



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΣΠΕΙΡΟ ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ  
ΜΙΜΗΤΩΝ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΝΩΝ**

**ΚΙΡΚΙΛΕΣΗ ΟΛΓΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΛΙΟΣ 2017**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΣΠΕΙΡΟ ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΜΙΜΗΤΩΝ  
ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΝΩΝ**

**Κιρκιλέση Όλγα**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Τσοτίνης Ανδρέας, Καθηγητής**

**Δρ Καλογεροπούλου Θεοδώρα, Διευθύντρια Ερευνών**

**Παπαναστασίου Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής**

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα διπλωματική εργασία σχεδιάσθηκαν και συντέθηκαν νέα 17-σπειρο ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) με στόχο τη διερεύνηση των στεροειδών απαιτήσεων για δράση ως μιμητών των νευροτροφινών.

Ο σχεδιασμός των αναλόγων αυτών στηρίχθηκε σε προηγούμενες μελέτες της ομάδας της Δρ Θ. Καλογεροπούλου, που έδειξαν σε συνεργασία με την ομάδα του Καθ. Αχιλλέα Γραβάνη, ότι 17-σπειροεποξυ-ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης εμφανίζουν νευροπροστατευτική δράση μιμούμενα αυτή του NGF, μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα TrkA. Ειδικότερα, στην παρούσα εργασία συντέθηκαν δύο σειρές C17-σπειρο αναλόγων και ειδικότερα, μία σειρά 2,6-διϋδροπυρανικών και 2,5-διϋδροφουρανικών αναλόγων, καθώς επίσης και μία σειρά σπειροκυκλοπροπανικών αναλόγων. Αντιδράσεις-κλειδί για τη σύνθεση των 17-σπειρο ετεροκυκλικών δακτυλίων ήταν η ολεφινική και ενυνική μετάθεση με κύκλωση, καταλυόμενες από καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς, ενώ για τα σπειροκυκλοπροπανικά ανάλογα η αντίδραση κυκλοπροπανίωσης Simmons-Smith.

Στόχος ήταν να μελετηθεί η επίδραση του μεγέθους του σπειρανικού δακτυλίου και των υποκαταστατών του στην αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς των νευροτροφινών, καθώς επίσης και στη νευροπροστατευτική δράση. Η βιολογική αποτίμηση των νέων αναλόγων είναι σε εξέλιξη.

## **ABSTRACT**

The present dissertation involves the design and synthesis of new 17-spiro-dehydroepiandrosterone (DHEA) derivatives with the aim to evaluate the stereochemical requirements for neurotrophin mimetic activity.

The design of these analogues was based on previous findings of the research group of Dr Theodora Calogeropoulou, in collaboration with the group of Prof. Achileas Gravanis, which showed that 17-spiroepoxy analogues of dehydroepiandrosterone possess neuroprotective activity mimicking that of nerve growth factor (NGF), through their interaction with the TrkA receptor. More specifically, in the present work two series of C17-spiro derivatives were synthesized: one series encompasses C17-spiro-2,6-dehydropyran and C17-spiro-2,5-dehydrofuran analogues of DHEA and one series C17-spiro-cyclopropyl analogues. The key-reactions for the synthesis of 17-spiro heterocyclic rings were the ring closing ene and enyne metathesis, catalyzed by Grubbs' catalyst 2<sup>nd</sup> generation, while for the cyclopropane derivatives the Simmons-Smith cyclopropanation reaction.

The aim of the work was to investigate the effect of the size and substitution of the spiro rings on the binding to neurotrophins' receptors, as well as on the neuroprotective activity of the respective analogues. The biological evaluation is in progress.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Δρ. Θεοδώρας Καλογεροπούλου, Διευθύντριας Ερευνών.

Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Θ. Καλογεροπούλου, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στην ερευνητική της ομάδα, καθώς επίσης και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Όλο αυτό το διάστημα η συνεχής στήριξη και παρουσία της στο εργαστήριο ήταν πολύ σημαντική, δίνοντας συνεχώς ερεθίσματα για περαιτέρω βελτίωση.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Α. Τσοτίνη για την άμεση βοήθειά του, όποτε ήταν απαραίτητη, καθώς επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή, κ. Ιωάννη Παπαναστασίου, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις πολύτιμες υποδείξεις του, κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κυριάκο Προυσή τόσο για το ενδιαφέρον του κατά την επίβλεψή μου, καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Επιπλέον, θερμά ευχαριστώ τόσο για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου προσέφεραν, όσο και για το μοναδικό επαγγελματικό και ταυτόχρονα φιλικό κλίμα μέσα στο οποίο δούλεψα αυτούς τους μήνες οφείλω στους συναδέλφους Δρ. Μ. Ρουσσάκη, Δρ. Γ. Μαγουλά, Ι. Χριστόπουλο, Δρ. Θ. Φωτοπούλου και Ε. Χαζάπη.

Τέλος, ευχαριστώ τους δικούς μου ανθρώπους για τη στήριξη και την κατανόησή τους όλο αυτό τον καιρό.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>Πρόλογος</u></b> .....	12
<b><u>Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b> .....	13
1.1 Γενικά.....	13
1.2 Νευροστεροειδή.....	14
1.3 Βιοσύνθεση των νευροστεροειδών.....	16
1.4 Νευροτροφικοί παράγοντες.....	22
1.4.1 Γενικά.....	22
1.4.2 Νευροαυξητικός παράγοντας.....	24
1.4.3 Νέα μόρια, μιμητές των νευροτροφινών.....	27
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b> .....	33
2.1 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....	33
2.2 Σύνθεση νέων αναλόγων εν δυνάμει μιμητών των νευροτροφινών.....	35
2.2.1 Σύνθεση νέων πυρανο-αναλόγων της DHEA.....	36
2.2.2 Σύνθεση νέων φουρανο-αναλόγων της DHEA.....	62
2.2.3 Σύνθεση νέων σπειρο-κυκλοπροπανικών αναλόγων της DHEA.....	67
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιολογική αποτίμηση της ένωσης (17,2'R)-5'-αιθενυλο-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν]-3β-όλης (5)</u></b> .....	73
3.1 Εισαγωγή.....	73
3.2 Αποτελέσματα.....	73
3.2.1 Η ένωση 5 (BNN237) συνδέεται στους υποδοχείς των νευροτροφινών TrkA/p75 <sup>NTR</sup> με υψηλή συγγένεια.....	73
3.2.2 Το BNN237 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών (Neural Stem)/προγονικών νευρικών (Neural Progenitors) κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης του εγκεφάλου μετά από 48 ώρες πλήρους απουσίας EGF.....	74
3.2.3 Παρουσία ειδικού αναστολέα του EGFR, AG1478, ακυρώνεται η επίδραση του BNN237 στα NSCs.....	76
3.2.4 Το BNN237 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των SVZ NS/NPs in vivo...77	77

3.2.5 Το BNN237 ενεργοποιεί τους υποδοχείς EGF, μέσω μηχανισμού που παρεμβάλλει ο υποδοχέας TrkA.....	78
<b><u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u></b> .....	80
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:</u></b> Πειραματικό μέρος.....	81
4.1 Όργανα και διατάξεις.....	81
4.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....	81
4.3 Αντιδραστήρια και διαλύτες.....	81
4.4 Πειραματικές Μέθοδοι.....	82
<b><u>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</u></b> .....	127
<b><u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</u></b> .....	128
<b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b> .....	164

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Γενική δομή και αρίθμηση στεροειδών.....	13
Σχήμα 1.2: Δομές ενώσεων-αγωνιστών του TrkA.....	28
Σχήμα 1.3: Δομές ενώσεων-ανταγωνιστών του p75.....	29
Σχήμα 1.4: Απεικόνιση δράσης του αναλόγου BNN27.....	32
Σχήμα 2.1: Σχεδιασμός των νέων αναλόγων .....	34
Σχήμα 2.2: Πετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 5.....	36
Σχήμα 2.3: Σύνθεση της ένωσης 5.....	36
Σχήμα 2.4: Αντιδράσεις ενυλικής μετάθεσης στην οργανική χημεία .....	39
Σχήμα 2.5: Προτεινόμενος μηχανισμός της ενυλικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου στην περίπτωση ακραίου αλκινίου .....	40
Σχήμα 2.6: Συσχέτιση της exo/endo-εκλεκτικότητας με το μέγεθος του σχηματιζόμενου δακτυλίου στην ενυλική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου.	41
Σχήμα 2.7: Προϊόντα αντίδρασης ενυλικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου, με χρήση 10% καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς.....	43
Σχήμα 2.8: Σύνθεση της ένωσης 7.....	47
Σχήμα 2.9: Νέα ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 5.....	48
Σχήμα 2.10 : Τροποποιημένη σύνθεση της ένωσης 5.....	49
Σχήμα 2.11: Πετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 13.....	50
Σχήμα 2.12: Σύνθεση της ένωσης 13.....	51
Σχήμα 2.13: Προϊόντα που λαμβάνονται κατά την αντίδραση αποπροστασίας με χρήση 2eq DDQ.....	52
Σχήμα 2.14: Σύνθεση της ένωσης 15.....	52
Σχήμα 2.15: Μηχανισμός της αντίδρασης αποπροστασίας <i>p</i> -μεθοξυβενζυλαιθέρων με DDQ.....	54
Σχήμα 2.16: Μηχανισμός οξειδωσης αλλυλικών αλκοολών με χρήση DDQ.....	54
Σχήμα 2.17: Αντίδραση ολεφινικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου.....	55
Σχήμα 2.18: Οι δομές I και II απεικονίζουν τους καταλύτες Grubbs πρώτης και δεύτερης γενιάς, αντίστοιχα.....	56
Σχήμα 2.19: Προτεινόμενος μηχανισμός της ολεφινικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου .....	56
Σχήμα 2.20: Μηχανισμός αντίδρασης Wittig.....	57
Σχήμα 2.21: Πετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού των ενώσεων 17, 19...	58
Σχήμα 2.22: Σύνθεση των ενώσεων 17, 19.....	59
Σχήμα 2.23: Μηχανισμός της αντίδρασης Horner-Wadsworth-Emmons....	60
Σχήμα 2.24: Πετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 25.....	62
Σχήμα 2.25: Σύνθεση της ένωσης 25.....	63
Σχήμα 2.26: Πετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 29.....	64
Σχήμα 2.27: Σύνθεση της ένωσης 29.....	65
Σχήμα 2.28: Πετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού των ενώσεων 37, 38...	67
Σχήμα 2.29: Σύνθεση των αναλόγων 37, 38.....	68
Σχήμα 2.30: Προϊόντα αντίδρασης κυκλοπροπανίωσης του αναλόγου 32.	69
Σχήμα 2.31: Σύνθεση των ενώσεων 37, 38.....	71
Σχήμα 3.1: Αναίρεση του φαινομένου νευρογένεσης του BNN237 στον πολλαπλασιασμό των SVZ NS/NPs, παρουσία αναστολέα του EGFR.....	76
Σχήμα 3.2: In vivo επίδραση του BNN237 στον πολλαπλασιασμό των ενδογενών νευρικών βλαστικών (Neural Stem)/προγονικών νευρικών (Neural Progenitors) κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης του εγκεφάλου...	78



Σχήμα 3.3: Πιθανός μηχανισμός δράσης του BNN237.....	79
------------------------------------------------------	----

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Τα στάδια της στεροειδογένεσης και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή.....	18
Εικόνα 1.2: Επίδραση των νευροστεροειδών δεϋδροεπιανδροστερόνη και αλοπρεγνανολόνη στα νευρικά κύτταρα .....	19
Εικόνα 1.3: Υποθετικό μοντέλο για την επίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης στους νευρώνες ύστερα από πρόσδεσή της στους υποδοχείς του νευροαυξητικού παράγοντα.....	21
Εικόνα 1.4: Μονοπάτια σηματοδότησης των νευροτροφινών.....	22
Εικόνα 1.5: Κρυσταλλική δομή του NGF και του υποδοχέα του, TrkA. Το τμήμα d5, που βρίσκεται πιο κοντά στην μεμβράνη είναι αυτό που συνδέεται άμεσα με την ώριμη μορφή της νευροτροφίνης .....	25
Εικόνα 1.6: Μηχανισμοί της ασθένειας και πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	27
Εικόνα 1.7: Μελέτες Μοριακής Δυναμικής, όπου φαίνεται η σύνδεση του BNN27 στα συμπλέγματα $p75^{NTR}/NGF$ 2:1 και $p75^{NTR}/\mu\epsilon\tau\alpha\lambda\lambda\alpha\gamma\mu\epsilon\nu\ \text{proNGF}$ 2:2.....	31
Εικόνα 2.1: Νέα ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης με σπειροκυκλικούς ακόρεστους εξαμελείς και πενταμελείς αιθερικούς δακτυλίους στη θέση C17.....	35
Εικόνα 2.2: Φάσματα $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ NMR της ένωσης 5 σε $\text{CDCl}_3$ .....	38
Εικόνα 2.3: Φάσματα $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ NMR της ένωσης 6 σε $\text{CDCl}_3$ .....	44
Εικόνα 2.4: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 6 σε $\text{CDCl}_3$ .....	45
Εικόνα 2.5α: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 6 σε $\text{CDCl}_3$ .....	46
Εικόνα 2.5β: Περιοχή χαμηλών πεδίων ετεροπυρηνικού φάσματος HSQC της ένωσης 6 σε $\text{CDCl}_3$ .....	46
Εικόνα 2.6: Φάσματα $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ NMR της ένωσης 15 σε $\text{CDCl}_3$ .....	53
Εικόνα 2.7: Αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons.....	60
Εικόνα 2.8: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της ένωσης 29 σε $\text{CDCl}_3$ .....	66
Εικόνα 2.9: Φάσματα $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ NMR της ένωσης 33 σε $\text{CDCl}_3$ .....	70
Εικόνα 2.10: Μηχανισμός κυκλοπροτανίωσης Simmons-Smith.....	72
Εικόνα 3.1: Το BNN237 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς TrkA και $p75^{NTR}$ σε συγκέντρωση nanomolar.....	74
Εικόνα 3.2: Επίδραση του BNN237 στον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών (Neural Stem)/προγονικών νευρικών (Neural Progenitors) κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης του εγκεφάλου. Α. Ανάλυση κυτταρομετρίας Ροής των BrdU-APC staining of SVZ NS/NPs ύστερα από 48 ώρες Β. Ποσοστό των BrdU-APC+/7-AAD ύστερα από κατεργασία με BNN237, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του EGF.....	75

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Δομές των φυσιολογικών νευροστεροειδών.....	16
Πίνακας 1.2: Δομές συνθετικών αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης με νευροπροστατευτική δράση.....	30
Πίνακας 2.1: Νέα ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης με σπειροκυκλοπροπανικό δακτύλιο στη θέση C17.....	35
Πίνακας 2.2: Πειραματικές συνθήκες με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης της αλκυλίωσης της ένωσης 2.....	41
Πίνακας 2.3: Νέα ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης με σπειροκυκλικούς ακόρεστους πενταμελείς αιθερικούς δακτυλίους στη θέση C17.....	62

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

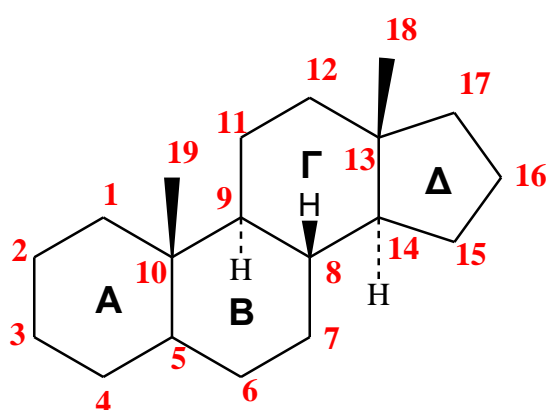
Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών Δρ. Θεοδώρας Καλογεροπούλου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 Γενικά

Τα στεροειδή είναι οργανικά μόρια, των οποίων η δομή βασίζεται σε ένα τετρακυκλικό σύστημα συμπυκνωμένων αλειφατικών δακτυλίων. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.1, οι δακτύλιοι υποδηλώνονται ως Α, Β, Γ, Δ αρχίζοντας από αριστερά, ενώ τα άτομα άνθρακα αριθμούνται ξεκινώντας από το δακτύλιο Α. Οι τρεις εξαμελείς δακτύλιοι (Α, Β, Γ) έχουν διαμόρφωση τύπου ανακλίντρου, ενώ ο πενταμελής δακτύλιος έχει διαμόρφωση 14α φακέλου (οι δακτύλιοι Γ και Δ είναι ενωμένοι υπό μορφή trans).



Σχήμα 1.1: Γενική δομή και αρίθμηση στεροειδών

Τα στεροειδή απαντώνται σε φυτά (π.χ. φυτοστερόλες), ζώα και μύκητες (π.χ. εργοστερόλες). Στα ζώα και τους μύκητες τα στεροειδή παράγονται στα κύτταρα από τη λανοστερόλη, ενώ στα φυτά παράγονται από την κυκλοαρτενόλη. Ωστόσο, και η λανοστερόλη και η κυκλοαρτενόλη προέρχονται από την κυκλοποίηση του τριτερπενίου σκουαλενίου.

Στον άνθρωπο, τα περισσότερα στεροειδή λειτουργούν ως ορμόνες, δηλαδή ως "χημικοί αγγελιοφόροι" οι οποίοι εκκρίνονται από τους αδένες και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται σε συγκεκριμένους ιστούς. Οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να διακριθούν σε πέντε κατηγορίες ανάλογα με τους υποδοχείς στους οποίους προσδένονται: γλυκοκορτικοειδή, αλατοκορτικοειδή, ανδρογόνα, οιστρογόνα και προγεστογόνα. Τα γλυκοκορτικοειδή (π.χ. κορτιζόνη) και τα αλατοκορτικοειδή (π.χ. αλδοστερόνη) ανήκουν στα αδρενοκορτικοειδή, εκκρίνονται από τα επινεφρίδια και η μεν πρώτη κατηγορία συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και στον έλεγχο των φλεγμονών, η δε δεύτερη ρυθμίζει την ισορροπία των ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  στα κυτταρικά υγρά και ελέγχει τον μηχανισμό διόγκωσης στους ιστούς. Τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα και τα προγεστογόνα ανήκουν στις

γεννητικές ορμόνες. Τα ανδρογόνα (π.χ. τεστοστερόνη, ανδροστερόνη) είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των δευτερευόντων ανδρικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της εφηβείας και την ανάπτυξη ιστών και μυών, συντίθενται δε στους όρχεις από τη χοληστερόλη. Τα οιστρογόνα (π.χ. οιστρόνη, 3,17β-οιστραδιόλη) είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των δευτερευόντων γυναικείων χαρακτηριστικών και τη ρύθμιση της εμμηνορροίας, ενώ βιοσυντίθενται στις ωοθήκες από την τεστοστερόνη. Τέλος, τα προγεστογόνα (π.χ. προγεστερόνη) είναι απαραίτητα για την προπαρασκευή της μήτρας προκειμένου να δεχτεί το γονιμοποιημένο ωάριο κατά τη διάρκεια της κύησης.

Φυσικά θα πρέπει να αναφερθούν και τα συνθετικά στεροειδή τα οποία έχουν παρασκευασθεί σε φαρμακευτικά εργαστήρια και στα οποία ανήκουν τα αντισυλληπτικά και τα αναβολικά.<sup>1</sup>

## 1.2 Νευροστεροειδή

Οι στεροειδείς ορμόνες συντίθενται σε περιφερικά όργανα και μπορούν να δράσουν σε γονιδιακό επίπεδο προκαλώντας αλλαγές στη διάθεση και τη συμπεριφορά. Αυτά τα φαινόμενα αναπτύσσονται σχετικά αργά και συνεχίζουν να υφίστανται για αρκετό διάστημα μετά την εξάλειψη των στεροειδών από τον εγκέφαλο. Αντίθετα, κάποια στεροειδή μπορούν να προκαλέσουν άμεσες αλλαγές στη νευρική διέγερση σε χρόνο ο οποίος αποκλείει τη δράση σε γονιδιακό επίπεδο.<sup>2</sup> Ειδικότερα στις αρχές της δεκαετίας του 1940, ο Selye ανέφερε ότι πολλά στεροειδή όπως η προγεστερόνη, η δεϋδροεπιανδροστερόνη και πολλοί μεταβολίτες τους μπορούσαν να επάγουν τη νάρκωση και την αναισθησία.<sup>3,4</sup>

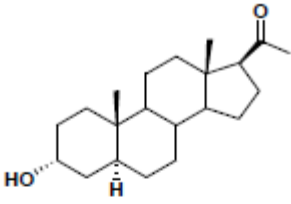
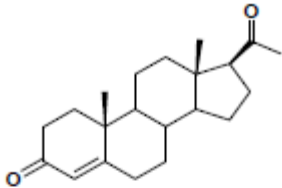
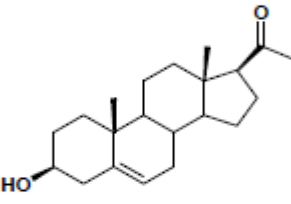
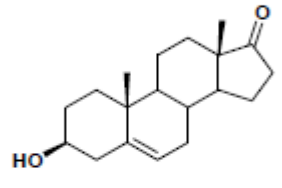
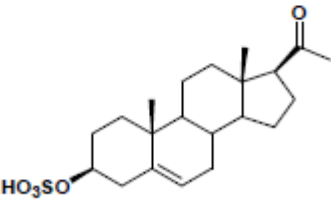
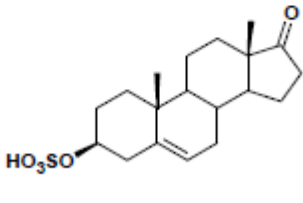
Η ανακάλυψη ότι συγκεκριμένα στεροειδή συντίθενται *de novo* στον εγκέφαλο και αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος τύπου A (GABA<sub>A</sub>)<sup>5,6</sup> και του Ν-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος (NMDA)<sup>7</sup> οδήγησε στην εξέλιξη ενός νέου πεδίου. Συγκεκριμένα, τη δεκαετία του 1980 ο Baulieu και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι στεροειδή όπως η πρεγνενολόνη (PREG), η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), οι εστέρες τους με θειϊκό οξύ, καθώς και με λιπαρά οξέα ανιχνεύθηκαν σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ιστούς του νευρικού συστήματος (εγκέφαλος και περιφερικοί νευρώνες) σε σύγκριση με το πλάσμα.<sup>8,9</sup> Παρόλο που αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί ως αποτέλεσμα της περιφερικής σύνθεσης των στεροειδών και της συσσώρευσής τους στον εγκέφαλο, βρέθηκε ότι τα στεροειδή αυτά παρέμεναν στο νευρικό σύστημα επί μακρόν, ακόμα και μετά από γοναδεκτομή (χειρουργική απομάκρυνση των γονάδων, δηλαδή των ωοθηκών ή των όρχεων) ή επινεφριδεκτομή (χειρουργική αφαίρεση των επινεφριδίων).<sup>10</sup> Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα στεροειδή αυτά είτε συντίθενται *de novo* στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ

και ΠΝΣ, αντίστοιχα), είτε έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στις περιοχές αυτές. Στα εν λόγω στεροειδή αποδόθηκε η ονομασία **νευροστεροειδή**, για να υποδηλώνεται η ασυνήθιστη προέλευσή τους και για να διαφοροποιούνται από τα στεροειδή τα οποία προέρχονται από τα κλασικά στεροειδογενετικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των γονάδων, των επινεφριδίων και του πλακούντα.<sup>11</sup> Σήμερα ο αρχικός αυτός ορισμός έχει τροποποιηθεί, ώστε να χρησιμοποιείται και για τα νευροδραστικά στεροειδή τα οποία παράγονται στον εγκέφαλο, αλλά και για τα στεροειδή τα οποία προέρχονται από περιφερικά συστήματα και μεταβολίζονται σε νευροδραστικά παράγωγα επίσης στον εγκέφαλο.<sup>12</sup>

Στη συνέχεια, το ερώτημα, το οποίο έπρεπε να απαντηθεί ήταν αν τα νευροστεροειδή συντίθενται στον εγκέφαλο ή συσσωρεύονται στο νευρικό σύστημα. Πολλές ήταν οι ερευνητικές ομάδες, οι οποίες ασχολήθηκαν με το παραπάνω ζήτημα και τελικά κατέληξαν ομόφωνα ότι τα ένζυμα που εμπλέκονται στην κλασική στεροειδογένεση εντοπίζονται και στο νευρικό σύστημα και, επομένως, είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των νευροστεροειδών.<sup>13</sup> Ωστόσο, θα πρέπει να τονισθεί ότι το νευρικό σύστημα διαθέτει επιπλέον ένζυμα για την τροποποίηση των στεροειδών σε νευροδραστικά ανάλογα.<sup>14</sup>

Τα φυσιολογικά νευροστεροειδή επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασής τους με κλασικούς ενδοκυττάριους πυρηνικούς υποδοχείς (intracellular nuclear receptors) ή επιδρούν στη νευροδιαβίβαση μέσω αλληλεπίδρασής τους με μεμβρανικούς ιονοτρόπους υποδοχείς (ion-gated receptors) και άλλους υποδοχείς νευροδιαβιβαστών (neurotransmitter receptors). Στον Πίνακα 1.1 παρατίθενται μερικά από τα αντιπροσωπευτικότερα φυσιολογικά νευροστεροειδή: αλλοπρεγνανολόνη (allopregnanolone, Allo), προγεστερόνη (progesterone, PROG), πρεγνενολόνη (pregnenolone, PREG), δεϋδροεπιανδροστερόνη (dehydroepiandrosterone, DHEA), θειϊκός εστέρας της πρεγνενολόνης (PREGS) και θειϊκός εστέρας της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS).

**Πίνακας 1.1:** Δομές των φυσιολογικών νευροστεροειδών.

 <p><b>Αλλοπρεγνανολόνη (Allo)</b></p>	 <p><b>Προγεστερόνη (PROG)</b></p>
 <p><b>Πρεγνενολόνη (PREG)</b></p>	 <p><b>Δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA)</b></p>
 <p><b>Θειϊκός εστέρας της πρεγνενολόνης (PREGS)</b></p>	 <p><b>Θειϊκός εστέρας της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS)</b></p>

### 1.3 Βιοσύνθεση των νευροστεροειδών

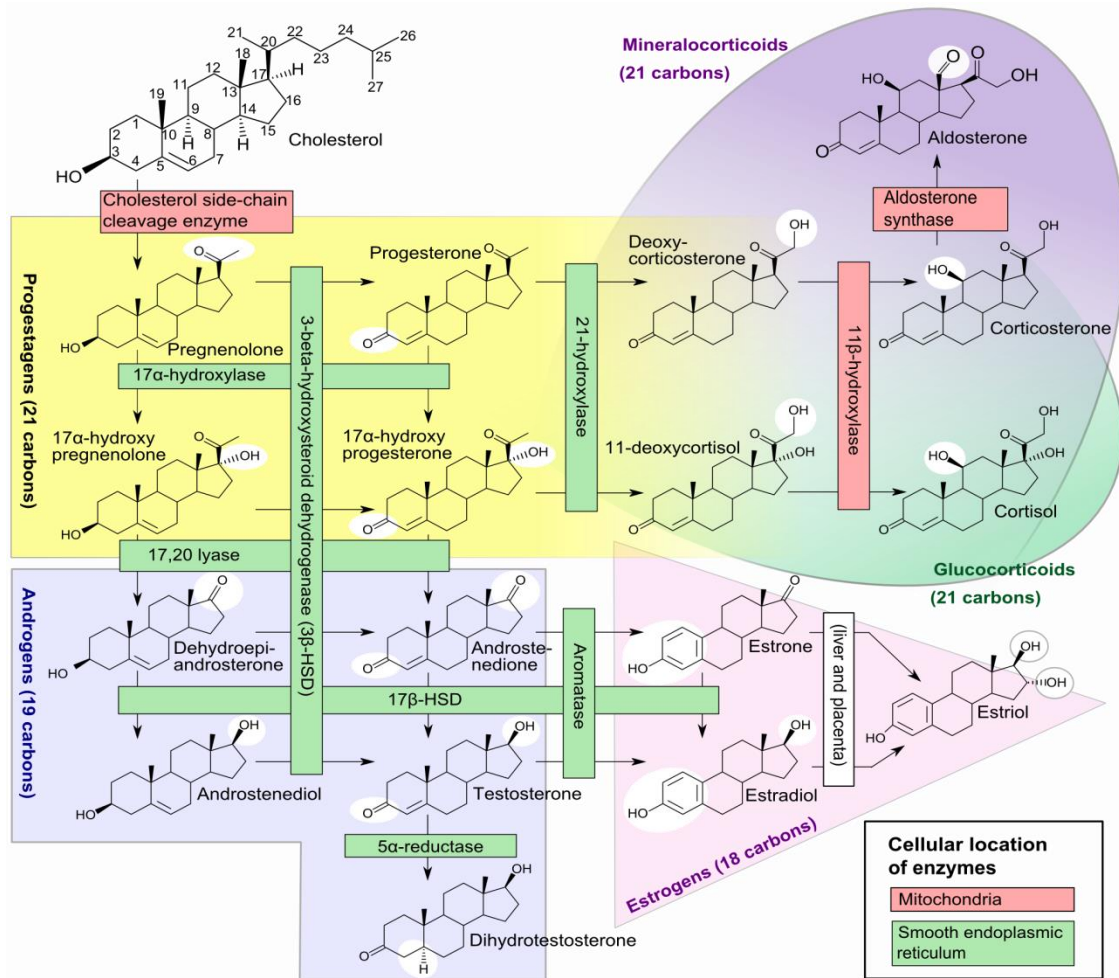
Η πρώτη φάση της στεροειδογένεσης περιλαμβάνει τη δέσμευση της χοληστερόλης από τον περιφερικού-τύπου υποδοχέα βενζοδιαζεπίνης (PBR). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της στεροειδογόνου οξειάς ρυθμιστικής πρωτεΐνης (StAR)<sup>15-17</sup> η χοληστερόλη εισάγεται στα μιτοχόνδρια των γλοιακών κυττάρων και των νευρώνων του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος<sup>18</sup>, όπου και λαμβάνει χώρα η βιοσύνθεση των στεροειδών, η οποία περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων καταλυόμενων από τα στεροειδογενετικά ένζυμα. Στη στεροειδογένεση, το πρώτο στάδιο το οποίο καθορίζει την ταχύτητα σχηματισμού όλων των στεροειδών ορμονών και το οποίο είναι ορμονικά ρυθμιζόμενο είναι η μετατροπή της χοληστερόλης προς



πρεγνενολόνη. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται και στον εγκέφαλο και στους κλασικούς ενδοκρινείς ιστούς<sup>15,19</sup> και καταλύεται από το μιτοχονδριακό ένζυμο P450<sub>sc</sub>c, το οποίο διασπά την πλευρική αλυσίδα της χοληστερόλης σε τρία διαδοχικά στάδια: α) 20 $\alpha$ -υδροξυλίωση, β) 22-υδροξυλίωση και γ) διάσπαση του ανθρακικού δεσμού C20-C22 της χοληστερόλης. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι η πρεγνενολόνη (PREG) και το ισοκαπροϊκό οξύ, ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι σε όλους τους στεροειδογενετικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου, απαντάται ένα μόνο είδος του ενζύμου P450<sub>sc</sub>c<sup>20,21</sup>.

Στη συνέχεια, η πρεγνενολόνη με τη βοήθεια εξειδικευμένων ενζύμων μπορεί να μετατραπεί σε όλους τους τύπους των στεροειδών ορμονών. Κατ' αρχήν, μπορεί είτε να υδροξυλιωθεί στη 17-θέση από το μικροσωμικό ένζυμο P450<sub>c</sub>17, σχηματίζοντας τη 17 $\alpha$ -υδροξυπρεγνενολόνη, είτε να μετατραπεί στην προγεστερόνη (PROG) μέσω του ενζύμου 3 $\beta$ -HSD το οποίο εκφράζεται σε νευρώνες και στη γλοία<sup>13,22</sup>. Όσον αφορά στην υδροξυλίωση στη 17-θέση, είναι γνωστό ότι υπάρχει μια εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα: κάποια είδη προτιμούν τα  $\Delta^5$ -στεροειδή (π.χ. πρεγνενολόνη) και κάποια άλλα προτιμούν τα  $\Delta^4$ -στεροειδή (π.χ. προγεστερόνη)<sup>23</sup>.

Η 17 $\alpha$ -υδροξυπρεγνενολόνη αποτελεί πρόδρομη ένωση της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) και του θειϊκού εστέρα της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS). Παρουσία του ενζύμου P450<sub>c</sub>17 μετατρέπεται σε δεϋδροεπιανδροστερόνη, η οποία με τη σειρά της μετασχηματίζεται σε ανδρογόνα μέσω των ιστοειδικών ενζύμων 17 $\beta$ -HSD. Αρχικά, σχηματίζει την ανδροστενοδιόλη, η οποία με επίδραση του ενζύμου 3 $\beta$ -HSD παράγει την τεστοστερόνη. Η δε τεστοστερόνη μέσω της αρωματάσης P450<sub>a</sub>ο οδηγεί στην 3,17 $\beta$ -οιστραδιόλη, ενώ μέσω της 5 $\alpha$ -αναγωγάσης οδηγεί στη δεϋδροτεστοστερόνη (DHT).

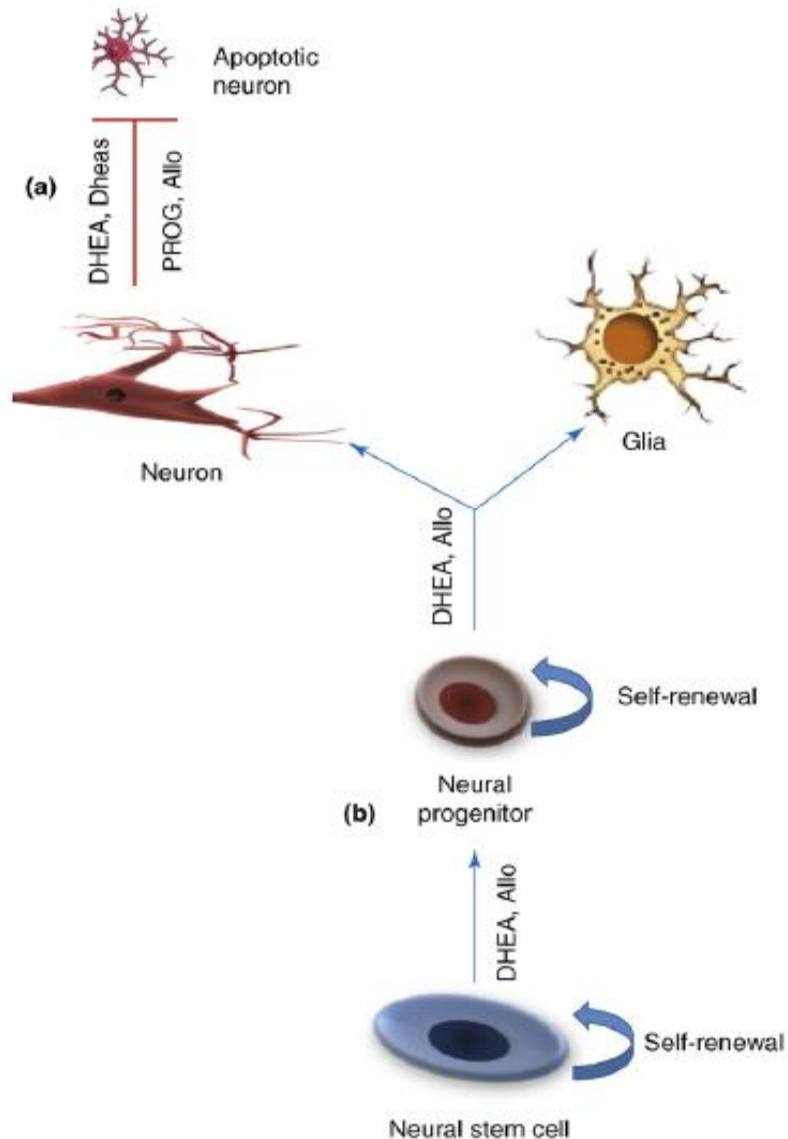


**Εικόνα 1.1:** Τα στάδια της στεροειδογένεσης και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή.<sup>24</sup>

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι τα νευροστεροειδή, τα οποία παράγονται *de novo* στο νευρικό σύστημα προάγουν, καθοδηγούν και τελειοποιούν την ανάπτυξη των νευραξόνων και των συνάψεων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο.<sup>22,25</sup>

Ειδικά, η δεϋδροεπιανδροστερόνη, ένα στεροειδές που απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον άνθρωπο, και ο θειϊκός εστέρας της ρυθμίζουν εκλεκτικά την αύξηση των νευρώνων στις περιοχές όπου εκφράζεται το ένζυμο P450c17.<sup>22,26,27</sup> Η τοπικά παραγόμενη δεϋδροεπιανδροστερόνη επιδρά σημαντικά στην ανάπτυξη των φλοιϊκών νευρώνων από έμβryo επίμυος, ενώ επάγει και το σχηματισμό των συνάψεων του νωτιαίου μυελού σε νευρώνες ιππόκαμπου.<sup>28,29</sup> Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (nM), το εν λόγω νευροστεροειδές προάγει την επιμήκυνση των νευραξόνων, επιδρώντας κατά αυτό τον τρόπο στην ανάπτυξη των νευρώνων.<sup>25</sup> Αντίθετα, ο θειϊκός εστέρας της δεϋδροεπιανδροστερόνης επηρεάζει την ανάπτυξη των δενδριτών και των διακλαδώσεων.<sup>30</sup> Η δε αναλογία της δεϋδροεπιανδροστερόνης έναντι του

θειϊκού εστέρα της μπορεί να ρυθμίζει εκλεκτικά την παραγωγή των νευρώνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νεοφλοιού και ως εκ τούτου, τη διαμόρφωση των προβολών και των συνάψεων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Η αλοπρεγνανολόνη επάγει τη νευριτική επιμήκυνση στον αναπτυσσόμενο υποθάλαμο (Εικόνα 1.2).



**Εικόνα 1.2:** Επίδραση των νευροστεροειδών δεϋδροεπιανδροστερόνη και αλοπρεγνανολόνη στα νευρικά κύτταρα.<sup>22</sup>

Όσον αφορά στη νευρογένεση, η δεϋδροεπιανδροστερόνη, αλλά όχι τα παράγωγά της, αυξάνει τον αριθμό των σχηματιζόμενων νευρώνων της οδοντωτής έλικας στον ιππόκαμπο επίμυος, ενώ ανταγωνίζεται την κατασταλτική επίδραση της κορτικοστερόνης στη νευρογένεση και τον

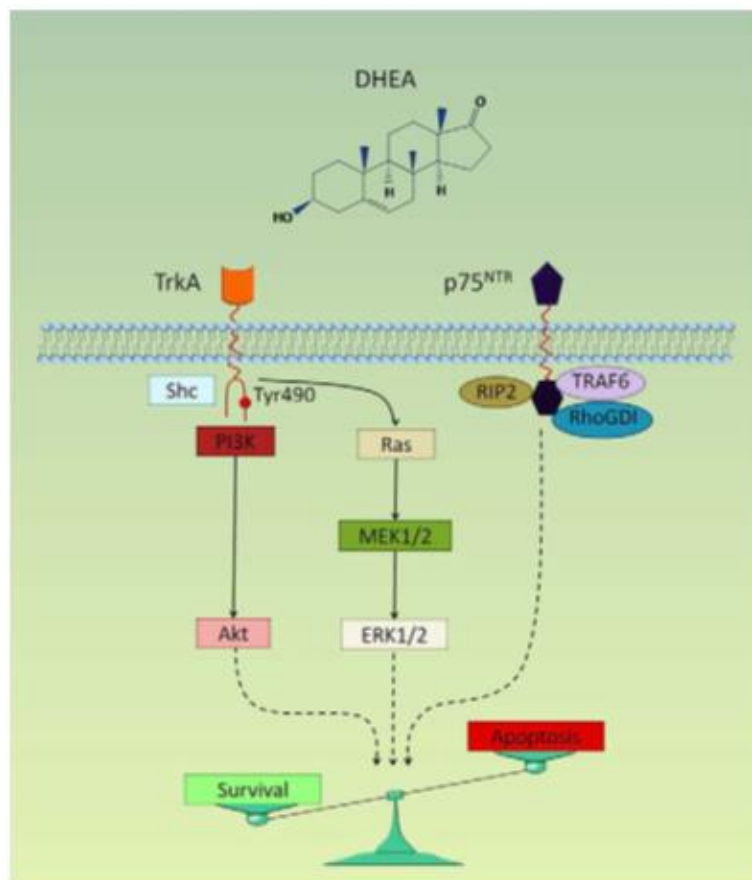
πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρώνων. Η επίδρασή της στη νευρογένεση βασίζεται στην αγωνιστική της δράση στους υποδοχείς NMDA, η οποία προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των νευρικών βλαστοκυττάρων.<sup>31</sup> Γενικότερα, η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο θειϊκός εστέρας της εκδηλώνουν αντίθετες δράσεις στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, οδηγώντας προς τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση. Τα επίπεδα των προαναφερθέντων νευροστεροειδών μειώνονται κατά τη γήρανση, με αποτέλεσμα την μη αναπλήρωση των νευρώνων, καθώς και τις εγκεφαλικές ατροφίες οι οποίες και σχετίζονται με τη γήρανση και την περιορισμένη δράση των νευροστεροειδών αυτών.<sup>22</sup>

Σύμφωνα με νεώτερα ερευνητικά δεδομένα, έχει βρεθεί ότι η δεϋδροεπιανδροστερόνη προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από την απόπτωση. Η αντιαποπτωτική/νευροπροστατευτική της δράση είναι αποτέλεσμα της πρόσδεσής της σε ειδικά σημεία πρόσδεσης στην κυτταρική μεμβράνη (mDBS). Η δεϋδροεπιανδροστερόνη προσδέεται στα mDBS, σε συγκεντρώσεις nanomolar, επάγοντας την ενεργοποίηση προ-επιβιωτικών κινασών, όπως είναι η Src, η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), PKC $\alpha/\beta$ , οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνο ή ρυθμιζόμενες από εξωτερική σηματοδότηση πρωτεϊνικές κινάσες 1 και 2 (MEK1/2) και οι ρυθμιζόμενες από εξωτερική σηματοδότηση κινάσες 1 και 2 (ERK1/2). Η ενεργοποίηση αυτών των κινασών επάγουν τη φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων CREB και NF- $\kappa$ B, οδηγώντας στον μεταγραφικό έλεγχο γονιδίων που κωδικοποιούν τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL. Παράλληλα, επάγεται και η ενεργοποίηση των κινασών PI3K και Akt, οι οποίες φωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad. Με αυτό τον τρόπο, η δεϋδροεπιανδροστερόνη αναστέλλει τον αποπτωτικό μηχανισμό των κυττάρων, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο.<sup>32a,b</sup>

Πρόσφατα, αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία από την ομάδα του Καθ. Α. Γραβάνη<sup>32a,b</sup> η αλληλεπίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης με τους μεμβρανικούς υποδοχείς TrkA και p75<sup>NTR</sup> του νευροαυξητικού παράγοντα (NGF) ( $IC_{50}=7.4\pm 1.75$  nM και  $IC_{50}=5.6\pm 0.55$  nM, αντίστοιχα) (Εικόνα 1.3). Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, τόσο ο NGF όσο και η DHEA προστατεύουν αποτελεσματικά τα νευρικά κύτταρα έναντι της απόπτωσης. Οι ομοιότητες που παρουσιάζουν οι δύο παράγοντες (NGF, DHEA) ως προς την επαγωγή των σηματοδοτικών μονοπατιών: δράση στην κυτταρική μεμβράνη, ενεργοποίηση των προ-επιβιωτικών κινασών και του μεταγραφικού ελέγχου της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων CREB και NF- $\kappa$ B, οδήγησαν τους ερευνητές να συμπεράνουν, ύστερα από μία σειρά πειραμάτων, το σημαντικό ρόλο των υποδοχέων του NGF στην αντιαποπτωτική δράση της DHEA.

Είναι επίσης γνωστό ότι η δεϋδροεπιανδροστερόνη δρα συνεργιστικά με το νευροαυξητικό παράγοντα όσον αφορά στη διαμόρφωση του εγκεφάλου, όσο και κατά την προστασία των νευρώνων από την απόπτωση. Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα επιβεβαίωσαν την ικανότητα της DHEA να μειώνει σε σημαντικό βαθμό τον αριθμό των αποπτωτικών συμπαθητικών νευρώνων, σε συνθήκες απουσίας του παράγοντα NGF.

Συνοψίζοντας, η **DHEA** αποτελεί ένα νευροστεροειδές, το οποίο προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από την απόπτωση, μιμούμενο σε κάποιο βαθμό την νευροπροστατευτική δράση του NGF. Η μειωμένη παρουσία και δράση τόσο του NGF όσο και της DHEA, η οποία πραγματοποιείται φυσιολογικά λόγω της γήρανσης, έχει συνδεθεί επίσης, με την εκδήλωση σημαντικού αριθμού νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Λαμβάνοντας υπόψη τα νέα δεδομένα και φυλογενετικές μελέτες σχετικά με την εξέλιξη των νευροτροφινών, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η δεϋδροεπιανδροστερόνη λειτουργούσε ως ένας φυλογενετικά αρχέγονος νευροτροφικός παράγοντας. Η υπόθεση αυτή μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό μη ενδοκρινικών, νευροπροστατευτικών, νευροαναγεννητικών και μικρομοριακών μιμητών του νευροαυξητικού παράγοντα με βάση τη δομή της δεϋδροεπιανδροστερόνης.

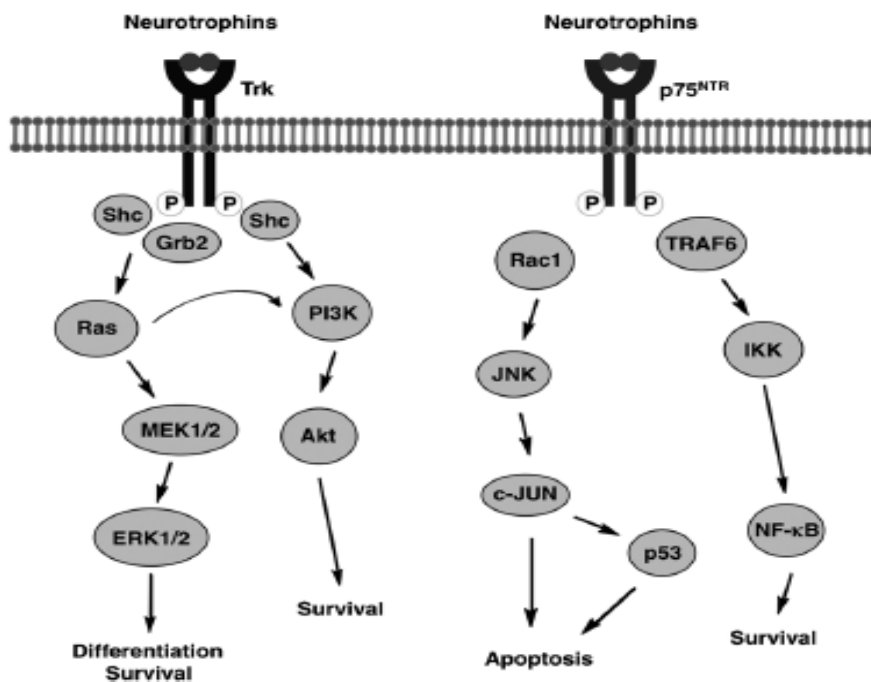


**Εικόνα 1.3:** Υποθετικό μοντέλο για την επίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης στους νευρώνες ύστερα από πρόσδεσή της στους υποδοχείς του νευροαυξητικού παράγοντα.<sup>32a</sup>

## 1.4 Νευροτροφικοί Παράγοντες

### 1.4.1 Γενικά

Οι νευροτροφικοί παράγοντες ή νευροτροφίνες είναι μία ομάδα αυξητικών παραγόντων, που σχετίζονται μεταξύ τους ως προς την δομή και την λειτουργία, και ρυθμίζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κεντρικών και περιφερικών νευρώνων. Η οικογένεια των νευροτροφινών απαρτίζεται από τον νευροαυξητικό παράγοντα (NGF), τον προερχόμενο από τον εγκέφαλο νευροτροφικό παράγοντα (BDNF), τη νευροτροφίνη 3 (NT3) και τη νευροτροφίνη 4/5 (NT4/5). Κάθε ένας νευροτροφικός παράγοντας συνδέεται με υψηλή συγγένεια σε ένα μέλος της οικογένειας των υποδοχέων κινασών της τυροσίνης, Trk (Tyrosine receptor kinase): ο NGF συνδέεται στον TrkA, οι BDNF και NT4/5 συνδέονται στον TrkB, ενώ η NT3 συνδέεται στον TrkC. Η σύνδεσή τους αυτή οδηγεί στο διμερισμό των υποδοχέων Trk, στη *τρανς*-φωσφορυλίωσή τους και τελικά στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, η οποία σχετίζεται με την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρώνων, αλλά και με τη σωστή λειτουργία τους τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Καθένας από τους νευροτροφικούς παράγοντες μπορεί επίσης να προσδεθεί, με μικρότερη συγγένεια, στον υποδοχέα νευροτροφινών 75kD (p75<sup>NTR</sup>), μέλος της οικογένειας των υποδοχέων παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR), ενεργοποιώντας ένα αποπτωτικό μονοπάτι.<sup>33,34</sup>



Εικόνα 1.4: Μονοπάτια σηματοδότησης των νευροτροφινών<sup>34</sup>

Όλες οι νευροτροφίνες συντίθενται ως πρόδρομες πρωτεΐνες μεγέθους περίπου 30 kDa, τις προ-νευροτροφίνες, οι οποίες διασπώνται, σχηματίζοντας τελικά τις ώριμες πρωτεϊνικές μορφές, οι οποίες είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα ομοδιμερή, όπου κάθε μονομερές έχει μέγεθος περίπου 13 kDa. Όλες αποτελούν βασικές πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικό σημείο μεγαλύτερο του 9.0.

Κάθε μία από τις νευροτροφίνες κατανέμεται διαφορετικά στο περιφερικό και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι, στον εγκέφαλο ενός ενήλικου ποντικού τα υψηλότερα επίπεδα BDNF mRNA και NGF mRNA εντοπίζονται στον ιππόκαμπο, με τον αριθμό του BDNF mRNA να ξεπερνά κατά 50 φορές τον αριθμό του NGF mRNA.<sup>35</sup> Στο περιφερικό νευρικό σύστημα, ο NGF αποτελεί την κυρίαρχη νευροτροφίνη, δρώντας στους συμπαθητικούς και αισθητήριους νευρώνες. Αντίθετα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα ο BDNF αποτελεί την επικρατέστερη νευροτροφίνη που χρησιμοποιείται, εξαιτίας της άφθονης έκφρασης του TrkB, ενώ ο NGF δρα στους βασικούς προσθεγκεφαλικούς χολινεργικούς νευρώνες (BFCNs), όπου και εκφράζεται ο TrkA. Μελέτες με ετερόζυγα ποντίκια με μειωμένα τα επίπεδα των NGF και BDNF, έδειξαν ότι αυτοί οι δύο παράγοντες είναι βασικοί για πολλαπλές λειτουργίες κατά την ενηλικίωση, όπως απόκτηση μνήμης, δυνατότητα απομνημόνευσης και χολινεργική νεύρωση.<sup>36</sup>

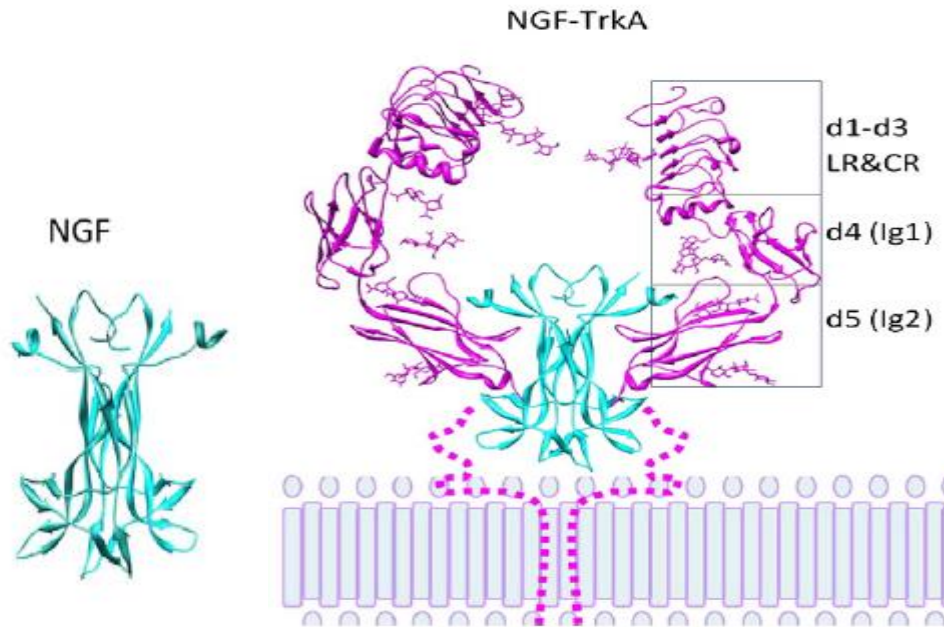
Ο τεκμηριωμένος ρόλος των νευροτροφινών να προλαμβάνουν τον κυτταρικό θάνατο και να διατηρούν την κυτταρική λειτουργία έχει οδηγήσει τους επιστήμονες να ερευνήσουν τα οφέλη τους. Μέχρι σήμερα, η πιθανή ωφέλιμη επίδραση των νευροτροφινών NGF και BDNF, ιδιαίτερα, έχουν ερευνηθεί έναντι σοβαρών νευροεκφυλιστικών δυσλειτουργιών, οι οποίες προκύπτουν ως αποτέλεσμα απώλειας της νευρικής δομής και λειτουργίας, καθώς επίσης ακόμα και νευρικού θανάτου περιλαμβάνοντας αλλά χωρίς να περιορίζεται μόνο σε αυτές τις ασθένειες, Alzheimer's, Parkinson's και Huntington, την Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση ακόμα και την παχυσαρκία.<sup>37</sup> Μικρά μόρια-μιμητές των νευροτροφινών, που στοχεύουν στους υποδοχείς TrkA, TrkB και p75<sup>NTR</sup>, έχουν αναπτυχθεί και φαίνονται ικανά να ενεργοποιήσουν σηματοδοτικά μονοπάτια, αποφέροντας ευεργετικά αποτελέσματα.

#### 1.4.2 Νευροαυξητικός παράγοντας (NGF)

Ο νευροαυξητικός παράγοντας αποτελεί την πρώτη νευροτροφίνη που ανακαλύφθηκε (1948). Ο NGF είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και τη διατήρηση του φαινότυπου των νευρώνων στο περιφερικό νευρικό σύστημα και για την λειτουργική ακεραιότητα των χολινεργικών νευρώνων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Εκφράζεται από περιφερικούς ιστούς, οι οποίοι εννερώνονται από αισθητήριες και συμπαθητικές νευρωνικές προεκτάσεις, καθώς επίσης και από κύτταρα του περιφερικού και κεντρικού νευρικού συστήματος ακόμα και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η ώριμη μορφή του NGF προκύπτει ύστερα από πρωτεολυτική διάσπαση της πρόδρομης πρωτεΐνης του, proNGF, και εκτελεί τη βιολογική του δράση, μέσω της σύνδεσής του με υψηλή συγγένεια στον ειδικό υποδοχέα τροπομοσίνης κινάσης A (TrkA), ο οποίος είναι ένας τυπικός υποδοχέας κινάσης τυροσίνης. Επιπλέον, ο NGF έχει τη δυνατότητα να συνδεθεί και να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα p75<sup>NTR</sup>, ωστόσο με μικρότερη συγγένεια σε σχέση με την πρόδρομη ένωσή του, proNGF. Ο υποδοχέας p75<sup>NTR</sup> παν-νευροτροφικός υποδοχέας, αποτελεί μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, ικανή να ρυθμίζει τη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα TrkA. Ωστόσο, η πρόσδεση του NGF στον υποδοχέα αυτό, απουσία του TrkA, επάγει την ενεργοποίηση σηματοδοτικού μονοπατιού, το οποίο οδηγεί τα κύτταρα στην απόπτωση.<sup>38</sup> Σύμφωνα με το κλασικό νευροτροφικό μοντέλο, ο NGF παράγεται και απελευθερώνεται από ιστούς-στόχους, στη συνέχεια δεσμεύεται από ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι εκφράζονται στα νευρικά άκρα και μεταφέρεται αναδρομικά στο κυτταρικό σώμα, όπου εκδηλώνει τη νευροτροφική του δραστηριότητα. Οποιαδήποτε διατάραξη σε αυτή τη νευροτροφική πορεία θα μπορούσε να προκαλέσει περιφερική νευρική δυσλειτουργία και νευρική ανοχή, ή όπως γενικά αποκαλούνται, περιφερικές νευροπάθειες. Στο πλαίσιο αυτής της έρευνας, αναπτύχθηκε η **Υπόθεση του Νευροτροφικού παράγοντα**. Σύμφωνα με αυτή, υπανάπτυκτοι νευρώνες οδηγούνται στο θάνατο εάν αποτύχουν να ανταγωνιστούν για τις περιορισμένες συγκεντρώσεις νευροτροφικού παράγοντα προερχόμενου από το στόχο.<sup>37</sup>





**Εικόνα 1.5:** Κρυσταλλική δομή του NGF και του υποδοχέα του, TrkA. Το τμήμα d5, που βρίσκεται πιο κοντά στην μεμβράνη είναι αυτό που συνδέεται άμεσα με την ώριμη μορφή της νευροτροφίνης.<sup>37</sup>

Το ανθρώπινο γονίδιο του NGF βρίσκεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 (1p22) και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 307 αμινοξέων, το οποίο τελικά καταλήγει σε μία ώριμη πρωτεΐνη που αποτελείται από 118 αμινοξέα, η οποία υπάρχει φυσιολογικά ως ένα ομοιοπολικά συνδεδεμένο ομοδιμερές.<sup>37</sup>

Ο NGF διαδραματίζει κύριο ρόλο στην επιβίωση και την λειτουργία των χολινεργικών νευρώνων του βασικού προσθεγκεφαλικού συμπλέγματος. Στις λειτουργίες περιλαμβάνονται η προσοχή, η διέγερση, η κινητοποίηση, η μνήμη και η συνείδηση. Λαμβάνοντας υπόψη ότι, οι νευρώνες του βασικού προσθεγκεφαλικού συμπλέγματος επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό στην ασθένεια Alzheimer's, ο NGF θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας πιθανός προστατευτικός ή/και θεραπευτικός παράγοντας για νευροεκφυλιστικές δυσλειτουργίες που σχετίζονται με αυτούς τους νευρώνες. Επιπλέον, σε πρόσφατες μελέτες αναφέρονται τα ευεργετικά αποτελέσματα του NGF τόσο στη νευροτοξικότητα που προέρχεται από το β-αμυλοειδές, όσο και στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau, δύο από τους κυριότερους παράγοντες που χαρακτηρίζουν την παθοφυσιολογία της ασθένειας Alzheimer's.

Ο NGF έχει χρησιμοποιηθεί ως δυνητικός θεραπευτικός παράγοντας σε κλινικές μελέτες, με σκοπό τη θεραπεία ασθενειών, όπως Alzheimer's,

Parkinson's, διαβήτης, γλοίωμα, τραυματισμούς του εγκεφάλου, προχωρημένη ατροφία του οπτικού νεύρου, ρετινοπάθειες και γλαύκωμα.

Σε κλινικές δοκιμές, έγινε ενδοεγκεφαλοκοιλιακή χορήγηση NGF ποντικού σε τρεις ασθενείς που έπασχαν από νόσο AD συνεχώς και επί 3 μήνες. Τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά για τον κάθε ασθενή. Παρόλο που υπήρχαν βελτιώσεις σχετικά με τα γνωσιακά τεστ των ασθενών, σημαντική ήταν η εμφάνιση παρενεργειών, όπως έλλειψη βάρους και όρεξης, ενώ και οι τρεις ασθενείς εκδήλωσαν πόνο. Οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι, έπρεπε να βρεθεί διαφορετικός τρόπος χορήγησης του NGF. Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι, ύστερα από εμβολιασμό με επισημασμένο <sup>125</sup>I NGF στον οσφρητικό βολβό ποντικών, ραδιοεπισημασμένος NGF βρέθηκε να μεταφέρεται αναδρομικά στον βασικό προσθεγκεφαλικό χολινεργικό πυρήνα.<sup>36</sup>

Σύμφωνα με μελέτες, από άλλη ερευνητική ομάδα, σε τρωκτικά αποδείχθηκε ότι εξωγενής NGF είχε την ικανότητα νευροπροστασίας των βασικών προσθεγκεφαλικών χολινεργικών νευρώνων τόσο από τραυματικές προσβολές, όσο και από την ηλικιακά σχετιζόμενη χολινεργική μείωση. Επίσης, αποδείχθηκε ότι ο NGF μπορεί να δράσει απευθείας στα δύο βασικά φαινόμενα που παρατηρούνται κατά την ασθένεια Alzheimer's, τη νευροτοξικότητα του β-αμυλοειδούς και την tau υπερφωσφορυλίωση (αποτελέσματα *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων).<sup>38</sup>

Ωστόσο, η κλινική χρήση του NGF, και ειδικότερα όταν η χορήγησή του είναι συστηματική, παραμένει προβληματική από την εκδήλωση παρενεργειών, όπως η πρόκληση πόνου. Ένα επιπλέον προαπαιτούμενο είναι η συγκέντρωση του NGF, που χορηγείται κατά τη θεραπεία, να μην επηρεάζει και φυσιολογικές περιοχές που δεν αποτελούν στόχους της. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η οφθαλμική χορήγηση του NGF δεν συνοδεύεται από την εκδήλωση παρενεργειών ακόμα και αν αυτή επαναλαμβάνεται για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, έχοντας την ικανότητα να στοχεύει συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές.

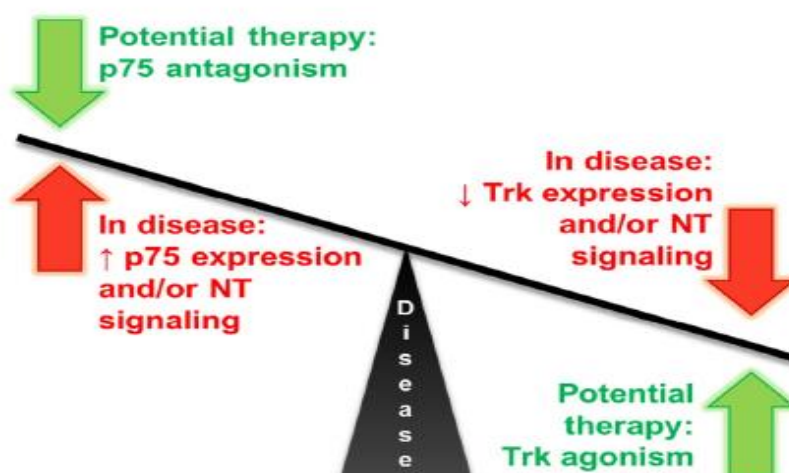
Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τρόποι χορήγησης του NGF. Έχει δειχθεί ότι, επιμολυσμένοι ινοβλάστες, οι οποίοι παράγουν τον ώριμο NGF, όταν εμφυτεύθηκαν στον βασικό προσθεγκεφαλο, διέσωσαν τη χολινεργική λειτουργία σε ποντίκια, τα οποία έπασχαν από κάκωση στην παρυφή του ιππόκαμπου και σε πιθήκους, οι οποίοι παρουσίαζαν χολινεργική έλλειψη-οφειλόμενη στην ηλικία. Όπως αναφέρθηκε, λόγω του ότι η πρωτεΐνη NGF ενδέχεται να προκαλέσει υπερευαισθησία στον πόνο, ύστερα από τη σύνδεσή της στους υποδοχείς TrkA και p75<sup>NTR</sup>, δοκιμάστηκε η χρήση NGF που έχει υποστεί μετάλλαξη, ώστε να μην διεγείρει μονοπάτια πόνου. Τα αποτελέσματα μελετών χορήγησης NGF σε ποντικούς, οδήγησαν σε δοκιμή Φάσης I, ώστε να ελεγχθεί η ασφάλεια, η ανεκτικότητα και η προκαταρκτική αποτελεσματικότητα ενός αδeno-συσχετιζόμενου ιού (AAV) που μεσολαβεί για

την μεταφορά του NGF ύστερα από στερεοτακτική έγχυση στον εγκέφαλο των ασθενών.<sup>37,38</sup>

### 1.4.3 Νέα μόρια, μιμητές των νευροτροφινών

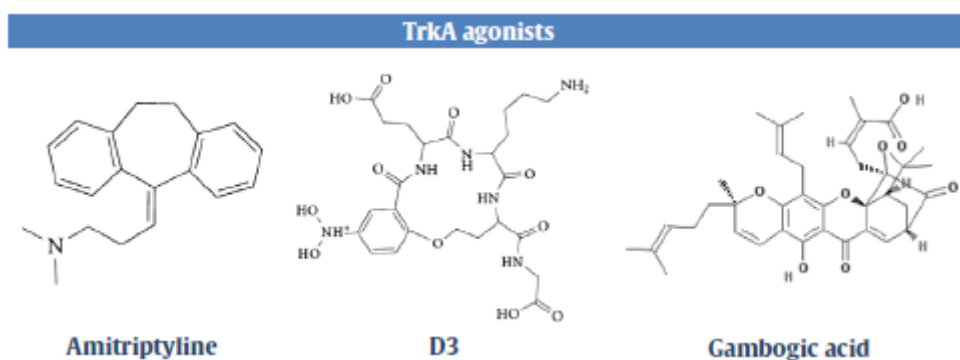
Η πολύπλοκη παθοφυσιολογία των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων καθιστά δύσκολη την μέχρι τώρα έρευνα με σκοπό την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας. Έχει βρεθεί ότι, η εκδήλωση των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων σχετίζεται με την διατάραξη της ισορροπίας των επιπέδων των νευροτροφινών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη απόκριση σήματος μέσω των υποδοχέων Trk, ή/και σε αυξημένη προ-αποπτωτική δραστηριότητα μέσω του υποδοχέα p75<sup>NTR</sup>.

Ωστόσο, οι νευροτροφίνες είναι σχετικά μεγάλα πολικά πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία δεν μπορούν εύκολα να διασχίσουν το αιματοεγκεφαλικό φράγμα (BBB), ώστε να κατευθυνθούν απ'ευθείας και να δράσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ έχουν μικρό χρόνο ημιζωής. Η ανάπτυξη των νευροτροφινών ως θεραπευτικά μέσα έχει συναντήσει σημαντικά εμπόδια, κυρίως εξαιτίας των μη κατάλληλων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους (μικρή σταθερότητά τους στον ορό, μικρή βιοδιαθεσιμότητα μετά από χορήγηση από το στόμα και περιορισμένη διείσδυση στο κεντρικό νευρικό σύστημα) παρά τις προσπάθειες των ερευνητών να βρουν εναλλακτικούς τρόπους χορήγησής τους στους ασθενείς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.<sup>37</sup> Μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση αποτελεί η σύνθεση νέων, μικρών μορίων, τα οποία μιμούνται τη δράση των νευροτροφινών, δρώντας εκλεκτικά, ενεργοποιώντας τους υποδοχείς Trk (αγωνιστές) ή απενεργοποιώντας τον υποδοχέα p75 (ανταγωνιστές) (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Μηχανισμοί της ασθένειας και πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις<sup>39a</sup>

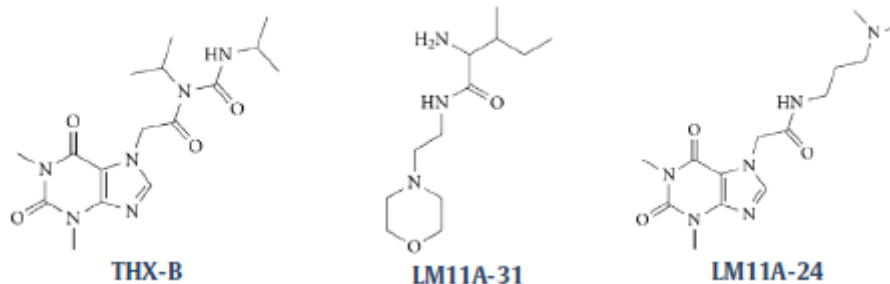
Ειδικότερα, όσον αφορά στην ασθένεια Alzheimer's, έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στη φυσιολογία του συμπλέγματος NGF-TrkA, ενώ σημειώνεται αλλαγή στην αναλογία του ώριμου NGF ως προς τον pro-NGF. Η μέχρι τώρα θεραπεία που παρέχεται στους ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο περιορίζεται στη χορήγηση donepezile, galantamine ή rivastigmine, που επάγουν την αύξηση της ακετυλοχολίνης, ή memantine, που επάγει την μείωση της φλεβοτοξικότητας από το γλουταμικό οξύ, καμία ωστόσο από αυτές δεν στοχεύουν άμεσα στις αιτίες της ασθένειας.



**Σχήμα 1.2:** Δομές ενώσεων-αγωνιστών του TrkA<sup>39a</sup>

Στο πλαίσιο ερευνών, συντέθηκε το μόριο idebenone, ένα μικρό μόριο αγωνιστής του υποδοχέα TrkA, με ευνοϊκές φαρμακολογικές ιδιότητες, το οποίο όμως δεν έδειξε επιθυμητά αποτελέσματα βελτίωσης σε ασθενείς με AD. Ένα άλλο ανάλογο, μιμητής των νευροτροφινών, το D3 (Σχήμα 1.2) έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, με σημαντική δράση *in vitro* και *in vivo*. Αποτελεί έναν μερικό αγωνιστή του υποδοχέα TrkA, ενεργοποιώντας τον ύστερα από πρόσδεσή του στον υποδοχέα, σε διαφορετική όμως θέση από τον NGF. Παρατηρήθηκε ότι προωθεί την επιβίωση και διαφοροποίηση των νευρώνων DRG (Dorsal Root Ganglia), ενώ η χρήση του αποδείχθηκε αποτελεσματική σε δύο διαφορετικά μοντέλα, τα οποία παρουσίαζαν απώλεια μνήμης. Επίσης, αγωνιστές του TrkA προήλθαν και από το φυσικό προϊόν οξύ gambogic (Σχήμα 1.2). Συγκεκριμένα, όταν χορηγήθηκε με υποδόρια ένεση το αντίστοιχο αμίδιο του φυσικού αυτού προϊόντος σε ποντικούς, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του υποδοχέα TrkA και μείωση του θανάτου νευρώνων του ιππόκαμπου, επαγόμενη από το καϊνικό οξύ.

### p75 antagonists



Σχήμα 1.3: Δομές ενώσεων-ανταγωνιστών του p75<sup>NTR39a</sup>

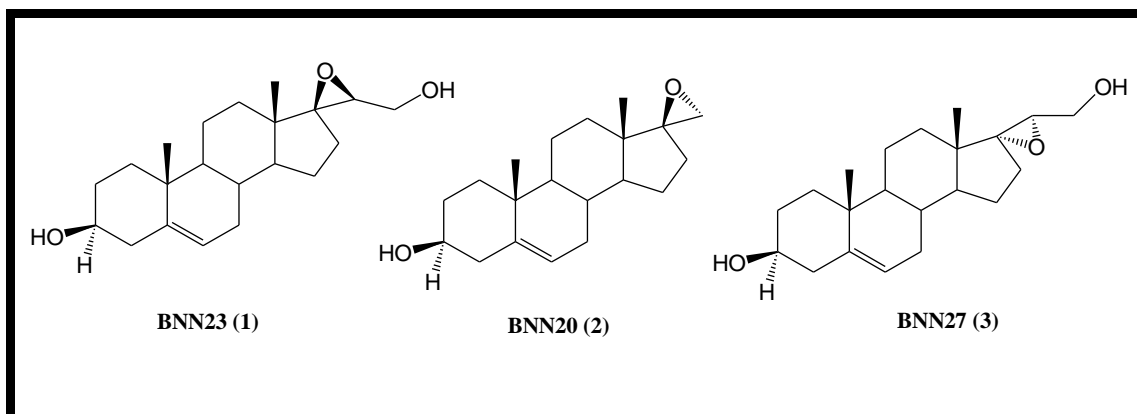
Στηριζόμενοι στην άποψη για τον ρόλο που πιθανώς να διαδραματίζει ο υποδοχέας p75<sup>NTR</sup> στην παθολογία της AD, έχουν αναπτυχθεί μόρια, τα οποία ανταγωνίζονται τους NGF και proNGF κατά τη σύνδεσή τους με τον υποδοχέα. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσεται το μόριο LM11A-31 (Σχήμα 1.3), με καλές φαρμακολογικές ιδιότητες, το οποίο θεράπευσε ζωικά μοντέλα με AD. Στην ίδια κατηγορία ανήκει και το μόριο LM11A-24 (Σχήμα 1.3), με καλή βιοδιαθεσιμότητα και δυνατότητα νευροπροστασίας και βελτίωση μνήμης, επίσης σε ζωικό μοντέλο με AD.

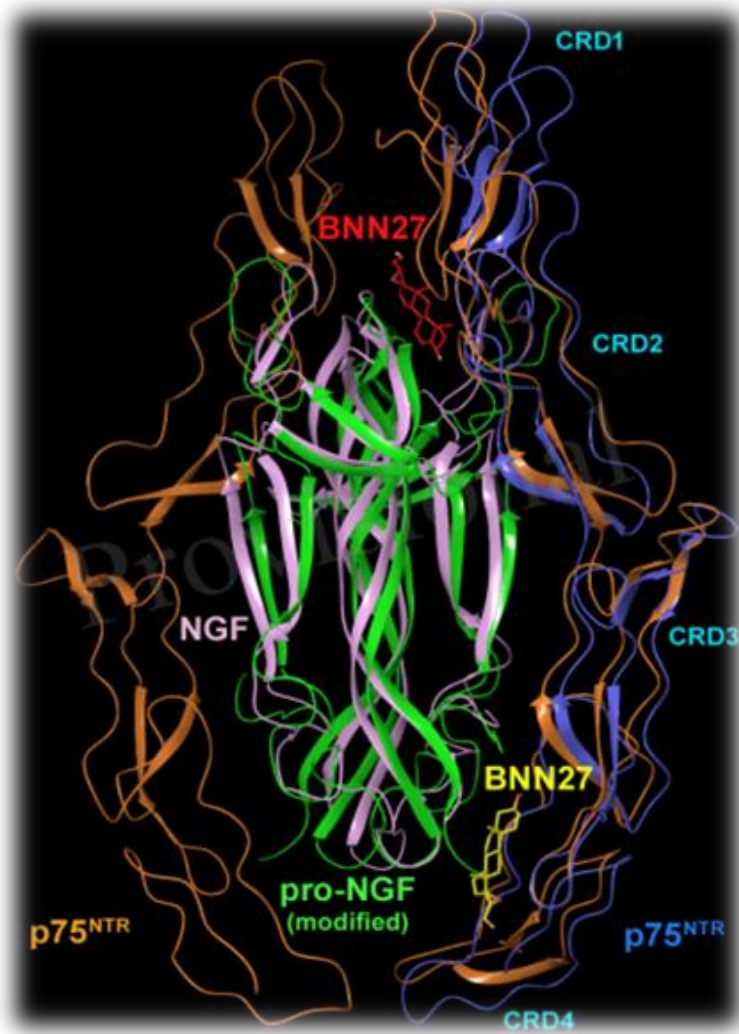
Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν τον πιθανό νευροπροστατευτικό ρόλο των νευροστεροειδών σε διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Φυσικά απαντώμενα νευροστεροειδή, όπως η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), εμφανίζουν έντονη νευροπροστατευτική και νευροαναγεννητική δράση *in vitro* και *in vivo*. Ωστόσο, αυτά τα νευροστεροειδή μεταβολίζονται στον άνθρωπο σε οιστρογόνα, ανδρογόνα ή προγεστογόνα, τα οποία είναι γνωστό ότι εκδηλώνουν σημαντικές ενδοκρινικές παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένης της ορμονοεξαρτώμενης νεοπλασίας, οι οποίες περιορίζουν την κλινική τους χρήση.

Στα πλαίσια μελετών επί των νευροδραστικών στεροειδών από την ομάδα της Δρ Θ. Καλογεροπούλου, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν 17-σπειροκυκλικά ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης,<sup>39b</sup> με στόχο τη διερεύνηση των στερεοηλεκτρονικών απαιτήσεων για βέλτιστη αντιαποπτωτική-νευροπροστατευτική δράση και την απουσία ορμονικών παρενεργειών. Το σκεπτικό του σχεδιασμού βασίστηκε στο γεγονός ότι η C-17 θέση της δεϋδροεπιανδροστερόνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολικό μετασχηματισμό της σε ανδρογόνα και οιστρογόνα, ενώ η 3β-υδροξυλομάδα θεωρείται απαραίτητη για την εκδήλωση νευροπροστατευτικής δράσης. Ειδικότερα, συντέθηκαν τα 17,20-σπειροεπόξυ ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης 1-3 (Πίνακας 1.2), τα οποία ήταν ικανά να προστατεύσουν τα νευρικά κύτταρα από την απόπτωση, που είναι αποτέλεσμα της έλλειψης ορού. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα των αναλόγων

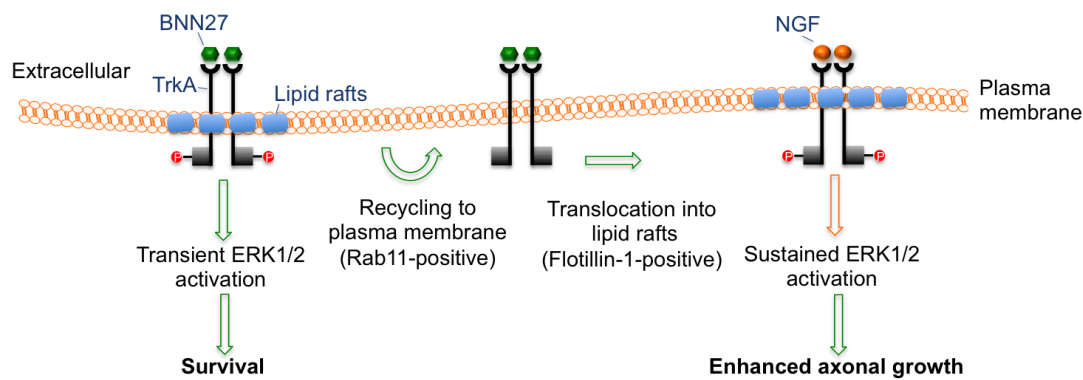
αυτών είναι ότι δεν προκαλούν ορμονικές παρενέργειες.<sup>39b</sup> Πειράματα με χρήση STD (Saturation Transfer Difference) NMR Spectroscopy έδειξαν αλληλεπίδραση του πιο δραστικού αναλόγου (*R*)-3β,21-διϋδροξυ-17*R*,20-εποξυ-5-πρεγνενίου **3** (BNN27), με τον ανασυνδυασμένο υποδοχέα TrkA, καθώς επίσης μελέτες Μοριακής Δυναμικής (MD simulations) του συμπλέγματος 2TrkA:2NGF έδειξαν ότι το ανάλογο BNN27 αναπτύσσει σταθερές αλληλεπιδράσεις γεφυρώνοντας το ετεροδιμερές του NGF με τον υποδοχέα TrkA (Εικόνα 1.7).

**Πίνακας 1.2:** Δομές συνθετικών αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης με νευροπροστατευτική δράση





**Εικόνα 1.7:** Μελέτες Μοριακής Δυναμικής, όπου φαίνεται η σύνδεση του BNN27 στα συμπλέγματα p75<sup>NTR</sup>/NGF 2:1 και p75<sup>NTR</sup>/μεταλλαγμένου proNGF 2:2.<sup>40b</sup>



**Σχήμα 1.4:** Απεικόνιση δράσης του αναλόγου BNN27<sup>40a</sup>

Επίσης, πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι το ανάλογο **3** προσδένει στον υποδοχέα TrkA με συγγένεια  $K_i=1.31\pm 0.6$  nM, και δρώντας συνεργιστικά με τον NGF, προωθεί την ανάπτυξη των αξόνων και διασώζει αποτελεσματικά σε ποντικούς που δεν εκφράζουν τον NGF, από την απόπτωση συμπαθητικούς και αισθητήριους νευρώνες, εξαρτώμενους από τον NGF και θετικούς στον TrkA.<sup>40a</sup> Το ίδιο ανάλογο δοκιμάστηκε και σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων, τα οποία εξέφραζαν τον  $p75^{NTR}$ , αλλά όχι τον TrkA. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, το BNN27 ενεργοποιεί τον υποδοχέα  $p75^{NTR}$ , διασώζοντας τα κύτταρα από την απόπτωση, που επάγεται σε συνθήκες στέρησης ορού. Με αυτό τον τρόπο, το ανάλογο αυτό μπορεί να αποτελέσει μία ένωση-οδηγό για το σχεδιασμό νέων μορίων, τα οποία θα συνδέονται ειδικά στον  $p75^{NTR}$ , με πιθανές εφαρμογές στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών και τραυματισμών του εγκεφάλου.<sup>40b</sup> Τέλος, μελετήθηκε η δράση του ίδιου αναλόγου και στη γλοία. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα σε ποντικούς-μοντέλα με πολλαπλή σκλήρυνση (cuprizone mouse model), δείχθηκε ότι το BNN27 μπορεί να τα προστατεύσει από απομυελίνωση, διατηρώντας τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα, μειώνοντας όμως την μικρογλοίωση και την αστρογλοίωση, ενώ ταυτόχρονα δεν επηρεάζει τη διαδικασία αναμυελίνωσης.<sup>40c</sup>



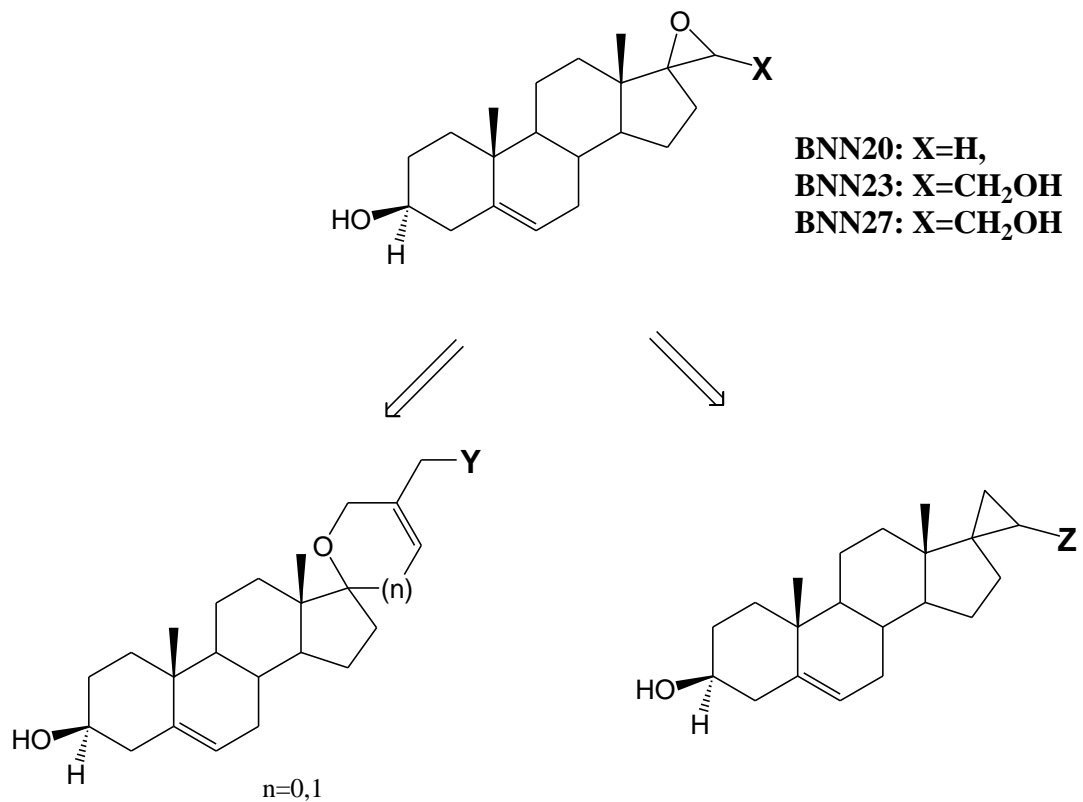
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### **2.1 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας**

Η έλλειψη αποτελεσματικής θεραπείας διαφόρων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, όπως η νόσος Huntington (HD), η νόσος Alzheimer's (AD) και η νόσος Parkinson (PD), έχει προκαλέσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη προστατευτικών μέσων, τα οποία είτε παρεμποδίζουν είτε θεραπεύουν την προοδευτική απώλεια της νευρωνικής λειτουργίας. Συνεπώς, είναι επιτακτική η ανάγκη σύνθεσης νέων ενώσεων, τα οποία θα στοχεύουν στην επιβίωση και στην προστασία των νευρώνων από την απόπτωση, στην επιδιόρθωση των νευρικών κυττάρων, αλλά και στη νευρογένεση.

Στηριζόμενοι σε αποτελέσματα προηγούμενων μελετών από την ερευνητική ομάδα της Δρ. Θεοδώρας Καλογεροπούλου (υποενότητα **1.4.3**), σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης, μιμητών των νευροτροφινών, για τη λήψη σχέσεων δομής δραστικότητας. Ειδικότερα, ο σχεδιασμός των νέων αναλόγων στηρίχθηκε στο γεγονός ότι ο εποξειδικός δακτύλιος που φέρουν ως υποκαταστάτη στη θέση C-17 της DHEA τα αρχικά ανάλογα **1**, **2**, **3** (Πίνακας **1.2**, υποενότητα **1.4.3**), αποτελεί μία ομάδα ευαίσθητη σε πυρηνόφιλη προσβολή, με αποτέλεσμα την εύκολη διάνοιξη του δακτυλίου, οδηγώντας σε μη δραστικά παράγωγα. Γι' αυτό το λόγο, σχεδιάστηκε η αντικατάσταση του εποξειδικού δακτυλίου με άλλους σπειρανικούς δακτυλίους. Συγκεκριμένα, α) με άλλους σπειρο ετεροκυκλικούς δακτυλίους μεγαλύτερου μεγέθους (πενταμελείς και εξαμελείς) στη θέση C-17 της δεϋδροεπιανδροστερόνης, οι οποίοι φέρουν διάφορους υποκαταστάτες και β) με την κυκλοπροπυλο-ομάδα. Η επιλογή της κυκλοπροπυλομάδας ως υποκαταστάτη στη θέση C-17 έγινε με γνώμονα το σχετικά μικρό μέγεθός της, το οποίο πιθανά δεν θα επηρεάζει δραστικά τη δυνατότητα πρόσδεσης στους υποδοχείς των νευροτροφινών, και τη σχετικά μικρή δραστικότητά της σε αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσβολής, η οποία μειώνει την πιθανότητα αλκυλίωσης των αναλόγων αυτών από διάφορα βιομόρια *in vivo* (Σχήμα **2.1**). Σκοπός είναι να διερευνηθεί, μέσω μελετών σχέσης δομής-δραστικότητας, η επίδραση του σπειρο δακτυλίου και των υποκαταστατών του στην αλληλεπίδραση των νέων αναλόγων με τους υποδοχείς των νευροτροφινών, καθώς επίσης και στη νευροπροστατευτική και νευροαναγεννητική τους δράση.

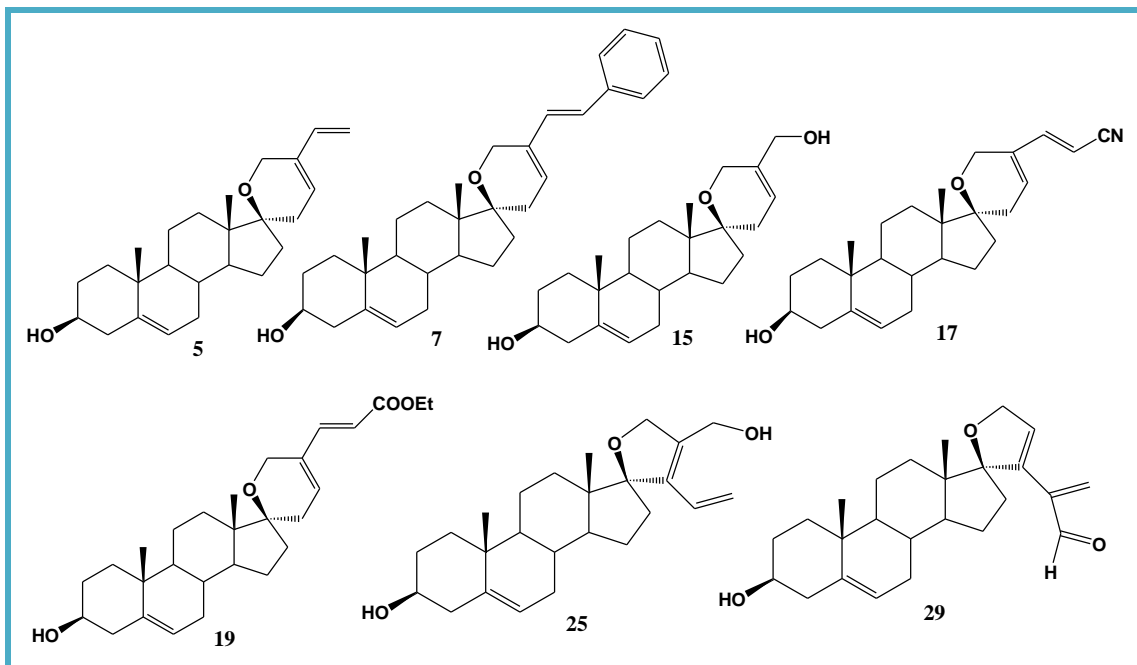


**Σχήμα 2.1:** Σχεδιασμός των νέων αναλόγων.

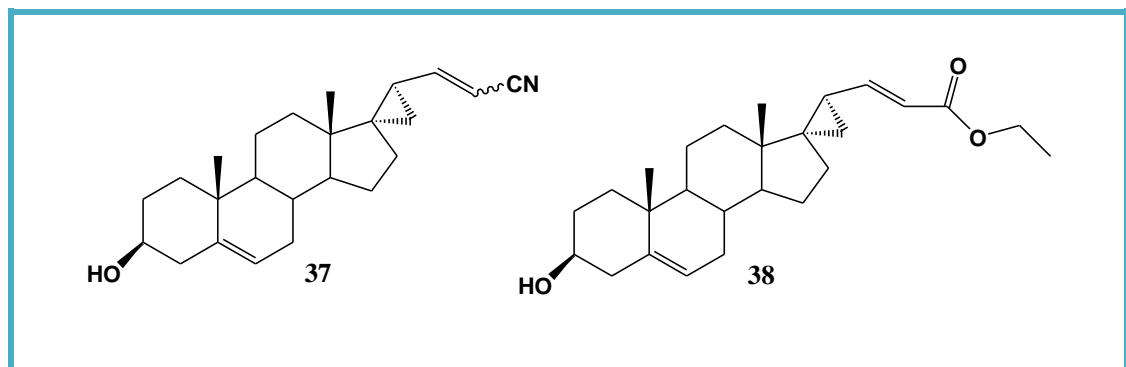
## 2.2 Σύνθεση νέων αναλόγων εν δυνάμει μιμητών των νευροτροφινών

Συγκεκριμένα, στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, συντέθηκαν **2 σειρές αναλόγων**. Η πρώτη σειρά περιλαμβάνει τα C-17-σπειροκυκλικά ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης, τα οποία περιέχουν υποκατεστημένους πενταμελείς και εξαμελείς αιθερικούς δακτυλίους (Εικόνα 2.1). Στη δεύτερη σειρά περιλαμβάνονται τα 17-σπειροκυκλοπροπανικά ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης, τα οποία φέρουν ως υποκαταστάτες στη θέση C23 μία κυανομάδα και μία εστερομάδα. (Πίνακας 2.1).

**Εικόνα 2.1:** Νέα ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης με σπειροκυκλικούς ακόρεστους εξαμελείς και πενταμελείς αιθερικούς δακτυλίους στη θέση C17.



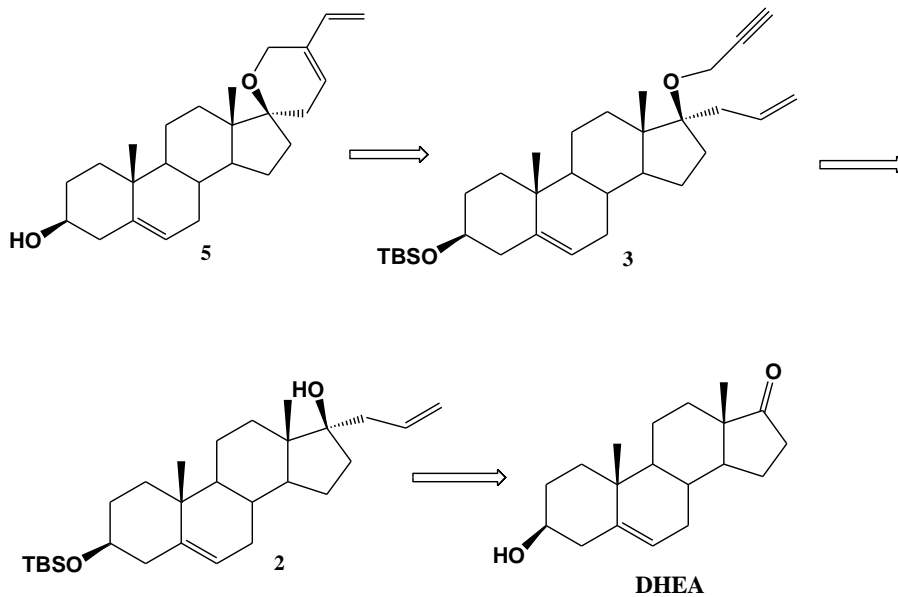
**Πίνακας 2.1:** Νέα ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης με σπειροκυκλοπροπανικό δακτύλιο στη θέση C17.



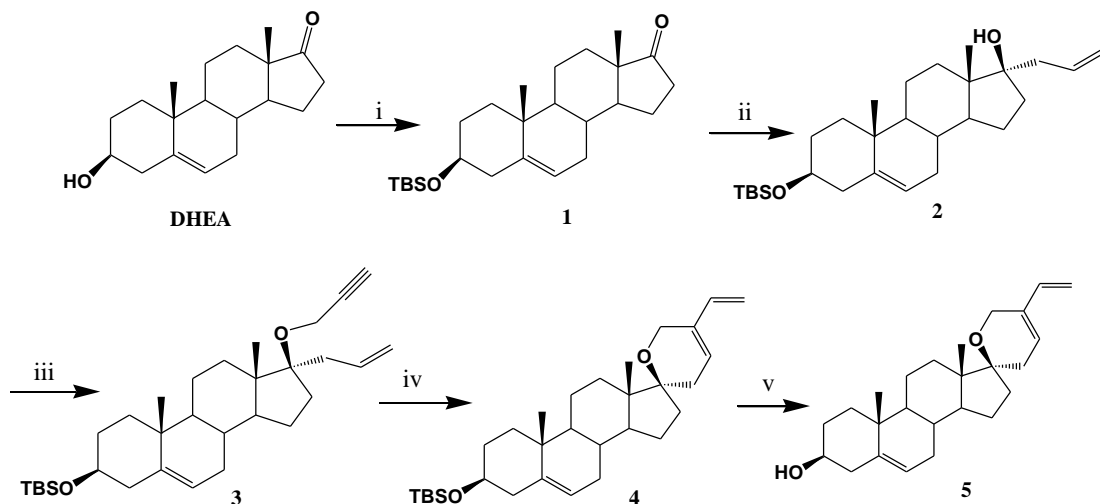
### 2.2.1 Σύνθεση νέων πυρανο-αναλόγων της DHEA

Στο Σχήμα 2.2 περιγράφεται η ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 5, η οποία περιλαμβάνει ενυλική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου της ένωσης 3, η οποία είναι προϊόν αλκυλίωσης της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλοξυ)-17α-προπυλο-5-ανδροστεν-17β-όλης 2, η οποία προκύπτει από την DHEA, μετά από προστασία του C3-OH και προσθήκη αλλυλομαγνησιοβρωμιδίου στο καρβονύλιο στη θέση C-17.

Σχήμα 2.2: Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 5



Σχήμα 2.3: Σύνθεση της ένωσης 5

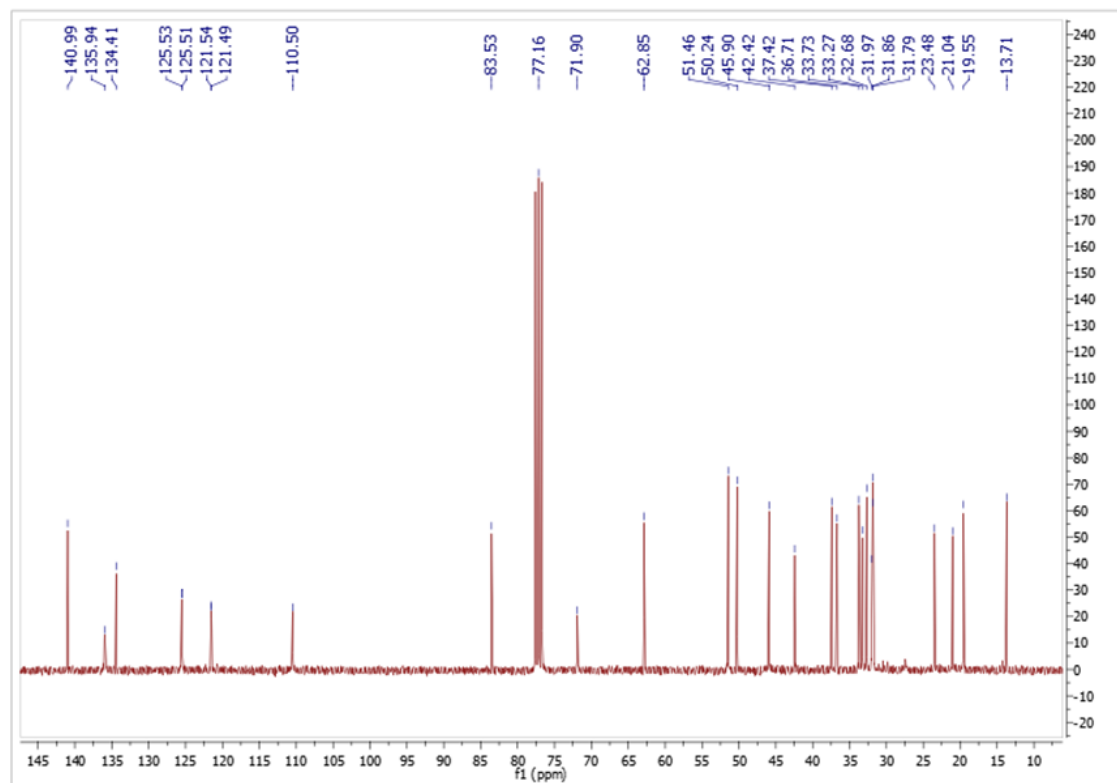
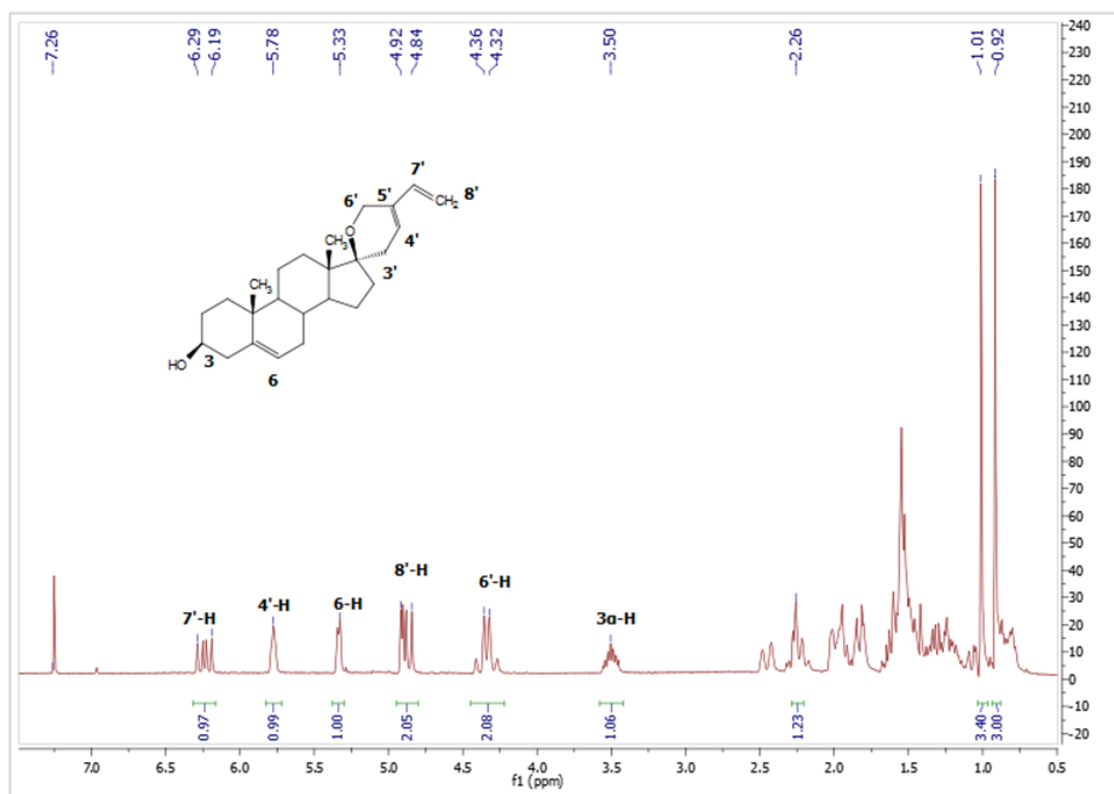


### Αντιδραστήρια και συνθήκες:

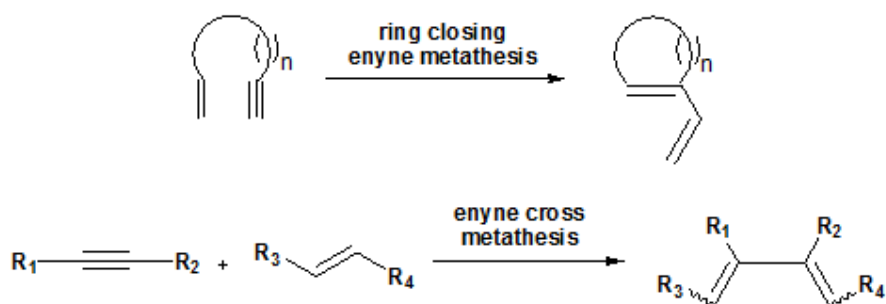
- (i) *t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο, ιώδιο, ιμιδαζόλιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.
- (ii) αλλυλομαγνησιοβρωμίδιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.
- (iii) προπαργυλοβρωμίδιο, υδρίδιο του καλίου (30% σε λάδι), τετραϋδροφουράνιο, 80°C.
- (iv) Καταλύτης Grubbs 2<sup>ης</sup> γενιάς, διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- (v) Υδροφθορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Η σύνθεση της ένωσης **5** περιγράφεται στο Σχήμα **2.3**. Προστασία του C3-υδροξυλίου της δεϋδροεπιανδροστερόνης με *t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο παρουσία ιμιδαζολίου και ιωδίου σε τετραϋδροφουράνιο δίνει το ανάλογο **1** (97%), το οποίο μετά από αντίδραση προσθήκης αλλυλομαγνησιοβρωμιδίου στο 17-καρβονύλιο, οδηγεί στο προϊόν προσθήκης από την α-πλευρά, λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης από το μεθύλιο 18, **2** (97%). Αλκυλίωση της αλκοόλης **2** με προπαργυλοβρωμίδιο με χρήση υδριδίου του καλίου ως βάση σε τετραϋδροφουράνιο οδηγεί στο ανάλογο **3** (24%), το οποίο στη συνέχεια μέσω ενυικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου (ene metathesis) παρουσία καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς σε διχλωρομεθάνιο δίνει τον σπειροκυκλικό αιθέρα **4** (19%). Το επιθυμητό προϊόν **5** προκύπτει ύστερα από απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας του 3β-υδροξυλίου με υδροφθορική πυριδίνη σε διχλωρομεθάνιο (97%), η δομή του οποίου ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR και HRMS (Εικόνα **2.2**).

Εικόνα 2.2: Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 5 σε  $\text{CDCl}_3$



Όπως ήδη αναφέρθηκε, για τη σύνθεση του σπειρανικού αιθέρα **5** χρησιμοποιήθηκε η ενυνική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου (ring closing enyne metathesis, RCEM).<sup>41-43</sup> Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει την αναδιοργάνωση ενός αλκενίου και ενός αλκινίου προς σχηματισμό ενός 1,3-διενίου υπό ήπιες συνθήκες (Σχήμα **2.4**). Στην περίπτωση όπου ο διπλός και ο τριπλός δεσμός ανήκουν στο ίδιο μόριο, τότε λαμβάνει χώρα ενδομοριακή κύκλωση προς σχηματισμό κυκλικών διενίων, όπως η παραπάνω ένωση.



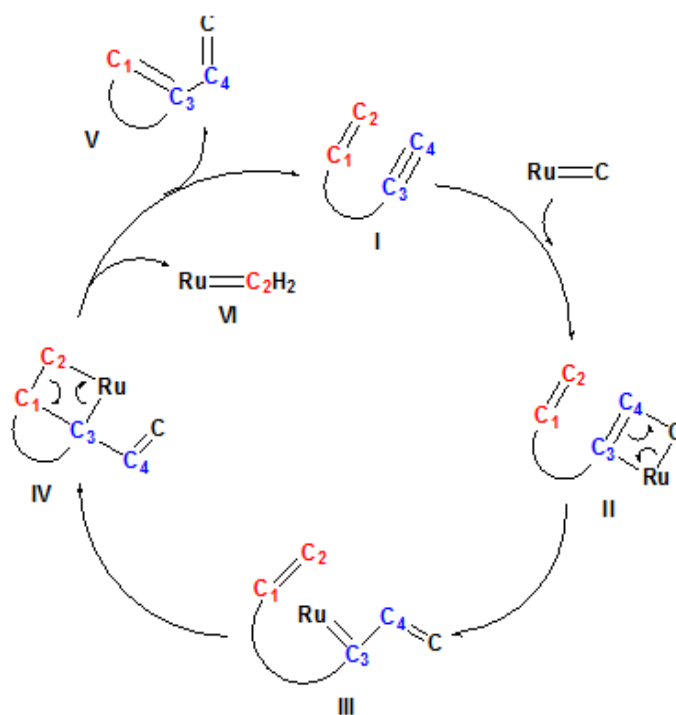
**Σχήμα 2.4 :** Αντιδράσεις ενυνικής μετάθεσης στην οργανική χημεία

Η ενυνική μετάθεση είναι μία αντίδραση με τεράστιες συνθετικές εφαρμογές, η οποία χαρακτηρίζεται επίσης και ως "οικονομική" από άποψη ατόμων<sup>44</sup>, αφού δεν παράγεται κανένα παραπροϊόν. Διέπεται μάλλον από ενθαλπικούς παρά από εντροπικούς παράγοντες, λόγω της αυξημένης σταθερότητας του συζυγιακού συστήματος των τελικών διενίων, και με κατάλληλη τοποθέτηση του διπλού και τριπλού δεσμού στο αρχικό υπόστρωμα μπορεί να προκύψουν εκλεκτικά ακόμα και πολύπλοκες κυκλικές δομές.<sup>45</sup>

Η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία έγινε από τον Katz και τους συνεργάτες του, οι οποίοι πρότειναν και τον μέχρι σήμερα αποδεκτό μηχανισμό ο οποίος περιλαμβάνει [2+2] κυκλοπροσθήκη ακολουθούμενη από κυκλοαναστροφή με τη συμμετοχή και ενός μεταλλοκαρβενίου.<sup>43</sup> Μεταγενέστερα, η ομάδα του Trost διεύρυνε την γκάμα των μετάλλων μετάπτωσης, τα οποία μπορούν να καταλύσουν τέτοιου τύπου αντιδράσεις<sup>46</sup>, με αποτέλεσμα σήμερα να χρησιμοποιούνται καταλύτες ρουθηνίου, ιριδίου και λευκοχρύσου. Ωστόσο, ο Mori και η ομάδα του υπήρξαν πρωτοπόροι στην ανάδειξη των συμπλόκων ρουθηνίου ως των περισσότερο διαδεδομένων καταλυτών της ενυνικής μετάθεσης, κυρίως εξαιτίας της υψηλής δραστηριότητας και της ανοχής στην παρουσία διαφόρων λειτουργικών ομάδων.

Ο μηχανισμός της ενυνικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου καταλυόμενης από καταλύτες ρουθηνίου απεικονίζεται στο Σχήμα **2.5**. Αρχικά,

ο τριπλός δεσμός του υποστρώματος **I** αντιδρά με τον καταλύτη για να σχηματισθεί το ενδιάμεσο μεταλλοκυκλοβουτάνιο **II**. Η [2+2] κυκλοπροσθήκη οδηγεί στο σχηματισμό ενός νέου διπλού δεσμού και ενός νέου καρβενίου **III**. Ακολουθεί η ολεφινική μετάθεση, καθώς ο διπλός δεσμός αντιδρά με το μεταλλοκαρβένιο προς το ενδιάμεσο **IV**. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζεται το 1,3-διένιο **V** και να απελευθερώνεται το νέο ενεργό καρβένιο **VI**, το οποίο συνεχίζει στον επόμενο καταλυτικό κύκλο.

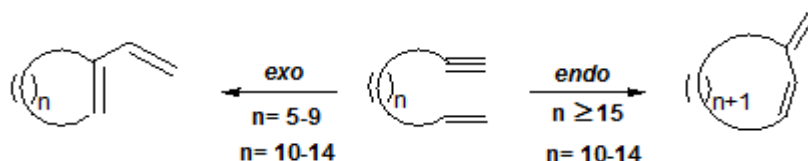


**Σχήμα 2.5:** Προτεινόμενος μηχανισμός της ενυικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου στην περίπτωση ακραίου αλκινίου.

Δεδομένης της φύσης του προϊόντος της ενυικής μετάθεσης, τίθεται το ζήτημα της *exo/endo*-εκλεκτικότητας. Ειδικότερα, στην ενυική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου η παράμετρος αυτή είναι καθοριστική για το μέγεθος του δακτυλίου ο οποίος σχηματίζεται, διότι στα *endo*-προϊόντα ο δακτύλιος περιέχει ένα επιπλέον άτομο άνθρακα συγκριτικά με τα *exo*-προϊόντα. Σύμφωνα με το Σχήμα 2.6, τα *exo*-προϊόντα ευνοούνται για δακτυλίους μικρού ή μεσαίου μεγέθους, σε αντίθεση με τα *endo*-προϊόντα τα οποία παράγονται κατεξοχήν στα μακροκυκλικά μόρια, καθώς και στη διασταυρούμενη ενυική μετάθεση (*cross enyne metathesis*). Τέλος, όσον αφορά στο σχηματισμό μεγάλων δακτυλίων, οι οποίοι απαιτούν ατμόσφαιρα αιθυλενίου, δεν μπορεί να προβλεφθεί ποια διάταξη θα επικρατήσει. Αυτό οφείλεται στη σχετικά μικρή ταχύτητα σχηματισμού του δακτυλίου, οπότε η διασταυρούμενη μετάθεση μεταξύ του αιθυλενίου και του αλκινίου του υποστρώματος είναι επικρατέστερη, μετατρέποντας τη δυσκολότερη ενυική μετάθεση με κλείσιμο



δακτυλίου στην ευκολότερη διενική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου (diene ring closing metathesis).

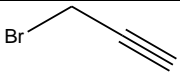
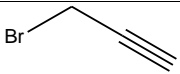
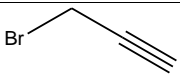
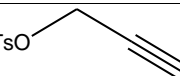
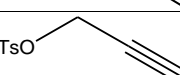
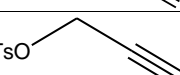
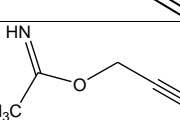
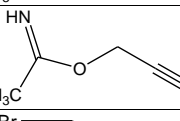
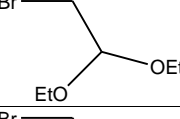
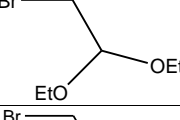
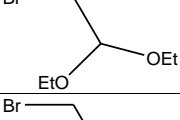
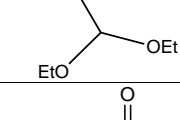
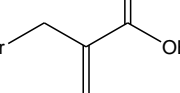


**Σχήμα 2.6:** Συσχέτιση της exo/endo-εκλεκτικότητας με το μέγεθος του σχηματιζόμενου δακτυλίου στην ενυλική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου.

Ωστόσο, τα δύο καθοριστικά στάδια της πορείας του Σχήματος 2.3, δηλαδή η αλκυλίωση με προπαργυλοβρωμίδιο καθώς και το αμέσως επόμενο στάδιο της ενυλικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου, οδηγούν στα επιθυμητά προϊόντα με μικρή απόδοση. Αρχικά με στόχο να βελτιστοποιηθεί η απόδοση της αντίδρασης αλκυλίωσης προς την ένωση 3 (Σχήμα 2.3) έγιναν αρκετές πειραματικές δοκιμές μεταβάλλοντας κάθε φορά μία παράμετρο της αντίδρασης (διαλύτης, θερμοκρασία, αλκυλιωτικό μέσο).

**Πίνακας 2.2:** Πειραματικές συνθήκες με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης της αλκυλίωσης της ένωσης 2.

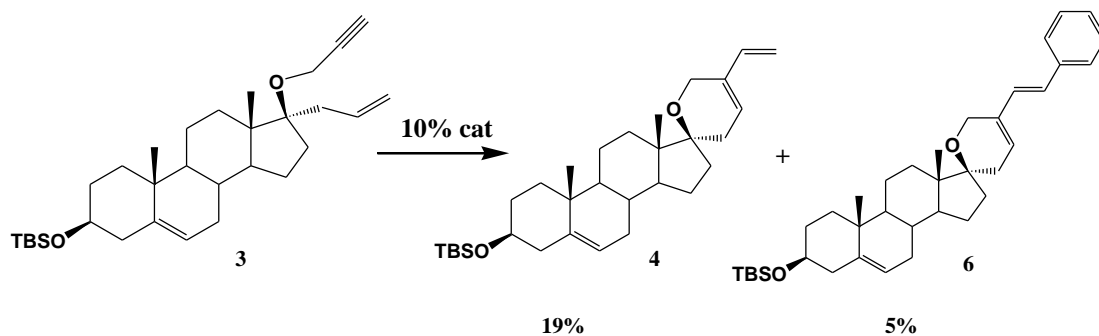
Πείραμα	Διαλύτης	Βάση/Οξύ	Αλκυλιωτικό μέσο	Θερμοκρασία	Απόδοση	Χρήση TIBAΙ
1	THF/DMF 4:5	KOH 85%		Επαναρροή (85°C)	- <sup>α</sup>	x
2	THF	KH		Επαναρροή (85°C)	- <sup>β</sup>	1eq
3	DMSO	KOH 5%		MW, 100°C	- <sup>γ</sup>	x
4	THF	NaH		90°C	- <sup>α</sup>	1eq
5	THF/DMF 9:3	NaH		Θ.π.	- <sup>α</sup>	x
6	THF+HMPA	BuLi		Θ.π.	- <sup>α</sup>	x
7	THF+HMPA	NaH		Θ.π.	- <sup>α</sup>	x
<b>8</b>	<b>THF</b>	<b>NaH</b>		<b>115°C</b>	<b>13%</b>	<b>x</b>

9	DMA	NaH		Θ.π.	- <sup>α</sup>	x
<b>10</b>	<b>THF</b>	<b>KH</b>		<b>80°C</b>	<b>24%</b>	<b>x</b>
11	DMSO	NaH		35°C	- <sup>α</sup>	x
12	THF	KH		Επαναρροή	- <sup>α</sup>	x
13	THF	NaH		Επαναρροή	- <sup>α</sup>	x
14	Dioxane	NaH		Επαναρροή	- <sup>α</sup>	x
15	DCM	TFA		Θ.π.	- <sup>α</sup>	x
16	DCM	TMSOTf		0°C	- <sup>α</sup>	x
17	THF	NaH		Επαναρροή	- <sup>α</sup>	x
18	THF	BuLi		40°C	- <sup>α</sup>	x
19	THF	NaH		Θ.π.	- <sup>α</sup>	x
20	THF	NaH		Θ.π.	- <sup>α</sup>	x
21	THF	KH		Επαναρροή	- <sup>β</sup>	x

<sup>α</sup> Δεν παρατηρήθηκε προϊόν, <sup>β</sup> Ελάχιστο προϊόν, <sup>γ</sup> Απομάκρυνση της τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο ομάδας

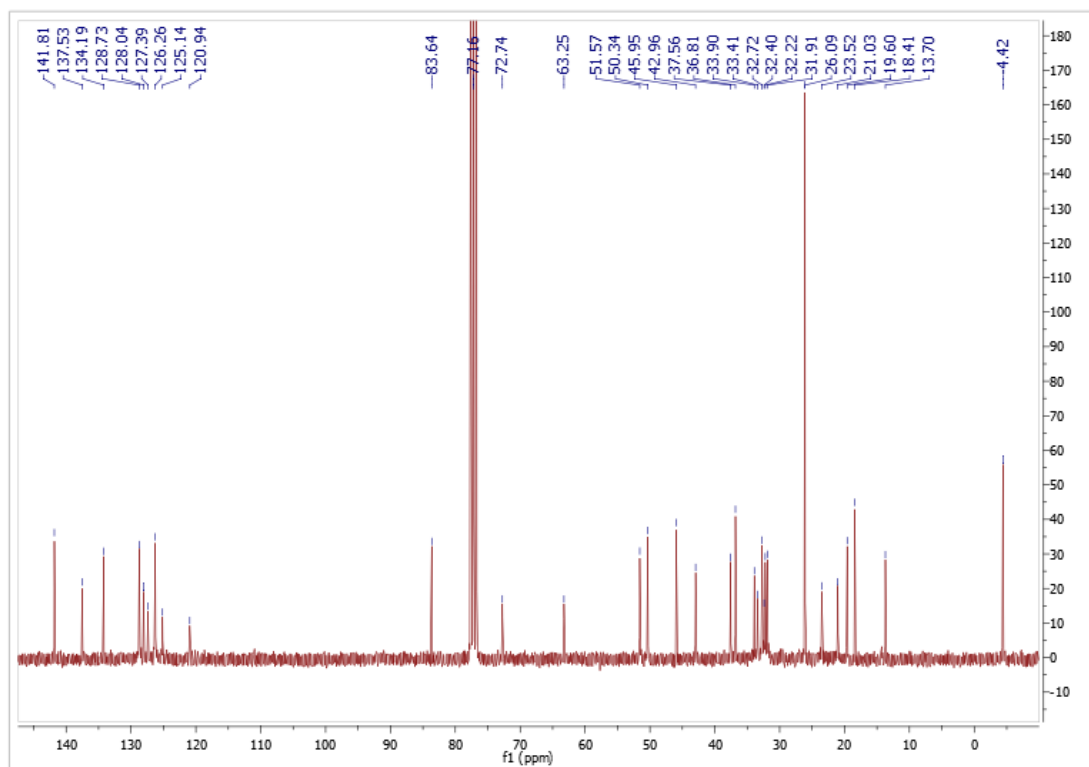
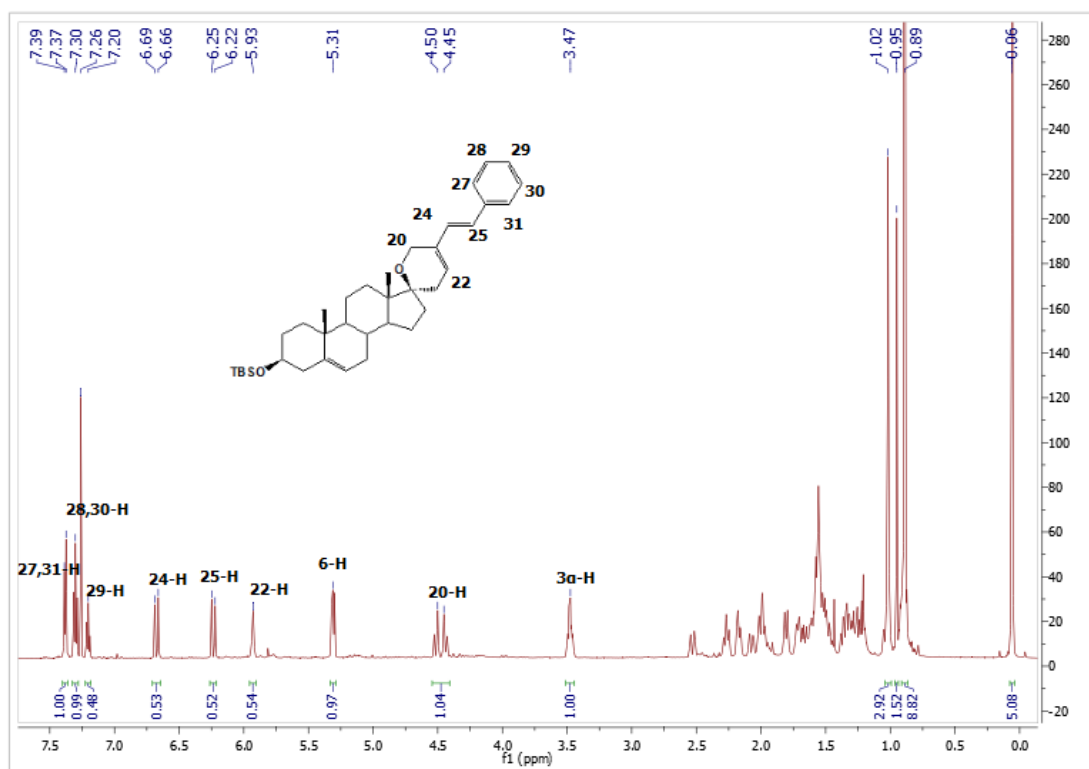
Παρόλες τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, δεν βρέθηκαν κατάλληλες συνθήκες ώστε να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της απόδοσης της αντίδρασης. Η υψηλότερη απόδοση, που ελήφθη το επιθυμητό προϊόν **3**, ήταν μόλις **24%**, με χρήση προπαραγυλοβρωμιδίου παρουσία υδριδίου του καλίου ως βάση σε τετραϋδροφουράνιο στους 80°C. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα υποκατεστημένα βρωμίδια, τα οποία δεν θα οδηγούσαν άμεσα στο ενδιάμεσο **3**, αλλά θα ακολουθείτο διαφορετική πορεία για τη σύνθεση του τελικού αναλόγου **4**. Ωστόσο καμία από αυτές τις αντιδράσεις δεν οδήγησε σε προϊόν αλκυλίωσης της αλκοόλης **2** (Πειράματα **17-21**, Πίνακας **2.2**).

Στη συνέχεια, σε προσπάθεια βελτιστοποίησης της απόδοσης της ενυικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου, αυξήθηκε το ποσοστό του καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς από 5% σε 10% (Σχήμα 2.7), το οποίο όμως δεν οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης, αντίθετα είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του παραπροϊόντος **6** (5%),<sup>47</sup> η δομή του οποίου ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR, μίας και δύο διαστάσεων (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC) και HRMS (Εικόνες 2.3, 2.4, 2.5).

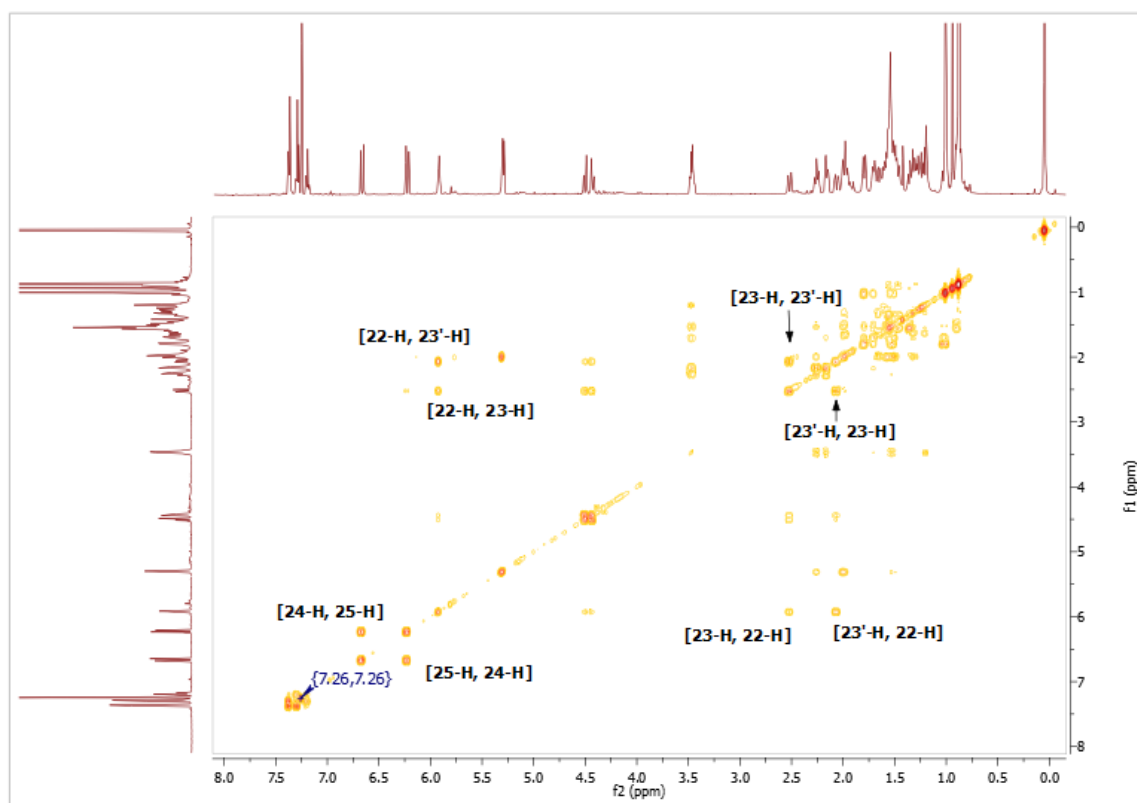


**Σχήμα 2.7:** Προϊόντα αντίδρασης ενυικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου, με χρήση 10% καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς.

Εικόνα 2.3: Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **6** σε  $\text{CDCl}_3$

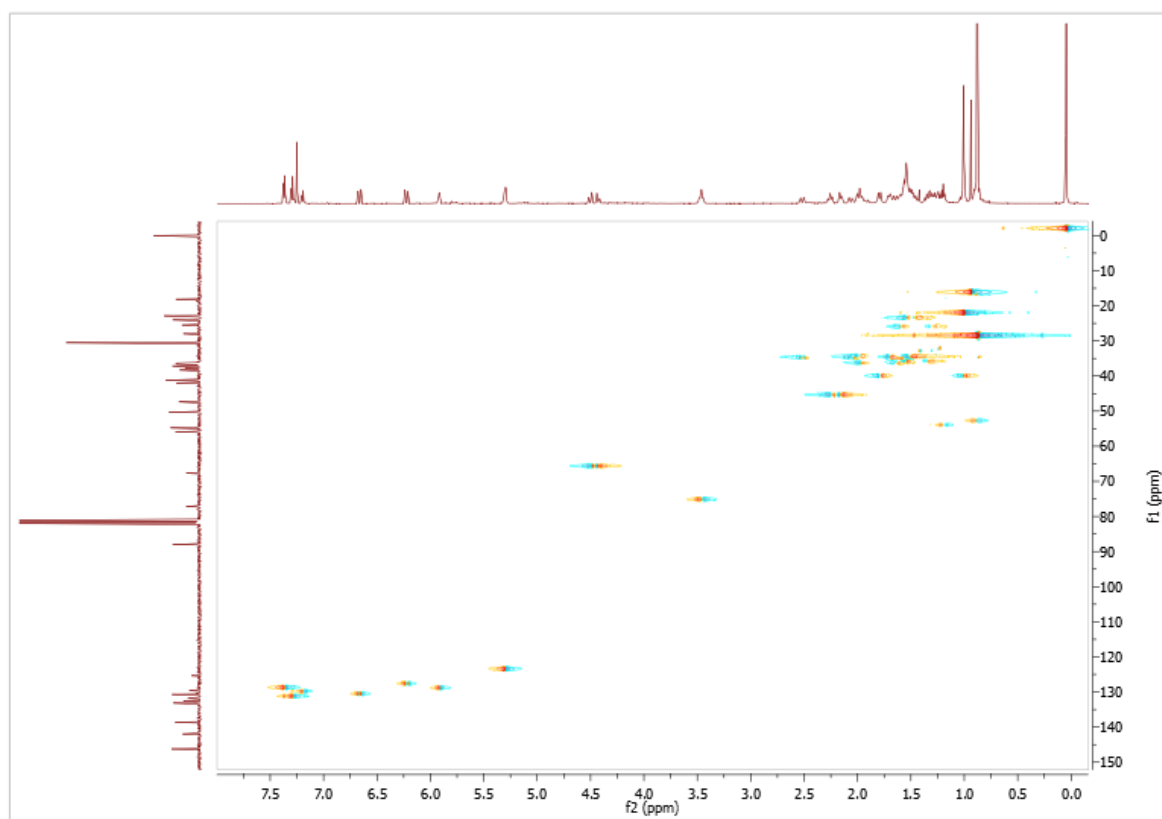


Εικόνα 2.4: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 6 σε  $CDCl_3$

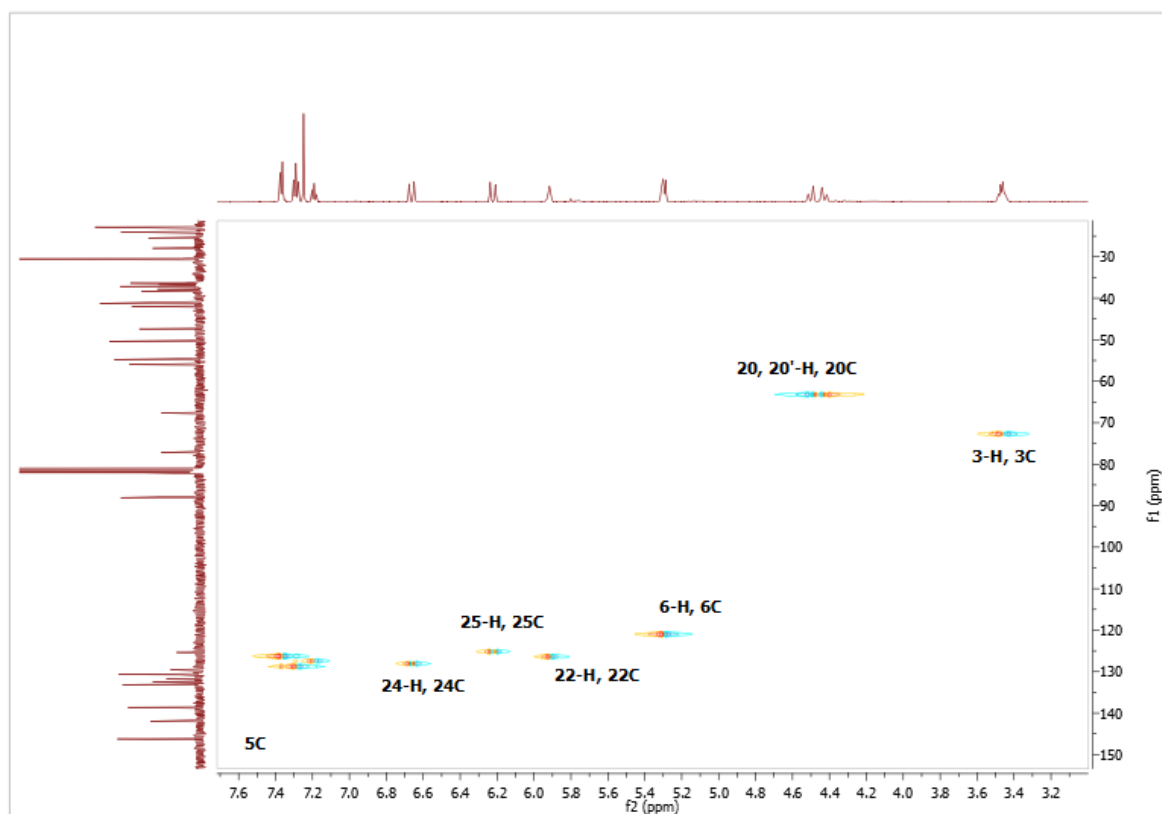


Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY παρατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων (Εικόνα 2.4). Χαρακτηριστικά αναφέρεται η σύζευξη ανάμεσα στα 2 πρωτόνια της θέσης 23 (2.08 και 2.53 ppm) με το πρωτόνιο της θέσης 22 (5.93 ppm) και η σύζευξη μεταξύ των βινυλικών πρωτονίων στις θέσεις 24 και 25 (6.64 και 6.21 ppm, αντίστοιχα,  $J = 16.6$  Hz).

**Εικόνα 2.5α:** Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης **6** σε  $CDCl_3$



**Εικόνα 2.5β:** Περιοχή χαμηλών πεδίων ετεροπυρηνικού φάσματος HSQC της ένωσης **6** σε  $CDCl_3$



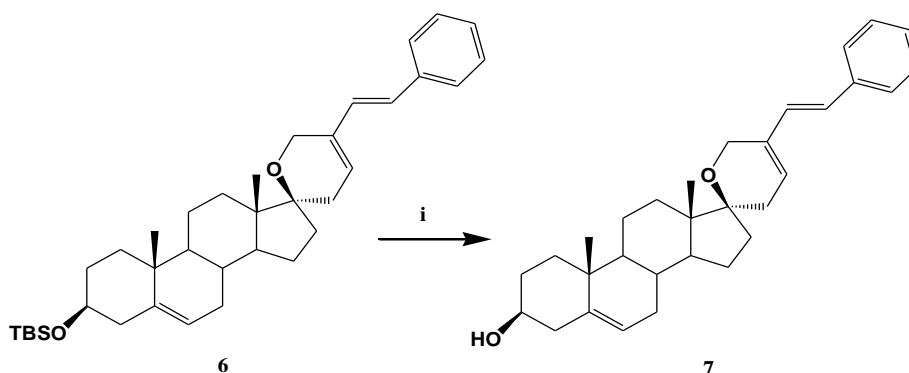
Συγκεκριμένα στην περιοχή χαμηλών πεδίων του ετεροπυρηνικού φάσματος HSQC της ένωσης **6** (Εικόνα **2.5β**) παρατηρούνται οι παρακάτω χαρακτηριστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα:

- ο 6-C συντονίζεται στα 120.98 ppm και συσχετίζεται με το H-6 (5.31 ppm)
- ο 22-C συντονίζεται στα 125.1 ppm και συσχετίζεται με το H-22 (5.93 ppm)
- ο 24-C συντονίζεται στα 127.39 ppm και συσχετίζεται με το H-24 (6.64 ppm)
- ο 25-C συντονίζεται στα 125.14 ppm και συσχετίζεται με το H-25 (6.21 ppm)
- ο 3-C συντονίζεται στα 72.76 ppm και συσχετίζεται με το H-3 (3.43 ppm)

Τέλος, δεδομένου ότι ο βινυλικός άνθρακας C-5 είναι τεταρτοταγής και δεν συσχετίζεται με κάποιο πρωτόνιο, συμπεραίνουμε ότι συντονίζεται στα 141.81 ppm.

Στη συνέχεια, αποπροστασία της ένωσης **6** με υδροφθορική πυριδίνη σε διχλωρομεθάνιο οδήγησε στο τελικό ανάλογο **7** (33%) (Σχήμα **2.8**).

**Σχήμα 2.8:** Σύνθεση της ένωσης **7**



**Αντιδραστήρια και συνθήκες:**

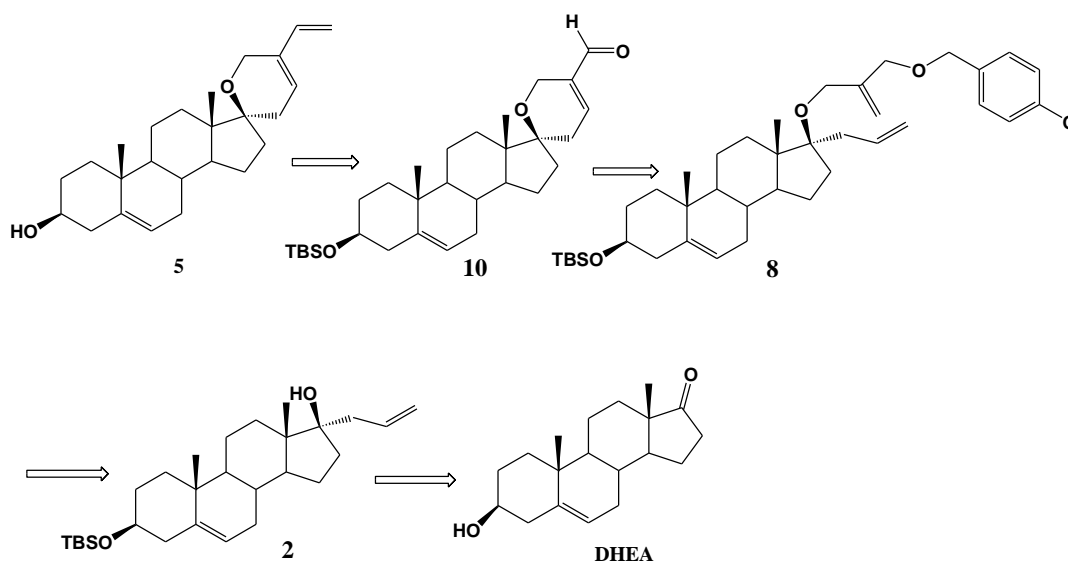
- (i) Υδροφθορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Δεδομένου ότι η πορεία του Σχήματος 2.3 για το ανάλογο 5 δεν δίνει το επιθυμητό προϊόν σε ικανοποιητική απόδοση, σχεδιάστηκε μία διαφορετική συνθετική πορεία, η οποία αν και περιλαμβάνει περισσότερα στάδια, καθένα από αυτά οδηγεί στα αντίστοιχα προϊόντα σε υψηλές αποδόσεις, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η σύνθεση της ένωσης 5 ακόμα και σε μεγάλη κλίμακα. Επιπλέον, επιτρέπει τη σύνθεση αναλόγων μέσω του ενδιάμεσου 10 (Σχήμα 2.9), δίνοντας τη δυνατότητα να μελετηθεί η επίδραση των διαφορετικών υποκαταστατών στους υποδοχείς των νευροτροφινών.

Η βασική αντίδραση σχηματισμού του σπειρο-πυρανικού δακτυλίου είναι η **ολεφινική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου**, η οποία συνήθως οδηγεί στα επιθυμητά κυκλικά ανάλογα με υψηλές αποδόσεις.

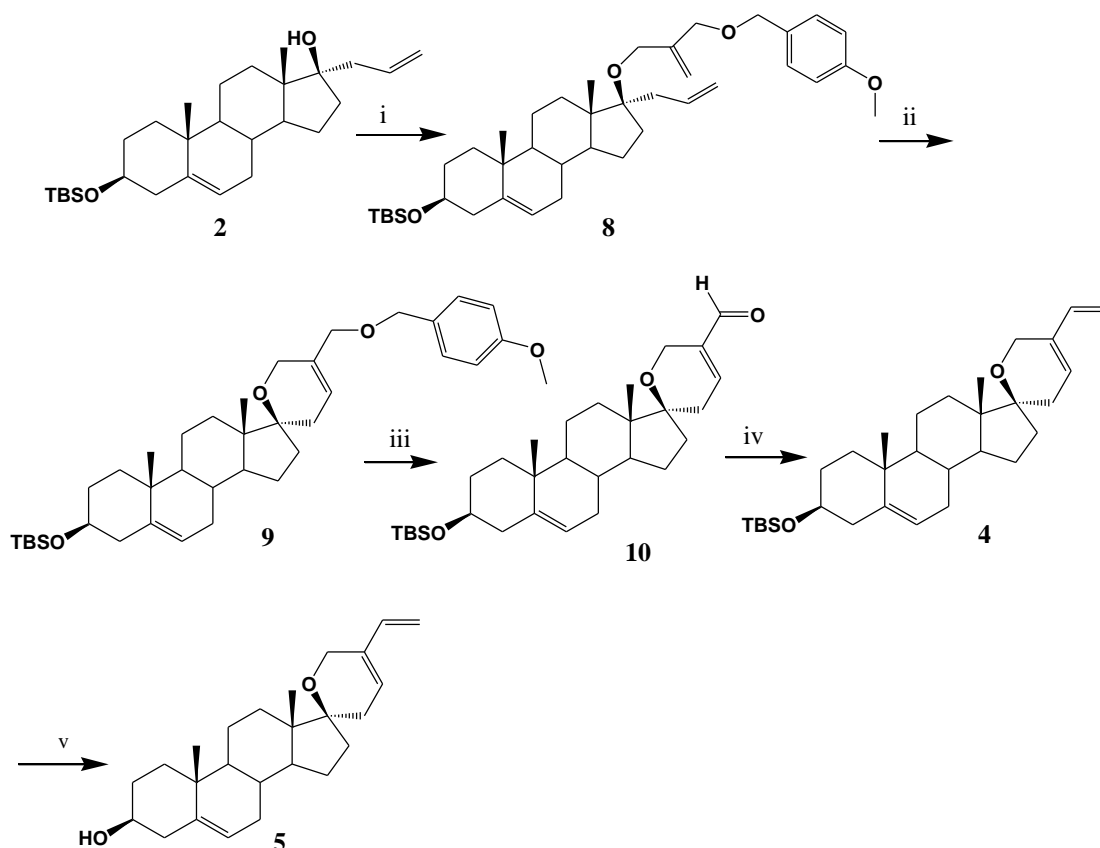
Στο Σχήμα 2.9 περιγράφεται η **νέα ρετροσυνθετική ανάλυση** σχεδιασμού της ένωσης 5. Το τελικό ανάλογο 5 είναι δυνατό να προκύψει ύστερα από αντίδραση Wittig της (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν-5'-άλης] (10) με μεθυλενοτριφαινυλοφωσφοράνιο, η οποία έχει προκύψει ύστερα από αποπροστασία και ταυτόχρονη οξείδωση του (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-(*p*-μεθοξυβενζυλομεθυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυρανίου] (9). Το ανάλογο (9) είναι δυνατόν να προκύψει από αντίδραση ολεφινικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου του 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπ-2-υλο-17β-[2-μεθυλ(αλλυλοξυ)μεθυλο(*p*-μεθοξυβενζυλο)]-ενυλοξυ-ανδροστ-5-ένιου (8). Η ένωση (8) αποτελεί προϊόν αλκυλίωσης της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπυλο-5-ανδροστεν-17β-όλης (2), η οποία προκύπτει ύστερα από αντίδραση προσθήκης στο καρβονύλιο C-17 της προστατευμένης στη θέση C3-δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA).

**Σχήμα 2.9:** Νέα ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 5





**Σχήμα 2.10:** Τροποποιημένη σύνθεση της ένωσης **5**



**Αντιδραστήρια και συνθήκες:**

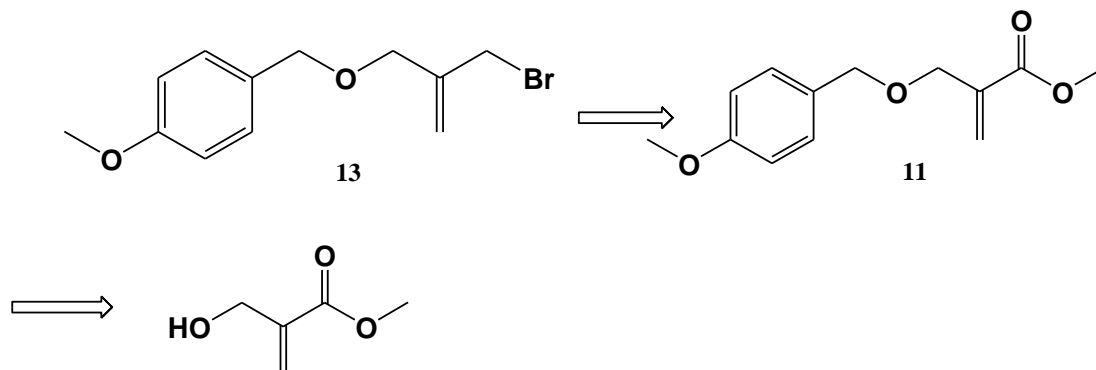
- (i) [(2-(Βρωμομεθυλο)αλλυλοξυ)μεθυλο]ρ-μεθοξυβενζόλιο, υδρίδιο του καλίου (30% σε λάδι), τετραϋδροφουράνιο, 75°C.
- (ii) Καταλύτης Grubbs 2<sup>ης</sup> γενιάς, διχλωρομεθάνιο, θ.π → 40°C.
- (iii) 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη, διχλωρομεθάνιο, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.0, θ.π.
- (iv) Βρωμίδιο του μεθυλοτριφαινυλοφωσφονίου, τερτ-βουτοξείδιο του καλίου, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.
- (v) Υδροφορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Η σύνθεση της ένωσης **5** πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την πειραματική πορεία του Σχήματος **2.10**. Αλκυλίωση της αλκοόλης **2** με [(2-(βρωμομεθυλο)αλλυλοξυ)μεθυλο]ρ-μεθοξυβενζόλιο (**13**) με χρήση υδριδίου του καλίου ως βάση σε τετραϋδροφουράνιο οδηγεί στο ανάλογο **8** (89%), το οποίο μέσω ολεφινικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου (ene metathesis) παρουσία καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς σε διχλωρομεθάνιο οδηγεί στο σπειροκυκλικό αιθέρα **9** (94%). Απομάκρυνση της ρ-μεθοξυβενζυλο προστατευτικής ομάδας και ταυτόχρονη οξειδωση της αλλυλικής αλκοόλης σε

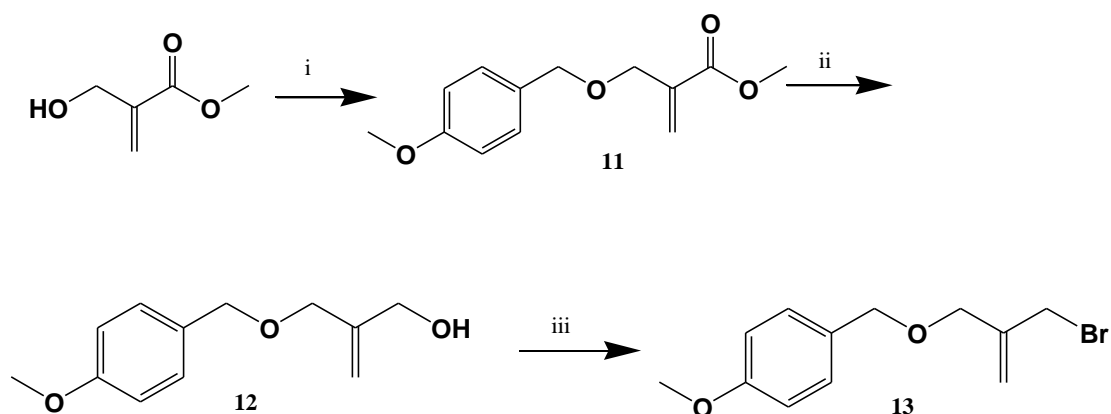
ένα στάδιο, με χρήση 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνης (3.4 eq) σε μίγμα διχλωρομεθάνιου/ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.0 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δίνει την αντίστοιχη αλδεΐδη **10** (81%), η οποία μέσω αντίδρασης Wittig με το υλίδιο του μεθυλοτριφαινυλοφωσφονίου με τερτ-βουτοξειδίο του καλίου ως βάση σε τετραϋδροφουράνιο στους 0 °C οδηγεί στο ανάλογο **4** (96%). Η ένωση **5** λαμβάνεται μετά από αποπροστασία της αλκοόλης του αναλόγου **4** με υδροφθορική πυριδίνη σε διχλωρομεθάνιο στους 0 °C (98%).

Το [(2-(βρωμομεθυλο)αλλυλοξυ)μεθυλο]*p*-μεθοξυβενζόλιο (**13**), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αλκυλιωτικό μέσο κατά τη σύνθεση της ένωσης **5**, δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο και είναι δυνατό να προκύψει από αντίδραση βρωμίωσης<sup>48</sup> της [(*p*-μεθοξυβενζυλο)μεθυλο]ακρυλικής αλκοόλης (**12**), η οποία έχει προέλθει από την αναγωγή του [(*p*-μεθοξυβενζυλο)μεθυλο]ακρυλικού εστέρα (**11**), ο οποίος αποτελεί προϊόν αντίδρασης προστασίας με *p*-μεθοξυ-βενζυλομάδα του εμπορικά διαθέσιμου (υδροξυμεθυλο)ακρυλικού μεθυλεστέρα.

**Σχήμα 2.11:** Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **13**.



**Σχήμα 2.12:** Σύνθεση της ένωσης **13**.

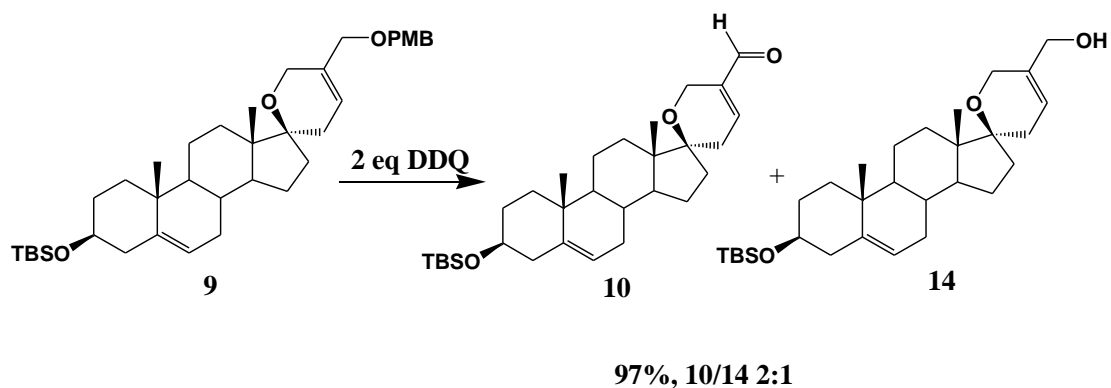


**Αντιδραστήρια και συνθήκες:**

- Τριχλωροακετιμίδιο της *p*-μεθοξυβενζυλικής αλκοόλης καμφοροσουλφονικό οξύ, διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- Διίσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο, διαιθυλαιθέρα,  $-78^{\circ}\text{C}$
- Τριφαινυλοφωσφίνη, τετραβρωμομεθάνιο, διχλωρομεθάνιο,  $-5^{\circ}\text{C}$

Η πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση της ένωσης **13**, όπως περιγράφεται στο Σχήμα **2.12**, περιλαμβάνει προστασία του υδροξυλίου του (υδροξυμεθυλο)ακρυλικού μεθυλεστέρα με χρήση τριχλωροακετιμιδίου της *p*-μεθοξυβενζυλικής αλκοόλης παρουσία καμφοροσουλφονικού οξέος σε διχλωρομεθάνιο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η οποία οδηγεί στην ένωση **11** (86%). Αναγωγή του [(*p*-μεθοξυβενζυλο)μεθυλο]ακρυλικού μεθυλεστέρα **11** με διίσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο σε διαιθυλαιθέρα στους  $-78^{\circ}\text{C}$  δίνει την αλκοόλη **12** (84%), η οποία μετατρέπεται στο αντίστοιχο βρωμίδιο **13** (87%), παρουσία τριφαινυλοφωσφίνης και τετραβρωμομεθανίου σε διχλωρομεθάνιο στους  $-5^{\circ}\text{C}$ .

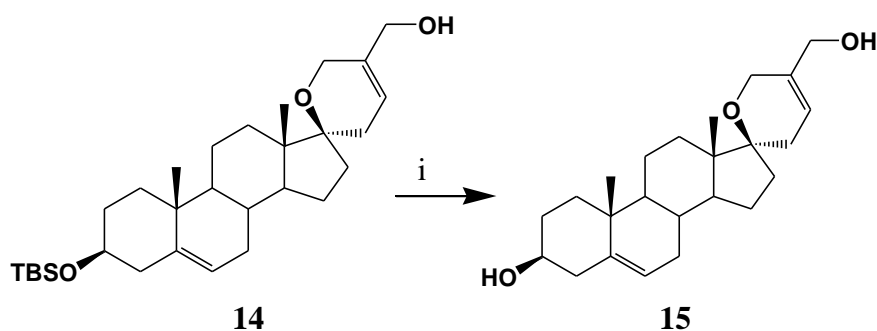
Αρχικά, η απομάκρυνση της *p*-μεθοξυβενζυλο προστατευτικής ομάδας της ένωσης **9** πραγματοποιήθηκε με επίδραση **2 eq** 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνης σε μίγμα διχλωρομεθάνιου/ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών  $\text{pH}=7.0$ . Με τις συνθήκες αυτές ελήφθη μείγμα της αποπροστατευμένης αλκοόλης **14** και της αντίστοιχης αλδεΐδης **10** (Σχήμα **2.13**). Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,<sup>49</sup> δεδομένου ότι η ένωση **9** είναι αλλυλική αλκοόλη είναι δυνατό με χρήση μεγαλύτερης ποσότητας 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνης να ληφθεί ως μοναδικό προϊόν η επιθυμητή αλδεΐδη. Έτσι, με χρήση 3.4 eq του αντιδραστήριου ελήφθη ως αποκλειστικό προϊόν η αλδεΐδη **10**. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της οξείδωσης της αλκοόλης **14**.



**Σχήμα 2.13:** Προϊόντα που λαμβάνονται κατά την αντίδραση αποπροστασίας με χρήση 2eq DDQ

Στη συνέχεια, η αλκοόλη **14** απομονώθηκε και ύστερα από απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας του 3β-υδροξυλίου με υδροφθορική πυριδίνη σε διχλωρομεθάνιο οδήγησε στο τελικό προϊόν **15** (72%) (Σχήμα 2.14), η δομή του οποίου ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR και HRMS (Εικόνα 2.3).

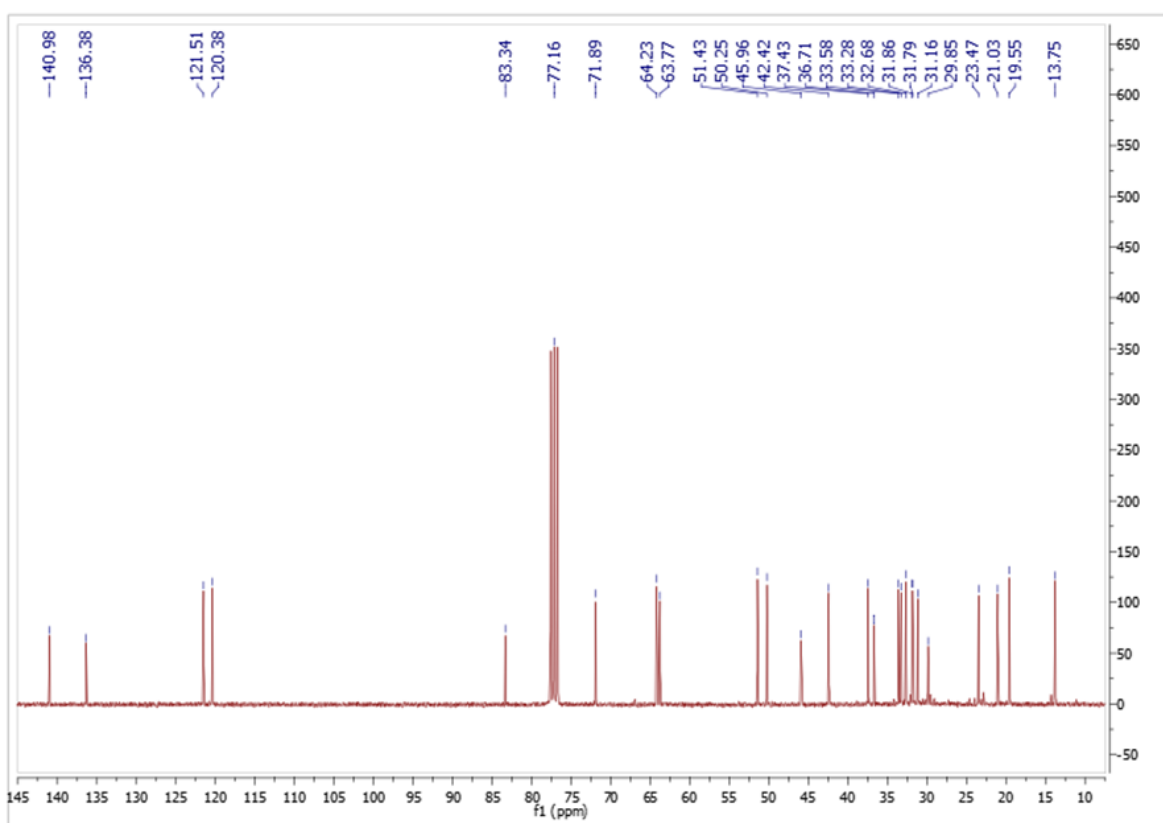
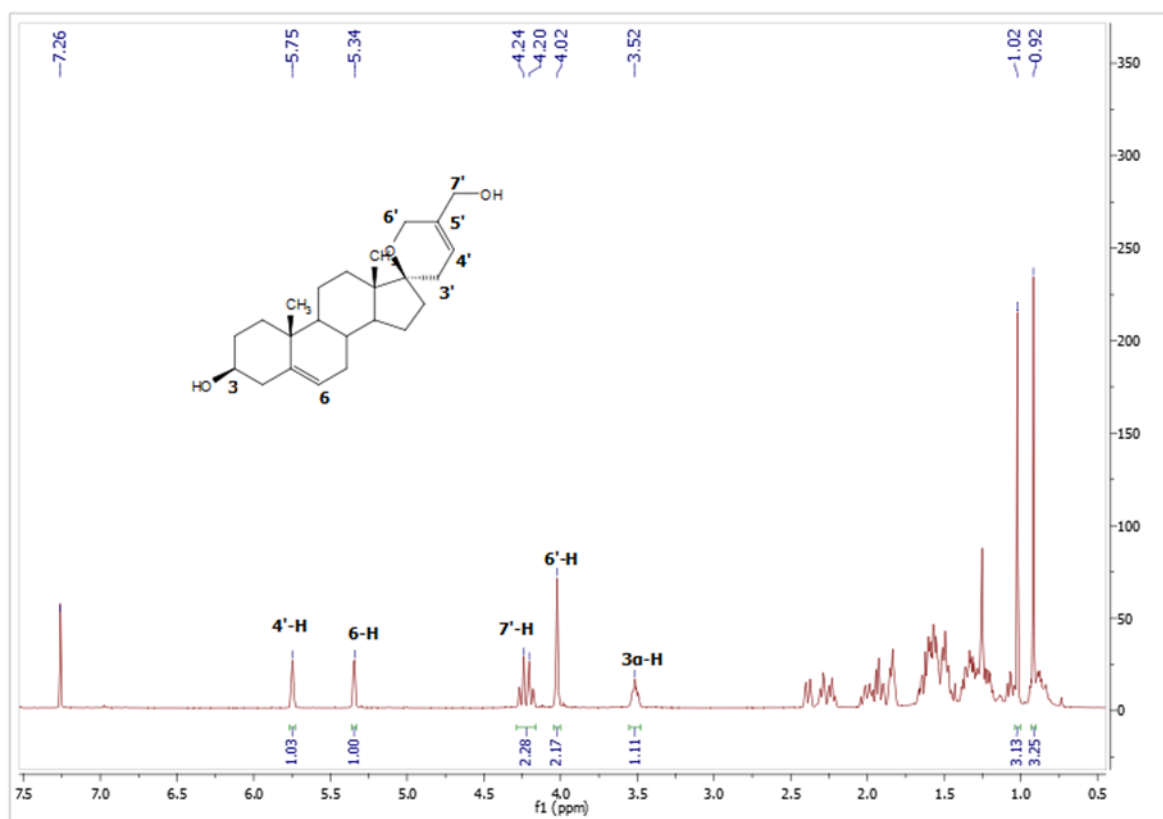
**Σχήμα 2.14:** Σύνθεση της ένωσης **15**



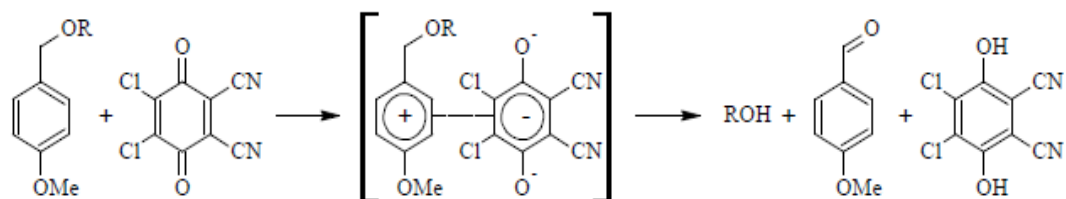
**Αντιδραστήρια και συνθήκες:**

(ii) Υδροφθορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Εικόνα 2.6: Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 15 σε  $\text{CDCl}_3$

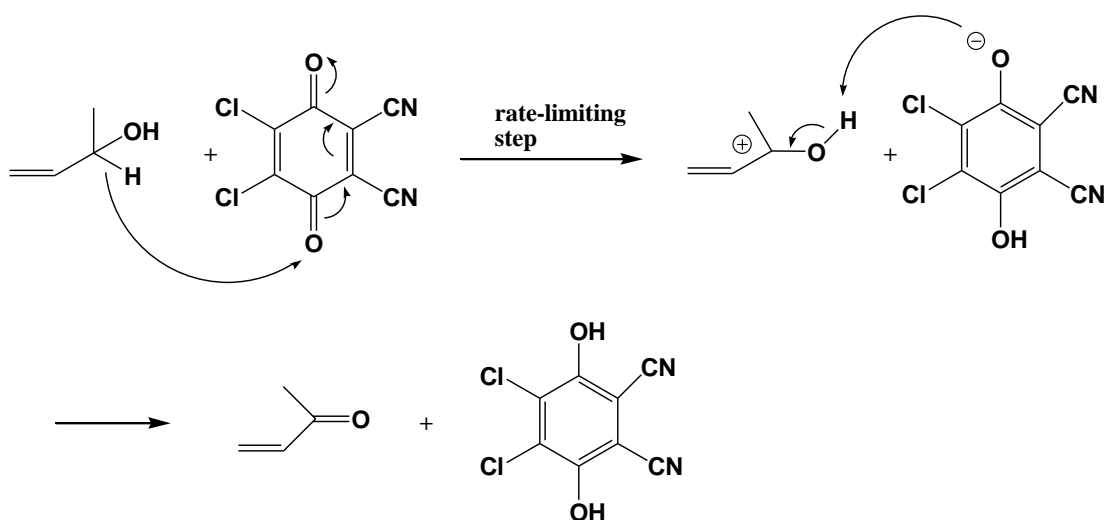


Η 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη (DDQ) αποτελεί ένα συχνά χρησιμοποιούμενο οξειδωτικό σε αντιδράσεις αποπροστασίας παρα-μεθοξυβενζυλαιθέρων. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η αντίδραση περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταφοράς φορτίου μεταξύ ενός αρωματικού δακτυλίου-δότη ηλεκτρονίων και του DDQ-δέκτη ηλεκτρονίων (Σχήμα 2.15). Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης εξαφανίζεται το πράσινο χρώμα του συμπλόκου, μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης οπότε και χάνει το χρωματισμό.<sup>49</sup>



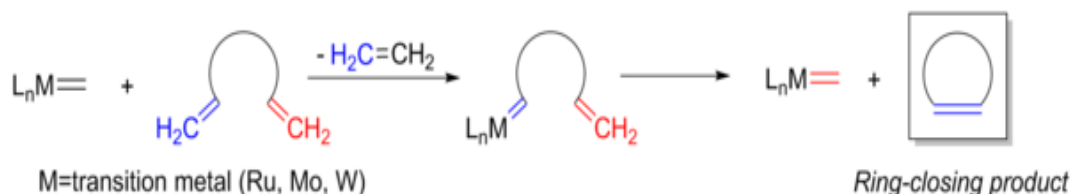
**Σχήμα 2.15:** Μηχανισμός της αντίδρασης αποπροστασίας *p*-μεθοξυβενζυλαιθέρων με DDQ<sup>49</sup>

Το 1956, ο Braude και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η εκλεκτική οξείδωση αλλυλικών αλκοολών με χρήση της κινόνης *o*-χλωροανιλ (***o*-chloroanil**) πραγματοποιείται μέσω σχηματισμού ενός ενδιάμεσου κατιόντος, ύστερα από απόσπαση ενός πρωτονίου, το οποίο σταθεροποιείται μέσω δομών συντονισμού. Σύμφωνα με μελέτες που ακολούθησαν, αποδείχτηκε ότι με τον ίδιο μηχανισμό αντιδρά και το DDQ (Σχήμα 2.16).<sup>50</sup>



**Σχήμα 2.16:** Μηχανισμός οξείδωσης αλλυλικών αλκοολών με χρήση DDQ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για τη σύνθεση του σπειρανικού αιθέρα **9**, χρησιμοποιήθηκε η ολεφινική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου (Ring Closing Metathesis, RCM) παρουσία καταλύτη Grubbs 2<sup>ης</sup> γενιάς. Πρόκειται για μία ευρέως χρησιμοποιούμενη στην οργανική χημεία αντίδραση, κατά την οποία προκύπτουν τελικά ακόρεστοι δακτύλιοι, ύστερα από ενδομοριακή μετάθεση ακραίων αλκενίων, και ένα μόριο αιθυλενίου.

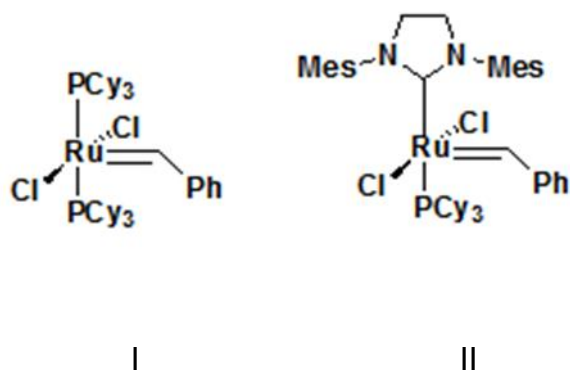


**Σχήμα 2.17:** Αντίδραση ολεφινικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου

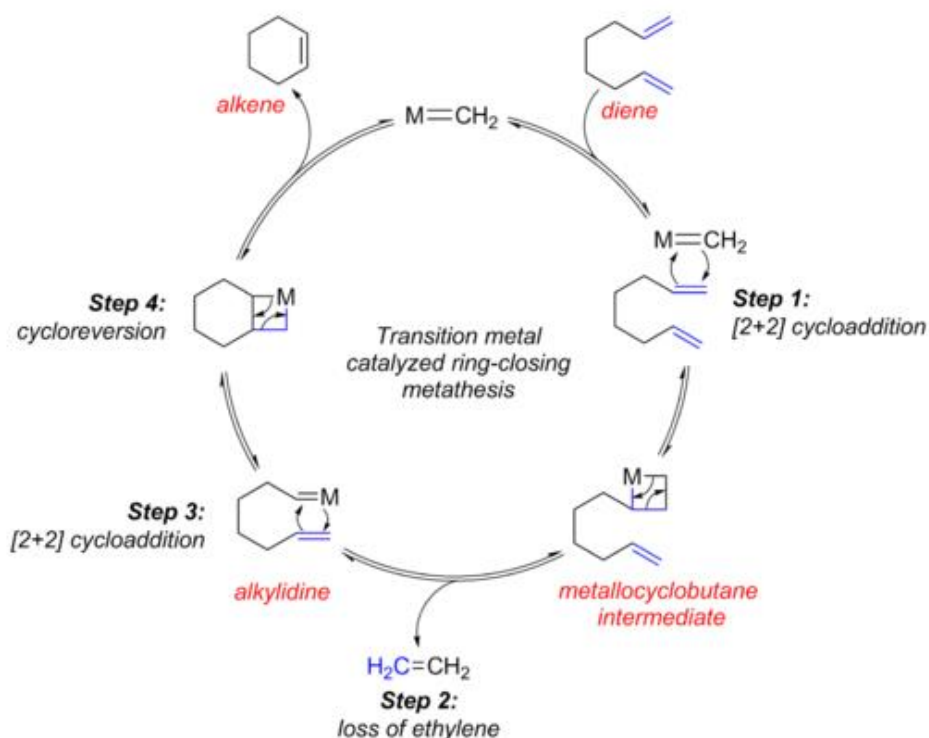
Η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία έγινε το 1980 από τον Dider Villemin, ωστόσο η αντίδραση έγινε γνωστή αργότερα από τους Robert H. Grubbs, Richard R. Schrock και Yves Chauvin, οι οποίοι βραβεύτηκαν το 2005 με το Νόμπελ Χημείας για την εργασία τους αναφορικά με την ολεφινική μετάθεση.<sup>51</sup> Η ευρεία χρήση της αντίδρασης από τους συνθετικούς χημικούς αποδίδεται στην ευκολία σχηματισμού των δακτυλίων (προτιμούνται κυρίως δακτύλιοι μεσαίου έως και μεγάλου μεγέθους), ενώ θεωρείται και μία οικονομική αντίδραση από άποψη ατόμων, καθώς το μοναδικό άλλο προϊόν που σχηματίζεται είναι το αιθυλένιο.

Στην ολεφινική μετάθεση χρησιμοποιήθηκαν αρχικά καταλύτες μολυβδενίου, οι οποίοι αν και προσφέρουν υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα στην περίπτωση ασύμμετρων ολεφινικών μεταθέσεων με κλείσιμο δακτυλίου, γρήγορα αντικαταστάθηκαν από αντίστοιχους ρουθηνίου, λόγω της υψηλής δραστηριότητας και ανοχής παρουσία διαφόρων λειτουργικών ομάδων, καθώς επίσης και της ευκολίας στη χρήση τους και της σταθερότητάς τους παρουσία οξυγόνου.

Στην παρούσα εργασία, ο σχηματισμός του αναλόγου **5** επιτυγχάνεται με χρήση του καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς. Πρόκειται για ένα σύμπλοκο με βάση το ρουθίνιο και δομή, η οποία φαίνεται στο Σχήμα **2.18** (δομή II).



**Σχήμα 2.18:** Οι δομές *I* και *II* απεικονίζουν τους καταλύτες Grubbs πρώτης και δεύτερης γενιάς, αντίστοιχα



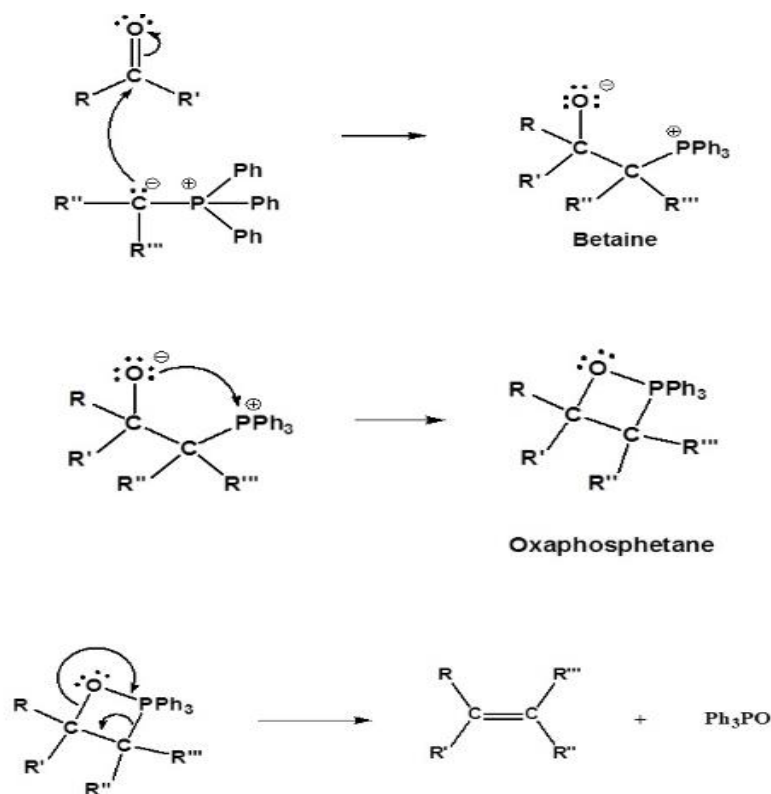
**Σχήμα 2.19:** Προτεινόμενος μηχανισμός της ολεφινικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου

Ο τρόπος δράσης των εν λόγω συμπλόκων απεικονίζεται στο Σχήμα 2.19. Αρχικά, λαμβάνει χώρα μία [2+2] κυκλοπροσθήκη μεταξύ του καταλύτη και του ενός από τους δυο διπλούς δεσμούς του υποστρώματος (**Step 1**), με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το ενδιάμεσο μεταλλοκυκλοβουτάνιο και να απελευθερώνεται αιθυλένιο (**Step 2**). Στη συνέχεια, ακολουθεί μία εκ νέου [2+2] κυκλοπροσθήκη, αλλά αυτή τη φορά μεταξύ του άλλου διπλού δεσμού του υποστρώματος και του καρβενίου που αποτελεί τμήμα του ίδιου μορίου (**Step 3**), σχηματίζοντας και πάλι ένα μεταλλοκυκλοβουτάνιο. Ακολουθεί η



κυκλική μετάθεση (**Step 4**), ο σχηματισμός και η απελευθέρωση του αλκενίου, ενώ το νέο ενεργό καρβένιο συνεχίζει στον επόμενο καταλυτικό κύκλο.<sup>52</sup>

Η αντίδραση Wittig, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του αναλόγου **5** (Σχήμα **2.20**), αποτελεί μία αντίδραση, η οποία οδηγεί στη δημιουργία αλκενίων μέσω της αντίδρασης μίας καρβονυλικής ένωσης (αλδεΐδη, κετόνη) και ενός υλιδίου του φωσφόρου. Σημαντικό χαρακτηριστικό της αντίδρασης αποτελεί η παρασκευή καθαρών αλκενίων γνωστής δομής, δηλαδή ο διπλός δεσμός του αλκενίου βρίσκεται πάντα ακριβώς εκεί που ήταν το καρβονύλιο της πρόδρομης ένωσης, ενώ δεν σχηματίζονται μείγματα προϊόντων (εκτός από τα *E, Z* ισομερή).



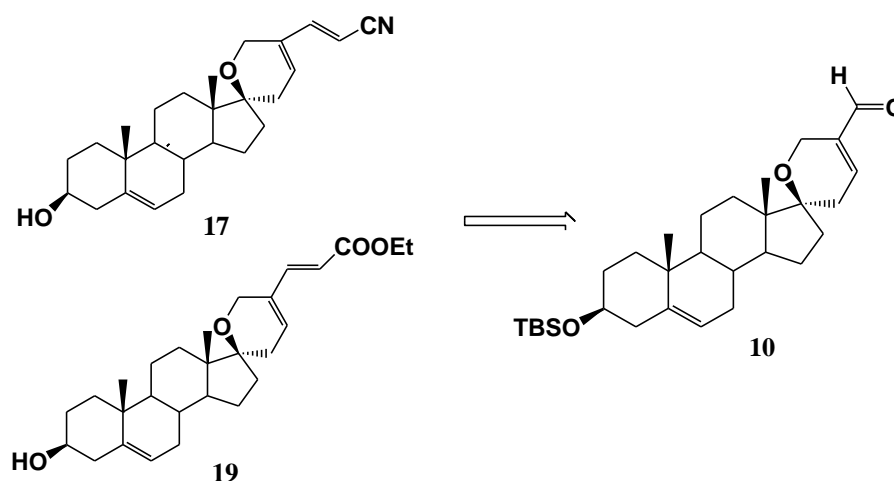
**Σχήμα 2.20:** Μηχανισμός αντίδρασης Wittig

Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για την αντίδραση Wittig (Σχήμα **2.20**) περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του υλιδίου του φωσφόρου στο καρβονύλιο της ένωσης, σχηματίζοντας έτσι ένα ενδιάμεσο που φέρει δύο αντίθετα φορτία και ονομάζεται βεταΐνη. Ακολουθεί αμέσως η δημιουργία ενός ετεροκυκλικού ενδιάμεσου, που καλείται οξαφωσφετάνιο, το οποίο αποσυντίθεται τελικά προς ένα αλκένιο και τριφαινυλοφωσφινοξειδίο. Τελικό

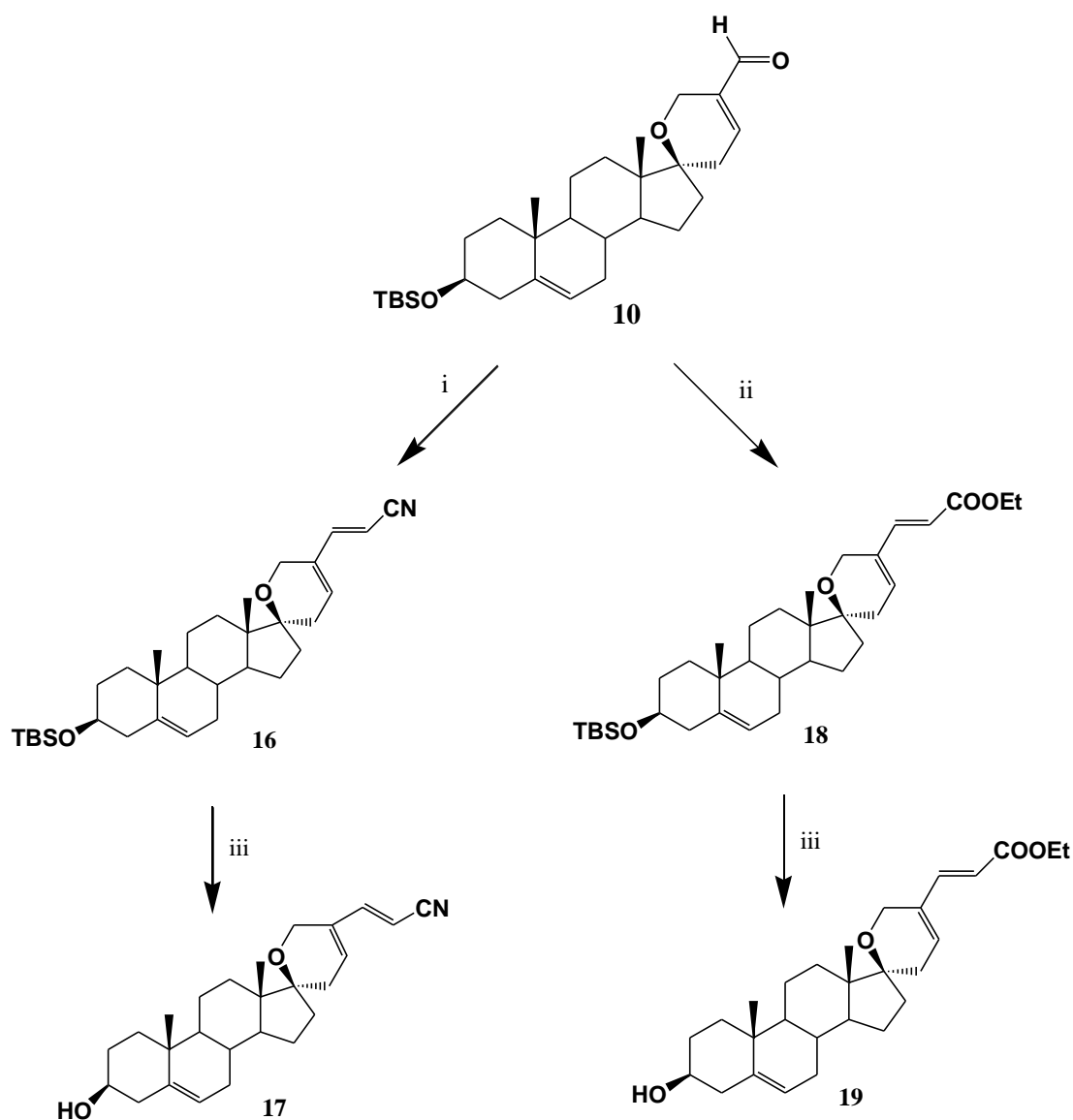
αποτέλεσμα είναι η αντικατάσταση του καρβονυλικού οξυγόνου από την οργανική ομάδα που ήταν αρχικά ενωμένη με τον φωσφόρο.<sup>53</sup>

Στη συνέχεια, η αλδεΐδη **10** χρησιμοποιήθηκε ως ενδιάμεσο, με σκοπό τη σύνθεση των αναλόγων **17** και **19**. Συγκεκριμένα, τα τελικά προϊόντα **16** και **18** μπορεί να προκύψουν ύστερα από αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons της (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν-5'-άλης] (**10**) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους φωσφονοεστέρες.

**Σχήμα 2.21:** Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού των ενώσεων **17**, **19**



Σχήμα 2.22: Σύνθεση των ενώσεων 17, 19



**Αντιδραστήρια και συνθήκες:**

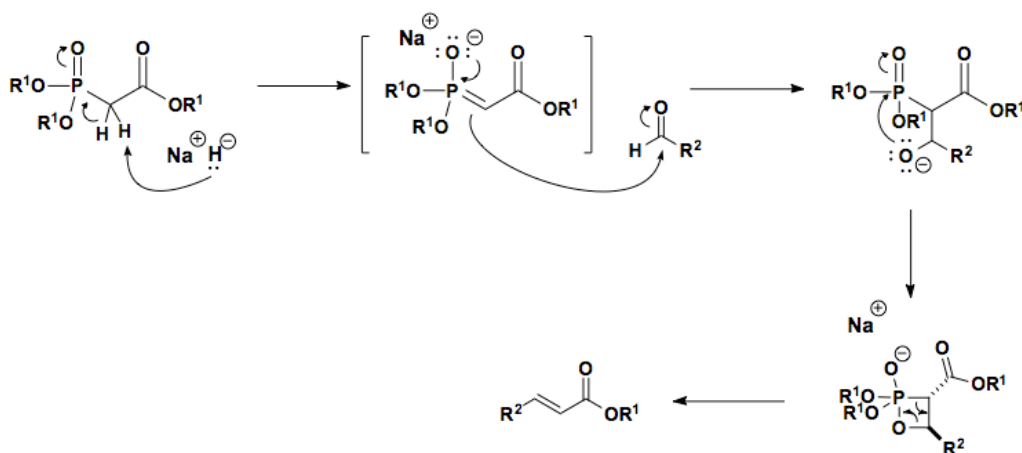
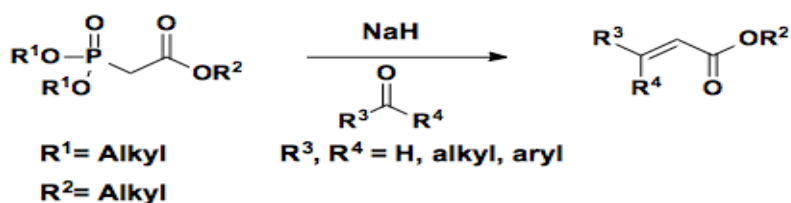
- (i) Κυανομεθυλοφωσφονικός διαιθυλεστέρας, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο, 0°C
- (ii) Αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο, 0°C
- (iii) Υδροφορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Η παρασκευή των ενώσεων 17 και 19 πραγματοποιείται σε 2 στάδια από το ενδιάμεσο 10, η σύνθεση του οποίου έχει περιγραφεί στο Σχήμα 2.22. Μέσω αντίδρασης Horner-Wadsworth-Emmons η αλδεΐδη 10 παρουσία του υλιδίου του κυανομεθυλοφωσφονιακού διαιθυλεστέρα ή του υλιδίου του

αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακού διαιθυλεστέρα οδηγεί στα ανάλογα **16** (ύστερα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης απομονώθηκε κλάσμα αποκλειστικά του *E* ισομερούς (**16**) και ένα κλάσμα μείγματος των *E,Z* ισομερών σε αναλογία 4:1) (93%) και **18** (92%), αντίστοιχα. Αποπροστασία των αλκοολών **16** (*E* ισομερές) και **18** με υδροφθορική πυριδίνη σε διχλωρομεθάνιο στους 0°C οδηγεί στα τελικά προϊόντα **17** (93%) και **19** (93%), αντίστοιχα.

Η αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons (Εικόνα 2.7), η οποία χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό των αναλόγων **16** και **18**, αποτελεί μία αντίδραση κατά την οποία μία καρβονυλική ένωση αντιδρά με ένα σταθεροποιημένο φωσφονιακό καρβανιόν, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός αλκενίου. Οι φωσφονιακοί εστέρες που χρησιμοποιούνται είναι αρκετά δραστικοί, ικανοί να αντιδρούν τόσο με αλδεΐδες όσο και με κετόνες, ενώ παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι το παραπροϊόν της αντίδρασης (διαλκυλοφωσφονικό άλας) να είναι υδατοδιαλυτό, με αποτέλεσμα να καθίσταται εύκολος ο διαχωρισμός του από το επιθυμητό προϊόν.

**Εικόνα 2.7:** Αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons.



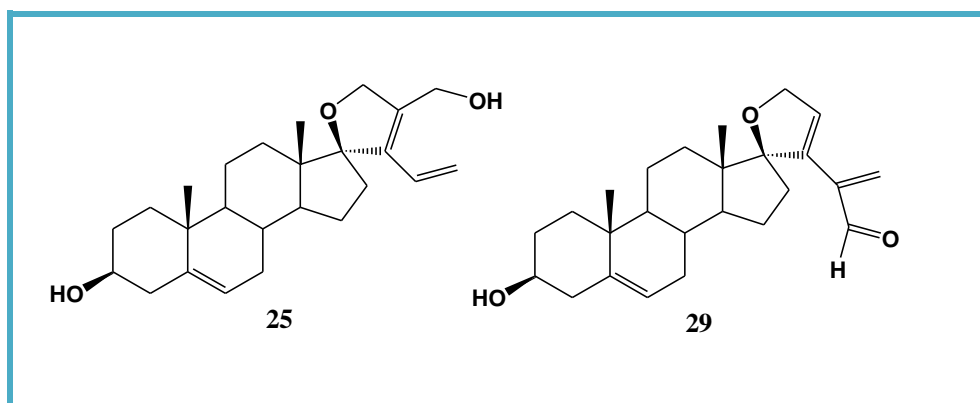
**Σχήμα 2.23:** Μηχανισμός της αντίδρασης Horner-Wadsworth-Emmons.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα **2.23**, περιλαμβάνει απόσπαση πρωτονίου του φωσφονιακού διαλκυλεστέρα από τη βάση, οδηγώντας στο σχηματισμό του αντίστοιχου καρβανιόντος, το οποίο πραγματοποιεί πυρηνόφιλη προσβολή στο καρβονύλιο της καρβονυλικής ένωσης. Τελικά, μέσω ενός κυκλικού ενδιάμεσου προκύπτει το επιθυμητό προϊόν, το οποίο φέρει ένα άτομο άνθρακα στη θέση του οξυγόνου του καρβονυλίου, ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται ανιόν του όξινου φωσφορικού διαιθυλεστέρα.<sup>54</sup>

### 2.2.2 Σύνθεση νέων φουρανο-αναλόγων της DHEA

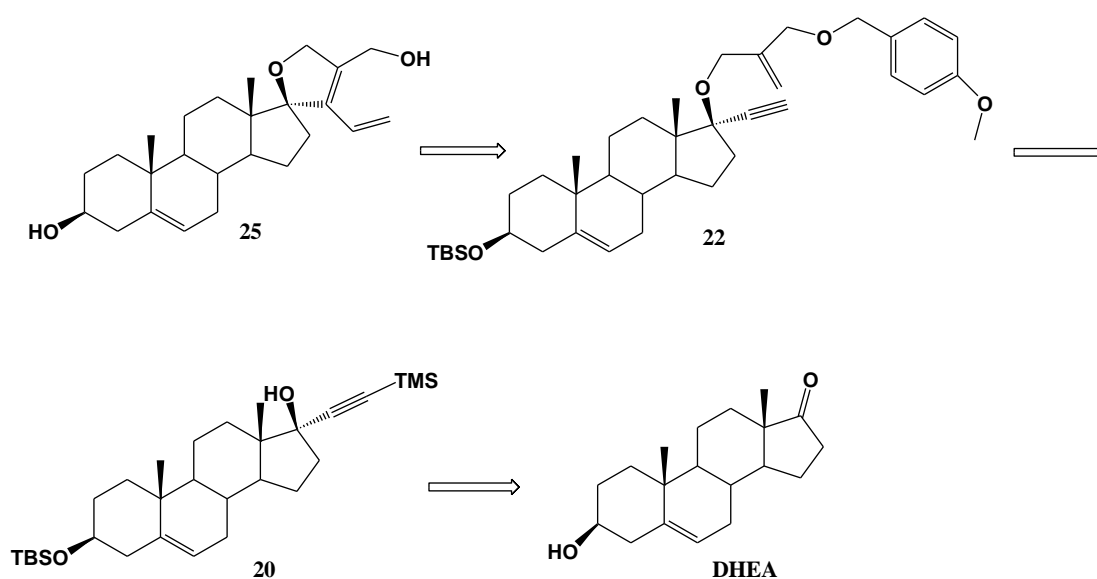
Στη συνέχεια, ακολούθησε η σύνθεση των C-17-σπειροφουρανικών αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης, τα οποία φέρουν διαφορετικούς υποκαταστάτες.

**Πίνακας 2.3:** Νέα ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης με σπειροκυκλικούς ακόρεστους πενταμελείς αιθερικούς δακτυλίους στη θέση C17.

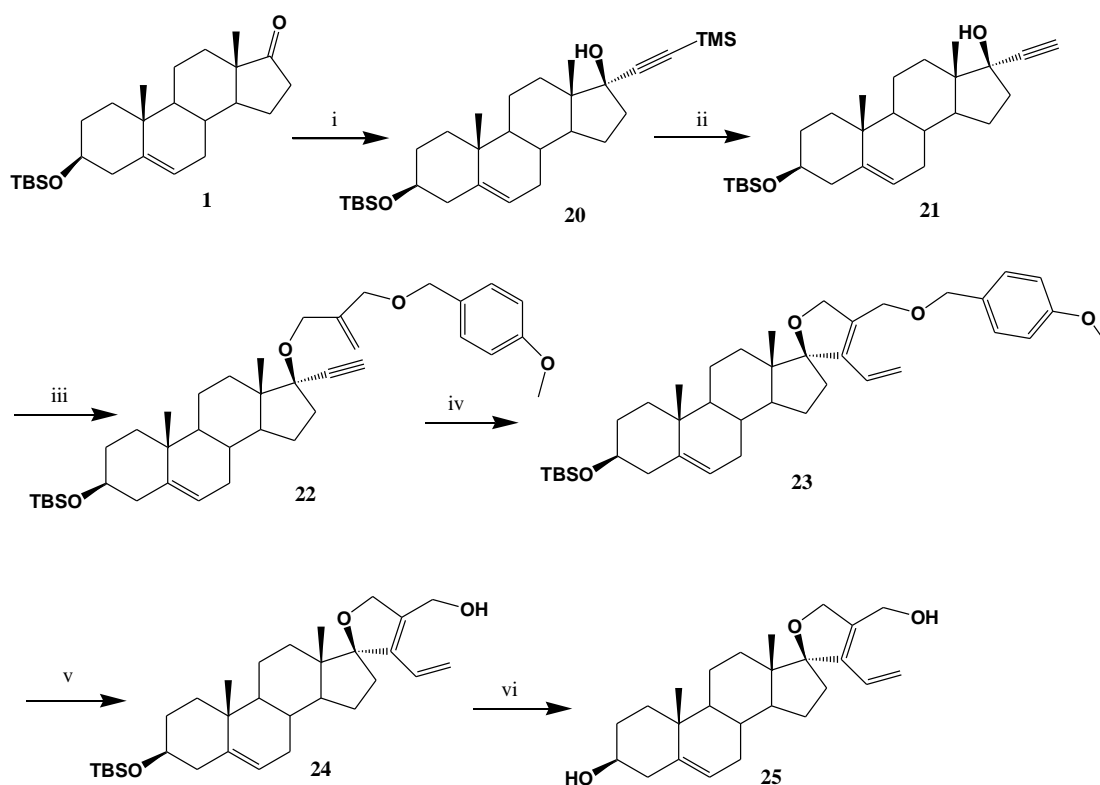


Το τελικό ανάλογο **25** είναι δυνατό να προκύψει ύστερα από αντίδραση ενυπικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου του αναλόγου **22**, το οποίο αποτελεί προϊόν αλκυλίωσης της ένωσης **20**, η οποία προκύπτει ύστερα από αντίδραση προσθήκης στο καρβονύλιο στον C-17 της C-3-προστατευμένης δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA).

**Σχήμα 2.24:** Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **25**



**Σχήμα 2.25:** Σύνθεση της ένωσης **25**



**Αντιδραστήρια και συνθήκες:**

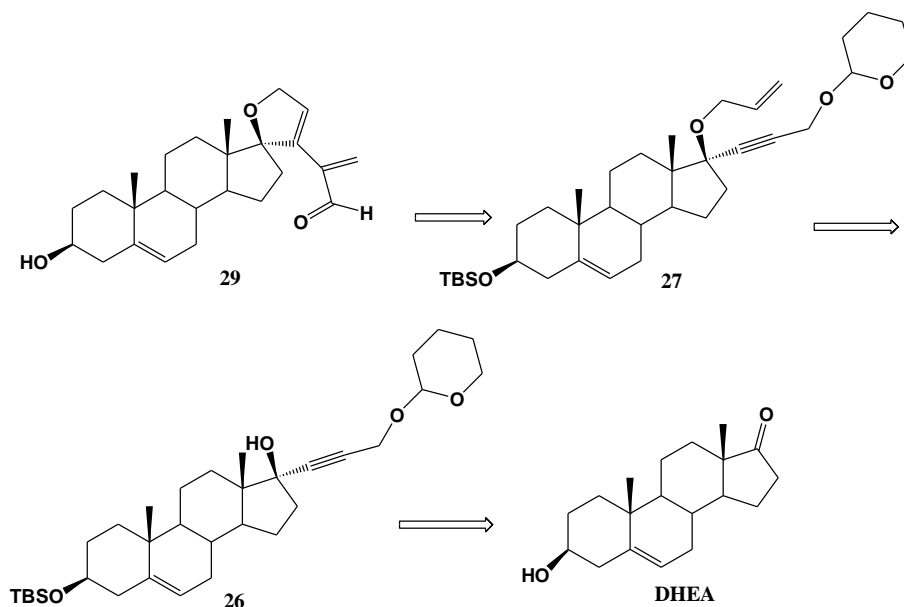
- (i) Τριμεθυλοσιλυλοακετυλένιο, *n*-βουτυλολίθιο (2.5 M σε εξάνιο),  $-78^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  θ.π.
- (ii) Ανθρακικό κάλιο, μεθανόλη, θ.π.
- (iii) [(2-(Βρωμομεθυλο)αλλυλοξυ)μεθυλο]*p*-μεθοξυβενζόλιο, υδρίδιο του καλίου (30% σε λάδι), τετραϋδροφουράνιο,  $75^{\circ}\text{C}$ .
- (iv) Καταλύτης Grubbs 2<sup>ης</sup> γενιάς, διχλωρομεθάνιο, θ.π  $\rightarrow$   $40^{\circ}\text{C}$ .
- (v) 2,3-Διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη, διχλωρομεθάνιο, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.0, θ.π.
- (vi) Υδροφθορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Στο Σχήμα **2.25** περιγράφεται η πορεία, η οποία ακολουθήθηκε για τη σύνθεση της ένωσης **25**. Προσθήκη ακετυλιδίου του τριμεθυλοσιλυλοακετυλενίου παρουσία *n*-βουτυλολίθιου σε τετραϋδροφουράνιο στο καρβονύλιο C-17 οδηγεί στο προϊόν προσθήκης από την  $\alpha$ -πλευρά, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από το μεθύλιο στον C-18, **20**. Απομάκρυνση της τριμεθυλοσιλυλο ομάδας με επίδραση ανθρακικού καλίου σε μεθανόλη, δίνει το αλκινικό παράγωγο **21** (88.9% για τα δύο στάδια). Αλκυλίωση της αλκοόλης **21** με [(2-(βρωμομεθυλο)αλλυλοξυ)μεθυλο]*p*-μεθοξυβενζόλιο **13** με χρήση υδριδίου του

νατρίου ως βάση σε τετραϋδροφουράνιο οδηγεί στο ανάλογο **22** (72%). Στη συνέχεια, ο αιθέρας **22** μέσω ενυικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου (enyne metathesis) παρουσία καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς σε διχλωρομεθάνιο οδηγεί στο σπειροκυκλικό αιθέρα **23** (50%). Απομάκρυνση της *p*-μεθοξυβενζυλο προστατευτικής ομάδας με χρήση 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνης σε μείγμα διχλωρομεθάνιου/ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.0 οδηγεί σε μείγμα της αλκοόλης **24** και της αντίστοιχης αλδεΐδης (60%, σε αναλογία 1:1). Κατά την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας του 3β-υδροξυλίου της αλκοόλης **24** με υδροφορική πυριδίνη σε διχλωρομεθάνιο, λόγω της μικρής κλίμακας της αντίδρασης, ύστερα από παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας δεν ελήφθη ικανή ποσότητα προϊόντος **25** για ταυτοποίηση με χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Αποπροστασία της αλδεΐδης δεν πραγματοποιήθηκε εξαιτίας της μικρής ποσότητάς της.

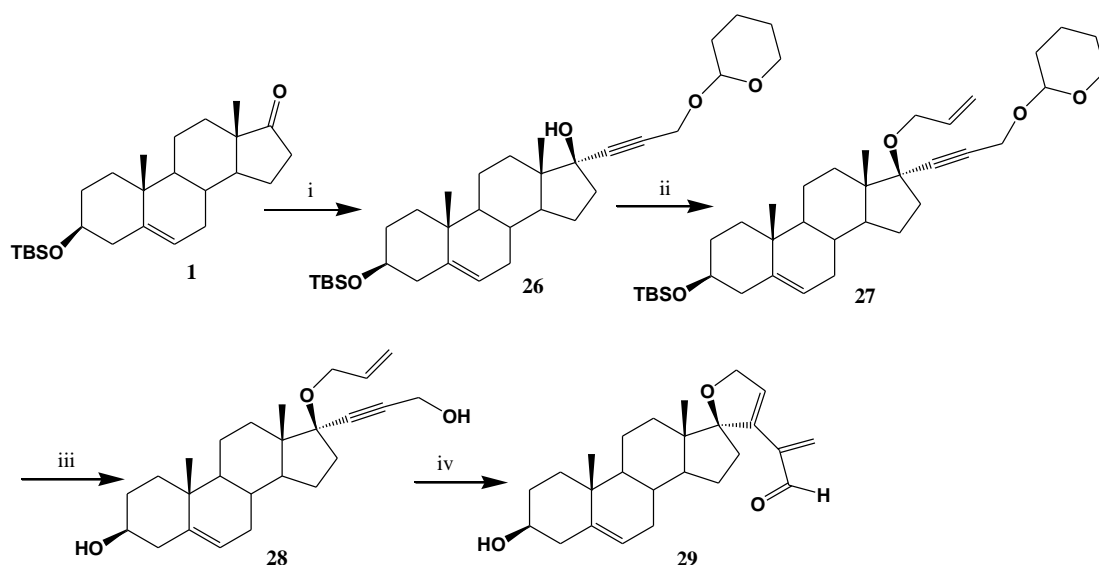
Το τελικό ανάλογο **29** είναι δυνατό να προκύψει από αντίδραση ενυικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου του αναλόγου **27**, το οποίο αποτελεί προϊόν αλκυλίωσης της ένωσης **26**, η οποία προκύπτει από αντίδραση προσθήκης στο καρβονύλιο στον C-17 της C-3-προστατευμένης δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA).

**Σχήμα 2.26:** Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **29**





**Σχήμα 2.27:** Σύνθεση της ένωσης **29**

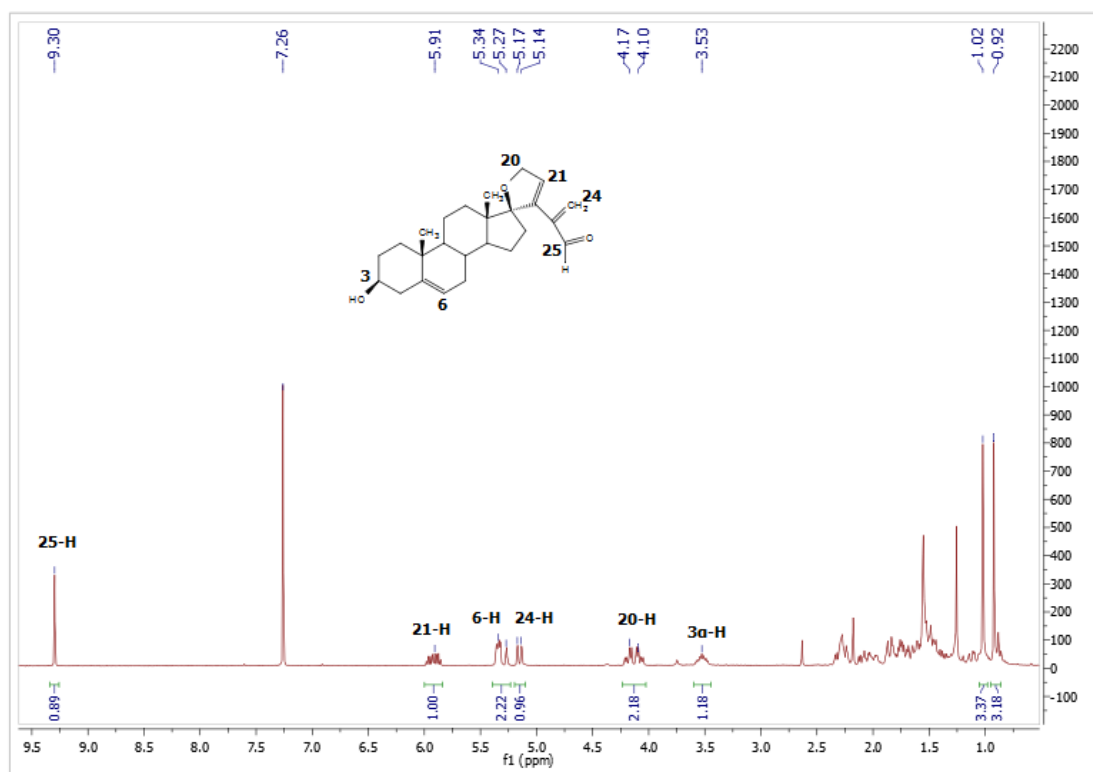


**Αντιδραστήρια και συνθήκες:**

- (i) (Τετραϋδροπυρανο)προπαργυλική αλκοόλη, βουτυλολίθιο, τετραϋδροφουράνιο,  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$
- (ii) Αλλυλοβρωμίδιο, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο
- (iii) *p*-τολουολο-σουλφονικό οξύ, μεθανόλη, θ.π.
- (iv) Καταλύτης Grubbs 2<sup>ης</sup> γενιάς, διχλωρομεθάνιο, θ.π

Στο Σχήμα **2.27** περιγράφεται η πορεία, η οποία ακολουθήθηκε για τη σύνθεση της ένωσης **29**. Προσθήκη του ακετυλιδίου του τετραϋδρο-2-(προπ-2-υνυλοξυ)-2*H*-πυρανίου (το οποίο συντέθηκε από το 3,4-διυδρο-2*H*-πυράνιο και την προπαργυλική αλκοόλη παρουσία *p*-τολουολο-σουλφονικού οξέος) με χρήση βουτυλολίου ως βάση σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο στους  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , στο καρβονύλιο στον C-17, οδηγεί στο προϊόν προσθήκης από την  $\alpha$ -πλευρά, λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης από το μεθύλιο στον C-18, **26** (33%). Ακολουθεί αλκυλίωση της αλκοόλης **26** με αλλυλοβρωμίδιο παρουσία υδριδίου του νατρίου ως βάση σε τετραϋδροφουράνιο, ώστε να προκύψει το ανάλογο **27** (48%). Απομάκρυνση της THP ομάδας της ένωσης **27** με *p*-τολουολο-σουλφονικό οξύ σε μεθανόλη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με ταυτόχρονη αποπροστασία της αλκοόλης στον C-3 δίνει τη διόλη **28** (70%), η οποία μέσω ενυικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου (enyne metathesis) παρουσία καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς σε διχλωρομεθάνιο οδηγεί στο σπειροκυκλικό αιθέρα **29** (10%), η δομή του οποίου ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  και HRMS (Εικόνα **2.8**).

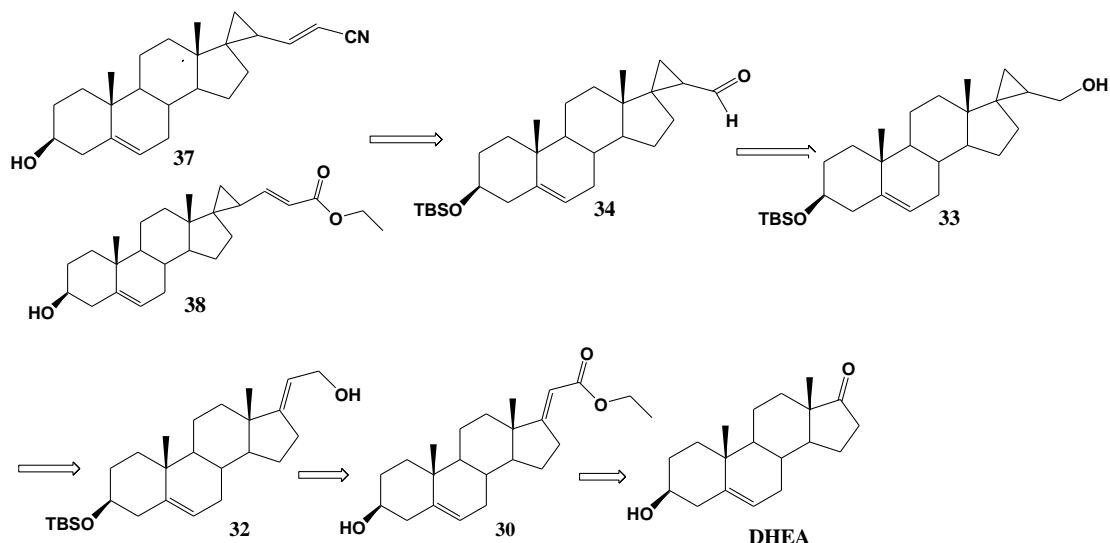
Εικόνα 2.8: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **29** σε  $\text{CDCl}_3$



### 2.2.3 Σύνθεση νέων σπειρο-κυκλοπροπανικών αναλόγων της DHEA

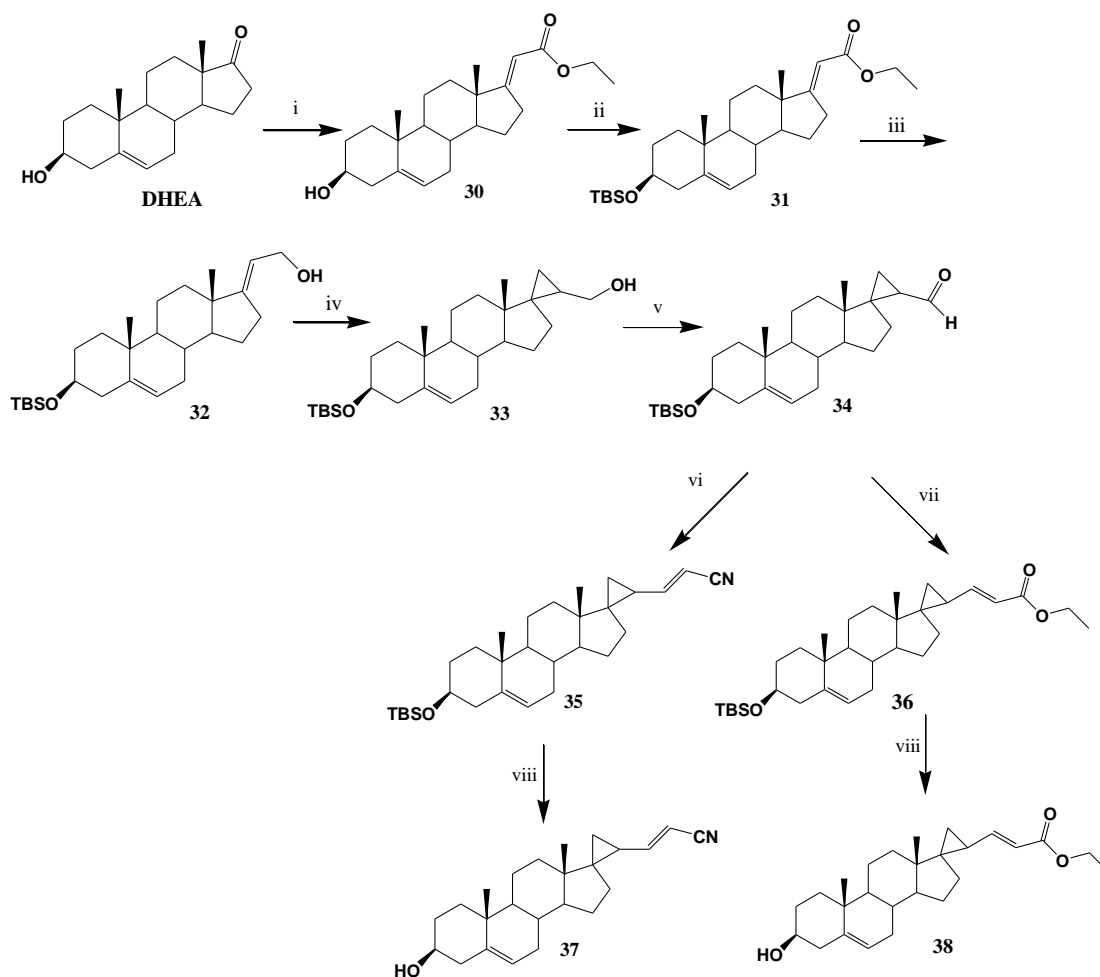
Η δεύτερη σειρά των C17-σπειροκυκλικών αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης περιλαμβάνει τα σπειροκυκλοπροπανικά ανάλογα, τα οποία φέρουν διαφορετική υποκατάσταση στη θέση C21 του κυκλοπροπανικού δακτυλίου.

**Σχήμα 2.28:** Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού των ενώσεων **37**, **38**



Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.28 τα ανάλογα **37**, **38** είναι δυνατό να προκύψουν από αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons της αλδεΐδης **34**, η οποία προκύπτει από οξείδωση της αλκοόλης **33**. Η αλκοόλη **33** αποτελεί προϊόν κυκλοπροπανίωσης της ένωσης **32**, η οποία λαμβάνεται από αναγωγή και προστασία του υδροξυλίου στον C-3 του εστέρα **30**, ο οποίος προκύπτει από αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons στο καρβονύλιο στον C-17 της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA).

**Σχήμα 2.29:** Σύνθεση των αναλόγων **37, 38**

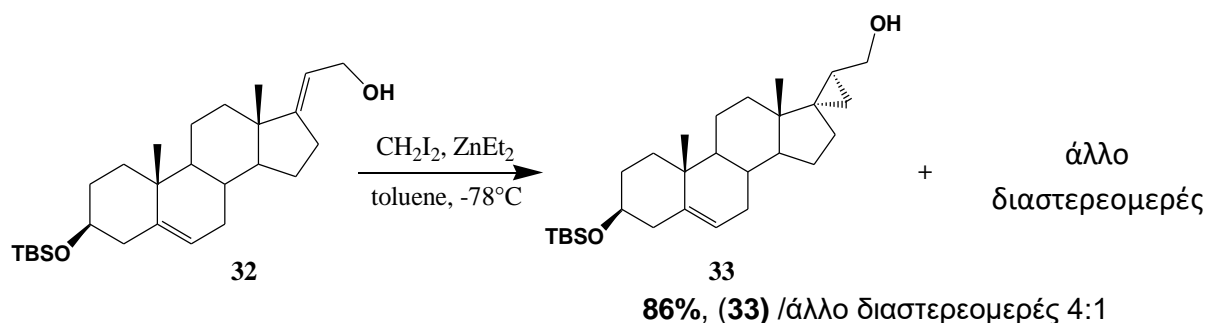


**Αντιδραστήρια και συνθήκες:**

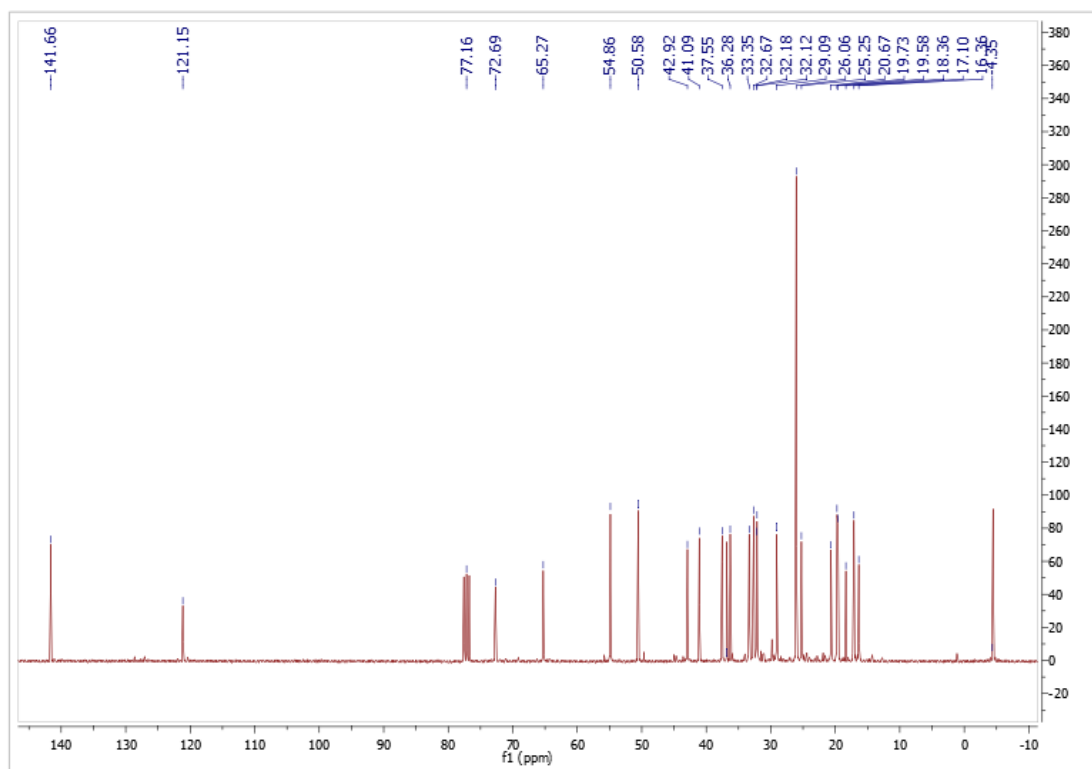
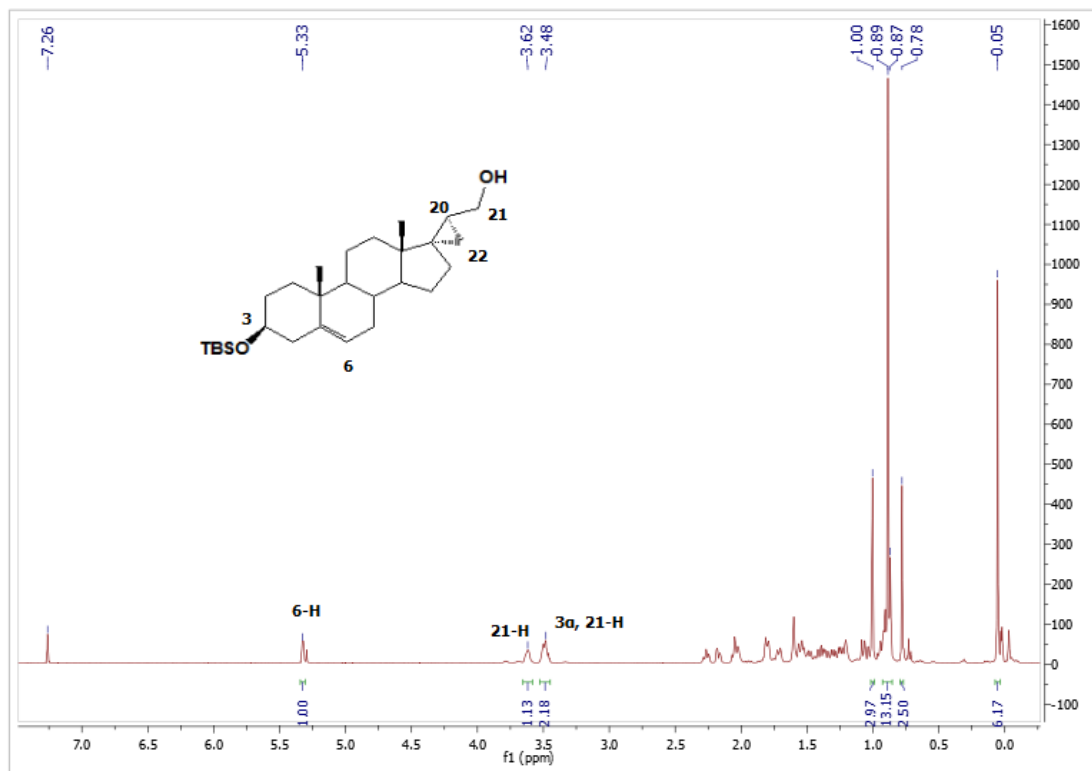
- (i) Αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας, μίγμα άνυδρου τετραϋδροφουρανίου/ απόλυτης αιθανόλης (1:1), διάλυμα 5% αιθοξυνατρίου σε αιθανόλη, επαναρροή
- (ii) *t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο, ιώδιο, ιμιδαζόλιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.
- (iii) Δίισοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο, τετραϋδροφουράνιο,  $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow \theta.\text{π.}$
- (iv) Διαιθυλοψευδάργυρος, διωδομεθάνιο, τολουόλιο, θ.π.
- (v) Αντιδραστήριο Dess-Martin, διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- (vi) Κυανομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο,  $0^{\circ}\text{C}$
- (vii) Αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο,  $0^{\circ}\text{C}$
- (viii) Υδροφορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των αναλόγων **37**, **38** περιγράφεται στο Σχήμα **2.29**. Μέσω αντίδρασης Horner-Wadsworth-Emmons στο καρβονύλιο στον C-17 της δεϋδροεπιανδροστερόνης με αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακό διαιθυλεστέρα σε μίγμα άνυδρου τετραϋδροφουρανίου/ απόλυτης αιθανόλης παρουσία αιθοξυνατρίου ως βάση (5% διάλυμα σε τετραϋδροφουράνιο) υπό επαναρροή προκύπτει το ανάλογο **30** (94%). Προστασία της υδροξυλομάδας στον C-3 με *t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο παρουσία ιμιδαζολίου και ιωδίου σε τετραϋδροφουράνιο οδηγεί στο ανάλογο **31** (50%), το οποίο με επίδραση διΐσοβουτυλοαργιλιοϋδριδίου σε τετραϋδροφουράνιο στους -78 °C δίνει την αλλυλική αλκοόλη **32**, η οποία με επίδραση διιωδομεθανίου και διαλύματος διαιθυλοψευδαργύρου σε τολουόλιο οδηγεί στην ένωση **33**, η δομή της οποίας ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C και HRMS (Εικόνα **2.9**) τα οποία συγκρίθηκαν με βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>55</sup> και στο σχηματισμό άλλου διαστερομερούς σε αναλογία 4:1 (Σχήμα **2.30**) (86%).

**Σχήμα 2.30:** Προϊόντα αντίδρασης κυκλοπροτανίωσης του αναλόγου **32**

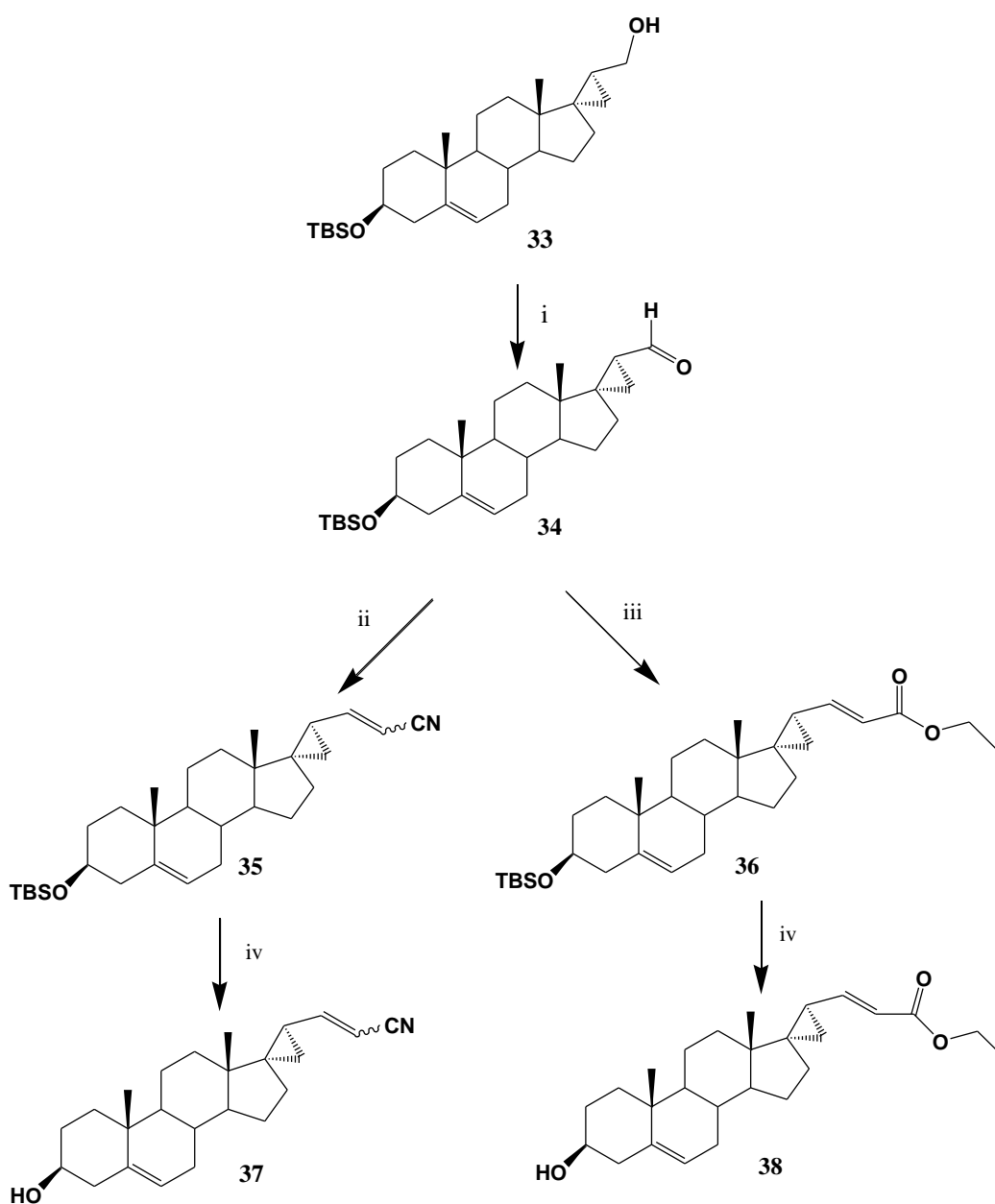


Εικόνα 2.9: Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 33 σε  $\text{CDCl}_3$



Τα επόμενα στάδια που ακολούθησαν, όπως αυτά απεικονίζονται στο Σχήμα 2.31 περιλαμβάνουν οξείδωση της αλκοόλης **33** με αντιδραστήριο Dess-Martin σε διχλωρομεθάνιο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος που οδηγεί στην αντίστοιχη αλδεΐδη **34** (88%), η οποία με χρήση κυανομεθυλοφωσφονιακού διαιθυλεστέρα παρουσία υδριδίου του νατρίου ως βάση σε τετραϋδροφουράνιο στους 0 °C δίνει το ανάλογο **35** (μείγμα *E,Z* ισομερών 60:40) (82%), ενώ με επίδραση αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακού διαιθυλεστέρα παρουσία υδριδίου του νατρίου σε τετραϋδροφουράνιο στους 0 °C προκύπτει το ανάλογο **36** (92%). Αποπροστασία των ενώσεων **35** και **36** με υδροφορική πυριδίνη σε διχλωρομεθάνιο στους 0 °C οδηγεί στα τελικά προϊόντα **37** (95%) και **38** (75%).

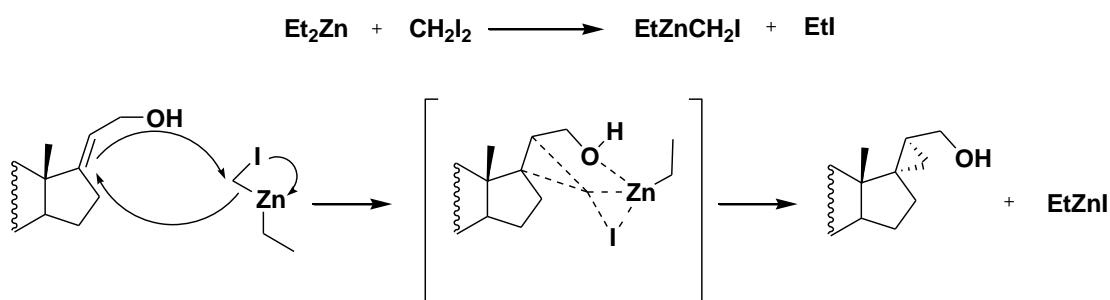
**Σχήμα 2.31:** Σύνθεση των ενώσεων **37**, **38**



### Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (i) Αντιδραστήριο Dess-Martin, διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- (ii) Κυανομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο, 0°C
- (iii) Αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο, 0°C
- (iv) Υδροφορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Η αντίδραση κυκλοπροπανίωσης, η οποία πραγματοποιήθηκε με χρήση διαιθυλοψευδαργύρου και διωδομεθανίου είναι γνωστή ως αντίδραση Simmons Smith<sup>56,57</sup> και υπόκειται σε στερεοχημικούς περιορισμούς, με συνέπεια η προσθήκη του καρβενίου να λαμβάνει χώρα στην λιγότερο παρεμποδισμένη επιφάνεια του διπλού δεσμού και η αντίδραση να είναι στερεοεκλεκτική. Στην περίπτωση του αναλόγου **33**, είναι πιθανό να παίζει κάποιο ρόλο και η παρουσία της υδροξυλομάδας, η οποία πιθανώς να αλληλεπιδρά με το άτομο του ψευδαργύρου (όπως φαίνεται και στην Εικόνα **2.10**), καθώς όταν δοκιμάστηκε αντίδραση του εστέρα **31** κάτω από τις ίδιες συνθήκες δεν λήφθηκε κανένα προϊόν. Επίσης, η αντίδραση κυκλοπροπανίωσης του αναλόγου **31** δοκιμάστηκε και με τη χρήση ιωδιδίου του τριμεθυλοσουλφοξονίου σε DMSO, με τη χρήση *t*-βουτοξειδίου του καλίου ή υδριδίου του νατρίου ως βάση, χωρίς να ληφθεί καθόλου προϊόν.



**Εικόνα 2.10:** Μηχανισμός κυκλοπροπανίωσης Simmons-Smith



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### **ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ (17,2'R)-5'-ΑΙΘΕΝΥΛΟ-3',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[5-ΑΝΔΡΟΣΤΕΝΟ-17,2'-ΠΥΡΑΝ]-3Β-ΟΛΗΣ (5)**

#### **3.1 Εισαγωγή**

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης από την ομάδα των Καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη και του Επ. Καθ. Ιωάννη Χαραλαμπίτσου.

#### **3.2 Αποτελέσματα**

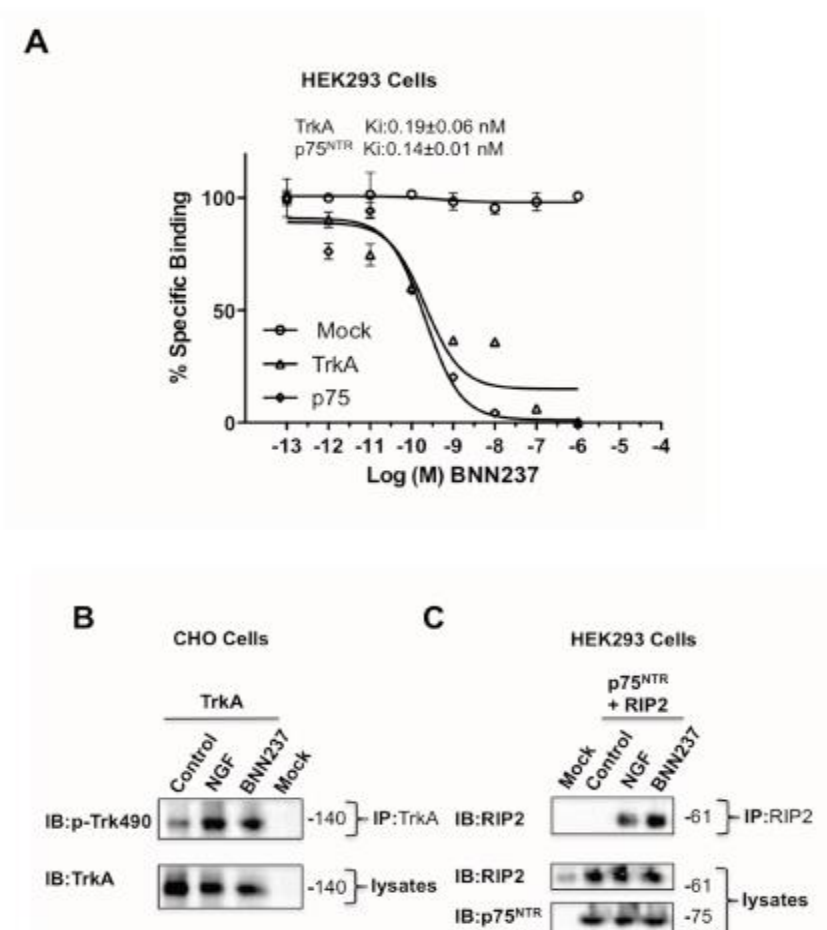
##### **3.2.1 Η ένωση 5 (BNN237) συνδέεται στους υποδοχείς των νευροτροφινών TrkA/p75<sup>NTR</sup> με υψηλή συγγένεια.**

Πειράματα ανταγωνιστικής σύνδεσης με χρήση [<sup>3</sup>H]-DHEA έδειξαν ότι η DHEA προσδένεται σε όλους τους υποδοχείς Trk με Κ<sub>i</sub> σε συγκεντρώσεις nanomolar. Στηριζόμενοι σε αυτά τα αποτελέσματα, οι ερευνητές πραγματοποίησαν πειράματα, κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν [<sup>3</sup>H]-DHEA, BNN237 το οποίο είχε ψυγεί, και μεμβράνες οι οποίες είχαν απομονωθεί από κυτταρικές σειρές HEK293, επιμολυσμένες και μη, με ειδικό φορέα TrkA. Το BNN237 αντικατέστησε αποτελεσματικά τη [<sup>3</sup>H]-DHEA που είχε προσδεθεί στις επιμολυσμένες με TrkA μεμβράνες των κυτταρικών σειρών HEK293<sup>TrkA</sup> (Κ<sub>i</sub>= 19 ± 0.06 nM) (Εικόνα **3.1A**). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα όταν χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές HEK293, επιμολυσμένες με τα cDNAs των υποδοχέων TrkB και TrkC.

Στη συνέχεια, όταν χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές CHO, επιμολυσμένες με το cDNA του υποδοχέα TrkA (CHO<sup>TrkA</sup>), επιβεβαιώθηκε η δράση του BNN237, που είχε ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του υπολείμματος της **τυροσίνης-490** του υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίησή του. Επιπλέον, το ανάλογο BNN237, μιμείται τη δράση του NGF, καθώς επάγει τη φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης 674/675 και 785 του υποδοχέα σε κυτταρικές σειρές CHO<sup>TrkA</sup> (Εικόνα **3.1B**). Αντίθετα, φωσφορυλίωση της τυροσίνης-490 δεν παρατηρήθηκε, όταν χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές CHO, επιμολυσμένες με τα cDNAs των υποδοχέων TrkB και TrkC, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το ανάλογο αυτό δεν προσδένεται σε αυτούς τους υποδοχείς.

Με σκοπό να εξετασθεί η ικανότητα πρόσδεσης του BNN237 στον υποδοχέα p75<sup>NTR</sup> πραγματοποιήθηκαν πειράματα, κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε [<sup>3</sup>H]-DHEA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το BNN237

αντικαθιστά αποτελεσματικά την [ $^3\text{H}$ ]-DHEA, η οποία είναι προσδεμένη σε μεμβράνες που έχουν απομονωθεί από κυτταρικές σειρές HEK293<sup>p75<sup>NTR</sup></sup> ( $K_i = 14 \pm 0.01$  nM) (Εικόνα 3.1A). Τέλος, διαπιστώθηκε η ικανότητα του BNN237, ύστερα από πρόσδεσή του στον υποδοχέα p75<sup>NTR</sup>, να επάγει την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης RIP2 (Εικόνα 3.1C).

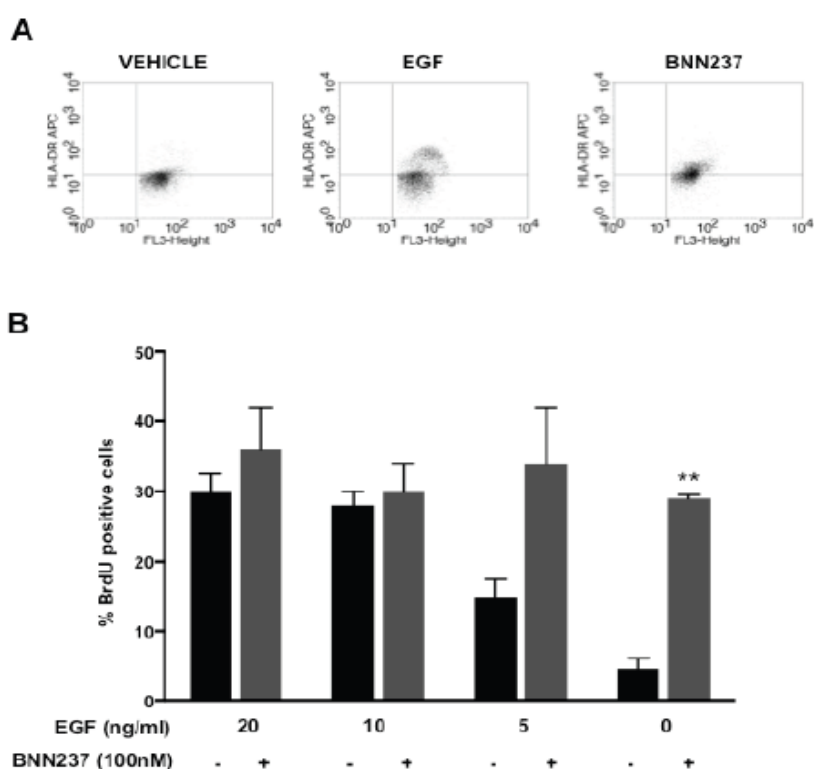


**Εικόνα 3.1:** Το BNN237 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς TrkA και p75<sup>NTR</sup> σε συγκέντρωση nanomolar.

**3.2.2 Το BNN237 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών (Neural Stem)/προγονικών νευρικών (Neural Progenitors) κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης του εγκεφάλου μετά από 48 ώρες πλήρους απουσίας EGF.**

Με σκοπό να διερευνηθούν οι πιθανές επιδράσεις του BNN237 στον πολλαπλασιασμό των προγονικών νευρικών κυττάρων (NPCs), χρησιμοποιήθηκαν, σε συνδυασμό με το μόριο προς εξέταση, μιτογόνα, όπως

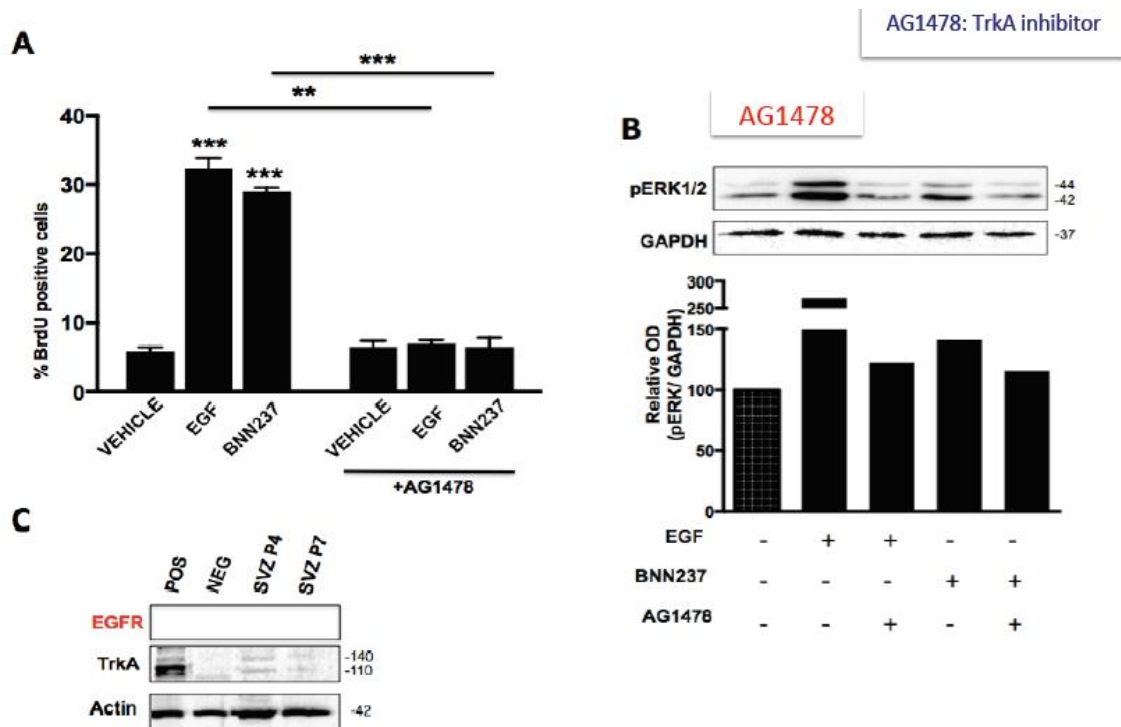
EGF ή/και FGF σε υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις. Έτσι, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν αρχικά για 15 ώρες, παρουσία του EGF και στη συνέχεια ακολούθησε κατεργασία με 100 nM του BNN237, μαζί με συγκέντρωση του EGF, η τιμή της οποίας κυμαινόταν σε: 20, 10, 5 και 0 ng/mL. Τέσσερις ώρες πριν το τέλος της κατεργασίας, προστέθηκε στις καλλιέργειες ανάλογο BrdU (10 nM). Όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς μειωνόταν η συγκέντρωση του EGF, τόσο μικρότερος ήταν και ο αριθμός των BrdU θετικών κυττάρων. Ωστόσο, ύστερα από 48 ώρες θεραπείας με το ανάλογο BNN237, παρατηρήθηκε εκπληκτικά αυξημένος ο αριθμός των BrdU θετικών κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις του EGF, με ιδιαίτερα σημαντικότερη την περίπτωση μηδενικής συγκέντρωσής του ( $29.0 \pm 0.5$ ,  $**P < 0.01$ ).



**Εικόνα 3.2:** Επίδραση του BNN237 στον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών (Neural Stem)/προγονικών νευρικών (Neural Progenitors) κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης του εγκεφάλου. **A.** Ανάλυση κυτταρομετρίας Ροής των BrdU-APC των SVZ NS/NPs ύστερα από 48 ώρες **B.** Ποσοστό των BrdU-APC+/7-AAD ύστερα από κατεργασία με BNN237, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του EGF.

### 3.2.3 Παρουσία ειδικού αναστολέα του EGFR, AG1478, ακυρώνεται η επίδραση του BNN237 στα NSCs.

Ακολούθησαν πειράματα με προσθήκη αναστολέα του υποδοχέα EGF σε συγκέντρωση 2ng/mL δύο ώρες πριν ακολουθηθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία του αναστολέα του EGFR, το ανάλογο BNN237 δεν είναι ικανό να επιφέρει σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των NSCs. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή του υποδοχέα EGF, κατά την μεταγωγή σήματος που επάγεται, ως αποτέλεσμα της δράσης του αναλόγου BNN237 στον υποδοχέα TrkA. Ακολουθώντας αυτό το σκεπτικό, προχώρησαν σε δοκιμές, με σκοπό να ερευνήσουν εάν το μόριο αυτό θα μπορούσε να επάγει τη φωσφορύλιωση της ERK1/2. Τόσο ο EGF, όσο και το BNN237 έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιήσουν αυτή την κίνηση, γεγονός που άρεται παρουσία του αναστολέα του EGFR. Καθίσταται επομένως πολύ πιθανό, το BNN237 να ενεργοποιεί τον υποδοχέα TrkA, επάγοντας αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς EGF.

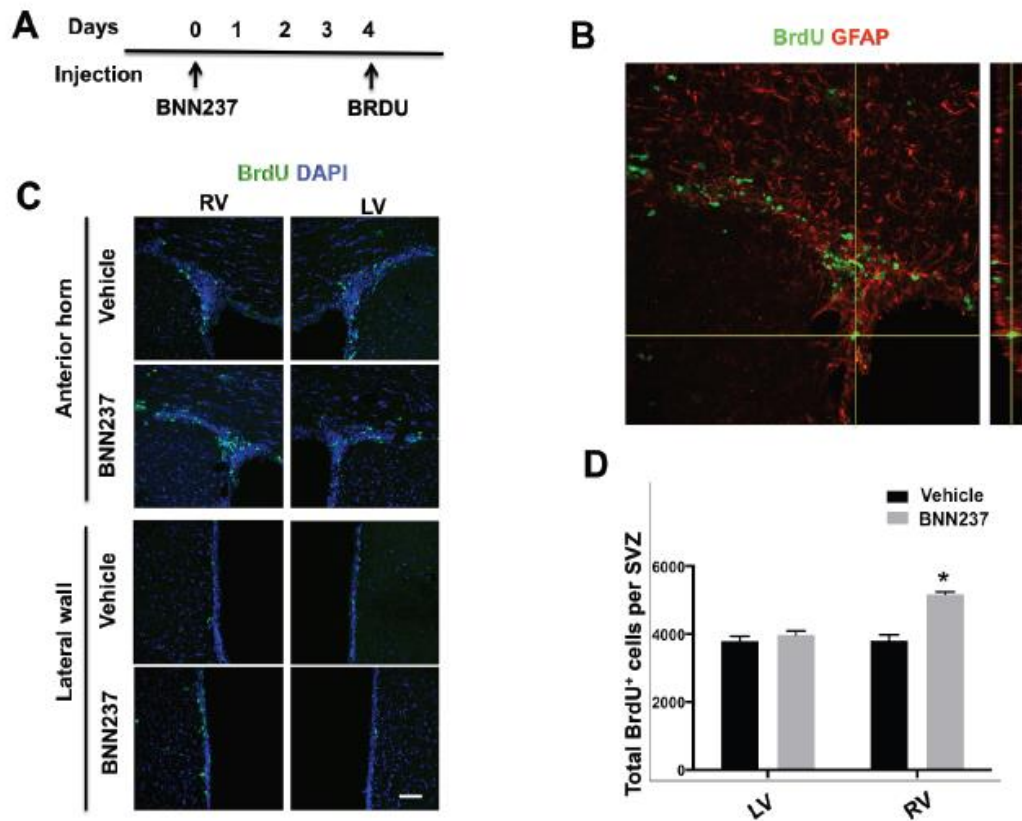


**Σχήμα 3.1:** Αναίρεση του φαινομένου νευρογένεσης του BNN237 στον πολλαπλασιασμό των SVZ NS/NPs, παρουσία αναστολέα του EGFR.

### **3.2.4 Το BNN237 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των SVZ NS/NPs *in vivo*.**

Βασιζόμενοι στα παραπάνω ενθαρρυντικά αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων, η ομάδα του Καθ. Α. Γραβάνη και Επ. Καθ. Ιωάννη Χαραλαμπόπουλου προχώρησαν σε *in vivo* μελέτες. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μεμονωμένη στερεοτακτική έγχυση του BNN237 ή μέσου (1:100 DMSO) στη δεξιά κοιλία ενός νέου ενήλικα και ενός 2 μηνών, αρσενικών B6 ποντικών, και ακολούθησε μετά από πέντε μέρες, ενδοπεριτοναϊκή έγχυση με 100 mg/mL BrdU, 6 ώρες πριν από την υποκοιλιακή διάχυση (Σχήμα **3.2A**). Ο όγκος, με τον οποίο εμβολιάστηκαν και στις δύο περιπτώσεις ήταν 3.5  $\mu$ L. Η συγκέντρωση του BNN237, με την οποία εμβολιάστηκαν τα ζώα ήταν  $10^{-4}$ M, ώστε η τελική συγκέντρωση στην εγκεφαλική κοιλία να ήταν  $10^{-5}$ M, εφόσον ο όγκος του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στην εγκεφαλική κοιλία των ποντικών είναι περίπου 35  $\mu$ L. Ακολούθησε επιπλέον, προσθήκη χρωστικής, ώστε να είναι εφικτή η παρατήρησή τους στα χρησιμοποιούμενα όργανα. Η παρουσία της χρωστικής ήταν εμφανής στη δεξιά κοιλία-εμβολιασμένη με το ανάλογο- σε αντίθεση με την αριστερή κοιλία.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αριθμός των BrdU θετικών κυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερος στο δεξί τμήμα, που είχε εμβολιαστεί με το ανάλογο BNN237, συγκρινόμενα με το αρχικό μη εμβολιασμένο (Σχήμα **3.2B**). Γίνεται επομένως κατανοητό ότι η επίδραση του μορίου είναι τοπική, παρά το γεγονός ότι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό μεταφέρεται και στα δύο τμήματα του εγκεφάλου. Στο Σχήμα **3.2C** τα BrdU θετικά κύτταρα παρουσιάζονται πιο έντονα.

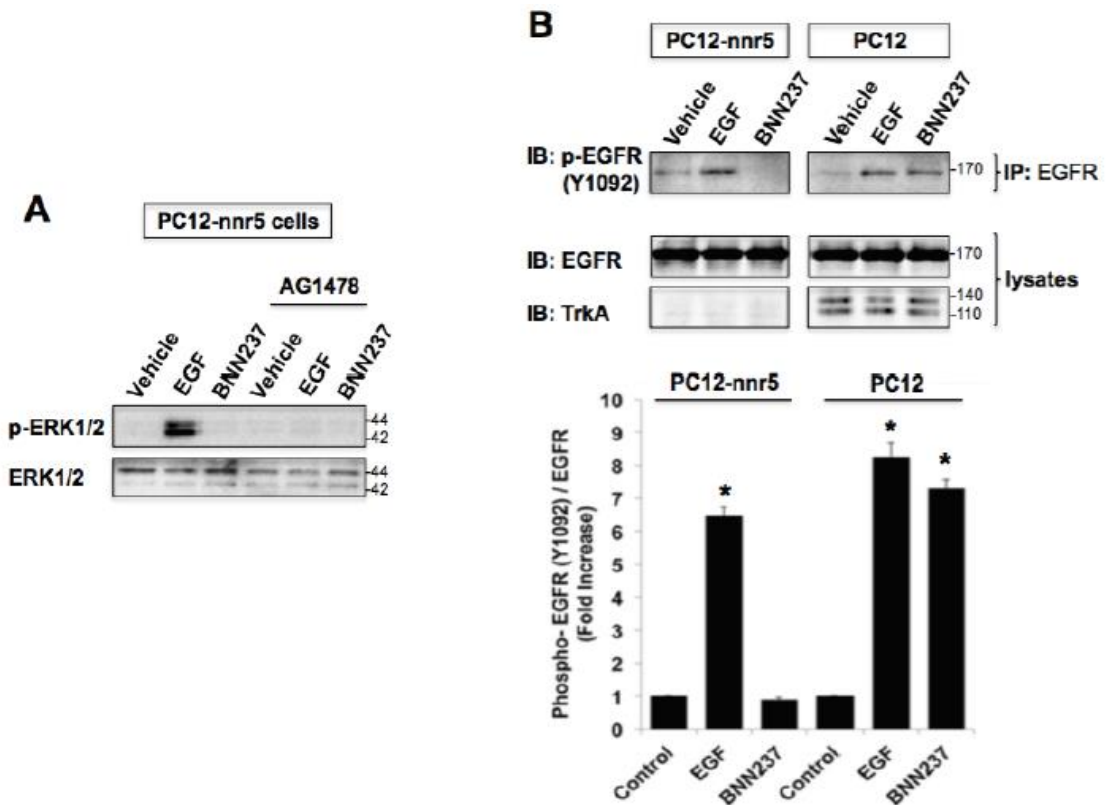


**Σχήμα 3.2:** *In vivo* επίδραση του BNN237 στον πολλαπλασιασμό των ενδογενών νευρικών βλαστικών (Neural Stem)/προγονικών νευρικών (Neural Progenitors) κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης του εγκεφάλου.

### 3.2.5 Το BNN237 ενεργοποιεί τους υποδοχείς EGF, μέσω μηχανισμού που παρεμβάλλει ο υποδοχέας TrkA.

Στο πλαίσιο αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές PC12 και PC12-nnr5. Γνωρίζοντας ότι το BNN237 συνδέεται ειδικά και ενεργοποιεί τον υποδοχέα TrkA, καθώς και ότι τα SVZ/NSCs εκφράζουν τόσο τον TrkA, όσο και τον EGFR, επιδιώχθηκε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση αυτών των μονοπατιών. Είναι γνωστό ότι τα PC12 κύτταρα εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς, ενώ ο κλώνος PC12-nnr5 της κυτταρικής σειράς PC12, δεν εκφράζει τον υποδοχέα TrkA. Ύστερα από διέγερση των PC12-nnr5 με 100nM BNN237 ή 20ng/ml EGF για 15min, ο EGF προκαλεί τη φωσφορυλίωση της ERK, μέσω μηχανισμού που σχετίζεται με τον EGFR, φαινόμενα τα οποία αναιρέθηκαν παρουσία του αναστολέα του EGFR, AG1478. Ωστόσο, το BNN237 δεν ήταν ικανό να ενεργοποιήσει τη σηματοδότηση της ERK σε αρνητικά κύτταρα PC12-nnr5 ως προς τον TrkA,

γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ανάλογο αυτό δεν μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα τον EGFR. Τέλος, ύστερα από δοκιμή που πραγματοποιήθηκε σε PC12-nnr5 κύτταρα, παρουσία BNN237 και EGF, παρατηρήθηκε επαγωγή της φωσφορυλίωσης της ERK από τον EGF, μέσω μηχανισμού σχετιζόμενου με τον EGFR. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση του EGFR από το BNN237 απαιτεί την παρουσία του υποδοχέα TrkA.



Σχήμα 3.3: Πιθανός μηχανισμός δράσης του BNN237.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας και με σκοπό την μελέτη σχέσεων δομής-δραστικότητας συντέθηκαν δύο σειρές νέων 17-σπειρανικών αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης και ειδικότερα μία σειρά 2,6-διϋδροπυρανικών και 2,5-διϋδροφουρανικών αναλόγων, καθώς επίσης και μία σειρά σπειροκυκλοπροπανικών αναλόγων. Αντιδράσεις-κλειδί για τη σύνθεση των 17-σπειρανικών ετεροκυκλικών δακτυλίων ήταν η ολεφινική και ενυνική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου, καταλυόμενες από καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς, καθώς επίσης και η αντίδραση κυκλοπροπανίωσης Simmons-Smith.

Ειδικότερα, η βιολογική αποτίμηση της ένωσης **5** (BNN237) έδειξε ότι το ανάλογο αυτό:

- Συνδέεται εκλεκτικά και φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα TrkA, επάγοντας την ενεργοποίησή του ( $K_i = 19 \pm 0.06$  nM)
- Ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια ύστερα από την πρόσδεσή του στον υποδοχέα p75<sup>NTR</sup> ( $K_i = 14 \pm 0.01$  nM)
- Εμφανίζει νευροπροστατευτική δράση και επάγει τη νευρογένεση *in vitro* και *in vivo*
- Δεν εμφανίζει οιστρογονική ή ανδρογονική δράση.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **4.1 Όργανα και διατάξεις**

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ ) ελήφθησαν σε φασματογράφους Varian 300 και 600 MHz. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένος διαλύτης  $\text{CDCl}_3$ . Οι σταθερές σύζευξης (J) εκφράζονται σε Hz, ενώ τα σύμβολα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή της πολλαπλότητας των κορυφών είναι: (s) απλή, (bs) ευρεία απλή, (d) διπλή, (dd) διπλή διπλών, (ddd) διπλή διπλών διπλών, (t) τριπλή και (m) πολλαπλή.

Τα φάσματα μάζας HR-MS ελήφθησαν σε φασματογράφο μάζας UHPLC-MS<sup>n</sup> Orbitrap Velos Thermo και ο ιονισμός των ουσιών έγινε είτε μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού (ESI) είτε μέσω της τεχνικής χημικού ιονισμού (APCI).

#### **4.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας**

Για τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες επιστρωμένες με γέλη πυριτίου και φθορίζον υλικό  $\text{F}_{254}$ . Η εμφάνιση των κηλίδων έγινε με: α) έκθεση σε υπεριώδες φως, β) ψεκασμό με διάλυμα φωσφομολυβδαινικού αμμωνίου (PMA) και θέρμανση πλάκας.

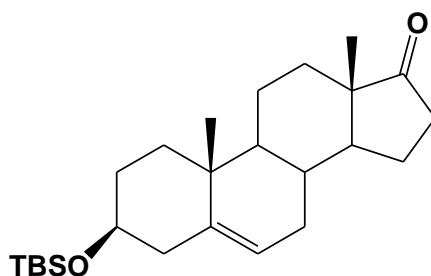
Ο χρωματογραφικός καθαρισμός των ενώσεων επιτεύχθηκε με χρήση χρωματογραφίας υπό πίεση και υλικού πλήρωσης silica gel (200-400 mesh).

#### **4.3 Αντιδραστήρια και διαλύτες**

Σε όλες τις συνθετικές πορείες χρησιμοποιήθηκαν χημικώς καθαρά αντιδραστήρια, τα οποία ήταν εμπορικά προϊόντα των εταιρειών Aldrich, Fluka και Merck, καθαρότητας  $\geq 98\%$ . Επίσης, η απομάκρυνση της υγρασίας από τους διαλύτες έγινε με απόσταξη τους υπό αργό (το τετραϋδροφουράνιο καθώς και ο διαιθυλαιθέρας αποστάζονται από νάτριο παρουσία βενζοφαινόνης, ενώ το διχλωρομεθάνιο από υδρίδιο του ασβεστίου). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό αδρανείς συνθήκες.

#### 4.4 Πειραματικές Μέθοδοι

##### 3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-όνη (1)



Σε διάλυμα δεϋδροεπιανδροστερόνης (5.0 g, 17.3 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (53 mL) προστίθεται στους 0 °C ιμιδαζόλιο (3.5 g, 5.19 mmol) και ιώδιο (13.2 g, 51.9 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη *t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωριδίου (2.8 g, 19.0 mmol) και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου επί 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται διαδοχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα θειοθειικού νατρίου και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **1** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 9:1).

**Απόδοση:** 6.8 g (97%)

**Σ.Τ.:** 147-149 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : 13.80° ( $c = 1.000$  g/mL, ακετόνη)

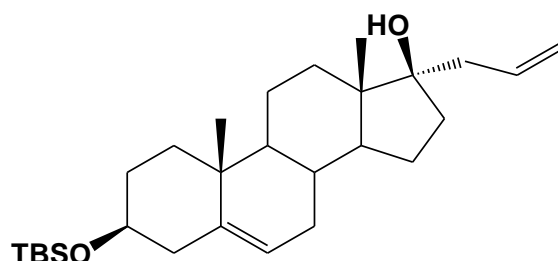
**R<sub>f</sub>:** 0.59, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 9:1

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 425.2846, ευρεθέν 425.2846.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.87 (s, 3H), 0.88 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.02 (s, 3H), 1.29 (dd,  $J = 4.78$  Hz, 12.65, 1H), 1.40-2.30 (m, 16H), 2.45 (dd,  $J = 8.79, 19.05$  Hz, 2H), 3.42-3.53 (m, 1H, 3α-H), 5.3 (d,  $J = 5.25$  Hz, 1H, 6-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.7, 18.4, 19.6, 20.5, 22.0, 26.1, 31.0, 31.6, 31.7, 32.1, 36.0, 36.9, 37.4, 42.9, 47.7, 50.5, 51.9, 72.6, 120.5, 141.9, 221.3.

### 3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπυλο-5-ανδροστεν-17β-όλη (2)



Σε διάλυμα της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-όνης (**1**) (1 g, 2,48 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (6 mL) προστίθεται στους 0 °C διάλυμα αλλυλομαγνησιοβρωμιδίου (1.0 M σε διαιθυλαιθέρα, 3.4 mL, 19.1 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **2** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

**Απόδοση:** 1.02 g (97%)

**Σ.Τ.:** 102-104 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -68.57 ° ( $c = 0.175$  g/L, χλωροφόρμιο)

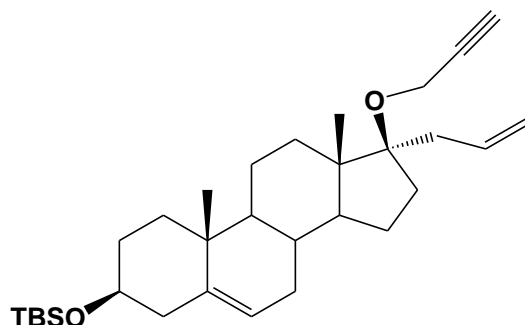
**R<sub>f</sub>:** 0.34, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 95:5

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 467.3316, ευρεθέν 467.3315.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.90 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.09-2.34 (m, 22H), 3.42-3.53 (m, 1H, 3α-H), 5.13 (bs, 1H, 22-H), 5.18-5.21 (m, 1H, 22-H), 5.30 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, 6-H), 5.92-6.06 (m, 1H, 21-H).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 14.4, 18.3, 19.6, 20.8, 24.0, 26.1, 31.8, 31.9, 32.2, 32.9, 35.1, 36.8, 37.6, 41.9, 42.9, 46.1, 50.4, 51.1, 72.7, 82.5, 119.2, 121.0, 135.0, 141.7.

**3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπ-2-υλο-17β-(προπ-2-  
υνυλοξυ)-ανδροστ-5-ένιο (3)**



Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται το υδρίδιο του καλίου (30% σε ορυκτέλαιο, 94 mg, 0.7 mmol), το οποίο εκπλένεται με άνυδρο εξάνιο (3x4.0 mL). Ακολουθεί προσθήκη άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (2.0 mL) και στη συνέχεια προσθήκη διαλύματος της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπυλο-5-ανδροστέν-17β-όλης (**2**) (30 mg, 0.07 mmol) σε 1 mL άνυδρο τετραϋδροφουράνιο και το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα στους 80 °C. Στη συνέχεια, το μίγμα αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί προσθήκη του προπαργυλοβρωμιδίου (39 μL, 0.35 mmol) σε 1.0 mL άνυδρου τετραϋδροφουρανίου. Το προκύπτον μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C για 12 ώρες, πραγματοποιείται έλεγχος της αντίδρασης με TLC και παρατηρείται μη κατανάλωση των αντιδρώντων, οπότε η αντίδραση διακόπτεται. Αρχικά, προστίθεται στους 0 °C στάγδην νερό και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **3** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 97:3).

**Απόδοση:** 6.0 mg (24%)

**R<sub>f</sub>:** 0.86, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /διαιθυλαιθέρας 9:1

**Σ.Τ.:** 95-97 °C

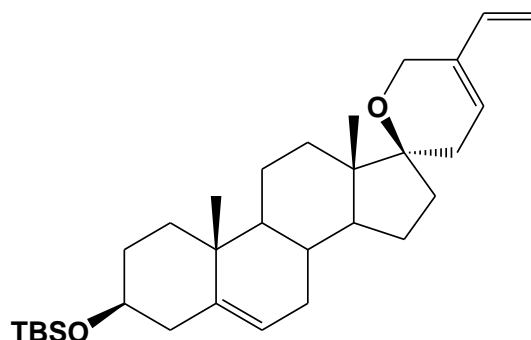
**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** -54.35 ° (c = 0.092 g/L, χλωροφόρμιο)

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 505.3600, ευρεθέν 505.3469.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.88 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.96 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.6-2.26 (m, 20H), 2.37 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, 25-H), 2.68 (dd, *J* = 15.5, 5.5 Hz, 1H, 20H), 3.41-3.51 (m, 1H, 3α-H), 4.11 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, 23-H), 5.11 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, 22-H), 5.15 (s, 1H, 22-H), 5.29 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, 6-H), 5.86-6.00 (m, 1H, 21-H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  -4.4, 14.2, 18.4, 19.6, 21.1, 23.7, 26.1, 31.9, 32.2, 32.7, 33.9, 34.4, 36.5, 36.8, 37.5, 42.9, 46.9, 50.1, 51.9, 52.4, 72.7, 73.3, 81.1, 88.9, 117.7, 121.0, 134.7, 141.7.

**(17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-αιθενυλο-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυράνιο] (4)**



Σε διάλυμα του 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπ-2-υλο-17β-(προπ-2-υλοξυ)ανδροστ-5-ένιου (**3**) (76 mg, 0.16 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (2.6 mL) προστίθεται, μετά από απαέρωση, καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (6.8 mg, 0.008 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) εξατμίζεται ο διαλύτης υπό κενό. Το προϊόν **4** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης πεντάνιο/διαιθυλαιθέρας 98:2).

**Απόδοση:** 14.0 mg (**18%**)

**Σ.Τ.:** 89-91 °C

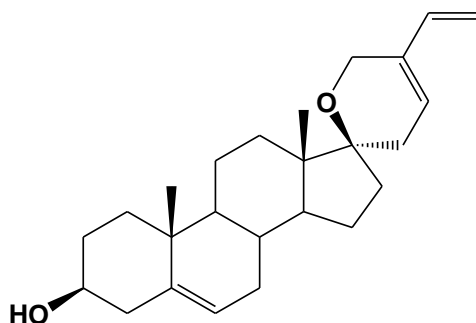
**R<sub>f</sub>:** 0.47, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 9:1

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 505.3472, ευρεθέν 505.3468.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.92 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.21-2.28 (m, 20H), 2.47 (d, *J*= 18.0 Hz, 1H, 23-H), 3.45-3.50 (m, 1H, 3α-H), 4.29, 4.38 (AB<sub>q</sub>, *J*<sub>AB</sub>= 15.7 Hz, 2H, 20-H), 4.86 (d, *J*= 10.9 Hz, 1H), 4.91 (d, *J*= 3.9 Hz, 1H), 5.31 (d, *J*= 5.3 Hz, 1H, 6-H), 5.79 (bs, 1H, 22-H), 6.25 (dd, *J*= 17.9, 11.1 Hz, 1H, 24-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.7, 18.4, 19.6, 21.1, 23.5, 26.1, 31.9, 32.2, 32.7, 33.3, 33.8, 36.9, 37.6, 42.9, 45.9, 50.3, 51.5, 53.6, 62.9, 72.7, 83.5, 110.5, 121.0, 125.6, 134.4, 135.9, 141.8.

**(17,2'*R*)-5'-αιθενυλο-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν]-3β-όλη (5)**



Σε διάλυμα του (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-αιθενυλο-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυρανίου] (**4**) (174.0 mg, 0.36 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (10.8 mL) προστίθεται στους 0 °C υδροφθορική πυριδίνη (63.0 mL, 3.60 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), το μίγμα αραιώνεται με νερό υπό ψύξη και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **5** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/δισαιθυλαιθέρας 75:25).

**Απόδοση:** 131.0 mg (**98%**)

**Σ.Τ.:** 134-136 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -46.67 ° (*c* = 0.15 g/L, χλωροφόρμιο)

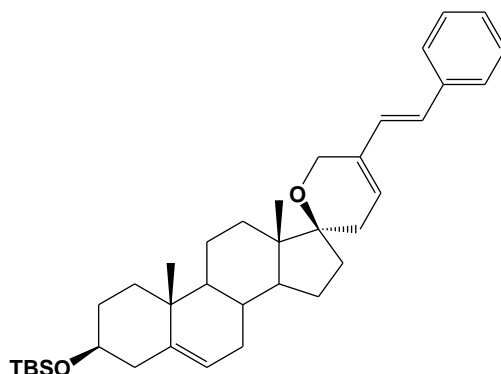
**R<sub>f</sub>:** 0.09, εξάνιο/ δισαιθυλαιθέρας 75:25

**HRMS (APCI):** υπολογισθέν για C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 369.2788, ευρεθέν 369.2794.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.92 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.05-2.32 (m, 22H), 2.45 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, 23-H), 3.45-3.56 (m, 1H, 3α-H), 4.29, 4.38 (AB<sub>q</sub>, *J*<sub>AB</sub> = 16.5 Hz, 2H, 20H), 4.86 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, 25-H), 4.91 (d, *J* = 4.1, 1H, 25-H), 5.34 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, 6-H), 5.78 (bs, 1H, 22-H), 6.25 (dd, *J* = 17.8, 11.2 Hz, 1H, 24-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 13.71, 19.55, 21.04, 23.48, 31.79, 31.86, 31.97, 32.68, 33.27, 33.73, 36.71, 37.42, 42.42, 45.90, 50.24, 51.46, 62.85, 71.90, 83.53, 110.50, 121.49, 125.51, 134.41, 135.94, 140.99.

**(17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-2' [αιθυλενο(8'-φαινυλο)σπειρο][5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)πυράνιο] (6)**



Σε διάλυμα του 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπ-2-υλο-17β-(προπ-2-υνυλοξυ)ανδροστ-5-ένιου (**3**) (120 mg, 0.25 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (4 mL) προστίθεται, μετά από απαέρωση, καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (21.0 mg, 0.025 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 6 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) εξατμίζεται ο διαλύτης υπό κενό. Το προϊόν **6** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης εξάνιο/διαιθυλαιθέρας 93:7). Επίσης απομονώθηκε και η ένωση **4** (19%).

**Απόδοση:** 7.0 mg (5%)

**R<sub>f</sub>:** 0.58, εξάνιο/διαιθυλαιθέρας 9:1

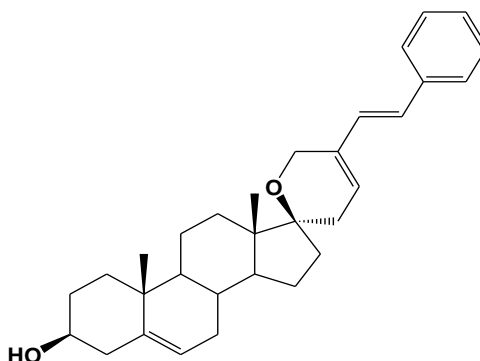
**HRMS (APCI):** υπολογισθέν για C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>O<sub>2</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 559.3966, ευρεθέν 559.3970.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.95 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.18-2.56 (m, 21H), 3.42-3.53 (m, 1H, 3α-H), 4.44, 4.51 (AB<sub>q</sub>, J<sub>AB</sub> = 15.2 Hz, 2H), 5.31 (d, J = 5.1 Hz, 1H, 6-H), 5.93 (bs, 1H, 22-H), 6.23 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 7.18-7.39 (m, 5H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.7, 18.4, 19.6, 21.0, 23.5, 26.1, 31.9, 32.2, 32.7, 33.4, 33.9, 36.8, 37.6, 42.9, 45.9, 50.3, 51.6, 63.2, 72.7, 83.6, 120.9, 125.1, 126.3, 127.4, 128.0, 128.7, 134.2, 137.5, 141.8.



**(17,2'*R*)-3β-υδροξυ-2'-[αιθυλενο(8'-φαινυλο)σπειρο][5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)-πυράνιο] (7)**



Σε διάλυμα του (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-2'-[αιθυλενο(8'-φαινυλο)σπειρο][5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)πυράνιου] (**6**) (7.0 mg, 0.36 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (0.4 mL) προστίθεται στους 0 °C υδροφορική πυριδίνη (2.0 mL, 0.11 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), το μείγμα αραιώνεται με νερό υπό ψύξη και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **7** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/ οξικός αιθυλεστέρας 60:40).

**Απόδοση:** 1.6 mg (33%)

**Σ.Τ.:** 206-208 °C

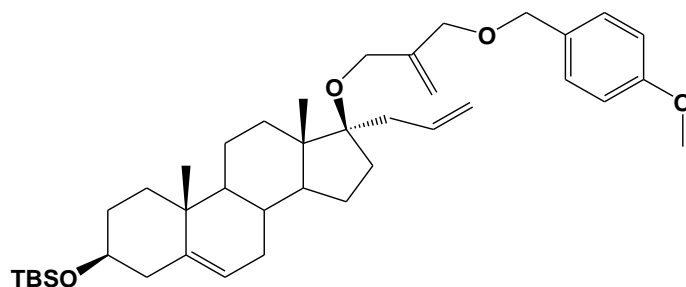
$[\alpha]_D^{20}$ : -25.00 ° (*c* = 0.2 g/L, χλωροφόρμιο)

**R<sub>f</sub>:** 0.58, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / οξικός αιθυλεστέρας 60:40

**HRMS (APCI):** υπολογισθέν για C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 445.3101, ευρεθέν 445.3105.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.95 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.18-2.56 (m, 23H), 3.50-3.55 (m, 1H, 3α-H), 4.44, 4.51 (AB<sub>q</sub>, *J*<sub>AB</sub> = 15.6 Hz, 2H), 5.35 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, 6-H), 5.93 (bs, 1H, 22-H), 6.24 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 7.18-7.39 (m, 5H).

**3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπ-2-υλο-17β-[2-μεθυλ(αλλυλοξυ)μεθυλο(*p*-μεθοξυβενζυλο)]-ενυλοξυ-ανδροστ-5-ένιο (8)**



Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται υδρίδιο του καλίου (30% σε ορυκτέλαιο, 94 mg, 0.7 mmol), το οποίο εκπλένεται με άνυδρο εξάνιο σε συσκευή υπερήχων (3×2 mL). Ακολουθεί προσθήκη άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (2 mL) και στη συνέχεια στάγδην προσθήκη διαλύματος της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπυλο-5-ανδροστεν-17β-όλης (**2**) (30 mg, 0.07 mmol) σε 1 mL άνυδρου τετραϋδροφουρανίου και το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα στους 55 °C και αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη διαλύματος ((2-(βρωμομεθυλο)αλλυλοξυ)μεθυλο)*p*-μεθοξυβενζολίου (**13**) (93 mg, 0.35 mmol) σε 2 mL άνυδρου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα θερμαίνεται στους 60 °C για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), προστίθεται στάγδην στους 0 °C νερό και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **8** λαμβάνεται υπο την μορφή ελαίου, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 99:1).

**Απόδοση:** 39.6 mg (**89%**)

$[\alpha]_D^{20}$ : -68.38 ° ( $c = 0.117$  g/L, χλωροφόρμιο)

$R_f$ : 0.73, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 9:1

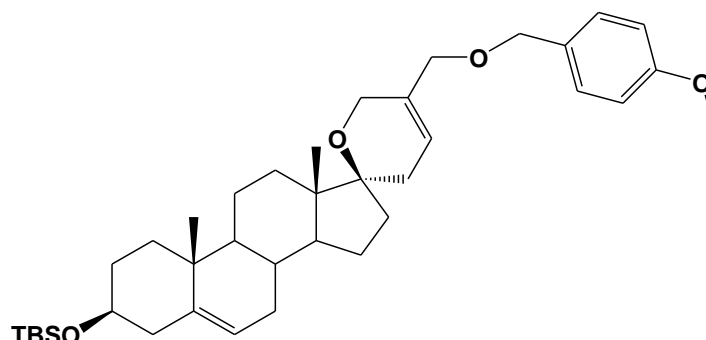
**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για  $C_{40}H_{62}O_4SiNa$   $[M+Na]^+$  657.4310, ευρεθέν 657.4312.

**$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):** δ 0.06 (s, 6H,  $Si(CH_3)_2$ ), 0.89 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 0.92 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.16-2.28 (m, 21H), 2.76 (dd,  $J = 15.3, 4.9$  Hz, 1H, 20H), 3.45-3.50 (m, 1H, 3α-H), 3.80 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.94-3.99 (m, 2H, 23-H), 3.99-4.03 (m, 2H, 26-H), 4.39-4.43 (m, 2H, 27-H), 5.08 (s, 1H, 22-H), 5.10 (s, 1H, 22-H), 5.13 (s, 1H, 25-H), 5.31 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, 6-H), 5.86-5.93 (m, 1H, 21-H), 6.87 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):** δ -4.4, 14.1, 18.4, 19.6, 21.1, 23.8, 26.1, 31.9, 32.2, 32.8, 34.1, 34.5, 36.6, 36.8, 37.6, 42.9, 46.9, 50.2, 52.4, 55.4, 63.9,

71.2, 71.7, 72.8, 87.6, 113.5, 114.0, 117.2, 121.8, 129.5, 130.6, 135.3, 141.7,  
143.7, 159.3.

**(17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-(*p*-μεθοξυβενζυλομεθυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυράνιο] (9)**



Σε διάλυμα του 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-προπ-2-υλο-17β-[2-μεθυλ(αλλυλοξυ)μεθυλο(*p*-μεθοξυβενζυλο)]-ενυλοξυ-ανδροστ-5-ένιου (**8**) (26 mg, 0.04 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (1 mL) προστίθεται, μετά από απαέρωση, καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (1.7 mg, 0.002 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και στη συνέχεια στους 40 °C για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **9** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 98:2).

**Απόδοση:** 22.8 mg (94%)

**Σ.Τ.:** 95-97 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -108.43 ° (*c* = 0.083 g/L, χλωροφόρμιο)

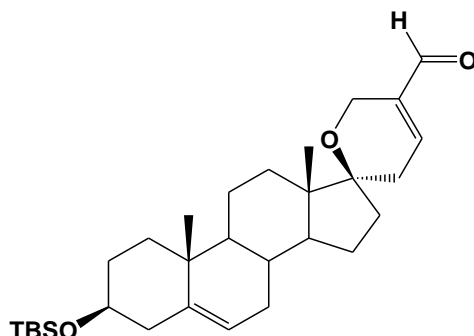
**R<sub>f</sub>:** 0.47, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 9:1

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>38</sub>H<sub>59</sub>O<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 607.4177, ευρεθέν 607.4189, υπολογισθέν για C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>O<sub>4</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 629.3997, ευρεθέν 629.4006.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.91 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.55-2.43 (m, 22H), 3.42-3.53 (m, 1H, 3α-H), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 2H, 24-H), 4.15-4.27 (m, 2H, 20-H), 4.39 (s, 2H, 25-H), 5.31 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, 6-H), 5.75 (bs, 1H, 22-H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.8, 14.3, 18.4, 19.6, 21.0, 22.8, 23.5, 26.1, 29.8, 31.2, 31.9, 32.2, 32.7, 33.2, 33.5, 36.8, 37.6, 42.9, 46.0, 50.3, 51.4, 64.2, 71.0, 71.3, 72.8, 83.3, 113.9, 120.9, 121.9, 129.4, 130.5, 133.8, 141.8, 159.3.

**(17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν-5'-άλη] (10)**



Σε διάλυμα (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-(*p*-μεθοξυβενζυλομεθυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυρανίου] (**9**) (165 mg, 0.27 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (2.70 mL) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.0 (1.0 mL) προστίθεται 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη (202.5 mg, 0.95 mmol) και το μίγμα αναδεύεται έντονα υπό ατμόσφαιρα Ar για 12 ώρες (παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από πράσινο σε ροζ). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **10** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία σήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1).

**Απόδοση:** 106.0 mg (81%)

**Σ.Τ.:** 155-157 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -32.72 ° ( $c = 0.275$  g/L, χλωροφόρμιο)

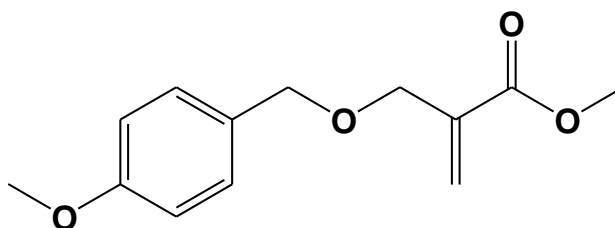
**R<sub>f</sub>:** 0.63, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 85:15

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 507.3265, ευρεθέν 507.3272.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.93 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.17-2.29 (m, 20H), 2.63, 2.66 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 2.3$  Hz, 1H, 23-H), 3.45-3.50 (m, 1H, 3α-H), 4.35, 4.46 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 17.1$  Hz, 2H, 20-H), 5.31 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, 6-H), 6.89 (t,  $J = 3.9$  Hz, 1H, 22-H), 9.41 (s, 1H, CHO).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.6, 14.3, 18.4, 19.6, 20.9, 23.5, 26.1, 29.9, 31.9, 32.2, 32.7, 32.9, 33.4, 34.1, 36.8, 37.6, 42.9, 46.1, 50.3, 51.7, 60.9, 72.7, 83.7, 120.8, 140.0, 141.9, 147.1, 191.7.

**[(*p*-Μεθοξυβενζυλο)μεθυλο]ακρυλικός μεθυλεστέρας (11)**



Σε διάλυμα του (υδροξυμεθυλο)ακρυλικού μεθυλεστέρα (1.00 g, 8.6 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (16.8 mL) προστίθεται καμφοροσουλφονικό οξύ (199.6 mg, 0.86 mmol) και στη συνέχεια τριχλωροακετιμίδιο της *p*-μεθοξυβενζυλικής αλκοόλης (3.64 g, 12.90 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη. Το προϊόν **11** λαμβάνεται υπό την μορφή ελαίου, μετά από διήθηση του υπολείμματος μέσω Celite με 2% οξικό αιθυλεστέρα/ πετρελαϊκό αιθέρα 40-60 °C και εξάτμιση υπό κενό.

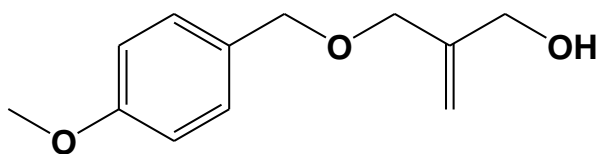
**Απόδοση:** 1.88 g (86%)

**R<sub>f</sub>:** 0.60, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 85:15

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 259.0941, ευρεθέν 259.0936.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.21 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 5.92 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H).

**[(*p*-Μεθοξυβενζυλο)μεθυλο]ακρυλική αλκοόλη (12)**



Διάλυμα του [(*p*-μεθοξυβενζυλο)μεθυλο]ακρυλικού μεθυλεστέρα (**11**) (1.88 g, 7.95 mmol) σε άνυδρο διαιθυλαιθέρα (64.4 mL) ψύχεται στους -78 °C. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη του διίσοβουτυλοαργιλίου υδριδίου (23.85 mL, 23.85 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στους -78°C για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), προστίθεται υδατικό διάλυμα άλατος Rochelle και οξικός αιθυλεστέρας, και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, ξήρανση της οργανικής στιβάδας υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν **12** λαμβάνεται υπό την μορφή ελαίου, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/ οξικός αιθυλεστέρας 85:15).

**Απόδοση:** 1.40 g (84%)

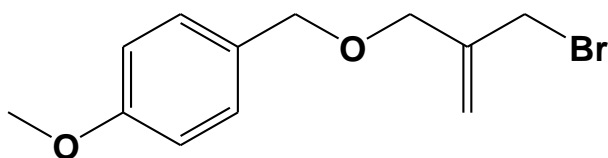
**R<sub>f</sub>:** 0.59, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / οξικός αιθυλεστέρας 90:10

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 231.0992, ευρεθέν 231.0987.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.07 (s, 2H), 4.19 (d, *J*= 5.9 Hz, 2H), 4.45 (s, 2H), 5.14 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 6.88 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H), 7.26 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 55.21, 64.09, 71.22, 71.84, 113.11, 113.80, 129.38, 130.03, 145.18, 159.22.

**[(2-(Βρωμομεθυλο)αλλυλοξυ)μεθυλο]p-μεθοξυβενζόλιο (13)**



Σε διάλυμα της [(p-μεθοξυβενζυλο)μεθυλο]ακρυλικής αλκοόλης (**12**) (800 mg, 3.84 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (74 mL) στους -5 °C προστίθεται τριφαινυλοφωσφίνη (2 g, 7.68 mmol) και ακολούθως στάγδην διάλυμα τετραβρωμομεθανίου (2.5 g, 7.68 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (30 mL) και το μίγμα αναδεύεται στους -5 °C για 5 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) συμπυκνώνεται ο διαλύτης. Το προϊόν **13** λαμβάνεται υπό την μορφή ελαίου, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/ διαιθυλαιθέρα 95:5).

**Απόδοση:** 866 mg (**87%**)

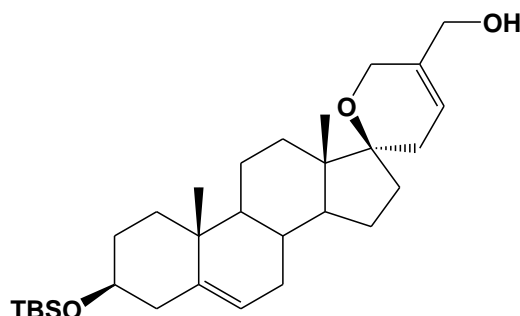
**R<sub>f</sub>:** 0.79, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 75:25

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 293.0148, ευρεθέν 293.0146.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.04 (s, 2H), 4.12 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 5.25 (s, 1H), 5.34 (s, 1H), 6.89 (d, J= 8.6 Hz, 2H), 7.27 (d, J= 8.8 Hz, 2H).



**(17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν-5'-όλη] (14)**



Σε διάλυμα του (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-(*p*-μεθοξυβενζυλομεθυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυρανίου] (**9**) (158 mg, 0.26 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (2.6 mL) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.0 (0.95 mL) προστίθεται 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη (118.04 mg, 0.52 mmol) και το μίγμα αναδεύεται έντονα υπό ατμόσφαιρα Ar για 2 ώρες (παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από πράσινο σε ροζ). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 9:1) απομονώθηκε το προϊόν **14**, το οποίο ελήφθη ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, καθώς και η αντίστοιχη αλδεΐδη **10** σε αναλογία 1:2.

**Απόδοση:** 42.0 mg (**97%**)

**Σ.Τ.:** 176-178 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -80.00 ° ( $c = 0.1$  g/L, χλωροφόρμιο)

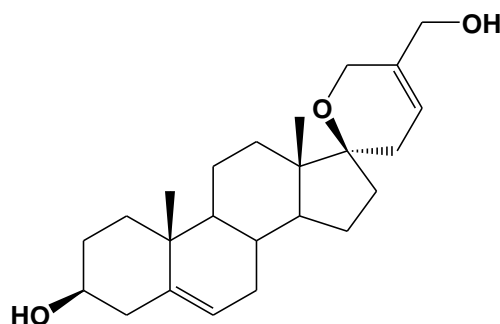
**R<sub>f</sub>:** 0.17, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 85:15

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 487.3602, ευρεθέν 487.3600, υπολογισθέν για C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 509.3422, ευρεθέν 509.3421.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.91 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.55-2.42 (m, 23H), 3.42-3.53 (m, 1H, 3α-H), 4.02 (s, 2H, 20-H), 4.19, 4.26 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 16.0$  Hz, 2H, 24-H), 5.31 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, 6-H), 5.75 (bs, 1H, 22-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.7, 18.4, 19.6, 21.0, 23.5, 26.1, 29.9, 31.2, 31.9, 32.2, 32.7, 33.3, 33.6, 36.8, 37.6, 42.9, 45.9, 50.3, 51.5, 63.8, 64.3, 72.7, 83.4, 120.4, 120.9, 136.4, 141.8.

**(17,2'*R*)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυρανο-5',3β-διόλη] (15)**



Σε διάλυμα της (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν-5'-όλης] (**14**) (15.8 mg, 0.03 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (0.9 mL) προστίθεται στους 0 °C υδροφορική πυριδίνη (5 mL, 0.3 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 6 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), το μείγμα αραιώνεται με νερό υπό ψύξη και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **15** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/ οξικός αιθυλεστέρας 65:35).

**Απόδοση:** 8 mg (72%)

**Σ.Τ.:** 195-197 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -80.00 ° ( $c = 0.075$  g/L, χλωροφόρμιο)

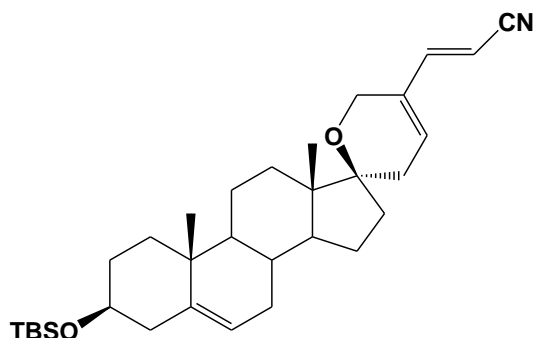
**R<sub>f</sub>:** 0.03, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 75:25

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 395.2557, ευρεθέν 395.2553.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.92 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.20-2.40 (m, 23H), 3.49-3.54 (m, 1H, 3α-H), 4.02 (s, 2H, 20-H), 4.19, 4.25 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 16.1$  Hz, 2H, 24-H), 5.35 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, 6-H), 5.75 (bs, 1H, 22-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 13.7, 19.5, 21.0, 23.5, 29.8, 31.2, 31.9, 32.7, 33.9, 33.6, 36.7, 37.4, 42.4, 45.9, 50.2, 51.4, 63.8, 64.2, 71.9, 83.3, 120.4, 121.5, 136.4, 141.0.

**(17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-αιθυλενοκυανο-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυράνιο] (16)**



Σε εναιώρημα του υδριδίου του νατρίου (60% σε ορυκτέλαιο, 4.4 mg, 0.11 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.50 mL) προστίθεται στους 0 °C κυανομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας (16 μL, 0.10 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται στους 0 °C διάλυμα της (17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν-5'-άλης] (**10**) (25 mg, 0.05 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.1 M) και το μίγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 85:15) απομονώθηκε το προϊόν **16** (*E* ισομερές), το οποίο λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό καθώς επίσης και μείγμα των γεωμετρικών ισομερών *E,Z* 4:1.

**Απόδοση:** 23.4 mg (**93%**)

**Σ.Τ.:** 177-179 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -46.30 ° ( $c = 0.108$  g/L, χλωροφόρμιο)

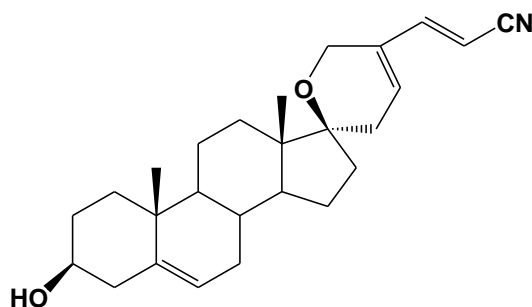
**R<sub>f</sub>:** 0.63, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 85:15

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>32</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>2</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 530.3425, ευρεθέν 530.3420.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.88 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.91 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.44-2.32 (m, 20H), 2.55 (d,  $J = 18.3$  Hz, 1H, 23-H), 3.44-3.49 (m, 1H, 3α-H), 4.25, 4.32 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 15.6$  Hz, 2H, 20-H), 5.00 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 5.30 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, 6-H), 6.23 (bs, 1H, 22-H), 6.91 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.7, 14.3, 18.4, 19.6, 21.0, 23.5, 26.1, 29.9, 31.9, 32.2, 32.7, 33.3, 33.7, 36.8, 37.6, 42.9, 46.0, 50.3, 51.5, 61.8, 72.7, 83.5, 93.3, 120.8, 133.1, 135.9, 141.8, 149.0.

**(17,2'*R*)-3β-υδροξυ-5'-αιθυλενοκυανο-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυράνιο] (17)**



Σε διάλυμα του (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-αιθυλενοκυανο-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραίνιου] (αποκλειστικά *E*-ισομερές) (**16**) (13.0 mg, 0.026 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (0.8 mL) προστίθεται στους 0 °C υδροφθορική πυριδίνη (4.6 μL, 0.26 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), το μίγμα αραιώνεται με νερό υπό ψύξη και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **17** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/ οξικός αιθυλεστέρας 80:20).

**Απόδοση:** 23.4 mg (**93%**)

**Σ.Τ.:** 193-195 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -36.92 ° ( $c = 0.325$  g/L, χλωροφόρμιο)

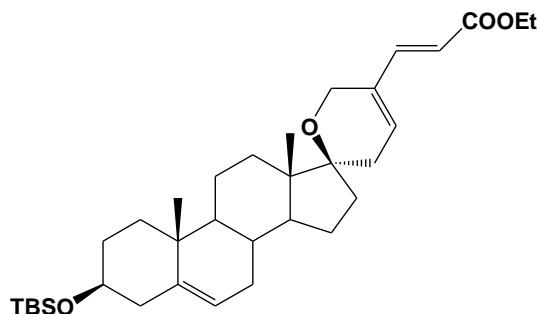
**R<sub>f</sub>:** 0.10, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 80:20

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 416.2560, ευρεθέν 416.2558.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.92 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.44-2.32 (m, 21H), 2.55 (d,  $J = 18.3$  Hz, 1H, 23-H), 3.44-3.49 (m, 1H, 3α-H), 4.26, 4.32 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 15.8$  Hz, 2H, 20-H), 5.00 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 5.30 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, 6-H), 6.23 (bs, 1H, 22-H), 6.91 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.6, 14.3, 18.4, 19.6, 21.0, 23.5, 26.1, 29.9, 31.8, 32.2, 32.7, 33.3, 33.7, 36.8, 37.6, 42.9, 46.0, 50.3, 51.5, 61.8, 72.7, 83.5, 93.3, 120.8, 133.1, 135.9, 141.8, 149.0.

**(17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5'-  
[αιθυλενο(αιθυλεστερο)]σπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)πυράνιο (18)**



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60% σε ορυκτέλαιο, 8.8mg, 0.22 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.50 mL) προστίθεται στους 0 °C αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας (40 μL, 0.20 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται στους 0 °C διάλυμα της (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν-5'-άλης] (**10**) (25 mg, 0.05 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.1 M) και το μίγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 30 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **18** (αποκλειστικά *E* ισομερές) λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

**Απόδοση:** 25.4 mg (92%)

**Σ.Τ.:** 181-183 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -50.00 ° ( $c = 0.1$  g/L, χλωροφόρμιο)

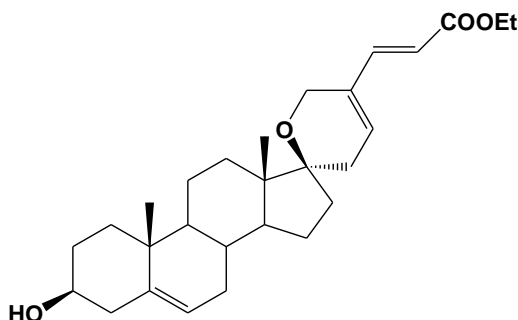
**R<sub>f</sub>:** 0.90, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 80:20

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 577.3684, ευρεθέν 577.3682.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.88 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.92 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.29 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.45-2.28 (m, 20H), 2.54 (d,  $J = 18.0$  Hz, 1H, 23-H), 3.44-3.49 (m, 1H, 3α-H), 4.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.30, 4.37 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 15.8$  Hz, 2H, 20-H), 5.30 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, 6-H), 5.59 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 6.22 (bs, 1H, 22-H), 7.20 (d,  $J = 16.2$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 13.6, 14.5, 18.4, 19.6, 21.0, 23.5, 26.1, 29.9, 31.9, 32.2, 32.7, 32.8, 33.4, 33.9, 36.8, 37.6, 42.9, 46.0, 50.3, 51.6, 60.5, 62.6, 72.7, 83.5, 115.2, 120.9, 133.3, 134.5, 141.8, 143.2, 167.3.

**(17,2'*R*)-3β-υδροξυ-5'-[αιθυλενο(αιθυλεστερο)]σπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)πυράνιο (19)**



Σε διάλυμα (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυοξυ)-5'-[αιθυλενο(αιθυλεστερο)]σπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)πυρανίου (**18**) (20.4 mg, 0.04 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (1.2 mL) προστίθεται στους 0 °C υδροφθορική πυριδίνη (7.0 μL, 0.40 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), το μίγμα αραιώνεται με νερό υπό ψύξη και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **19** (αποκλειστικά *E* ισομερές) λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/ οξικός αιθυλεστέρας 85:15).

**Απόδοση:** 16.5 mg (**93%**)

**Σ.Τ.:** 164-166 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -36.87 ° (*c* = 0.217 g/L, χλωροφόρμιο)

**R<sub>f</sub>:** 0.04, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 90:10

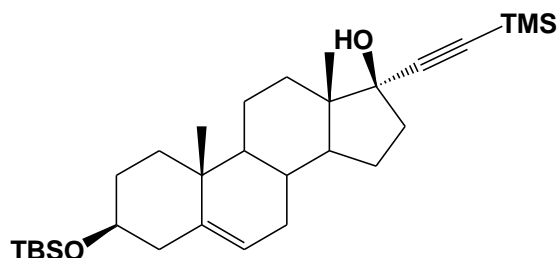
**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 441.2999, ευρεθέν 441.2982, υπολογισθέν για C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 463.2819, ευρεθέν 463.2818.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.92 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.44-2.30 (m, 21H), 2.53 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H, 23-H), 3.4-3.53 (m, 1H, 3α-H), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.24, 4.31 (AB<sub>q</sub>, *J*<sub>AB</sub> = 15.8 Hz, 2H, 20-H), 5.34 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, 6-H), 5.59 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.22 (bs, 1H, 22-H), 7.20 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 13.6, 14.44, 19.53, 20.98, 23.46, 29.83, 31.81, 32.65, 32.73, 33.34, 33.84, 36.68, 37.40, 42.38, 45.93, 50.17, 51.51, 60.50, 62.58, 71.83, 83.48, 115.18, 121.40, 133.28, 134.43, 140.99, 143.16, 167.28.



**3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-(2'-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνο)-5-ανδροστεν-17β-όλη (20)**



Διάλυμα τριμεθυλοσιλυλοακετυλενίου (1.90 g, 193 μmol) σε τετραϋδροφουράνιο (7 mL) ψύχεται στους  $-78^{\circ}\text{C}$  και ακολουθεί στάγδην προσθήκη του βουτυλολιθίου (2.5 M σε εξάνιο, 0.61 mL, 1.53 μmol). Το μείγμα αναδεύεται στους  $-78^{\circ}\text{C}$  για 30 min και στη συνέχεια για 30 min στους  $0^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθεί ψύξη του μείγματος στους  $-78^{\circ}\text{C}$  και προσθήκη στάγδην διαλύματος της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστενο-17-όνης (1) (257 mg, 0.64 μmol) σε τετραϋδροφουράνιο (7 mL) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), γίνεται κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση πλένεται με νερό, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται. Το υπόλειμμα χρησιμοποιείται στην επόμενη αντίδραση χωρίς καθαρισμό.

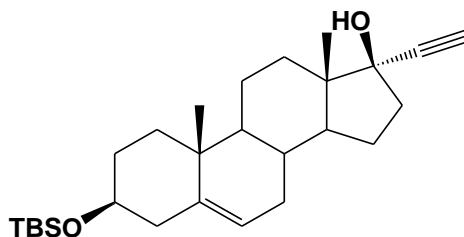
**R<sub>f</sub>**: 0.54, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/ακετόνη 9:1

**HRMS (ESI)**: υπολογισθέν για  $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2\text{Si}_2\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  523.3398, ευρεθέν 523.3402.

**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta$  0.06 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.17 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.84 (s, 3H), 0.89 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.02 (s, 3H), 1.05-2.35 (m, 20H), 3.43-3.54 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H), 5.33 (d,  $J = 5.07$  Hz, 1H, 6-H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta$  -4.4, -0.2, 12.9, 18.4, 19.6, 21.0, 23.4, 26.1, 31.7, 32.3, 32.7, 32.8, 36.8, 37.6, 39.1, 43.0, 46.9, 50.2, 51.0, 72.8, 80.3, 90.1, 109.6, 121.0, 141.9.

**3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-αιθινυλο-5-ανδροστεν-17β-όλη  
(21)**



Σε διάλυμα της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-(2'-τριμεθυλοσιλυλοαιθινυλο)-5-ανδροστεν-17β-όλης (**20**) (117 mg, 0.29 mmol) σε μεθανόλη (9.7 mL) προστίθεται ανθρακικό κάλιο (0.48 g, 3.5 mmol) και το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 12 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), εξατμίζεται ο διαλύτης και ακολουθεί προσθήκη νερού και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική σιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **21** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /ακετόνη 95:5).

**Απόδοση:** 110 mg (**88.9 %**, συνολική απόδοση για τα δύο στάδια από την **2**)

**Σ.Τ.:** 177-179 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -75.95 ° ( $c = 0.158$  g/L, χλωροφόρμιο)

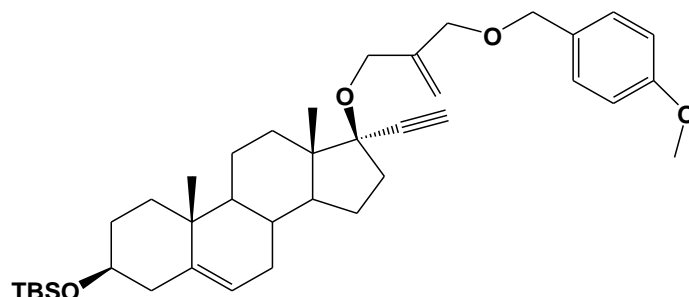
**R<sub>f</sub>:** 0.37, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/ακετόνη 9:1

**HRMS (APCI):** υπολογισθέν για C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>O<sub>2</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 429.3183, ευρεθέν 429.3173, υπολογισθέν για C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>OSi [M+H]<sup>+</sup> 411.3078, ευρεθέν 411.3077.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.88 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.05-2.35 (m, 19H), 2.50 (s, 1H, 21-H), 3.42-3.52 (m, 1H, 3α-H), 5.31 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, 6-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.40, 12.80, 18.40, 19.60, 20.90, 23.40, 26.10, 31.60, 32.20, 32.71, 32.74, 36.80, 37.60, 39.10, 43.00, 46.80, 50.00, 50.90, 72.70, 74.10, 80.10, 87.70, 120.90, 141.70.

**3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-αιθυνυλο-17β-[2-  
μεθυλ(αλλυλοξυ)μεθυλο(*p*-μεθοξυβενζυλοξυ)]-ενυλοξυ-ανδροστ-5-ένιο  
(22)**



Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται υδρίδιο του νατρίου (60% σε ορυκτέλαιο, 14.4 mg, 0.36 mmol), το οποίο εκπλένεται με άνυδρο εξάνιο (3×2 mL). Ακολουθεί προσθήκη άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (1.0 mL) και στη συνέχεια στάγδην προσθήκη στους 0 °C διαλύματος της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-αιθυνυλο-5-ανδροστεν-17β-όλης (**21**) (50 mg, 0.12 mmol) σε 1 mL άνυδρο τετραϋδροφουράνιο το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 40 °C και αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη διαλύματος ((2-(βρωμομεθυλο)αλλυλοξυ)μεθυλο)*p*-μεθοξυβενζολίου (**13**) (325 mg, 1.20 mmol) σε 1 mL άνυδρου τετραϋδροφουρανίου. Το μείγμα θερμαίνεται στους 58°C για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), προστίθεται στάγδην στους 0 °C νερό και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται ο διαλύτης υπό κενό. Το προϊόν **22** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πεντάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 99:1).

**Απόδοση:** 53.0 mg (72%)

**Σ.Τ.:** 74-76 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -120.30 ° ( $c = 0.133$  g/L, χλωροφόρμιο)

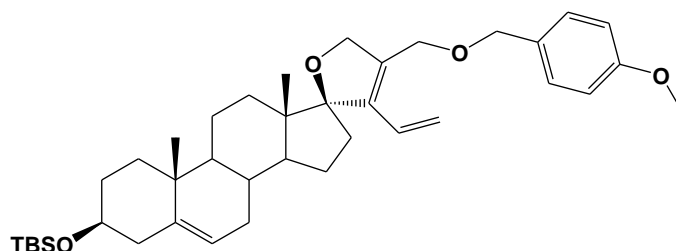
**R<sub>f</sub>:** 0.65, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 9:1

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>39</sub>H<sub>58</sub>O<sub>4</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 641.3997, ευρεθέν 641.3996.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.86 (s, 3H), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.01 (s, 3H), 1.24-2.31 (m, 19H), 2.56 (s, 1H, 21-H), 3.41-3.53 (m, 1H, 3α-H), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.98-4.07 (m, 2H, 25-H), 4.07-4.24 (m, 2H, 22-H), 4.43 (s, 2H, 26-H), 5.16 (s, 1H, 24-H), 5.24 (s, 1H, 24-H), 5.31 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, 6-H), 6.87 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.27 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.42, 12.92, 18.42, 19.62, 20.95, 23.42, 26.09, 31.65, 32.23, 32.49, 33.99, 36.75, 37.02, 37.53, 42.97, 47.36, 50.00, 50.84, 55.43, 66.50, 71.03, 71.81, 72.75, 75.74, 85.18, 85.40, 113.44, 113.89, 120.95, 129.50, 130.64, 141.73, 143.59, 159.28.

**(17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-(3'αιθυλενο-4'*p*-μεθοξυβενζυλομεθυλοξυ)σπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)φουράνιο] (23)**



Σε διάλυμα του 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-αιθινυλο-17β-[2-μεθυλ(αλλυλοξυ)μεθυλο(*p*-μεθοξυβενζυλοξυ)]-ενυλοξυ-ανδροστ-5-ένιου (**22**) (48 mg, 0.08 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (2 mL) προστίθεται, μετά από απαέρωση, καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (3.4 mg, 0.004 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και στη συνέχεια στους 40°C για 12 ώρες. Πραγματοποιείται έλεγχος με TLC και παρατηρείται μη ολοκλήρωση της αντίδρασης. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν **23** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 98:2).

**Απόδοση:** 15.4 mg (32%)

**Σ.Τ.:** 77-79 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -84.34 ° ( $c = 0.083$  g/L, χλωροφόρμιο)

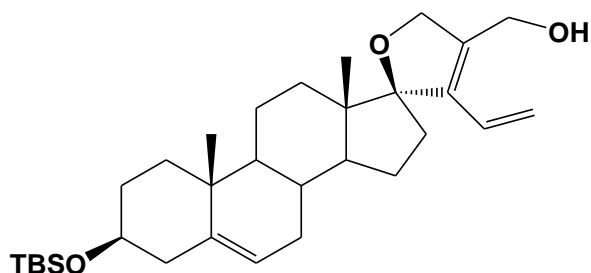
**R<sub>f</sub>:** 0.47, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 9:1

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>39</sub>H<sub>58</sub>O<sub>4</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 641.3997, ευρεθέν 641.4001.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.88 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.92 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.25-2.30 (m, 19H), 3.41-3.51 (m, 1H, 3α-H), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.14, 4.27 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 12.6$  Hz, 2H, 20-H), 4.39 (q,  $J = 11.4$  Hz, 2H, 25-H), 4.59- 4.69 (m, 2H, 26-H), 5.12 (dd,  $J = 17.4, 1.8$  Hz, 1H, 24-H), 5.28 (dd,  $J = 11.3, 1.7$  Hz, 1H, 24-H), 5.31 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, 6-H), 6.07- 6.22 (m, 1H, 23-H), 6.87 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.23 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 15.6, 18.4, 19.6, 20.8, 24.1, 26.1, 31.8, 32.2, 32.5, 32.6, 34.6, 36.8, 37.6, 43.0, 47.5, 50.2, 50.7, 55.4, 64.2, 72.1, 72.8, 74.8, 102.2, 113.9, 119.4, 121.0, 129.5, 130.3, 130.4, 133.9, 140.4, 141.9, 159.4.

**(17,2'*R*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3'αιθυλενοσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)φουράν-4'-όλη] (24)**



Σε διάλυμα του (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-(3'αιθυλενο-4'*p*-μεθοξυβενζυλομεθυλοξυ)σπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)φουρανίου] (**23**) (18 mg, 0.03 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (0.30 mL) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.0 (0.11 mL) προστίθεται 2,3-δichλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόννη (13.6 mg, 0.06 mmol) και το μίγμα αναδεύεται έντονα υπό αργό για 12 ώρες (παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από πράσινο σε ροζ). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Τα προϊόντα (αλκοόλη/αλδεΐδη 1:1) δεν απομονώθηκαν απολύτως καθαρά, ύστερα από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 97:3) και η αλκοόλη (υπό την μορφή ελαίου) χρησιμοποιήθηκε απευθείας στην επόμενη αντίδραση.

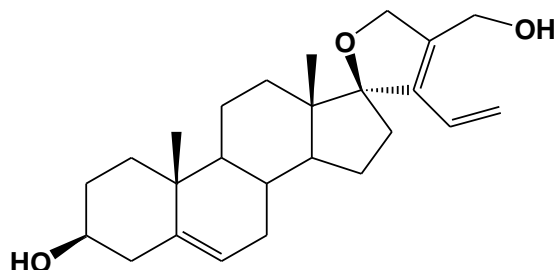
**Απόδοση:** 5.0 mg αλκοόλη (33%)

**R<sub>f</sub>:** 0.20, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 85:15

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.88 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.92 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.35-2.28 (m, 20H), 3.43-3.48 (m, 1H, 3α-H), 4.28 (dd, *J*= 12.9, 1.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 4.49 (d, *J*= 12.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 4.68 (q, *J*= 13.3 Hz, 2H, 20-H), 5.15 (dd, *J*= 17.2, 0.9 Hz, 1H, 24-H), 5.31-5.33 (2H, 6-H, 24-H), 6.15 (m, 1H, 23-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.44, 14.22, 15.64, 18.43, 19.59, 20.78, 24.14, 26.09, 31.81, 32.23, 32.41, 32.63, 34.50, 36.79, 37.54, 42.98, 47.52, 50.20, 50.66, 57.58, 72.79, 74.36, 102.22, 120.97, 130.45, 135.62, 139.60, 141.89.

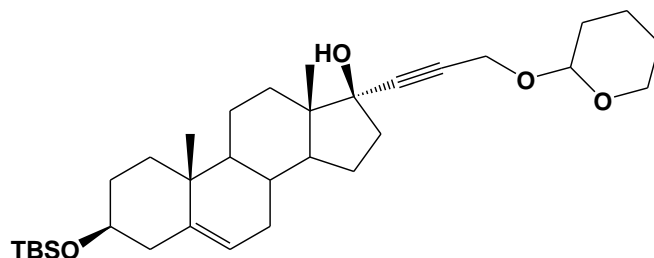
**(17,2'*R*)-3'αιθυλενοσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)φουράν-4',3β-διόλη]**  
**(25)**



Σε διάλυμα της (17,2'*R*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-3'αιθυλενοσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)φουράν-4'-όλης] (**24**) (4.5 mg, 0.009 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (0.25 mL) προστίθεται στους 0 °C υδροφθορική πυριδίνη (1.5 mL, 0.09 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), το μίγμα αραιώνεται με νερό υπό ψύξη και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Εξαιτίας της μικρής κλίμακας της αντίδρασης δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίηση του προϊόντος με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR.

**R<sub>f</sub>**: 0.06, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 80:20

**3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-  
[(τετραϋδροπυρανο)προπαργυνυλο]-5-ανδροστεν-17β-όλη (26)**



Σε διάλυμα της (τετραϋδροπυρανο)προπαργυλικής αλκοόλης (1.04 g, 7.44 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (27.25 mL) προστίθεται στους -78 °C στάγδην διάλυμα βουτυλολιθίου ( 2.5M σε εξάνιο, 0.92 mL, 2.3 mmol) και το μίγμα αναδεύεται αρχικά για 20 λεπτά στους -78 °C και στη συνέχεια για 20 λεπτά στους 0 °C. Ακολουθεί ψύξη του μείγματος στους -78 °C και στάγδην προσθήκη διαλύματος της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-όνης (**1**) (1 g, 2.48 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (27.25 mL) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Ακολουθεί έλεγχος με TLC και παρατηρείται μη κατανάλωση του αρχικού αντιδρώντος και το μίγμα αναδεύεται στους 60°C για 4 επιπλέον ώρες. Η αντίδραση διακόπτεται (γίνεται έλεγχος με TLC) με προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου και ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **26** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /ακετόνη 98:2).

**Απόδοση:** 452.0 mg (33%)

**Σ.Τ.:** 82-84 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -72.00 ° (*c* = 0.125 g/L, χλωροφόρμιο)

**R<sub>f</sub>:** 0.27, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /ακετόνη 90:10

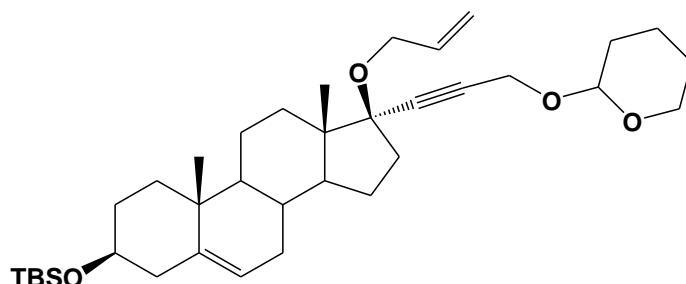
**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>33</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 565.3682, ευρεθέν 565.3684.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.85 (s, 3H), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.01 (s, 3H), 1.08-2.31 (m, 26H), 3.42-3.56 (m, 2H), 3.79-3.91 (m, 1H, 23-H), 4.33 (d, *J*= 1.1 Hz, 2H), 4.83 (dd, *J*= 3.6, 3.1 Hz, 1H), 5.31 (d, *J*= 5.3 Hz, 1H, 6-H).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 12.9, 18.4, 19.3, 19.6, 20.9, 23.4, 25.5, 26.1, 30.5, 31.6, 32.2, 32.7, 32.9, 36.8, 37.6, 39.1, 43.0, 47.0, 50.0, 51.0, 54.5, 62.3, 72.7, 80.1, 82.0, 89.6, 96.9, 121.0, 141.7.



**3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-  
[(τετραϋδροπυρανο)προπαργυνυλο]-17β-(προπ-2-ενυλοξυ)-ανδροστ-5-  
ένιο (27)**



Σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου (60% σε ορυκτέλαιο, 98.3 mg, 0.04 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (7.0 mL) προστίθεται στους 0 °C διάλυμα της 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-[(τετραϋδροπυρανο)προπαργυνυλο]-5-ανδροστέν-17β-όλης (**26**) (445 mg, 0.82 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (7.0 mL), το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος αλλυλοβρωμιδίου (708 μL, 8.19 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3.0 mL) στους 0 °C. Το μίγμα θερμαίνεται στους 75°C για 12 ώρες. Γίνεται έλεγχος με TLC και παρατηρείται μη κατανάλωση των αντιδρώντων. Ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου στους 0 °C και εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται ο διαλύτης υπό κενό. Το προϊόν **27** λαμβάνεται υπό την μορφή ελαίου, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 98:2).

**Απόδοση:** 230.0 mg (48%)

$[\alpha]_D^{20}$ : -73.73 ° ( $c = 0.217$  g/L, χλωροφόρμιο)

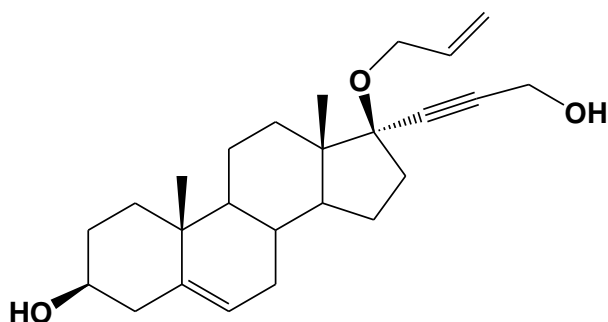
$R_f$ : 0.82, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /ακετόνη 95:5

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για  $C_{36}H_{58}O_4SiNa$   $[M+Na]^+$  605.3997, ευρεθέν 605.3999.

**$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):** δ 0.06 (s, 6H,  $Si(CH_3)_2$ ), 0.87 (s, 3H), 0.89 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 1.01 (s, 3H), 1.08-2.31 (m, 25H), 3.42-3.56 (m, 2H), 3.80-3.93 (m, 1H, 23-H), 4.01-4.21 (m, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.86 (t,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 5.11 (dd,  $J = 10.5, 1.7$  Hz, 1H), 5.27 (dd,  $J = 17.3, 1.7$  Hz, 1H), 5.31 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H, 6-H), 5.92 (ddt,  $J = 17.0, 10.4, 5.2$  Hz, 1H, 29-H).

**$^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ):** δ -4.4, 13.0, 19.4, 19.6, 21.0, 23.4, 25.6, 26.1, 29.8, 30.5, 31.7, 32.2, 32.5, 34.3, 36.7, 37.4, 37.6, 43.0, 47.5, 50.0, 51.0, 54.5, 62.4, 66.8, 72.7, 83.7, 85.5, 87.2, 96.7, 115.8, 121.0, 135.7, 141.7.

## 17α-[Προπαργγυνολο]-17β-(προπ-2-ενυλοξυ)-5-ανδροστ-3β,22-διόλη (28)



Σε διάλυμα του 3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-[(τετραϋδροπυρανο)προπαργγυνολο]-17β-(προπ-2-ενυλοξυ)-ανδροστ-5-ένιου (**27**) (74 mg, 0.13 mmol) σε μεθανόλη (3.0 mL) προστίθεται *p*-τολουολο σουλφονικό οξύ (5 mg, 0.03 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **28** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /ακετόνη 85:15).

**Απόδοση:** 35.0 mg (70%)

**Σ.Τ.:** 160-162 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -156.63 ° (*c* = 0.083 g/L, χλωροφόρμιο)

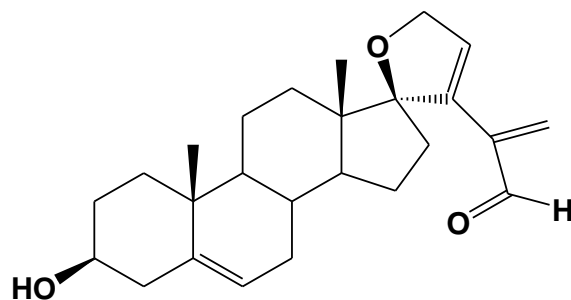
**R<sub>f</sub>:** 0.20, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /ακετόνη 80:20

**HRMS (APCI):** υπολογισθέν για C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 407.2557, ευρεθέν 407.2555.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.87 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.08-2.31 (m, 21H), 3.45-3.56 (m, 1H, 3α-H), 4.11 (qd, *J* = 12.6, 5.2 Hz, 2H, 23-H), 4.35 (s, 2H, 22-H), 5.10 (dd, *J* = 10.4, 1.7 Hz, 1H, 25-H), 5.27 (dd, *J* = 17.2, 1.8 Hz, 1H, 25-H), 5.33 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, 6-H), 5.91 (ddt, *J* = 17.2, 10.4, 5.2 Hz, 1H, 24-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 13.0, 19.6, 21.0, 23.4, 29.8, 31.6, 31.8, 32.5, 34.3, 36.6, 37.3, 37.4, 42.4, 47.5, 49.9, 51.0, 51.5, 66.8, 71.9, 85.4, 86.0, 87.1, 115.8, 121.5, 135.6, 140.9.

**(17,2'*R*)-3β-υδροξυ-3'αιθυλενοσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'*H*)φουραν-8'-άλη] (29)**



Σε διάλυμα της 17α-[προπαργγυνο]-17β-(προπ-2-ενυλοξυ)-5-ανδροστ-3β,22-διόλης (**28**) (18 mg, 0.05 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (0.8 mL) προστίθεται, μετά από απαέρωση, καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (2.0 mg, 0.0025 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στους 40 °C για 5 ώρες και στη συνέχεια για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιείται έλεγχος με TLC και παρατηρείται μη ολοκλήρωση της αντίδρασης. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν **29** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης εξάνιο/ακετόνη 85:15).

**Απόδοση:** 2.0 mg (10%)

**Σ.Τ.:** 56-58 °C

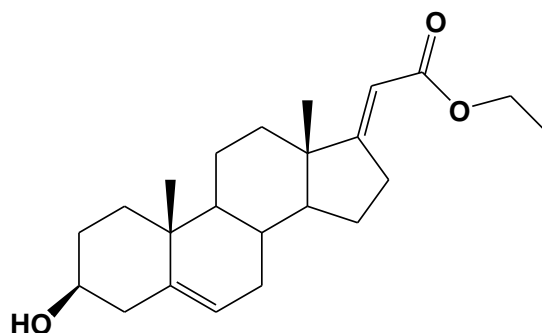
$[\alpha]_D^{20}$ : -149.25 ° ( $c = 0.067$  g/L, χλωροφόρμιο)

**R<sub>f</sub>:** 0.64, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /ακετόνη 75:25

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> [M-CH<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> 353.2508, ευρεθέν 353.2482.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.92 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.10-2.34 (m, 20H), 3.47-3.58 (m, 1H, 3α-H), 4.06, 4.10, 4.16, 4.20 (AB<sub>q</sub>,  $J_{AB} = 5.3$  Hz, 2H, 20-H), 5.15 (dd,  $J = 10.5, 1.5$  Hz, 1H, 24-H), 5.30 (dd,  $J = 17.3, 1.7$  Hz, 1H, 24-H), 5.35 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, 6-H), 5.92 (m, 1H, 21-H), 9.30 (s, 1H, CHO).

**(E)-(3β-υδροξυ-5-ανδροστεν-17-υλιδενο)μεθυλεστέρας (30)**



Σε διάλυμα της δεϋδροεπιανδροστερόνης (2.0 g, 6.94 mmol) και του αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακού διαιθυλεστέρα (15.46 mL, 77.9 mmol) σε μίγμα άνυδρου τετραϋδροφουρανίου/ απόλυτης αιθανόλης (1:1, 21.4/21.4 mL) προστίθεται στάγδην διάλυμα 5% αιθοξυνατρίου σε αιθανόλη (1.59 g Na σε 30 mL απόλυτη αιθανόλη) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το μίγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή για 2 ώρες και 30 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), προστίθεται στους 0 °C νερό και στη συνέχεια 5% υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος. Το προϊόν **30** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από διήθηση από Celite, έκπλυση με πετρελαϊκό αιθέρα και στη συνέχεια διαλυτοποίηση με διχλωρομεθάνιο. Ακολουθεί ξήρανση υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό.

**Απόδοση:** 4.78 g (94%)

**Σ.Τ.:** 178-180 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -96.00 ° (c = 0.125 g/L, χλωροφόρμιο)

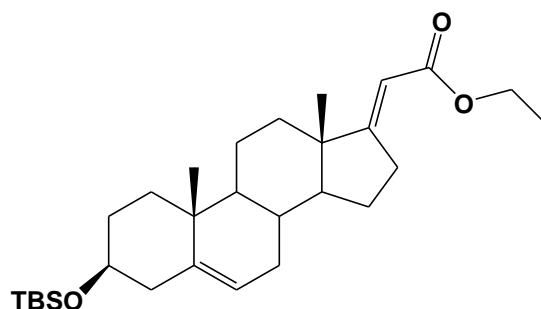
**R<sub>f</sub>:** 0.04, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 95:5

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>Na [M+H]<sup>+</sup> 359.2580, ευρεθέν 359.2581, υπολογισθέν για C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 381.2399, ευρεθέν 381.2400.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.84 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.36-2.33 (m, 18H), 2.78-2.90 (m, 2H), 3.50-3.56 (m, 1H, 3α-H), 4.09-4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.37 (d, J = 5.0 Hz, 1H, 6-H), 5.55 (bs, 1H, 20-H).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14.5, 18.4, 19.6, 21.1, 24.6, 30.6, 31.7, 31.8, 35.3, 36.8, 37.4, 42.4, 46.2, 50.4, 54.0, 59.7, 71.7, 71.8, 108.8, 121.5, 140.9, 167.6, 176.3.

**(E)-[3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-υλιδενο]μεθυλεστέρας (31)**



Σε διάλυμα του (*E*)-(3β-υδροξυ-5-ανδροστεν-17-υλιδενο)μεθυλεστέρας (**30**) (2.03 g, 5.7 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (17.3 mL) προστίθεται στους 0 °C ιμιδαζόλιο (1.2 g, 17.1 mmol) και ιώδιο (4.3 g, 17.1 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη *t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωριδίου (945 mg, 6.27 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 36 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται διαδοχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα θειοθειικού νατρίου και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **31** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από ανακρυστάλλωση από αιθανόλη.

**Απόδοση:** 1.35 g (50%)

**Σ.Τ.:** 100-102 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -106.67 ° ( $c = 0.075$  g/L, χλωροφόρμιο)

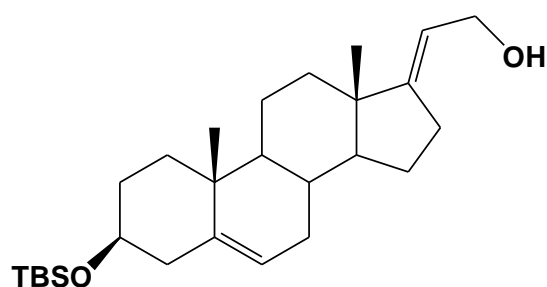
**R<sub>f</sub>:** 0.77, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 95:5

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 473.3445, ευρεθέν 473.3445, υπολογισθέν για C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 495.3263, ευρεθέν 495.3265.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.83 (s, 3H), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.02 (s, 3H), 1.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.36-2.32 (m, 19H), 3.43-3.53 (m, 1H, 3α-H), 4.15 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.33 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, 6-H), 5.54 (t,  $J = 2.3$  Hz, 1H, 20-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.3, 14.5, 18.4, 19.6, 21.1, 24.6, 26.1, 30.6, 31.7, 31.8, 32.2, 35.4, 36.8, 37.5, 42.9, 46.2, 50.5, 54.0, 59.7, 72.7, 108.8, 120.9, 121.0, 141.8, 167.6, 176.4.

**(E)- 3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)πρεγνα-5,17(20)-διεν-21-όλη (32)**



Σε διάλυμα του (*E*)-[3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-υλιδενο]μεθυλεστέρα (**31**) (1.12 g, 2.38 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (47.8 mL) προστίθεται στάγδην στους -78 °C διίσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο (1.0M σε εξάνιο, 9.52 mL, 9.52 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στους -78 °C για 3 ώρες και στη συνέχεια για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), προστίθεται στους 0 °C κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται διαδοχικά με 10% υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρησιμοποιείται στην επόμενη αντίδραση χωρίς καθαρισμό.

**Απόδοση:** 1.0 g (ποσοτικά)

**Σ.Τ.:** 129-131 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -108.43 ° (*c* = 0.083 g/L, χλωροφόρμιο)

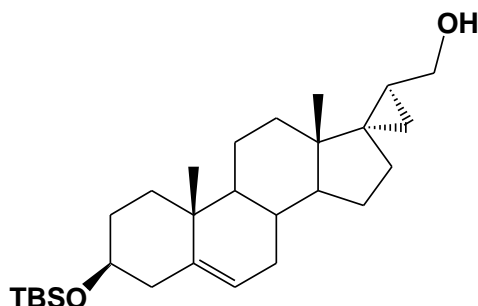
**R<sub>f</sub>:** 0.05, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 95:5

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 453.3158, ευρεθέν 454.3193.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.77 (s, 3H), 0.88 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.01 (s, 3H), 1.18-2.41 (m, 22H), 3.41-3.53 (m, 1H, 3α-H), 5.20-5.28 (m, 1H, 20-H), 5.32 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, 6-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 14.3, 18.4, 18.7, 19.6, 21.1, 21.2, 24.5, 26.1, 26.3, 31.8, 31.9, 32.2, 35.8, 36.9, 37.5, 42.9, 44.0, 50.7, 72.7, 115.7, 121.0, 141.8, 155.9.

**(17S,20S)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5-πρεγνεν-21-όλη (33)**



Σε διάλυμα της (*E*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)πρεγνα-5,17(20)-διεν-21-όλης (**32**) (600 mg, 1.44 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (11.2 mL) προστίθεται διϊωδομεθάνιο (0.6 mL, 7.2 mmol) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, το μίγμα ψύχεται στους -78 °C και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος διαιθυλοψευδαργύρου (0.9 M σε εξάνιο, 8 mL, 7.2 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), γίνεται κατεργασία του μείγματος με 10% υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος στους 0 °C και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται ο διαλύτης υπό κενό. Μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 90:10) λήφθηκε το προϊόν **33** ως λευκό κρυσταλλικό στερεό και ένα άλλο διαστερεομερές του προϊόντος σε αναλογία 3:1.

**Απόδοση:** 554 mg (**86%**)

**Σ.Τ.:** 149-151 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -89.55 ° (*c* = 0.067 g/L, χλωροφόρμιο)

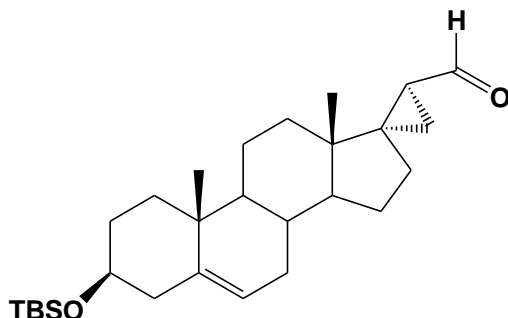
**R<sub>f</sub>:** 0.29, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C /οξικός αιθυλεστέρας 9:1

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 467.3316, ευρεθέν 467.3318.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.78 (s, 3H), 0.89 (m, 10H), 1.00 (s, 3H), 1.36-2.32 (m, 22H), 3.45-3.51 (m, 2H), 3.57-3.66 (m, 1H, 21-H), 5.33 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, 6-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 4.3, 16.4, 17.1, 18.4, 19.6, 19.7, 20.7, 25.2, 26.1, 29.1, 32.1, 32.2, 32.7, 33.3, 36.3, 36.9, 37.5, 41.1, 42.9, 50.6, 54.9, 65.3, 72.7, 121.1, 141.7.

**(17S,20S)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5-πρεγνεν-21-  
άλη (34)**



Σε διάλυμα της (17S,20S)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5-πρεγνεν-21-όλης (**33**) (86 mg, 0.19 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (10 mL) προστίθεται στους 0 °C αντιδραστήριο Dess-Martin και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1,5 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), ακολουθεί προσθήκη μίγματος κορεσμένου υδατικού διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου και 10% υδατικού διαλύματος θειοθειικού νατρίου (1:1) και το μίγμα αναδεύεται για 30 λεπτά. Ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα, έκπλυση της οργανικής στιβάδας αρχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και στη συνέχεια με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξήρανση υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν **34** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C/οξικός αιθυλεστέρας 98:2).

**Απόδοση:** 73.6 mg (**88%**)

**Σ.Τ.:** 114-116 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -49.30 ° (*c* = 0.142 g/L, χλωροφόρμιο)

**R<sub>f</sub>:** 0.62, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 9:1

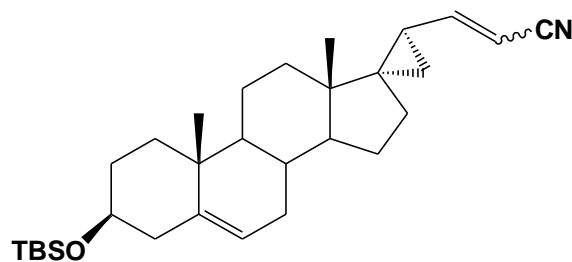
**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 465.3159, ευρεθέν 465.3157.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.79 (s, 3H), 0.88 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.95 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 1.00 (s, 3H), 1.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 1.11-2.30 (m, 20H), 3.42-3.52 (m, 1H, 3α-H), 5.32 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, 6-H), 9.08 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, CHO).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 17.1, 18.4, 19.6, 20.5, 21.1, 25.3, 26.0, 29.6, 31.0, 32.0, 32.1, 32.6, 33.1, 36.8, 37.5, 42.3, 42.9, 43.8, 50.4, 53.9, 72.6, 120.9, 141.7, 202.0.



**(17S,20S)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5,21-πρεγνε-  
διεν-22(*E,Z*)-ακετονιτρίλιο (35)**



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60% σε ορυκτέλαιο, 14.0 mg, 0.35 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.25 mL) προστίθεται στους 0 °C κυανομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας (52 μL, 0.32 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται στους 0 °C διάλυμα της (17S,20S)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5-πρεγνεν-21-άλης (**34**) (35.8 mg, 0.08 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.1 M) και το μίγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 1 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **35** (μείγμα γεωμετρικών ισομερών *E,Z* 60:40) λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C / οξικός αιθυλεστέρας 97:3).

**Απόδοση:** 30.7 mg (82%)

**Σ.Τ.:** 130-132 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -120.00 ° ( $c = 0.125$  g/L, χλωροφόρμιο)

**R<sub>f</sub>:** 0.71, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 90:10

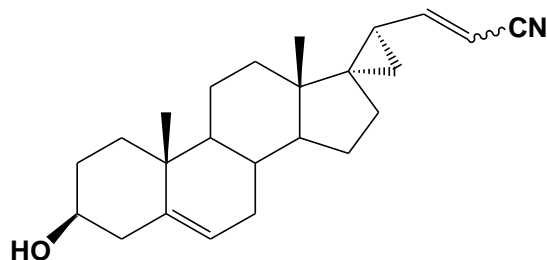
**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>NOSiNa [M+Na]<sup>+</sup> 488.3319, ευρεθέν 488.3315.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.54 (dd,  $J = 10.0, 5.0$  Hz, 1H), 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 1H), 0.89 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.00 (s, 3H), 1.04-2.28 (m, 18H), 3.46-3.50 (m, 1H, 3α-H), 5.19 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 5.30-5.32 (m, 2H), 6.03 (t,  $J = 10.9$  Hz, 1H), 6.30 (dd,  $J = 16.0, 10.2$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 16.7, 16.8, 18.4, 19.6, 20.6, 20.6, 22.3, 22.9, 23.1, 23.3, 25.2, 25.2, 26.1, 29.8, 29.9, 32.0, 32.1, 32.2, 32.6, 32.6, 33.3, 33.3, 36.8, 36.9, 37.6, 42.2, 42.2, 42.3, 42.4, 42.9, 50.4, 50.5, 54.5,

54.6, 72.7, 72.7, 95.9, 96.2, 117.2, 118.3, 120.9, 121.0, 141.7, 141.8, 158.0,  
159.0.

**(17S,20S)-3β-υδροξυ-17α,20-μεθανο-5,21-πρεγνε-διεν-22(E,Z)-ακετονιρίλιο (37)**



Σε διάλυμα του (17S,20S)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5,21-πρεγνε-διεν-22(*E,Z*)-ακετονιρίλιου (**36**) (26.7 mg, 0.06 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (1.8 mL) προστίθεται στους 0 °C υδροφθορική πυριδίνη (10.0 mL, 0.60 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), το μίγμα αραιώνεται με νερό υπό ψύξη και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **37** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό (μείγμα *E,Z* 60:40), μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/ οξικός αιθυλεστέρας 90:10).

**Απόδοση:** 20.0 mg (**95%**)

**Σ.Τ.:** 82-84 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : -71.86 ° ( $c = 0.167$  g/L, χλωροφόρμιο)

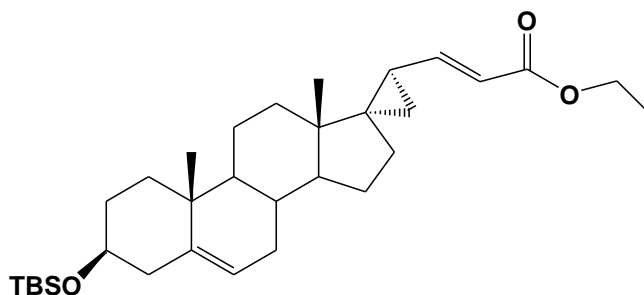
**R<sub>f</sub>:** 0.06, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 90:10

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>NONa [M+Na]<sup>+</sup> 374.2454, ευρεθέν 374.2452.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.50-0.55 (m, 1H), 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 1H), 1.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.05- 2.04 (m, 17H), 2.19-2.33 (m, 2H), 3.49- 3.53 (m, 1H, 3α-H), 5.18 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 5.31 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 5.35 (s, 1H), 6.02 (t,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 6.30 (dd,  $J = 16.0, 10.3$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 16.7, 16.8, 19.5, 20.5, 20.6, 22.2, 22.9, 23.1, 23.2, 25.1, 25.2, 29.8, 29.8, 31.7, 31.7, 31.9, 32.0, 32.5, 32.6, 33.2, 33.3, 36.7, 36.8, 37.4, 42.1, 42.2, 42.3, 42.3, 42.3, 50.3, 50.4, 54.5, 54.5, 71.8, 71.8, 96.0, 96.1, 117.2, 118.3, 121.4, 121.5, 121.5, 121.5, 140.9, 141.0, 158.0, 159.0.

**(17*S*,20*S*)-3β-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5,21-πρεγνα-διεν-22-μεθυλεστέρας (36)**



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60% σε ορυκτέλαιο, 12.3 mg, 0.31 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.20 mL) προστίθεται στους 0 °C αιθοξυκαρβονυλομεθυλοφωσφονιακός διαιθυλεστέρας (56 μL, 0.28 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται στους 0 °C διάλυμα της (17*S*,20*S*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5-πρεγνεν-21-άλης (**34**) (31.5 mg, 0.07 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.1 M) και το μίγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 30 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC) ακολουθεί κατεργασία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **36** (αποκλειστικά *E* ισομερές) λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

**Απόδοση:** 33.0 mg (92%)

**Σ.Τ.:** 127-129 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : 9.61 ° ( $c = 0.208$  g/L, χλωροφόρμιο)

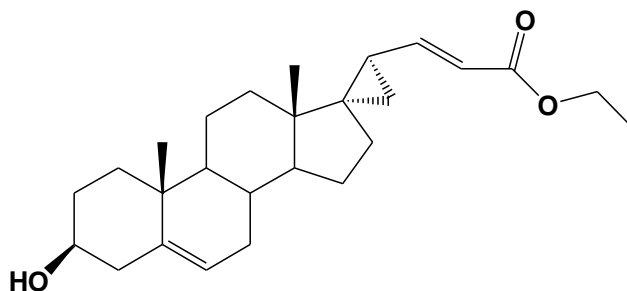
**R<sub>f</sub>:** 0.78, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 90:10

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>32</sub>H<sub>53</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 513.3758, ευρεθέν 513.3757, υπολογισθέν για C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>3</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 535.3578, ευρεθέν 535.3576.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.50 (t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 0.75 (s, 3H), 0.89 (m, 10H), 1.00 (s, 3H), 1.28 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.38-2.28(m, 20H), 3.49-3.53 (m, 1H, 3α-H), 4.14-4.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.35 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H, 6-H), 5.85 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H, 23-H), 6.60 (dd,  $J = 15.3, 10.4$  Hz, 1H, 22-H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.4, 14.5, 16.7, 18.4, 19.6, 20.6, 22.0, 22.5, 25.2, 26.1, 29.8, 32.1, 32.2, 32.6, 33.4, 36.9, 37.6, 41.7, 42.1, 42.9, 50.5, 54.7, 60.1, 72.7, 118.9, 121.1, 141.7, 152.8, 166.9.

**(17*S*,20*S*)-3β-υδροξυ-17α,20-μεθανο-5,21-πρεγνα-διεν-22-μεθυλεστέρας (38)**



Σε διάλυμα του (17*S*,20*S*)-3β-(*t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α,20-μεθανο-5,21-πρεγνα-διεν-22-μεθυλεστέρα (**37**) (30.0 mg, 0.06 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (1.8 mL) προστίθεται στους 0 °C υδροφθορική πυριδίνη (10.0 mL, 0.60 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), το μίγμα αραιώνεται με νερό υπό ψύξη και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **38** (αποκλειστικά *E* ισομερές) λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό, μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/ οξικός αιθυλεστέρας 90:10).

**Απόδοση:** 18.0 mg (75%)

**Σ.Τ.:** 123-125 °C

$[\alpha]_D^{20}$ : 14.08 ° ( $c = 0.142$  g/mL, χλωροφόρμιο)

**R<sub>f</sub>:** 0.06, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C /οξικός αιθυλεστέρας 90:10

**HRMS (ESI):** υπολογισθέν για C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>Na [M+H]<sup>+</sup> 399.2894, ευρεθέν 399.2897, υπολογισθέν για C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 421.2713, ευρεθέν 421.2716.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.50 (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 0.75 (s, 3H), 0.91-0.98 (m, 1H), 1.00 (s, 3H), 1.27 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.38-2.31 (m, 21H), 3.45-3.51 (m, 1H, 3α-H), 4.14-4.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.32 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, 6-H), 5.86 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H, 23-H), 6.61 (dd,  $J = 15.4, 10.3$  Hz, 1H, 22-H).

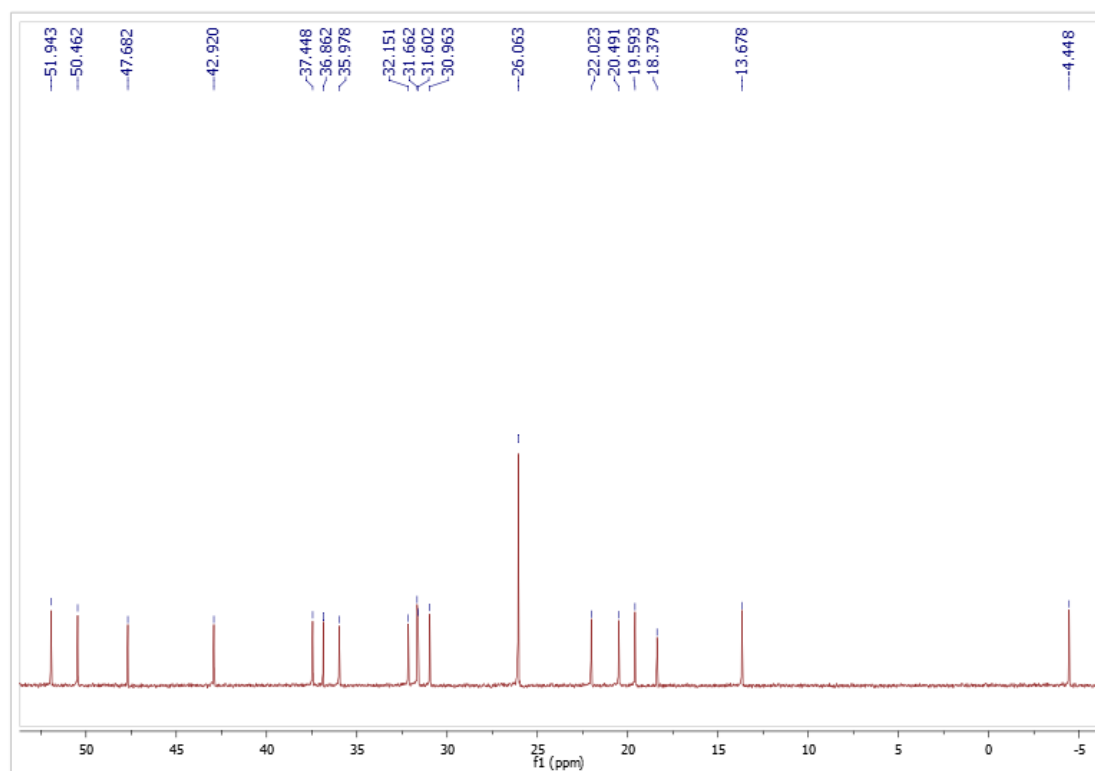
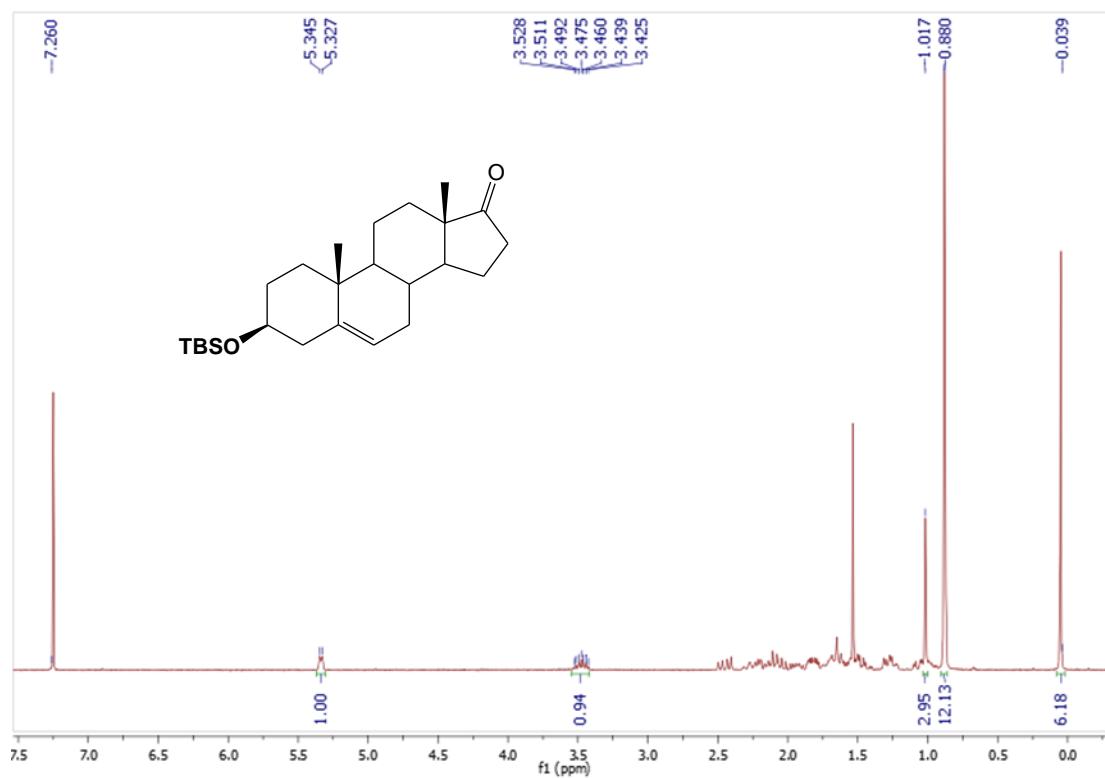
**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14.5, 16.7, 19.5, 20.6, 21.9, 22.4, 25.2, 29.8, 31.7, 32.0, 32.6, 33.4, 36.7, 37.4, 41.6, 42.1, 42.4, 50.4, 54.6, 60.1, 71.8, 118.9, 121.6, 140.9, 152.8, 166.9.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b><math>^{13}\text{C}</math> NMR</b>	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός ισοτόπου άνθρακα 13
<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
<b><math>^1\text{H}</math> NMR</b>	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός πρωτονίου
<b>NGF</b>	Νευροαυξητικός παράγοντας
<b>BDNF</b>	Νευροτροφικός παράγοντας προερχόμενος από τον εγκέφαλο
<b>HRMS</b>	Φασματομετρία μάζας υψηλής ευκρίνειας
<b><math>[\text{}^3\text{H}]</math>-DHEA</b>	Τριτιωμένη δεϋδροεπιανδροστερόνη
<b>NPCs</b>	Νευρικά προγονικά κύτταρα
<b>NSCs</b>	Νευρικά βλαστικά κύτταρα

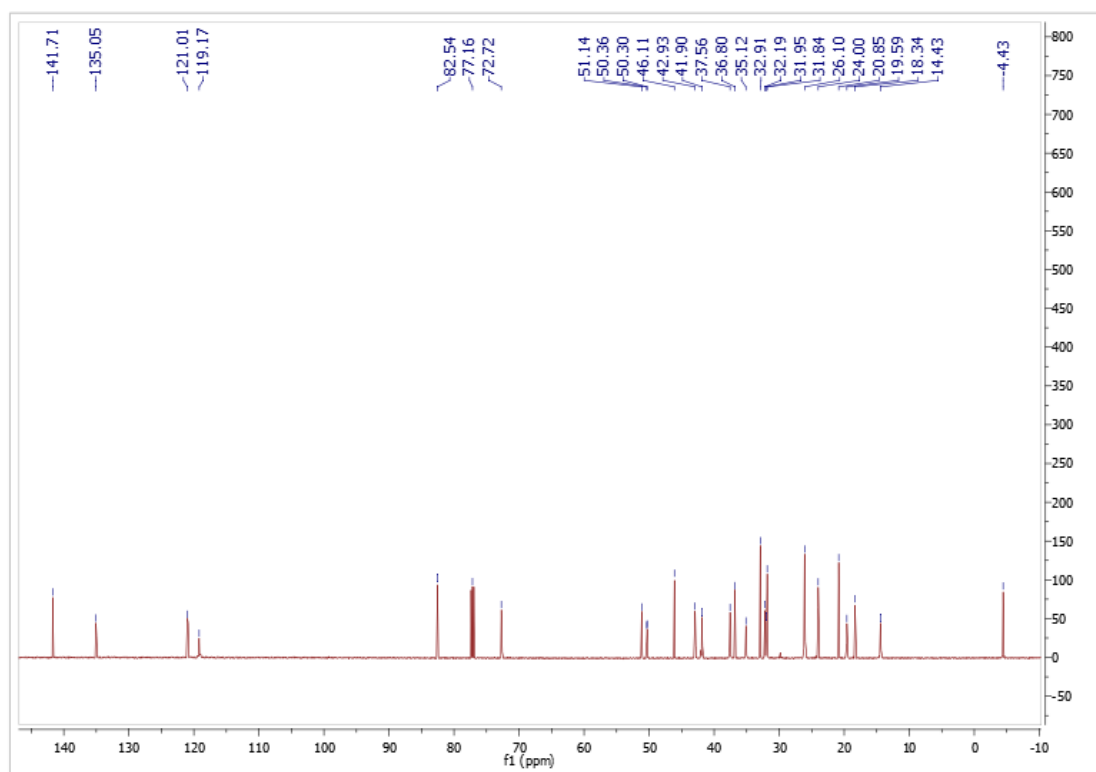
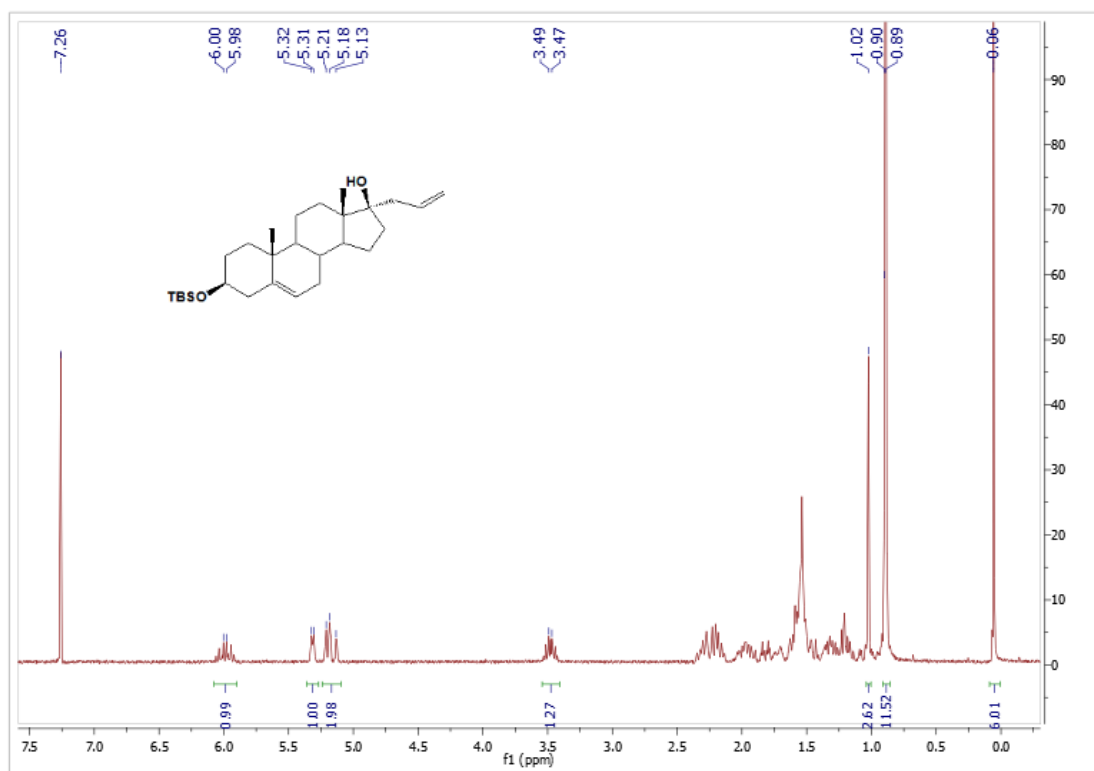
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 1

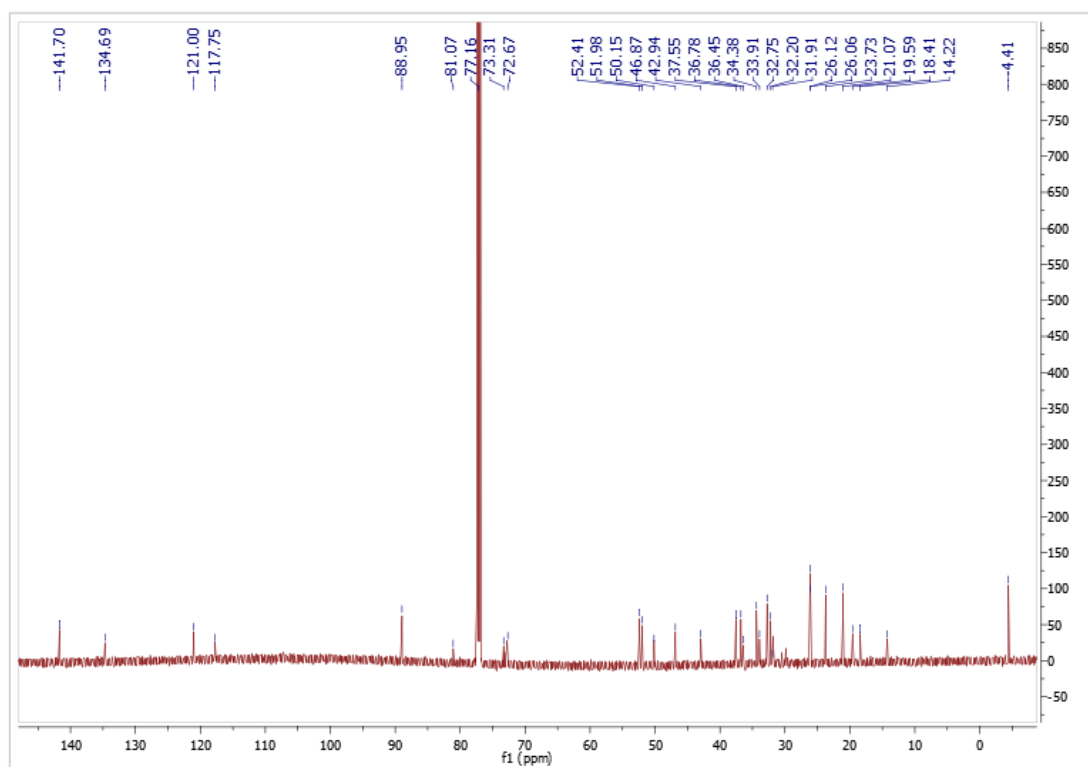
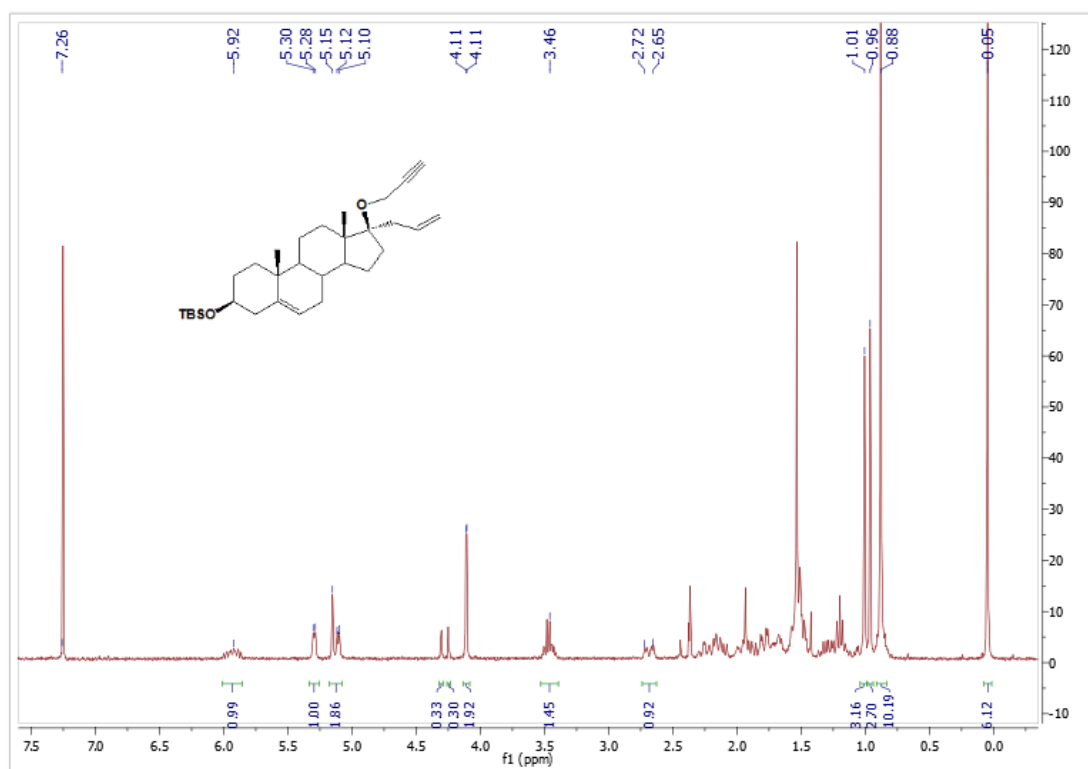




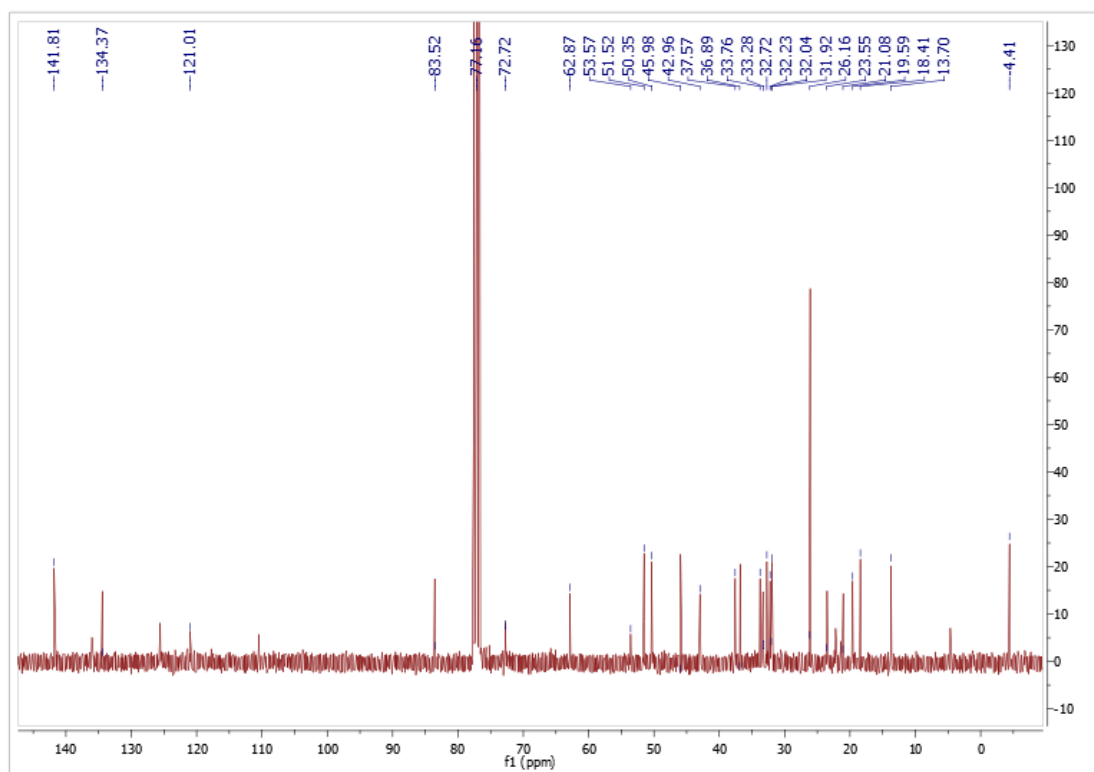
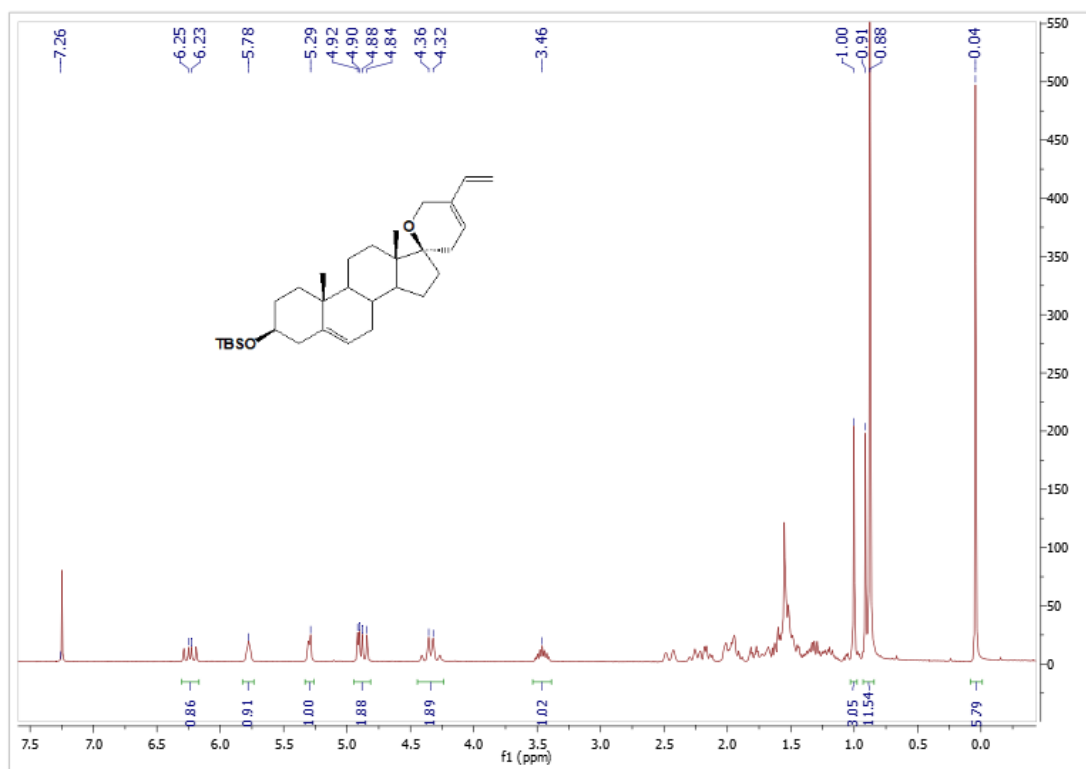
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **2**



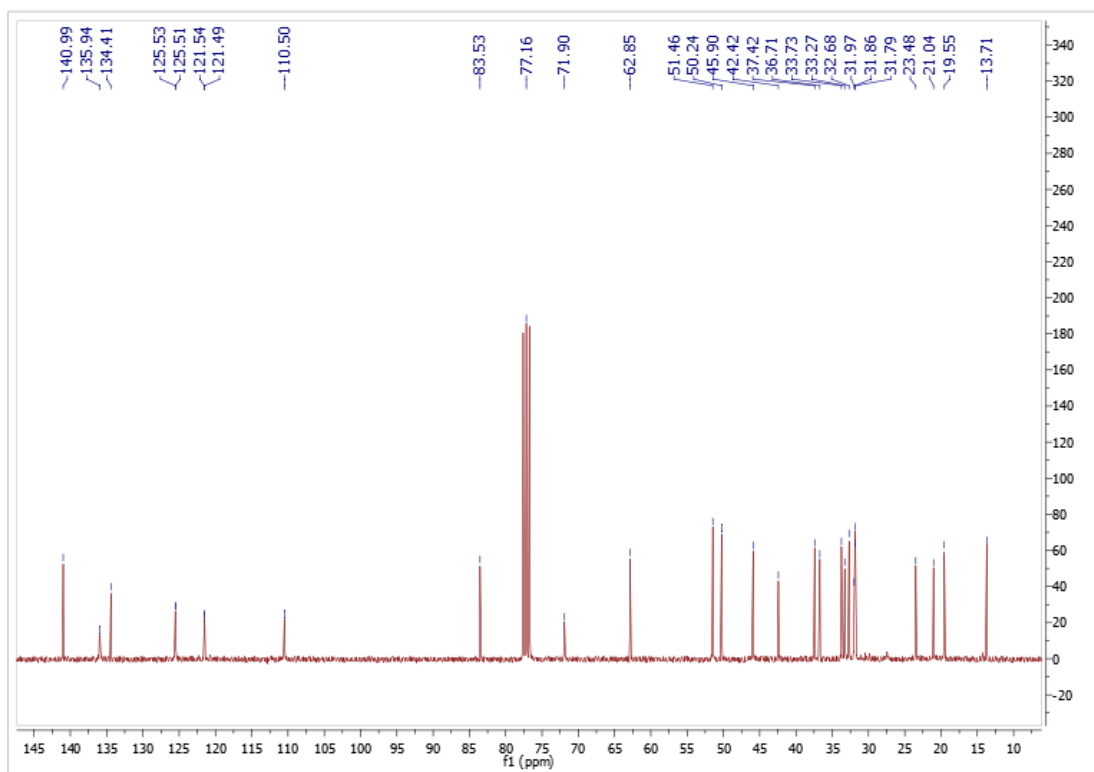
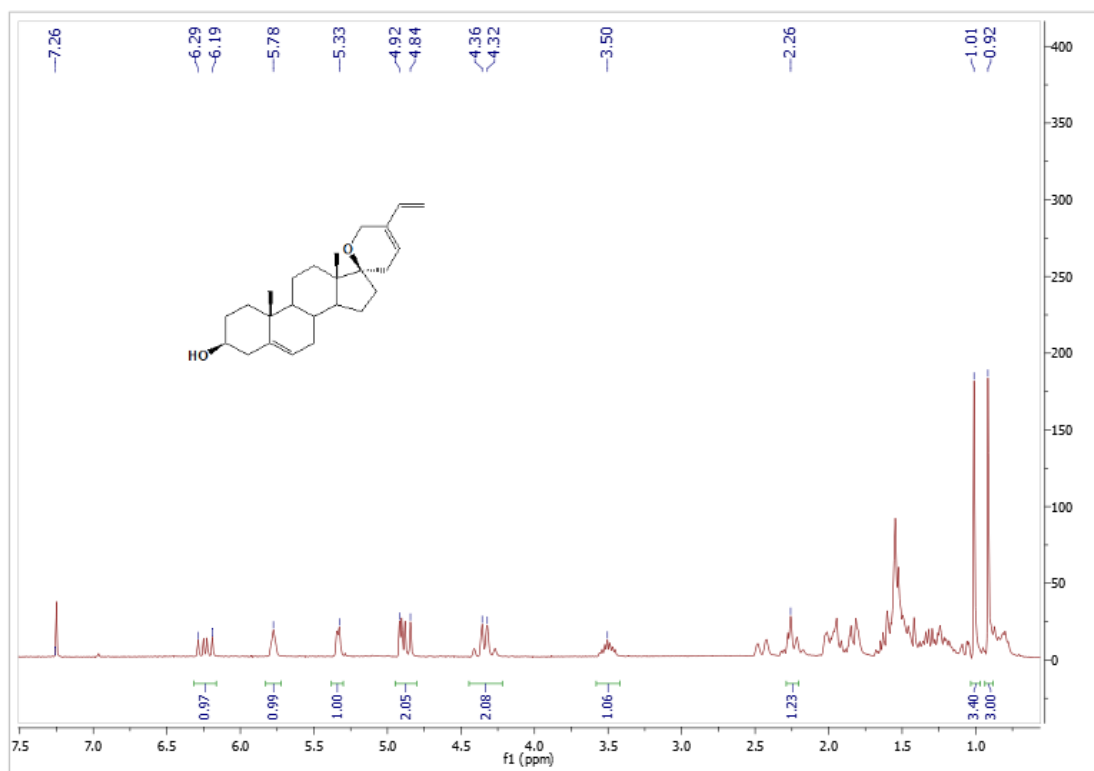
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **3**



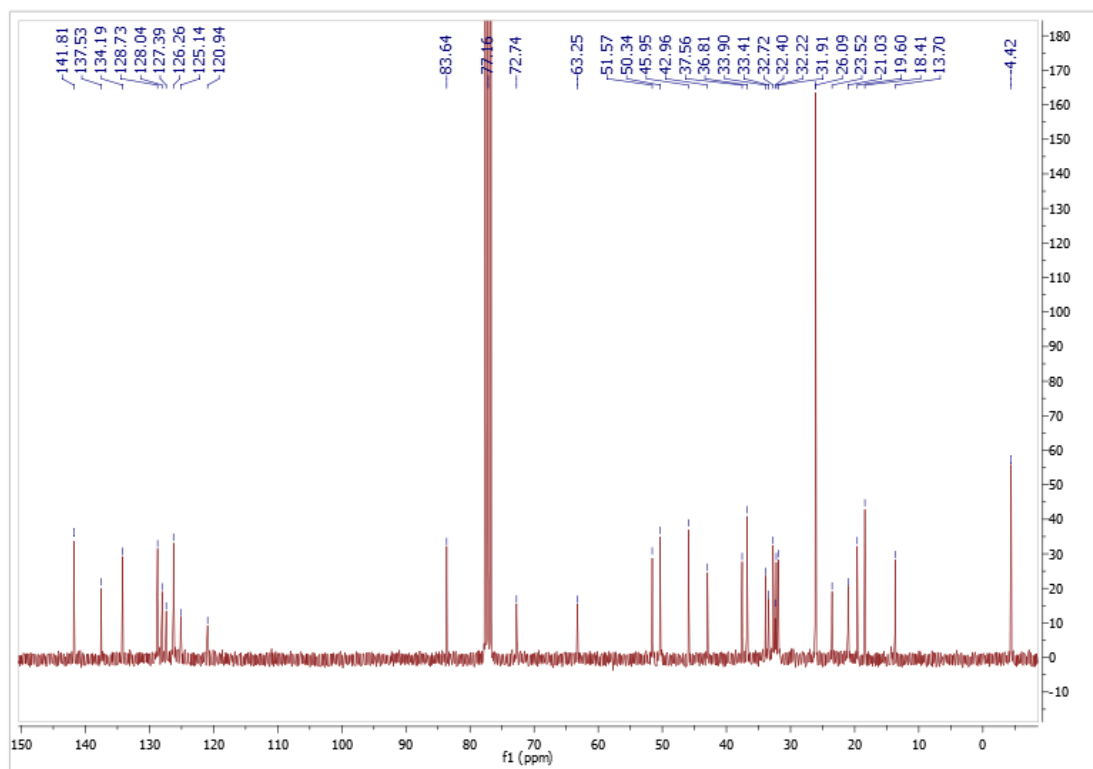
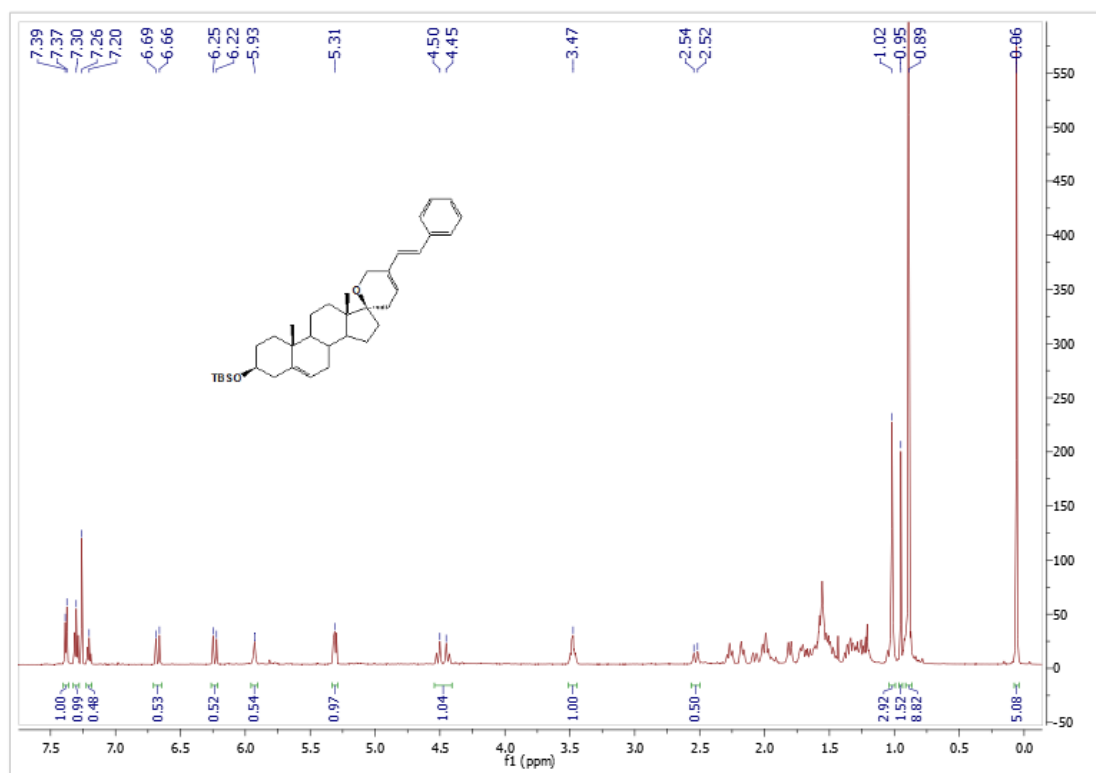
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 4



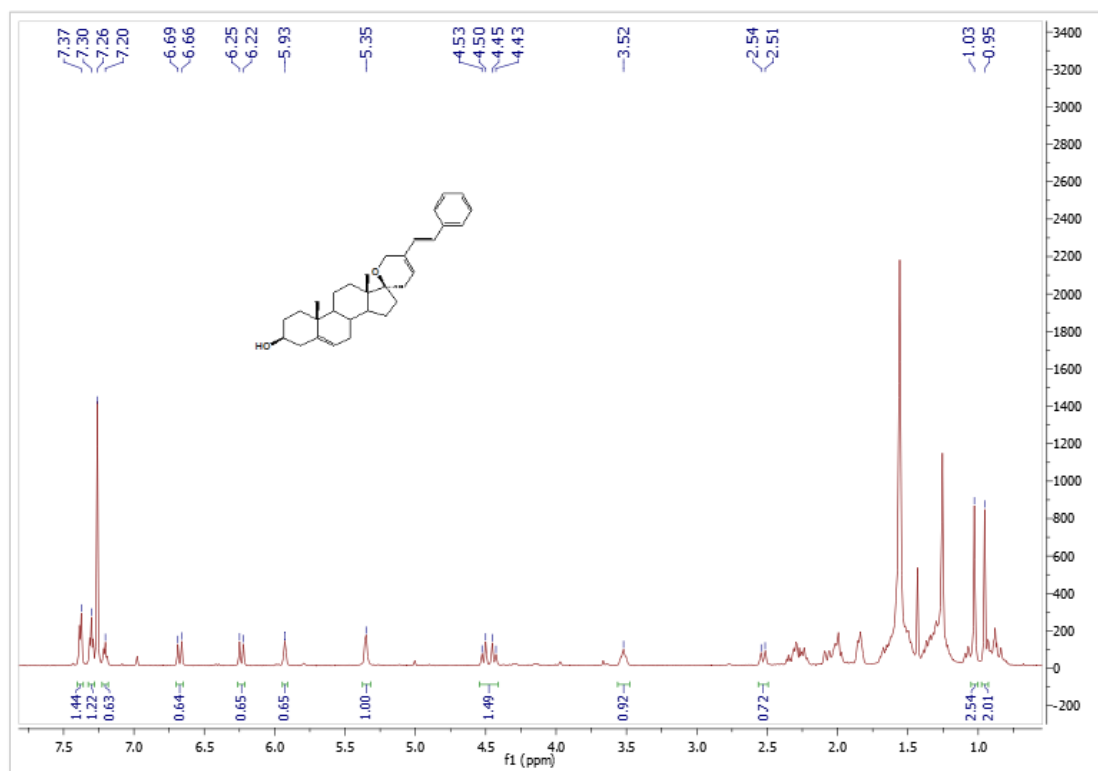
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **5**



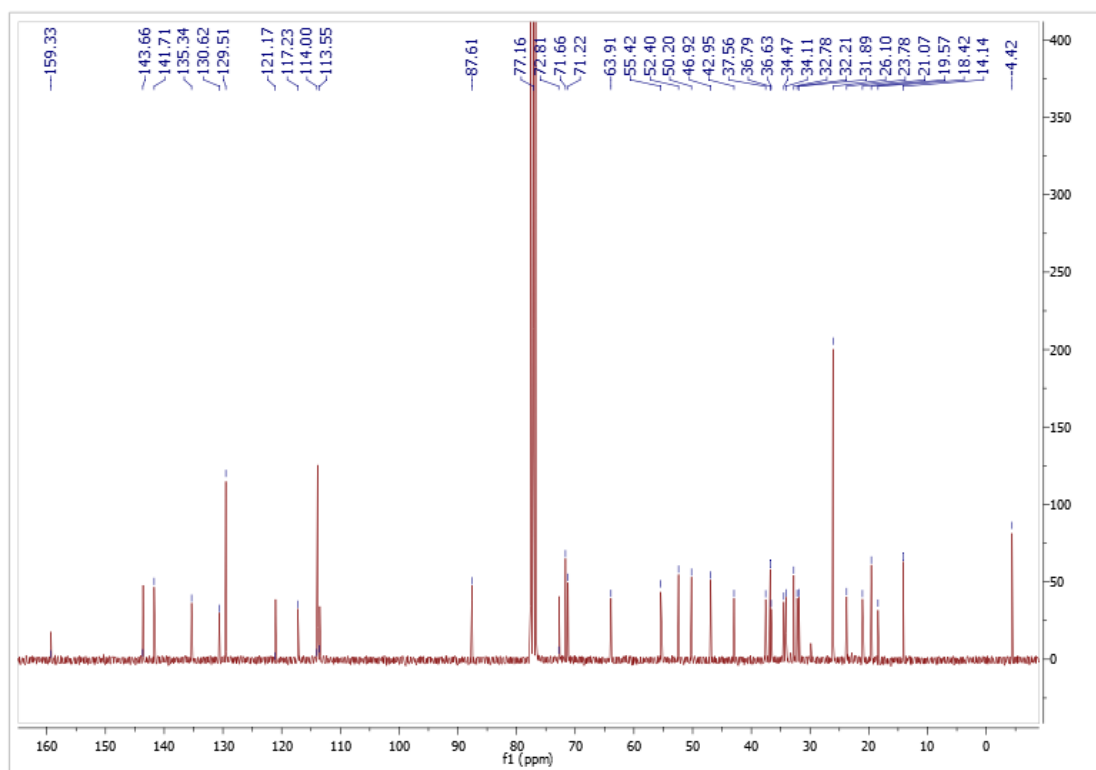
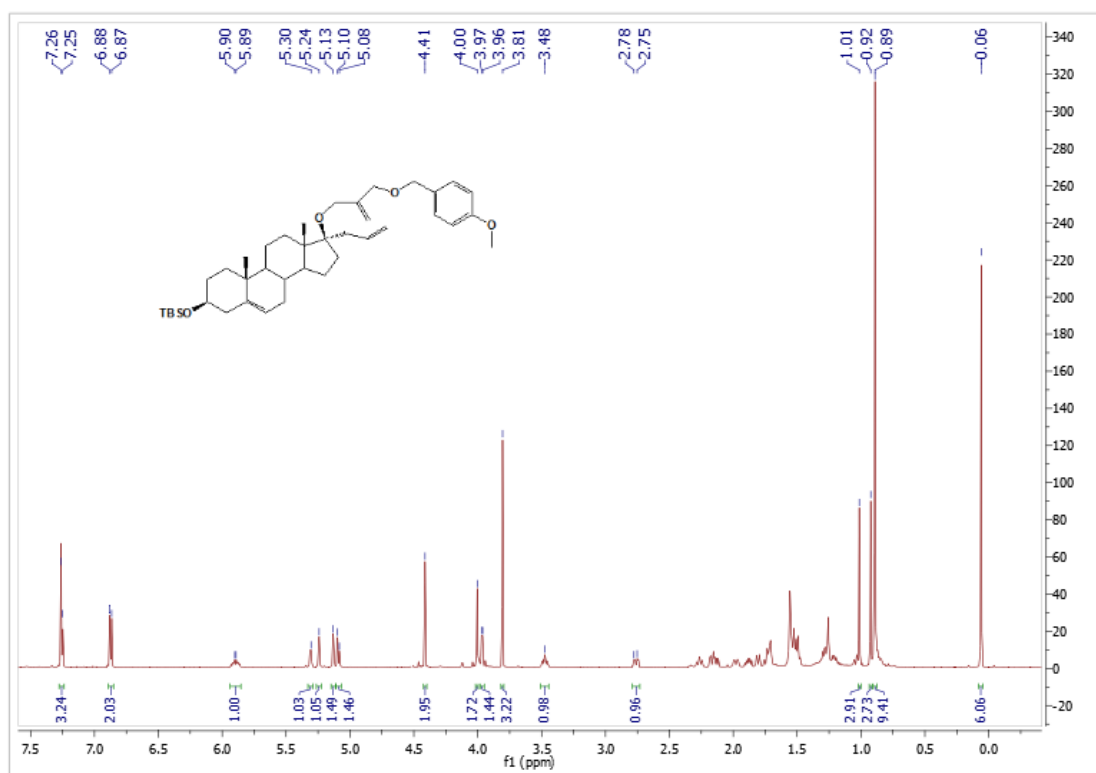
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **6**



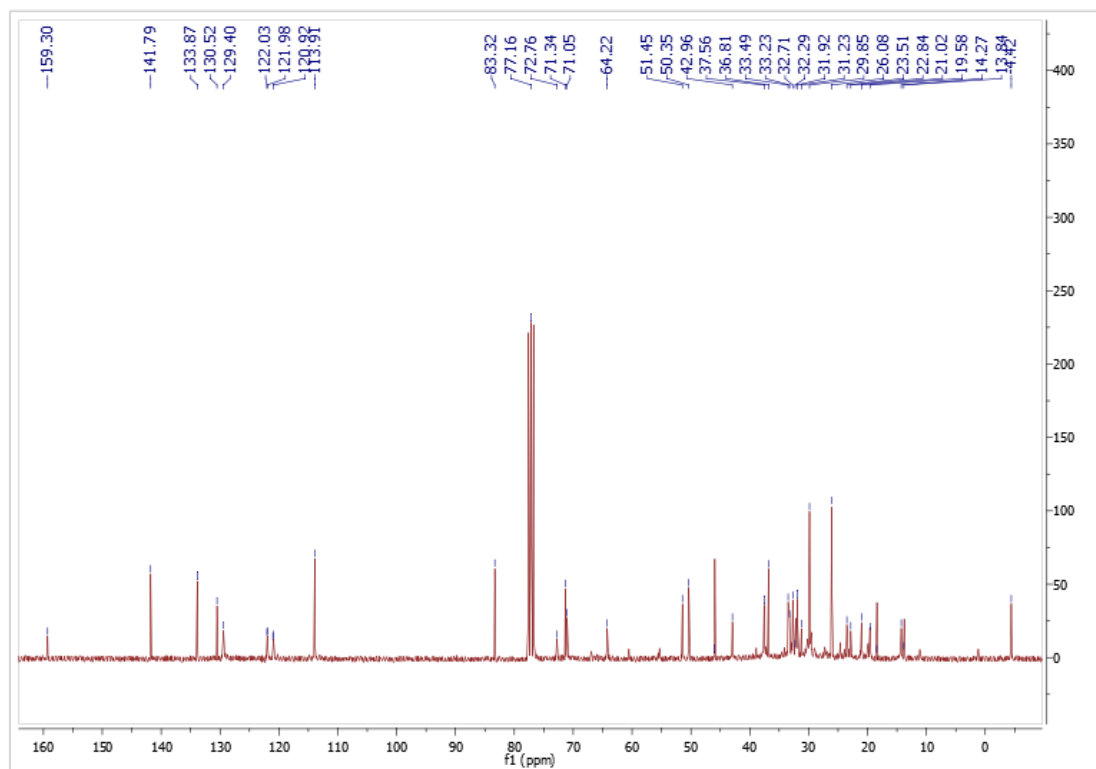
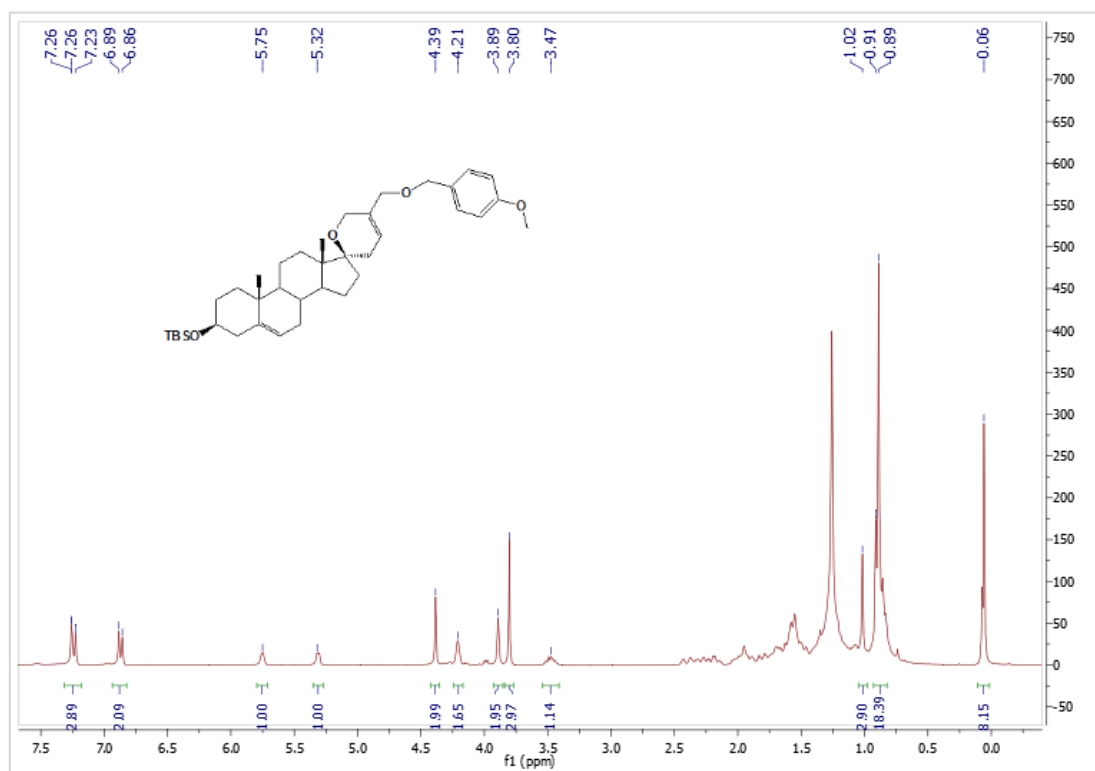
# Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της ένωσης 7



Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **8**

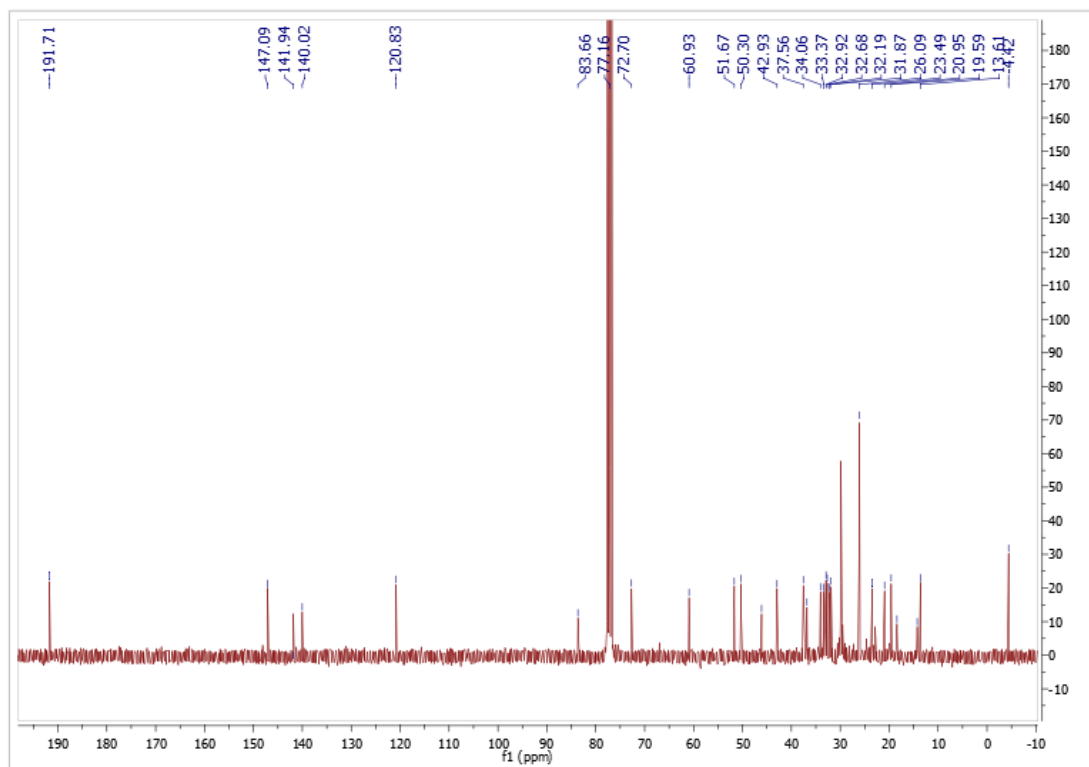
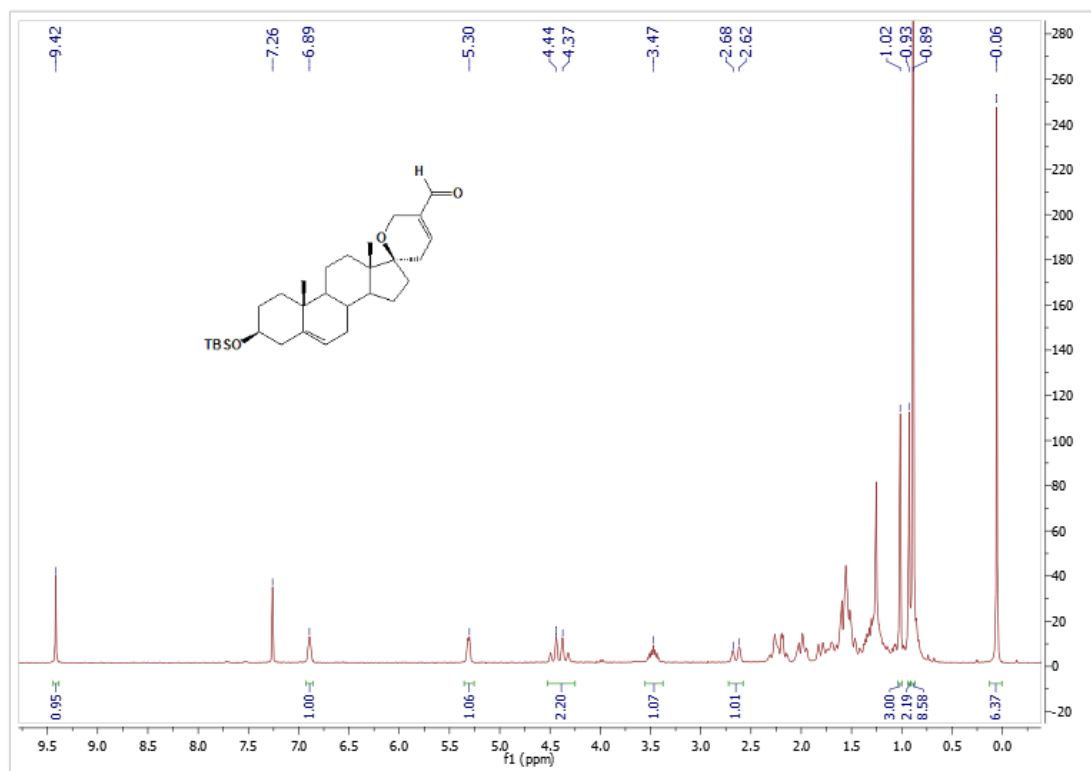


Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **9**





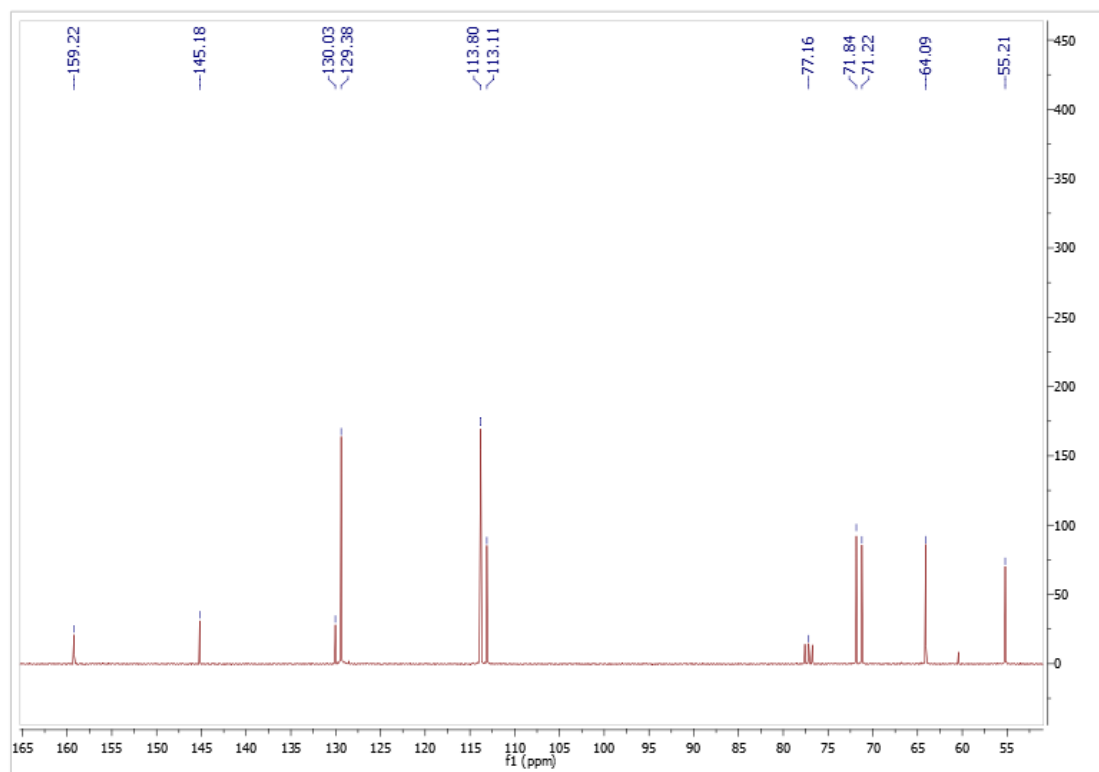
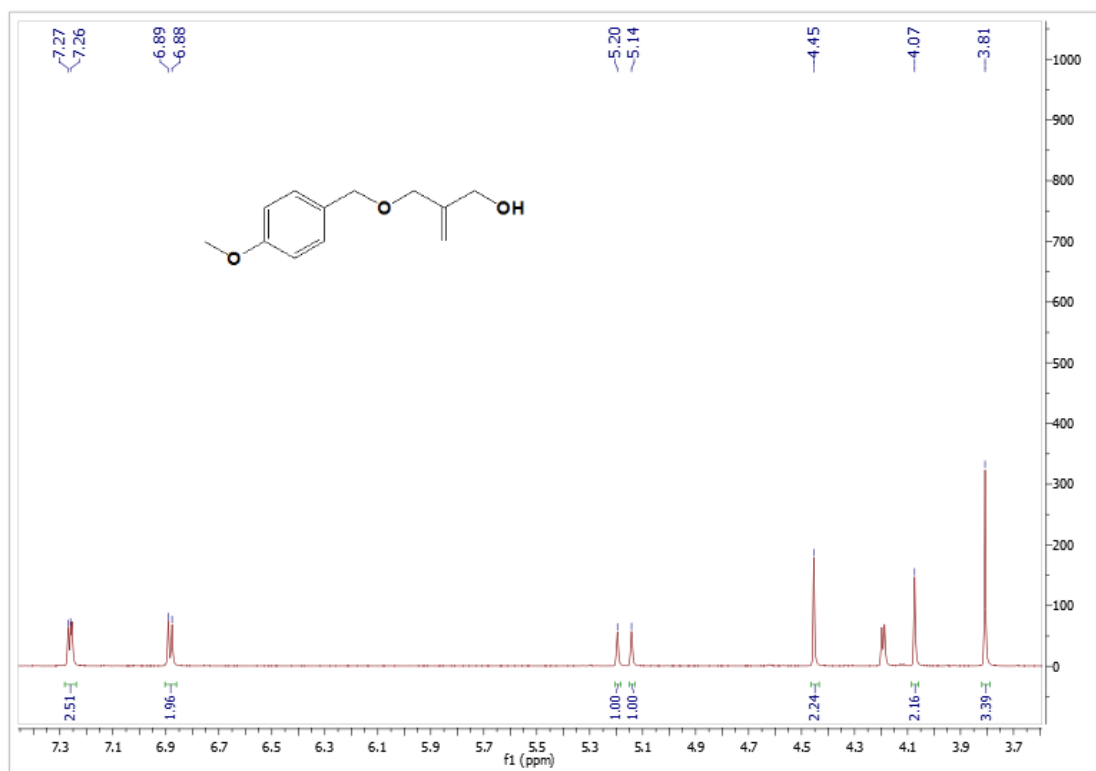
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 10



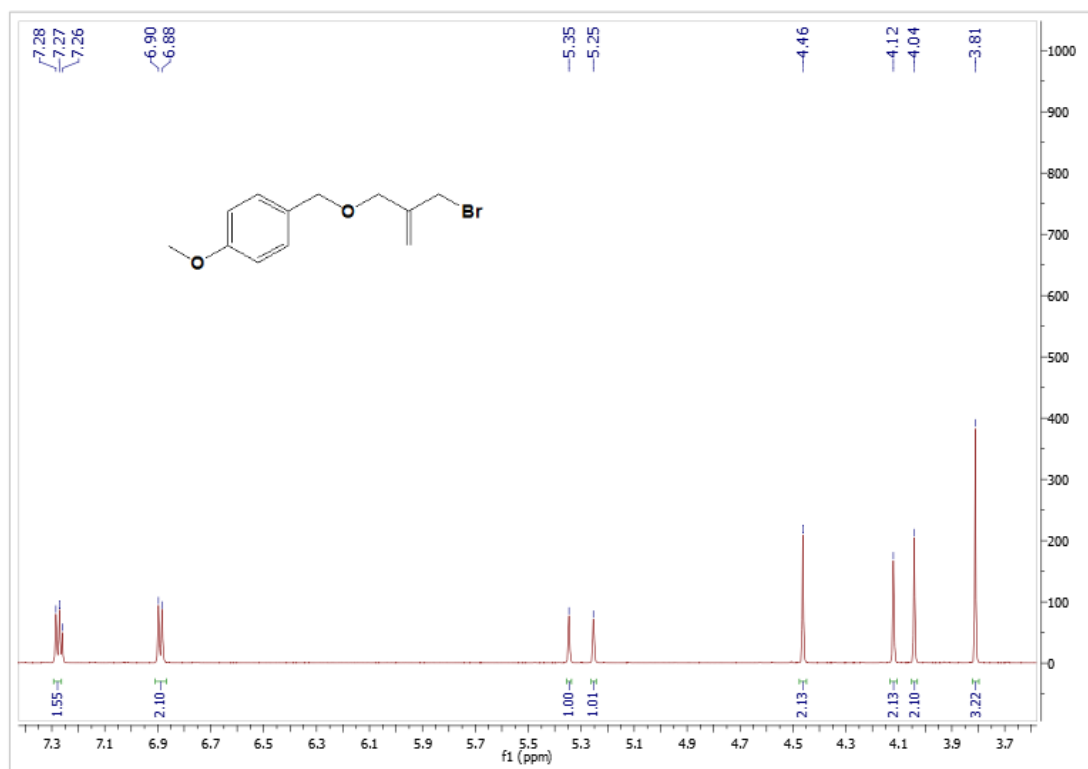
Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 11



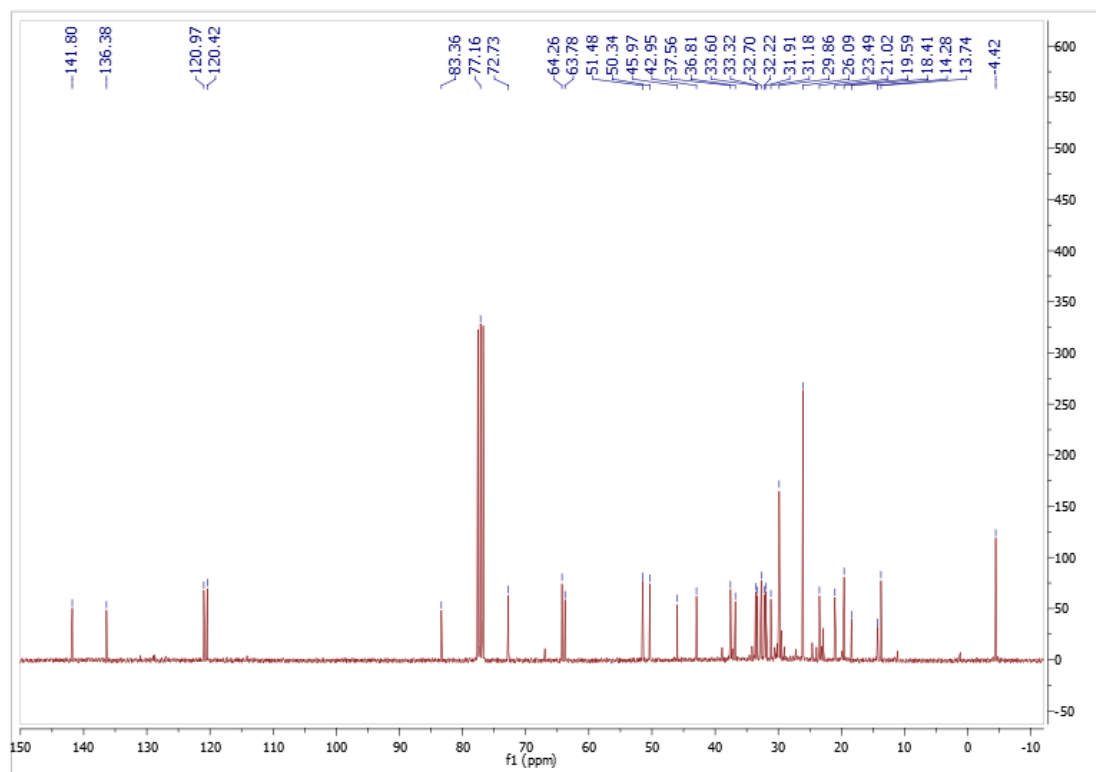
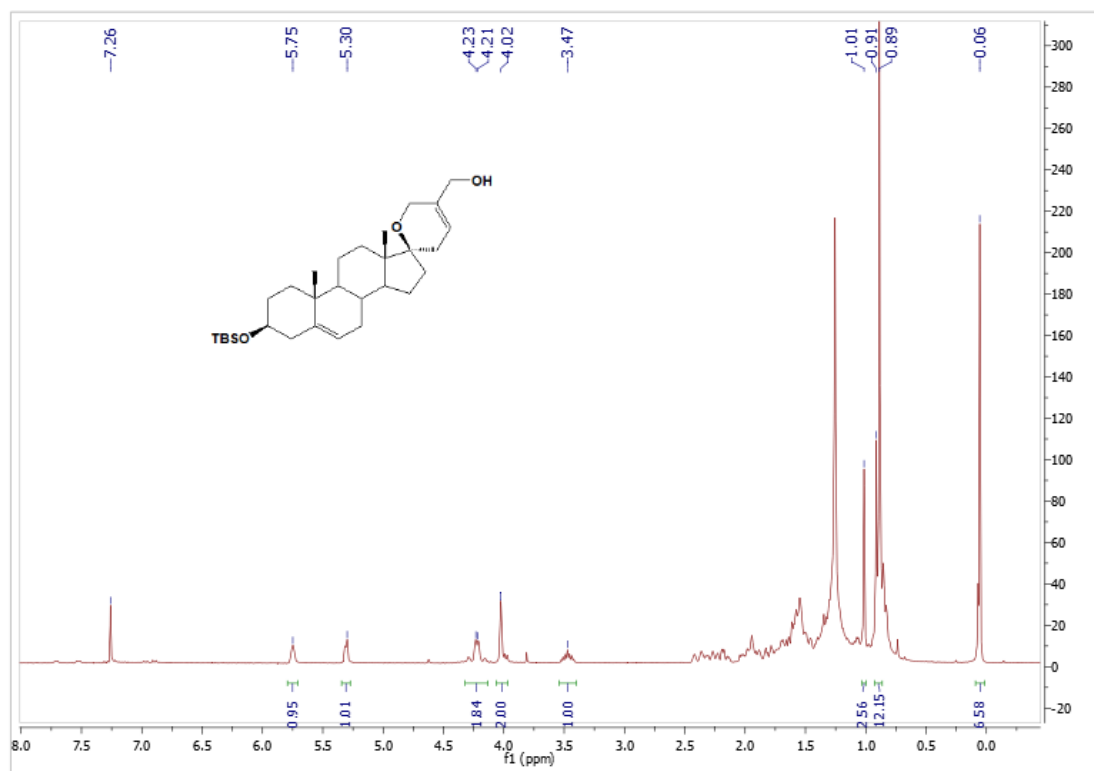
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 12



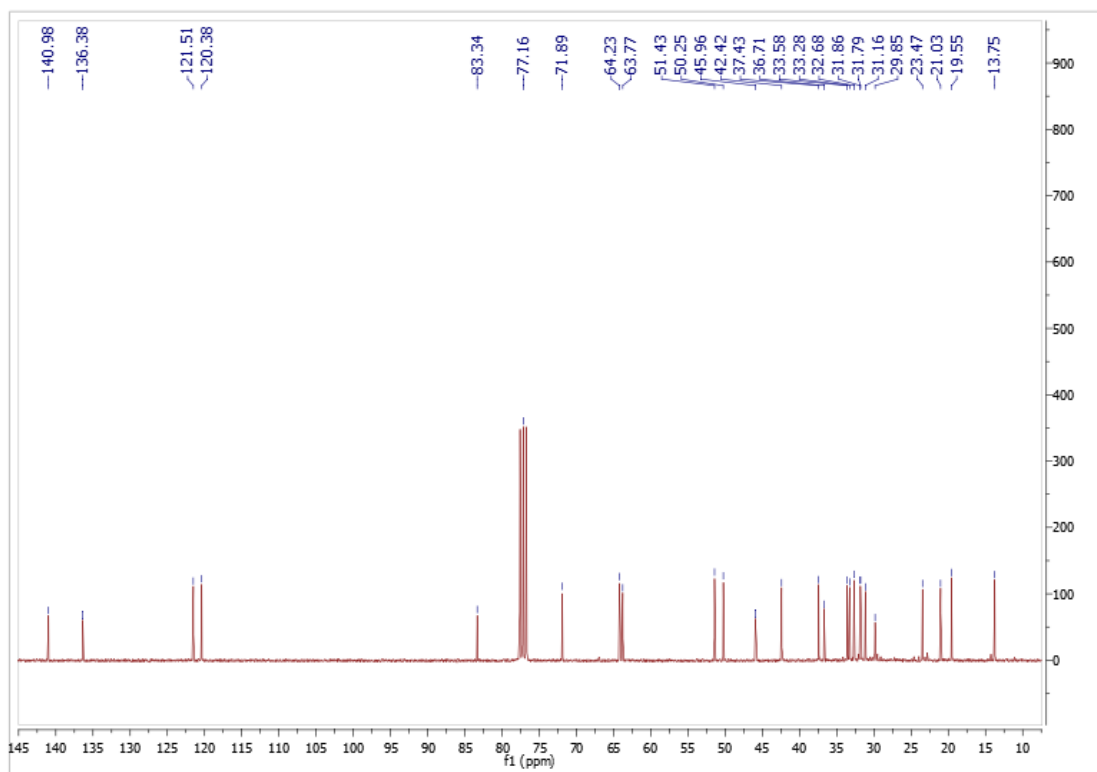
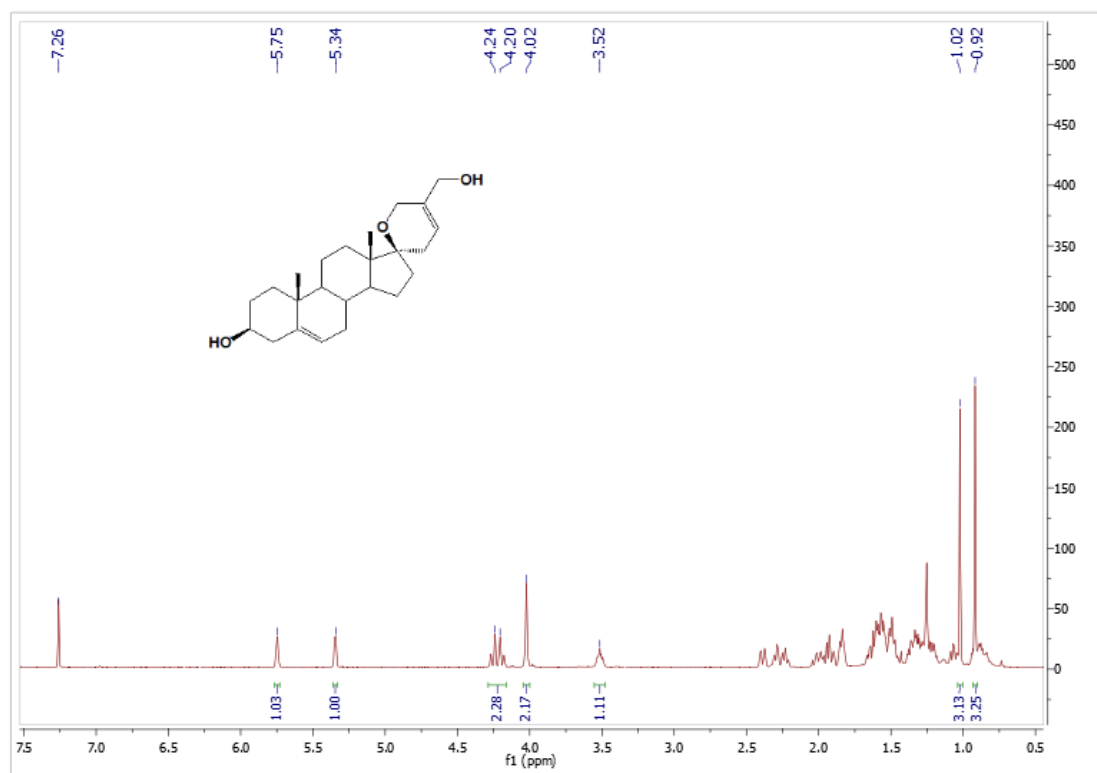
Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 13



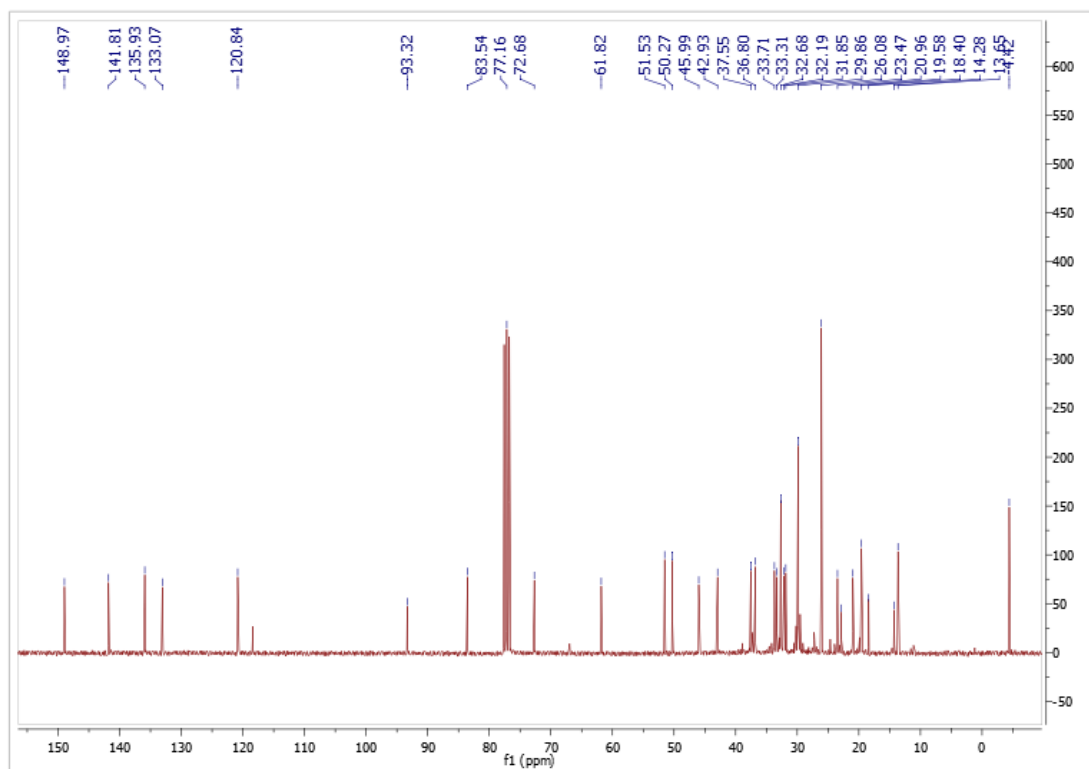
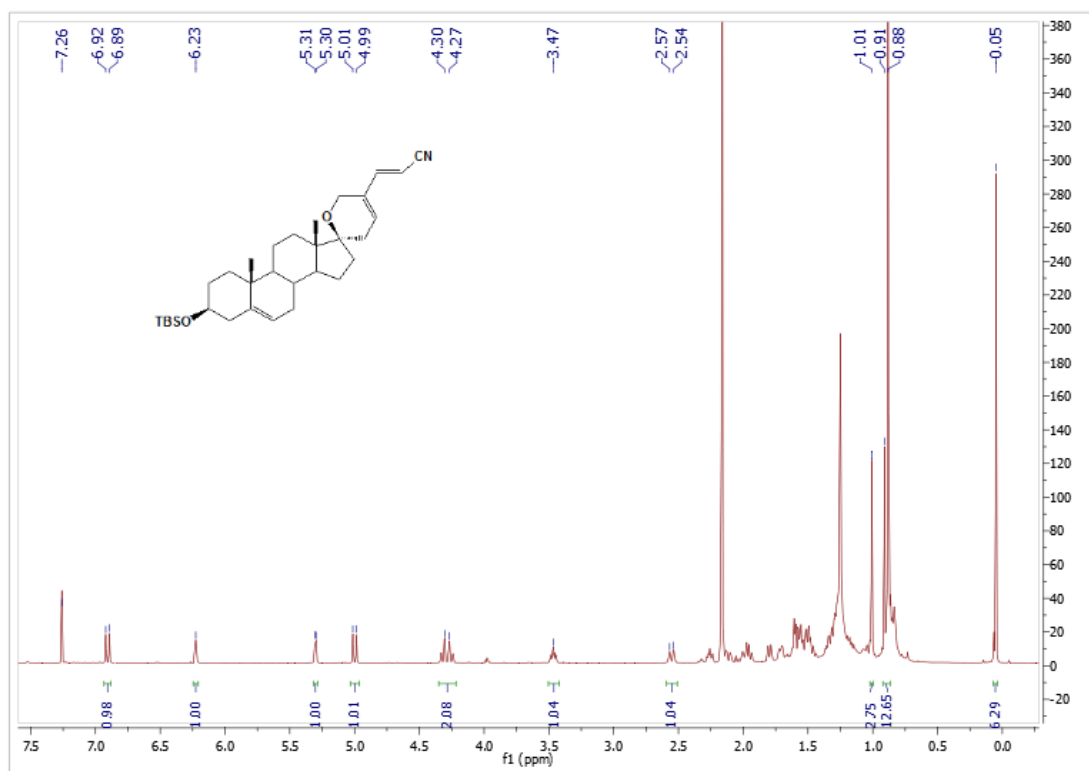
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **14**



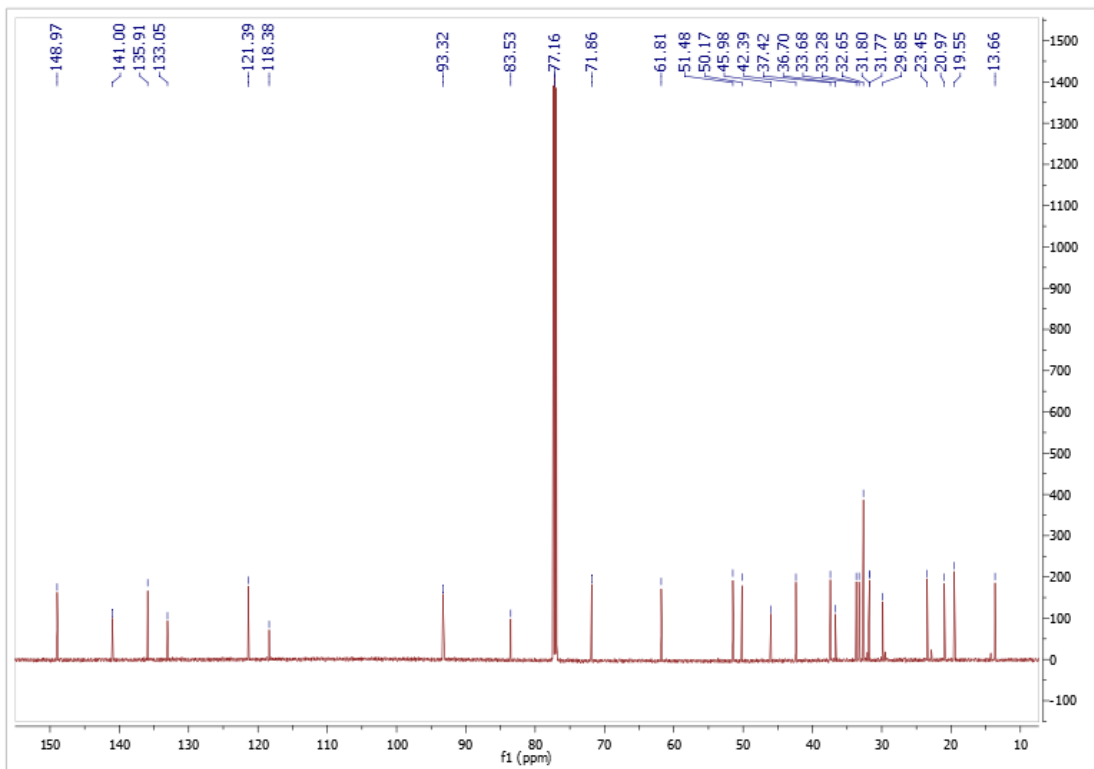
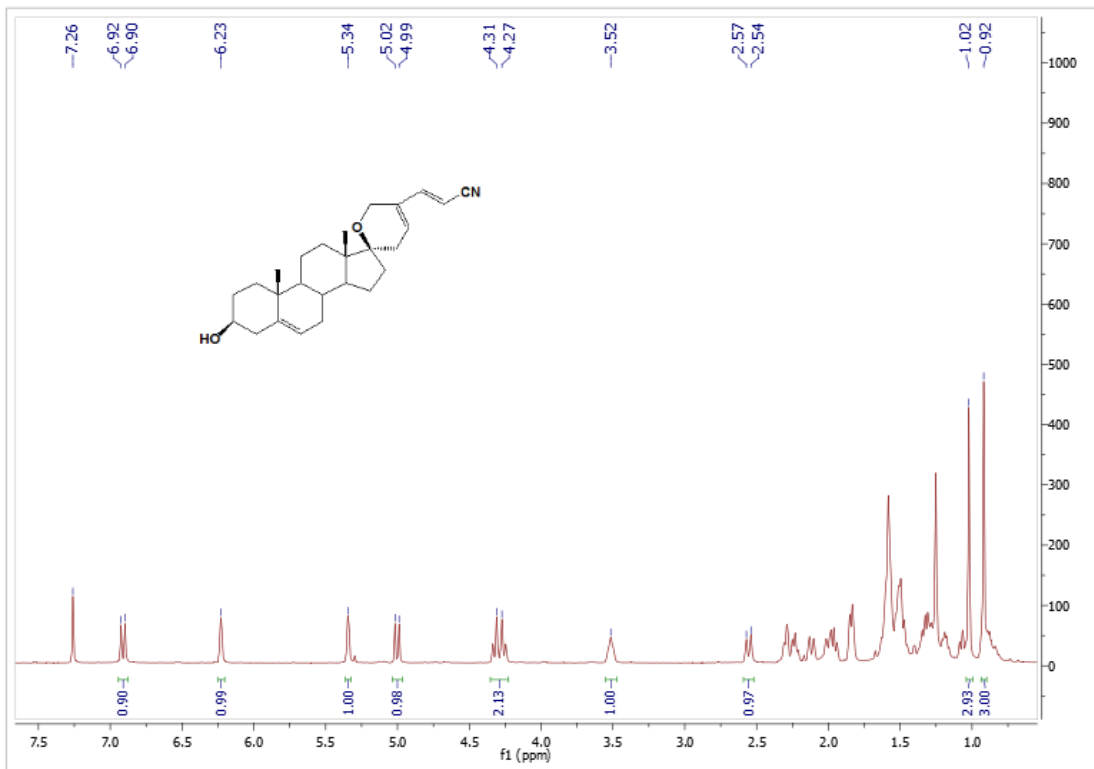
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 15



Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **16**

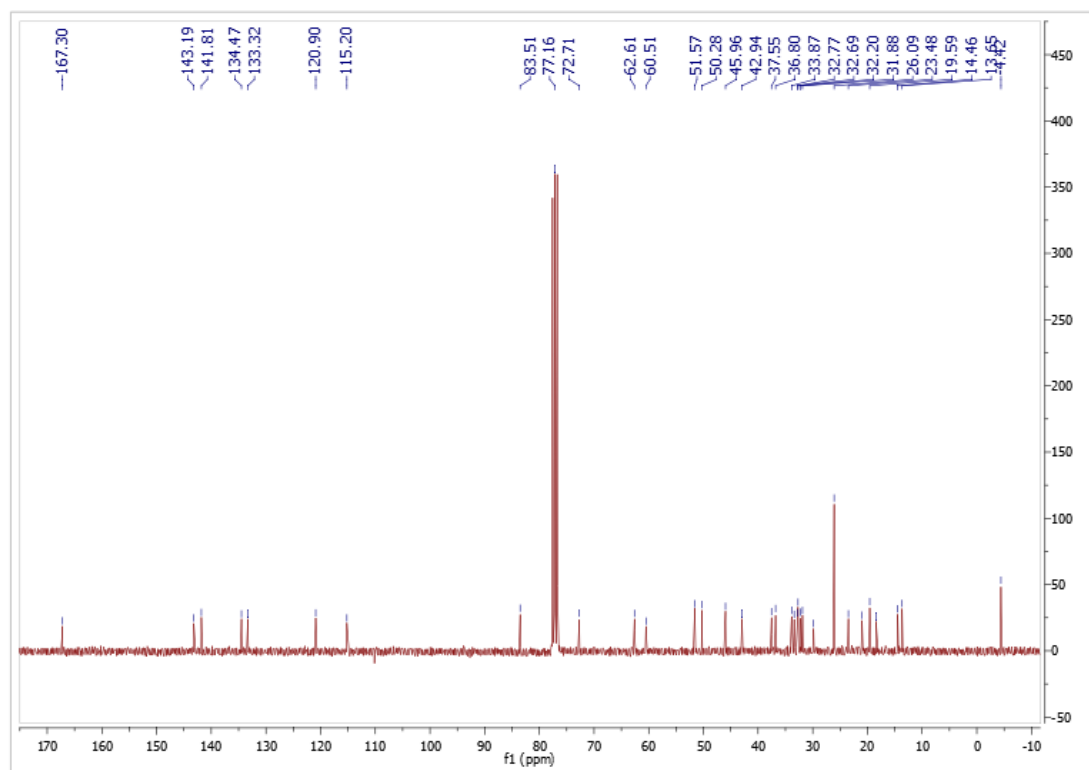
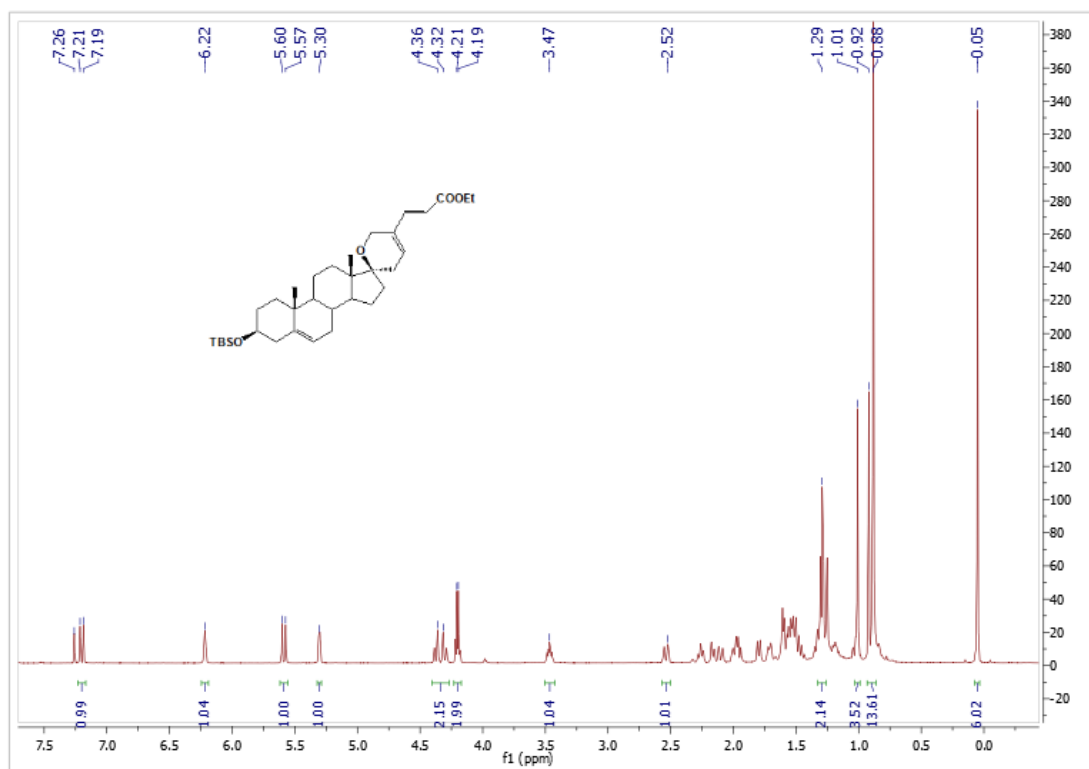


Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 17

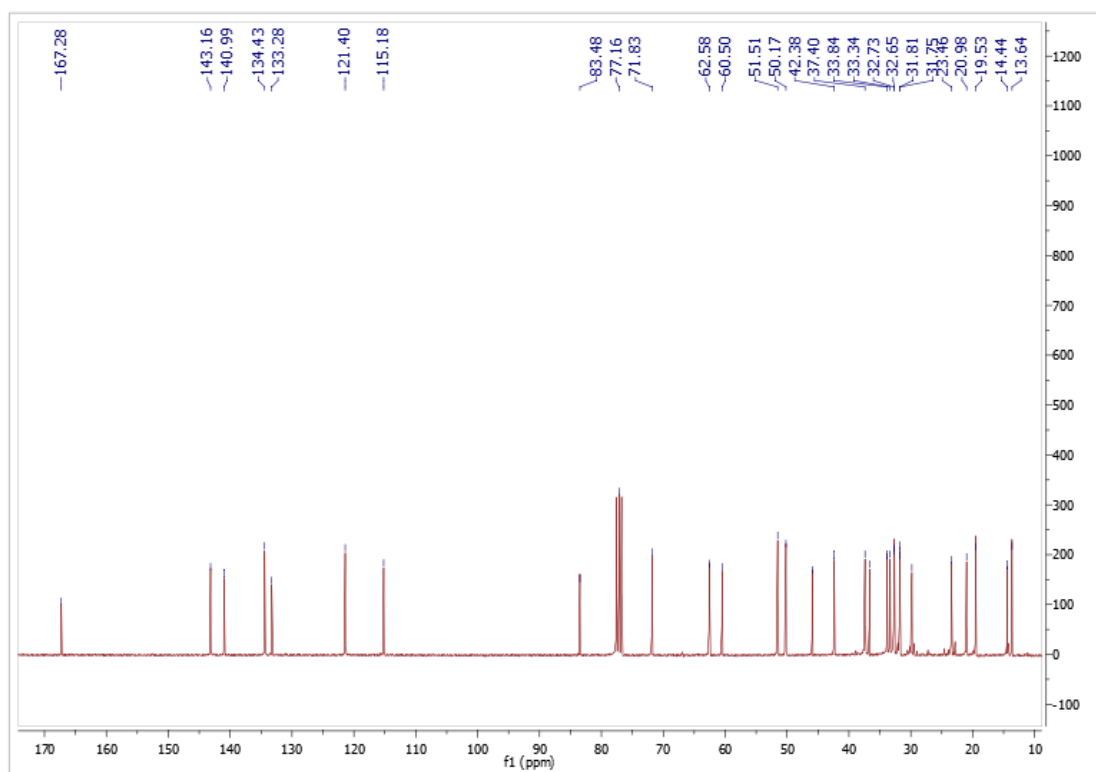
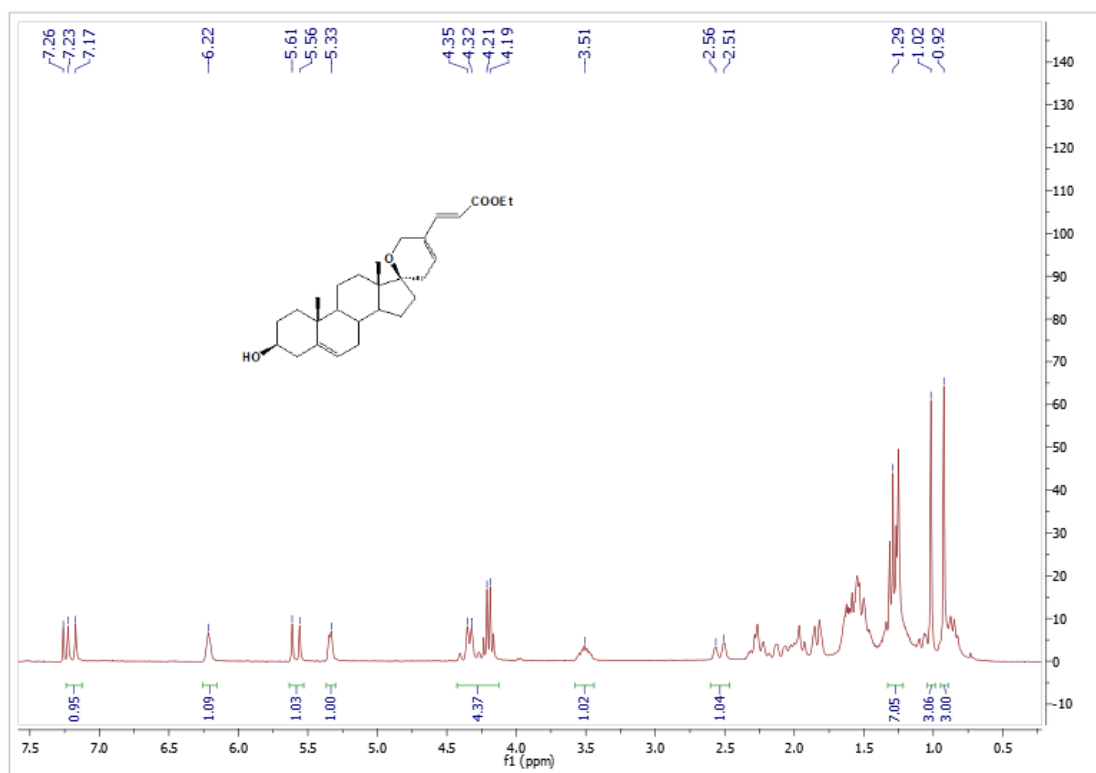




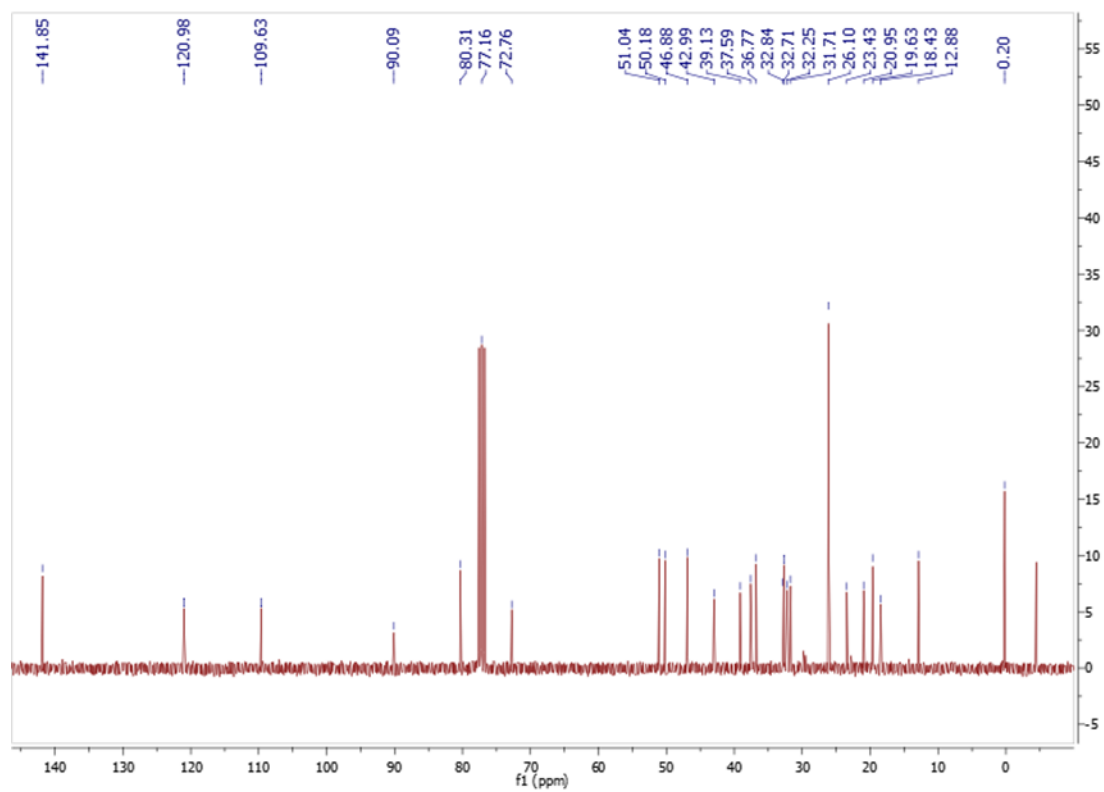
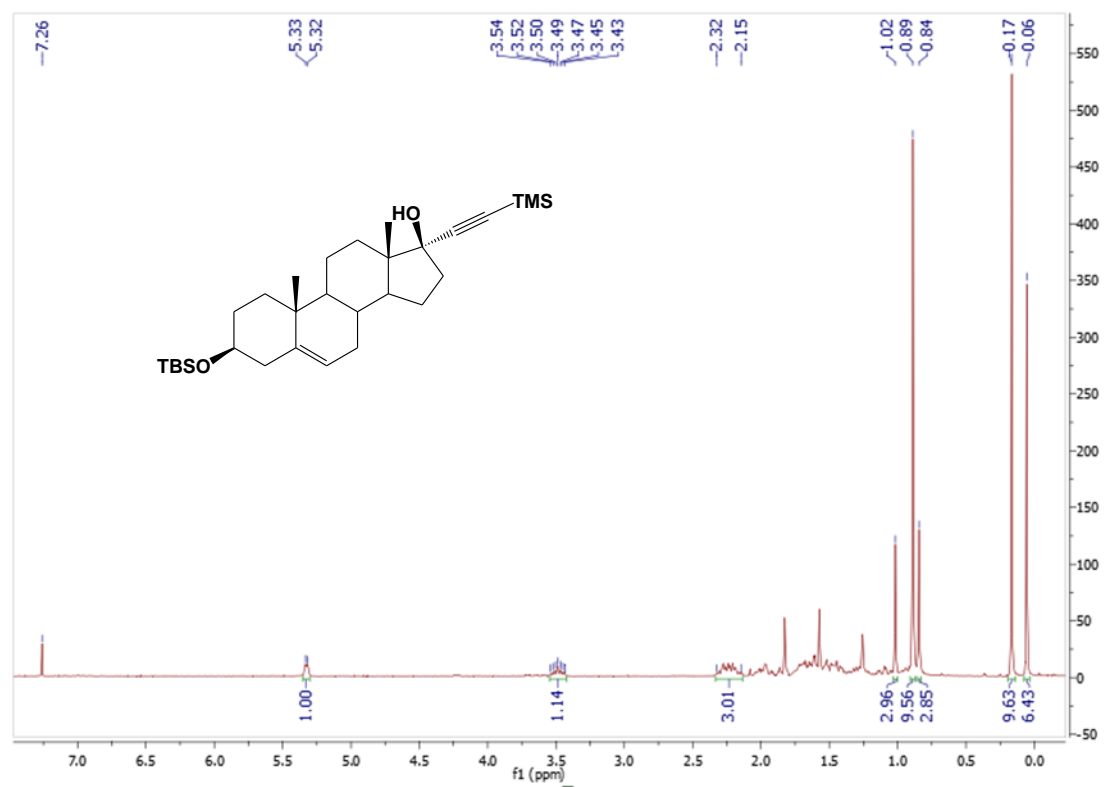
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **18**



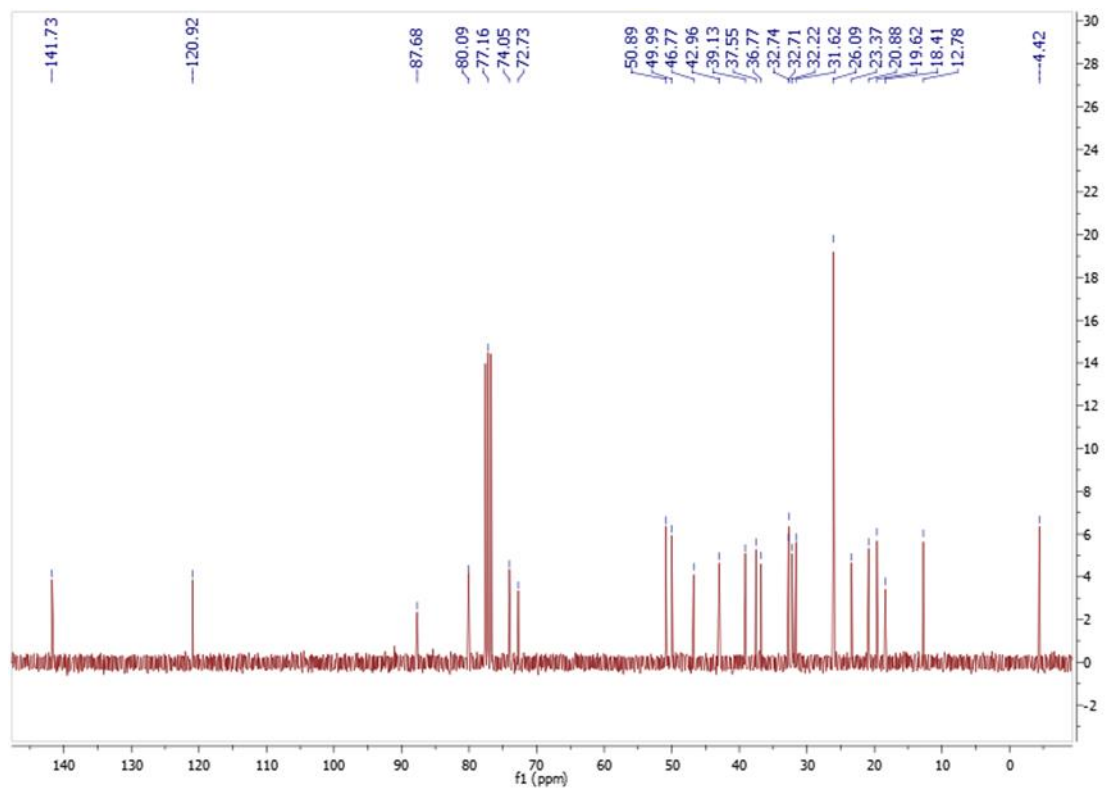
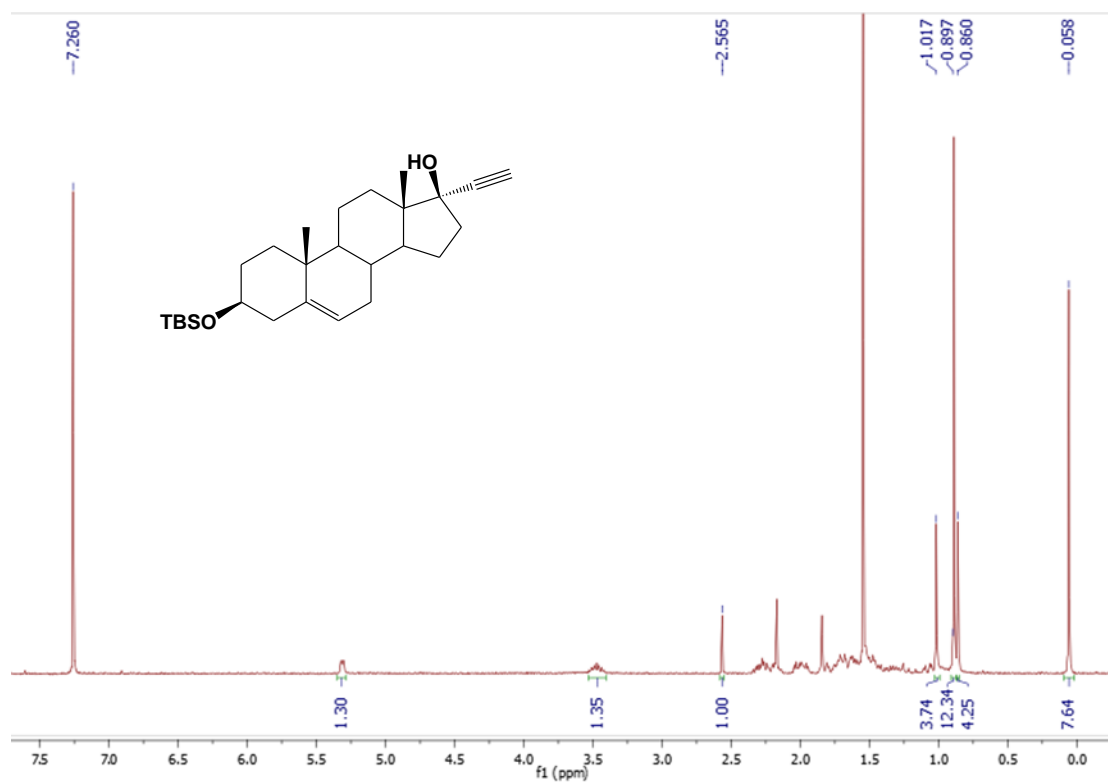
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 19



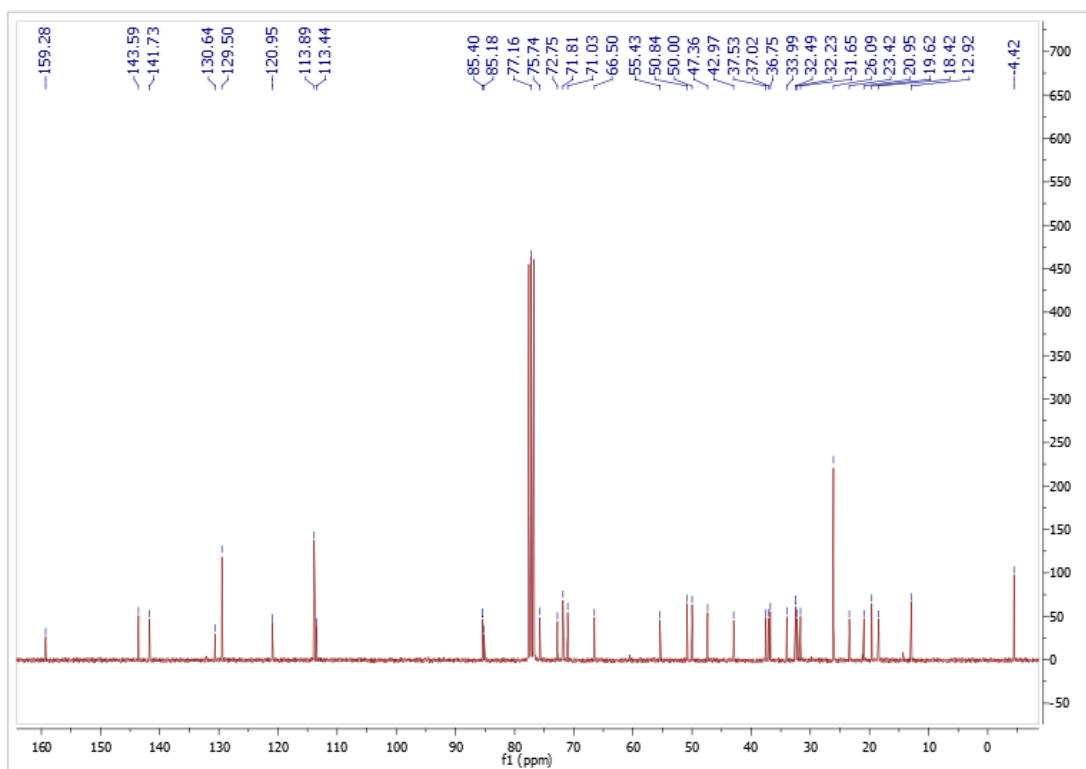
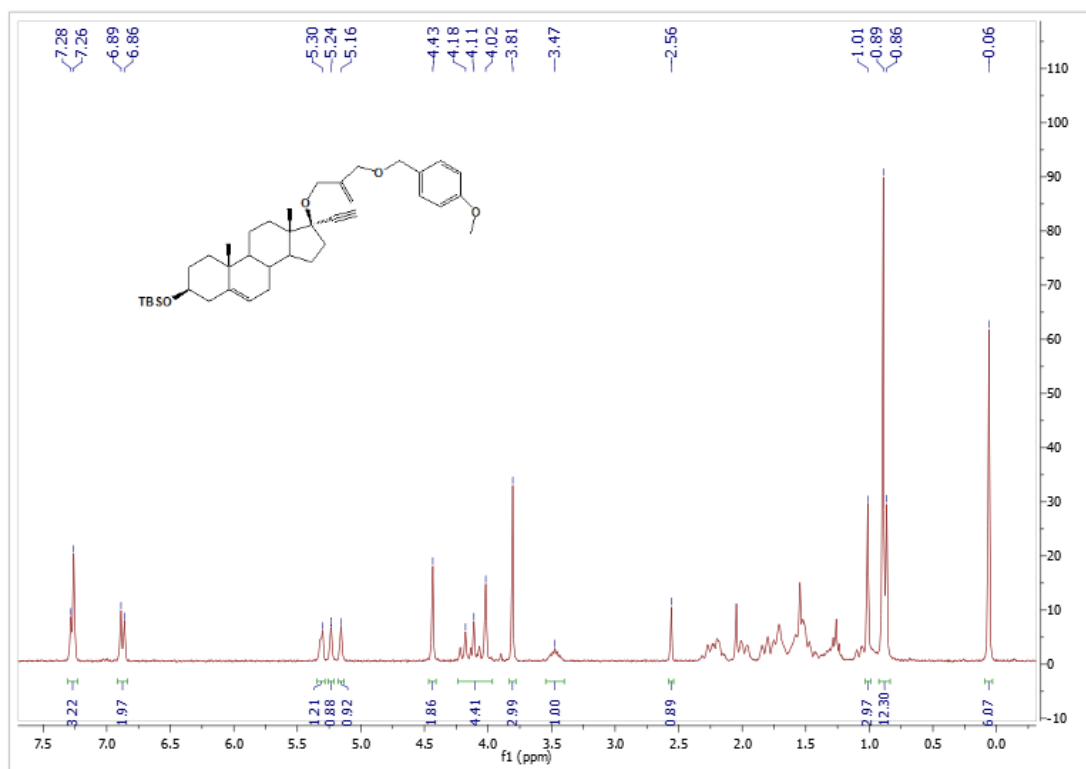
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **20**



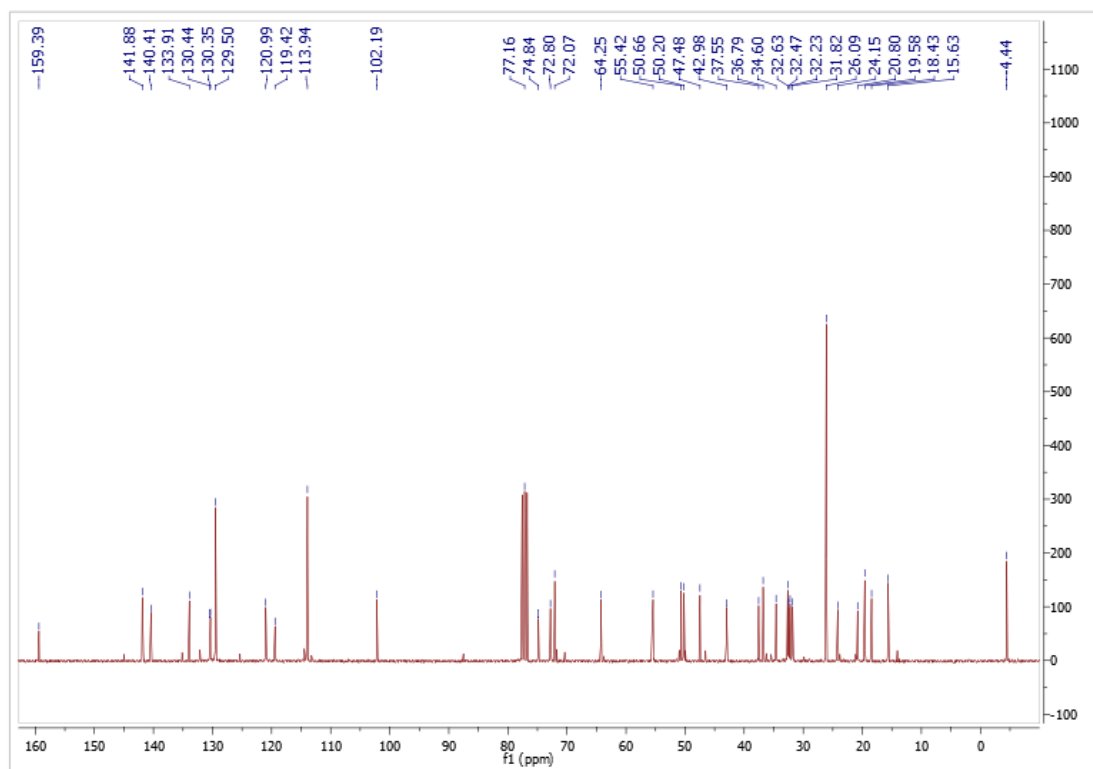
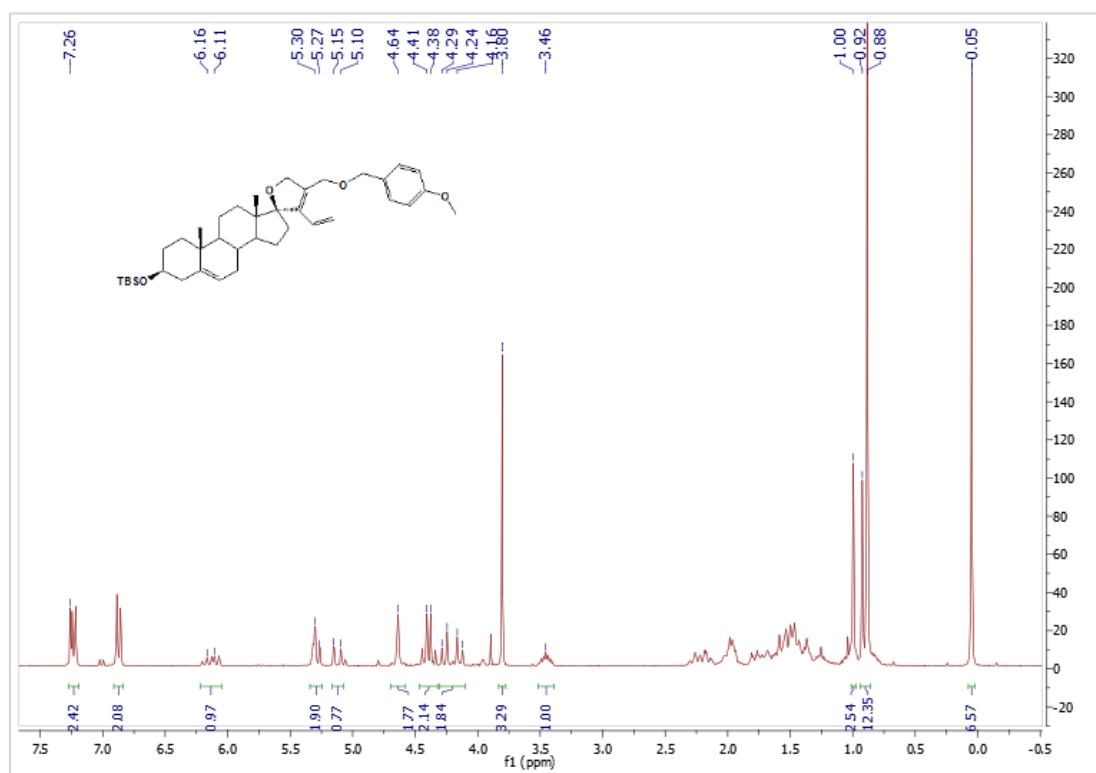
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 21



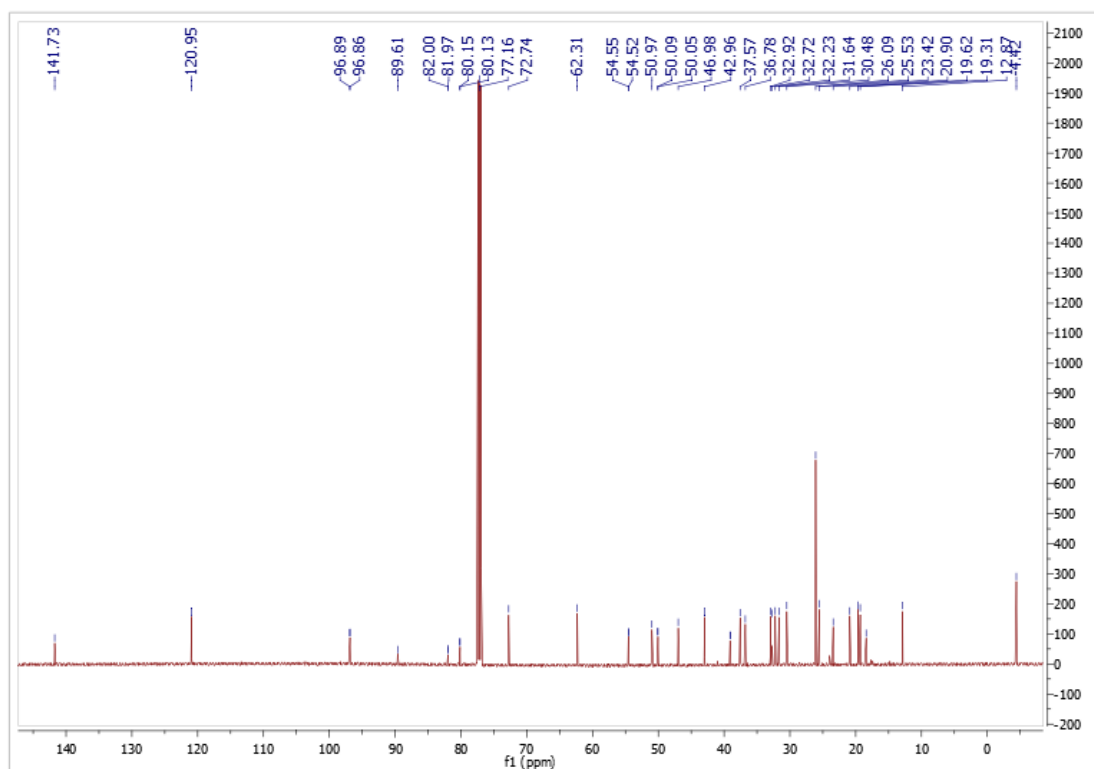
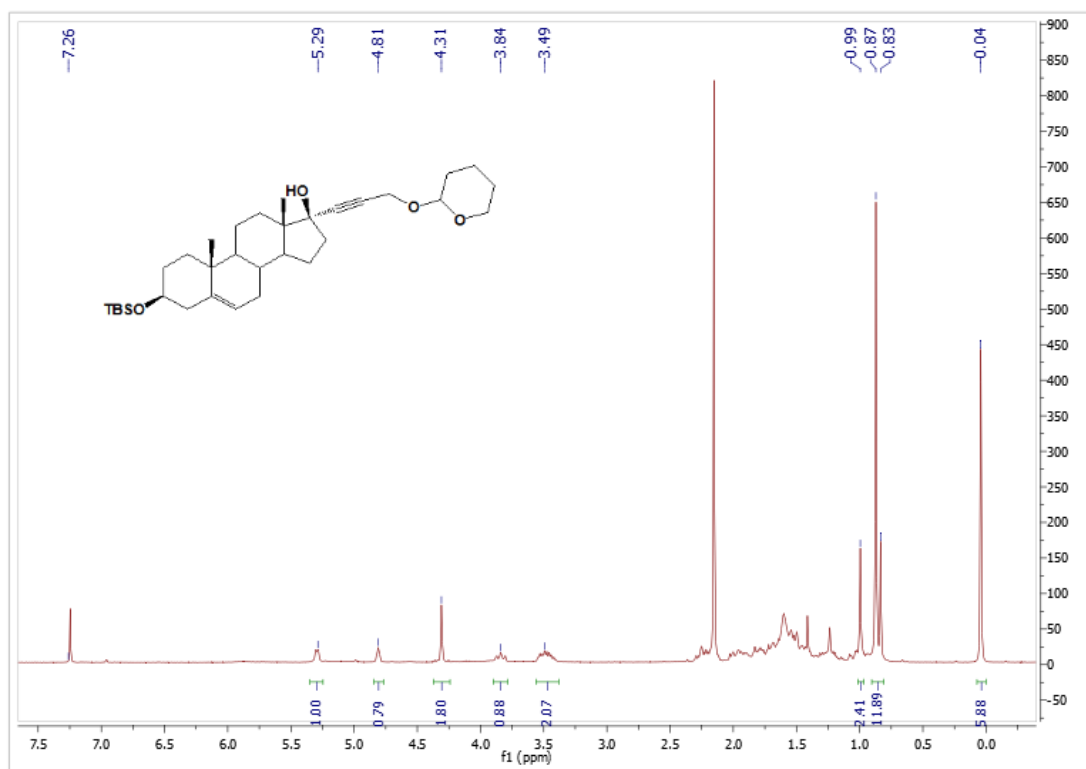
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **22**



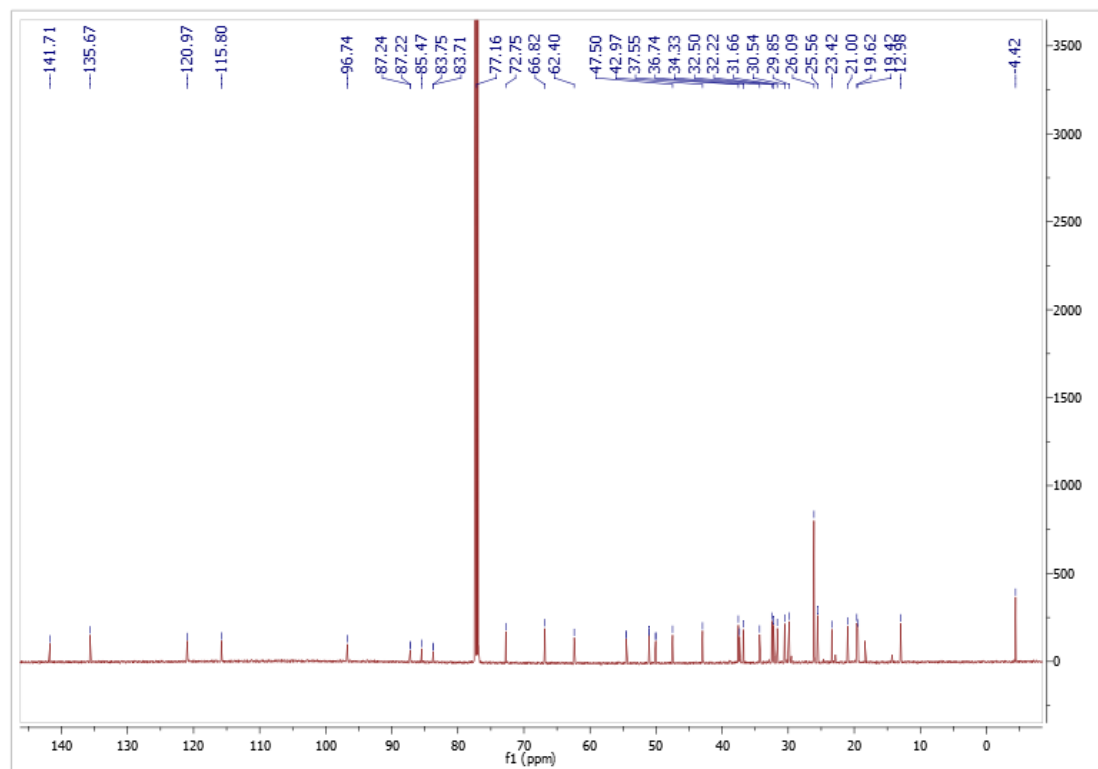
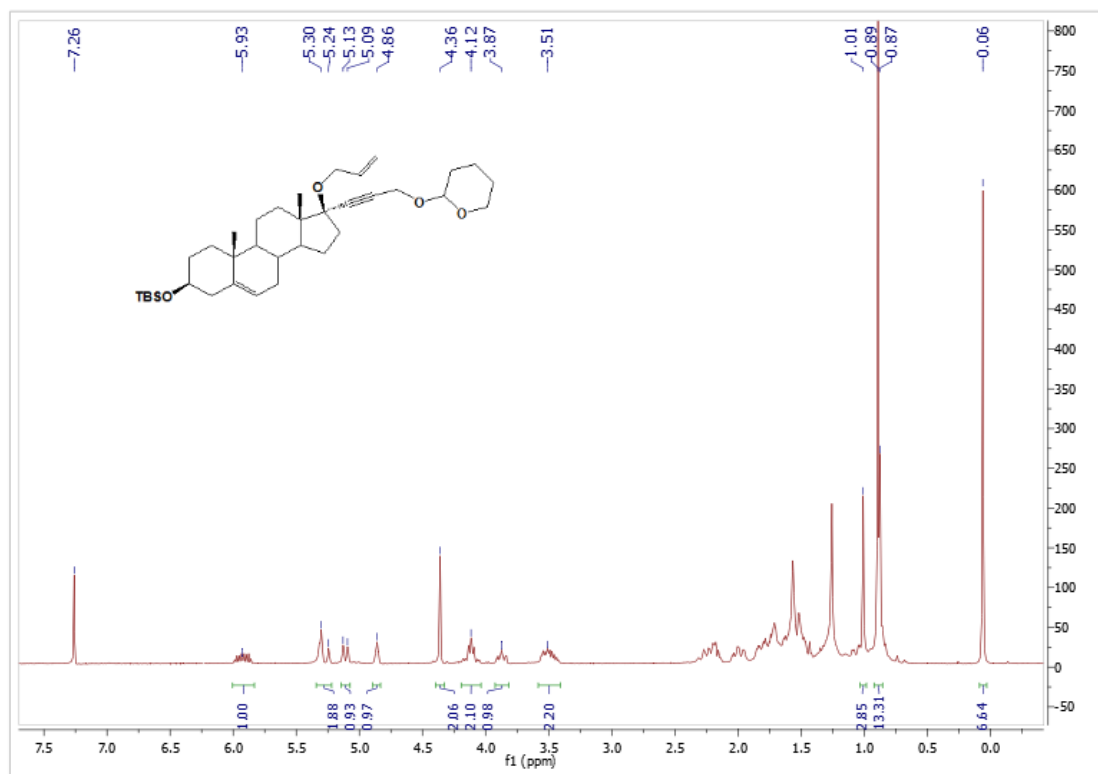
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **23**



Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **26**

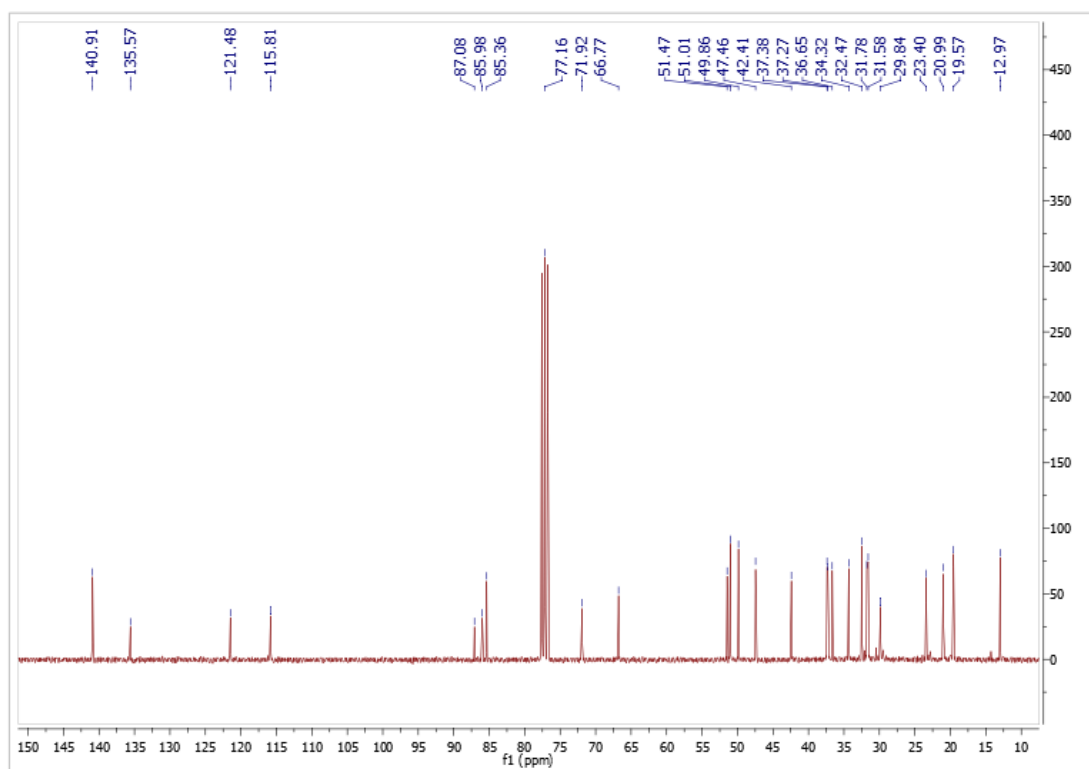
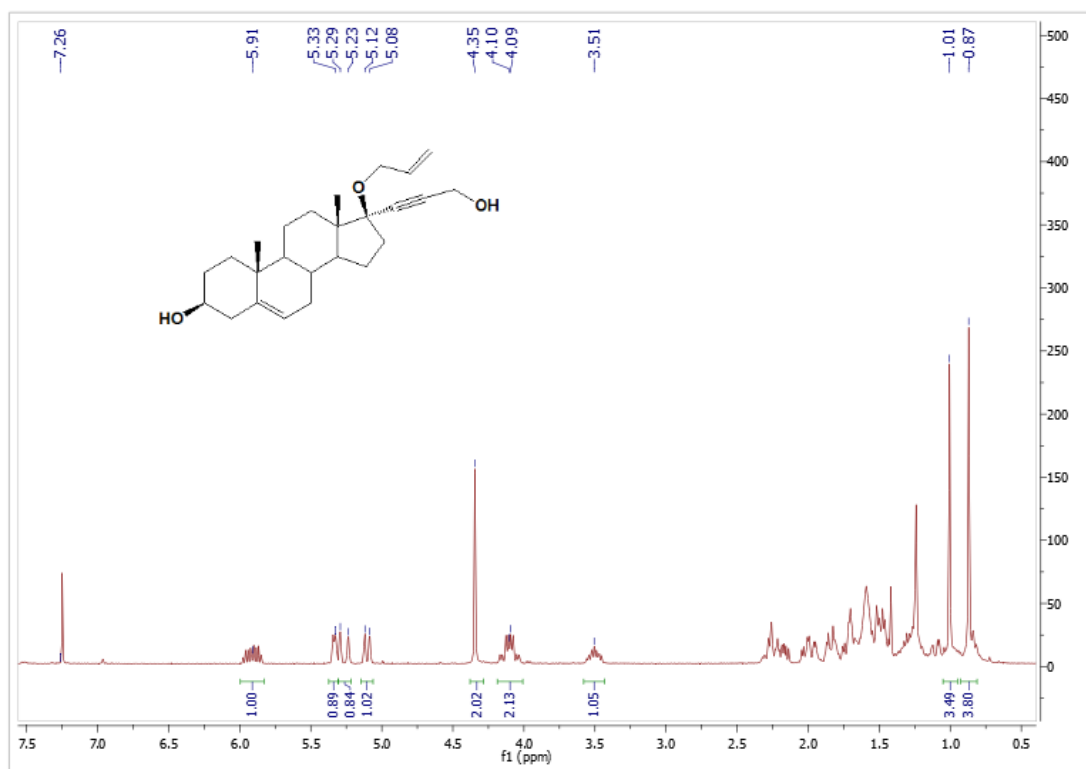


Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **27**

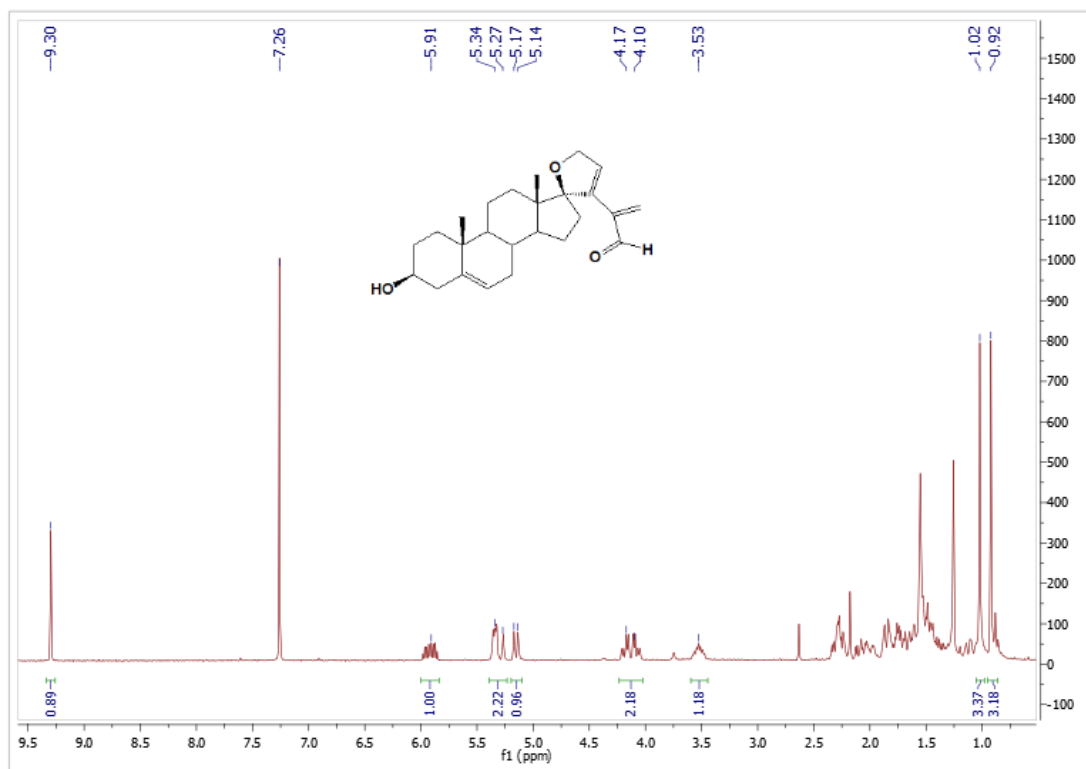




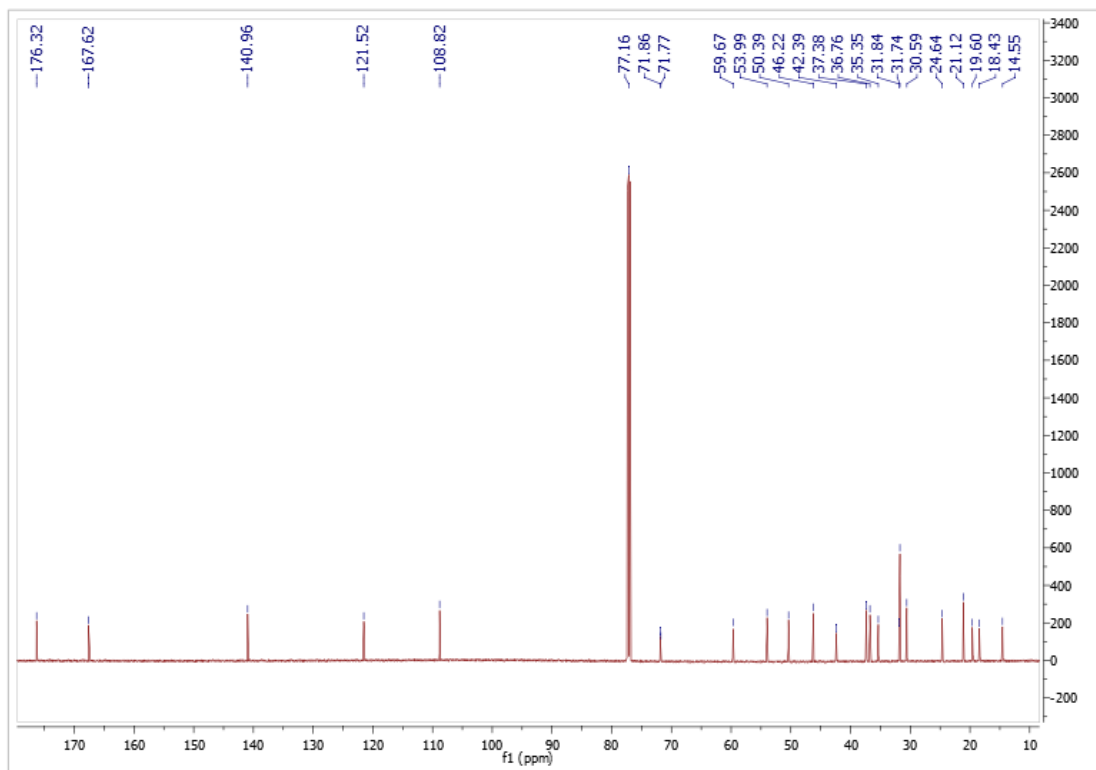
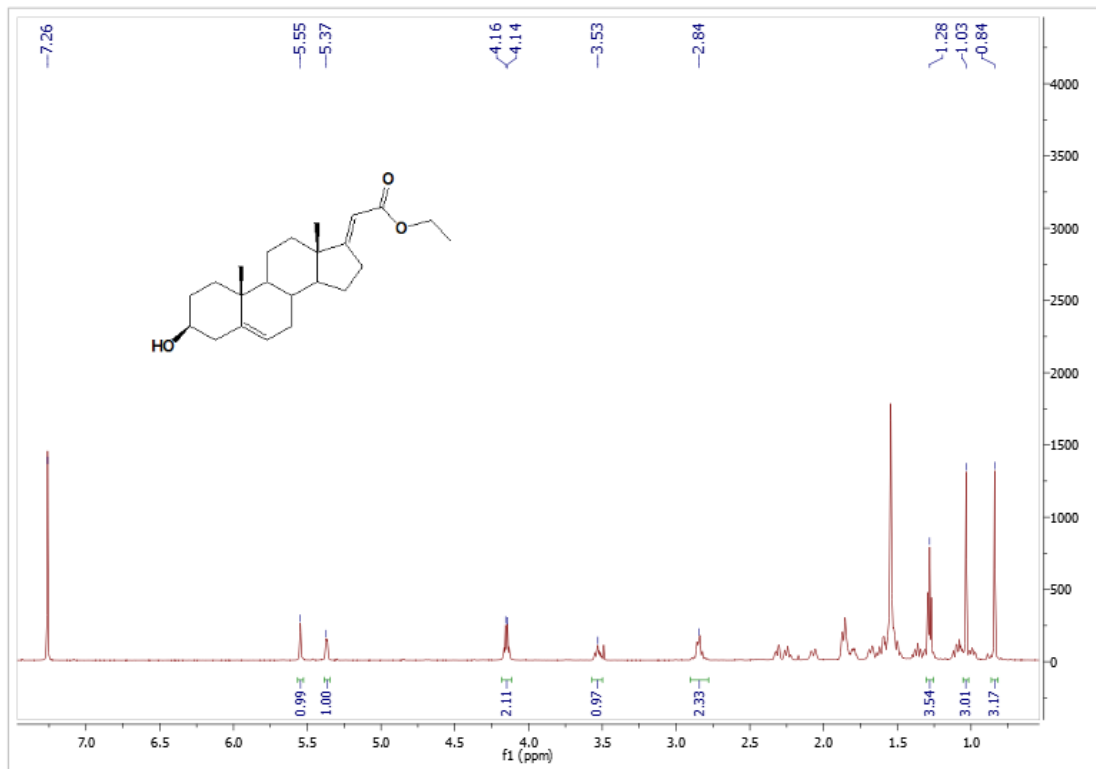
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **28**



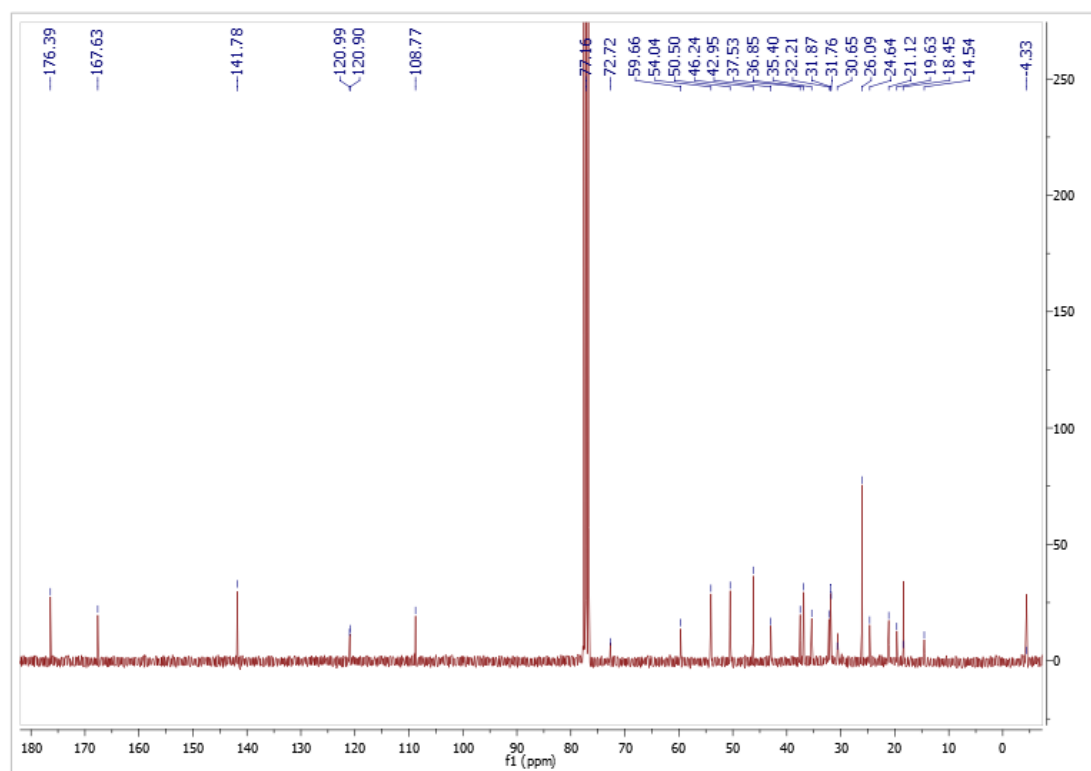
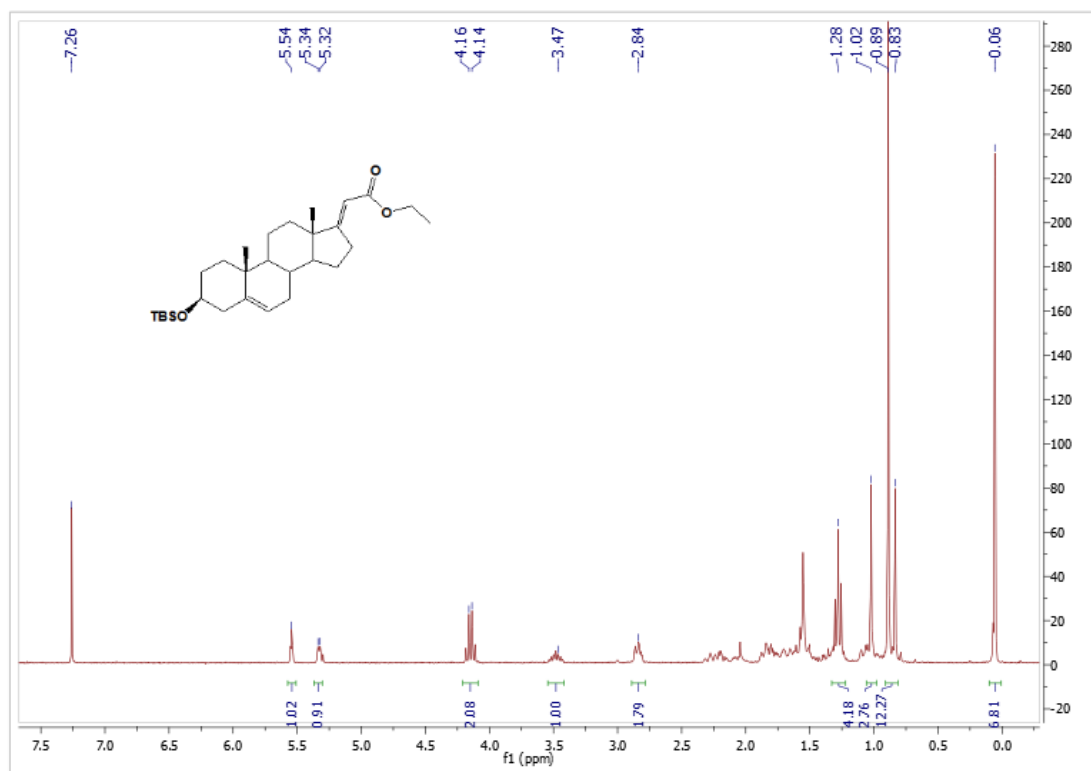
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **29**



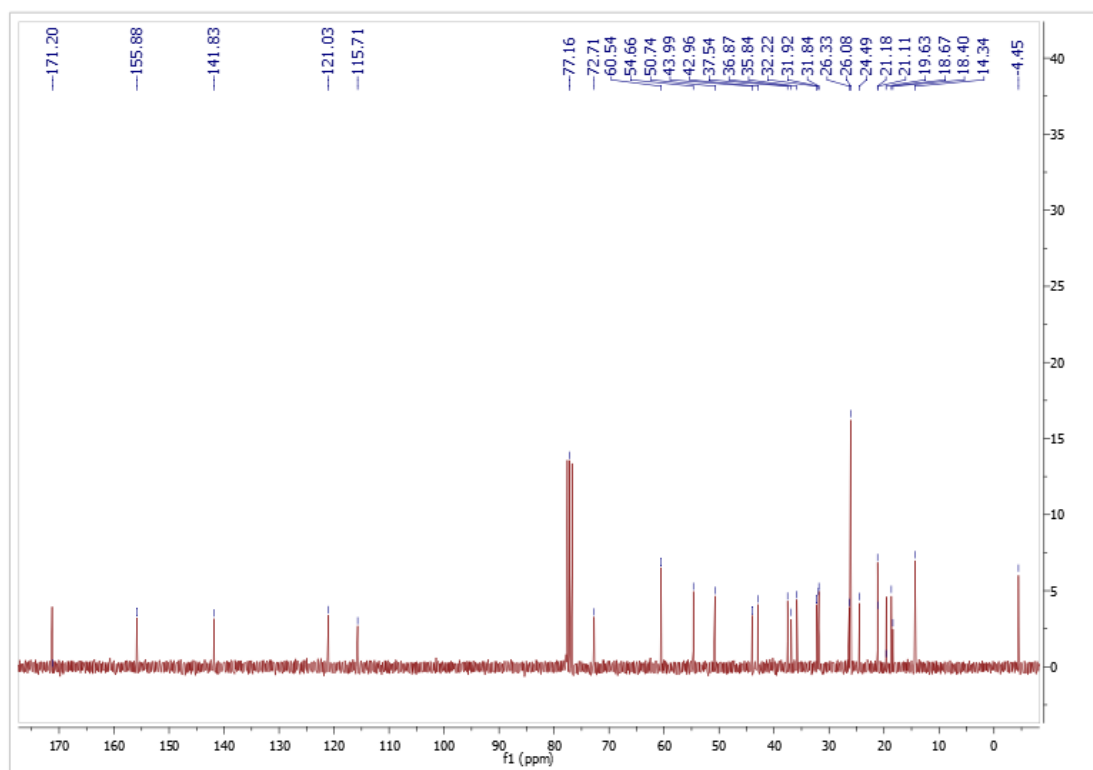
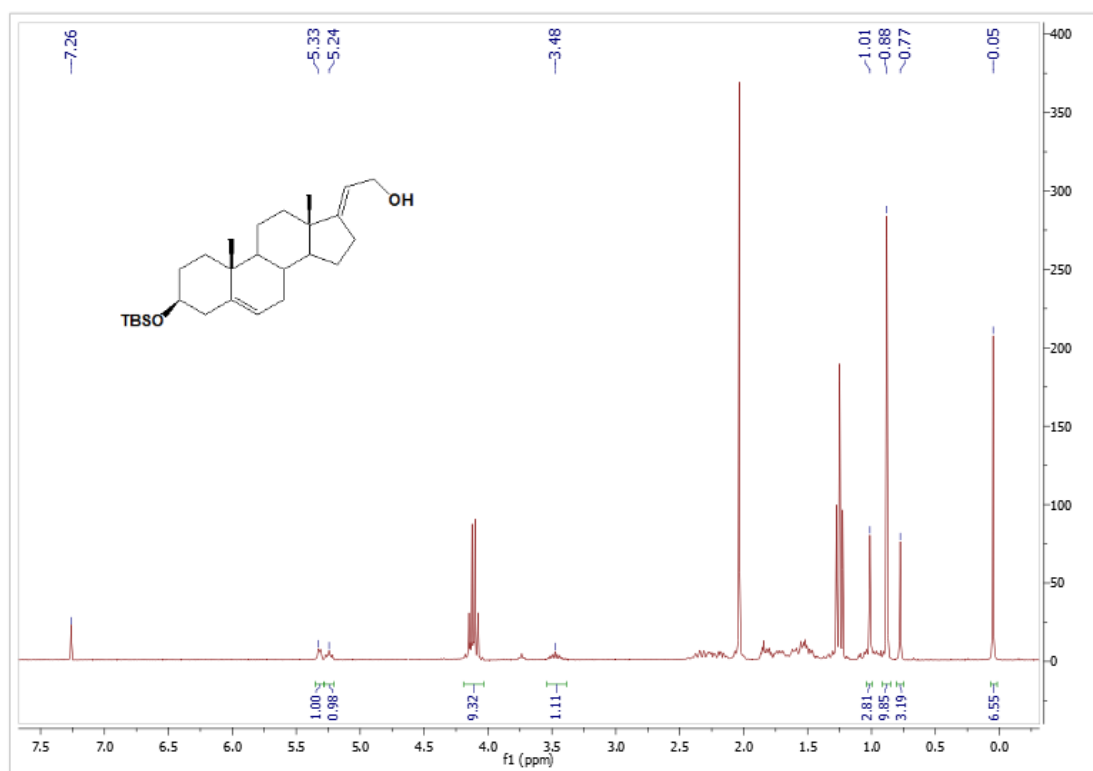
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **30**



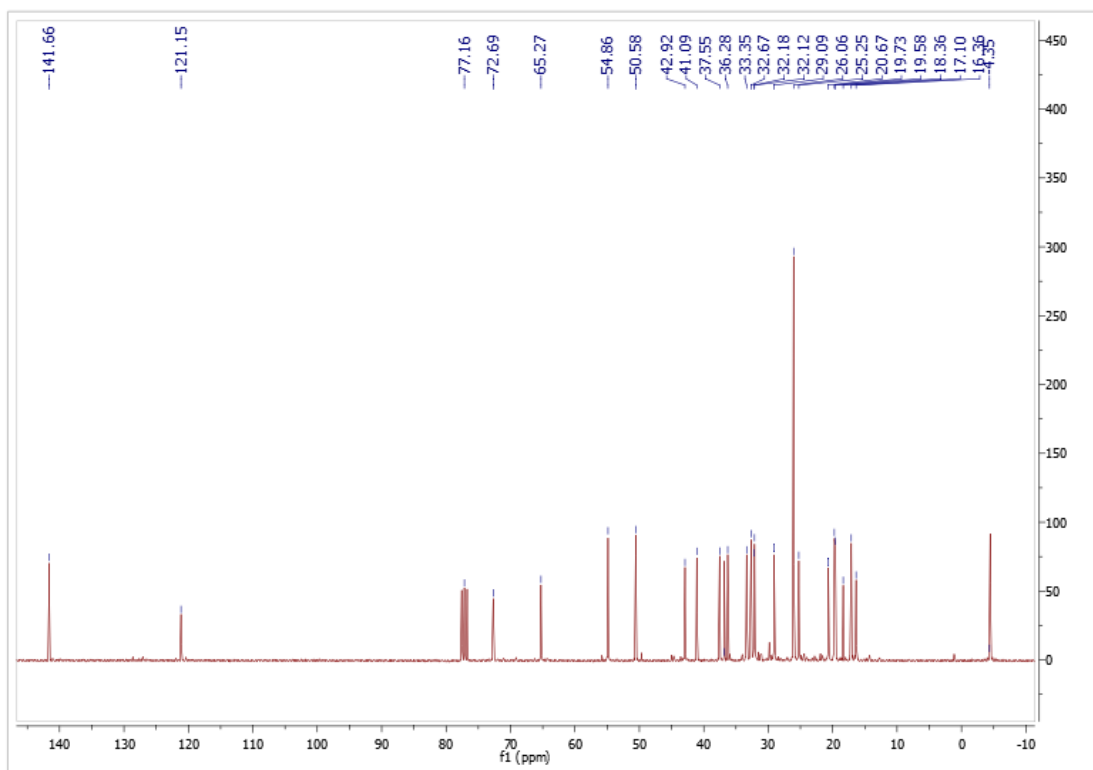
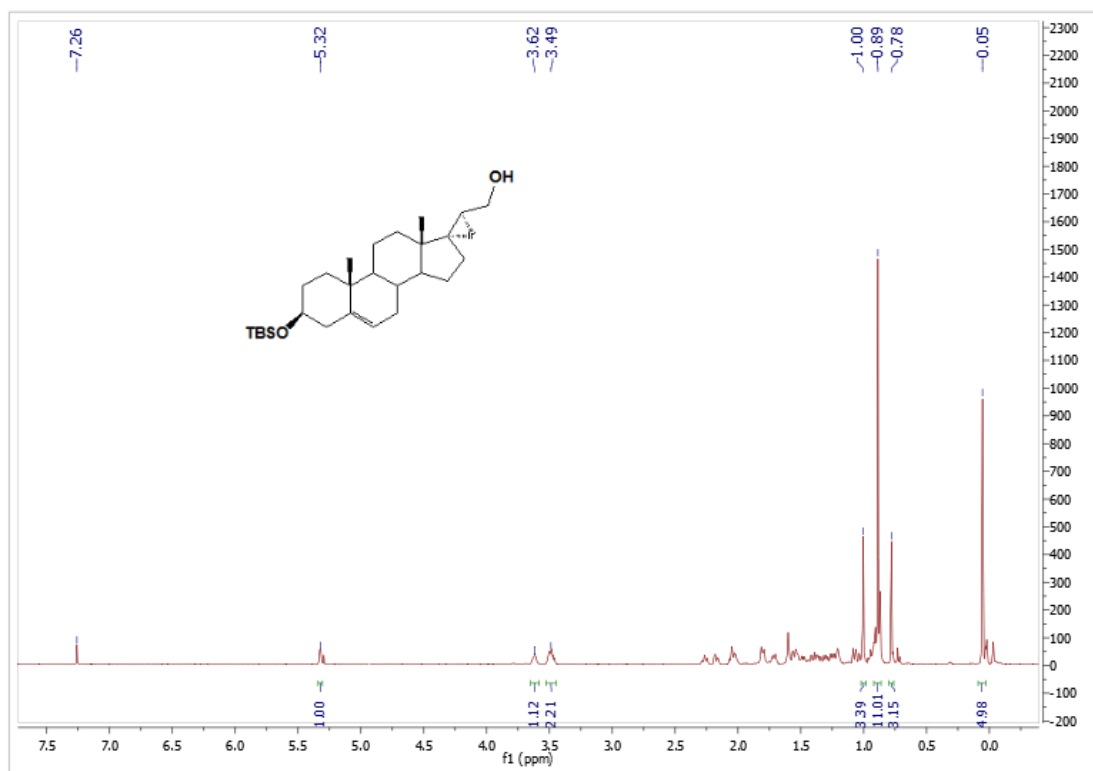
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 31



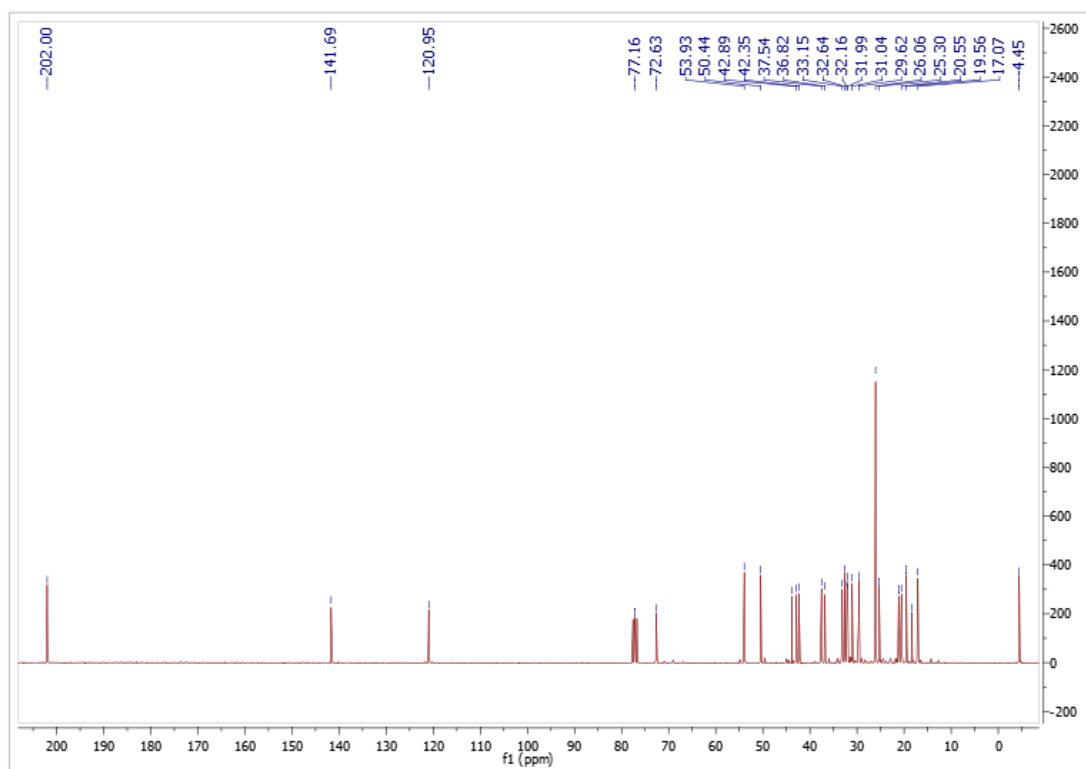
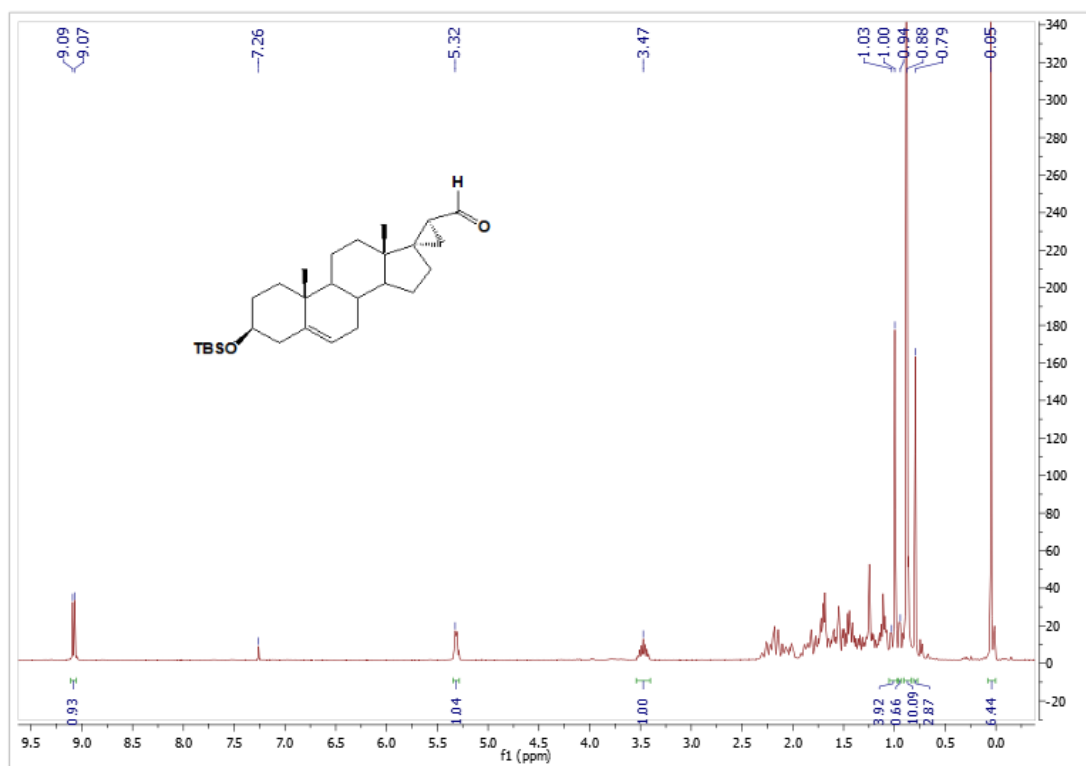
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **32**



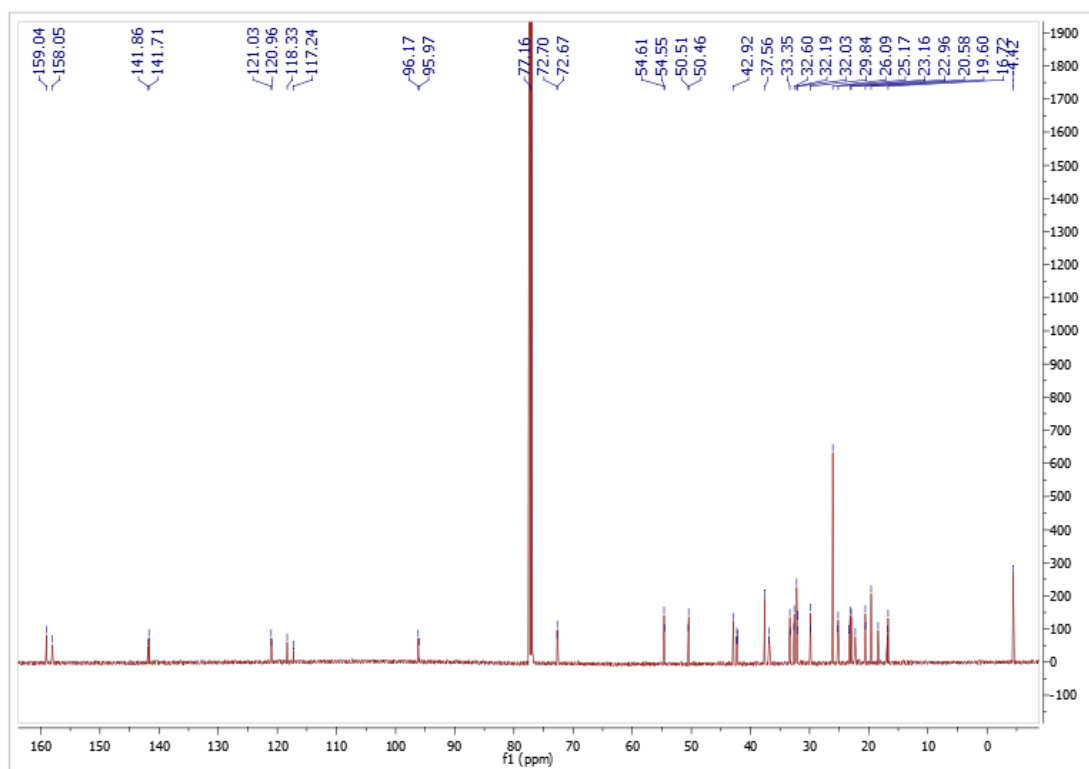
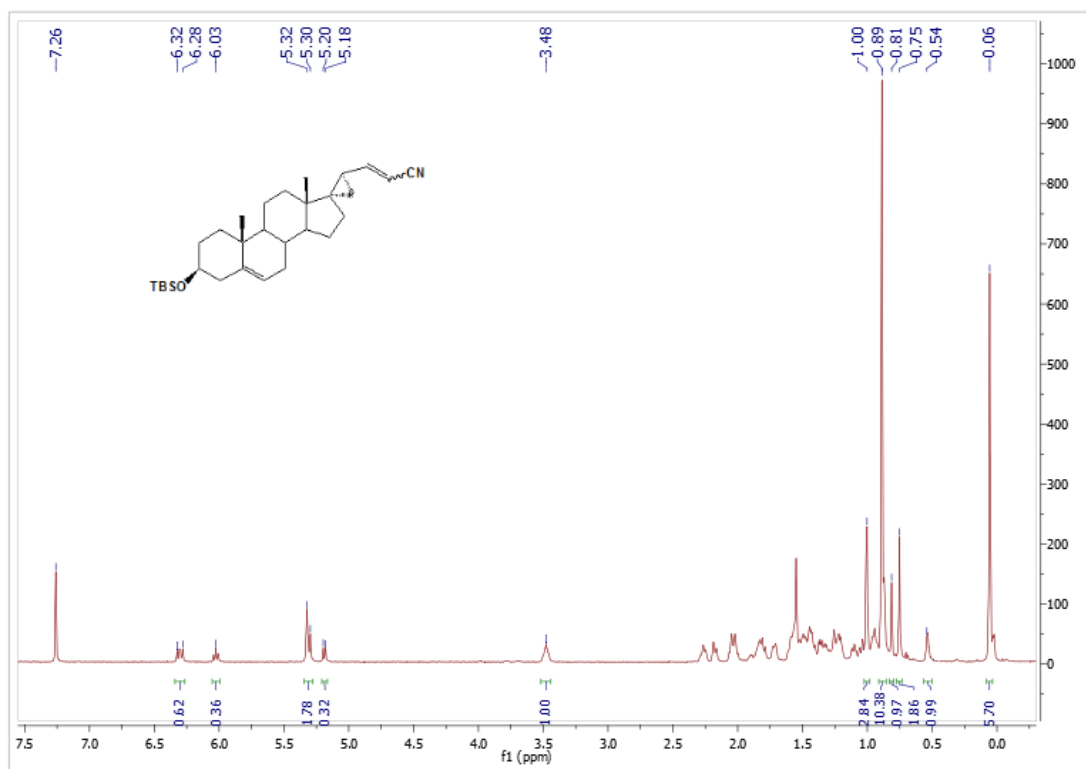
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **33**



Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **34**

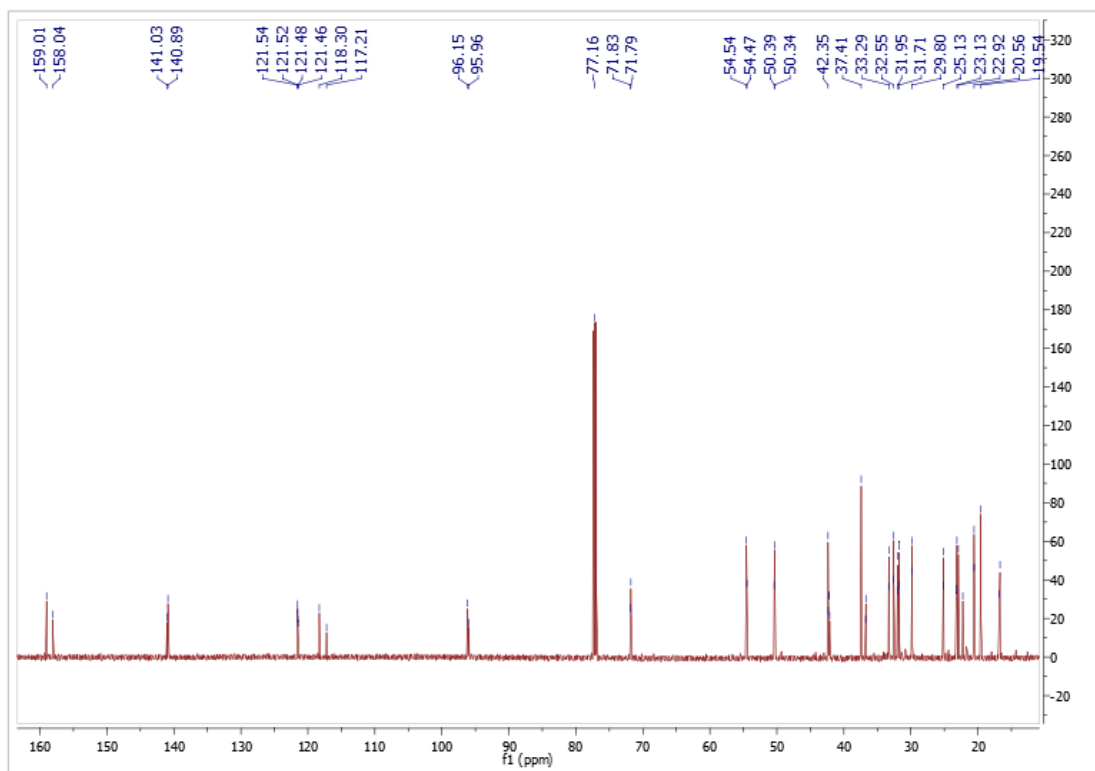
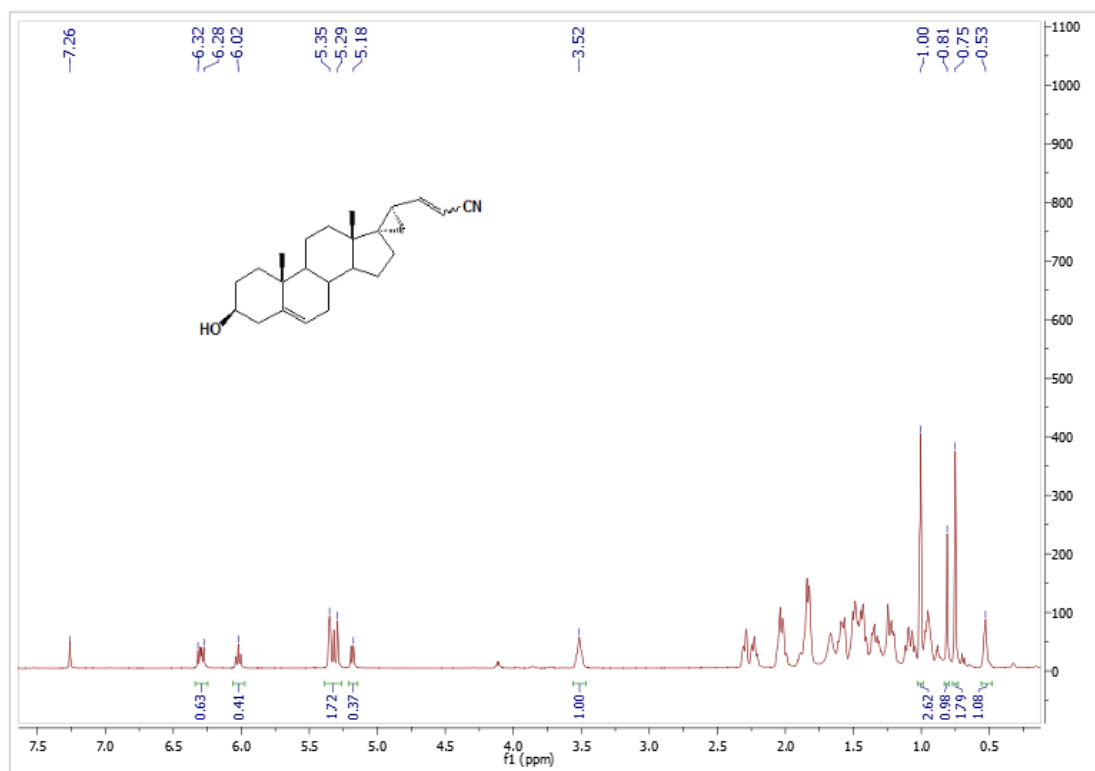


Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **35**

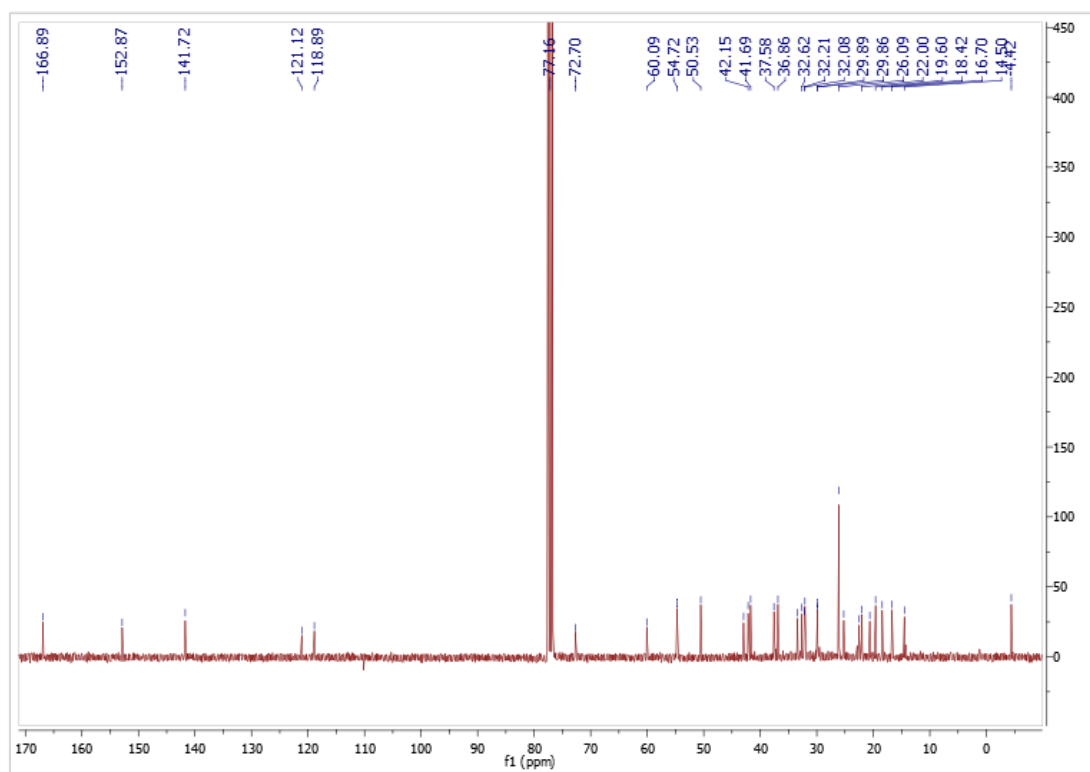
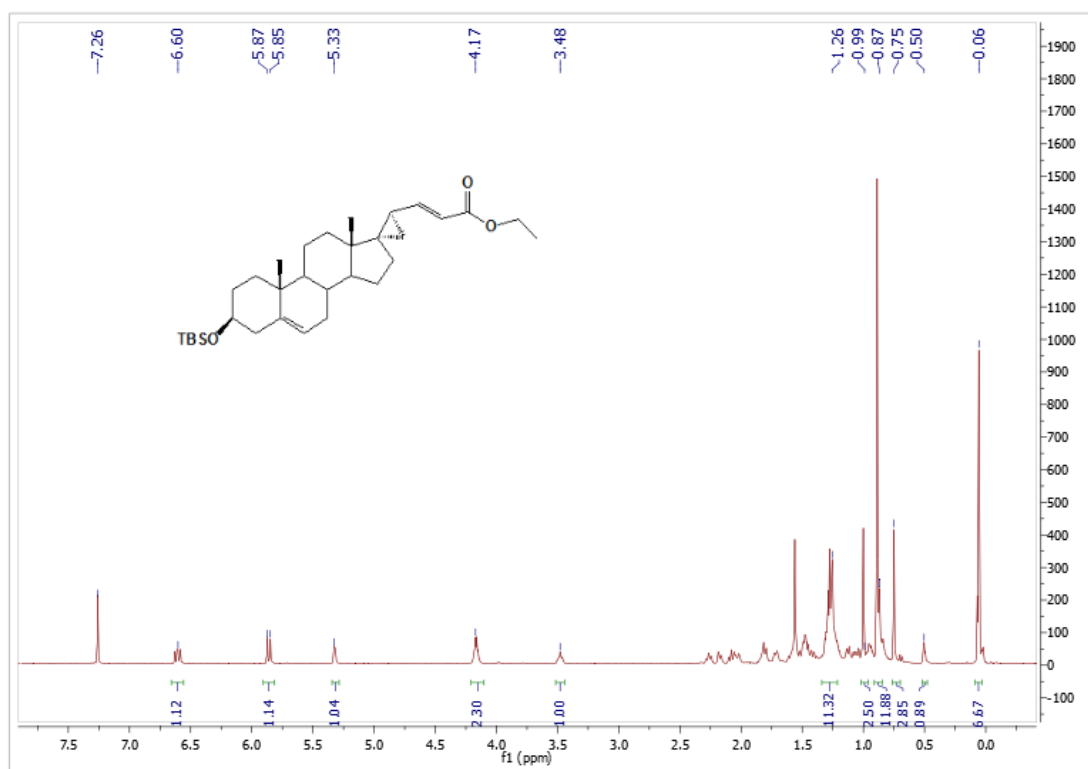




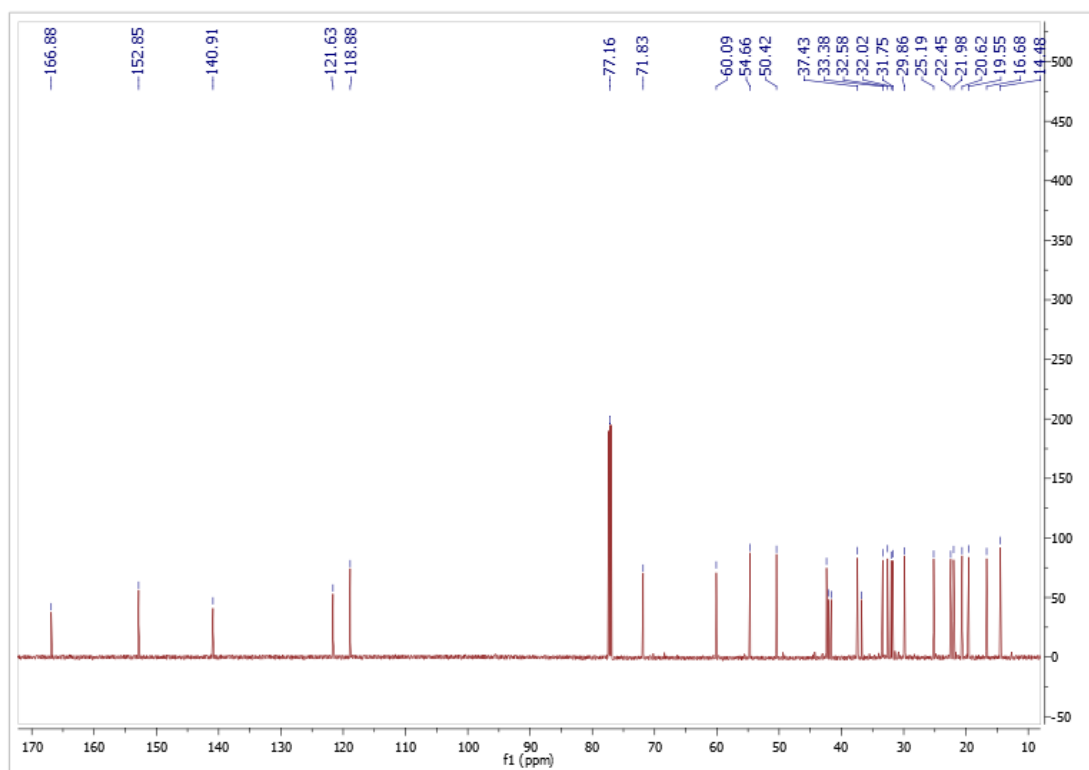
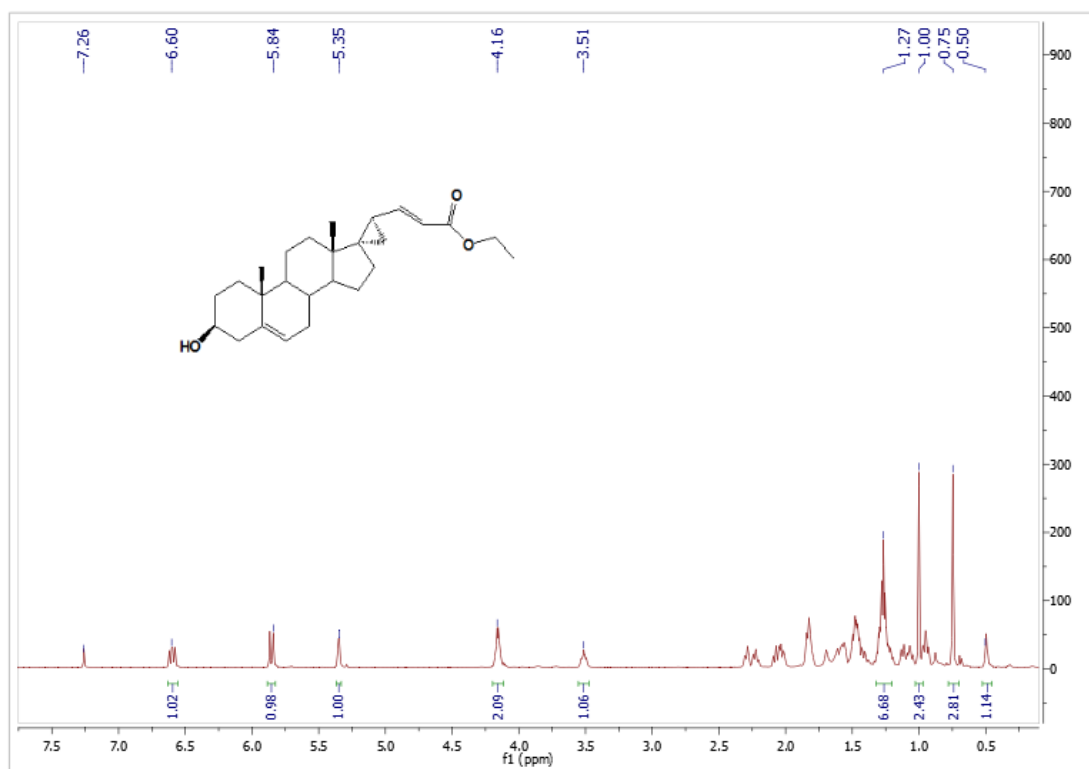
Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **37**



Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **36**



Φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **38**



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- (1) McMurry, J., *Οργανική Χημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **2001**, Vol. II.
- (2) Belelli, D., Lambert, J. J., Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Nature Reviews Neuroscience* **2005**, 6, 565-575.
- (3) Selye, H., Anesthetic effect of steroid hormones, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1941**, 46, 116-121.
- (4) Selye, H., The antagonism between anesthetic steroid hormones and pentamethyltetrazol, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **1942**, 27, 1051-1053.
- (5) Harrison, N. L., Simmonds, M. A.: Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Research* **1984**, 323, 287-292.
- (6) Majewska, M., Harrison, N., Schwartz, R., Barker, J., Paul, S., Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **1986**, 232, 1004-1007.
- (7) Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H., Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacology* **1991**, 40, 333-336.
- (8) Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J., Baulieu, E. E., Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, 78, 4704-4707.
- (9) Corpéchet, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjövall, J., Vihko, R., Baulieu, E.-E., Robel, P., Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Research* **1983**, 270, 119-125.
- (10) Baulieu, E. E., Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **1998**, 23, 963-987.
- (11) Mellon, S. H.; Griffin, L. D., Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2002**, 13, 35-43.
- (12) Pisu, M. G., Serra, M., Neurosteroids and neuroactive drugs in mental disorders. *Life Sciences* **2004**, 74, 3181-3197.
- (13) Mellon, S. H., Vaudry, H., Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. In *International Review of Neurobiology*, Giovanni Biggio, R. H. P., Ed., *Academic Press*, **2001**, 46, 33-60, IN1, 61-78.

- (14) Compagnone, N. A.; Mellon, S. H., Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* **2000**, *21*, 1-56.
- (15) Mellon, S. H., Deschepper, C. F., Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Research* **1993**, *629*, 283-292.
- (16) King, S., Matassa, A., White, E., Walsh, L., Jo, Y., Rao, R., Stocco, D., Reyland, M., Oxysterols regulate expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *Journal of Molecular Endocrinology* **2004**, *32*, 507-517.
- (17) Papadopoulos, V., Lecanu, L., Brown, R. C., Han, Z., Yao, Z. X., Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* **2006**, *138*, 749-756.
- (18) Schumacher, M., Akwa, Y., Guennoun, R., Robert, F., Labombarda, F., Désarnaud, F., Robel, P., De Nicola, A. F., Baulieu, E.-E., Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: Trophic and protective effects. *Journal of Neurocytology* **2000**, *29*, 307-326.
- (19) Mellon, S.: Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1994**, *78*, 1003-1008.
- (20) Stapleton, G., Steel, M., Richardson, M., Mason, J. O., Rose, K. A., Morris, R. G. M., Lathe, R., A Novel Cytochrome P450 Expressed Primarily in Brain. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 29739-29745.
- (21) Rose, K. A., Stapleton, G., Dott, K., Kieny, M. P., Best, R., Schwarz, M., Russell, D. W., Björkhem, I., Seckl, J., Lathe, R., Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy pregnenolone, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 4925-4930.
- (22) Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N., Gravanis, A., Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2008**, *19*, 300-307.
- (23) Miller, W., Tyrell, J., The adrenal cortex, in: Felig, P., Baxter, J., Frohman, L. (Eds.). In *Endocrinology & Metabolism*, McGraw Hill: New York, **1994**, 555-711.
- (24) Boron, W. F., Boulpaep, E. L., *Medical Physiology: a cellular and molecular approach* Elsevier/Saunders, **2003**.

- (25) Compagnone, N. A.; Mellon, S. H., Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* **2000**, *21*, 1-56.
- (26) Compagnone, N. A.; Mellon, S. H.: Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 4678-4683.
- (27) Bologna, L., Sharma, J., Roberts, E., Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures, *Journal of Neuroscience Research* **1987**, *17*, 225-234.
- (28) Hajszan, T., MacLusky, N. J., Leranth, C., Dehydroepiandrosterone Increases Hippocampal Spine Synapse Density in Ovariectomized Female Rats., *Endocrinology* **2004**, *145*, 1042-1045.
- (29) MacLusky, N. J., Hajszan, T., Leranth, C., Effects of dehydroepiandrosterone and futamide on hippocampal CA1 spine synapse density in male and female rats: implications for the role of androgens in maintenance of hippocampal Structure. *Endocrinology* **2004**, *145*, 4154-4161.
- (30) Brinton, R., The neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* **1994**, *14*, 2763-2774.
- (31) Suzuki, M., Wright, L. S., Marwah, P., Lardy, H. A.; Svendsen, C. N.: Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 3202-3207.
- (32) (a) Lazaridis, I., Charalampopoulos, I., Alexaki, I., Avlonitis, N., Peditakis, I., Efstathopoulos, P., Calogeropoulou, T., Castanas, E., Gravanis, A., Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Interacts with Nerve Growth Factor (NGF) Receptors, Preventing Neuronal Apoptosis. *Public Library of Science Biology* **2011**, *9*, in press, (b) Achille Gravanis, Theodora Calogeropoulou, Vily Panoutsakopoulou, Kyriaki Thermos, Constantinos Neophytou and Ioannis Charalampopoulos, Neurosteroids and Microneurotrophins Signal Through NGF Receptors to Induce Prosurvival Signaling in Neuronal Cells, *Science Signaling* **2012**, *5*, 246.
- (33) Junying Cai, Fuzhou Hua, Linhui Yuan, Wei Tang, Jun Lu, Shuchun Yu, Xifeng Wang, and Yanhui Hu, Potential Therapeutic Effects of Neurotrophins for Acute and Chronic Neurological Diseases, *BioMed Research Internationa, Hindawi Publishing Corporation*, **2014**.

- (34) Jing Xu, Michelle H. Lacoske, and Emmanuel A. Theodorakis, Neurotrophic Natural Products: Chemistry and Biology, *Angew. Chem. Int.Ed.* **2014**, *53*, 956 – 987.
- (35) D. Dawbarn and S. J. Allen, Neurotrophins and neurodegeneration, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **2003**, *29*, 211–230.
- (36) April M Weissmiller and Chengbiao Wu, Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders, *Translational Neurodegeneration*, **2012**, *1*:14.
- (37) Shelley J. Allen, Judy J. Watson, Deborah K. Shoemark, Neil U. Barua, Nikunj K. Patel, GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration, *Pharmacology & Therapeutics*, **2013**, *138*, 155–175.
- (38) Luigi Aloe, Maria Luisa Rocco, Patrizia Bianchi and Luigi Manni, Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use, *Aloe et al. Journal of Translational Medicine*, **2012**, *10*:239.
- (39) (a) Sylvia Josephy-Hernandez, Sean Jmaeff, Iulia Pirvulescu, Tahar Aboukassima, H. Uri Saragovi, Neurotrophin receptor agonists and antagonists as therapeutic agents: An evolving paradigm, *Neurobiology Disease*, **2016**, review, (b) Theodora Calogeropoulou, Nicolaos Avlonitis, Vassilios Minas, Xanthippi Alexi, Athanasia Pantzou, Ioannis Charalampopoulos, Maria Zervou, Varvara Vergou, Efrosini S. Katsanou, Iakovos Lazaridis, Michael N. Alexis, and Achille Gravanis, Novel Dehydroepiandrosterone Derivatives with Antiapoptotic, Neuroprotective Activity, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 6569–6587.
- (40) (a) Pediaditakis, I., Efstathopoulos, P., Prousis, K.C., Zervou, M., Arévalo, J.C., Alexaki, V.I., Nikolettou, V., Karagianni, E., Potamitis, C., Tavernarakis, N., Chavakis, T.Margioris, A.N., Venihaki, M., Calogeropoulou, T., Charalampopoulos, I., Gravanis, A., Selective and differential interactions of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, with TrkA receptors, regulating neuronal survival and differentiation, *Neuropharmacology*, **2016**, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.09.007, (b) Iosif Pediaditakis, Alexandra Kourgiantaki, Kyriakos C. Prousis, Constantinos Potamitis, Kleanthis P. Xanthopoulos, Maria Zervou, Theodora Calogeropoulou, Ioannis Charalampopoulos, Achille Gravanis, BNN27, a 17-spiroepoxy steroid derivative, interacts with and activates p75 neurotrophin receptor, rescuing Cerebellar Granule Neurons from apoptosis, *Front. Pharmacol.*, **2016**, *7*:512, doi:10.3389/fphar.2016.00512, (c) Giulia Bonetto, Ioannis Charalampopoulos, Achille Gravanis, Domna Karagogeos, The novel synthetic microneurotrophin BNN27 protects mature oligodendrocytes against cuprizone-induced death, through the NGF receptor TrkA, *Glia Wiley Periodicals*, **2017**, 1-19.
- (41) Diver, S. T. Giessert, A. J., Enyne Metathesis (Enyne Bond Reorganization), *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 1317-1382.

- (42) Grubbs, R. H., *Handbook of Metathesis: Catalyst Development*, WILEY-VCH: Weinheim, **2003**.
- (43) Katz, T. J. Sivavec, T. M., Metal-catalyzed rearrangement of alkene-alkynes and the stereochemistry of metallacyclobutene ring opening, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 737-738.
- (44) Trost, B. M., On Inventing Reactions for Atom Economy, *Accounts of Chemical Research*, **2002**, *35*, 695-705.
- (45) Kim, S.-H., Bowden, N., Grubbs, R. H., Catalytic Ring Closing Metathesis of Dienes: Construction of Fused Bicyclic Rings, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 10801-10802.
- (46) Trost, B. M., Tanoury, G. J., An unusual mechanism of a palladium-catalyzed intramolecular carbametalation, A novel palladium-catalyzed rearrangement, *Journal of the American Chemical Society*, **1988**, *110*, 1636-1638.
- (47) Hidetoshi Takahashi, Kazuhiro Yoshida, Akira Yanagisawa, Synthesis of Carbocyclic Aromatic Compounds Using Ruthenium-Catalyzed Ring-Closing Enyne Metathesis, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 3632-3640.
- (48) Siham Farhane, Michelle-Audrey Fournier, Rene Maltais, Donald Poirier, *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 2434-2440.
- (49) Lukac, M., Smolarikova, E., Lacko, I., Devinsky, F., The methoxybenzyl ethers as useful protecting groups for hydroxyl compounds: methods of deprotection, *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae*, **2005**, *52*, 31-45.
- (50) Gabriel Tojo, Marcos Fernandez, Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones, *Springer*.
- (51) Grubbs, R. H., Burk, P. L., Carr, D. D., Mechanism of the olefin metathesis reaction, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3265-3266.
- (52) Edwin F. van der Eide, Warren E. Piers, Mechanistic insights into the ruthenium-catalysed diene ring-closing metathesis reaction, *Nature Chemistry*, **2010**, *2*, 571-576.
- (53) Vedejs, E., Peterson, M. J., *Top. Stereochem.*, **1994**, *21*, 1-157.
- (54) William S. Wadsworth, JR., William D. Emmons, The utility of phosphonate carbanions in olefin synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 1733-1738.



(55) Ricardo Riveiros, Antonio Rumbo, Luis A. Sarandeses, Antonio Mourino, Synthesis and Conformational Analysis of 17 $\alpha$ ,21-Cyclo-22-Unsaturated Analogues of Calcitriol, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 5477-5485.

(56) Andre B. Charette, Helene Juteau, Helene Lebel, Carmela Molinaro, Enantioselective Cyclopropanation of Allylic Alcohols with Dioxaborolane Ligands: Scope and Synthetic Applications, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11943-11952.

(57) Hun Young Kim, Luca Salvi, Patrick J. Carroll, and Patrick J. Walsh, Highly Enantio- and Diastereoselective One-Pot Methods for the Synthesis of Halocyclopropyl Alcohols, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 954–962.