkami steroidowymi za pośrednictwem grupy 3 α -hydroksylowej jednej cząsteczki i 24-karboksylowej drugiej (metodą „głowa do ogona”). Celem moich badań wstępnych była weryfikacja możliwości tworzenia przez kwas cholowy (**47**) układów dimerycznych za pośrednictwem mniej reaktywnych grup 7 α - i 12 α -hydroksylowych.

W pierwszym eksperymencie poddałem acylowaniu 3-*O*-acetylocholan metylu (**51**) z równomolową ilością chlorku oksalilu (Schemat 14). W jego wyniku otrzymałem mieszaninę trzech, mniej polarnych niż substrat, produktów. Dwoma okazały się dimery otwarte, w których estryfikacji uległy grupy hydroksylowe C-7 i C-7' (**52**) oraz C-12 i C-12' (**53**), zaś trzecim, najmniej polarnym, jeden z oczekiwanych dimerów cyklicznych (*cis* (**54**) lub *trans* (**55**)). Dalsze, „domykające” acylowanie, zarówno dimeru **52**, jak i **53**, prowadziło, oczywiście, do dimeru cyklicznego *trans* (**55**). Widma ¹H NMR dimeru **55** i otrzymanego wcześniej układu cyklicznego o nieznannej strukturze były niemal identyczne, lecz wyraźna różnica polarności na płytkach TLC pozwoliła jednoznacznie przypisać powstałemu w pierwszej próbie dimerowi konfigurację *cis* (**54**). Dalsze prace nad otrzymanymi strukturami cyklicznymi miały na celu przekształcenie ich drogą redukcji w dimery z wolnymi grupami 3 α -OH i 24-CH₂OH. Niestety, wodorek litowo-tri-*t*-butoksyglikowy okazał się niereaktywny, zaś LiAlH₄ redukował estry szczawianowe. Natomiast redukcja dimeru **55** w układzie LiAlH₄/BF₃/Et₂O doprowadziła niespodziewanie do powstania alkoholu **56** (Schemat 14) bez naruszenia mostków szczawianowych [**H.8**].



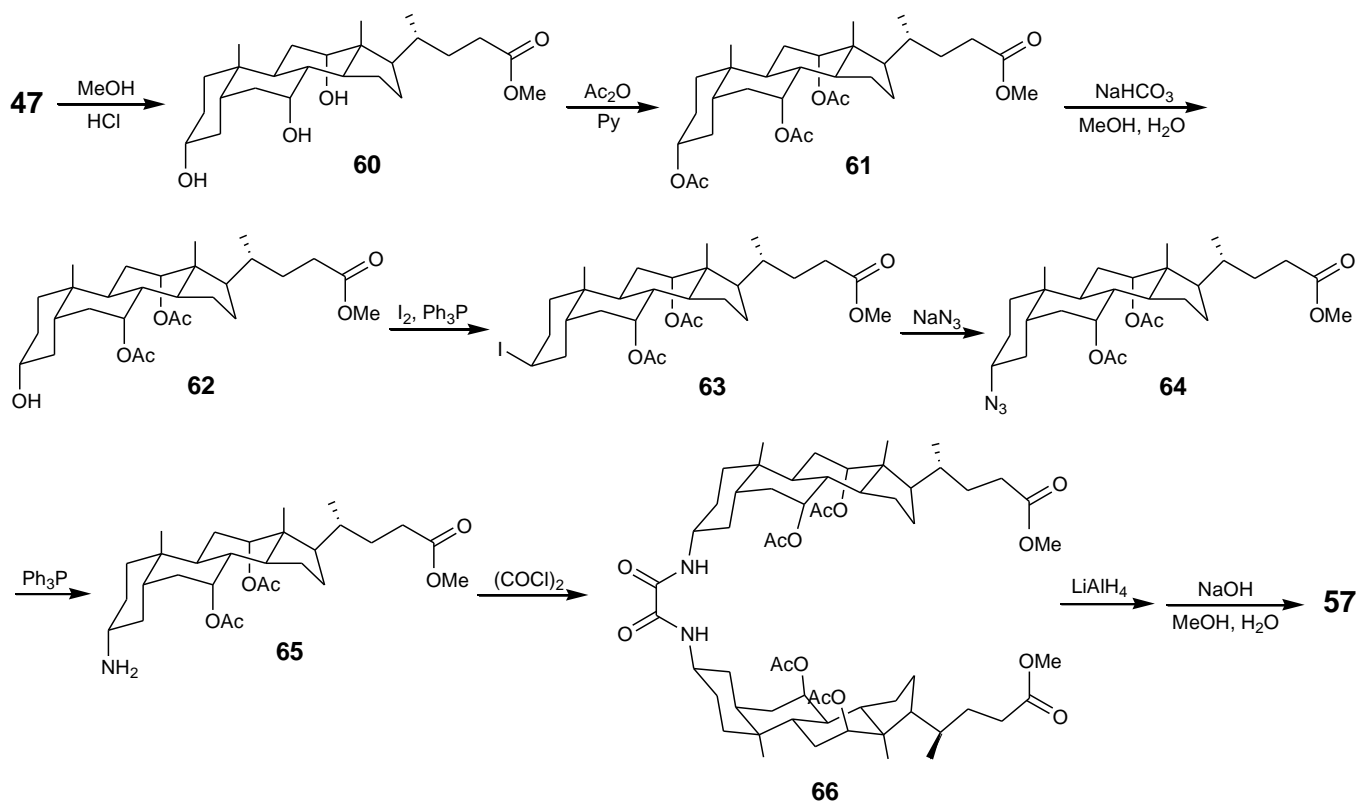
Schemat 14.

Kolejne syntezy miały na celu otrzymanie serii dimerów kwasu cholowego (acyklicznych, oraz cyklicznych – cholafanów), zawierających w cząsteczkach, a ściślej – spejserach, łączących jednostki steroidowe, atomy azotu. Zaprojektowane zostały trzy dimery typu szczelinowego (**57**, **58** i **59**; Schemat 15), w których funkcję spejserów pełnią wiązania oksamidowe (dimery typu „ogon do ogona” **57** i „głowa do głowy” **58**) i izomeryczne hydrazydowe (dimer typu „głowa do głowy” **59**). Wiązanie oksamidowe jest ważnym komponentem wielu produktów, wykazujących aktywność biologiczną, np. regulatorów wzrostu roślin [3.10], inhibitorów proteazy HIV-1 [3.11], czy pestycydów [3.12].



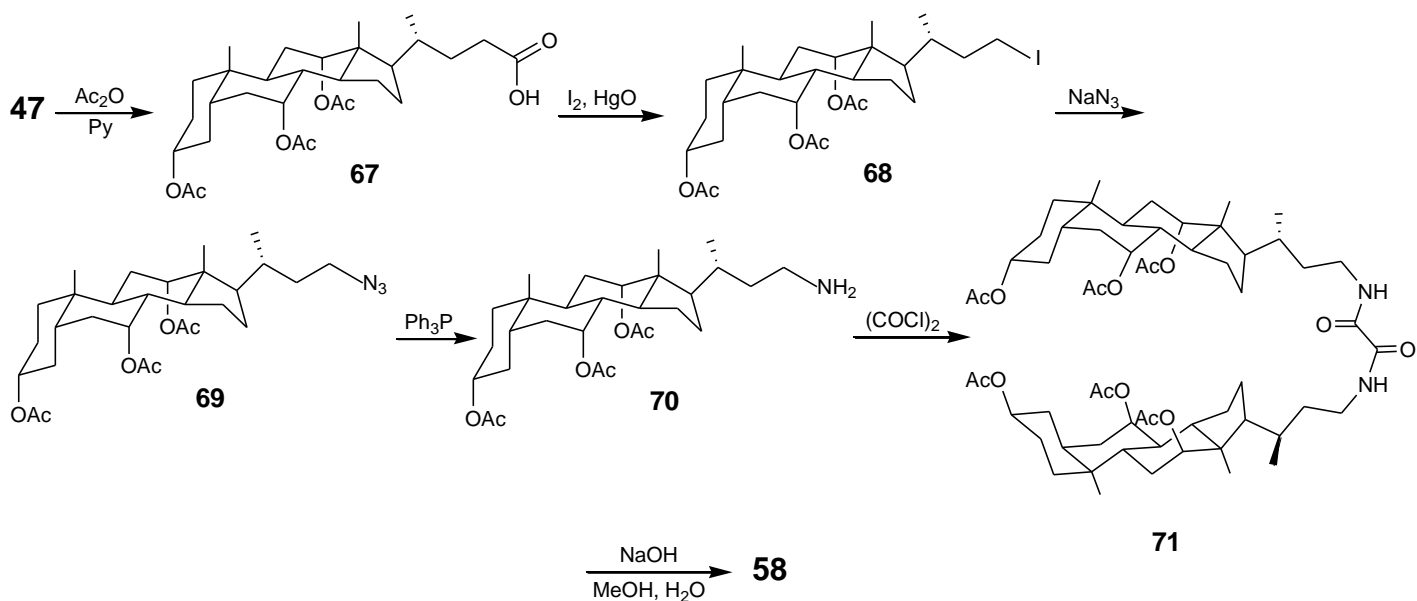
Schemat 15.

Dimer **57** otrzymałem zgodnie ze Schematem 16. Nieoczekiwanym problemem okazał się etap usuwania ochronnych grup estrowych w związku **66**. Dwudniowe działanie LiAlH_4 w temperaturze pokojowej prowadziło jedynie do kompletnej redukcji obu estrów metylowych w łańcuchach bocznych, zaś podwyższenie temperatury skutkowało tworzeniem się bardzo polarnych produktów, prawdopodobnie redukcji wiązania oksamidowego. W tej sytuacji skutecznym rozwiązaniem okazała się dwuetapowa procedura, obejmująca redukcję wodorkiem, a następnie – trwającą tydzień – hydrolizę zasadą sodową w mieszaninie wody i metanolu.



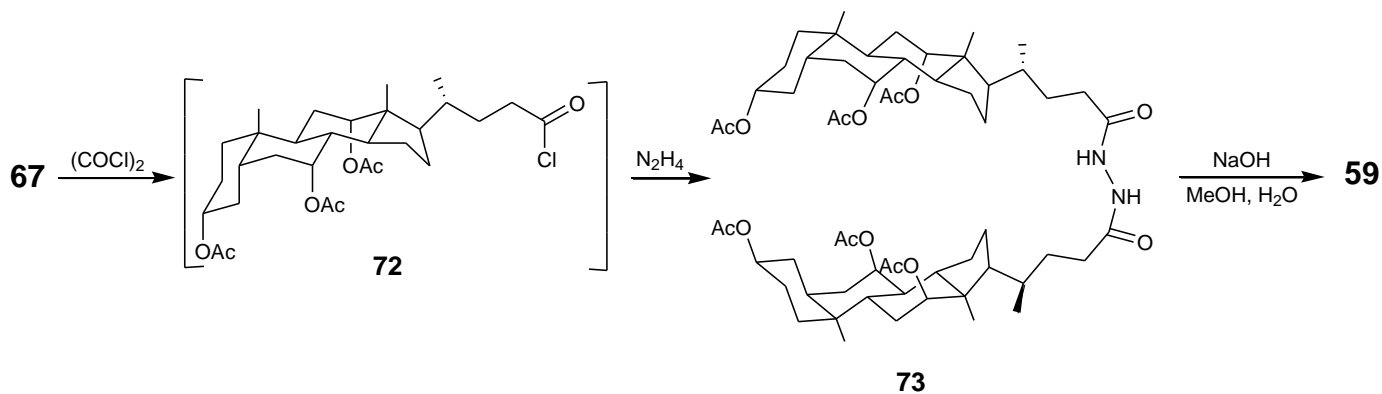
Schemat 16.

Syntezy kolejnych dwóch dimerów przeprowadziłem za pomocą typowych procedur, przedstawionych na schematach: 17 (dimer **58**) i 18 (dimer **59**). Oba związki **58** i **59** pomyślane zostały jako izomery strukturalne, stąd w trakcie syntezy dimeru **58** konieczne było usunięcie jednego atomu węgla w imtermediacie **67** (Schemat 17). Próby bezpośredniej transformacji: kwas karboksylowy (**67**) → amina (**70**) z wykorzystaniem różnych wariantów reakcji Schmidta [3.13] nie powiodły się z uwagi na bardzo niską (poniżej 10%) wydajność. W tej sytuacji przeprowadziłem najpierw reakcję dekarboksylacji, wykorzystując zmodyfikowaną metodę Hunsdieckera [3.14] z zastosowaniem tlenku rtęci i jodu we wrzącym CCl_4 , a otrzymany jodek **68** przekształciłem w azydek **69**, który, w wyniku redukcji, utworzył aminę **70** z dobrą, ponad 40% wydajnością.



Schemat 17.

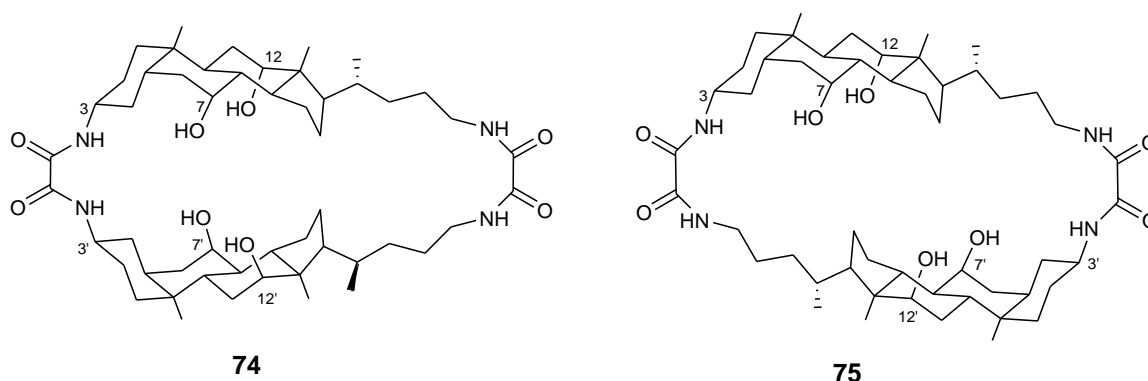
Procedura otrzymania dimeru **59** obejmowała przekształcenie kwasu **67** w przejściowy chlorek kwasowy, który niezwłocznie poddany został reakcji z handlowo dostępnym roztworem hydrazyny w THF [**H.9**].



Schemat 18.

Cholafany są strukturami makrocyklicznymi, zbudowanymi z dwóch do czterech cząsteczek kwasów żółciowych, połączonych sposobem „głowa do ogona” za pośrednictwem różnych grup atomów, pełniących rolę spejserów. Ich konstrukcja jest bardziej sztywna, w związku z czym cholafany zdolne są do silniejszego wiązania jonów i molekul gości w porównaniu z układami acyklicznymi. Metodami syntezy tego typu supramolekularnych gospodarzy, są najczęściej reakcje makrolaktonizacji [3.15] i makrolaktamizacji [3.16]. Podejmowane są również próby zastosowania reakcji metatezy w syntezie cholafanów [3.17].

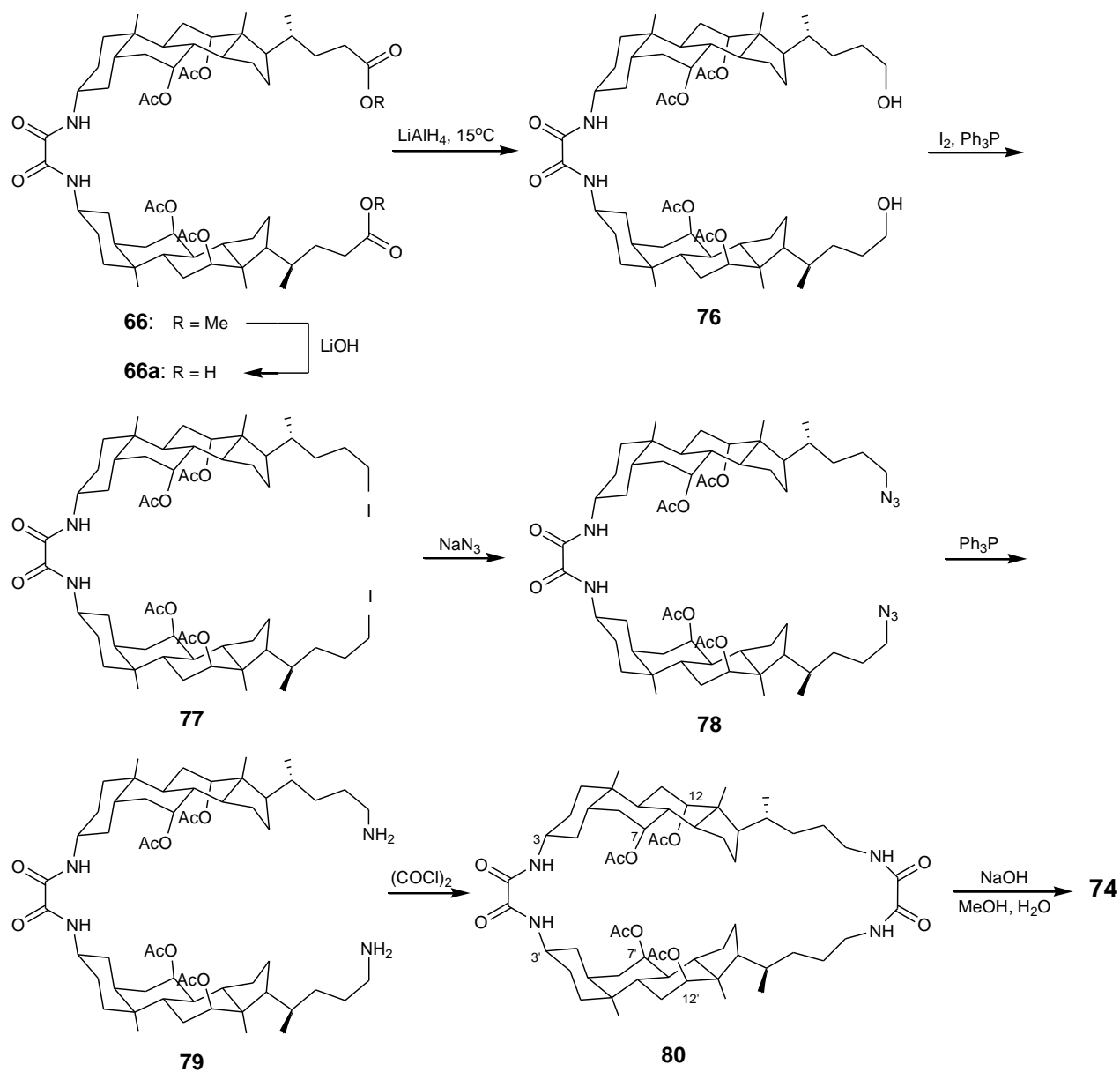
Przeprowadziłem syntezy dwóch dimerycznych cholafanów ze spejserami oksamidowymi (Schemat 19), w których spejsery łączą jednostki steroidowe poprzez pozycje 3, 3' i 24, 24' (dimer *cis*; **74**), oraz 3, 24' i 3', 24 (dimer *trans*; **75**).



Schemat 19.

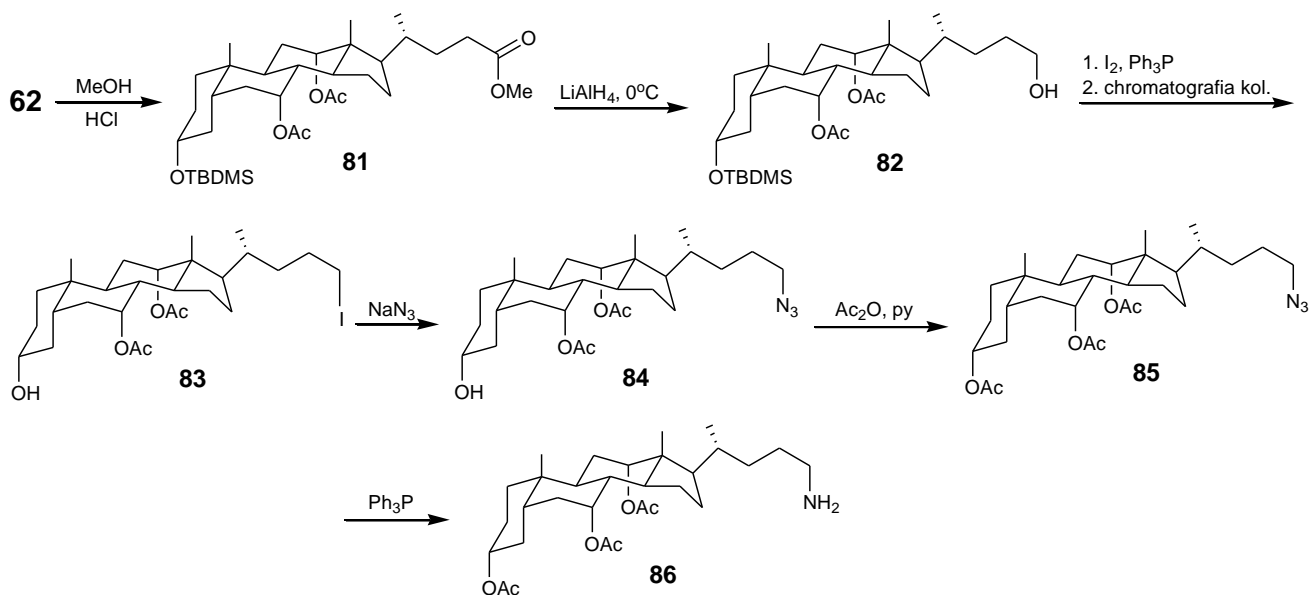
Dimer **74** został otrzymany na szlaku syntetycznym, przedstawionym na Schemacie 20. Selektywna redukcja estrów metylowych w substracie **66** zachodziła łatwo w temperaturze nie przekraczającej 15°C (w wyższej częściowo ulegają jej także grupy octanowe). Kluczowym momentem w syntezie okazał się być etap cyklizacji za pomocą chlorku oksalilu. Dobre rezultaty zostały osiągnięte wtedy, gdy syntezę prowadziłem w bardzo rozcieńczonych (poniżej 0.2%) roztworach. W przypadku wyższych stężeń substratu, dominującymi procesami były międzycząsteczkowe kondensacje, prowadzące prawdopodobnie do bardzo polarnych struktur liniowych z terminalnymi grupami aminowymi i karboksylowymi.

Zaprojektowany także został 24,24'-bisnor analog dimeru **74**. W wyniku hydrolizy substratu **66**, przeprowadzonej w pierwszym etapie syntezy, otrzymałem kwas dikarboksylowy **66a** (Schemat 20), który okazał się być silnym czynnikiem żelującym w stosunku typowych rozpuszczalników organicznych (CH₂Cl₂, CHCl₃, CCl₄, C₆H₆, MeOH, AcOEt) oraz ich mieszanin. Rozpuszczał się jedynie w acetonie, jednakże ze względu na to, iż rozpuszczalnik ten nie jest odpowiednim medium dla reakcji rodnikowych (reakcja Hunsdieckera w kolejnym etapie syntezy), dalsze prace nad tym dimerem zakończyłem.

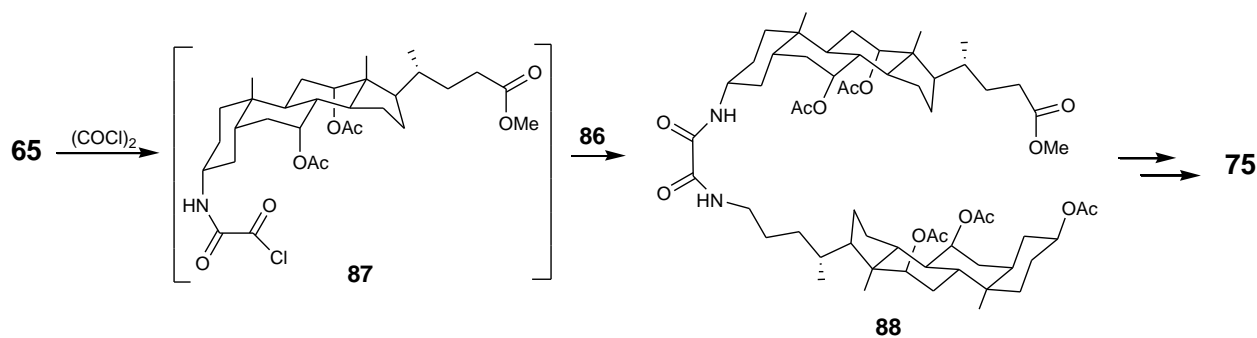


Schemat 20.

Problemem w syntezie dimeru **75** okazało się połączenie jednostek steroidowych sposobem „głowa do ogona”. Planowane utworzenie tymczasowego wiązania estrowego 24-COOH – C(3’)-OH okazało się, w eksperymencie modelowym, rozwiązaniem niespełniającym oczekiwań. W związku z tym przeprowadziłem syntezę dwóch amin: 24-NH₂ (**86**; Schemat 21) oraz 3 α -NH₂ (**65**; Schemat 16). W kluczowym etapie sprzężenia aminę **65** poddałem reakcji z nadmiarem chlorku oksalilu w celu wytworzenia chlorku kwasowego **87** (Schemat 22), który niezwłocznie użyty został do acylowania aminy **86**. Oczekiwany dimer **88** powstał z dobrą, blisko 50% wydajnością.



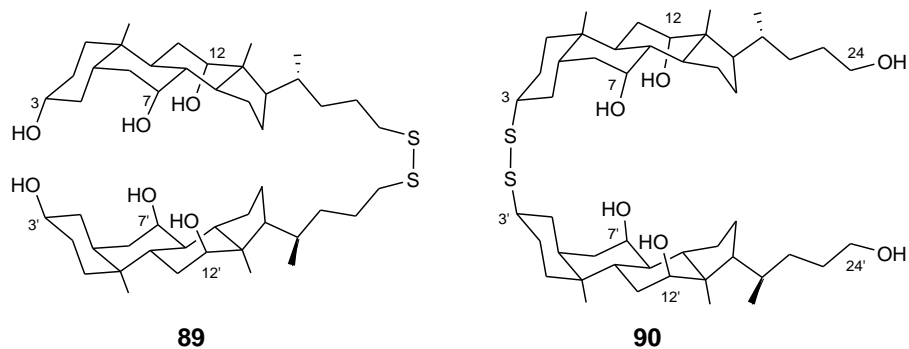
Schemat 21.



Schemat 22.

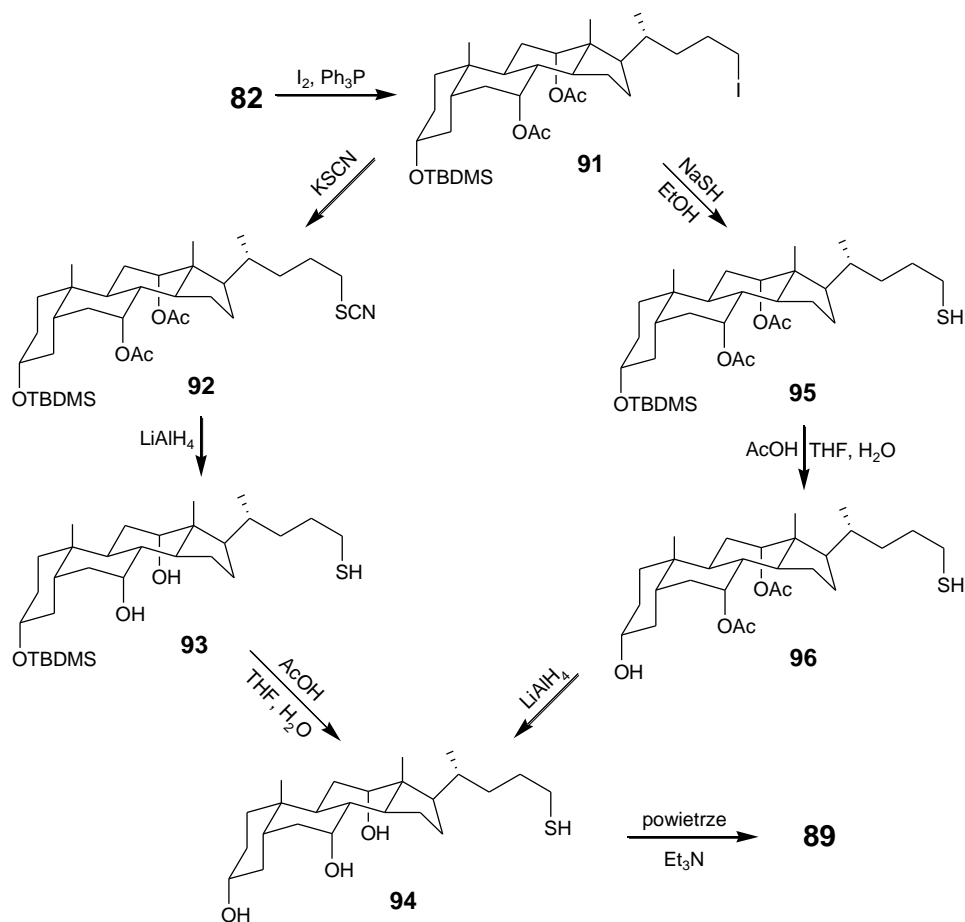
Dalsze jego przekształcenia prowadzone były metodami, zastosowanymi wcześniej podczas otrzymywania cholafanu **74** (Schemat 20) [H.10].

Serię syntez steroidowych supramolekularnych gospodarzy zakończyło otrzymanie dwóch molekularnych szczelin ze spejserami disiarczowymi (**89** i **90**), przedstawionych na Schemacie 23. Odwracalne reakcje redoks: $2 \cdot \text{tiol} \rightleftharpoons \text{disiarczek} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$, np. cysteina–cystyna lub glutation–GSSG, odgrywają istotną rolę w układach biologicznych [3.18]. Mostki disiarczkowe służą także do łączenia innych klas związków, np. cukrów [3.19] lub glikopeptydów [3.20]. Zastosowanie spejsera disiarczowego, który łatwo ulega redukcji, a tym samym powoduje rozpad supramolekuły, powinno ułatwić uwolnienie cząsteczki lub jonu gościa do środowiska. Dodatkowo, konwersja hydrofobowego disiarczku do hydrofilowych grup tiolowych powinna sprzyjać usuwaniu cząsteczek gospodarza z organizmu.



Schemat 23.

Syntezę dimeru „głowa do głowy” (**89**), przedstawia Schemat 24. Steroidowy jodek **91** poddany został bezpośredniej reakcji podstawienia jonem HS^- w różnych rozpuszczalnikach. Najlepszy rezultat uzyskałem, stosując etanol absolutny. W wyniku dwustopniowej procedury usuwania grup zabezpieczających (hydroliza eteru TBDMS w kwasie octowym, a następnie redukcja grup octanowych LiAlH_4), otrzymałem tiol **94** z ponad 20% wydajnością. Jego utlenienie tlenem z powietrza wobec katalitycznej ilości zasady (trietyloaminy) przebiegło niemal ilościowo. Znacznie wydajniejszą okazała się metoda, polegająca na wymianie jonu jodkowego na tiocyjanianowy i jego redukcji, wraz z grupami octanowymi, wodorkiem litowo-glinowym. Po hydrolizie eteru silylowego wydajność tiolu **94** zwiększyła się do około 50% [**H.12**].

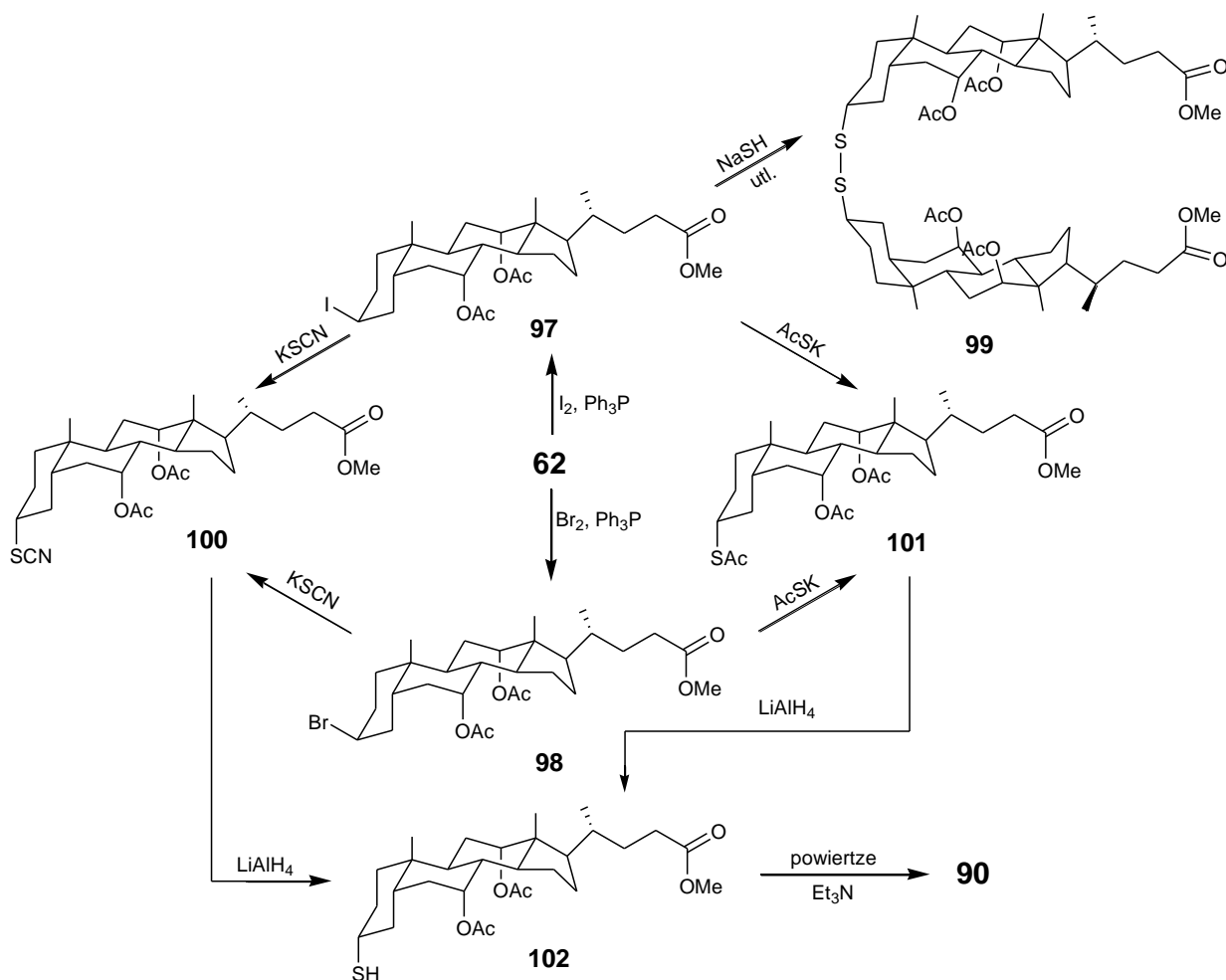


Schemat 24.

Dimer „ogon do ogona” (**90**) został otrzymany kilkoma sposobami. W metodzie bezpośredniej wymiany: $I^- \rightarrow HS^-$, przeprowadzonej w absolutnym etanolu, powstała złożona mieszanina związków, z której, drogą rekrytalizacji, wyodrębniłem z niską (4%) wydajnością dimer **99** (Schemat 25). Natomiast głównymi składnikami mieszaniny były produkty eliminacji jodowodoru oraz najprawdopodobniej dalszego utleniania **99** do ditlenku disiarczku i tetratlenku disiarczku, co zostało potwierdzone obecnością odpowiadających tej hipotezie pików w widmie masowym. Przepuszczalnie tworzenie się produktów utleniania miało miejsce na etapie obróbki mieszaniny poreakcyjnej w kontakcie z powietrzem.

Aby zapobiec powstawaniu produktów eliminacji, przeprowadziłem syntezę bromku **98** i również poddałem go reakcji z NaSH w bezwodnym etanolu, jednak tym razem otrzymałem ester etylowy jako produkt transestryfikacji, oraz kwas karboksylowy – wynik częściowej hydrolizy substratu.

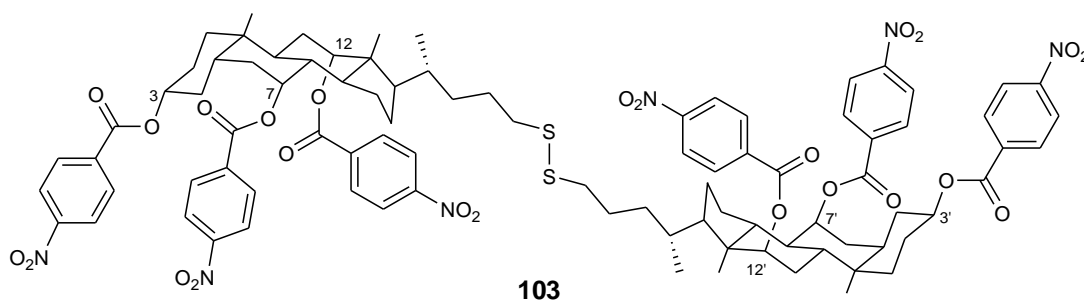
Najbardziej wydajnymi sposobami syntezy dimeru **90** okazały się metody z zastosowaniem transformacji: halogenek \rightarrow tiocyjanian i halogenek \rightarrow tiooctan, które zachodziły z bardzo dobrymi wydajnościami zarówno z bromku **98**, jak i jodku **97** (Schemat 25). Jedynie w przypadku reakcji jodku z KSCN obserwowałem tworzenie się niewielkich ilości olefin, co wymagało wykonania powolnej chromatografii kolumnowej dla ich oddzielenia. Redukcja za pomocą $LiAlH_4$ i utlenianie powietrzem wobec Et_3N pozwoliło otrzymać końcowy dimer **90** z łączną wydajnością ponad 70%.



Schemat 25.

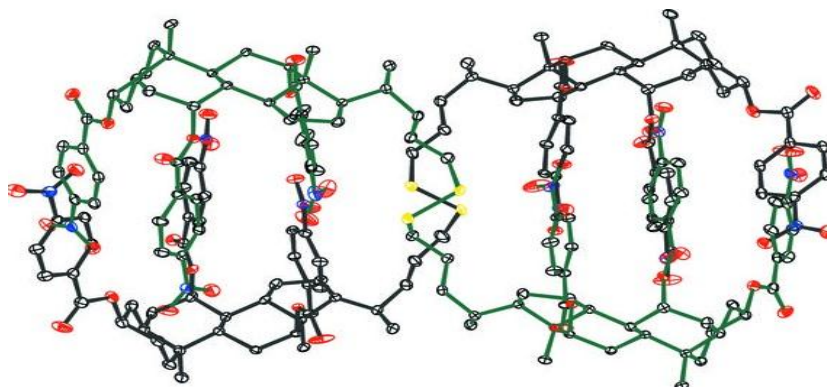
We wszystkich reakcjach typu S_N2 , przeprowadzanych na centrum stereogenicznym C-3 szkieletu steroidowego (alkohol \rightarrow jodek lub bromek, jodek \rightarrow tiol lub disiarczek, bromek lub jodek \rightarrow tiocyjanian lub tiooctan), tworzyły się produkty diastereoizomerycznie czyste. Otrzymane struktury dimeryczne, zarówno acykliczne, jak i cykliczne, są potencjalnymi gospodarzami supramolekularnymi i zostaną poddane badaniom w kierunku zdolności kompleksujących w stosunku do jonów i małych cząsteczek [H.14].

Przeprowadzono analizę rentgenostrukturalną pochodnej dimeru **89**, zawierającej zacylowane za pomocą chlorku 4-nitrobenzoilu wszystkie obecne w cząsteczce grupy hydroksylowe (**103**, Schemat 26). Derywatywacja była zabiegiem niezbędnym z uwagi na fakt, iż dimer **89** tworzy kryształy nieodpowiednie do badań rentgenograficznych.



Schemat 26.

Z przeprowadzonych badań wynika m. in., że związek krystalizuje w układzie ortorombowym, a jego asymetryczna komórka elementarna zawiera dwie cząsteczki pochodnej **107** w postaci rozciągniętej, ciasno splecione ze sobą wskutek oddziaływań π - π -stackingowych (warstwowych) typu „głowa do ogona” pomiędzy pierścieniami aromatycznymi. Powoduje to, że cała cząsteczka przyjmuje strukturę przestrzenną typu podwójnej helisy. Efektem wspomnianych wcześniej oddziaływań jest niemal idealnie równoległe ustawienie pierścieni aromatycznych pomiędzy sąsiednimi cząsteczkami dimerów w pozycjach C-7 i C-7' oraz C-12 i C-12', natomiast w pozycjach C-3 i C-3' grupy te ustawione są skośnie (Rysunek 2). Dodatkowo w komórce elementarnej znajdują się dwie cząsteczki octanu etylu i $\frac{1}{2}$ cząsteczki *n*-heksanu. Z powodu różnej symetrii obu cząsteczek disiarczku **103** cząsteczka nie posiada elementów symetrii [H.15].



Rysunek 2. Obraz przestrzenny dimeru w komórce elementarnej kryształu.

Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiłem szereg nowych metod syntezy dimerów steroidowych, z których większość wykazuje ciekawe właściwości fizykochemiczne, mogące znaleźć zastosowanie w medycynie, elektrochemii i chemii supramolekularnej.

Do najważniejszych osiągnięć tej pracy mogę zaliczyć:

- opracowanie prostych i stosunkowo wydajnych metod syntezy symetrycznych steroidowych bispirazyn jako układów modelowych w badaniach nad cefalostatynami i ritterazynami, oraz nieskomplikowanych sposobów ich funkcjonalizacji w pozycji *quasi*-benzylowej;
- opracowanie syntezy dimerów steroidowych, znacznie przyspieszających proces formowania sztucznych membran fosfolipidowych, z możliwością szeregu zastosowań w elektrochemii, analizie chemicznej i elektronice;
- opracowanie syntez układów dimerycznych, zarówno acyklicznych, jak i cyklicznych, mogących potencjalnie pełnić rolę tzw. supramolekularnych gospodarzy w stosunku do prostych jonów i cząsteczek.

Zainteresowanie związkami steroidowymi i ich dimerami w ostatnich latach bardzo wzrosło, głównie po odkryciach cefalostatyn i ritterazyn, wykazujących, jak dotychczas, najsilniejsze działanie antynowotworowe spośród wszystkich znanych medycynie cytostatyków. Przedstawiony przeze mnie zakres badań i przeprowadzonych syntez stanowi z pewnością rozwiązanie jedynie niewielkiej części problemów w tej dziedzinie chemii organicznej. Wydaje mi się jednakże, iż osiągnięte wyniki wytyczają ciekawe perspektywy dla dalszych prac w tym kierunku, które w przyszłości zamierzam kontynuować.

Literatura cytowana:

Spis publikacji oznaczonych jako [H.1]...[H.15] znajduje się na początku niniejszego opracowania.

[W.1] Fieser L.F., Fieser M. „Steroids”, Reinhold Pub. Corp., New York, **1959**.

[W.2] Windaus A., Borgeaud P. *Ann.*, **1928**, 480, 235-237.

[W.3] Crabbe P., Zderic J.A. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1961**, 70, 403-405.

[W.4] Banerji J., Chatterjee A. *Indian J. Chem.*, **1973**, 11, 1056-1057.

[W.5] McKenna J., McKenna J.M., Thornthwaite D.W.J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1977**, 809-811.

[W.6] Guthrie J.P., Cossar J., Darson B.A. *Can. J. Chem.*, **1986**, 64, 2456-2469.

[W.7] Schmidt A., Beckert R. Weiß D. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 4299-4300.

[1.1] Ganesan A. w: „Studies in Natural Products Chemistry”, *vol. 18*, 875-906, Elsevier Science B.V., **1996**.

[1.2] LaCour T.G., Guo C., Bhandaru S., Boyd M.R., Fuchs P.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 692-707.

[1.3] Pan Y., Merriman R.L., Tanzer L.R., Fuchs P.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, 2, 967-972.

- [1.4] a) Heathcock C.H., Smith S.C. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 6828-6839; b) Smith H.E., Hicks A.A. *J. Org. Chem.*, **1971**, *36*, 3659-3668.
- [1.5] Morzycki J.W., Łotowski Z., Stępniewska M., Gryszkiewicz A., Wilczewska A.Z. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 16161-16168.
- [1.6] a) Hassner A., Larkin J.M., Dowd J.E. *J. Org. Chem.*, **1968**, *33*, 1733-1739; b) Fischer R.H., Weitz H.M. *Synthesis*, **1980**, 261-282; c) Rathore R., Lin Z., Kochi J.K. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 1859-1862; d) Rank W. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 5353-5356.
- [1.7] Černý L., Pouzar V., Buděšinský M., Drašar P. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2000**, *65*, 1597-1608.
- [1.8] a) Joule J.A., Smith G.F. „Heterocyclic Chemistry”, Van Nostrand Reinhold Company, London, 105, **1984** (polskie wyd. PWN); b) Bell T.W., Firestone A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 8109-8111.
- [2.1] a) Stryer L. „Biochemistry” W.M. Freeman & Co., San Francisco, Second Ed., **1981**, 205; b) Gennis R.B. „Biomembranes: Molecular Structure and Functions”, Cantor C.R. Ed.; Springer-Verlag, New York, **1989**.
- [2.2] Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. *J. Phys. Chem.*, **1963**, *67*, 534-535.
- [2.3] Rand R.P., Parsegian V.A. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **1984**, *62*, 752-759.
- [2.4] Chapman D., Kramers M.T.C., Restall C.J. *Cholesterol and Biomembrane Structures*. W: Danielsson H., Sjövall J. Eds.; „Sterols and Bile Acids”, Elsevier, Amsterdam, **1985**, 151-174.
- [2.5] a) Johnston D.S., Sanghera S., Manjon - Rubio A., Chapman D. *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, *602*, 213-216; b) Janas T., Kotowski J., Tien H.T. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1988**, *19*, 405-412.
- [2.6] Moss R., Li J.-M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 9227-9229.
- [2.7] Tien H.T. „Bilayer Lipid Membranes: Theory and Practice”, Marcel Dekker, Inc., New York, **1974**.
- [2.8] a) Pettit G.R., Bowyer W.J. *J. Org. Chem.*, **1960**, *25*, 84-86; b) Ni Y., Kim H.-S., Wilson W.K., Kusic A., Schroepfer Jr., G.J. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 3687-3690.
- [2.9] Prisbe E.J., Smejkal J., Verheyden J.P.H., Moffat J.G. *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 1836-1846.
- [2.10] Stowell J.C. „Carbanions in Organic Synthesis”, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1979**.
- [2.11] a) Wicha J., Bal K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1978**, *11*, 1282-1288; b) Kurek-Tyrlik A., Minksztyl K., Wicha J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1849-1850.
- [2.12] Zarecki A., Wicha J. *Synthesis*, **1996**, 455-456.
- [2.13] Brown A.J., Jessup W. *Artherosclerosis*, **1999**, *142*, 1-48.
- [2.14] Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G. *J. Nutr. Biochem.*, **2002**, *13*, 700-710.
- [2.15] a) Groves J.T., Neumann R. *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 3891-3893; b) Maki S., Konno K., Ohba S., Takayama H. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 3541-3542; c) Wu X., Song C., Cheng F. *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, *327*, 321-325.
- [2.16] Kowalski J., Płoszyńska J., Sobkowiak A., Morzycki J., Wilczewska A.Z. *J. Electroanal. Chem.*, **2005**, *585*, 275-280.

- [2.17] a) Morrow G.W. *Anodic Oxidation of Alcohols and Derivatives*; w: Lund H., Hammerich O. „Organic Electrochemistry”, Dekker, New York, **2001**, 611-613; b) Amatore C., Cammoun C., Jurand A. *Synlett*, **2007**, *14*, 2173-2178; c) Rodrigues I.A., Nart F.C. *J. Electroanal. Chem.*, **2006**, *590*, 145-151.
- [2.18] Kirk D.N., Hartshorn M.P. „Steroid Reaction Mechanisms”, Elsevier Publishing Co., New York, **1968**, 236-248.
- [3.1] Kączkowski J. „Podstawy biochemii”, WNT, Warszawa, **1995**.
- [3.2] a) Lehn J.-M., Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., Vögtle F. „Comprehensive Supramolecular Chemistry”, Pergamon, Oxford, **1996**; b) Schroeder G. w: Koroniak H., Barciszewski J., Markiewicz W.T., Ziemnicki K. „Na Pograniczu Chemii i Biologii”; t. 2, Wyd. Naukowe U.A.M, Poznań, **1999**, 143-166.
- [3.3] a) Li Y., Dias J.R. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 283-304; b) Wallimann P., Marti T., Furer A., Diederich F. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1567-1608.
- [3.4] a) Tamminen J., Kolehmainen E. *Molecules*, **2001**, *6*, 21-46; b) Virtanen E., Kolehmainen R. *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, *16*, 3385-3399.
- [3.5] Maitra U. *Curr. Sci.*, **1996**, *71*, 617-624.
- [3.6] Balasubramanian R., Rao P., Maitra U. *Chem. Commun.*, **1999**, *23*, 2353-2354.
- [3.7] Janout V., Lanier M., Regen S.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1573-1574.
- [3.8] a) Bonar-Law R.P., Sanders J.K.M. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 1677-1680; b) Gao H., Dias J.R. *Croat. Chem. Acta*, **1998**, *71*, 827-831.
- [3.9] a) Davis A.P. *Chem. Soc. Rev.*, **1993**, *22*, 243-253; b) Davis A.P., Wareham R.S., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1999**, *38*, 2978-2996.
- [3.10] Kitagawa T., Tsutsui C. *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, *48*, 1363-1366.
- [3.11] Medou M., Priem G., Quélever G., Camplo M., Kraus J.L. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 4021-4024.
- [3.12] Boger M., Drabek J., Neumann R. Brit. UK Pat. Appl. GB 2,145,716; *Chem. Abstr.* 1985, 103, 141636u.
- [3.13] a) Palmere R.M., Conley R.T., *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 2703-2707; b) Moriconi R.J., Stemmiski M.A. *J. Org. Chem.*, **1972**, *37*, 2035-2039; c) *Org. Synth.* **1973**, *Coll. Vol. V*, 273.
- [3.14] Johnson R.G., Ingham R.K. *Chem. Rev.*, **1956**, *56*, 219-269.
- [3.15] a) Li Y., Dias J.R. *Synthesis*, **1997**, 425-430; b) Ghosh S., Choudhury A.R., Row T.N.G., Maitra U. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 1441-1444.
- [3.16] a) Davis A.P., Gilmer J.F., Perry J.J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 1312-1315; b) Albert D., Feigel M. *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 2168-2181.
- [3.17] Czajkowska D., Morzycki J.W. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 2851-2855.
- [3.18] Fluharty A.L. *Biochemistry of the Thiol Group*, w: Patai S. „The Chemistry of the Thiol Group”, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1974**, 598-668.

[3.19] Szilágyi L., T.-Z. Illyés T.-Z., P. Herczegh P. , *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 3901-3903.

[3.20] Mu Y.Q., Nodwell M., Pace J.L., Shaw J.-P., Judice J.K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 735-738.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Zabawo', with a long horizontal stroke extending to the right.