

Wydział Chemii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

mgr inż. Grzegorz Hajdaś

**Otrzymywanie nowych koniugatów steroidowych
o potencjalnych właściwościach
przeciwdrobnoustrojowych**

**Synthesis of New Steroid Conjugates with Potential
Antimicrobial Properties**

Rozprawa doktorska w formie cyklu artykułów naukowych



**UNIwersytet
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU**

Poznań, 2026 r.

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Produktów Bioaktywnych

Wydziału Chemii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. Tomasz Pospieszny

Promotor pomocnicza: dr inż. Hanna Koenig

Pragnę złożyć podziękowania Panu Profesorowi Tomaszowi Pospiesznemu oraz Pani dr inż. Hannie Koenig, za poświęcony czas, merytoryczne uwagi oraz przekazaną wiedzę, które przyczyniły się do realizacji przedstawionych badań.

Pragnę podziękować mojej rodzinie, przyjaciołom oraz Erykowi za wsparcie, wyrozumiałość oraz życzliwość okazane mi w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej. Dziękuję za obecność, cierpliwość i zrozumienie.

Spis treści

Życiorys naukowy	1
Wykaz artykułów naukowych i monografii w czasopismach naukowych lub w materiałach pokonferencyjnych wraz z danymi bibliograficznymi.....	2
Wykaz uczestnictwa w ogólnopolskich i międzynarodowych konferencjach naukowych	4
Spis rysunków	6
Spis schematów	8
Spis tabel.....	11
Wykaz skrótów	14
Wstęp	16
Sekcja literaturowa.....	
1. Charakterystyka ogólna steroidów	18
1.1. Struktura steroidów	18
1.2. Stereochemia steroidów	20
1.3. Aktywność biologiczna steroidów.....	23
2. Sterole	25
2.1. Fitosterole.....	25
2.2. Zoosterole.....	27
2.3. Mykosterole	29
3. Stanole	31
4. Kwasy żółciowe.....	32
5. Znaczenie biologiczne i zastosowanie kwasów żółciowych.....	34
6. Modyfikacje chemiczne steroidów	34
6.1. Modyfikacje pierścienia A	35
6.2. Modyfikacje pierścienia B	43
6.3. Modyfikacje pierścienia C.....	47
6.4. Modyfikacje pierścienia D.....	49

7.	Grupy ochronne w chemii steroidów	54
7.1.	Znaczenie grup ochronnych w chemii steroidów	55
7.2.	Ochrona grup hydroksylowych.....	55
7.3.	Ochrona grup karboksylowych	57
8.	Chemia „click”	58
8.1.	Reakcja Huisgena	61
9.	Wykorzystanie chemii „click” w projektowaniu i funkcjonalizacji pochodnych steroidowych.....	64
9.1.	Wprowadzanie grup azydkowych	65
9.2.	Wprowadzanie terminalnych grup alkinowych	68
10.	Koniugaty steroidowe	69
	Sekcja badawcza	
1.	Koniugaty steroli i octanowych pochodnych kwasów żółciowych [P2].....	78
1.1.	Synteza nowych koniugatów steroli i pochodnych kwasów żółciowych...78	
1.2.	Analiza spektroskopowa otrzymanych związków	79
1.3.	Analiza hemolityczna <i>in vitro</i>	82
1.4.	Obliczenia semiempiryczne PM5	83
1.5.	Predykcja potencjalnej aktywności farmakologicznej (PASS).....	85
1.6.	Dokowanie molekularne	87
2.	Koniugaty dimeryczne octanowych pochodnych kwasów żółciowych [P3]	90
2.1.	Synteza dimerycznych koniugatów acylowych pochodnych kwasów żółciowych.....	90
2.2.	Charakterystyka spektroskopowa otrzymanych związków	91
2.3.	Obliczenia semiempiryczne metodą PM5	94
2.4.	Predykcja potencjalnej aktywności farmakologicznej (PASS).....	96
2.5.	Aktywność hemolityczna	96
2.6.	Dokowanie molekularne	98
3.	Synteza koniugatów mrówczanowych pochodnych kwasów żółciowych [P6]	102

3.1.	Synteza mrówczanowych pochodnych kwasów żółciowych	102
3.2.	Analiza spektroskopowa otrzymanych związków	104
3.3.	Aktywność przeciwgrzybicza	107
3.4.	Obliczenia semiempiryczne metodą PM5	110
3.5.	Predykcja potencjalnej aktywności farmakologicznej (PASS)	111
3.6.	Dokowanie molekularne	113
	Podsumowanie	115
	Bibliografia	118
	Streszczenie	130
	Abstract	132

Życiorys naukowy

Urodziłem się 24 czerwca 1997 w Gryfinie. W 2016 roku rozpocząłem studia licencjackie na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na kierunku chemia, specjalność chemia materiałowa. Pracę licencjacką pt. „*Hybrydy kowalencyjne tlenku grafenu z 4-trityloaniliną*” obroniłem w 2019 roku. W tym samym roku podjąłem studia drugiego stopnia na kierunku analityka żywności, prowadzonym wspólnie przez Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu. Pracę magisterską pt. „*Synteza i analiza spektroskopowa oraz badania semiempiryczne nowego koniugatu kwasu lichołowego i cholestanolu zawierającego pierścień 1,2,3-triazolowy*” przygotowałem pod kierunkiem prof. Tomasza Pospieszego, uzyskując w 2021 roku tytuł magistra inżyniera.

Zainteresowania naukowe rozwinąłem w obszarze syntezy i modyfikacji związków steroidowych oraz zastosowań reakcji chemii „click” w otrzymywaniu koniugatów o potencjalnych właściwościach biologicznych. W 2021 roku rozpocząłem kształcenie w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, kontynuując pracę badawczą w grupie prof. dr. hab. Tomasza Pospieszego. Tematem mojej rozprawy doktorskiej jest „*Otrzymywanie nowych koniugatów steroidowych o potencjalnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych*”.

W ramach pracy doktorskiej zajmowałem się syntezą oraz charakterystyką spektroskopową nowych koniugatów steroidowych połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym, jak również analizą ich aktywności biologicznej. Moje badania obejmowały także zastosowanie metod *in silico* w ocenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych związków.

Dotychczasowa działalność naukowa zaowocowała sześcioma publikacjami w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, w tym pięcioma z pierwszym autorstwem. W publikacji opublikowanej w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* pełniłem funkcję asystenta redaktora gościnnego w ramach wydania specjalnego. Mój sumaryczny Impact Factor wynosi 19,8 przy całkowitej punktacji ministerialnej 440 pkt. Wyniki moich badań prezentowałem na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych, podczas których trzykrotnie zostałem wyróżniony nagrodami za najlepsze wystąpienia ustne.

Współpracowałem także z zespołami badawczymi z Politechniki Krakowskiej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Wydziału Biologii UAM. Poza działalnością naukową aktywnie angażowałem się w popularyzację chemii, uczestnicząc w organizacji Nocy Naukowców oraz Poznańskiego Festiwalu Nauki i Sztuki.

**Wykaz artykułów naukowych i monografii w czasopismach naukowych lub
w materiałach pokonferencyjnych wraz z danymi bibliograficznymi**

LP	OPIS BIBLIOGRAFICZNY	PKT	IF
P1	Anna Kawka, Grzegorz Hajdaś , Damian Kułaga, Hanna Koenig, Iwona Kowalczyk, Tomasz Pospieszny*, <i>Molecular structure, spectral and theoretical study of new type bile acid–sterol conjugates linked via 1,2,3-triazole ring</i> , Journal of Molecular Structure, 2022 , 1273, 134313	70	3.8**
<i>Synteza związków, metodologia, analiza formalna, analiza danych, edycja tekstu, wizualizacja.</i>			
P2	Grzegorz Hajdaś , Anna Kawka, Hanna Koenig, Damian Kułaga, Katarzyna Sosnowska, Lucyna Mrówczyńska, Tomasz Pospieszny*, <i>Click chemistry as a method for the synthesis of steroid bioconjugates of bile acids derivatives and sterols</i> , Steroids, 2023 , 199, 1-12.	70	2.7**
<i>Koncepcja pracy, synteza związków, metodologia, analiza danych, przygotowanie manuskryptu, udział w dyskusji z recenzentami, edycja tekstu.</i>			
P3	Grzegorz Hajdaś* , Damian Kułaga, Hanna Koenig, Katarzyna Sosnowska, Lucyna Mrówczyńska, Tomasz Pospieszny, <i>Synthesis, Hemolytic Activity, and In Silico Studies of New Bile Acid Dimers Connected with a 1,2,3-Triazole Ring</i> , ACS Omega, 2024 , 9(37), 39277-39286.	70	4.1**
<i>Koncepcja pracy, synteza związków, metodologia,, analiza danych, przygotowanie manuskryptu, udział w dyskusji z recenzentami, edycja tekstu.</i>			
P4	Grzegorz Hajdaś* , Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, <i>Changing the game: innovative applications of steroid conjugates</i> , Rozdział [w] <i>Na pograniczu chemii, biologii i fizyki - rozwój nauk. Tom 6</i> . Wydawnictwo Naukowe UMK, Toruń, Polska, 2025 , 11-30.	20	–
<i>Koncepcja pracy, metodologia, analiza danych, udział w dyskusji z recenzentami, edycja tekstu, nadzór administracyjny.</i>			
P5	Grzegorz Hajdaś , Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny*, <i>Recent Advances in Steroid Discovery: Structural Diversity and Bioactivity of Marine and Terrestrial Steroids</i> , International Journal of Molecular Sciences, 2025 , 26(7), 3203.	140	4.9**
<i>Koncepcja pracy, przygotowanie manuskryptu, metodologia, analiza danych, udział w dyskusji z recenzentami, edycja tekstu, nadzór administracyjny.</i>			

P6	Grzegorz Hajdaś* , Damian Kułaga, Hanna Koenig, Justyna Starzyk, Vladislav Maliugin, Tomasz Pospieszny, <i>Formylated Bile Acid–Steroid Conjugates: Synthesis, Antifungal Properties, and in silico studies</i> , ACS Omega, 2025 , 49, 60152-60161.	70	4.3**
<i>Koncepcja pracy, synteza związków, metodologia, analiza danych, przygotowanie manuskryptu, udział w dyskusji z recenzentami, edycja tekstu.</i>			

*autor korespondencyjny; **Impact Factor w dniu opublikowania artykułu

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej: P2, P3, P4, P5, P6

Autor korespondencyjny w trzech publikacjach: P3, P4, P6.

Wykaz uczestnictwa w ogólnopolskich i międzynarodowych konferencjach naukowych

Wystąpienia ustne

1. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Nowe koniugaty kwasów żółciowych i cholestanolu połączone pierścieniem 1,2,3-triazolowym*, Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki, Warszawa, 20–22 września **2022**.*
2. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Nowe dimery pochodnych kwasów żółciowych połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym*, Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki, Warszawa, 18–20 września **2023**.
3. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Synthesis and in silico research of new conjugates of bile acid derivatives connected with a 1,2,3-triazole ring*, XVII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 6–7 czerwca **2024**.**
4. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Koniugaty steroidowe: nowatorskie podejście do zwalczania oporności na antybiotyki i hipercholesterolemii*, Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki, Warszawa, 23–25 września **2024**.*

Wystąpienia posterowe

1. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Nowe dimery kwasów żółciowych i cholestanolu zawierające pierścień 1,2,3-triazolowy*, IV Pomorskie Sympozjum Studentów Chemii, 23–24 kwietnia **2022**.
2. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Dimery kwasów żółciowych i cholestanolu połączone pierścieniem 1,2,3-triazolowym: synteza, badania spektroskopowe i teoretyczne*, IX Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 19–20 maja **2022**.
3. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Nowe dimery steroidowe pierścieniem 1,2,3-triazolowym*, IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg, Poznań, 3 grudnia **2022**.
4. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Synteza nowych dimerów steroidowych połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym*, I Ogólnopolska Konferencja PUTChemikon, Poznań, 6 maja **2023**.
5. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Synteza nowych dimerów steroidowych połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym*, III Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów US 2.0 „MKDUS 2.0”, 21–23 czerwca **2023**.
6. **Grzegorz Hajdaś**, Anna Kawka, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *New steroid conjugates connected with a 1,2,3-triazole ring*, XXIV International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 24 listopada **2023**.

7. Anna Kawka, **Grzegorz Hajdaś**, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Zastosowanie chemii „click” w syntezie biokoniugatów steroidowych pochodnych kwasów żółciowych i steroli*, 47. Międzynarodowe Seminarium Naukowo-Techniczne „Chemistry for Agriculture”, Karpacz, 26–29 listopada **2023**.
8. Anna Kawka, **Grzegorz Hajdaś**, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny, *Biokoniugaty steroidowo-triazolowe jako potencjalne środki farmakoterapeutyczne o dużej aktywności biologicznej*, 66. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Poznań, 15–20 września **2024**.

*Nagroda za najlepsze wystąpienie podczas Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki, Warszawa, 20–22 września **2022** oraz Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki, Warszawa, 23–25 września **2024**.

Wyróżnienie za wystąpienie podczas XVII Kopernikańskiego Seminarium Doktoranckiego, Toruń, 6–7 czerwca **2024.

Spis rysunków

Numer	Opis
1	Struktury chemiczne cholesterolu oraz kwasu cholowego.
2	Struktury chemiczne dihydrotestosteronu, kwasu cholowego oraz koprostanolu z uwzględnieniem stereochemii pierścieni A/B/C/D.
3	Struktury chemiczne i stereochemia szkieletu steroidowego w zależności od obecności wiązań nienasyconych w strukturze.
4	Struktury chemiczne wybranych fitosteroli.
5	Struktury chemiczne wybranych zoosteroli: cholesterolu, desmosterolu, 7-dehydrocholesterolu oraz lathosterolu.
6	Struktura chemiczna ergosterolu.
7	Struktury chemiczne wybranych stanoli.
8	Struktury chemiczne wybranych kwasów żółciowych: kwasu lithocholowego, cholowego, deoksycholowego oraz chenodeoksycholowego.
9	Podobieństwo triazoli oraz związków amidowych.
10	Struktura chemiczna skwalaminy.
11	Przykładowy koniugat steroidowy zawierający pierścień 1,2,3-triazolowy (wykazuje aktywność przeciwmalaryczną oraz przeciwliszczniczą).
12	Struktura koniugatu steroidowego naśladującego polimiksynę B.
13	Struktura estensumizydu A wyizolowanego z <i>Myriopteron extensum</i> .
14	Koniugat steroidowo-monosacharydowy z linkerem 1,2,3-triazolowym.
15	Koniugat steroidowo-juwenoidowy.
16	Koniugat kwasu cholowego ze zmodyfikowaną pochodną karbaminianu.
17	Koniugat steroidowy pochodnej selenomocznika.
18	Widma ¹ H NMR w zakresie 4,60–8,30 ppm związków: A (124), B (125), C (126).
19	Aktywność hemolityczna badanych związków (0,1 mg/ml) po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C.
20	Modele molekularne związku (129): A) konformer <i>syn</i> , B) konformer <i>anti</i> .
21	Nałożenie związków (124) (żółty), (127) (niebieski) i mewastatyny (fioletowy).
22	Sposób wiązania związków (124) (żółty, po lewej) i (127) (niebieski, po prawej).
23	Widma ¹ H NMR w zakresie 4,60–8,40 ppm dla najbardziej charakterystycznych sygnałów związków: A (136), B (140), C (144).
24	Modele molekularne związków (136), (140) i (144) obliczone za pomocą techniki PM5.

25	Aktywność hemolityczna badanych związków (0,1 mg/ml) po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C.
26	(A–C) Sposób wiązania związków dokowanych (136) – fioletowy, (140) – czerwony, (144) – czarny; (D) powierzchnia gyrazy DNA z dokowanymi związkami.
27	Sposób wiązania związków dokowanych z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi: (A) związek (136) – fioletowy, (B) związek (140) – czerwony.
28	Widma ¹ H NMR w zakresie 4,75–8,45 ppm dla najbardziej charakterystycznych sygnałów związków: A (156), B (158), C (159), D (164).
29	Modele molekularne związków: (156), (158), (159) i (164).
30	Ułożenie w pozycji dokowania związków (159) (A, czerwony) i (160) (B, zielony) w kieszeni wiążącej enzymu TRI5.
31	Nałożenie związków (159) (czerwony) i (160) (zielony) w kieszeni wiążącej enzymu TRI5.

Spis schematów

Numer	Opis
1	Numeracja atomów węgla w szkielecie steroidowym i przykłady podstawowych struktur steroidowych.
2	Podział steroidów ze względu na ich aktywność biologiczną.
3	Szlak biosyntetyczny witaminy D ₃ .
4	Biosynteza soli żółciowych na przykładzie kwasu cholowego.
5	Główne obszary struktury steroidów poddawane modyfikacjom chemicznym.
6	Reakcja nitrowania i redukcji estronu.
7	Reakcja utlenienia pierścienia A estronu z użyciem kwasu 2-jodoksybenzoesowego.
8	Reakcja alkirowania grupy hydroksylowej estronu poprzez sekwencję alkirowania i przegrupowania Claisena.
9	Reakcja karbonylacji palladowej pochodnej estronu.
10	Reakcja deoksygenacji estronu.
11	Reakcja otrzymywania testosteronu poprzez modyfikacje chemiczne pierścienia A.
12	Przykładowa reakcja utlenienia testosteronu.
13	Przykład zastosowania reakcji Mannicha do wprowadzania wiązań C–C w pierścieniu A steroidów.
14	Przykładowe reakcje halogenacji pierścienia A steroidów.
15	Przykład reakcji tworzenia wiązania podwójnego w pierścieniu A.
16	Redukcja pochodnej DHEA prowadząca do powstania ketonowej pochodnej.
17	Otrzymywanie tiolowych pochodnych pregnanu.
18	Przykład modyfikacji pierścienia B – przemiany 6-dehydroestronu.
19	Przykład modyfikacji pierścienia B w pozycji C(6).
20	Przykład modyfikacji pierścienia B przy użyciu reakcji Vilsmeijera.
21	Przykład modyfikacji pierścienia B w pozycji C(7).
22	Modyfikacja pierścienia B pochodnej z grupy pregnanów.
23	Przykładowa modyfikacja pierścienia C pochodnej estranowej.
24	Przykładowa modyfikacja pierścienia C pochodnej androstanowej.
25	Synteza chemiczna 16 α -hydroksyestradiolu.
26	Synteza <i>cis</i> -diolowej pochodnej 17-benzoesanu estradiolu.
27	Modyfikacja C(17) steroidów z wykorzystaniem reakcji Suzuki.
28	Modyfikacja pierścienia D w oparciu o przemiany dehydroepiandrosteronu.
29	Reakcja modyfikacji pierścienia D w położeniu C(16) wykorzystująca reakcję Grignarda.
30	Reakcja modyfikacji pierścienia D w położeniu C(16) związku z grupy pregnanów.

31	Zastosowanie grupy <i>tert</i> -butylo-dimetylosililowej w serii przemian 3 α -cholestanu.
32	Estryfikacja polihydroksylowych pochodnych steroidowych jako strategia zastosowania grup ochronnych.
33	Zastosowanie grup octanowych i ich selektywnej hydrolizy w syntezie pochodnej kwasu cholowego.
34	Wprowadzanie i usuwanie grup metylowych jako strategia ochrony grupy karboksylowej łańcucha bocznego kwasów żółciowych.
35	Przykładowe rodzaje reakcji chemii „click”.
36	Przykłady reakcji typu „non-aldol”.
37	Przykłady reakcji otwarcia pierścienia w chemii „click”.
38	Reakcja Dielsa–Aldera.
39	Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji (reakcja Huisgena).
40	Przykłady reakcji addycji do wiązań wielokrotnych.
41	Reakcja Huisgena (1,3-dipolarnej cykloaddycji).
42	Mechanizm reakcji CuACC.
43	Mechanizm reakcji RuACC.
44	Wprowadzenie grupy azydkowej do cząsteczki steroidu z zachowaniem konfiguracji.
45	Wprowadzenie grupy azydkowej do cząsteczki steroidu ze zmianą konfiguracji.
46	Wprowadzenie grupy azydkowej do łańcucha bocznego kwasu żółciowego.
47	Alternatywne wprowadzenie grupy azydkowej do łańcucha bocznego kwasu żółciowego.
48	Wprowadzenie grupy azydkowej do kwasu żółciowego poprzez modyfikację grup hydroksylowych.
49	Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez modyfikację grup hydroksylowych pochodnych steroidowych.
50	Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez modyfikację grupy karboksylowej łańcucha bocznego kwasu żółciowego.
51	Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez tworzenie estrów lub amidów alkinowych łańcucha bocznego kwasów żółciowych.
52	Synteza koniugatu kwasu żółciowego i flukonazolu.
53	Synteza propiolowych pochodnych estrów kwasów żółciowych.
54	Synteza azydkowych pochodnych steroli.
55	Synteza koniugatów steroidowych kwasów żółciowych i steroli z wykorzystaniem reakcji Huisgena.
56	Synteza octanowych pochodnych kwasów żółciowych z terminalnym ugrupowaniem alkinowym
57	Synteza octanowych pochodnych kwasów żółciowych z grupą azydkową.

58	Synteza koniugatów octanowych pochodnych kwasów żółciowych.
59	Synteza estrów metylowych oraz pochodnych mrówczanowych kwasów żółciowych.
60	Synteza propiolowych estrów kwasów żółciowych.
61	Synteza propiolowych pochodnych steroli.
62	Synteza azydooctanowych pochodnych estrów kwasów żółciowych.
63	Synteza mrówczanowych koniugatów steroidowych.

Spis tabel

Numer	Opis
1	Numeracja atomów węgla w szkielecie steroidowym i przykłady podstawowych struktur steroidowych.
2	Podział steroidów ze względu na ich aktywność biologiczną.
3	Szlak biosyntetyczny witaminy D ₃ .
4	Biosynteza soli żółciowych na przykładzie kwasu cholowego.
5	Główne obszary struktury steroidów poddawane modyfikacjom chemicznym.
6	Reakcja nitrowania i redukcji estronu.
7	Reakcja utlenienia pierścienia A estronu z użyciem kwasu 2-jodoksybenzoesowego.
8	Reakcja alkirowania grupy hydroksylowej estronu poprzez sekwencję alkirowania i przegrupowania Claisena.
9	Reakcja karbonylacji palladowej pochodnej estronu.
10	Reakcja deoksygenacji estronu.
11	Reakcja otrzymywania testosteronu poprzez modyfikacje chemiczne pierścienia A.
12	Przykładowa reakcja utlenienia testosteronu.
13	Przykład zastosowania reakcji Mannicha do wprowadzania wiązań C–C w pierścieniu A steroidów.
14	Przykładowe reakcje halogenacji pierścienia A steroidów.
15	Przykład reakcji tworzenia wiązania podwójnego w pierścieniu A.
16	Redukcja pochodnej DHEA prowadząca do powstania ketonowej pochodnej.
17	Otrzymywanie tiolowych pochodnych pregnanu.
18	Przykład modyfikacji pierścienia B – przemiany 6-dehydroestranu.
19	Przykład modyfikacji pierścienia B w pozycji C(6).
20	Przykład modyfikacji pierścienia B przy użyciu reakcji Vilsmeijera.
21	Przykład modyfikacji pierścienia B w pozycji C(7).
22	Modyfikacja pierścienia B pochodnej z grupy pregnanów.
23	Przykładowa modyfikacja pierścienia C pochodnej estranowej.
24	Przykładowa modyfikacja pierścienia C pochodnej androstanowej.
25	Synteza chemiczna 16 α -hydroksyestradiolu.
26	Synteza <i>cis</i> -diolowej pochodnej 17-benzoesanu estradiolu.
27	Modyfikacja C(17) steroidów z wykorzystaniem reakcji Suzuki.
28	Modyfikacja pierścienia D w oparciu o przemiany dehydroepiandrosteronu.
29	Reakcja modyfikacji pierścienia D w C(16) wykorzystująca reakcję Grignarda.
30	Reakcja modyfikacji pierścienia D w C(16) związku z grupy pregnanów.

31	Zastosowanie grupy <i>tert</i> -butylo-dimetylosililowej w serii przemian 3 α -cholestanu.
32	Estryfikacja polihydroksylowych pochodnych steroidowych jako strategia zastosowania grup ochronnych.
33	Zastosowanie grup octanowych i ich selektywnej hydrolizy w syntezie pochodnej kwasu cholowego.
34	Wprowadzanie i usuwanie estrów metylowych jako strategia ochrony grupy karboksylowej łańcucha bocznego kwasów żółciowych.
35	Przykładowe rodzaje reakcji chemii „click”.
36	Przykłady reakcji typu „non-aldol”.
37	Przykłady reakcji otwarcia pierścienia w chemii „click”.
38	Reakcja Dielsa–Aldera.
39	Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji (reakcja Huisgena).
40	Reakcja tworzenia azydryn.
41	Reakcja Huisgena (1,3-dipolarnej cykloaddycji).
42	Mechanizm reakcji CuACC.
43	Mechanizm reakcji RuACC.
44	Wprowadzenie grupy azydkowej do cząsteczki steroidu z zachowaniem konfiguracji.
45	Wprowadzenie grupy azydkowej do cząsteczki steroidu ze zmianą konfiguracji.
46	Wprowadzenie grupy azydkowej do łańcucha bocznego kwasu żółciowego.
47	Alternatywne wprowadzenie grupy azydkowej do łańcucha bocznego kwasu żółciowego.
48	Wprowadzenie grupy azydkowej do kwasu żółciowego poprzez modyfikację grup hydroksylowych.
49	Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez modyfikację grup hydroksylowych pochodnych steroidowych.
50	Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez modyfikację grupy karboksylowej łańcucha bocznego kwasu żółciowego.
51	Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez tworzenie estrów lub amidów alkinowych łańcucha bocznego kwasów żółciowych.
52	Synteza koniugatu kwasu żółciowego i flukonazolu.
53	Synteza propiolowych pochodnych estrów kwasów żółciowych.
54	Synteza azydkowych pochodnych steroli.
55	Synteza koniugatów steroidowych kwasów żółciowych i steroli z wykorzystaniem reakcji Huisgena.
56	Synteza octanowych pochodnych kwasów żółciowych z terminalnym ugrupowaniem alkinowym
57	Synteza octanowych pochodnych kwasów żółciowych z grupą azydkową.

58	Synteza koniugatów octanowych pochodnych kwasów żółciowych.
59	Synteza estrów metylowych oraz pochodnych mrówczanowych kwasów żółciowych.
60	Synteza propiolowych estrów kwasów żółciowych.
61	Synteza propiolowych pochodnych steroli.
62	Synteza azydooctanowych pochodnych estrów kwasów żółciowych.
63	Synteza mrówczanowych koniugatów steroidowych.
Numer	Opis
1	Ciepła tworzenia (HOF) [kcal/mol] kwasów żółciowych (2, 19–20), steroli (1, 17) i koniugatów (124–129).
2	Wartości prawdopodobieństwa (Pa) dla przewidywanej aktywności biologicznej biokoniugatów (124–129).
3	Obliczona energia wiązania i aminokwasy biorące udział w tworzeniu wiązań wodorowych dokowanych do miejsca aktywnego HMGCR–CoA.
4	Ciepła tworzenia (HOF) [kcal/mol] azydooctanowych pochodnych kwasów żółciowych (133–135) oraz koniugatów (136–144).
5	Wartości prawdopodobieństwa (Pa) dla przewidywanej aktywności biologicznej koniugatów (136–144).
6	Wyniki dokowania i wiązania wodorowe utworzone z reprezentatywnymi związkami (136), (140) i (141).
7	Aktywność przeciwgrzybicza związków (153–164) oceniana metodą dyfuzji studzienkowej.
8	Wartości HOF związków (153–164) otrzymane za pomocą obliczeń PM5.
9	Wartości prawdopodobieństwa (Pa) dla przewidywanej aktywności biologicznej związków (153–164).
10	Charakterystyka wykrytych oddziaływań między badanymi związkami (159) i (160) a wybranymi aminokwasami w kieszeni wiążącej.
11	Wykaz numeracji związków w artykułach naukowych (NrA) w porównaniu z obowiązującymi w pracy (NrP).

Wykaz skrótów

Skrót	
Ac	Grupa acetylowa (ang. <i>Acetyl group</i>)
AcOH	Kwas octowy (ang. <i>Acetic Acid</i>)
Bz	Grupa benzoilowa (ang. <i>Benzoyl group</i>)
CA	Kwas cholowy (ang. <i>Cholic Acid</i>)
¹³C NMR	Węglowy magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance</i>)
CoA	Koenzym A (ang. <i>Coenzyme A</i>)
CTX	Ksantomatoza mózgowo–ścięgnowa (ang. <i>Cerebrotendinous Xanthomatosis</i>)
CuAAC	Cykloaddycja azydowo–alkinowa katalizowana jonami Cu(I) (ang. <i>Cu(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition</i>)
DA	Kwas deoksycholowy (ang. <i>Deoxycholic Acid</i>)
DDQ	Dichlorodicyjanobenzochinon (ang. <i>Dichlorodicyanobenzoquinone</i>)
DHEA	Dehydroepiandrosteron (ang. <i>Dehydroepiandrosterone</i>)
DHT	Dihydrotestosteron (ang. <i>Dihydrotestosterone</i>)
DIAD	Diizopropylodwumelanian (ang. <i>Diisopropyl azodicarboxylate</i>)
DMF	Dimetyloformamid (ang. <i>Dimethylformamide</i>)
EDC·HCl	Chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (ang. <i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride</i>)
ESI-MS	Spektrometria masowa z jonizacją elektrosprayową (ang. <i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>)
FHB	Fuzarioza kłosów (ang. <i>Fusarium Head Blight</i>)
FPP	Difosforan farnesylu (ang. <i>Farnesyl Pyrophosphate</i>)
FRR	Zgnilizna podstawy źdźbła (ang. <i>Fusarium Foot and Root Rot</i>)
FT-IR	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
FXR	Receptor farnesoidowy X (ang. <i>Farnesoid X Receptor</i>)
HMG-CoA	Reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (ang. <i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase</i>)
¹H NMR	Protonowy magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Proton Nuclear Magnetic Resonance</i>)
HOF	Ciepło tworzenia (ang. <i>Heat of Formation</i>)
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HTZ	Hormonalna terapia zastępcza (ang. <i>Hormone Replacement Therapy</i>)

IBX	Kwas 2-jodoksybenzoesowy (ang. <i>2-Iodoxybenzoic Acid</i>)
LA	Kwas litocholowy (ang. <i>Lithocholic Acid</i>)
LDL	Lipoproteina o niskiej gęstości (ang. <i>Low-Density Lipoprotein</i>)
LPS	Lipopolisacharyd (ang. <i>Lipopolysaccharide</i>)
LXR	Receptor wątrobowy X (ang. <i>Liver X Receptor</i>)
mCPBA	Kwas <i>m</i> -chloronadbenzoesowy (ang. <i>m-Chloroperoxybenzoic Acid</i>)
MRP1	Białko związane z wielolekoopornością typu 1 (ang. <i>Multidrug Resistance-associated Protein 1</i>)
NAFLD	Niealkoholowe stłuszczenie wątroby (ang. <i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i>)
<i>p</i>-TsOH	Kwas <i>p</i> -toluenosulfonowy (ang. <i>p-Toluenesulfonic Acid</i>)
PA	Prawdopodobieństwo wystąpienia danej aktywności biologicznej (ang. <i>Probability "to be Active"</i>)
PASS	Przewidywane spektrum aktywności substancji (ang. <i>Prediction of Activity Spectra for Substances</i>)
PDB ID	Identyfikator w bazie danych białek (ang. <i>Protein Data Bank Identifier</i>)
PI	Prawdopodobieństwo braku wystąpienia danej aktywności biologicznej (ang. <i>Probability „to be Inactive”</i>)
PM5	Metoda parametryczna 5 (ang. <i>Parametric Method 5</i>)
PMB	Polimyksyna B (ang. <i>Polymyxin B</i>)
POCl₃	Trichlorek fosforylu (ang. <i>Phosphoryl Chloride</i>)
RuAAC	Cykloaddycja azydkowo–alkinowa katalizowana rutenem (ang. <i>Ruthenium-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition</i>)
SMT	Sterol C(24)-metylotransferaza (ang. <i>Sterol C(24)-Methyltransferase</i>)
TBDMS	Grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa (ang. <i>tert-Butyldimethylsilyl Group</i>)
TES	Grupa trietylosililowa (ang. <i>Triethylsilyl Group</i>)
TFA	Kwas trifluorooctowy (ang. <i>Trifluoroacetic Acid</i>)
THF	Tetrahydrofuran (ang. <i>Tetrahydrofuran</i>)
TIPS	Grupa triizopropylsililowa (ang. <i>Triisopropylsilyl Group</i>)
TMG	Tetrametyloguanidyna (ang. <i>Tetramethylguanidine</i>)
TRI5	Syntaza trichodieny (ang. <i>Trichodiene Synthase</i>)
TGR5	Receptor sprzężony z białkiem G typu Takeda 5 (ang. <i>Takeda G Protein-Coupled Receptor 5</i>)
UV	Promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>Ultraviolet Radiation</i>)

Wstęp

Natura stanowi ogromne źródło związków o wyjątkowej aktywności biologicznej, obejmujących liczne klasy struktur organicznych o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. Związki naturalne i ich pochodne od dziesięcioleci stanowią podstawę nowoczesnej farmakoterapii, jednak coraz częściej napotyka się ograniczenia wynikające z niskiej biodostępności, słabej rozpuszczalności, szybkiego metabolizmu lub narastającej oporności mikroorganizmów. Poszukiwanie nowych strategii projektowania cząsteczek o ulepszonych parametrach farmakologicznych i selektywności wobec celów biologicznych stanowi obecnie jedno z głównych wyzwań chemii medycznej. Jednym z obiecujących kierunków w tym obszarze jest sprzęganie dwóch bioaktywnych cząsteczek w jedną strukturę tzw. biokoniugat. Pozwala to na połączenie ich właściwości farmakologicznych, ograniczenie toksyczności oraz zwiększenie skuteczności terapeutycznej. Biokoniugaty są szczególnie interesujące z punktu widzenia projektowania nowoczesnych leków o działaniu celowanym, gdyż umożliwiają jednoczesną modyfikację aktywności biologicznej i właściwości fizykochemicznych przy zachowaniu wysokiej stabilności strukturalnej.

Steroidy stanowią jedną z najważniejszych klas związków naturalnych występujących we wszystkich organizmach eukariotycznych. Ich czteropierścieniowy rdzeń cyklopentanoperhydrofenantrenowy nadaje cząsteczkom sztywną strukturę, warunkującą ich oddziaływanie z receptorami białkowymi. Silnie lipofilowy charakter umożliwia im przenikanie przez błony komórkowe i wpływanie na liczne procesy metaboliczne. Obecność reaktywnych grup funkcyjnych, zwłaszcza hydroksylowej w pozycji C(3) i karboksylowej lub alkilowej w C(17), ułatwia modyfikacje chemiczne prowadzące do pochodnych o nowych właściwościach biologicznych. Dzięki temu steroidy stanowią atrakcyjny szkielet do projektowania związków bioaktywnych.

Szczególne znaczenie mają dwie grupy związków steroidowych: kwasy żółciowe i sterole. Kwasy żółciowe, będące pochodnymi cholanu, wykazują amfipatyczny charakter oraz zawierają reaktywne grupy hydroksylowe i karboksylowe, co czyni je interesującymi substratami w chemii supramolekularnej. Sterole, takie jak cholesterol, pełnią istotną rolę strukturalną w błonach komórkowych, a modyfikacje ich cząsteczek pozwalają na uzyskanie pochodnych o zmienionej polarności i aktywności biologicznej. Obie grupy wykazują dużą różnorodność chemiczną, stanowiąc dogodne platformy do tworzenia biokoniugatów o określonych funkcjach.

Projektowanie nowych koniugatów steroidowych nabiera znaczenia wobec narastającej oporności drobnoustrojów na dostępne środki farmakologiczne. Modyfikacje strukturalne mogą prowadzić do otrzymywania związków o zwiększonej przepuszczalności przez błony komórkowe patogenów lub zdolnych do oddziaływania z nowymi celami molekularnymi. Kluczowym narzędziem w syntezie tego typu pochodnych jest chemia „click”, zaproponowana przez Sharplessa. Opiera się ona

na prostych, wysokowydajnych reakcjach prowadzonych w łagodnych warunkach, prowadzących do trwałych produktów. Najbardziej znaną reakcją z tego zakresu jest katalizowana jonami Cu(I) cykloaddycja azydku i alkinu (CuAAC), prowadząca do powstania pierścienia 1,2,3-triazolowego. Układ triazolowy jest wyjątkowo stabilny, odporny na hydrolizę i degradację enzymatyczną, a jednocześnie zdolny do tworzenia licznych oddziaływań niekowalencyjnych z białkami. Dzięki temu stanowi idealny łącznik w projektowaniu biokoniuatów.

Zastosowanie chemii „click” w modyfikacjach steroidów umożliwia szybkie i selektywne tworzenie stabilnych koniuatów o przewidywalnej strukturze i wysokim potencjale biologicznym. Połączenie fragmentów kwasów żółciowych i steroli przez pierścień triazolowy pozwala uzyskać wielofunkcyjne układy o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym, szczególnie w kontekście rosnącej oporności drobnoustrojów na klasyczne leki przeciwdrobnoustrojowe.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie i scharakteryzowanie nowych koniuatów steroidowych o potencjalnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Zsyntezowano łącznie dwadzieścia dziewięć nowych związków, w tym dwadzieścia siedem koniuatów o charakterze mieszanym i dimerycznym. Związki te otrzymano w wyniku reakcji Huisgena będącej przykładem chemii „click”, prowadzącej do powstania trwałego połączenia 1,2,3-triazolowego. W pracy przeprowadzono pełną analizę spektroskopową (NMR, FT-IR) i spektrometryczną (ESI-MS) otrzymanych produktów, badania *in silico* obejmujące obliczenia kwantowo-mechaniczne (PM5), predykcję aktywności biologicznej metodą PASS oraz dokowanie molekularne. W wybranych przypadkach wykonano także badania biologiczne obejmujące ocenę aktywności przeciwgrzybiczej i hemolitycznej. Uzyskane wyniki posłużyły do określenia zależności między strukturą a aktywnością otrzymanych koniuatów oraz do sformułowania wniosków dotyczących ich potencjalnego zastosowania jako związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Zastosowane podejście badawcze, łączące syntezę, analizę strukturalną oraz metody *in silico* i *in vitro*, pozwoliło na uzyskanie nowych, wcześniej nieopisywanych danych dotyczących właściwości koniuatów steroidowych. Otrzymane rezultaty rozszerzają aktualną wiedzę w zakresie chemii i biologii tej klasy związków. Uzyskane wyniki istotnie poszerzają aktualny stan wiedzy w obszarze chemii koniuatów steroidowych i wskazują nowe kierunki ich funkcjonalizacji.

Badania opisane w niniejszej pracy znalazły odzwierciedlenie w publikacjach w recenzowanych czasopismach naukowych z zakresu chemii organicznej i chemii medycznej, m.in. *ACS Omega*, *Steroids*, *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Journal of Molecular Structure*, a także były prezentowane na konferencjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym.

Sekcja literaturowa

1. Charakterystyka ogólna steroidów

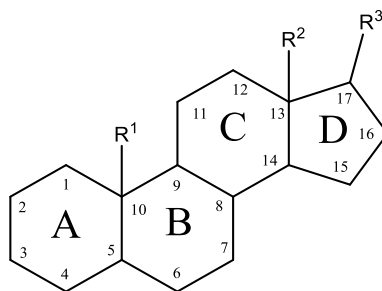
Steroidy stanowią obszerną grupę związków pochodzenia naturalnego. Są obecne w organizmach zwierzęcych, roślinnych oraz w mikroorganizmach. Wspólną cechą wszystkich steroidów jest obecność charakterystycznego tetracyklicznego szkieletu węglowego [1,2]. Zmienność strukturalna wewnątrz tej grupy związków wynika głównie z różnic w układzie pierścieni tworzących szkielet, obecności grup funkcyjnych w określonych pozycjach szkieletu oraz zróżnicowania budowy i długości łańcucha bocznego. Grupy chemiczne, takie jak hydroksylowe, karbonylowe czy nienasycone wiązania podwójne decydują o właściwościach fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej poszczególnych grup steroidów.

Pośród wszystkich steroidów szczególną rodzinę związków stanowią sterole, zawierające grupę hydroksylową w swojej strukturze. Najbardziej znanym przedstawicielem tej klasy związków jest cholesterol. Jest to kluczowy składnik błon komórkowych zwierząt, odpowiedzialny za regulację ich płynności i integralności [3]. Pełni on także rolę biosyntetycznego prekursora wielu kluczowych związków takich jak kwasy żółciowe, witamina D, glikokortykoidy czy hormony płciowe [1]. Kwasy żółciowe są hydroksylowanymi pochodnymi cholesterolu syntezowanymi w wątrobie na drodze wieloetapowych przemian biochemicznych [4]. Zawierają charakterystyczny, amfipatyczny układ grup hydroksylowych oraz grupę karboksylową w łańcuchu bocznym [5]. Występują głównie w postaci soli sodowych i potasowych pełniąc istotną rolę w procesach emulgacji lipidów w przewodzie pokarmowym oraz regulacji gospodarki lipidowej organizmu. Dzięki swojej strukturze i reaktywności chemicznej, kwasy żółciowe oraz ich pochodne stanowią atrakcyjną grupę związków do projektowania związków biologicznie czynnych.

Steroidy odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Hormony steroidowe uczestniczą w regulacji metabolizmu, rozwoju płciowego, procesów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej. Niektóre steroidy wykazują również działanie cytotoksyczne, antybiotyczne czy przeciwnowotworowe co czyni je obiektem badań farmakologicznych i chemicznych.

1.1. Struktura steroidów

Charakterystyczną cechą wszystkich steroidów jest obecność szkieletu węglowego, będącego pochodną 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenu (Schemat 1). Składa się on z trzech pierścieni cykloheksanowych (A, B i C) oraz jednego pierścienia cyklopentanowego (D), tworząc wspólnie tetracykliczny rdzeń węglowy. Szkielet ten uznawany za podstawowy motyw strukturalny mogący ulegać licznym modyfikacjom, tym samym determinując właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczną poszczególnych związków steroidowych [6].



R ¹	R ²	R ³	Przykłady	
			A/B– <i>cis</i>	A/B– <i>trans</i>
CH ₃	CH ₃	H	Testan	Androstan
CH ₃	H	H	Estran	–
CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃	Pregnan	Allopregnan
CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH ₃	Cholan	Allocholan
CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃) (CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂	Koprostan	Cholestan

Schemat 1. Numeracja atomów węgla w szkielecie steroidowym i przykłady podstawowych struktur steroidowych.

Podstawowy szkielet steroidowy zawiera 17 atomów węgla których numeracja została ujednolicona dla tetracyklicznego układu pierścieni i jest powszechnie stosowana w nomenklaturze związków steroidowych. Typowymi elementami tej struktury są dwie grupy metylowe zlokalizowane przy atomach C(10) i C(13) oraz zróżnicowany strukturalnie łańcuch boczny przy atomie C(17). Łańcuch ten może przyjmować postać prostych bądź rozgałęzionych fragmentów węglowodorowych o różnym stopniu nienasycenia, grupy karboksylowe bądź dodatkowe pierścienie (w tym heterocykliczne).

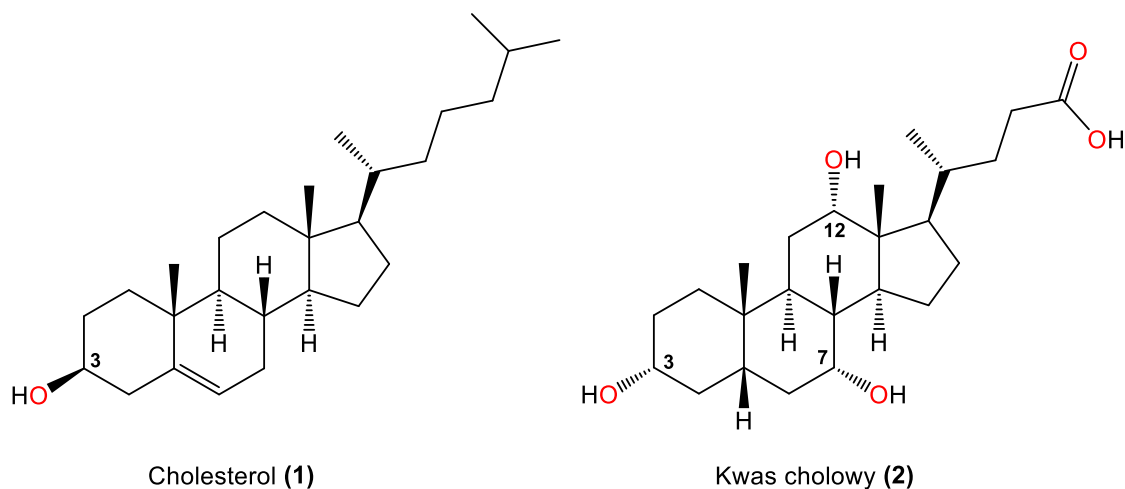
Zróżnicowanie strukturalne steroidów wynika z kilku czynników takich jak [7]:

- Konfiguracja przestrzenna kondensacji pierścieni – możliwe są różne układy przestrzenne pomiędzy pierścieniami A/B, B/C i C/D m.in. układ *cis* oraz *trans*;
- Stopień nienasycenia – obecność wiązań podwójnych w obrębie szkieletu;
- Rodzaj podstawników – głównie w położeniach C(3), C(7), C(11), C(17) i innych;
- Budowy łańcucha bocznego przy C(17) – długość oraz rodzaj wpływa na klasyfikację steroidu i jego właściwości fizykochemiczne.

Na Schemacie 1 przedstawiono zestawienie podstawowych przykładowych struktur szkieletów steroidowych w zależności od konfiguracji pierścieni A/B oraz rodzaju podstawników R¹, R² i R³. Układ pierścieniowy oraz budowa łańcucha bocznego stanowi podstawę do klasyfikacji steroidów na grupy takie jak estrany, androstany, pregnany, cholany czy cholestany. Przykładowo, układ estranowy

charakteryzuje się brakiem łańcucha bocznego przy atomie C(17) ($R^3=H$), natomiast szkielet cholestanowy posiada w tym miejscu rozbudowany fragment alifatyczny.

Innym sposobem klasyfikacji steroidów jest obecność charakterystycznych grup funkcyjnych. Sterole np. cholesterol (**1**) posiadają przy atomie C(3) grupę hydroksylową, najczęściej w konfiguracji β (Rysunek 1) [8]. Kwasy żółciowe np. kwas cholowy (**2**), będące pochodnymi cholesterolu posiadają minimum jedną grupę hydroksylową w obrębie szkieletu oraz karboksylową przy łańcuchu bocznym (Rysunek 1). Cechy te są odpowiedzialne za ich amfipatyczność.



Rysunek 1. Struktury chemiczne cholesterolu oraz kwasu cholowego.

1.2 Stereochemia steroidów

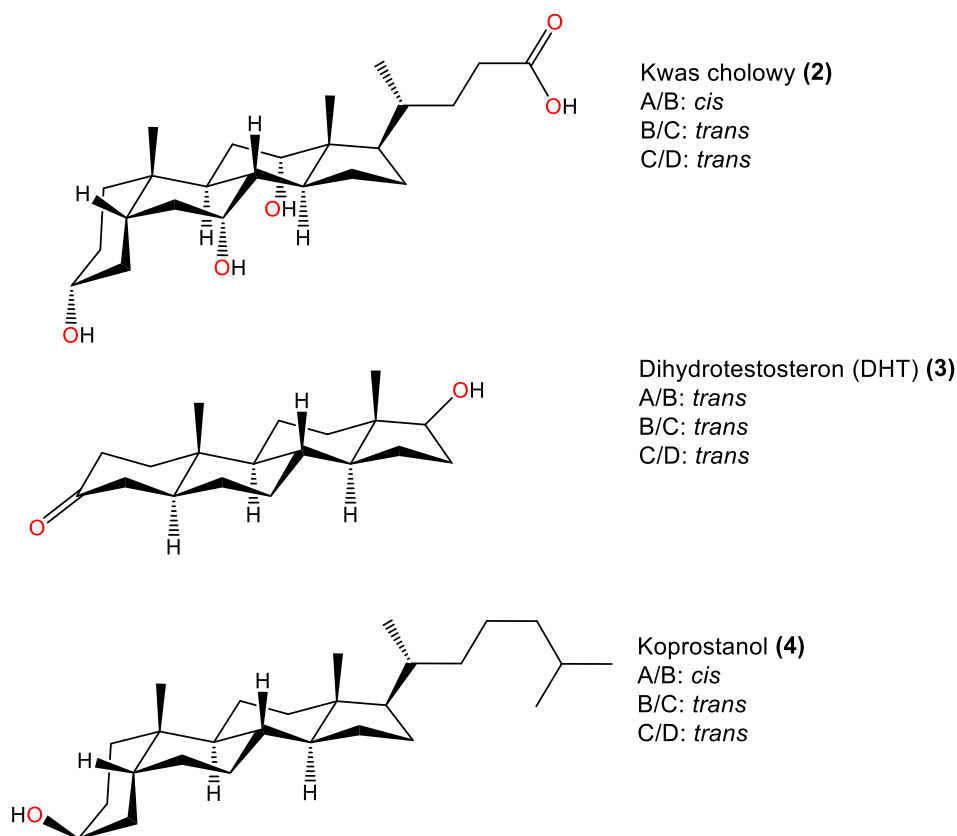
Szkielet 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenu zawiera siedem centrów chiralnych przy atomach węgla C(5), C(8), C(9), C(10), C(14) oraz C(17). Warunkiem koniecznym dla istnienia centrów chiralnych jest obecność czterech różnych podstawników przy rozpatrywanych atomach węgla. Teoretyczna liczba możliwych stereoizomerów wynikająca z obecności siedmiu centrów stereogenicznych wynosi 2^7 , czyli 128. W rzeczywistości liczba ta jest ograniczona przez sztywność i wzajemne ułożenie pierścieni w szkielecie steroidowych. Przyjęte konformacje, zwłaszcza dla połączeń pierścieni *trans*, eliminują część możliwych konfiguracji przestrzennych.

W przypadku steroli np. cholesterolu (**1**) (Rysunek 1), dodatkowo pojawia się grupa hydroksylowa przy atomie C(3), która stanowi kolejne centrum chiralności. Skutkuje to dalszym zwiększeniem liczby potencjalnych stereoizomerów. Każde dodatkowe centrum stereogeniczne w cząsteczce podwaja możliwą ilość konfiguracji przestrzennych. Warto również wspomnieć o związkach, w których centrum stereogeniczne powstaje wtórnie w wyniku podstawienia grupy funkcyjnej, np. epoksydacji lub hydroksylacji. Przykładem są hydroksylowane pochodne cholesterolu, w których stereochemia przy nowo wprowadzonych centrach decyduje o rozpoznawaniu przez enzymy metabolizujące.

Steroidy pochodzenia naturalnego wykazują dużą różnorodność stereochemiczną, która bezpośrednio wpływa na ich właściwości biologiczne. Kluczowym aspektem jest wzajemna orientacja pierścieni A/B. Orientacja ta może występować w dwóch wariantach *cis* lub *trans*, zależnie od konfiguracji w pozycjach C(5) oraz C(10). Różnica ta pozwala wyodrębnić dwa główne szeregi strukturalne: normalny (układ *cis*, np. cholestan) oraz *allo* (układ *trans*, np. koprostan) (Schemat 1) [9]. Choć różnica dotyczy jedynie geometrii w jednym miejscu szkieletu, znacząco kształtuje przestrzenną budowę cząsteczek, co przekłada się na ich rozpoznawanie przez receptory biologiczne. Historycznie pierwszymi poznanymi steroidami były związki o układzie *cis* A/B pierścieni w szkielecie. Określono je mianem steroidów normalnych. Później odkryte związki o układzie pierścieni *trans* A/B nazwano *allo* steroidami, od greckiego „*allos*” czyli „inny”. Termin ten miał podkreślać odmienność stereochemiczną nowo odkrytej grupy steroidów. Nazewnictwo obydwu szeregów jest powszechnie używane w nazewnictwie steroidów, z uwagi na fakt iż różnice w konfiguracji znacząco wpływają na właściwości biologiczne i fizykochemiczne.

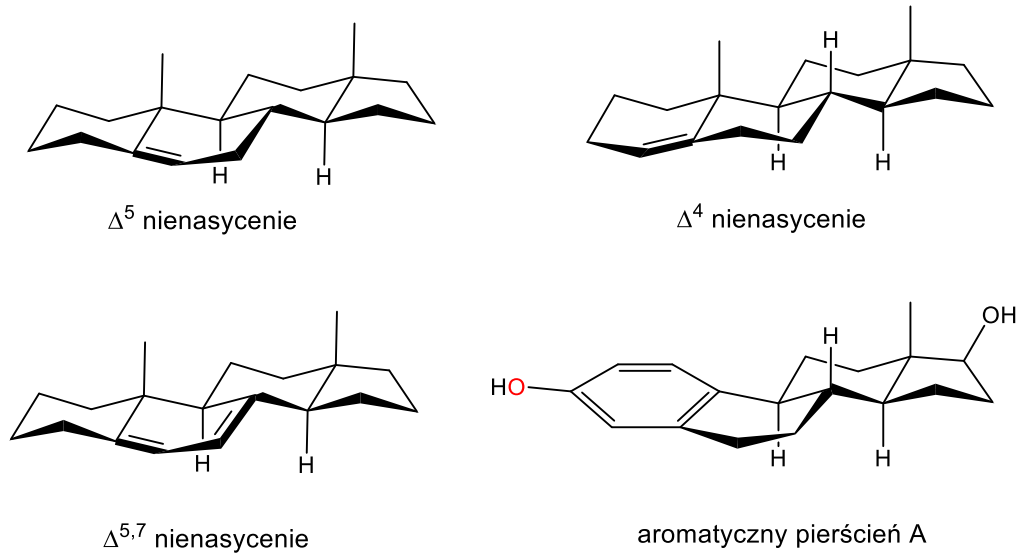
Podobne znaczenie mają inne układy pierścieni. W przypadku połączeń B/C i C/D najczęściej obserwuje się układ *trans*, który nadaje cząsteczce bardziej liniową i sztywną konformację. Stabilizuje on strukturę całego rdzenia steroidowego i ogranicza możliwość przekształceń konformacyjnych. Układ *cis* w tych pozycjach występuje rzadziej i zwykle jest związany z określonymi grupami związków o specyficznej funkcji biologicznej. W naturalnych estranach i androstanach dominują układy *trans* B/C i C/D, podczas gdy w niektórych kwasach żółciowych oraz steroidach pochodzenia mikrobiologicznego występują mniej typowe konfiguracje – np. układ *cis* A/B przy zachowanym *trans* C/D. Konfiguracja pierścieni wpływa nie tylko na rozpoznanie przez receptory biologiczne, ale również na rozpuszczalność, powinowactwo do błon biologicznych oraz stabilność chemiczną. Jest to szczególnie istotne w przypadku związków o działaniu hormonalnym, takich jak androgeny, estrogeny, glikokortykoidy czy progestageny.

Przykłady wybranych steroidów z uwzględnieniem stereochemii pierścieni szkieletu 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenu przedstawiono na Rysunku 2. Dihydrotestosteron (DHT) (**3**) jest naturalnym androgenem o w pełni *trans*-połączonych pierścieniach A/B, B/C i C/D (Rysunek 2) [1]. Taka konfiguracja nadaje cząsteczce sztywną, wydłużoną i stosunkowo płaską geometrię, co sprzyja jej wysokiemu powinowactwu do receptora androgenowego. Kwas cholowy (**2**), należący do grupy kwasów żółciowych, charakteryzuje się układem *cis* A/B oraz *trans* B/C i C/D (Rysunek 2). Obecność układu *cis* A/B powoduje wygiętą konformację cząsteczki, natomiast *trans* C/D stabilizuje sztywniejszą część rdzenia steroidowego. Podobną geometrię wykazuje koprostanol (**4**), steroid pochodzenia mikrobiologicznego, powstający w wyniku redukcji cholesterolu w jelicie grubym (Rysunek 2). Jego układ pierścieni *cis* A/B i *trans* C/D wpływa na wyraźnie zgiętą budowę przestrzenną cząsteczki.



Rysunek 2. Struktury chemiczne dihydrotestosteronu, kwasu cholowego oraz koprostanolu z uwzględnieniem stereochemii pierścieni A/B/C/D.

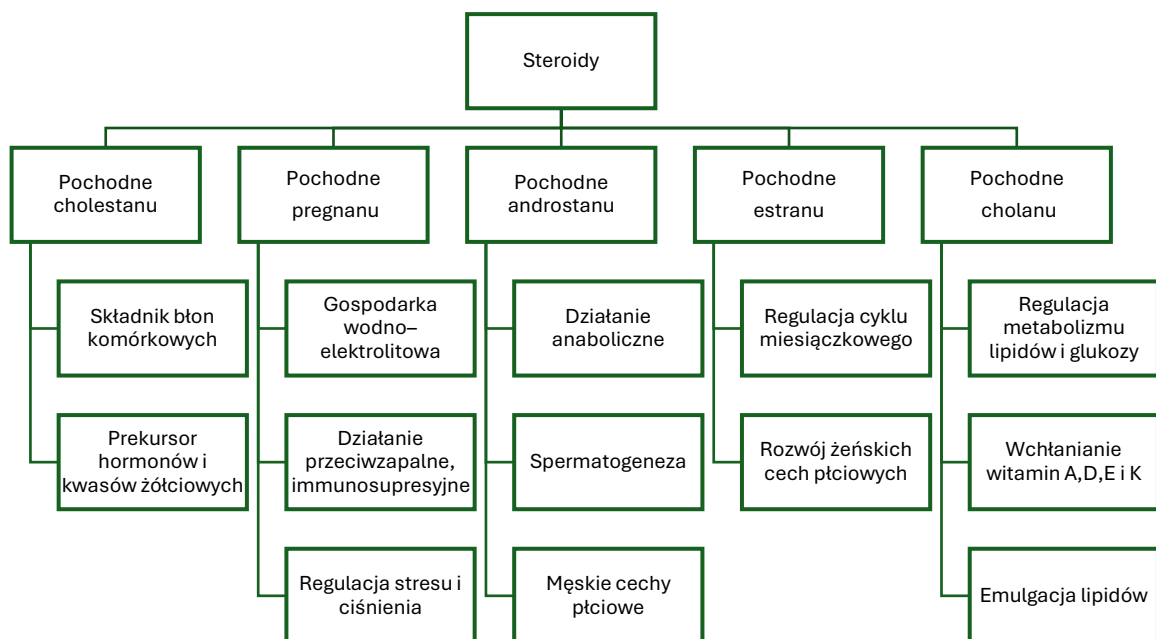
Obecność wiązania podwójnego w obrębie pierścieni szkieletu steroidowego znacząco wpływa na ich konformację i sztywność (Rysunek 3) [1,3]. Najczęściej spotykanymi układami są Δ^4 (C(4)=C(5)) oraz Δ^5 (C(5)=C(6)), szczególnie w pierścieniu B. Układ Δ^5 , charakterystyczny m.in. dla cholesterolu (1) pozwala na zachowanie większej elastyczności pierścienia A, przez co cała cząsteczka zyskuje pewną ruchomość konformacyjną. Wariant Δ^4 , obecny np. w kortyzolu czy testosteronie, prowadzi do spłaszczenia pierścienia A, ograniczając jego rotację (Rysunek 3). Ponadto stopień nienasycenia wpływa na układ centrów chiralnych, eliminując możliwość ich istnienia na atomach bezpośrednio zaangażowanych w wiązanie podwójne. Przykładem szczególnym jest aromatyzacja pierścienia A, obserwowana m.in. w estradiolu, skutkująca utratą centrum chiralności przy atomie C(10) i powstaniem planarnie usztywnionego układu aromatycznego (Rysunek 3). Konsekwencją tej zmiany jest zasadniczo inny sposób wiązania z receptorami estrogenowymi.



Rysunek 3. Struktury chemiczne i stereochemia szkieletu steroidowego w zależności od obecności wiązań nienasyconych w strukturze.

1.3 Aktywność biologiczna steroidów

Steroidy działają w wielu obszarach fizjologii. Regulują ekspresję genów, metabolizm i gospodarkę wodno–elektrolitową. Uczestniczą także w trawieniu lipidów i utrzymaniu integralności błon. Na Schemacie 2 przedstawiono podział steroidów ze względu na ich aktywność biologiczną. Ich działanie często związane jest z oddziaływaniem z wyspecjalizowanymi białkami, takimi jak enzymy, transportery czy receptory wewnątrzkomórkowe. Interakcje te zależą nie tylko od rodzaju grup funkcyjnych, lecz także od kształtu cząsteczki, jej konformacji przestrzennej oraz stopnia nienasycenia.



Schemat 2. Podział steroidów ze względu na ich aktywność biologiczną.

Wśród steroidów wyróżnia się kilka głównych podklas o zróżnicowanej funkcji biologicznej:

- Pochodne cholestanu, do których należy m.in. cholesterol, odgrywają kluczową rolę jako składnik błon komórkowych oraz prekursor w biosyntezie hormonów steroidowych i kwasów żółciowych. Cholesterol wpływa na płynność błony oraz uczestniczy w tworzeniu raftów lipidowych, pełniących funkcje sygnałowe i organizacyjne w komórkach ssaków;
- Pochodne pregnanu, takie jak kortyzol, aldosteron czy progesteron, są hormonami steroidowymi produkowanymi w korze nadnerczy. Regulują one odpowiedzi stresowe, gospodarkę elektrolitową oraz przebieg cyklu miesięczkowego. Kortykosteroidy wykazują również silne działanie przeciwzapalne i immunosupresyjne, co znajduje zastosowanie w farmakoterapii;
- Pochodne androstanu, reprezentowane przez testosteron i androsteron, to główne męskie hormony płciowe. Odpowiadają za rozwój cech płciowych, regulację spermatogenezy oraz anaboliczne procesy związane z budową masy mięśniowej i gęstości kości. Ich syntetyczne pochodne znalazły zastosowanie w leczeniu niedoborów hormonalnych, ale również jako środki dopingujące;
- Pochodne estranu, takie jak estradiol i estron, są żeńskimi hormonami płciowymi. Uczestniczą w regulacji cyklu miesięczkowego, rozwoju gruczołów sutkowych oraz wielu innych procesach rozrodczych i metabolicznych. Współczesna terapia hormonalna (HTZ) oraz środki antykoncepcyjne bazują w dużej mierze na pochodnych estradiolu;
- Pochodne cholanu, reprezentowane przez kwasy żółciowe (np. kwas cholowy, deoksycholowy), pełnią funkcje fizjologiczne w procesie trawienia lipidów. Działają jako detergenty ułatwiające emulgację tłuszczów oraz wspomagają wchłanianie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Ponadto uczestniczą w regulacji metabolizmu lipidów i glukozy poprzez interakcje z receptorami FXR (receptor farnesoidowy X) i TGR5 (receptor sprzężony z białkiem G typu Takeda 5) [9].

W grupie steroidów istotne miejsce zajmują również sterole i ich utlenione pochodne (oksysterole), które mogą działać jako związki sygnałowe, wpływając na ekspresję genów związanych z metabolizmem lipidów lub odpowiedzią zapalną [10]. Zdolność do selektywnej modyfikacji ich struktury otwiera perspektywy projektowania nowych pochodnych o ukierunkowanym działaniu farmakologicznym.

Modyfikacja steroidów umożliwia nie tylko poprawę ich właściwości farmakokinetycznych, ale również generowanie nowych struktur o potencjalnie odmiennym profilu biologicznym. Tego rodzaju

strategie stanowią podstawę wielu prac badawczych w zakresie chemii medycznej i biologii chemicznej [11,12].

2. Sterole

Sterole stanowią obszerną grupę naturalnych steroidów obecnych we wszystkich organizmach eukariotycznych. Pełnią kluczowe funkcje strukturalne i metaboliczne. W ich budowie charakterystyczne jest występowanie grupy hydroksylowej przy atomie węgla C(3) oraz zróżnicowanego strukturalnie, najczęściej alifatycznego łańcucha bocznego w pozycji C(17) [13]. W zależności od źródła biologicznego, sterole różnią się budową m.in. stopniem nienasycenia, co warunkuje ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne.

Cząsteczki te są amfifilowe, zawierają zarówno fragment hydrofilowy (grupa hydroksylowa), jak i hydrofobowy (reszta steroidowa i łańcuch boczny), co umożliwia im integrację z błonami biologicznymi. Dzięki tej cesze pełnią one funkcję stabilizującą błony komórkowe. Regulują ich płynność, grubość oraz tworzenie mikrostruktur. Sterole są także prekursorami licznych metabolitów wtórnych – hormonów steroidowych, kwasów żółciowych, witamin D oraz związków sygnałowych.

Można wyróżnić trzy główne klasy steroli, zależne od źródła ich pochodzenia:

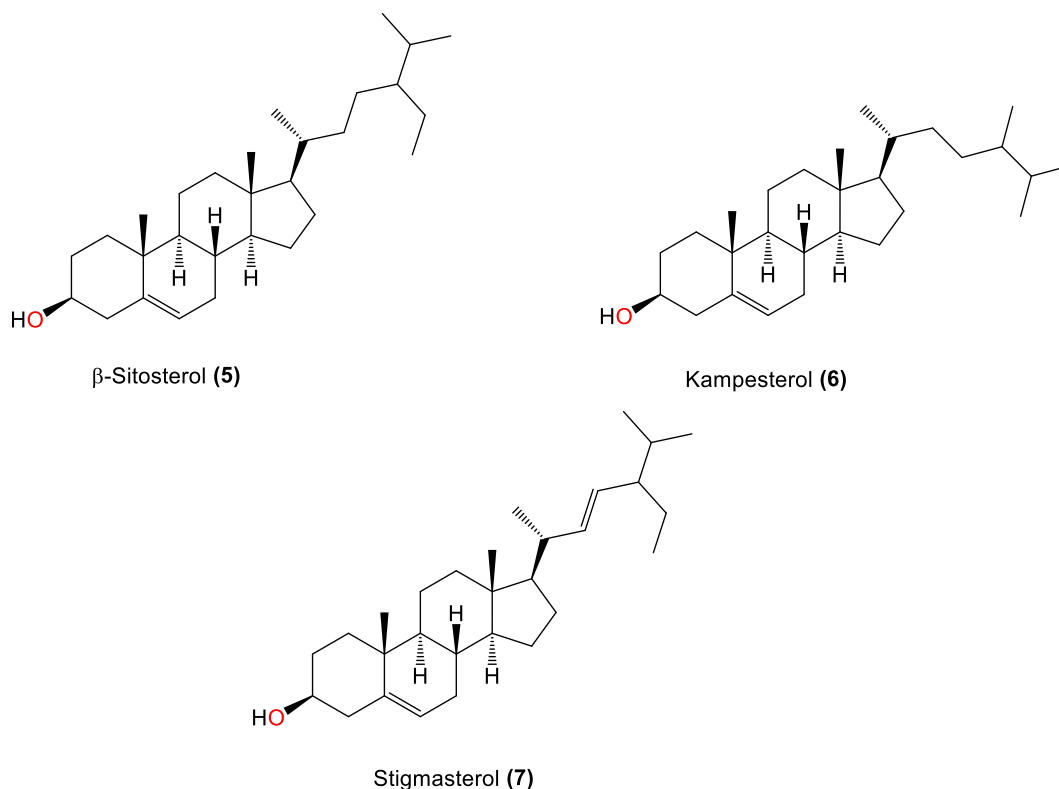
- **Fitosterole** – występujące u roślin, z dominującymi przedstawicielami: β -sitosterolem, kampesterolem i stigmasterolem;
- **Zoosterole** – głównie cholesterol, obecny w błonach komórkowych zwierząt i uczestniczący w syntezie hormonów;
- **Mykosterole** – występujące u grzybów, z ergosterolem jako głównym komponentem błon komórkowych.

Pomimo wspólnych cech strukturalnych i biosyntetycznych, poszczególne klasy steroli wykazują istotne różnice w funkcji biologicznej i metabolizmie. W kolejnych podrozdziałach omówiono budowę, biosyntezę, występowanie oraz znaczenie fitosteroli, zoosteroli i mykosteroli.

2.1 Fitosterole

Fitosterole to naturalnie występujące steroidy roślinne, strukturalnie zbliżone do cholesterolu [14]. Pełnią w organizmach roślinnych głównie funkcję strukturalną jako składniki błon komórkowych. Wśród roślinnych steroli najczęściej spotykane są: β -sitosterol (**5**), kampesterol (**6**) i stigmasterol (**7**), przy czym β -sitosterol zwykle dominuje ilościowo w tkankach roślinnych [15]. Struktury powyższych związków zostały przedstawione na Rysunku 4.

Struktura fitosteroli opiera się na szkieletach cholestanu, ergostanu lub stigmastanu, różniących się długością i rozgałęzieniem łańcucha bocznego w pozycji atomu C(17). Główne różnice pomiędzy fitosterolami a cholesterolem dotyczą budowy łańcucha bocznego. W większości przypadków fitosterole zawierają dodatkowe grupy metylowe lub etylowe w pozycji atomu węgla C(24), jak np. w stigmasterolu (7) (Rysunek 4).



Rysunek 4. Struktury chemiczne wybranych fitosteroli.

Fitosterole mogą występować jako wolne alkohole, estry kwasów tłuszczowych lub jako glikozydy. Ponadto, niektóre rośliny syntetyzują stanole – całkowicie nasycone pochodne steroli np. sitostanol, o zbliżonej funkcji biologicznej.

Fitosterole są szeroko rozpowszechnione w tkankach roślinnych, szczególnie w błonach komórkowych. Największe stężenia obserwuje się w nasionach oleistych, otrębach, kielkach, orzechach i olejach roślinnych [16]. W organizmach roślinnych pełnią funkcję analogiczną do cholesterolu, odpowiadają za utrzymanie stabilności błon biologicznych, regulują ich płynność oraz biorą udział w odpowiedzi komórki na czynniki stresowe.

Biosynteza fitosteroli przebiega z udziałem szlaku mewalonianowego, a podstawowym prekursorem jest cyklartenol, produkt cyklizacji skwalenu (w odróżnieniu od lanosterolu powstającego w organizmach zwierząt). Z cyklartenolu syntetyzowane są kolejne sterole przez metylacje, redukcje

i przesunięcia wiązań podwójnych. Enzymy takie jak C(24)–metylotransferaza sterolowa (SMT) oraz Δ^7 –reduktaza odpowiadają za różnorodność końcowych produktów.

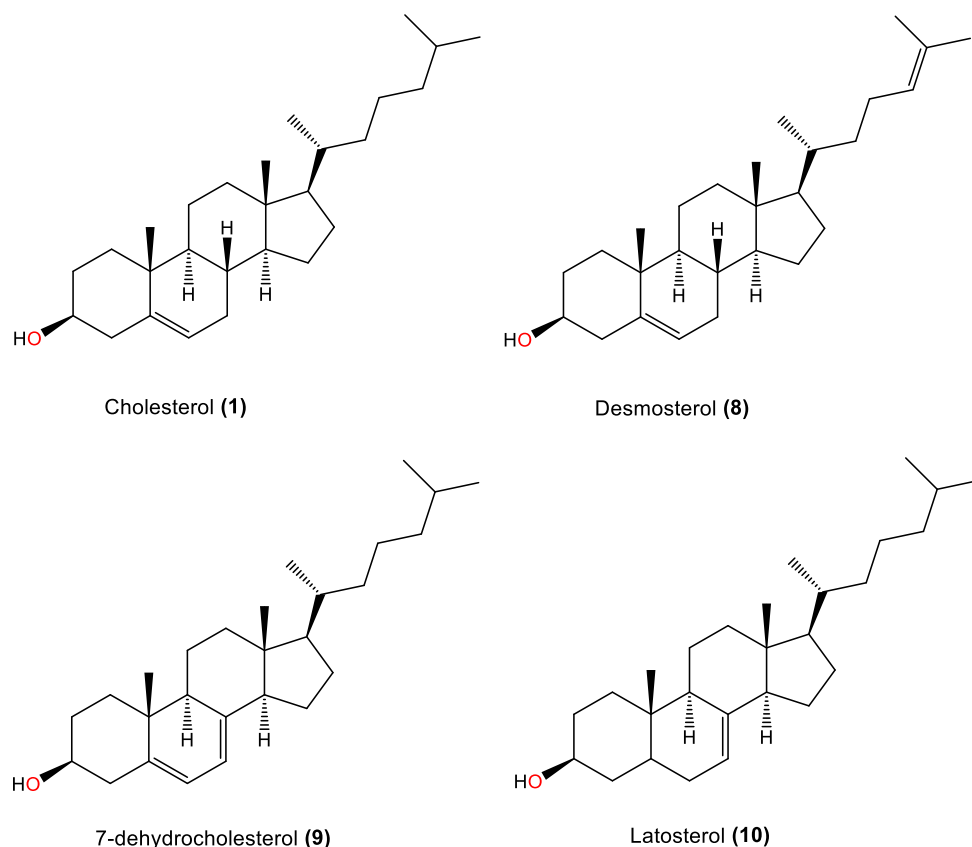
Fitosterole pełnią ważną rolę nie tylko w fizjologii roślin, ale także działają prozdrowotnie w organizmach ludzkich. Ze względu na strukturalne podobieństwo do cholesterolu, fitosterole konkurują z nim o wchłanianie w jelicie cienkim, co prowadzi do obniżenia poziomu cholesterolu całkowitego i LDL we krwi [17]. Mechanizm ten wykorzystywany jest w produkcji żywności funkcjonalnej, w tym margaryn wzbogaconych w sterole roślinne. Wykazano także, że niektóre fitosterole mają działanie przeciwwzapalne, przeciwnowotworowe (szczególnie w nowotworach jelita grubego i prostaty), a także immunomodulujące. Prowadzone są badania nad wykorzystaniem fitosteroli jako ligandów receptorów jądrowych (np. LXR), co mogłoby poszerzyć zakres ich potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

2.2 Zoosterole

Sterole zwierzęce (zoosterole) to steroidy charakterystyczne dla organizmów zwierzęcych. Pełnią kluczowe funkcje w utrzymaniu integralności błon komórkowych, regulacji metabolizmu lipidów oraz biosyntezie hormonów steroidowych. Cholesterol jest dominującym sterolem w tej grupie, stanowiąc główny komponent sterolowy tkanek zwierzęcych.

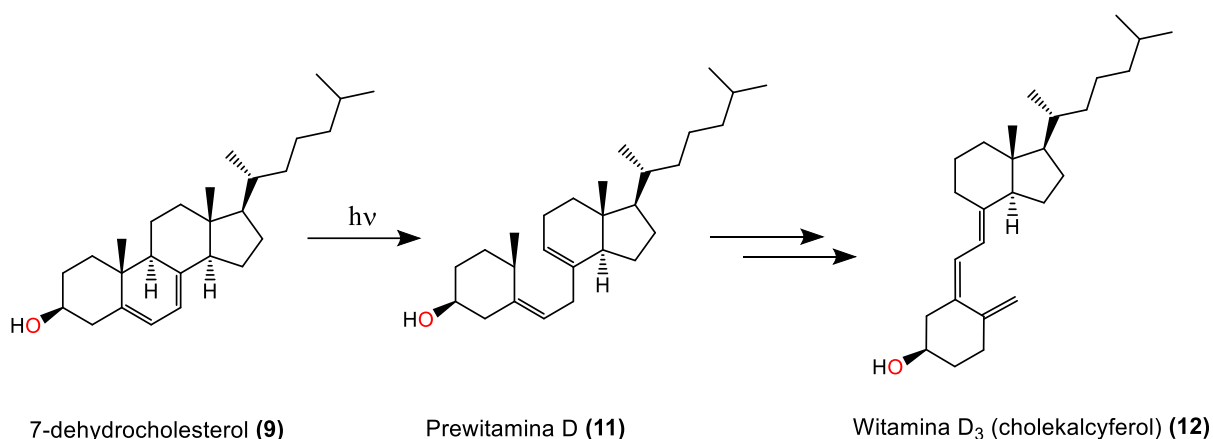
Cholesterol (**1**) zawiera grupę hydroksylową przy atomie węgla C(3), wiązanie podwójne $\Delta^{5(6)}$, oraz ośmiowęglowy łańcuch alkilowy w pozycji atomu C(17) (Rysunek 5).

Poza cholesterolem w komórkach mogą być obecne także: desmosterol (**8**) (z dodatkowym wiązaniem $\Delta^{24(25)}$), 7–dehydrocholesterol (**9**) – prekursor witaminy D₃ oraz latosterol (**10**), pośredni metabolit biosyntezy cholesterolu (Rysunek 5) [18,19]. Ich obecność odzwierciedla stan metaboliczny komórki oraz aktywność poszczególnych enzymów szlaku biosyntezy.



Rysunek 5. Struktury chemiczne wybranych zoosteroli: cholesterolu, desmosterolu, 7-dehydrocholesterolu oraz latosterolu.

W wątrobie cholesterol jest wykorzystywany do syntezy kwasów żółciowych – związków niezbędnych do emulgacji tłuszczów i wchłaniania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K) w przewodzie pokarmowym [20]. Jako prekursor biosyntezy hormonów steroidowych, cholesterol stanowi punkt wyjścia do powstawania kortyzolu, aldosteronu, testosteronu oraz estradiolu. Hormony te regulują m.in. gospodarkę wodno–elektrolitową, metabolizm, funkcje rozrodcze oraz odpowiedź immunologiczną. Dodatkowo pełni istotną rolę w skórze, gdzie pod wpływem promieniowania UV ulega konwersji do prewitaminy D₃ (**11**), a następnie do aktywnej formy witaminy D₃ (cholekalcyferolu) (**12**), niezbędnej m.in. do utrzymania prawidłowego metabolizmu wapnia i zdrowia układu kostnego (Schemat 3) [21]. Dzięki tym zróżnicowanym funkcjom cholesterol jest nie tylko ważnym składnikiem strukturalnym, lecz także metabolicznie aktywną cząsteczką o fundamentalnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Schemat 3. Szlak biosyntetyczny witaminy D₃.

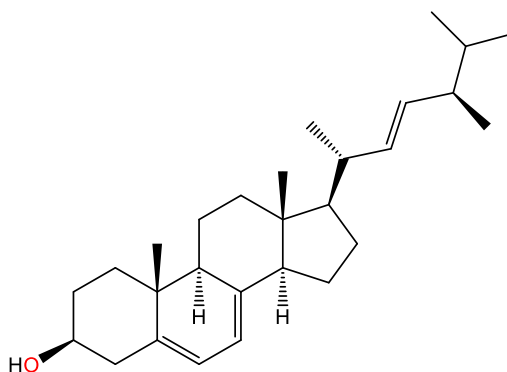
Patologiczne stężenia cholesterolu we krwi, zwłaszcza jego frakcji LDL (tzw. „złego” cholesterolu), są ściśle związane z rozwojem miażdżycy, czyli odkładania się złogów lipidowych w ścianach naczyń krwionośnych [22-24]. Prowadzi to do zwężenia światła naczyń, upośledzenia przepływu krwi i w konsekwencji zwiększonego ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca, zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu oraz innych powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego [25]. Zaburzenia gospodarki cholesterolowej są zatem jednym z głównych czynników ryzyka chorób cywilizacyjnych i stanowią istotny problem zdrowia publicznego.

Zbyt niski poziom cholesterolu również może mieć negatywne konsekwencje, szczególnie w kontekście rozwoju układu nerwowego [26]. Niedobory tego sterolu, występujące m.in. w zaburzeniach peroksysomalnych takich jak zespół Zellwegera, mogą prowadzić do poważnych deficytów neurologicznych [27]. Cholesterol jest bowiem niezbędny do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania mózgu. Bierze udział w tworzeniu osłonek mielinowych otaczających aksony neuronów, w synaptogenezie oraz w utrzymaniu integralności błon komórkowych komórek nerwowych. Zaburzenia jego syntezy lub transportu mogą skutkować opóźnieniem rozwoju psychoruchowego, zaburzeniami poznawczymi i innymi poważnymi objawami neurologicznymi.

2.3 Mykosterole

Mykosterole stanowią grupę steroli charakterystycznych dla organizmów grzybowych. Ich podstawową funkcją jest stabilizacja struktury błon komórkowych, analogicznie do roli cholesterolu w komórkach zwierzęcych i fitosteroli w komórkach roślinnych [28]. Ergosterol (13), będący dominującym sterolem w większości gatunków grzybów, odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu integralności i płynności błony komórkowej. Jego obecność jest powszechnie wykorzystywana jako biomarker obecności komórek grzybowych. Jego biosynteza stanowi ponadto cel działania licznych leków przeciwgrzybiczych, co dodatkowo podkreśla jego znaczenie biologiczne i farmakologiczne [29,30].

Ergosterol (**13**) posiada trzy wiązania podwójne w pozycjach $\Delta^{5(6)}$, $\Delta^{7(8)}$ i $\Delta^{22(23)}$ oraz grupę hydroksylową w pozycji C(3) (Rysunek 6). Dodatkowe nienasycenie w pierścieniach steranowych oraz łańcuchu bocznym odróżnia go od cholesterolu. Ergosterol oraz jego pochodne, takie jak episterol, fekosterol czy 24(28)–dehydroergosterol, mogą występować równocześnie. Tworzą wtedy charakterystyczny profil sterolowy danego gatunku grzyba [31-33]. Znajduje on zastosowanie w analizach chemotaksonomicznych oraz badaniach środowiskowych, np. do oceny obecności grzybów mikroskopowych w powietrzu lub glebie.



Ergosterol (**13**)

Rysunek 6. Struktura chemiczna ergosterolu.

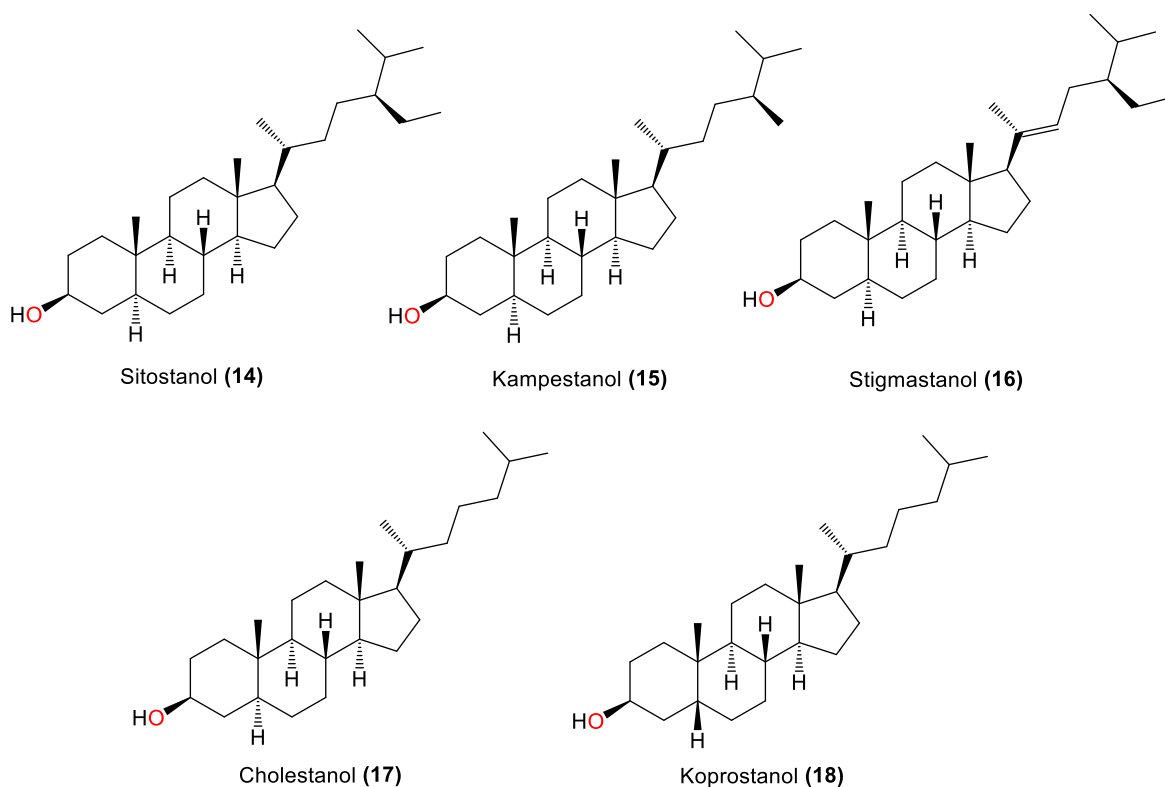
Ergosterol jako główny sterol obecny w błonach komórkowych grzybów, pełni wspomnianą wcześniej funkcję analogiczną do cholesterolu w komórkach zwierzęcych. Jego obecność jest kluczowa dla utrzymania odpowiedniej płynności i integralności błon, co ma istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek grzybowych [34]. Ergosterol stabilizuje strukturę lipidową błon, wpływa na ich przepuszczalność oraz umożliwia prawidłowe działanie białek błonowych, w tym kanałów jonowych i receptorów.

Związek ten pełni również istotną funkcję biologiczną jako fotochemiczny prekursor witaminy D₂ (ergokalcylferolu). Pod wpływem promieniowania UV dochodzi do konwersji ergosterolu do prewitaminy D₂, a następnie do aktywnej formy witaminy, co ma znaczenie w kontekście suplementacji i produkcji preparatów witaminowych pochodzenia niezwierzęcego [35].

Z perspektywy farmakologicznej, ergosterol stanowi główny cel działania niektórych leków przeciwgrzybiczych, zwłaszcza antybiotyków polienowych, takich jak amfoterycyna B i nystatyna [36]. Związki te wykazują powinowactwo do ergosterolu, z którym tworzą kompleksy zaburzające strukturę błony komórkowej, prowadząc do jej uszkodzenia i śmierci komórki.

3. Stanole

Stanole stanowią uwodornione pochodne steroli, w których wiązanie podwójne w pierścieniu B zostało zredukowane (Rysunek 7). W przypadku fitostanoli do najważniejszych przedstawicieli zalicza się sitostanol (**14**) oraz kampestanol (**15**) [37]. Związki te są naturalnie obecne w niektórych produktach roślinnych, jednak w skali przemysłowej pozyskiwane są głównie jako produkt uboczny procesów przetwarzania drewna w przemyśle celulozowym.



Rysunek 7. Struktury chemiczne wybranych stanoli.

Rozwój technologii inżynierii genetycznej umożliwił modyfikację genomu wybranych roślin w celu zwiększenia biosyntezy stanoli bez konieczności stosowania chemicznej redukcji [38]. Przykładem rośliny transgenicznej o zwiększonej zawartości stanoli są modyfikowane genetycznie nasiona soi, w których wykazano obecność znacznych ilości sitostanolu (**14**), kampestanolu (**15**) oraz stigmastanolu (**16**) (Rysunek 7) [39].

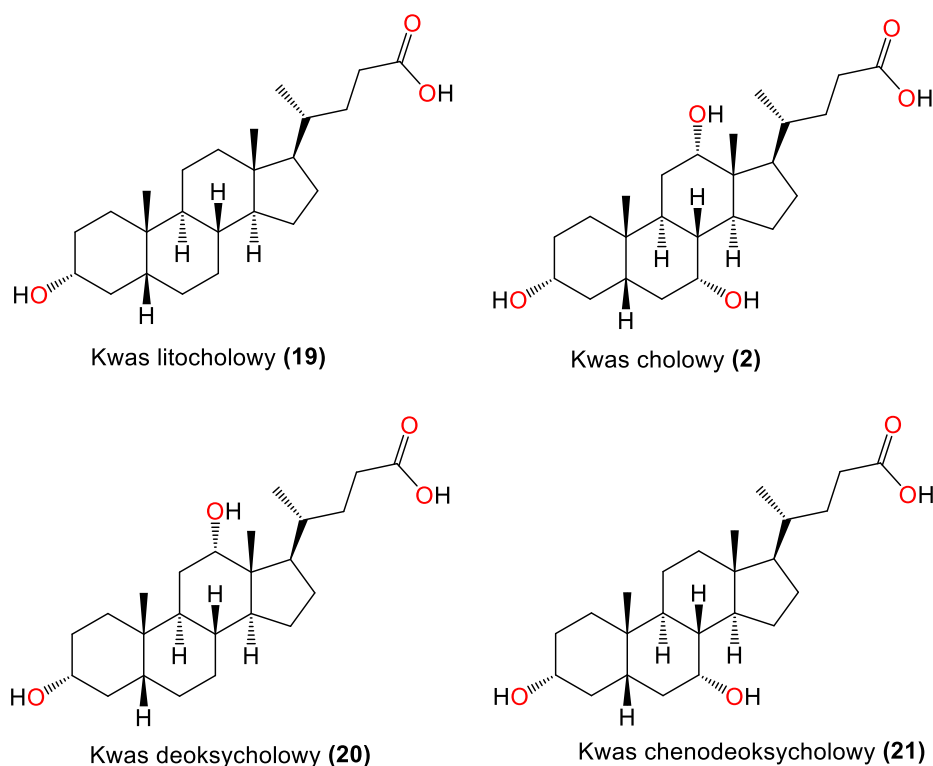
Wśród stanoli pochodzenia zwierzęcego (zoostanoli) szczególną uwagę zwraca cholestanol (**17**), będący produktem redukcji cholesterolu (Rysunek 7). Związek ten naturalnie występuje w żółci oraz w kale, a jego obecność stwierdzono także w tkankach zwierząt oraz u roślin wyższych, gdzie powstaje zarówno z cholesterolu, jak i z kampestanolu. Struktura cholestanolu przypomina cholesterol, jedyną różnicą jest brak wiązania podwójnego w pierścieniu steroidowym. W organizmie człowieka cholestanol syntetyzowany jest z 4-cholesten-3-olu, a jego stężenie w organizmie pozostaje zwykle niskie i mieści się w zakresie od 1/800 do 1/500 wartości stężenia cholesterolu [40]. Patologiczny wzrost

poziomu cholestanolu obserwowany jest w przypadku ksantomatozy mózgowo–ścięgnej (CTX). Jest to rzadka choroba metaboliczna o podłożu genetycznym. Diagnostyka CTX opiera się m.in. na ilościowym oznaczaniu cholestanolu w surowicy metodą HPLC z wykorzystaniem 27–hydroksylazy sterolu. W leczeniu stosuje się kwas chenodeoksycholowy, który skutecznie obniża poziom cholestanolu i łagodzi objawy choroby.

Kolejnym przedstawicielem nasyconych steroli pochodzenia zwierzęcego jest koprostanol (**18**), izomer cholestanolu należący do szeregu normalnego (Rysunek 7). Obecność tego stanolu w kale człowieka bywa wykorzystywana jako wskaźnik aktywności fermentacyjnej mikrobiomu oraz biomarker zanieczyszczenia kałem w badaniach środowiskowych [41,42].

4. Kwasy żółciowe

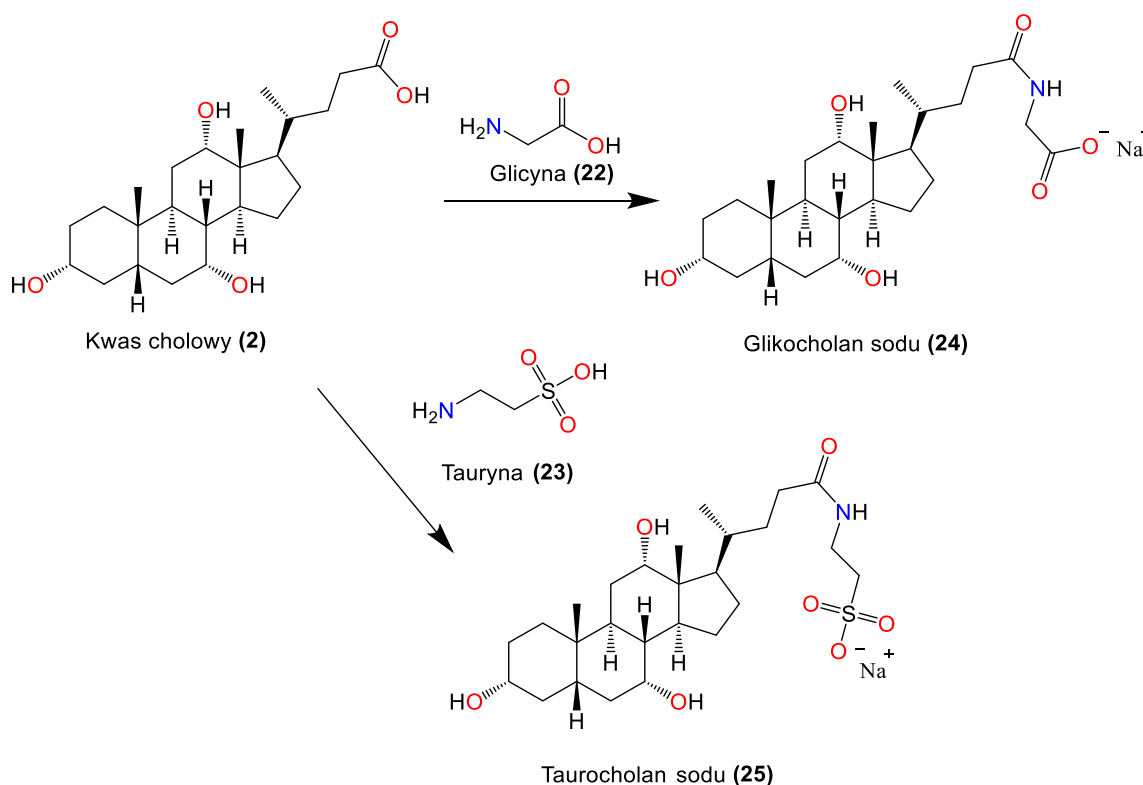
Kwasy żółciowe to grupa naturalnie występujących steroidowych kwasów karboksylowych, stanowiących kluczowe metabolity cholesterolu, syntetyzowane w komórkach wątroby ssaków. Cząsteczki te składają się ze sztywnego, zakrzywionego szkieletu steroidowego typu 5 β -cholanu, zawierającego od jednej do trzech grup hydroksylowych (zwykle w pozycjach 3 α , 7 α i 12 α) oraz bocznego łańcucha zakończonego grupą karboksylową w pozycji atomu węgla C(24) [43]. Struktury wybranych kwasów żółciowych zostały przedstawione na Rysunku 8.



Rysunek 8. Struktury chemiczne wybranych kwasów żółciowych: kwasu litocholowego, cholowego, deoksycholowego oraz chenodeoksycholowego.

Kwasy żółciowe charakteryzują się czystością enancjomeryczną oraz amfifilowym charakterem cząsteczki, wynikającym z asymetrycznego rozmieszczenia grup hydroksylowych (część hydrofilowa) względem węglowodorowego szkieletu (część hydrofobowa). W warunkach fizjologicznych ulegają one koniugacji z glicyną (**22**) lub tauryną (**23**), co prowadzi do powstania odpowiednio gliko- i tauro pochodnych kwasów żółciowych (Schemat 4) [44]. Te koniugaty, określane jako sole żółciowe, mają znacznie niższe pKa oraz wyższą rozpuszczalność w wodzie, co zwiększa ich zdolność do działania jako środki powierzchniowo czynne.

Strukturalna różnorodność kwasów żółciowych wynika głównie z liczby i pozycji grup hydroksylowych oraz konfiguracji ich podstawienia (α lub β) (Rysunek 8). Wyróżnia się kwasy żółciowe pierwotne takie jak kwas cholowy (**2**) i kwas chenodeoksycholowy (**21**) powstające bezpośrednio w wątrobie, oraz kwasy wtórne np. kwas deoksycholowy (**20**) i kwas lithocholowy (**19**) generowane w świetle jelita poprzez dehydroksylację przez mikrobiotę jelitową. Choć większość naturalnych kwasów żółciowych posiada stereochemię typu A/B *trans* (szereg normalny), rzadziej spotykane są ich izomery szeregu *allo* (A/B-*cis*). Kwasy żółciowe stanowią cenny szkielet w chemii biomimetycznej i supramolekularnej [45-48]. Ich sztywna i chiralna struktura, a także obecność regionów hydrofilowych i hydrofobowych, sprzyjają kontrolowanej samoorganizacji i oddziaływaniom z różnorodnymi cząsteczkami. Związki te wykorzystywane są jako promotory przenikalności błon, nośniki leków, matryce do tworzenia układów supramolekularnych, a także jako platformy do projektowania sensorów molekularnych i materiałów ciekłokrystalicznych.



Schemat 4. Biosynteza soli żółciowych na przykładzie kwasu cholowego.

5. Znaczenie biologiczne i zastosowanie kwasów żółciowych

Kwasy żółciowe i ich sole pełnią fundamentalne funkcje w organizmach kręgowców, wykraczające daleko poza ich pierwotną rolę w procesie trawienia [49]. W jelicie cienkim działają jako naturalne detergenty, umożliwiając emulgację tłuszczów pokarmowych i zwiększając powierzchnię kontaktu lipidów z enzymami trawiennymi. Dzięki amfipatycznemu charakterowi ułatwiają one tworzenie miceli wspomagając absorpcję długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, cholesterolu oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K). Niedobory kwasów żółciowych prowadzą do zaburzeń wchłaniania tłuszczów (zespół upośledzonego wchłaniania) i awitaminoz.

Poza funkcją trawienną, kwasy żółciowe stanowią istotne cząsteczki sygnałowe uczestniczące w regulacji ekspresji genów, metabolizmu lipidów, glukozy oraz procesów zapalnych. Działają jako ligandy receptorów jądrowych (takich jak FXR) oraz błonowych (np. TGR5), inicjując szlaki sygnalizacyjne, które wpływają na syntezę kwasów tłuszczowych, sekrecję insuliny czy homeostazę glukozy [50-54]. Ponadto kontrolują przepuszczalność bariery jelitowej i modulują skład mikrobioty jelitowej, co czyni je kluczowymi regulatorami osi jelitowo-wątrobowej.

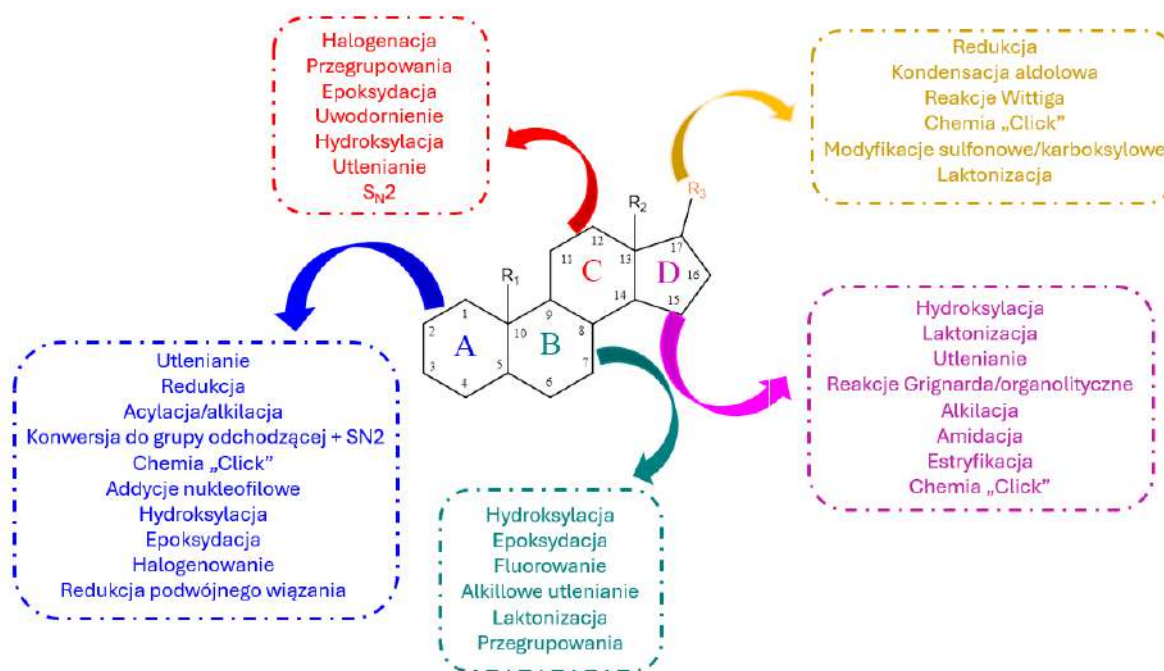
W warunkach fizjologicznych biosynteza kwasów żółciowych jest precyzyjnie regulowana sprzężeniem zwrotnym, a ich nadmiar lub niedobór prowadzi do zaburzeń metabolicznych i chorób. Niewłaściwy stosunek stężeń cholesterolu do kwasów żółciowych w żółci może skutkować jego krystalizacją i rozwojem kamicy żółciowej [55]. Dodatkowo, zaburzenia w metabolizmie kwasów żółciowych są powiązane z patogenezą cholestazy, niealkoholowego stłuszczenia wątroby, zespołu jelita drażliwego oraz chorób zapalnych jelit [56,57].

W medycynie klinicznej kwasy żółciowe, szczególnie ich syntetyczne analogi (np. kwas obeticholowy) są wykorzystywane w terapii pierwotnej marskości żółciowej wątroby czy cholestatycznych chorób wątroby [58]. Z kolei ich naturalne formy, jak kwas ursodeoksycholowy, znalazły zastosowanie w rozpuszczaniu kamieni żółciowych oraz poprawie przepływu żółci [59,60]. Coraz częściej są też rozważane jako potencjalne czynniki terapeutyczne w chorobach metabolicznych, neurodegeneracyjnych, a nawet w terapii nowotworów, gdzie wykorzystuje się ich zdolność do modulacji ekspresji genów pro i antyapoptotycznych [61-63].

6. Modyfikacje chemiczne steroidów

Struktura steroidów, oparta na szkielecie cyklopentanoperhydrofenantrenowym, oferuje liczne możliwości chemicznej modyfikacji, zarówno w obrębie samych pierścieni A–D, jak i przyłączonych ugrupowań funkcyjnych m.in. w łańcuchu bocznym przy atomie C(17). Obecność licznych centrów stereogenicznych, różnorodnych grup funkcyjnych oraz reaktywnych miejsc w cząsteczce sprawia, że steroidy stanowią doskonały szkielet do chemicznej modyfikacji w celu poprawy ich właściwości biologicznych, farmakokinetyki czy dostępności metabolicznej.

Modyfikacje chemiczne mogą dotyczyć m.in. utleniania, redukcji, addycji nukleofilowych, reakcji substytucji, halogenowania, tworzenia pierścieni heterocyklicznych, jak również przekształceń bardziej zaawansowanych, takich jak reakcje Grignarda, reakcje Wittiga, czy kondensacje aldolowe. Przedstawiony na Schemacie 5 zestaw reakcji uwzględnia najczęściej wykorzystywane kierunki syntezy w odniesieniu do poszczególnych pierścieni szkieletu steroidowego.



Schemat 5. Główne obszary struktury steroidów poddawane modyfikacjom chemicznym

W niniejszym rozdziale skupiono się na wybranych typach modyfikacji, które zilustrowano przykładami syntez i przemian obejmujących poszczególne pierścienie steroidowe. Uwzględniono zarówno klasyczne reakcje (np. utlenianie, halogenowanie, alkilacje), jak i bardziej wyspecjalizowane podejścia, takie jak modyfikacje z wykorzystaniem chemii „click”, które omówiono w osobnym podrozdziale.

Ponadto, ze względu na istotną rolę planowania ochrony grup funkcyjnych w przebiegu złożonych syntez organicznych, osobny podrozdział poświęcono zastosowaniu grup ochronnych. Ich właściwy dobór i kolejność odsłaniania stanowią kluczowy element strategii syntezy wieloetapowej związków steroidowych.

6.1 Modyfikacje pierścienia A

Pierścień A stanowi kluczowy fragment szkieletu steroidowego. Ze względu na swoją różnorodną strukturę (nasyconą, nienasyconą lub aromatyczną) oraz obecność reaktywnych centrów, szczególnie w położeniach atomów C(1)–C(3), stanowi atrakcyjny cel chemicznej modyfikacji. Reakcje

zachodzące w obrębie tego fragmentu mogą znacząco wpływać na właściwości biologiczne steroidów, ich powinowactwo do receptorów, stabilność metaboliczną oraz profil farmakologiczny.

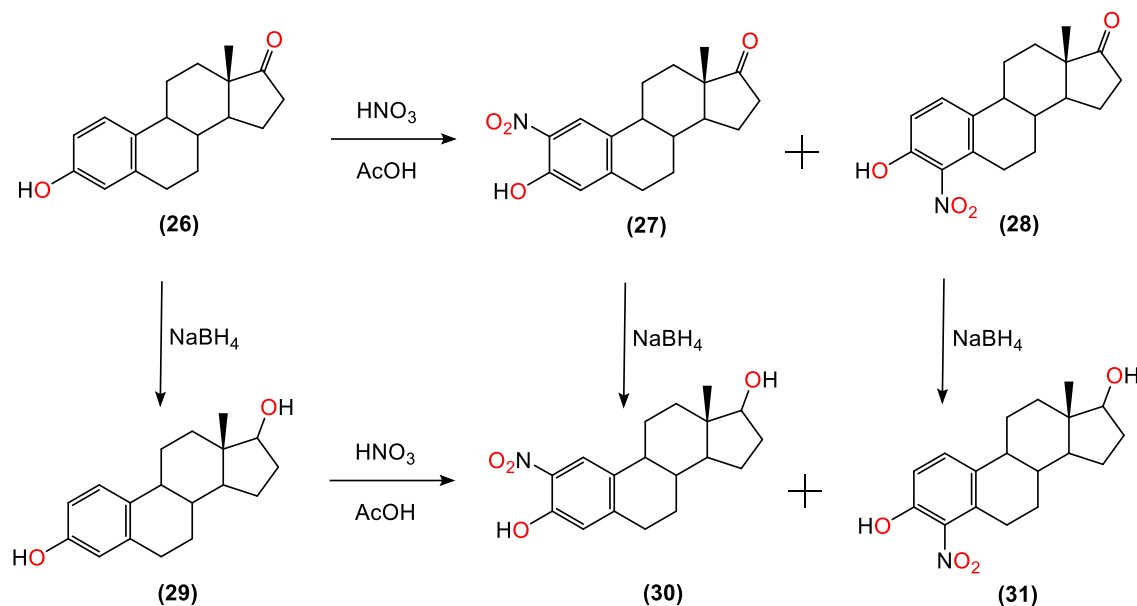
Do najczęściej stosowanych metod modyfikacji pierścienia A należą klasyczne reakcje utleniania i redukcji, wprowadzanie podstawników halogenowych lub hydroksylowych, epoksydacja, alkilacja oraz reakcje umożliwiające budowę dodatkowych układów pierścieniowych, takich jak pochodne izoksazoli czy pirazoli. Ważnym kierunkiem są również przekształcenia grup hydroksylowych w inne ugrupowania funkcyjne (np. etery, estry, enole) oraz reakcje zmieniające stopień utlenienia atomów węgla w tym fragmencie cząsteczki [64-68].

W niniejszym podrozdziale omówiono wybrane typy modyfikacji pierścienia A, z uwzględnieniem zarówno związków zawierających nasycony układ cykloheksanowy, jak i pochodnych z aromatyzowanym fragmentem A, typowym dla estrogenów. Przedstawione przykłady ilustrują zróżnicowaną reaktywność chemiczną tego fragmentu oraz potencjał transformacyjny, umożliwiający projektowanie strukturalnie i funkcjonalnie zróżnicowanych pochodnych steroidowych.

Aromatyzacja pierścienia A, charakterystyczna dla estrogenów takich jak estron i estradiol, znacząco zwiększa jego reaktywność elektrofilową. Obecność fenolowego ugrupowania hydroksylowego przy atomie węgla C(3) ułatwia podstawienie elektrofilowe, szczególnie w pozycjach atomów węgla C(2) i C(4), co umożliwia selektywną funkcjonalizację cząsteczki.

Nitrowanie związków steroidowych, szczególnie w pierścieniu A, stanowi cenne narzędzie modyfikacji ich aktywności biologicznej i właściwości fizykochemicznych. Wprowadzenie grupy nitrowej w tej części cząsteczki wpływa na gęstość elektronową układu i może istotnie zmieniać powinowactwo do receptorów steroidowych oraz enzymów uczestniczących w metabolizmie hormonów steroidowych.

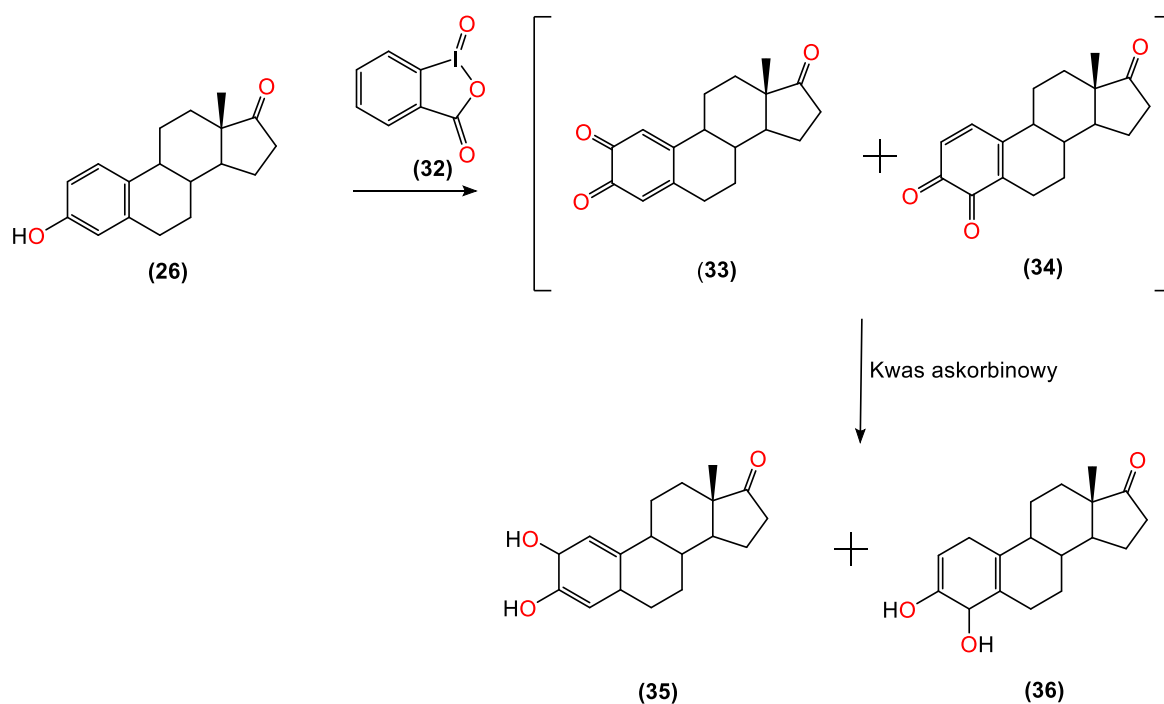
Reakcja nitrowania estronu (**26**) przeprowadzona w kwasie octowym z dodatkiem stężonego HNO_3 prowadzi do mieszaniny dwóch głównych produktów: 2-nitroestronu (**27**) oraz 4-nitroestronu (**28**), powstających w zbliżonych ilościach (Schemat 6) [69,70]. Obie nitropochodne mogą następnie ulec redukcji za pomocą borowodoru sodu, co pozwala na otrzymanie odpowiednich pochodnych estradiolu: 2-nitroestradiolu (**30**) oraz 4-nitroestradiolu (**31**). Porównanie przebiegu reakcji na estronie i estradiolu wskazuje, że stopień utlenienia fragmentu D cząsteczki przy atomie C(17) nie wpływa znacząco na kierunek podstawienia elektrofilowego w pierścieniu A. Spośród poznanych nitropochodnych szczególne znaczenie mają 2-nitrosteroidy, które oprócz klasycznych właściwości farmakologicznych wykazują działanie anestetyczne, analeptyczne i przeciwświądowe, a niektóre z nich stosowane są jako środki dermatologiczne i antykoncepcyjne. 4-Nitrosteroidy, w tym pochodne estronu, odznaczają się natomiast silnym działaniem inhibitorowym wobec aromatazy, steroidowej C17–20 liazy oraz 5α -reduktazy, co czyni je interesującymi kandydatami w terapii chorób nowotworowych i zaburzeń hormonalnych [71].



Schemat 6. Reakcja nitrowania i redukcji estronu.

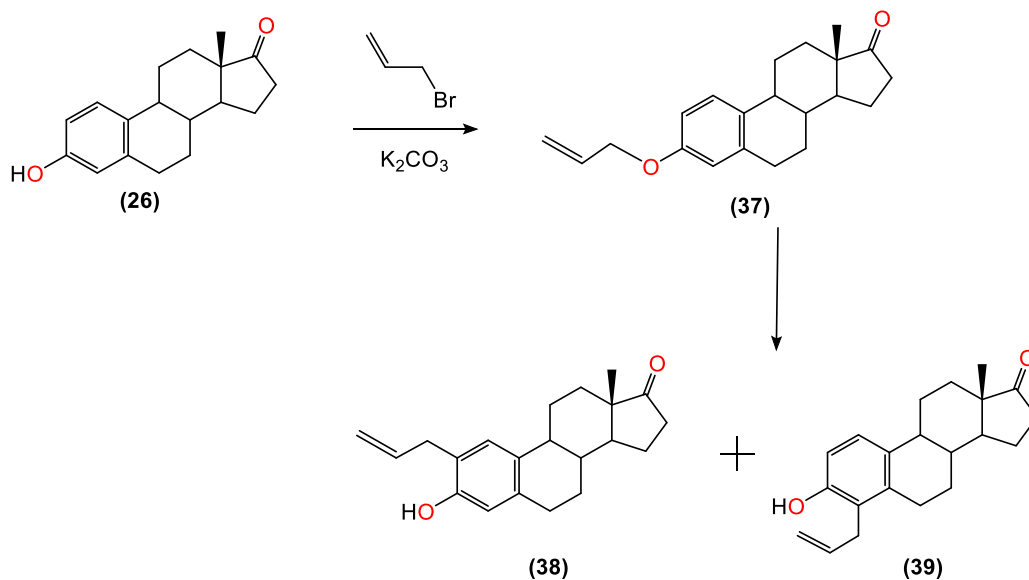
Inną strategią jest utlenianie z wykorzystaniem bezwodnika 2-jodoksybenzoesowego (IBX) (32), które umożliwia bardziej kontrolowane otrzymanie dwóch produktów: 2,3–chinonu (33) oraz izomerycznego 3,4–chinonu (34) (Schemat 7). Oba chinony mogą następnie zostać zredukowane *in situ* przy użyciu kwasu askorbinowego, co pozwala na uzyskanie hydroksylowanych pochodnych estronu: 2–hydroksyestronu (35) oraz 4–hydroksyestronu (36). Związek (35) wykazuje specyficzne, zależne od receptora estrogenowego działanie antyestrogenowe w komórkach raka piersi MCF-7 oraz w modelach doświadczalnych działa przeciwnowotworowo [72,73].

Funkcjonalizacja pierścienia A steroidów aromatycznych może również obejmować bezpośrednie tworzenie nowych wiązań węgiel–węgiel, co otwiera drogę do syntezy bardziej złożonych pochodnych strukturalnych.



Schemat 7. Reakcja utlenienia pierścienia A estronu poprzez wykorzystanie kwasu 2-jodoksybenzoesowego.

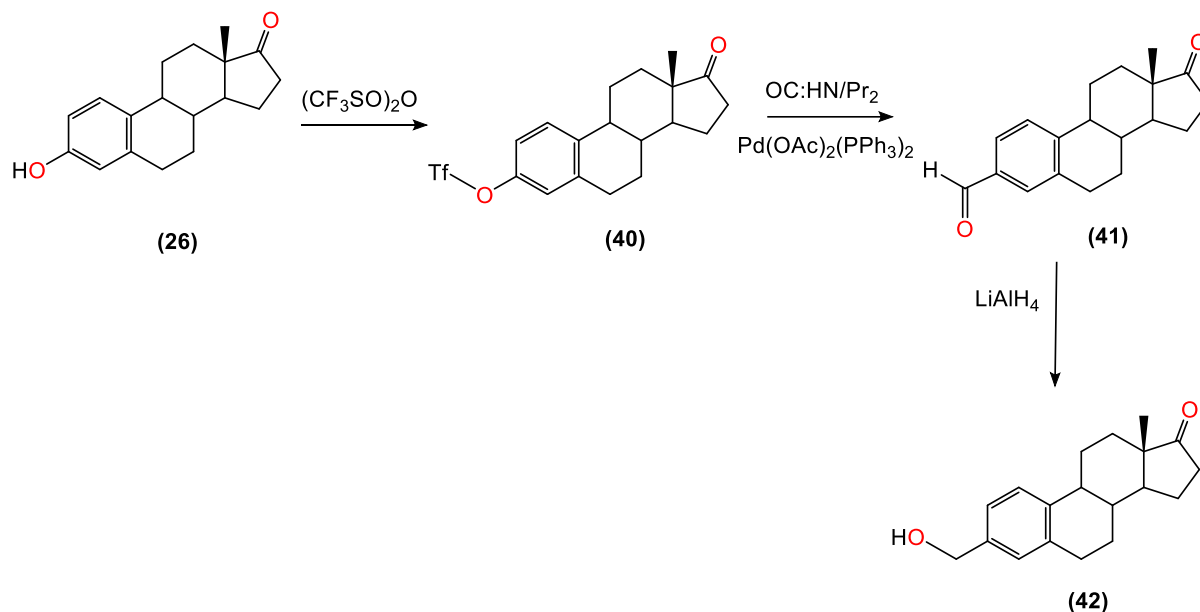
Alkilacja grupy hydroksylowej w pozycji C(3) estronu (26) z użyciem bromku allilu prowadzi do powstania eteru allilowego (37) (Schemat 8) [69,74,75]. Poddanie tego związku ogrzewaniu w wysokowrzącej *N,N*-dietyloanilinie inicjuje przegrupowanie Claisena, skutkujące otrzymaniem mieszaniny dwóch izomerów allilowych: 2-allilowego (38) oraz 4-allilowego estronu (39).



Schemat 8. Reakcja alkilowania grupy hydroksylowej estronu jako przykład reakcji tworzenia wiązania C-C, poprzez sekwencje alkilowania i przegrupowanie Claisena.

Alternatywnym podejściem do tworzenia wiązań C-C w pozycji atomu C(3) jest karbonylacja palladowa [69,76]. Umożliwia wydajne, selektywne i elastyczne wprowadzanie grup

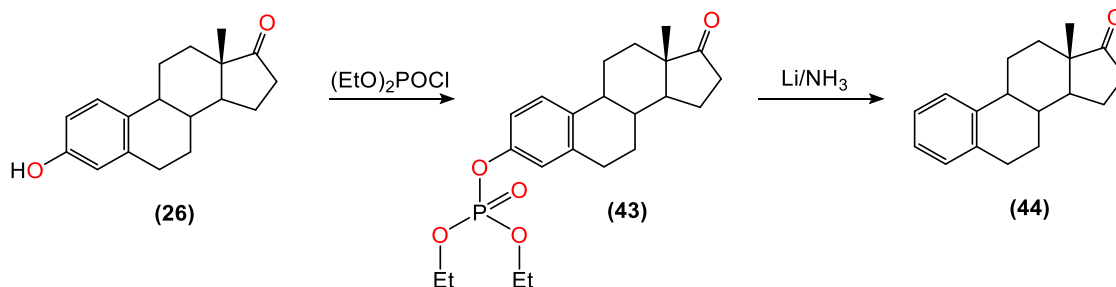
karboksamidowych i estrowych do szkieletu steroidowego [77-79]. Grupa hydroksylowa estronu (**26**) zostaje przekształcona w pochodną trifluorometanosulfonową poprzez reakcję z bezwodnikiem trifluorometanosulfonowym, co prowadzi do powstania pochodnej estronu (**40**) (Schemat 9). Następnie, w obecności kompleksu palladu(II) oraz odpowiedniego źródła tlenu węgla (np. formamidu), przeprowadzana jest reakcja karbonylacji, która prowadzi do powstania estru (**41**). Końcowa redukcja tego związku przy użyciu LiAlH_4 umożliwia uzyskanie zredukowanego homologu estradiolu (**42**), w którym dochodzi do redukcji zarówno grupy estrowej, jak i ketonowej w pozycji C(17).



Schemat 9. Reakcja karbonylacji palladowej pochodnej estronu.

Usunięcie grup hydroksylowych z pozycji C(3) za pomocą nowoczesnych metod dehydroksylacji pozwala na uzyskanie czystych produktów oraz zwiększa możliwości dalszej, selektywnej funkcjonalizacji szkieletu steroidowego [69,80,81].

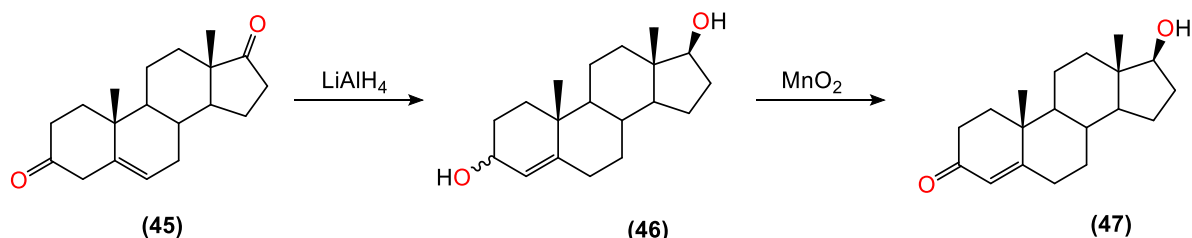
W przypadku estronu (**26**), reakcja rozpoczyna się od przekształcenia fenolowej grupy hydroksylowej w pochodną fosfinitową (**43**), uzyskiwaną w wyniku kondensacji z $(\text{EtO})_2\text{POCl}$ (Schemat 10) [82,83]. Kolejny etap obejmuje redukcję w ciekłym amoniaku w obecności litu, prowadzącą do efektywnego usunięcia atomu tlenu w pozycji C(3) (**44**).



Schemat 10. Reakcja deoksygenacji estronu.

W układach androstanu pozycje atomów C(3) i C(17) odgrywają kluczową rolę w modulowaniu aktywności biologicznej i stanowią częsty cel selektywnych modyfikacji chemicznych. Przykładem takiego podejścia jest synteza testosteronu z łatwo dostępnego dehydroepiandrosteronu, w której centralne znaczenie ma kontrola stopnia utlenienia obu wymienionych pozycji [84-88].

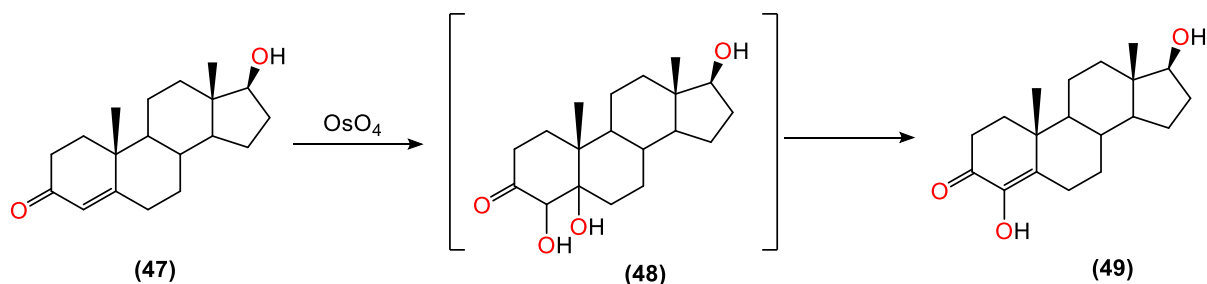
Redukcja androst-5-en-3,17-dionu (**45**) z użyciem LiAlH_4 prowadzi do całkowitej redukcji obu grup karbonylowych (Schemat 11) [84,89]. Redukcja w pozycji atomie C(17) przebiega stereoselektywnie z utworzeniem epimeru β , natomiast w przypadku grupy ketonowej przy atomie węgla C(3) powstaje mieszanina epimerów hydroksylowych (**46**). Selekttywne utlenienie alkoholu allilowego w pozycji C(3) z użyciem tlenku manganu(IV) (MnO_2) umożliwia następnie uzyskanie testosteronu (**47**) bez ingerencji w nietrwałą wobec wielu utleniaczy grupę hydroksylową w pozycji atomu C(17). Wysoka selektywność MnO_2 względem alkoholi allilowych ma kluczowe znaczenie dla tej transformacji, eliminując konieczność stosowania ochrony grup funkcyjnych.



Schemat 11. Reakcja otrzymywania testosteronu poprzez modyfikacje chemiczne pierścienia A.

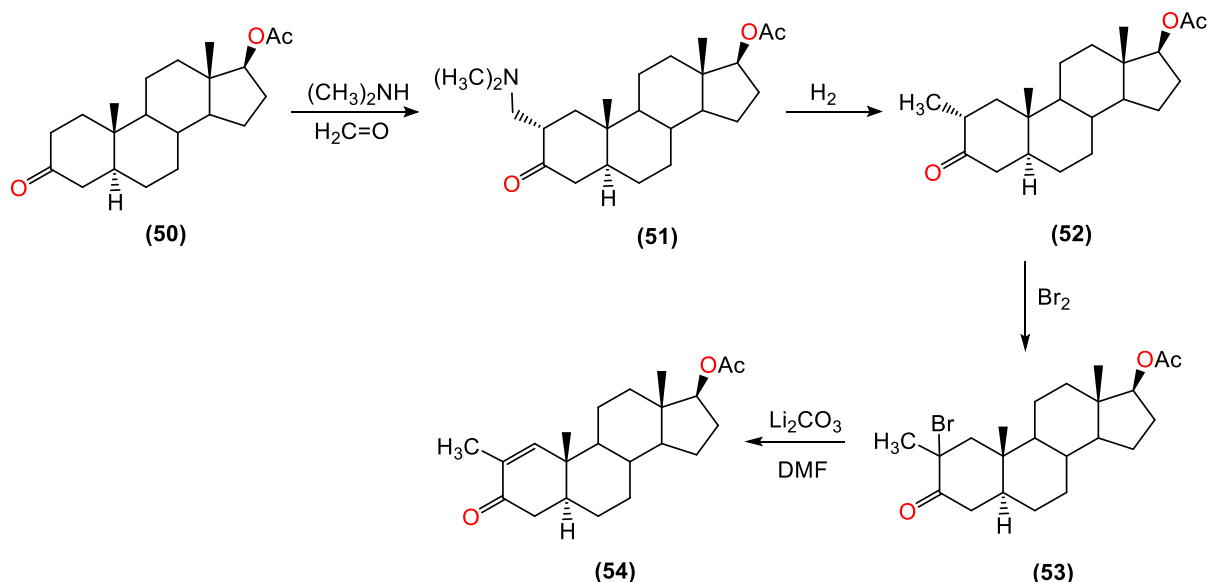
Opisana sekwencja reakcji ilustruje, w jaki sposób różnice w reaktywności grup hydroksylowych w pozycjach atomów C(3) i C(17) mogą być wykorzystane do precyzyjnego zarządzania stopniem utlenienia w cząsteczce androstanu. Ma to istotne znaczenie nie tylko w kontekście projektowania syntez, lecz również dla zrozumienia zależności między strukturą a aktywnością biologiczną steroidów.

Dodatkowo, utlenianie testosteronu (**47**) tlenkiem osmu(IV) (OsO_4) prowadzi do powstania 4,5-glikolu (**48**) o nieokreślonej stereochemii (Schemat 12) [84]. Na podstawie mechanizmu reakcji przyjmuje się, że obie grupy hydroksylowe w tym produkcie mają konfigurację β . Ten związek ulega spontanicznej eliminacji wody β , prowadząc do powstania enolowej pochodnej formestanu (**49**).



Schemat 12. Przykładowa reakcja utlenienia testosteronu.

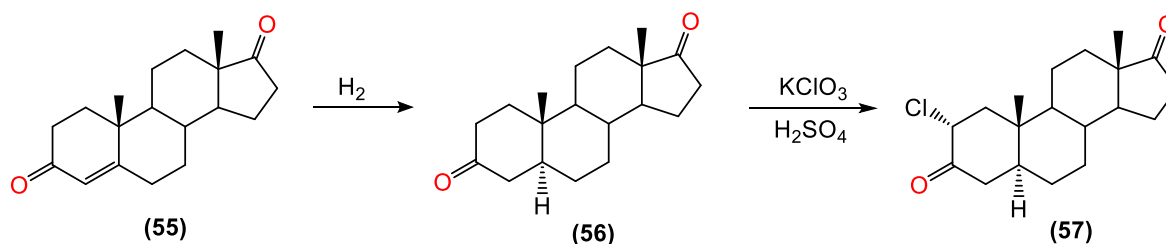
Reakcja Mannicha stanowi efektywną metodę wprowadzania dodatkowych atomów węgla w pozycji enolizowalnej [84,90,91]. Przykładem jest reakcja octanu dihydrotestosteronu (**50**) z formaldehydem i dimetyloaminą, prowadząca do powstania 2-dimetyloaminometylenowej pochodnej (**51**) (Schemat 13). Regiochemia tej reakcji wskazuje na preferowaną enolizację w pozycji atomu C(2). Katalityczna redukcja tego związku w podwyższonej temperaturze zastępuje grupę dimetyloaminową atomem wodoru, co prawdopodobnie zachodzi poprzez utworzenie i redukcję pośredniego związku po eliminacji dimetyloaminy (**52**). Następne bromowanie prowadzi do powstania 2-bromo pochodnej (**53**), która po reakcji z węglanem litu w dimetyloformamidzie ulega eliminacji halogenowodoru, tworząc układ 1-en-3-onowy (**54**) [92]. Pochodna ta, znana jako anaboliczny androgen: stenbolon, ma istotne znaczenie farmakologiczne i znajduje się na liście kontrolowanych substancji.



Schemat 13. Przykład zastosowania reakcji Mannicha do wprowadzania wiązań C–C w pierścieniu A steroidów.

Wprowadzanie atomów halogenów do szkieletu steroidowego stanowi istotną strategię modyfikacji strukturalnej, często prowadzącą do zwiększenia aktywności biologicznej i zmiany właściwości farmakokinetycznych [2,93].

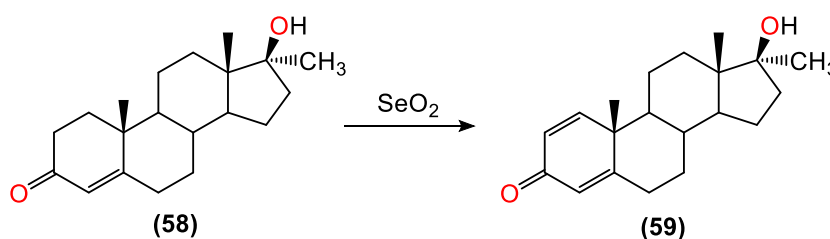
Katalityczna redukcja androst-4-en-3,17-dionu (**55**) pozwala na otrzymanie 5α -dihydro pochodnej (**56**) (Schemat 14) [84,94,95]. Następnie, reakcja tego związku z chloranem potasu i kwasem siarkowym(VI), czyli warunkach silnie kwaśnych z jonami chloranowymi, prowadzi do selektywnego powstania 2α -chlorowanej pochodnej (**57**). Regiochemia tej modyfikacji może być wyjaśniona analogicznie do reakcji formylacji, gdzie preferowana jest konfiguracja mniej sterycznie zatłoczona.



Schemat 14. Przykładowe reakcje halogenacji pierścienia A steroidów.

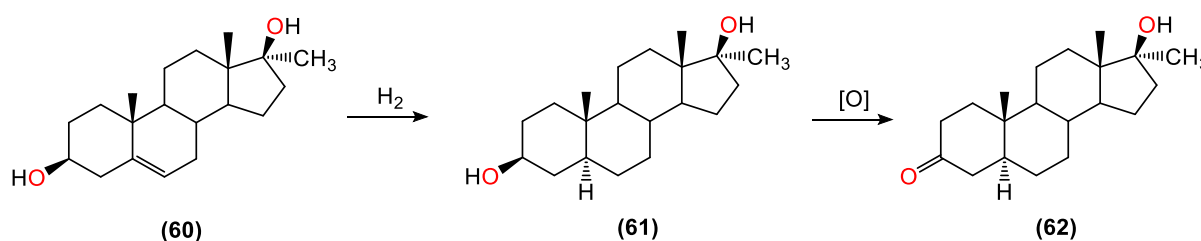
Wiele prostych modyfikacji chemicznych pierścienia A w steroidach przebiega analogicznie do reakcji zachodzących w związkach pozbawionych grup alkilowych w pozycji C(17). W rzeczywistości wiele z tych transformacji było początkowo opracowywanych i testowanych na pochodnych z alkilacją przy atomie węgla C(17).

Przykładem jest reakcja mestanolonu (**58**) z tlenkiem selenu(IV), która, podobnie jak w związkach pozbawionych podstawienia alkilowego przy atomie C(17), powoduje dehydrogenację pierścienia A z utworzeniem podwójnego wiązania w pozycji atomu C(1), dając metandrostenolon (**59**) (Schemat 15) [84].



Schemat 15. Przykład reakcji tworzenia wiązania podwójnego w obrębie pierścienia A.

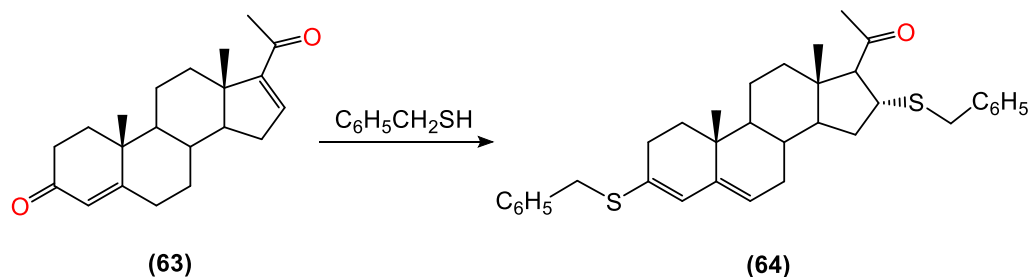
Katalityczna redukcja 17-metylowanego dehydroepiandrosteronu (**60**) prowadzi do powstania pochodnej (**61**) z addycją wodoru od strony przeciwnej (Schemat 16). Następnie, oksydacja różnymi metodami, na przykład reakcją Oppenauera, odtwarza keton w pozycji atomu węgla C(3), dając związek (**62**), który stanowi wyjściowy substrat do dalszych modyfikacji pierścienia A [96,97].



Schemat 16. Redukcja pochodnej DHEA prowadząca do powstania ketonowej pochodnej

Grupa karbonylowa w pozycji atomu węgla C(3) pregnanów, ze względu na mniejsze steryczne ograniczenia, wykazuje znacznie większą reaktywność niż jej analog w pozycji atomu C(20), który jest bardziej przestrzennie odsłonięty [98]. Reakcję 16-dehydroprogesteronu (**63**) z fenylotimetanem

przedstawiono na Schemacie 17. W pozycji C(3) powstaje enolowy tioeter, co wskazuje na bezpośrednią addycję tiolu do ugrupowania karbonylowego. Natomiast reakcja w obrębie nienasycenia zlokalizowanego w pierścieniu D – bardziej oddalonym od grupy karbonylowej, przebiega jako addycja sprzężona tiolu do układu enonowego, prowadząc do otrzymania produktu **(64)** (Schemat 17).

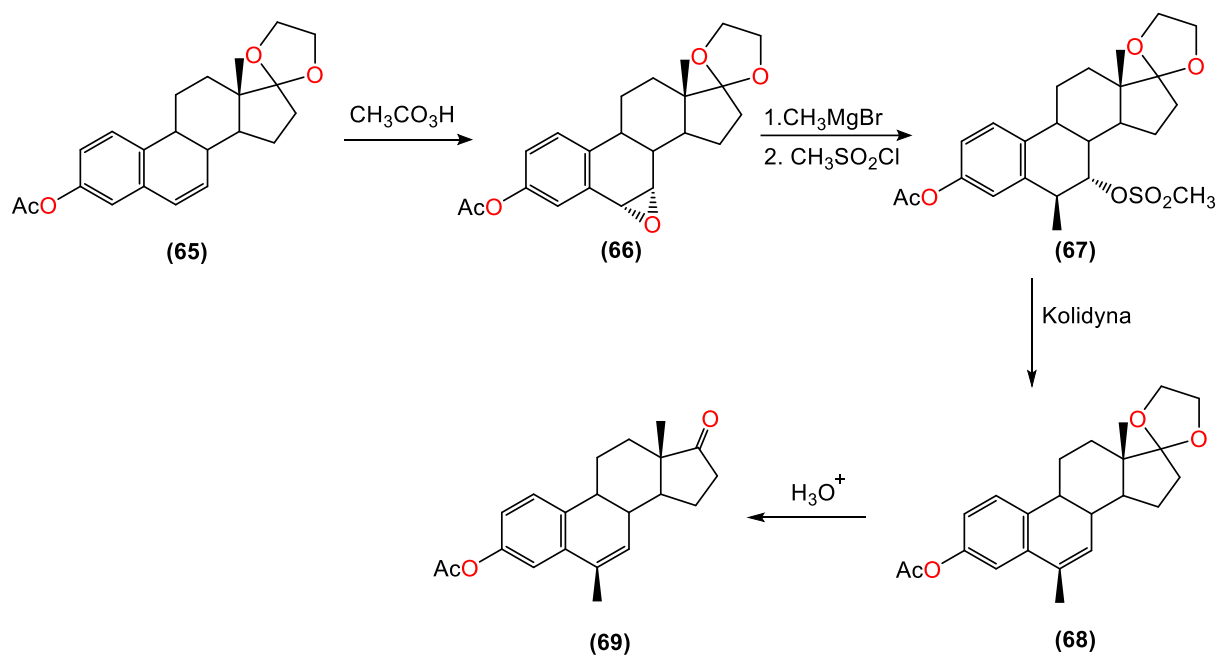


Schemat 17. Otrzymywanie tiolowych pochodnych pregnanu.

6.2 Modyfikacje pierścienia B

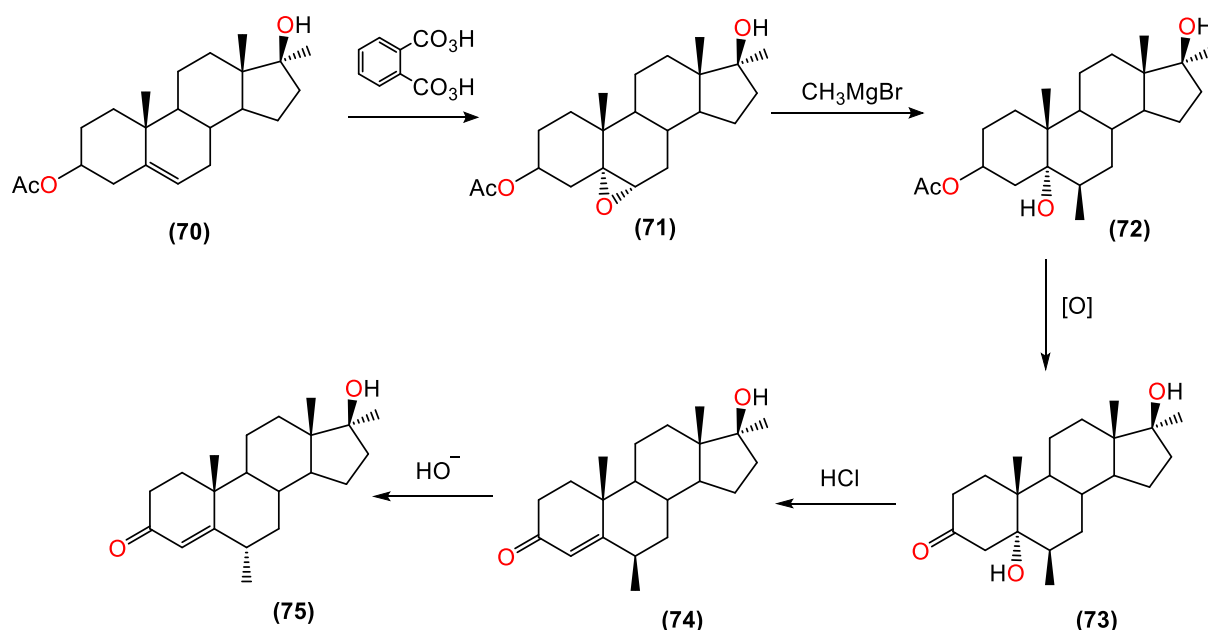
Pierścień B cząsteczek steroidowych, odgrywa istotną rolę w kształtowaniu konformacji cząsteczki oraz wpływa na rozkład gęstości elektronowej w strukturze steroidu. Choć w literaturze rzadziej poddawany modyfikacjom niż pierścienie A i D, stanowi wartościowy cel syntez ukierunkowanych na zmianę właściwości biologicznych, biodostępności oraz stabilności metabolicznej. Transformacje obejmujące zmianę stopnia nasycenia, wprowadzenie heteroatomów, rozszczepienie lub kondensację pierścienia B stanowią istotne narzędzia w projektowaniu nowych pochodnych o zmodyfikowanej aktywności receptorowej oraz profilu farmakokinetycznym.

Synteza pochodnych estranów zawierających podstawnik w pozycji C(6) wykorzystuje substraty z wiązaniem podwójnym w tym rejonie cząsteczki. Przykładem takiego podejścia jest modyfikacja 6-dehydroestronu zabezpieczonego jako 17-acetal **(65)**, który poddaje się epoksydacji kwasem nadoctowym (Schemat 18) [69,99]. Reakcja prowadzi do powstania epoksydu **(66)** w wyniku selektywnego otwarcia mniej sterycznie zasłoniętej strony układu podwójnego. Następnie, działanie bromkiem metylomagnezowym w reakcji Grignarda powoduje nukleofilowe otwarcie pierścienia oksiranowego z zachowaniem diaksjalnej regiochemii, prowadząc do alkoholu. Wprowadzona grupa hydroksylowa jest przekształcana w mesylan poprzez reakcję z $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, a następnie eliminowana w obecności kolidyny, co skutkuje odtworzeniem wiązania podwójnego i powstaniem związku **(67)**. Końcowa hydroliza umożliwia jednoczesne usunięcie grup acetalowej i acetylowej odpowiednio z pozycji atomów C(17) i C(3), prowadząc do otrzymania docelowego produktu: 6-metylequiliny **(69)**.



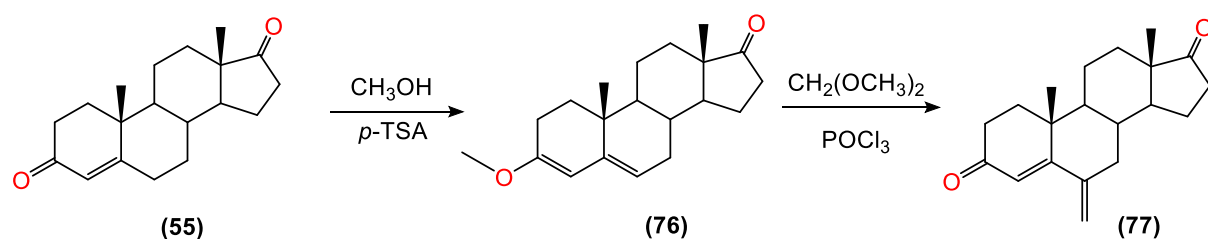
Schemat 18. Przykład modyfikacji pierścienia B na przykładzie przemian 6-dehydroestranu.

Standardowa sekwencja reakcji służąca do wprowadzania podstawników w pozycji C(6) pierścienia B znajduje zastosowanie nie tylko w estranach, lecz również w szeregu pregnanów i kortykosteroidów. Przykładowo, w przypadku układu androstanowego, proces ten rozpoczyna się od epoksydacji wiązania podwójnego w pierścieniu B z wykorzystaniem kwasu fталowego (Schemat 19) [98]. Reakcja przebiega preferencyjnie od mniej sterycznie zatłoczonej strony, prowadząc do utworzenia α -epoksydu (71). Następnie, otwarcie pierścienia oksiranowego za pomocą bromku metylomagnezu zachodzi z zachowaniem regiochemii diaksjalnej, prowadząc do produktu 5 α -hydroksy-6 β -metyloandrostanu (72). Grupa hydroksylowa w pozycji C(3) ulega utlenieniu w warunkach reakcji Oppenauera, dając hydroksyketon (73). Pod wpływem ogrzewania z udziałem silnego kwasu następuje eliminacja wody, w wyniku której powstaje układ 4-en-3-onowy (74) z podstawioną grupą metylową w pozycji konformacji β [100]. Ze względu na układ winylowy względem grupy karbonylowej, atom węgla C(6) staje się podatny na epimeryzację. Działanie łagodnej zasady umożliwia przekształcenie β -metyloepimeru do bardziej stabilnej struktury z podstawieniem w pozycji α , co prowadzi do powstania związku (75).



Schemat 19. Przykład modyfikacji pierścienia B w pozycji C(6).

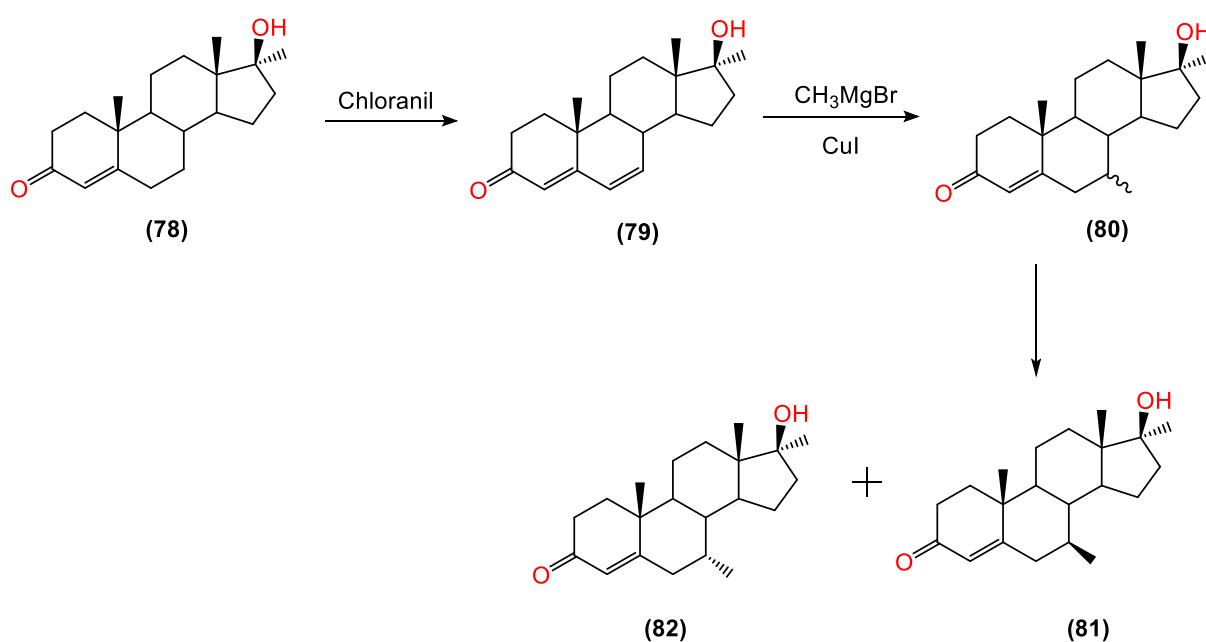
Alternatywne podejście do wprowadzania podstawnika w pozycji C(6) opiera się na reakcji Vilsmeyera, klasycznie stosowanej wobec pierścieni aromatycznych, lecz znajdującej również zastosowanie w chemii cyklicznych enoloeterów (Schemat 20) [98, 101]. Substrat (76) otrzymuje się poprzez kondensację metanolu z androst-4-ene-3,17-dionem (55) w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego [102,103]. Tak uzyskany enoloeter poddaje się działaniu trichlorkiem fosforu (POCl_3) oraz $\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2$ w chloroformie. Po obróbce poreakcyjnej izolowany jest produkt (77). Związek ten, znany jako eksemestan, stanowi silny, nieodwracalny inhibitor aromatazy, enzymu odpowiedzialnego za konwersję androstanoidów w estrogeny. Dzięki tym właściwościom znajduje zastosowanie w terapii nowotworów hormonozależnych.



Schemat 20. Przykład modyfikacji pierścienia B przy wykorzystaniu reakcji Vilsmeyera.

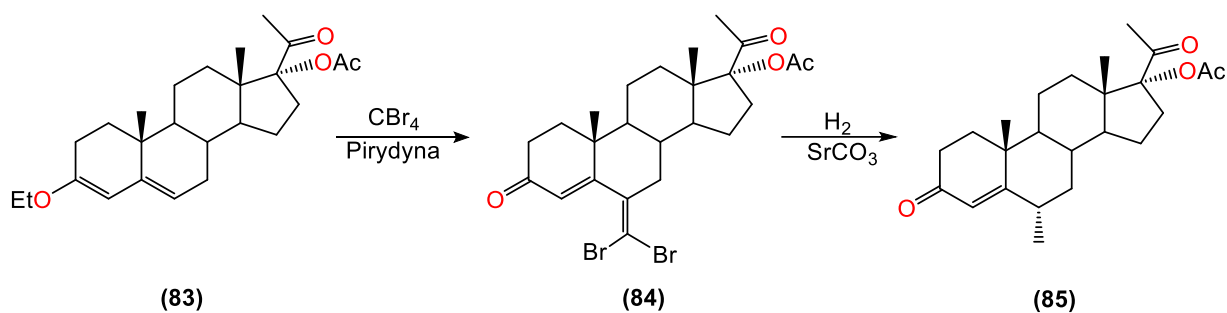
Strategia modyfikacji pozycji C(7) w szeregach gonanowych znajduje szerokie zastosowanie również w innych klasach steroidów. Kluczowym etapem tej sekwencji jest rozszerzenie układu sprzężonych wiązań podwójnych poprzez utworzenie struktury 4,6-dien-3-onowej (Schemat 21) [98,104]. Transformacja taka możliwa jest dzięki utlenieniu 17α -metylo-testosteronu (78) przy użyciu chloranilu, który selektywnie eliminuje wodór z pierścienia B, prowadząc do powstania związku (79). W dalszym etapie przeprowadza się sprzężoną addycję bromku metylomagnezowego w obecności

katalitycznej ilości soli miedzi(I), co skutkuje otrzymaniem mieszaniny epimerów 7-metylowych (**80**). Po ich rozdzieleniu uzyskuje się dwa produkty o odmiennej konfiguracji przestrzennej: bolasteron (**82**), w którym podstawnik przyjmuje pozycję aksjalną, oraz kalusteron (**81**) – epimer z grupą metylową w pozycji ekwatorialnej. Podstawnik wprowadzony w pozycji C(7), ze względu na brak sąsiedztwa z grupą karbonylową, cechuje się stabilnością konfiguracyjną i nie ulega łatwej epimeryzacji. Bolasteron, jako główny produkt reakcji, wykazuje wyjątkowo wysoką aktywność anaboliczno-androgenną. Kalusteron, mimo niższego powinowactwa do receptorów androgenowych, znalazł zastosowanie jako lek przeciwnowotworowy.



Schemat 21. Przykład modyfikacji pierścienia B w pozycji C(7).

Przykładem modyfikacji pierścienia B może być także seria reakcji otrzymywania octanu medroksyprogesteronu (Schemat 22) [98]. Etylowy enolowy eter otrzymywany w reakcji kondensacji 17-hydroksyprogesteronu z ortoformianem etylu, stanowi alternatywny substrat w syntezie octanu medroksyprogesteronu (**83**). Jego bromowanie za pomocą tetrabromku węgla w obecności pirydyny prowadzi do powstania pochodnej 7-bromometylenowej (**84**). Mechanizm tej reakcji najprawdopodobniej obejmuje nukleofilowy atak enolanu na elektrofilowy atom węgla w cząsteczce CBr₄, co skutkuje formowaniem nowego wiązania C–C. W warunkach reakcyjnych dochodzi równocześnie do eliminacji HBr, inicjowanej przez pirydynę, prowadzącej do utworzenia wiązania w pozycji C(6). Końcowy etap obejmuje redukcję katalityczną nad węglanem strontu, która selektywnie nasyca wiązanie podwójne, prowadząc do uzyskania struktury medroksyprogesteronu (**85**).

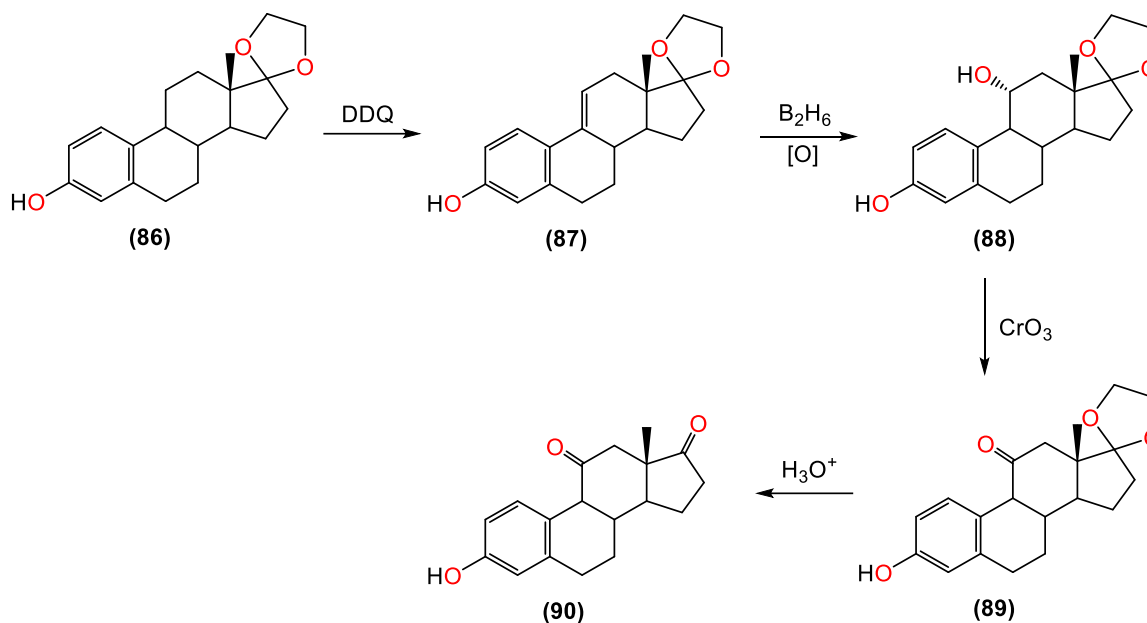


Schemat 22. Modyfikacja pierścienia B pochodnej z grupy pregnanów.

6.3 Modyfikacje pierścienia C

Pierścień C steroidów, choć chemicznie mniej reaktywny niż pierścienie A i B, stanowi istotny punkt modyfikacji strukturalnych mających na celu regulację właściwości konformacyjnych oraz metabolicznych cząsteczki. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się pozycje przy atomach C(9), C(11) i C(12), które poddawane są przekształceniom prowadzącym do zmian przestrzennego układu rdzenia steroidowego i modulacji powinowactwa do receptorów. Wśród najczęściej stosowanych strategii znajdują się reakcje elektrofilowej substytucji, selektywnego utleniania lub redukcji oraz tworzenia mostków oksanowych czy układów heterocyklicznych, szczególnie w kontekście syntezy pochodnych kortykosteroidowych i progestagennych. Modyfikacje w tym rejonie szkieletu węglowego stanowią kluczowy element projektowania nowych ligandów o korzystniejszym profilu farmakokinetycznym i farmakodynamicznym.

Przykładem selektywnej modyfikacji w obrębie pierścienia C jest utlenianie 17-acetalu estronu (**86**), otrzymanego w reakcji estronu z 1,2-etanodiolem (Schemat 23) [69]. Zastosowanie dichlorodicyjanobenzochinonu (DDQ) prowadzi do utworzenia wiązania podwójnego w pierścieniu C, w wyniku czego powstaje układ styrenowy (**87**) [105]. Preferencyjne utworzenie wiązania w pozycjach atomów C(9)–C(11), a nie C(6)–C(7), przypisuje się stabilniejszej konformacji. Kolejny etap obejmuje hydroborowanie związku, po którym następuje utlenienie prowadzące do wprowadzenia grupy hydroksylowej w pozycji 11 α , co daje pochodną (**88**). Selektywna oksydacja tej funkcji przy użyciu CrO₃ umożliwia uzyskanie mostka tlenowego w obrębie pierścienia C (**89**). Zakończeniem sekwencji jest hydroliza ugrupowania acetalowego w pozycji C(17) powszechnie znana w literaturze [106,107]. Prowadzi do otrzymania związku 11-oksastronu (**90**). Tego rodzaju modyfikacja istotnie wpływa na rozkład gęstości elektronowej i kształt cząsteczki. Może to przekładać się na zmianę jej właściwości farmakologicznych, w tym powinowactwa receptorowego i podatności na przemiany metaboliczne.

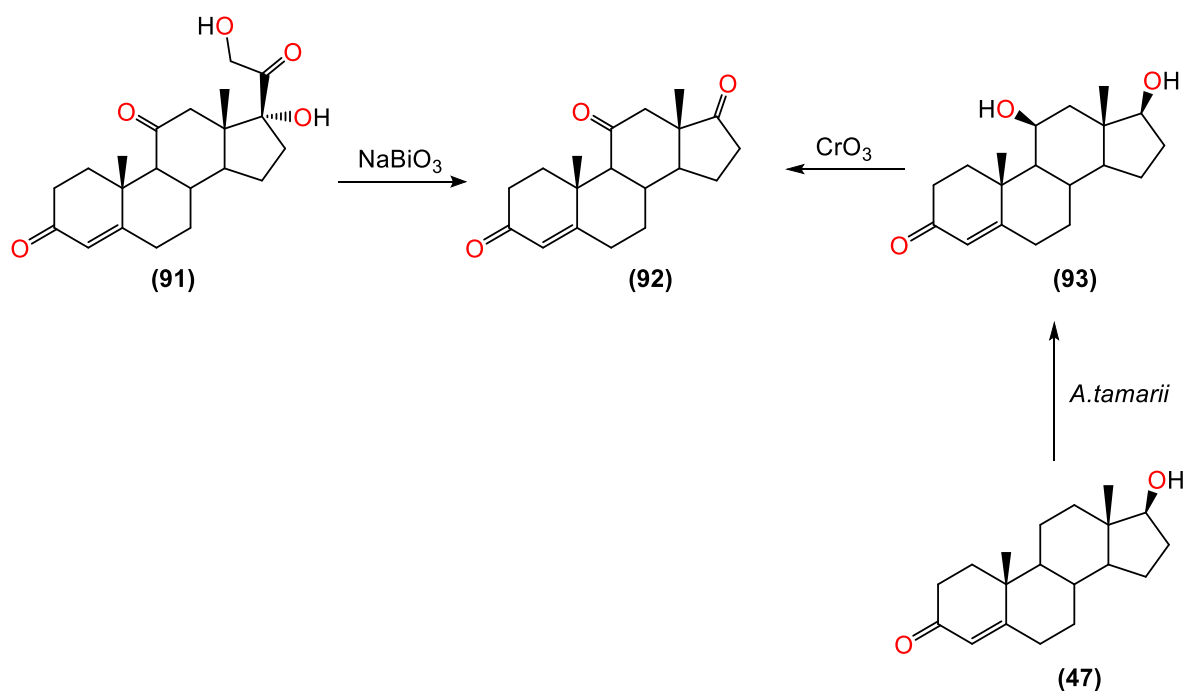


Schemat 23. Przykładowa modyfikacja pierścienia C pochodnej z grupy estranów.

Modyfikacje w pozycji atomu C(11) steroidów zawierających grupę metylową przy atomie węgla C(19) należą do szczególnie wymagających. Wynika to z ograniczonego dostępu sterycznego oraz bliskości grup C(18) i C(19), tworzących gęste otoczenie przestrzenne. Choć pozycja ta jest relatywnie bardziej dostępna w szeregach 19–norsteroidów niż w układach pregnanowych, synteza pochodnych z modyfikacją przy atomie C(11) wymaga zazwyczaj długich, wieloetapowych procedur.

Materiał wyjściowy do modyfikacji pierścienia C zależy w dużej mierze od obecności grupy ketonowej lub hydroksylowej w pozycji atomu C(11). Biologiczne wprowadzenie grupy hydroksylowej w tym miejscu, szczególnie w progesteronie, stanowiło istotny przełom w produkcji kortykosteroidów.

Przykładem chemicznego prekursora jest kortyzon (**91**), którego rozszczepienie łańcucha bocznego za pomocą bizmutanu sodu umożliwia otrzymanie adrenalonu (**92**) (Schemat 24) [98,108]. Nowsze badania wykazały, że niektóre mikroorganizmy, takie jak *Aspergillus tamarii*, potrafią wprowadzać grupę hydroksylową w pozycji C(11) podczas fermentacji testosteronu (**47**). Utlenienie produktu fermentacji (**93**) przy użyciu tlenku chromu(VI) również prowadzi do powstania adrenalonu (**92**), potwierdzając znaczenie metod mikrobiologicznych i chemicznych w modyfikacji pierścienia C steroidów.



Schemat 24. Przykładowa modyfikacja pierścienia C pochodnej androstanowej.

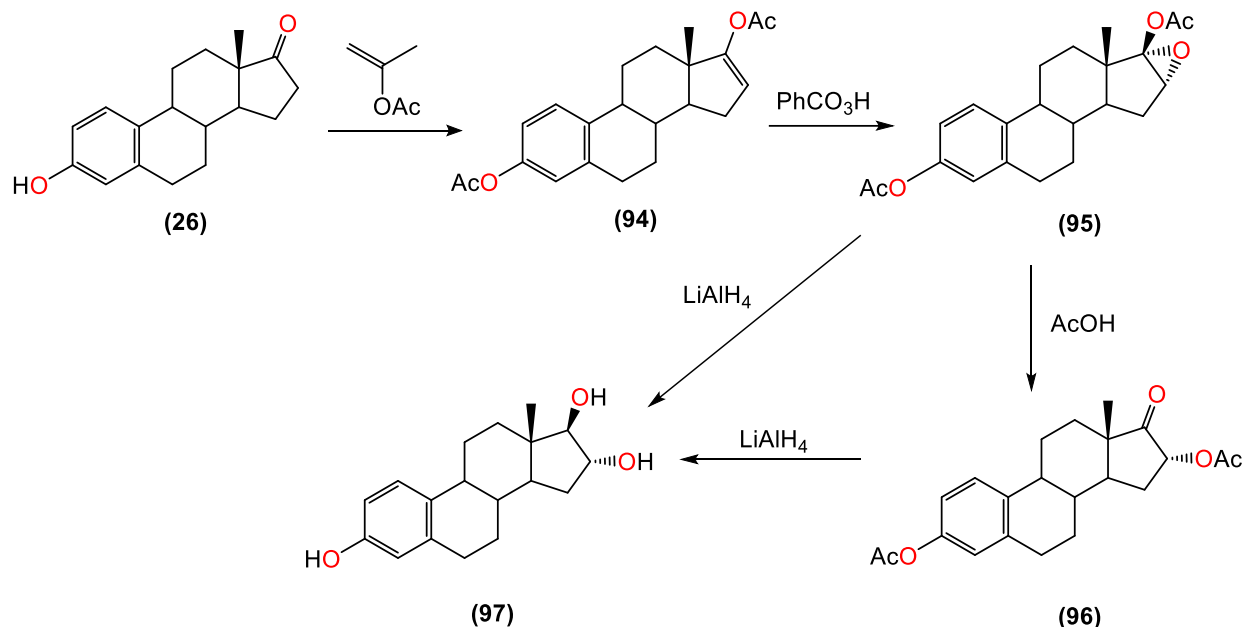
6.4 Modyfikacje pierścienia D

Pierścień D steroidów, zawierający kluczowe centrum funkcjonalne w pozycji atomu C(17), odgrywa zasadniczą rolę w kształtowaniu aktywności biologicznej wielu grup związków, takich jak androgeny, estrogeny, gestageny czy kortykosteroidy. Modyfikacje tej części cząsteczki koncentrują się przede wszystkim na przekształceniach grupy hydroksylowej lub ketonowej przy atomie węgla C(17). Możliwa jest również ingerencja w strukturę łańcucha bocznego oraz atomu węgla w pozycji C(16). Do najczęściej stosowanych strategii należą reakcje addycji nukleofilowej, utleniania i redukcji, epimeryzacji, wprowadzania ugrupowań alkilowych lub halogenowych, a także eliminacji i tworzenia struktur cyklicznych.

Jednym z częstych kierunków modyfikacji pierścienia D jest podstawienie w pozycji atomu C(16), które odgrywa istotną rolę w modulowaniu aktywności estrogenowej oraz wpływa na szlak metaboliczny naturalnych hormonów steroidowych. Wśród uzyskiwanych w ten sposób pochodnych znajduje się m.in. 16α -hydroksyestradiol (**97**), możliwy do otrzymania syntetycznie (Schemat 25) [69].

Syntezę rozpoczyna się od reakcji estronu (**26**) z octanem izopropylidenu, prowadzącej do powstania pochodnej acetylowanego enolu w pozycji atomu węgla C(17) oraz C(3) (**94**) [109]. Kolejnym etapem jest epoksydacja układu nienasyconego za pomocą kwasu peroksybenzoesowego, co prowadzi do utworzenia epoksydu (**95**) [110]. Regiochemia tej reakcji wynika z preferencyjnego ataku elektrofilowego od strony mniej zatłoczonej przestrzennie. Otrzymany epoksyd może zostać poddany acetolizie, w wyniku której następuje otwarcie pierścienia oksiranowego i podstawienie grupy acetoksylowej w pozycji 16α , prowadzące do związku (**96**). Redukcja tego związku za pomocą LiAlH_4

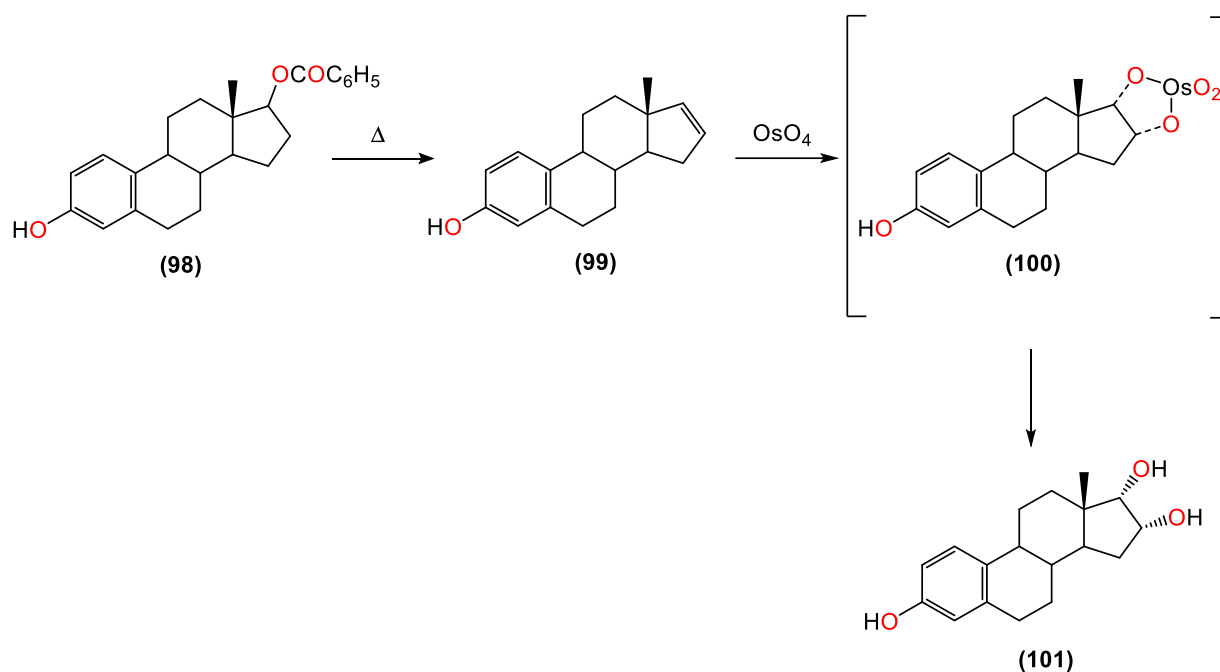
umożliwia jednoczesną redukcję grupy ketonowej przy atomie C(17) oraz usunięcie grup ochronnych, co skutkuje powstaniem docelowego produktu 16 α -hydroksy-17 β -estradiolu (**97**). Alternatywnie, związek ten można również uzyskać poprzez bezpośrednią redukcję epoksydu z pominięciem etapu acetolizy.



Schemat 25. Synteza chemiczna 16 α -hydroksyestradiolu.

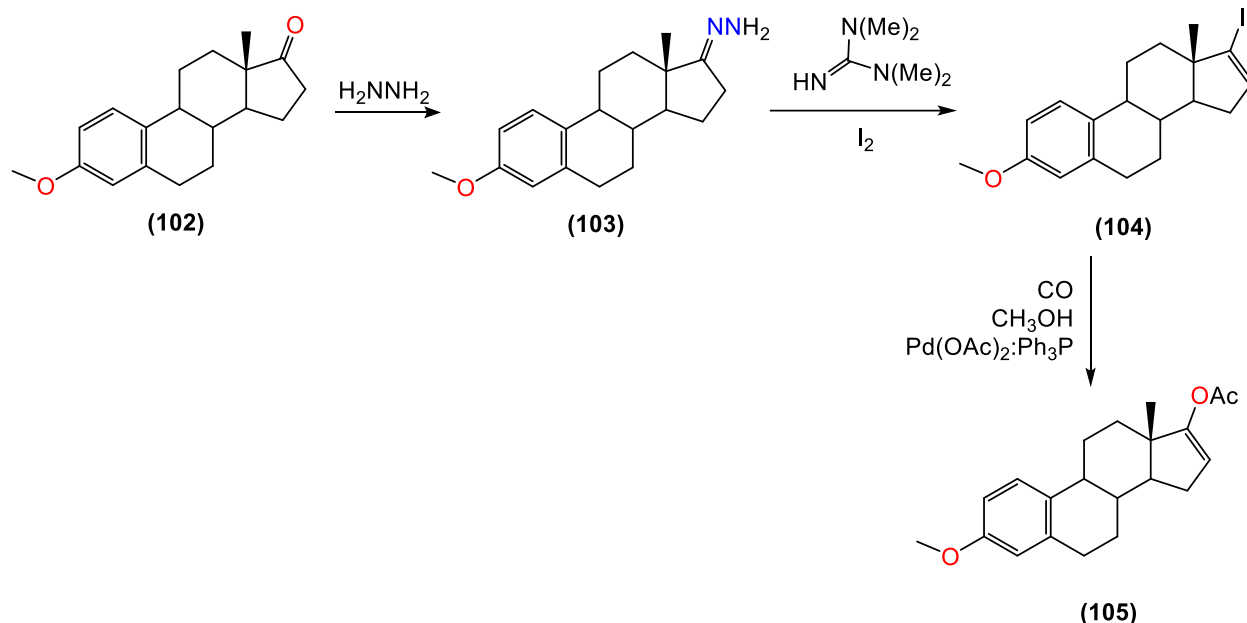
Synteza dioli w pozycjach atomów C(16) i C(17) stanowi istotny kierunek w chemicznej modyfikacji estrogenów, szczególnie w kontekście uzyskiwania izomerów o określonej stereochemii. Wprowadzenie *cis* układu hydroksylowego jest możliwe dzięki zastosowaniu specyficznych nieorganicznych utleniaczy, takich jak tlenek osmu(VIII), znanych z preferencyjnego generowania *cis* dioli (Schemat 26) [69].

W opisywanej sekwencji jako substrat wyjściowy wykorzystuje się 17-benzoestan estradiolu (**98**). Pod wpływem ogrzewania następuje eliminacja kwasu benzoesowego, prowadząca do powstania pochodnej 16-dehydro (**99**). Następnie związek ten poddaje się dihydroksylacji z użyciem OsO₄, co skutkuje stereoselektywnym wprowadzeniem dwóch grup hydroksylowych (**101**). Stereochemia produktu końcowego wynika z utworzenia pięciocząłowego kompleksu przejściowego (**100**), charakterystycznego dla mechanizmu *cis*-osmiowania.

Schemat 26. Przykładowa synteza *cis*-diolowej pochodnej 17-benzoesu estradiolu.

Grupa ketonowa zlokalizowana w pozycji C(17) steroidów, zwłaszcza w strukturach estronowych, wykazuje dużą podatność na reakcje addycji nukleofilowej. Z uwagi na zatłoczenie przestrzenne po stronie β pierścienia D, nukleofile atakują najczęściej od strony α , tj. mniej osłoniętej sterycznie. Przykładem takiej reakcji jest addycja grupy metylowej do eteru metylowego estronu z użyciem odczynnika Grignarda (CH_3MgBr), która prowadzi do powstania 17α -alkilowanego alkoholu.

Innym podejściem do funkcjonalizacji pozycji C(17) jest zastosowanie sprzęgania typu Suzuki (Schemat 27) [69]. Sekwencję rozpoczyna przekształcenie eteru metylowego estronu (**102**) do odpowiedniego hydrazynu (**103**), który po reakcji z tetrametyloguanidyną i jodem przekształca się w 17-eno-jodek (**104**) [111-113]. Następnie przeprowadza się reakcję karbonylacyną tego związku z tlenkiem węgla w obecności kompleksu $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{PPh}_3$ w metanolu, co skutkuje otrzymaniem 17-karbometylowej pochodnej estronu (**105**). Zastąpienie metanolu odpowiednią aminą umożliwia uzyskanie amidów, co dodatkowo zwiększa różnorodność możliwych przekształceń w tej pozycji.

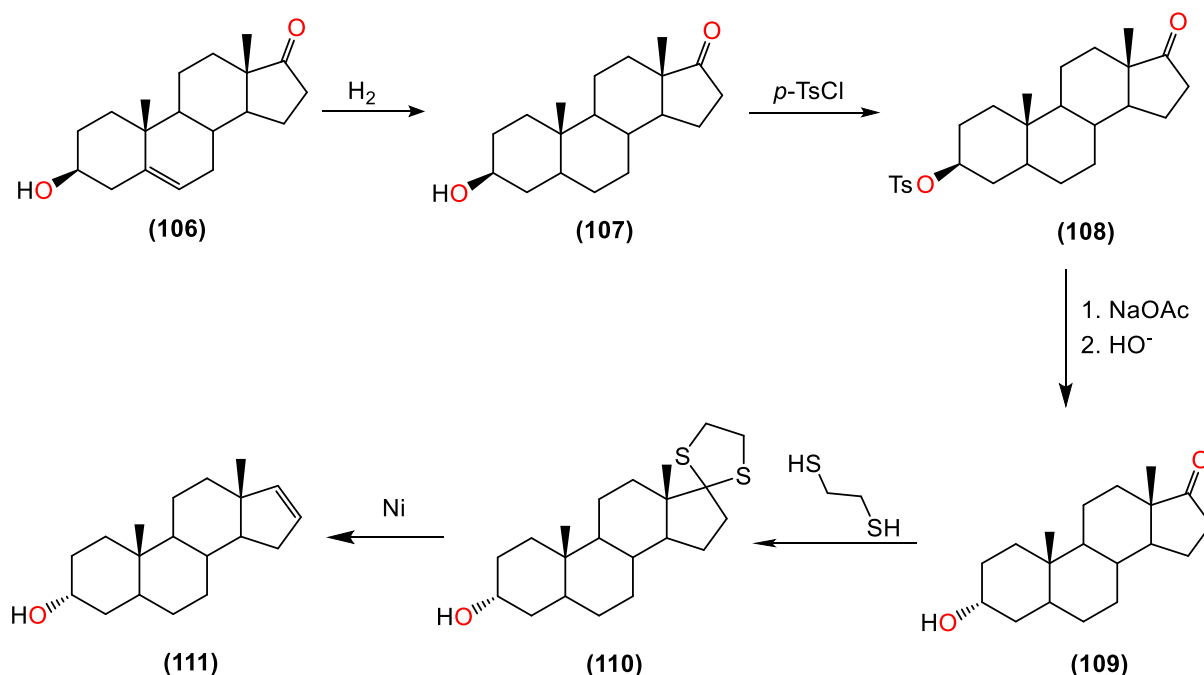


Schemat 27. Przykładowa modyfikacja C(17) steroidów z wykorzystaniem reakcji Suzuki.

Redukcja polarności cząsteczki steroidowej poprzez usunięcie grup funkcyjnych stanowi skuteczną strategię w syntezie związków o właściwościach feromonowych oraz zmodyfikowanej biodostępności. Jednym z przykładów tego podejścia jest synteza uproszczonego androstanu, będącego głównym składnikiem feromonu knura [98]. Związek ten, niemal całkowicie pozbawiony ugrupowań polarnych, charakteryzuje się wysoką lotnością i intensywnym zapachem.

Proces syntezy rozpoczyna się od katalitycznej redukcji dehydroepiandrosteronu (**106**) prowadzącej do pełnego nasycenia szkieletu steroidowego i uzyskania androstanu (**107**) (Schemat 28) [114-116]. Następnie grupa hydroksylowa w pozycji C(3) przekształcana jest w pochodną tosyłową (**108**) w reakcji z chlorkiem *p*-toluenosulfonylu [117,118]. Jej dalsze przekształcenie z octanem sodu powoduje podstawienie reszty tosyłowej grupą acetoksyłową, z jednoczesną inwersją konfiguracji w pozycji atomu węgla C(3). Hydroliza produktu daje alkohol (**109**) [119]. Kolejny etap obejmuje konwersję hydroksylu do ugrupowania tioacetalowego poprzez reakcję z etylenoditiolem, prowadzącą do powstania (**110**). Zastosowanie niklu Raney'a umożliwia jednoczesne usunięcie grup tiolowych oraz eliminację, której efektem jest powstanie wiązania podwójnego w pierścieniu D (**111**) [98].

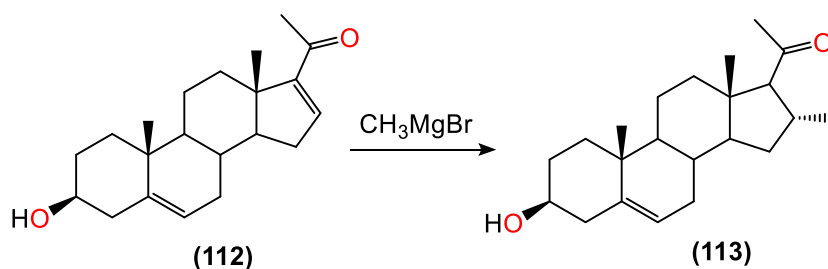
Tego rodzaju przekształcenia umożliwiają uzyskanie steroidów pozbawionych typowych grup polarnych, co znacząco zwiększa ich hydrofobowość, poprawia dystrybucję w fazie lotnej. Potencjalnie wzmacnia to ich aktywność biologiczną, szczególnie w kontekście działania zapachowego i feromonowego.



Schemat 28. Przykładowa modyfikacja pierścienia D na podstawie przemian dehydroepiandrosteronu.

Wiele strategii opracowanych dla progesteronu znajduje bezpośrednie zastosowanie w modyfikacjach kortykosteroidów, szczególnie w kontekście wprowadzania podstawników metylowych w pozycję atomu C(16) pierścienia D. Jednym z podejść prowadzących do otrzymania 16 α -metyloprogesteronów jest wykorzystanie reakcji z odczynnikami Grignarda.

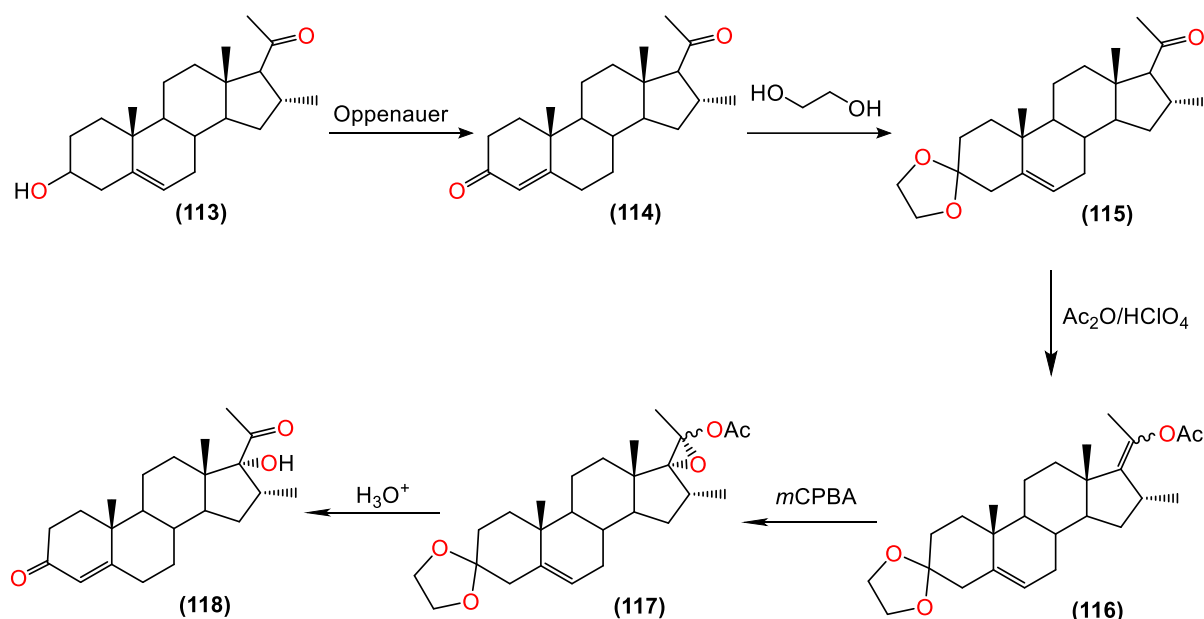
Przykładowo, acylowany 16-dehydropregnenolon (**112**) reaguje z bromkiem metylomagnezowym, co prowadzi do podstawienia metylowego w pozycji atomu C(16) i jednoczesnej eliminacji grupy acylowej (Schemat 29) [98,120]. Kierunek addycji determinowany jest dostępnością przestrzenną, preferowany atak od strony α skutkuje utworzeniem produktu (**113**) o określonej stereochemii.



Schemat 29. Przykładowa reakcja modyfikacji pierścienia D w pozycji C(16) wykorzystująca reakcję Grignarda.

Uzyskany intermediat (**113**) można dalej utlenić metodą Oppenauera, co pozwala na przekształcenie grupy hydroksylowej przy atomie C(3) w keton i otrzymanie 16 α -metyloprogesteronu (**114**) (Schemat 30) [121]. Selektowna funkcjonalizacja pozycji C(17) wykorzystuje różnice

reaktywności pomiędzy obecnymi grupami karbonyłowymi. Reakcja z glikolem etylenowym przebiega wybiórczo w pozycji atomu węgla C(3), dając związek (**115**). Niska reaktywność grupy karbonylowej łańcucha bocznego wynika z obecności sąsiadującego podstawnika metylowego. Kolejny etap obejmuje acetylację tego związku bezwodnikiem octowym w obecności katalitycznych ilości kwasu nadchlorowego. Skutkuje to powstaniem enolowego estru w pozycji atomu C(20) (**116**). Utlenienie tego związku za pomocą *m*CPBA umożliwia utworzenie epoksydu 17,20 (**117**), traktowanego jako forma ukrytej hydroksylacji. Obecne w cząsteczce grupy ochronne można następnie usunąć poprzez traktowanie roztworem kwasu, co prowadzi do jednoczesnej hydrolizy ketalu w pozycji atomu węgla C(3) i otwarcia epoksydu, dając produkt końcowy hydroksylowany 16 α -metyloprogesteron (**118**).



Schemat 30. Przykładowa reakcja modyfikacji pierścienia D w pozycji C(16) związku z grupy pregnanów.

7. Grupy ochronne w chemii steroidów

Grupy ochronne (ang. *protecting groups*) odgrywają kluczową rolę w syntezie organicznej, zwłaszcza w przypadku złożonych cząsteczek biologicznie czynnych, takich jak steroidy. Ich podstawową funkcją jest tymczasowe zablokowanie reaktywnych grup funkcyjnych w celu zapobiegania niepożądanym reakcjom chemicznym podczas kolejnych etapów syntezy [122]. Po zakończeniu planowanych modyfikacji grupa ochronna może zostać selektywnie usunięta, odsłaniając grupę funkcyjną w niezmienionej formie. Zastosowanie tej strategii umożliwia prowadzenie reakcji w sposób bardziej kontrolowany i selektywny.

W przypadku związków steroidowych, które zawierają wiele centrów reaktywności (głównie grupy hydroksylowe i karbonylowe), stosowanie grup ochronnych stanowi nieodzowny element planowania syntezy. Szkielet steroidowy jest sztywną, wielopierścieniową strukturą o określonej

stereochemii, co czyni selektywną funkcjonalizację trudnym zadaniem bez zastosowania odpowiednich technik ochrony grup funkcyjnych.

7.1 Znaczenie grup ochronnych w chemii steroidów

W związkach steroidowych najczęściej chronionymi grupami są grupy hydroksylowe w pozycjach atomów C(3), C(7), C(12) oraz C(17), jak również grupy karbonylowe przy atomach węgla C(3) i C(20). Bez zastosowania odpowiednich grup ochronnych, reakcje prowadzone na jednym z tych centrów mogą prowadzić do niekontrolowanych przemian w innych fragmentach cząsteczki. Co więcej, obecność licznych wiązań wodorowych w cząsteczkach steroidów może wpływać na reaktywność sąsiadujących grup funkcyjnych, co dodatkowo komplikuje syntezę.

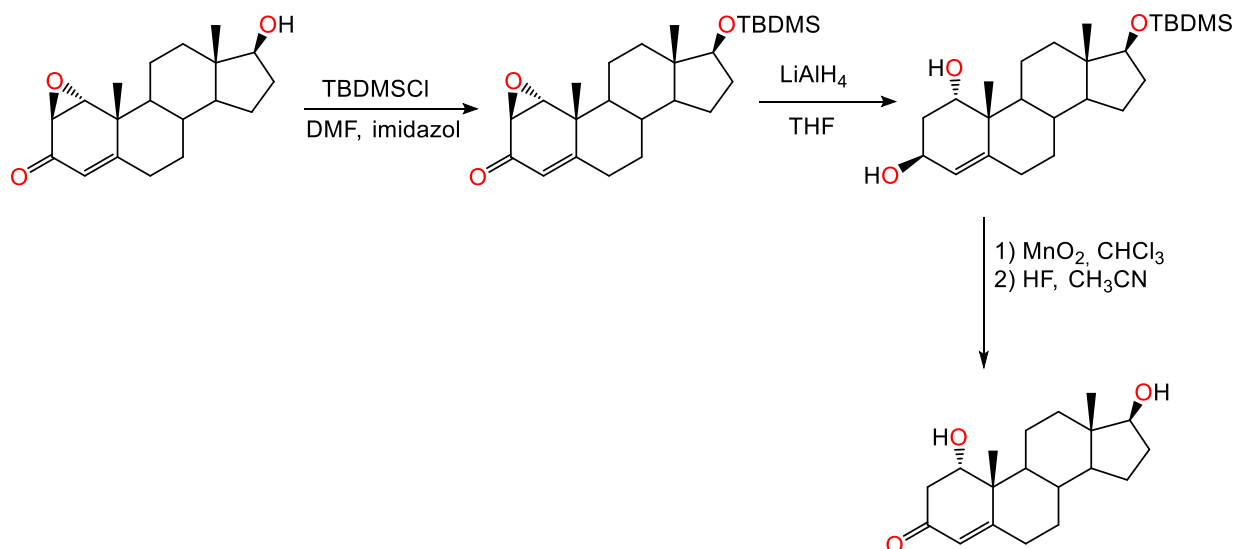
Stosowanie grup ochronnych w chemii steroidów pozwala na:

- selektywne prowadzenie modyfikacji strukturalnych;
- ochronę wrażliwych centrów reaktywnych przed utlenieniem lub redukcją;
- przeprowadzanie reakcji w obecności silnych nukleofilów lub elektrofilów;
- kontrolę stereoselektywności i regioselektywności reakcji.

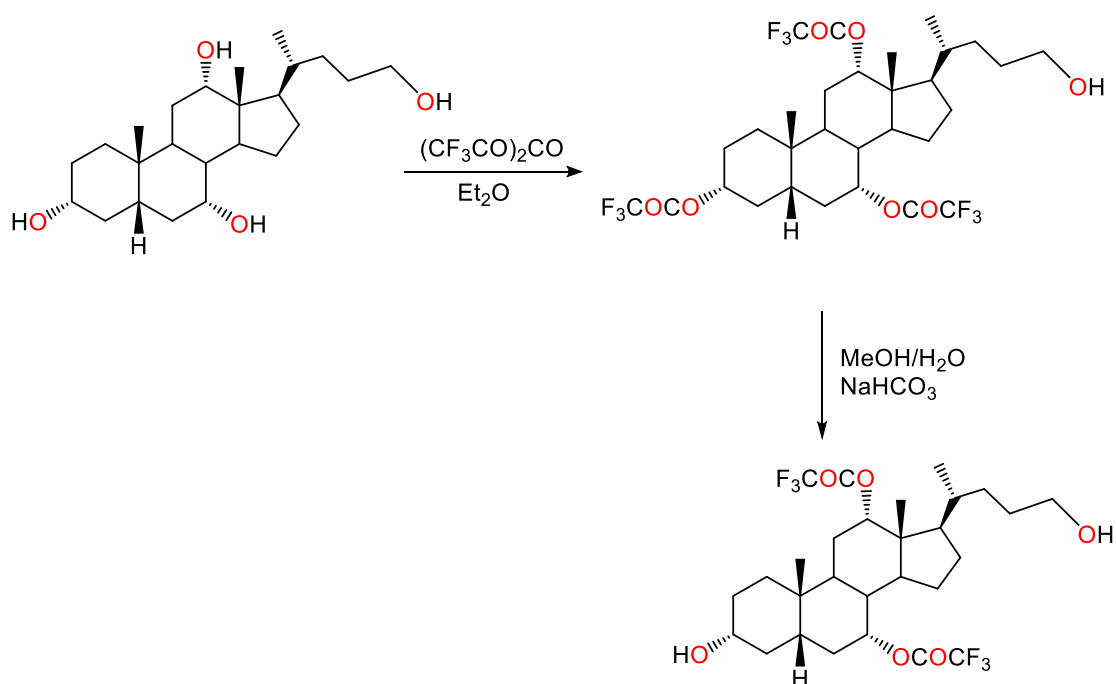
7.2 Ochrona grup hydroksylowych

Sterole i kwasy żółciowe mogą zawierać jedną lub więcej grup hydroksylowych (np. w pozycjach 3 α , 7 α , 12 α , 25), których selektywna modyfikacja może stanowić istotne wyzwanie. W celu uniknięcia niepożądanego reaktywności, powszechnie stosuje się eteryfikację lub estryfikację jako metodę ochrony tych grup.

Jedną z najczęściej stosowanych strategii ochrony grup hydroksylowych jest zastosowanie grupy *tert*-butylodimetylosililowej, która cechuje się stabilnością w warunkach zasadowych i umiarkowaną odpornością na działanie kwasów [7]. Alternatywą są bardziej trwałe grupy, takie jak triizopropylsilil czy trietylosilil, które stosuje się przy bardziej wymagających warunkach reakcyjnych [122]. Typowy przykład ochrony grupy hydroksylowej w pozycji 3 α cholestanu przedstawiono na Schemacie 31.

Schemat 31. Zastosowanie grupy tert-butylo-dimetylosililowej w serii przemian 3 α -cholestanu.

Dla polihydroksylowanych układów, takich jak m.in. kwasy żółciowe selektywność ochrony może być osiągana poprzez różnice w kwasowości oraz dostępności przestrzennej poszczególnych grup hydroksylowych [122]. Przykładem takiej selektywnej ochrony może być reakcja z nadmiarem kwasu trifluorooctowego bądź częściej jego bezwodnika, prowadząca do utworzenia odpowiednich estrów (Schemat 32).

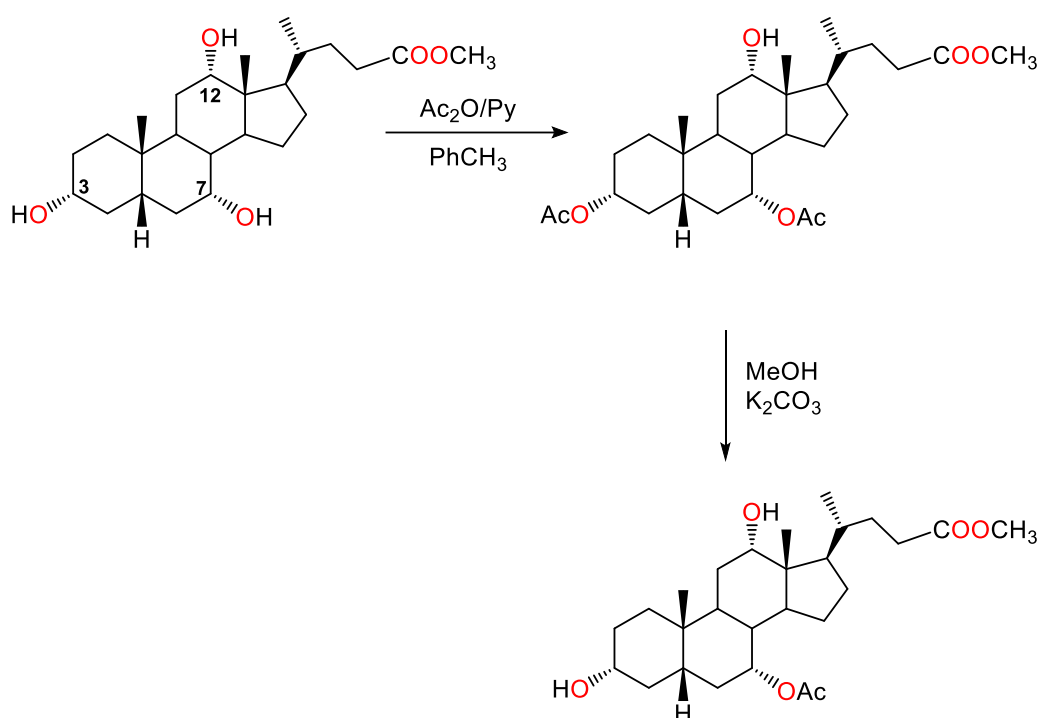


Schemat 32. Estryfikacja polihydroksylowanych pochodnych steroidowych jako strategia zastosowania grup ochronnych.

Inną popularną strategią jest zastosowanie grup benzoilowych lub acetylowych, szczególnie przy syntezach prowadzonych w warunkach chemii „click”, gdzie reakcje azydek–alkin są często

katalizowane jonami miedzi(I) i prowadzone w obecności wody lub alkoholi. Te grupy ochronne można łatwo wprowadzić z wykorzystaniem odpowiednich bezwodników lub chlorków acylowych, a następnie usunąć w warunkach zasadowych (np. NaOMe/MeOH) lub hydrolitycznych (np. K₂CO₃/MeOH) [7].

Zdolność grup octanowych do hydrolizy maleje w szeregu 3 α >>7 α >12 α . Selekttywne usunięcie grupy 3-acetylowej zachodzi w przy użyciu węgla potasu w metanolu, a więc w dość łagodnych warunkach. W przypadku acetylowania grup 3 α i 7 α -hydroksylowych w kwasie cholowym używana jest procedura z wykorzystaniem bezwodnika octowego i pirydyny (Schemat 33). Załoczona przestrzennie grupa 12 α -OH aktywuje mniej załoczoną grupę hydroksylową 7 α . Zastosowanie więc łagodnej hydrolizy np. metanolowego roztworu węgla potasu skutkuje selektywną hydrolizą grupy 3 α -OH (Schemat 33).



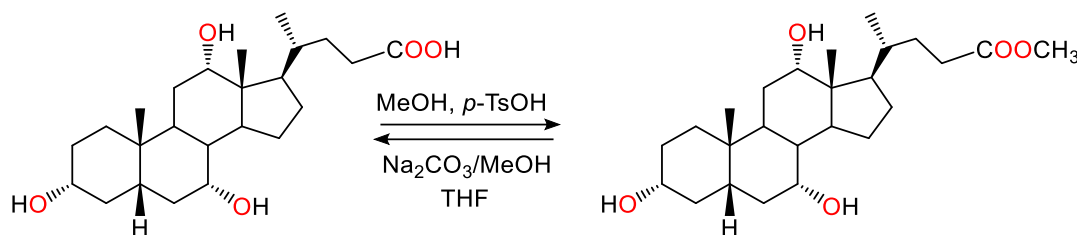
Schemat 33. Zastosowanie grup octanowych oraz ich selektywnej hydrolizy w przykładowej syntezie pochodnej kwasu cholowego.

7.3 Ochrona grup karboksylowych

Grupa karboksylowa, typowa dla kwasów żółciowych i ich koniugatów, również wymaga czasowego zablokowania podczas niektórych etapów syntezy. Najczęściej stosuje się metylowe lub benzylowe, które są łatwe do wprowadzenia poprzez reakcję z diazometanem lub alkoholem w obecności kwasu (np. gazowy HCl w MeOH).

Estry metylowe są usuwalne pod wpływem zasady (np. NaOH) lub enzymatycznie (Schemat 34) [7]. Stosowanie tych grup może być ograniczone w przypadku obecności innych wrażliwych grup funkcyjnych. Estry benzylowe są natomiast odłączane w warunkach uwodornienia katalitycznego

(H₂, Pd/C), co czyni je kompatybilnymi z szeroką gamą reakcji pośrednich, w tym reakcją Huisgena typu CuAAC.



Schemat 34. Wprowadzanie oraz usuwanie grup metylowych jako strategia ochrony grupy karboksylowej łańcucha bocznego kwasów żółciowych.

Alternatywą, szczególnie w przypadku bardziej złożonych cząsteczek lub wymagających etapów sprzęgania, jest użycie grup *tert*-butylowych, które mogą być usunięte z wykorzystaniem kwasu trifluorooctowego, bez naruszania większości pozostałych ugrupowań ochronnych w cząsteczce.

Ważnym aspektem w projektowaniu ochrony jest nie tylko jej trwałość, ale również łatwość i selektywność deprotekcji. W przypadku syntez z użyciem chemii „click”, reakcja Huisgena wymaga obecności terminalnych grup alkinowych oraz azydkowych, które mogą ulegać degradacji w warunkach silnie kwasowych lub zasadowych. Dlatego preferuje się stosowanie grup ochronnych, które można odłączyć w łagodnych warunkach np. Ac, Bz, Bn, TBDMS, *t*-Bu, dostosowując procedurę do kompatybilności z pozostałymi grupami funkcyjnymi.[122]

Zarówno dla grup hydroksylowych, jak i karboksylowych, istotne jest zachowanie kompatybilności z dalszymi etapami funkcjonalizacji. Odpowiednio dobrana sekwencja ochrony umożliwia przeprowadzenie złożonych syntez koniugatów steroid–steroid lub steroid–cząsteczka biologicznie aktywna bez niepożądanego reaktywności.

8. Chemia „click”

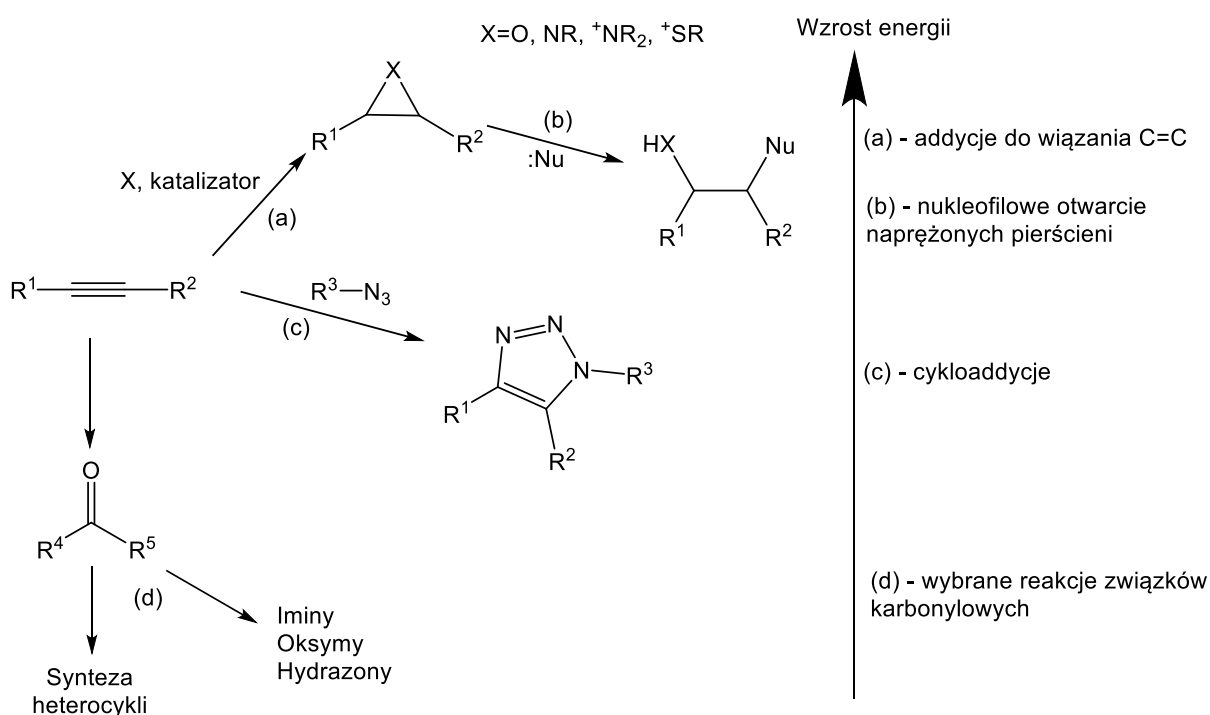
W 2001 roku profesor K.B. Sharpless z Instytutu Scripps wprowadził pojęcie chemii „click” [123]. Zgodnie z jego koncepcją głównym celem syntezy organicznej powinno być „wytwarzanie właściwości”, czyli uzyskiwanie związków o pożądanej aktywności w możliwie najprostszy i najbardziej efektywny sposób. Idea ta stanowiła odpowiedź na obserwowaną w syntezie tendencję do nadmiernego komplikowania struktur, co prowadziło do projektowania wieloetapowych i pracochłonnych procesów. Jednocześnie, takie same właściwości mogą często wykazywać związki o prostszej budowie [124].

Sharpless określił kryteria, jakie musi spełniać reakcja, aby można ją zaklasyfikować do chemii „click”. Należą do nich:

- proste warunki reakcji;

- łatwo dostępne substraty i odczynniki;
- nieszkodliwe produkty uboczne, które można usunąć metodami niechromatograficznymi (np. krystalizacja, sączenie);
- brak rozpuszczalników lub stosowanie rozpuszczalników łatwych do usunięcia;
- stabilność produktu w warunkach fizjologicznych i jego łatwa izolacja;
- stereospecyficzność i modularność;
- wysoka wydajność reakcji.

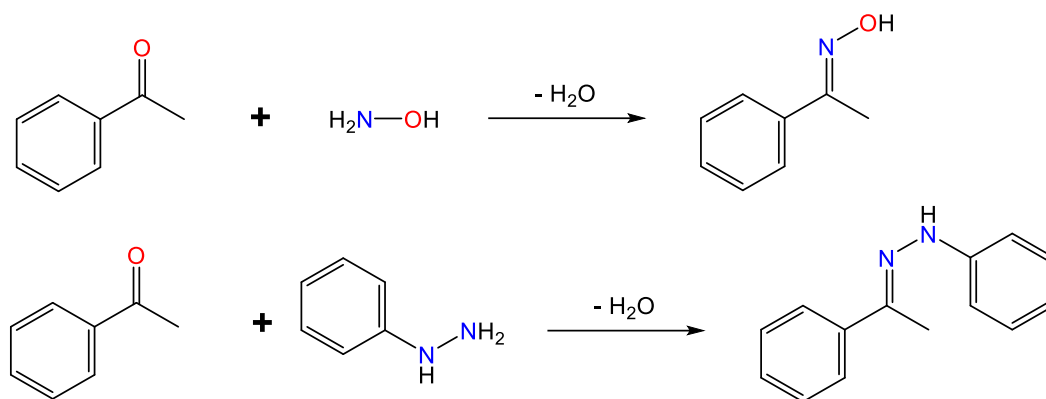
Cechą wspólną tych reakcji jest ich silna aktywacja termodynamiczna (powyżej 20 kcal/mol), co umożliwia osiągnięcie wysokiej wydajności, szybkości oraz selektywności procesów. Przykłady reakcji chemii „click” przedstawiono na Schemacie 35.



Schemat 35. Przykładowe rodzaje reakcji chemii „click”

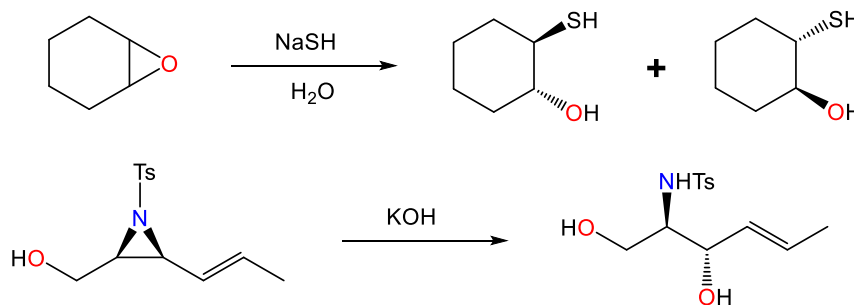
Wymienione kryteria spełnia kilka głównych typów reakcji prowadzących do powstania wiązań atom węgla–heteroatom [123,124]:

- **Reakcje związków karbonylowych typu „non-aldol”**, obejmujące m.in. syntezę pochodnych oksymów, amidów, moczników, tiomoczników, hydrazonów oraz heterocykli aromatycznych (Schemat 36).



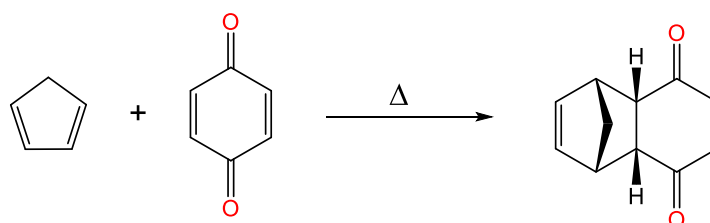
Schemat 36. Przykłady reakcji typu „non-aldol”.

- **Substytucje nukleofilowe**, polegające na otwarciu naprężonych pierścieni heterocyklicznych, takich jak epoksydy czy azydryny (Schemat 37).

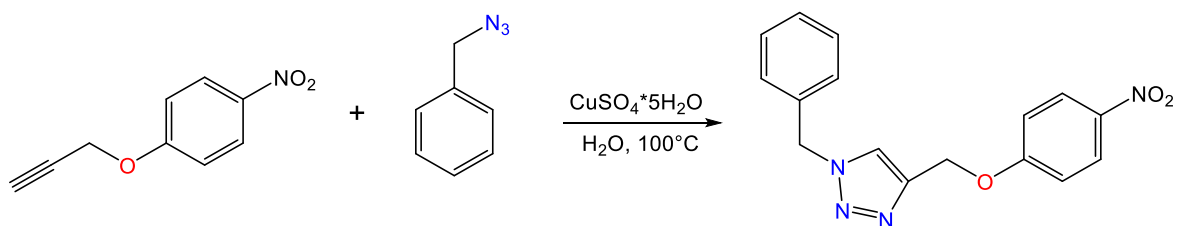


Schemat 37. Przykłady reakcji otwarcia pierścienia w chemii „click”.

- **Cykloaddycje związków nienasyconych**, obejmujące reakcję Dielsa–Aldera oraz 1,3–dipolarną cykloaddycję (Schemat 38 i 39).

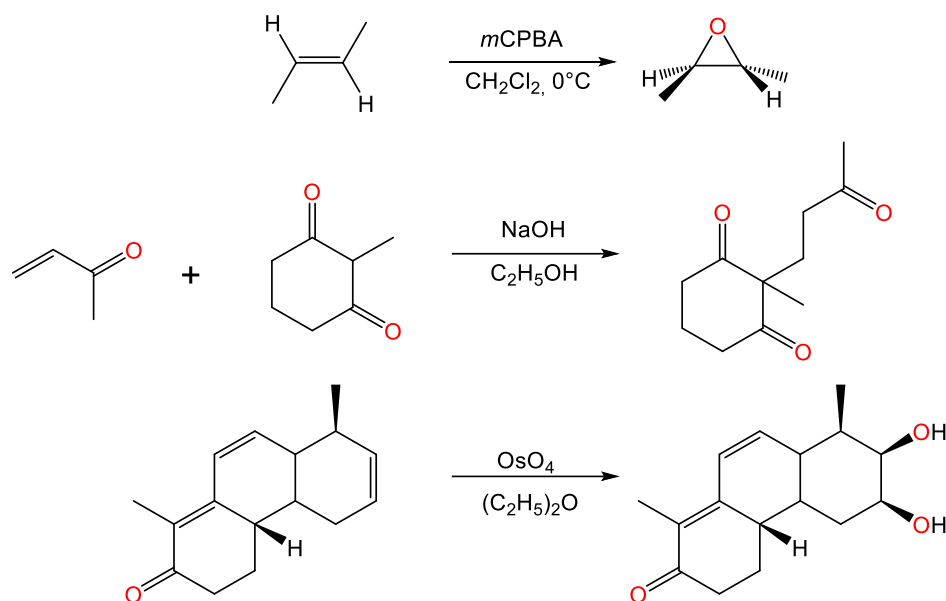


Schemat 38. Przykład reakcji Dielsa–Aldera.



Schemat 39. Przykład reakcji 1,3–dipolarnej cykloaddycji (Reakcja Huisgena).

- **Addycje do wiązań wielokrotnych C=C**, np. epoksydacja, addycja Michaela, tworzenie azyrydyn czy dihydroksylacja (Schemat 40).

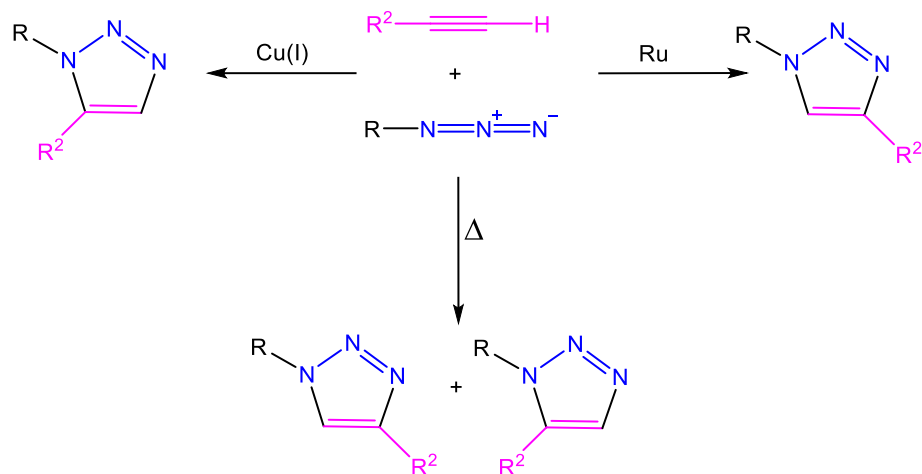


Schemat 40. Przykłady reakcji addycji do wiązań wielokrotnych.

Znaczenie chemii „click” zostało dodatkowo podkreślone w 2022 roku, kiedy to K.B. Sharpless, M. Meldal i C.R. Bertozzi otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za rozwój tej koncepcji oraz chemii bioortogonalnej. Wyróżnienie to podkreśliło fundamentalną rolę prostych, wysokoselektywnych i wydajnych reakcji w nowoczesnej syntezie organicznej, umożliwiających szybkie i powtarzalne konstruowanie złożonych układów molekularnych. Chemia „click” ugruntowała się jako jedno z kluczowych narzędzi współczesnej chemii organicznej i medycznej, znajdując zastosowanie m.in. w syntezie biokoniuatów, projektowaniu cząsteczek bioaktywnych oraz badaniach na styku chemii i biologii.

8.1 Reakcja Huisgena

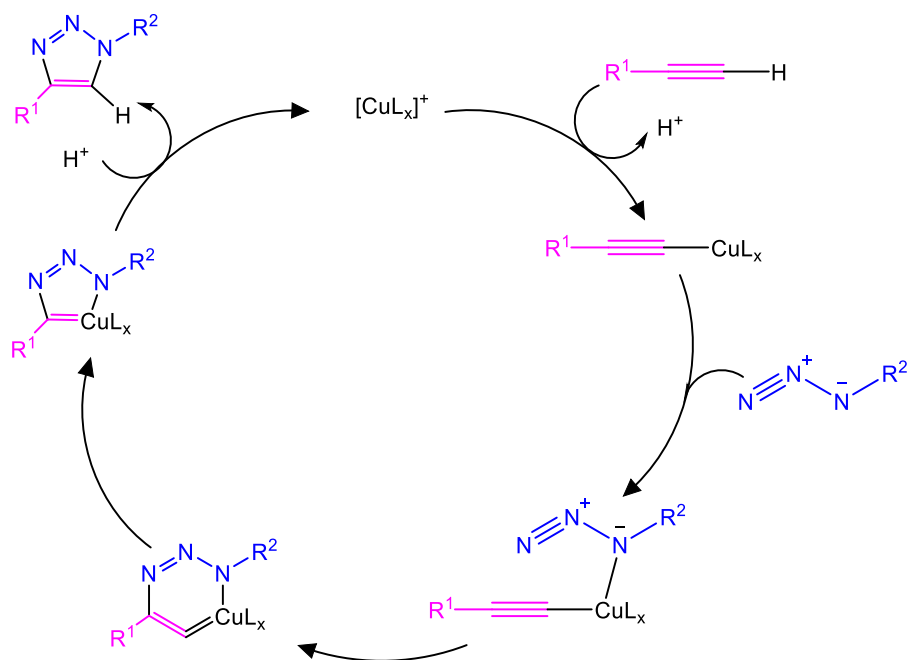
Reakcja cykloaddycji 1,3–dipolarnej pomiędzy azydkami a alkinami, opisana po raz pierwszy przez Rudolfa Huisgena w latach 60. XX wieku, stanowi klasyczny przykład transformacji typu „click chemistry” [125]. Mechanizm tego procesu opiera się na interakcji dipolu 1,3 (azydku) z dipolarofilem (alkinem) w warunkach podwyższonej temperatury. Prowadzi do powstania mieszaniny izomerów 1,4– oraz 1,5–disubstytuowanych 1,2,3–triazoli (Schemat 41) [126,127].



Schemat 41. Reakcja Huisgena (1,3-dipolarnej cykloaddycji).

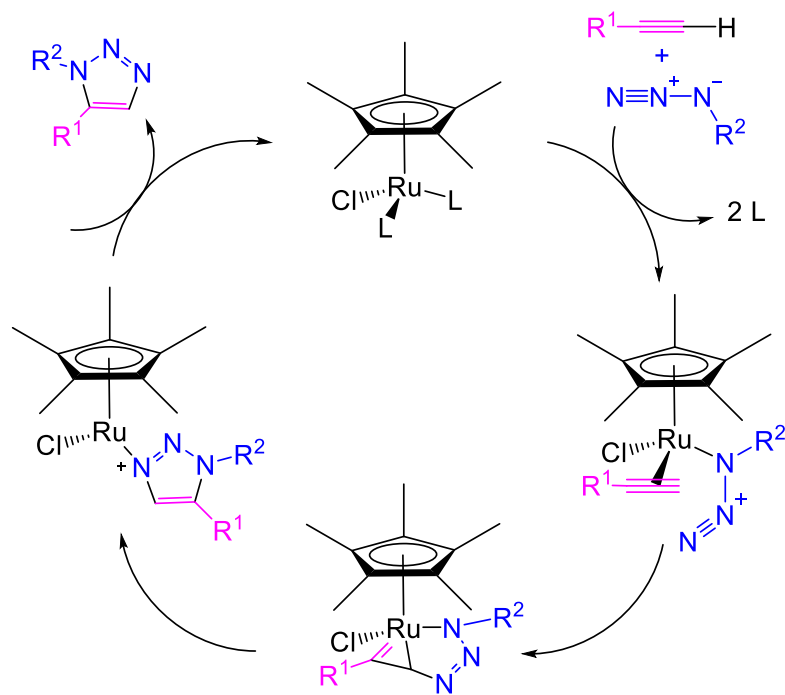
Reakcja Huisgena należy do cykloaddycji typu 3+2, w wyniku której powstaje pięcioczłonowy heterocykl. Tworzy się on poprzez przesunięcie elektronów π , prowadzące do utworzenia co najmniej dwóch nowych wiązań.

Istotnym ograniczeniem pierwotnej metody Huisgena była konieczność stosowania wysokiej temperatury, co znacząco utrudniało jej wykorzystanie w chemii bioorganicznej, zwłaszcza w modyfikacjach cząsteczek termolabilnych, takich jak peptydy, nukleotydy czy steroidy. Dodatkowy brak regioselektywności znacząco wpływał na wąski zakres użyteczności reakcji. Przełom nastąpił w 2002 roku, kiedy Sharpless i Meldal niezależnie opisali katalizowaną miedzią(I) cykloaddycję azydku do terminalnego alkinu, która umożliwia selektywną syntezę jedynie 1,4-disubstytuowanych triazoli w łagodnych warunkach reakcji [128,129]. Mechanizm CuAAC obejmuje kompleksowanie atomu miedzi(I) z alkinem i powstanie karbanionowego kompleksu, który następnie ulega atakowi nukleofilowemu przez azydek (Schemat 42). W wyniku zamknięcia cyklu pięcioczłonowego powstaje stabilny pierścień 1,2,3-triazolu [130,131].



Schemat 42. Mechanizm reakcji CuACC.

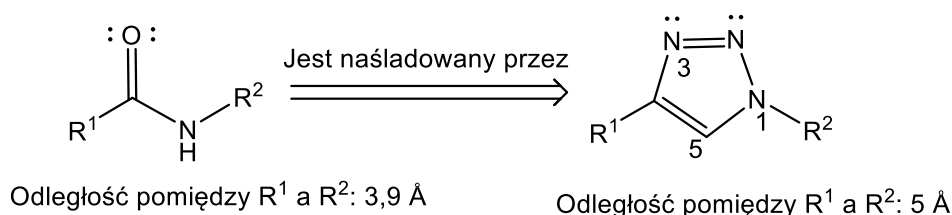
Alternatywą wobec katalizy miedziowej jest RuAAC, umożliwiającą otrzymywanie izomerów 1,5-dipodstawionych [132,133]. Odmienność tego mechanizmu wynika z innej aktywacji alkinu przez kompleks rutenu, co wpływa na orientację orbitalną względem nukleofilowego ataku azydu (Schemat 43). Dzięki rozwojowi różnych metod katalitycznych reakcja Huisgena stała się narzędziem pozwalającym kontrolować regioselektywność, a tym samym projektować triazole o określonych właściwościach biologicznych i farmakologicznych.



Schemat 43. Mechanizm reakcji RuACC.

Jedną z istotnych zalet tej reakcji jest możliwość łatwego wprowadzania grup funkcyjnych umożliwiających jej przebieg. Zarówno związki chemiczne, jak i cząsteczki biologiczne mogą być w prosty sposób funkcjonalizowane grupami alkinowymi lub azydkowymi, co znacząco poszerza zakres jej zastosowań. Azydki i alkiiny wykazują niemal całkowitą obojętność w warunkach biologicznych, nie reagując nawet z wysoce reaktywnymi cząsteczkami biologicznymi, tlenem ani wodą [134]. Dodatkowo, szczególne zainteresowanie badaczy wzbudziły same produkty tej reakcji 1,2,3-triazole, które okazały się wartościowymi związkami w chemii medycznej.

Triazole wykazują zdolność do sztywnego łączenia podjednostek, a ich pierścień pięcioczłonowy może naśladować układy funkcyjne występujące w naturze, m.in. wiązania amidowe, bez ich podatności na hydrolizę enzymatyczną. Funkcja mimetyczna triazoli wynika z podobieństwa do amidów (Rysunek 9). Ponadto, triazole charakteryzują się wyższym momentem dipolowym niż amidy, co wzmacnia ich zdolności do uczestniczenia w wiązaniach wodorowych zarówno jako donory, jak i akceptory. W strukturze pierścienia atomy N(2) i N(3) mogą pełnić rolę akceptorów wiązania wodorowego, a silny dipol polaryzuje atom węgla w pozycji C(5) w stopniu umożliwiającym mu zachowanie właściwości donorowej [135].



Rysunek 9. Podobieństwo triazoli oraz związków amidowych.

Te unikalne właściwości fizykochemiczne przekładają się na szerokie spektrum aktywności biologicznej. Otrzymywane triazole wykazują potencjał jako związki o działaniu anti-HIV, przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybiczym czy przeciwhistaminowym, dodatkowo cechuje je wysoka stabilność chemiczna oraz nietoksyczność [136-140]. Właśnie połączenie prostoty syntezy, stabilności chemicznej i wszechstronnych zastosowań biologicznych sprawia, że cykloaddycja Huisgena i jej warianty zajmują centralne miejsce w nowoczesnej chemii bioorganicznej i projektowaniu leków.

9. Wykorzystanie chemii „click” w projektowaniu i funkcjonalizacji pochodnych steroidowych

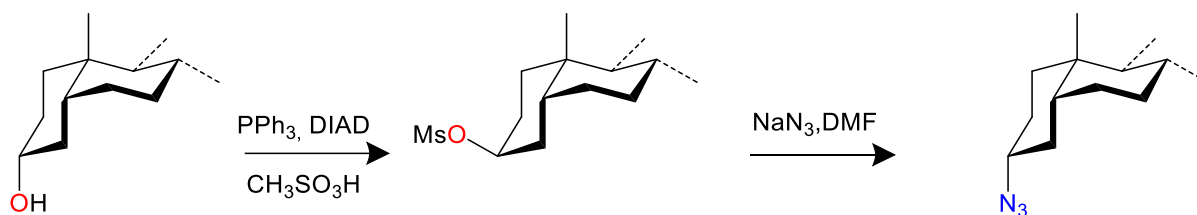
Steroidy, dzięki obecności grup hydroksylowych i karboksylowych oraz sztywnemu szkieletowi pierścieniowemu, są doskonałymi substratami do selektywnej modyfikacji chemicznej. W chemii „click” najczęściej wprowadzane są grupy azydkowe i terminalne grupy alkinowe, które umożliwiają

późniejsze tworzenie pochodnych 1,2,3-triazolowych. Reaktywność tych grup i możliwość kontrolowania stereochemii są kluczowe w projektowaniu funkcjonalnych pochodnych steroidowych.

9.1 Wprowadzanie grup azydkowych

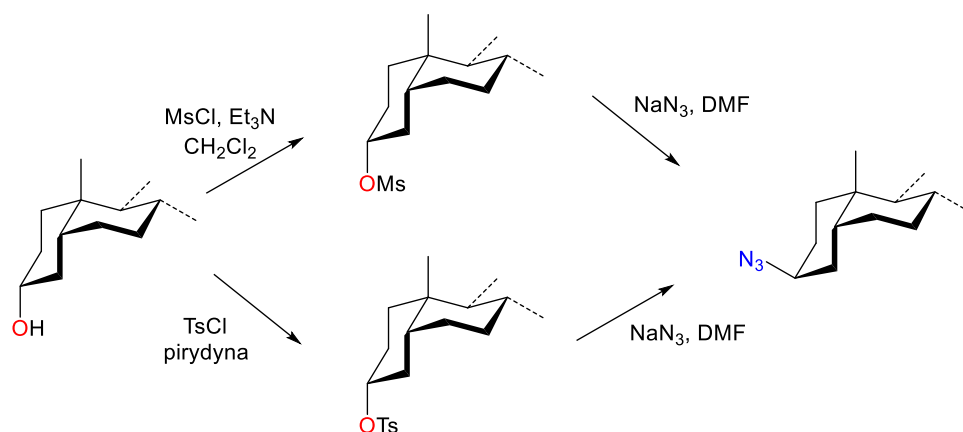
Jednym z najczęściej stosowanych sposobów wprowadzania grupy azydkowej do szkieletu steroidów jest przekształcenie grupy hydroksylowej w lepiej odchodzącą grupę, np. tosyłową lub mesyłową. Powstała grupa działa jako dobry elektrofil w następnej reakcji substytucji nukleofilowej, w której używa się anionu azydkowego. Sposób wprowadzenia azydku determinuje stereochemię końcowego produktu:

- **Zachowanie konfiguracji wyjściowego alkoholu:** w tym przypadku stosuje się reakcję Mitsunobu. Reakcja ta, poprzez odwrócenie konfiguracji w etapie pośrednim, pozwala na uzyskanie azydku o stereochemii identycznej z pierwotnym alkoholem po końcowej substytucji (Schemat 44). Mechanizm opiera się na tworzeniu kompleksu z diizopropylaozodikarbonylu i tryfenylofosfiny, który aktywuje alkohol do inwersyjnej substytucji przez nukleofil, w tym przypadku anion azydkowy.



Schemat 44. Wprowadzenie grupy azydkowej do cząsteczki steroidu z zachowaniem konfiguracji.

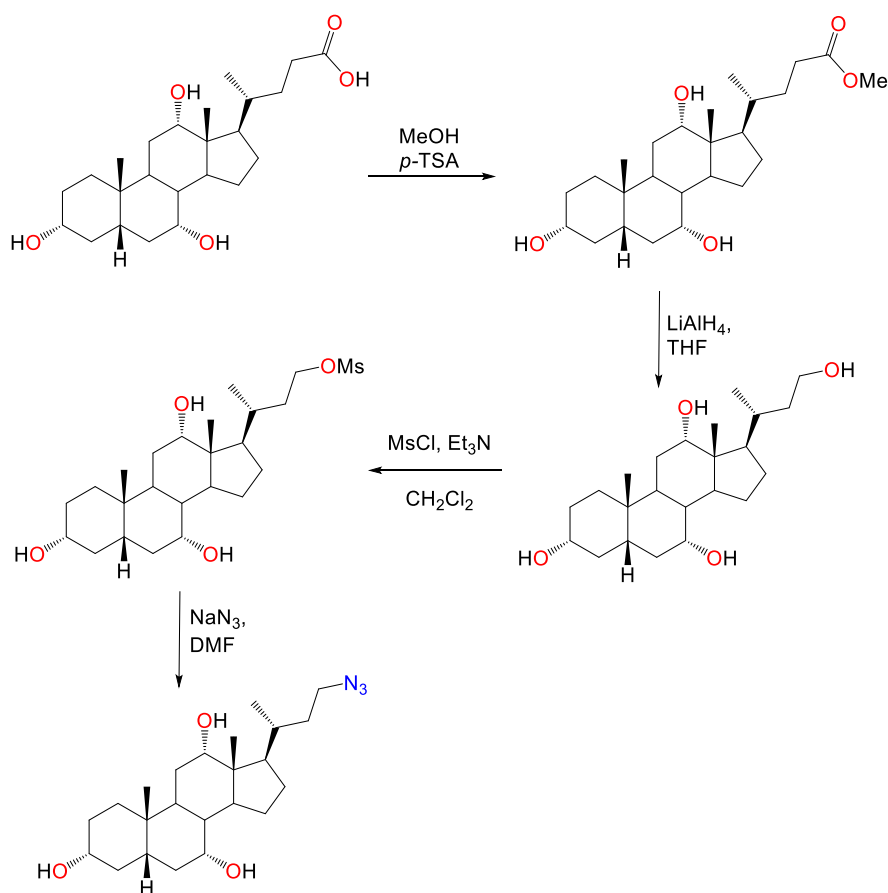
- **Odwrócona konfiguracja względem alkoholu wyjściowego:** uzyskanie azydku steroidowego o konfiguracji przeciwnej do zastosowanego alkoholu wymaga wprowadzenia grupy mesyłowej przy użyciu innych reagentów niż w reakcji Mitsunobu. Jednym ze znanych podejść jest zastosowanie pochodnej tosyłowej jako związku pośredniego, który następnie reaguje z azotkiem sodu, prowadząc do powstania azydku o odwróconej konfiguracji (Schemat 45). W tym mechanizmie kluczowa jest bezpośrednia substytucja nukleofilowa typu S_N2, w której nukleofil atakuje od strony przeciwnej do grupy opuszczającej, co skutkuje inwersją stereochemiczną.



Schemat 45. Wprowadzenie grup azydkowych do cząsteczki steroidu ze zmianą koniguracji.

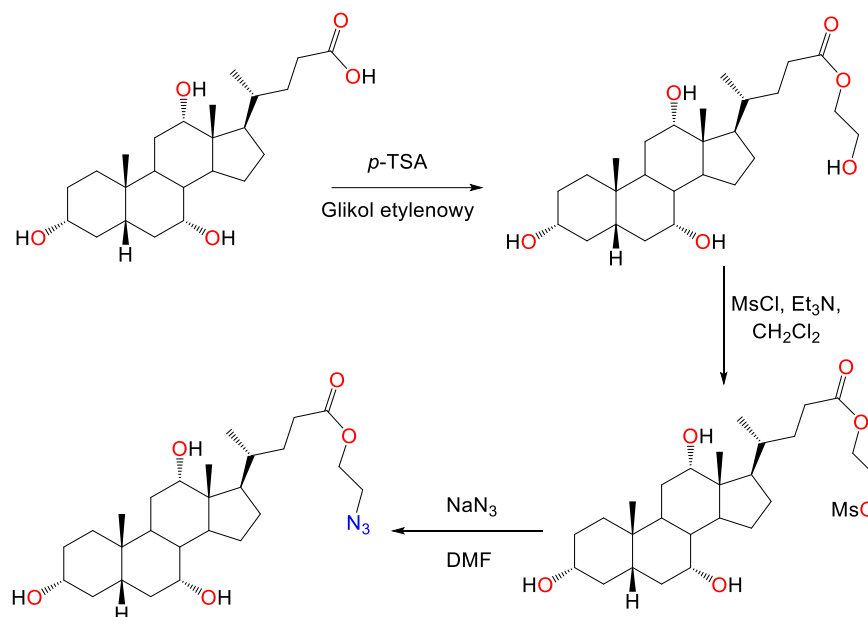
Alternatywnie, w przypadku kwasów żółciowych i innych steroidów zawierających grupę karboksylową w łańcuchu bocznym, można wprowadzać grupę azydkową poprzez kilka strategii [141-143]:

- **Redukcja karboksylu do alkoholu**, następnie jego mesylowanie i reakcja z azydkiem sodu, co pozwala uzyskać azydek w łańcuchu bocznym (Schemat 46).



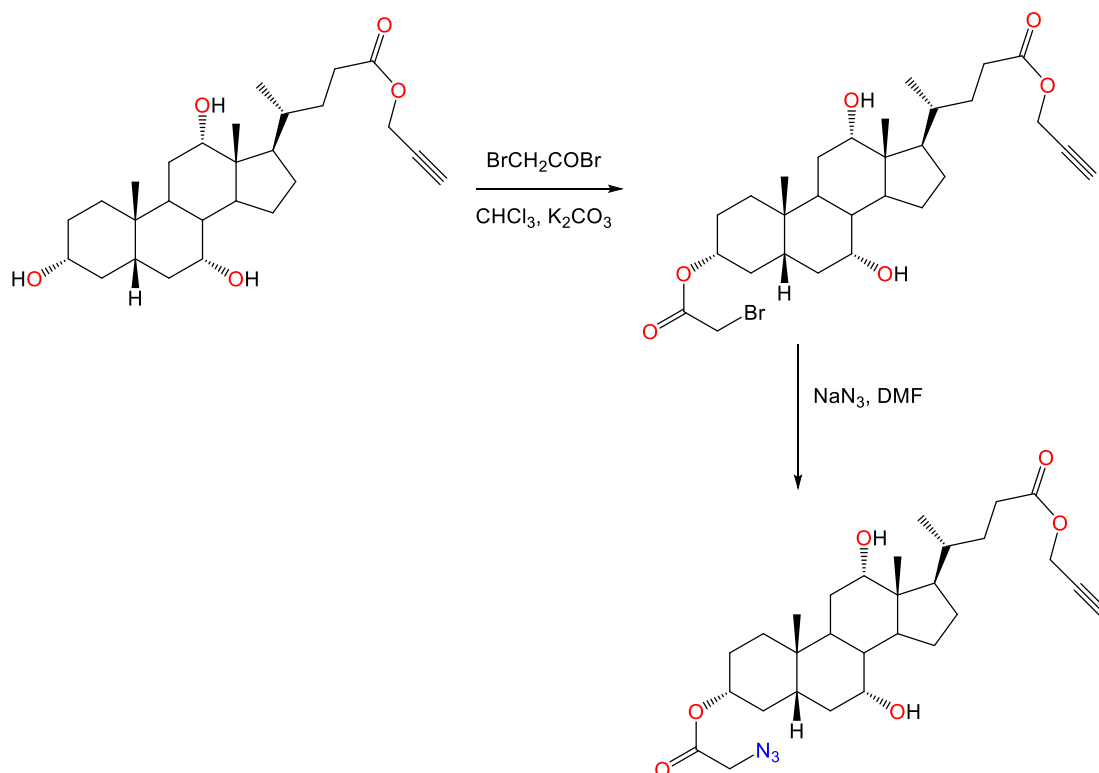
Schemat 46. Wprowadzenie grupy azydkowej do łańcucha bocznego kwasu żółciowego.

- **Estryfikacja grupy karboksylowej z glikolem etylenowym**, mesylowanie terminalnej grupy hydroksylowej i przekształcenie w azydek (Schemat 47).



Schemat 47. Alternatywne wprowadzenie grupy azydkowej do łańcucha bocznego kwasu żółciowego.

- **Synteza halogenoacetoksy pochodnych**, w których atom halogenu ulega zastąpieniu przez anion azydkowy (Schemat 48).



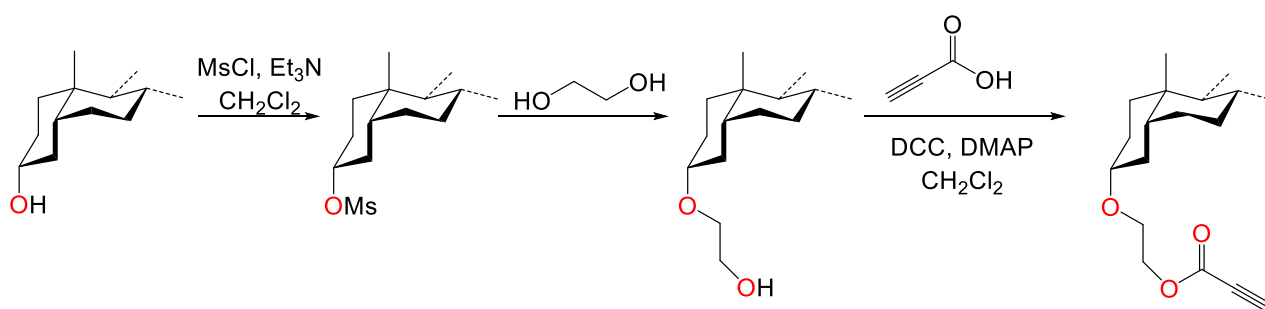
Schemat 48. Wprowadzenie grupy azydkowej do kwasu żółciowego poprzez modyfikację grup hydroksylowych.

Takie strategie umożliwiają selektywne uzyskanie azydków zarówno w pierścieniach steroidowych, jak i w łańcuchach bocznych kwasów żółciowych, przy zachowaniu kontroli nad stereochemią produktu i minimalizowaniu ryzyka powstawania produktów ubocznych.

9.2 Wprowadzanie terminalnych grup alkinowych

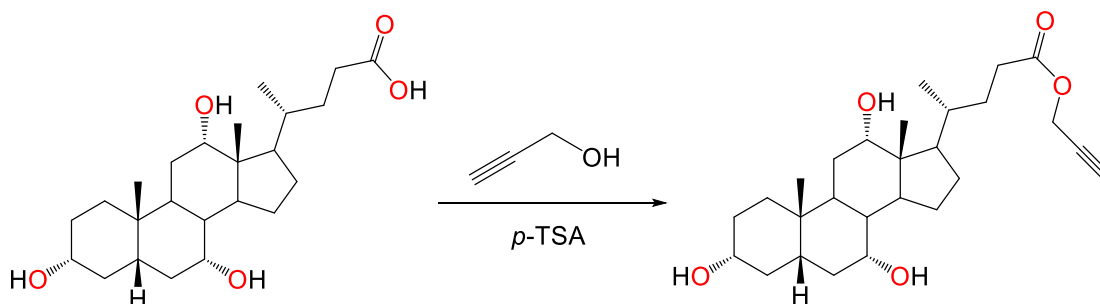
Terminalne grupy alkinowe można wprowadzać zarówno do pierścieni steroidowych, jak i do łańcuchów bocznych kwasów żółciowych. Są one kluczowymi substratami w reakcjach „click”, ponieważ zapewniają wysoką reaktywność wobec azydków, jednocześnie pozostając niemal inertnymi w warunkach biologicznych. Wybrane strategie funkcjonalizacji steroidów w terminalne grupy alkinowe to m.in.[144,145]:

- **Modyfikacja grup hydroksylowych w pierścieniach steroidowych:** grupa hydroksylowa poddawana jest mesyłowaniu, następnie reakcji z glikolem etylenowym i estryfikacji Steglicha. Sekwencja reakcji prowadzi do utworzenia terminalnej grupy alkinowej w pierścieniu steroidowym (Schemat 49).



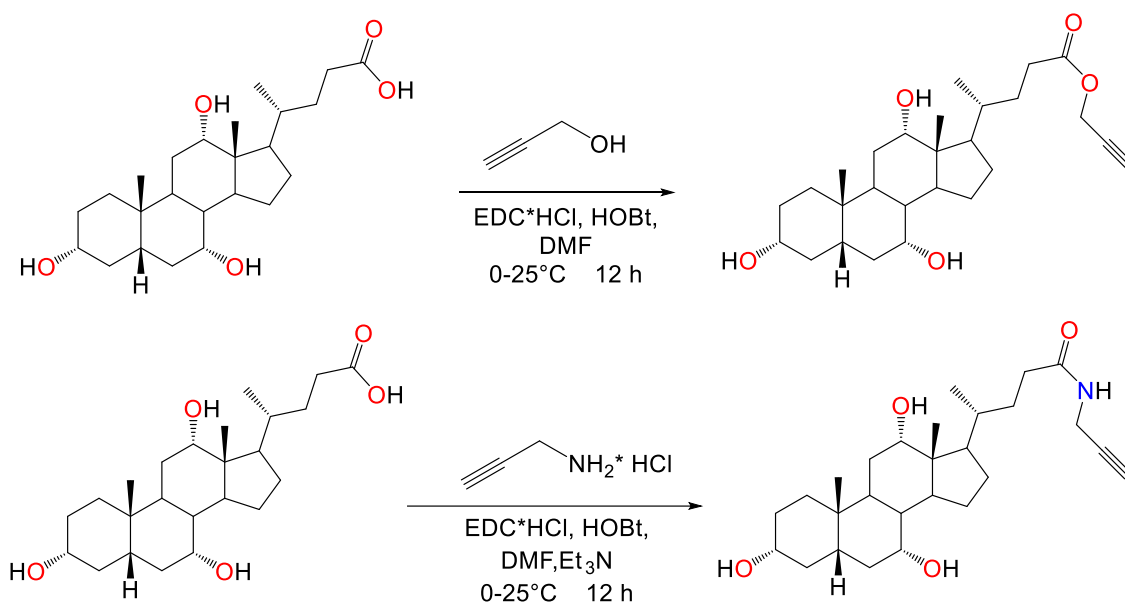
Schemat 49. Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez modyfikację grup hydroksylowych pochodnych steroidowych.

- **Modyfikacja łańcuchów bocznych kwasów żółciowych:** estryfikacja karboksylu z alkoholem propargilowym pozwala wprowadzić terminalną grupę alkinową w łańcuchu bocznym (Schemat 50). Mechanizm reakcji opiera się na aktywacji grupy karboksylowej przez katalizator, co umożliwia nukleofilowy atak alkoholu propargilowego.



Schemat 50. Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez modyfikację grupy karboksylowej łańcucha bocznego kwasu żółciowego.

- **Synteza amidów i estrów z terminalną grupą alkinową:** w reakcji z użyciem katalizatora EDC*HCl żółciowe mogą reagować z propargiloaminą, tworząc amidy z terminalną grupą alkinową, lub z alkoholem propargilowym, dając odpowiednie estry (Schemat 51). Mechanizm reakcji polega na aktywacji grupy karboksylowej przez wytworzenie *O*-acylowego pośrednika karbodiimidowego, który następnie ulega atakowi nukleofilowemu przez grupę amonową lub hydroksylową.



Schemat 51. Wprowadzenie grupy alkinowej poprzez tworzenie estrów/amidów alkinowych tańcucha bocznego kwasów żółciowych.

Dzięki tym strategiom uzyskuje się steroidy wyposażone w reaktywne grupy, które zachowują kontrolę nad stereochemią i pozwalają na dalszą syntezę pochodnych 1,2,3-triazolowych, niezbędnych w chemii „click” oraz w projektowaniu funkcjonalnych biokonjugatów.

10. Koniugaty steroidowe

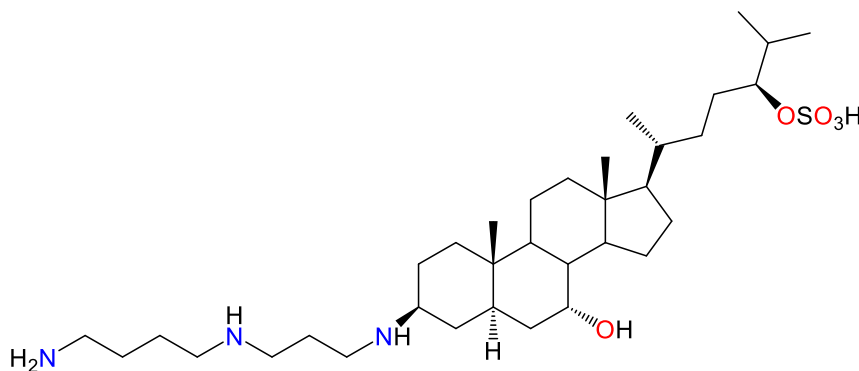
Koniugaty steroidowe to związki, w których cząsteczka steroidu jest połączona z inną cząsteczką bioaktywną. Steroidowa część może obejmować takie indywidualia chemiczne jak sterole, kwasy żółciowe lub inne pochodne steroidowe. Steroidy charakteryzują się dużą elastycznością w tworzeniu koniugatów, co umożliwia ich wykorzystanie w badaniach biologicznych i farmaceutycznych.

Przykłady sprzężeń obejmują wiązania estrowe z kwasami tłuszczowymi, które mogą działać jako proleki, przekształcane w aktywne formy steroidów [146,147]. Steroidy mogą też tworzyć wiązania amidowe lub peptydowe z białkami i peptydami, co pozwala na ich zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej jako koniugaty przeciwciało–lek lub w badaniach receptorowych [148,149].

Sprzęganie steroidów z polimerami, np. polietylenoglikolem, wydłuża czas krążenia w organizmie i zmniejsza immunogenność, poprawiając właściwości terapeutyczne i diagnostyczne [150,151]. Steroidy mogą być też łączone z lekami, np. inhibitorami enzymów lub ligandami receptorowymi, co zwiększa ich biodostępność, selektywność i stabilność [152].

Naturalne koniugaty steroidowe występujące w organizmach są stosunkowo nieliczne i obejmują głównie siarczany i glukuronidy. Choć wcześniej uważano je głównie za produkty wydalania, obecne badania pokazują, że wykazują one aktywność biologiczną, odmienną od wolnych hormonów i ich metabolitów. Steroidowe siarczany wykazują znaczną aktywność biologiczną, a glukuronidy regulują poziom aktywnych steroidów [153].

Przykładem naturalnego koniugatu jest skwalamina, będąca pierwszym odkrytym sterolo-spermidynowym koniugatem wyizolowanym z tkanek kolenia pospolitego (*Squalus acanthias*), (Rysunek 10) [154].

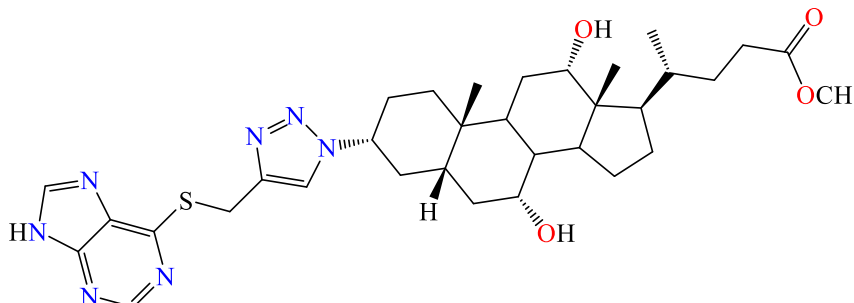


Rysunek 10. Struktura chemiczna skwalaminy.

Związek ten wykazuje silne działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe, a także potencjał w leczeniu nowotworów płuc, jajnika i mózgu, w terapii zwyrodnienia płamki żółtej oraz w kontroli masy ciała [155,156]. Badania nad analogami skwalaminy wykazały, że aktywność biologiczna wymaga trzech elementów: sztywnej jednostki hydrofobowej, elastycznego łańcucha hydrofilowego oraz polarnej grupy końcowej. Struktura poliaminy jest mniej istotna, a grupy siarczanowe można zastąpić innymi lub usunąć bez utraty aktywności.

Synteza koniugatów steroidowych obejmuje różne metody łączenia steroidów z fragmentami biologicznie aktywnymi. Najczęściej stosuje się wiązania kowalencyjne, które zapewniają trwałość i stabilność. Koniugacja może przebiegać bezpośrednio lub przez modyfikację istniejących grup funkcyjnych (głównie hydroksylowych, karboksylowych lub podwójnych wiązań). Różnice w reaktywności grup funkcyjnych wynikają ze sterycznego dostępu i stereochemii, co umożliwia selektywną modyfikację.

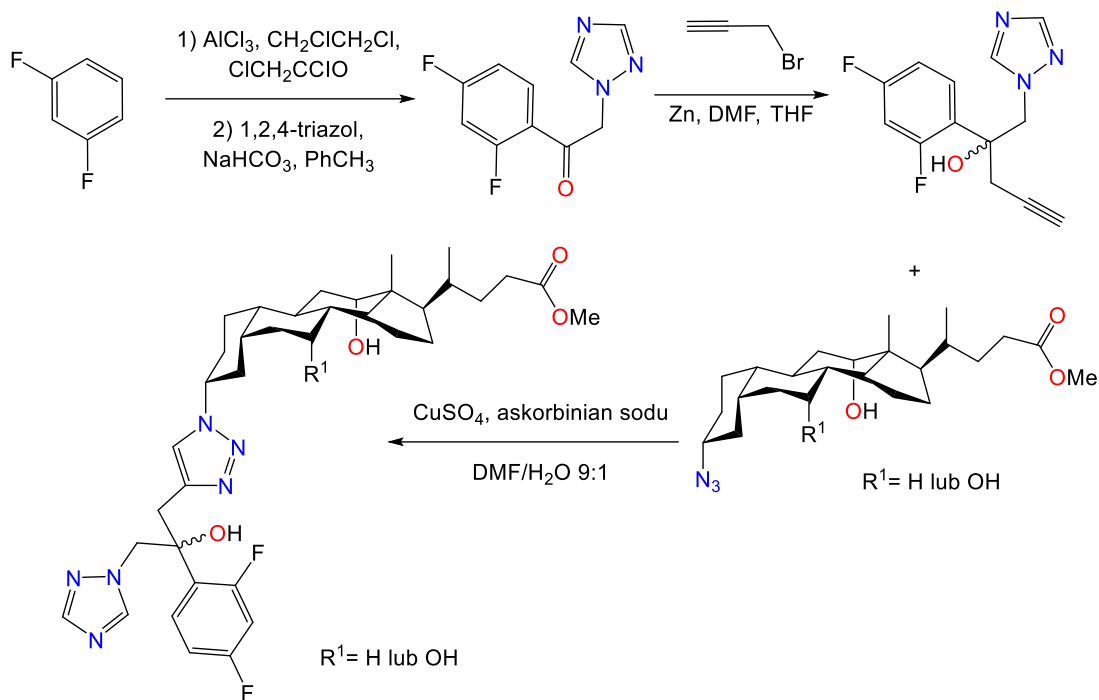
Często stosowaną metodą jest sprzężenie przez pierścień 1,2,3-triazolowy, powstający w reakcji Huisgena między terminalnym alkinem a azydkiem. Wiązanie to jest stabilne, odporne na utlenianie i hydrolizę oraz nie występuje w naturze, co czyni je niewykrywalnym dla mikroorganizmów (Rysunek 11) [157].



Rysunek 11. Przykładowy koniugat steroidowy zawierający pierścień 1,2,3-triazolowy (wykazuje aktywność przeciwmalaryczną oraz przeciwleiszmaniowe).

Koniugaty steroidowe można też tworzyć z użyciem cross-linkerów, np. *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu, który łączy grupy funkcyjne steroidu i drugiego fragmentu [158]. Alternatywnie stosuje się tzw. *zero-length linking*, np. wiązanie estrowe, które pozwala na bezpośrednie sprzężenie z możliwością uwolnienia aktywnej jednostki w miejscu działania.

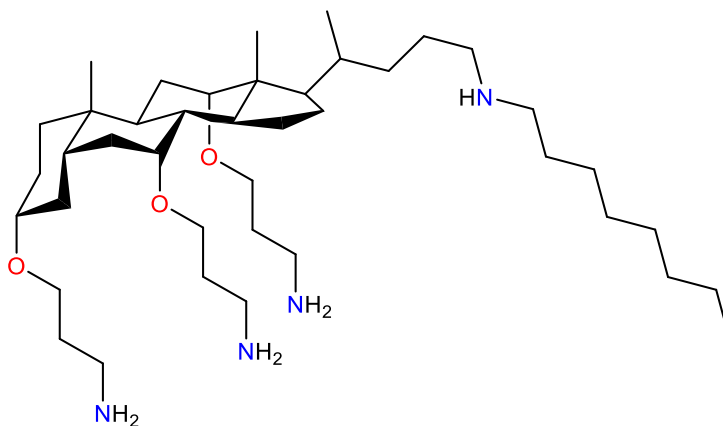
Steroidowe biokoniugaty łączą zalety steroidów takie jak lipofilność, stabilność i selektywność z właściwościami fragmentu biologicznie aktywnego. Zwiększona lipofilność ułatwia przenikanie przez błony biologiczne, a stabilność wydłuża czas działania w organizmie. Precyzyjne projektowanie pozwala kierować koniugaty do określonych receptorów lub tkanek, zmniejszając efekty uboczne i zwiększając skuteczność terapeutyczną.



Schemat 52. Synteza koniugatu kwasu żółciowego i flukonazolu.

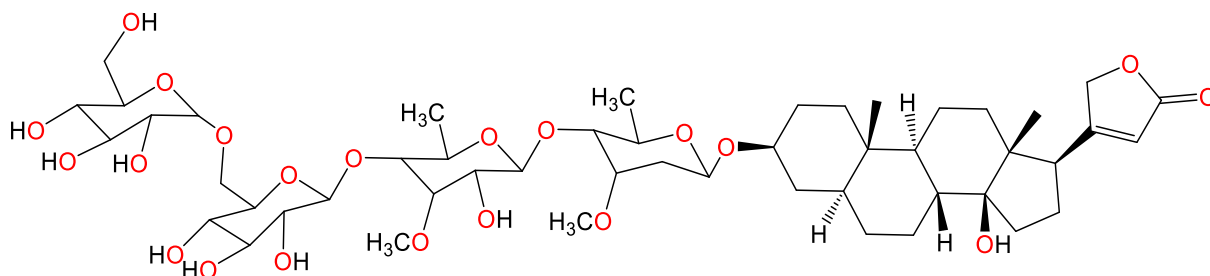
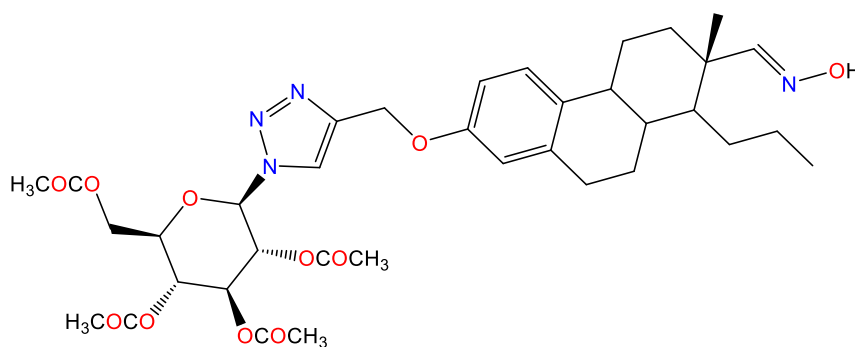
Jednym z najciekawszych przykładów są koniugaty steroidowe w leczeniu zakażeń grzybiczych. Sprzęganie leków przeciwgrzybiczych, takich jak flukonazol, z kwasami żółciowymi poprzez stabilny pierścień 1,2,3-triazolowy umożliwia ich synergiczne działanie. Kwas żółciowy pełni tu funkcję nośnika, wspomagając transport cząsteczki leku do komórki grzyba, a flukonazol działa jako inhibitor enzymu 14α -demetylasy, niezbędnego do syntezy ergosterolu w błonie komórkowej grzybów. Takie koniugaty wykazują wysoką skuteczność wobec *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* i *Candida parapsilosis* (Schemat 52) [159].

Kolejnym przykładem są steroidowe antybiotyki kationowe, zaprojektowane na wzór polimyksyny B. PMB działa poprzez wiązanie z lipopolisacharydem w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, zmieniając jej przepuszczalność. Steroidowe koniugaty zostały tak zaprojektowane, aby imitować powierzchniową amfifilowość PMB. Część steroidowa nadaje sztywność hydrofobową, a fragment poliaminowy wprowadza interakcje elektrostatyczne. Dzięki temu nowe cząsteczki wykazują działanie bakteriobójcze porównywalne lub przewyższające PMB i umożliwiają badanie selektywności wobec komórek bakteryjnych w modelach fluorescencyjnych. (Rysunek 12) [160-164].



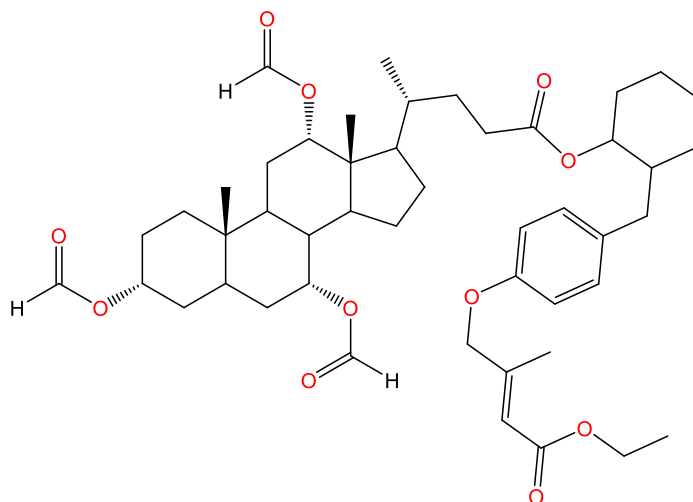
Rysunek 12. Struktura koniugatu steroidowego naśladowującego polimiksynę B.

Inne przykłady zastosowań steroidowych koniugatów obejmują m.in. glikozydy steroidowe i saponiny, które wykazują aktywność przeciwnowotworową (Rysunki 13 i 14) [165-168].

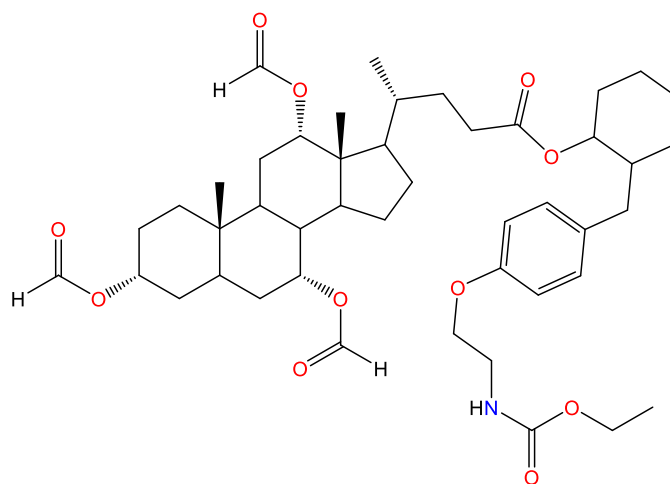
Rysunek 13. Struktura ekstensumizydu A wyizolowanego z *Myriopterion extensum*.

Rysunek 14. Koniugat steroidowo-monosacharydowy z linkerem 1,2,3-triazolowym.

Steroidowe koniugaty z hormonami owadzimi, jak juwenoidy, znalazły zastosowanie w badaniach agrochemicznych, wpływając na rozwój larw (Rysunki 15 i 16) [169-173].

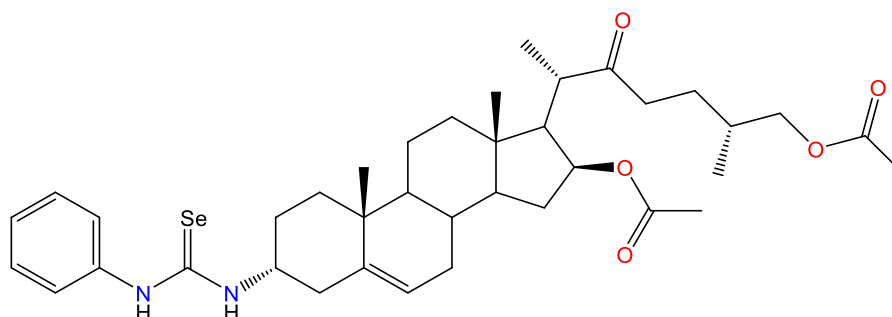


Rysunek 15. Koniugat steroidowo-juwenoidowy.



Rysunek 16. Koniugat kwasu cholowego z zmodyfikowaną pochodną karbaminianu.

Hybrydy steroidowe z diosgeniną i jej pochodnymi wykazują zarówno działanie antyproliferacyjne, jak i antyoksydacyjne, oferując potencjał w terapii przeciwnowotworowej (Rysunek 17) [174].



Rysunek 17. Koniugat steroidowy pochodnej selenomocznika.

Steroidowe koniugaty i dimerowe układy pozwalają modulować aktywność biologiczną poprzez jednoczesną modyfikację części steroidowej i fragmentu sprzężonego. Takie podejście umożliwia projektowanie molekuł o zwiększonej stabilności, selektywności wobec receptorów i poprawionej skuteczności terapeutycznej. Czyni to obiecującą strategią w nowoczesnym projektowaniu leków.

Sekcja badawcza

Współczesna chemia bioorganiczna i medyczna koncentruje się na racjonalnym projektowaniu cząsteczek o złożonym profilu biologicznym oraz precyzyjnie modulowanej aktywności farmakologicznej. W tym kontekście rosnące zainteresowanie budzą koniugaty steroidowe, w których sztywny i bioaktywny szkielet steroidowy łączony jest z innymi bioaktywnymi cząsteczkami przy użyciu reakcji chemii „click”, zapewniających wysoką selektywność i wydajność syntezy.

Część eksperymentalna niniejszej pracy opiera się na wcześniejszych wynikach dotyczących syntezy i charakterystyki pochodnych kwasów żółciowych i steroli, stanowiących podstawę do dalszych badań nad nowymi koniugatami steroidowymi. Moje dotychczasowe badania w tym obszarze zaowocowały sześcioma publikacjami naukowymi [P1–P6]. W pracach [P2–P6] jestem pierwszym autorem, a w artykułach [P3, P4, P6] pełniłem również rolę autora korespondencyjnego.

W literaturze podkreśla się znaczenie chemicznych modyfikacji szkieletu steroidowego, które pozwalają na uzyskanie związków o zmienionej aktywności biologicznej, lepszej biodostępności oraz mniejszej toksyczności. Doniesienia naukowe wskazują, że wprowadzenie pierścienia 1,2,3-triazolowego sprzyja poprawie stabilności i funkcjonalizacji cząsteczki, a także umożliwia kontrolę jej konformacji. Wiele z takich pochodnych wykazuje aktywność przeciwnowotworową, przeciwgrzybiczą i przeciwdrobnoustrojową, co czyni je interesującym kierunkiem dalszych badań.

Na podstawie dostępnych danych literaturowych można sformułować hipotezę, że nawet subtelne modyfikacje struktury steroidu mogą prowadzić do znaczących zmian w jego profilu biologicznym. Wprowadzenie pierścienia 1,2,3-triazolowego, znanego z aktywności przeciwdrobnoustrojowej i nieobecnego w związkach naturalnych, stanowi obiecującą strategię zwiększenia potencjału biologicznego otrzymywanych pochodnych. W niniejszej pracy zaprojektowałem serię związków różniących się charakterem podstawników w celu oceny wpływu tych modyfikacji na ich przewidywane właściwości biologiczne.

Celem pracy doktorskiej było otrzymanie i charakterystyka nowych pochodnych kwasów żółciowych, steroli oraz ich koniugatów z wykorzystaniem reakcji chemii „click” a także ocena ich właściwości fizykochemicznych oraz potencjalnej aktywności biologicznej. W szczególności zaplanowałem:

- 1) Otrzymanie estrów mrówczanowych oraz octanowych kwasów żółciowych (**130–132, 145–146**);
- 2) syntezę 3 α -bromoacetoksy- i 3 α -azydoacetoksy-pochodnych kwasów żółciowych oraz wybranych steroli (**122–123, 133–135, 151–152**);
- 3) syntezę pochodnych propargilowych estrów kwasów żółciowych oraz steroli (**119–121, 147–150**);
- 4) otrzymanie koniugatów steroidowych połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym;
 - a. koniugatów typu sterol-kwas żółciowy (**124–129, 161–164**);

b. koniugatów „dimerycznych” pochodnych kwasów żółciowych (**136–144, 152–160**);

- 5) przeprowadzenie pełnej charakterystyki spektroskopowej otrzymanych związków;
- 6) wykonanie obliczeń semiempirycznych metodą PM5;
- 7) ocenę przewidywanej aktywności biologicznej metodą *in silico* (PASS) oraz analizę potencjalnych oddziaływań ligand–białko z wykorzystaniem dokowania molekularnego;
- 8) przeprowadzenie w wybranych przypadkach badań biologicznych otrzymanych związków.

Przeprowadzone badania dały wgląd w pogłębioną charakterystykę nowych biokoniugatów steroidowych zawierających pierścień triazolowy oraz ocenę ich potencjału aplikacyjnego w kontekście zastosowań terapeutycznych. Zaproponowane podejście syntetyczne stanowi podstawę do dalszego projektowania związków o modulowanej aktywności biologicznej i zwiększonej selektywności działania.

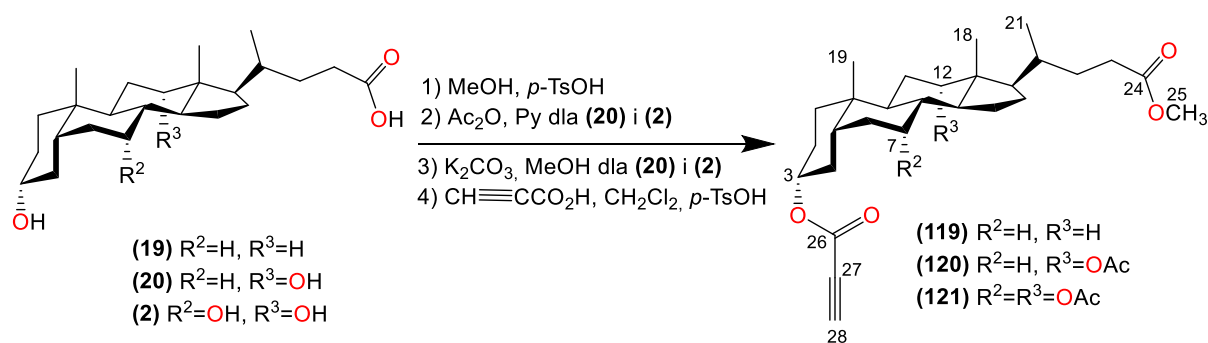
1. Koniugaty steroli i octanowych pochodnych kwasów żółciowych [P2]

Jednym z głównych wyzwań współczesnej chemii organicznej jest projektowanie i synteza nowych związków o potencjalnym znaczeniu biologicznym i terapeutycznym. Szczególne miejsce zajmują tu steroidy, które dzięki swojej różnorodności strukturalnej i zdolności do interakcji z układami biologicznymi stanowią cenne związki wyjściowe do dalszych modyfikacji. W ostatnich latach można zauważyć stały wzrost zainteresowania zastosowaniem chemii „click” jako uniwersalnego narzędzia umożliwiającego tworzenie koniugatów w sposób wydajny i selektywny.

W ramach mojej pracy doktorskiej przeprowadziłem syntezę nowych koniugatów steroidowych połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym. Otrzymane związki zostały poddane szczegółowej charakterystyce przy użyciu metod spektroskopowych i spektrometrycznych oraz zweryfikowane obliczeniami teoretycznymi. Dodatkowo oceniłem ich potencjalną aktywność biologiczną z wykorzystaniem metod *in silico* oraz testów *in vitro*. Tak zaplanowane badania pozwoliły na ocenę zarówno właściwości strukturalnych, jak i bioaktywności uzyskanych związków.

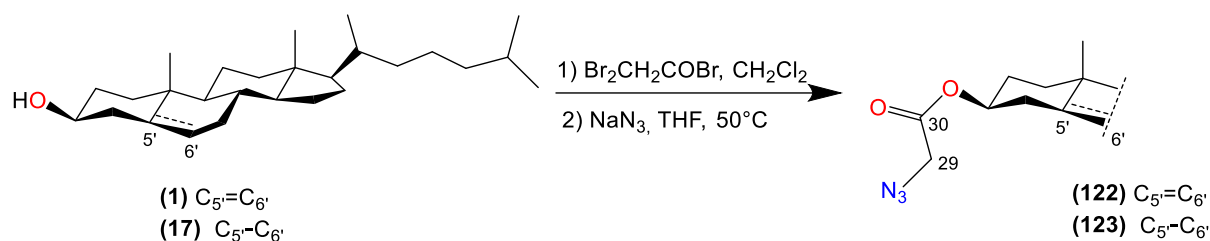
1.1 Synteza nowych koniugatów steroli i pochodnych kwasów żółciowych

W pierwszym etapie badań opracowałem warunki syntezy estrów propiolowych wybranych pochodnych kwasów żółciowych. Estry kwasu litocholowego, deoksycholowego i cholowego poddałem reakcji z kwasem propiolowym w obecności katalitycznych ilości *p*-TsOH w dichlorometanie (Schemat 53). Reakcję prowadziłem w temperaturze pokojowej przez 24 h. Uzyskane produkty poddałem oczyszczaniu metodą chromatografii kolumnowej, otrzymując kolejno związki (119), (120) i (121) z wydajnościami 45%, 57% i 30%.



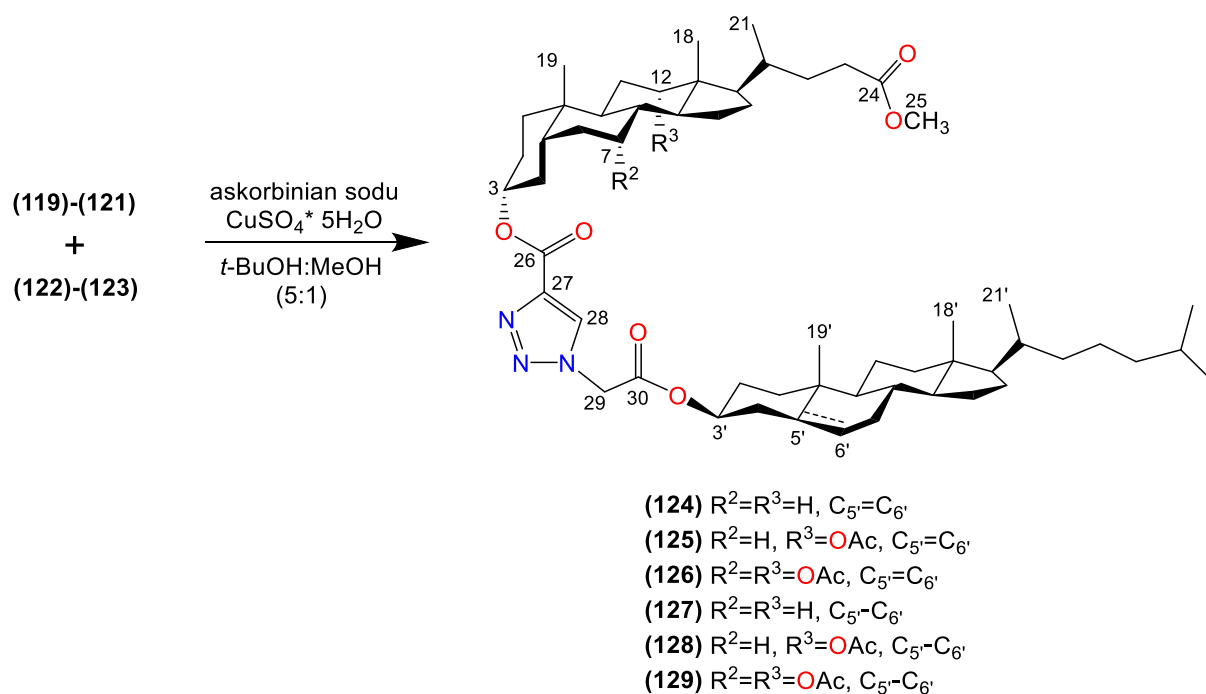
Schemat 53. Synteza propiolowych pochodnych estrów kwasów żółciowych.

Cholesterol (1) i 5 α -cholestan-3 β -ol (17) poddałem reakcji z bromkiem kwasu bromooctowego w bezwodnym dichlorometanie (Schemat 54). Następnie związki te poddałem reakcji substytucji nukleofilowej z azydkiem sodu w THF w temperaturze 50 °C przez 4 h. otrzymując związki (122) i (123) z bardzo dobrymi wydajnościami odpowiednio 95% i 88%.



Schemat 54. Synteza azydkowych pochodnych steroli.

Otrzymane wcześniej estry propiolowe kwasów żółciowych (**119–121**) oraz azydooctanowe pochodne steroli (**122–123**) wykorzystałem jako substraty w reakcji cykloaddykcji Huisgena (Schemat 55). Reakcję prowadziłem w mieszaninie *t*-BuOH/MeOH (5:1) w obecności katalitycznych ilości CuSO₄·5H₂O oraz askorbinianu sodu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewałem w temperaturze 60°C przez 8 h.



Schemat 55. Synteza koniugatów steroidowych kwasów żółciowych i steroli poprzez wykorzystanie reakcji Huisgena.

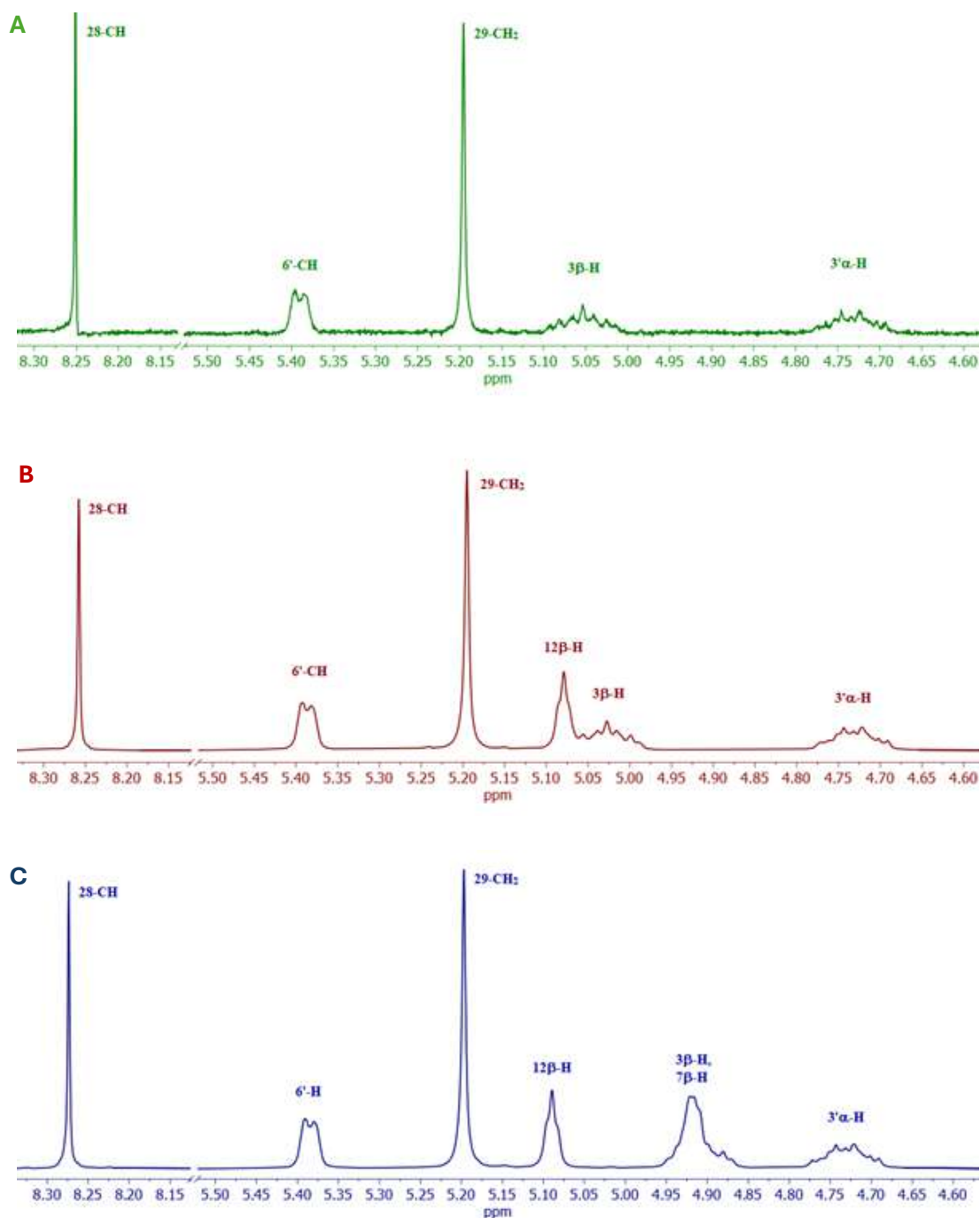
Po oczyszczeniu otrzymałem sześć nowych koniugatów steroidowych (**124–129**) z wydajnościami 35% (**124**), 68% (**125**), 60% (**126**), 92% (**127**), 82% (**128**) i 81% (**129**).

1.2 Analiza spektroskopowa otrzymanych związków

W widmach protonowych magnetycznego rezonansu jądrowego substratów (**122**) i (**123**) zaobserwowałem obecność singletów w zakresie 0,92–0,72 ppm oraz dubletu przy 0,81–0,80 ppm, odpowiadających protonom grup metylowym 18–CH₃, 19–CH₃ oraz 21–CH₃. Dodatkowo sygnały protonów grup acetylowych 7 α -OAc i 12 α -OAc przypisałem wartościom 2,15 i 2,09–2,11 ppm.

Charakterystyczny singlet pochodzący od protonu grupy $\equiv\text{C-H}$ zaobserwano w zakresie 2,91–2,89 ppm.

W przypadku widm ^1H NMR koniugatów steroidowych (**123–128**) zidentyfikowałem charakterystyczne sygnały pochodzące od protonów pierścienia 1,2,3-triazolowego (Rysunki 18). Singlet pochodzący od protonu usytuowanego przy grupie 28-CH pojawiał się w zakresie 8,27–8,24 ppm, natomiast sygnały protonów grup metylenowych 29-CH₂, bezpośrednio związanych z triazolem, widoczne były w zakresie 5,20–5,17 ppm.



Rysunek 18. Widma ^1H NMR w zakresie 4,60–8,30 ppm związków: A (**124**), B (**125**), C (**126**).

Dla związków (**123–128**) widoczne były analogiczne przesunięcia protonów grup metylowych w zakresie 0,95–0,64 ppm oraz sygnały dla protonów grup 26'–CH₃ i 27'–CH₃ przy 0,87–0,86 ppm. Charakterystyczne multiplety dla protonów 3β–H rdzenia steroidowego pojawiały się w zakresie 5,10–4,86 ppm. Dodatkowo w koniugatach (**126**) i (**129**) zaobserwowano sygnały protonów 7β–H (4,96–4,88 ppm) oraz 12β–H (5,09 ppm), podczas gdy w koniugatach (**125**) i (**128**) sygnał 12β–H występował przy 5,08 ppm.

Analiza widm ¹³C NMR otrzymanych przez mnie substratów (**122–123**) oraz koniugatów (**124–129**) potwierdziła obecność charakterystycznych sygnałów odpowiadających atomom węgla grup metylowych 18–CH₃, 19–CH₃ i 21–CH₃, które obserwowałem w zakresie 22,98–12,02 ppm. Położenie tych sygnałów pozostaje zgodne z wartościami typowymi dla niezmodyfikowanego szkieletu steroidowego, co wskazuje, że przeprowadzona modyfikacja nie wpływała znacząco na środowisko elektronowe tych fragmentów cząsteczki. W badanych związkach zaobserwowałem również wyraźne sygnały w obszarze 174,78–174,51 ppm, które przypisałem atomom węgla grup karbonylowych C(24)=O. Dodatkowo, sygnały pojawiające się w zakresie 170,87–170,65 ppm odpowiadały atomom węgla grup acylowych 7α–OCO oraz 12α–OCO, co potwierdza zachowanie struktury pochodnych octanowych po przeprowadzonych reakcjach.

Diagnostyczne sygnały charakterystyczne dla atomów pierścienia 1,2,3-triazolowego występowały w przedziałach 141,11–138,75 ppm dla atomu węgla C(27) oraz 129,22–128,84 ppm dla atomu C(28). Obecność tych przesunięć jednoznacznie potwierdzała powstanie pierścienia triazolowego w wyniku reakcji typu „click”, a ich wartości były zbliżone do tych opisywanych w literaturze dla analogicznych koniugatów steroidowych zawierających ugrupowanie 1,2,3-triazolu.

W widmach FT–IR substratów (**122–123**) zaobserwowałem charakterystyczne pasma w zakresie 3292–3251 cm⁻¹, przypisane drganiom grup ≡C–H. Silne pasma odpowiadające drganiom ν(C=O) występowały w zakresie 1737–1734 cm⁻¹, natomiast sygnały ν(C–O) przy 1247–1246 cm⁻¹. W widmach koniugatów (**124–129**) zidentyfikowałem dwa dominujące pasma: w zakresie 1743–1721 cm⁻¹ dla drgań karbonylowych oraz w zakresie 1261–1213 cm⁻¹ dla drgań ν(C–O). Dodatkowo w rejonie 2962–2852 cm⁻¹ widoczne były charakterystyczne pasma odpowiadające drganiom grup C–H w szkielecie steroidowym. Zanik pasm właściwych dla ugrupowań propargilowych i azydkowych (2106–2111 cm⁻¹) potwierdził przebieg reakcji cykloaddycji „click”.

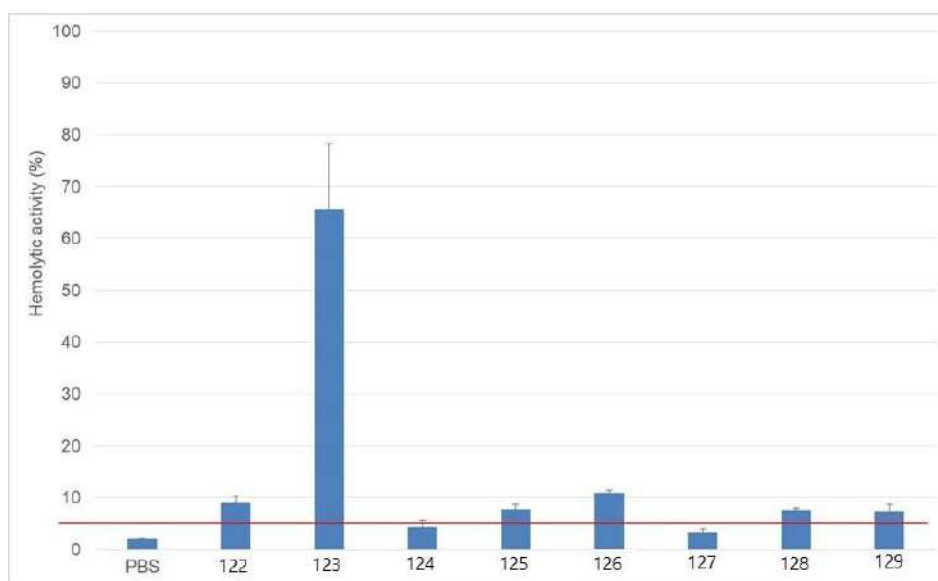
Analiza widm spektrometrii masowej w technice ESI–MS potwierdziła masy cząsteczkowe wszystkich otrzymanych koniugatów (**124–129**). We wszystkich przypadkach obserwowałem dominujące sygnały odpowiadające jonom [M+Na]⁺ (100%), zgodne z wartościami teoretycznie obliczonymi. Dodatkowo, w widmach odnotowałem słabsze sygnały odpowiadające jonom [M+K]⁺

(5-10%). Uzyskane dane jednoznacznie potwierdziły strukturę zsyntetyzowanych biokoniugatów steroidowych.

1.3 Analiza hemolityczna *in vitro*

Kwasów żółciowych i ich pochodnych nie można rozpatrywać w kontekście zastosowań biomedycznych bez wcześniejszej oceny ich wpływu na integralność błon komórkowych. Z uwagi na ich amfifilowy charakter mogą one, w zależności od stężenia, działać stabilizująco na błonę lipidową erytrocytów lub powodować jej destabilizację i hemolizę. Dlatego przeprowadziłem badania cytotoksyczności *in vitro* z użyciem ludzkich erytrocytów jako modelu komórkowego.

Stwierdziłem, że substraty propiolowe różniły się istotnie aktywnością hemolityczną (Rysunek 19). Związek (**123**) wykazywał najwyższy stopień hemolizy (66%), podczas gdy związek (**122**) działał siedmiokrotnie słabiej (9%). W przypadku otrzymanych dimerów steroidowych (**124–129**) aktywność hemolityczna była znacznie niższa. Dwa związki, (**124**) i (**127**), nie powodowały hemolizy w badanym zakresie stężeń (odpowiednio 4% i 3%), natomiast pozostałe charakteryzowały się niską aktywnością hemolityczną w przedziale 7–11%. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że zastosowanie połączenia triazolowego między kwasem żółciowym i steroidem zmniejsza toksyczność w porównaniu do wolnych substratów.



Rysunek 19. Aktywność hemolityczna badanych związków (0,1 mg/ml) po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C. Stopień hemolizy powyżej 5% wskazuje na aktywność związków zakłócającą błonę komórkową. Czerwona linia oznacza próg hemolizy równy 5%. Przedstawiono wartości średnie \pm SD (n = 9). PBS – kontrola ujemna, brak hemolizy.

Zaobserwowane zmniejszenie aktywności hemolitycznej dimerów (**124–129**) można wyjaśnić ich większą masą i bardziej sztywną konformacją, co prawdopodobnie ogranicza zdolność tych cząsteczek do penetracji i zakłócania dwuwarstwy lipidowej erytrocytów. Dodatkowo, w przypadku

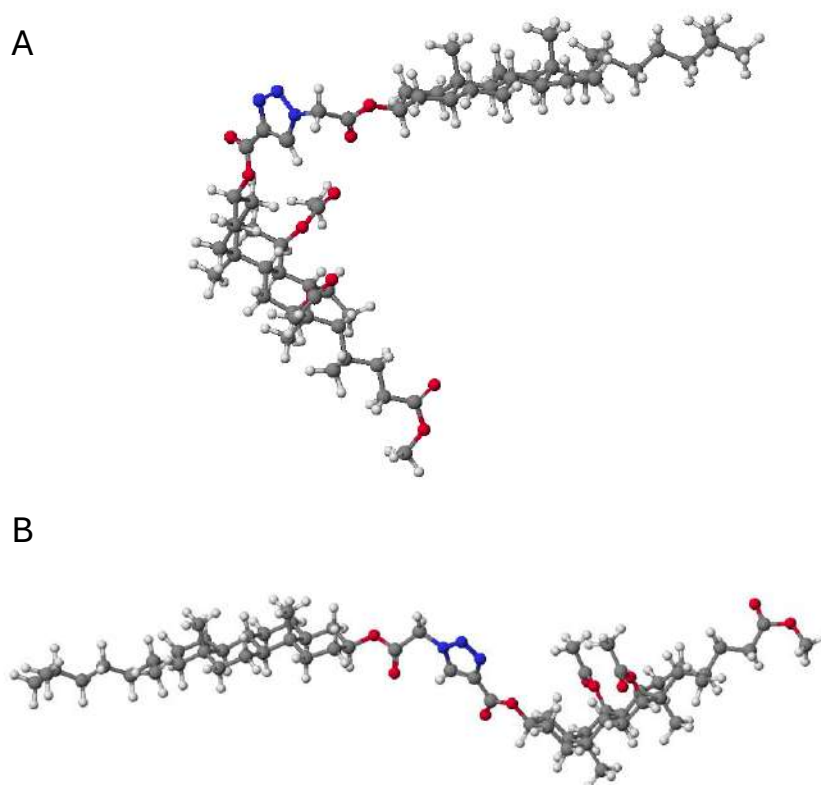
badanych substratów, posiadana przez nie grupa azydkowa może sama w sobie przyczyniać się do podwyższonej toksyczności. Jej przekształcenie w pierścień triazolowy eliminuje ten efekt. Powstały łącznik triazolowy, utworzony w wyniku reakcji azydku z wiązaniem potrójnym, jest chemicznie stabilny i nie wykazuje właściwości hemolitycznych, co dodatkowo tłumaczy obserwowany spadek toksyczności koniugatów względem wolnych substratów.

Otrzymane wyniki wskazują, że modyfikacja oparta na tworzeniu łącznika triazolowego istotnie poprawia profil bezpieczeństwa otrzymanych pochodnych, co czyni tę strategię obiecującym kierunkiem w projektowaniu nowych związków o potencjalnych zastosowaniach biomedycznych.

1.4 Obliczenia semiempiryczne PM5

Metoda PM5 jest półempirycznym podejściem wykorzystywanym w chemii kwantowej, umożliwiającym szybkie i efektywne modelowanie struktur molekularnych oraz przewidywanie ich właściwości chemicznych. Opiera się na uproszczonym równaniu Schrödingera, które jest uzupełnione o parametry empiryczne wprowadzone na podstawie danych eksperymentalnych oraz dokładnych obliczeń *ab initio*. Dzięki temu metoda PM5 pozwala na względnie szybkie szacowanie geometrii molekuł, energii oraz właściwości elektronowych, co czyni ją przydatną w wstępnej ocenie związków chemicznych przed bardziej czasochłonnymi obliczeniami wysokiej dokładności.

W celu określenia stabilności energetycznej oraz możliwych oddziaływań intramolekularnych zsyntezowanych koniugatów przeprowadziłem obliczenia półempiryczne metodą PM5. Geometrie zoptymalizowanych cząsteczek (**123–129**) posłużyły następnie do analiz dokowania molekularnego. Poniżej przedstawiono konformacje *syn* oraz *anti* wybranego koniugatu (**129**) (Rysunek 20).



Rysunek 20. Modele molekularne związku (**129**): A) konformer *syn*, B) konformer *anti*.

Uzyskane wartości ciepła tworzenia (HOF) wykazały istotny wpływ liczby grup hydroksylowych i acetylowych w szkieletcie kwasów żółciowych na stabilność koniugatów. Najniższe wartości HOF zarejestrowałem dla koniugatów kwasu cholowego (**126**) i (**129**), co wskazuje na ich największą stabilność termodynamiczną (Tabela 1). Grupy acetylowe sprzyjały powstawaniu wiązań wodorowych wewnątrzcząsteczkowych oraz kompleksów typu gość–gospodarz, co dodatkowo stabilizowało układ. Analiza konformerów *syn* i *anti* wykazała, że w przypadku koniugatów kwasów deoksycholowego i cholowego (**125–126**, **128–129**) bardziej trwałe są formy *anti*. Odmiennie zachowywały się koniugaty kwasu lithocholowego (**124**, **127**), gdzie stabilniejszym układem były formy *syn*, co wynika z mniejszej objętości cząsteczki i braku oddziaływań donorowo–akceptorowych.

Zaobserwowana większa stabilność konformeru *syn* wynika najpewniej z jego zgiętej geometrii, która zbliża do siebie fragmenty steroidowe i grupy acetylowe w sąsiedztwie pierścienia triazolowego, umożliwiając tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych oraz korzystnych oddziaływań van der Waalsa i kompleksów typu gość–gospodarz. Konformer *anti*, o wydłużonej konformacji, ogranicza naprężenia steryczne i wzajemne oddziaływania fragmentów, traci opisywane wewnętrzne stabilizacje, co przekłada się na wyższe (mniej ujemne) wartości HOF. Dodatkowo obserwowany trend obniżania HOF wraz ze wzrostem liczby grup acetylowych wskazuje, że reakcja estryfikacji sprzyja stabilizacji koniugatów poprzez zwiększenie możliwości tworzenia oddziaływań donor–akceptor oraz

wewnętrznych wiązań wodorowych. Te zależności są zgodne z przedstawionymi konformerami (Rys. 22–23) oraz wartościami HOF zamieszczonymi w Tabeli 1.

Tabela 1. Ciepła tworzenia (HOF) [kcal/mol] kwasów żółciowych (2, 19–20), steroli (1, 17) i koniugatów (124–129).

Związek	HOF	HOF _{syn}	HOF _{anti}	ΔHOF ₁	ΔHOF ₂	ΔHOF ₃	ΔHOF ₄
2	-229,2756	–	–	–	–	–	–
19	-266,8560	–	–	–	–	–	–
20	-309,8662	–	–	–	–	–	–
1	-145,2016	–	–	–	–	–	–
17	-167,9130	–	–	–	–	–	–
124	–	-363,8662	-363,7903	-134,5906	-134,5147	-218,6646	-218,5887
125	–	-444,3851	-450,1979	-177,5291	-183,3419	-299,1835	-304,9963
126	–	-522,4936	-535,3569	-212,6274	-225,4907	-377,2920	-390,1553
127	–	-386,8430	-386,5739	-157,5674	-157,2983	-218,9300	-218,6609
128	–	-467,3787	-472,9543	-200,5227	-206,0983	-299,4657	-305,0413
129	–	-545,5568	-558,0889	-235,6906	-248,2227	-377,6438	-390,1769

$$\Delta\text{HOF}_1 = \text{HOF}_{\text{koniugatów anti (124–129)}} - \text{HOF}_{\text{kwasów żółciowych (2, 19–20)}}$$

$$\Delta\text{HOF}_2 = \text{HOF}_{\text{koniugatów anti (124–129)}} - \text{HOF}_{\text{kwasów żółciowych (2, 19–20)}}$$

$$\Delta\text{HOF}_3 = \text{HOF}_{\text{koniugatów syn (124–129)}} - \text{HOF}_{\text{steroli (1, 17)}}$$

$$\Delta\text{HOF}_4 = \text{HOF}_{\text{koniugatów syn (124–129)}} - \text{HOF}_{\text{steroli (1, 17)}}$$

Otrzymane wyniki wskazują, że stabilność energetyczna biokoniugatów zależy od obecności i rozmieszczenia grup funkcyjnych, co może mieć znaczenie w projektowaniu przyszłych modyfikacji strukturalnych.

Przeprowadzone obliczenia półempiryczne dostarczyły nowych informacji o relacji między geometrią konformerów a stabilnością zsyntezowanych biokoniugatów, wskazując na istotną rolę liczby i układu grup acetylowych w modulowaniu ich energii oraz możliwych oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych.

1.5 Predykcja potencjalnej aktywności farmakologicznej (PASS)

Synteza nowych związków chemicznych oraz modyfikacja istniejących struktur wymagają oceny ich potencjalnych właściwości farmakologicznych i toksycznych. Tradycyjne badania *in vitro* i *in vivo* są jednak kosztowne i czasochłonne, dlatego coraz częściej stosuje się podejścia *in silico*.

PASS umożliwia wstępne przewidywanie aktywności biologicznej związków chemicznych na podstawie ich struktury molekularnej. Program porównuje analizowaną cząsteczkę z obszerną bazą danych, obejmującą około miliona związków biologicznie aktywnych i ponad 5500 rodzajów aktywności biologicznych. Na tej podstawie oblicza prawdopodobieństwo wystąpienia danej aktywności (PA) oraz jej braku (PI). Wysokie wartości PA (>0,7) wskazują na duże prawdopodobieństwo potwierdzenia aktywności w eksperymentach, wartości między 0,5 a 0,7 oznaczają umiarkowane prawdopodobieństwo, a PA < 0,5 – niskie. Obecność w strukturze cząsteczki elementów znanych z aktywności biologicznej zwiększa szansę na pozytywne wyniki w testach eksperymentalnych.

Program ten jest szczególnie przydatny przy analizie związków pochodzenia naturalnego lub ich metabolitów wtórnych, skracając czas potrzebny do identyfikacji potencjalnie aktywnych molekuł. Warto jednak zaznaczyć ograniczenia tej metody: PASS traktuje badaną cząsteczkę jako model „płaski”, co oznacza, że nie uwzględnia w pełni jej rzeczywistej geometrii przestrzennej. Z tego powodu przewidywania programu wymagają dalszej weryfikacji, m.in. poprzez dokowanie molekularne, które uwzględnia pełną konformację cząsteczki i jej interakcje z białkami docelowymi.

Aby oszacować potencjalne właściwości farmakologiczne koniugatów (124–129), zastosowałem program PASS, który przewiduje aktywność biologiczną na podstawie struktury molekularnej i porównania z rozległą bazą znanych związków aktywnych biologicznie. Metoda ta umożliwia szybkie wskazanie prawdopodobnych kierunków dalszych badań biologicznych.

W analizie PASS uzyskałem przewidywania, że najczęściej występującymi typami aktywności farmakologicznej dla badanych koniugatów są działania hipolipemiczne oraz antagonistyczne wobec cholesterolu (Tabela 2). Dodatkowo koniugaty (123–126) charakteryzują się przewidywaną aktywnością antyhipercholesterolemiczną, natomiast (127–129) wykazują prawdopodobne działanie inhibitorów hydrolazy acylokarnityny. Wyniki te wskazują, że zsyntezowane dimery steroidowe mogą oddziaływać na metabolizm lipidów i mieć potencjalne znaczenie w terapii zaburzeń gospodarki cholesterolowej.

Uzyskane przewidywania PASS po raz pierwszy wskazują, że otrzymane przeze mnie dimery steroidowe mogą wykazywać działania hipolipemiczne oraz antagonistyczne wobec cholesterolu, co sugeruje ich potencjał w terapii zaburzeń lipidowych. Stanowi to istotny wkład w ocenę ich możliwego znaczenia farmakologicznego.

Tabela 2. Wartości prawdopodobieństwa (PA) dla przewidywanej aktywności biologicznej biokoniugatów (124–129).

PA > 70%	Związki					
	124	125	126	127	128	129
Antagonista cholesterolu	90	85	85	76	–	–
Aktywność hipolipemiczna	84	85	90	73	75	83
Aktywność antyhipercholesterolemiczna	84	77	85	–	–	–
Stymulant Capasy 3	71	–	–	71	–	–
Leczenie chorób proliferacyjnych	–	73	77	–	–	–
Inhibitor monoooksygenazy eteru glicerylowego,	–	–	74	–	74	76
Inhibitor hydrolazy acylokarnityny	–	–	–	79	73	73

1.6 Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne jest metodą obliczeniową pozwalającą przewidzieć interakcje między małymi cząsteczkami, takimi jak potencjalne leki, a białkowymi celami. Technika ta polega na dopasowaniu ligandów do miejsc wiązania w białku w taki sposób, aby oszacować stabilność i charakter powstających kompleksów. Dzięki temu możliwe jest wstępne określenie siły oddziaływań oraz identyfikacja najbardziej obiecujących kandydatów biologicznych.

Z uwagi na niską aktywność hemolityczną oraz korzystne prognozy aktywności farmakologicznej (PASS), do badań dokowania molekularnego wybrałem koniugaty (**124**) i (**127**). Analizie poddałem ich zdolność wiązania z reduktazą HMG–CoA (HMGCR, hydroksymetyloglutarycilo koenzym A), będącą kluczowym enzymem w biosyntezie cholesterolu. Enzym ten odpowiada za konwersję HMG–CoA do mewalonianu, co stanowi etap ograniczający szybkość całego szlaku biosyntezy steroli. Z tego względu HMGCR jest klasycznym celem terapeutycznym dla statyn, najpowszechniej stosowanych leków obniżających poziom cholesterolu we krwi.

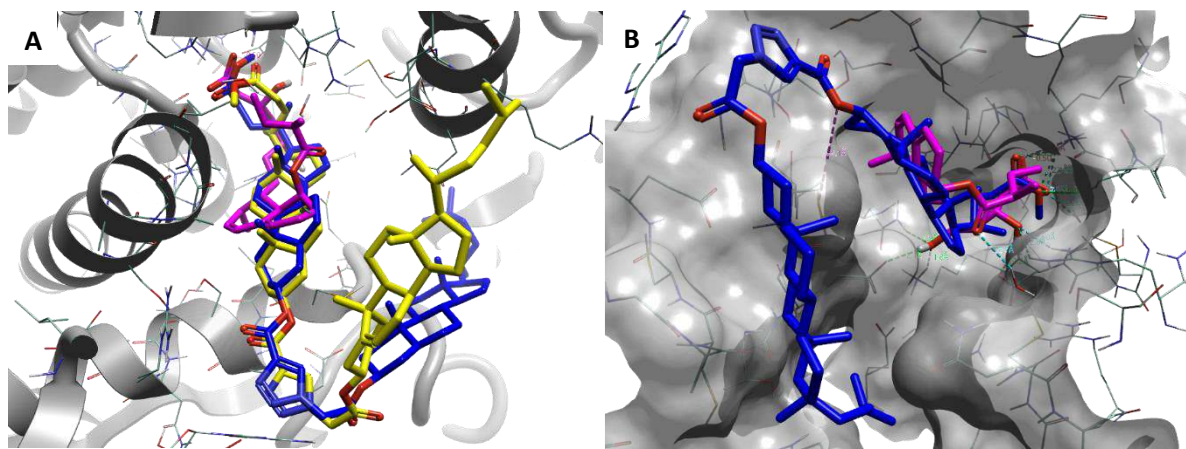
Jako ligand referencyjny wybrałem mewastatynę, pierwszy znany naturalny inhibitor HMGCR. Jej struktura i sposób wiązania w centrum aktywnym enzymu są dobrze poznane i stanowią punkt odniesienia w projektowaniu nowych statyn. W badaniach dokowania potwierdziłem, że mewastatyna lokalizuje się w charakterystycznej kieszeni aktywnej enzymu i tworzy stabilne wiązania wodorowe m.in. z resztami Glu559, Arg590, Asp690, Lys735, Ser684, Lys692, Asn755 i Lys691 (Tabela 3). Obecność tych oddziaływań uznano za kryterium porównawcze dla nowych ligandów.

Tabela 3. Obliczona energię wiązania i ważne aminokwasy biorące udział w tworzeniu wiązań wodorowych dokowaniu do miejsca aktywnego HMGCR–CoA.

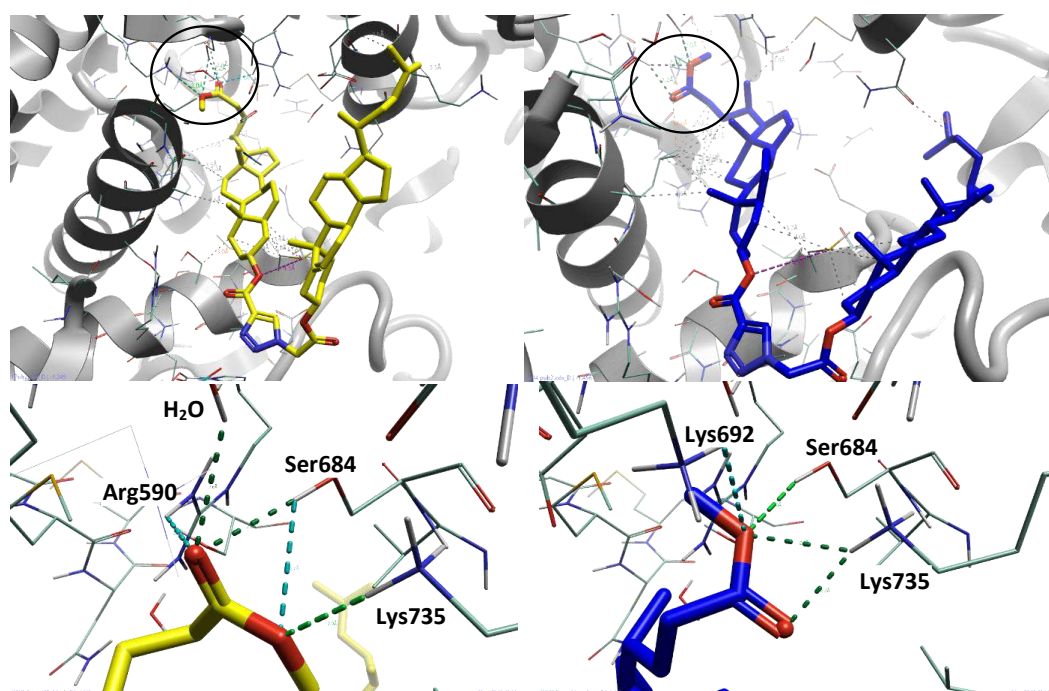
Związek	Energia wiązania [kJ/mol]	Aminokwasy tworzące wiązanie wodorowe	Długość wiązania wodorowego [Å]
124	–10,137 kJ/mol	Lys735	2,0
		Arg590	2,5
		Ser684	2,2; 2,7
127	–11,463 kJ/mol	Lys735	2,2; 2,4
		Lys692	2,8
		Ser684	2,0
Mewastatyna	–10,153 kJ/mol	–	–

Otrzymane wyniki wskazały, że koniugaty (**124**) i (**127**) wiążą się w tej samej kieszeni aktywnej co mewastatyna (Rysunek 21 oraz 22). Grupy estrowe kwasu litocholowego tworzą silne wiązania wodorowe z resztami Lys735, Ser684 oraz Arg590 (**124**) i Lys692 (**127**). Dodatkowo odnotowałem

oddziaływania elektrostatyczne z Cys561 oraz liczne kontakty hydrofobowe stabilizujące kompleks (m.in. z Leu853 i His752).



Rysunek 21. A – Naożenie związków **(124)** (żółty), **(127)** (niebieski) i mewastatyny (fioletowy). B – Powierzchnia białka z naożeniem koniugatu **(127)** i mewastatyny w jamie wiążącej.



Rysunek 22. Sposób wiązania dla związków **(124)** (żółty, po lewej) i **(127)** (niebieski, po prawej). Przerwane linie kolorowe reprezentują wiązania wodorowe z odpowiednimi aminokwasami.

Analiza energii wiązania wykazała, że koniugat **(124)** posiada wartość porównywalną z mewastatyną ($-10,1$ kJ/mol), natomiast związek **(127)** charakteryzuje się jeszcze niższą energią wiązania, co sugeruje jego silniejsze powinowactwo do HMGCR. Wyniki te wskazują, że zwłaszcza koniugat **(127)** może stanowić obiecujący punkt wyjścia w projektowaniu nowych inhibitorów biosyntezy cholesterolu o mechanizmie działania zbliżonym do naturalnych statyn.

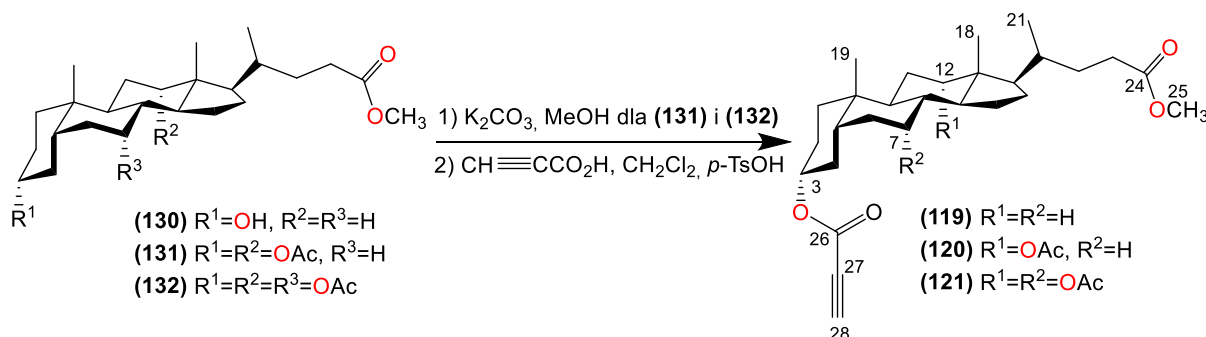
Przeprowadzona analiza dokowania molekularnego pozwoliła mi wykazać, że koniugaty **(124)** i **(127)** oddziałują z enzymem HMGCR w sposób zbliżony do naturalnych statyn, tworząc stabilne kompleksy i korzystne oddziaływania wodorowe. Obserwowane energie wiązania, w szczególności dla związku **(127)**, sugerują potencjalną przydatność otrzymanych przeze mnie związków jako struktur wiodących w projektowaniu nowych modulatorów metabolizmu cholesterolu.

2. Koniugaty dimeryczne octanowych pochodnych kwasów żółciowych [P3]

W moich poprzednich badaniach wykazałem, że połączenie steroidów przez pierścień 1,2,3-triazolowy prowadzi do istotnego obniżenia aktywności hemolitycznej. Wyniki te wskazały, że ta strategia chemiczna jest obiecującym sposobem otrzymywania nowych koniugatów steroidowych, które mogą posiadać właściwości przeciwdrobnoustrojowe i potencjalnie znaleźć zastosowanie w medycynie. Zainspirowany tymi obserwacjami, postanowiłem rozszerzyć zakres badań, syntezując serię dziewięciu nowych dimerycznych koniugatów kwasów żółciowych i oceniłem ich właściwości biologiczne oraz wydajność reakcji.

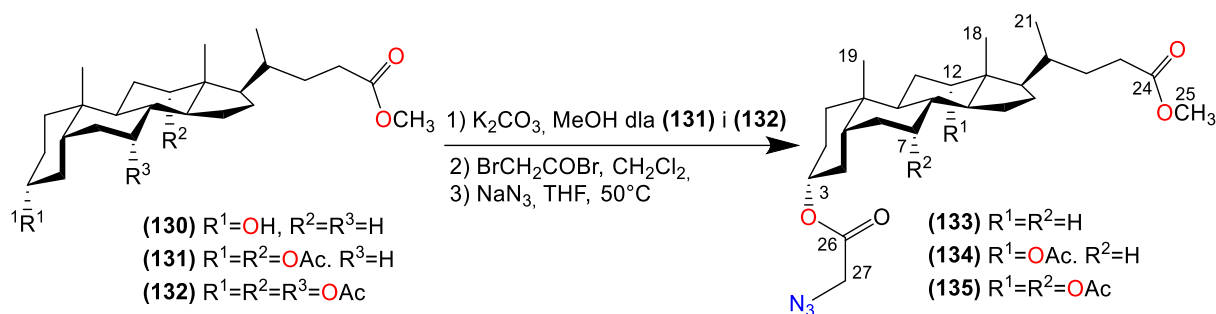
2.1 Synteza dimerycznych koniugatów acylowych pochodnych kwasów żółciowych

Pochodne estrów metylowych kwasów żółciowych (**130–132**) poddałem reakcji z kwasem propionowym w dichlorometanie w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego, otrzymując propiolowe pochodne (**119–121**) (Schemat 56). Reakcję przeprowadziłem zgodnie z procedurą opisaną wcześniej w [P1]. Proces prowadziłem przez 24 h w temperaturze pokojowej, po oczyszczeniu otrzymałem produkty z wydajnościami: 45% (**119**), 57% (**120**), 30% (**121**).



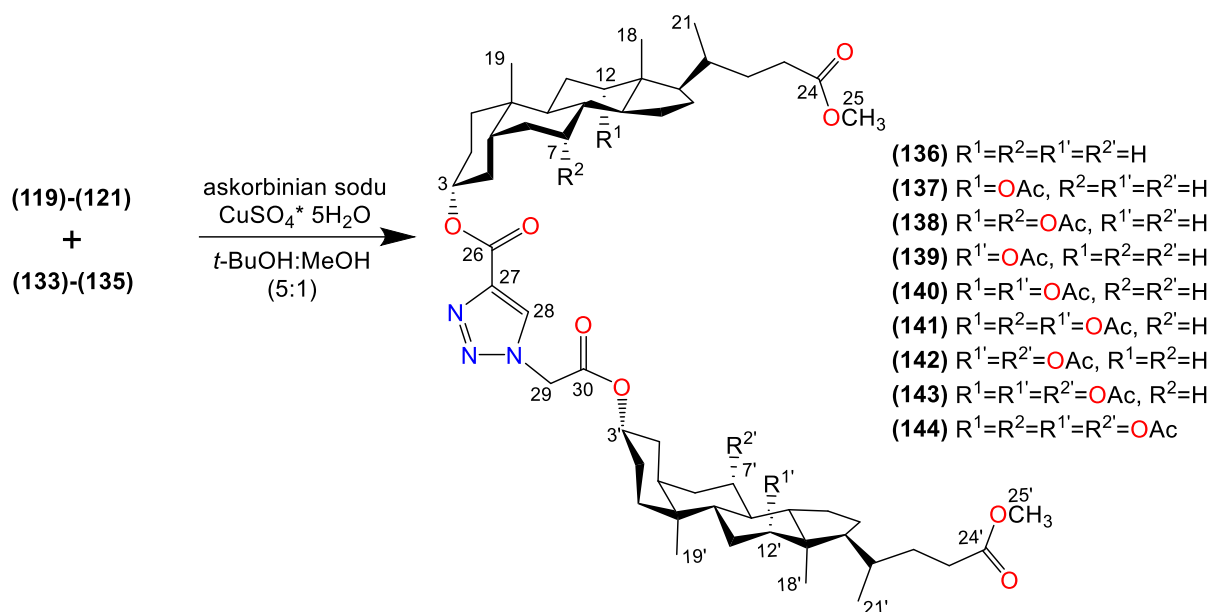
Schemat 56. Synteza octanowych pochodnych kwasów żółciowych z terminalnym ugrupowaniem alkinowym.

Aby uzyskać pochodne 3 β -bromoacetylowe niezbędne do syntezy związków (**133–135**), estry metylowe kwasów żółciowych (**130–131**) poddałem reakcji z bromkiem kwasu bromooctowego w bezwodnym dichlorometanie otrzymując serię bromoacetoksypochodnych. Następnie, w wyniku reakcji otrzymanych związków z NaN_3 w THF otrzymałem pochodne azydkowe (**133–135**) z wydajnościami: 85% (**133**), 88% (**134**), 78% (**135**) (Schemat 57).



Schemat 57. Synteza octanowych pochodnych kwasów żółciowych z grupą azydkową.

Estry propiolowe kwasów żółciowych (**119–121**) oraz pochodne azydkowe (**133–135**) zastosowałem jako substraty w reakcji Huisgena, przeprowadzonej w obecności CuSO₄·5H₂O i askorbinianu sodu w mieszaninie *t*-BuOH/MeOH (5:1) w 45 °C przez 1 h. Reakcja doprowadziła do powstania mieszaniny surowych produktów (**136–144**), które następnie oczyszczono techniką chromatografii kolumnowej. Uzyskałem dimery w następujących wydajnościach: (**136**) 80%, (**137**) 90%, (**138**) 47%, (**139**) 80%, (**140**) 60%, (**141**) 62%, (**142**) 70%, (**143**) 50%, (**144**) 67% (Schemat 58).



Schemat 58. Synteza koniugatów octanowych pochodnych kwasów żółciowych

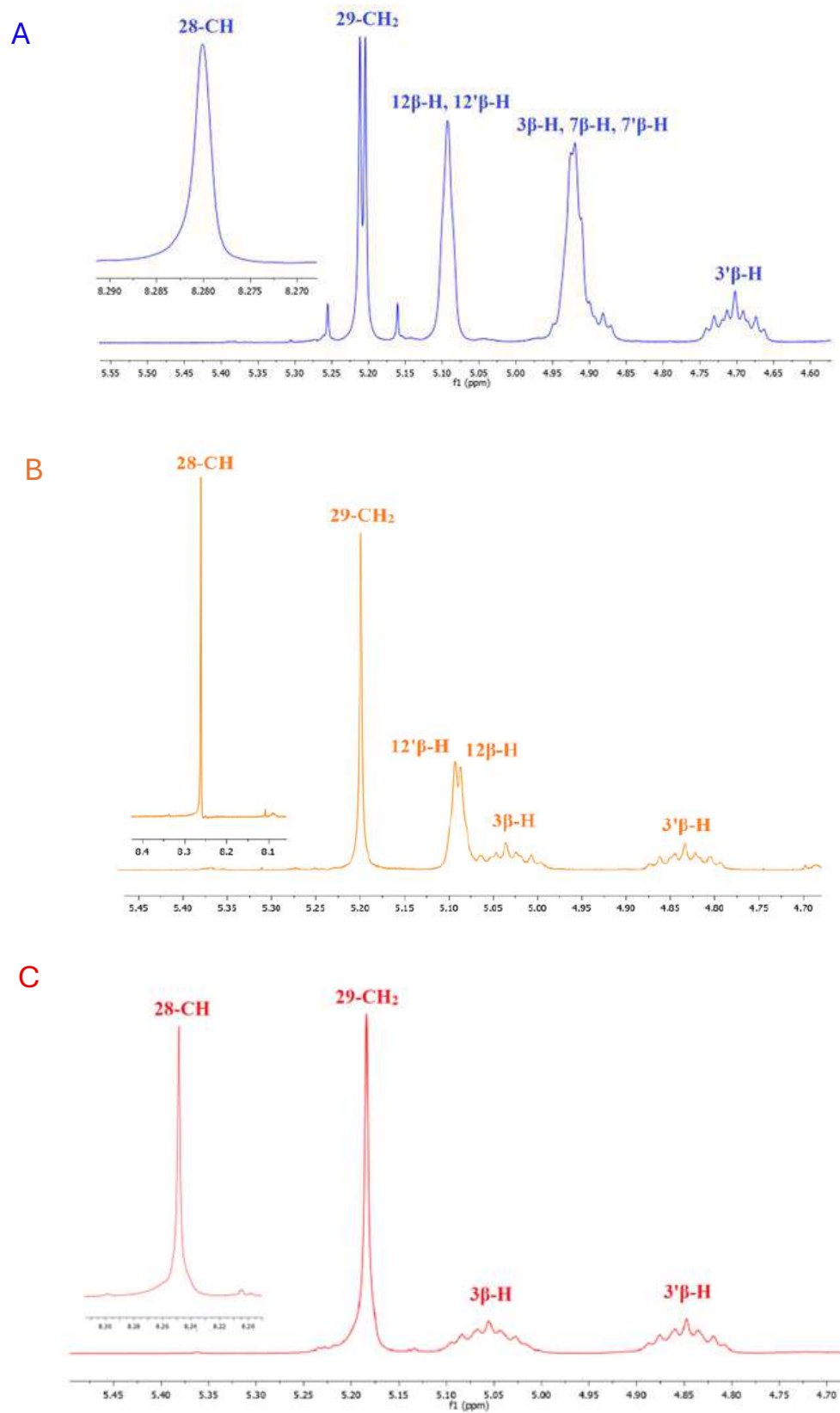
2.2 Charakterystyka spektroskopowa otrzymanych związków

W widmach ¹H NMR sygnały diagnostyczne protonów pierścienia 1,2,3-triazolowego 28–CH obserwowałem jako singlet w przedziale 8,28–8,25 ppm, a protony grupy metylenowej bezpośrednio przyłączone do triazolu 29–CH₂ w zakresie 5,21–5,18 ppm (Rysunek 23). W pochodnych azydkowych acetylowych estrów kwasu cholowego (**142–144**) sygnały od protonów metylenowych 27–CH₂

pojawiały się jako podwójny singlet w 5,21 ppm. Dla wszystkich związków widoczne były sygnały protonów $3\beta\text{-H}$ i $3\beta'\text{-H}$. Dodatkowo, w produktach pochodzących z kwasów deoksyholowego i cholowego obserwowałem sygnały pochodzące od protonów $12\beta\text{-H}/12'\beta\text{-H}$ (**137–144**) oraz $7\beta\text{-H}/7'\beta\text{-H}$ (**138, 141–144**).

Sygnały protonów $3'\beta\text{-H}$ i $3\beta\text{-H}$ w związkach (**136–141**) występowały w formie multipletów w zakresie 4,89–4,79 ppm i 5,10–4,99 ppm, zależnie od wyjściowej pochodnej. Protony $7\beta\text{-H}$ i $12\beta\text{-H}$ generowały sygnały w postaci singletów lub multipletu w zakresie 4,94–5,09 ppm w zależności od nałożenia sygnałów w danym związku. W przypadku związków (**142–144**) sygnały $3'\beta\text{-H}$ tworzyły multiplet w 4,74–4,66 ppm, natomiast protony $12\beta\text{-H}$ i $12'\beta\text{-H}$ nakładały się, dając singlet w 5,09 ppm. Sygnały protonów 25-CH_3 i $25'\text{-CH}_3$ występowały przy 3,67 ppm jako singlet lub podwójny singlet, a protony grup metylowych $12\alpha\text{-CO}_2\text{CH}_3$, $12'\alpha\text{-OCOCH}_3$, $7\alpha\text{-OCOCH}_3$ i $7'\alpha\text{-OCOCH}_3$ w zakresie 2,08–2,21 ppm. Sygnały grup 18- , 19- i 21-CH_3 oraz $18'\text{-}$, $19'\text{-}$ i $21'\text{-CH}_3$ występowały jako singlety lub „dublety” w obszarze 0,65–0,95 ppm. Nakładanie się pojedynczych rezonansów często skutkowało powstawaniem singletów o zwiększonej intensywności bądź sygnałów o charakterze dubletowym. Należy przy tym zaznaczyć, że obserwowane dublety są jedynie artefaktem superpozycji dwóch singletów o niemal identycznych przesunięciach chemicznych, co wynika z dużej symetrii układu i minimalnych różnic środowisk magnetycznych tych protonów.

Analiza widm ^{13}C NMR koniugatów (**142–144**) wykazała obecność charakterystycznych sygnałów odpowiadających atomom węgla grup metylowych zarówno w części sterolowej, jak i w jej odpowiedniku połączonym mostkiem triazolowym. Dla grup $18'\text{-CH}_3$, $19'\text{-CH}_3$ i $21'\text{-CH}_3$ sygnały obserwowałem odpowiednio w zakresach 12,4–12,2; 23,2–22,4 oraz 18,3–17,5 ppm, natomiast dla grup 18-CH_3 , 19-CH_3 i 21-CH_3 w zakresach 12,4–12,1; 23,2–22,6 oraz 18,2–17,5 ppm. Obecność tych sygnałów potwierdza występowanie w cząsteczkach dwóch części steroidowych o zachowanej integralności strukturalnej. Atomom węgla grup $3\alpha\text{-acetylowych}$ C(26) odpowiadały sygnały w zakresie 160,2–160,0 ppm, natomiast atomy węgla należące do grup acylowych C(30), $7\alpha\text{-OCOCH}_3$, $12\alpha\text{-OCOCH}_3$, $7'\alpha\text{-OCOCH}_3$ oraz $12'\alpha\text{-OCOCH}_3$ rezonowały w przedziale 165,1–170,8 ppm. Sygnały te potwierdzały zachowanie ugrupowań acetylowych po obu stronach cząsteczki, co wskazuje na brak niepożądanych przemian w trakcie etapu sprzęgania. Karbonylowe atomy węgla grup C(24)=O oraz C(24')=O dawały sygnały w obszarze 174,8–174,5 ppm, zgodnie z wartościami typowymi dla ugrupowań karbonylowych w analogicznych układach steroidowych. Z kolei charakterystyczne przesunięcia chemiczne odpowiadające atomom węgla C(27) i C(28) pierścienia 1,2,3-triazolowego obserwowałem odpowiednio przy 141,1 ppm oraz w zakresie 128,8–129,2 ppm. Wartości te stanowiły jednoznaczne potwierdzenie obecności mostka triazolowego łączącego obie części cząsteczki i były zgodne z danymi literaturowymi dla pochodnych steroidowych uzyskanych metodą chemii „click”.



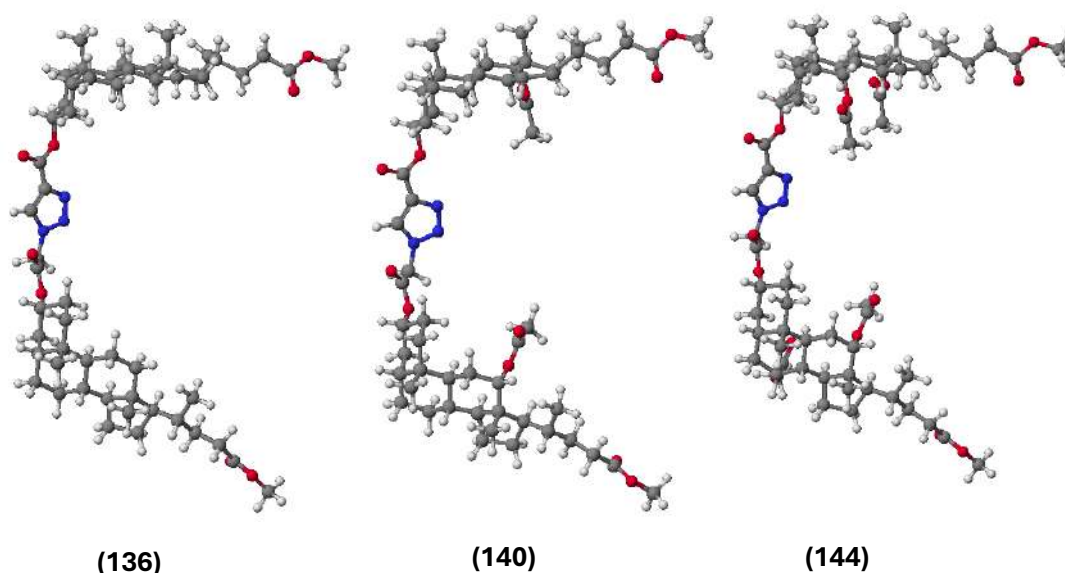
Rysunek 23. Widma ^1H NMR w zakresie 4,60–8,40 ppm dla najbardziej charakterystycznych sygnałów związków: A (136), B (140), C (144).

Podstawowy szkielet cyklopentanoperhydrofenantrenowy wszystkich badanych steroidów nie generuje wielu charakterystycznych pasm w widmach IR. Wibracje wiązań C–C są słabe i często nakładają się na pasma w regionie „finger print”. Wibracje rozciągające wiązania C–H w układach sprzężonych pojawiały się jako szerokie pasmo w zakresie 2952–2867 cm^{-1} we wszystkich związkach (136–144). Obecność grup karbonylowych estrów uwidaczniała się charakterystycznymi pasmami $\nu(\text{C}=\text{O})$ w 1736–1741 cm^{-1} oraz drganiem $\nu(\text{C}-\text{O})$ w 1247–1215 cm^{-1} .

Analiza spektrometrii masowej w technice ESI–MS potwierdziła masy cząsteczkowe wszystkich otrzymanych koniugatów (136–144). W większości przypadków obserwowałem dominujące sygnały odpowiadające jonom $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100%), zgodne z wartościami teoretycznie obliczonymi. W niektórych przypadkach sygnały $[\text{M}+\text{Na}]^+$ były obserwowane również przy niższej intensywności względnej (10-50%). Dodatkowo, w widmach odnotowałem słabsze sygnały odpowiadające jonom $[\text{M}+\text{K}]^+$ (5–10%). Uzyskane dane jednoznacznie potwierdziły strukturę zsyntetyzowanych biokoniugatów steroidowych.

2.3 Obliczenia semiempiryczne metodą PM5

Do oceny stabilności energetycznej zsyntetyzowanych dimerów kwasów żółciowych sprzężonych pierścieniem 1,2,3–triazolowym przeprowadziłem obliczenia półempiryczne metodą PM5. Końcowe entalpie tworzenia (HOF) dla związków (136–144) zestawiono w Tabeli 4, a molekularne modele reprezentatywnych związków przedstawiono na Rysunku 24.



Rysunek 24. Modele molekularne związków (136), (140) i (144) obliczone za pomocą techniki PM5.

Tabela 4. Ciepła tworzenia (HOF) [kcal/mol] azydoocjanowych pochodnych kwasów żółciowych (133–135) oraz koniugatów (136–144).

Związek	HOF [kcal/mol]	Δ HOF [kcal/mol]
(133)	-192,5621	–
(134)	-278,4880	–
(135)	-356,3252	–
(136)	-453,9492	-261,3871
(137)	-540,5013	-347,9392
(138)	-613,4933	-420,9312
(139)	-540,0357	-261,5477
(140)	-626,4624	-347,9744
(141)	-711,7935	-433,3055
(142)	-617,7925	-261,4673
(143)	-704,2530	-347,9278
(144)	-789,6462	-433,3210

$$\Delta\text{HOF} = \text{HOH}_{(136-144)} - \text{HOF}_{(133-136)}$$

Analiza wyników wykazała, że produkty końcowe (136–144) cechują się niższymi wartościami HOF w porównaniu do substratów, co wskazuje na większą stabilność energetyczną uzyskanych dimerów. Najwyższą wartość HOF odnotowano dla związku (136), natomiast najniższą dla (144). Obserwacje te wskazują, że obecność grup hydroksylowych oraz ich substytucja grupami acetylowymi wpływa na wartość HOF. Wprowadzenie grup OAc sprzyja tworzeniu stabilnych kompleksów intramolekularnych poprzez wiązania wodorowe, a wzrost liczby grup OAc w szkielecie kwasu żółciowego prowadzi do dalszego obniżenia HOF. Stabilizacja energetyczna może wynikać zarówno z wiązań wodorowych, jak i oddziaływań elektrostatycznych pochodzących od grup OAc w cząsteczce. Wyniki PM5 pozwalają zatem wnioskować o korzystnym wpływie acetylacji na stabilność energetyczną dimerów kwasów żółciowych.

Uzyskane w obliczeniach półempirycznych PM5 wyniki potwierdziły, że wprowadzenie grup acetylowych wyraźnie obniża entalpię tworzenia i stabilizuje dimery kwasów żółciowych, co stanowi istotną przesłankę do traktowania acetylacji jako efektywnej strategii zwiększania stabilności konformacyjnej takich układów.

2.4 Predykcja potencjalnej aktywności farmakologicznej (PASS)

Potencjalne właściwości farmakologiczne zsyntetyzowanych biokoniugatów (136–144) oceniono metodą *in silico*, stosując program PASS Na podstawie analizy PASS wytypowano najbardziej prawdopodobne działania biologiczne, przedstawione w Tabeli 5. Najczęściej przewidywane aktywności obejmowały właściwości krioprotekcyjne oraz hipolipemiczne. Niektóre koniugaty, w tym związki (141, 143–144), wykazywały przewidywaną aktywność przeciwwirusową, natomiast związki (136–138, 142, 144) mogły działać jako inhibitory polipowatości gruczolakowej.

Tabela 5. Wartości prawdopodobieństwa (PA) dla przewidywanej aktywności biologicznej koniugatów (136–144).

Związek PA>0,7	(136)	(137)	(138)	(139)	(140)	(141)	(142)	(143)	(144)
Inhibitor hydrolazy acylokarnityny	0,85	0,82	0,82	0,82	0,84	0,84	0,82	0,84	0,85
Inhibitor alkiloacetyloglicerofosfatazy	0,81	0,75	–	0,75	0,78	0,72	–	0,72	–
Inhibitor hydrolazy alkenyloglicerofosfocholin	0,76	–	–	–	0,72	–	–	–	–
Aktywność przeciwwypryskowa	0,75	0,71	–	0,71	–	–	–	–	–
Inhibitor monoooksygenazy eteru glicerylowego,	0,72	0,76	0,80	0,76	0,77	0,80	0,80	0,80	0,80
Leczenie polipowatości gruczolakowatej	0,71	0,70	0,70	0,70	–	–	0,70	–	0,71
Antagonista cholesterolu	0,71	–	–	–	–	–	–	–	–
Cytoprotektant	0,70	–	0,73	–	–	0,71	0,73	0,71	0,70
Aktywność hipolipemiczna	–	–	0,78	–	–	0,77	0,78	0,77	0,76
Leczenie zaburzeń dróg żółciowych	–	–	0,73	–	–	0,72	0,73	0,72	0,73
Lek przeciwwirusowy (grypa)	–	–	–	–	–	0,71	–	0,71	0,72

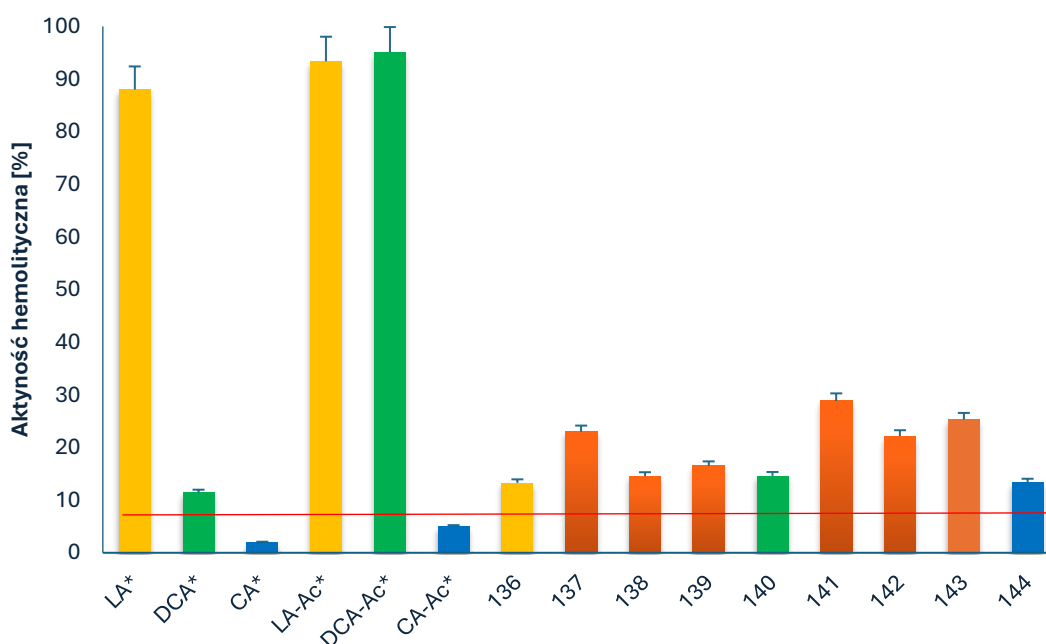
2.5 Aktywność hemolityczna

Aktywność hemolityczna kwasów żółciowych zależy od ich struktury chemicznej oraz stężenia. Hydrofobowe kwasy żółciowe, takie jak lithocholowy i deoksycholowy, indukują hemolizę erytrocytów w sposób zależny od dawki, zwiększając przepuszczalność błony dla jonów. W stężeniach subletalnych kwasy żółciowe mogą stabilizować dwuwarstwą lipidową błon i modulować aktywność białek błonowych, takich jak MRP1.

W związku z tym ocenę hemolityczności przeprowadzono dla wszystkich związków (136–144) w teście *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich erytrocytów. Wyniki wykazały, że dimeryzacja

acetylowanych pochodnych kwasów żółciowych prowadzi do obniżenia aktywności hemolitycznej w porównaniu do substratów.

Dla LA i CA estryfikacja substratów do LA–Ac i CA–Ac powodowała niewielki wzrost hemolityczności, przy czym LA wykazywał znacząco wyższą aktywność niż DA i CA. Wprowadzenie grupy octanowej do kwasu deoksycholowego zwiększyło hemolityczność do wartości 90%. Wszystkie uzyskane związki wykazały hemolityczność w zakresie 13–28% (Rysunek 25). Sprzężenie LA–Ac i DA–Ac z innymi acetylowanymi pochodnymi kwasów żółciowych pozwoliła uzyskać dimery o niższej hemolityczności niż substraty wyjściowe. Wyjątek stanowiły pochodne CA–Ac, które po sprzężeniu z innymi acetylowanymi pochodnymi wykazywały wzrost hemolityczności o 10–20%. Najbardziej wyraźnie zależności te widoczne są dla związków (136), (140) i (144), będących dimerami acetylowanych pochodnych LA, DA i CA (oznaczonych na Rysunku 25 tym samym kolorem co substraty).



Rysunek 25. Aktywność hemolityczna badanych związków (0,1 mg/ml) po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C. Stopień hemolizy wyższy niż 5% wskazuje na aktywność związków zaktócającą błonę komórkową. PBS – kontrola negatywna, brak hemolizy.

Analiza aktywności hemolitycznej związków (136–144) wykazała, że hemolityczność kwasów żółciowych zależy od ich hydrofobowości, liczby grup hydroksylowych oraz rodzaju modyfikacji chemicznych. Pojedyncze kwasy hydrofobowe, takie jak lithocholowy i deoksycholowy, wykazywały znaczną hemolizę erytrocytów, która dodatkowo wzrastała po wprowadzeniu grup acylowych, co wynika ze zwiększonej hydrofobowości i zdolności do integracji z lipidową dwuwarstwą błony komórkowej. Z kolei kwas cholowy, bardziej hydrofilowy, charakteryzował się niską hemolitycznością, a jego acylowane pochodne nie wykazywały istotnego wzrostu aktywności, co sugeruje ograniczoną

interakcję z błoną. Dimeryzacja acetylowanych pochodnych przez pierścień triazolowy prowadziła do wyraźnego spadku hemolityczności, co można przypisać zwiększonemu efektowi hydrofilowemu całej cząsteczki, efektowi sterycznemu oraz ograniczeniu kontaktu grup hydrofobowych z dwuwarstwą lipidową. Wyjątek stanowiły pochodne CA–Ac, które po dimeryzacji wykazały umiarkowany wzrost hemolityczności, wskazując, że wpływ dimeryzacji zależy od pierwotnej struktury kwasu i rozmieszczenia grup hydrofobowych. Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że zarówno estryfikacja, jak i dimeryzacja są skutecznymi reakcjami do modulowania aktywności hemolitycznej kwasów żółciowych, co ma istotne znaczenie przy projektowaniu związków o zmniejszonej toksyczności wobec erytrocytów i potencjalnych zastosowaniach biologicznych.

Przeprowadzona przeze mnie szczegółowa analiza aktywności hemolitycznej dimerów (**136–144**) po raz pierwszy wykazała, że odpowiednia kombinacja modyfikacji poprzez wprowadzenie grup octanowych i dimeryzacji kwasów żółciowych pozwala skutecznie modulować ich oddziaływanie z błonami komórkowymi, prowadząc do uzyskania związków o znacząco obniżonej toksyczności w porównaniu z substratami. Wynik ten stanowi istotny wkład w projektowanie bezpieczniejszych pochodnych steroidowych o potencjalnym znaczeniu biologicznym.

2.6 Dokowanie molekularne

W ramach niniejszej pracy wybrano do badań molekularnych trzy reprezentatywne dimery kwasów żółciowych: kwasu lithocholowego (**136**), kwasu deoksycholowego (**140**) oraz kwasu cholowego (**144**). Związki te różnią się zarówno rodzajem kwasu żółciowego, jak i liczbą wprowadzonych grup acetylowych, co może wpływać na ich zdolność do tworzenia interakcji w miejscach aktywnych białek docelowych.

Do badań dokowania wybrano dwa białka kluczowe dla funkcjonowania bakterii:

1. **Gyraża DNA (podjednostka GyrB)** – enzym z rodziny topoisomeras, który uczestniczy w replikacji, transkrypcji i rekombinacji bakteryjnego DNA. Blokowanie jego aktywności prowadzi do zahamowania podziału komórkowego i śmierci komórki bakteryjnej. Jego wybór jako białka docelowego wynika z udokumentowanej skuteczności fluoroquinolonów, które poprzez wiązanie w miejscu aktywnym GyrB skutecznie niszczą bakterie Gram–dodatnie, co czyni gyrażę DNA doskonałym celem do oceny potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej nowych związków.
2. **Transglikozylaza związana z Lipid II (*Staphylococcus aureus*, PDB: 3VMT)** – enzym uczestniczący w biosyntezie ściany komórkowej, wykorzystujący Lipid II jako prekursor peptydoglikanu. Peptydoglikan nadaje komórkom bakteryjnym integralność strukturalną i odporność na stres mechaniczny. Zahamowanie aktywności tego białka prowadzi do zaburzenia syntezy ściany komórkowej i w konsekwencji śmierci komórki. Jako że wiele

antybiotyków glikopeptydowych działa poprzez wiązanie się z Lipid II, transglikozylaza stanowi naturalny i istotny cel dla nowych związków o potencjale przeciwdrobnoustrojowym.

Wybór tych dwóch celów molekularnych pozwala na zbadanie różnych mechanizmów działania potencjalnych inhibitorów: jeden obejmuje hamowanie replikacji DNA, a drugi blokadę biosyntezy ściany komórkowej. Porównanie interakcji nowo zaprojektowanych dimerów z miejscami aktywnymi gyrazy DNA oraz transglikozylazy umożliwia ocenę ich potencjału antybakteryjnego w oparciu o znane mechanizmy działania klasycznych antybiotyków, takich jak fluoroquinolony czy glikopeptydy.

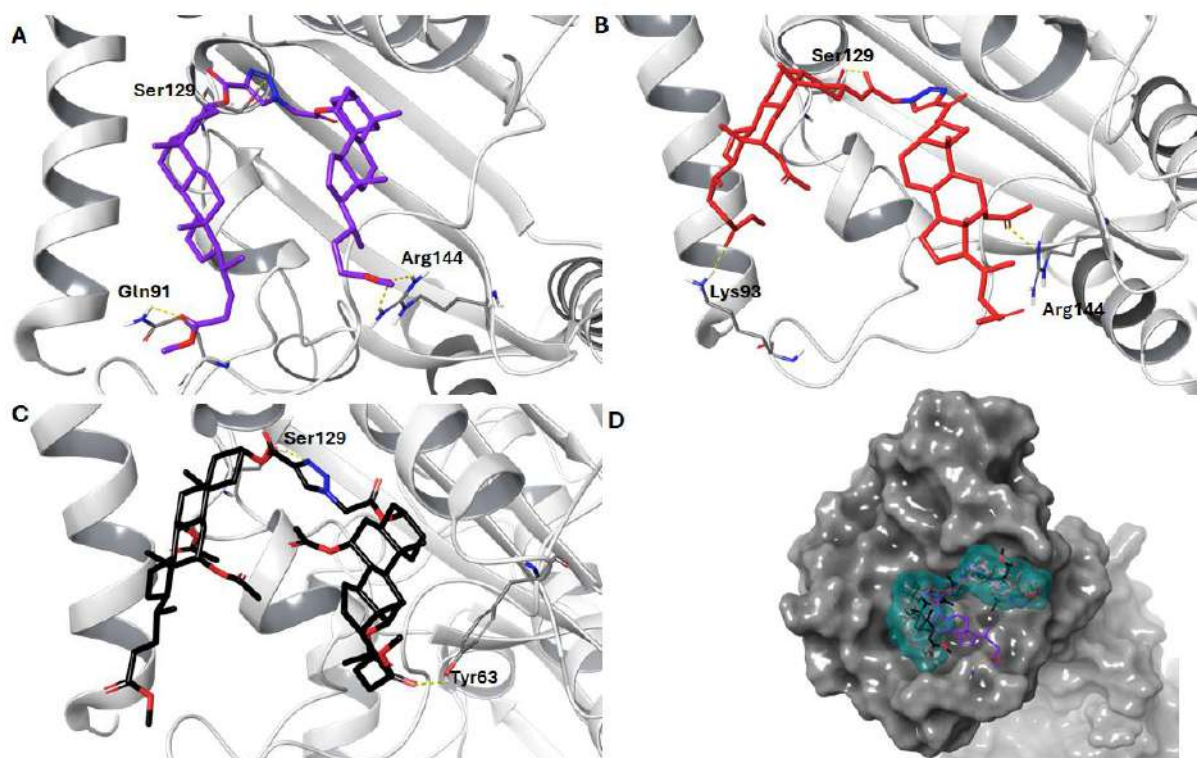
W przypadku gyrazy DNA wszystkie trzy związki (**136**), (**140**) i (**144**), przyjęły podobną konformację szkieletową w miejscu aktywnym, przyjmując kształt litery „U”, z punktem zgięcia na poziomie pierścienia triazolowego, zajmując przestrzeń odpowiadającą miejscu wiązania ciprofloksacyny. Związek ten został wybrany jako punkt odniesienia ze względu na dobrze poznany mechanizm działania polegający na wiązaniu z kompleksem DNA–gyraza oraz powszechne wykorzystanie jako inhibitora referencyjnego w badaniach nad aktywnością inhibitorów gyrazy DNA (Rysunek 26).

- Związek (**136**) (dimer kwasu litocholowego) wykazał tworzenie stabilnych wiązań wodorowych z resztą Ser129 (2,91 Å) przez pierścień triazolowy, a grupy karbonylowe bocznego łańcucha kwasu żółciowego wytworzyły trzy wiązania wodorowe – jedno podwójne z Arg144 (2,37 i 2,34 Å) oraz jedno z Gln91 (2,17 Å), co sugeruje jego największy potencjał hamowania enzymu wśród testowanych związków.
- Związek (**140**) (dimer kwasu deoksycholowego) utworzył wiązanie wodorowe z Ser129 (1,96 Å) poprzez grupę karbonylową w pozycji C(26), a dodatkowo wiązania wodorowe powstały z Arg144 (2,39 Å) i Lys93 (2,12 Å).
- Związek (**144**) (dimer kwasu cholowego) przyjął podobną konformację, tworząc dwa wiązania wodorowe: z Ser129 (2,07 Å) oraz Tyr63 (2,28 Å), przy czym żadne z czterech wprowadzonych grup acetylowych nie uczestniczyło w interakcjach w miejscu aktywnym.

Analiza wyników wskazuje, że związek (**136**) wykazuje największą liczbę korzystnych interakcji, co może przekładać się na najwyższy potencjał hamowania gyrazy DNA, natomiast związek (**144**), z mniejszą liczbą interakcji, posiada niższy potencjał w tym kontekście (Tabela 6).

Tabela 6. Wyniki dokowania i wiązania wodorowe utworzone z reprezentatywnymi związkami **(136)**, **(140)** i **(141)**.

Związek	Wynik dokowania (kcal/mol)	Wiązania wodorowe (odległośćÅ)
(136)	-6,761	Ser129 (2,91 Å) Arg144 (2,37 Å) Arg144 (2,34 Å) Gln91 (2,17 Å)
(140)	-4,300	Ser129 (1,96 Å) Arg144 (2,39 Å) Lys93(2,12 Å)
(144)	-3,216	Ser129 (2,07 Å) Tyr63 (2,28 Å)
Cyprofloksacyna	-7,169	Ser129 (2,68 Å) Glu58 (2,95 Å) Asn54 (2,80 Å)

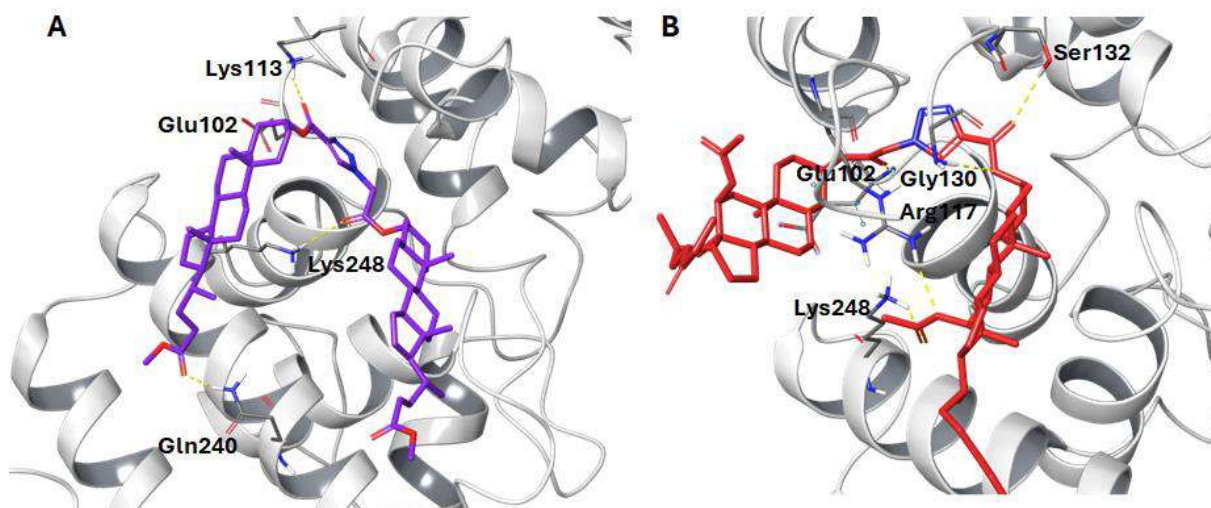


Rysunek 26.(A–C) Sposób wiązania związków dokowanych **(136)** – fioletowy, **(140)** – czerwony, **(144)** – czarny, z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi z kluczowymi aminokwasami. (D) Reprezentacja powierzchni gyrazy DNA z dokowanymi związkami. Żółta linia przerywana oznacza wiązanie wodorowe.

W badaniach dokowania z transglikozylazą związaną z Lipid II, związki **(136)** i **(140)** przyjęły zgiętą konformację U, z pierścieniem triazolowym w roli punktu infleksji, zajmując miejsce wiązania odpowiadające krystalizowanemu związkowi LHI301 (Rysunek 27).

- **Związek (136)** wytworzył wiązania wodorowe z Glu102 (2,70 Å), Lys113 (2,09 Å), Lys248 (2,36 Å) oraz Gln240 (2,04 Å), co wskazuje na stabilne zakotwiczenie w miejscu aktywnym.
- **Związek (140)** wytworzył wiązania wodorowe z Glu102 (1,87 Å, przez C-30), Ser132 (2,52 Å), Gly130 (2,46 Å), Arg117 (2,55 Å) i Lys248 (2,43 Å), co również sugeruje istotną stabilizację kompleksu.
- **Związek (144)** nie wykazał zdolności do skutecznego dokowania w miejscu aktywnym transglycosylase.

Na podstawie powyższych danych zarówno związek **(136)**, jak i **(140)** wykazują potencjalną aktywność przeciwbakteryjną poprzez zdolność blokowania enzymów kluczowych dla replikacji DNA oraz biosyntezy ściany komórkowej. Kształt „U” dimerów i obecność pierścienia triazolowego wydają się kluczowe dla ich zdolności do interakcji w miejscach aktywnych, co potwierdza hipotezę o znaczeniu koniunkcji steroidów poprzez 1,2,3-triazol w poszukiwaniu nowych antybiotyków.



Rysunek 27. Sposób wiązania związków dokowanych z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi z kluczowymi aminokwasami. (A) Związek **(136)** – fioletowy, (B) związek **(140)** – czerwony. Żółta linia przerywana oznacza wiązanie wodorowe.

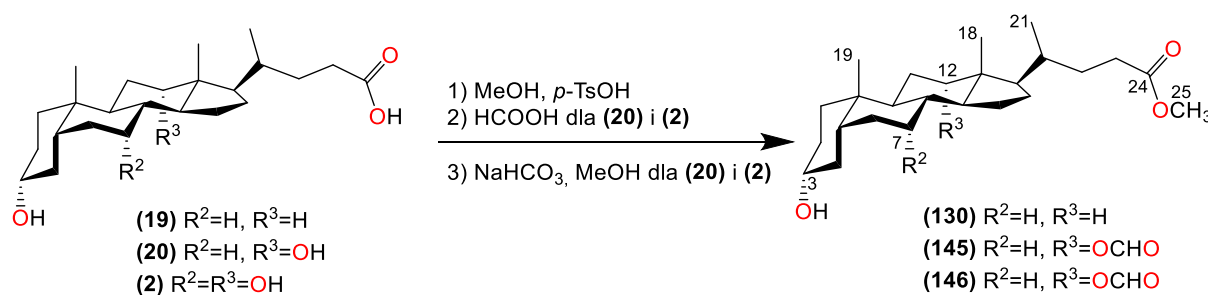
3. Synteza koniugatów mrówczanowych pochodnych kwasów żółciowych [P6]

Zachęcony sukcesem wcześniejszej syntezy koniugatów pochodnych kwasów żółciowych, postanowiłem rozszerzyć zakres badań o otrzymanie nowych triazolowych koniugatów steroidowych o potencjalnej aktywności przeciwgrzybiczej. Infekcje grzybicze wywoływane przez fitopatogeny, takie jak *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum* oraz *Botrytis cinerea*, stanowią poważne zagrożenie dla rolnictwa i zdrowia człowieka. Grzyby te wytwarzają mikotoksyny, które zanieczyszczają produkty żywnościowe, obniżają plony oraz powodują poważne zaburzenia zdrowotne u ludzi i zwierząt. Narastająca oporność na powszechnie stosowane fungicydy dodatkowo potęguje te problemy, wskazując na konieczność opracowania nowych związków o działaniu przeciwgrzybiczym.

W ramach tej części pracy otrzymałem, z wykorzystaniem metody chemii „click”, serię dwunastu nowych koniugatów steroidowych zawierających pierścień triazolowy. Wśród nich znalazły się dimeryczne koniugaty mrówczanowe pochodnych kwasów żółciowych oraz układy typu sterol–mrówczanowa pochodna kwasu żółciowego, stanowiące zróżnicowaną grupę strukturalną umożliwiającą analizę zależności między budową a aktywnością biologiczną. Struktury otrzymanych związków potwierdziłem za pomocą analiz spektroskopowych (^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR, ESI-MS), a ich potencjalną aktywność biologiczną oceniono na podstawie badań *in silico* oraz testów biologicznych. Wykonano również badania podstawowe mające na celu określenie potencjału uzyskanych koniugatów jako nowych związków o działaniu przeciwgrzybiczym.

3.1 Synteza mrówczanowych pochodnych kwasów żółciowych

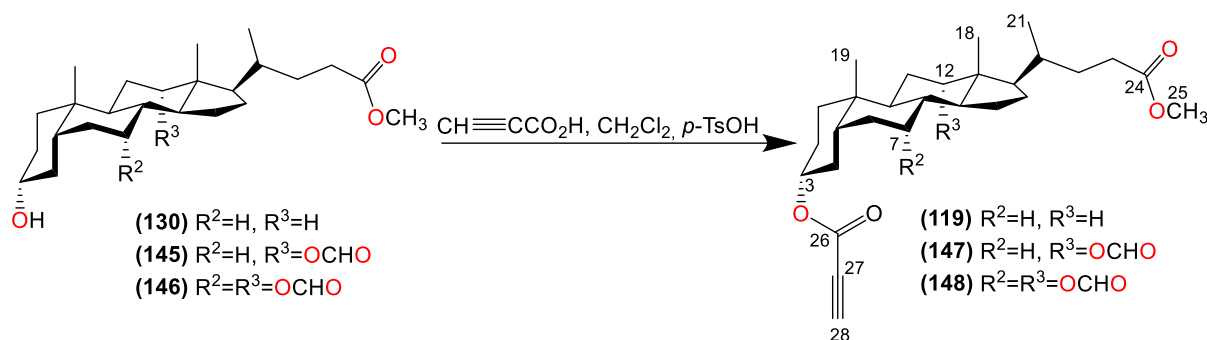
Estry metylowe kwasów żółciowych oraz ich pochodne mrówczanowe (**130**, **145**, **146**) otrzymano w przyzwoitych wydajnościach, stosując znane z literatury procedury [**P3**] (Schemat 59). Pochodne mrówczanowe uzyskano poprzez reakcję estrów metylowych kwasów żółciowych z kwasem mrówkowym, a następnie selektywną hydrolizę z użyciem wodorowęglanu sodu w metanolu.



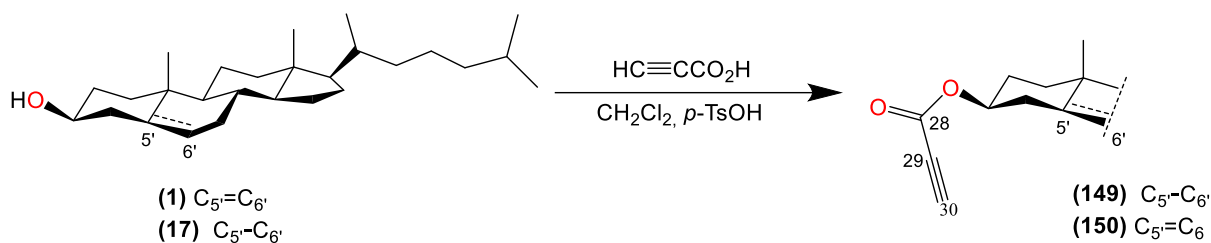
Schemat 59. Synteza estrów metylowych oraz pochodnych mrówczanowych kwasów żółciowych.

Syntezę estrów propiolowych kwasów żółciowych (**119**, **147–148**) przeprowadzono w wyniku reakcji pochodnych mrówczanowych estrów metylowych kwasów żółciowych (**130**, **145–146**)

z kwasem propiolowym w dichlorometanie w obecności *p*-TsOH, co doprowadziło do powstania estrów z terminalnym wiązaniem potrójnym w cząsteczce (**119**, **147–148**) (Schemat 60). Tę samą procedurę zastosowano dla steroli (**1**, **17**) uzyskując związki (**149–150**) (Schemat 61).

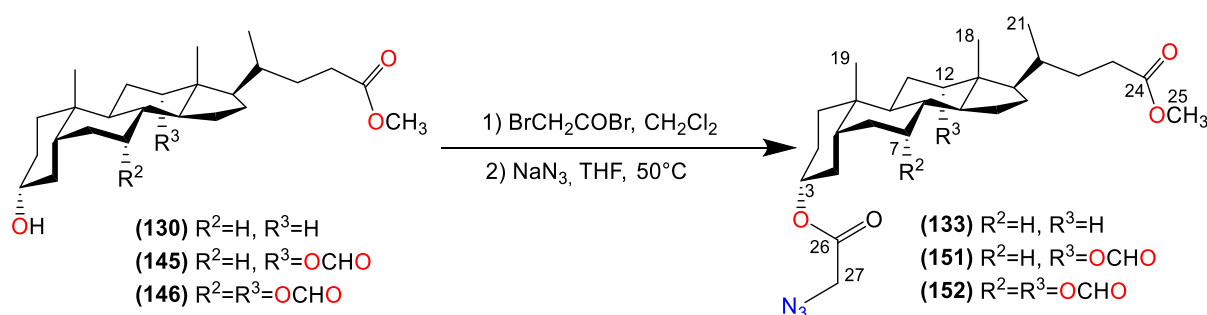


Schemat 60. Synteza propiolowych estrów kwasów żółciowych.



Schemat 61. Synteza propiolowych pochodnych steroli.

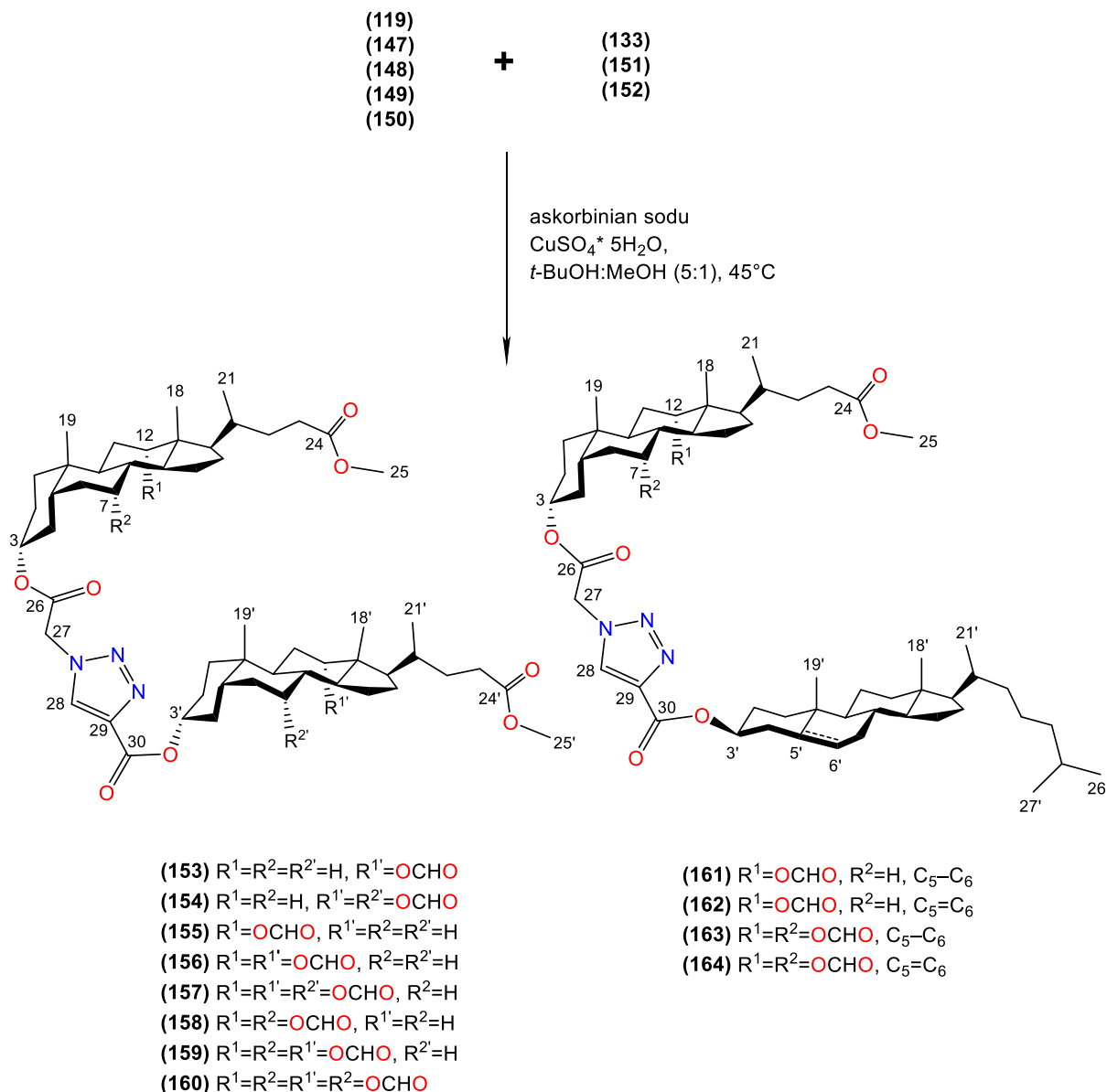
W celu otrzymania azydooctanowych pochodnych kwasów żółciowych (**133**, **151–152**), estry metylowe pochodnych mrówczanowych (**130**, **145–146**) przekształcono najpierw w bromooctanowe pochodne poprzez reakcję z bromkiem kwasu bromooctowego w bezwodnym dichlorometanie (Schemat 62). Otrzymane produkty poddano następnie reakcji podstawienia z azydkiem sodu (NaN_3) w THF w temperaturze $50^\circ C$, co pozwoliło uzyskać odpowiadające im pochodne azydooctanowe (**133**, **151–152**).



Schemat 62. Synteza azydooctanowych pochodnych estrów kwasów żółciowych.

Estry propiolowe kwasów żółciowych (**119**, **147–148**) lub steroli (**149–150**) oraz pochodne azydkowe (**133**, **151–152**) wykorzystano jako substraty w reakcji chemii „click” prowadzonej w obecności $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ i askorbinianu sodu w mieszaninie *t*-BuOH/MeOH (5:1) (Schemat 63). Reakcja doprowadziła do powstania mieszaniny produktów (**153–164**), przedstawionych na Schemacie

64, które rozdzielono metodą chromatografii kolumnowej. Reakcja prowadziła do powstania koniugatów z wydajnościami odpowiednio: 32% (**153**), 41% (**154**), 53% (**155**), 65% (**156**), 21% (**157**), 48% (**158**), 59% (**159**), 37% (**160**), 45% (**161**), 50% (**162**), 62% (**163**) i 32% (**164**).

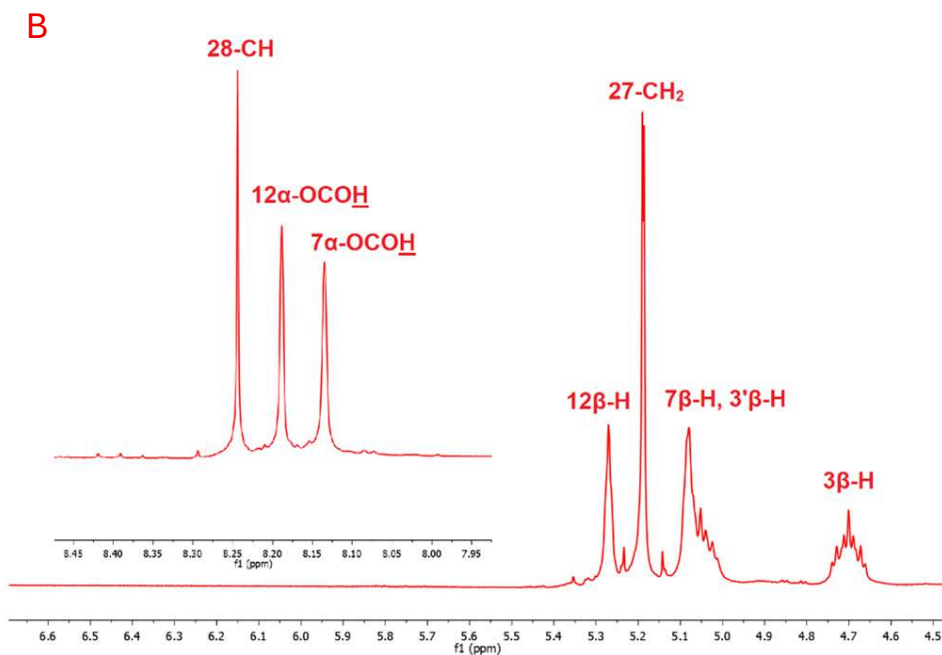
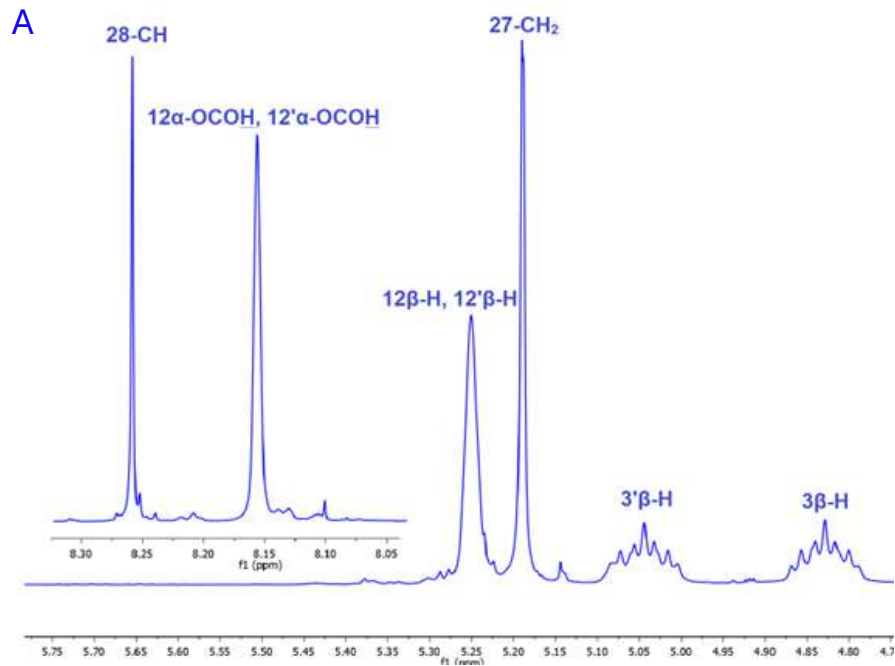


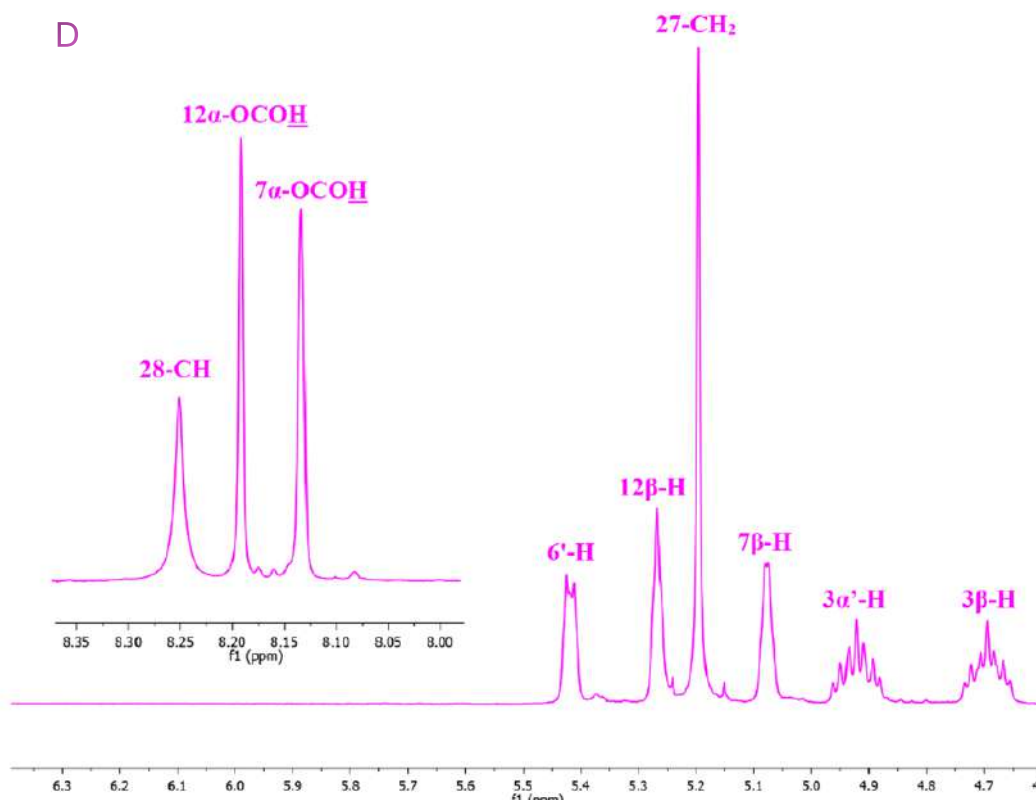
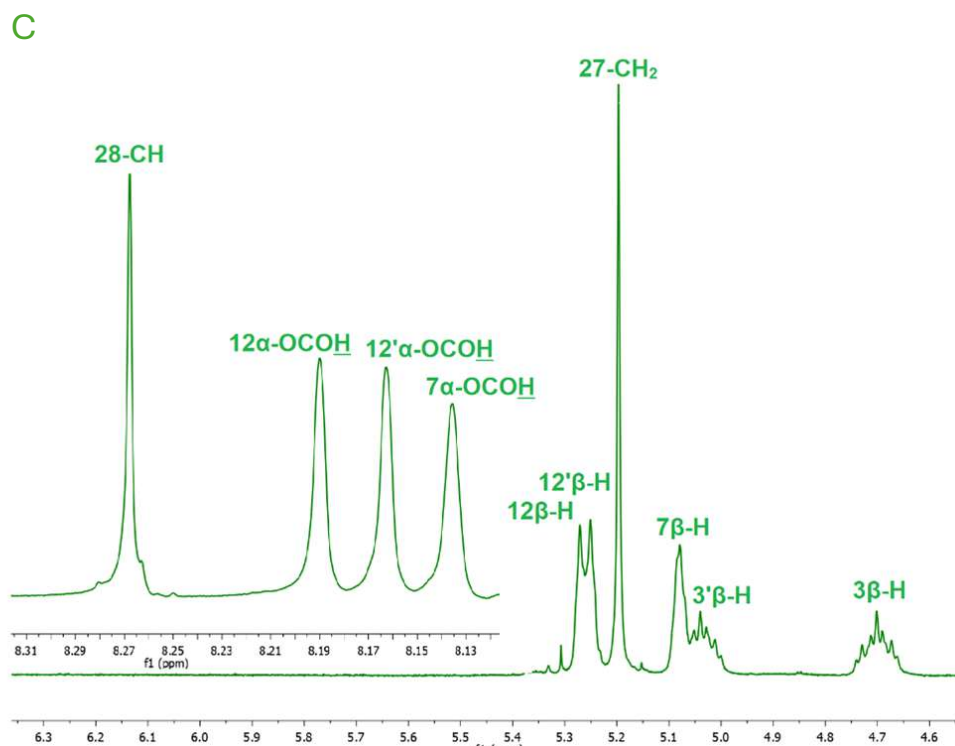
Schemat 63. Synteza mrówczanowych koniugatów steroidowych.

3.2 Analiza spektroskopowa otrzymanych związków

Widma ^1H NMR wszystkich zsyntezowanych koniugatów (**153–164**) wykazywały charakterystyczne sygnały potwierdzające obecność pierścienia 1,2,3–triazolowego oraz struktury steroidowej. Diagnostyczne sygnały odpowiadające protonowi grupy 28–CH zaobserwowałem jako singlet w zakresie 8,27–8,22 ppm (Rysunek 28). Protony z grup metylenowych 27– CH_2 , bezpośrednio połączonych z pierścieniem triazolowym, pojawiały się jako singlet w zakresie 5,21–5,19 ppm. Multiplety przypisane protonom 3 β –H i/lub 3 β' –H obserwowano w zakresie 5,10–4,65 ppm. Dla

pochodnych sterolowych (**162–164**) zaobserwowałem multiplet odpowiadający protonowi $3\alpha\text{-H}$ (5,05–4,88 ppm) oraz dwa sygnały w postaci dubletów od grup metylowych 26-CH_3 i 27-CH_3 (0,87–0,84 ppm). W widmach pochodnych kwasu deoksycholowego i cholowego widoczne były sygnały rezonujące w postaci siguletów od protonów $12\beta\text{-H}/12'\beta\text{-H}$ (**153–164**) oraz $7\beta\text{-H}/7'\beta\text{-H}$ (**154, 157–160, 163–164**) odpowiednio w zakresach 5,28–5,24 ppm i 5,10–4,99 ppm. Charakterystyczny singlet przy 5,42 ppm, obserwowany dla pochodnych cholesterolu (**162**) i (**164**), pochodził od protonu 6-H .





Rysunek 28. Widma ^1H NMR w zakresie 4,75–8,45 ppm dla najbardziej charakterystycznych sygnałów związków: A (**156**), B (**158**), C (**159**), D (**164**).

Widma ^{13}C NMR zsyntezowanych koniugatów (**153–164**) potwierdzały obecność charakterystycznych fragmentów strukturalnych zarówno dla części steroidowej, jak i pierścienia

1,2,3-triazolowego. Wyraźne sygnały w zakresie 12,34–11,81 ppm odpowiadały atomom węgla grup metylowych 18-CH₃/18'-CH₃, natomiast piki obserwowane przy 22,91–22,50 ppm przypisano atomom węgla grup 19-CH₃/19'-CH₃ w pochodnych (**156–157**, **159–164**). Dla związków (**153–155**, **158**) sygnały w zakresie 17,49–17,41 ppm pochodziły od fragmentu kwasu litocholowego (19-CH₃ lub 19'-CH₃), a piki przy 22,93–22,75 ppm przypisano atomom węgla grup 19'-CH₃ lub 19-CH₃ w części cholowej lub deoksycholowej. Sygnały z zakresu 18,71–17,43 ppm pochodziły od atomów węgla grup metylowych 21-CH₃/21'-CH₃. Obecność pierścienia triazolowego potwierdzały charakterystyczne sygnały atomów węgla przy 141,11–141,00 ppm C(29) oraz 129,13–128,71 ppm C(28). Atomy węgla grup karbonylowych C(26) i C(30) generowały przesunięcia chemiczne odpowiednio w zakresie 165,11–165,07 ppm oraz 160,08–159,01 ppm. Sygnały rezonansowe przy 160,68–160,43 ppm wskazywały na obecność atomów węgla grup mrówczanowych 12 α -OCHO/12' α -OCHO w związkach (**153–164**) oraz 7 α -OCHO/7' α -OCHO w pochodnych (**154**, **157–160**, **163–164**). Sekwencje sygnałów w zakresie 77,22–77,16 ppm, 75,99–75,02 ppm i 70,57–70,50 ppm przypisano odpowiednio atomom C(12)/C(12'), C(3)/C(3') oraz C(7)/C(7'). Dla pochodnych sterolowych (**161–164**) obserwowano dodatkowe sygnały przy 21,22–21,01 ppm, odpowiadające atomom węgla grup metylowych C(26') i C(27'). Pochodne cholesterolu (**162**) i (**164**) wykazywały charakterystyczne przesunięcia przy 139,47–139,41 ppm oraz 122,93–122,00 ppm, przypisane do atomów węgla wiązania podwójnego C(5')=C(6').

Widma IR otrzymanych związków (**153–164**) zawierały pasma drgań odpowiadających wiązaniom C–C, które były stosunkowo słabe i nakładały się z innymi sygnałami w obszarze odcisku palca. Drgania rozciągające wiązań C–H tworzyły szerokie pasmo w zakresie 2946–2870 cm⁻¹, typowe dla sprzężonych układów węglowodorowych. Charakterystyczne pasma rozciągające karbonylu ν (C=O) obserwowano w zakresie 1741–1717 cm⁻¹ i stanowiły one kluczowy wskaźnik obecności grup estrowych we wszystkich produktach. Dodatkowo, w obszarze 1211–1176 cm⁻¹ zaobserwowano sygnały przypisane do drgań ν (C–O).

Widma ESI-MS wszystkich pochodnych (**153–164**) wykazały obecność intensywnych jonów [M+Na]⁺ i [M+Cl]⁻ o intensywności 100%. W niektórych przypadkach zaobserwowano również jony [M+K]⁺(30–80%) oraz [M+HCOO]⁻ (20%), jednak ich intensywność była znacząco niższa w porównaniu z jonami sodowymi czy chlorkowymi.

3.3 Aktywność przeciwgrzybicza

Infekcje grzybicze stanowią rosnący problem zarówno w medycynie, jak i w rolnictwie, a skuteczność obecnie stosowanych środków przeciwgrzybowych często ograniczają narastająca oporność patogenów oraz toksyczność leków wobec komórek gospodarza. W związku z tym poszukiwanie nowych związków o aktywności przeciwgrzybowej, szczególnie pochodnych związków naturalnych o zmodyfikowanej strukturze steroidowej, stanowi istotny kierunek badań. Steroidy i pochodne kwasów żółciowych, ze względu na swoją amfifilową naturę oraz zdolność do

oddziaływania z błonami biologicznymi, stanowią obiecującą grupę związków w kontekście opracowywania nowych środków przeciwdrobnoustrojowych.

Oceniono aktywność przeciwgrzybową serii koniugatów steroidowych **(153–164)** wobec wybranych gatunków grzybów: *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma atroviridae* oraz *Trichoderma harzianum*. Wybrane szczepy reprezentują zarówno grzyby fitopatogeniczne, odpowiedzialne za znaczne straty w uprawach roślin (np. *B. cinerea*, *F. culmorum*, *A. alternata*), jak i gatunki saprotroficzne z rodzaju *Trichoderma*, które wykazują zdolność do konkurencyjnego wzrostu w środowisku i stanowią modelowe organizmy do oceny działania przeciwgrzybowego. Zastosowanie tego zestawu mikroorganizmów pozwala na szeroką ocenę potencjalnego spektrum działania otrzymanych pochodnych substancji w podłożu.

Tabela 7. Aktywność przeciwgrzybicza związków **(153–164)** oceniana metodą dyfuzji studzienkowej. Strefy zahamowania wzrostu <9 mm (niska aktywność) zaznaczono na czerwono, 10–15 mm (umiarkowana aktywność) na żółto, a >15 mm (wysoka aktywność) na zielono, przy czym ciemniejsze odcienie wskazują na silniejsze działanie.

Związek	Strefa zahamowania [mm]					
	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Trichoderma atroviridae</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
(153)	15	0	0	7,5	11,5	17
(154)	13	0	10,5	6	10	12
(155)	18	0	10	6	11,5	13
(156)	16,5	0	9	8,5	9,5	9
(157)	12,5	0	12	7	9,5	13
(158)	12	0	10	9	10	13
(159)	20	0	10	7	8,5	15
(160)	19	0	9,5	7	10,5	10
(161)	15,5	0	13	6	7	11
(162)	14	0	10	8,5	7,7	11
(163)	0	0	11	10	9,5	10
(164)	0	0	10	8,5	8	14

Przeprowadzono wstępny przesiew aktywności przeciwgrzybowej wszystkich związków **(153–164)** z wykorzystaniem metody dyfuzji w studzienkach (Tabela 7). W celu zapewnienia porównywalności wyników, wszystkie próbki badano w jednakowym stężeniu 4 mg/mL. Aktywność fungicydową klasyfikowano na podstawie średnicy strefy zahamowania wzrostu: wartości <9 mm uznano za niską aktywność, 10–15 mm za umiarkowaną, natomiast >15 mm za wysoką. Klasyfikacja ta odpowiada powszechnie stosowanym kryteriom interpretacji wyników testów dyfuzyjnych, w których

większa strefa zahamowania wzrostu świadczy o silniejszym działaniu biologicznym lub lepszej dyfuzji. Analiza wyników wykazała, że związek **(159)** charakteryzował się najsilniejszą aktywnością wobec *Botrytis cinerea*, powodując powstanie strefy zahamowania wzrostu o średnicy 15 mm. Wysoką aktywność wobec tego szczepu wykazywały również pochodne **(153)** (17 mm) oraz **(155)** i **(158)** (po 13 mm). W przypadku *Fusarium culmorum* najwyższą skuteczność odnotowano dla produktu **(159)**, który generował strefę zahamowania o średnicy 20 mm, natomiast związki **(160)** i **(155)** wykazywały nieco słabsze działanie (odpowiednio 19 mm i 18 mm).

Badania ujawniły również znaczną aktywność związku **(159)** wobec *Alternaria alternata* (10,5 mm). Zbliżoną skuteczność wobec tego szczepu zaobserwowano dla pochodnych **(160)** i (odpowiednio 10,5 mm i 11,5 mm). W odniesieniu do *Trichoderma atroviridae* najwyższą aktywność wykazał związek **(161)** (13 mm), natomiast związek **(163)** był najbardziej efektywny wobec *Trichoderma harzianum*, powodując strefę zahamowania wzrostu o średnicy 10 mm.

Warto podkreślić, że związek **(159)** wykazywał szerokie spektrum działania przeciwgrzybowego, przejawiając skuteczność wobec większości testowanych gatunków. Związki o niskiej aktywności (<10 mm) zaobserwowano jedynie w kilku przypadkach, m.in. **(154)** wobec *T. harzianum* (6 mm) oraz **(155)** wobec *T. atroviridae* (6 mm).

Wyniki przesiewu wskazują na zależność między określonymi elementami strukturalnymi a aktywnością biologiczną syntetyzowanych koniugatów. Szczególnie formylowane pochodne, zawierające końcową grupę formylową przy łączniku triazolowym (np. związek **(159)**), wykazywały zwiększoną aktywność. Efekt ten można tłumaczyć większą polarnością oraz zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych, co może sprzyjać interakcji z błonami komórkowymi lub miejscami aktywnymi enzymów.

Sama obecność grup formylowych nie tłumaczy jednak w pełni obserwowanych różnic w aktywności. Przykładowo, związki **(156)** i **(158)**, zawierające tę samą liczbę takich podstawników, wykazują wyraźnie odmienne poziomy aktywności, co sugeruje istotny wpływ geometrii i sztywności konformacyjnej rdzenia steroidowego. Dodatkowo, obecność wiązania podwójnego w rdzeniu steroidowym (układ Δ^5) może korzystnie wpływać na aktywność przeciwgrzybową poprzez zmianę lipofilowości, planaryzację cząsteczki lub lepsze dopasowanie do receptorów biologicznych.

Łącznie uzyskane wyniki wskazują, że aktywność przeciwgrzybiczna syntetyzowanych pochodnych wynika ze złożonego współdziałania efektów elektronowych, sterycznych i przestrzennych. Nawet niewielkie modyfikacje w strukturze steroidowej mogą prowadzić do istotnych zmian w efekcie biologicznym. Otrzymane obserwacje dostarczają cennych wskazówek dla dalszej, ukierunkowanej optymalizacji tej klasy związków.

Przeprowadzone badania wykazały, że syntetyzowane koniugaty steroidowe mogą wykazywać znaczną i zróżnicowaną aktywność przeciwgrzybiczą, zależną od konkretnych modyfikacji strukturalnych. Wyniki podkreślają potencjał chemii steroidów w projektowaniu nowych środków przeciwdrobnoustrojowych oraz mogą służyć jako punkt wyjścia do dalszej optymalizacji przeciwgrzybowych pochodnych związków naturalnych.

3.4 Obliczenia semiempiryczne metodą PM5

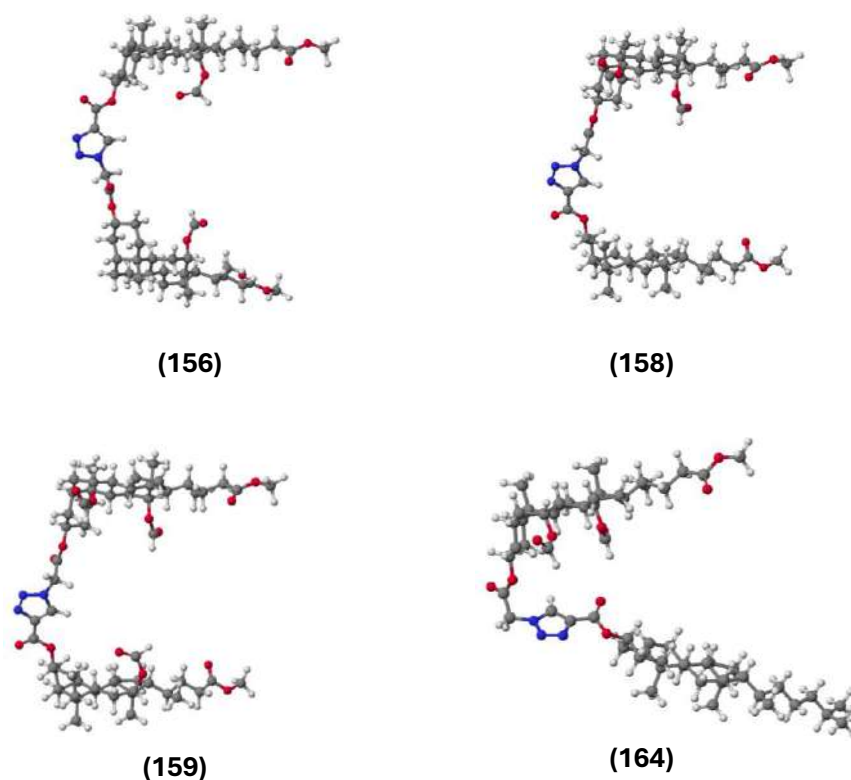
W celu oceny stabilności termodynamicznej otrzymanych koniugatów przeprowadziłem obliczenia półempiryczne metodą PM5. Uzyskane wartości ciepła tworzenia (HOF) dla dimerów steroidowych połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym zestawiono w Tabeli 8 natomiast wybrane modele cząsteczek przedstawiono na Rysunku 29.

Analiza wyników wskazuje na wyraźny spadek wartości HOF wraz ze wzrostem liczby grup mrówczanowych w szkielecie kwasu żółciowego. Najwyższą wartość HOF uzyskano dla związku **(153)**, natomiast najniższą dla związku **(160)**. Wprowadzenie grup mrówczanowych do struktury kwasu żółciowego wpływa istotnie na jego stabilność termodynamiczną, sprzyjając tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań wodorowych. W rezultacie zwiększenie liczby tych grup prowadzi do wzrostu stabilizacji całego układu i systematycznego obniżenia wartości HOF.

Spadek wartości HOF świadczy o większej stabilności termodynamicznej związków, co oznacza mniejszą podatność na rozkład lub niepożądane reakcje chemiczne. Uzyskane wyniki potwierdzają, że obecność grup mrówczanowych sprzyja stabilizacji układów steroidowych poprzez sieć oddziaływań elektrostatycznych i wodorowych, co znajduje odzwierciedlenie w obserwowanym trendzie energetycznym.

Tabela 8. Wartości HOF związków **(153–164)** otrzymane za pomocą obliczeń PM5.

Związek	HOF [kcal/mol]
(153)	-520,1304
(154)	-595,7649
(155)	-525,5031
(156)	-601,6515
(157)	-682,4143
(158)	-603,758
(159)	-678,7866
(160)	-754,8479
(161)	-468,025
(162)	-440,134
(163)	-544,1711
(164)	-519,3649



Rysunek 29. Modele molekularne związków: (156), (158) i (159) oraz (164).

Zauważona zależność pomiędzy stabilnością termodynamiczną a liczbą grup mrówczanowych może mieć znaczenie w interpretacji aktywności biologicznej badanych koniugatów. Bardziej stabilne cząsteczki mogą wykazywać obniżoną reaktywność chemiczną, a tym samym dłuższy czas oddziaływania w środowisku biologicznym.

3.5 Predykcja potencjalnej aktywności farmakologicznej (PASS)

W celu poszerzenia informacji o potencjalnej aktywności biologicznej zsyntezowanych koniugatów (153–164) przeprowadziłem analizę *in silico* za pomocą programu Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). Wybrane aktywności z najwyższymi wartościami PA dla poszczególnych związków zestawiono w Tabeli 9.

Najczęściej przewidywaną aktywnością było hamowanie enzymu monoooksygenazy eteru glicerylowego, z wartościami PA powyżej 0,7 dla związków (154, 156–160, 163), co wskazuje na istotny potencjał w tym zakresie. Enzym ten uczestniczy w metabolizmie lipidów oraz w prawidłowym funkcjonowaniu błon komórkowych, a jego inhibitory mogą być istotne w kontekście zaburzeń metabolicznych i neurodegeneracyjnych. Podobnie koniugaty (156, 158–160) przewidziano jako inhibitory hydrolazy acylokarnitynowej, z wartościami PA bliskimi 0,75. Enzym ten odgrywa kluczową

rolę w metabolizmie kwasów tłuszczowych, a jego hamowanie może mieć znaczenie terapeutyczne w leczeniu chorób związanych z magazynowaniem lipidów lub innymi zaburzeniami metabolicznymi.

Dodatkowo, dla związków **(155, 157, 159)** przewidziano potencjalne hamowanie alkyloacetylglicerofosfatazy (PA do 0,69), co może wskazywać na wpływ na metabolizm fosfolipidów. W przypadku związków **(154, 158–160)** prognozowano możliwość zastosowania w terapii zaburzeń dróg żółciowych (PA≈0,69), co podkreśla potencjał tej grupy w leczeniu chorób wątroby i układu żółciowego.

Tabela 9. Wartości prawdopodobieństwa (*Pa*) dla przewidywanej aktywności biologicznej związków **(153–164)**.

Związek	(153)	(154)	(155)	(156)	(157)	(158)	(159)	(160)	(161)	(162)	(163)	(164)
<i>Pa</i>												
Inhibitor monoooksygenazy glicerolowo–eterowej	0,74	0,78	0,74	0,75	0,78	0,77	0,77	0,78	0,72	0,68	0,76	0,72
Inhibitor hydrolazy acylokarnitynowe	0,74	0,74	0,74	0,77	0,77	0,74	0,78	0,79	0,63	–	0,63	–
Inhibitor alkiloacetylglicerofosfatazy	0,65	–	0,65	0,69	0,61	–	0,61	0,58	–	–	–	–
Aktywność przeciwypryskowa	0,68	0,66	0,67		0,63	0,65		0,62	0,64		0,62	–
Leczenie zaburzeń dróg żółciowych	0,61	0,69	0,61	0,59	0,68	0,68	0,67	0,69	0,58	–	0,66	–
Aktywność hipolipemiczna	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,59	–	0,69
Antagonista cholesterolu	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,66	–	0,66
Aktywność przeciwhipercholesterolemiczna	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,62
Inhibitor CYP17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,61	–	0,60
Inhibitor Myc	–	–	–	–	–	–	–	–	0,55	0,59	–	–
Inhibitor oksydazy bilirubiny	0,56	0,60	0,57	0,57	0,60	0,60	0,60	0,60	–	–	–	–
Aktywność cytoprotekcyjna	–	0,62	–	–	0,60	0,62	0,60	0,58	–	–	–	–

Przewidywania obejmowały również działanie przeciwegzematyczne (przeciwypryskowe) dla związków **(154–155, 158, 160)** oraz działanie hipolipemiczne dla związku **(164)**, co może wskazywać na korzystny wpływ w regulacji poziomu lipidów. Związek **(164)** przewidywano także jako antagonistę cholesterolu oraz środek przeciwhipercholesterolemiczny, sugeruje to jego potencjalne zastosowanie w terapii chorób układu krążenia.

Wśród innych istotnych aktywności należy wymienić hamowanie enzymu CYP17 **(162, 164)**, co może mieć znaczenie w leczeniu zaburzeń hormonalnych, oraz hamowanie MYC dla związków **(158,**

163), wskazujące na potencjał przeciwnowotworowy. Hamowanie bilirubin oksydazy może z kolei sugerować udział w regulacji stresu oksydacyjnego, natomiast działanie cytoprotekcyjne (PA 0,60–0,62) przewidziano dla kilku związków, co podkreśla ich potencjalne mechanizmy ochronne na poziomie komórkowym.

Uzyskane wyniki wskazują, że zsyntezowane koniugaty wykazują zróżnicowane i obiecujące profile farmakologiczne, obejmujące hamowanie enzymów, regulację metabolizmu oraz potencjalne zastosowania terapeutyczne w chorobach układu krążenia, dermatologicznych i hepatobiliarnych. Dane te stanowią istotne uzupełnienie wyników badań przeciwgrzybiczych i mogą stanowić podstawę do dalszej weryfikacji eksperymentalnej.

3.6 Dokowanie molekularne

Zgnilizna podstawy źdźbła oraz fuzarioza kłosów to choroby roślin wywoływane przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium*, w tym *Fusarium culmorum*, prowadzące do znacznych strat w uprawach zbóż i innych roślin rolniczych. Jednym z kluczowych czynników wirulencji tych patogenów jest produkcja trichotecenów, mikotoksyn hamujących syntezę białek w komórkach roślinnych, co zwiększa ich toksyczność i zdolność infekcyjną. Biosynteza trichotecenów jest kontrolowana przez szlak enzymatyczny, w którym kluczową rolę odgrywa enzym syntaza trichodien (TRI5), katalizujący pierwszy etap tego procesu – przekształcenie difosforanu farnezyli (FPP) w trichodien. Inhibicja aktywności enzymu TRI5 może prowadzić do zahamowania syntezy toksyn, co czyni go obiecującym celem w projektowaniu nowych związków o działaniu przeciwgrzybiczym. Literatura wskazuje, że TRI5 jest niezbędny do produkcji trichotecenów przez szczepy *Fusarium spp.*, a jego „wyciszenie” znacząco obniża wirulencję patogenu. Dlatego też TRI5 stanowi atrakcyjny cel dla projektowania inhibitorów zdolnych do ograniczenia toksyczności *Fusarium* i potencjalnego zahamowania rozwoju chorób.

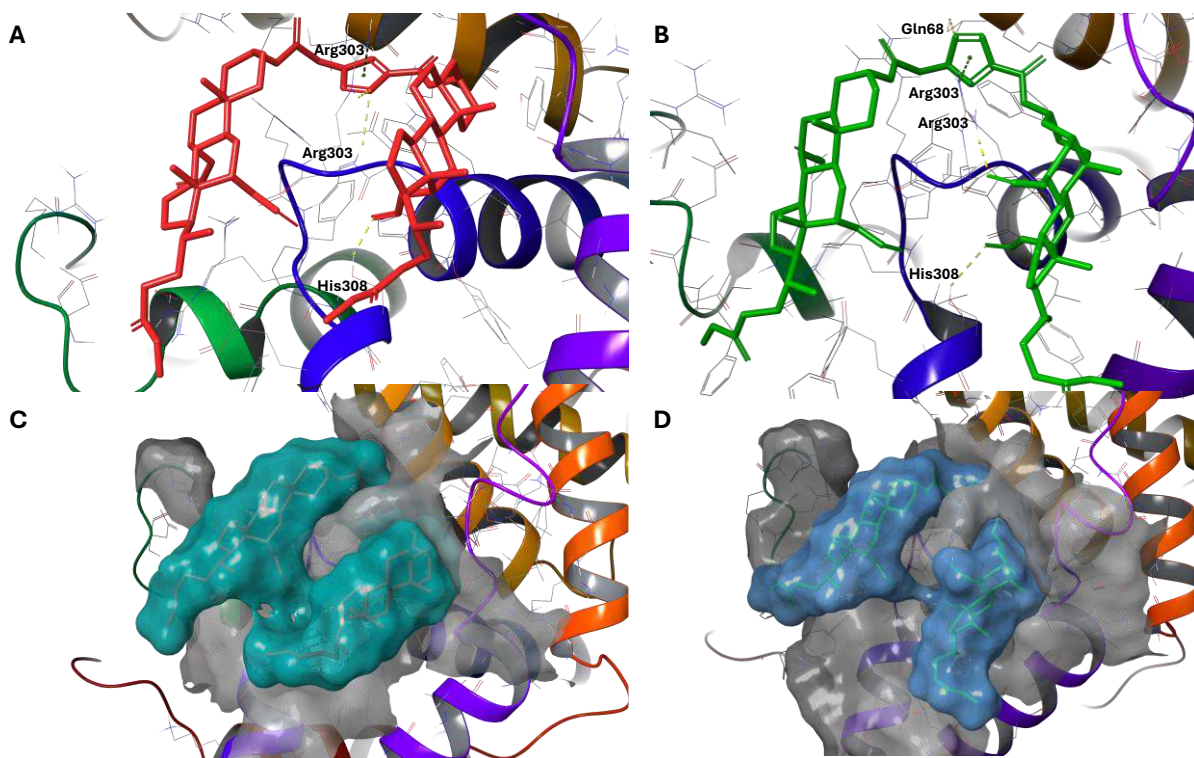
Ponieważ krystaliczna struktura enzymu TRI5 z *Fusarium culmorum* nie jest dostępna, w celu przeprowadzenia badań dokowania molekularnego wykonano modelowanie homologiczne. Sekwencję białka TRI5 pobrano z bazy UniProt. Jako matrycę wybrano krystaliczną strukturę homologicznego enzymu pochodzącego z *Fusarium sporotrichioides* (PDB ID: 1JFG), ze względu na wysokie podobieństwo sekwencji i funkcji. Modelowanie strukturalne przeprowadzono przy użyciu serwera Swiss-Model, który wygenerował model TRI5 na podstawie wybranego szablonu. Ocenę jakości modelu wykonano poprzez analizę parametrów strukturalnych, a jego wiarygodność funkcjonalną zweryfikowano w procesie dokowania molekularnego. W celu potwierdzenia poprawności modelu przeprowadzono dokowanie znanych inhibitorów TRI5 (kwasu kawowego, kwasu ferulowego i eugenolu) opisanych w literaturze. Otrzymane sposoby wiązania ligandów wykazały wysokie podobieństwo do wcześniej opublikowanych wyników, co potwierdziło poprawność modelu i jego przydatność do dalszych badań nad nowymi inhibitorami.

Po potwierdzeniu wiarygodności modelu przeprowadzono dokowanie molekularne dla dwóch najbardziej aktywnych wobec *Fusarium culmorum* związków **(159)** i **(160)** (Rysunek 30), które wykazały najsilniejsze działanie przeciwgrzybicze w testach biologicznych. Oba związki zajmowały region wiązania otoczony resztami aminokwasowymi Gln68, Arg303, His308, Arg304 oraz Phe329, co pozostaje zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi struktury centrum aktywnego. Cząsteczki nie wnikały głęboko w kieszeń wiążącą, lecz przylegały do jej powierzchni, tworząc kluczowe oddziaływania z wybranymi aminokwasami (Rysunek 30). Pierścień triazolowy obu związków tworzył dwa wiązania wodorowe z Arg303 oraz dodatkową interakcję typu π -kation z tą samą resztą. Ponadto zaobserwowano wiązanie wodorowe pomiędzy grupą acylową przy C(30) a resztą His308. Związek **(160)** tworzył dodatkowe wiązanie wodorowe pomiędzy pierścieniem triazolowym a Gln68. Wartość energii dokowania dla związku **(159)** wynosiła $-8,01$ kJ/mol, natomiast dla związku **(160)** $-7,79$ kJ/mol. Oba ligandy przyjęły lekko wygiętą konformację, obejmującą pierścień triazolowy, co umożliwiło ich optymalne dopasowanie do powierzchni centrum aktywnego i stabilizację oddziaływań w jego obrębie (Rysunek 31). Charakterystykę oddziaływań między związkami a wybranymi aminokwasami zestawiono w Tabeli 10.

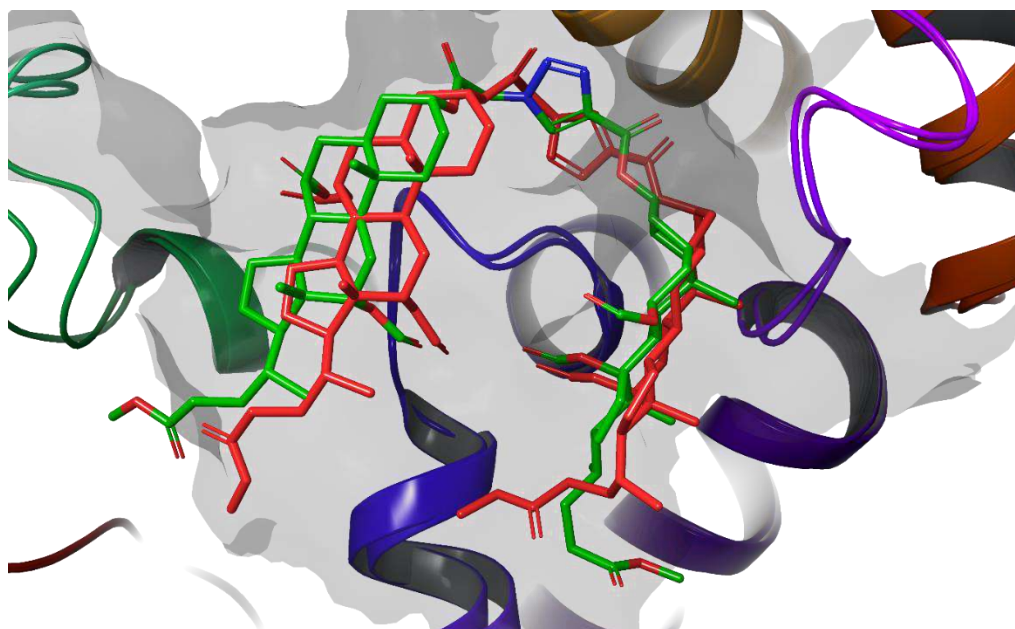
Uzyskane wyniki dokowania molekularnego wskazują, że enzym TRI5 może stanowić potencjalny cel dla nowych inhibitorów o działaniu przeciwgrzybiczym. Dwa najlepiej dopasowane związki wykazały silne oddziaływania z kluczowymi resztami centrum aktywnego, co sugeruje ich potencjalną skuteczność w hamowaniu funkcji TRI5 oraz ogólnej aktywności przeciwgrzybiczej.

Tabela 10. Charakterystyka wykrytych oddziaływań między badanymi związkami **(159)** i **(160)** a wybranymi aminokwasami w kieszeni wiążącej.

Związek	Rodzaj oddziaływania	Aminokwas	Odległość(Å)
(159)	Wiązanie wodorowe	His303	1,83
	Wiązanie wodorowe	Arg303	2,52
	Wiązanie wodorowe	Arg303	2,11
	π -kation	Arg303	3,52
(160)	Wiązanie wodorowe	His308	2,51
	Wiązanie wodorowe	Arg303	1,84
	π -kation	Arg303	4,31
	Wiązanie wodorowe	Gln68	2,47



Rysunek 30. Ułożenie w pozycji dokowania dwóch najbardziej aktywnych związków (**159**) (A, czerwony) i (**160**) (B, zielony) w kieszeni wiążącej enzymu TRI5. Żółto-zielona przerywana linia przedstawia oddziaływania molekularne. C-D przedstawia powierzchnię wiążącą dla dokowanych związków. Szary – powierzchnia miejsca wiążącego, niebieski – powierzchnia wiązania związku.



Rysunek 31. Należenie związków (**159**) (czerwony) i (**160**) (zielony) w kieszeni wiążącej enzymu TRI5.

Podsumowanie

Realizując cel rozprawy doktorskiej, przeprowadziłam serię syntez prowadzących do otrzymania łącznie 29 nowych, dotychczas nieopisanych w literaturze chemicznej pochodnych steroidowych. Struktury wszystkich związków zostały jednoznacznie potwierdzone z wykorzystaniem analiz spektroskopowych (^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR, ESI-MS). Dla otrzymanych pochodnych przeprowadzono również szeroki zakres badań *in silico*, obejmujących m.in. predykcję aktywności farmakologicznej (PASS), obliczenia ciepła tworzenia oraz modelowanie molekularne konformerów (PM5) co umożliwiło analizę stabilności energetycznej związków, określenie tendencji trwałości w obrębie badanych serii oraz ocenę ich potencjalnych właściwości biologicznych. W oparciu o uzyskane wyniki wykonano badania dokowania molekularnego, których celem była próba wyjaśnienia możliwych mechanizmów aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków.

Otrzymano osiem nowych pochodnych steroidowych: sześć koniugatów triazolowych, będących dimerami octanowych pochodnych kwasów żółciowych i steroli, oraz dwa substraty w postaci azydooctanowych pochodnych steroli. Wszystkie produkty wykazały obniżoną aktywność hemolityczną w porównaniu z substratami. Dwa związki (**124 i 127**) były całkowicie niehemolityczne i wykazywały największe powinowactwo do reduktazy HMG-CoA, porównywalne z mewastatyną. Wyniki te wskazują na potencjał triazolowych koniugatów steroidowych jako nowych inhibitorów biosyntezy cholesterolu i kierunek dalszych badań w projektowaniu związków hipolipemicznych [P2].

Zsyntezowano dziewięć nowych dimerycznych koniugatów octanowych pochodnych kwasów żółciowych połączonych pierścieniem triazolowym. Dimery wykazywały większą stabilność energetyczną i znacznie niższą aktywność hemolityczną niż substraty wyjściowe, a związki (**136 i 140**) tworzyły stabilne kompleksy z gyrazą DNA i transglikozylazą z Lipid II, sugerując potencjał przeciwbakteryjny. Wyniki potwierdzają, że dimeryzacja kwasów żółciowych może prowadzić do powstania związków o obniżonej cytotoxyczności i nowej aktywności biologicznej [P3].

W ramach badań opracowano reakcje otrzymywania serii dwunastu nowych formylowanych koniugatów kwasów żółciowych zarówno dimerycznych jak i w połączeniu ze sterolami (**153–164**). Pośród otrzymanych związków pięć wykazało silną aktywność przeciwgrzybiczną, szczególnie związek (**159**) wobec *Fusarium culmorum* i *Botrytis cinerea*. Dokowanie molekularne potwierdziło zdolność tych związków do wiązania się z enzymem TRI5, kluczowym w biosyntezie mikotoksyn. Wyniki wskazują na możliwość wykorzystania formylowanych koniugatów steroidowych jako nowych inhibitorów szlaków grzybowych i potencjalnych środków ochrony roślin [P6].

Artykuły przeglądowe stanowią kompleksowe omówienie aktualnego stanu wiedzy na temat koniugatów steroidowych, obejmując zarówno ich syntezę, jak i szerokie spektrum właściwości

biologicznych oraz potencjalnych zastosowań. Szczególną uwagę poświęcono koniugatom otrzymywanym poprzez sprzężanie steroidów z różnymi fragmentami biologicznie aktywnymi, co umożliwia modulację ich aktywności farmakologicznej i biodostępności. Przedstawione dane jednoznacznie wskazują, że takie modyfikacje prowadzą do zwiększenia selektywności działania oraz ograniczenia toksyczności, co czyni koniugaty steroidowe obiecującą grupą związków w terapii chorób nowotworowych, zakaźnych i zapalnych, jak również w zastosowaniach agrochemicznych [P4].

W drugim artykule przeglądowym przedstawiono przekrojową analizę najnowszych odkryć w zakresie steroidów naturalnych pochodzenia morskiego i lądowego, ukazując ich niezwykle różnorodność strukturalną oraz bogactwo aktywności biologicznych. Wskazano, że związki zawierające grupy hydroksylowe, siarczanowe, karboksylowe i glikozydowe cechują się wyjątkowo wysoką aktywnością przeciwnowotworową, cytotoksyczną i immunomodulującą. Zwrócono uwagę na rosnącą rolę metod półsyntezy i biosyntezy w pozyskiwaniu nowych pochodnych, a także na potrzebę pogłębiania badań nad relacją struktura–aktywność. Artykuł ten podkreśla dynamiczny rozwój chemii i biologii steroidów naturalnych jako źródła inspiracji do projektowania nowych leków i związków bioaktywnych [P5].

Wyniki uzyskane w badaniach własnych stanowią istotny wkład w rozwój chemii koniugatów steroidowych, łącząc oryginalne podejście syntetyczne z kompleksową oceną ich potencjału biologicznego. Opracowane i zweryfikowane eksperymentalnie strategie syntezy umożliwiły otrzymanie nowych, strukturalnie zróżnicowanych pochodnych steroidowych o potwierdzonej budowie i korzystnym profilu biologicznym, obejmującym aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową przy jednoczesnym obniżeniu aktywności hemolitycznej. Uzyskane rezultaty nie tylko poszerzają aktualny stan wiedzy w zakresie modyfikacji steroidów, lecz również wyznaczają racjonalne kierunki dalszych badań nad selektywnymi i bezpieczniejszymi układami bioaktywnymi o potencjalnych zastosowaniach w medycynie, biotechnologii i chemii materiałów. Znaczenie uzyskanych rezultatów potwierdza ich publikacja w recenzowanych czasopismach o międzynarodowym zasięgu oraz pozytywny odbiór środowiska naukowego. Przedstawione w pracy rozwiązania syntetyczne i wnioski biologiczne mogą stanowić punkt odniesienia dla dalszych badań nad modyfikacją steroidów o ukierunkowanej aktywności. Dla zachowania spójności pomiędzy numeracją związków w publikacjach a w niniejszej rozprawie, w Tabeli 11 zestawiono odpowiednie oznaczenia (NrA i NrP).

Tabela 11. Wykaz numeracji związków w artykułach naukowych (NrA) w porównaniu z obowiązującymi w pracy (NrP).

Artykuły					
P2		P3		P6	
NrA	NrP	NrA	NrP	NrA	NrP
1	19	1	19	1	19
2	20	2	20	2	20
3	2	3	2	3	2
4	119	4	130	4	130
5	120	5	131	5	145
6	121	6	132	6	146
7	1	7	119	7	119
8	17	8	120	8	147
9	122	9	121	9	148
10	123	10	133	10	133
11	124	11	134	11	151
12	125	12	135	12	152
13	126	13	136	13	1
14	127	14	137	14	17
15	128	15	138	15	149
16	129	16	139	16	150
–	–	17	140	17	153
–	–	18	141	18	154
–	–	19	142	19	155
–	–	20	143	20	156
–	–	21	144	21	157
–	–	–	–	22	158
–	–	–	–	23	159
–	–	–	–	24	160
–	–	–	–	25	161
–	–	–	–	26	162
–	–	–	–	27	163
–	–	–	–	28	164

Bibliografia

- [1] Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach* 3rd Ed., John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, **2009**, 232–285.
- [2] Dembitsky, V. M. Biological Activity and Structural Diversity of Steroids Containing Aromatic Rings, Phosphate Groups, or Halogen Atoms. *Molecules* **2023**, 28(14), 5549.
- [3] Morzycki, J. W. Recent Advances in Cholesterol Chemistry. *Steroids* **2014**, 83, 62–79.
- [4] Albuquerque, H. M.; Santos, C. M.; Silva, A. M. Cholesterol-Based Compounds: Recent Advances in Synthesis and Applications. *Molecules* **2018**, 24(1), 116.
- [5] Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. Chemistry and Biology of Bile Acids. *Curr. Sci.* **2004**, 87, 1666–1683.
- [6] Blickenstaff, R. T.; Ghosh, A. C.; Wolf, G. C. Total Synthesis of Steroids. *Organic Chemistry: A Series of Monographs*, Vol. 30. Academic Press: Cambridge, MA, USA, **2013**, 1-34.
- [7] Paryzek, Z.; Piasecka, M.; Pospieszny, T.; Skiera, I. *Steroidy. Wybrane Zagadnienia i Ćwiczenia*. Wydawnictwo Naukowe UAM: Poznań, Poland, **2011**, 13–32, 51–69, 83–88, 137–159.
- [8] Kołodziejczyk, A. *Naturalne Związki Organiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, Poland, **2003**, 467.
- [9] Stryer, L. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, Polska, **2019**, 355–381, 807–843.
- [10] Samadi, A.; Sabuncuoglu, S.; Samadi, M.; Isikhan, S. Y.; Chirumbolo, S.; Peana, M.; Lay, I.; Yalcinkaya, A.; Bjørklund, G. A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2021**, 28, 110–136.
- [11] Wang, H.; Abe, I. Recent Developments in the Enzymatic Modifications of Steroid Scaffolds. *Org. Biomol. Chem.* **2024**, 22, 3559–3583.
- [12] Swizdor, A.; Kolek, T.; Panek, A.; Milecka, N. Selective Modifications of Steroids Performed by Oxidative Enzymes. *Curr. Org. Chem.* **2012**, 16, 2551–2582.
- [13] Goad, J.; Akihisa, T. *Analysis of Sterols*. Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, **2012**, 2–3.
- [14] Szymańska, R.; Kruk, J. Fitosterole–Występowanie i Znaczenie dla Człowieka. *Kosmos* **2007**, 56, 107–114.
- [15] Leśniarek, A.; Grudniewska, A.; Gładkowski, W. Sterole Roślinne. Charakterystyka i Metody Analizy. *Przem. Chem.* **2017**, 9, 1935–1938.
- [16] Podgórska, I.; Solarska, E. Sterole Roślinne w Żywieniu i Przemysle Spożywczym. *Przem. Spoż.* **2017**, 71, 34–36.
- [17] Nowak, A. Fitosterole w Codziennej Diecie. *Postępy Fitoter.* **2011**, 1, 48–51.
- [18] Risley, J. M. Cholesterol Biosynthesis: Lanosterol to Cholesterol. *J. Chem. Educ.* **2002**, 79, 377.

- [19] Kuwabara, N.; Ohta-Shimizu, M.; Fuwa, F.; Tomitsuka, E.; Sato, S.; Nakagawa, S. Ergosterol Increases 7-Dehydrocholesterol, a Cholesterol Precursor, and Decreases Cholesterol in Human HepG2 Cells. *Lipids*, **2022**, 57(6), 303–311.
- [20] Zampelas, A.; Magriplis, E. New Insights into Cholesterol Functions: A Friend or an Enemy? *Nutrients* **2019**, 11, 1645.
- [21] Glover, M.; Glover, J.; Morton, R. A. Provitamin D3 in Tissues and the Conversion of Cholesterol to 7-Dehydrocholesterol in Vivo. *Biochem. J.* **1952**, 51(1), 1–9.
- [22] Grundy, S. M. Cholesterol and Coronary Heart Disease: A New Era. *JAMA* **1986**, 256(20), 2849–2858.
- [23] Holmes, M. V.; Ala-Korpela, M. What Is ‘LDL Cholesterol’? *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, 16, 197–198.
- [24] Martin, S. S.; Blumenthal, R. S.; Miller, M. LDL Cholesterol: The Lower the Better. *Med. Clin.* **2012**, 96(1), 13–26.
- [25] Tabas, I. Cholesterol in Health and Disease. *J. Clin. Invest.* **2002**, 110(5), 583–590.
- [26] Jira, P. Cholesterol Metabolism Deficiency. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 113; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2013**, 1845–1850.
- [27] Lorico, A.; Santos, M. F.; Karbanová, J.; Corbeil, D. Extracellular Membrane Particles en Route to the Nucleus – Exploring the VOR Complex. *Biochem. Soc. Trans.* **2025**, 53(3), 529–546.
- [28] Sułkowska-Ziaja, K.; Hałaszuk, P.; Mastej, M.; Piechaczek, M.; Muszyńska, B. Mycosteroles – Characteristics and Biological Importance. *Med. Int. Rev.* **2021**, 27(1), 26–34.
- [29] Scalese, G.; Mosquillo, M. F.; Pérez-Díaz, L.; Gambino, D. Biosynthesis of Ergosterol as a Relevant Molecular Target of Metal-Based Antiparasitic and Antifungal Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2024**, 503, 215608.
- [30] Müller, C.; Staudacher, V.; Krauss, J.; Giera, M.; Bracher, F. A Convenient Cellular Assay for the Identification of the Molecular Target of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors and Quantification of Their Effects on Total Ergosterol Biosynthesis. *Steroids* **2013**, 78(5), 483–493.
- [31] Quail, M. A.; Kelly, S. L. The Extraction and Analysis of Sterols from Yeast. In *Yeast Protocols*; Evans, I. H., Ed.; Methods in Molecular Biology, Vol. 53; Humana Press: Totowa, NJ, USA, **1996**, 123–131.
- [32] Zinser, E.; Paltauf, F.; Daum, G. Sterol Composition of Yeast Organelle Membranes and Subcellular Distribution of Enzymes Involved in Sterol Metabolism. *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 2853–2858.
- [33] Harmouch, N.; Coulon, J.; Bonaly, R. Identification of 24-Methylene-24,25-Dihydrolanosterol as a Precursor of Ergosterol in the Yeasts *Schizosaccharomyces pombe* and *Schizosaccharomyces octosporus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 134(2–3), 147–152.
- [34] Nes, W. R.; Sekula, B. C.; Nes, W. D.; Adler, J. H. The Functional Importance of Structural Features of Ergosterol in Yeast. *J. Biol. Chem.* **1978**, 253(17), 6218–6225.
- [35] Göring, H. Vitamin D in Nature: A Product of Synthesis and/or Degradation of Cell Membrane Components. *Biochem (Mosc)* **2018**, 83(11), 1350–1357.

- [36] Carrillo-Munoz, A. J.; Quindos, G.; Tur, C.; Ruesga, M. T.; Miranda, Y.; Valle, O. D.; Wallace, T. L. In Vitro Antifungal Activity of Liposomal Nystatin in Comparison with Nystatin, Amphotericin B Cholesteryl Sulphate, Liposomal Amphotericin B, Amphotericin B Lipid Complex, Amphotericin B Desoxycholate, Fluconazole and Itraconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, 44(3), 397–401.
- [37] Jones, P. J. H.; Shamloo, M.; MacKay, D. S.; Rideout, T. C.; Myrie, S. B.; Plat, J.; Rouillet, J.-B.; Baer, D. J.; Calkins, K. L.; Davis, H. R.; Duell, P. B.; Ginsberg, H.; Gylling, H.; Jenkins, D.; Lütjohann, D.; Moghadasian, M.; Moreau, R. A.; Mymin, D.; Ostlund, R. E.; Ras, R. T.; Ochoa Reparaz, J.; Trautwein, E. A.; Turley, S.; Vanmierlo, T.; Weingärtner, O. Progress and Perspectives in Plant Sterol and Plant Stanol Research. *Nutr. Rev.* **2018**, 76(10), 725–746.
- [38] Piironen, V.; Lindsay, D. G.; Miettinen, T. A.; Toivo, J.; Lampi, A. M. Plant Sterols: Biosynthesis, Biological Function and Their Importance to Human Nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80(7), 939–966.
- [39] Neelakandan, A. K.; Chamala, S.; Valliyodan, B.; Nes, W. D.; Nguyen, H. T. Metabolic Engineering of Soybean Affords Improved Phytosterol Seed Traits. *Plant Biotechnol. J.* **2012**, 10(1), 12–19.
- [40] Seyama, Y. Cholesterol Metabolism, Molecular Pathology, and Nutritional Implications. *J. Med. Food* **2003**, 6(3), 217–224.
- [41] Juste, C.; Gérard, P. Cholesterol-to-Coprostanol Conversion by the Gut Microbiota: What We Know, Suspect, and Ignore. *Microorganisms* **2021**, 9(9), 1881.
- [42] Aydoğan, D.; Yurdun, T. Determination of Selected Steroid Compounds in Sediment Samples from Golden Horn Estuary (the Sea of Marmara, Turkey) Using LC-ESI/MS-MS. *J. Black Sea/Medit. Environ.* **2021**, 27(3), 342–364.
- [43] Alrefai, W. A.; Gill, R. K. Bile Acid Transporters: Structure, Function, Regulation and Pathophysiological Implications. *Pharm. Res.* **2007**, 24(10), 1803–1823.
- [44] Vessey, D. A. The Biochemical Basis for the Conjugation of Bile Acids with Either Glycine or Taurine. *Biochem. J.* **1978**, 174(2), 621–626.
- [45] Nurunnabi, M.; Khatun, Z.; Revuri, V.; Nafiujjaman, M.; Cha, S.; Cho, S.; Huh, K. M.; Lee, Y.-K. Design and Strategies for Bile Acid Mediated Therapy and Imaging. *RSC Adv.* **2016**, 6, 73986–74002.
- [46] Maitra, U. Unlocking the Potential of Bile Acids in Synthesis, Supramolecular/Materials Chemistry and Nanoscience. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6(4), 657–669.
- [47] Tamminen, J.; Kolehmainen, E. Bile Acids as Building Blocks of Supramolecular Hosts. *Molecules* **2001**, 6(1), 21–46.
- [48] Virtanen, E.; Kolehmainen, E. Use of Bile Acids in Pharmacological and Supramolecular Applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2004(16), 3385–3399.
- [49] Di Ciaula, A.; Garruti, G.; Baccetto, R. L.; Molina-Molina, E.; Bonfrate, L.; Portincasa, P.; Wang, D. Q. Bile Acid Physiology. *Ann. Hepatol.* **2018**, 16(1), 4–14.

- [50] Katafuchi, T.; Makishima, M. Molecular Basis of Bile Acid-FXR-FGF15/19 Signaling Axis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23(11), 6046.
- [51] Kliewer, S. A.; Mangelsdorf, D. J. Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig. Dis.* **2015**, 33(3), 327–331.
- [52] Shin, D. J.; Wang, L. Bile Acid-Activated Receptors: A Review on FXR and Other Nuclear Receptors. In *Bile Acids and Their Receptors*; Springer: Cham, Switzerland, **2019**, 51–72.
- [53] Thomas, C.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. Bile Acids and the Membrane Bile Acid Receptor TGR5—Connecting Nutrition and Metabolism. *Thyroid* **2008**, 18(2), 167–174.
- [54] Chiang, J. Y.; Ferrell, J. M. Bile Acid Receptors FXR and TGR5 Signaling in Fatty Liver Diseases and Therapy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2020**, 318(3), 554–573.
- [55] Lerch, M. M.; Aghdassi, A. A. The Role of Bile Acids in Gallstone-Induced Pancreatitis. *Gastroenterol.* **2010**, 138(2), 429–433.
- [56] Ng, J. J. J.; Loo, W. M.; Siah, K. T. H. Associations Between Irritable Bowel Syndrome and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *World J. Hepatol.* **2023**, 15(7), 925–944.
- [57] Evangelakos, I.; Heeren, J.; Verkade, E.; Kuipers, F. Role of Bile Acids in Inflammatory Liver Diseases. In *Seminars in Immunopathology*; Springer: Berlin/Heidelberg, **2021**, 43(4), 577–590.
- [58] Kowdley, K. V.; Luketic, V.; Chapman, R.; Hirschfield, G. M.; Poupon, R.; Schramm, C.; Obeticholic Acid PBC Monotherapy Study Group. A Randomized Trial of Obeticholic Acid Monotherapy in Patients with Primary Biliary Cholangitis. *Hepatol.* **2018**, 67(5), 1890–1902.
- [59] Jhaveri, M. A.; Kowdley, K. V. New Developments in the Treatment of Primary Biliary Cholangitis - Role of Obeticholic Acid. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2017**, 13, 1053–1060.
- [60] Nakagawa, S.; Makino, I.; Ishizaki, T.; Dohi, I. Dissolution of Cholesterol Gallstones by Ursodeoxycholic Acid. *Lancet* **1977**, 310(8034), 367–369.
- [61] Ramalho, R. M.; Viana, R. J.; Low, W. C.; Steer, C. J.; Rodrigues, C. M. Bile Acids and Apoptosis Modulation: An Emerging Role in Experimental Alzheimer's Disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, 14(2), 54–62.
- [62] Kusaczuk, M. Tauroursodeoxycholate - Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells* **2019**, 8(12), 1471.
- [63] Kaur, K. K.; Allahbadia, G. N.; Singh, M. An Update on Role of Bile Acids in Neurological Functions and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. *J. Clin. Biomed. Invest.* **2023**, 3(2), 22–39.
- [64] Cepa, M. M. D. S.; Tavares da Silva, E. J.; Correia-da-Silva, G.; Roleira, F. M. F.; Teixeira, N. A. A. Structure–Activity Relationships of New A,D-Ring Modified Steroids as Aromatase Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Activity Evaluation. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6379–6385.
- [65] Wojtkielewicz, A.; Majewski, A. D.; Łotowski, Z. Recent Progress in Steroid C(sp³)–H Functionalization. *Chem. Rec.* **2024**, 24, e202400150.
- [66] Abas, H.; Blencowe, P.; Brookfield, J. L.; Harwood, L. A. Selective Hydroxylation of C(sp³)–H Bonds in Steroids. *Chem. Eur. J.* **2023**, 29, e202301066.

- [67] Zach, T. L.; Herrman, V. A.; Hill, L. D.; Leuschen, M. P. Effect of Steroids on the Synthesis of Complement C3 in a Human Alveolar Epithelial Cell Line. *Exp. Lung Res.* **1993**, *19*, 603–616.
- [68] Kolhatkar, V.; Polli, J. E. Structural Requirements of Bile Acid Transporters: C-3 and C-7 Modifications of Steroidal Hydroxyl Groups. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *46*, 86–99.
- [69] Lednicer, D. *Steroid Chemistry at a Glance*; John Wiley & Sons: Chichester, **2011**, 37–45.
- [70] Chen, F.; Topf, C.; Radnik, J.; Kreyenschulte, C.; Lund, H.; Schneider, M.; Surkus, A.-E.; He, L.; Junge, K.; Beller, M. Stable and Inert Cobalt Catalysts for Highly Selective and Practical Hydrogenation of C≡N and C=O Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8781–8788.
- [71] Dembitsky, V. M. Steroids Bearing Heteroatom as Potential Drugs for Medicine. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2698.
- [72] Bradlow, H. L.; Telang, N. T.; Sepkovic, D. W.; Osborne, M. P. 2-Hydroxyestrone: The 'Good' Estrogen. *J. Endocrinol.* **1996**, *150*, 259–265.
- [73] Schneider, J.; Huh, M. M.; Bradlow, H. L.; Fishman, J. Antiestrogen Action of 2-Hydroxyestrone on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4840–4845.
- [74] Kotha, S.; Solanke, B. U.; Agarwala, P. K.; Kapoor, S. Design and Synthesis of Hetero-Steroids via Ring-Closing Metathesis: Biological Studies towards *In Vitro* Anticancer Activity. *Steroids* **2022**, *188*, 109119.
- [75] Fujihara, T.; Semba, K.; Terao, J.; Tsuji, Y. Copper-Catalyzed Hydrosilylation with a Bowl-Shaped Phosphane Ligand: Preferential Reduction of a Bulky Ketone in the Presence of an Aldehyde. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1472–1476.
- [76] Li, P. K.; Pillai, R.; Dibbelt, L. Estrone Sulfate Analogs as Estrone Sulfatase Inhibitors. *Steroids* **1995**, *60*, 299–306.
- [77] Skoda-Földes, R.; Horváth, J.; Tuba, Z.; Kollár, L. Homogeneous Coupling and Carbonylation Reactions of Steroids Possessing Iodoalkene Moieties: Catalytic and Mechanistic Aspects. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *586*, 94–100.
- [78] Ács, P.; Müller, E.; Czira, G.; Mahó, S.; Perreira, M.; Kollár, L. Facile Synthesis of 12-Carboxamido-11-Spirostenes via Palladium-Catalyzed Carbonylation Reactions. *Steroids* **2006**, *71*, 875–879.
- [79] Ács, P.; Takács, A.; Szilágyi, A.; Wölfling, J.; Schneider, G.; Kollár, L. The Synthesis of 17-Alkoxy-carbonyl- and 17-Carboxamido-13 α -Estra-1,3,5(10),16-Tetraene Derivatives via Palladium-Catalyzed Carbonylation Reactions. *Steroids* **2008**, *73*, 669–675.
- [80] Crabbe, P.; Leon, C. Novel Dehydration Reaction of Steroidal Alcohols. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2594–2596.
- [81] Parra, A.; Lopez, P. E.; Garcia-Granados, A. Different Pathways for the Deoxygenation of the A-Ring of Natural Triterpene Compounds. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 177–196.
- [82] Goldkamp, A. H.; Hoehn, W. M.; Mikulec, R. A.; Nutting, E. F.; Cook, D. L. The Preparation and Pharmacology of Some 3-Desoxyestratrienes: Lipid-Shifting and Estrogenic Effects. *J. Med. Chem.* **1965**, *8*, 409–414.

- [83] Chen, H.; Huang, Z.; Hu, X.; Tang, G.; Xu, P.; Zhao, Y.; Cheng, C.-H. Nickel-Catalyzed Cross-Coupling of Aryl Phosphates with Arylboronic Acids. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2338–2344.
- [84] Lednicer, D. *Steroid Chemistry at a Glance*; John Wiley & Sons: Chichester, **2011**, 69–76.
- [85] Chen, W.; Tsai, S. J.; Sheu, H. M.; Tsai, J. C.; Zouboulis, C. C. Testosterone Synthesized in Cultured Human SZ95 Sebocytes Derives Mainly from Dehydroepiandrosterone. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, 470–472.
- [86] Stárka, L.; Dušková, M.; Hill, M. Dehydroepiandrosterone: A Neuroactive Steroid. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *145*, 254–260.
- [87] Klinge, C. M.; Clark, B. J.; Prough, R. A. Dehydroepiandrosterone Research: Past, Current, and Future. *Vitam. Horm.* **2018**, *108*, 1–28.
- [88] Raheja, M. C.; Lucis, O. J. Role of Dehydroepiandrosterone and Its Sulphate in Synthesis of Testosterone by Human Testes *in Vivo* and *In Vitro*. *J. Endocrinol.* **1970**, *46*, 21–28.
- [89] Mamoli, L.; Vercellone, A. Biochemische Umwandlung von Δ^5 -Androstendion in Isoandrostandiol und Δ^4 -Testosteron. Weiterer Beitrag zur Genese der Keimdrüsenhormone. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1937**, *70*, 2079–2082.
- [90] Meyer, C. C.; Ortiz, E.; Krische, M. J. Catalytic Reductive Aldol and Mannich Reactions of Enone, Acrylate, and Vinyl Heteroaromatic Pronucleophiles. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 3721–3748.
- [91] Córdova, A. The Direct Catalytic Asymmetric Mannich Reaction. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 102–112.
- [92] Djerassi, C.; Finch, N.; Cookson, R. C.; Bird, C. W. Optical Rotatory Dispersion Studies. XXXVI. α -Haloketones (Part 7): Demonstration of Boat Form in the Bromination of 2α -Methylcholestan-3-one. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5488–5493.
- [93] Breslow, R.; Corcoran, R. J.; Snider, B. B.; Doll, R. J.; Khanna, P. L.; Kaleya, R. Selective Halogenation of Steroids Using Attached Aryl Iodide Templates. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 905–915.
- [94] Ravasio, N.; Rossi, M. Selective Hydrogenations Promoted by Copper Catalysts. 1. Chemoselectivity, Regioselectivity, and Stereoselectivity in the Hydrogenation of 3-Substituted Steroids. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4329–4333.
- [95] Kutney, J. P.; Piotrowska, K.; Somerville, J.; Huang, S.-P.; Rettig, S. J. The Chemistry of Thujone. XIII. Synthetic Studies in the Digitoxigenin Series. *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 580–589.
- [96] Gauthier, J.; Poirier, D.; Ayotte, C. Characterization of Desoxymethyltestosterone Main Urinary Metabolite Produced from Cultures of Human Fresh Hepatocytes. *Steroids* **2012**, *77*, 635–643.
- [97] Ferraboschi, P.; Colombo, D.; Prestileo, P. A Convenient Synthesis of Oxandrolone through a Regioselective *Candida antarctica* Lipase-Catalyzed Transformation. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2781–2785.
- [98] Lednicer, D. *Steroid Chemistry at a Glance*; John Wiley & Sons: Chichester, **2011**, 77–94.

- [99] Iriarte, J.; Ringold, H. J.; Djerassi, C. Steroids. XCIX. Synthesis of Ring B Oxygenated Estrogens. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6105–6108.
- [100] Campbell, J. A.; Babcock, J. C.; Hogg, J. A. 6-Methyl Steroids in the Androstane Series. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4717–4721.
- [101] Li, G.; Li, F.; Deng, L.; Fang, X.; Zou, H.; Xu, K.; Li, T.; Tan, G. Increased Yield of Biotransformation of Exemestane with β -Cyclodextrin Complexation Technique. *Steroids* **2013**, *78*, 1148–1151.
- [102] Jiangxi Ganliang Pharmaceutical Raw Materials. Method for the Preparation of Steroidal Compounds. CN104327142B, **2016** (23).
- [103] Guangxi Wonder Pharmaceutical. Method for the Preparation of Steroidal Compounds. CN108084238A, **2018**, *27*, 30-36.
- [104] Campbell, J. A.; Babcock, J. C. The Synthesis of Some 7α - and 7β -Methyl Steroid Hormones. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4069–4074.
- [105] Kürti, L.; Czakó, B.; Corey, E. J. A Short, Scalable Synthesis of the Carbocyclic Core of the Anti-Angiogenic Cortistatins from (+)-Estrone by B-Ring Expansion. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5247–5250.
- [106] Annamalai, M.; Hristeva, S.; Bielska, M.; Ortega, R.; Kumar, K. Highly Stereoselective Synthesis of a Compound Collection Based on the Bicyclic Scaffolds of Natural Products. *Molecules* **2017**, *22*, 827.
- [107] Yin, Y.-Z.; Liu, C.; Tang, L.-Q.; Liu, Z.-P. Recoverable Pd/C Catalyst Mediated Dehydrogenation of Sterols and an Improved Synthesis of 1α -Hydroxydehydroepiandrosterone. *Steroids* **2012**, *77*, 1419–1422.
- [108] Fetizon, M.; Goulaouic, P.; Hanna, I. Chemistry of Dihydro-1,4-Dioxin III: A New Method for the Preparation of α, α' -Dihydroxy Ketones from Ketones and Aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4925–4928.
- [109] Sun, C.-L.; Wang, Y.; Zhou, X.; Wu, Z.-H.; Li, B.-J.; Guan, B.-T.; Shi, Z.-J. Construction of Polysubstituted Olefins through Ni-Catalyzed Direct Activation of Alkenyl C–O of Substituted Alkenyl Acetates. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5844–5847.
- [110] Leeds, N. S.; Fukushima, D. K.; Gallagher, T. F. Studies of Steroid Ring D Epoxides of Enol Acetates: A New Synthesis of Estriol and of Androstane- $3\beta, 16\alpha, 17\beta$ -Triol. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 2943–2948.
- [111] Schweder, B.; Uhlig, E. Synthese von Δ^{16-17} (Trialkylstannyl)steroiden aus 17-Ketosteroiden. II. *J. Prakt. Chem.* **1991**, *333*, 223–228.
- [112] Gui, R.; Alaghemand, F.; Khaliullin, R. Z.; Li, C.-J. En Route to Direct Cross-Coupling between Carbonyl Derivatives and Allyl Alcohols via Hydrazones. *ACS Catal.* **2025**, *15*, 5943–5953.
- [113] Fu, L.; Mighion, J. D.; Voight, E. A.; Davies, H. M. L. Synthesis of 2,2,2-Trichloroethyl Aryl- and Vinyldiazoacetates by Palladium-Catalyzed Cross-Coupling. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3272–3275.

- [114] Sage Therapeutics. Method for the Preparation of Steroidal Compounds. WO2013/36835A1, **2013**, 356.
- [115] Sage Therapeutics. Method for the Preparation of Steroidal Compounds. US2016/22701A1, **2016**, 528, 529-530.
- [116] Ravasio, N.; Gargano, M.; Rossi, M. Selective Hydrogenations Promoted by Copper Catalysts. 2. Hydrogen-Transfer Reactions Leading to Stereoselective Hydrogenation of Δ^5 -3 β -Sterols to 5 β -Derivatives. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1259–1261.
- [117] Ciceri, S.; Colombo, D.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Iannone, M.; Mori, M.; Meneghetti, F. Vecuronium Bromide and Its Advanced Intermediates: A Crystallographic and Spectroscopic Study. *Steroids* **2021**, *176*, 108928.
- [118] Merlani, M. I.; Davitishvili, M. G.; Nadaraia, N. S.; et al. Conversion of Epiandrosterone into 17 β -Amino-5 α -Androstane. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, *40*, 144–146.
- [119] Iriarte, J.; Rosenkranz, G.; Sondheimer, F. Steroids. LXV. A Synthesis of Androsterone. *J. Org. Chem.* **1955**, *20*, 542–545.
- [120] Chen, H.; Han, C.; Wu, J.; Liu, X.; Zhan, Y.; Chen, J.; Chen, Y.; Gu, R.; Zhang, L.; Chen, S.; Jia, J.; Zhen, X.; Zheng, L. T.; Jiang, B. Accessible Method for the Development of Novel Sterol Analogues with Dipeptide-like Side Chains That Act as Neuroinflammation Inhibitors. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 305–315.
- [121] Li, C.; Qiu, W.; Yang, Z.; Luo, J.; Yang, F.; Liu, M.; Xie, J.; Tang, J. Stereoselective Synthesis of Some Methyl-Substituted Steroid Hormones and Their In Vitro Cytotoxic Activity against Human Gastric Cancer Cell Line MGC-803. *Steroids* **2010**, *75*, 859–869.
- [122] Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; 4th ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, **2006**. 1–366, 431-646.
- [123] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*(11), 2004–2021.
- [124] Kacprzak, K. Click chemistry – a revolution in organic synthesis? *Wiad. Chem.* **2005**, *59*, 583.
- [125] Gontcharov, A. V.; Liu, H.; Sharpless, K. B. tert-Butylsulfonamide. A New Nitrogen Source for Catalytic Aminohydroxylation and Aziridination of Olefins. *Org. Lett.* **1999**, *1*(5), 783–786.
- [126] Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*(20), 3693–3695.
- [127] Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*(11), 633–645.
- [128] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*(14), 2596–2599.

- [129] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*(9), 3057–3064.
- [130] Liang, L.; Astruc, D. The Copper(I)-Catalyzed Alkyne–Azide Cycloaddition (CuAAC) “Click” Reaction and Its Applications. An Overview. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*(23–24), 2933–2945.
- [131] Hein, J. E.; Fokin, V. V. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC) and Beyond: New Reactivity of Copper(I) Acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*(4), 1302–1315.
- [132] Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. Ruthenium–Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(28), 8923–8930.
- [133] Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(46), 15998–15999.
- [134] Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287*(5460), 2007–2010.
- [135] Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*(1), 51–68.
- [136] Velázquez, S.; Alvarez, R.; Pérez, C.; Gago, F.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Regiospecific Synthesis and Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of Novel 5-Substituted N-Alkylcarbamoyl and N,N-Dialkyl Carbamoyl 1,2,3-Triazole-TSAO Analogues. *Antivir. Chem. Chemother.* **1998**, *9*(6), 481–489.
- [137] Genin, M. J.; Allwine, D. A.; Anderson, D. J.; Barbachyn, M. R.; Emmert, D. E.; Garmon, S. Substituent Effects on the Antibacterial Activity of Nitrogen–Carbon-Linked (Azolylphenyl)oxazolidinones with Expanded Activity Against the Fastidious Gram-Negative Organisms *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*(5), 953–970.
- [138] Buckle, D. R.; Rockell, C. J. M.; Smith, H.; Spicer, B. A. Studies on 1,2,3-Triazoles. 13. (Piperazinylalkoxy)-[1]benzopyrano[2,3-d]-1,2,3-Triazol-9(1H)-ones with Combined H1-Antihistamine and Mast Cell Stabilizing Properties. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*(11), 2262–2267.
- [139] Kim, D. K.; Kim, J.; Park, H. J. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-Pyridinyl-[1,2,3]triazoles as Inhibitors of Transforming Growth Factor β 1 Type 1 Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*(10), 2401–2405.
- [140] Dabak, K.; Sezer, Ö.; Akar, A.; Anaç, O. Synthesis and Investigation of Tuberculosis Inhibition Activities of Some 1,2,3-Triazole Derivatives. *J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 215–218.
- [141] Pospieszny, T.; Koenig, H.; Kowalczyk, I.; Brycki, B. Synthesis, Spectroscopic and Theoretical Studies of New Quasi-Podands from Bile Acid Derivatives Linked by 1,2,3-Triazole Rings. *Molecules* **2014**, *19*, 2557–2570.

- [142] Kumar, A.; Chhatra, R. K.; Pandey, P. S. Synthesis of Click Bile Acid Polymers and Their Application in Stabilization of Silver Nanoparticles Showing Iodide Sensing Property. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 24–27.
- [143] Luo, J.; Chen, Y.; Zhu, X. X. Highly Efficient Synthesis and Inclusion Properties of Star-Shaped Amphiphilic Derivatives of Cholic Acid. *Synlett* **2007**, *14*, 2201–2204.
- [144] Zhang, Z.; Ju, Y.; Zhao, Y. Synthesis of 1,2,3-Triazole-Containing Bile Acid Dimers and Properties of Inverse Micellar Mimic. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 1450–1451.
- [145] Vatmurge, N. S.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Shirazi, F.; Chavan, P. S.; Deshpande, M. V. Synthesis and Antimicrobial Activity of β -Lactam–Bile Acid Conjugates Linked via Triazole. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2043–2047.
- [146] Lesma, G.; Luraghi, A.; Bavaro, T.; Bortolozzi, R.; Rainoldi, G.; Roda, G.; Viola, G.; Ubiali, D.; Silvani, A. Phytosterol and γ -Oryzanol Conjugates: Synthesis and Evaluation of Their Antioxidant, Antiproliferative, and Anticholesterol Activities. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81* (10), 2212–2221.
- [147] Malyarenko, T.; Kicha, A.; Malyarenko, O.; Zakharenko, V.; Kotlyarov, I.; Kalinovsky, A.; Popov, R.; Svetashev, V.; Ivanchina, N. New Conjugates of Polyhydroxysteroids with Long-Chain Fatty Acids from the Deep-Water Far Eastern Starfish *Ceramaster patagonicus* and Their Anticancer Activity. *Mar. Drugs* **2020**, *18* (10), 514.
- [148] Sangar, M.; Girard, E.; Hopping, G.; Yin, C.; Pakiam, F.; Brusniak, M.; Nguyen, E.; Ruff, R.; Gewe, M.; Byrnes-Blake, K.; Nairn, N.; Miller, D.; Mehlin, C.; Strand, A.; Mhyre, A.; Correnti, C.; Strong, R.; Simon, J.; Olson, J. A Potent Peptide–Steroid Conjugate Accumulates in Cartilage and Reverses Arthritis without Evidence of Systemic Corticosteroid Exposure. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12* (571), 1041.
- [149] Neugebauer, W.; Côté, J.; Fortier, A.; Bkaily, G.; Avedanian, L.; Jaques, D.; Gobeil, F. Steroid–Peptide Conjugates. *Adv. Protein Chem.* **2006**, *72*, 120–121.
- [150] Funk, D.; Schrenk, H. H.; Frei, E. Development of a Novel Polyethylene Glycol–Corticosteroid Conjugate with an Acid-Cleavable Linker. *J. Drug Target.* **2011**, *19*, 434–445.
- [151] Bayard, F. J. C.; Thielemans, W.; Pritchard, D. I.; Paine, S. W.; Young, S. S.; Bäckman, P.; Ewing, P.; Bosquillon, C. Polyethylene Glycol–Drug Ester Conjugates for Prolonged Retention of Small Inhaled Drugs in the Lung. *J. Control. Release* **2013**, *171*, 234–240..
- [152] Dao, K.-L.; Hanson, R. N. Targeting the Estrogen Receptor Using Steroid–Therapeutic Drug Conjugates (Hybrids). *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 2139–2158.
- [153] Vítků, J.; Hampl, R. Steroid Conjugates and Their Physiological Role. *Physiol. Res.* **2023**, *72*, 317–322.
- [154] Moore, K.; Wehrli, S.; Roder, H.; Rogers, M.; Forrest, J.; McCrimmon, D.; Zasloff, M. Squalamine: An Aminosterol Antibiotic from the Shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 1354–1358.
- [155] Kikuchi, K.; Bernard, E.; Sadownik, A.; Regen, S.; Armstrong, D. Antimicrobial Activities of Squalamine Mimics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1433–1438.

- [156] Williams, J.; Weitman, S.; Gonzalez, C.; Jundt, C.; Marty, J.; Stringer, S.; Holroyd, K.; McLane, M.; Chen, Q.; Zasloff, M.; Hoff, D. Squalamine Treatment of Human Tumors in Nu/Nu Mice Enhances Platinum-Based Chemotherapies. *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7 (3), 724–733.
- [157] Corrales, R. C. N. R.; de Souza, N. B.; Pinheiro, L. S.; Abramo, C.; Coimbra, E. S.; Da Silva, A. D. Thiopurine Derivatives Containing Triazole and Steroid: Synthesis, Antimalarial and Antileishmanial Activities. *Biomed. Pharmacother.* **2011**, 65, 198–203.
- [158] Singla, P.; Salunke, D. B. Recent Advances in Steroid Amino Acid Conjugates: Old Scaffolds with New Dimensions. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 187, 111990.
- [159] Pore, V. S.; Aher, N. G.; Kumar, M.; Shukla, P. K. Design and Synthesis of Fluconazole/Bile Acid Conjugate Using Click Reaction. *Tetrahedron* **2006**, 62, 11178–11186.
- [160] Savage, P. B. Design, Synthesis and Characterization of Cationic Peptide and Steroid Antibiotics. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 5, 759–768.
- [161] Savage, P. B.; Li, C.; Taotafa, U.; Ding, B.; Guan, Q. Antibacterial Properties of Cationic Steroid Antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, 217, 1–7.
- [162] Vaara, M.; Vaara, T. Sensitization of Gram-Negative Bacteria to Antibiotics and Complement by a Nontoxic Oligopeptide. *Nature* **1983**, 303, 526–528.
- [163] Davis, A. P.; Perry, J. J.; Williams, R. P. Anion Recognition by Tripodal Receptors Derived from Cholic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1793–1794.
- [164] Schmidt, E. J.; Boswell, S. R.; Walsh, J. P.; Schellenberg, M. M.; Winter, T. W.; Li, C.; Allman, G. W.; Savage, P. B. Activities of Cholic Acid-Derived Antimicrobial Agents against Multidrug-Resistant Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, 47, 671–674.
- [165] Ortin, S.; Basseur, K.; Morin, N.; Asselin, É.; Bérubé, G. New Platinum(II) Complexes Conjugated at Position 7 α of 17 β -Acetyl-Testosterone as New Combi-Molecules against Prostate Cancer: Design, Synthesis, Structure–Activity Relationships and Biological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 68, 433–443.
- [166] Jin, J. M.; Zhang, Y. J.; Li, H. Z.; Yang, C. R. Cytotoxic Steroidal Saponins from *Polygonatum Zanzlanianense*. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1992–1995.
- [167] Yang, M. F.; Li, Y. Y.; Gao, X. P.; Li, B. G.; Zhang, G. L. Steroidal Saponins from *Myriopterion Extensum* and Their Cytotoxic Activity. *Planta Med.* **2004**, 70, 556–560.
- [168] Bodnár, B.; Mernyák, E.; Szabó, J.; Wölfling, J.; Schneider, G.; Zupkó, I.; Kupihár, Z.; Kovács, L. Synthesis and In Vitro Investigation of Potential Antiproliferative Monosaccharide-D-Secoestrone Bioconjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 1938–1942.
- [169] Henrick, C. A. Juvenoids in Agrochemicals from Natural Products. In *Natural Products in Agrochemicals*; Godfrey, C. R. A., Ed.; Dekker: New York, **1995**; 147–213.
- [170] Jurček, O.; Wimmer, Z.; Bennettová, B.; Moravcová, J.; Drasar, P.; Saman, D. Novel Juvenogens (Insect Hormonogenic Agents): Preparation and Biological Tests on *Neobellieria bullata*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 10852–10858.

- [171] Bjelaković, M. S.; Kop, T. J.; Vlajić, M.; Đorđević, J.; Milić, D. R. Design, Synthesis, and Characterization of Fullerene-Peptide-Steroid Covalent Hybrids. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 8564–8570.
- [172] Jurček, O.; Wimmer, Z.; Svobodová, H.; Bennettová, B.; Kolehmainen, E.; Drášar, P. Preparation and Preliminary Biological Screening of Cholic Acid Juvenoid Conjugates. *Steroids* **2009**, *74*, 779–785.
- [173] Svobodová, H.; Ryšavá, H.; Pavlík, M.; Šaman, D.; Drášar, P.; Wimmer, Z. Steroid Conjugates: Synthesis and Preliminary Biological Testing of Pro-Juvenoids. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8194–8203.
- [174] Romero-Hernandez, L. L.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Vega-Báez, J. L.; Abasolo, I.; Schwartz, S. Jr.; Lopez, O.; Fernandez-Bolanos, J. G. Diosgenin-Based Thio(seleno)ureas and Triazolylglycoconjugates as Hybrid Drugs: Antioxidant and Antiproliferative Profile. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *99*, 67–81.

Streszczenie

Otrzymywanie nowych koniugatów steroidowych o potencjalnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych

mgr inż. Grzegorz Hajdaś

Promotor: prof. dr hab. Tomasz Pospieszny

Promotor pomocnicza: dr inż. Hanna Koenig

Praca doktorska koncentruje się na projektowaniu, syntezie oraz charakterystyce spektroskopowej nowych koniugatów steroidowych otrzymanych w wyniku reakcji typu „click”. Celem badań było opracowanie i zbadanie właściwości biologicznych pochodnych kwasów żółciowych i steroli połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym, stanowiących potencjalne związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Rozprawa obejmuje część literaturową, w której omówiono tło teoretyczne i aktualny stan badań nad modyfikacjami chemicznymi steroidów, oraz część eksperymentalną poświęconą otrzymaniu i analizie nowych koniugatów steroidowych.

W części literaturowej przedstawiono charakterystykę strukturalną i stereochemiczną steroidów oraz ich różnorodne funkcje biologiczne. Omówiono właściwości i znaczenie biologiczne steroli oraz kwasów żółciowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w metabolizmie lipidów i funkcjonowaniu błon komórkowych. Opisano także kierunki modyfikacji chemicznych cząsteczek steroidowych, obejmujące poszczególne pierścienie układu cyklopentanoperhydrofenantrenowego, oraz zastosowanie grup ochronnych w ich funkcjonalizacji. Szczególne miejsce poświęcono chemii „click” i reakcji Huisgena, które dzięki prostocie, wysokiej wydajności i selektywności umożliwiają tworzenie stabilnych koniugatów zawierających pierścień 1,2,3-triazolowy. Przeanalizowano znaczenie tego typu połączeń w projektowaniu biokoniugatów o potencjale terapeutycznym oraz przedstawiono przykłady koniugatów steroidowych.

Część badawcza obejmuje opracowanie strategii syntezy oraz analizę strukturalną nowych koniugatów steroidowych, w tym dwudziestu siedmiu o charakterze mieszanym i dimerycznym. Związki otrzymano w wyniku reakcji Huisgena katalizowanej jonami Cu(I), prowadzącej do powstania pierścienia triazolowego. Strukturę uzyskanych produktów potwierdzono za pomocą spektroskopii NMR, FT-IR i spektrometrii masowej (ESI-MS). Obliczenia kwantowo-mechaniczne (PM5) oraz badania *in silico* metodą PASS i dokowania molekularnego umożliwiły określenie ich stabilności oraz przewidywanych właściwości biologicznych.

W ramach badań własnych zsyntezowano szereg koniugatów o zróżnicowanej budowie i właściwościach. Otrzymane triazolowe pochodne steroidowe charakteryzowały się obniżoną aktywnością hemolityczną w porównaniu z substratami, a wybrane związki wykazywały wysokie powinowactwo do reduktazy HMG-CoA, co wskazuje na ich potencjał jako inhibitorów biosyntezy

cholesterolu. Dimeryczne koniugaty kwasów żółciowych wykazały większą stabilność energetyczną i niższą cytotoksyczność, a wyniki dokowania potwierdziły ich zdolność do oddziaływania z gyrazą DNA i transglikozylazą Lipid II. Opracowano również serię formylowanych koniugatów kwasów żółciowych i steroli, spośród których kilka wykazało znaczną aktywność przeciwgrzybiczną wobec *Fusarium culmorum* i *Botrytis cinerea*. Analiza dokowania molekularnego ujawniła ich powinowactwo do enzymu TRI5, uczestniczącego w biosyntezie miko toksyn.

Uzyskane wyniki wskazują, że połączenie fragmentów steroidowych poprzez mostek triazolowy umożliwia uzyskanie trwałych i bioaktywnych struktur o szerokim spektrum przewidywanej aktywności biologicznej, obejmującej działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, hipolipemiczne i przeciwnowotworowe. Przeprowadzone badania dostarczyły istotnych danych na temat zależności struktura–aktywność w grupie pochodnych steroidowych, stanowiąc cenny wkład w rozwój chemii bioorganicznej i chemii leków.

Praca wniosła znaczący wkład w rozwój metod syntezy i projektowania koniugatów steroidowych, potwierdzając, że zastosowanie chemii „click” stanowi efektywne narzędzie w otrzymywaniu nowych związków o kontrolowanej strukturze i potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

Abstract

Synthesis of New Steroid Conjugates with Potential Antimicrobial Properties

MSc Eng. Grzegorz Hajdaś

Supervisor: Prof. DSc Tomasz Pospieszny,

Assistant Supervisor: PhD Eng. Hanna Koenig

This doctoral dissertation focuses on the design, synthesis, and spectroscopic characterization of new steroid conjugates obtained through „click” reactions. The aim of the research was to develop and investigate the biological properties of bile acid and sterol derivatives linked *via* a 1,2,3-triazole ring, representing potential antimicrobial compounds. The thesis consists of a literature section, discussing the theoretical background and current state of research on chemical modifications of steroids, and an experimental section devoted to the synthesis and analysis of new steroid conjugates.

The literature part presents the structural and stereochemical characteristics of steroids and their diverse biological functions. The biological significance of sterols and bile acids is discussed in detail, particularly their roles in lipid metabolism and cell membrane function. Various directions of chemical modification of the steroid framework are reviewed, including transformations involving individual rings of the cyclopentanoperhydrophenanthrene system and the use of protecting groups in their functionalization. Special attention is given to „click” chemistry and the Huisgen cycloaddition reaction, which due to their simplicity, high efficiency, and selectivity, enable the formation of stable conjugates containing a 1,2,3-triazole ring. The importance of such linkages in the design of bio-conjugates with therapeutic potential is analyzed, along with examples of known steroid conjugates.

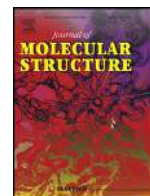
The experimental section describes the development of a synthetic strategy and structural analysis of new steroid conjugates, including twenty-seven mixed and dimeric derivatives. The compounds were obtained via the Cu(I)-catalyzed Huisgen reaction, leading to the formation of triazole linkages. The structures of the resulting products were confirmed by NMR, FT-IR, and ESI-MS spectroscopy. Quantum-mechanical calculations (PM5), as well as *in silico* studies using PASS prediction and molecular docking, allowed for the evaluation of their stability and predicted biological properties.

Within the scope of this work, a series of conjugates with diverse structures and properties was synthesized. The triazole-linked steroid derivatives exhibited reduced hemolytic activity compared to their parent substrates, while selected compounds demonstrated high affinity for HMG-CoA reductase, indicating potential as cholesterol biosynthesis inhibitors. Dimeric bile acid conjugates displayed greater energetic stability and lower cytotoxicity, and docking studies confirmed their ability to interact with DNA gyrase and Lipid II transglycosylase. Additionally, a series of formylated bile acid and sterol

conjugates was developed, several of which exhibited notable antifungal activity against *Fusarium culmorum* and *Botrytis cinerea*. Molecular docking analysis revealed their affinity for the TRI5 enzyme, which participates in mycotoxin biosynthesis.

The obtained results demonstrate that the conjugation of steroidal fragments through a triazole bridge enables the formation of stable and bioactive structures with a broad spectrum of predicted biological activities, including antibacterial, antifungal, hypolipidemic, and anticancer effects. The conducted studies provided valuable insights into structure–activity relationships within steroid derivatives, representing a meaningful contribution to the development of bioorganic and medicinal chemistry.

This work significantly advances the methods for the synthesis and design of steroid conjugates, confirming that the application of „click” chemistry is an efficient tool for obtaining new compounds with controlled structures and potential therapeutic relevance.



Molecular structure, spectral and theoretical study of new type bile acid–sterol conjugates linked via 1,2,3-triazole ring

Anna Kawka^a, Grzegorz Hajdaś^a, Damian Kułaga^b, Hanna Koenig^a, Iwona Kowalczyk^a, Tomasz Pospieszny^{a,*}

^a Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 8 Street, 61–614 Poznań, Poland

^b Department of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, Warszawska 24 Street, 31-155 Kraków, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2022

Revised 5 October 2022

Accepted 10 October 2022

Available online 11 October 2022

Keywords:

Bile acids

Sterols

Click chemistry

1,2,3-triazole ring

Semiempirical calculations

PASS

Molecular docking

ABSTRACT

New six steroid conjugates have been prepared from bile acids (tail part) and sterol (head part) derivatives using click chemistry method. The azide-alkyne Huisgen cycloaddition (intermolecular 1,3-dipolar cycloaddition) of the azide derivatives of lithocholic, deoxycholic, cholic acid and propiolate ester of cholesterol and cholestanol gave a new bile acid–sterol conjugates linked with a 1,2,3-triazole ring. Previously, bile acids were converted into bromoacetyl substituted derivatives by the reaction of propargyl esters of lithocholic, deoxycholic, cholic with bromoacetic acid bromide in toluene with TEBA and sodium hydride. Additionally, five of the reagents: bromoacetyl and azidoacetyl substituted derivatives of propargyl esters of deoxycholic and cholic acids as well as 5 α -cholestan-3-yl-propynoate were also obtained and characterized for the first time. All conjugates were obtained in good yields using an efficient synthesis method. The structures of all conjugates as well as four substrates were confirmed by spectral (¹H- and ¹³C NMR, and FT-IR) analysis, mass spectrometry (ESI-MS), as well as PM5 semiempirical methods. Also B3LYP calculations have been carried out. The screening constants for ¹³C and ¹H atoms have been calculated by the GIAO/B3LYP/6–311G(d,p) approach and analyzed. Theoretical vibrational parameters are compared with obtained experimental parameters. Estimation of the pharmacotherapeutic potential has been accomplished for the synthesized compounds on the basis of Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). Additionally molecular docking was performed for the selected conjugate.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

1. Introduction

The properties of compounds of natural origin represent important benefits for organic chemistry. Steroids deserve special mention. They are chemical compounds that perform several functions ensuring the proper functioning of living organisms, such as participation in metabolic changes, components of plant and animal cell membranes, and a precursor to the production of many vitamins [1–7]. Transformation of the cholesterol structure under the influence of UV radiation leads to obtaining 1 α ,25-dihydroxycalciferol (vitamin D3) [8–10]. In addition, special attention is drawn to bile acids, plant sterols (ergosterol), sex hormones (estrogens, testosterone, progesterone), plant hormones (brassinosteroids) [11–13]. Organic syntheses, in which different functional groups attached to the core of all steroid compounds of the cyclopentanoperhy-

drophenanthrene skeleton are modified, lead to the production of derivatives with significantly higher biological activity [14–20].

Bile acids were isolated in 1828 by L. Gmelin from whale bile. The starting compound for their receipt in the liver is cholesterol. After biosynthesis, they form derivatives with the amino acids taurine and glycine and are stored in the form of salts in the gallbladder [21–24]. Bile acids are distinguished by a large curved skeleton, A/B rings adopting *cis* geometry, enantiomeric purity, chirality, and the presence of hydroxyl groups in a different position at carbon atoms (3 α ; 3 α , 7 α ; 3 α ,7 α ,12 α) [25–27]. Polarity, amphiphilic properties and high reactivity of hydroxide groups, varying respectively in the order of 3 α >7 α >12 α , make these compounds have enormous potential as a precursor to the synthesis of organic macrocyclic steroid conjugates with high pharmacotherapeutic activity [28–34].

The possibility of modifying the 3 α -OH group contributed to the increase in interest in bile acid and sterol derivatives, especially in the synthesis of dimers, molecular pliers, artificial receptors, cholophans or quasi-podands [35–42].

* Corresponding author.

E-mail address: tposp@amu.edu.pl (T. Pospieszny).

“Click chemistry” is an innovative and modern method of synthesizing new steroid conjugates gaining importance in the pharmaceutical industry and medicine. The copper-alkyne azido-alkyne addition (CuAAC) described by K.B. Sharpless involves the formation of a new carbon-heteroatom bond in the ring [43–47]. Obtaining new conjugates by the “click” method is primarily a highly efficient, selective and effective synthesis. In addition, the resulting products are easy to isolate, stable in many solvents, including water, and resistant to metabolic degradation [44,48]. The 1,3-dipolar cycloaddition is crucial. The Huisgen reaction occurs in the presence of Cu(I) between terminal alkyne and azide. It is an extremely valuable method of synthesis of compounds containing 1,2,3-triazole rings [48–52]. The use of an appropriate catalyst and increased temperature determine the regioselectivity of the reaction, leading to the formation of 1,4- or 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles [53–57]. Conjugates containing 1,2,3-triazole rings in the structure have several important properties, especially they are distinguished by high resistance to oxidation reactions, reduction and hydrolysis of biological systems, invulnerability to metabolic degradation, anti-cancer activity and the possibility of forming hydrogen bonds [31,34,43,58–60].

2. Experimental

2.1. Instrumentation and chemicals

All of the synthesis reagents lithocholic, deoxycholic and cholic acids, cholesterol, cholestanol, acetic anhydride, pyridine, propionic acid, sodium azide, sodium ascorbate were purchased from Sigma-Aldrich Corporation. Solvents chloroform, dichloromethane, toluene, hexane, *t*-butanol, methanol were obtained from common commercial sources (Merck, Fisher) and used without purification. General. IR Spectra: FT/IR-4600 type A in solid state or oil; ν in cm^{-1} . ^1H and ^{13}C NMR spectra: Varian Mercury 300 MHz spectrometer (Oxford, UK), operating at 300.07 and 75.4614 for ^1H and ^{13}C , resp.; δ in ppm rel. to Me_4Si as internal standard, J in Hz. Typical conditions for the H-atom spectra: pulse width 32° , acquisition time 5 s, FT size 32 K and digital resolution 0.3 Hz per point; and for the C-atom spectra: pulse width 60° , FT size 60 K and digital resolution 0.6 Hz per point, the number of scans varied from 1200 to 10,000 per spectrum. ESI-MS: Waters/Micromass (Manchester, UK) ZQ mass spectrometer equipped with a Harvard Apparatus (Saint Laurent, Canada), syringe pump; in m/z . The sample solns. were prepared in MeOH at the concentration of ca. 10^{-5} M. The standard ESI-MS mass spectra were recorded at the cone voltage 90 V.

2.2. Synthesis

Procedure for methyl esters of bile acids as well as their acetoxy derivatives (4–6) was described earlier. Procedure for 3-bromoacetoxy derivatives of bile acids (7–9): methyl 5 β -cholan-24-oate (4), methyl 12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (5) or methyl 7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (6) was dissolved in 5 mL of anhydrous dichloromethane, and then subsequently, bromoacetic acid bromide was added drop wise and the reaction mixture was kept at room temperature for 24 h. Then the mixture was washed with NaHCO_3 (5%, 20 mL), brine (200 mL) and finally dried over Na_2CO_3 . The solvent was evaporated under reduced pressure to give the crude product. Products were purified by chromatography on silica gel (Merck, type 60, 70–230 mesh) with chloroform/hexane as eluent and to give the products 50% of (7), 92% (8) and 70% of (9). Procedure for 3-azidoacetoxy derivatives of bile acids (10–12): 3-bromoacetoxy derivatives of bile acids (7–9) were dissolved in 15 mL of THF. Then, NaN_3 was added, the

mixture was heated at 50 °C for 4 h. DMF was evaporated, extracted with toluene, washed with brine, and dried (Na_2SO_4) and to give the products 95% of (10), 88.6% (11) and 78% of (12). The sterols (cholesterol 13 or cholestanol 14) was dissolved in 15 mL of dichloromethane, then *p*-TsOH and propionic acid was added and the reaction was carried out for 24 h at room temperature. Next the mixture washed with cool water, extracted ethyl acetate and washed with water, brine, and dried (Na_2SO_4). The solvent was evaporated under reduced pressure to give the products: (53%) of (15) and (72%) of (16). Procedure for dimers of bile acids and sterols derivatives (17–22): compounds (10–12) was dissolved in a mixture of *t*-BuOH/ MeOH (6 mL, 5:1). Then, 5-cholesten-3 β -ol 3-propionate (15) or 5-cholestan-3 β -ol 3-propionate (16) was added. Next, to the homogenous mixture were added $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3 mg, 3 mol%) and sodium ascorbate (9 mg, 20 mol%) in water (0.3 mL). The reaction mixture was heated at 60 °C for 8 h and then extracted with chloroform, washed with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . The crude compound was purified by column chromatography on silica gel using chloroform/ethyl acetate (5:1) as an eluent.

2.3. Chemical characterization

2.3.1. Methyl 3 α -bromoacetoxy-12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (8)

White solid (92.7%), melting point: 119–120 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.09 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, 12 β -H), 4.81–4.72 (m, 1H, 3 β -H), 3.81 (s, 2H, CH_2 -27), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.10 (s, 3H, 12-OAc), 0.91 (s, 3H, CH_3 -19), 0.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.57 (C-24), 170.45 (12 α -CO), 166.71 (C-26), 76.32 (C-12), 75.84 (C-3), 51.49 (C-25), 49.39, 47.54, 44.97, 41.75, 35.60, 34.67, 34.55, 34.35, 33.97, 31.84, 30.94, 30.90, 30.79, 27.30 (C-27), 26.78, 26.34, 26.32, 26.29, 25.79, 25.58, 23.38, 22.97 (C-19), 21.34 (12 α -COCH₃), 17.47 (C-21), 12.37 (C-18). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2936, 2865, 1733, 1281, 1250. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 591 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 607 (15) $[\text{M} + \text{K}]^+$.

2.3.2. Methyl 3 α -bromoacetoxy-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (9)

Oil (70%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.09 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H, 12 β -H), 4.91 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, 7 β -H), 4.69–4.61 (m, 1H, 3 β -H), 3.81 (d, $J = 0.6$ Hz, 2H, CH_2 -27), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.15 (s, 3H, 7-OAc), 2.09 (s, 3H, 12-OAc), 0.92 (s, 3H, CH_3 -19), 0.81 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.50 (C-24), 170.50 (12 α -CO), 170.31 (7 α -CO), 166.74 (C-26), 76.06 (C-12), 75.32 (C-3), 70.61 (C-7), 51.51 (C-25), 47.33, 45.02, 43.35, 40.80, 37.69, 34.57, 34.43, 34.27, 34.22, 31.13, 30.85, 30.73, 28.86 (C-27), 27.15, 26.51, 26.28, 25.52, 22.76, 22.48 (C-19), 21.58 (12 α -COCH₃), 21.40 (7 α -COCH₃), 17.46 (C-21), 12.19 (C-18). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 1734, 1283, 1248. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 651 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.3. Methyl 3 α -azidoacetoxy-12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (11)

White solid (88.6%), melting point: 129–131 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.09 (d, $J = 3$ Hz, 1H, 12 β -H), 4.88–4.78 (m, 1H, 3 β -H), 3.84 (s, 2H, CH_2 -27), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.09 (s, 3H, 12-OAc), 0.92 (s, 3H, CH_3 -19), 0.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.57 (C-24), 170.43 (12 α -CO), 167.70 (C-26), 76.13 (C-12), 75.83 (C-3), 51.47 (C-25), 50.54 (C-27), 49.40, 47.55, 44.98, 41.76, 35.60, 34.67, 34.58, 34.35, 33.96, 32.08, 30.95, 30.80, 27.30, 26.77, 26.51, 25.81, 25.57, 23.38, 22.95 (C-19), 21.28 (12 α -COCH₃), 17.47 (C-21), 12.37 (C-18). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2106, 1733, 1281, 1256, 1235, 1198. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 554 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 570 (10) $[\text{M} + \text{K}]^+$.

2.3.4. Methyl 3 α -azidoacetoxy-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (12)

Oil (78%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.09 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H, 12 β -H), 4.92 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, 7 β -H), 4.74–4.66 (m, 1H, 3 β -H), 3.85 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, CH_2 -27), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.13 (s, 3H, 12-OAc), 2.08 (s, s, 3H, 7-OAc), 0.93 (s, 3H, CH_3 -19), 0.82 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.48 (C-24), 170.44 (12 α -CO), 170.28 (7 α -CO), 167.63 (C-26), 75.90 (C-12), 75.30 (C-3), 70.60 (C-7), 51.48 (C-25), 50.56 (C-27), 47.34, 45.02, 43.32, 40.85, 37.72, 34.58, 34.51, 34.45, 34.25, 31.17, 30.86, 30.74, 28.81, 27.14, 26.75, 25.48, 22.78, 22.44 (C-19), 21.50 (12 α -COCH $_3$), 21.30 (7 α -COCH $_3$), 17.47 (C-21), 12.18 (C-18). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2111, 1732, 1243, 1202. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 612 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.5. 5-cholestan-3 β -ol 3-propiolate (16)

Oil (72%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 4.81–4.73 (m, 1H, 3'-H), 2.85 (s, 1H, CH-30), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3 -21'), 0.86 (dd, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 1.4$ Hz, 6H, CH_3 -26' and CH_3 -27'), 0.82 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.64 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 152.29 (C-28), 77.20, 76.37 (C-30), 75.12 (C-29), 74.03 (C-3'), 56.35, 56.21, 54.11, 44.61, 42.55, 39.91, 39.48, 36.63, 36.13, 35.78, 35.40, 33.94, 33.63, 31.92, 28.52, 28.22, 28.00, 27.17, 24.17, 23.81, 22.82 (C-19'), 22.55 (C-27'), 21.17 (C-26'), 18.64 (C-21'), 12.17, 12.05 (C-18'). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 3284, 2117, 1707, 1236. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 463 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 479 (40) $[\text{M} + \text{K}]^+$, 904 (55) $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

2.3.6. 3 β -hydroxy-5-cholestene 1-[2-(methyl 5 β -cholan-24-oate)-2-oxoethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-(3-carboxylate) (17)

Oil (79.7%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.23 (s, 1H, CH-28), 5.42 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, 6'-H), 5.18 (s, 2H, CH_2 -27), 4.98–4.89 (m, 1H, 3' α -H), 4.88–4.79 (m, 1H, 3 β -H), 3.67 (s, 3H, CH_3 -25), 1.05 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.93 (s, 3H, CH_3 -19), 0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -21'*), 0.90 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H, CH_3 -21'*), 0.87 (dd, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 1.8$ Hz, 6H, CH_3 -26' and CH_3 -27'), 0.69 (s, 3H, CH_3 -18), 0.65 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ : 174.73 (C-24), 165.12 (C-26), 160.03 (C-30), 141.02 (C-29), 139.48 (C-5'), 128.83 (C-28), 122.96 (C-6'), 77.48 (C-3), 77.20, 75.18 (C-3'), 51.47 (C-25), 51.21 (C-27), 50.05, 40.44, 40.05, 39.74, 39.52, 32.04, 31.93, 31.87, 31.06, 31.01, 24.29, 24.16, 23.82, 23.23, 22.80 (C-19), 22.55 (C-19'), 21.05 (C-27'), 20.84 (C-26'), 19.23, 18.71 (C-21'), 18.28 (C-21), 12.03 (C-18), 11.85 (C-18'). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2946, 2867, 1743, 1467, 1364, 1211. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 935 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 951 (10) $[\text{M} + \text{K}]^+$.

2.3.7. 3 β -hydroxy-5-cholestene 1-[2-(methyl 12-acetoxy-5 β -cholan-24-oate)-2-oxoethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-(3-carboxylate) (18)

Oil (55.7%). ^1H NMR (401 MHz, CDCl_3) δ : 8.24 (s, 1H, CH-28), 5.42 (d, 1H, 6'-H), 5.19 (s, 2H, CH_2 -27), 5.08 (d, 1H, 12 β -H), 4.98–4.87 (m, 1H, 3' α -H), 4.86–4.77 (m, 1H, 3 β -H), 3.67 (s, 3H, CH_3 -25), 2.10 (s, 3H, 12-OAc), 1.05 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.92 (s, 3H, CH_3 -19), 0.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3 -21'*), 0.87 (dd, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 1.8$ Hz, 6H, CH_3 -26' and CH_3 -27'), 0.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -21'*), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18), 0.69 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.55 (C-24), 170.40 (12 α -CO), 165.11 (C-26), 159.95 (C-30), 140.98 (C-29), 139.43 (C-5'), 128.74 (C-28), 122.95 (C-6'), 77.19 (C-12), 75.81 (C-3'), 75.15 (C-3), 56.67, 56.12, 51.48 (C-25), 51.16 (C-27), 50.02, 49.37, 47.56, 44.99, 42.30, 41.76, 39.71, 39.49, 38.05, 36.98, 36.60, 36.16, 35.76, 35.60, 34.68, 34.50, 34.39, 33.94, 32.00, 31.90, 31.84, 30.97, 30.81, 28.20, 27.98, 27.73, 27.30, 26.75, 26.43, 25.77, 25.60, 24.26, 23.80, 23.38, 22.94 (C-19), 22.79, 22.53 (C-19'), 21.53 (12 α -COCH $_3$), 21.33 (C-26'), 21.02 (C-27'), 19.29, 18.69 (C-21'), 17.48 (C-21), 12.38 (C-18), 11.83 (C-

18'). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2950, 2868, 1739, 1244, 1212. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 993 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.8. 3 β -hydroxy-5-cholestene 1-[2-(methyl 7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate)-2-oxoethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-(3-carboxylate) (19)

Oil (60%). ^1H NMR (401 MHz, CDCl_3) δ : 8.24 (s, 1H, CH-28), 5.42 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 6'-H), 5.22 (s, 2H, CH_2 -27), 5.09 (d, 1H, 12 β -H), 4.98–4.86 (m, 2H, 7 β -H and 3' α -H), 4.74–4.64 (m, 1H, 3 β -H), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.14 (s, 3H, 7-OAc), 2.09 (s, 3H, 12-OAc), 1.05 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.92 (s, 3H, CH_3 -19), 0.92 (d, $J = 3.2$ Hz, 3H, CH_3 -21'*), 0.87 (dd, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 1.8$ Hz, 6H, CH_3 -26' and CH_3 -27'), 0.82 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -21'), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18), 0.69 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.47 (C-24), 170.43 (12 α -CO), 170.22 (7 α -CO), 165.08 (C-26), 159.88 (C-30), 140.97 (C-29), 139.39 (C-5'), 128.77 (C-28), 122.97 (C-6'), 76.87 (C-12), 75.26 (C-3'), 75.16 (C-3), 70.52 (C-7), 56.66, 56.10, 51.49 (C-25), 51.18 (C-27), 50.00, 47.34, 45.02, 43.32, 42.28, 40.83, 39.70, 39.48, 38.04, 37.70, 36.96, 36.59, 36.15, 35.75, 34.58, 34.38, 34.22, 31.89, 31.83, 31.14, 30.87, 30.73, 28.82, 28.19, 27.97, 27.72, 27.14, 26.68, 25.50, 24.25, 23.79, 22.78 (C-19), 22.53 (C-19'), 22.43 (7 α -COCH $_3$), 21.57 (12 α -COCH $_3$), 21.36 (C-26'), 21.01 (C-27'), 19.28, 18.68 (C-21'), 17.47 (C-21), 12.19 (C-18), 11.82 (C-18'). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2950, 2869, 1739, 1237. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 1051 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1067 (20) $[\text{M} + \text{K}]^+$.

2.3.9. 3 β -hydroxy-5-cholestane 1-[2-(methyl 5 β -cholan-24-oate)-2-oxoethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-(3-carboxylate) (20)

Oil (51%). ^1H NMR (401 MHz, CDCl_3) δ : 8.22 (s, 1H, CH-28), 5.18 (s, 2H, CH_2 -27), 5.04–4.98 (m, 1H, 3' α -H), 4.89–4.79 (m, 1H, 3 β -H), 3.67 (s, 3H, CH_3 -25), 0.93 (s, 3H, CH_3 -19), 0.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H, CH_3 -21'*), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3 -21'*), 0.86 (dd, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 2.4$ Hz, 6H, CH_3 -26' and CH_3 -27'), 0.85 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.66 (s, 3H, CH_3 -18), 0.65 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.73 (C-24), 165.14 (C-26), 160.16 (C-30), 141.09 (C-29), 128.76 (C-28), 77.46 (C-3), 77.20, 75.03 (C-3'), 56.43, 56.39, 56.28, 55.97, 54.24, 51.45 (C-25), 51.19 (C-27), 44.74, 42.73, 42.60, 41.89, 40.44, 40.05, 39.99, 39.51, 36.79, 36.17, 35.79, 35.77, 35.49, 35.35, 34.85, 34.54, 33.99, 32.04, 31.99, 31.06, 31.01, 28.61, 28.23, 28.16, 28.00, 27.46, 26.93, 26.47, 26.25, 24.20, 24.15, 23.83, 23.23, 22.80 (C-19), 22.55 (C-19'), 21.22 (C-27'), 20.84 (C-26'), 18.66 (C-21'), 18.27 (C-21), 12.25 (C-18), 12.06, 12.03 (C-18'). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2945, 2867, 1742, 1380, 1214. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 937 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 953 (5) $[\text{M} + \text{K}]^+$.

2.3.10. 3 β -hydroxy-5-cholestane 1-[2-(methyl 12-acetoxy-5 β -cholan-24-oate)-2-oxoethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-(3-carboxylate) (21)

Oil (53%). ^1H NMR (401 MHz, CDCl_3) δ : 8.22 (s, 1H, CH-28), 5.18 (s, 2H, CH_2 -27), 5.08 (d, 1H, 12 β -H), 5.04–4.96 (m, 1H, 3' α -H), 4.86–4.77 (m, 1H, 3 β -H), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.10 (s, 3H, 7-OAc), 0.91 (s, 3H, CH_3 -19), 0.90 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H, CH_3 -21'), 0.86 (dd, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 1.6$ Hz, 6H, CH_3 -26' and CH_3 -27'), 0.85 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -21'), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18), 0.65 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.56 (C-24), 170.42 (12 α -CO), 165.12 (C-26), 160.06 (C-30), 141.04 (C-29), 128.74 (C-28), 77.16 (C-12), 75.80 (C-3), 74.99 (C-3'), 51.49 (C-25), 51.13 (C-27), 47.54, 27.30, 22.93 (C-19), 22.53 (C-19'), 21.53 (12 α -COCH $_3$), 21.34 (C-26'), 21.18 (C-27'), 18.63 (C-21'), 17.47 (C-21), 12.37 (C-18), 12.03 (C-18'). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2948, 2867, 1738, 1244, 1212. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 994 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1011 (30) $[\text{M} + \text{K}]^+$.

2.3.11. 3 β -hydroxy-5-cholestane 1-[2-(methyl 7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate)-2-oxoethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-(3-carboxylate) (22)

Oil (52%). ^1H NMR (401 MHz, CDCl_3) δ : 8.22 (s, 1H, CH-28), 5.17 (s, 2H, CH_2 -27), 5.09 (d, 1H, 12 β -H), 5.05–4.95 (m, 1H, 3' α -H), 4.92 (s, 1H, 7 β -H), 4.75–4.64 (m, 1H, 3 β -H), 3.67 (s, 3H, CH_3 -25), 2.14 (s, 3H, 7-OAc), 2.09 (s, 3H, 12-OAc), 0.92 (s, 3H, CH_3 -19), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.86 (dd, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 2$ Hz, 6H, CH_3 -26' and CH_3 -27'), 0.85 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.82 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3 -21'), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18), 0.65 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.50 (C-24), 170.45 (12 α -CO), 170.25 (7 α -CO), 165.10 (C-26), 160.04 (C-30), 141.13 (C-29), 128.69 (C-28), 76.92 (C-12), 75.30 (C-3), 75.06 (C-3'), 70.55 (C-7), 51.52 (C-25), 51.20 (C-27), 47.39, 45.06, 44.73, 43.35, 42.60, 40.86, 39.98, 39.51, 37.73, 36.78, 36.17, 35.79, 35.49, 34.62, 34.41, 34.25, 33.99, 31.98, 31.18, 30.91, 30.77, 28.85, 28.61, 28.24, 28.01, 27.47, 27.17, 26.71, 25.53, 24.20, 23.83, 22.80 (C-19), 22.55 (C-19'), 22.46 (7 α -COCH₃), 21.60 (12 α -COCH₃), 21.39 (C-26'), 21.22 (C-27'), 18.66 (C-21'), 17.51 (C-21), 12.26 (C-18), 12.22, 12.07 (C-18'). FT-IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 2948, 2868, 1739, 1237. ESI-MS (MeOH) m/z (%): 1053 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1069 (10) $[\text{M} + \text{K}]^+$.

2.4. Theoretical calculations

The PM5 semiempirical calculations were performed using the WinMopac 2003 program. The final heat of formation (HOF) for dimers of bile acids and sterols derivatives (17–22) linked 1,2,3-triazole ring is presented in Table 5. The molecular models of compounds all compounds are shown in Figs. 3 and 4. The calculations were performed using the Gaussian 09 program package [61] and B3LYP [62,63] method in conjunction with 6-311G(d,p) [64] basis set. The magnetic isotropic shielding tensors were calculated using the standard GIAO/B3LYP/6-311G(d,p) (Gauge-Independent Atomic Orbital) approach [65,66].

2.5. Docking experiments

Docking experiments were performed using Flare application available in Cresset Software [67]. Downloaded target pdb's from PDB protein data bank [68] were prepared in protein preparation module using normal calculating mode. Active site size was set at 6 Å. Ligands were prepared according to automatic settings. Docking calculations were performed according to very accurate but slow method. Grid box was centered on co-crystallized ligand. Number of runs was set at 8 and max poses at 10.

3. Results and discussion

In our previous work we described the synthesis method and characterization bile acid-sterol conjugates linked with a 1,2,3-triazole ring of propargyl esters of lithocholic, deoxycholic as well as cholic acids and ergo ster-3 β -yl 2-azidoacetate and cholester-3 β -yl 2-azidoacetate [69]. To the best of our knowledge, no work has been published on the synthesis or the physicochemical properties of 3-bromoacetoxy (8,9) and 3-azidoacetoxy derivatives of methyl 12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (11) and methyl 7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (12), 5-cholestan-3 β -ol 3-propiolate (16) as well as new six conjugates of connected in a head-to-tail fashion of 3-azidoacetoxy derivatives of bile acids (tail) and propiolate esters of sterols (head) linked by a 1,2,3-triazole ring (17–22). This type of combination is a completely innovative approach to the preparation and research of a new type of steroid conjugates.

The structures of two bromoacetyl substituted derivatives of bile acids (8) and (9), azidoacetyl substituted derivatives of bile acids (11) and (12), 5-cholestan-3 β -ol 3-propiolate (16) as well as all synthesized conjugates (17–22) were determined on the basis of

their ^1H and ^{13}C NMR, FT-IR, and ESI-MS spectra. Moreover, PM5 and B3LYP calculation methods were performed for all compounds. The syntheses of substrates (8,9), (11,12) and (16), as well as conjugates (17–22), are shown in the Schemes 1 and 2, respectively.

3.1. Synthesis

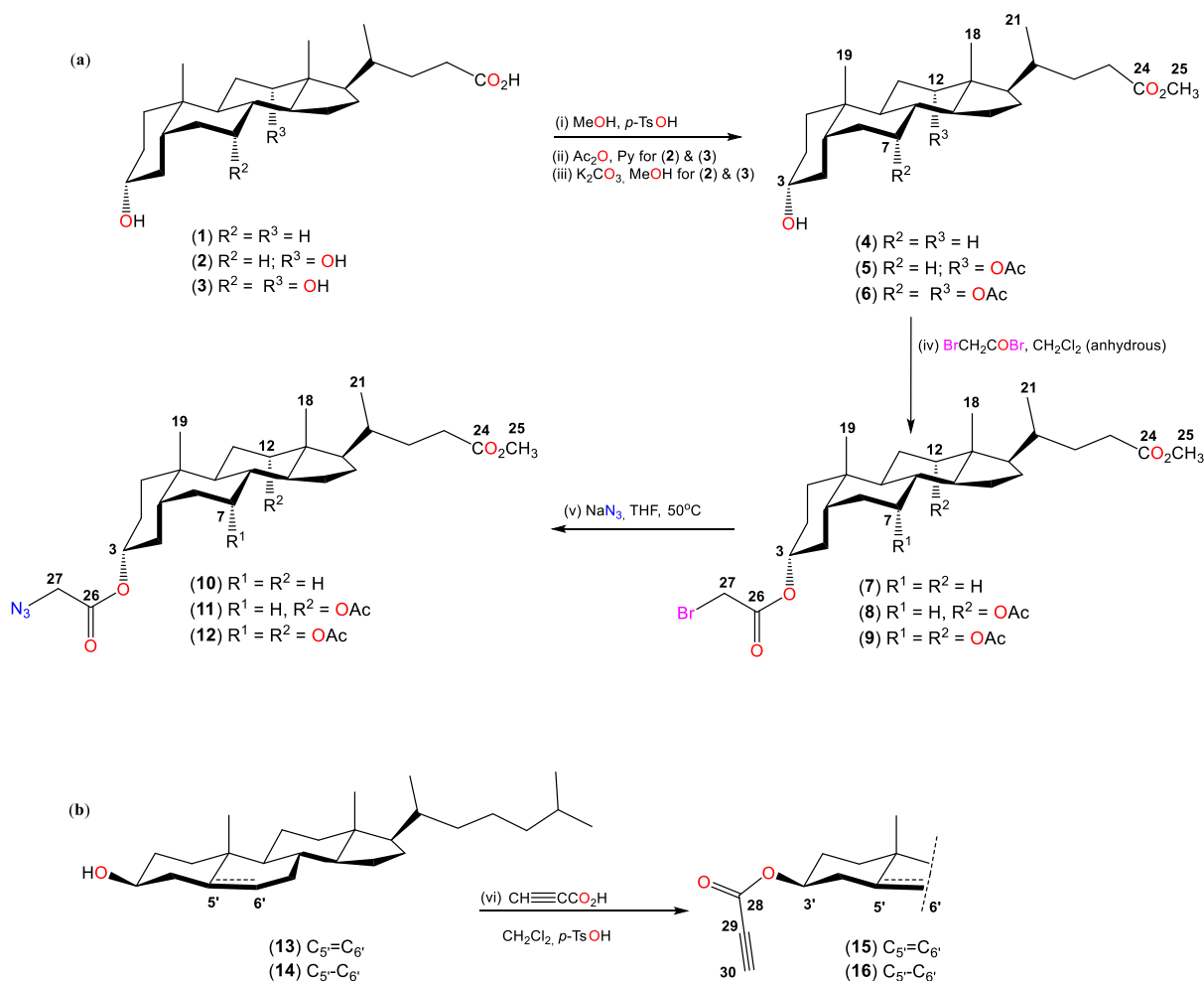
The bile acid methyl esters, steroids bromoacetates and azidoacetates derivatives as well as propiolate esters of sterols were obtained with satisfactory yields. The methyl 3 α -bromoacetoxy-5 β -cholan-24-oate (7), methyl 3 α -bromoacetoxy-12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (8), methyl 3 α -bromoacetoxy-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (9) was synthesized in the reaction of methyl esters of bile acids (4–6) with bromoacetic acid bromide in anhydrous dichloromethane. On the other hand methyl 3 α -azidoacetoxy-5 β -cholan-24-oate (10), methyl 3 α -azidoacetoxy-12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (11), methyl 3 α -azidoacetoxy-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (12) was synthesized in the reaction of bromoacetate derivatives of bile acids via a substitution reaction with NaN_3 in DMF at 50°. This one-pot reaction leads to azide derivatives in very good yield. The estrification of cholesterol (13) or cholestanol (14) with propiolic acid in dichloromethane with *p*-TsOH presence gave 5-cholesten-3 β -ol 3-propiolate (15) and 5-cholestan-3 β -ol 3-propiolate (16). The azides of derivatives bile acids (10–12) and propargyl esters of sterols (15–16) were used as a substrates in the „click” chemistry reaction in the presence of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate in *t*-BuOH/MeOH (5:1). A mixture of crude products (17–22) were obtained and separated by column chromatography. This reaction leads to dimers in saris factory yields.

3.2. Spectroscopic study

3.2.1. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The three substrates methyl 3 α -bromoacetoxy-5 β -cholan-24-oate (7), methyl 3 α -azidoacetoxy-5 β -cholan-24-oate (10) and 5-cholesten-3 β -ol 3-propiolate (15) have been described and characterized in the literature [37,69]. The ^1H and ^{13}C NMR data of compounds (8), (9), (11), (12) and (17–22) are shown in Tables 1–3 respectively. The ^1H NMR spectra in the region of 5.45–4.60 ppm for the most characteristic signals of compounds (17–22) are shown in Fig. 1.

In the ^1H NMR spectrum of methyl 3 α -bromoacetoxy-12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (8), methyl 3 α -bromoacetoxy-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (9), methyl 3 α -azidoacetoxy-12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (11) and methyl 3 α -azidoacetoxy-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (12) showed characteristic two hydrogen singlets in the range 0.73 and 0.93–0.91 ppm and doublet at 0.82–0.81 ppm assigned to CH_3 -18, CH_3 -19, and CH_3 -21, respectively. The protons of CH_3 -25 gave characteristic signal at 3.66 ppm. The protons of the 7 α -CO₂CH₃ group gave signals in the range 2.15–2.13 ppm for compounds (9) and (12), and additionally 12 α -CO₂CH₃ group gave signals in the range 2.08–2.10 ppm for compounds (8), (9) and (11) and (12). For all compounds show characteristic multiplets in the range 4.88–4.61 ppm assigned to axial positions of the C3 β -H protons in steroid skeleton. In the spectrum of compounds (9) and (12) additionally is present positions of the C7 β -H proton in the range 4.92–4.91 ppm. However, in the case of these acetoxy derivatives protons of C12 β -H appear at 5.09 ppm. The ^1H NMR spectra of these compounds show characteristic singlets at 3.81 ppm for the protons of the 3 α -CO₂CH₂Br group, whereas for compound (8) and (9). In turn for compounds (11) and (12) the protons of the 3 α -CO₂CH₂N₃ group in the range 3.85–3.84 ppm. The proton of C \equiv CH group in compound (16) gave signal at 2.85 ppm. Two hydrogen singlets at 0.64, 0.82 as well as



Scheme 1. Synthesis of bromoacetyl substituted derivatives of methyl esters of bile acids (**7–9**) and its azidoacetyl substituted derivatives (**10–12**) (a) as well as propargyl esters of cholesterol (**15**) and cholestanol (**16**) (b).

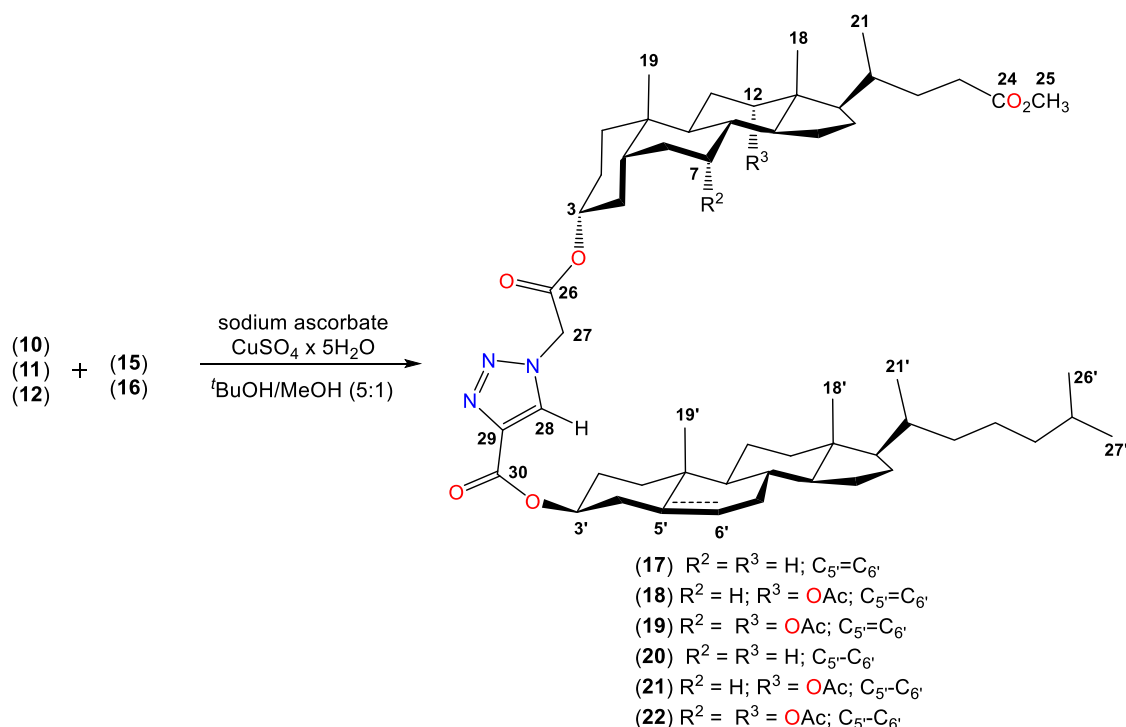
Table 1
 1H ^{13}C NMR chemical shift (ppm) of compounds (**8–9**) and (**11–12**) in $CDCl_3$.

No. of atoms	8		9		11		12	
	1H	^{13}C	1H	^{13}C	1H	^{13}C	1H	^{13}C
3	4.81–4.72	75.84	4.69–4.61	75.32	4.88–4.78	75.83	4.74–4.66	75.30
7	–	–	4.91	70.61	–	–	4.92	70.60
12	5.09	76.32	5.09	76.06	5.09	76.13	5.09	75.90
18	0.73	12.37	0.73	12.19	0.73	12.37	0.73	12.18
19	0.91	22.97	0.92	22.48	0.92	22.95	0.93	22.44
21	0.81	17.47	0.81	17.46	0.81	17.47	0.82	17.47
24	–	174.57	–	174.50	–	174.57	–	174.48
25	3.66	51.49	3.66	51.51	3.66	51.47	3.66	51.48
26	–	166.71	–	166.74	–	167.70	–	167.63
27	3.81	27.30	3.81	28.86	3.84	50.54	3.85	50.56
7α-CO	–	–	–	170.31	–	–	–	170.28
12α-CO	–	170.45	–	170.50	–	170.43	–	170.44
7α-COCH₃	–	–	2.15	21.40	–	–	2.13	21.30
12α-COCH₃	2.10	21.34	2.09	21.58	2.09	21.28	2.08	21.50

characteristic doublets at 0.90 ppm are assigned to CH_3-18' , CH_3-19' , and CH_3-21' , respectively. The doublets of doublets of protons of CH_3-26' and CH_3-27' gave signal at 0.86 ppm. The equatorial proton in positions of the $C3\alpha-H$ proton in cholestanol skeleton gave signal in the range 4.81–4.75 ppm.

The diagnostics proton signals of the triazole ring $C28-H$ of all conjugates with 1,2,3-triazole ring (**17–22**) in $CDCl_3$ arise as a singlet at about 8.24–8.22 ppm. In turns, the protons of the methy-

lene groups $C27-H$ linked directly to the triazole ring give signals at about 5.22–5.17 ppm. The 1H NMR spectra of (**17–22**) showed characteristic multiplets of protons of $C3'\alpha-H$ of sterol skeleton in the range of 5.04–4.86 ppm. In the same range there are also multiplets from the protons of $C3\beta-H$ group of bile acid skeleton. In the spectra of compounds (**18**), (**19**) and (**21**) and (**22**) characteristic broad singlets in the range 5.09 ppm are observed which are due to the $C12\beta-H$ protons. 1H NMR spectra of conjugate (**19**)



Scheme 2. Synthesis of dimers of bile acids and sterols derivatives (17–22) linked by 1,2,3-triazole ring.

Table 2

¹H NMR chemical shift (ppm) of compounds (17–22) in CDCl₃.

No. of atoms	Compounds					
	17	18	19	20	21	22
3β-H	4.88–4.79	4.86–4.77	4.74–4.64	4.89–4.79	4.86–4.77	4.75–4.64
7β-H	–	–	4.98–4.86	–	–	4.92
12β-H	–	5.08	5.09	–	5.08	5.09
18	0.69	0.73	0.73	0.66	0.73	0.73
19	0.93	0.92	0.92	0.93	0.91	0.92
21	0.90	0.81	0.82	0.91	0.90	0.90
25	3.67	3.67	3.66	3.67	3.66	3.67
27	5.18	5.19	5.22	5.18	5.18	5.17
28	8.23	8.24	8.24	8.22	8.22	8.22
7α-OAc	–	–	2.14	–	–	2.14
12α-OAc	–	2.10	2.09	–	2.10	2.09
3'α-H	4.98–4.89	4.98–4.87	4.98–4.86	5.04–4.98	5.04–4.96	5.05–4.95
6'-H	5.42	5.42	5.42	–	–	–
18'	0.65	0.69	0.69	0.65	0.65	0.65
19'	1.05	1.05	1.05	0.85	0.85	0.85
21'	0.92	0.92	0.92	0.90	0.81	0.82
26'	0.87	0.87	0.87	0.86	0.86	0.86
27'	0.87	0.87	0.87	0.86	0.86	0.86

show multiplets in the range of at 4.98–4.86 ppm but conjugate (22) gave singlet at 4.92 ppm assigned to the C7β-H protons of the bile acid skeleton. In the bile acids skeleton was observed two hydrogen singlets ranking from 0.73 to 0.66 and 0.93–0.91 ppm and characteristic doublet at 0.91–0.81 ppm assigned to CH₃-18, CH₃-19 and CH₃-21, respectively. On the other hand in the cholesterol part the characteristic hydrogen singlets in the range 0.69–0.65 and 1.05–0.85 ppm and doublet at 0.92–0.82 ppm assigned to CH₃-18', CH₃-19', and CH₃-21', respectively. The ¹H-NMR spectra of (17–22) showed a doublet at 0.87 or 0.86 ppm for the protons of the CH₃-26' and CH₃-27' methyl groups. For cholesterol derivatives (17–19) diagnostics is doublet for C6'-H at 5.42 ppm. Additionally in the ¹H NMR spectra of all conjugates show characteristic singlets in the range 2.14 ppm and 2.10–2.09 ppm for the protons of the 7α-CO₂CH₃ and 12α-CO₂CH₃ group, respectively. The

characteristic protons shifts for compounds (15–18) are collected in Table 3.

The ¹³C NMR spectra of compounds (8–9) and (11–12) show characteristic signals at 12.37–12.18, 22.97–22.44 and 17.47–17.46 ppm which are assigned to CH₃-18, CH₃-19 and CH₃-21, respectively. On the other hand, carbon atoms in carbonyl group of bromoacetoxy groups in positions 3α resonate in the range of 167.70–166.71 ppm. The carbon atoms of the C(12)=O steroid skeleton gave signals in the range of 170.50–170.43 ppm. However, carbon of the C(7)=O gave signal at 170.31–170.28 ppm. The diagnostics signal for CH₂Br groups in compounds (8–9) is observed at 28.86–27.30 ppm. Whereas the characteristic signal for CH₂N₃ groups in compounds (11–12) is observed at 50.56–50.54 ppm. Additionally for compound (16) were observed five signals from methyl groups CH₃-18', CH₃-19' and CH₃-21' as well as CH₃-26'

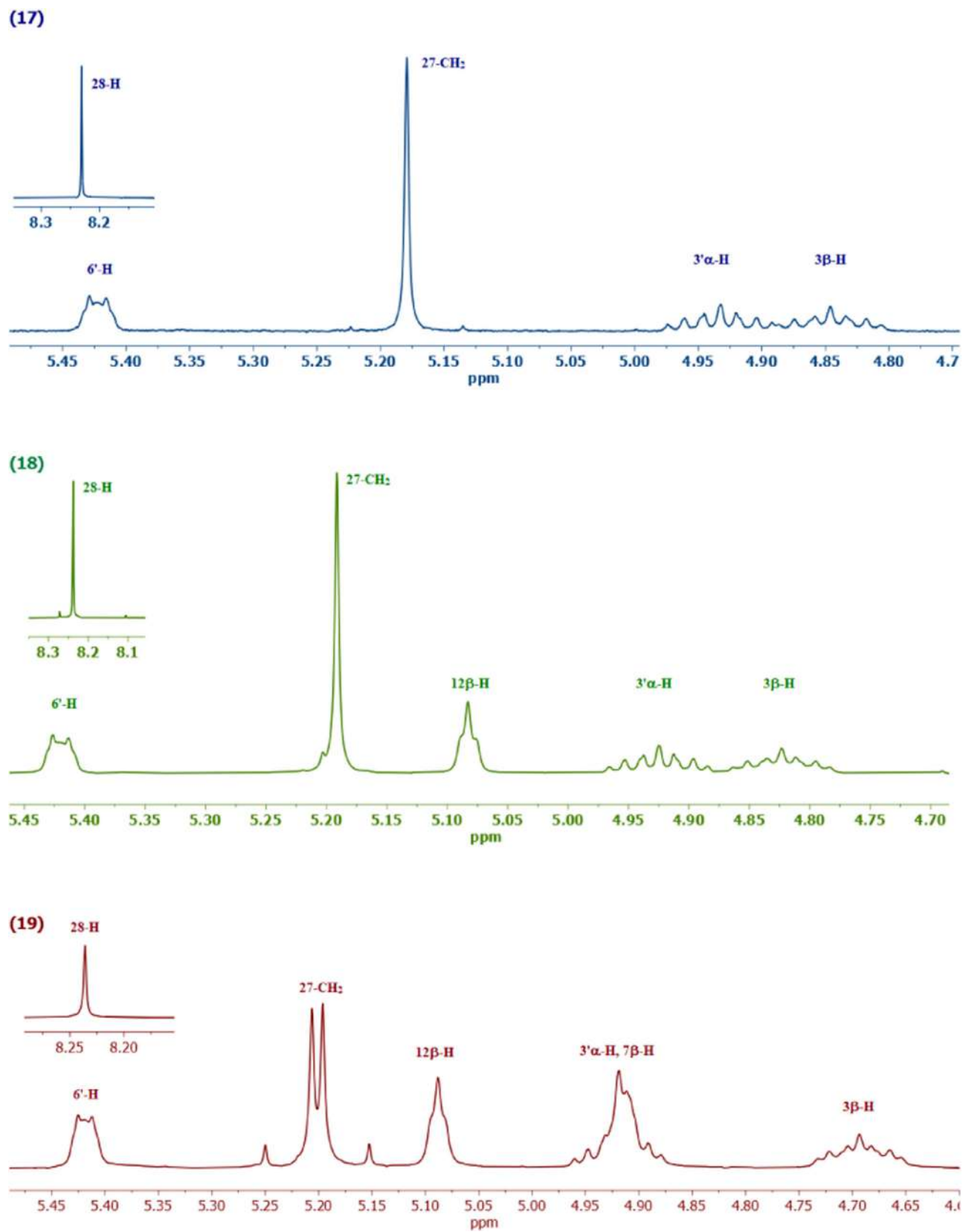


Fig. 1. ^1H NMR Spectra in the region of 5.45–4.65 ppm for the most characteristic signals of compounds (17–19).

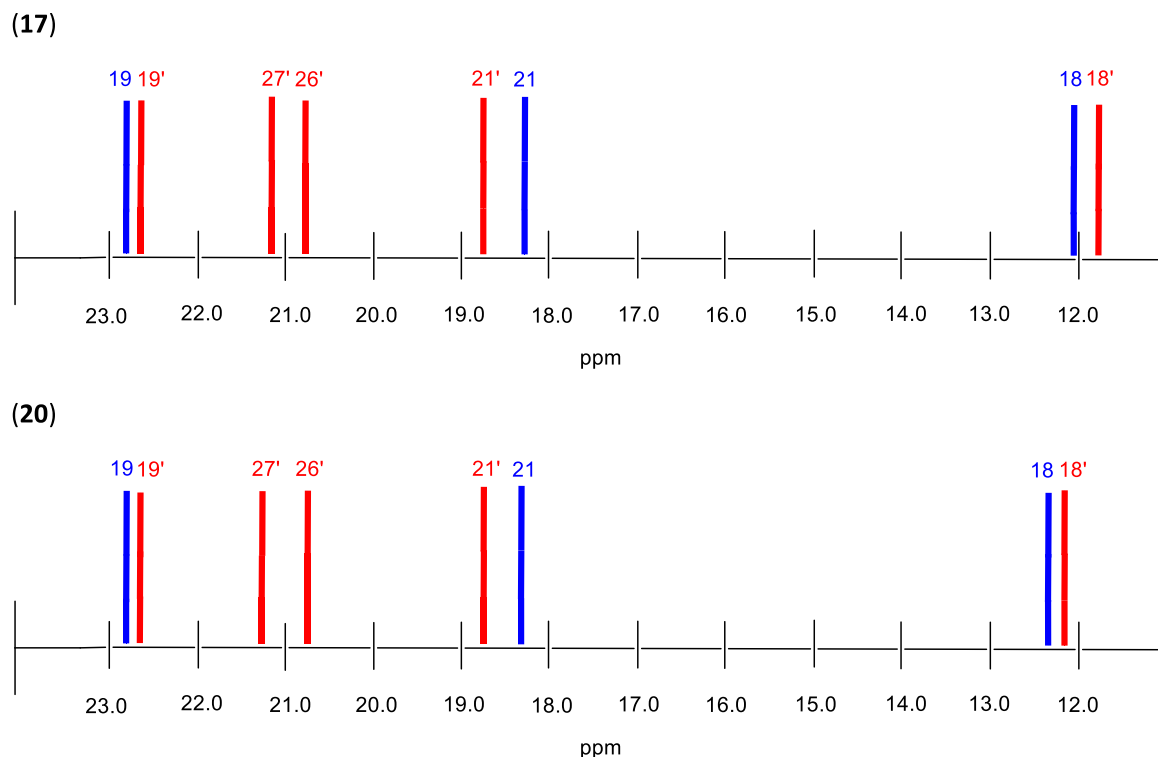


Fig. 2. Analytical differences of CH₃ groups of dimers of lithocholic acid and cholesterol (**17**) and lithocholic acid and cholestanol (**20**) linked by 1,2,3-triazole ring in the corresponding ¹³C NMR spectrum.

Table 3
¹³C NMR chemical shift (ppm) of compounds (**17–22**) in CDCl₃.

No. of atoms	Compounds					
	17	18	19	20	21	22
3	77.48	75.15	75.16	77.46	75.80	75.30
7	–	–	70.52	–	–	70.55
12	–	77.19	76.87	–	77.16	76.92
7 α -CO	–	–	170.22	–	–	170.25
12 α -CO	–	170.40	170.43	–	170.42	170.45
7 α -COCH ₃	–	–	22.43	–	–	22.46
12 α -COCH ₃	–	21.53	21.57	–	21.53	21.60
18	12.03	12.38	12.19	12.25	12.37	12.26
19	22.80	22.94	22.78	22.80	22.93	22.80
21	18.28	17.48	17.47	18.27	17.47	17.51
24	174.73	174.55	174.47	174.73	174.56	174.50
25	51.47	51.48	51.49	51.45	51.49	51.52
26	165.12	165.11	165.08	165.14	165.12	165.10
27	51.21	51.16	51.18	51.19	51.13	51.20
28	128.83	128.74	128.77	128.76	128.74	128.69
29	141.02	140.98	140.97	141.09	141.04	141.13
30	160.03	159.95	159.88	160.16	160.06	160.04
3'	75.18	75.81	75.26	75.03	74.99	75.06
5'	139.48	139.43	139.39	–	–	–
6'	122.96	122.95	122.97	–	–	–
18'	11.85	11.83	11.82	12.03	12.03	12.07
19'	22.55	22.53	22.53	22.55	22.53	22.55
21'	18.71	18.69	18.68	18.66	18.63	18.66
26'	20.84	21.33	21.36	20.84	21.34	21.39
27'	21.05	21.02	21.01	21.22	21.18	21.22

and CH₃-27' at 12.05 ppm, 22.85 ppm, 18.64 ppm and 27.17 and 22.55, respectively. The carbon atoms of the HC≡C-CO₂ group are observed in the range 152.29 ppm, and 75.12 ppm as well as at 76.37 ppm are assigned to CO₂, C≡C-H respectively.

The ¹³C NMR spectra of dimers linked by 1,2,3-triazole ring in CDCl₃, showed signals at 12.38–12.03 ppm, 22.93–22.78 ppm, 18.28–17.47 ppm, which were assigned to CH₃-18, CH₃-19 and

CH₃-21 of bile acids parts, respectively. In the case of cholesterol parts, the signals of C-atoms of CH₃-18', CH₃-19' and CH₃-21' groups were situated in the ranges of 12.07–11.82, 22.55–22.53, and 18.71–18.63 ppm, respectively. The following characteristic shifts of methyl groups were present in the sterol side chain: CH₃-26' and CH₃-27' are positioned in the range of 21.39–20.84 ppm and 21.22–21.01 ppm.

Analytical differences in the ¹³C NMR spectra of the methyl groups of compound (**17**) and (**20**) are shown in Fig. 2. On the other hand, in the ¹³C NMR spectra of compounds (**17–22**), the signals of the C(27)H₂ groups appeared in the range of 51.21–51.13 ppm. The carbon atoms from triazole ring: C(28) as well as C(29) groups resonated at 128.83–128.69 ppm and 141.13–140.97 ppm, respectively.

The signals of C(24)=O, C(26)=O and C(30)=O, appeared in the range of 174.73–174.47 ppm, 165.14–165.08 ppm and 160.16–159.95 ppm, respectively. However, carbon atoms in C = O of acetoxy groups in positions 7 α and 12 α resonate in the range of 170.45–170.22 ppm.

3.2.2. Infrared spectroscopy

The most characteristic feature of the FT-IR spectra of compound (**16**) is band at 3284 cm⁻¹ assigned to the ν (≡C-CH) group. Regarding that the steroid skeleton is a saturated hydrocarbon, it doesn't provide many useful IR features. Strong stretching vibrations of C-H bonds are identified at 2933 cm⁻¹ and 2865 cm⁻¹. For synthesized compounds (**10**), (**11**) and (**12**) are requisite and analytical bands at 2111–2106 cm⁻¹, which are specific attribute of ν (N = N⁺=N⁻) group. Moreover, for all substrates (**7–9**), (**10–12**) and (**15–16**) are also observed two strong characteristic bands at 1756–1707 cm⁻¹ and 1283–1198 cm⁻¹, which are assigned respectively to the symmetric group ν (C = O) and ν (C-O). It worth mentioning that the most distinctive in the FT-IR spectra of conjugated steroids (**15–20**) are represented by ν (C = O) and ν (C-O) groups, two powerful bands in the 1743–1732 cm⁻¹ and 1244–1211

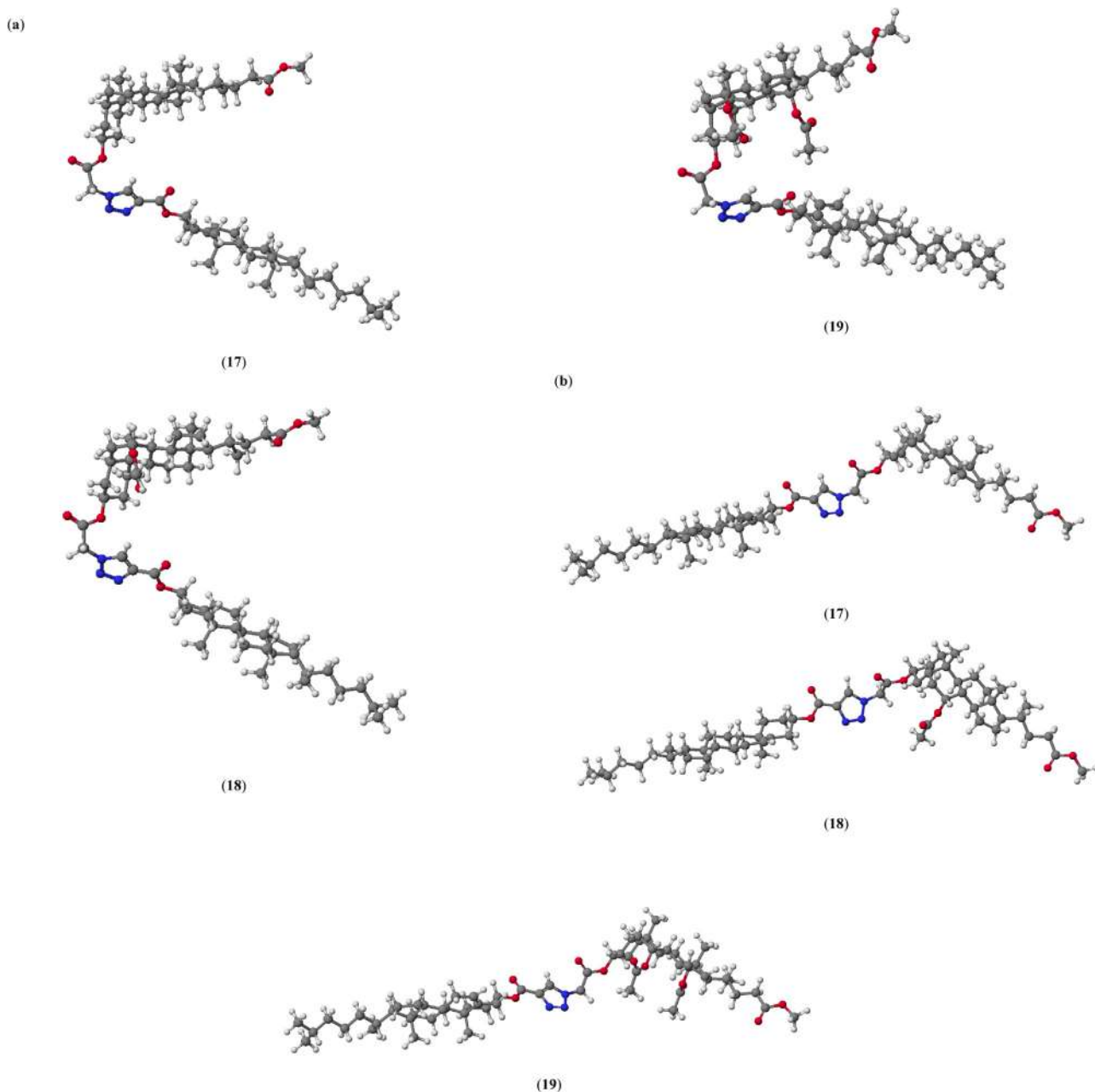


Fig. 3. Molecular models of conformers *syn* (a) and *anti* (b) for conjugates (17–19) calculated by PM5 method.

cm^{-1} region, appropriately. In addition, characteristic stretching vibrations of C–H bonds are present in the $2946\text{--}2867\text{ cm}^{-1}$.

3.3. PM5 and B3LYP calculations

PM5 semiempirical calculations were performed using the WinMopac 2003 program. The molecular models of all conjugates are shown in Fig. 3. Representative conjugates (19) of bile acids in conformers *syn* and *anti* are shown in Fig. 4. The final heats of formation (HOF) for the bile acids (1–3), cholesterol (13) and cholestanol (14) as well as their conjugates (17–22) are presented in Table 4. It is worth mentioning that, in many works that describe the application of computational methods, one can find information on the comparison of theoretical results with crystallographic structures. Not without significance is the use of computational methods in determining the properties of the docking [70–72]. We were

able to obtain a very good picture of molecular modeling using semiempirical calculations [73]. The lowest values of HOF for conjugates of bile acids and sterols (17–22) are observed for cholic acids and its conjugates (19) and (22). The number of hydroxyl groups in the steroid skeleton lowers the value of the determinant of HOF. We observe exactly the same relationship for blocked hydroxyl groups by bolting them with acetate groups. The OAc groups facilitate the formation of intramolecular H-bonds and stable host-guest complexes. These complexes may be stabilized by H-bonding or electrostatic interactions that arise from the OAc groups in the bile acid molecule. The HOF value decreases with the increasing number of OAc groups in the steroid skeleton. Furthermore, for *anti* conformers of deoxycholic and cholic acid derivatives, HOF is lower than for *syn* conformers. On the other hand, the *syn* conformer of the lithocholic acid derivatives (17) and (20) has a higher HOF value than the *anti* conformer and is therefore more durable as no

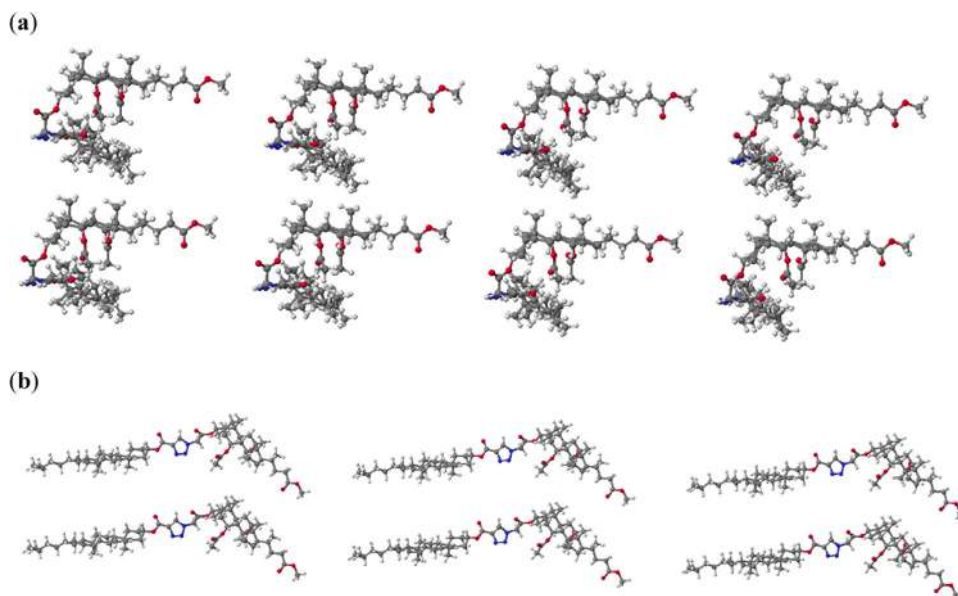


Fig. 4. Molecular models of conformers *syn* (a) and *anti* (b) of conjugate (19) calculated by PM5 method.

Table 4
Heat of formation (HOF) [kcal/mol] of bile acids (1–3), sterols (13,14) and conjugates (17–22).

Compound	HOF	HOF _{syn}	HOF _{anti}	ΔHOF ₁	ΔHOF ₂	ΔHOF ₃	ΔHOF ₄
1	-229.2756	-	-	-	-	-	-
2	-266.8560	-	-	-	-	-	-
3	-309.8662	-	-	-	-	-	-
13	-145.2016	-	-	-	-	-	-
14	-167.9130	-	-	-	-	-	-
17	-	-370.9984	-370.8825	-141.7228	-141.6069	-225.7968	-225.6809
18	-	-448.9483	-456.2749	-182.0923	-189.4189	-303.7467	-311.0733
19	-	-533.3628	-542.0610	-223.4966	-232.1948	-388.1612	-396.8450
20	-	-394.2004	-393.6084	-164.9248	-164.3328	-226.2874	-225.6954
21	-	-471.8692	-479.4003	-205.0132	-212.5443	-3,039,562	-311.4873
22	-	-557.2032	-557.2743	-247.3370	-247.4081	-389.2902	-389.3613

$$\Delta\text{HOF}_1 = \text{HOF}_{\text{conjugates syn (17-22)}} - \text{HOF}_{\text{bile acids (1-3)}}$$

$$\Delta\text{HOF}_2 = \text{HOF}_{\text{conjugates anti (17-22)}} - \text{HOF}_{\text{bile acids (1-3)}}$$

$$\Delta\text{HOF}_3 = \text{HOF}_{\text{conjugates syn (17-22)}} - \text{HOF}_{\text{sterols (13-14)}}$$

$$\Delta\text{HOF}_4 = \text{HOF}_{\text{conjugates anti (17-22)}} - \text{HOF}_{\text{sterols (13-14)}}$$

intramolecular interactions are formed. This is due to the absence of electron donating or acceptor groups in its molecule (without OAc groups). The preferential formation of *syn* conformers for conjugates (17) and (20) can therefore be explained by the formation of a molecule that is smaller in volume. However, for the remaining conjugates, deoxycholic and cholic acid derivatives (18–19) and (21–22), *anti* conformers with a lower HOF value are arranged in layers (Fig.3).

The relations between the experimental ^{13}C and ^1H chemical shifts (δ_{exp}) and the GIAO (Gauge-Independent Atomic Orbitals) magnetic isotopic shielding constants (σ_{calc}), which are widely used in an efficient implementation [65,66], are usually linear and described by the following equation: $\delta_{\text{exp}} = a + b \cdot \sigma_{\text{calc}}$. The slope and intercept of the least-squares correlation line is used to scale the GIAO magnetic isotopic shielding constants, σ_{calc} , and to predict the chemical shifts, $\delta_{\text{pred}} = a + b \cdot \sigma_{\text{calc}}$ (Fig. 5). The parameters a and b are given in Table 5. Usually, the correlations between the experimental chemical shifts and calculated magnetic isotopic shielding constants are better for carbon-13 atoms than for protons. The differences between the calculated and experimental shifts for protons are probably due to the fact that the shifts are calculated for single molecules in gas phase. As can be seen from Fig. 5 the correlation is good for both carbon atoms and for the protons.

3.4. Prediction of activity spectra for substances

Potential pharmacological activities of the synthesized compounds have been determined on the basis of computer-aided drug discovery approach with *in silico* Prediction of Activity Spectra for Substances (PASSs) program. It is based on a robust analysis of the structure-activity relationship in a heterogeneous training set currently including about 250,000 biologically active compounds from different chemical series with about 4,500 types of biological activities. Since only the structural formula of the chemical compound is necessary to obtain a PASS prediction, this approach can be used at the earliest stages of investigation. There are many examples of the successful use of the PASS approach leading to new pharmacological agents [74–78]. The PASS software is useful for the study of biological activity of secondary metabolites. We have selected the types of activities that were predicted for a potential compound with the highest probability (focal activities). If predicted activity is higher than 0.7 ($\text{PA} > 0.7$), the substance is very likely to exhibit the activity in experiment and the chance of the substance being the analogue of a known pharmaceutical agent is also high. If predicted activity is between 0.5 and 0.7 ($0.5 < \text{PA} < 0.7$), the substance is unlikely to exhibit the activity. In experiment and the similarity to known pharmaceutical substance is very limited. Additionally, analyses of the biolog-

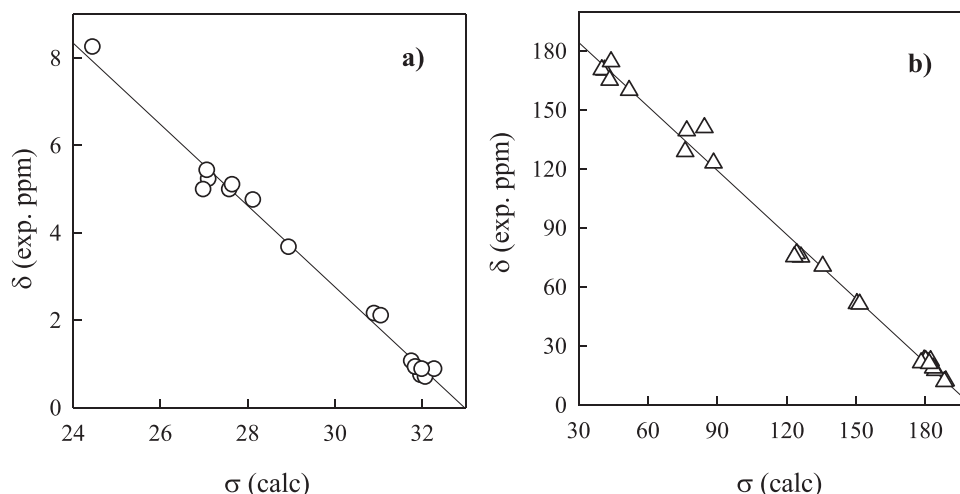


Fig. 5. Experimental chemical shifts (δ_{exp} , CDCl_3) in (**19**) vs isotropic magnetic shielding constants (σ_{calc}) from the GIAO/B3LYP/6-311G(d,p) calculations; (a) protons and (b) carbons-13.

Table 5

Chemical shifts (δ , ppm) in CDCl_3 and calculating GIAO nuclear magnetic shielding tensors (σ_{calc}) for (**19**). The predicted GIAO chemical shifts were computed from the linear equation $\delta_{\text{exp.}} = a + b \cdot \sigma_{\text{calc}}$ with a and b determined from the fit of the experimental data (r^2 is the correlation coefficient).

	$\delta_{\text{exp.}}$	δ_{calc}	σ_{calc}		$\delta_{\text{exp.}}$	δ_{calc}	σ_{calc}
C(3)	75.16	80.50	126.30	H(3 β)	4.74	4.49	28.14
C(7)	70.52	70.38	135.67	H(7 β)	4.98	4.99	27.66
C(12)	76.87	82.54	124.41	H(12 β)	5.09	4.93	27.58
C(7-CO)	170.22	172.33	41.27	H(18)	0.73	0.92	31.98
C(12-CO)	170.43	173.66	40.09	H(19)	0.92	1.02	31.86
C(7-COCH ₃)	22.43	19.94	182.38	H(21)	0.82	0.77	32.14
C(12-COCH ₃)	21.57	21.28	181.14	H(25)	3.66	3.73	28.95
C(18)	12.19	12.87	188.93	H(27)	5.22	5.45	27.11
C(19)	22.78	22.95	179.59	H(28)	8.24	7.91	24.46
C(21)	17.47	17.70	184.45	H(7 α -OAc)	2.14	1.91	30.91
C(24)	174.47	169.26	44.12	H(12 α -OAc)	2.09	1.77	31.06
C(25)	51.49	54.34	150.53	H(3' α)	4.98	5.55	26.78
C(26)	165.08	169.26	43.50	H(6')	5.42	5.48	27.08
C(27)	51.18	53.11	151.66	H(18')	0.69	0.82	32.08
C(28)	128.77	134.65	76.17	H(19')	1.05	1.12	31.76
C(29)	140.97	125.66	84.47	H(21')	0.92	1.03	31.85
C(30)	159.88	160.82	51.93	H(26')	0.87	0.63	32.29
C(3')	75.26	83.61	123.43	H(27')	0.87	0.89	32.00
C(5')	139.39	133.93	76.83	a			30.6665
C(6')	122.97	121.41	88.42	b			-0.9303
C(18')	11.82	13.45	188.39	r^2			0.9905
C(19')	22.53	22.23	180.26				
C(21')	18.68	18.72	183.51				
C(26')	21.36	24.33	178.32				
C(27')	21.01	20.59	181.78				
a			216.9071				
b			-1.848				
r^2			0.9942				

ical prediction activity spectra for the new bromoacetoxy derivatives of deoxy and cholic acids (**8–9**), azidoacetoxy derivatives of deoxy and cholic acids (**11–12**), and 5 α -cholestan-3-yl-propynoate (**16**) as well as all conjugates (**17–22**) prepared herein are good examples of *in silico* studies of chemical compounds. We also selected the types of activity that were predicted for a potential compound with the highest probability (focal activities) (Table 6). According to these data the most frequently predicted types of biological activity for (**8–9**) and (**11–12**) are: acylcarnitine hydrolase inhibitor, alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor, alkylacetyl glycerophosphatase inhibitor, dextranase inhibitor, glyceryl ether monooxygenase inhibitor, peptidoglycan glycosyltransferase

inhibitor. Additionally 5 α -cholestan-3-yl-propynoate greater than 0.80 are: anesthetic general, respiratory analeptic, protein-disulfide reductase (glutathione) inhibitor, cholestanetriol 26-monooxygenase inhibitor, prostaglandin-E2 9-reductase inhibitor, CYP2C, CYP3A, CYP2B6 and CYP3A4 substrates, flavin-containing monooxygenase inhibitor, alkenylglycerophosphoethanolamine hydrolase inhibitor, linoleate diol synthase inhibitor, glucan Endo-1,3-beta-D-glucosidase inhibitor, antiemetic, analeptic. Conjugates have significantly lower predicted biological activity than the substrates discussed above. The most important include: pancreatic disorders treatment, glyceryl ether monooxygenase inhibitor, cholesterol antagonist, antihypercholesterolemic, aypolipemic.

Table 6
"Probability to be Active" (PA) values for the predicted biological activity of (8–9) and (11–12), (16) as well as (15–20).

Focal Predicted Activity (PA > 0.70)	Compounds										
	8	9	11	12	16*	17	18	19	20	21	22
Acylcarnitine hydrolase inhibitor	0.96	0.96	0.95	0.95	0.96	-	-	-	-	-	-
Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor	0.93	0.90	0.89	0.83	0.95	-	-	-	-	-	-
Alkylacetyl glycerophosphatase inhibitor	0.93	0.90	0.90	0.86	0.95	-	-	-	-	-	-
Dextranase inhibitor	0.89	0.83	0.85	0.75	0.89	-	-	-	-	-	-
Glycerylether monooxygenase inhibitor	0.82	0.85	0.80	0.83	0.81	-	0.71	0.75	0.72	0.75	0.79
Peptidoglycanglycosyltransferase inhibitor	0.81	0.75	0.80	0.73	0.82	-	-	-	-	-	-
Cholesterol antagonist	0.79	0.76	-	-	0.89	0.84	0.76	0.76	0.71	-	-
Protein-disulfide reductase (glutathione) inhibitor	0.80	0.72	0.76	-	-	-	-	-	-	-	-
Adenomatous polyposis treatment	0.79	0.80	0.76	0.78	0.83	-	-	-	-	-	-
Cytoprotectant	0.74	0.76	0.73	0.75	-	-	-	-	-	-	-
Hypolipemic	-	0.71	-	0.74	0.73	0.76	0.78	0.85	-	-	0.78
	-	-	0.73	0.79	0.80	0.73	-	0.75	-	-	-
Antihypercholesterolemic	-	-	-	-	-	0.83	0.80	0.79	0.90	0.86	0.84
Pancreatic disorder treatment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* more examples in the text.

Table 7
Calculated docking scores for compounds (19) and (22).

Compound	ΔG docking score [kcal/mol]			
	2Q85	1KZN	5V5Z	1EZF
19	-6.877	-9.946	-15.856	-13.361
22	-0.238	-10.34	-15.388	-15.119

3.5. Molecular docking studies

Potential antibacterial and antifungal activity of two representative compounds was determined in docking study. In this case two of the most common molecular targets which are responsible for antibacterial activity were chosen: *E. coli* MurB (PDB ID: 2Q85) [79] and Gyrase (PDB ID: 1KZN) [80]. In terms of antifungal activity two of the most significant molecular targets are: CYP51_{Ca} (PDB ID: 5V5Z) [81] and Squalene synthase (PDB ID: 1EZF) [82] and that targets were chosen for docking study. Based on calculated docking score (Table 7), most of considered compounds may exhibit potential antibacterial and antifungal activity, however antifungal activity seems to be stronger. All docked compounds occupy the same binding pocket as the parent co-crystallized ligands.

3.5.1. Docking to antibacterial drug targets

During docking to *E. coli* MurB protein (Fig. 6), forming of strong hydrogen bond with Arg327 was observed for both compounds. Ligands adopt bent conformation in the binding site. Ligand **19** exhibited forming of additional strong hydrogen bonds (bond length ≤ 2.1 Å) with Gln120 and Arg159. For the same ligand, we identified stabilizing hydrophobic contact (with Ile110,

Leu290, Val291 and Pro111) as well. The binding mode for compound **19** is similar to those reported by A. Geronikaki [83]. Ligand **22** (Fig. 7) with the highest docking score ($\Delta G = -0.238$ kcal/mol) exhibited many steric clashes which may suggest it does not fit to the binding pocket which may implies low activity. In terms of binding to gyrase (Table 7, 1KZN) both compounds exhibit low docking score and forming hydrogen bonds with Arg136 and Arg76 (bond length ≤ 2.2 Å) and cation- π interaction between 1,2,3-triazole ring and Arg76. Some stabilizing hydrophobic interactions were identified as well as less number of steric clashes than for 2Q85.

3.5.2. Docking to antifungal drug targets

For both targets, docking study revealed the lowest docking scores and bent conformations for considered compounds. Ligand **19** (Fig. 8) forms strong hydrogen bond (bond length = 2.6 Å) between His377 and lanosterol 14 α -demethylase of *C. albicans* (Table 7, CYP51_{Ca}) whereas compound **22** (Fig. 8) forms hydrogen interaction with Met508 (bond length = 2.3 Å). In terms of stabilizing hydrophobic interactions (eg. Phe233 or Ile231) one of the most crucial is interaction between compound **19** and Hem601. This interaction was not observed for ligand **22**. For both ligands just a few steric clashes were identified which shows that ligands fit into binding pocket well. Docked ligand **19** to Squalene synthase (Fig. 9, Table 7) revealed forming of two strong hydrogen bonds with Arg218 and Arg52 (bond length ≤ 2.1 Å) while ligand **22** showed only one hydrogen bond with Gln212 (bond length ≤ 2.1 Å). Some weak stabilizing hydrophobic interactions were identified as well as a few steric clashes. Both compounds adopt bent conformation.

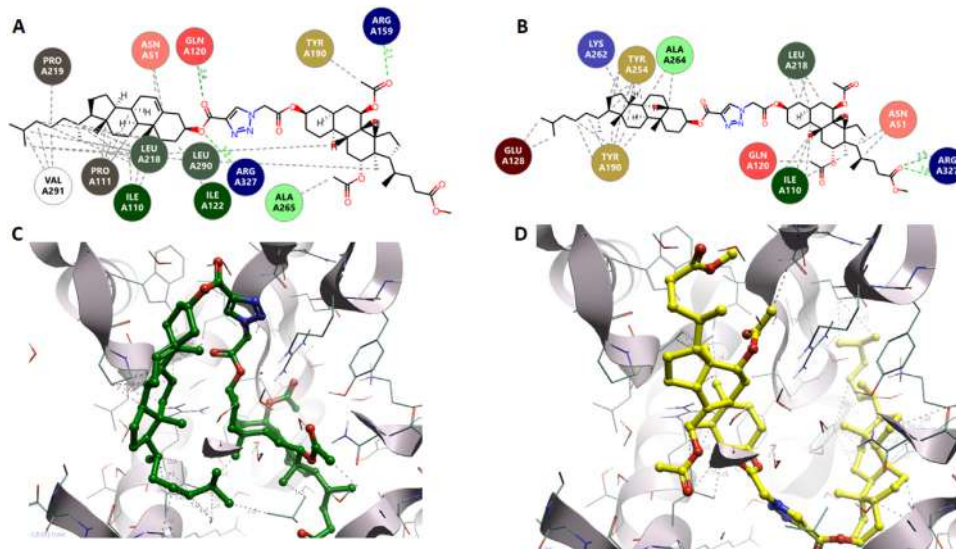


Fig. 6. Ligand interactions and binding mode for compound 19 and 22 in 2Q85. A, C – represents ligand 19 (green); B, D – represents ligand 22 (yellow).

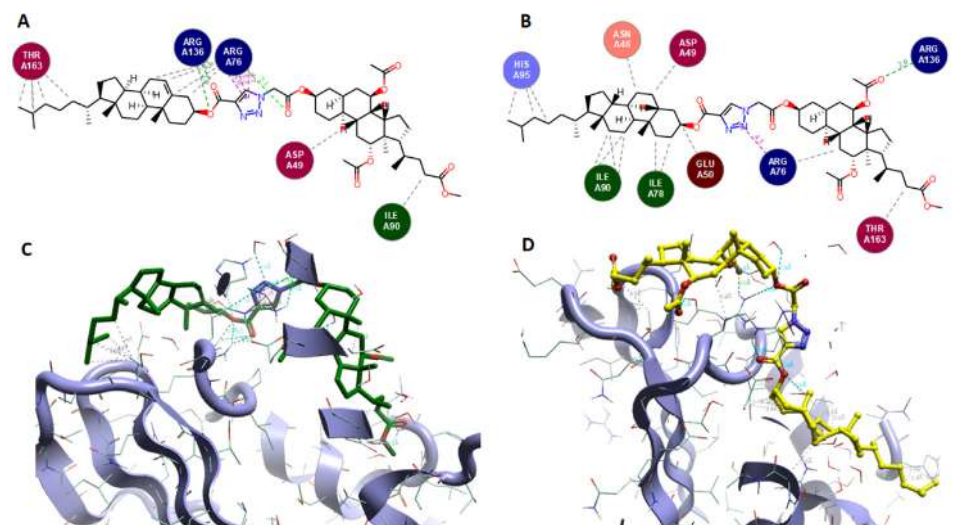


Fig. 7. Ligand interactions and binding mode for compound 19 and 22 in 1KZN. A, C – represents ligand 19 (green); B, D – represents ligand 22 (yellow).

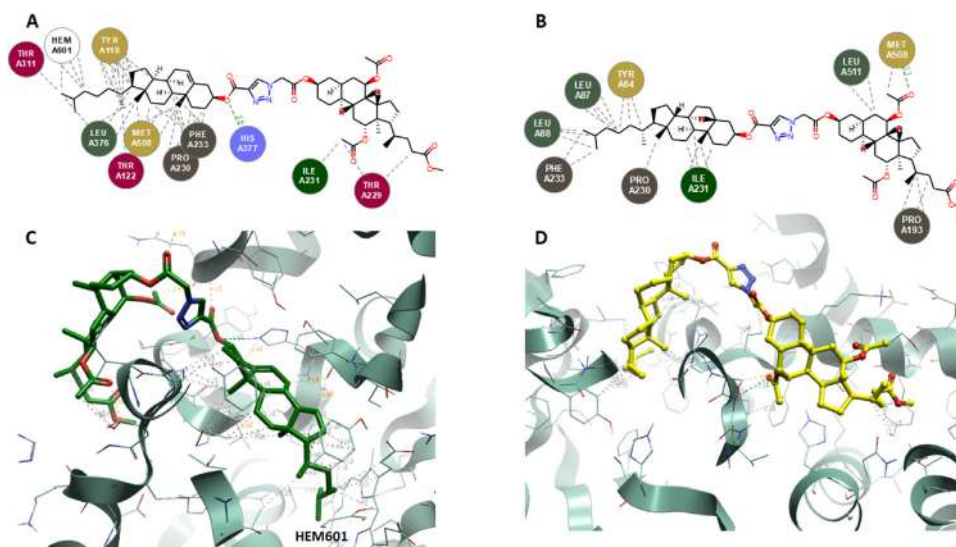


Fig. 8. Ligand interactions and binding mode for compound 19 and 22 in 5V5Z. A, C – represents ligand 19 (green); B, D – represents ligand 22 (yellow).

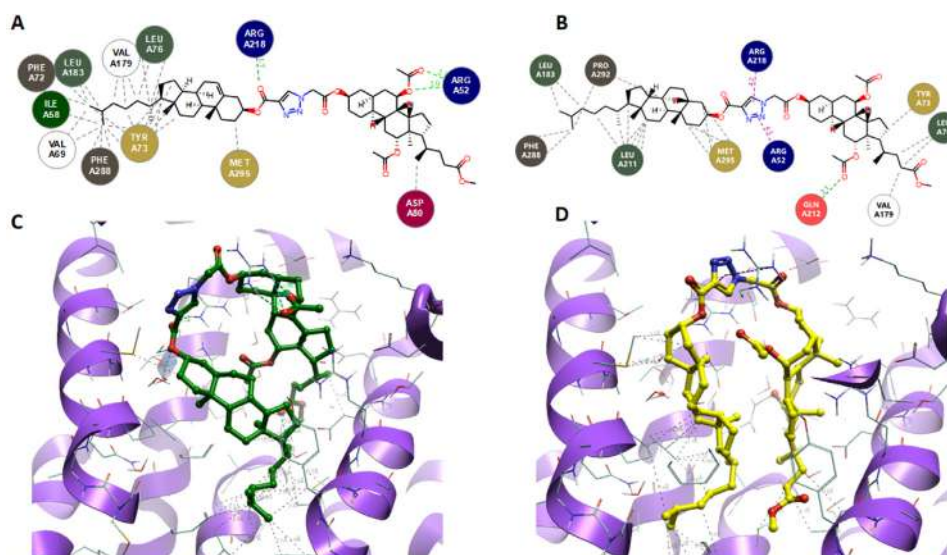


Fig. 9. Ligand interactions and binding mode for compound **19** and **22** in 1EZf. A, C – represents ligand **19** (green); B, D – represents ligand **22** (yellow).

4. Conclusions

The increasing interest in the synthesis of new bile acid conjugates using the click chemistry method significantly influences on the development of supramolecular chemistry, pharmacology and medicine. Design, preparation, enormous biological potential and a wide range of physicochemical properties of compounds containing the 1,2,3-triazole ring allow them to be used as artificial receptors, organogels or new complexing and transporting drugs. In conclusion, six new conjugates of bile acids and sterols linked with 1,2,3-triazole ring (**17–22**) in a way: head (sterol)-tail (bile acid) were prepared from cholesterol/cholestanol esters of propionic acid and azidoacetyl substituted derivatives of bile acids in *t*-BuOH/MeOH mixture in the presence of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate at 60 °C. Moreover, two bromoacetyl (**8**) and (**9**) as well as two azidoacetyl (**11**) and (**12**) substituted derivatives of bile acids were prepared from dehydrocholic or cholic acid in dry dichloromethane with bromoacetic acid bromide and in THF with sodium azide at 50 °C, appropriately. Additionally cholestanyl ester of propionic acid (**16**) were prepared from cholestanol in dichloromethane. These new compounds linked with 1,2,3-triazole ring were characterized by analytical methods such as spectroscopic (NMR, FT-IR), spectrometry (ESI-MS), semiempirical calculation (PM5) and PASS. The effects of inter and intramolecular interactions and conformation of molecules have been precisely explained by comparison of experimental data taken in the condensed phase and calculation data (gas phase). The magnetic isotopic shielding constants, σ_{calc} , were calculated by the GIAO/B3LYP/6–311G(dp) level of theory. Linear correlations between the experimental ^1H and ^{13}C chemical shifts and the computed screening constants confirm the optimized geometry. The potential antibacterial and antifungal activity of two representative compounds were determined in the docking study. Based on the calculated docking score most of the considered compounds may exhibit potential antibacterial and antifungal activity, however, antifungal activity seems to be stronger.

5. Author contributions

The listed authors contributed to this work as described in the following. Anna Kawka performed the synthesis of cholesterol and bile acid derivatives. Grzegorz Hajdaś performed the synthesis of cholestanol and bile acid derivatives. Hanna Koenig was purifying compounds and interpreted the results. Iwona Kowalczyk

performed quantum chemical calculations. Tomasz Pospieszny carried out of the synthetic work, interpretation of results, performed semiempirical calculations (PM5) and Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). Damian Kułaga performed and described molecular docking studies. All authors contributed with valuable discussions and scientific input and approved the final version.

Declaration of Competing Interest

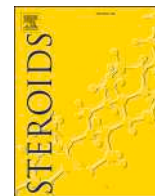
The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] T. Pospieszny, I. Małeczka, Z. Paryzek, Synthesis and spectroscopic studies of new bile acid derivatives linked by a 1,2,3-triazole ring, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 301–305, doi:10.1016/j.tetlet.2011.11.027.
- [2] I. Kirson, E. Glotter, Recent developments in naturally occurring ergostane-type steroids. A review, *J. Nat. Prod.* 44 (1981) 633–647, doi:10.1021/np50018a001.
- [3] T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, Spectroscopic methods and theoretical studies of bromoacetic substituted derivatives of bile acids, *Acta Chim. Slov.* 62 (2015) 15–27, doi:10.17344/acsi.2014.608.
- [4] P.M. Dewick, *Bile Acids*, in: *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*, 3rd Ed, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2009, pp. 275–277.
- [5] H. Gao, J.R. Dias, Selective protection of the various hydroxy groups of cholic acid and derivatives. a review, *Org. Prep. Proced. Int.* 31 (1999) 145–166, doi:10.1080/00304949909355705.
- [6] T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, Molecular structure, spectral and thermal properties and in silico biological activity of new bisphthalimidopropylalkylammonium conjugates of bile acids, *J. Mol. Struct.* 1243 (2021) 130814, doi:10.1016/j.molstruc.2021.130814.
- [7] J.Y.L. Chiang, Bile acids: regulation of synthesis: thematic review series: bile acids, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1955–1966, doi:10.1194/jlr.R900010-JLR200.
- [8] K. Rajakumar, S.L. Greenspan, S.B. Thomas, M.F. Holick, Solar ultraviolet radiation and vitamin D, *Am. J. Public Health.* 97 (2007) 1746–1754, doi:10.2105/AJPH.2006.091736.
- [9] P.L. Suarez, Z. Gándara, G. Gómez, Y. Fall, Vitamin D and click chemistry. Part 1: a stereoselective route to vitamin D analogues with triazole rings in their side chains, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 4619–4621, doi:10.1016/j.tetlet.2004.04.117.
- [10] M. Makishima, T.T. Lu, W. Xie, G.K. Whitfield, H. Domoto, R.M. Evans, M.R. Haussler, D.J. Mangelsdorf, Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor, *Science* 296 (2002) 1313–1316, doi:10.1126/science.1070477.
- [11] B. Brycki, H. Koenig, I. Kowalczyk, T. Pospieszny, Synthesis, spectroscopic and theoretical studies of new dimeric quaternary alkylammonium conjugates of sterols, *Molecules* 19 (2014) 9419–9434, doi:10.3390/molecules19079419.
- [12] W.H. Okamura, M.M. Midland, M.W. Hammond, N.Abd. Rahman, M.C. Dormanen, I. Nemere, A.W. Norman, Chemistry and conformation of vitamin D molecules, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53 (1995) 603–613, doi:10.1016/0960-0760(95)00107-B.

- [13] D.S. Agarwal, H.S. Anantaraju, D. Sriram, P. Yogeewari, S.H. Nanjagowda, P. Mallu, R. Sakhuja, Synthesis, characterization and biological evaluation of bile acid–aromatic/heteroaromatic amides linked via amino acids as anticancer agents, *Steroids* 107 (2016) 87–97, doi:10.1016/j.steroids.2015.12.022.
- [14] Y. Li, J.R. Dias, Dimeric and Oligomeric Steroids, *Chem. Rev.* 97 (1997) 283–304, doi:10.1021/cr9600565.
- [15] B. Brycki, H. Koenig, T. Pospieszny, Quaternary alkylammonium conjugates of steroids: synthesis, molecular structure, and biological studies, *Molecules* 20 (2015) 20887–20900, doi:10.3390/molecules201119735.
- [16] M. Malkoch, R.J. Thibault, E. Drockenmuller, M. Messerschmidt, B. Voit, T.P. Russell, C.J. Hawker, Orthogonal approaches to the simultaneous and cascade functionalization of macromolecules using click chemistry, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 14942–14949, doi:10.1021/ja0549751.
- [17] I.A. Pikuleva, Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 761–773, doi:10.1016/j.pharmthera.2006.05.014.
- [18] L. Xiao, E. Yu, H. Yue, Q. Li, Enhanced liver targeting of camptothecin via conjugation with deoxycholic acid, *Molecules* 1179 (24) (2019) 1179–1185, doi:10.3390/molecules24061179.
- [19] R. Mishra, S. Mishra, Updates in bile acid–bioactive molecule conjugates and their applications, *Steroids* 159 (2020) 108639, doi:10.1016/j.steroids.2020.108639.
- [20] H. Woo, H. Kang, A. Kim, S. Jang, J.C. Park, S. Park, B.–S. Kim, H. Song, K.H. Park, Azide–alkyne Huisgen [3+2] cycloaddition using CuO nanoparticles, *Molecules* 17 (2012) 13235–13252, doi:10.3390/molecules171113235.
- [21] K.Y. Tserng, D.L. Hachey, P.D. Klein, An improved procedure for the synthesis of glycine and taurine conjugates of bile acids, *J. Lipid Res.* 18 (1977) 404–407, doi:10.1016/S0022-2275(20)41691-8.
- [22] S.M. Huijghebaert, A.F. Hofmann, Influence of the amino acid moiety on deconjugation of bile acid amides by cholestyramine hydrolase or human fecal cultures, *J. Lipid Res.* 27 (1988) 742–752, doi:10.1016/S0022-2275(20)38791-5.
- [23] A.F. Hofmann, L.R. Hagey, M.D. Krasowski, Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 226–246, doi:10.1194/jlr.R000042.
- [24] J.Y.L. Chiang, Bile acids: regulation of synthesis, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1955–1966, doi:10.1194/jlr.R900010-JLR200.
- [25] S. Mukhopadhyay, U. Maitra, Chemistry and biology of bile acids, *Curr. Sci* 87 (2004) 1666–1683.
- [26] B. Brycki, H. Koenig, I. Kowalczyk, T. Pospieszny, Synthesis, spectroscopic and theoretical studies of new quaternary N,N-dimethyl-3-phthalimidopropylammonium conjugates of sterols and bile acids, *Molecules* 19 (2014) 4212–4233, doi:10.3390/molecules19044212.
- [27] J. Tamminen, E. Kolehmainen, Bile acids as building blocks of supramolecular hosts, *Molecules* 6 (2001) 21–46, doi:10.3390/60100021.
- [28] D. Opsenica, G. Pocsfalvi, Z. Juranic, B. Tinant, J.P. Declercq, D.E. Kyle, W.K. Milhous, B.A. Solaja, Cholic acid derivatives as 1,2,4,5-tetraoxane carriers: structure and antimalarial and antiproliferative activity, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3274–3282, doi:10.1021/jm000952f.
- [29] E. Virtanen, E. Kolehmainen, Use of bile acids in pharmacological and supramolecular applications, *Eur. J. Org. Chem.* 2004 (2004) 3385–3399, doi:10.1002/ejoc.200300699.
- [30] D. Albert, M. Feigel, β -Loop, γ -loop, and helical peptide conformations in cycloleptides containing a steroidal pseudo-amino acid, *Helv. Chim. Acta.* 80 (1997) 2168–2181, doi:10.1002/hlca.19970800716.
- [31] T. Pospieszny, H. Koenig, Design, synthesis, spectral and theoretical study of new bile acid–sterol conjugates linked via 1,2,3-triazole ring, *Steroids* 176 (2021) 108934, doi:10.1016/j.steroids.2021.108934.
- [32] D.S. Agarwal, V. Siva Krishna, D. Sriram, P. Yogeewari, R. Sakhuja, Clickable conjugates of bile acids and nucleosides: synthesis, characterization, in vitro anticancer and antituberculosis studies, *Steroids* 139 (2018) 35–44, doi:10.1016/j.steroids.2018.09.006.
- [33] H. Wang, W.–H. Chan, A cholic acid–based fluorescent chemosensor for the detection of ATP, *Org. Biomol. Chem.* 6 (2008) 162–168, doi:10.1039/B715086E.
- [34] A. Kumar, R.K. Chhatra, P.S. Pandey, Synthesis of click bile acid polymers and their application in stabilization of silver nanoparticles showing iodide sensing property, *Org. Lett.* 12 (2010) 24–27, doi:10.1021/ol902351g.
- [35] T. Pospieszny, Molecular pockets, umbrellas and quasi podands from steroids: synthesis, structure and applications, *Mini-Rev. Org. Chem.* 12 (2015) 258–270, doi:10.2174/1570193x1203150429105154.
- [36] P.S. Pandey, R. Rai, R.B. Singh, Synthesis of cholic acid–based molecular receptors: head-to-head cholaphanes, *J. Chem. Soc. Perkin 1* (1) (2002) 918–923, doi:10.1039/B200320C.
- [37] J. Ropponen, J. Tamminen, E. Kolehmainen, K. Rissanen, Synthesis and characterization of novel steroidal dendrons, *Synthesis (Mass)* (2003) 2226–2230, doi:10.1055/s-2003-41041.
- [38] T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, Synthesis, spectroscopic and theoretical studies of new Quasi-Podands from bile acid derivatives linked by 1,2,3-triazole rings, *Molecules* 19 (2014) 2557–2570, doi:10.3390/molecules19022557.
- [39] D. Verzele, S. Figaroli, A. Madder, Shortcut access to peptidosteroid conjugates: building blocks for solid-phase bile acid scaffold decoration by convergent ligation, *Molecules* 16 (2011) 10168–10186, doi:10.3390/molecules161210168.
- [40] H. Wang, W.–H. Chan, Cholic acid–based fluorescent sensor for mercuric and methyl mercuric ion in aqueous solutions, *Tetrahedron* 36 (2007) 8825–8830, doi:10.1016/j.tet.2007.06.026.
- [41] V. Noponen, H. Belt, M. Lahtinen, A. Valkonen, H. Salo, J. Ulrichová, A. Gaillardáková, E. Sievänen, Bile acid–cysteamine conjugates: structural properties, gelation, and toxicity evaluation, *Steroids* 77 (2012) 193–203, doi:10.1016/j.steroids.2011.11.006.
- [42] D. Pasini, The click reaction as an efficient tool for the construction of macrocyclic structures, *Molecules* 18 (2013) 9512–9530, doi:10.3390/molecules18089512.
- [43] T. Pospieszny, M. Pakiet, I. Kowalczyk, B. Brycki, Design, synthesis and application of new bile acid ligands with 1,2,3-triazole ring, *Supramol. Chem.* 29 (2017) 81–93, doi:10.1080/10610278.2016.1175568.
- [44] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click Chemistry: diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40 (2001) 2004–2021, doi:10.1002/1521-3773(20010601)40:11(2004):AID-ANIE2004.3.CO;2-5.
- [45] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 210–216, doi:10.1021/ja0471525.
- [46] J. Morales-Sanfrutos, M. Ortega-Muñoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, Synthesis of calixarene-based cavitands and nanotubes by click chemistry, *J. Org. Chem.* 73 (2008) 7768–7771, doi:10.1021/jo801325c.
- [47] C.D. Hein, X.–M. Liu, D. Wang, Click chemistry, A powerful tool for pharmaceutical sciences, *Pharm. Res.* 25 (2008) 2216–2230, doi:10.1007/s11095-008-9616-1.
- [48] J.E. Hein, V.V. Fokin, Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1302–1315, doi:10.1039/B904091A.
- [49] R. Huisgen, Kinetics and mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2 (1963) 633–645, doi:10.1002/anie.196306331.
- [50] F. Amblard, J.H. Cho, R.F. Schinazi, Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide–alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4207–4220, doi:10.1021/cr9001462.
- [51] G.C. Tron, T. Pirali, R.A. Billington, P.L. Canonico, G. Sorba, A.A. Genazzani, Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes, *Med. Res. Rev.* 28 (2008) 278–308, doi:10.1002/med.20107.
- [52] A. Kumar, P.S. Pandey, Steroidal 1,2,3-triazole-based sensors for Hg²⁺ ion and their logic gate behaviour, *Tetrahedron Lett* 50 (2009) 5842–5845, doi:10.1016/j.tetlet.2009.08.007.
- [53] L. Liu, K. Sun, L. Su, J. Dong, L. Cheng, X. Zhu, C.–T. Au, Y. Zhou, S.–F. Yin, Palladium-catalyzed regio- and stereoselective coupling–addition of propiolates with arylsulfonyl hydrazides: a pattern for difunctionalization of alkynes, *Org. Lett.* 20 (2018) 4023–4027, doi:10.1021/acs.orglett.8b01585.
- [54] J. Johansson, T. Beke-Somfai, A. Said Stålsmeden, N. Kann, Ruthenium-catalyzed azide alkyne cycloaddition reaction: scope, mechanism, and applications, *Chem. Rev.* 116 (2016) 14726–14768, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00466.
- [55] J. Palaniaraja, S. Roopan, Ruthenium mediated cycloaddition reaction in organic synthesis – review, *Chem. Sci. Rev. Lett.* 3 (2014) 93–100 ISSN 2278-6783.
- [56] B.C. Boren, S. Narayan, L.K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V.V. Fokin, Ruthenium-Catalyzed Azide–alkyne cycloaddition: scope and mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 8923–8930, doi:10.1021/ja0749993.
- [57] A. Kumar, P.S. Pandey, Anion recognition by 1,2,3-triazolium receptors: application of click chemistry in anion recognition, *Org. Lett.* 10 (2008) 165–168, doi:10.1021/ol702457w.
- [58] X. Cui, X. Zhang, W. Wang, X. Zhong, Y. Tan, Y. Wang, J. Zhang, Y. Li, X. Wang, Regitz Diazo transfer reaction for the synthesis of 1,4,5-trisubstituted 1,2,3-triazoles and subsequent regioselective construction of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles via C–C bond cleavage, *J. Org. Chem.* 86 (2021) 4071–4080, doi:10.1021/acs.joc.0c02912.
- [59] Y. Fang, K. Bao, P. Zhang, H. Sheng, Y. Yun, S.–X. Hu, D. Astruc, M. Zhu, Insight into the mechanism of the CuAAC reaction by capturing the crucial Au₄Cu₄– π -alkyne intermediate, *J. Am. Chem. Soc.* 143 (2021) 1768–1772, doi:10.1021/jacs.0c12498.
- [60] R. Ramapanicker, P. Chauhan, S. Chandrasekaran (Ed.), Click chemistry: mechanistic and synthetic perspectives, *Click React. Org. Synth* (2016) 1–24, doi:10.1002/9783527694174.ch1.
- [61] R. Dennington II, T. Keith, T.J. Millam, Gauss View, Version 4.1.2, Semichem. Inc., Shawnee Mission, KS, 2007.
- [62] M. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, Y. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [63] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. V. Systematic optimization of exchange–correlation functionals, *J. Chem. Phys.* 107 (1997) 8554–8560, doi:10.1063/1.475007.
- [64] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, Ab initio calculation of vibrational absorption and circular Dichroism spectra using density functional force fields density functional force fields, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 11623–11627, doi:10.1021/j100096a001.

- [65] W.J. Hehre, L. Random, P.V.R. Schleyer, J.A. Pople, *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, Wiley, New York, 1989.
- [66] K. Wolinski, J.F. Hilton, P.J. Pulay, Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8251–8260, doi:10.1021/ja00179a005.
- [67] Flare, version, Cresset®, Litlington, Cambridgeshire, UK; <http://www.cresset-group.com/flare/>; Copyright©, 2022 Cresset. All rights reserved.
- [68] RCSB Protein DATA BANK; <https://www.rcsb.org> access: 27.09.2022.
- [69] T. Pospieszny, Design and synthesis of new bile acid-sterol conjugates linked via 1,2,3-triazole ring, *Helv. Chim. Acta* 98 (2015) 1337–1350, doi:10.1002/hlca.201500118.
- [70] Ž.B. Milanović, D.S. Dimić, E.H. Avdović, D.A. Milenković, J. Dimitrić-Marković, O.R. Klisurić, S.R. Trifunović, Z.S. Marković, Synthesis and comprehensive spectroscopic (X-ray, NMR, FTIR, UV-Vis), quantum chemical and molecular docking investigation of 3-acetyl-4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-7-yl acetate, *J. Mol. Struct.* 1225 (2021) 129256, doi:10.1016/j.molstruc.2020.129256.
- [71] D. Milenković, E. Avdović, D. Dimić, S. Sudha, D. Ramarajan, Ž. Milanović, S. Trifunović, Z. Marković, Vibrational and Hirshfeld surface analyses, quantum chemical calculations, and molecular docking studies of coumarin derivative 3-(1-m-toluidinoethylidene)-chromane-2,4-dione and its corresponding palladium(II) complex, *J. Mol. Struct.* 1209 (2020) 127935 doi:10.1016/j.molstruc.2020.127935.
- [72] D. Dimić, Z. Marković, L. Saso, E. Avdović, J. Đorović, I. Petrović, D. Stanisavljević, M. Stevanović, I. Potočňák, Erika Samořová, S. Trifunović, J. Dimitrić-Marković, Synthesis and characterization of 3-(1-((3,4-dihydroxyphenethyl)amino)ethylidene)-chroman-2,4-dione as a potential antitumor agent, *Oxid. Med. Cell Longev* (2019) 2069250–12, doi:10.1155/2019/2069250.
- [73] T. Pospieszny, M. Pakiet, I. Kowalczyk, B. Brycki, Design, synthesis and application of new bile acid ligands with 1,2,3-triazole ring, *Supramol. Chem.* 29 (2) (2016) 81–93, doi:10.1080/10610278.2016.1175568.
- [74] Way2Drug.com © 2011 - 2022 Version 2.0 Privacy Policy, <http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/>.
- [75] V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, Y.V. Borodina, A.A. Lagunin, A. Kos, Robustness of biological activity spectra predicting by computer program PASS for non-congeneric sets of chemical compounds, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 40 (2000) 1349–1355, doi:10.1021/ci000383k.
- [76] V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, How to acquire new biological activities in old compounds by computer prediction, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 16 (2002) 819–824, doi:10.1023/A:1023836829456.
- [77] V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, in: *Predictive Toxicology*, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA, 2005, pp. 459–478. Helma, C., Ed.
- [78] A.V. Stepanchikova, A.A. Lagunin, D.A. Filimonov, V.V. Poroikov, Prediction of biological activity spectra for substances: evaluation on the diverse sets of drug-like structures, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 225–233, doi:10.2174/0929867033368510.
- [79] A.E. Zoeiby, F. Sanschagrín, R.C. Leves, Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors, *Mol. Microbiol.* 47 (1) (2003) 1–12, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03289.x.
- [80] F. Collin, S. Karkare, A. Maxwell, Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2011) 479–497, doi:10.1007/s00253-011-3557-z.
- [81] T.Y. Hargrove, L. Friggeri, Z. Wawrzak, A. Qi, W.J. Hoekstra, R.J. Schotzinger, J.D. York, F.P. Guengerich, G.I. Lepesheva, Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14-demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 292 (16) (2017) 6728–6743, doi:10.1074/jbc.M117.778308.
- [82] J. Song, N. Shang, N. Baig, J. Yao, Ch. Shin, B.K. Kim, Q. Li, S.R. Malwal, E. Oldfield, X. Feng, R.-T. Guo, *Aspergillus flavus* squalene synthase as an antifungal target: expression, activity, and inhibition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 512 (2019) 517–523, doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.070.
- [83] N.Sh. Nadaraia, L.Sh. Amiranashvili, M. Merlani, M.L. Kakhabrishvili, N.N. Barbakadze, A. Geronikaki, A. Petrou, V. Poroikov, A. Ciric, J. Glamoclija, M. Sokovic, Novel antimicrobial agents' discovery among the steroid derivatives, *Steroids* 144 (2019) 52–65, doi:10.1016/j.steroids.2019.02.012.



Click chemistry as a method for the synthesis of steroid bioconjugates of bile acids derivatives and sterols

Grzegorz Hajdaś^a, Anna Kawka^a, Hanna Koenig^a, Damian Kułaga^b, Katarzyna Sosnowska^c,
Lucyna Mrówczyńska^c, Tomasz Pospieszny^{a,*}

^a Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 8 Street, 61-614 Poznań, Poland

^b Department of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, Warszawska 24 Street, 31-155 Kraków, Poland

^c Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Bile acids
Sterols
Click chemistry
1,2,3-triazole ring
Human erythrocytes
PASS

ABSTRACT

Six steroid conjugates of bile acids and sterol derivatives have been synthesized using the click chemistry method. The azide-alkyne Huisgen cycloaddition of the propionyl ester of lithocholic, deoxycholic and cholic acid with azide derivatives of cholesterol and cholestanol gave new bile acid–sterol conjugates linked with a 1,2,3-triazole ring. Previously, sterols were converted to bromoacetate substituted derivatives by reaction with bromoacetic acid bromide in anhydrous dichloromethane. These compounds were then converted to azide derivatives using sodium azide. The propionic esters of lithocholic, deoxycholic and cholic acids were obtained by reaction with propionic acid in the presence of *p*-toluenesulfonic acid. Additionally, two of these steroids: methyl 3 α -propynoyloxy-12 α -acetoxy-5 β -cholane-24-oate and methyl 3 α -propynoyloxy-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholane-24-oate were also obtained and characterized for the first time. All conjugates were obtained in good yields using an efficient synthesis method. The structures of all conjugates and the four substrates were confirmed by spectral (¹H- and ¹³C NMR, FT-IR) analysis, mass spectrometry (ESI-MS), and PM5 semiempirical methods. The pharmacotherapeutic potential of the synthesized compounds was estimated based on the *in silico* Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) method. The cytotoxicity of the compounds was *in vitro* evaluated in a hemolytic assay using human erythrocytes as a cell model. The *in silico* and *in vitro* study results indicate that the selected compound possesses an interesting biological activity and can be considered as potential drug design agent. Additionally, molecular docking was performed for the selected conjugate.

1. Introduction

Natural products represent a vast number of chemical compounds synthesized by living organisms. Various natural products are essential in many processes that enable cells to function properly. Within this group, steroids are among the most important [1]. Cholesterol is one of the best-known steroids. It's present in high concentrations in nervous tissue and it's an important component of the cell membrane [2–4]. Moreover, cholesterol is significantly involved in many biosynthetic pathways [5–8].

All steroids have a secondary hydroxyl group in the steroid skeleton's C(3) position. Within this class of compounds, they also differ in modifying the side chains or the presence of double bonds [9–11]. Bile acids are known as the primary metabolites of cholesterol in the form of

polyhydroxylated steroids. The OH groups of bile acid (3 α or 3 α ,12 α as well as 3 α ,7 α ,12 α) take a significant role in their amphiphilic properties. Bile acids have contributed to the use of steroids and their derivatives in many areas of chemistry, e.g., molecular recognition, biomimetic chemistry, host–guest chemistry, and pharmacology [12–15]. Bile acids have found applications as building blocks in the synthesis of molecular receptors; their dimers are infused in synthesizing macrocyclic artificial receptors with good organogelling properties [16–21].

Exciting derivatives of steroids have been obtained by conjoining e.g., amino acids, nucleotides, sugars, ferrocene and β -lactams with bile acids, or sterol via a triazole ring [22–27]. Novel conjugates obtained via the formation of a 1,2,3-triazole ring between cholesterol and bile acids showed many potential applications due to their biological activity [28].

Nowadays, click chemistry is gaining popularity and recognition as a

* Corresponding author.

E-mail address: tposp@amu.edu.pl (T. Pospieszny).

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109282>

Received 18 May 2023; Received in revised form 19 July 2023; Accepted 20 July 2023

Available online 22 July 2023

0039-128X/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Table 1
Heat of formation (HOF) [kcal/mol] of bile acids 1–3, sterols 7 and 8 and conjugates 11–16.

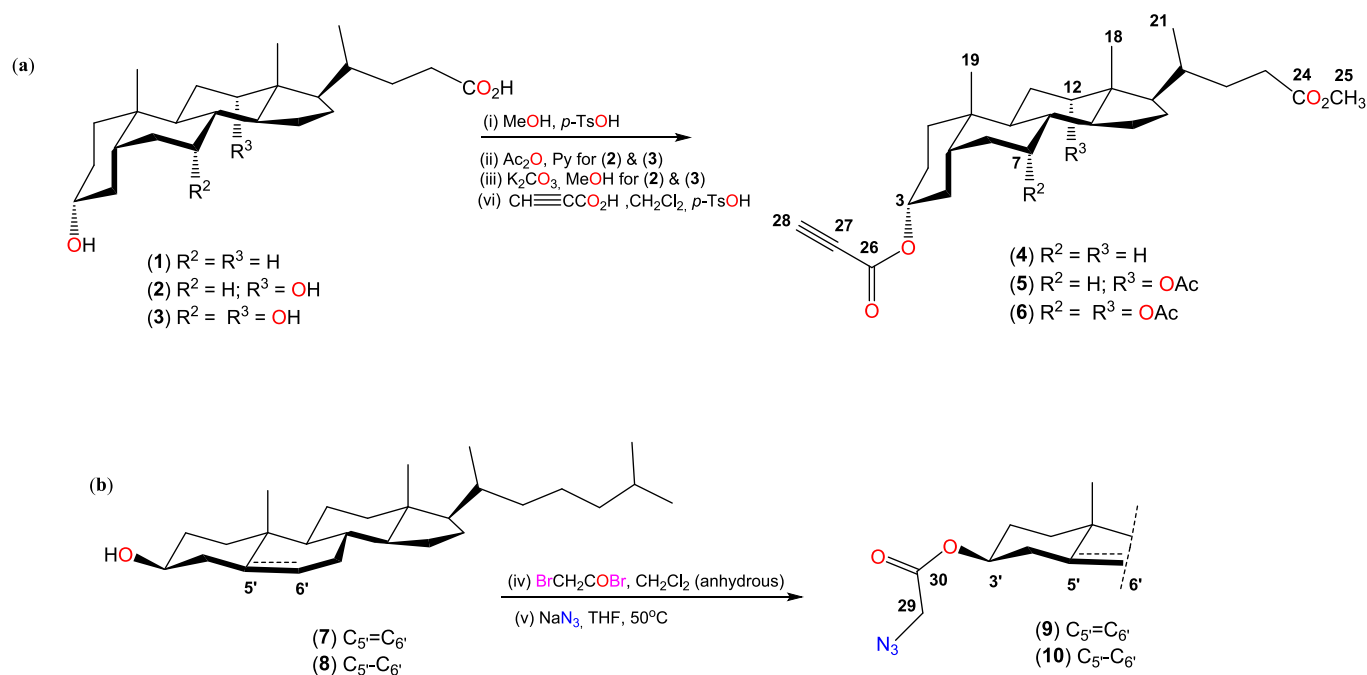
Compound	HOF	HOF _{syn}	HOF _{anti}	ΔHOF ₁	ΔHOF ₂	ΔHOF ₃	ΔHOF ₄
1	-229.2756	–	–	–	–	–	–
2	-266.8560	–	–	–	–	–	–
3	-309.8662	–	–	–	–	–	–
7	-145.2016	–	–	–	–	–	–
8	-167.9130	–	–	–	–	–	–
11	–	-363.8662	-363.7903	-134.5906	-134.5147	-218.6646	-218.5887
12	–	-444.3851	-450.1979	-177.5291	-183.3419	-299.1835	-304.9963
13	–	-522.4936	-535.3569	-212.6274	-225.4907	-377.2920	-390.1553
14	–	-386.8430	-386.5739	-157.5674	-157.2983	-218.9300	-218.6609
15	–	-467.3787	-472.9543	-200.5227	-206.0983	-299.4657	-305.0413
16	–	-545.5568	-558.0889	-235.6906	-248.2227	-377.6438	-390.1769

ΔHOF₁ = HOF_{conjugatessyn(11–16)} – HOF_{bile acids (1–3)}.

ΔHOF₂ = HOF_{conjugatesanti (11–16)} – HOF_{bile acids (1–3)}.

ΔHOF₃ = HOF_{conjugatessyn(11–16)} – HOF_{sterols(7–8)}.

ΔHOF₄ = HOF_{conjugatesanti(11–16)} – HOF_{sterols(7–8)}.



Scheme 1. Synthesis of propynoyl esters of bile acids 4–6 (a) and azidoacetyl substituted derivatives of sterols 9–10 (b).

valuable tool in modern organic synthesis. This term includes carbon-heteroatom bond-forming reactions that meet requirements such as simple reaction conditions, selectivity, high efficiency, and simple isolation of products [29–30]. Another advantage of click chemistry is that the products are stable in various solvents, including water. The Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition is one of the most important and efficient methods of 1,2,3-triazole ring synthesis. The reaction between azides and terminal alkynes catalyzed by copper(I) generated 1,2,3-triazole compounds which are very resistant to oxidation, hydrolysis, and reduction conditions of metabolic degradation [31–34]. This five-membered heterocyclic ring can form various intramolecular hydrogen bonds and dipole–dipole interactions. These interactions increase their solubility and ability to bind other molecules [35]. Also the copper(I) catalyzed „Click” reaction (CuACC) is a very efficient method for the synthesis of new 1,2,3-triazole derivatives [36–43].

Our research aims to test the utility of click chemistry as a method for the rapid synthesis of steroid bioconjugates composed of derivatives of bile acids and sterols derivatives for biomedical applications. Since compounds with potential biomedical applications should be biocompatible, the cytotoxicity of the new compounds was *in vitro* evaluated

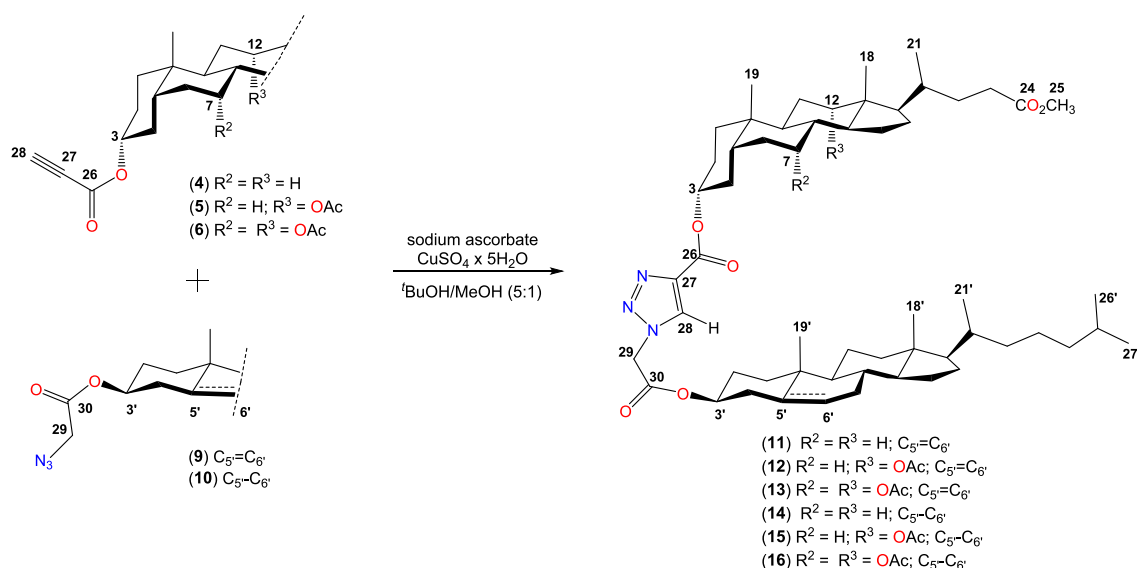
using human red blood cells as a cell model. In addition, *in silico* analysis was performed to assess bioconjugates biological activity.

To the best of our knowledge, no work has been published on the synthesis or the physicochemical properties of propynoyl esters of acetoxy derivatives of deoxycholic acid (5) and cholic acid (6) as well as for compounds 11–16, which are six new conjugates connected in a head-to-head fashion from propionate esters of acetoxy derivatives of bile acids (head) and 3-azidoacetoxysterols (head) linked by a 1,2,3-triazole ring. This connection is an entirely innovative approach to preparing a new type of steroid bioconjugates.

2. Experimental

2.1. Instrumentation and chemicals

Lithocholic, deoxycholic and cholic acids, formyl acid, pyridine, propargyl alcohol, sodium azide, sodium ascorbate were purchased from Sigma-Aldrich Corporation. Solvents chloroform, dichloromethane, toluene, hexane, *t*-butanol, and methanol were obtained from standard commercial sources (Merck, Fisher) and used without purification.



Scheme 2. Synthesis of dimers of bile acids and sterols derivatives **11–16** linked by 1,2,3-triazole ring.

General. IR Spectra: FT/IR-4600 type A in solid state or oil; ν in cm^{-1} . 1H and ^{13}C NMR spectra: Varian Mercury 400 MHz spectrometer (Oxford, UK), operating at 400 and 101 for 1H and ^{13}C , respectively; δ in ppm relative to Me_4Si as internal standard, J in Hz. Typical conditions for the H-atom spectra: pulse width 32° , acquisition time 5 s, FT size 32 K and digital resolution 0.3 Hz per point; and for the C-atom spectra: pulse width 60° , FT size 60 K and digital resolution 0.6 Hz per point, the number of scans varied from 1200 to 10,000 per spectrum. ESI-MS: Waters/Micromass (Manchester, UK) ZQ mass spectrometer equipped with a Harvard Apparatus (Saint Laurent, Canada), syringe pump; in m/z . The sample solutions were prepared in MeOH at a concentration of ca. 10^{-5} M. The standard ESI-MS mass spectra were recorded at the cone voltage of 90 V.

2.2. Synthesis

2.2.1. General procedure for the preparation of propiolicesters 4–6

The procedure for methyl esters of bile acids, as well as their acetoxy derivatives, was described earlier [44–45]. Bile acid derivatives **1**, **2** or **3** were dissolved in 15 mL of dichloromethane, then *p*-TsOH and propiolic acid were added and the reaction was carried out for 24 h at room temperature. Next, the mixture was washed with cool water, extracted with chloroform and washed with water, brine, and dried (Na_2SO_4). The solvent was evaporated under reduced pressure to give the products: 45% of **4**, 57% of **5** and 30% of **6**.

2.2.2. General procedure for the preparation of azidoacetates 9 and 10

The sterols **7** and **8** were dissolved in 5 mL of anhydrous dichloromethane, and then subsequently, bromoacetic acid bromide was added drop wise and the reaction mixture was kept at room temperature for 24 h. Then the mixture was washed with $NaHCO_3$ (5%, 20 mL), brine (200 mL) and finally dried over Na_2SO_4 . The solvent was evaporated under reduced pressure to give the crude product. Products were purified by chromatography on silica gel (Merck, type 60, 70–230 mesh) with chloroform/ethyl acetate as eluent. Procedure for **9** and **10**: 3-bromoacetoxy derivatives of sterols were dissolved in 15 mL of THF. Then, NaN_3 was added and the mixture was heated at $50^\circ C$ for 4 h. THF was evaporated, chloroform was added (20 mL), washed with brine, and dried (Na_2SO_4) and to give the products 95% of **9** and 88% of **10**.

2.2.3. General procedure for the preparation of bioconjugates 11–16

Procedure for bioconjugates **11–16**: azidoacetates **9** or **10** was

dissolved in a mixture of *t*-BuOH/ MeOH (6 mL, 5:1) and compounds **4–6** added. Next, to the homogenous mixture were added $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (3 mg, 3 mol %) and sodium ascorbate (9 mg, 20 mol%) in water (0.3 mL). The reaction mixture was heated at $60^\circ C$ for 8 h and then extracted with chloroform, washed with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . The crude compound was purified by column chromatography on silica gel using chloroform/ethyl acetate (5:1) as an eluent and give the products: 35% of **11**, 68% of **12**, 60% of **13**, 92% of **14**, 82% of **15** and 81% of **16**.

2.3. Chemical characterization

Compounds **4**, **9** and **10** are known in the literature. Their chemical characteristics are described in references [45–47].

2.3.1. Methyl 3 α -propynoyloxy-12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (5)

Oil, 57%, 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.08 (s, 1H, 12 β -H), 4.88–4.80 (m, 1H, 3 β -H), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.89 (s, 1H, $-C\equiv CH$), 2.11 (s, 3H, 12 α - $COCH_3$), 0.91 (s, 3H, CH_3 -19), 0.80 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.72 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 174.59 (C-24), 170.54 (CO-12 α), 152.11 (C-26), 75.80 (C-12), 75.77 ($\equiv CH$), 75.04 (C-3), 74.20 ($-C\equiv$), 51.50 (C-25), 49.35, 47.52, 44.97, 41.80, 35.61, 34.65, 34.56, 34.39, 34.00, 31.88, 30.93, 30.78, 27.29, 26.80, 26.29, 25.78, 25.62, 23.39, 22.98 (C-19), 21.39 ($COCH_3$ -12 α), 17.46 (C-21), 12.37 (C-18). ESI-MS m/z : 523 [$M + Na$] $^+$, 539 [$M + K$] $^+$. FT-IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3445, 3251, 2938, 2869, 2112, 1734, 1701, 1377, 1246, 1194.

2.3.2. Methyl 3 α -propynoyloxy-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-24-oate (6)

Oil, 30%, 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.09 (s, 1H, 12 β -H), 4.92 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, 7 β -H), 4.76–4.68 (m, 1H, 3 β -H), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.91 (s, 1H, $-C\equiv CH$), 2.15 (s, 1H, 7 α - $COCH_3$), 2.09 (s, 1H, 12 α - $COCH_3$), 0.92 (s, 3H, CH_3 -19), 0.81 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 174.51 (C-24), 170.54 (CO-12 α), 170.40 (CO-7 α), 152.04 (C-26), 75.30 (C-12), 75.26 ($\equiv CH$), 75.02 (C-3), 74.37 ($-C\equiv$), 70.53 (C-7), 51.25 (C-25), 47.32, 45.04, 43.36, 40.88, 37.68, 34.56, 34.47, 34.30, 34.18, 31.18, 30.85, 30.72, 29.67, 28.91, 27.14, 26.53, 25.56, 22.77, 22.45 (C-19), 21.63 ($COCH_3$ -7 α), 21.47 ($COCH_3$ -12 α), 17.47 (C-21), 12.20 (C-18). ESI-MS m/z : 581 [$M + Na$] $^+$, 597 [$M + K$] $^+$, 594 [$M + Cl$] $^-$. FT-IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3247, 2952, 2873, 2116, 1737, 1439, 1378, 1247.

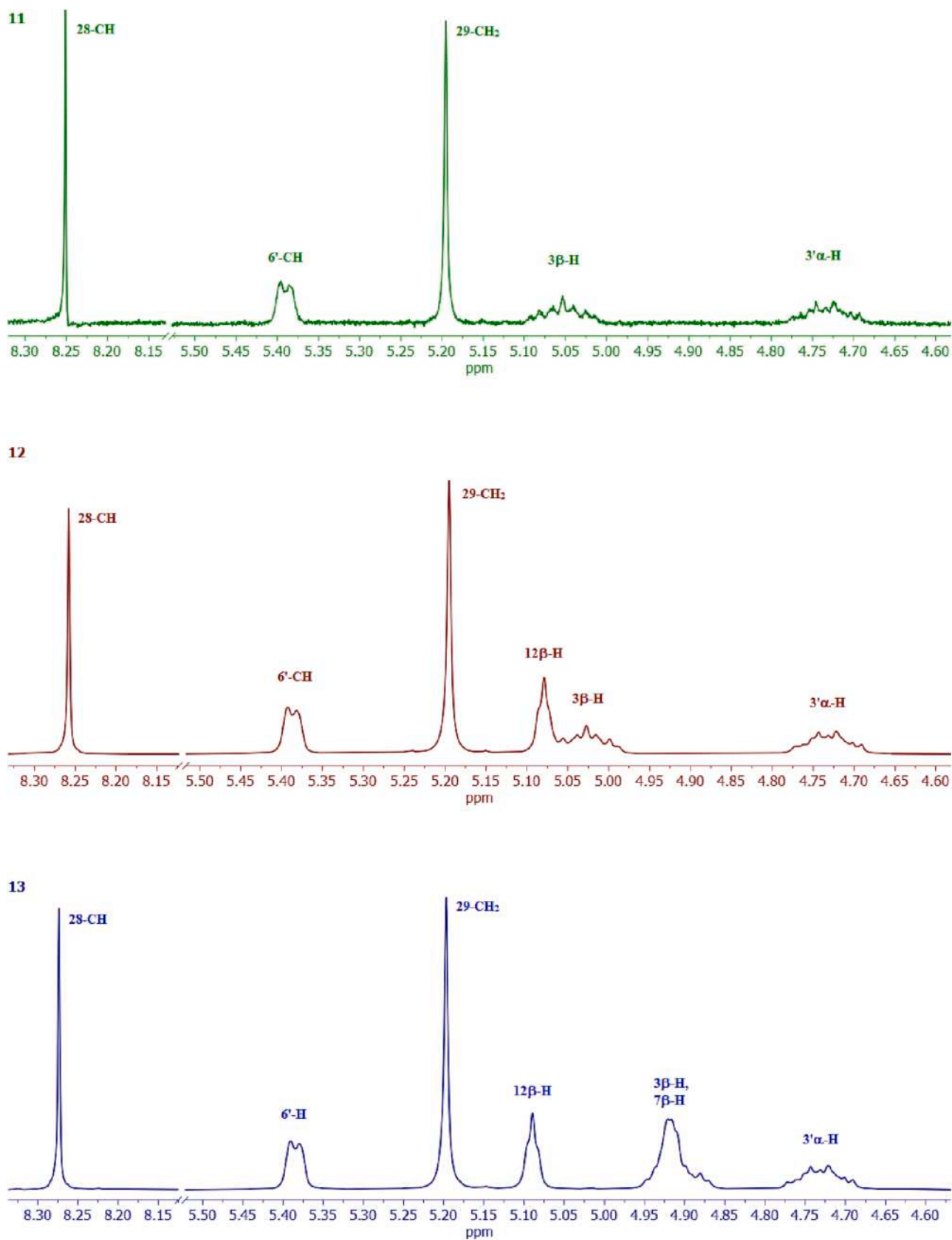


Fig. 1. ^1H NMR Spectra in the region of 3.90–8.50 ppm for the most characteristic signals of compounds 11–13.

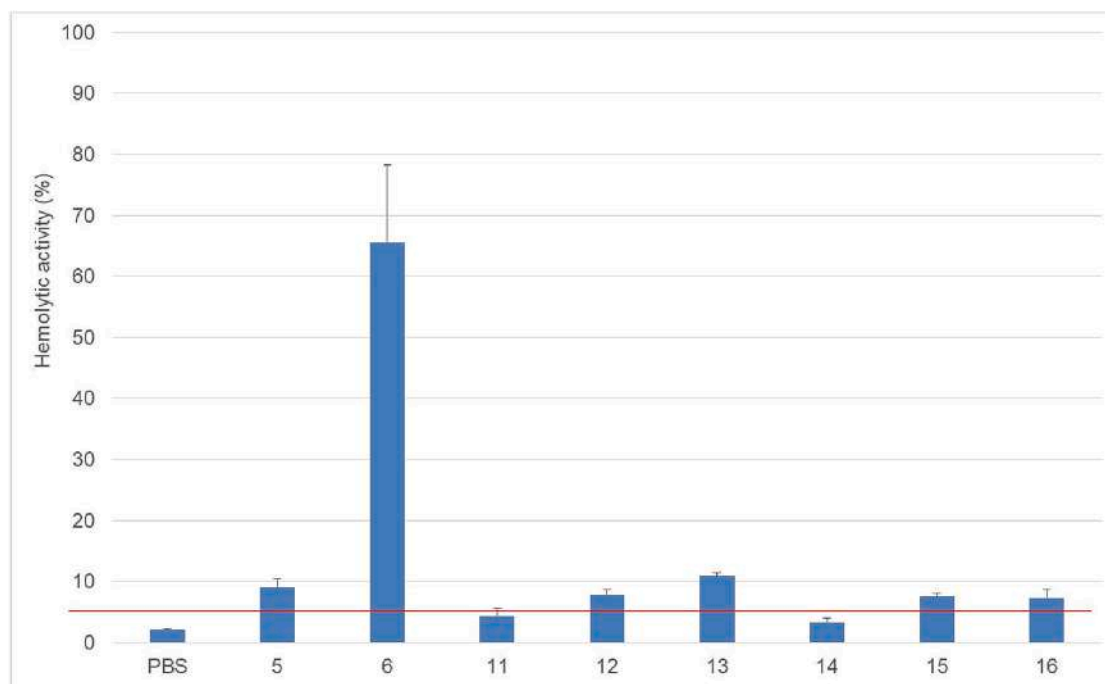


Fig. 2. Hemolytic activity of compounds tested (0.1 mg/mL) after 1 h incubation at 37 °C. Hemolysis degree higher than 5% indicates the cell membrane-perturbing activity of compounds. Red line is plotted for a hemolysis threshold of 5%. Means values \pm SD are presented (n = 9). PBS – negative control, no hemolysis.

Table 2
Probability 'to be Active' (PA) values for the predicted biological activity of bioconjugates **11–16**.

PA > 70%	Bioconjugates					
	11	12	13	14	15	16
Cholesterol antagonist	90	85	85	76	–	–
Hypolipemic	84	85	90	73	75	83
Antihypercholesterolemic	84	77	85	–	–	–
Caspase 3 stimulant	71	–	–	71	–	–
Proliferativediseasestreatment	–	73	77	–	–	–
Glyceryl-ethermonooxygenase inhibitor	–	–	74	–	74	76
Acylcarnitinehydrolase inhibitor	–	–	–	79	73	73

2.3.3. 24-methoxy-24-oxo-5 β -cholan-3 β -yl 1-(2-((cholest-5-en-3 β -yl)oxy)-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**11**)

Oil, 35%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.25 (s, 1H, CH-28), 5.39 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, CH-6'), 5.20 (s, 2H, CH_2 -29), 5.05–5.03 (m, 1H, 3 β -H), 4.78–4.68 (m, 1H, 3' α -H), 3.67 (s, 3H, CH_3 -25), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 0.92 (dd, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 2.1$ Hz, 6H, CH_3 -21, CH_3 -21'), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -26'), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -27'), 0.68 (s, 3H, CH_3 -18'), 0.65 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.78 (C-24), 165.06 (CO-30), 160.09 (CO-26), 141.11 (C-5'), 138.82 (27-C), 128.85 (28-C), 123.42 (C-6'), 75.55 (C-3, C-3'), 56.63, 56.47, 56.09, 55.93, 51.46 (C-25), 51.14 (C-29), 49.93, 42.72, 42.28, 41.95, 40.31, 40.13, 39.66, 39.49, 37.86, 36.78, 36.51, 36.15, 35.79, 35.76, 35.37, 35.06, 34.60, 32.16, 31.86, 31.79, 31.07, 30.99, 29.68, 29.34, 28.19, 27.99, 27.60, 27.01, 26.55, 26.29, 24.25, 24.18, 23.80, 23.24, 22.80, 22.68 (C-19), 22.54 (C-26', C-27'), 21.00, 20.80, 19.25 (C-19'), 18.69 (C-21'), 18.24 (C-21), 12.02 (C-18), 11.83 (C-18'). ESI-MS m/z : 936 [M + Na] $^+$, 948 [M + Cl] $^-$. FT-IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 2948, 2867, 1743, 1468, 1377, 1364, 1213.

2.3.4. 24-methoxy-24-oxo-12 α -acetoxy-5 β -cholan-3 β -yl 1-(2-((cholest-5-en-3 β -yl)oxy)-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**12**)

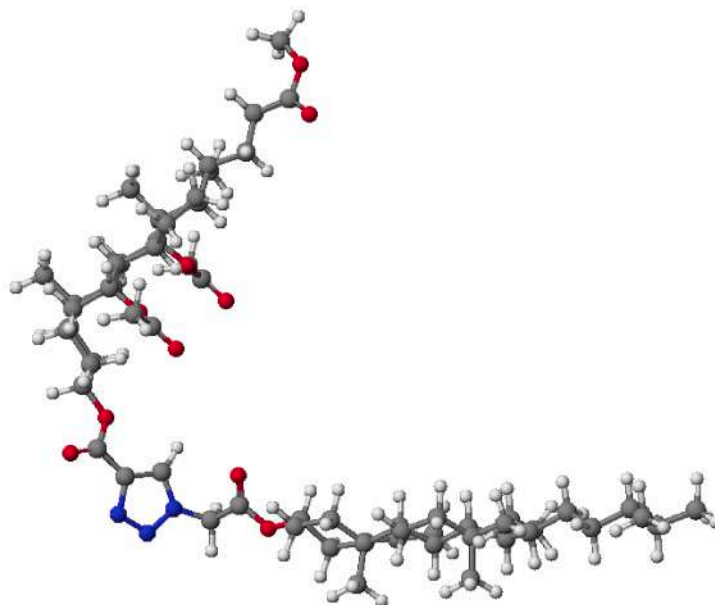
Oil, 68%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.26 (s, 1H, CH-28), 5.39 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, CH-6'), 5.20 (s, 2H, CH_2 -29), 5.08 (s, 1H, 12 β -H), 5.06–4.99 (m, 1H, 3 β -H), 4.77–4.69 (m, 1H, 3' α -H), 3.67 (s, 3H, CH_3 -

25), 2.12 (s, 3H, 12 α -OCOCH $_3$), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.94 (s, 3H, CH_3 -19), 0.91 (d, $J_1 = 6.6$, 3H, CH_3 -21'), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -26'), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -27'), 0.80 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3 -21) 0.73 (s, 3H, CH_3 -18), 0.68 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.60 (C-24), 170.69 (CO-12 α), 165.03 (CO-30), 160.13 (CO-26), 141.10 (C-5'), 138.79 (C-27), 129.02 (C-28), 123.41 (C-6'), 75.82 (C-12), 75.58 (C-3, C-3'), 56.61, 56.08, 51.49 (C-25), 51.14 (C-29), 49.91, 49.31, 47.53, 45.01, 42.27, 42.01, 39.64, 39.47, 37.84, 36.76, 36.49, 36.14, 35.74, 34.75, 34.65, 34.53, 34.16, 32.25, 31.85, 31.77, 30.95, 30.80, 28.18, 27.98, 27.59, 27.31, 26.99, 26.57, 25.81, 25.76, 24.23, 23.78, 23.44, 23.08, 22.79 (C-19), 22.53 (C-26', C-27'), 21.53, 20.99, 19.24 (C-19'), 18.68 (C-21'), 17.48 (C-21), 12.40 (C-18), 11.82 (C-18'). ESI-MS m/z : 992 [M + Na] $^+$, 1008 [M + K] $^+$, 1004 [M + Cl] $^-$. FT-IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 2950, 2868, 1739, 1468, 1377, 1244, 1042, 1025.

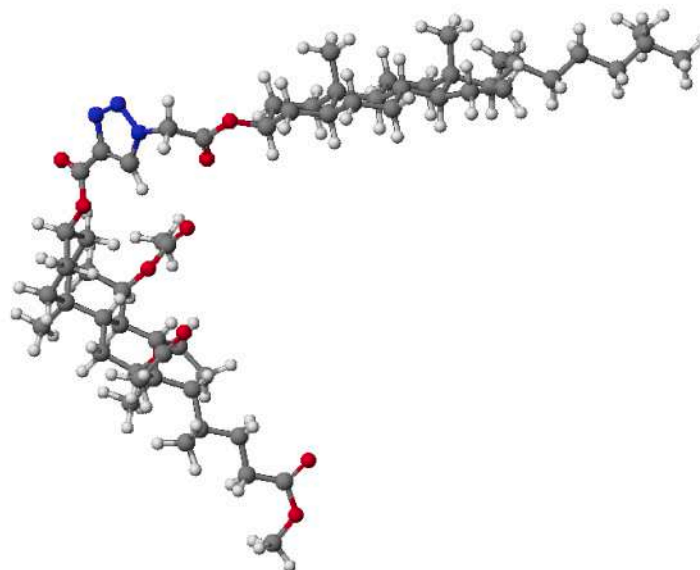
2.3.5. 24-methoxy-24-oxo-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-3 β -yl 1-(2-((cholest-5-en-3 β -yl)oxy)-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**13**)

Oil, 60%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.27 (s, 1H, CH-28), 5.38 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, CH-6'), 5.20 (s, 2H, CH_2 -29), 5.09 (s, 1H, 12 β -H), 4.96–4.88 (m, 2H, 3 β -H, 7 β -H), 4.77–4.69 (m, 1H, 3' α -H), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 2.21 (s, 3H, 7 α -OCOCH $_3$), 2.08 (s, 3H, 12 α -OCOCH $_3$), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 0.91 (d, $J = 6.6$, 3H, CH_3 -21'), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -26'), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -27'), 0.81 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3 -21) 0.74 (s, 3H, CH_3 -18), 0.68 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.53 (C-24), 170.85 (CO-7 α), 170.65 (CO-12 α), 165.03 (CO-30), 160.19 (CO-26), 141.11 (C-5'), 138.75 (C-27), 129.22 (C-28), 123.42 (C-6'), 75.49 (C-12), 75.29 (C-3, C-3'), 70.54 (C-7), 56.60, 56.06, 51.51 (C-25), 51.15 (C-29), 49.89, 47.30, 45.09, 43.43, 42.25, 41.05, 39.62, 39.46, 37.83, 37.71, 36.75, 36.48, 36.12, 35.74, 34.70, 34.55, 34.47, 34.42, 31.90, 31.84, 31.75, 31.30, 30.84, 30.73, 30.00, 29.67, 29.33, 29.12, 28.17, 27.98, 27.58, 27.14, 26.74, 25.70, 24.23, 23.77, 22.79 (C-19), 22.67, 22.53 (C-26', C-27'), 21.76, 21.72, 20.98, 19.23 (C-19'), 18.67 (C-21'), 17.46 (C-21), 14.10, 12.21 (C-18), 11.82 (C-18'). ESI-MS m/z : 1050 [M + Na] $^+$, 1066 [M + K] $^+$, 1063 [M + Cl] $^-$. FT-IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 2962, 2922, 2852, 1741, 1467, 1378, 1261, 1099, 1021.

(a)



(13)



(16)

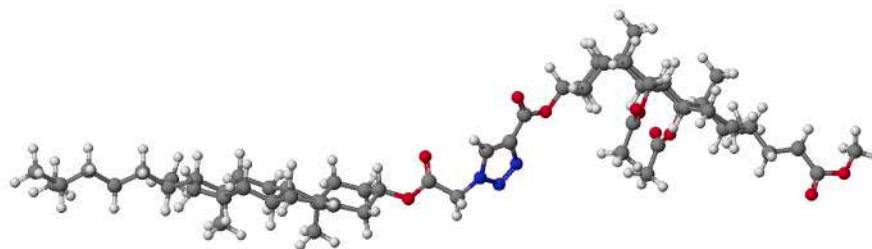
Fig. 3. Molecular models of conformers *syn* (a) and *anti* (b) for conjugates 13 and 16 calculated by PM5 method.

2.3.6. 24-methoxy-24-oxo-5 β -cholan-3 β -yl 1-(2-((cholest-5-*an*-3 β -yl)oxy)-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (14)

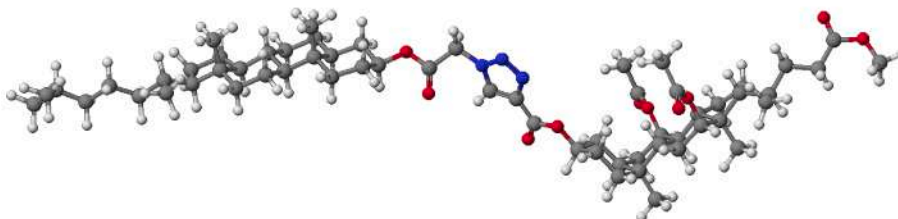
Oil, 92%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.24 (s, 1H, CH-28), 5.17 (s, 2H, CH_2 -29), 5.10–5.00 (m, 1H, 3 β -H), 4.85–4.78 (m, 1H, 3' α -H), 3.66 (s, 3H, CH_3 -25), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.89 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -21'), 0.863 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -26'), 0.858 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -27'), 0.82 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.64 (bs, 6H, CH_3 -18', CH_3 -18). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.77 (C-24), 165.15 (CO-30), 160.12 (CO-26), 141.11 (C-27), 128.84 (C-28), 75.55 (C-3, C-

3'), 56.48, 56.37, 56.24, 55.95, 54.12, 51.46 (C-25), 51.18 (C-29), 44.59, 42.73, 42.57, 41.96, 40.32, 40.14, 39.92, 39.49, 36.59, 36.14, 35.80, 35.77, 35.42, 35.39, 35.38, 35.07, 34.61, 33.78, 32.17, 31.90, 31.08, 31.00, 28.53, 28.21, 28.18, 27.99, 27.30, 27.01, 26.56, 26.30, 24.18, 23.81, 23.24, 22.80 (C-19', C-19), 22.54 (C-26', C-27), 21.19, 20.81, 18.65 (C-21'), 18.25 (C-21), 12.20 (C-18), 12.02 (C-18'). ESI-MS m/z : 937 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 953 $[\text{M} + \text{K}]^+$. FT-IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 2938, 2866, 1743, 1721, 1530, 1467, 1450, 1384, 1362, 1225, 1012.

(b)



(13)



(16)

Fig. 3. (continued).

2.3.7. 24-methoxy-24-oxo-12 α -acetoxy-5 β -cholan-3 β -yl 1-(2-((cholest-5-an-3 β -yl)oxy)-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (15)

Oil, 82%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.25 (s, 1H, CH-28), 5.18 (s, 2H, CH_2 -29), 5.08 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, 12 β -H), 5.06–4.97 (m, 1H, 3 β -H), 4.86–4.78 (m, 1H, 3' α -H), 3.67 (s, 3H, CH_3 -25), 2.12 (s, 3H, 12 α -OCOCH₃), 0.94 (s, 3H, CH_3 -19), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3 -21'), 0.863 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -26'), 0.858 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -27'), 0.82 (s, 3H, CH_3 -19'), 0.80 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18), 0.65 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.61 (C-24), 170.70 (CO-12 α), 165.12 (CO-30), 160.15 (CO-26), 141.09 (C-27), 129.02 (C-28), 75.82 (C-12), 75.58 (C-3, C-3'), 56.34, 56.21, 54.08, 51.50 (C-25), 51.18 (C-29), 49.31, 47.53, 45.01, 44.55, 42.54, 42.01, 39.89, 39.47, 36.56, 36.12, 35.75, 35.73, 35.39, 35.37, 34.75, 34.65, 34.53, 34.16, 33.76, 32.26, 31.88, 30.95, 30.80, 28.50, 28.19, 27.98, 27.30, 26.99, 26.57, 25.81, 24.16, 23.79, 23.44, 23.09, 22.79 (C-19', C-19), 22.53 (C-26', C-27'), 21.54, 21.16, 18.63 (C-21'), 17.48 (C-21), 12.40 (C-18), 12.19, 12.03 (C-18'). ESI-MS m/z : 995 [M + Na]⁺, 1010 [M + K]⁺. FT-IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 2951, 2868, 1740, 1631, 1467, 1379, 1245, 1042, 1017.

2.3.8. 24-methoxy-24-oxo-7 α ,12 α -diacetoxy-5 β -cholan-3 β -yl 1-(2-((cholest-5-an-3 β -yl)oxy)-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (16)

Oil, 81%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.26 (s, 1H, CH-28), 5.18 (s, 2H, CH_2 -29), 5.09 (d, 1H, 12 β -H), 4.96–4.86 (m, 2H, 3 β -H, 7 β -H), 4.86–4.77 (m, 1H, 3' α -H), 3.67 (s, 3H, CH_3 -25), 2.21 (s, 3H, 7 α -OCOCH₃), 2.08 (s, 3H, 12 α -OCOCH₃), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 0.89 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -21'), 0.862 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -26'), 0.858 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3 -27'), 0.82 (s, 3H, CH_3 -19), 0.82–0.80 (d, $J = 5.7$ Hz, 3H,

CH_3 -21), 0.73 (s, 3H, CH_3 -18), 0.65 (s, 3H, CH_3 -18'). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 174.55 (C-24), 170.87 (CO-7 α), 170.67 (CO-12 α), 165.12 (CO-30), 160.22 (CO-26), 141.10 (C-27), 129.22 (C-28), 125.98, 75.50 (C-12), 75.31 (C-3, C-3'), 70.56 (C-7), 56.33, 56.20, 54.07, 51.52 (C-25), 51.20 (C-29), 47.31, 45.10, 44.54, 43.44, 42.53, 41.06, 39.88, 39.47, 37.72, 36.55, 36.11, 35.75, 35.38, 35.36, 34.71, 34.55, 34.48, 34.43, 33.76, 31.87, 31.30, 30.85, 30.74, 29.67, 29.12, 28.50, 28.19, 27.98, 27.28, 27.15, 26.75, 25.71, 24.15, 23.79, 22.80 (C-19, C-19'), 22.56, 22.53 (C-26', C-27'), 21.77, 21.72, 21.16, 18.63 (C-21'), 17.47 (C-21), 12.20 (C-18), 12.03 (C-18'). ESI-MS m/z : 1053 [M + Na]⁺, 1069 [M + K]⁺, 1065 [M + Cl]⁻. FT-IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 2950, 2869, 1739, 14.68, 1378, 1245, 1042, 1021.

2.4. Erythrocyte preparation

Human red blood cell (RBC) concentrates (hematocrit 65%) were purchased from the blood bank in Poznan according to the bilateral agreement no ZP/2867/D/21 signed between the Regional Blood Center in Poznań and Adam Mickiewicz University in Poznań. The RBC suspension was washed three times (960 \times g, 10 min, +4 $^\circ\text{C}$) in 7.4 pH phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄) supplemented with 10 mM glucose. After washing, the cells were suspended in PBS buffer at 1.65×10^9 cells/mL (Ht = 15%), stored at +4 $^\circ\text{C}$ and used within 5 h.

2.5. In vitro hemolysis assay

The compounds' cytotoxicity was determined by a standard hemolytic assay, as previously reported. Briefly, human RBC (1.65×10^8

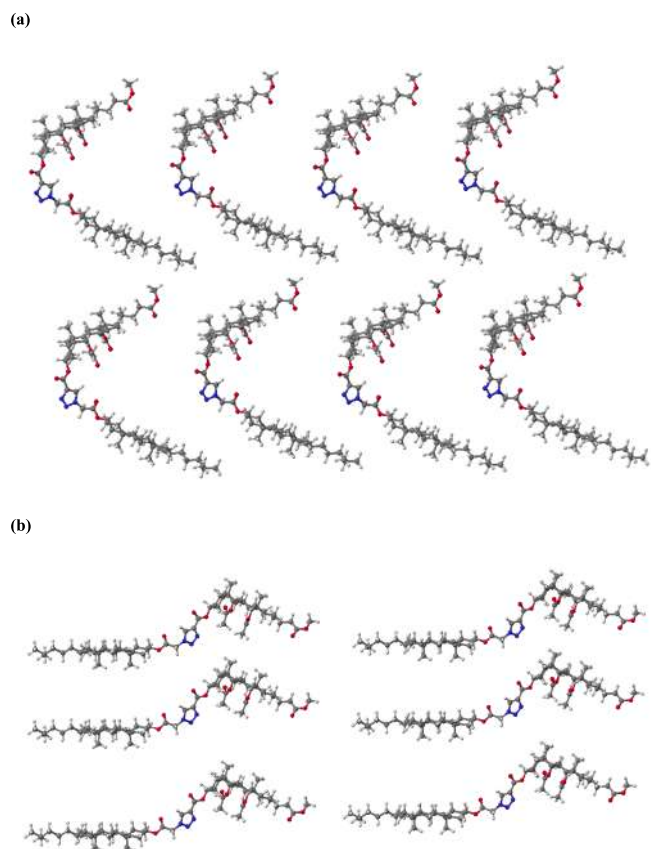


Fig. 4. Molecular models of conformers *syn* (a) and *anti* (b) of conjugate 13 calculated by PM5 method.

Table 3

Calculated binding energy and important amino acids taking part in hydrogen bond formation.

Compound	Binding energy [kJ/mol]	Amino acids forming HB*	HB* length [Å]
11	−10.137 kJ/mol	Lys735	2.0
		Arg590	2.5
		Ser684	2.2, 2.7
14	−11.463 kJ/mol	Lys735	2.2, 2.4
		Lys692	2.8
		Ser684	2.0
Mevastatin	−10.153 kJ/mol	–	–

* HB – hydrogen bond.

cells/mL, hematocrit 1.5%) were incubated in PBS (7.4 pH) supplemented with 10 mM glucose and containing compounds tested at a 0.1 mg/mL concentration for 60 min at 37 °C under gentle shaking. Samples with RBC incubated in PBS without compounds tested were taken as the negative control. Samples with RBC incubated in ice-cold deionized water without compounds tested were taken as the positive control. Each sample was prepared in triplicate and the experiments were repeated three times with RBC from different donors. After incubation, RBC suspensions were centrifuged (3000 rpm, 10 min, +4°C), and the degree of compounds-induced hemolysis was assessed by measuring the absorbance value of the supernatant at $\lambda = 540$ nm in a BioMate™ 160 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The results were expressed as the percentage of hemolysis, which was determined using the formula:

$$\text{hemolysis (\%)} = \left(\frac{\text{sample absorbance}}{\text{positive control absorbance}} \right) \times 100 (\text{Eqn. 1}).$$

The results are presented as a mean value (\pm SD) of three

independent experiments ($n = 12$). A hemolysis degree less than 5% indicated very weak hemolytic activity of the compounds tested. A hemolysis degree higher than 10% showed significant hemolytic activity of compounds at the given concentration.

2.6. Theoretical calculations

The PM5 semiempirical calculations were performed using the WinMopac 2003 program. The final heat of formation (HOF) for dimers of bile acids and sterol derivatives 13 and 16 linked 1,2,3-triazole ring is presented in Table 1. The molecular models of representative compounds are shown in Fig. 3 and Fig. 4.

2.7. Docking experiments

Docking experiments were performed using Flare application available in Cresset Software [48]. Downloaded target pdb's from PDB protein data bank [49] were prepared in protein preparation module using normal calculating mode. Active site size was set at 6 Å. Ligands were prepared according to automatic settings. Docking calculations were performed according to very accurate but slow method. Grid box was centered on co-crystallized ligand. Number of runs was set at 8 and max poses at 10.

3. Results and discussion

The structures of two propynoyl esters of acetoxy derivatives of deoxycholic acid (5) and cholic acid (6), and all synthesized bioconjugates 11–16, were determined from their ^1H and ^{13}C NMR, FT-IR, and ESI-MS spectra. The syntheses of the substrates and bioconjugates are shown in Schemes 1 and 2, respectively.

3.1. Synthesis

Bile acid methyl esters, their acetoxy derivatives and propynoyl ester of acetoxy derivatives of bile acids, and sterols bromoacetoxy and azidoacetoxy derivatives, were obtained with satisfactory yields. The esterification of acetoxy derivatives of methyl ester of bile acids 1–3 with propionic acid in dichloromethane and *p*-TsOH gave methyl propynoyl esters 4, 5 and 6. The 3 β -bromoacetoxy derivatives needed for the synthesis 9 and cholestanol 10, were obtained in the reaction of sterols 7 and 8 with bromoacetic acid bromide in anhydrous dichloromethane. Subsequently, compounds 9 and 10 were synthesized from bromoacetate derivatives of sterols via a substitution reaction with NaN_3 in THF at 50 °C. This one-pot reaction leads to azide derivatives in good yields. The propynoyl esters of bile acids 4–6 and azide derivatives of sterols 9 and 10 were used as substrates in the click chemistry reaction in the presence of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate in *t*-BuOH/MeOH (5:1). A mixture of crude products 11–16 was obtained and separated by column chromatography. This reaction leads to dimers in satisfactory yields of 60–92%, with the exception of compound 11 (35%).

3.2. Spectroscopic study

3.2.1. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The most characteristic signals of compounds 11–13 in the range of 3.90–8.50 ppm in the ^1H NMR spectra are shown in Fig. 1.

The diagnostic proton signals of the triazole ring C28–H of all bioconjugates 11–16 with 1,2,3-triazole ring arise as a singlet at about 8.27–8.24 ppm. The protons of the methylene groups C29–H linked directly to the triazole ring give signals at about 5.20–5.17 ppm.

In the ^1H NMR spectrum of propynoyl esters 5 and 6, two characteristic hydrogen singlets in the range 0.73–0.72 and 0.92–0.91 ppm and a doublet at 0.81–0.80 ppm assigned to CH_3 -18, CH_3 -19, and CH_3 -21, respectively, are present. The protons of the 12 α -OAc group gave signals at 2.11 ppm for 5 and additionally 2.15 ppm for the 7 α -OAc group and

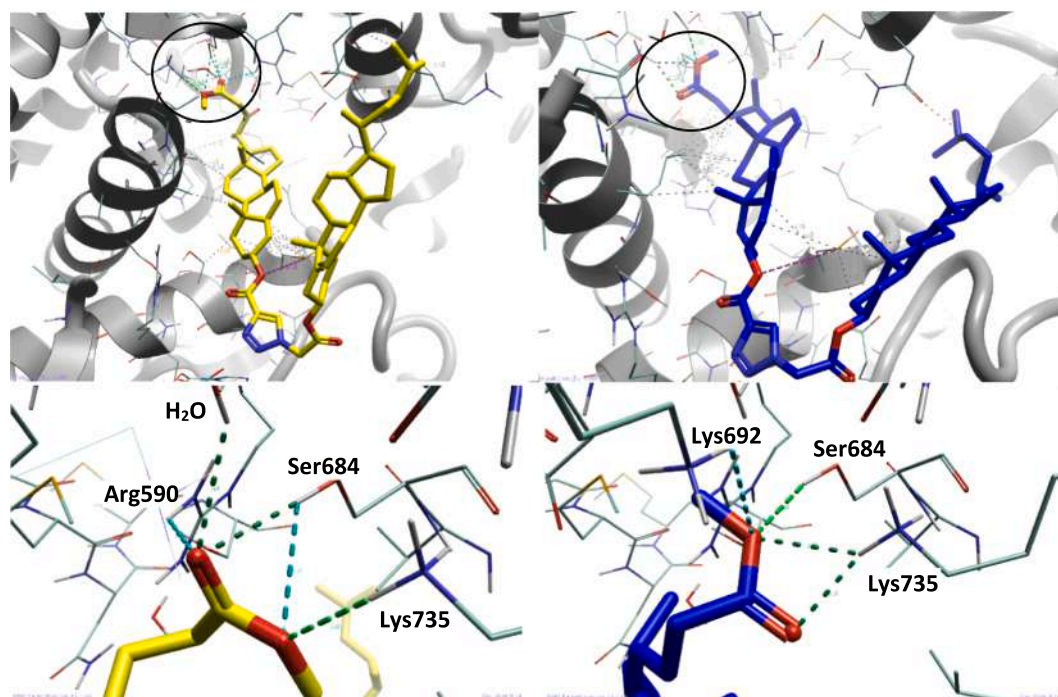


Fig. 5. Binding mode for **11** (yellow, left) and **14** (blue, right). For better view, binding cavity was zoomed in. Dotted color lines represent hydrogen bonds with appropriate amino acids.

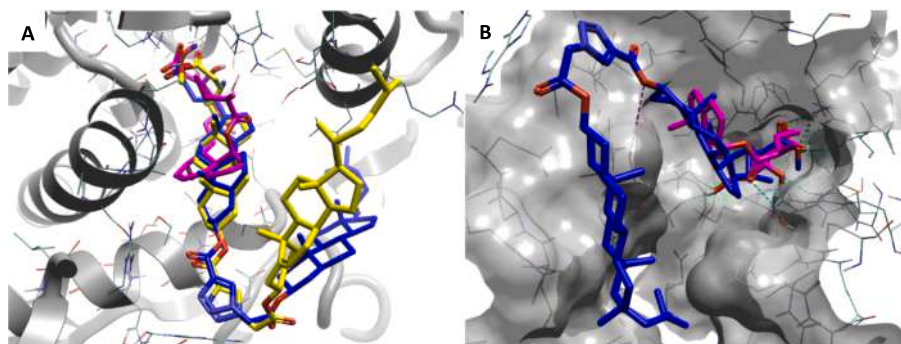


Fig. 6. A – Imposition of **11** (yellow), **14** (blue) and mevastatin (magenta). B – Protein surface with imposition representative **14** and mevastatin in the binding cavity.

2.09 ppm for the 12α -OAc group in compound **6**. A very diagnostic signal is a singlet derived from the proton $C\equiv CH$ group, located in the 2.91–2.89 ppm range.

In the 1H NMR spectrum of conjugates **11–16** showed two characteristic hydrogen singlets in the range 0.74–0.64 ppm and 0.95–0.94 ppm and doublet at 0.82–0.80 ppm assigned to CH_3 -18, CH_3 -19, and CH_3 -21, respectively. The protons of CH_3 -25 gave a characteristic signal in the range 3.67–3.66 ppm. The protons of the 12α - CO_2CH_3 group showed signals at 2.12 ppm for compounds **12** and **15**. On the other hand, protons of the 7α - CO_2CH_3 and 12α - CO_2CH_3 groups gave signals at 2.21 ppm and 2.08 ppm for the bioconjugates **13** and **16**. For all compounds, characteristic multiplets in the range 5.10–4.86 ppm assigned to the axial positions of the $C3\beta$ -H protons in the steroid skeleton, are visible. In the spectrum of compounds **13** and **16**, positions of the $C7\beta$ -H proton in the range of 4.96–4.88 ppm, and the $C12\beta$ -H proton at 5.09 ppm, are additionally present. However, for the bioconjugates **12** and **15**, protons of $C12\beta$ -H appear at 5.08 ppm. Two hydrogen singlets in the range 0.68–0.64, 1.02–0.82 and characteristic doublets at 0.92–0.89 ppm are assigned to CH_3 -18', CH_3 -19', and CH_3 -21', respectively. The two doublets for protons of CH_3 -26' and

CH_3 -27' gave a signal at 0.87 and 0.86 ppm for **11**, **12** and **13**. Additionally for bioconjugates **14**, **15** and **16** observed two doublets of CH_3 -26' and CH_3 -27' gave a signal at 0.863 or 0.862 and 0.858 ppm, respectively. The equatorial proton in the positions of the $C3\alpha$ -H proton in the cholesterol skeleton gave a signal in the 4.86–4.68 ppm range.

The ^{13}C NMR spectra of new substrates **5** and **6** and bioconjugates **11–16** show characteristic signals at 12.40–12.02, 22.98–22.45 and 18.25–17.46 ppm, which are assigned to CH_3 -18, CH_3 -19 and CH_3 -21, respectively. Additionally, signals from these groups occur from the sterol part moiety in the ranges: 12.03–11.82, 22.80–19.24 and 18.69–18.63 ppm are assigned to CH_3 -18', CH_3 -19' and CH_3 -21', respectively. However, carbonyl of the 3α -formyloxy groups ($C26$) resonate at 152.11–152.04 ppm in **5** and **6**, and 160.22–160.09 ppm for **11–16**. In turn, carbonyl of acetoxy groups ($C30$) resonate at 165.15–165.03 ppm, 170.70–170.65 ppm (CO -12 α), and 170.87–170.85 ppm (CO -7 α). Alternatively, carbon atoms of the $C(24) = O$ group gave signals in the 174.78–174.51 ppm range. The diagnostic signal for $C(27)$ as well as $C(28)$ atoms in the 1,2,3-triazole ring in compounds **11–16** is observed in the range of 141.11–138.75 ppm and 129.22–128.84 ppm respectively. The carbon atoms of the

HC≡C=O group in substrates **5** and **6** are observed in the range 75.77–75.26 ppm, and 74.37–74.20 ppm as well as 152.11–152.04 ppm, respectively.

3.2.2. Infrared spectroscopy

The most characteristic feature of the FT-IR spectra of compounds **5** and **6** are bands at 3251 cm⁻¹ as well as 3292 and 3286 cm⁻¹ assigned to the ν(≡C–H) group. The steroid skeleton itself, being a saturated hydrocarbon, is not a source of many useful IR features. Any vibrational bands due to C–C bonds were very weak and were lost among others in the fingerprint region. Stretching vibrations of C–H bonds merged into one broad band, for conjugate structure, between 2952 and 2869 cm⁻¹. The symmetric carbonyl group ν(C=O) stretching vibration gives rise to analytical bands at 1737–1734 cm⁻¹ in the FT-IR spectrum, which are important for these two substrates. Moreover strong characteristic bands in the region 1247–1246 cm⁻¹ are present, which are assigned to the ν(C–O). It should be noted, that the parent most characteristic in the FT-IR spectra of **11–18** are two strong bands in the 1743–1721 cm⁻¹ and 1261–1213 cm⁻¹ region, which are assigned to the ν(C=O) and ν(C–O), respectively. In all spectra of conjugates there are also visible bands related to vibrations of C–H bonds in the region 2962–2852 cm⁻¹.

3.3. Biological study

Bile acids are amphiphilic compounds with cell membrane partitioning activity dependent on their chemical structure and concentration [50–51]. At high concentrations, hydrophobic bile acids (lithocholic and deoxycholic) induce hemolysis of red blood cells due to increased membrane permeability [52]. On the other hand, at sublytic concentration, bile acids molecules stabilize the lipid bilayer of the cell membrane and modify the activity of membrane protein, e.g. protein MRP1 [53]. Taking into account the amphiphilic nature of bile acids and their derivatives, it is mandatory to test their hemolytic activity before inferring possible biomedical applications. Therefore, all compounds studied were *in vitro* evaluated for their cytotoxic activity in the hemolytic assay using human erythrocytes. As shown in Fig. 2, the highest hemolytic activity was assessed for the starting compound **6**, methyl 3α-propynoyloxy-7α,12α-diacetoxy-5β-cholan-24-oate (66%). The second starting compound **5**, methyl 3α-propynoyloxy-12α-acetoxy-5β-cholan-24-oate, was a 7-fold weaker hemolytic agent compared to compound **6**, as it induced hemolysis at 9%. Among the dimers tested, **11** and **14** were not the hemolytic agents, as they didn't cause any perturbation in the erythrocyte membrane (degree of hemolysis 4% and 3%, respectively). The other dimers induced hemolysis from 7% to 11%. It can therefore be concluded that the dimers obtained are either not hemolytic (compounds **11** and **14**) or have low hemolytic activity in the following order: **16**, **15**, **12** (all 7%), and **13** (11%).

3.4. Prediction of activity spectra for Substances

The potential pharmacological activities of the synthesized bioconjugates **11–16** were determined based on a computer-aided drug discovery approach using the *in silico* Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) program [54–58]. Additionally, the types of biological activity predicted for a potential compound with the highest probability (focal activities) have also been selected and presented (Table 2). As can be seen from the presented data, the most frequently predicted types of biological activity are hypolipemic and cholesterol antagonist activity. On the other hand, bioconjugates **11–13** have an anti-hypercholesterolemic activity and **14–16** acylcarnitine hydrolase inhibitor activity.

3.5. PM5 calculations

PM5 semiempirical calculations were performed using the

WinMopac 2003 program. The molecular models of representative conjugates are shown in Fig. 3. Representative conjugate **13** in conformers *syn* and *anti* are shown in Fig. 4. The final heats of formation (HOF) for the bile acids **1–3**, cholesterol (**7**) and cholestanol (**8**) as well as their conjugates **11–16** are presented in Table 1.

Additionally, in many works that describe the application of *in silico* methods, one can find information on comparing theoretical results with crystallographic structures. Not without significance is the use of computational methods in determining the properties of the docking [59–61]. We were able to obtain a very good picture of molecular modeling using semiempirical calculations.

The lowest values of HOF for conjugates **11–16** of bile acids and sterols are observed for cholic acids and their conjugates **13** and **16**. The number of hydroxyl groups in the bile acid skeleton lowers the value of the determinant of HOF. The same relationship was observed for blocked hydroxyl groups by acetate groups. The OAc groups facilitate the formation of intramolecular H-bonds and stable host-guest complexes. These complexes may be stabilized by H-bonding or electrostatic interactions that arise from the OAc groups in the bile acid molecule.

The HOF value decreases with the increasing number of OAc groups in the bile acids skeleton. Moreover, for *anti* conformers of deoxycholic and cholic acid derivatives, HOF is lower than for *syn* conformers. On the other hand, the *syn* conformer of the lithocholic acid derivatives **11** and **14** has a higher HOF value than the *anti* conformer and is consequently more durable as no intramolecular interactions are formed. This is due to the absence of electron donating or acceptor groups in its molecule (without OAc groups). The preferential formation of *syn* conformers for conjugates **11** and **14** can therefore be explained by the formation of a molecule that is smaller in volume. However, for the remaining conjugates, deoxycholic and cholic acid derivatives **12–13** and **15–16**, *anti* conformers with a lower HOF value are arranged in layers (Fig. 3).

3.6. Molecular docking study

Compounds **11** and **14**, as non-hemolytic agents (Fig. 2), can be considered potential therapeutic agents. Analyzing the results presented in Fig. 2, compound **11** is indicated as the most promising due to its hypolipemic and antihypercholesterolemic activity as an agent that lowers the concentration of fats and cholesterol in the blood. Considering the number of people with hypercholesterolemia worldwide, our study may point to a new direction in future hypolipemic drug design. On the other hand, compound **11** has the ability to activate caspase 3, a key apoptotic protein, so it may be considered as a starting compound in drug design for targeted cancer therapy.

Because of the exciting properties that compounds may exhibit (Table 3), we decided to screen our two representative molecules **11** and **14** in the docking study. The antihypercholesterolemic activity of selected molecules was assessed based on binding energy and binding mode to hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) compared to reference ligand – mevastatin – known with cholesterol decrease [62]. HMGCR is a vital enzyme to produce cholesterol in the liver. Inhibiting the activity of HMGCR it is possible to decrease the production of cholesterol, resulting in reduced concentration in the bloodstream [63]. We started our investigation by redocking mevastatin to know the binding energy of the protein-ligand complex. Mevastatin occupies typical binding pocket characteristics for other known statins and forms stable hydrogen bonds with Glu559, Arg590, Asp690, Lys735, Ser684, Lys692, Asn755 and Lys691. Our research (Table 3) identified that methyl ester of lithocholic acid moiety for both compounds occupies the same binding cavity as mevastatin (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 6.). Compounds methyl ester group forms strong hydrogen bonds with Lys735, Lys692 (only **14**), Ser684, Arg590 (only **11**) (Fig. 5). Additional sulfur ion pair with Cys561 was observed for both compounds.

Apart from forming hydrogen bonds, some weaker stabilizing hydrophobic contacts were indicated. For instance, both steroid cores of dimers form interactions with Leu853, Cys561, His752, while

compound **11** is stabilized by only hydrophobic interactions with lithocholic acid rings. Analyzing binding energies (Table 3), compound **11** has almost similar binding energy (−10.137 kJ/mol) to mevastatin, while compound **14** has lower binding energy than previous ones. Based on lower binding energy and a similar binding mode to mevastatin, compound **14** may bind stronger than compound **11** and exhibits stronger antihypercholesterolemic activity.

4. Conclusion

The Nobel Prize in chemistry for research into click chemistry is direct proof of the importance of this method in organic synthesis. The increasing interest in synthesizing new bile acid and sterol bioconjugates using the click chemistry method significantly influences the development of supramolecular chemistry, pharmacology and medicine. Design, preparation, enormous biological potential and a wide range of physicochemical properties of compounds containing the 1,2,3-triazole ring allow them to be used as artificial receptors, organogels or new complexing and transporting drugs. In conclusion, two new substrates and six new bioconjugates of bile acids and sterols linked with 1,2,3-triazole ring dimers **11–16** in a way: head to head were prepared from azidoacetyl substituted derivatives of cholesterol/cholestanol and propionic acid esters of bile acids in *t*-BuOH/MeOH mixture in the presence of CuSO₄·5H₂O and sodium ascorbate at 60 °C. These new bioconjugates linked with the 1,2,3-triazole ring were characterized by analytical methods, such as spectroscopic (NMR, FT-IR) and spectrometry (ESI-MS). Currently available active substances in medicines may be ineffective in treating civilization diseases. Our compounds are characterized by biological activity, which can be an excellent prospect for future patients. Compound **11**, a non-hemolytic agent, can be considered a potential therapeutic agent due to its hypolipemic and antihypercholesterolemic activity, which were predicted by using *in silico* PASS program. Considering the number of people with hypercholesterolaemia worldwide, our study may point to a new direction in future hypolipemic drug design. On the other hand, compound **11** can activate caspase 3, so it may also be considered as a starting compound in drug design for targeted cancer therapy. However, further research is needed to confirm their effectiveness fully. Our studies identified that methyl ester of lithocholic acid moiety for both compounds occupies the same binding cavity as mevastatin. Based on lower binding energy and a similar binding mode to mevastatin, compound **14** may bind stronger than compound **11** and exhibits stronger antihypercholesterolemic activity.

Author Contributions.

The authors declare no competing financial interest. The chemical synthesis were performed by H.K., A.K. and G.H. and discussed by all authors. D.K. described and performed molecular docking. The hemolytic assay was performed and analyzed by L.M and K.S. and T.P. designed the experiments and prepared the manuscript. All authors edited the manuscript and figures and approved the final version for submission. The Research Subsidy financially supported this work at the Faculty of Chemistry and the Faculty of Biology of Adam Mickiewicz University in Poznań.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] M. P. Savić, M. N. Sakač, I. Z. Kuzminac, J. J. Ajduković, Structural diversity of bioactive steroid compounds isolated from soft corals in the period 2015–2020. [2] *J. Steroid Biochem. Mol.* 218 (2022) 106061.
- [3] M.-S. Lee, S.J. Bensinger, Reprogramming cholesterol metabolism in macrophages and its role in host defense against cholesterol-dependent cytotoxins, *Cell. Mol. Immunol.* 19 (3) (2022) 327–336.
- [4] P. M. Dewick, *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2009:pp. 275–277.
- [5] K. Bloch, Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function, *Steroids*. 57 (1997) 378–383.
- [6] J. M. Ridlon, Special Issue: Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism, *Microorganisms*. 10(2) (2007) 477.
- [7] M.J. Risley, Cholesterol biosynthesis: banosterol to cholesterol, *J. Chem. Educ.* 79 (2002) 377–384.
- [8] I. Hanukoglu, Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (1992) 779–804.
- [9] T. Nagrady, D.F. Weaver, *Medicinal chemistry: a molecular and biochemical approach*, 3rd Edition, Oxford University Press, New York, NY, USA, 2005, pp. 316–320.
- [10] E.J. Parish, W.D. Nes, *Biochemistry and function of sterols*, CRC-Press, Boca Raton, FL, USA, 1997.
- [11] H. Schaller, The role of sterols in plant growth and development, *Prog. Lipid Res.* 42 (3) (2003) 163–175.
- [12] D. Lednicer, *Strategies for organic drug synthesis and design*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2011.
- [13] G.I. Santiago-Sampedro, A. Aguilar-Granda, A. Torres-Huerta, M. Flores-Álamo, M. Maldonado-Domínguez, B. Rodríguez-Molina, A. Iglesias-Arteaga, Self-assembly of an amphiphilic bile acid dimer: a combined experimental and theoretical study of its medium-responsive fluorescence, *J. Org. Chem.* 87 (5) (2022) 2255–2266.
- [14] S. Patel, D. Bariya, R. Mishra, B. Mishra, Bile acid-based receptors and their applications in recognition, *Steroids*. 179 (2022), 108981.
- [15] M. Jain, B.P. Nowak, B.J. Ravoo, Supramolecular hydrogels based on cyclodextrins: progress and perspectives, *Chem. Nano. Mat.* 8 (2022) e202200077.
- [16] B. Kovacevic, M. Jones, C. Ionsecu, D. Walker, S. Wagle, J. Chester, T. Foster, D. Brown, M. Mikov, A. Mooranian, H. Al-Salami, The effect of deoxycholic acid on chitosan-enabled matrices for tissue scaffolding and injectable nanogels, *Biomaterials*. 283 (2022), 121459.
- [17] H. Gao, J.R. Dias, Synthesis and characterization of dimeric bile acid ester derivatives, *Prakt. Chem.* 339 (1) (1997) 187–190.
- [18] Y. Li, J.R. Dias, Syntheses of α - and β -dimers of lithocholic acid esters, *Org. Prep. Proced. Int.* 28 (2) (1996) 203–209.
- [19] Z. Paryzek, R. Joachimiak, M. Piasecka, T. Pospieszny, A new approach to steroid dimers and macrocycles by the reaction of 3-chlorocarbonyl derivatives of bile acids with O-, O-, N-, N-, and S-, S-dinucleophile, *Tetrahedron Lett.* 46 (2012) 6212–6215.
- [20] P. Wallimann, T. Marti, A. Furer, F. Diederich, Steroids in molecular recognition, *Chem. Rev.* 97 (5) (1997) 1567–1608.
- [21] J. Tamminen, E. Kolehmainen, Bile acids as building blocks of supramolecular hosts, *Molecules*. 6 (12) (2001) 21–46.
- [22] T. Pospieszny, Molecular pockets, umbrellas and quasi podands from steroids: synthesis, structure and applications, *Mini Rev. Org. Chem.* 12 (2015) 258–270.
- [23] A. Clemmen, C. Boutton, P. Vanlandschoot, A. Wittelsberger, I. Borghmans, A. Coppens, P. Casteels, A. Madder, Straightforward synthesis of cholic acid stabilized loopmimetics, *Tetrahedron Lett.* 55 (2) (2014) 423–429.
- [24] D.S. Agarwal, V.S. Krishna, D. Sriram, P. Yogeewari, R. Sakhuja, Clickable conjugates of bile acids and nucleosides: synthesis, characterization, *in vitro* anticancer and antituberculosis studies, *Steroids*. 139 (2018) 35–44.
- [25] R. Mishra, S. Mishra, Updates in bile acid-bioactive molecule conjugates and their applications, *Steroids*. 159 (2020), 108639.
- [26] M. Zhiyuan, X.X. Zhu, Copolymers containing carbohydrates and other biomolecules: design, synthesis and applications, *J. Mater. Chem. B*. 7 (2019) 1361–1378.
- [27] N.S. Vatmurge, B.G. Hazra, V.S. Pore, F. Shirazi, P.S. Chavan, M.V. Deshpande, Synthesis and antimicrobial activity of β -lactam bile acid conjugates linked via triazole, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (6) (2008) 2043–2047.
- [28] R. Bansal, A. Suryan, A comprehensive review on steroidal bioconjugates as promising leads in drug discovery, *ACS Bio. Med. Chem. Au.* 2 (4) (2022) 340–369.
- [29] V. Raićević, N. Radulović, M. Sakač, Toward selective anticancer agents: ferrocene-steroid conjugates, *Eur. J. Inorg. Chem.* 9 (2022) e202100951.
- [30] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 2004–2021.
- [31] S. Narayan, J. Muldoon, M.G. Finn, V.V. Fokin, H.C. Kolb, K.B. Sharpless, “On water”: unique reactivity of organic compounds in aqueous suspension, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 3275–3279.
- [32] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H.H.Y. Sun, I.D. Williams, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, G. Jia, Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (46) (2005) 15998–15999.
- [33] M. Meldal, F. Diness, Recent fascinating aspects of the CuAAC click reaction, *Trends Chem.* 2 (6) (2020) 569–584.
- [34] V. Castro, H. Rodríguez, F. Albericio, CuAAC: an efficient click chemistry reaction on solid phase, *ACS Comb. Sci.* 18 (1) (2016) 1–14.
- [35] E. Haldón, M.C. Nicasio, P.J. Pérez, Copper-catalysed azide-alkyne cycloadditions (CuAAC): An update, *Org. Biomol. Chem.* 13 (37) (2015) 9528–9550.
- [36] G. Latyshev, M. Baranov, A. Kazantsev, A. Averin, N. Lukashov, I. Beletskaya, Copper-catalyzed [1,3]-dipolar cycloaddition for the synthesis of macrocycles containing acyclic, aromatic and steroidal moieties, *Synthesis*. 15 (2009) 2605–2615.

- [37] S. Neumann, M. Biewend, S. Rana, W. H. Binder The CuAAC: principles, homogeneous and heterogeneous catalysts, and novel developments and applications, *Macromol. Rapid Commun.* 41 (2020) 1900359.
- [38] G.C. Tron, T. Pirali, R.A. Billington, P.L. Canonico, G. Sorba, A.A. Genazzani, Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes, *Med. Res. Rev.* 28 (2008) 278–308.
- [39] V.S. Pore, N.G. Aher, M. Kumar, P.K. Shukla, Design and synthesis of fluconazole/bile acid conjugate using click reaction, *Tetrahedron*. 62 (48) (2006) 11178–11186.
- [40] A. Kumar, P.S. Pandey, Anion recognition by 1,2,3-triazolium receptors: application of click chemistry in anion recognition, *Org. Lett.* 10 (2008) 165–168.
- [41] A. Kumar, R.K. Chhatra, P.S. Pandey, Synthesis of click bile acid polymers and their application in stabilization of silver nanoparticles showing iodide sensing property, *Org. Lett.* 12 (1) (2010) 24–27.
- [42] T. Pospieszny, I. Malecka, Z. Paryzek, Synthesis and spectroscopic studies of new bile acid derivatives linked by a 1,2,3-triazole ring, *Tetrahedron Lett.* 53 (3) (2012) 301–305.
- [43] C. Altinkok, H.R. Ferhat Karabulut, M. Atila Tasdelen, G. Acik, Bile acid bearing poly (vinyl chloride) nanofibers by combination of CuAA Cclick chemistry and electrospinning process, *Mater. Today Commun.* 25 (2022), 101425.
- [44] R. Sheng, T. Luo, H. Li, J. Sun, Z. Wang, A. Cao, “Click” synthesized sterol-based cationic lipids as gene carriers, and the effect of skeletons and head groups on gene delivery, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (21) (2013) 6366–6377.
- [45] C. D’Amore, F.S. Di Leva, V. Sepe, B. Renga, C. Del Gaudio, M.V. D’Auria, A. Zampella, S. Fiorucci, V. Limongelli, Design, synthesis, and biological evaluation of potent dual agonists of nuclear and membrane bile acid receptors, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 937–954.
- [46] R. Thakare, H. Gao, R.E. Kosa, Y.-A. Bi, M.V.S. Varma, M.A. Cerny, R. Sharma, M. Kuhn, B. Huang, Y. Liu, A. Yu, G.S. Walker, M. Niosi, L. Tremaine, Y. Alnouti, A. D. Rodrigues, Leveraging of rifampicin-dosed cynomolgus monkeys to identify bile acid 3-O-sulfate conjugates as potential novel biomarkers for organic anion-transporting polypeptides, *Drug Metab. Dispos.* 45 (7) (2017) 721–733.
- [47] H.R.F. Karabulut, A.O. Karatavuk, H. Ozyildirim, et al., Synthesis of novel dimeric compounds containing triazole using click method and their selective antiproliferative and proapoptotic potential via mitochondrial apoptosis signaling, *Med. Chem. Res.* 29 (2020) 643–655.
- [48] E.W. Sugandhi, C. Slebodnick, J.O. Falkinham, R.D. Gandour, Synthesis and antimicrobial evaluation of water-soluble, dendritic derivatives of epimeric 5 α -cholestan-3-amines and 5 α -cholestan-3-yl aminoethanoates, *Steroids* 72 (8) (2007) 615–626.
- [49] Flare, version, Cresset®, Litlington, Cambridgeshire, UK; <http://www.cresset-group.com/flare/>; Copyright©, 2022 Cresset. All rights reserved.
- [50] RCBS Protein DATA BANK; <https://www.rcsb.org> access: 27.09.2022.
- [51] B. Jasiewicz, L. Mrówczyńska, K. Malczewska-Jaskóła, Synthesis and haemolytic activity of novel salts made of nicotine alkaloids and bile acids, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (4) (2014) 1104–1107.
- [52] W. Kozanecka-Okupnik, B. Jasiewicz, T. Pospieszny, M. Matuszak, L. Mrówczyńska, Haemolytic activity of formyl- and acetyl-derivatives of bile acids and their gramine salts, *Steroids*. 126 (2017) 50–56.
- [53] L. Mrówczyńska, J. Bielawski, The mechanism of bile salts-induced hemolysis, *J. Cell. Mol. Biol. Lett.* 6 (4) (2001) 881–895.
- [54] L. Mrówczyńska, M. Bobrowska-Hägerstrand, T. Söderström, Inhibition of MRP1-mediated efflux in human erythrocytes by mono-anionic bile salts, *Anticancer Res.* 25 (5) (2005) 3173–3178.
- [55] PharmaExpert Predictive Services. Available online: <http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/> (accessed on 1 November 2013).
- [56] V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, Y.V. Borodina, A.A. Lagunin, A. Kos, Robustness of biological activity spectra predicting by computer program PASS for noncongeneric sets of chemical compounds, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 40 (6) (2000) 1349–1355.
- [57] V.V. Poroikov, D.A. Filimonow, How to acquire new biological activities in old compounds by computer prediction, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 16 (2002) 819–824.
- [58] V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, In: *Predictive Toxicology*, Boca Raton, FL, USA, Christoph Helma Taylor & Francis, 2005, pp. 459–478.
- [59] A.V. Stepanchikova, A.A. Lagunin, D.A. Filimonov, V.V. Poroikov, Prediction of biological activity spectra for substances: evaluation on the diverse sets of drug-like structures, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 225–233.
- [60] B. Jasiewicz, W. Kozanecka-Okupnik, M. Przygodzki, B. Warzajtis, U. Rychlewska, T. Pospieszny, L. Mrówczyńska, Synthesis, antioxidant and cytoprotective activity evaluation of C-3 substituted indole derivatives, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 15425.
- [61] A.E. Zoeiby, F. Sanschagrin, R.C. Leves, Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors, *Mol. Microbiol.* 47 (1) (2003) 1–12.
- [62] F. Collin, S. Karkare, A. Maxwell, Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (3) (2011) 479–497.
- [63] E.S. Istvan, J. Eisenhofer, Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase, *Science* 229 (5519) (2001) 1160–1164.

Synthesis, Hemolytic Activity, and In Silico Studies of New Bile Acid Dimers Connected with a 1,2,3-Triazole Ring

Grzegorz Hajdaś,* Damian Kułaga, Hanna Koenig, Katarzyna Sosnowska, Lucyna Mrówczyńska, and Tomasz Pospieszny



Cite This: *ACS Omega* 2024, 9, 39277–39286



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information



ABSTRACT: The synthesis of bile acid conjugates plays a significant role in pharmacology and organic chemistry. These complex compounds are widely studied due to their potential therapeutic applications (e.g., drug carriers or antibacterial agents) and their impact on interactions with biological target systems. It is important to determine the biological activity of the obtained conjugates with potential pharmacological applications. The research aimed to synthesize acyl conjugates of bile acids, determine the influence of acyl groups on potential antibacterial activity and evaluate the impact of conjugation on hemolytic activity. New acetyl bile acid acetyl dimers were synthesized using the “Click Chemistry” reaction, aiming to investigate their hemolytic and antibacterial activity. The structures of all compounds were confirmed through spectral analysis techniques, including ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), and electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). The PMS semiempirical method was also used to estimate the heat of formation of individual conjugates, and the prediction of activity spectra for substances (PASS) technique was used to determine the pharmacokinetic potential of compounds. Docking studies indicate that obtained conjugates have the potential ability to inhibit the biosynthesis of Lipid II and block DNA gyrase. These compounds can therefore be treated as potential candidates for antibacterial compounds. Research findings suggest that conjugating bile acids and their derivatives through 1,2,3-triazole ring, results in final products with reduced hemolytic activity.

1. INTRODUCTION

Steroids, as a subgroup of natural products, have long been a subject of interest in scientific research due to their potential applications across various fields, including organic chemistry and biomedicine.^{1,2} Steroids, crucial compounds found in all living organisms, play pivotal roles in many biological processes such as regulation of metabolism, immune response, and reproductive function.⁴

Bile acids—derivatives of cholesterol synthesized predominantly in the liver, form a unique subset within the steroid group.⁵ Traditionally associated with digestion and fat solubilization, bile acids have recently been identified as signaling molecules involved in glucose and energy metabolism regulation. Their amphipathic properties facilitate the solubilization and emulsification of fats during digestion.⁶ Bile acids act as signaling molecules by binding to receptors like the nuclear receptor farnesol-X-receptor (FXR) and the G-protein-

coupled receptor TGR5. The distinctive structural characteristics of bile acids, including their fused four-ring core and specific hydroxyl group positions, contribute to their diverse biological activities.^{7,8} These compounds' stereochemistry and amphiphilic nature make them suitable for various biomedical applications e.g., as antimicrobial agents.^{9–15} Bile acids are utilized in biomimetic chemistry to construct molecular receptors, supramolecular assemblies, and drug delivery systems.^{16–18} Their ability to form stable complexes with

Received: August 2, 2024

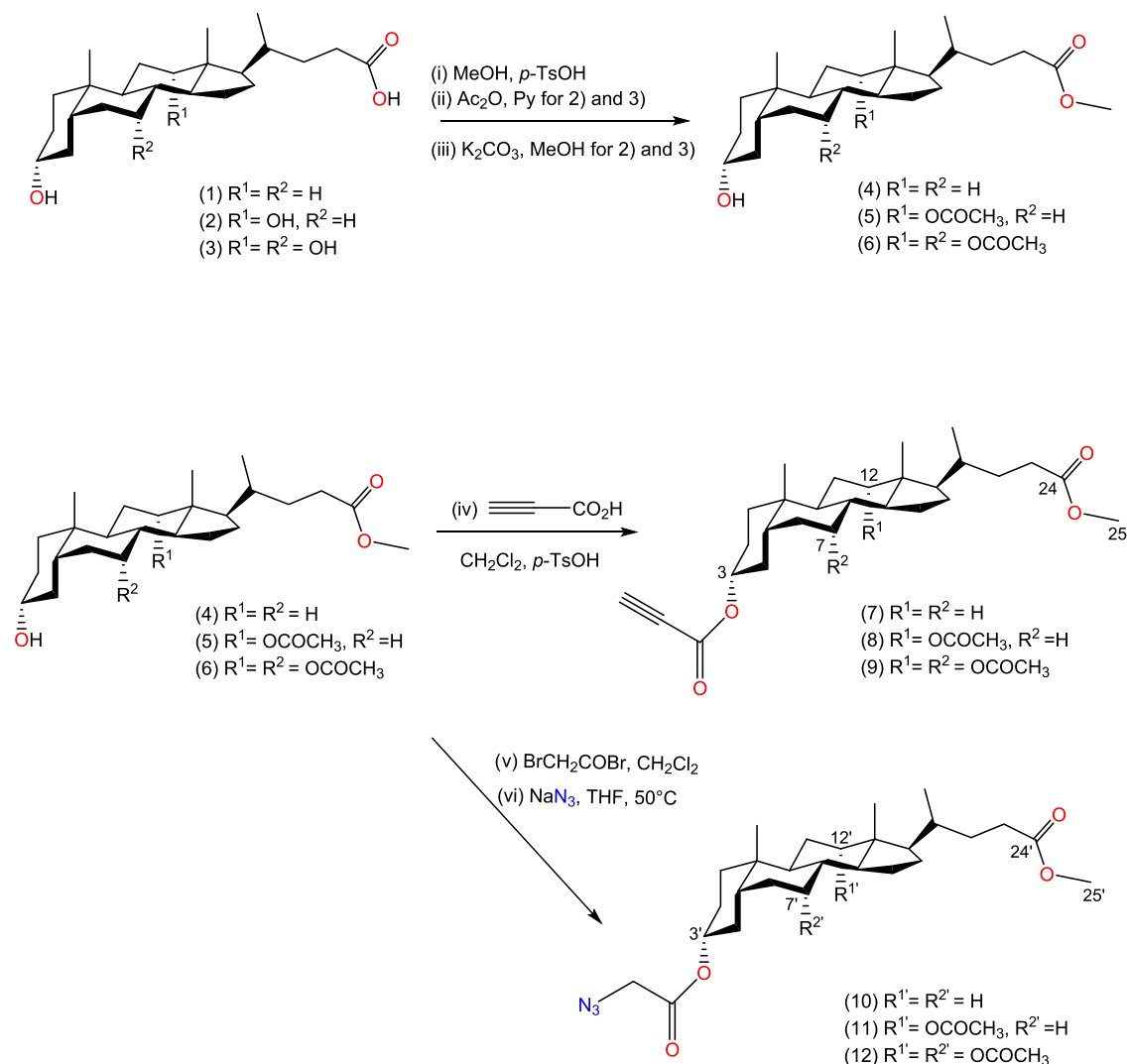
Revised: August 21, 2024

Accepted: August 30, 2024

Published: September 5, 2024



Scheme 1. Synthesis of Propynoyl Esters of Bile Acids (7–9) Azidoacetyl Substituted Derivatives (10–12)



guest molecules highlights their utility in molecular recognition and host–guest interactions.^{19,20}

The concept of “Click Chemistry” has revolutionized the synthesis of complex molecules, offering effective and selective reactions for chemical modification.^{21,22} The Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition is a highly efficient technique for synthesizing disubstituted 1,2,3-triazole rings, which are resistant to oxidation, hydrolysis, and reduction. Various strategies for modifying steroids and generating bioactive derivatives with enhanced pharmacological properties have been reported, leveraging “Click Chemistry” principles.^{23–26}

One promising approach involves synthesizing bile acid conjugates, which show potential for drug discovery, targeted drug delivery, and biomedical imaging due to their antifungal, antibacterial, antiviral, and anticancer properties.^{27–30} These conjugates can address the limitations of traditional steroids, such as restricted bioavailability and dose-related toxicity. The initial high hemolytic activity of bile acids can be reduced through chemical modifications. These modifications often introduce linkers like the 1,2,3-triazole ring, which is not recognized by bacteria or fungi.

Before experimental research, computational investigations are crucial to predict the chemical activity and physicochemical properties of synthesized compounds.^{31,32} Computational

modeling provides valuable insights into structure–activity relationships and facilitates the rational design of bile acid derivatives with optimized pharmacological profiles. Molecular docking is an effective tool for predicting interactions between potential drugs and target bacterial proteins, accelerating the development of new antibacterial therapies.

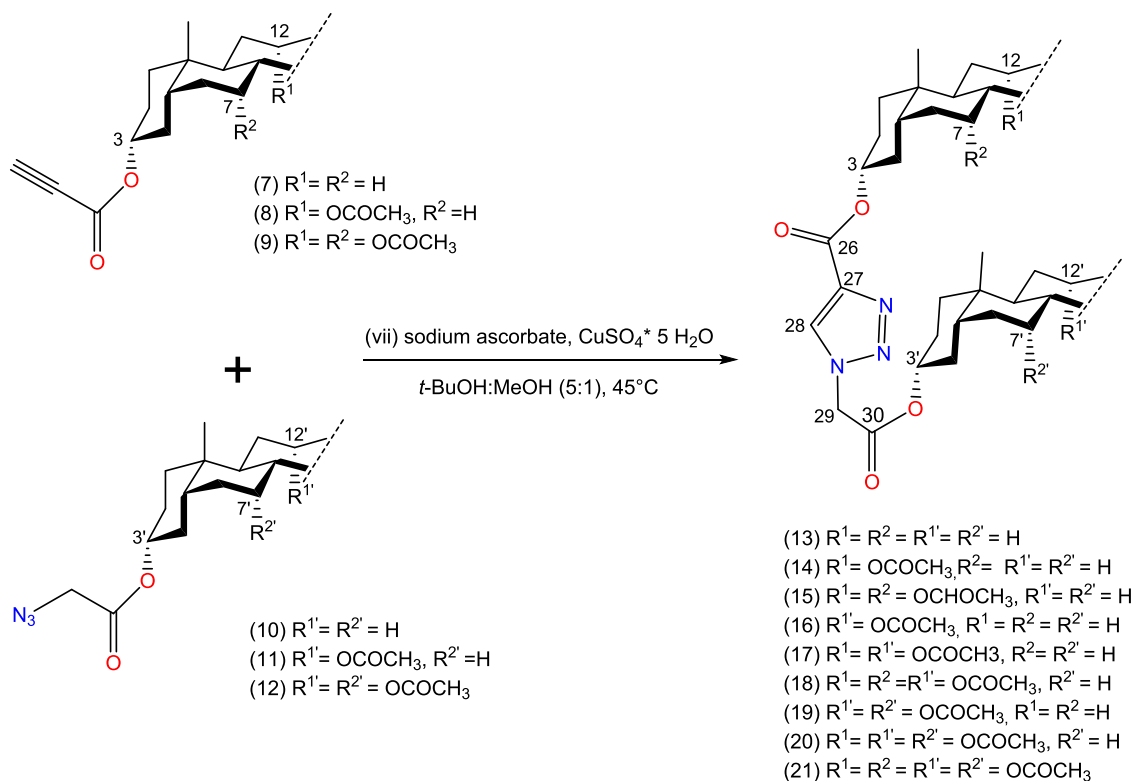
This research aims to synthesize steroid conjugates by combining acetate derivatives of bile acids with reduced hemolytic activity and to evaluate their potential antibacterial properties. The hemolytic activity of the synthesized compounds was assessed, and molecular docking studies were conducted to predict their antibacterial efficacy. These investigations were carried out to determine the impact of conjugation on the hemolytic activity and to explore the potential of these compounds as candidates for antibacterial drug

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Synthesis and Spectroscopic Characterization.

Bile acid methyl esters and their acetoxy derivatives were successfully synthesized with decent yields, following established protocols from existing literature.^{33–35} The process involved reacting acetoxy derivatives of methyl esters of bile acids (4–6) with propionic acid in dichloromethane and *p*-

Scheme 2. Synthesis of Dimers of Bile Acids (13–21) Linked by 1,2,3-Triazole Ring



TsOH, resulting in the formation of methyl propynoyl esters (7–9) is shown in Scheme 1. To obtain the 3 β -bromoacetoxyl derivatives necessary for synthesizing compounds (10–12), methyl esters of bile acids (4–6) reacted with bromoacetic acid bromide in anhydrous dichloromethane. Subsequently, compounds (10–12) were synthesized from bromoacetate derivatives of bile acids via substitution reactions with NaN_3 in THF at 50 °C, yielding azide derivatives in satisfactory quantities shown in Scheme 1. The propynoyl esters of bile acids (7–9) and azide derivatives (10–12) were used as substrates in the “Click Chemistry” reaction, conducted in the presence of $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ and sodium ascorbate in $t\text{-BuOH/MeOH (5:1)}$. This led to the formation of a mixture of crude products (13–21) showed at Scheme 2, which were separated using column chromatography. The reaction yielded dimers with satisfactory yields ranging from 60 to 90%, except for compounds (15) (47%) and (20) (50%).

The basic building block of all steroids is the cyclopentanoperhydrophenanthrene ring system is not a source of many useful infrared (IR) signals. The vibrational bands corresponding to C–C bonds were notably weak and were obscured by overlapping signals in the fingerprint region. Stretching vibrations of C–H bonds merged into one broad band, for conjugate structure, between 2952 and 2867 cm^{-1} . These signals are present for all compounds (13–21). The symmetric carbonyl group $\nu(C=O)$ stretching vibration induces characteristic bands at 1736–1741 cm^{-1} in the Fourier-transform-IR (FT-IR) spectrum, serving as essential signals for all products. Moreover, strong characteristic signals in the region 1247–1215 cm^{-1} are present, which are assigned to the $\nu(C-O)$. Compound (13), which is a derivative of lithocholic acids does not contain an acetate group in its molecule. Consequently, its FT-IR spectrum exhibits an

absence of signals attributed to the $\nu(C=O)$ and $\nu(C-O)$ functional groups.

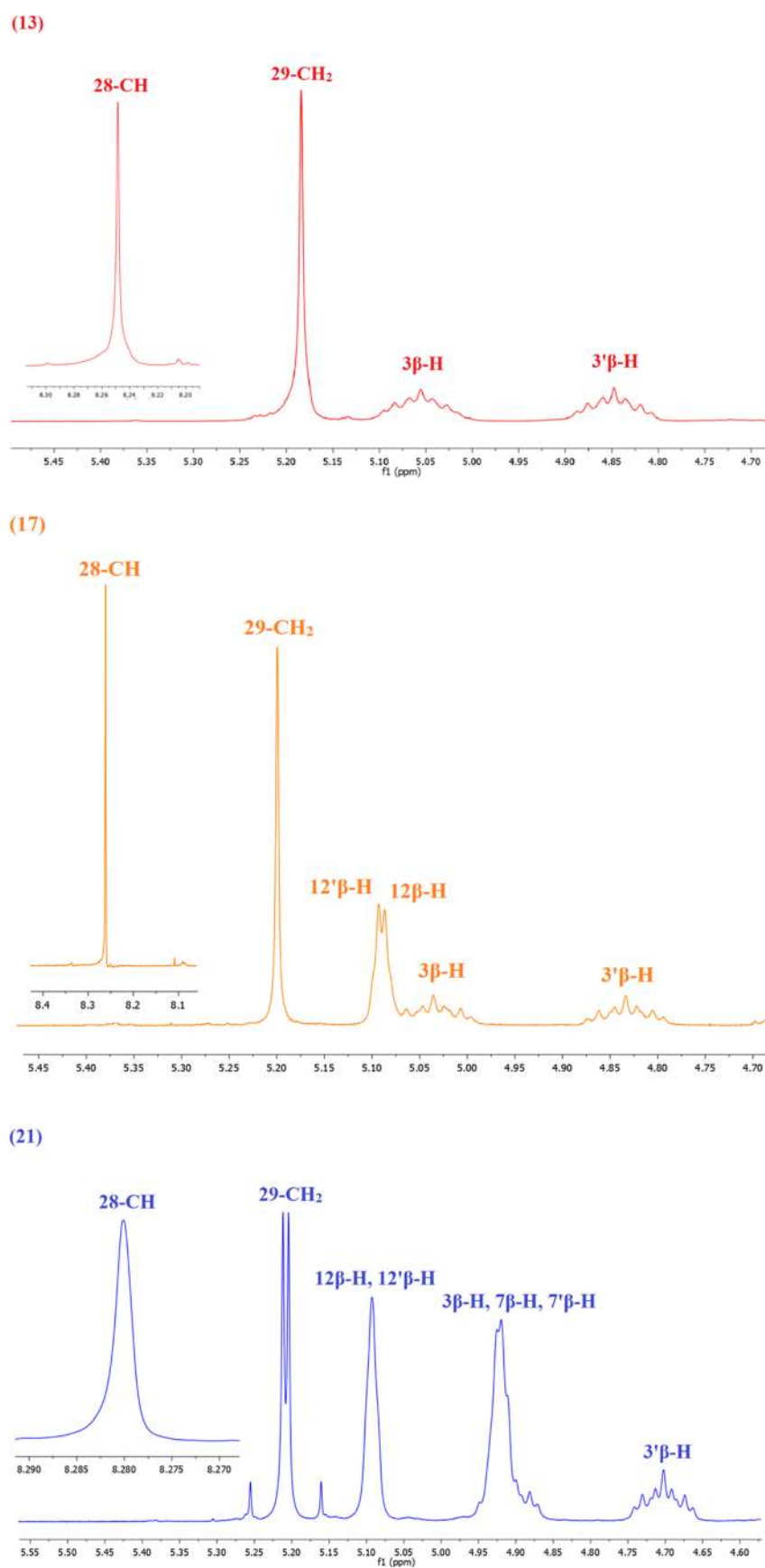
The most characteristic signals of compounds (13–21) in the range of 3.90–8.50 ppm in the 1H NMR spectra are shown in Figure 1.

The diagnostic proton signals of the triazole ring 28-CH in all bioconjugates (13–21), featuring a 1,2,3-triazole ring are manifested as a singlet approximately at 8.28–8.25 ppm. The protons from the methylene groups 29- CH_2 directly bonded to the triazole ring exhibit signals at approximately 5.21–5.18 ppm. However, in the case of compounds (19–21) (methyl cholate azidoacetate derivatives), these signals appear as a double singlet at 5.21 ppm.

All compounds (13–21) showed signals originating from 3 β -H and 3' β -H protons. In the case of compounds derived from deoxycholic or cholic acids, signals originating from the following protons 12 β -H/12' β -H (14–21) and 7 β -H/7' β -H (15, 18, 19–21) were also present.

Compounds (13) and (14), a series of products from azidoacetate derivatives of lithocholic acid, had a 3' β -H signal in the form of a multiplet at 4.89–4.81 ppm. 3 β -H signals occurred as multiplets with values ranging from 5.10 to 5.03 (13), 5.06 and 4.99 (14). Compound (14) also showed a signal from the 7 β -H proton as a singlet at 5.08 ppm. In the case of compound (15), the 12' β -H proton was visible in the form of a distinct singlet at 5.09 ppm, however, the signals from 7' β -H, 3 β -H, 3' β -H overlapped, creating a multiplet at 4.96–4.80 ppm.

Compounds (16) and (17), a series of products from azidoacetate derivatives of deoxycholic acid, had a 3' β -H signal in the form of a multiplet at 4.87–4.79 ppm. Compound (17) also showed signals from the 3 β -H proton at 5.06–4.99 ppm in the form of a multiplet. Moreover, the signals from 12 β '-H and 12 β -H were visible as singlets at 5.09 and 5.08 ppm. In the case



of compound (16), signals from 12' β -H and 3 β -H overlapped forming a multiplet at 5.09–5.01 ppm. Signals from 12 β -H and 12' β -H protons in compound (18) overlapped giving a singlet signal at 5.09 ppm. In addition, the signal from 7' β -H, 3 β -H, and 3' β -H also overlapped, creating a multiplet at 4.94–4.76 ppm (18).

In the case of compounds (19–21), which are a series of products from azidoacetate cholate derivatives, all signals from the 3' β -H group were present in the form of a multiplet at 4.74–4.66 ppm. In compound (19), 12' β -H and 7' β -H protons gave clear singlet and double singlet signals at 5.09 and 4.92 ppm corresponding. Compounds (20–21) had a signal at 5.09 ppm from overlapped 12 β -H and 12' β -H. In the case of compound (20), a multiplet from 3 β -H at 5.05–4.98 ppm and a double singlet from 7 β -H and 7' β -H at 4.92 ppm were visible. To 12' β -H and 7' β -H, respectively. The multiplet at 5.07–5.00 ppm was a signal originating from 3 β -H. Similarly to the above, in compound (21) the signals from the 12 β -H and 12' β -H protons overlapped to form a double singlet at 5.09. The signal at 4.94–4.86 ppm was a multiplet created by the overlap of signals from 3 β -H, 7 β -H, and 7' β -H.

The 2S-CH₃ and 2S'-CH₃ groups were visible as a signal at 3.67 ppm as singlet (13–18, 21) or double singlet (19, 20). The protons of the 12 α -CO₂CH₃ group showed signals at 2.12–2.08 ppm for compounds (14–15, 17, 18, 20–21). Similarly, signals coming from protons of 12' α -CO₂CH₃ were visible at 2.11–2.08 ppm for (16–21). On the other hand, protons of the 7 α -CO₂CH₃ and 7' α -CO₂CH₃ groups gave signals at 2.21 and 2.15–2.14 ppm for the conjugates (15, 18, 21) and (19–21) respectively.

Two hydrogen singlets in the range 0.73–0.65, 0.93–0.91 and characteristic doublets at 0.93–0.81 ppm are assigned to 18'-CH₃, 19'-CH₃, and 21'-CH₃, respectively. Similarly, singlets in ranges 0.74–0.65, 0.95–0.94 and doublets at 0.93–0.80 were assigned to 18-CH₃, 19-CH₃, and 21-CH₃.

The ¹³C NMR spectra of conjugates (19–21) exhibit distinct signals at 12.4–12.2, 23.2–22.4, and 18.3–17.5 ppm, corresponding to 18'-CH₃, 19'-CH₃, and 21'-CH₃, respectively. Moreover, signals originating from the group moiety range from 12.4–12.1 ppm for 18-CH₃, 23.2–22.6 ppm for 19-CH₃, and 18.2–17.5 ppm for 21-CH₃. However, the resonance of the carbonyl groups of the 3 α -acetoxy moiety (C26) is observed at 160.2–160.0 ppm. Conversely, the carboxyl group of the acetoxy moiety (C30) resonates at 165.1–165.1 ppm, 170.7–170.6 ppm (12 α -O₂CCH₃), and 170.8 ppm (7 α -O₂CCH₃) 170.4–170.2 ppm (12' α -O₂CCH₃) and 170.4 ppm (7' α -O₂CCH₃). Alternatively, the carbon atoms of the C(24)=O and C(24')=O groups produce signals in the range of 174.8–174.5 and 174.7–174.5 ppm. The diagnostic signals for the C(27) and C(28) atoms within the 1,2,3-triazole ring are observed at 141.1 ppm and 129.2–128.8 ppm, respectively.

2.2. PM5 Calculations. The PM5 semiempirical calculations were performed using the WinMopac 2003 program. The final heat of formation (HOF) for dimers of bile acids linked 1,2,3-triazole ring is presented in Table 1. The molecular models of representative compounds are shown in Figure 2.

As evident, the end products (13–21) exhibit lower HOF values compared to their substrates. The highest HOF values are observed for the compound (13), while the lowest is for (21). The presence of hydroxyl groups in the bile acid structure, as well as their substitution by acetate groups, affects

Table 1. Heat of Formation (HOF) [kcal/mol] of Azidoacetate Bile Acids Derivatives (10–12) and Conjugates (13–21)^a

compounds	HOF [kcal/mol]	Δ HOF [kcal/mol]
(10)	-192.5621	
(11)	-278.4880	
(12)	-356.3252	
(13)	-453.9492	-261.3871
(14)	-540.5013	-347.9392
(15)	-613.4933	-420.9312
(16)	-540.0357	-261.5477
(17)	-626.4624	-347.9744
(18)	-711.7935	-433.3055
(19)	-617.7925	-261.4673
(20)	-704.2530	-347.9278
(21)	-789.6462	-433.3210

^a Δ HOF = HOH_(13–21) - HOF_(10–12).

the determinant value of the HOF. Moreover, the incorporation of OAc groups facilitates the formation of stable host–guest complexes through intramolecular hydrogen bonds. Consequently, an increase in the number of OAc groups in the bile acid skeleton results in a decrease in the HOF value. These complexes can be stabilized via hydrogen bonding or electrostatic interactions stemming from the OAc groups within the bile acid molecule.

2.3. Prediction of Activity Spectra for Substances.

The potential pharmacological activities of the synthesized bioconjugates (13–21) were determined based on a computer-aided drug discovery approach using the *in silico* prediction of activity spectra for substances (PASS) program.^{36–40} Biological activity predicted for a potential compound with the highest probability (focal activities) has also been selected and presented in Table 2. The most frequently predicted types of biological activity are cryoprotectant and hypolipemic. On the other hand, conjugates (18, 20–21) have an antiviral activity and (13–15, 19, 21) Adenomatous polyposis inhibitor activity.

2.4. Hemolytic Activity.

Bile acids exhibit different effects on the molecular structure of cell membranes dependent on their chemical structure and concentration.^{41,42} Hydrophobic bile acids like lithocholic and deoxycholic acid provoke hemolysis in red blood cells (RBC) in a dose-dependent manner by enhancing the cell membrane permeability to ions.⁴³ Conversely, at sublytic concentrations, bile acid molecules serve to stabilize the lipid bilayer of cell membranes and modulate the activity of membrane proteins such as MRP1.^{44,45} Considering the amphiphilic properties of bile acids and their derivatives, it is essential to evaluate their hemolytic activity before any biomedical uses. Therefore, all compounds underwent *in vitro* evaluation for cytotoxicity using a hemolytic assay with human RBC. Based on literature data and the results obtained, it can be concluded that the dimerization of acetyl derivatives of bile acids results in a reduction in hemolytic activity.⁴⁶ In the case of lithocholic (LA) and cholic acid (CA), it can be seen that the result of acylates to derivatives LA-Ac and CA-Ac is a slight increase in hemolytic activity. It is worth noting, however, that LA's activity is much higher than the tested deoxycholic acid (DA) and CA. Acylation of DA increases its hemolytic activity to a value of 90%. For all compounds obtained, the hemolytic activity value was 13–28%, as shown in Figure 3. LA-Ac and

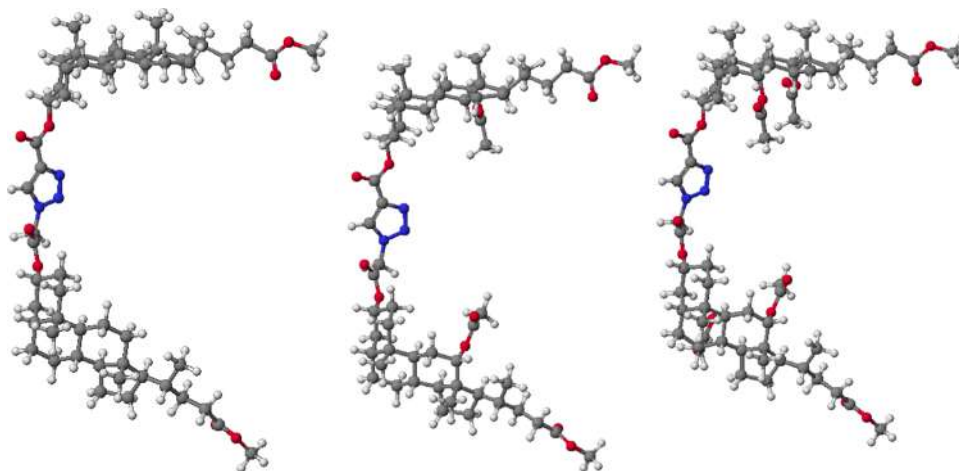


Figure 2. Molecular models of (13) (left), (16) (middle), and (21) (right) were calculated by the PMS method.

Table 2. Probability “To Be Active” (PA) Values for the Predicted Biological Activity of Dimers (13–21)

compounds	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)
PA > 0.7									
acylcarnitine hydrolase inhibitor	0.85	0.82	0.82	0.82	0.84	0.84	0.82	0.84	0.85
alkylacetylgllycerophosphatase inhibitor	0.81	0.75		0.75	0.78	0.72		0.72	
alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor	0.76				0.72				
antieczematic	0.75	0.71		0.71					
glyceryl-ether monooxygenase inhibitor	0.72	0.76	0.80	0.76	0.77	0.80	0.80	0.80	0.80
adenomatous polyposis treatment	0.71	0.70	0.70	0.70			0.70		0.71
cholesterol antagonist	0.71								
cytoprotectant	0.70		0.73			0.71	0.73	0.71	0.70
hypolipemic			0.78			0.77	0.78	0.77	0.76
biliary tract disorders treatment			0.73			0.72	0.73	0.72	0.73
antiviral (influenza)						0.71		0.71	0.72

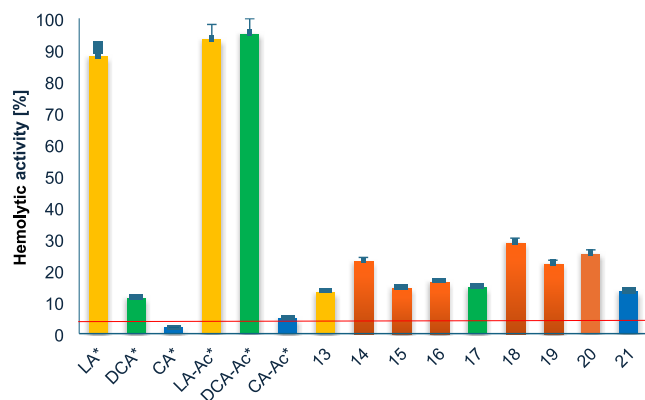


Figure 3. Hemolytic activity of compounds tested (0.1 mg/mL) after 1 h incubation at 37 C. A hemolysis degree higher than 5% indicates the cell membrane-perturbing activity of compounds. PBS—negative control, no hemolysis. * Adapted from data in ref 46.

DA-Ac conjugation with other acetyl bile acid derivatives results in obtaining dimers with lower hemolytic activity than the initial one. Only in the case of CA-Ac derivatives, an increase in hemolytic activity by 10–20% can be observed when conjugates with other acetyl derivatives. The above conclusions are particularly visible for compounds (13), (18), and (21) which are dimers of acetyl derivatives of lithocholic, deoxycholic and cholic acids (marked with the same color as the substrates in Figure 3).

2.5. Molecular Docking. In the modern world, the growing threat from antibiotic-resistant bacteria poses an urgent need for scientists and researchers to discover new chemical compounds with antibacterial properties. Drug-resistant bacteria are becoming more common, which makes existing treatments less effective. Therefore, the search for new compounds with antibacterial activity is becoming a key goal of scientists around the world. It is known that steroid derivatives may have antibacterial activities.⁴⁷

Three representative compounds were selected for virtual screening: (13), (17), and (21). These are dimers of lithocholic, deoxycholic and cholic acids respectively, which additionally differ in the number of acetyl groups present. The presence or absence of these groups may therefore influence the ability to dock to selected active sites. Numerous mechanisms of antibacterial action exist. For example, antibacterial glycopeptides show activity by inhibiting Lipid II of bacteria.⁴⁷ Lipid II plays a crucial role in bacterial cell wall synthesis as it serves as a precursor molecule for the formation of peptidoglycan, an essential component of bacterial cell walls. Peptidoglycan provides structural integrity and protection to bacterial cells, making the biosynthesis of Lipid II a vital process for bacterial survival and proliferation. In turn, fluoroquinolones, by blocking DNA gyrase, effectively destroy Gram-positive bacteria.^{47,48} DNA gyrase, which belongs to topoisomerases, is a key enzyme involved in many life processes of bacteria, including replication, transcription and recombination of bacterial DNA. It is composed of two

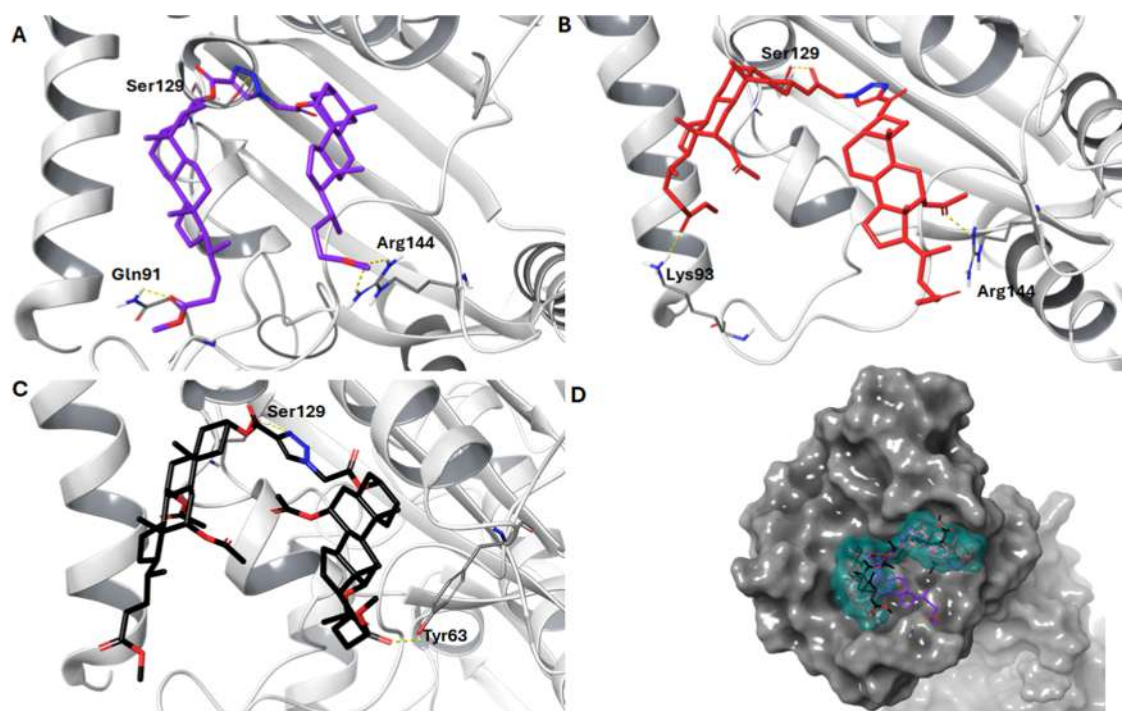


Figure 4. (A–C) Binding modes with hydrogen bonds of key amino acids of docked compounds (13)–magenta, (17)–red, (21)–black. (D) The surface of the gyrase DNA with docked compounds on. The yellow dotted line represents the hydrogen bond.

subunits—A (responsible for cell division processes) and B (responsible for ATP hydrolysis).⁴⁹

Due to literature reports confirming the antibacterial activity of steroids, molecular docking was performed.^{47,48} Docking involved activity to inhibit Lipid II and DNA gyrase of compounds (13), (17), and (21).

To assess the antibacterial activity of selected compounds, the first step is to assess the arrangement and type of interactions of a typical representative of fluoroquinolones—ciprofloxacin in the GyrB binding pocket (PBD: 3U2D).⁵⁰ Then compare them with the arrangement and type of interactions created by the tested compounds. Docked ciprofloxacin (docking score -7.169 kJ/mol) forms stable hydrogen bond interactions with Ser129 (2.68 Å), while protonated piperazine forms a salt bridge with Glu58 (3.86 Å) and an additional hydrogen bond also with Glu58 (2.95 Å) and Asn54 (2.80 Å).

All three molecules (13), (17), and (21) show a similar skeletal conformation, when binding to the binding pocket of DNA gyrase. These compounds take the shape of the letter “U”, with the inflection region at the level of the triazole ring, and occupy the same space as ciprofloxacin. The results are presented in Figure 4.

For compound (13), the triazole forms a hydrogen interaction with Ser129 (2.91 Å) similar to that in the case of ciprofloxacin or other sterol derivatives described by Ansari et al.⁴⁹ Both carbonyl groups of the bile acid side chain form a total of three hydrogen bonds—one double with Arg144 (2.37 and 2.34 Å) and one with Gln91 (2.17 Å). The results are presented in Figure 4A. Compound (17) (Figure 4B) similar to compound (13), it forms a hydrogen interaction with Ser129 (1.96 Å), but not through the triazole ring but through the carbonyl group at C-26 (derived from the propioloacetate derivative). Moreover, the carbonyl group present in the steroid side chain also forms hydrogen bonds with Arg144

(2.39 Å) while the carbonyl oxygen forms a hydrogen bond with Lys93 (2.12 Å). Compound (21) (Figure 4D) adopts a similar conformation as (13) and (17), forming hydrogen interactions with Ser129 (2.07 Å) and only one hydrogen bond between Tyr63 (2.28) with the oxygen of the bile acid side chain carbonyl group. None of the four introduced acetate groups interacts with the DNA gyrase binding pocket.

As shown in Table 3, compound (13) may have the best potential to inhibit DNA gyrase. It has a similar docking score

Table 3. Docking Scores and Hydrogen Bonds Formed with Representative Compounds (13), (17), and (21)^a

compounds	docking score (kcal/mol)	H-bond residues (distance Å)
13	−6.761	Ser129 (2.91 Å)
		Arg144 (2.37 Å)
		Arg144 (2.34 Å)
		Gln91 (2.17 Å)
17	−4.300	Ser129 (1.96 Å)
		Arg144 (2.39 Å)
		Lys93 (2.12 Å)
21	−3.216	Ser129 (2.07 Å)
		Tyr63 (2.28 Å)
ciprofloxacin	−7.169	Ser129 (2.68 Å)
		Glu58 (2.95 Å)
		Asn54 (2.80 Å)

^aCiprofloxacin is used as a reference with good antibacterial activity.

and creates the largest number of hydrogen bonds. Compound (21), in turn, has the highest docking score and creates only two interactions with Ser129 (2.07 Å) and Tyr63 (2.28 Å).

The tested compounds were also docked to the crystal structure of *Staphylococcus aureus* membrane receptor transglycosylase (PDB: 3VMT)⁵¹ with parent Lipid II as a reference. The tested compounds (13) and (17), similarly to

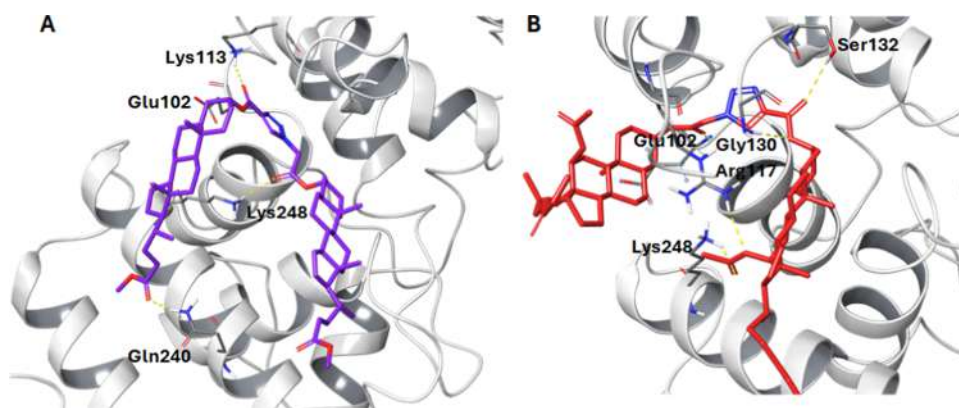


Figure 5. Binding modes with hydrogen bonds of key amino acids of docked compounds: (A) compound (13) magenta, (B) compound (17) red. The yellow dotted line represents the hydrogen bond.

DNA gyrase, adopt a bent U-shaped conformation where the triazole ring (which is the inflection point) squeezes into the binding pocket, occupying the same space as the parent crystallized compound—LHI301 which is shown in Figure 5.

In the case of compound (13) (docking score -5.423 kcal/mol), the triazole forms an interaction with Glu102 (2.70 Å), while the carbonyl oxygen directly attached to the triazole through C-26 interacts with a hydrogen bond with Lys113 (2.09 Å). The carbonyl oxygen located on the other side of the triazole ring at C-30 also forms a hydrogen bond with Lys248 (2.36 Å). Furthermore, the carbonyl oxygen of the bile acid side chain forms a hydrogen bond with Gln240 (2.04 Å). For compound (17) (docking score -5.144 kcal/mol), the hydrogen bond with Glu102 (1.87 Å) is not formed with the triazole ring but with the carbonyl group at C-30 (from the azidoacetate derivative part). The ester group attached directly to the triazole (from the propionate derivative part), in turn, forms two hydrogen interactions with Ser132 (2.52 Å) and Gly130 (2.46 Å). The second ester group attached to the bile acid side chain (from the azide derivative part) also forms two hydrogen interactions with Arg117 (2.55 Å) and Lys248 (2.43 Å). Compound (21) did not dock to the crystal structure of the molecular target. Taking into account the above and analyzing the data from Table 4, both compounds (13) and (17) have the potential to exhibit antibacterial activity.

3. CONCLUSIONS

This study presents the synthesis and chemical characterization of conjugates of bile acid derivatives connected via a 1,2,3-triazole ring (13–21). The results obtained in this study confirm that the conjugation of acetyl derivatives of lithocholic

and deoxycholic acid esters causes a significant reduction in hemolytic activity of the obtained products (13) and (17). In the case of a dimer conjugate of cholic acid derivatives (21), an increase in hemolytic activity can be observed compared with cholic acid and its acyl derivative. The results indicate that for bile acid derivatives with high initial hemolytic activity, conjugation is a convenient method of obtaining new compounds with reduced hemolytic activity. This approach circumvents the challenge posed by the high hemolytic activity of these compounds.

Molecular docking studies prove that the compounds (13) and (17) exhibit possible binding affinity toward the protein targets of interest (3U2D and 3VMT). Inhibition of both protein's activity could indicate the tested compound's antibacterial properties. Docking results suggest that the antibacterial activity primarily stems from interactions associated with triazole rings or carbonyl groups, rather than acetate groups. It is therefore worth considering the possibility of other modifications of the hydroxyl groups.

Bacteria can develop resistance to commonly used antibiotics, making these drugs ineffective. This poses a serious threat to humanity. Therefore, there is an urgent need to search for new antibacterial drug candidates. The compounds obtained in this study appear valuable based on the results. This prompts further *in vitro* tests on pathogenic bacterial strains.

4. EXPERIMENTAL SECTION

4.1. General Procedure for the Preparation of Propiolic Esters (7–9). The methyl esters of bile acids and their acetoxy derivatives, as well as azidoacetates or propiolic esters of bile acid were synthesized following the procedures outlined in the refs 1–3. Bile acid derivatives (4), (5), or (6) were dissolved in 15 mL of dichloromethane, followed by the addition of *p*-TsOH (catalytic amount) and propiolic acid (2 equiv). The reaction was carried out for 24 h at room temperature. Then the mixture was washed with cold water, extracted with chloroform, washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na_2SO_4). The solvent was evaporated under reduced pressure to obtain the crude products. Products were purified by chromatography on silica gel (Merck, type 60, 70–230 mesh) with chloroform/hexane as eluent. Yields for the products (7–9): 45, 57, and 30% respectively.

4.2. General Procedure for the Preparation of Azidoacetates (10–12). To obtain bromoacetate derivatives,

Table 4. Docking Scores and Hydrogen Bonds Formed with Representative Compounds (13) and (17)

compounds	docking score (kcal/mol)	H-bond residues (distance Å)
13	-5.423	Glu102 (2.70 Å)
		Lys113 (2.09 Å)
		Lys248 (2.36 Å)
		Gln240 (2.04 Å)
17	-5.144	Glu102 (1.87 Å)
		Ser132 (2.52 Å)
		Gly130 (2.46 Å)
		Arg117 (2.55 Å)
		Lys248 (2.43 Å)

compounds (4–6) were dissolved in 5 mL of anhydrous dichloromethane, and then subsequently, bromoacetic acid bromide was added dropwise and the reaction mixture was kept at room temperature for 24 h. Then the mixture was washed with NaHCO₃ (5%, 20 mL), brine (100 mL) and dried over Na₂CO₃. The solvent was evaporated under reduced pressure to give the crude product. Products were purified by chromatography on silica gel (Merck, type 60, 70–230 mesh) with chloroform/hexane as eluent. Obtained products were dissolved in 15 mL of THF. Then, NaN₃ (2 equiv) was added, the mixture was heated at 50 °C for 4 h. THF was evaporated, extracted with chloroform, washed with brine, and dried (Na₂SO₄). Yields of the products (10–12): 85, 88, and 78% respectively.

4.3. General Procedure for the Preparation of Bioconjugates (13–21). Procedure for bioconjugates (13–21): Azidoacetate (10–12) was dissolved in a mixture of *t*-BuOH/MeOH (6 mL, 5:1) and compound (7–9) added. Next, CuSO₄·5 H₂O (3 mg, 3 mol %) and sodium ascorbate (9 mg, 20 mol %) were added to the homogeneous mixture in water (1 mL). The reaction mixture was heated at 45 °C for 1 h, then extracted with chloroform (30 mL), washed with brine (60 mL), and dried over anhydrous Na₂SO₄. The crude compound was purified by column chromatography on silica gel using chloroform/ethyl acetate (15:1) as an eluent and gave the products (13–21) with yields 80, 90, 47, 80, 60, 62, 70, 50, and 67% respectively.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.4c07103>.

¹H and ¹³C NMR and ESI-MS spectra of bioconjugates (13–21) and technical and experimental specifications for PMS calculations, hemolysis assay and molecular docking (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Grzegorz Hajdaś – Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznań, Poland; orcid.org/0000-0001-7500-4274; Email: grzhaj@amu.edu.pl

Authors

Damian Kułaga – Department of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, 31-155 Kraków, Poland

Hanna Koenig – Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznań, Poland

Katarzyna Sosnowska – Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznań, Poland

Lucyna Mrówczyńska – Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznań, Poland

Tomasz Pospieszny – Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznań, Poland; orcid.org/0000-0001-5071-7016

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.4c07103>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

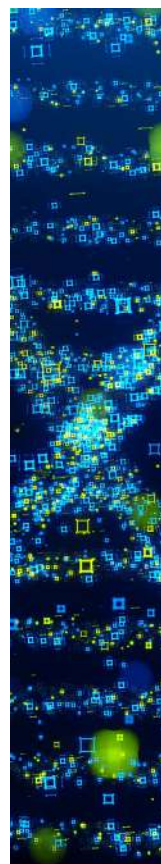
■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by ID-UB Proposals (project number: 054/13/SNS/0002).

■ REFERENCES

- (1) Yang, X.; Stein, K. R.; Hang, H. C. Anti-infective bile acids bind and inactivate a Salmonella virulence regulator. *Nat. Chem. Biol.* **2023**, *19*, 91–100.
- (2) Mustafa, N. H.; Sekar, M.; Fuloria, S.; Begum, M. Y.; Gan, S. H.; Rani, N. N. I. M.; Ravi, S.; Chidambaram, K.; Subramaniyan, V.; Sathasivam, K. V.; et al. Chemistry, Biosynthesis and Pharmacology of Sarsasapogenin: A Potential Natural Steroid Molecule for New Drug Design, Development and Therapy. *Molecules* **2022**, *27*, No. 2032.
- (3) Rasheed, A.; Qasim, M. A Review of Natural Steroids and their Applications. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2013**, *4* (2), 520–531.
- (4) Di Ciaula, A.; Garruti, G.; Lunardi, B. R.; et al. Bile Acid Physiology. *Ann. Hepatol.* **2017**, *16* (1), S4–S14.
- (5) Lefebvre, P.; Cariou, B.; Lien, F.; Kuipers, F.; Stals, B. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol. Rev.* **2009**, *89* (1), 147–191.
- (6) Baptissart, M.; Vega, A.; Maqdasy, S.; Caira, F.; Baron, S.; Lobaccaro, J. M. A.; Volle, D. H. Bile acids: From digestion to cancers. *Biochimie* **2013**, *95* (3), 504–517.
- (7) Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. Chemistry and biology of bile acids. *Curr. Sci.* **2004**, *87* (12), 1666–1683.
- (8) Tamminen, J.; Kolehmainen, E. Bile Acids as Building Blocks of Supramolecular Hosts. *Molecules* **2001**, *6* (1), 21–46.
- (9) Lin, C.; Wang, Y.; Le, M.; Chen, K. F.; Jia, Y.-G. Recent Progress in Bile Acid-Based Antimicrobials. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32* (3), 395–441.
- (10) Li, Y.; Dias, J. R. Syntheses of α - and β -Dimers of Lithocholic Acid Esters. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28* (2), 203–209.
- (11) Itoh, M.; Wada, K.; Tan, S.; et al. Antibacterial action of bile acids against *Helicobacter pylori* and changes in its ultrastructural morphology: effect of unconjugated dihydroxy bile acid. *J. Gastroenterol.* **1999**, *34*, 571–576.
- (12) Lin, C.; Wang, Y.; Le, M.; Chen, K.-F.; Jia, Y. G. Recent Progress in Bile Acid-Based Antimicrobials. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32* (3), 395–410.
- (13) Fernández, L. R.; Svetaz, L.; Butassi, E.; Zacchino, S. A.; Palermo, J. A.; Sánchez, M. Synthesis and antifungal activity of bile acid-derived oxazoles. *Steroids* **2016**, *108*, 68–76.
- (14) Hazra, B.; Pore, V.; Dey, S.; Datta, S.; Darokar, M.; Saikia, D.; Khanuja, S.; Thakur, A. Bile acid amides derived from chiral amino alcohols: novel antimicrobials and antifungals. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (3), 773–777.
- (15) Guinan, J.; Villa, P.; Thangamani, S. Secondary bile acids inhibit *Candida albicans* growth and morphogenesis. *Pathog. Dis.* **2018**, *76* (3), No. fty038, DOI: [10.1093/femspd/fty038](https://doi.org/10.1093/femspd/fty038).
- (16) Santiago-Sampedro, G. I.; Aguilar-Granda, A.; Torres-Huerta, A.; Flores-Álamo, M.; Maldonado-Domínguez, M.; Rodríguez-Molina, B.; Iglesias-Arteaga, M. A. Self-Assembly of an Amphiphilic Bile Acid Dimer: A Combined Experimental and Theoretical Study of Its Medium-Responsive Fluorescence. *J. Org. Chem.* **2022**, *87* (5), 2255–2266.
- (17) Patel, S.; Bariya, D.; Mishra, R.; Mishra, S. Bile acid-based receptors and their applications in recognition. *Steroids* **2022**, *179*, No. 108981.
- (18) Jain, M.; Nowak, B. P.; Ravoo, B. J. Supramolecular Hydrogels Based on Cyclodextrins: Progress and Perspectives. *ChemNanoMat* **2022**, *8* (5), No. e202200077.

- (19) Gautrot, J. E.; Zhu, X. X. Macrocyclic bile acids: from molecular recognition to degradable biomaterial building blocks. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (32), 5705–5716.
- (20) Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M. Bile acid derivatives as enantiodifferentiating host molecules in inclusion processes. *Chirality* **2005**, *17* (3), 121–130.
- (21) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (22) Hein, C. D.; Liu, X. M.; Wang, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216–2230.
- (23) Pospieszny, T. Molecular Pockets, Umbrellas and Quasi Podands from Steroids: Synthesis, Structure and Applications. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2015**, *12* (3), 258–270.
- (24) Bansal, R.; Suryan, A. A Comprehensive Review on Steroidal Bioconjugates as Promising Leads in Drug Discovery. *ACS Bio Med. Chem. Au* **2022**, *2* (4), 340–369.
- (25) Latyshev, G. V.; Baranov, M. S.; Kazantsev, A. V.; Averin, A. D.; Lukashov, N. V.; Beletskaya, I. P. Copper-Catalyzed [1,3]-Dipolar Cycloaddition for the Synthesis of Macrocycles Containing Acyclic, Aromatic and Steroidal Moieties. *Synthesis* **2009**, *2009* (15), 2605–2615.
- (26) Altinkok, C.; Karabulut, H. R. F.; Tasdelen, M. A.; Acik, G. Bile acid bearing poly (vinyl chloride) nanofibers by combination of CuAAC click chemistry and electrospinning process. *Mater. Today Commun.* **2020**, *25*, No. 101425.
- (27) Agarwal, D. S.; Siva Krishna, V.; Sriram, D.; Yogeewari, P.; Sakhuja, R. Clickable Conjugates of Bile acids and Nucleosides: Synthesis, Characterization, in vitro anticancer and antituberculosis studies. *Steroids* **2018**, *139*, 35–44.
- (28) Enhsen, A.; Kramer, W.; Wess, G. Bile acids in drug discovery. *Drug Discovery Today* **1998**, *3* (9), 409–418.
- (29) Mishra, S.; Mishra, R. Updates in Bile Acid-Bioactive Molecule Conjugates and Their Applications. *Steroids* **2020**, *159*, No. 108639.
- (30) Hong, S.; Lee, Y.; Shin, H.; Kim, T.; Jung, E.; Lee, D. Nanoassemblies of Disulfide-Bridged Bile Acid Dimers as Therapeutic Agents for Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4* (4), 3145–3154.
- (31) Jakhar, R.; Dangi, M.; Khichi, A.; Chhillar, A. K. Relevance of Molecular Docking Studies in Drug Designing. *Curr. Bioinf.* **2020**, *15* (4), 270–278.
- (32) Slick, H. E.; Beresford, A. P.; Tarbit, M. H. The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2002**, *7* (2), 109–116.
- (33) Sheng, R.; Luo, T.; Li, H.; Sun, J.; Wang, Z.; Cao, A. ‘Click’ synthesized sterol-based cationic lipids as gene carriers, and the effect of skeletons and headgroups on gene delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (21), 6366–6377.
- (34) D’Amore, C.; Di Leva, F. S.; Sepe, V.; Renga, B.; Del Gaudio, C.; D’Auria, M. V.; Zampella, A.; Fiorucci, S.; Limongelli, V. Design, synthesis, and biological evaluation of potent dual agonists of nuclear and membrane bile acid receptors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (3), 937–954.
- (35) Kawka, A.; Hajdaś, G.; Kulaga, D.; Koenig, H.; Kowalczyk, I.; Pospieszny, T. Molecular structure, spectral and theoretical study of new type bile acid–sterol conjugates linked via 1,2,3-triazole ring. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1273*, No. 134313.
- (36) Mrówczyńska, L.; Bobrowska-Hägerstrand, M.; Söderström, T.; et al. Inhibition of MRP1-mediated efflux in human erythrocytes by mono-anionic bile salts. *Anticancer Res.* **2005**, *25* (5), 3173–3178.
- (37) PharmaExpert Predictive Services, 2013. <http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/>. (accessed on November 01, 2013).
- (38) Poroikov, V. V.; Filimonov, D. A.; Borodina, Y. V.; Lagunin, A. A.; Kos, A. Robustness of biological activity spectra predicting by computer program PASS for noncongeneric sets of chemical compounds. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40* (6), 1349–1355.
- (39) Poroikov, V.; Filimonov, D. How to acquire new biological activities in old compounds by computer prediction. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 819–824.
- (40) Poroikov, V. V.; Filimonov, D. A. *Predictive Toxicology*; Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2005; pp 459–478.
- (41) RCBS Protein DATA BANK, 2023. <https://www.rcsb.org>. access: May 30, 2023.
- (42) Jasiewicz, B.; Mrówczyńska, L.; Malczewska-Jaskóła, K. Synthesis and haemolytic activity of novel salts made of nicotine alkaloids and bile acids. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *24* (4), 1104–1107.
- (43) Kozanecka-Okupnik, W.; Jasiewicz, B.; Pospieszny, T.; Matuszak, M.; Mrówczyńska, L. Haemolytic activity of formyl- and acetyl-derivatives of bile acids and their gramine salts. *Steroids* **2017**, *126*, 50–56.
- (44) Mrówczyńska, L.; Bielawski, J. The mechanism of bile salts-induced hemolysis. *J. Cell. Mol. Biol. Lett.* **2001**, *6* (4), 881–895.
- (45) Mrówczyńska, L.; Bobrowska-Hägerstrand, M.; Wróbel, A.; Söderström, T.; Hägerstrand, H. Inhibition of MRP1-mediated efflux in human erythrocytes by mono-anionic bile salts. *Anticancer Res.* **2005**, *25* (5), 3173–3178.
- (46) Berdzik, N.; Koenig, H.; Mrówczyńska, L.; Nowak, D.; Jasiewicz, B.; Pospieszny, T. Synthesis and Hemolytic Activity of Bile Acid-Indole Bioconjugates Linked by Triazole. *J. Org. Chem.* **2023**, *88* (24), 16719–16734.
- (47) Nadaraia, N. S.; Amiranashvili, L. S.; Merlani, M.; Kakhbrishvili, M. L.; Barbakadze, N. N.; Geronikaki, A.; Petrou, A.; Poroikov, V.; Ciric, A.; Glamoclija, J.; Sokovic, M. Novel antimicrobial agents’ discovery among the steroid derivatives. *Steroids* **2019**, *144*, 52–65.
- (48) Silver, L. L. Appropriate Targets for Antibacterial Drugs. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2016**, *6* (12), No. a030239.
- (49) Ansari, A.; Ali, A.; Asif, M.; Rauf, M. A.; Owais, M.; Shamsuzzaman. Facile one-pot multicomponent synthesis and molecular docking studies of steroidal oxazole/thiazole derivatives with effective antimicrobial, antibiofilm and hemolytic properties. *Steroids* **2018**, *134*, 22–36.
- (50) RCBS Protein DATA BANK, 2024. <https://www.rcsb.org/3d-view/3U2D/1>. access: March 16, 2024.
- (51) RCBS Protein DATA BANK, 2024. <https://www.rcsb.org/structure/3vmt>. access: March 16, 2024.



CAS BIOFINDER DISCOVERY PLATFORM™

STOP DIGGING THROUGH DATA —START MAKING DISCOVERIES

CAS BioFinder helps you find the
right biological insights in seconds

Start your search



CHANGING THE GAME: INNOVATIVE APPLICATIONS OF STEROID CONJUGATES

Grzegorz Hajdaś, Hanna Koenig, Tomasz Pospieszny

Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University,
Poznań

e-mail: grzhaj@amu.edu.pl

Abstract: Steroid conjugates have emerged as a versatile group of compounds with applications in medicine, biotechnology, and materials science. They are formed by linking steroids with other molecules, offering new avenues for drug development. Steroids play crucial roles in many organisms, but factors like poor absorption and side effects limit their traditional use. Conjugating steroids with other molecules aims to overcome these challenges and enhance their effectiveness. Steroid conjugates come in various forms and offer advantages such as improved stability and targeting. They find applications in antifungal, antibacterial, and anticancer drugs and eco-friendly insecticides. Steroid conjugates represent a promising class of compounds with diverse applications in healthcare and agriculture. Their ability to address multiple challenges makes them valuable tools for improving human health and environmental sustainability.

Keywords: Steroid conjugate, Bioconjugates, Therapeutic applications

1. Introduction

Steroid conjugates represent an interesting class of compounds that has garnered significant attention in recent years owing to their diverse applications in medicine, biotechnology, and materials science [1-4]. These compounds, resulting from the covalent linkage of steroids with other chemical moieties, present a promising direction for the development of novel therapeutic agents, diagnostic tools, and functional materials. The synthesis and utilization of steroid conjugates have opened up new frontiers in scientific research, revolutionizing our understanding of steroid biology.

Steroids are a group of chemical compounds with incredibly diverse biological properties [5]. They play a crucial role in regulating physiological and pathological processes in many organisms. Their unique chemical structure, including characteristic steroid rings (Fig. 1), provides them the ability to interact with various receptors, resulting in a wide spectrum of biological activity [6]. Steroids are also known for their strong therapeutic

properties, such as anti-inflammatory, immunosuppressive, and hormonal activity, making them attractive candidates for further investigation [7-9].

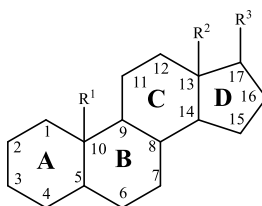


Fig. 1. Scheme of the steroid skeleton and atom numbering

Despite their potent therapeutic effects, traditional steroid usage is often limited by restricted bioavailability, off-target effects, and dose-related toxicity. For this reason, there's a growing interest in conjugating steroids with other molecules, aiming to improve their effectiveness while mitigating adverse reactions.

2. Steroid conjugates

Steroid conjugates are chemical entities in which a steroid molecule is bonded to another molecule. The steroid component displays notable diversity, including sterols, bile acids, and other steroid derivatives (Fig. 2). Steroids demonstrate versatile conjugation possibilities with various molecules. For instance, they can form ester bonds with fatty acids, serving as prodrugs metabolized into active steroid forms [10-11]. Alternatively, steroids can create peptide or amide bonds with peptides or proteins, potentially applied in cancer therapy as antibody-drug conjugates or in receptor interaction studies [12-13]. Coupling steroids with polymers such as polyethylene glycol yields polymeric steroid conjugates, prolonging circulation time and reducing immunogenicity, thus benefiting therapy and diagnostics [14-15]. Furthermore, steroids can be linked to active pharmaceutical compounds like enzyme inhibitors or receptor ligands, enhancing their bioavailability, selectivity, or stability [16]. These varied examples underscore the extensive opportunities for steroid conjugation, tailored to meet specific research objectives.

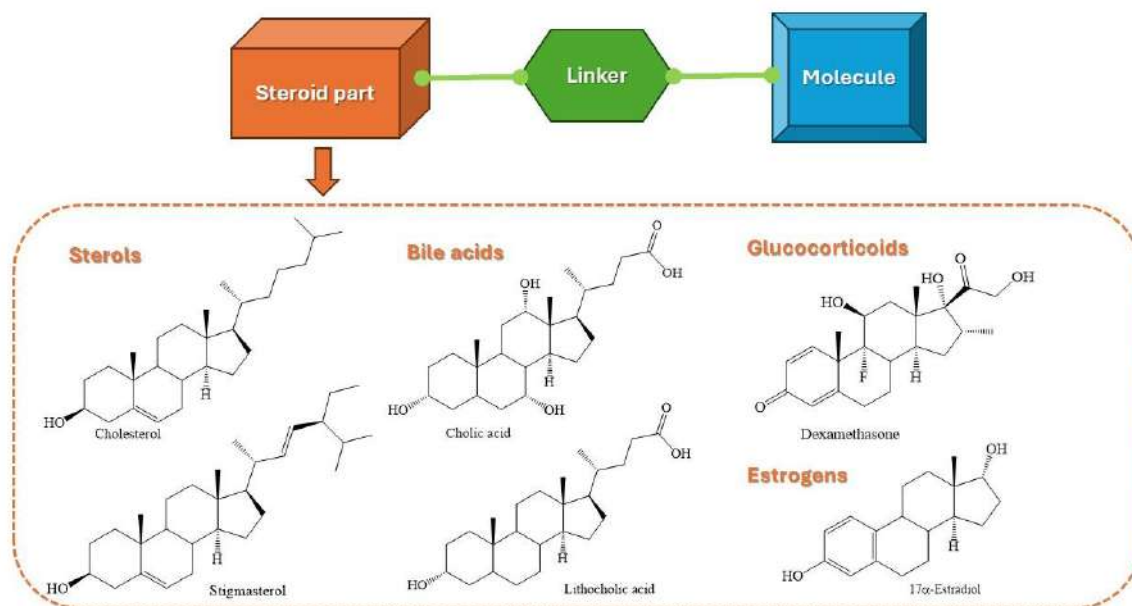


Fig. 2. Scheme of the structure of steroid conjugates with details of the steroid part

In contrast to synthetic conjugates, which are diverse, natural steroid conjugates occurring in living organisms are relatively limited, primarily consisting of two types: those conjugated with sulfuric acid (sulfates) or with glucuronic acid (glucuronides). While previously considered primarily as excretion products, recent investigations have unveiled their inherent biological activities, distinct from free hormones and their metabolites. Notably, steroid sulfates exhibit significant biological effects, while glucuronides primarily function in regulating the levels of biologically active steroids [17-18].

Squalamine originates from tissues of the dogfish shark, *Squalus acanthias*, marking the first discovery of a sterol-spermidine conjugate in this species [19]. The structure of this molecule is shown in Figure 3. This unique natural compound has garnered significant interest due to its potent antimicrobial properties against various microorganisms [20]. Squalamine shows promise in treating serious conditions such as lung, ovarian, and brain cancers, age-related macular degeneration, and managing body weight in humans [21]. Efforts to obtain large quantities of squalamine from dogfish sharks led to the identification, isolation, and characterization of a novel family of aminosterols. However, the limited availability of squalamine for mechanistic studies, along with the demand for analogs, prompted multiple research groups to undertake its synthesis and its derivatives.

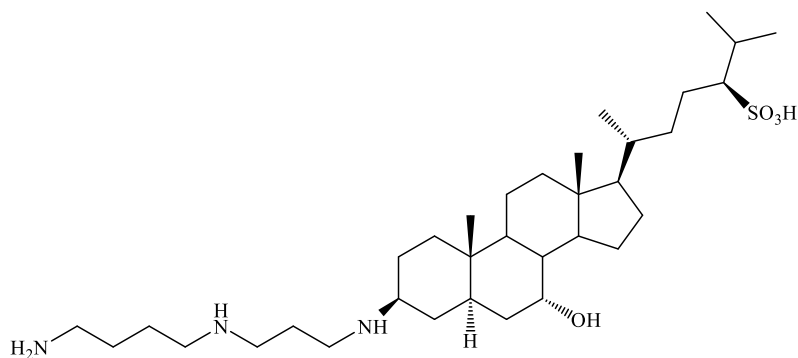


Fig. 3. Chemical structure of the Squalamine

Structural variations in the analogs resulted in alterations in activity spectra against various bacteria and yeasts, yielding several key findings. The characteristic activity requires three essential elements: a long and rigid hydrophobic unit, a flexible hydrophilic chain linked to the hydrophobic unit, and a pendant polar head group. The specific structure of the polyamine component appears to be less critical. Sulfate groups can be substituted with carboxylate or hydroxyl groups or eliminated. The structure of the rigid hydrophobic unit, i.e., the steroid, is also amenable to variation.

The foregoing example illustrates a prevalent trend within the novel drug research approaches – drawing inspiration from natural products and improving it. Upon the discovery of compounds exhibiting intriguing properties, extensive synthesis of analogs ensues, aiming to mimic the structure-activity relationship. Conjugates represent a unique case wherein both the steroid component and the attached molecule can be modified. This allows to design of a molecule with selected properties by controlling the structures of the selected compounds used.

The synthesis of steroid conjugates involves combining steroids with other biologically active moieties through various methods. The literature documents numerous methods for synthesizing steroid conjugates, with selected linkers depicted in Fig. 4. The majority of these methods rely on covalent bonds, renowned for their robustness and stability. Additionally, these methods can be further categorized based on the direct connection approach or by modifying existing functional groups. Modifications primarily target functional groups such as hydroxyl groups, carboxyl groups, and multiple bonds. Typically, a steroid molecule contains various types of functional groups, enabling selective modification owing to their differing reactivity. These differences arise from variations in steric availability and stereochemistry. Such findings underscore the suitability of steroids for their chemical modification, which also explains their popularity within drug research as a good building block.

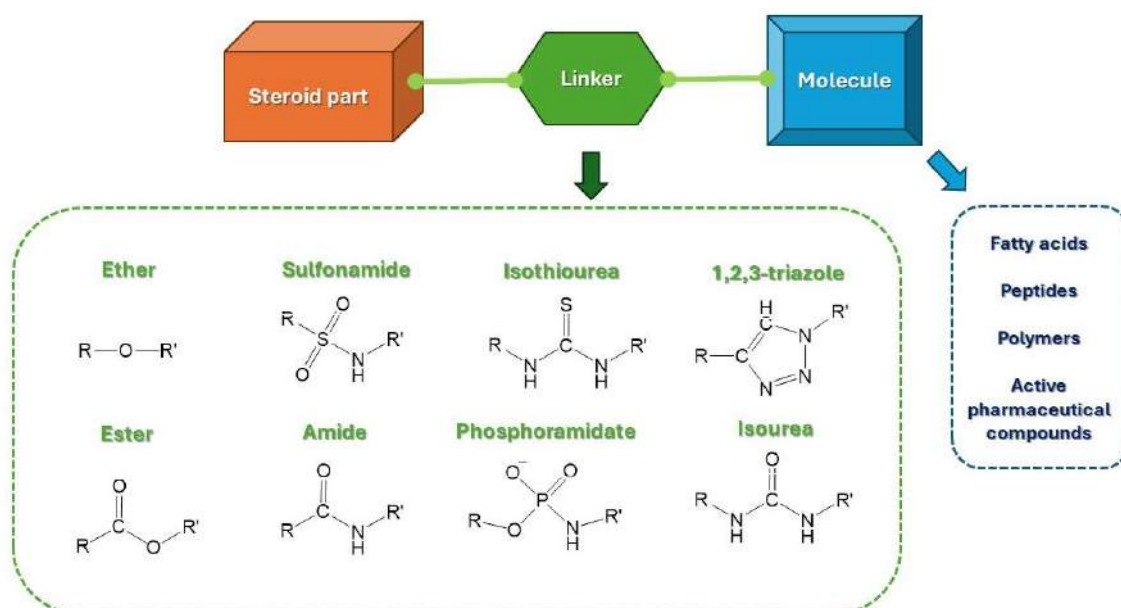


Fig. 4. Scheme of the structure of steroid conjugates with details of the linkers and attached molecules

One of the methods of conjugation involves the direct formation of a covalent bond between the steroid molecule and the desired moiety. This can be achieved through chemical reactions that allow for the attachment of the two components, resulting in a stable conjugate. In some cases, steroid conjugates are synthesized by forming labile ester bonds between the steroid molecule and the conjugated moiety. This reversible bond can be used to link the two components and release the active moiety at the target site.

Steroid conjugates can also be synthesized by reacting specific functional groups on the steroid molecule with complementary functional groups on the other moiety. This selective reaction allows for the precise attachment of the two components, leading to the formation of the conjugate. This method emphasizes not the utilization of pre-existing functional groups into linkers but their modification into the desired chemical moieties. An excellent illustration is the synthesis of steroid conjugates linked by a 1,2,3-triazole ring. This linker is formed through the Huisgen reaction between the terminal triple bond and the azide group. Neither of these chemical groups naturally occurs in steroid molecules, necessitating their chemical modification. The 1,2,3-triazole serves as an invaluable linker owing to its exceptional stability, resisting oxidation and hydrolysis processes. Moreover, this linker is absent in nature, making it undetectable by bacteria, viruses, or fungi. Consequently, this particular connection has garnered significant popularity in research on novel drug development and the modification of existing drugs, especially in response to the

emergence of drug resistance among microorganisms. Figure 5 below shows a steroid conjugate with a 1,2,3-triazole linker. This compound is used as an anti-leishmal drug [22].

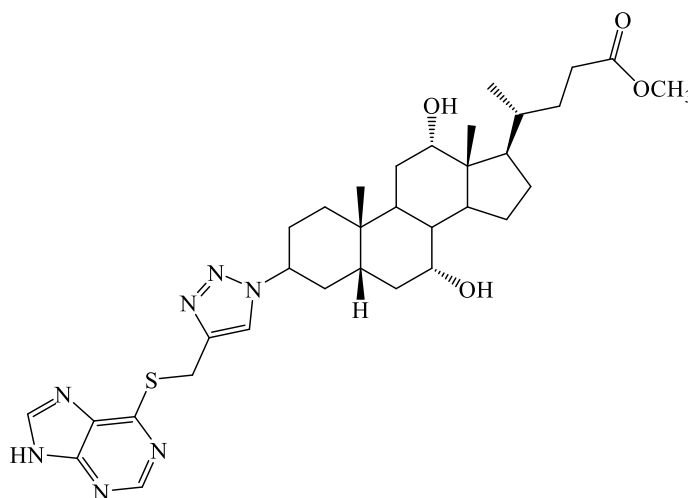


Fig. 5. Steroid conjugate with 1,2,3-triazole linker used as an anti-leishmanial drug

The method of connecting steroid conjugates can be divided into two groups: cross-linking or zero-length linking (direct). Both methods aim to establish covalent bonds, although they differ in the type of linker and modifications made. Cross-linking agents, such as *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, can be used to connect functional groups on the steroid and the other moiety [23]. These agents facilitate the formation of covalent bonds between the two components, leading to the synthesis of the conjugate. Another example is the previously mentioned synthesis of 1,2,3-triazoles – the Huisgen reaction.

Zero-length cross-linking agents are used to form bonds between two active moieties without introducing additional atoms. This method allows for the direct linkage of functional groups on the steroid and the conjugated moiety, resulting in a stable conjugate. An example of such a connection is an ester linker. It is a relatively simple linker to obtain due to the presence of hydroxyl or carboxyl groups in the molecules of selected steroids. The ester bond, while versatile, lacks the stability of other bonds, primarily serving as a linker to facilitate detachment of the molecule bound to the steroid at the intended site of action.

Steroidal bioconjugates offer several advantages in terms of lipophilicity, stability, and target specificity, rendering them promising candidates in drug discovery. They exhibit heightened lipophilicity, facilitating their efficient penetration through biological membranes. This characteristic enhances drug delivery by enabling molecules to reach their intended targets more effectively. Enhanced stability contributes to prolonged activity within the body, thereby ensuring a sustained therapeutic effect. This feature is particularly advantageous for drugs requiring prolonged action. The tailored design allows steroidal

bioconjugates to target specific receptors or sites within the body, augmenting their affinity for particular tissues or cells. This approach mitigates off-target effects and enhances the overall therapeutic efficacy of the drug.

Overall, the use of steroidal bioconjugates combines the advantageous properties of steroids with the specific benefits of conjugation, resulting in molecules characterized by enhanced lipophilicity, stability, and target specificity. This synergy holds promise for advancing drug discovery and development efforts.

3. Applications

Steroid conjugates represent an emerging area of interest in mostly pharmaceutical research, combining the distinct properties of steroids with biologically active moieties. In this subsection, the diverse applications of steroid conjugates are being explored. Through an in-depth examination of their enhanced properties, they have expanded therapeutic applications. We seek to highlight the considerable influence of steroid conjugates in shaping innovative and effective therapeutic interventions.

The prevalence of life-threatening fungal infections has surged in recent decades, driven by factors such as widespread immunosuppressive drug use, prolonged broad-spectrum antibiotic administration, and the increased use of indwelling catheters, particularly among cancer and AIDS patients. However, existing antifungal medications, like fluconazole, face challenges due to either high toxicity or the emergence of resistant strains (Fig. 6) [24]. Consequently, efforts are underway to enhance the efficacy of fluconazole through chemical modifications.

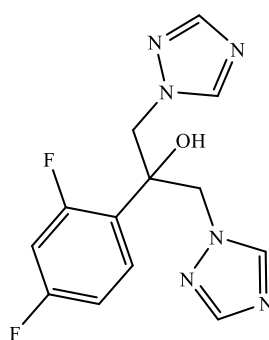


Fig. 6. Structure of Fluconazole

Bile acid structures have emerged as crucial elements in pharmacology and biomimetics, with bile acid-derived compounds exhibiting amphiphilic properties akin to established antimicrobial agents. These compounds play a pivotal role in ion transport, contributing to their antimicrobial activity.

Bioconjugation offers a promising avenue for creating novel complexes with synergistic properties. Specifically, bioconjugates resembling fluconazole and amphotericin-B have been designed using 1,2,3-triazole as a stable linking unit [25]. This approach capitalizes on the stability and hydrogen bonding capabilities of 1,2,3-triazole to enhance binding to biomolecular targets and improve solubility. Their synthesis typically involves the 1,3-dipolar cycloaddition of terminal acetylene and organic azides, proving to be an effective method for generating diverse bioactive compounds.

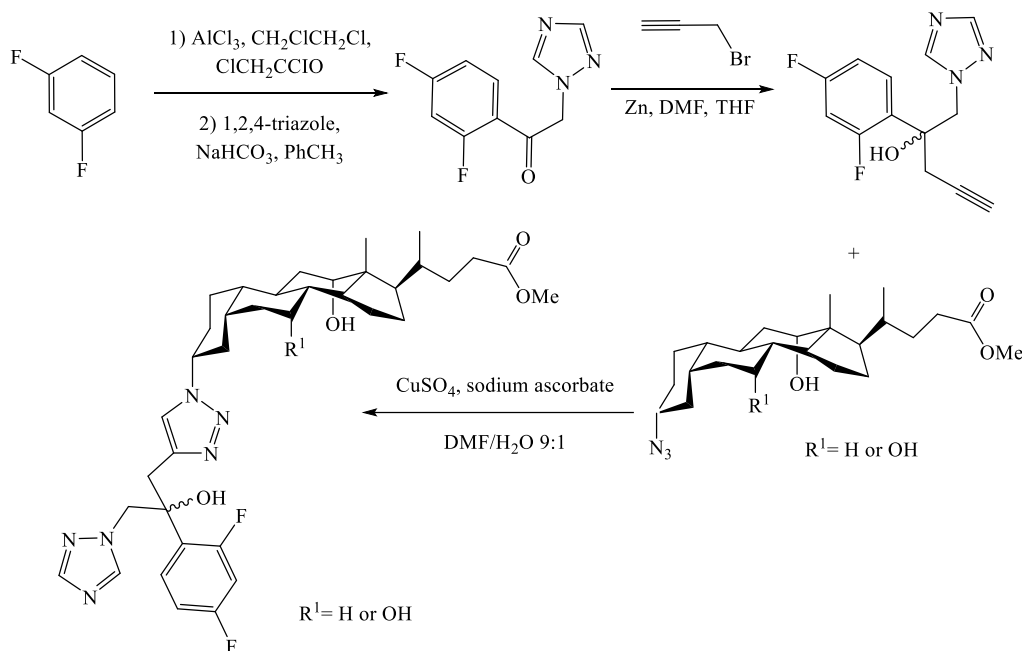


Fig. 7. Scheme of the synthesis of Fluconazole conjugates with bile acids

The novel molecules demonstrated in Figure 7 exhibit excellent antifungal efficacy against *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, and *Candida parapsilosis*. It is hypothesized that in this biological activity, the bile acid component serves as a drug carrier, while the fluconazole component acts as an inhibitor of 14α -demethylase enzymes in fungal cells.

Researchers from Brigham Young University have developed a group of cationic steroid antibiotics as steroid polyamine conjugates, aiming to replicate the antibacterial effects of polymyxin B (PMB) shown in Figure 8 [26-28]. These antibiotics exhibit antibacterial activity comparable to or surpassing that of PMB against Gram-negative bacteria.

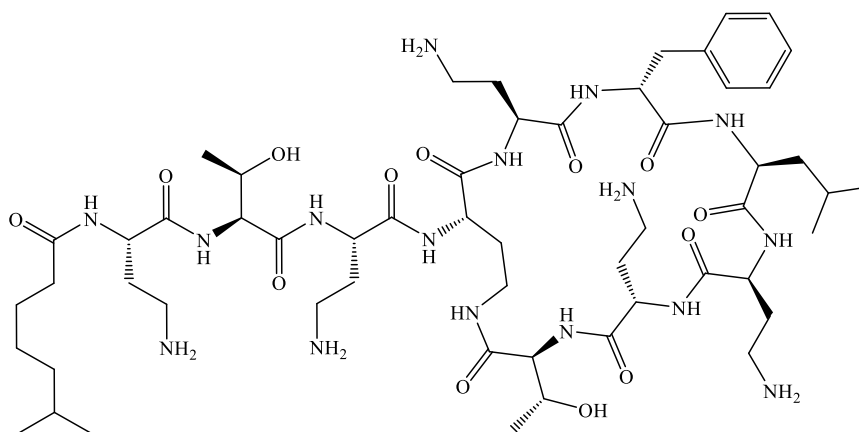


Fig. 8. Structure of Polymyxin B (PMB)

Additionally, they have established a method for directly observing cell selectivity using antibiotics tagged with fluorophores, employing intact prokaryotic and eukaryotic cells to assess whether the affinity of steroid antibiotics for lipid A corresponds with cell selectivity. When bacteria become resistant to antibiotics that target their cell membranes, like PMB, they change the structure of their outer membranes to prevent the antibiotics from getting in. PMB works by attaching to a part of the bacterial membrane called lipopolysaccharide (LPS). Bacteria become resistant to PMB by changing the structure of their LPS. To tackle this problem, the researchers designed simpler molecules that can bind to LPS and change the permeability of Gram-negative bacteria membranes. This approach is promising because it's difficult to make PMB and purify it for use in medicine. Simpler molecules that work just as well could help fight antibiotic-resistant bacteria. To confront this issue, the researchers devised simplified molecules with the ability to bind to lipopolysaccharides (LPS) and alter the permeability of Gram-negative bacterial membranes [29]. This strategy is particularly promising given the challenges associated with synthesizing and purifying polymyxin B (PMB) for medical use.

Steroid-based analogs of polymyxin B (PMB) were initially developed using bile acids as a model. Bile acids, known for their hydroxyl group arrangement, have garnered attention for potential applications such as receptor design and amphiphile synthesis [30]. Additionally, they are recognized by hepatic cells and undergo recycling during enterohepatic circulation. Mimicking PMB, bile acid derivatives were synthesized from cholic acid, where amino groups were strategically positioned on one face of the steroid moiety *via* ether linkage with stereochemically oriented oxygen atoms [31]. This arrangement conferred facial amphiphilicity akin to cationic peptide antibiotics. Notably, a

compound shown in Figure 9 exhibited potent bactericidal activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria.

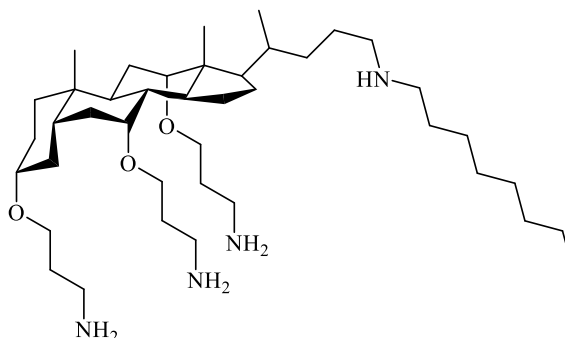


Fig. 9. Steroid conjugate mimicking PMB

Literature has highlighted steroidal glycosides as promising candidates for antineoplastic therapy [32]. These compounds consist of a sugar (glycone) and a steroid (aglycone) part and are commonly used in treating congestive heart failure. Research on the cytotoxic effects of steroidal glycosides has spurred efforts to develop them further as potent and safer anticancer agents.

Yang et al. investigated steroidal saponins found in the roots of *Polygonatum zanlanscianense* and identified their structures [33]. These naturally occurring saponins demonstrated significant activity against HeLa cancer cells. Additionally, saponins from the *Myriophyton extensum* plant were isolated and analyzed. One of these saponins, Extensumside A shown in Figure 10, containing an unsaturated lactone ring at the 17 β -position, displayed promising antitumor activity across various cancer cell lines [34]. Notably, Extensumside A showed maximum activity against A549 cell lines.

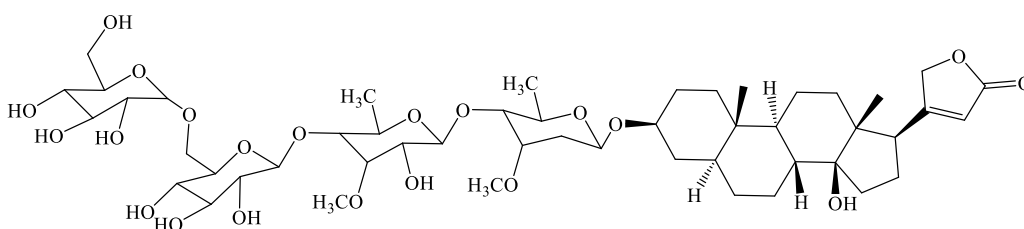


Fig. 10. Structure of Extensumside A isolated from *Myriophyton extensum*.

Furthermore, recent research has focused on synthesizing monosaccharide-D-secosterone bioconjugates through copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction (Huisgen reaction) [35]. Among these conjugates, glucoside-conjugated steroids exhibited potent antiproliferative activity against the HeLa cell line, nearly half that of the standard cisplatin. The structure of the most active of these conjugates is shown in Figure 11. The presence of an acetylated carbohydrate unit and oxime functionality on the secosteroid were

identified as crucial for its anticancer properties, as their removal significantly reduced the bioconjugate's efficacy.

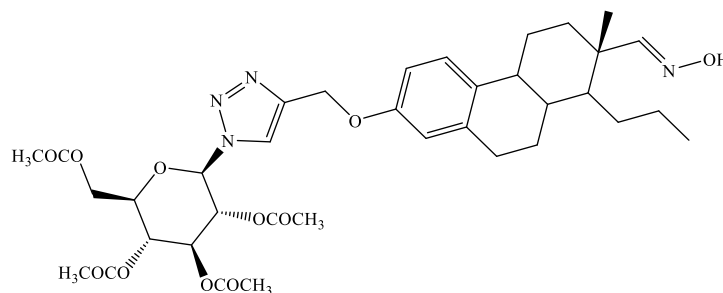


Fig. 11. Monosaccharide-D-secosterone conjugate with the 1,2,3-triazole linker

Steroids are pivotal in biological systems, with natural steroid growth hormones like ecdysterone, 20-hydroxyecdysone and turkesterone playing crucial roles in insect development. Analogues of these hormones hold the potential for eco-friendly insecticide development [36]. Juvenile hormones also regulate insect physiology, and combining juvenile analogs (juvenoids) with steroids enhances target specificity, forming pro-juvenoids or juvenogens. Recent studies explore steroid-juvenoid conjugates as promising agrochemicals [37-38]. Researchers, such as Jurček et al., have synthesized various conjugates, including those with bile acids, to influence larval hatching in insects [39]. The conjugate shown in Figure 12, featuring a Z configuration of the juvenoid part, demonstrated significant hatchability in blowfly species.

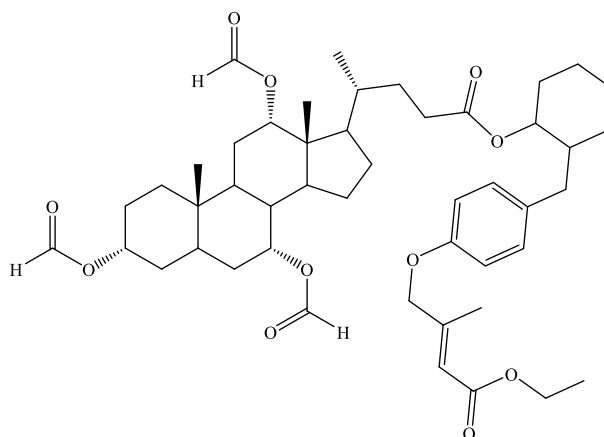


Fig. 12. Steroid-juvenoid conjugate

Additionally, novel pro-juvenoids composed of modified carbamate derivatives and bile acids or phytosterols were evaluated for insecticidal activity in red firebugs [40]. Monomeric cholate shown in Figure 13 displayed high activity in drinking assays, while other conjugates such as *cis*-juvenoid stigmasterol showed promising results in topical screening tests.

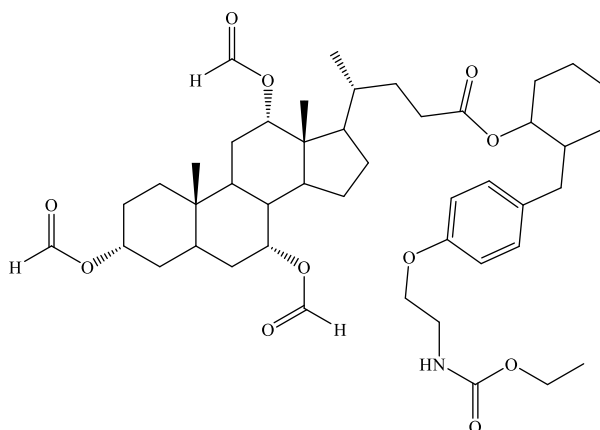


Fig. 13. Modified carbamate derivatives and cholic acid conjugate

Generally, a steroidal moiety is often used to deliver the active moiety at the site of action, however, non-steroidal units are sometimes also employed as carriers to deliver the steroidal moiety at the targeted site. An intriguing strategy involves incorporating dual and multitargeted pharmacophores for synthesizing several hybrids based on diosgenin [41]. The incorporation of thio- and selenoureas at the C-3 position of diosgenin was carried out to overcome the limitations of combination therapy. These hybrids exhibited both antiproliferative and antioxidant properties. The compound shown in Figure 14, which includes selenourea, demonstrated significant inhibitory activity against various cancer cell lines, including HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, and HepG2. This activity was notably higher compared to the parent compound, diosgenin. Additionally, it exhibits potent antioxidant properties, acting as a scavenger against free radicals. Moreover, the molecule displayed activity resembling that of glutathione peroxidase and demonstrated selectivity towards HeLa cells.

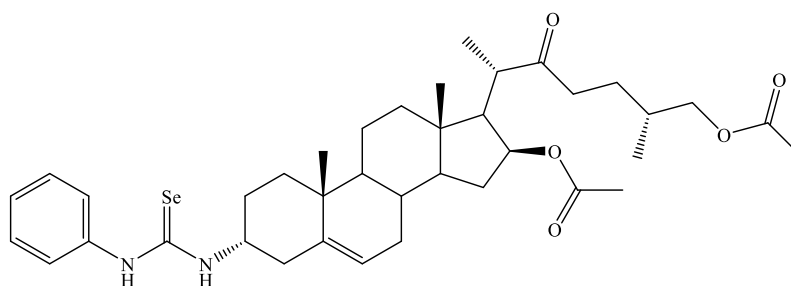


Fig. 14. Selenourea derivative steroid conjugate

4. Summary

Steroid conjugates are increasingly recognized in the fields of medicine, biotechnology, and materials science due to their versatile applications. These compounds, formed by linking steroids with other molecules, offer promising avenues for therapeutic agents,

diagnostics, and functional materials, revolutionizing our understanding of steroid biology [42-44]. Steroids play crucial roles in biological systems, possessing diverse properties like anti-inflammatory and immunosuppressive activity. However, their traditional use is limited by factors like bioavailability and toxicity. Conjugating steroids with other molecules aims to enhance their effectiveness while minimizing adverse effects.

The synthesis of steroid conjugates involves combining steroids with other moieties through various methods, including direct covalent bonds or modification of functional groups. These methods enable precise modification of steroids, enhancing their properties for specific applications. Steroid conjugates offer advantages like enhanced lipophilicity, stability, and target specificity, making them promising candidates in drug discovery.

Steroid conjugates find applications in diverse fields like antifungal medications, antibacterial agents, and anticancer therapy. For instance, they have been explored as potential treatments for fungal infections, with bile acid-derived compounds showing promising antimicrobial activity. Additionally, steroid-based antibiotics exhibit potent antibacterial effects against Gram-negative bacteria, offering alternatives to traditional antibiotics. In cancer therapy, steroidal glycosides and bioconjugates have demonstrated significant anticancer activity, showing potential as safer and more effective alternatives to conventional treatments. Furthermore, steroid-juvenoid conjugates have emerged as promising agrochemicals for insecticide development, offering eco-friendly solutions for pest control.

Overall, steroid conjugates represent a rapidly growing area of research with diverse applications in medicine, agriculture, and biotechnology. Their unique properties and versatile synthesis methods make them valuable tools for addressing various health and environmental challenges.

Literature

- [1] Gomes R., Meredith W., Snape C., Sephton M. Conjugated steroids: analytical approaches and applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 453-458.
- [2] Bansal R., Suryan A. A Comprehensive Review on Steroidal Bioconjugates as Promising Leads in Drug Discovery. *ACS Bio & Med Chem. Au.* 2022, 2, 340-369.
- [3] Salunke D., Hazra B., Pore V. Steroidal conjugates and their pharmacological applications. *Curr. Med. Chem.* 2006, 13(7), 813-847.
- [4] Váradi M., Skoda-Földes R. Synthetic methods towards steroid-ferrocene conjugates. *Arkivoc* 2022, 197-239.

- [5] Cole T., Short K., Hooper S. The science of steroids. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2019, 24 3, 170-175.
- [6] Kirk D., Marples B. The structure and nomenclature of steroids. *Chem. Inform.* 1995, 27, 1-24.
- [7] Morrow A. Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids-Introduction to the special issue. *Pharmacol. Ther.* 2007, 116(1), 1–6.
- [8] Salvador J., Carvalho J., Neves M., Silvestre S., Leitão A., Silva M., Melo M. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Nat. Prod. Rep.* 2013, 30(2), 324–74.
- [9] Skidmore I. Anti-inflammatory steroids - the pharmacological and biochemical basis of clinical activity. *Mol. Aspects. Med.* 1981 4, 303–327.
- [10] Lesma G., Luraghi A., Bavaro T., Bortolozzi R., Rainoldi G., Roda G., Viola G., Ubiali D., Silvani A. Phytosterol and γ -Oryzanol Conjugates: Synthesis and Evaluation of their Antioxidant, Antiproliferative, and Anticholesterol Activities. *J. Nat. Prod.* 2018, 81(10), 2212–2221.
- [11] Malyarenko T., Kicha A., Malyarenko O., Zakharenko V., Kotlyarov I., Kalinovsky A., Popov R., Svetashev V., Ivanchina N. New Conjugates of Polyhydroxysteroids with Long-Chain Fatty Acids from the Deep-Water Far Eastern Starfish *Ceramaster patagonicus* and Their Anticancer Activity. *Mar. Drugs.* 2020, 18.
- [12] Sangar M., Girard E., Hopping G., Yin C., Pakiam F., Brusniak M., Nguyen E., Ruff R., Gewe M., Byrnes-Blake K., Nairn N., Miller D., Mehlin C., Strand A., Mhyre A., Correnti C., Strong R., Simon J., Olson J. A potent peptide-steroid conjugate accumulates in cartilage and reverses arthritis without evidence of systemic corticosteroid exposure. *Sci. Transl. Med.* 2020, 12.
- [13] Neugebauer W., Côté J., Fortier A., Bkaily G., Avedanian L., Jaques D., Gobeil F. Steroid-Peptide Conjugates. *APS.* 2006, 120–121.
- [14] Funk D., Schrenk H. H., Frei E. Development of a novel polyethylene glycol-corticosteroid-conjugate with an acid-cleavable linker. *J. Drug Target.* 2011 19(6), 434–445.
- [15] Bayard F.J.C., Thielemans W., Pritchard D.I., Paine S.W., Young S.S., Bäckman P., Ewing P., Bosquillon C. Polyethylene glycol-drug ester conjugates for prolonged retention of small inhaled drugs in the lung. *J. Control. Release.* 2013, 171(2), 234–240.
- [16] Dao K.-L., Hanson R. N. Targeting the Estrogen Receptor using Steroid–Therapeutic Drug Conjugates (Hybrids). *Bioconjugate Chem.* 2012, 23(11), 2139–2158.

- [17] Vítků J., Hampl, R. Steroid Conjugates and Their Physiological Role. *Physiol. Res.* 2023, 72, 317–322.
- [18] Kalogera E., Pistos C., Provatopoulou X., Athanaselis S., Spiliopoulou C., Gounaris A. Androgen glucuronides analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Could it raise new perspectives in the diagnostic field of hormone-dependent malignancies? *J. Chromatogr.* 2013, 940, 24–34.
- [19] Moore K., Wehrli S., Roder H., Rogers M., Forrest J., McCrimmon D., Zasloff M. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, 1354–1358.
- [20] Kikuchi K., Bernard E., Sadownik A., Regen S., Armstrong D. Antimicrobial activities of squalamine mimics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41, 1433–1438.
- [21] Williams J., Weitman S., Gonzalez C., Jundt C., Marty J., Stringer S., Holroyd K., Mclane M., Chen Q., Zasloff M., Hoff D. Squalamine treatment of human tumors in nu/nu mice enhances platinum-based chemotherapies. *Clin. Cancer. Res.* 2001, 73, 724–33.
- [22] Corrales R.C.N.R., de Souza N.B., Pinheiro L.S., Abramo C., Coimbra E.S., Da Silva A.D. Thiopurine derivatives containing triazole and steroid: Synthesis, antimalarial and antileishmanial activities. *Biomed. Pharmacother.* 2011, 65(3), 198–203.
- [23] Singla P., Salunke D. B. Recent advances in steroid amino acid conjugates: Old scaffolds with new dimensions. *Eur. J. Med. Chem.* 2020, 187, 11190.
- [24] Grant S.M., Clissold S.P. Fluconazole. *Drugs.* 1990, 39, 877–916.
- [25] Pore V.S., Aher N.G., Kumar M., Shukla P. K. Design and synthesis of fluconazole/bile acid conjugate using click reaction, *Tetrahedron.* 2006, 62(48) 11178–11186.
- [26] Savage, P. B., Li, C. Cholic acid derivatives: novel antimicrobials. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2000, 9(2), 263–272.
- [27] Savage P. B. Design, Synthesis and Characterization of Cationic Peptide and Steroid Antibiotics. *Eur. J. Org. Chem.* 2002, 5, 759–768.
- [28] Savage P. B., Li C., Taotafa U., Ding B., Guan Q. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 217(1), 1–7.
- [29] Vaara M., Vaara T. Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. *Nature.* 1983, 303, 526–528.
- [30] Davis A. P., Perry J. J., Williams R. P. Anion Recognition by Tripodal Receptors Derived from Cholic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119(7), 1793–1794.

- [31] Schmidt E. J., Boswell S. R., Walsh J. P., Schellenberg M. M., Winter T. W., Li C., Allman G. W., Savage P. B. Activities of cholic acid-derived antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 47, 671–674.
- [32] Fortin S., Brasseur K., Morin N., Asselin É., Bérubé G. New platinum(II) complexes conjugated at position 7 α of 17 β -acetyl-testosterone as new combi-molecules against prostate cancer: Design, synthesis, structure–activity relationships and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 68, 433–443.
- [33] Jin J. M., Zhang Y. J., Li H. Z., Yang C. R. Cytotoxic steroidal saponins from *Polygonatum zanlanscianense*. *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 1992–1995.
- [34] Yang M. F., Li Y. Y., Gao X. P., Li B. G., Zhang G. L. Steroidal saponins from *Myriopterion extensum* and their cytotoxic activity. *Planta. Med.* 2004, 70, 556–560.
- [35] Bodnár B., Mernyák E., Szabó J., Wölfling J., Schneider G., Zupkó I., Kupihár Z., Kovács L. Synthesis and in vitro investigation of potential antiproliferative monosaccharide-D-secoestrone bioconjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, 27(9), 1938–1942.
- [36] Henrick C. A. Juvenoids in agrochemicals from natural products. Godfrey, C. R. A., Ed., Dekker: New York, 1995, 147–213.
- [37] Jurček O., Wimmer Z., Bennettová B., Moravcová J., Drasar P., Saman D. Novel juvenogens (insect hormonogenic agents): preparation and biological tests on *Neobellieria bullata*. *J. Agric. Food. Chem.* 2009, 57(22), 10852–10858.
- [38] Bjelaković M. S., Kop T.J., Vlajić M., Đorđević J., Milić D. R. Design, synthesis, and characterization of fullerene-peptide-steroid covalent hybrids. *Tetrahedron.* 2014, 70, 8564–8570.
- [39] Jurček O., Wimmer Z., Svobodová H., Bennettová B., Kolehmainen E., Drášar P. Preparation and preliminary biological screening of cholic acid juvenoid conjugates. *Steroids.* 2009, 74, 779–785.
- [40] Svobodová H., Ryšavá H., Pavlík M., Šaman D., Drášar P., Wimmer Z. Steroid conjugates: Synthesis and preliminary biological testing of pro-juvenoids. *Bioorg. Med. Chem.* 2010 18, 8194–8203.
- [41] Romero-Hernandez L.L., Merino-Montiel P., Montiel-Smith S., Meza-Reyes S., Vega-Báez J. L., Abasolo I., Schwartz S. Jr., Lopez O., Fernandez-Bolanos J. G. Diosgenin-based thio(seleno)ureas and triazolylglycoconjugates as hybrid drugs. Antioxidant and antiproliferative profile. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 99, 67–81.

- [42] Hajdaś G., Kawka A., Koenig H., Kułaga D., Sosnowska K., Mrówczyńska L., Pospieszny T. Click chemistry as a method for the synthesis of steroid bioconjugates of bile acids derivatives and sterols. *Steroids*. 2023, 199, 109282.
- [43] Kawka A., Hajdaś G., Kułaga D., Koenig H., Kowalczyk I., Pospieszny T. Molecular structure, spectral and theoretical study of new type bile acid–sterol conjugates linked via 1,2,3-triazole ring. *J. Mol. Struct.* 2023, 1273, 134313.
- [44] Berdzik N., Koenig H., Mrówczyńska L., Nowak D., Jasiewicz B., Pospieszny T. Synthesis and Hemolytic Activity of Bile Acid-Indole Bioconjugates Linked by Triazole. *J. Org. Chem.* 2023, 88(24), 16719-16734.

Review

Recent Advances in Steroid Discovery: Structural Diversity and Bioactivity of Marine and Terrestrial Steroids

Grzegorz Hajdaś , Hanna Koenig and Tomasz Pospieszny *

Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 8 Street, 61-614 Poznań, Poland; grzhaj@amu.edu.pl (G.H.); hanna.koenig@amu.edu.pl (H.K.)

* Correspondence: tomasz.pospieszny@amu.edu.pl

Abstract: Steroids have been pivotal in medicine and biology, with research into their therapeutic potential accelerating over the past few decades. This review examines recent steroid discoveries from marine and terrestrial sources, highlighting both novel compounds and those with newly identified biological activities. The structural diversity of these steroids contributes to their wide range of biological activity, including anticancer, antimicrobial, antidiabetic, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. Particular emphasis is placed on steroids derived from marine invertebrates, fungi, and medicinal plants, which have shown promising therapeutic potential. Advances in analytical techniques such as NMR spectroscopy and mass spectrometry have facilitated the identification of these compounds. These findings emphasize the growing importance of steroids in addressing pressing global health issues, particularly antibiotic resistance and cancer, where new therapeutic strategies are urgently needed. Although many newly identified steroids exhibit potent bioactivity, challenges remain in translating these findings into clinical therapies. Ongoing exploration of natural sources, along with the application of modern synthetic and computational methods, will be crucial in unlocking the full therapeutic potential of steroid-based compounds.

Keywords: steroids; natural products; marine-derived steroids; steroid pharmacology; bioactive compounds; drug discovery; medicinal chemistry



Academic Editor: Giuseppe Gattuso

Received: 12 February 2025

Revised: 27 March 2025

Accepted: 28 March 2025

Published: 30 March 2025

Citation: Hajdaś, G.; Koenig, H.; Pospieszny, T. Recent Advances in Steroid Discovery: Structural Diversity and Bioactivity of Marine and Terrestrial Steroids. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 3203. <https://doi.org/10.3390/ijms26073203>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Steroids have played a pivotal role in medicine and biology since their discovery in the early 20th century [1,2]. Their significant impact on human physiology and disease treatment has driven advancements in endocrinology, oncology, and immunology [3,4]. Initial research focused on steroid hormones like cortisone and testosterone, which transformed into therapeutic approaches [5–9]. Especially over the past two decades, as the need for new bioactive compounds grew, steroid research has expanded significantly to cover a wide range of sources, including marine organisms as well as terrestrial organisms. New steroid structures with unique biological properties have been discovered, broadening our understanding of the therapeutic potential of this group of compounds [10–12].

Recently, attention has turned to novel steroids from marine and terrestrial sources, owing to their unique biological activities [13,14]. Marine ecosystems, particularly invertebrates such as echinoderms, tunicates, and sponges, have provided many new steroids. These steroids often possess distinct structural features, such as hydroxylated side chains and sulfate groups [15,16]. Simultaneously, medicinal plants and fungi have yielded steroidal alkaloids and saponins with significant therapeutic potential [17–22]. Over the

last 20 years, many studies have reported the antitumor, antimicrobial, antidiabetic, and anti-inflammatory effects of these newly discovered steroids.

This review examines some recent discoveries about steroids made in the last two decades, focusing mainly on compounds from both marine and terrestrial environments. It also explores discoveries regarding previously known steroids, emphasizing their structural diversity and properties that had not been investigated before. Emphasis is placed on their potential therapeutic uses.

2. Marine Organisms

2.1. Marine Invertebrates

Marine natural product research, especially involving invertebrates like echinoderms, has proven to be a rich source of lead compounds for drug discovery [23–26]. Echinoderms such as *Acanthaster planci* have adapted to challenging marine environments by producing a diverse range of bioactive secondary metabolites. Previous studies on *A. planci* have led to the isolation of novel steroidal structures with antimicrobial, anti-inflammatory, and cytotoxic properties [27–30].

Chemical studies on *Acanthaster planci*, commonly known as the crown of thorns starfish, led to the isolation of two new steroids: 5 α -cholesta-24-en-3 β ,20 β -diol-23-one (**1**) and 5 α -cholesta-9(11)-en-3 β ,20 β -diol (**2**) (Figure 1) [31]. Their structures were determined using spectroscopic techniques. Compound (**1**) exhibited notable antibacterial activity, with a zone of inhibition measuring 21.0 ± 0.06 mm against *Pseudomonas aeruginosa*, while compound (**2**) displayed moderate activity (13.0 ± 0.03 mm). Both compounds were also evaluated for their antitumor properties against human breast carcinoma cells (MCF-7), with LC₅₀ values of 49 ± 1.6 μ g/mL for compound (**1**) and 57.5 ± 1.5 μ g/mL for compound (**2**). These results are comparable to those of the commonly used chemotherapeutic drug cisplatin (LC₅₀ 46 ± 1.1 μ g/mL). Additionally, both steroids demonstrated anti-diabetic activity by inhibiting α -glucosidase, with IC₅₀ values of 58 ± 0.8 μ g/mL and 55 ± 0.5 μ g/mL, respectively [31].

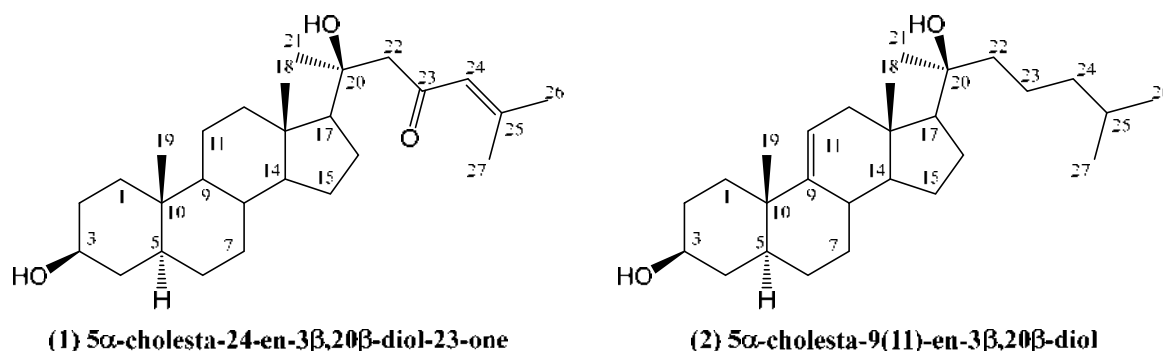
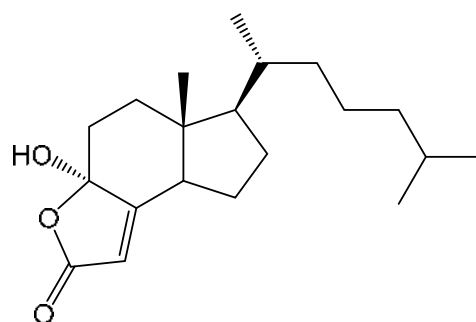


Figure 1. Two new steroids isolated from *Acanthaster planci*.

Recent studies have also demonstrated the presence of the cytotoxic C-20 steroid dendrodoristerol (**3**) (Figure 2) in the Vietnamese nudibranch *Dendrodoris fumata*, highlighting the structural diversity of marine-derived steroids [32]. The structure of dendrodoristerol was elucidated using a combination of advanced spectroscopic techniques, including 1D and 2D NMR, HR-QTOF MS, and circular dichroism (CD). *Nudibranch mollusks*, such as *D. fumata*, are renowned for their unique chemical defense mechanisms, often accumulating bioactive metabolites from their prey [33]. The chemical composition of these mollusks, typically dominated by sesquiterpenes like drimane derivatives, reflects their role in repelling predators. In this study, the focus was on the steroid dendrodoristerol and three

known compounds: 5 α ,6 α -epoxy-3 β ,7 α -dihydroxycholest-8(14)-ene, 3 β -hydroxycholesta-5,8-dien-7-one, and 5 α ,8 α -epidioxycholest-6-en-3 β -ol.



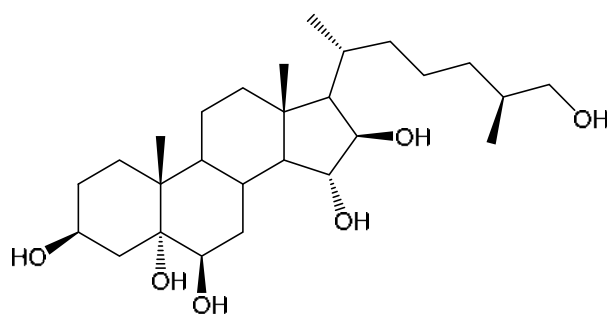
(3) Dendrodoristerol

Figure 2. Structure of dendrodoristerol.

Dendrodoristerol (**3**) is classified as a degraded sterol belonging to the incisterol class, which is characterized by significant structural modifications, including the loss of side-chain carbons and rearrangements in the steroidal nucleus. These modifications are hypothesized to occur through enzymatic oxidation and hydrolysis processes facilitated by marine microbial communities or the host organism itself. Such degradation pathways are common in marine environments, where sterols are subjected to oxidative stress, enzymatic activity, and interactions with symbiotic microorganisms. For instance, similar degradation patterns have been observed in sterols isolated from marine sponges (*Dictyonella incisa*), sea slugs (*Syphonota geographica*), and marine-derived fungi (*Phellinus igniarius*). These processes often result in the formation of highly oxidized or truncated sterols, which exhibit unique biological activities, including cytotoxicity and antimicrobial effects [33–36]. These sterols have been shown to exhibit various biological activities, including cytotoxic, antimicrobial, and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory effects. Although *D. fumata* is known to feed on sponges, further studies are needed to determine if dendrodoristerol is synthesized by the mollusk itself or acquired through its diet [32].

In cytotoxic assays, compound (**3**) demonstrated significant activity against six human cancer cell lines (HL-60, KB, LU-1, MCF-7, LNCaP, and HepG2), with IC₅₀ values ranging from 21.59 to 41.19 μ M [32]. While its cytotoxicity was slightly lower than the positive control ellipticine, its unique structure and bioactivity make it a promising candidate for further exploration. Furthermore, dendrodoristerol (**3**) induced apoptosis in HL-60 cells, as confirmed by morphological changes at concentrations of 15.63 and 31.25 μ M with Hoechst 33342 staining. Flow cytometry analysis revealed that at 31.25 μ M, dendrodoristerol (**3**) induced early apoptosis (14.11%) and necrosis (5.24%) after 24 h of treatment. Caspase-3 activation further supported its role in triggering apoptosis [32]. The results suggest that dendrodoristerol may be a promising anticancer agent, highlighting the need for further exploration of its therapeutic applications [32].

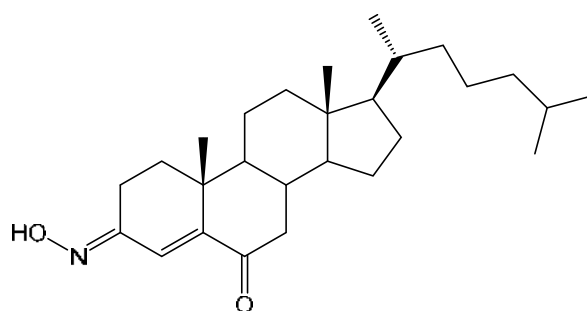
Five steroids were extracted from the cold-water starfish *Ctenodiscus crispatus*, collected in the Sea of Okhotsk [37]. The steroids were identified using various spectroscopic techniques, including 1D and 2D NMR and mass spectrometry (MS). Among the isolated compounds, (25S)-5 α -cholestane-3 β ,5,6 β ,15 α ,16 β ,26-hexaol (**4**) demonstrated significant cytotoxic activity against two human carcinoma cell lines: hepatocellular carcinoma (HepG2) and glioblastoma (U87MG) (Figure 3) [37].



(4) (25S)-5 α -cholestane-3 β ,5,6 β ,15 α ,16 β ,26-hexaol

Figure 3. Structure of new steroid extracted from *Ctenodiscus crispatus*.

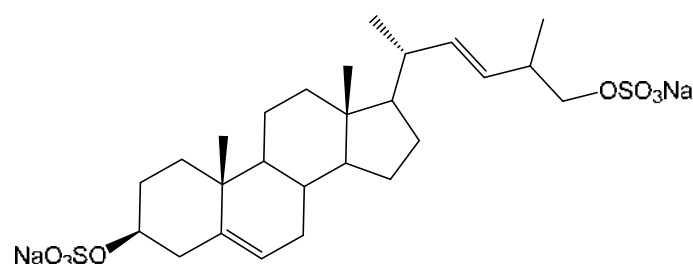
D. J. Xiao et al., from the Guangzhou Institute of Chemistry, reported the discovery of a new steroid from the marine sponge *Cinachyrella australiensis*, collected in the South China Sea (Figure 4) [38]. The isolated compound: (3E)-cholest-4-en-3,6-dione-3-oxime (**5**) was characterized using various spectroscopic techniques, including IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, mass spectrometry (MS), DQCOSY, NOESY, TOCSY, HMQC, and HMBC. This steroid was subjected to a bioassay, which demonstrated its cytotoxic properties against Hep G2 liver cancer cells, indicating its potential biological significance [38].



(5) (3E)-cholest-4-en-3,6-dione-3-oxime

Figure 4. Structure of new steroid oxime isolated from *Cinachyrella australiensis*.

Phallusiasterol C (**6**), a new disulfated steroid isolated from the Mediterranean tunicate *Phallusia fumigata*, provides insights into the structural diversity and biological roles of marine steroids (Figure 5) [39]. The structure of this compound (**6**) was elucidated through extensive spectroscopic analysis. This steroid features a unique (22E)-26,27-dinor-24-methyl-25-hydroxy side chain, making it the first sterol with such a side chain identified from tunicates. This rare structural motif has been observed in only one other sterol, isolated from the starfish *Ctenodiscus crispatus* [40].



(6) Phallusiasterol C

Figure 5. Structure of the steroid isolated from *Phallusia fumigata*.

The potential role of phallusiasterol C in modulating PXR activity was studied using HepG2 cells (human hepatocarcinoma cell line). Despite its structural similarity to solomonsterol A, a known PXR agonist from the sponge *Theonella swinhoei*, phallusiasterol C did not activate PXR or induce the expression of PXR target genes such as CYP3A4 and MDR1 [39]. This lack of activity highlights the critical structural requirements for PXR modulation, particularly the importance of features in the steroid's side chain and the configuration around the A/B ring junction. Previous studies have indicated that the sulfate group in the side chain is essential for stabilizing interactions with PXR [41]. However, the failure of phallusiasterol C to exhibit activity suggests that other structural factors, such as the Δ^5 double bond, may negate the receptor-binding properties observed in related compounds. Although compound (6) did not show bioactivity in the PXR assays, this study provides valuable information on the structure–activity relationship of sulfated steroids, particularly in nuclear receptor modulation.

Research on the Vietnamese starfish *Archaster typicus* led to the isolation and characterization of eight highly hydroxylated steroids, including three new compounds (7–9) (Figure 6) [42]. These new compounds were identified as sodium salts of (24S)-5 α -cholestane-3 β ,4 β ,5,6 α ,7 β ,8,14,15 α ,24-nonaol 6-sulfate (7), (24E)-5 α -cholest-24-ene-26-yde-3 β ,6 α ,8,14,15 α -pentaol 15-sulfate (8), and 5 α -cholest-3 β ,6 α ,8,14,15 α ,24,25,26-octaol 15-sulfate (9). The structure elucidation of these compounds was accomplished using advanced spectroscopic techniques, including 1D/2D NMR and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR-MS). These steroids exhibit unique hydroxylation patterns, which can serve as chemical markers for the taxonomic identification of *A. typicus* [42].

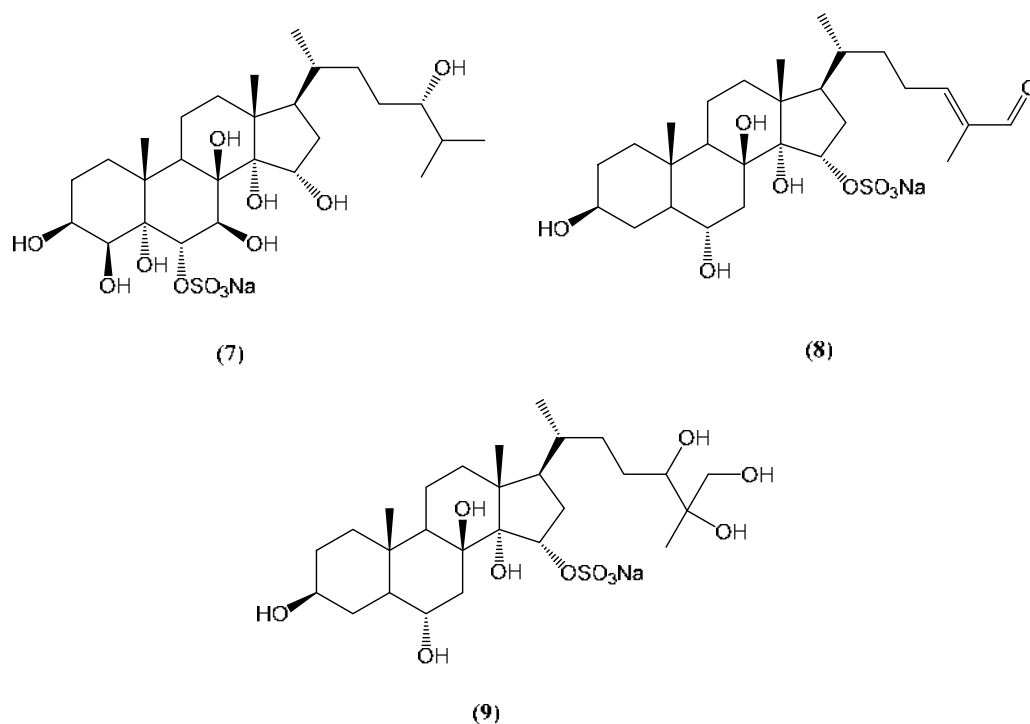


Figure 6. Chemical structures of highly hydroxylated steroids from *Archaster typicus*.

Polyhydroxylated steroids and steroidal glycosides from starfish represent a structurally diverse and biologically active class of marine natural products [43,44]. These compounds typically contain four to nine hydroxyl groups, positioned at strategic locations on the steroidal nucleus and side chains, such as 3 β , 6 α (or β), 8, 15 α (or β), and 16 β , contributing significantly to their bioactivity. Asterosaponins, a prominent subclass, are characterized by a 3-O-sulfated 3 β ,6 α -dihydroxysteroid nucleus with a 9(11)-double

bond and oligosaccharide chains linked at C-6 [45–51]. The structural complexity of these compounds is exemplified by pectiniferosides A–J from *Patiria pectinifera*, which feature a pentahydroxycholestane aglycone with sulfated and/or methylated monosaccharides [52].

Recent studies on *Archaster typicus* have identified highly hydroxylated steroids and asterosaponins with unique hydroxylation and sulfation patterns, expanding the known structural diversity of these marine steroids [45–51]. Comparative analyses with other starfish species, such as *Acanthaster planci* and *Ctenodiscus crispatus*, further highlight the pharmacological relevance of these compounds. Steroidal oligoglycosides from *A. planci* exhibit antimicrobial, anti-inflammatory, and cytotoxic properties, including activity against *Pseudomonas aeruginosa* and MCF-7 breast carcinoma cells [43,44].

Extracts from the starfish *Aphelasterias japonica*, collected off the Russian coast of the Sea of Japan, yielded two new steroids: the disulfated quinovoside aphelasteroside C (**10**) and the monosulfated polyhydroxysteroid aphelaketotriol (**11**) (Figure 7) [53]. Both compounds feature a unique 23-oxo-24-hydroxylated side chain, unprecedented in marine steroids. Additionally, the known compounds cheliferoside L1 (**12**), 3-O-sulfoasterone (**13**), forbeside E3 (**14**), and 3-O-sulfothornasterol A (**15**) were isolated. Biological assays revealed that compounds (**10–12**, **14**, **15**) exhibited hemolytic activity against mouse erythrocytes, whereas 3-O-sulfoasterone (**4**) was inactive at concentrations below 5×10^{-4} M [45]. Structurally, compounds (**10–15**) share key features with asterosaponins, including the $3\beta,6\alpha$ -diol moiety, a $\Delta^9(11)$ double bond, and a sulfate group at C-3, but they differ in their sugar chains. Unlike asterosaponins, which possess extended five- or six-sugar chains, compounds (**10**, **12**, **14**) contain only a single sugar residue. The observed differences in steroid composition between Japanese and Russian populations of *A. japonica* may be attributed to ecological factors such as diet and seasonality, or they could indicate taxonomic distinctions [53].

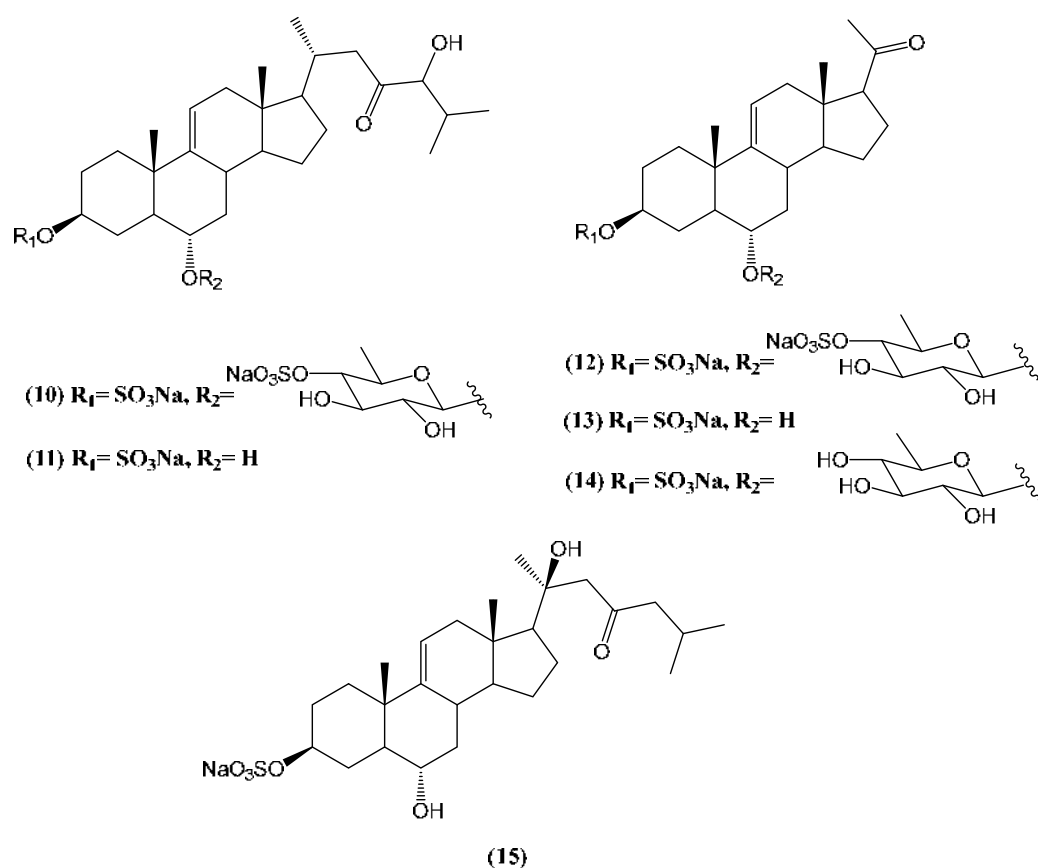


Figure 7. Chemical structures of steroids from *Aphelasterias japonica*.

The alcoholic extract of the starfish *Henricia leviuscula*, collected from the Sea of Okhotsk, yielded four previously unreported polyhydroxysteroids (**16–19**) and a novel steroidal glycoside, leviusculoside J (**20**) (Figure 8) [54]. Hemolytic activity assays against mouse erythrocytes demonstrated that compounds (**17**) and (**20**) exhibited membrane-disrupting effects, with HC_{50} values of 2.1×10^{-4} M and 8.0×10^{-5} M, respectively. At 40 °C, leviusculoside J (**20**) induced complete hemolysis at 8.0×10^{-5} M within 5 min, indicating its potent lytic activity [54].

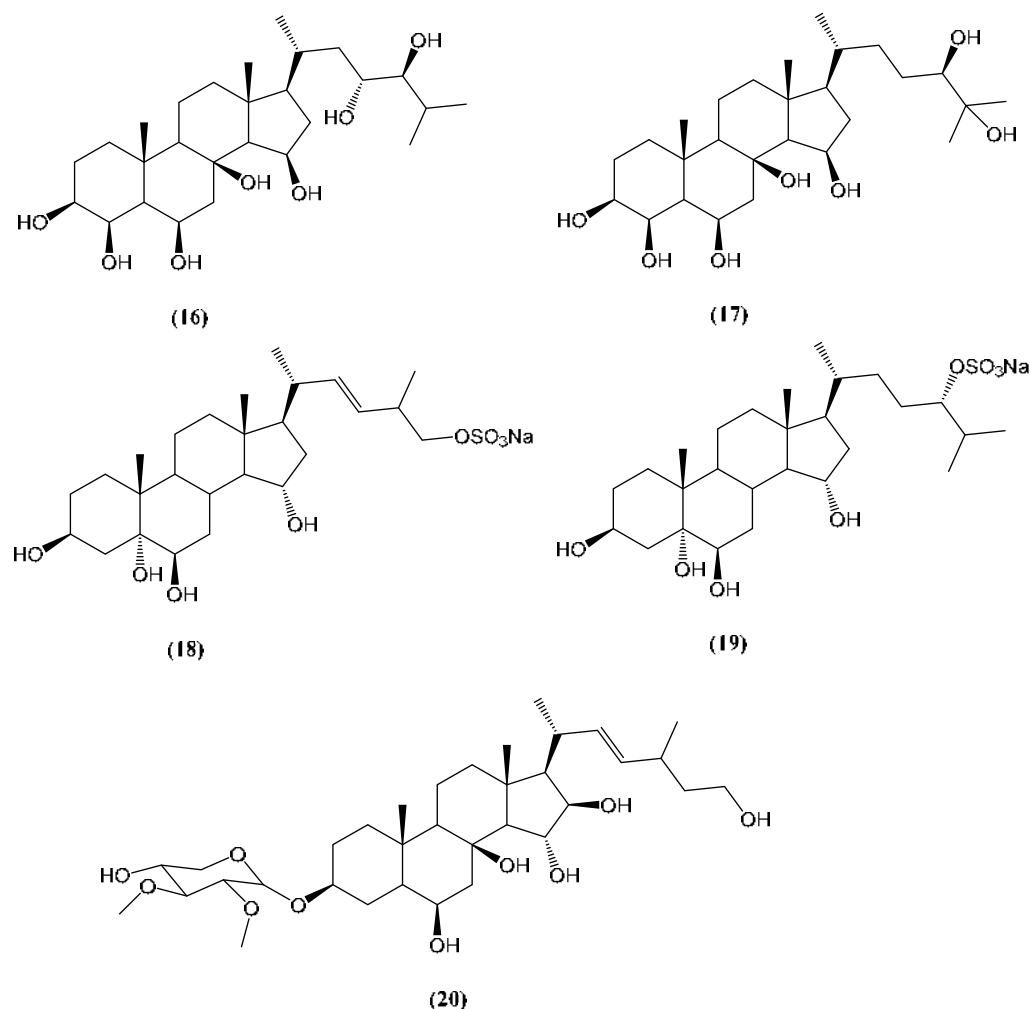


Figure 8. Chemical structures of polyhydroxysteroids from *Henricia leviuscula*.

Two new sulfated triterpene glycosides, hemoiedemosides A (**21**) and B (**22**), were isolated from the Patagonian sea cucumber *Hemoiedema spectabilis* (Figure 9) [55]. Structural elucidation using NMR and FABMS revealed that both compounds share a common aglycon but differ in the sulfation pattern of their tetrasaccharide chains. Hemoiedemoside B (**22**) represents a rare example of a trisulfated triterpene glycoside within the Cucumariidae family. Both glycosides exhibited notable antifungal activity against *Cladosporium cucumerinum*, with hemoiedemoside A (**21**) demonstrating stronger inhibition than the commercial fungicide benomyl at higher concentrations. The presence and number of sulfate groups in the sugar moiety appear to significantly influence bioactivity, as the desulfated derivative 1a showed substantially reduced antifungal potency. Additionally, hemoiedemoside A (**21**) displayed higher brine shrimp toxicity, LC_{50} of 18.7 ppm, compared with hemoiedemoside B (**22**), which was two times less active [55]. These findings highlight the structural and biological significance of sulfated triterpene glycosides from *Hemoiedema spectabilis*.

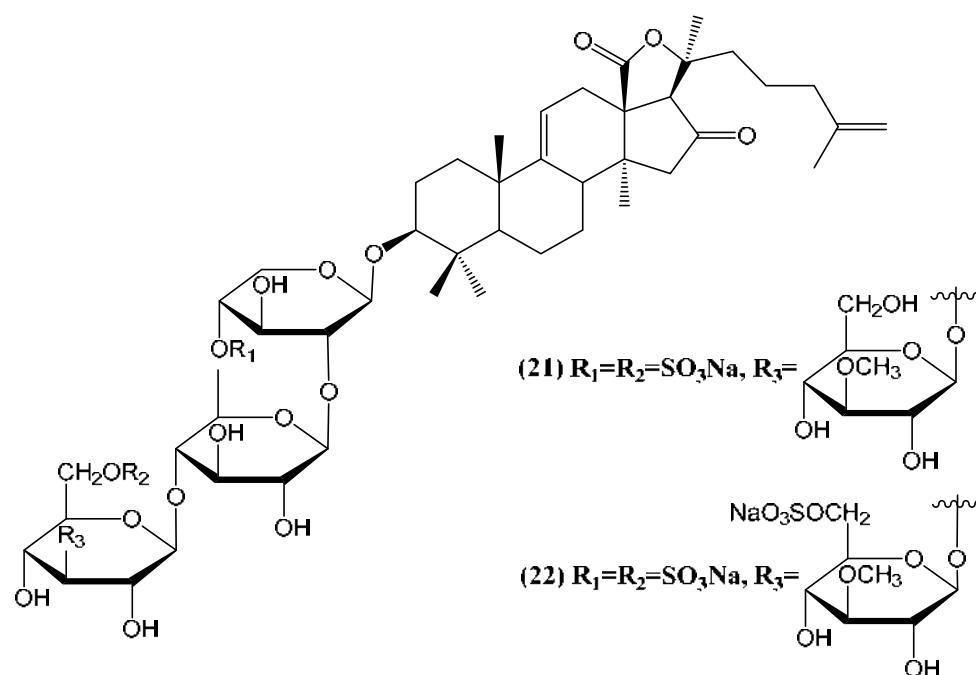


Figure 9. Chemical structures of sulfated triterpene glycosides from the Patagonian sea cucumber *Hemoiedema spectabilis*.

Four new compounds, spiculiferosides A (**23**), B (**24**), C (**25**), and D (**26**), were isolated from the starfish *Henricia leviuscula spiculifera* collected in the Sea of Okhotsk (Figure 10) [56]. Compounds (**23–25**) are monosulfated polyhydroxysteroid glycosides containing two carbohydrate moieties, with one attached to C-3 of the steroid core and another at C-24 of the aglycone's side chain. Compounds (**24**) and (**25**) are biosides, while compound (**23**) contains three monosaccharide residues, a rare characteristic among polar steroids from starfish. Notably, the presence of a 5-substituted 3-OSO₃- α -L-Araf unit in these compounds was identified for the first time in starfish-derived steroid glycosides. Cell viability assays revealed negligible cytotoxicity against human embryonic kidney HEK293, melanoma SK-MEL-28, breast cancer MDA-MB-231, and colorectal carcinoma HCT 116 cells at concentrations up to 100 μ M [56]. However, compounds (**23–25**) significantly inhibited the proliferation and colony formation of HCT 116 cells, with compound (**25**) showing the most potent effects. Compound (**25**) induced dose-dependent G2/M cell cycle arrest and regulated the expression of cell cycle proteins (CDK2, CDK4, cyclin D1, p21), while also inhibiting the phosphorylation of c-Raf, MEK1/2, and ERK1/2 kinases of the MAPK/ERK pathway. The effects of compounds (**23–25**) on cell proliferation were further assessed, with compound (**25**) exhibiting the greatest antiproliferative activity. Compound (**25**) at 100 μ M suppressed HCT 116 cell proliferation by 55%, 57%, and 60% after 24, 48, and 72 h, respectively. In soft agar colony formation assays, compounds (**23–25**) reduced colony numbers of HCT 116 cells in a dose-dependent manner, with compound (**25**) showing the most significant inhibition [56]. These findings highlight compound (**25**) as a promising candidate for further studies on its molecular mechanisms in colorectal cancer treatment. Further analysis of the compound (**25**) mechanism revealed that its anticancer activity involves the regulation of cell cycle proteins and inhibition of the ERK1/2 MAPK signaling pathway, suggesting that compound antiproliferative effects are likely mediated through these pathways [56].

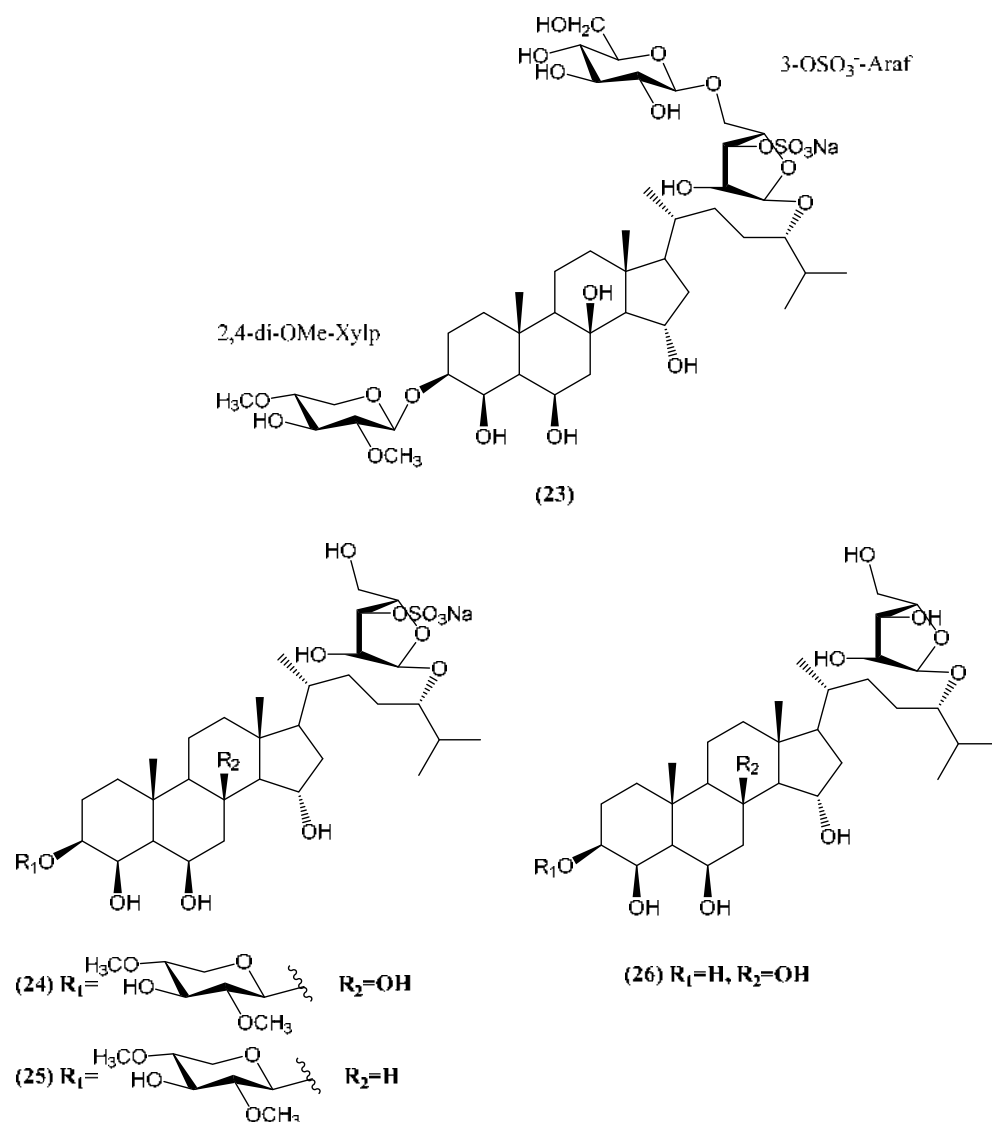


Figure 10. Spiculiferosides A (23), B (24), C (25), and D (26) isolated from the starfish *Henricia leviuscula spiculifera*.

From the ethanolic extract of the Japanese slime sea star *Pteraster marsippus*, two new steroid 3 β ,21-disulfates (27, 28) and two new steroid 3 β ,22- and 3 α ,22-disulfates (29, 30) were isolated (Figure 11) [57]. The structures of compounds (27–30) were determined using detailed one-dimensional and two-dimensional NMR, HR ESI MS, and HR ESI MS/MS data. Compounds (27) and (28) possess a Δ 22-21-sulfoxy-24-norcholestane side chain, while compounds (29) and (30) contain a Δ 24(28)-22-sulfoxy-24-methylcholestane side chain, a feature first discovered in the polar steroids of starfish and ophiuroids. The cytotoxic effects of compounds (27–30) were evaluated using the human breast cancer cell lines T-47D, MCF-7, and MDA-MB-231 [57]. Compounds (27) and (28) exhibited significant colony-inhibiting activity against T-47D cells, while compounds (29) and (30) demonstrated stronger effects on MDA-MB-231 cells. In cell viability assays, compounds (27–30) inhibited cell viability at 50 μM in a dose-dependent manner, with inhibition rates ranging from 5% to 22% across the different cell lines, lower than that of cisplatin, which was used as a positive control. Compound (30) showed the highest inhibition of MDA-MB-231 cells. In colony formation assays, compounds (27–30) inhibited colony formation significantly in a dose-dependent manner. Compound (27) inhibited colony formation by up to 76% in T-47D cells, compound (28) by up to 86% in T-47D cells, compound (29) by up to 87% in

MCF-7 cells, and compound (30) by up to 90% in MDA-MB-231 cells at the highest tested concentration of 50 μM [57]. These results indicate that compounds (27) and (28) are most effective against T-47D cells, while compounds (29) and (30) exhibit stronger effects on MDA-MB-231 cells.

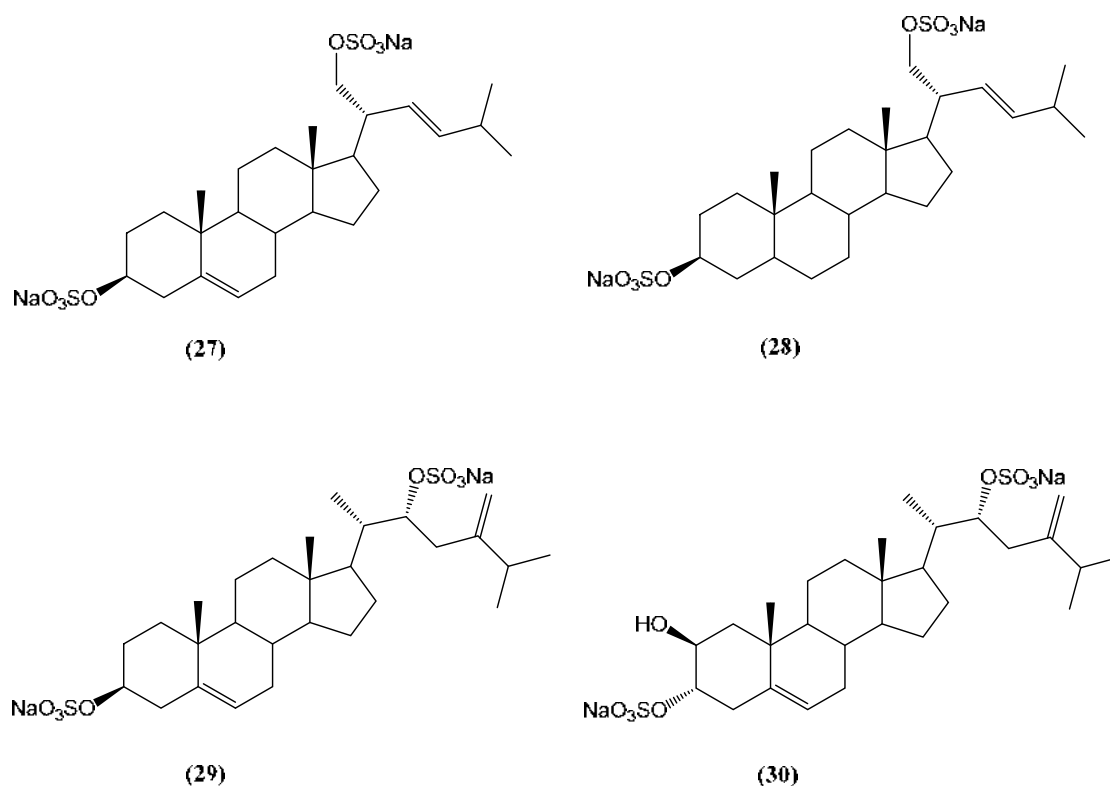


Figure 11. Chemical structures of steroids isolated from *Pteraster marsippus*.

Four new disulfated steroids (31–34), including three 3 β ,21-disulfates (31–33) and one 3 β ,22-disulfate (34), were isolated from the ethanolic extract of *Pteraster marsippus*, a Far Eastern starfish species (Figure 12) [58]. The structures of these compounds were determined using detailed NMR and HR ESI MS analyses. Steroids (31) and (32) contain an oxo group at position C-7 in the steroid nucleus and differ by the presence of the conjugated 5(6)-double bond. Compound (34) features a novel Δ 24-22-sulfoxycholestane side chain not previously described in starfish or ophiuroid steroids. The cytotoxic activities of compounds (31–34) were evaluated in 2D and 3D cultures of human epithelial kidney cells (HEK293), melanoma cells (SK-MEL-28), small intestine carcinoma cells (HuTu80), and breast carcinoma cells (ZR-75-1) using the MTS assay. The mixture of (31) and (32) showed significant inhibitory effects on the viability of ZR-75-1 breast carcinoma cells, with IC₅₀ values of 90.4 μM in 2D and 21.9 μM in 3D cultures, indicating their potential as antineoplastic agents [58]. Other tested compounds exhibited less pronounced effects [58]. These findings suggest that the combination of (31) and (32) has the highest cytotoxicity among the compounds studied, and their structural features, including the oxo group and conjugated double bond, play a critical role in their biological activity.

Four new conjugates, esters of poly(hydroxy)steroids with long-chain fatty acids, were isolated from the deep-sea starfish *Ceramaster patagonicus* (Figure 13) [59]. After detailed structural analysis using NMR techniques, ESI MS, and chemical transformations, the authors determined that compounds (35–38) share a common steroidal core of 5 α -cholestan-3 β ,6 β ,15 α ,16 β ,26-penta(hydroxy)steroid and differ by the following fatty acid units: 5'Z,11'Z-octadecadienoic (35), 11'Z-octadecenoic (36), 5'Z,11'Z-eicosadienoic (37), and 7'Z-eicosenoic (38) acids. Compounds (35–38) exhibit cytotoxic activity, though

their effects vary depending on the cell type. To evaluate the cytotoxic effects of these compounds, several human and mouse cell lines were tested. The JB6 Cl41 cell line, derived from mouse epidermis, was used to assess potential effects on skin cancer. This cell line is sensitive to tumor promoters, which makes it a relevant model for studying the early stages of skin cancer. Compounds (35), (36), and (37) caused 50% growth inhibition of JB6 Cl41 cells at concentrations of 81, 40, and 79 μM , respectively [59]. These results suggest that these compounds may modulate the pathways involved in skin cancer development. The MDA-MB-231 cell line, a human triple-negative breast cancer model, was also tested. This subtype of breast cancer is aggressive and resistant to conventional hormonal therapies. Compounds (35), (36), and (37) showed IC_{50} values of 74, 33, and 73 μM , respectively, indicating significant cytotoxicity in this cell line. Notably, compound (36) was particularly effective at 20 μM , significantly inhibiting colony formation and migration of MDA-MB-231 cells. The migration of MDA-MB-231 cells was reduced by 50%, while compound (36) completely inhibited the migration of HCT 116 cells, a human colon carcinoma line, at the same concentration. HCT 116 cells, known for their ability to form tumors in immunodeficient mice, were also tested. The IC_{50} values for compounds (35), (36), and (37) were 73, 31, and 71 μM , respectively. Furthermore, migration assays revealed that compound (36) completely halted the migration of HCT 116 cells at 20 μM . In contrast, compounds (35), (37), and (38) showed more moderate effects in limiting HCT 116 cell migration [59]. It is important to note that the compounds did not exhibit selective toxicity toward cancer cells alone. Normal cells were also affected, albeit to a lesser extent. To further investigate their effects on cancer-related processes, the authors performed additional studies using soft agar and wound healing assays. The studies suggest that polyhydroxylated steroids such as those isolated from starfish may play an important role in transporting fatty acids to peripheral tissues, similar to cholesterol in vertebrates. These steroids are found predominantly in the digestive organs of starfish, with the highest concentrations located in the stomach and pyloric caeca, suggesting their biological importance in marine organisms [59].

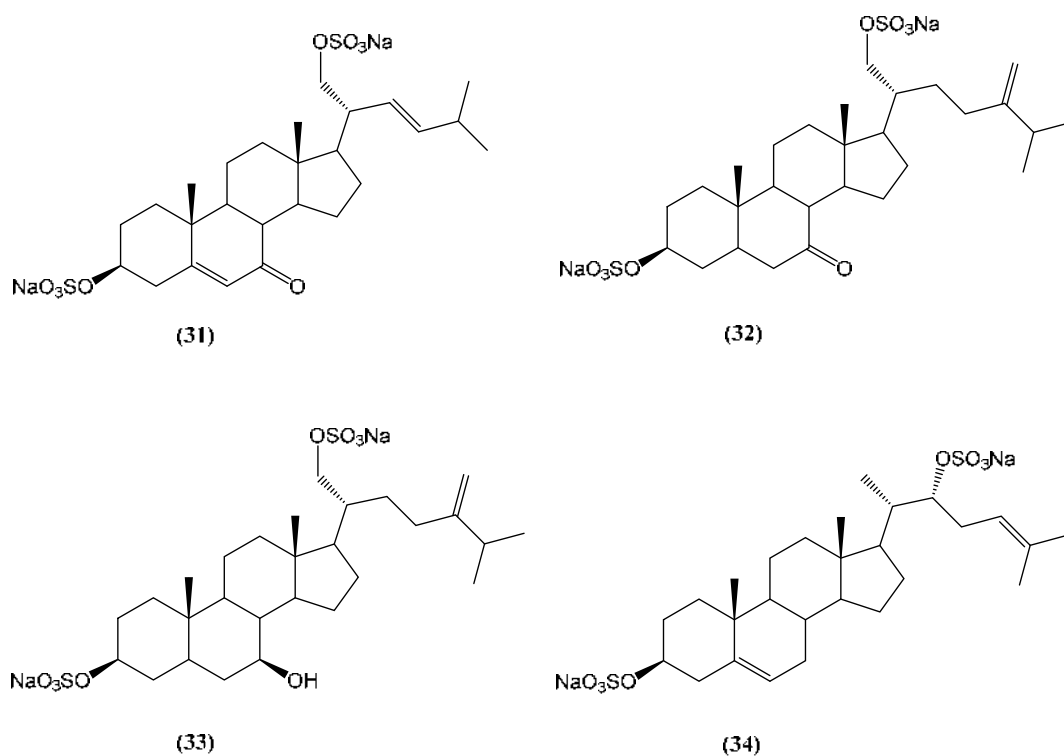


Figure 12. Chemical structures of new disulfated steroids from *Pteraster marsippus*.

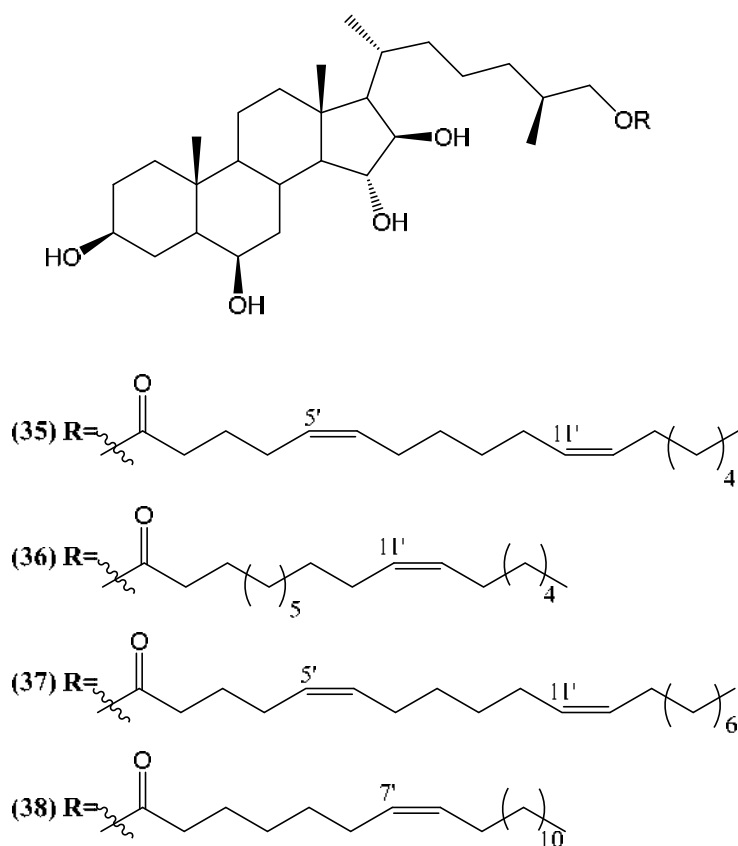


Figure 13. New conjugates of polyhydroxysteroids with long-chain fatty acids from the Starfish *Ceramaster patagonicus*.

The new sterol (23R)-methoxycholest-5,24-dien-3 β -ol (**39**) was isolated from the marine bryozoan *Cryptosula pallasiana* collected at Huang Island, China (Figure 14) [60]. This sterol features a rare methoxy group at C-23 and a double bond between C-24 and C-25, setting it apart from the typical sterols found in marine organisms. Its structure was determined through extensive spectroscopic analysis, including quantum electronic circular dichroism (ECD) calculations. In terms of biological activity, compound (**39**) was evaluated for cytotoxicity against the human tumor cell lines HL-60 (human myeloid leukemia), HepG2 (human hepatocellular carcinoma), and SGC-7901 (human gastric carcinoma). The results indicated that (23R)-methoxycholest-5,24-dien-3 β -ol (**39**) displayed moderate cytotoxicity, with IC₅₀ values ranging between 12.34 μ M and 18.37 μ M across the tested cell lines [60].

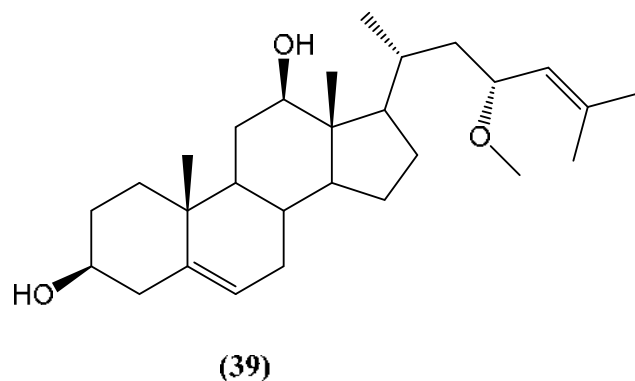
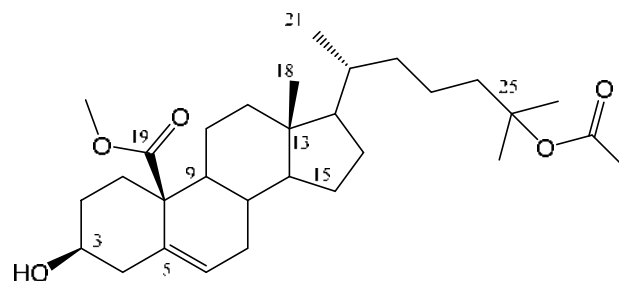


Figure 14. (23R)-methoxycholest-5,24-dien-3 β -ol isolated from *Cryptosula pallasiana*.

2.2. Soft Corals

Research on *Dichotella gemmacea* led to the isolation of one new 19-oxygenated steroid, 25-acetate-nebrosteroid K (**40**), and five known steroids, along with one known 19-hydroxy steroidal glycoside—Juncecelloside C (Figure 15) [61]. The new compound (**40**) is significant as the first steroid with a 19-oic acid methyl ester group isolated from gorgonians, representing a novel structural feature within this class of compounds.



(40) 25-acetate-nebrosteroid K

Figure 15. The new 19-oxygenated steroid from *Dichotella gemmacea*.

The structure and relative configuration of 25-acetate-nebrosteroid K (**40**) were elucidated using various spectroscopic techniques, including NOESY, along with 1D and 2D NMR methods. Compound (**40**) belongs to the class of 19-oxygenated steroids, which are rarely found in gorgonians. Its methyl ester group at C-19 serves as a key structural feature, distinguishing it from other known gorgonian steroids. The biological activity of the isolated steroids was evaluated for lethal activity against *Artemia salina* (brine shrimp) and cytotoxicity against A549 and HL-60 cell lines [61]. Compound (**40**) exhibited strong lethality toward *A. salina*, with a lethality rate of 75.9% at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicating its potential as a bioactive compound. However, it did not demonstrate significant cytotoxic activity [61].

Six new steroids—Klyflaccisteroids (**41–46**)—were isolated from the soft coral *Klyxum flaccidum* (Figure 16) [62]. Compound (**46**) is notable as the first 9,11-secogorgosteroid 11-carboxylic acid isolated from natural sources. The cytotoxicity and anti-inflammatory activities of these compounds were evaluated, revealing promising bioactivity in several cases. Compound (**41**) selectively inhibited the growth of human lung adenocarcinoma (A549) cells with an ED_{50} of 7.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compound (**46**) exhibited the strongest cytotoxicity toward human colon carcinoma (HT-29) cells, with an ED_{50} of 6.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [62]. Additionally, compounds (**43**) and (**45**) demonstrated potent cytotoxic effects against A549 and murine leukemia (P388) cells, with ED_{50} values of 6.1 and 3.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively [62].

Anti-inflammatory assays showed that compounds (**43**) and (**46**) exhibited strong inhibition of superoxide anion generation and elastase release in human neutrophils, with inhibition percentages exceeding 75% at 10 μM . Most compounds displayed cytotoxicity against specific cancer cell lines, while compounds (**43**) and (**46**) exhibited significant anti-inflammatory effects [62].

Twelve steroids, including five new compounds (**47–51**), were isolated from the methanol extract of the Vietnamese soft coral *Simularia conferta* (Figure 17) [63]. The investigation focused on their cytotoxic effects against three human cancer cell lines: lung carcinoma (A-549), cervical adenocarcinoma (HeLa), and pancreatic epithelioid carcinoma (PANC-1). Evaluation using MTT assays revealed that one of the new compounds, ergosta-24(28)-ene-3 β ,5 α ,6 β -triol-6-acetate (**52**), exhibited potent cytotoxic activity against all three tested cell lines. The IC_{50} values were $3.64 \pm 0.18 \mu\text{M}$ for A-549, $19.34 \pm 0.42 \mu\text{M}$ for HeLa, and $1.78 \pm 0.69 \mu\text{M}$ for PANC-1 [63]. Compound (**52**) was notably more effective than

standard anticancer agents such as camptothecin and etoposide in A-549 and HeLa cells. It also displayed comparable potency to etoposide in PANC-1 cells. Structural analysis suggested that the $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol motif, along with an acetate group at the 6-position, may play a key role in the observed cytotoxicity [63].

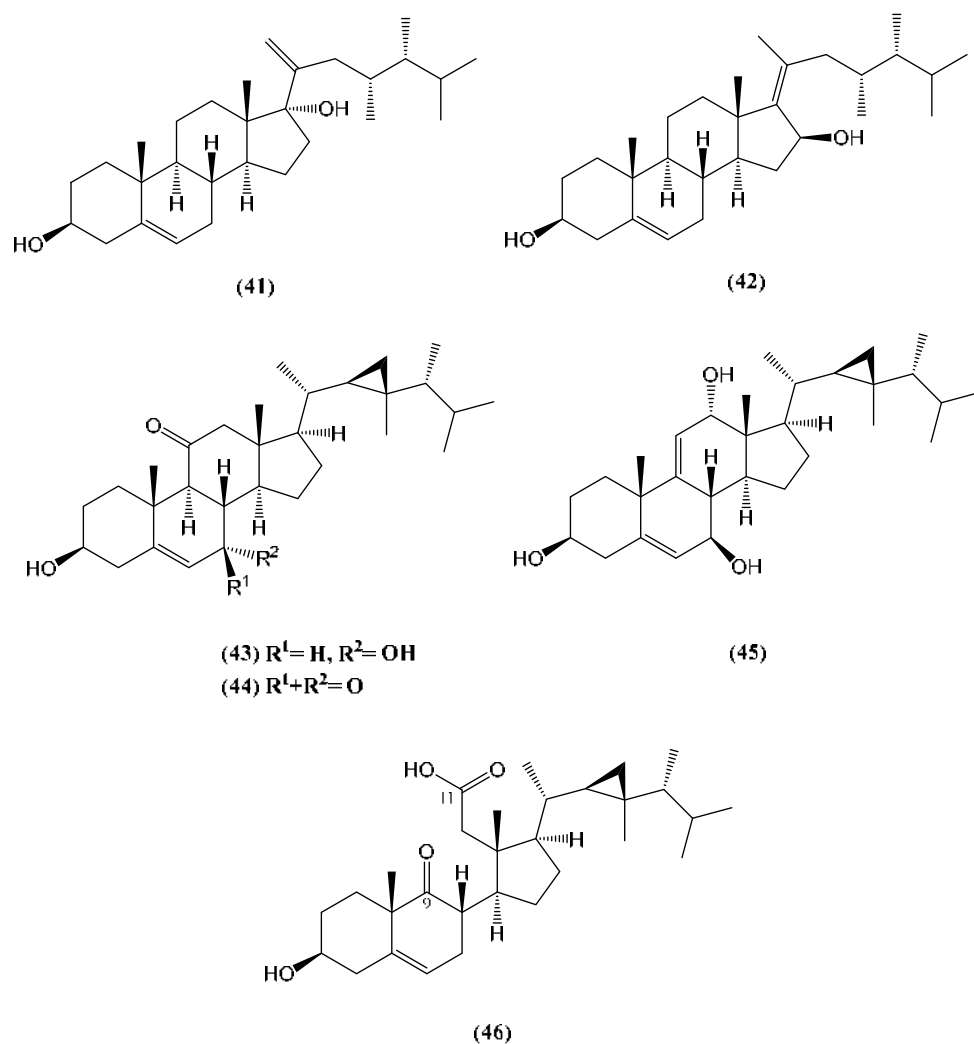


Figure 16. New steroids extracted from the coral *Klyxum flaccidum*.

The presence of the acetate group at C-6 appears to enhance the compound's lipophilicity, potentially improving its interaction with cellular targets and membrane permeability. This structural feature likely contributes to the significantly higher cytotoxic activity of compound (52) compared with its non-acetylated analog, ergosta-24(28)-ene- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol (51), which exhibited markedly lower activity ($IC_{50} > 100 \mu M$). These findings highlight the critical role of the acetate group in modulating the biological activity of steroids [63].

This study expands the chemical profile of *Sinularia conferta*, a relatively understudied species, and identifies promising bioactive compounds for potential therapeutic applications in cancer treatment [63]. The results underscore the importance of structural modifications, such as acetylation, in enhancing the pharmacological properties of marine-derived steroids.

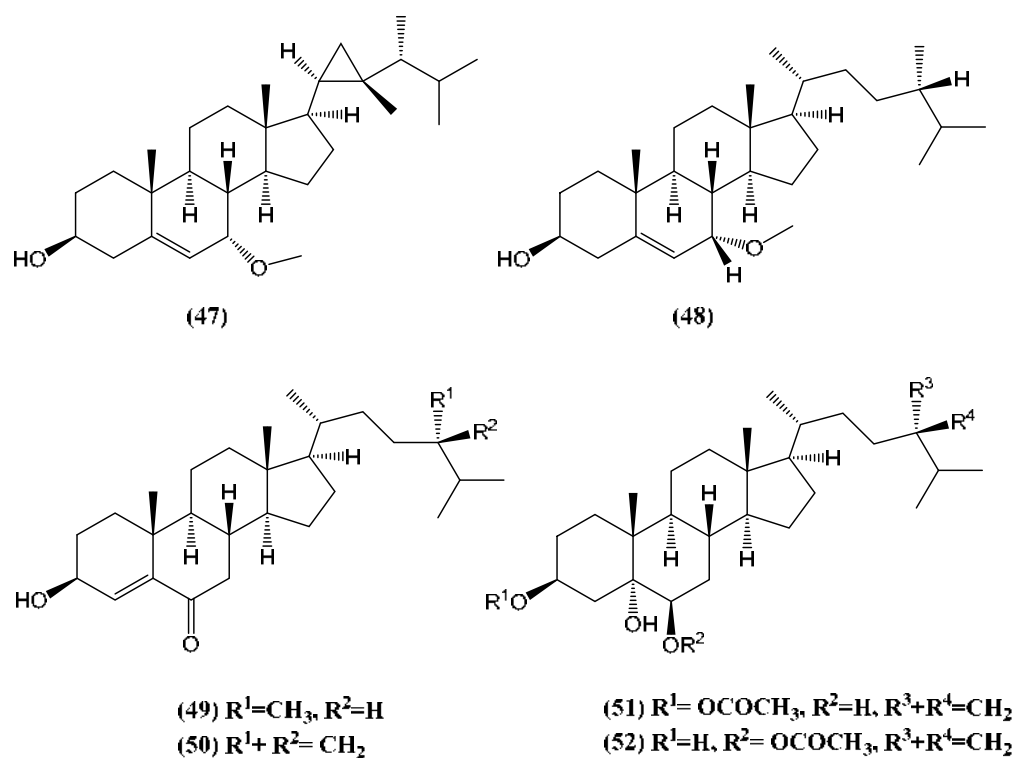


Figure 17. Structure of new steroids isolated from the methanol extract of *Simularia*.

Researchers reported the discovery of two new steroid derivatives: erectsterate A (**53**) and erectsterate B (**54**) (Figure 18) [64]. These compounds, epimers at the C-10 position, were isolated from the soft coral *Simularia erecta*, collected in the South China Sea. Their structures are characterized by significant degradation of the B ring and an ester bond linking rings A and C/D. Structures were confirmed using advanced spectroscopic techniques. Interestingly, these compounds share structural similarities with the previously identified Chaxin B (**55**) [65]. However, this discovery marks the first report of such steroids in soft corals. A novel biosynthetic pathway, distinct from that of chaxins, has also been proposed. Understanding the biosynthetic pathways of natural products is crucial for elucidating their origin, structural diversity, and potential for drug discovery. In the context of marine-derived steroids, these pathways often involve complex enzymatic processes that lead to unique structural features. During the biosynthesis of erectsterates A and B, Baeyer–Villiger oxidation occurred in the C ring, resulting in the formation of a unique seven-membered lactone ring—an unprecedented feature in steroid chemistry [64]. The discovery of this pathway not only explains the biosynthesis of these compounds but also provides insights into potential synthetic strategies for creating structurally similar bioactive molecules.

Preliminary biological activity assays revealed that erectsterate B (**54**) exhibited weak cytotoxicity against four cancer cell lines: A549, HT-29, SNU-398, and Capan-1. These results suggest potential avenues for further research into its application in anticancer therapies, although more extensive studies are needed to fully assess its therapeutic efficacy [64,65].

Hurgadacin (**56**) is a newly discovered steroid isolated from the soft coral *Simularia polydactyla*, collected from the Red Sea near Hurgada (Figure 19) [66]. The newly identified steroid compound (**56**) was found alongside other closely related compounds, 24-methylenecholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (**57**) and 24-methylenecholestane-1 α ,3 β ,5 α ,6 β ,11 α -pental (**58**). The biological activity of the extracts and isolated components was assessed, focusing on their antibacterial activity against various pathogenic microorganisms and

cytotoxicity, examined with a shrimp mortality test [66]. The biological tests performed highlight the potential of these compounds. Corals from the Red Sea are known for their unique chemistry, which may provide valuable compounds for research into antibiotic resistance and antineoplastic therapy [67–69].

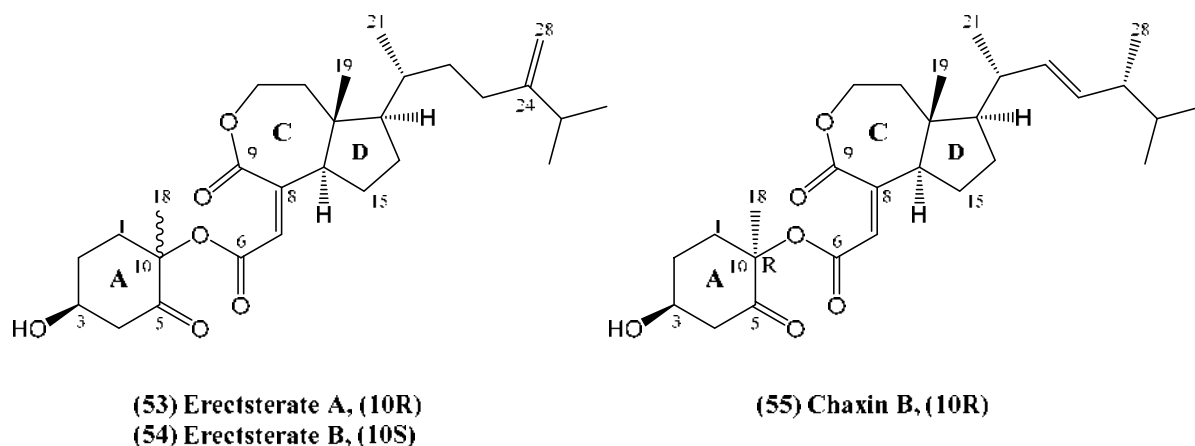


Figure 18. Structures of the erectsterates (A and B) and Chaxin B from *Simularia erecta*.

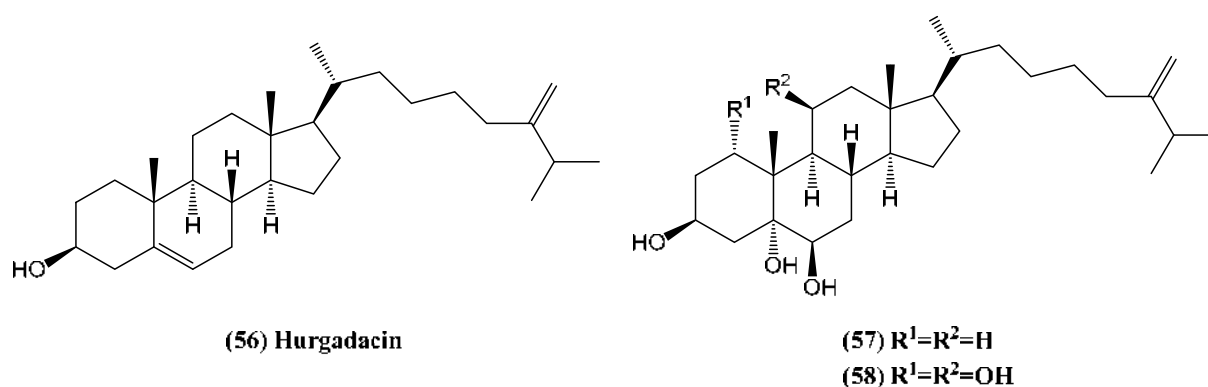


Figure 19. Steroids found in the soft coral *Simularia polydactyla*.

However, the isolated compounds, including the new steroid, were found to be inactive against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces viridochromogenes* (Tü57), *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Mucor miehi*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus subspicatus*, *Rhizoctonia solani*, and *Pythium ultimum*. In contrast, the crude coral extract displayed significant activity against the phytopathogenic fungus *R. solani* [66].

The Red Sea soft coral *Dendronephthya* sp. has yielded a novel cytotoxic steroid, dendronestadione (59), featuring a C-27 carbocyclic skeleton with two α,β -unsaturated carbonyl groups (Figure 20) [70]. This structural motif enhances cytotoxic activity, particularly against prostate adenocarcinoma (PC-3) cells, with an IC_{50} value of $7.8 \pm 0.80 \mu M$. Additionally, dendronestadione (59) exhibited notable antiproliferative effects against hepatocellular carcinoma (HepG2) and colorectal adenocarcinoma (HT-29) cells, with IC_{50} values of $19.1 \pm 1.81 \mu M$ and $32.4 \pm 2.84 \mu M$, respectively [70]. The pronounced cytotoxicity observed for this ketosteroid suggests a structure–activity relationship wherein the presence of α,β -unsaturated carbonyl functionalities contributes to enhanced biological activity.

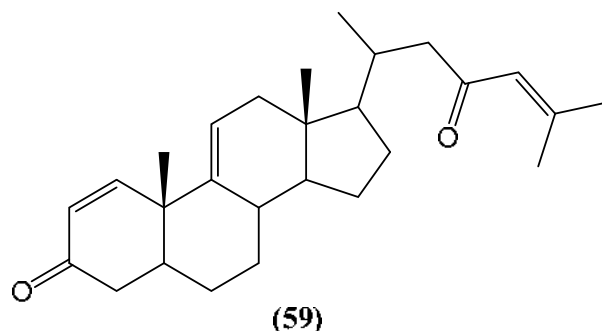


Figure 20. Cytotoxic ketosteroids from the Red Sea soft coral *Dendronephthya* sp.

The novel steroid $3\beta,7\beta,9\alpha$ -trihydroxycholest-5-en (**60**) was isolated from *Petrosia* sp. (Figure 21) [71]. This polyoxygenated steroid features a unique arrangement of hydroxyl groups at the 3, 7, and 9 positions and a conjugated double bond at the 5 position, characteristic for sterol compounds. The chemical structure of compound (**60**) was elucidated through detailed 1D and 2D NMR, UV, IR, and MS spectroscopy. Its cytotoxicity was evaluated against the HepG2 and MCF-7 cancer cell lines, with an IC_{50} value in the range of 20 to 500 μ M [71], suggesting its potential as a bioactive compound. Furthermore, compound (**60**) demonstrated a significant affinity for DNA, which may underlie its cytotoxic effects.

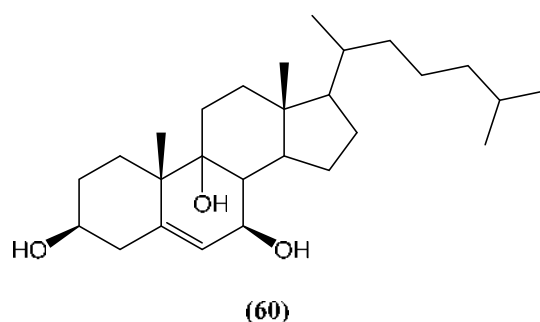
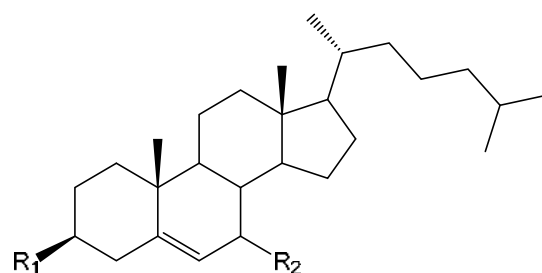


Figure 21. New steroid from *Petrosia* sp.

Three marine steryl hexadecanoates, 3β -hexadecanoylcholest-5-en-7-one (**61**), 3β -hexadecanoylcholest-5-en-7 β -ol (**62**), and cholest-5-en-3 β -yl-formate (**63**), were isolated from the anthozoan black coral *Antipathes dichotoma* (Figure 22) [72]. The structures of these compounds were determined through extensive 1D (1H , ^{13}C , and DEPT) and 2D (COSY, HSQC, and HMBC) NMR, UV, IR, and MS spectroscopic analyses. Compound (**61**) features a 7-one functional group and a hexadecanoyl moiety at the 3β position, while compound (**62**) is similar but contains a hydroxyl group at position 7β . Compound (**63**), a known steryl derivative, consists of a formate ester group at the 3β position. In terms of biological activity, compounds (**61**) and (**63**) exhibited moderate cytotoxic effects, with IC_{50} values ranging from 28.7 to 48.2 μ g/mL across several cancer cell lines, including HepG2, WI 38, VERO, and MCF-7 [72]. Compound (**62**) showed weaker cytotoxic activity, with IC_{50} values ranging from 70.5 to 84.8 μ g/mL [72].

From the black coral *Antipathes dichotoma*, a new steroid, (22E)-methylcholesta-5,22-diene-1 $\alpha,3\beta,7\alpha$ -triol (**64**), along with three known steroid derivatives, $3\beta,7\alpha$ -dihydroxycholest-5-ene (**65**), (22E,24S),5 $\alpha,8\alpha$ -epidioxy-24-methylcholesta-6,22-dien-3 β -ol (**66**), and (22E,24S),5 $\alpha,8\alpha$ -epidioxy-24-methylcholesta-6,9(11),22-trien-3 β -ol (**67**), were isolated (Figure 23) [73]. The structures of these steroids were determined using NMR spectroscopic analysis and comparisons with data from the literature. Among the steroids tested for antibacterial activity, compound (**64**), the trihydroxy steroid, exhibited potent activity against

Bacillus subtilis and *Pseudomonas aeruginosa*. The epidioxy steroids (66) and (67) showed similar strong antibacterial activity, particularly against *B. subtilis* [73].



(61) R₁ = n-C₁₆H₃₂O₂, R₂ = O

(62) R₁ = n-C₁₆H₃₂O₂, R₂ = β-OH

(63) R₁ = OCHO, R₂ = H

Figure 22. Steroids isolated from *Antipathes dichotoma*.

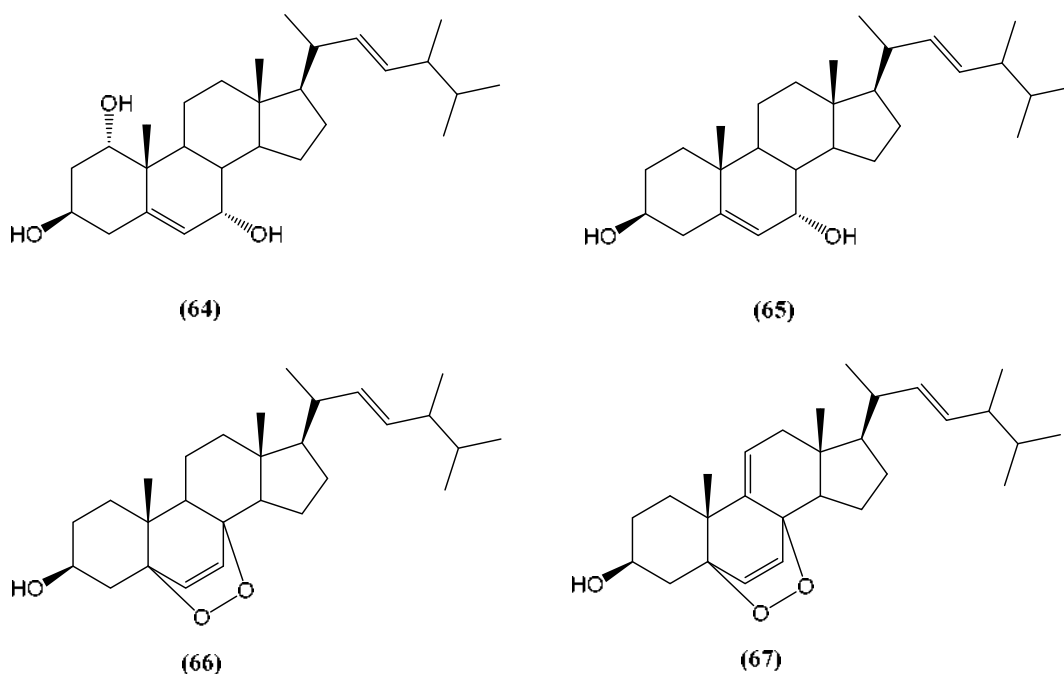


Figure 23. Steroids extracted from the black coral *Antipathes dichotoma*.

From the Red Sea sponge *Echinoclathria gibbosa*, two new steroid compounds, β-sitosterol-3-O-(3Z)-pentacosenoate (68) and 5α-pregna-3β-acetoxy-12β,16β-diol-20-one (69), were isolated (Figure 24) [74]. The structures of these compounds were determined through 1D and 2D NMR spectroscopy and mass spectrometry. Compound (68) is a steryl ester derivative, which combines the well-known sterol β-sitosterol with a long-chain fatty acid, 3Z-pentacosenoic acid. Compound (69) is a pregnane-type steroid with acetoxy, diol, and ketone functionalities at positions 3, 12, and 20. These compounds and the total MeOH extract and fractions of *E. gibbosa* were screened for antimicrobial, anti-inflammatory, antipyretic, and hepato-protective activities. Compound (68) exhibited weak growth inhibitory activity against three human cancer cell lines—A549 (non-small-cell lung cancer), U373 (glioblastoma), and PC-3 (prostate cancer). Compound (69) was found to be inactive in the same assays [74].

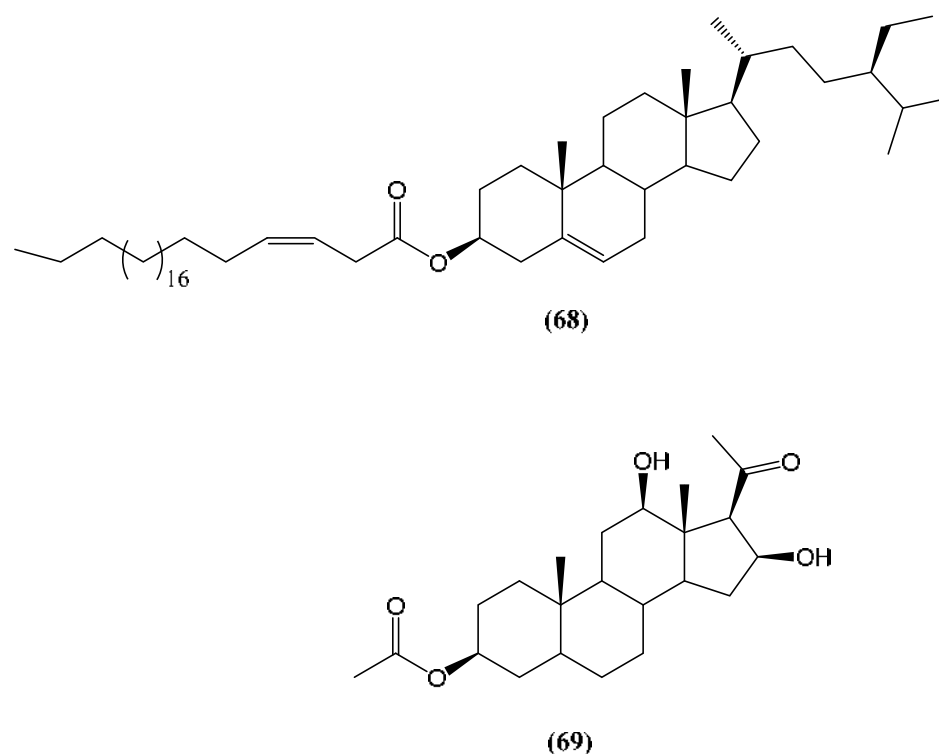


Figure 24. Steroid compounds from *Echinoclathria gibbosa*.

2.3. Marine and Mangrove-Associated Fungi

Marine-derived fungi, particularly those associated with algae, are an emerging source of bioactive secondary metabolites [75–77]. Despite being relatively understudied, these fungi hold potential for novel pharmacological applications.

Research on the deep-sea-derived fungus *Rhizopus* sp. W23 led to the identification of six new cyclocitrinol analogs (70–72, 75, 77–78) and twelve known compounds (73–74, 79–88) (Figure 25) [78]. These compounds feature a unique 7/7/6/5-tetracyclic scaffold with bicyclo [4.4.1] A/B rings. Notably, norcyclocitrinoic acids A (70) and B (71) represent only the second instance of 24,25-bisnor cyclocitrinols in natural products. The structures of these new steroids were elucidated through detailed spectroscopic analysis and X-ray crystallography [78]. The stereochemistry at C-24 remains undefined due to the lack of data.

Cyclocitrinol analogs are an uncommon class of natural products, first discovered from the terrestrial fungus *Penicillium citrinum* [78]. This subgroup of steroids is characterized by minor modifications of the tetracyclic scaffold, particularly in the A/B ring system. The key modifications include variations in the degree of unsaturation, especially the presence of a double bond, and alterations in substituent patterns. These modifications may include changes in the hydroxylation and methylation patterns in the tetracyclic structure, which are crucial for the biological activity of these compounds. These compounds have shown a variety of biological properties such as antibacterial properties and moderate cytotoxicity against cancer cell lines. The structural diversity within this group increases their scientific significance [78].

Compound (82) is particularly noteworthy for its ability to enhance osteoblastogenesis while inhibiting adipogenesis in mature bone marrow stromal cells at 5 μ M [78]. It suggests a potential as an anti-osteoporosis agent. Osteoporosis is a major clinical challenge marked by diminished bone density. It is commonly treated through therapies that either inhibit osteoclast activity or promote osteoblast function. Among the tested compounds, (82) and (87) were the most effective, showing 78% and 65% inhibition of adipogenic differentiation in BMSCs, respectively, alongside enhanced mineralization of osteoblasts. Importantly,

these compounds exhibited no significant cytotoxicity ($IC_{50} > 20 \mu M$), further highlighting their potential as safe therapeutic agents [78]. This research points to the promising potential of cyclocitrinol analogs as candidates for osteoporosis treatment, offering a rare example of natural products with osteogenic activity.

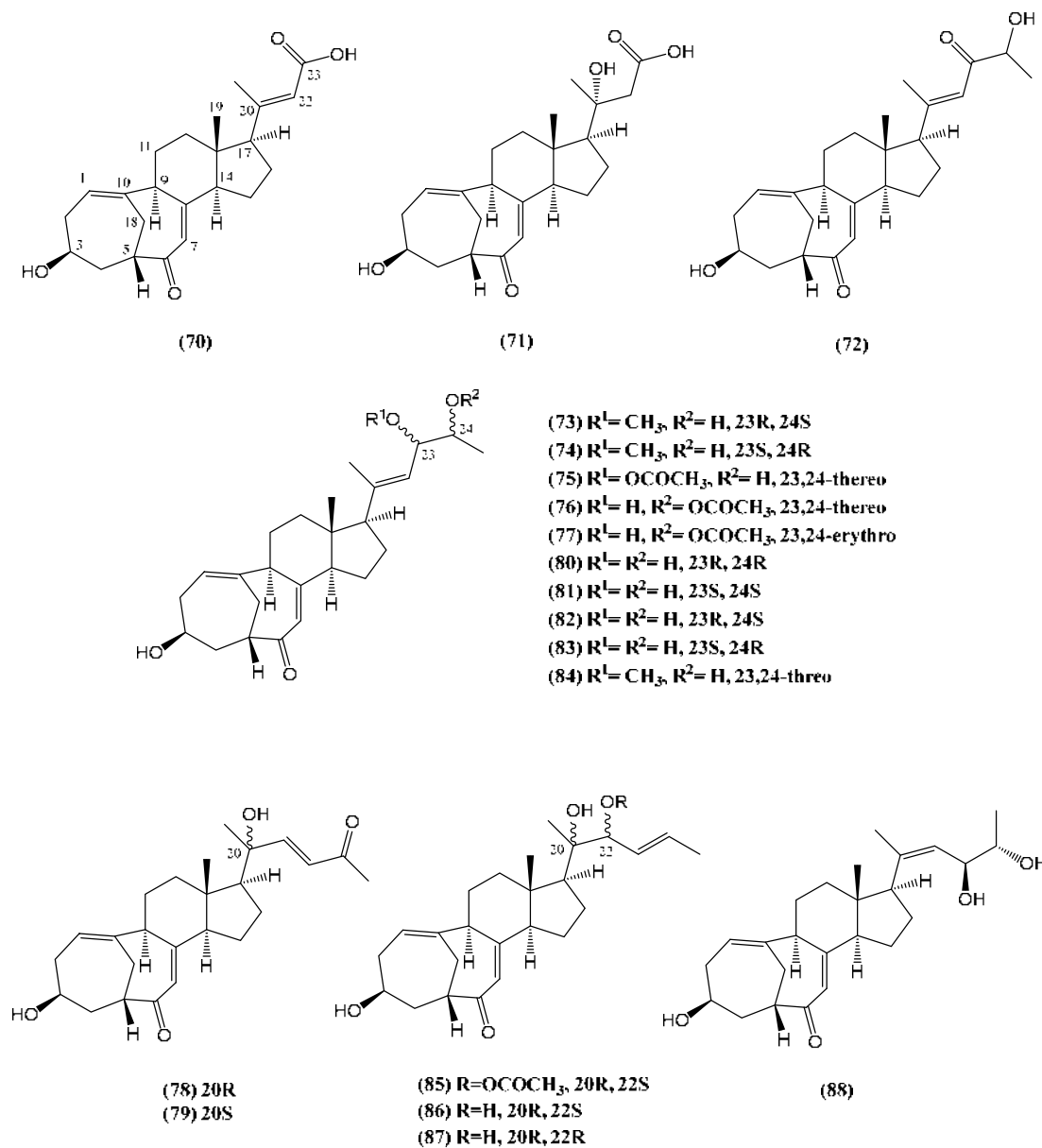
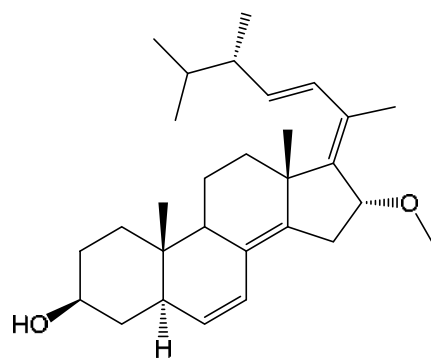
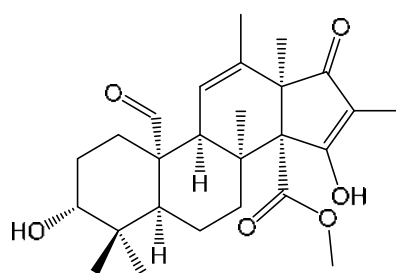


Figure 25. Steroids extracted from the deep-sea-derived fungus *Rhizopus* sp. W23.

Qiao et al. detail the discovery of Asporergosterol (**89**), a novel steroid characterized by an E double bond between C-17 and C-20 (Figure 26) [79]. This compound was isolated from the endophytic fungus *Aspergillus oryzae*, which was found in the marine red alga *Heterosiphonia japonica*. Alongside asporergosterol, four known steroids were also identified: (22E,24R)-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, (22E,24R)-3 β -hydroxyergosta-5,8,22-trien-7-one, (22E,24R)-ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol, and (22E,24R)-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol. The authors suggest that all isolated steroids from *Aspergillus oryzae* showed low activity in modulating acetylcholinesterase [79].

**(89) Asporyergosterol****Figure 26.** Structure of asporyergosterol.

From the fermentation broth of the endophytic fungus *Penicillium oxalicum* HLLG-13, isolated from the roots of the mangrove tree *Lumnitzera littorea*, fifteen secondary metabolites were identified, including the newly discovered steroid andrastin H (**90**) (Figure 27) [80]. The structure of this compound was elucidated using NMR and HR ESI MS spectral analysis, and its absolute configuration was confirmed through quantum chemical electronic circular dichroism (ECD) calculations. Compound (**90**) exhibited potent antibacterial activity, particularly against *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*, with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 6.25 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [80]. The presence of a steroidal framework in this compound suggests a potential mode of action involving membrane disruption or inhibition of key enzymatic pathways in microbial cells.

**(90) Andrastin H****Figure 27.** Structure of andrastin H.

In addition to its antimicrobial properties, andrastin H (**90**) demonstrated significant insecticidal activity against newly hatched larvae of *Helicoverpa armigera*, an important agricultural pest. The compound exhibited an IC_{50} value of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparable to the widely used botanical insecticide azadirachtin [80]. This bioactivity highlights the ecological role of fungal steroids as chemical defense agents and underscores their potential for agricultural applications. The discovery of andrastin H (**90**) adds to the structural diversity of bioactive steroids from fungal sources and reinforces the importance of marine-derived fungi as a reservoir of novel steroidal scaffolds with promising pharmacological and agrochemical applications.

The chemical investigation of a mangrove-derived *Aspergillus* sp. led to the identification of two structurally unique steroids, ergosterdiacids A (**91**) and B (**92**), featuring an unusual 6/6/6/6/5 pentacyclic system (Figure 28) [81]. These compounds were characterized using comprehensive spectroscopic techniques, including 1D and 2D NMR, HR ESI MS, and quantum chemical ECD calculations. Their biosynthetic origin suggests a rare natural Diels–Alder addition. Ergosterdiacids A (**91**) and B (**92**) demonstrated notable biological activity, particularly in the inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* protein

tyrosine phosphatase B (MptpB), a validated target for tuberculosis treatment, with IC_{50} values of 15.1 and 30.1 μM , respectively [81]. Molecular docking analyses suggested that their carboxyl groups play a critical role in binding to key active site residues, similar to the known inhibitor OMTS. This inhibition of MptpB highlights the potential of these steroids as lead compounds for drug development. Beyond their antitubercular properties, both compounds exhibited strong anti-inflammatory activity by suppressing nitric oxide (NO) production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. At concentrations of 4.5 and 3.6 μM , respectively, ergosterdiacids A (**91**) and B (**92**) significantly reduced NO levels without cytotoxic effects. However, at concentrations exceeding 10 μM , partial suppression of macrophage viability was observed, indicating potential cytotoxicity at higher doses [81].

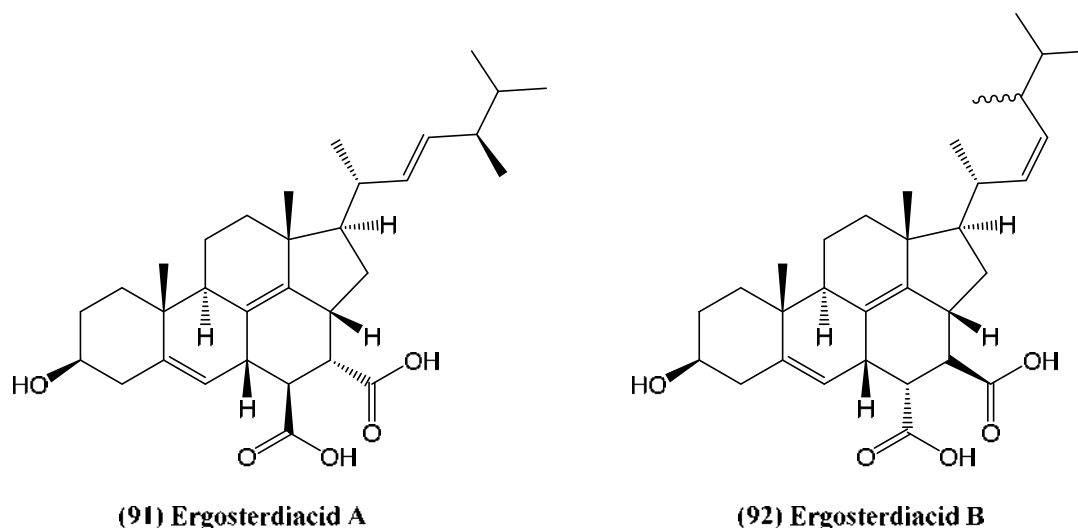


Figure 28. Structure of ergosterdiacids A and B.

The coral-associated fungus *Penicillium oxalicum* HL-44, isolated from *Sinularia gaweli*, produced a new ergostane-type sterol ester (**93**) alongside several structurally related derivatives (Figure 29) [10]. The structure of (**93**) was determined using NMR, HR-MS, and other spectroscopic techniques, revealing a rare modification within the ergosteroid framework. Notably, this is the first report of such a sterol ester from the *Eurotiaceae* family, highlighting its unique biosynthetic origin. Biological evaluation of (**93**) demonstrated significant anti-inflammatory activity in *Raw264.7* macrophage cells [10]. At a concentration of 20 μM , (**92**) reduced *Ifnb1* expression by 67.4%, suggesting strong suppression of the cGAS-STING pathway. Additionally, sterols (**94**) and (**95**) exhibited complementary inhibitory effects on *Tnf α* expression, with reductions of 52.3% and 48.7%, respectively, at the same concentration [10].

Solitumergosterol A (**96**), a unique C30 steroid, was isolated from the deep-sea-derived fungus *Penicillium solitum* MCCC 3A00215 (Figure 30) [11]. Its structure, featuring a 6/6/6/6/5 pentacyclic carbon skeleton, was determined using 1D and 2D NMR, HR ESI MS, and ECD spectra. Compound (**96**) is a Diels–Alder adduct formed through the cyclization of a steroid with an alien motif, likely maleic acid or maleimide. It exhibited weak in vitro antiproliferative activity against MB231 cells, with an inhibition rate of 44.1% at 20 μM , via an RXR α -dependent mechanism [11]. Compound (**96**) attenuates the transcriptional activity of RXR α , as measured using a luciferase reporter assay system. In this experimental setup, the luciferase gene is placed under the control of RXR α -responsive elements, allowing for the quantitative measurement of RXR α -mediated transcription. The results show a relative luciferase activity of 68.6% at 50 μM , which parallels the activity of the positive control, 9-cis-retinoic acid, at 0.1 μM . This decrease in luminescence directly

reflects reduced RXR α -mediated gene transcription, as the light output in this system is proportional to the transcriptional activity of RXR α . When RXR α is activated, it binds to its responsive elements and promotes the transcription of the luciferase gene, resulting in increased luminescence. Conversely, when RXR α activity is attenuated, as observed with compound (96), there is a decrease in luciferase gene transcription, leading to reduced luminescence. This suggests that solitumergosterol A (96) might influence cancer cell proliferation through the retinoid X receptor (RXR) pathway. The observed reduction in RXR α transcriptional activity implies that compound (96) may act as a partial antagonist or modulator of RXR α , which is significant given RXR α 's known roles in various cellular processes, including cell growth, differentiation, and apoptosis. The proposed biosynthetic pathway, which involves a Diels–Alder cycloaddition followed by decarboxylation and aromatization, adds new insights into steroid chemistry, inspiring further research into its chemical and biological synthesis [11]. This unique biosynthetic pathway, coupled with the compound's ability to modulate RXR α activity, opens up possibilities for developing new therapeutic strategies targeting the RXR pathway in cancer treatment.

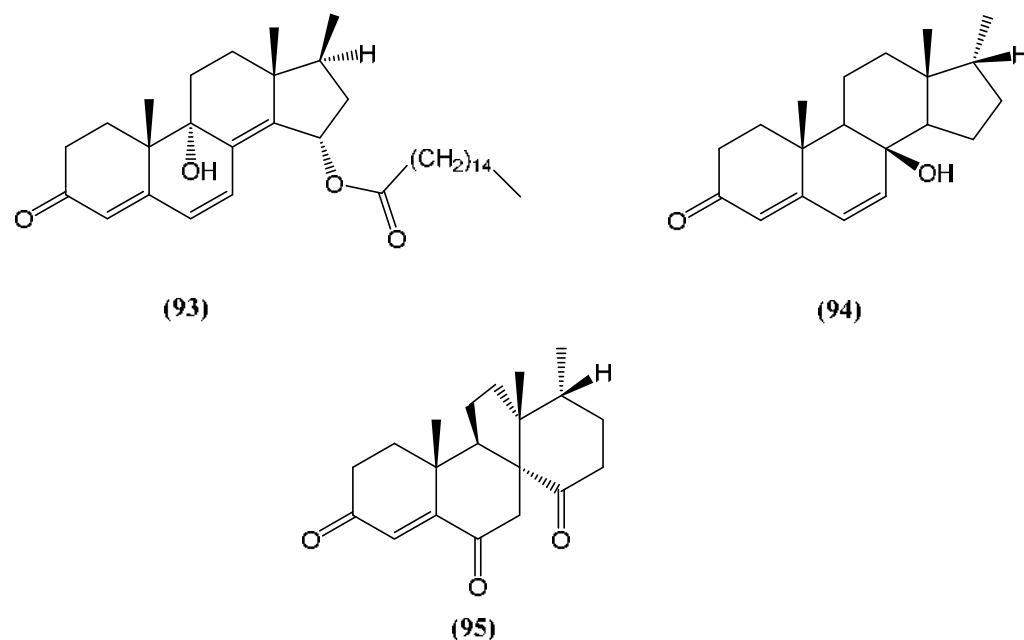


Figure 29. Structure of steroids extracted from *Penicillium oxalicum* HL-44, isolated from *Sinularia gaweli*.

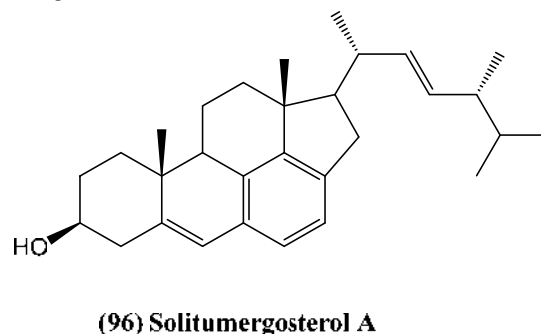


Figure 30. Structure of Solitumergosterol A.

3. Terrestrial Organisms

3.1. Plants

The article “Chenisterol, a New Antimicrobial Steroid from *Chenopodium badachschanicum*” presents the first phytochemical investigation of *Chenopodium badachschanicum*, a

member of the *Chenopodiaceae* family [82]. Several plants from this genus are widely used in traditional medicine. Their secondary metabolites display various pharmacological properties, including antimicrobial, antiviral, antifungal, anthelmintic, antioxidant, trypanocidal, antineoplastic, and immunomodulatory activities [83]. This study led to the isolation of a new steroid named chenisterol (97) (Figure 31). Known compounds such as ergosterol, stigmasterol, and fucosterol were also isolated. The structure of chenisterol was determined using spectroscopic techniques, including HR ESI-MS along with 1D and 2D NMR [82].

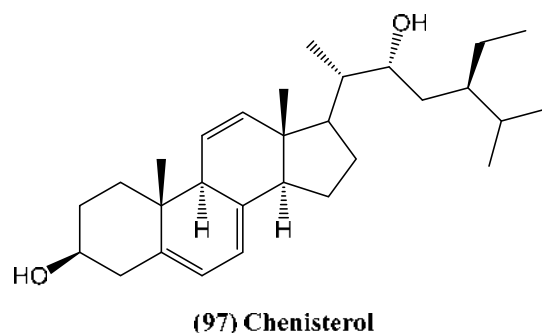


Figure 31. Structure of chenisterol.

Chenisterol exhibited significant antimicrobial activity against three Gram-positive bacterial strains: *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, and *Corynebacterium diphtheriae* [82]. It also showed activity against one Gram-negative strain, *Klebsiella pneumoniae*. These results suggest that chenisterol has potential as a novel antimicrobial agent and warrants further exploration for therapeutic applications.

The chemical investigation of compounds isolated from the roots of *Codonopsis pilosula* var. *modesta* identified a total of 15 compounds, including five steroids: α -spinasterol (99), β -sitosterol (100), stigmasterol, β -sitosterol-3-O-glucoside, and stigmasterol-3-O-glucoside [84]. Additionally, one new tirucallane-type triterpenoid, codopitirol A (98), was isolated and identified (Figure 32). The structures of these steroids and codopitirol A (98) were confirmed using spectroscopic techniques, including HR ESI-MS and 1D/2D NMR [84].

These steroids were evaluated for their α -glucosidase inhibitory activity. Notably, α -spinasterol (99) and β -sitosterol (100) exhibited promising potential as antidiabetic agents [84]. This study emphasizes the importance of steroids in the pharmacological activities of *Codonopsis pilosula*, particularly regarding their potential role as inhibitors of enzymes related to diabetes management. It also highlights the significance of these findings, especially considering that only a few phytochemical investigations have been conducted on *C. pilosula* var. *modesta*.

The discovery of turpesteryl ester (101), a novel steroid isolated from *Ipomoea turpethum* (L.) R.Br., enhances the understanding of bioactive compounds from medicinal plants (Figure 33) [85]. The structure of turpesteryl ester was confirmed through spectroscopic techniques, including 2D NMR. *Ipomoea turpethum*, native to various parts of Asia, is used in traditional Unani and Ayurvedic medicine. It belongs to the *Convolvulaceae* family, which includes about 40 genera and 1200 species of climbing or twining herbaceous plants [86]. The genus *Ipomoea* is well known for its wide distribution in tropical regions. Despite its medicinal relevance, little research has been conducted on its chemical constituents [87]. Previous studies on this species reported only an acrylamide derivative, making this study the first to isolate and characterize turpesteryl ester and other associated compounds [85]. Turpesteryl ester (101) demonstrated significant antibacterial activity against both Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*) bacterial strains, as shown by the agar

well diffusion method [85]. This bioactivity suggests its potential as a natural antibacterial agent. Additionally, positive Salkowski and Lieberman–Burchard tests confirmed the steroidal nature of the compound, while its brisk reaction with dilute NaHCO_3 indicated the presence of a free carboxylic acid group, which may contribute to its biological activity [85].

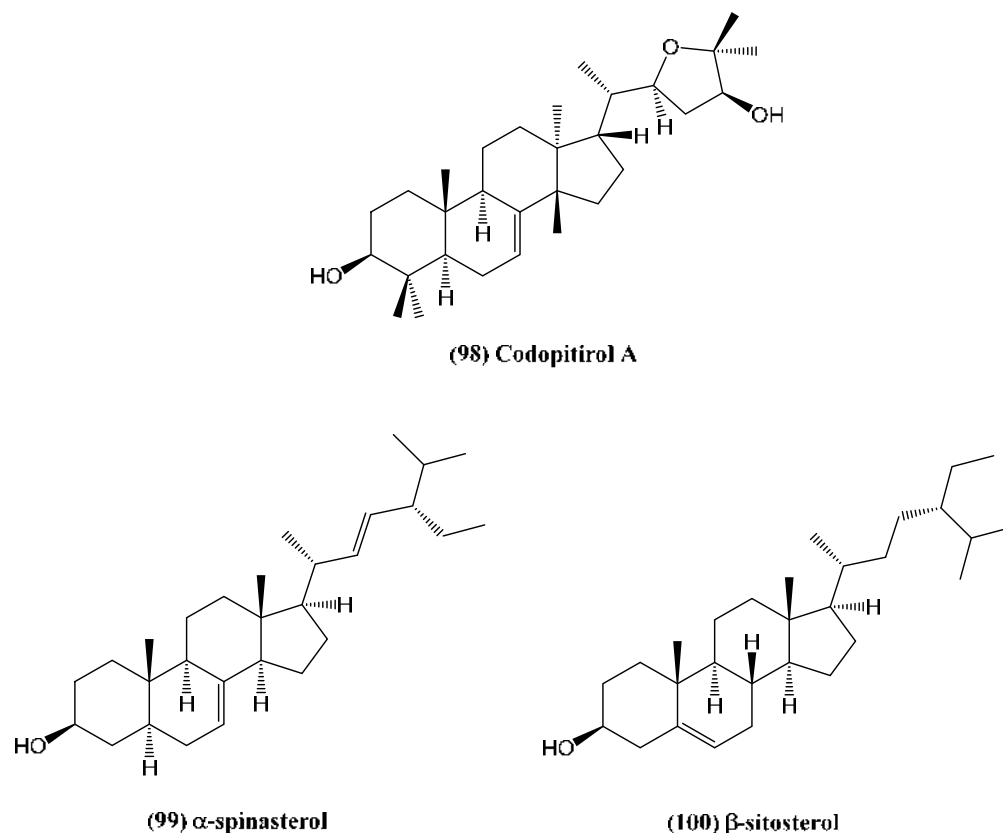


Figure 32. Structures of selected steroids from *Codonopsis pilosula* var. *modesta*.

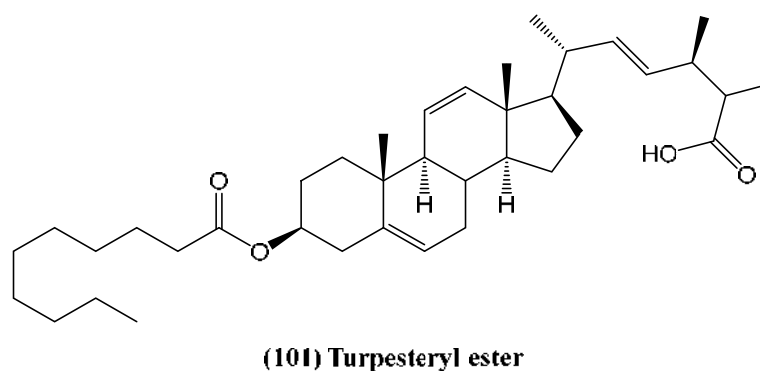
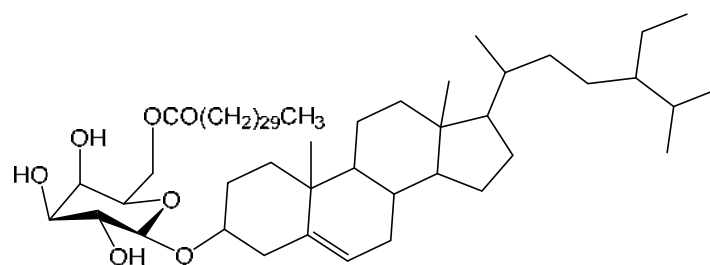


Figure 33. Structure of turpesteryl ester from *Ipomoea turpethum* (L.) R.Br.

Research on *Cyperus rotundus* L. led to the identification of a new steroid glycoside—sitosteryl (6'-hentriacontanoyl)- α -D-galactopyranoside (**102**) (Figure 34) [88]. The structure of this steroid glycoside was determined through 1D and 2D NMR spectroscopic analysis. This analysis revealed it as an ester of sitosterol glycoside attached to a fatty acid. The biological activity of sitosteryl (6'-hentriacontanoyl)- α -D-galactopyranoside (**102**) was notable, demonstrating strong cytotoxicity against L5178y mouse lymphoma cells. It also showed activity in the brine shrimp lethality test, suggesting its potential for further biomedical studies [88].



(102) Sitosteryl (6'-hentriacontanoyl)- α -D-galactopyranoside

Figure 34. New steroid glycoside from *Cyperus rotundus* L.

Investigation of the biologically active compounds from *Fritillaria thunbergii* led to the isolation of steroidal alkaloids (**103–107**) (Figure 35), including two new compounds, Frithunbol A and B (**103–104**) [89]. The structures of these compounds were determined using 1D and 2D NMR spectroscopy along with HR-FAB-MS techniques. The compounds were evaluated for their anti-neuroinflammatory and neuroprotective effects *in vitro* [89].

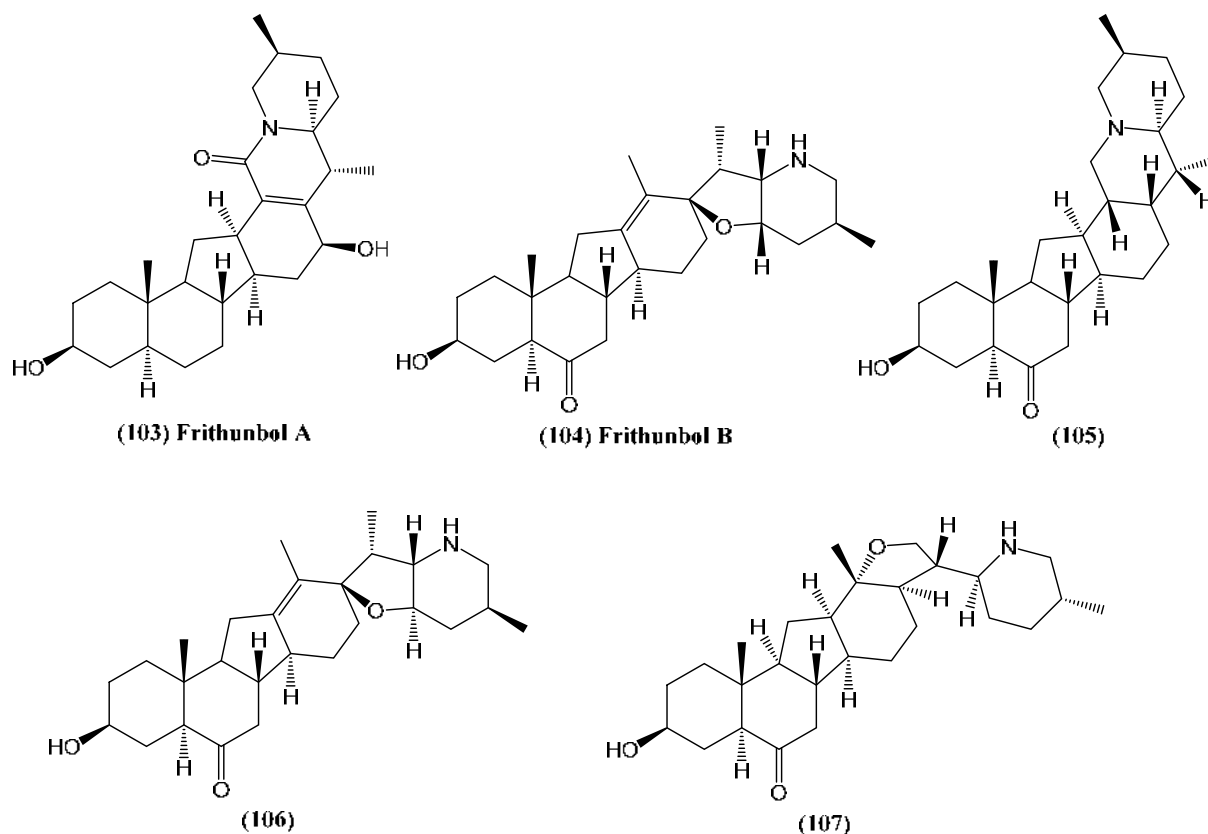


Figure 35. Structures of compounds isolated from *Fritillaria thunbergii*.

The anti-neuroinflammatory effects were tested by measuring nitric oxide (NO) levels in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. Compounds (**103–104**) and (**107**) exhibited significant NO inhibition, with IC_{50} values of 16.35, 11.45, and 18.02 μ M, respectively. These values surpassed the NO inhibition of the positive control, NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), which had an IC_{50} value of 19.45 μ M [89]. Notably, these compounds were non-cytotoxic at a concentration of 20 μ M, indicating selective anti-inflammatory action without harming the cells. The neuroprotective potential of the isolated compounds was assessed by measuring nerve growth factor (NGF) secretion in C6 glioma cells. Compound (**106**) significantly stimulated NGF release, enhancing levels by 134.81% without cytotoxic effects, comparable to the positive control, 6-shogaol, which stimulated

NGF release by 134.08% [89]. These findings suggest that these compounds are potential candidates for further studies on their therapeutic applications in neuroinflammation and neurodegeneration.

Two steroid alkaloids, tomatidine (**108**) and solasodine (**109**), were isolated from the berries of *Solanum aculeastrum*, a medicinal plant traditionally used in South Africa for cancer treatment (Figure 36) [90]. These compounds were evaluated for their anticancer activity against HeLa, MCF7, and HT29 cancer cell lines. The IC_{50} values indicated that both tomatidine and solasodine had the strongest inhibitory effect on HeLa cells. A synergistic effect was observed when the compounds were combined. Cell cycle analysis revealed that tomatidine and solasodine blocked the cell cycle in the G0/G1 phase after 24 h of exposure, increasing the percentage of cells in this phase. However, they showed low apoptotic activity. While both compounds did not induce significant apoptosis, they increased necrotic cell death, particularly at higher concentrations [90].

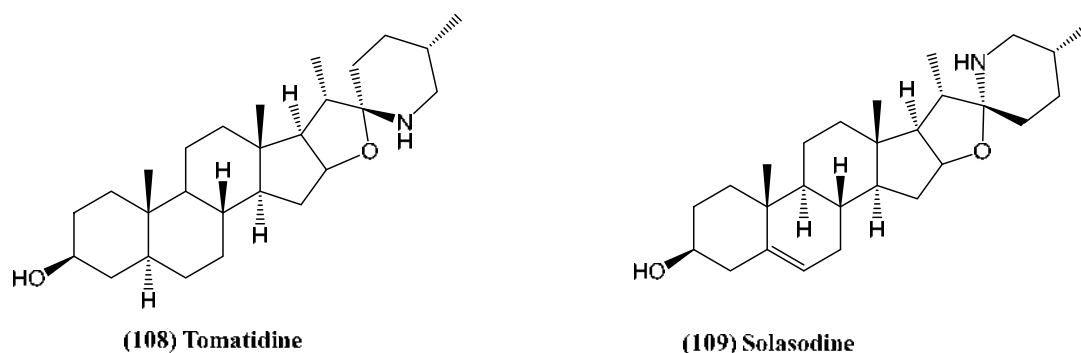


Figure 36. Chemical structures of tomatidine and solasodine.

Researchers investigated the antidiabetic potential of the methanolic extract from the male flowers of *Borassus flabellifer* (*Palmae*) (Figure 37) [91]. This plant, widely distributed and cultivated in tropical Asian countries, has been traditionally utilized for its medicinal properties. The fruit pulp and sap of *B. flabellifer* are commonly used in traditional dishes and as a sweetener for diabetic patients. The study found that the methanolic extract of the male flowers significantly inhibited the increase in serum glucose levels in sucrose-loaded rats when administered orally at a dose of 250 mg/kg. Six new spirostane-type steroid saponins, named borassosides A–F (**110–115**), were isolated from this extract. The structures of borassosides A–F were elucidated through chemical and physicochemical analyses [91].

Additionally, the principal steroid saponin, Dioscin (**116**), was tested and demonstrated an inhibitory effect on serum glucose levels in sucrose-loaded rats at a dose of 50 mg/kg orally [91]. This effect was comparable to or greater than that of metformin hydrochloride, which is recognized for its action on intestinal glucose absorption and peripheral insulin sensitivity. Dioscin's effect surpassed that of metformin hydrochloride in this model. While previous research has identified various steroidal saponins and other constituents from *B. flabellifer*, this study marks the first detailed characterization of the flower parts of the plant [92,93].

Researchers reported the discovery of a new steroid, albosteroid (**117**) (Figure 38) [94]. It was isolated from the *Morus alba*, a plant known for its medicinal properties. This plant has been traditionally used in Asian countries for anti-inflammatory, hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant purposes [95–102]. Compounds were isolated using column chromatography, and their molecular structures were determined through IR, UV, 1H and ^{13}C NMR, and mass spectroscopic analysis [94]. Among the isolated compounds, albosteroid demonstrated significant anti-ulcer activity in two models: pylorus-ligation-

induced and ethanol-induced ulcers. In both models, compound **(117)** substantially reduced the number and severity of ulcers in the stomach [94].

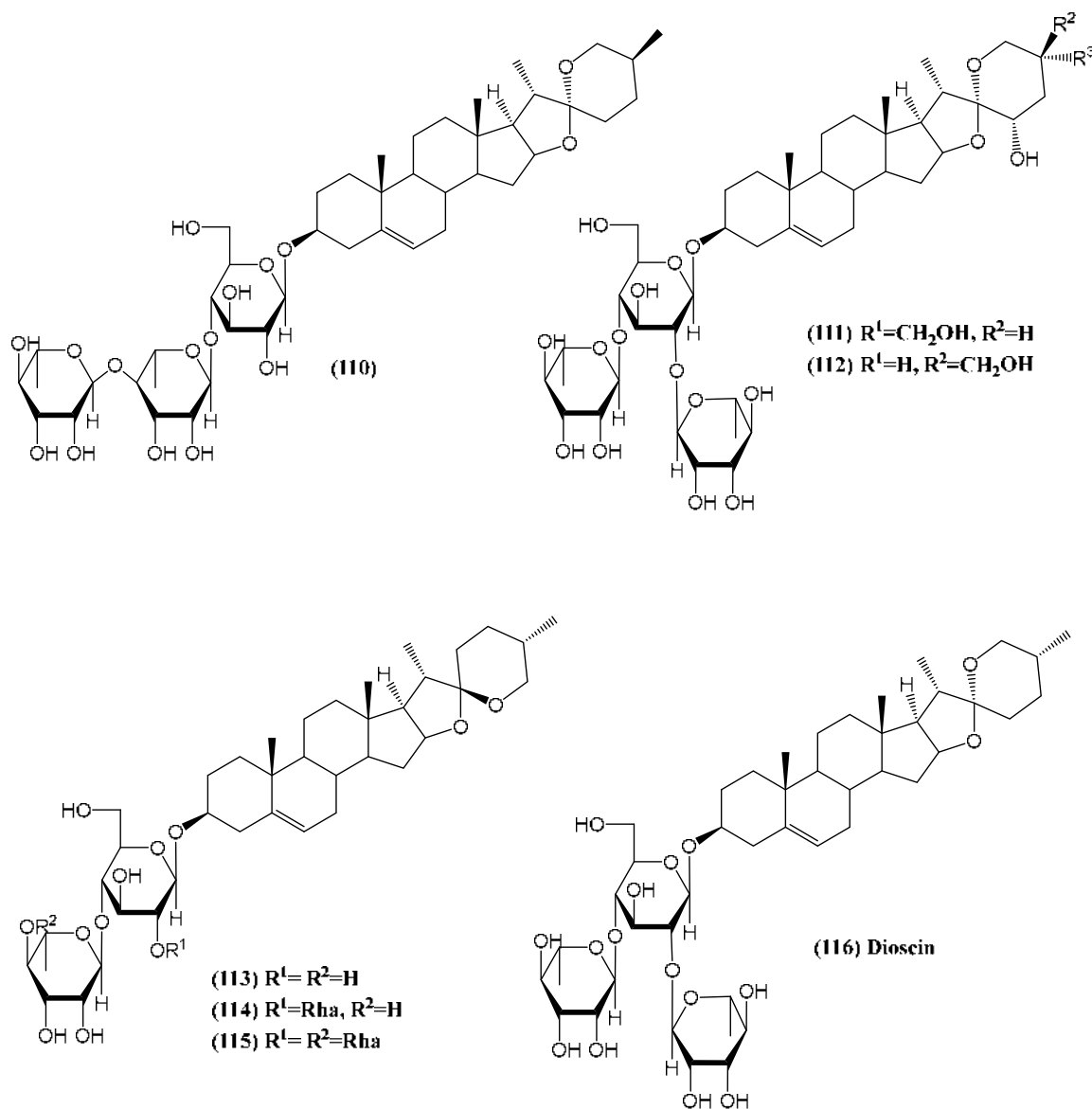
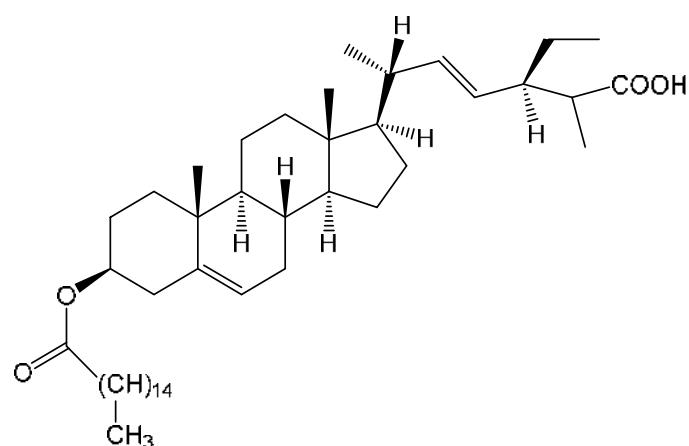


Figure 37. Active compounds from *Borassus flabellifer*.

In animal models, albosteroid **(117)** not only decreased ulcer formation but improved other biochemical markers associated with gastric damage [94]. In the ethanol-induced ulcer model, where alcohol triggers oxidative stress and inflammation, albosteroid **(117)** exhibited dose-dependent protective effects. It enhanced the activity of key antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase, which help neutralize oxidative damage. Compound **(117)** increased levels of reduced glutathione while lowering elevated levels of glutathione reductase and lipid peroxidation, both markers of oxidative stress. The protective effect on the gastric lining was further confirmed by histopathological analysis of stomach tissues from treated animals, which showed significantly less damage in the groups administered albosteroid [94]. The findings indicate the compound's potential not only to prevent ulcer formation but also to reverse oxidative damage caused by ethanol.



(117) Albosteroid

Figure 38. Structure of new steroid isolated from *Morus alba*.

Two new steroids, 29-hydroperoxy-stigmasta-7,24(28)*E*-dien-3 β -ol (**118**) and 24 ξ -hydroperoxy-24-vinyl-lathosterol (**119**) (Figure 39), have been identified from the bark of *Melia azedarach* [103]. The structures of these steroids were elucidated using spectroscopic methods, including ^1H NMR, ^{13}C NMR, and HR ESI MS [103].

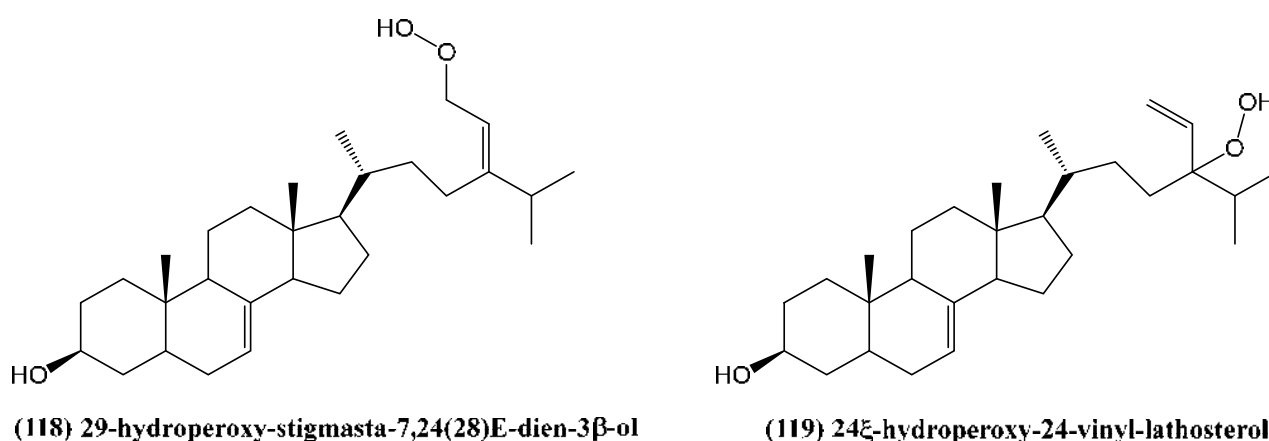
(118) 29-hydroperoxy-stigmasta-7,24(28)*E*-dien-3 β -ol(119) 24 ξ -hydroperoxy-24-vinyl-lathosterol

Figure 39. Structures of new steroids from *Melia azedarach*.

Among the cytotoxic evaluations, compounds (**118**) and (**119**) exhibited significant activity against the human lung cancer cell lines A549 and H460, as well as a human gastric carcinoma cell line, HGC27 [103]. The IC_{50} values ranged from 5.6 to 21.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicating a promising cytotoxic profile and highlighting their potential as anticancer agents [103]. Steroids such as 29-hydroperoxy-stigmasta-7,24(28)*E*-dien-3 β -ol (**118**) and 24 ξ -hydroperoxy-24-vinyl-lathosterol (**119**) are particularly noteworthy due to their novel structural elements, including hydroperoxy groups and vinyl substitutions at C-24.

Five new steroidal saponins were isolated from the fruits of *Tribulus terrestris*, and their structures were fully elucidated through spectroscopic and chemical analysis as (23*S*,25*S*)-5 α -spirostane-24-one-3 β ,23-diol-3-*O*-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-galactopyranoside} (**120**), (24*S*,25*S*)-5 α -spirostane-3 β ,24-diol-3-*O*-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-galactopyranoside} (**121**), 26-*O*- β -D-glucopyranosyl-(25*R*)-5 α -furostan-2 α ,3 β ,22 α ,26-tetraol-3-*O*-{ β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-galactopyranoside} (**122**), 26-*O*- β -D-glucopyranosyl-(25*R*)-5 α -furostan-20(22)-en-2 α ,3 β ,26-triol-3-*O*-{ β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -

D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-galactopyranoside) (**123**), and 26-O-β-D-glucopyranosyl-(25S)-5α-furostan-12-one-22-methoxy-3β,26-diol-3-O-{\alpha-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-β-D-galactopyranoside} (**124**) (Figure 40) [104].

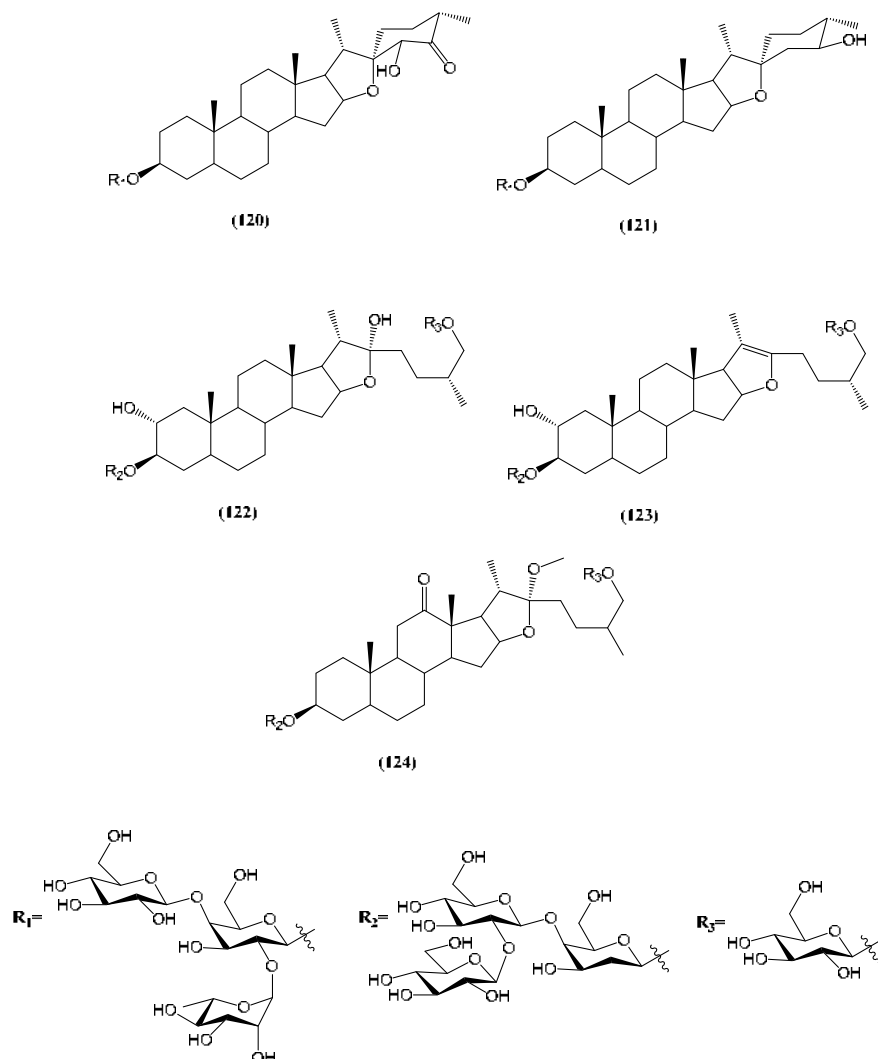


Figure 40. Structures of new steroids from the fruits of *Tribulus terrestris*.

The cytostatic activity of compounds (**120–124**) was evaluated against HL-60 cancer cells, with IC_{50} values of $47.55 \pm 6.7 \mu\text{M}$, $46.87 \pm 2.5 \mu\text{M}$, $46.52 \pm 4.7 \mu\text{M}$, $49.45 \pm 7.2 \mu\text{M}$, and $41.42 \pm 3.4 \mu\text{M}$, respectively [104].

Five years later, another seven new steroidal saponins were isolated from *Tribulus terrestris*, including six furostanol saponins (**125–130**) and one spirostanol saponin (**131**) (Figure 41) [105]. Their structures were fully elucidated using 1D and 2D NMR spectroscopy, mass spectrometry, and chemical methods. These newly identified compounds were evaluated for their platelet aggregation activities. Compounds (**125**), (**126**), and (**128–130**) were tested for their effects on platelet aggregation induced by U46619, a TxA₂ analog, in rat platelets. Tested compounds exhibited weak or no inhibitory effects on U46619-induced platelet aggregation, suggesting that these compounds do not significantly interfere with platelet activation [105].

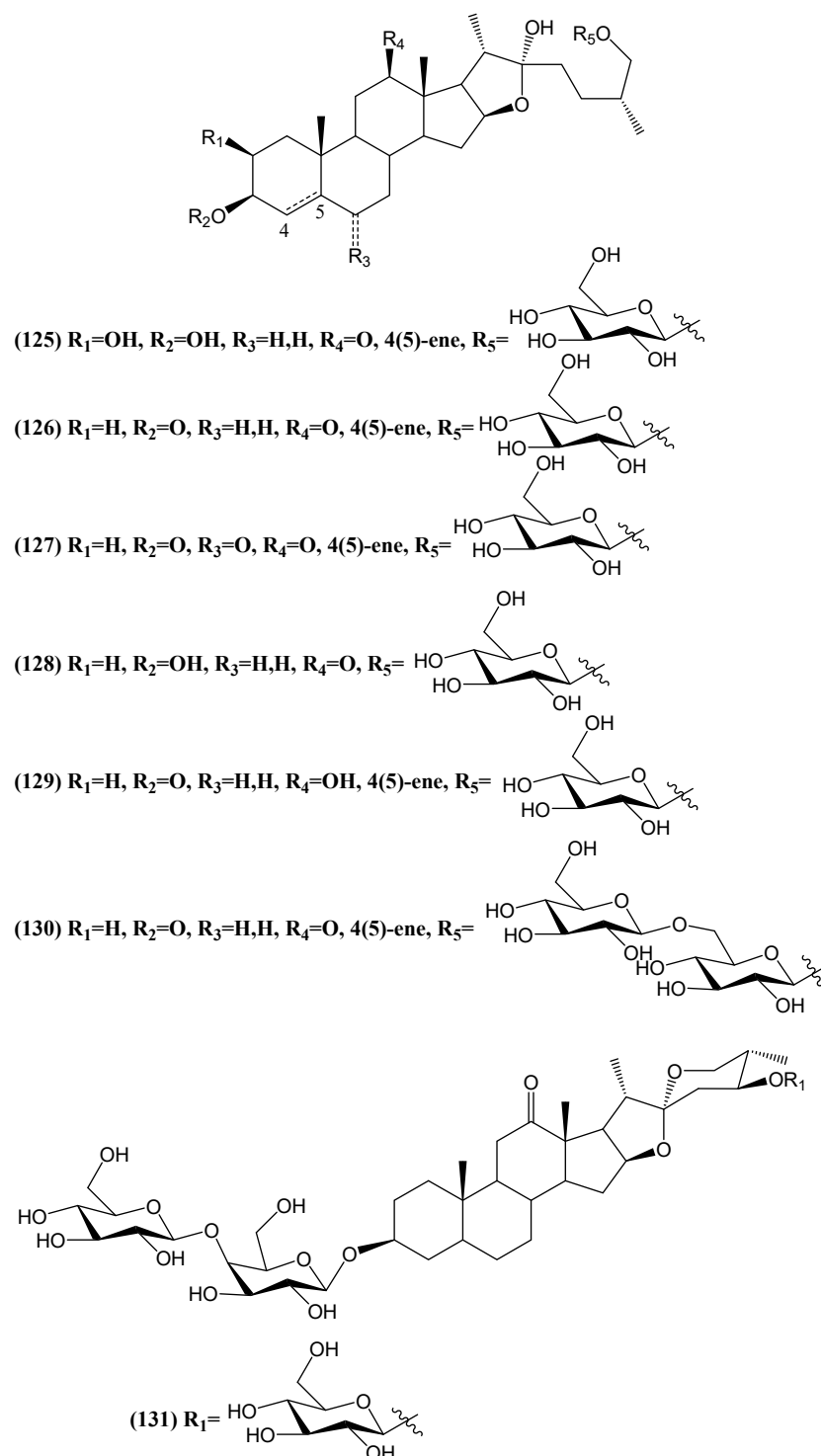


Figure 41. Structures of new steroidal saponins from the fruits of *Tribulus terrestris*.

3.2. Fungi

Two new lanostane triterpenoids (**132**, **133**) and two new ergostane-type steroids (**134**, **135**), along with two known lanostane triterpenoids (**136**, **137**) and one known steroid (**138**), were isolated from the cultured mycelia of *Ganoderma capense* (CGMCC 5.71) (Figure 42) [106]. Their structure was determined by comprehensive spectroscopic analyses, including HR ESI-MS and 1D/2D NMR techniques. *Ganoderma* is a well-known medicinal macrofungus that is widely recognized for its diverse bioactivities, including antineoplastic and immunomodulatory properties [107–114]. Previous studies on *G. capense*

have led to the discovery of novel sesquiterpenoids, motivating further exploration of its secondary metabolites, especially from cultured mycelia, which offer distinct physiological and environmental conditions compared with fruiting bodies [106].

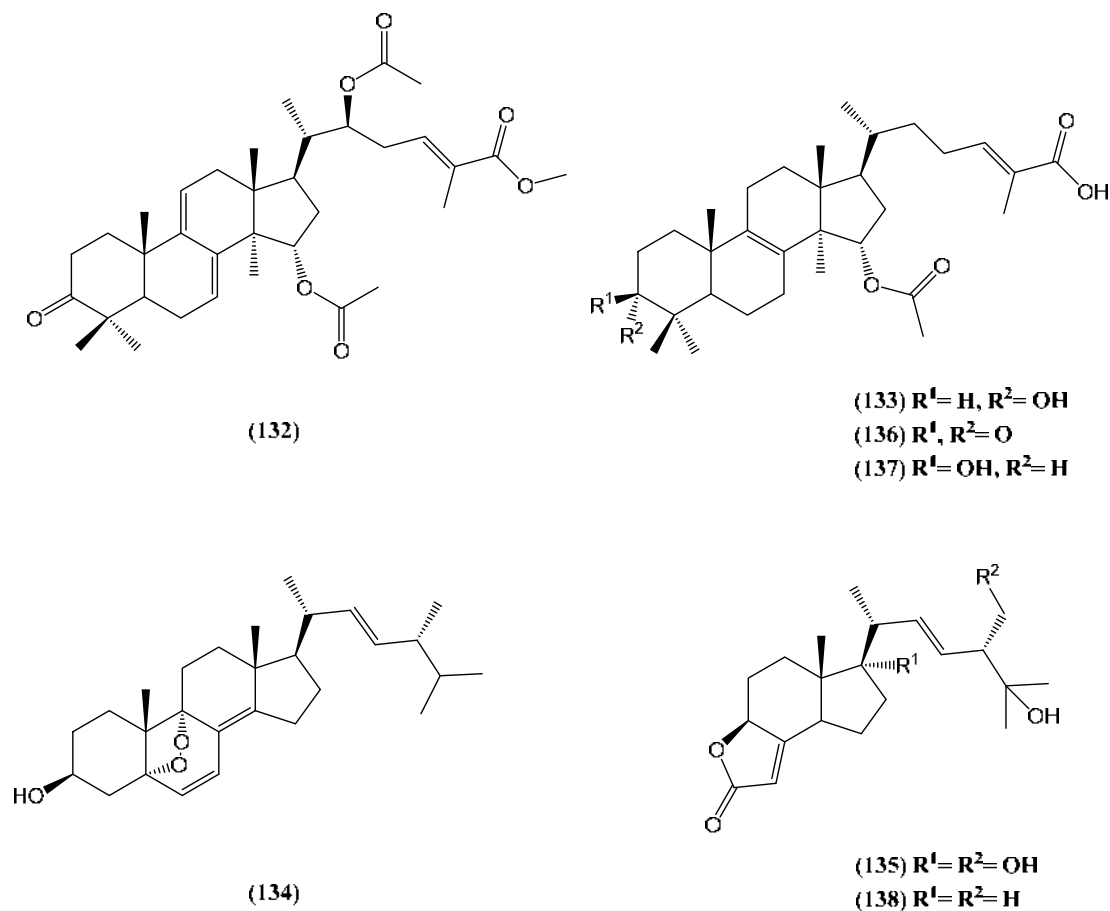


Figure 42. Steroids isolated from cultured mycelia of *Ganoderma capense* (CGMCC 5.71).

Compound (132) displayed moderate cytotoxicity against the human cancer cell line NCI-H1650, with an IC_{50} value of 22.3 μM , while compound (138) exhibited cytotoxic activity against the HCT116 cell line, with an IC_{50} value of 17.4 μM [106]. Additionally, compounds (133, 134) and (136, 137) showed weak anti-HIV activity, with IC_{50} values of 23.5, 46.7, 21.6, and 30.1 μM , respectively. These results highlight the therapeutic potential of the newly identified compounds from *G. capense* [106].

The investigation of *Fomitiporia aethiopica*, a basidiomycete from East Africa, led to the discovery of five new pregnenolone-type steroids, named aethiopinolones A–E (compounds (139–143), respectively) (Figure 43) [115]. These compounds were isolated from the fungal mycelial culture after fermentation on rice, followed by methanol extraction and chromatographic purification. The chemical structures of aethiopinolones A–E were determined with 1D and 2D NMR as well as HR MS data analysis [115].

Pregnenolone-type steroids are uncommon in fungal metabolism, but compounds (139–140) add to the growing list of steroids derived from the *Basidiomycota*, particularly within the *Hymenochaetales* order. While steroids are common in the *Basidiomycota*, they had not previously been reported from the genus *Fomitiporia*. Related compounds have been discovered in various fungus species, including *Phellinus igniarius* and the marine-derived *Phaeosphaeria spartinae*. Additionally, novel pregnenolone-like compounds have been identified in the genus *Fomitiporia* [115–117].

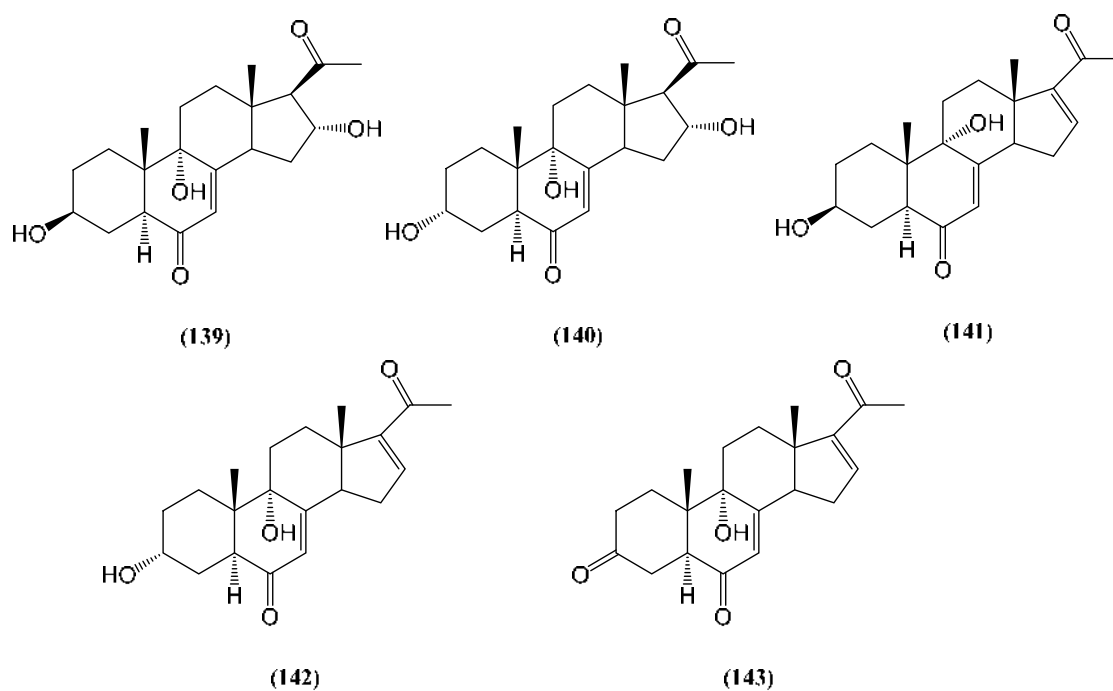
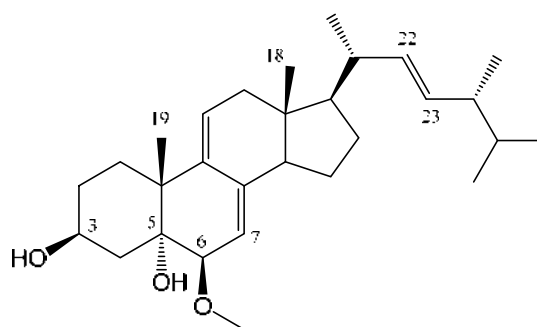


Figure 43. New aethiopinolones from *Fomitiporia aethiopica*.

The biological activity of aethiopinolones A–E (**139–143**) was assessed for cytotoxicity against various mammalian cell lines, including MCF-7, A431, L929, and PC-3. Compounds (**141**) and (**142**) exhibited moderate cytotoxic effects across all tested cell lines [115]. Compound (**139**) showed the strongest cytotoxicity, with an IC_{50} of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against PC-3 cells. Compound (**140**) displayed moderate activity only against the L929 and KB3.1 cell lines, with IC_{50} values of 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. However, none of the compounds exhibited significant antimicrobial or nematocidal activities at tested concentrations (≤ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and ≤ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) [115].

A novel steroid (22*E*,24*R*)-6 β -methoxyergosta-7,9(11),22-triene-3 β ,5 α -diol (**144**) was identified from the Basidiomycota *Ganoderma sinense* as a potent natural inhibitor of hexokinase 2 (HK2) (Figure 44) [118]. HK2 is a key enzyme in the glycolysis pathway that is overexpressed in cancer cells and is a promising target for cancer therapy due to its critical role in tumor growth and metastasis [119–123].



(144) (22*E*,24*R*)-6 β -methoxyergosta-7,9(11),22-triene-3 β ,5 α -diol

Figure 44. Structure of the steroid from *Ganoderma sinense*.

The inhibition of HK2 has garnered significant attention in cancer research due to its critical role in tumor metabolism. HK2 inhibition disrupts the glycolytic pathway, which is crucial for cancer cell survival and proliferation. Studies have shown that HK2 inhibition reduces glucose uptake, decreases lactate production, and impairs tumor growth [124].

In pancreatic cancer, where HK2 is notably overexpressed, inhibition of this enzyme has been associated with decreased anchorage-independent growth and reduced invasive capabilities [125].

Using structure-based virtual ligand screening, compound (144) demonstrated high binding affinity to HK2. This finding was confirmed through microscale thermophoresis (MST), enzyme inhibition assays, and cell-based experiments. Compound (144) inhibited HK2 with an IC_{50} of 2.06 μ M, acting as a non-competitive inhibitor [118]. It reduced the maximal reaction rate (V_{max}) of glucose without significantly affecting the binding affinity (K_m). This mode of inhibition is particularly valuable as it allows for the modulation of enzyme activity without directly competing with the substrate, potentially leading to more selective targeting of cancer cells. The inhibition of HK2 has been shown to effectively disrupt cancer cell metabolism, offering a potential avenue for therapeutic intervention across various cancer types [118].

4. Conclusions

Over the past two decades, research on marine and terrestrial steroids has expanded significantly, revealing remarkable structural diversity and bioactivity. This review highlights that approximately 60–70% of the newly discovered steroids originate from marine sources, reinforcing the role of marine ecosystems as reservoirs of bioactive compounds.

Novel steroidal frameworks, particularly those featuring unique hydroxylation, sulfation, and glycosylation patterns, have demonstrated potent anticancer, antimicrobial, antidiabetic, and immunomodulatory properties. Marine-derived polyhydroxylated steroids have shown cytotoxicity comparable to clinically used drugs, with some compounds exhibiting additional antibacterial and enzyme-inhibitory activities. Notable examples include steroids from *Acanthaster planci* and *Dendrodoris fumata*, which have shown promising effects against cancer cells and pathogenic bacteria. Terrestrial sources have also contributed significant steroidal compounds, such as chenisterol from *Chenopodium badachschanicum*, which exhibited broad-spectrum antimicrobial activity.

Despite these advances, several challenges remain in translating bioactive steroids into clinical applications. Many marine-derived steroids suffer from poor bioavailability and rapid metabolism, limiting their therapeutic potential. Additionally, sustainable access to rare natural steroids poses a challenge, necessitating the development of synthetic and semi-synthetic approaches. Advances in cheminformatics, enzymatic modifications, and AI-driven molecular design offer promising solutions to optimize steroidal frameworks for enhanced efficacy and stability.

Future research should prioritize structure–activity relationship studies and targeted modifications to refine steroidal scaffolds. Synthetic biology and engineered biosynthesis hold great potential for generating complex steroidal architectures with improved bioactivity. The integration of computational modeling, high-throughput screening, and rational drug design will be essential for accelerating the discovery of steroid-based therapeutics.

By merging natural product research with modern synthetic and computational methods, the full pharmacological potential of steroids can be unlocked. This integrated approach will be crucial to addressing global health challenges such as antimicrobial resistance and cancer, paving the way for next-generation steroid-based pharmaceuticals. The diversity and potency of the newly discovered steroids underscore the need for continued exploration and investment in this field.

Author Contributions: Conceptualization, G.H.; methodology, G.H.; formal analysis, G.H.; investigation, G.H.; writing—original draft preparation, G.H.; writing—review and editing, G.H., H.K. and T.P.; visualization, G.H.; supervision, H.K. and T.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding, and no article processing charges (APC) were covered by any funding source.

Data Availability Statement: This review is based on the data available in the cited publications. No new data were generated or analyzed in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Theodorakidou, M.; Nikola, O.; Lambrou, G. The multiple roles of steroids and anabolic steroids and its relations to cardiovascular and musculoskeletal pathology: A brief review. *J. Res. Prev. Med. Sci.* **2018**, *2*, 22–30.
2. Herbert, J. Neurosteroids: A new regulatory function in the nervous system. *J. Psychiatry Neurosci.* **2001**, *26*, 421–422.
3. Auchus, R. Steroid assays, and endocrinology: Best practices for basic scientists. *Endocrinology* **2014**, *155*, 2049–2051.
4. Chapman, K.; Odermatt, A. Steroids: Modulators of inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *120*, 67–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fenchel, D.; Levkovitz, Y.; Vainer, E.; Kaplan, Z.; Zohar, J.; Cohen, H. Beyond the HPA-axis: The role of the gonadal steroid hormone receptors in modulating stress-related responses in an animal model of PTSD. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2015**, *25*, 944–957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cole, T.; Short, K.; Hooper, S. The science of steroids. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2019**, *24*, 170–175.
7. Pugeat, M.; Dunn, J.; Nisula, B. Transport of steroid hormones: Interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1981**, *53*, 69–75. [[PubMed](#)]
8. Taylor, S.; Ayer, J.; Morris, R. Cortical steroids in treatment of cancer; observations on effects of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisone in far advanced cases. *JAMA* **1950**, *144*, 1058–1064.
9. Siminoski, K.; Murphy, R.; Rennert, P.; Heinrich, G. Cortisone, testosterone, and aldosterone reduce levels of nerve growth factor messenger ribonucleic acid in L-929 fibroblasts. *Endocrinology* **1987**, *121*, 1432–1437.
10. Pang, C.; Chen, Y.-H.; Bian, H.-H.; Zhang, J.-P.; Su, L.; Han, H.; Zhang, W. Anti-inflammatory ergosteroid derivatives from the coral-associated fungi *Penicillium oxalicum* HL-44. *Molecules* **2023**, *28*, 7784. [[CrossRef](#)]
11. He, Z.-H.; Xie, C.-L.; Hao, Y.-J.; Xu, L.; Wang, C.-F.; Hu, M.-Y.; Li, S.-J.; Zhong, T.-H.; Yang, X.-W. Solitumergosterol A, a unique 6/6/6/6/5 steroid from the deep-sea-derived *Penicillium solitum* MCCC 3A00215. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 9369–9372. [[PubMed](#)]
12. Qiu, Y.; Chen, S.; Yu, M.; Shi, J.; Liu, J.; Li, X.; Chen, J.; Sun, X.; Huang, G.; Zheng, C. Natural products from marine-derived fungi with anti-inflammatory activity. *Mar. Drugs* **2024**, *22*, 433. [[CrossRef](#)]
13. Xu, M.; Dong, P.; Tian, X.; Wang, C.; Huo, X.; Zhang, B.; Wu, L.; Deng, S.; Ma, X. Drug interaction study of natural steroids from herbs specifically toward human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 and their quantitative structure activity relationship (QSAR) analysis for prediction. *Pharmacol. Res.* **2016**, *110*, 139–150. [[PubMed](#)]
14. Clanton, N.; Hastings, S.; Foults, G.; Contreras, J.; Yee, S.; Arman, H.; Risinger, A.; Frantz, D. Synthesis and biological evaluations of electrophilic steroids inspired by the taccalonolides. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 2534–2543. [[PubMed](#)]
15. Fu, X.; Ferreira, M.; Schmitz, F.; Kelly, M. Tamosterone sulfates: A C-14 epimeric pair of polyhydroxylated sterols from a new *Oceanapiid* sponge genus. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6706–6709.
16. Makarieva, T.; Shubina, L.; Kalinovskiy, A.; Stonik, V.; Elyakov, G. Steroids in porifera. II. Steroid derivatives from two sponges of the family *Halichondriidae*: Sokotrasterol sulfate, a marine steroid with a new pattern of side chain alkylation. *Steroids* **1983**, *42*, 267–281.
17. Moses, T.; Papadopoulou, K.; Osbourn, A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 439–462. [[CrossRef](#)]
18. Dey, P.; Kundu, A.; Chakraborty, H.; Kar, B.; Choi, W.; Lee, B.; Bhakta, T.; Atanasov, A.; Kim, H. Therapeutic value of steroidal alkaloids in cancer: Current trends and future perspectives. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 1731–1744.
19. Jiang, Q.; Chen, M.; Cheng, K.; Yu, P.; Wei, X.; Shi, Z. Therapeutic potential of steroidal alkaloids in cancer and other diseases. *Med. Res. Rev.* **2016**, *36*, 119–143.
20. Lu, Y.; Luo, J.; Kong, L. Steroidal alkaloid saponins and steroidal saponins from *Solanum surattense*. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 668–673. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, X.; Ito, Y.; Liang, J.; Liu, J.; He, J.; Sun, W. Therapeutic effects of total steroid saponin extracts from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright in Freund's complete adjuvant induced arthritis in rats. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *23*, 407–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fuchs, H.; Bachran, D.; Panjideh, H.; Schellmann, N.; Weng, A.; Melzig, M.; Sutherland, M.; Bachran, C. Saponins as tools for improved targeted tumor therapies. *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 140–151. [[CrossRef](#)]

23. Zhang, W.; Guo, Y.; Gu, Y. Secondary metabolites from the South China Sea invertebrates: Chemistry and biological activity. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2041–2090. [[CrossRef](#)]
24. Proksch, P.; Ebel, R.; Edrada, R.; Wray, V.; Steube, K. Bioactive natural products from marine invertebrates and associated fungi. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **2003**, *37*, 117–142.
25. Kobayashi, J. Search for new bioactive marine natural products and application to drug development. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 1079–1083.
26. Gomes, A.; Freitas, A.; Rocha-Santos, T.; Duarte, A. Bioactive compounds derived from echinoderms. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 29365–29382. [[CrossRef](#)]
27. Ha, D.; Kicha, A.; Kalinovsky, A.; Malyarenko, T.; Popov, R.; Malyarenko, O.; Ermakova, S.; Thủy, T.; Long, P.; Ivanchina, N. Asterosaponins from the tropical starfish *Acanthaster planci* and their cytotoxic and anticancer activities in vitro. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *35*, 548–555.
28. Vien, L.; Hanh, T.; Huong, P.; Tu, V.; Thanh, N.; Lyakhova, E.; Cuong, N.; Nam, N.; Kiem, P.; Minh, C.; et al. New steroidal glycosides from the starfish *Acanthaster planci*. *Chem. Nat. Compd.* **2016**, *52*, 1056–1060.
29. Itakura, Y.; Komori, T. Biologically active glycosides from Asteroidea, X. steroid oligoglycosides from the starfish *Acanthaster planci* L., 3. Structures of four new oligoglycoside sulfates. *Eur. J. Org. Chem.* **1986**, *1986*, 499–508.
30. Vien, L.; Hanh, T.; Huong, P.; Dang, N.; Thanh, N.; Lyakhova, E.; Cuong, N.; Nam, N.; Kiem, P.; Kicha, A.; et al. Pyrrole oligoglycosides from the starfish *Acanthaster planci* suppress lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 1654–1657.
31. Hafez, M.; Okbah, M.; Ibrahim, H.; Hussein, A.; Moneim, N.; Ata, A. First report of steroid derivatives isolated from starfish *Acanthaster planci* with anti-bacterial, anti-cancer and anti-diabetic activities. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *36*, 5545–5552. [[PubMed](#)]
32. Huong, P.; Phong, N.; Thao, N.; Binh, P.; Thao, D.; Thanh, N.; Cuong, N.; Nam, N.; Thung, D.; Minh, C. Dendrodoristerol, a cytotoxic C20 steroid from the Vietnamese nudibranch mollusk *Dendrodoris fumata*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2020**, *22*, 193–200. [[PubMed](#)]
33. Pansini, M.; Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mangoni, A. Incisterols, a new class of highly degraded sterols from the marine sponge *Dictyonella incisa*. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3505–3509.
34. Chianese, G.; Sepe, V.; Limongelli, V.; Renga, B.; D'Amore, C.; Zampella, A.; Tagliatalata-Scafati, O.; Fiorucci, S. Incisterols, highly degraded marine sterols, are a new chemotype of PXR agonists. *Steroids* **2014**, *83*, 80–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gavagnin, M.; Carbone, M.; Nappo, M.; Mollo, E.; Roussis, V.; Cimino, G. First chemical study of anaspidean *Syphonota geographica*: Structure of degraded sterols aplykurodinone-1 and -2. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 617–621.
36. Wu, X.; Lin, S.; Zhu, C.; Yue, Z.; Yu, Y.; Zhao, F.; Liu, B.; Dai, J.; Shi, J. Homo- and heptanor-sterols and tremulane sesquiterpenes from cultures of *Phellinus igniarius*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1294–1300.
37. Quang, T.H.; Lee, D.-S.; Han, S.J.; Kim, I.C.; Yim, J.H.; Kim, Y.-C.; Oh, H. Steroids from the cold water starfish *Ctenodiscus crispatus* with cytotoxic and apoptotic effects on human hepatocellular carcinoma and glioblastoma cells. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, *35*, 2335–2340.
38. Xiao, D.-J.; Peng, X.-D.; Deng, S.-Z.; Ma, W.-J.; Wu, H.-M. Structure elucidation of (3E)-Cholest-4-en-3,6-dione-3-oxime in marine sponge *Cinachyrella australiensis* from the South China Sea. *Chin. J. Org. Chem.* **2005**, *25*, 1606–1609.
39. Imperatore, C.; Senese, M.; Aiello, A.; Luciano, P.; Fiorucci, S.; D'Amore, C.; Carino, A.; Menna, M. Phallusiasterol C, A new disulfated steroid from the mediterranean tunicate *Phallusia fumigata*. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 117. [[CrossRef](#)]
40. Kicha, A.A.; Ivanchina, N.V.; Kalinovsky, A.I.; Dmitrenok, P.S.; Stonik, V.A. Structures of new polar sterols from the far-eastern starfish *Ctenodiscus crispatus*. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2005**, *54*, 1266–1271.
41. Festa, C.; de Marino, S.; D'Auria, M.V.; Bifulco, G.; Renga, B.; Fiorucci, S.; Petek, S.; Zampella, A. Solomonsterols A and B from *Theonella swinhoei*. The first example of C-24 and C-23 sulfated sterols from a marine source endowed with a PXR agonistic activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 401–405. [[CrossRef](#)]
42. Tran, T.H.H.; Vien, L.T.; Vinh, L.B.; Thanh, N.V.; Cuong, N.X.; Nam, N.H.; Thung, D.C.; Kiem, P.V.; Minh, C.V. Further highly hydroxylated sterols from the Vietnamese starfish *Archaster typicus*. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 1523–1527.
43. Minale, L.; Riccio, R.; Zollo, F. Structural studies on chemical constituents of echinoderms. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1995**, *15*, 43–110.
44. Dong, G.; Xu, T.; Yang, B.; Lin, X.; Zhou, X.; Yang, X.; Liu, Y. Chemical constituents and bioactivities of starfish. *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 740–791. [[CrossRef](#)]
45. Kicha, A.A.; Ivanchina, N.V.; Huong, T.T.T.; Kalinovsky, A.I.; Dmitrenok, P.S.; Long, P.Q. Minor asterosaponin archasteroside C from the starfish *Archaster typicus*. *Russ. Chem. Bull.* **2010**, *59*, 2133–2136. [[CrossRef](#)]
46. Kicha, A.A.; Ivanchina, N.V.; Huong, T.T.T.; Kalinovsky, A.I.; Dmitrenok, P.S.; Fedorov, S.N.; Dyshlovoy, S.A.; Long, P.Q.; Stonik, V.A. Two new asterosaponins, archasterosides A and B, from the vietnamese starfish *Archaster typicus* and their anticancer properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3826–3830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Yang, X.W.; Chen, X.Q.; Dong, G.; Zhou, X.F.; Chai, X.Y.; Li, Y.Q.; Yang, B.; Zhang, W.D.; Liu, Y. Isolation and structural characterisation of five new and 14 known metabolites from the commercial starfish *Archaster typicus*. *Food Chem.* **2011**, *124*, 1634–1638. [[CrossRef](#)]
48. Ivanchina, N.V.; Kicha, A.A.; Huong, T.T.; Kalinovsky, A.I.; Dmitrenok, P.S.; Agafonova, I.G.; Long, P.Q.; Stonik, V.A. Highly hydroxylated steroids of the starfish *Archaster typicus* from the Vietnamese waters. *Steroids* **2010**, *75*, 897–904.
49. Riccio, R.; Santaniello, M.; Greco, O.S.; Minale, L. Structure elucidation of (22E,24R,25R)-24-methyl-5 α -cholest-22-ene-3 β ,4 β ,5,6 α ,8,14,15 α ,25,26-nonaol and (22E,24S)-24-methyl-5 α -cholest-22-ene-3 β ,4 β ,5,6 α ,8,14,15 α ,25,28-nonaol, minor marine polyhydroxysteroids isolated from the starfish *Archaster typicus*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, *4*, 823–826. [[CrossRef](#)]
50. Mattia, C.A.; Mazzarella, L.; Puliti, R.; Riccio, R.; Minale, L. Structure and stereochemistry of (24R)-27-nor-5 α -cholestane-3 β ,4 β ,5,6 α ,7 β ,8,14,15 α ,24-nonaol: A highly hydroxylated marine steroid from the starfish *Archaster typicus*. *Acta Cryst.* **1988**, *C44*, 2170–2173. [[CrossRef](#)]
51. Riccio, R.; Squillace Greco, O.; Minale, L.; Laurent, D.; Duhet, D. Highly hydroxylated marine steroids from the starfish *Archaster typicus*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1986**, *1*, 665–670. [[CrossRef](#)]
52. Zhang, R.; Lu, Z.; Wang, D.; Yan, Z.; Sun, X.; Li, X.; Yin, X.; Wang, S.; Li, K. Pectiniferosides A–J: Diversified glycosides of polyhydroxy steroids isolated from the sea star *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera*. *Mar. Drugs* **2024**, *22*, 545. [[CrossRef](#)]
53. Ivanchina, N.V.; Kicha, A.A.; Kalinovsky, A.I.; Dmitrenok, P.S.; Stonik, V.A.; Riguera, R.; Jiménez, C. Hemolytic polar steroidal constituents of the starfish *Aphelasterias japonica*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1178–1181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ivanchina, N.V.; Kicha, A.A.; Kalinovsky, A.I.; Dmitrenok, P.S.; Dmitrenok, A.S.; Chaikina, E.L.; Stonik, V.A.; Gavagnin, M.; Cimino, G. Polar steroidal compounds from the far eastern starfish *Henricia leviuscula*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 224–228. [[CrossRef](#)]
55. Chludil, H.D.; Muniain, C.C.; Seldes, A.M.; Maier, M.S. Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the patagonian sea cucumber *Hemoiedema spectabilis*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 860–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kicha, A.A.; Tolkanov, D.K.; Malyarenko, T.V.; Malyarenko, O.S.; Kuzmich, A.S.; Kalinovsky, A.I.; Popov, R.S.; Stonik, V.A.; Ivanchina, N.V.; Dmitrenok, P.S. Sulfated polyhydroxysteroid glycosides from the Sea of Okhotsk starfish *Henricia leviuscula spiculifera* and potential mechanisms for their observed anti-cancer activity against several types of human cancer cells. *Mar. Drugs* **2024**, *22*, 294. [[CrossRef](#)]
57. Kicha, A.A.; Malyarenko, T.V.; Kuzmich, A.S.; Malyarenko, O.S.; Kalinovsky, A.I.; Popov, R.S.; Tolkanov, D.K.; Ivanchina, N.V. Rare ophiuroid-type steroid 3 β ,21-, 3 β ,22-, and 3 α ,22-disulfates from the slime sea star *Pteraster marsippus* and their colony-inhibiting effects against human breast cancer cells. *Mar. Drugs* **2024**, *22*, 43. [[CrossRef](#)]
58. Kicha, A.A.; Kalinovsky, A.I.; Malyarenko, T.V.; Malyarenko, O.S.; Ermakova, S.P.; Popov, R.S.; Stonik, V.A.; Ivanchina, N.V. Disulfated ophiuroid type steroids from the far eastern starfish *Pteraster marsippus* and their cytotoxic activity on the models of 2D and 3D cultures. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Malyarenko, T.V.; Kicha, A.A.; Malyarenko, O.S.; Zakharenko, V.M.; Kotlyarov, I.P.; Kalinovsky, A.I.; Popov, R.S.; Svetashev, V.I.; Ivanchina, N.V. New conjugates of polyhydroxysteroids with long-chain fatty acids from the deep-water far eastern starfish *Ceramaster patagonicus* and their anticancer activity. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 260. [[CrossRef](#)]
60. Tian, X.-R.; Gao, Y.-Q.; Tian, X.-L.; Li, J.; Tang, H.-F.; Li, Y.-S.; Lin, H.-W.; Ma, Z.-Q. New cytotoxic secondary metabolites from marine bryozoan *Cryptosula pallasiana*. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 120. [[CrossRef](#)]
61. Cao, F.; Liu, H.-Y.; Zhao, J.; Fang, Y.-C.; Wang, C.-Y. New 19-oxygenated steroid from the South China Sea gorgonian *Dichotella gemmacea*. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 169–173.
62. Tsai, C.-R.; Huang, C.-Y.; Chen, B.-W.; Tsai, Y.-Y.; Shih, S.-P.; Hwang, T.-L.; Dai, C.-F.; Wang, S.-Y.; Sheu, J.-H. New bioactive steroids from the soft coral *Klyxum flaccidum*. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 12546–12554.
63. Ninh, T.N.; Huong, P.T.M.; Thanh, N.V.; Chi, N.T.P.; Dang, N.H.; Cuong, N.X.; Nam, N.H.; Thung, D.C.; Kiem, P.V.; Minh, C.V. Cytotoxic steroids from the Vietnamese soft coral *Sinularia conferta*. *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, *65*, 300–305.
64. Liu, J.; Wu, X.; Yang, M.; Gu, Y.-C.; Yao, L.-G.; Huan, X.-J.; Miao, Z.-H.; Luo, H.; Guo, Y.-W. Erectsterates A and B, a pair of novel highly degraded steroid derivatives from the South China Sea soft coral *Sinularia erecta*. *Steroids* **2020**, *161*, 108681. [[PubMed](#)]
65. Choi, J.-H.; Ogawa, A.; Abe, N.; Masuda, K.; Koyama, T.; Yazawa, K.; Kawagishi, H. Chaxines B, C, D, and E from the edible mushroom *Agrocybe chaxingu*. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9850–9853.
66. Shaaban, M.; Shaaban, K.A.; Ghani, M.A. Hurgadacin: A new steroid from *Sinularia polydactyla*. *Steroids* **2013**, *78*, 866–873. [[CrossRef](#)]
67. Mohammed, R.; Seliem, M.A.E.; Mohammed, T.A.A.; Abed-Elfatah, A.; Abo-Youssef, A.M.; Thabet, M.M. Bioactive secondary metabolites from the Red Sea soft coral *Heteroxenia fuscescens*. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* **2012**, *4*, 15–27.
68. Coll, J.C. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 613–631.
69. Shaaban, M.; Shaaban, K.A.; Abd-Alla, H.I.; Hanna, A.G.; Laatsch, H. Dendrophén, a novel glycyrrhetyl amino acid from *Dendronephthya hemprichi*. *Z. Naturforsch. B* **2011**, *66*, 1199–1207.
70. Ghandourah, M.A. Cytotoxic Ketosteroids from the Red Sea Soft Coral *Dendronephthya* sp. *Open Chem.* **2023**, *21*, 20220327.

71. Abdel-Lateff, A.; Alarif, W.M.; Asfour, H.Z.; Ayyad, S.-E.N.; Khedr, A.; Badria, F.A.; Al-Lihaibi, S.S. Cytotoxic effects of three new metabolites from Red Sea marine sponge, *Petrosia* sp. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *37*, 928–935. [[PubMed](#)]
72. Alarif, W.M.; Abdel-Lateff, A.; Al-Lihaibi, S.S.; Ayyad, S.-E.N.; Badria, F.A.; Alsofyani, A.A.; Abou-Elnaga, Z.S. Marine bioactive steryl esters from the Red Sea black coral *Antipathes dichotoma*. *CLEAN Soil Air Water* **2013**, *41*, 1116–1121. [[CrossRef](#)]
73. Al-Lihaibi, S.S.; Ayyad, S.-E.N.; Shaher, F.; Alarif, W.M. Antibacterial sphingolipid and steroids from the black coral *Antipathes dichotoma*. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 1635–1638.
74. Mohamed, G.A.; Abd-Elrazek, A.E.E.; Hassanean, H.A.; Youssef, D.T.A.; Soest, R. New compounds from the Red Sea marine sponge *Echinoclathria gibbosa*. *Phytochem. Lett.* **2014**, *9*, 51–58.
75. Jia, T.Z.; Liu, H.B.; Fang, Y.C.; Zhu, T.J.; Gu, Q.Q.; Zhu, W.M. Advances in secondary metabolites of fungi isolated from the marine alga. *Chin. J. Antibiot.* **2006**, *31*, 328–334.
76. König, G.M.; Kehraus, S.; Seibert, S.F.; Abdel-Lateff, A.; Müller, D. Natural products from marine organisms and their associated microbes. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 229–238.
77. Bugni, T.S.; Ireland, C.M. Marine-Derived Fungi: A chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 143–163. [[CrossRef](#)]
78. He, Z.-H.; Xie, C.-L.; Wu, T.; Yue, Y.-T.; Wang, C.-F.; Xu, L.; Xie, M.-M.; Zhang, Y.; Hao, Y.-J.; Xu, R.; et al. Tetracyclic steroids bearing a bicyclo[4.4.1] ring system as potent antiosteoporosis agents from the deep-sea-derived fungus *Rhizopus* sp. W23. *J. Nat. Prod.* **2022**, *86*, 157–165. [[CrossRef](#)]
79. Qiao, M.-F.; Ji, N.-Y.; Liu, X.-H.; Li, F.; Xue, Q.-Z. Asporierygosterol, a new steroid from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1575–1578. [[CrossRef](#)]
80. Wang, Y.; Chen, W.; Xu, Z.; Bai, Q.; Zhou, X.; Zheng, C.; Bai, M.; Chen, G. Biological secondary metabolites from the Lumnitzera littorea-derived fungus *Penicillium oxalicum* HLLG-13. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 22. [[CrossRef](#)]
81. Liu, Z.; Dong, Z.; Qiu, P.; Wang, Q.; Yan, J.; Lu, Y.; Wasu, P.A.; Hong, K.; She, Z. Two new bioactive steroids from a mangrove-derived fungus *Aspergillus* sp. *Steroids* **2018**, *140*, 32–38. [[CrossRef](#)]
82. Afaq, S.; Fatima, I.; Inamullah, F.; Khan, S.; Kazmi, M.H.; Malik, A.; Tareen, R.B.; Ali, M.S.; Farhad, M.Z.; Abbas, T. Chenisterol, a new antimicrobial steroid from *Chenopodium badachschanicum*. *Chem. Nat. Compd.* **2018**, *54*, 710–713. [[CrossRef](#)]
83. Kokanova-Nedialkova, Z.; Nedialkov, P.T.; Nikolov, S.D. The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. *Phcog. Rev.* **2009**, *3*, 280–306.
84. Li, B.; Wang, R.-Y.; Wang, M.-J.; Hu, F.-D.; Fei, D.-Q.; Zhang, Z.-X. Triterpenoids, steroids, and other constituents from the roots of *Codonopsis pilosula* var. *modesta*. *Chem. Nat. Compd.* **2022**, *58*, 611–615. [[CrossRef](#)]
85. Arif, Z.; Khan, S.; Farheen, S.; Kazmi, M.H.; Fatima, I.; Malik, A.; Ali, M.S.; Inamullah, F.; Afaq, S.; Shaikh, S.A.; et al. Turpesteryl ester, a new antibacterial steroid from *Ipomoea turpethum*. *Chem. Nat. Compd.* **2020**, *56*, 197–201. [[CrossRef](#)]
86. Austin, D.F.; Huaman, Z. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. *Taxon* **1996**, *45*, 399–419. [[CrossRef](#)]
87. Harun-Or-Rashid, M.; Gafur, M.A.; Sadik, M.G.; Rahman, M.A.A. Biological activities of a new acrylamide derivative from *Ipomoea turpethum*. *Pak. J. Biol. Sci.* **2002**, *5*, 968–971. [[CrossRef](#)]
88. Sayed, H.M.; Mohamed, M.H.; Farag, S.F.; Mohamed, G.A.; Proksch, P. A new steroid glycoside and furochromones from *Cyperus rotundus* L. *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21*, 343–350. [[CrossRef](#)]
89. Suh, W.S.; Lee, S.Y.; Park, J.E.; Kim, D.H.; Kim, S.Y.; Lee, K.R. Two new steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria thunbergii*. *Heterocycles* **2018**, *96*, 921–930.
90. Koduru, S.; Grierson, D.S.; van de Venter, M.; Afolayan, A.J. Anticancer activity of steroid alkaloids isolated from *Solanum aculeastrum*. *Pharm. Biol.* **2007**, *45*, 613–618. [[CrossRef](#)]
91. Yoshikawa, M.; Xu, F.; Morikawa, T.; Pongpiriyadacha, Y.; Nakamura, S.; Asao, Y.; Kumahara, A.; Matsuda, H. Medicinal Flowers. XII.1) New spirostane-type steroid saponins with antidiabetogenic activity from *Borassus flabellifer*. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 308–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Jansz, E.; Nikawela, J.K.; Theivendirarajah, K. Studies on the bitter principle and debittering of *Palmyrah* fruit pulp. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *65*, 185–189. [[CrossRef](#)]
93. Ariyasena, D.D.; Jansz, E.R.; Abeysekera, A. Some studies directed at increasing the potential use of palmyrah (*Borassus flabellifer* L) fruit pulp. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 1347–1352. [[CrossRef](#)]
94. Ahmad, A.; Gupta, G.; Afzal, M.; Kazmi, I.; Anwar, F. Antiulcer and antioxidant activities of a new steroid from *Morus alba*. *Life Sci.* **2013**, *92*, 202–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Singab, A.N.; El-Beshbishy, H.A.; Yonekawa, M.; Nomura, T.; Fukai, T. Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: Effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 333–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Lee, Y.J.; Choi, D.H.; Kim, E.J.; Kim, H.Y.; Kwon, T.O.; Kang, D.G.; Lee, H.S. Hypotensive, hypolipidemic, and vascular protective effects of *Morus alba* L. in rats fed an atherogenic diet. *Am. J. Chin. Med.* **2011**, *39*, 39–52. [[CrossRef](#)]

97. Kim, S.H.; Kim, N.J.; Choi, J.S.; Park, J.C. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **1993**, *22*, 68–72. [[CrossRef](#)]
98. Arabshahi-Delouee, S.; Urooj, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem.* **2007**, *102*, 1233–1240. [[CrossRef](#)]
99. Wattanapitayakul, S.K.; Chularojmontri, L.; Herunsalee, A.; Charuchong-kolwongse, S.; Niumsakul, S.; Bauer, J.A. Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *96*, 80–87. [[CrossRef](#)]
100. Choi, E.M.; Hwang, J.K. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 608–613. [[CrossRef](#)]
101. Niidome, T.; Takahashi, K.; Goto, Y.; Goh, S.M.; Tanaka, N.; Kamei, K. Mulberry leaf extract prevents amyloid beta-peptide fibril formation and neurotoxicity. *Neuroreport* **2007**, *18*, 813–816. [[PubMed](#)]
102. Ameen, A.M.; Hapipah, M.A.; Abdul, A.K.; Mohd, N.S.; Salmah, I. Evaluation of the antiulcer activities of *Morus alba* extracts in experimentally induced gastric ulcer in rats. *Biomed. Res.* **2009**, *20*, 35–39.
103. Wu, S.-B.; Bao, Q.-Y.; Wang, W.-X.; Zhao, Y.; Xia, G.; Zhao, Z.; Zeng, H.; Hu, J.-F. Cytotoxic triterpenoids and steroids from the bark of *Melia azedarach*. *Planta Med.* **2011**, *77*, 922–928. [[CrossRef](#)]
104. Su, L.; Chen, G.; Feng, S.-G.; Wang, W.; Li, Z.-F.; Chen, H.; Pei, Y.-H. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. *Steroids* **2009**, *74*, 399–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Kang, L.-P.; Wu, K.-L.; Yu, H.-S.; Pang, X.; Liu, J.; Han, L.-F.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Xiong, C.-Q.; Song, X.-B.; et al. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. *Phytochemistry* **2014**, *107*, 182–189. [[PubMed](#)]
106. Tan, Z.; Zhao, J.-L.; Liu, J.-M.; Zhang, M.; Chen, R.-D.; Xie, K.-B.; Chen, D.-W.; Dai, J.-G. Lanostane triterpenoids and ergostane-type steroids from the cultured mycelia of *Ganoderma capense*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2018**, *20*, 844–851.
107. Hen, S.; Xu, J.; Liu, C.; Zhu, Y.; Nelson, D.R.; Zhou, S.; Li, C.; Wang, L.; Guo, X.; Sun, Y.; et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 913.
108. Müller, C.I.; Kumagai, T.; O’Kelly, J.; Seeram, N.P.; Heber, D.; Koeffler, H.P. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leuk. Res.* **2006**, *30*, 841–848.
109. Lu, Q.Y.; Jin, Y.S.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Heber, D.; Go, V.L. *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. *Cancer Lett.* **2004**, *216*, 9–20.
110. Isaka, M.; Chinthanom, P.; Sappan, M.; Danwisetkanjana, K.; Boonpratuang, T.; Choeyklin, R. Antitubercular lanostane triterpenes from cultures of the Basidiomycete *Ganoderma* sp. BCC 16642. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 161–169. [[CrossRef](#)]
111. Min, B.S.; Nakamura, N.; Miyashiro, H.; Bae, K.W.; Hattori, M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 Protease. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1607–1612. [[CrossRef](#)]
112. Kim, H.W.; Shim, M.J.; Choi, E.C.; Kim, B.K. Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus-1 by water-soluble extract of *Ganoderma lucidum*. *Arch. Pharm. Res.* **1997**, *20*, 425–431. [[CrossRef](#)]
113. Ma, H.-T.; Hsieh, J.-F.; Chen, S.-T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **2015**, *114*, 109–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Adams, M.; Christen, M.; Pletzko, I.; Zimmermann, S.; Brun, R.; Kaiser, M.; Hamburger, M. Antiplasmodial lanostanes from the *Ganoderma lucidum* mushroom. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 897–900. [[CrossRef](#)]
115. Chepkirui, C.; Sum, W.C.; Cheng, T.; Matasyoh, J.C.; Decock, C.; Stadler, M. Aethiopinolones A–E, new pregnenolone type steroids from the East African Basidiomycete *Fomitiporia aethiopica*. *Molecules* **2018**, *23*, 369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Mahmoud, F.E.; Kehraus, S.; König, G.M. Caught between triterpene- and steroid-metabolism: 4a-Carboxylic pregnane-derivative from the marine alga-derived fungus *Phaeosphaeria spartinae*. *Steroids* **2013**, *78*, 880–883.
117. Yin, R.; Zhao, Z.; Ji, X.; Dong, Z.; Li, Z.; Feng, T.; Liu, J. Steroids and sesquiterpenes from cultures of the fungus *Phellinus igniarius*. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2015**, *5*, 17–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Bao, F.; Yang, K.; Wu, C.; Gao, S.; Wang, P.; Chen, L.; Li, H. New natural inhibitors of hexokinase 2 (HK2): Steroids from *Ganoderma sinense*. *Fitoterapia* **2018**, *125*, 123–129. [[CrossRef](#)]
119. Mathupala, S.P.; Ko, Y.H.; Pedersen, P.L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer’s stygian link to the “Warburg effect” and a pivotal target for effective therapy. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 17–24. [[CrossRef](#)]
120. Tan, V.P.; Miyamoto, S. HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. *Autophagy* **2015**, *11*, 963–964. [[CrossRef](#)]
121. Krasnov, G.S.; Dmitriev, A.A.; Lakunina, V.A.; Kirpiy, A.A.; Kudryavtseva, A.V. Targeting VDAC-bound hexokinase II: A promising approach for concomitant anticancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2013**, *17*, 1221–1233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Ros, S.; Schulze, A. Glycolysis back in the limelight: Systemic targeting of HK2 blocks tumor growth. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 1105–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

123. Patra, K.C.; Wang, Q.; Bhaskar, P.T.; Miller, L.; Wang, Z.; Wheaton, W.; Chandel, N.; Laakso, M.; Muller, W.J.; Allen, E.L. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 213–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Wang, L.; Zhang, R.-K.; Sang, P.; Xie, Y.-X.; Zhang, Y.; Zhou, Z.-H.; Wang, K.-K.; Zhou, F.-M.; Ji, X.-B.; Liu, W.-J.; et al. HK2 and LDHA upregulation mediate hexavalent chromium-induced carcinogenesis, cancer development and prognosis through miR-218 inhibition. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2024**, *279*, 116500. [[CrossRef](#)]
125. Wang, X.; Ma, M.; Shao, S.; Xu, X.; Qin, C.; Gao, R.; Zhang, Z. TWIST1 Regulates HK2 ubiquitination degradation to promote pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Cell Int.* **2025**, *25*, 37. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Formylated Bile Acid–Steroid Conjugates: Synthesis, Antifungal Properties, and *In Silico* Studies

Grzegorz Hajdaś,* Damian Kułaga, Hanna Koenig, Justyna Starzyk, Vladislav Maliugin, and Tomasz Pospieszny



Cite This: *ACS Omega* 2025, 10, 60152–60161



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

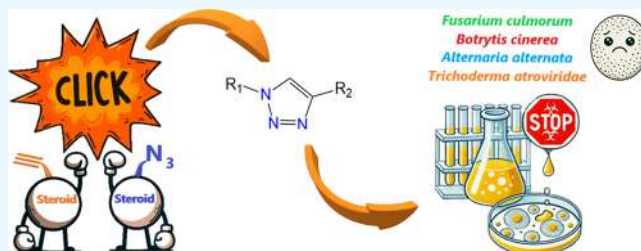


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Fungal infections caused by *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum* (*F. culmorum*), and *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) pose significant risks to agriculture and human health. The emergence of fungicide resistance underscores the need for new antifungal agents. Bile acid–steroid conjugates, synthesized via “click chemistry”, offer a promising solution due to their stability and biological activity. In this study, bile acid derivatives linked by 1,2,3-triazole rings were synthesized and evaluated for antifungal activity. Spectroscopic analysis confirmed successful conjugation, and molecular docking studies identified interactions with fungal targets. Biological assays revealed potent antifungal effects, especially against *F. culmorum* and *B. cinerea*, with compounds (23) and (24) showing the strongest activity. These findings highlight the potential of bile acid derivatives as novel antifungal agents, and further optimization could enhance their efficacy and selectivity for therapeutic applications.



1. INTRODUCTION

Fungal infections caused by phytopathogens such as *Alternaria alternata* (*A. alternata*), *Fusarium culmorum* (*F. culmorum*), and *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) pose significant threats to both agriculture and human health. These fungi are known for their ability to produce mycotoxins, which contaminate food products, reduce crop yields, and pose serious health risks to humans and animals.^{1–17} The widespread emergence of resistance to commonly used fungicides amplifies these challenges, highlighting the need to identify alternative compounds with antifungal properties for further research.^{18,19} Steroids offer a promising platform for developing novel bioactive molecules due to their unique amphiphilic structures, modifiable functional groups, and diverse biological activities.

The concept of “click chemistry” has revolutionized synthetic methodologies by providing highly selective, efficient, and versatile reactions.²⁰ Among these, copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) stands out for its ability to produce 1,2,3-triazole-disubstituted derivatives under mild reaction conditions with excellent yields.^{21–23} This approach is particularly valuable for the modification of many natural compounds.²⁴ It enables the synthesis of conjugates with improved stability, reduced metabolic degradation, and tailored bioactivities.^{25,26} The resulting triazole-linked compounds are resistant to hydrolysis and oxidative conditions. Their ability to form hydrogen bonds and dipole interactions enhances their potential for biological applications.²⁷ These advantages make “click chemistry” a cornerstone technique in modern medicinal chemistry, including the development of antifungal agents.

Bile acids, natural cholesterol derivatives, are well-known for their role in digestion and as signaling molecules in various physiological processes.²⁸ Their distinctive steroidal framework featured with modifiable functional groups and amphiphilic properties provides a versatile material for designing compounds with enhanced and specific biological activities.²⁹ Bile acids and their derivatives exhibit natural biological activity and antimicrobial properties, further enhancing their potential as therapeutic agents.^{30–34}

Previous studies have demonstrated that bile acid conjugates linked via triazole rings, obtained through “click chemistry” reactions exhibit changed properties compared to their unmodified counterparts.^{35–37} This structural modification not only preserves the biological potential of bile acids but also introduces stability against metabolic degradation, making triazole-linked conjugates promising candidates for drug discovery.

In this study, formate derivatives of bile acids were synthesized and conjugated with other modified bile acids or sterols using “click chemistry” to produce novel triazole-linked compounds. The spectroscopic analysis confirmed the successful synthesis of these derivatives. Molecular docking studies were

Received: June 5, 2025

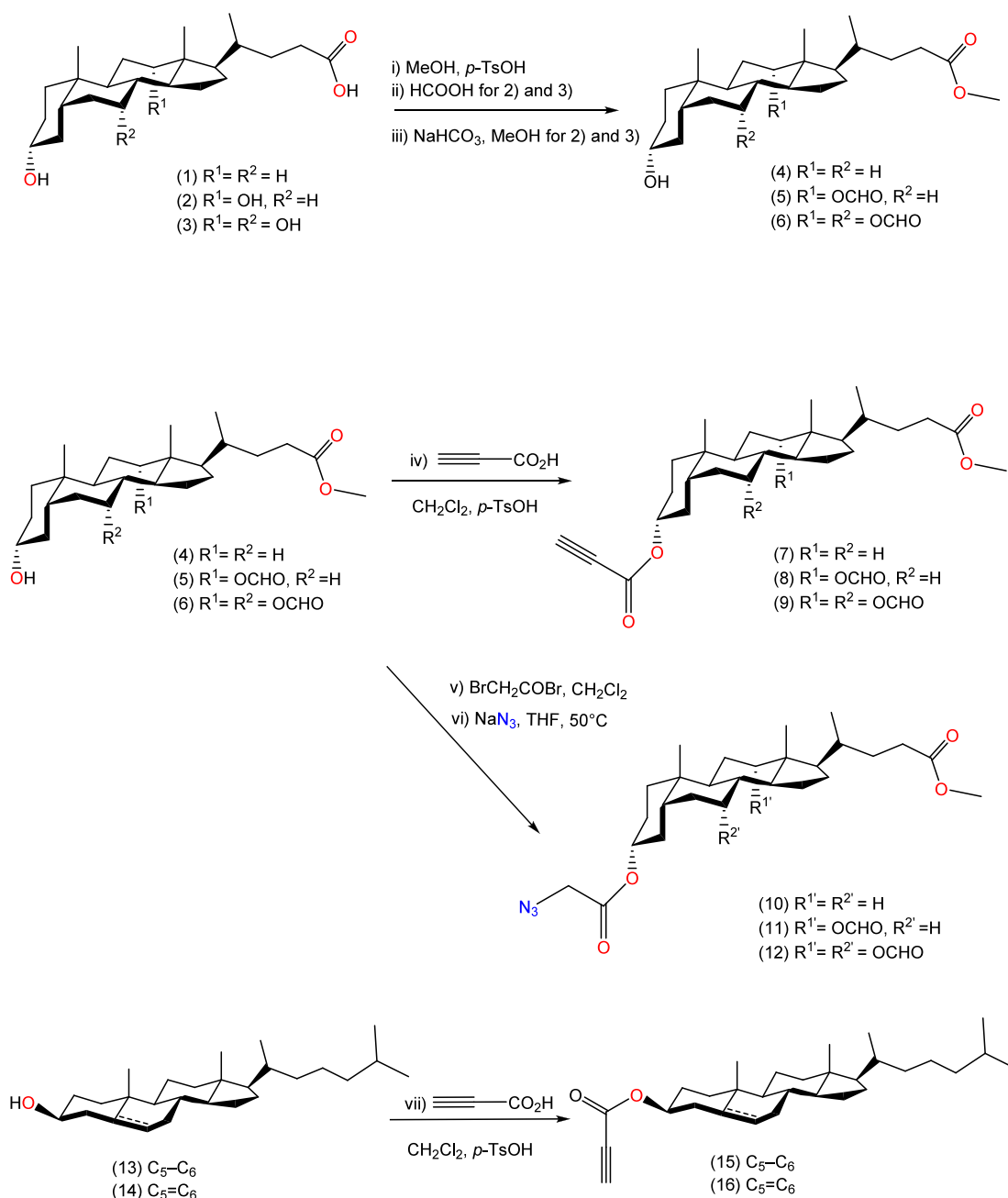
Revised: October 30, 2025

Accepted: November 4, 2025

Published: December 3, 2025



Scheme 1. Synthesis of Propynoyl Esters of Bile Acids (7–9) or Sterols (15–16) and Azidoacetyl-Substituted Derivatives (10–12)



performed to elucidate the potential mechanisms of interaction between the synthesized molecules and fungal targets, shedding light on their antifungal activity and possible mechanisms of toxicity. Biological assays revealed that the new conjugates exhibit inhibitory effects against *A. alternata*, *F. culmorum*, and *B. cinerea*, highlighting their potential as antifungal agents.

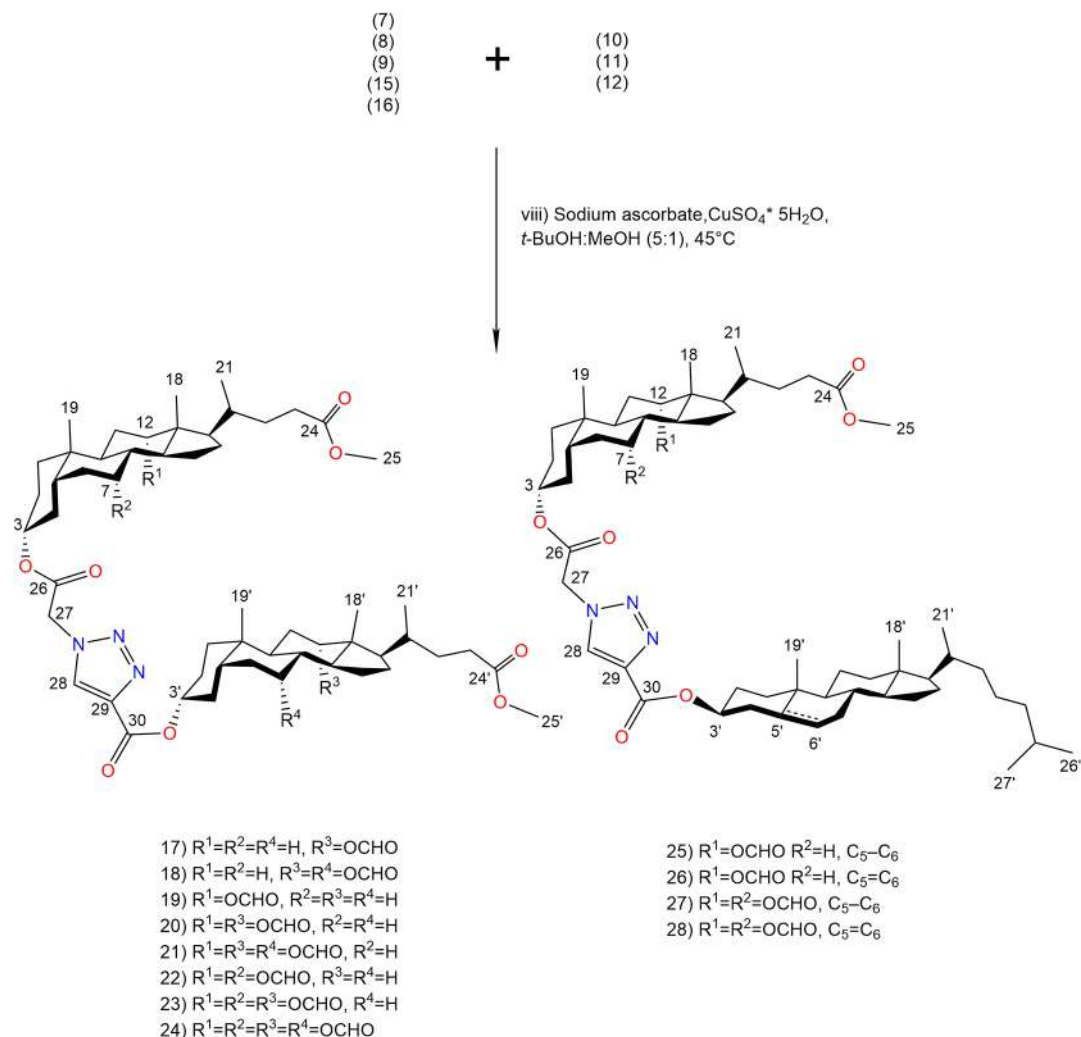
The findings presented here not only demonstrate the versatility of bile acids as building blocks for drug discovery but also emphasize the utility of “click chemistry” in generating compounds with enhanced antifungal properties. These results contribute to the growing interest in bile acid derivatives as a sustainable and effective solution to combat fungal resistance in agricultural and clinical settings.

2. EXPERIMENTAL SECTION

Bile acid methyl esters and their formyl derivatives (4–6) were successfully synthesized with decent yields, following established protocols from existing literature.^{38–41}

Synthesis of propynoyl esters of bile acids (7–9) involved reacting formyl derivatives of methyl esters of bile acids (4–6) with propiolic acid in dichloromethane and *p*-TsOH, resulting in the formation of methyl propynoyl esters (7–9) as is shown in Scheme 1.⁴² The same procedure was applied to sterols (13–14), yielding the compounds (15–16).⁴³ To obtain azidoacetate derivatives of bile acids (10–12), methyl esters of formyl derivatives (7–9) were first converted into bromoacetate derivatives by reaction with bromoacetic acid bromide in anhydrous dichloromethane. Obtained products were subsequently subjected to substitution reactions with NaN₃ in THF at

Scheme 2. Synthesis of Dimers of Bile Acids (17–28) Linked by a 1,2,3-Triazole Ring



50°C , yielding the corresponding azidoacetate derivatives (10–12).⁴³ The propynoyl esters of bile acids (7–9) or sterols (15–16) and azide derivatives (10–12) were used as substrates in the “click chemistry” reaction, conducted in the presence of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate in $t\text{-BuOH}/\text{MeOH}$ (5:1). This led to the formation of a mixture of crude products (17–28) shown in Scheme 2, which were separated using column chromatography. The reaction yielded dimers with yields ranging from 21 to 65%.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Spectroscopic Studies. The structures of all obtained compounds were determined by analyzing their ^1H and ^{13}C NMR, FT-IR, and ESI-MS spectra. The NMR (^1H and ^{13}C) and ESI-MS spectra of the investigated compounds are provided in the Supporting Information.

The fundamental structural unit of all steroids is the phenanthrene skeleton, as saturated hydrocarbon does not provide many distinct IR signals. Vibrational bands corresponding to C–C bonds were relatively weak and overlapped with other signals in the fingerprint region. The stretching vibrations of C–H bonds merged into broadband for conjugated structures, typically between 2946 and 2870 cm^{-1} . These signals were observed in all compounds (17–28). The stretching vibration of the symmetric carbonyl group $\nu(\text{C}=\text{O})$ produces

characteristic bands between 1741 – 1717 cm^{-1} in the FT-IR spectrum, which serve as key indicators for all products. Signals in the region 1211 – 1176 cm^{-1} were also observed and attributed to $\nu(\text{C}-\text{O})$.

The ESI-MS spectra for all derivative (17–28) ions $[\text{M} + \text{Na}]^+$ with an intensity of 100% were observed. In some cases, spectra also showed ions like $[\text{M} + \text{K}]^+$, $[\text{M} + \text{Cl}]^-$, and $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$. The above ions were characterized mostly by the lower intensity compared to $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

The diagnostic proton signals corresponding to the 28-CH in all compounds (17–28), characterized by the presence of a 1,2,3-triazole ring, appear as singlets in the 8.27 – 8.22 ppm range on ^1H NMR spectra (Figure 1). Protons from the methylene groups 27- CH_2 , directly attached to the triazole ring, exhibit signals as singlets around 5.21 – 5.19 ppm . Multiplets associated with $3\beta\text{-H}$ and/or $3\beta'\text{-H}$ protons showed signals in the 5.10 – 4.65 ppm range. Compounds (25–28) as sterol derivatives display multiplet related to $3\alpha'\text{-H}$ at 5.05 – 4.88 ppm and two doublets from $26'\text{-CH}_3$ and $27'\text{-CH}_3$ at the range of 0.87 – 0.84 ppm . For derivatives of deoxycholic and cholic acids, signals associated with protons $12\beta\text{-H}/12'\beta\text{-H}$ (17–28) and $7\beta\text{-H}/7'\beta\text{-H}$ (18, 21–24, and 27–28) were observed as singlets at 5.28 – 5.24 and 5.10 – 4.99 ppm , respectively. A characteristic singlet at 5.42 ppm is exhibited by cholesterol derivatives (26) and (28) originating from $6'\text{-H}$.

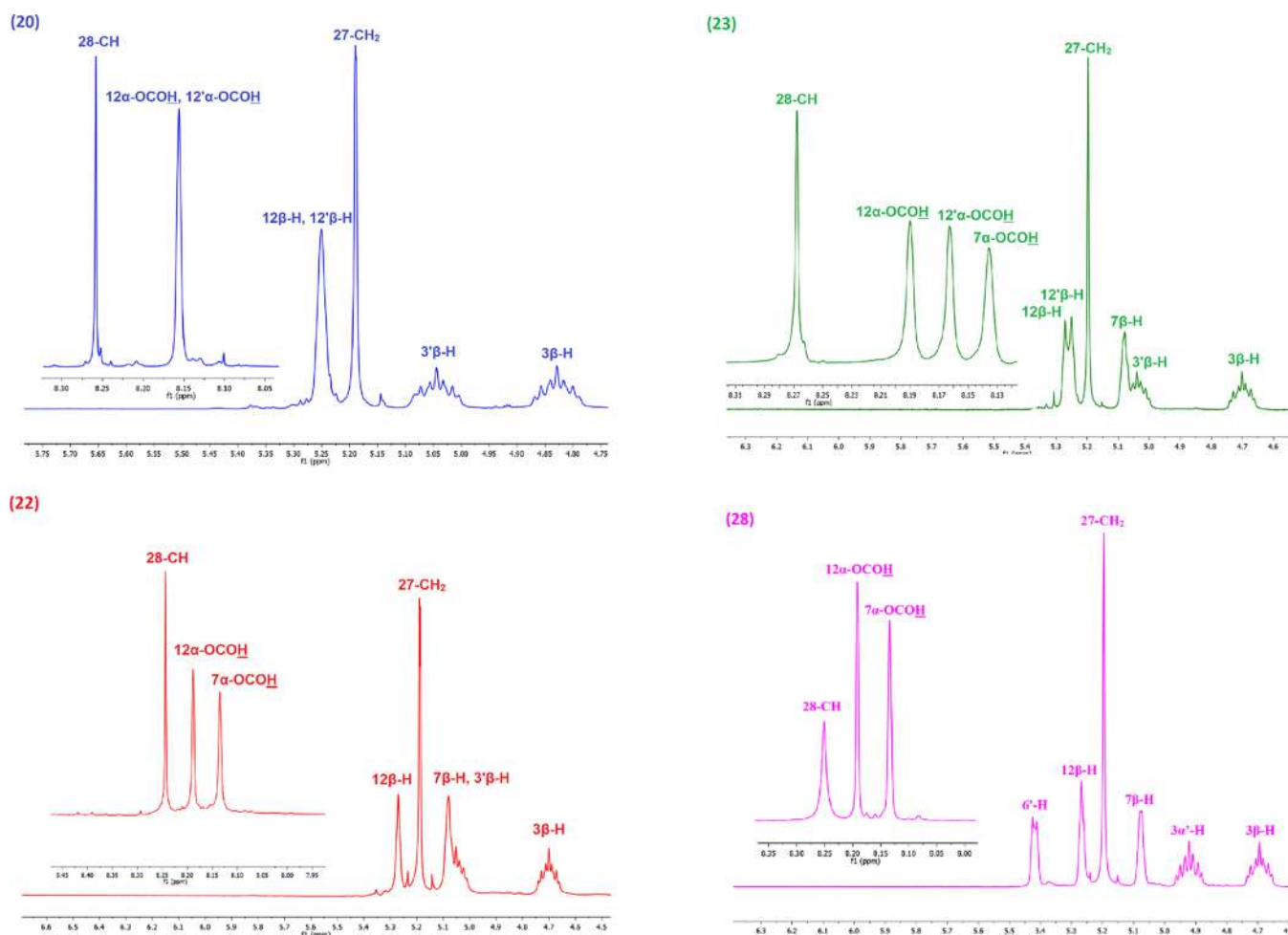


Figure 1. ¹H NMR spectra in the region of 4.5–8.45 ppm for the most characteristic signals of compounds (20, 22, 23, and 28).

Table 1. Antifungal Activity of Compounds (17–28) Assessed by the Well Diffusion Method^a

Compound	Inhibition zone [mm]					
	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Trichoderma atroviridae</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
(17)	15	0	0	7,5	11,5	17
(18)	13	0	10,5	6	10	12
(19)	18	0	10	6	11,5	13
(20)	16,5	0	9	8,5	9,5	9
(21)	12,5	0	12	7	9,5	13
(22)	12	0	10	9	10	13
(23)	20	0	10	7	8,5	15
(24)	19	0	9,5	7	10,5	10
(25)	15,5	0	13	6	7	11
(26)	14	0	10	8,5	7,7	11
(27)	0	0	11	10	9,5	10
(28)	0	0	10	8,5	8	14

^aInhibition zones <9 mm (low activity) are marked in red, 10–15 mm (moderate activity) in yellow, and >15 mm (high activity) in green, with darker shades indicating stronger effects.

The ¹³C NMR spectra of conjugates (17–28) exhibit distinct signals at 12.34–11.81 ppm, corresponding to 18-CH₃/18'-CH₃. Signals in the range of 22.91–22.50 ppm are attributed to 19-CH₃/19'-CH₃ for derivatives (20–21 and 23–28). In the

case of compounds (17–19 and 22) at 17.49–17.41 ppm, the signals came from the lithocholic acid part 19-CH₃ (17–18) or 19'-CH₃ (19 and 22). Similarly, for the products (17–18) and (19 and 22), signals at 22.93–22.75 ppm correspond to groups

19'-CH₃ (17–18) and 19-CH₃ (19 and 22) attributed to the cholic acid or deoxycholic acid components. Peaks at 18.71–17.43 ppm are associated with methyl groups 21-CH₃/21'-CH₃. Signals at 141.11–141.00 and 129.13–128.71 ppm originating from C(29) and C(28), respectively, provide evidence for the presence of the triazole ring. Carboxyl carbons C(26) and C(30) appear at characteristic chemical shifts at 165.11–165.07 and 160.08–159.01 ppm sequentially. The presence of carbon resonances at 160.68–160.43 ppm confirms the existence of 12 α -OCHO/12' α -OCHO for compounds (17–28) and 7 α -OCHO/7' α -OCHO (18, 21–24, and 27–28). The sequences of signals at 77.22–77.16, 75.99–75.02, and 70.57–70.50 ppm are attributed to C(12)/C(12'), C(3)/C(3'), and C(7)/C(7'), respectively. Distinct peaks at 21.22–21.01 correspond to the carbon atoms of methyl groups C(26') and C(27') for all sterol derivatives (25–28). Cholesterol derivatives (26) and (28) show very characteristic signals at 139.47–139.41 and 122.93–122.00 ppm corresponding to C(5') and C(6') double bonds, respectively.

3.2. Antifungal Activity of Tested Compounds. A preliminary screening of the antifungal activity of all compounds (17–28) was conducted against selected fungi, including dangerous pathogens, using the well diffusion technique. (Table 1). To enable consistent comparison across the series, all compounds were tested at a uniform concentration of 4 mg/mL. The fungicidal activity of compounds (17–28) was categorized based on the size of the growth inhibition zones, with <9 mm indicating low activity, 10–15 mm representing moderate activity, and >15 mm classified as high activity. This classification reflects the standard interpretation of inhibition zone diameters, where larger zones correspond to stronger antifungal effects due to higher compound potency or better diffusion properties in the test medium. Such thresholds provide a consistent framework for comparing the efficacy of tested compounds against fungal pathogens.

The analysis revealed that compound (23) exhibited the strongest antagonistic activity against *Botrytis cinerea*, with a growth inhibition zone of 15 mm. High activity against this fungus was also observed for derivatives (17) (17 mm) and (19 and 22) (13 mm each). For *Fusarium culmorum*, the highest activity was recorded for product (23), which generated a growth inhibition zone of 20 mm, while (24) and (19) produced zones of 19 and 18 mm, respectively.

The study also highlighted the significant efficacy of (23) against *Alternaria alternata*, with a growth inhibition zone of 10.5 mm. Notable activity against this species was also observed for (24) and (19) (10.5 and 11.5 mm, respectively). Regarding *Trichoderma atroviridae* (*T. atroviridae*), the most active compound was (25), with a 13 mm inhibition zone, whereas (27) showed the highest effectiveness against *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*), producing a 10 mm zone of inhibition.

It is worth noting that compound (23) demonstrated broad-spectrum antifungal activity, showing effectiveness against most tested fungal species. Compounds with low activity (<10 mm) were identified in a few cases, such as (18) against *T. harzianum* (6 mm) and (19) against *T. atroviridae* (6 mm).

The preliminary screening results suggest a correlation between specific structural motifs and antifungal activity within the synthesized bile acid–steroid conjugates. Notably, formylated derivatives, particularly those with terminal formyl groups on the triazole linker (e.g., compound (23)), exhibited enhanced antifungal effects. This enhancement is likely due to

increased polarity and hydrogen bonding capacity, facilitating improved molecular recognition or membrane interaction.

However, the presence of formyl groups alone does not fully explain the observed bioactivity patterns. For example, compounds (20) and (22), which contain the same number of formyl substituents, exhibit markedly different levels of antifungal activity. This indicates that additional structural factors, such as the geometry or conformational rigidity of the steroid scaffold, must also play a critical role in modulating biological effects.

Furthermore, unsaturation in the steroidal core (e.g., Δ^5 double bond) appears to contribute positively to antifungal potency, potentially by influencing lipophilicity, planarity, or interaction with biological targets. Altogether, the results suggest that antifungal activity arises from a combination of electronic, steric, and spatial effects and even minor modifications to the core scaffold can significantly influence biological outcomes. These observations provide valuable insight for the future structure-guided optimization of this compound class.

3.3. PM5. The PM5 semiempirical calculations were performed by using the WinMopac 2003 program. The final heat of formation (HOF) for steroid dimers linked with the 1,2,3-triazole ring is presented in Table 2. The molecular models of the representative compounds are shown in Figure 2.

Table 2. HOF Values of Compounds (17–28)

compound	HOF (kcal/mol)
(17)	−520.1304
(18)	−595.7649
(19)	−525.5031
(20)	−601.6515
(21)	−682.4143
(22)	−603.758
(23)	−678.7866
(24)	−754.8479
(25)	−468.025
(26)	−440.134
(27)	−544.1711
(28)	−519.3649

PM5 calculations are a valuable tool for analyzing the thermodynamic stability of chemical compounds with the heat of formation (HOF) being a crucial parameter in evaluating their energetic properties and potential reactivity. For the studied compounds (17–28), a clear decreasing trend in HOF values is observed with an increasing number of formate groups in the bile acid skeleton (Table 2). Compound (17) exhibits the highest HOF value, while the lowest is recorded for compound (24).

The incorporation of formate groups into the bile acid structure significantly influences the thermodynamic stability, as these groups facilitate the formation of host–guest complexes through intramolecular hydrogen bonding. Consequently, increasing the number of formate groups enhances stabilization of the bile acid framework, resulting in a systematic reduction in HOF values. A decrease in the HOF values indicates improved thermodynamic stability, suggesting that the modified compounds are less prone to decomposition or undesired reactions. This stabilization can be attributed to hydrogen bonding or electrostatic interactions arising from the formate groups, which underpin the observed thermodynamic trends.

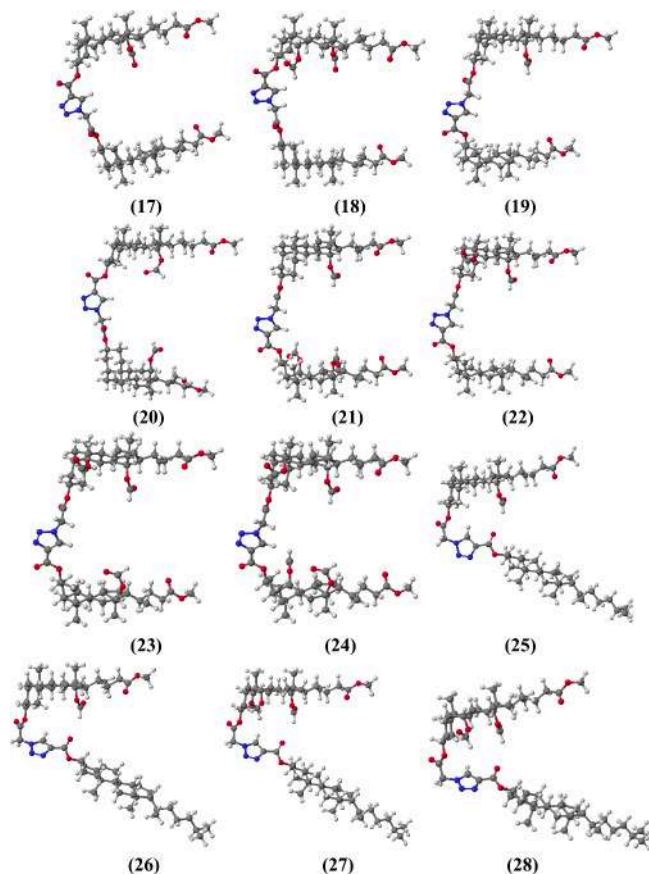


Figure 2. Molecular models of compounds (17–28).

3.4. Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). The potential pharmacological activities of the synthesized bioconjugates (17–28) were evaluated using the *in silico* Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) program. This approach predicts probable biological activities based on structural information, expressed as probability. Values of $P_a > 0.7$ indicate high probable activity, and values of $0.5 \leq P_a \leq 0.7$ indicate moderate activity. Biological activities with the highest P_a values for each compound were selected and are summarized in Table 3.

The most frequently predicted activities include glyceryl-ether monoxygenase inhibition, with probabilities exceeding 0.7 for compounds (18, 20–24, and 27), indicating strong

potential for this activity. Glyceryl-ether monoxygenase is involved in lipid metabolism and membrane function, making its inhibitors relevant in metabolic and neurodegenerative disorders. Similarly, several bioconjugates, such as (20, 22, 23, and 24), are predicted to act as acylcarnitine hydrolase inhibitors, showing P_a values close to 0.75. Acylcarnitine hydrolase plays a key role in fatty acid metabolism, and its inhibition may be beneficial in treating lipid storage diseases or metabolic disorders.

Newly predicted activities further highlight the pharmacological potential of these compounds. Alkylacetylgllycerophosphatase inhibition is suggested for compounds (19, 21, and 23), with P_a values reaching 0.69, which may imply effects on phospholipid metabolism. Biliary tract disorder treatment is predicted for (18, 22, 23, and 24) with P_a around 0.69, supporting their potential application in hepatobiliary diseases.

Results also suggest antieczematic properties for compounds (18, 19, 22, and 24), with P_a values ranging from 0.62 to 0.68, as well as hypolipemic activity for compound (28) ($P_a = 0.69$), suggesting potential benefits in managing lipid levels. Compound (28) is predicted to act as a cholesterol antagonist ($P_a = 0.66$) and antihypercholesterolemic agent ($P_a = 0.62$), reinforcing its relevance in cardiovascular therapy.

Other notable predictions include CYP17 inhibition (26 and 28) with P_a values around 0.60, suggesting possible applications in hormone-related disorders. MYC inhibition ($P_a = 0.55–0.59$) was predicted for compounds (22 and 27), indicating potential anticancer activity. Bilirubin oxidase inhibition ($P_a \approx 0.60$) points to a possible role in oxidative stress regulation. Cytoprotective effects ($P_a = 0.60–0.62$) were observed for several compounds, highlighting their protective cellular mechanisms.

These results indicate that the synthesized bioconjugates possess diverse and promising pharmacological profiles, particularly in enzymatic inhibition, metabolic regulation, and potential therapeutic applications in cardiovascular, dermatological, and hepatobiliary diseases. Further experimental validation is warranted to confirm these computational predictions.

3.5. Docking Studies. Fusarium foot and root rot (FRR) and Fusarium head blight (FHB) are plant diseases caused by pathogenic fungi of the *Fusarium* genus, including *Fusarium culmorum*, leading to significant losses in cereals and other agricultural crops. One of the key virulence factors of these pathogens is the production of trichothecenes—mycotoxins

Table 3. Probability “To Be Active” (P_a) Values for the Predicted Biological Activity of Compounds (17–28)

compound	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)
P_a												
glyceryl-ether monoxygenase inhibitor	0.74	0.78	0.74	0.75	0.78	0.77	0.77	0.78	0.72	0.68	0.76	0.72
acylcarnitine hydrolase inhibitor	0.74	0.74	0.74	0.77	0.77	0.74	0.78	0.79	0.63		0.63	
alkylacetylgllycerophosphatase inhibitor	0.65		0.65	0.69	0.61		0.61	0.58				
antieczematic	0.68	0.66	0.67		0.63	0.65		0.62	0.64		0.62	
biliary tract disorder treatment	0.61	0.69	0.61	0.59	0.68	0.68	0.67	0.69	0.58		0.66	
hypolipemic										0.59		0.69
cholesterol antagonist										0.66		0.66
antihypercholesterolemic												0.62
CYP17 inhibitor										0.61		0.60
Myc inhibitor									0.55	0.59		
bilirubin oxidase inhibitor	0.56	0.60	0.57	0.57	0.60	0.60	0.60	0.60				
cytoprotectant		0.62			0.60	0.62	0.60	0.58				

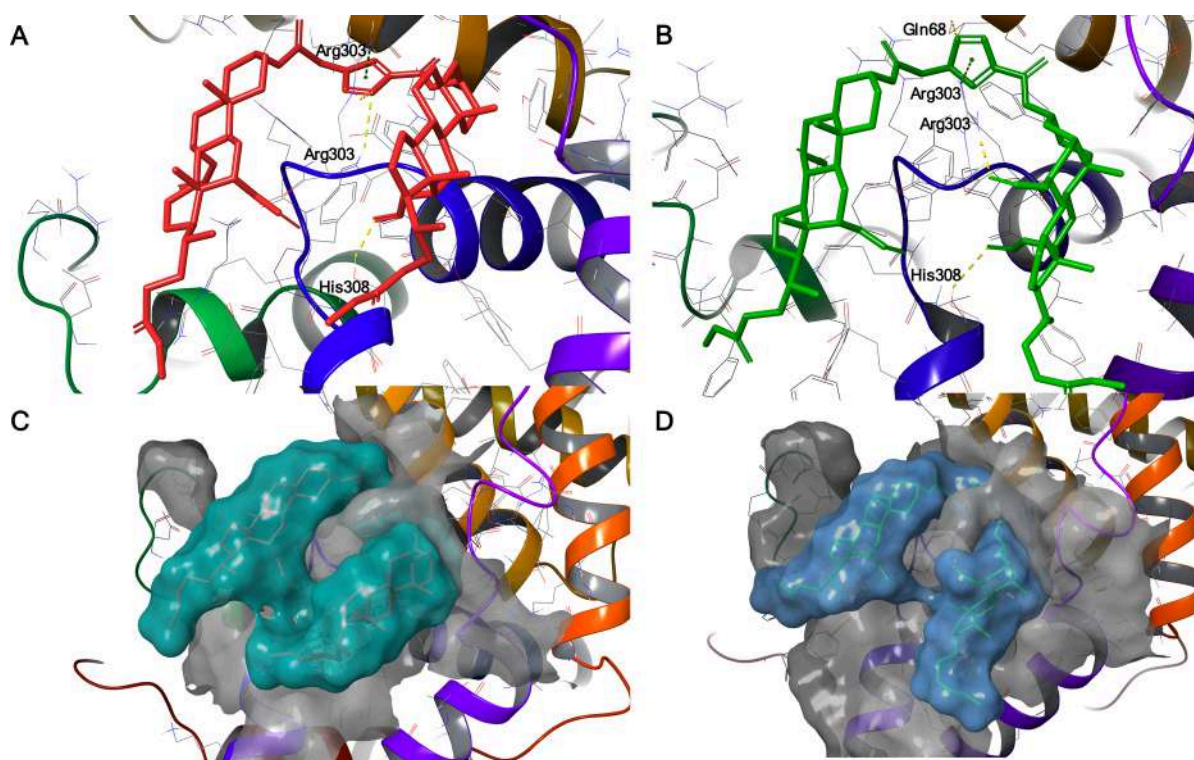


Figure 3. Docked poses of the most active compounds (23) (A, red) and (24) (B, green) in the binding cavity of TRIS. Yellow/green dotted lines represent molecular interactions. (C, D) Binding surfaces for docked compounds. Gray, binding site surface; blue, compound binding surface.

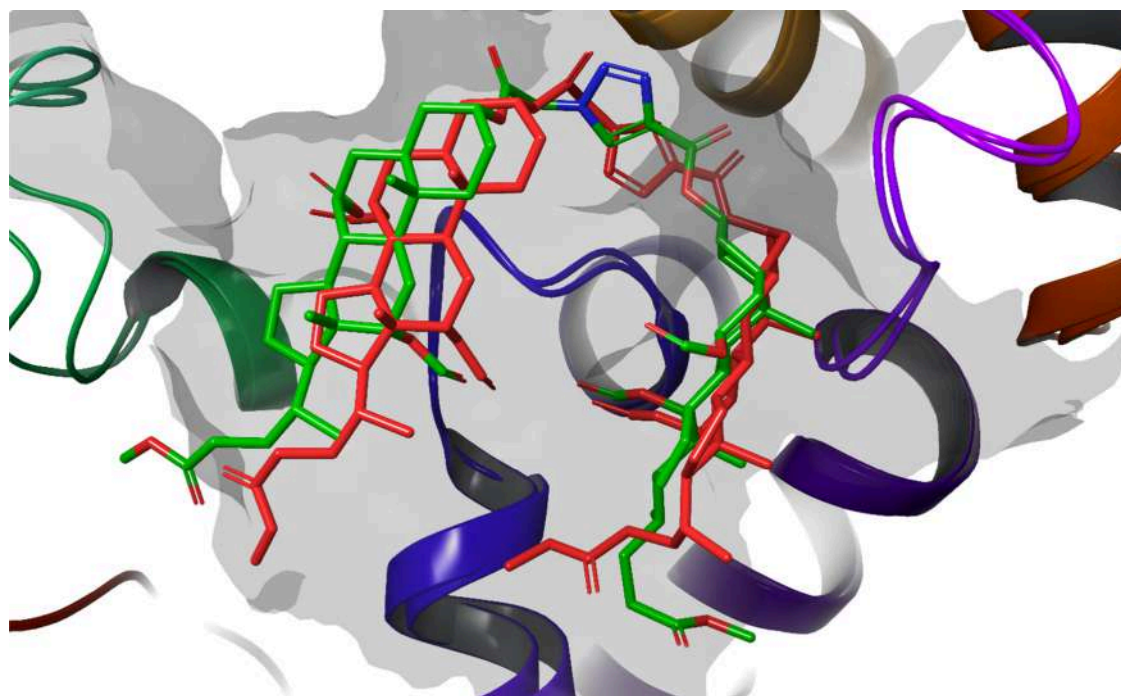


Figure 4. Two overlapping compounds (23–24).

that inhibit protein synthesis in plant cells, thereby increasing their pathogenicity and toxicity.⁴⁴ The biosynthesis of trichothecenes is controlled by an enzymatic pathway that includes a key enzyme, trichodiene synthase (TRIS), which catalyzes the first step of this pathway by converting farnesyl diphosphate (FPP) into trichodiene. Inhibition of TRIS may lead to the suppression of toxin synthesis, making it a promising

target for the development of new antifungal agents. The literature indicates that TRIS is essential for trichothecene production in *Fusarium* spp., and its “silencing” significantly reduces pathogen virulence. Therefore, TRIS represents an attractive target for the development of inhibitors capable of reducing *Fusarium* toxicity and potentially halting disease progression.^{45,46}

Since the crystal structure of *Fusarium* TRIS is not available, a homology model was constructed to facilitate molecular docking studies. The protein sequence of TRIS was retrieved from the UniProt database (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8NIG9>; access date: 02.02.2025). The crystal structure of a homologous enzyme from *Fusarium sporotrichioides* (PDB ID 1JFG) was selected as the template due to its high sequence homology and functional similarity. Structural modeling was performed using the Swiss-Model server,⁴⁷ which generated the TRIS model based on the selected template. The model was evaluated for quality by analyzing structural parameters, and its functional accuracy was verified through molecular docking. To validate the reliability of the model, molecular docking was conducted using known TRIS inhibitors (caffeic acid, ferulic acid, and eugenol) described in the publication.⁴⁸ The obtained binding modes of the ligands showed high similarity to previously reported interactions, confirming the model's validity and its applicability in further studies on novel inhibitors.

After validation of the homology model, molecular docking was performed for the two most active compounds against *Fusarium culmorum*, (23) and (24) (Figure 3), which exhibited the strongest antifungal activity in biological assays. These compounds occupied a binding region surrounded by amino acid residues Gln68, Arg303, His308, Arg304, and Phe329, confirming consistency with previous findings on the active site structure.⁴⁸ The molecules did not penetrate deeply into the binding pocket but adhered to its surface while forming key interactions with selected amino acids (Figure 3). The triazole ring of both compounds established two hydrogen bonds with Arg303 and an additional π -cation interaction with the same residue. Furthermore, a hydrogen bond was observed between the acyl group at C(30) and His308. Compound (24) formed an additional hydrogen bond between the triazole ring and Gln68. The docking score for compound (23) was -8.01 kJ/mol, while for compound (24), it was -7.79 kJ/mol. Both ligands adopted a slightly bent conformation, folding around the triazole ring, which allowed optimal adaptation to the active site surface and stabilization of interactions within the binding pocket (Figure 4). Table 4 presents the interaction characteristics between the compounds and selected amino acids.

Table 4. Characteristics of the Detected Interactions between the Tested Compounds and Selected Amino Acids in the Binding Pocket

compound	interaction type	amino acid	distance (Å)
(23)	hydrogen bond	His303	1.83
	hydrogen bond	Arg303	2.52
	hydrogen bond	Arg303	2.11
	π -cation	Arg303	3.52
(24)	hydrogen bond	His308	2.51
	hydrogen bond	Arg303	1.84
	π -cation	Arg303	4.31
	hydrogen bond	Gln68	2.47

The molecular docking results indicate that TRIS is a potential target for new antifungal inhibitors. The two best-performing compounds exhibit strong interactions with key active site residues, suggesting their potential effectiveness in inhibiting the TRIS function and overall antifungal activity.

4. CONCLUSIONS

The present study demonstrates that bile acid–steroid conjugates linked via a 1,2,3-triazole ring exhibit promising antifungal activity, particularly against *Fusarium culmorum* and *Botrytis cinerea*. The application of “click chemistry” enabled the synthesis of structurally diverse compounds with improved stability and tailored biological properties. The molecular docking studies provided insights into the potential interactions of the most active derivatives with fungal targets, highlighting their possible mechanisms of action. Notably, compounds (23) and (24) emerged as the most potent inhibitors, displaying broad-spectrum antifungal activity and strong binding interactions with the TRIS enzyme.

Future research should focus on further optimizing these conjugates to enhance their antifungal potency and selectivity while ensuring minimal cytotoxicity toward mammalian cells. Structural modifications, particularly at the triazole linkage and bile acid framework, could improve the pharmacokinetic properties and bioavailability of these compounds. Additionally, detailed *in vivo* studies are required to validate their efficacy and safety in biological systems.

Despite the promising findings, some limitations should be acknowledged. The observed antifungal activity, while significant, varies among different fungal strains, suggesting that additional modifications may be necessary to enhance the selectivity. Furthermore, the limited aqueous solubility of some derivatives may pose challenges for their practical application. Future studies could explore formulation strategies, such as encapsulation in nanocarriers or prodrug approaches, to improve their delivery and efficacy.

Overall, the findings underscore the potential of bile acid–steroid conjugates as a novel class of antifungal agents. Their dual advantage of chemical versatility and biological activity positions them as valuable candidates for further development, not only in antifungal therapy but also in broader biomedical and agricultural applications, where fungal resistance remains a pressing challenge.

■ ASSOCIATED CONTENT

Data Availability Statement

The data presented in this study were obtained from the author's own experimental work. All relevant experimental data are provided in the Supporting Information.

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.5c05320>.

¹H and ¹³C NMR spectra of the obtained compounds; ESI-MS spectra of the obtained compounds; docking protocol description and technical details of the molecular modeling procedures; technical information, including equipment used and source of reagents (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Grzegorz Hajdaś – Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznań 61-614, Poland; orcid.org/0000-0001-7500-4274; Email: grzhaj@amu.edu.pl

Authors

Damian Kulaga – Department of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Engineering and Technology,

Cracow University of Technology, Kraków 31-155, Poland;

orcid.org/0000-0001-8779-4170

Hanna Koenig – Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznań 61-614, Poland

Justyna Starzyk – Department of Soil Science and Microbiology, Faculty of Agronomy, Horticulture, and Bioengineering, University of Life Science, Poznań 60-656, Poland

Vladislav Maliugin – Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznań 61-614, Poland

Tomasz Pospieszny – Department of Bioactive Products, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznań 61-614, Poland; orcid.org/0000-0001-5071-7016

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.5c05320>

Funding

This research received no external funding, and no article processing charges (APC) were covered by any funding source.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Damian Kułaga and Prof. Justyna Starzyk for the opportunity to collaborate and for their valuable assistance.

REFERENCES

- (1) Troncoso-Rojas, R.; Tiznado-Hernández, M. E. *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). In *Postharvest Decay*; Bautista-Baños, S., Ed.; Academic Press: 2014, 147–187. DOI: .
- (2) Logrieco, A.; Moretti, A.; Solfrizzo, M. *Alternaria* Toxins, and Plant Diseases: An Overview of Origin, Occurrence, and Risks. *World Mycotoxin J.* **2009**, *2* (2), 129–140.
- (3) Kustrzeba-Wójcicka, I.; Siwak, E.; Terlecki, G.; Wolańczyk-Mędrala, A.; Mędrala, W. *Alternaria alternata* and Its Allergens: A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2014**, *47*, 354–365.
- (4) Sakiyo, J. J.; Németh, Á. The Potential of Bacilli-Derived Biosurfactants as an Additive for Biocontrol against *Alternaria alternata* Plant Pathogenic Fungi. *Microorganisms* **2023**, *11*, 707.
- (5) Zhang, M.-J.; Zheng, X.-R.; Li, H.; Chen, F.-M. *Alternaria alternata*, the Causal Agent of a New Needle Blight Disease on *Pinus bungeana*. *J. Fungi* **2023**, *9*, 71.
- (6) Mangwende, E.; Kritzinger, Q.; Truter, M.; Aveling, T. A. S. *Alternaria alternata*: A New Seed-Transmitted Disease of Coriander in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* **2018**, *152*, 409–416.
- (7) Johansson, P. M.; Johansson, L.; Gerhardson, B. Suppression of Wheat-Seedling Diseases Caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* Using Bacterial Seed Treatment. *Plant Pathol.* **2003**, *52*, 219–227.
- (8) Wagacha, J. M.; Muthomi, J. W. *Fusarium culmorum*: Infection Process, Mechanisms of Mycotoxin Production, and Their Role in Pathogenesis in Wheat. *Crop Prot.* **2007**, *26* (7), 877–885.
- (9) Scherm, B.; Balmas, V.; Spanu, F.; Pani, G.; Delogu, G.; Pasquali, M.; Migheli, Q. *Fusarium culmorum*: Causal Agent of Foot and Root Rot and Head Blight on Wheat. *Mol. Plant Pathol.* **2013**, *14* (4), 323.
- (10) Oldenburg, E.; Ellner, F. Distribution of Disease Symptoms and Mycotoxins in Maize Ears Infected by *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum*. *Mycotoxin Res.* **2015**, *31*, 117–126.
- (11) Gebremariam, E. S.; Karakaya, A.; Erginbas-Orakci, G.; Dababat, A. A.; Paulitz, T. C. Assessment of the Seedling Resistance of Spring Wheat Lines to *Fusarium culmorum*. *J. Agr. Sci.-Tarim Bili* **2020**, *26* (1), 87–93.
- (12) Hollaway, G. J.; Evans, M. L.; Wallwork, H.; Dyson, C. B.; McKay, A. C. Yield Loss in Cereals, Caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, Is Related to Fungal DNA in Soil Prior to Planting, Rainfall, and Cereal Type. *Plant Dis.* **2013**, *97* (7), 977.
- (13) Williamson, B.; Tudzynski, B.; Tudzynski, P.; Van Kan, J. A. L. *Botrytis cinerea*: The Cause of Grey Mould Disease. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8* (5), 561–580.
- (14) Petrasch, S.; Knapp, S. J.; Van Kan, J. A. L.; Blanco-Ulate, B. Grey Mould of Strawberry, a Devastating Disease Caused by the Ubiquitous Necrotrophic Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20* (6), 877–892.
- (15) Bika, R.; Baysal-Gurel, F.; Jennings, C. *Botrytis cinerea* Management in Ornamental Production: A Continuous Battle. *Can. J. Plant Pathol.* **2021**, *43* (3), 345–365.
- (16) Romanazzi, G.; Feliziani, E. *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In *Postharvest Decay*; Bautista-Baños, S., Ed.; Academic Press: 2014, 131–146. DOI: .
- (17) Bi, K.; Liang, Y.; Mengiste, T.; Sharon, A. Killing Softly: A Roadmap of *Botrytis cinerea* Pathogenicity. *Trends Plant Sci.* **2023**, *28* (2), 211–222.
- (18) Deising, H. B.; Reimann, S.; Pascholat, S. F. Mechanisms and Significance of Fungicide Resistance. *Braz. J. Microbiol.* **2008**, *39* (2), 286.
- (19) Hossain, C. M.; Ryan, L. K.; Gera, M.; Choudhuri, S.; Lyle, N.; Ali, K. A.; Diamond, G. Antifungals and Drug Resistance. *Encyclopedia* **2022**, *2* (4), 1722.
- (20) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (21) Pospieszny, T. Molecular Pockets, Umbrellas and Quasi Podands from Steroids: Synthesis, Structure and Applications. *Mini Rev. Org. Chem.* **2015**, *12* (3), 258–270.
- (22) Latyshev, G. V.; Baranov, M. S.; Kazantsev, A. V.; Averin, A. D.; Lukashev, N. V.; Beletskaya, I. P. Copper-Catalyzed [1,3]-Dipolar Cycloaddition for the Synthesis of Macrocycles Containing Acyclic, Aromatic and Steroidal Moieties. *Synth.* **2009**, *2009* (15), 2605–2615.
- (23) Hein, C. D.; Liu, X. M.; Wang, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216–2230.
- (24) Zhang, X.; Zhang, S.; Zhao, S.; Wang, X.; Liu, B.; Xu, H. Click Chemistry in Natural Product Modification. *Front. Chem.* **2021**, *9*, No. 774977.
- (25) Zhang, C.; Wu, J.; Zhang, Y.; Huang, Z. Click Chemistry and Natural Products. *Chin. J. Nat. Med.* **2024**, *22* (2), 97–99.
- (26) Xiao, Z.; Gu, Y.; Dong, H.; Liu, B.; Jin, W.; Li, J.; Ma, P.; Xu, H.; Hou, W. Strategic Application of CuAAC Click Chemistry in the Modification of Natural Products for Anticancer Activity. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* **2023**, *9*, No. 100113.
- (27) Lauria, A.; Delisi, R.; Mingoia, F.; Terenzi, A.; Martorana, A.; Barone, G.; Almerico, A. M. 1,2,3-Triazole in Heterocyclic Compounds, Endowed with Biological Activity, through 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (16), 3289–3306.
- (28) Di Ciaula, A.; Garruti, G.; Lunardi Baccetto, R.; Molina-Molina, E.; Bonfrate, L.; Wang, D. Q. H.; Portincasa, P. Bile Acid Physiology. *Ann. Hepatol.* **2017**, *16* (1), 4–14.
- (29) Rasheed, A.; Qasim, M. A Review of Natural Steroids and their Applications. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2013**, *4* (2), 520–531.
- (30) Lin, C.; Wang, Y.; Le, M.; Chen, K. F.; Jia, Y.-G. Recent Progress in Bile Acid-Based Antimicrobials. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32* (3), 395–441.
- (31) Hazra, B.; Pore, V.; Dey, S.; Datta, S.; Darokar, M.; Saikia, D.; Khanuja, S. P. S.; Thakur, A. Bile acid amides derived from chiral amino alcohols: novel antimicrobials and antifungals. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (3), 773–777.
- (32) Guinan, J.; Villa, P.; Thangamani, S. Secondary bile acids inhibit *Candida albicans* growth and morphogenesis. *Pathog. Dis.* **2018**, *76* (3), fty038.
- (33) Itoh, M.; Wada, K.; Tan, S.; et al. Antibacterial action of bile acids against *Helicobacter pylori* and changes in its ultrastructural

morphology: effect of unconjugated dihydroxy bile acid. *J. Gastroenterol.* **1999**, *34*, 571–576.

(34) Mishra, S.; Mishra, R. Updates in Bile Acid-Bioactive Molecule Conjugates and Their Applications. *Steroids* **2020**, *159*, No. 108639.

(35) Hajdaś, G.; Kułaga, D.; Koenig, H.; Sosnowska, K.; Mrówczyńska, L.; Pospieszny, T. Synthesis, Hemolytic Activity, and In Silico Studies of New Bile Acid Dimers Connected with a 1,2,3-Triazole Ring. *ACS Omega* **2024**, *9* (37), 39277–39286.

(36) Vatmurge, N. S.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Shirazi, F.; Chavan, P. S.; Deshpande, M. V. Synthesis and Antimicrobial Activity of β -Lactam–Bile Acid Conjugates Linked via Triazole. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (6), 2043–2047.

(37) Perrone, D.; Bortolini, O.; Fogagnolo, M.; Marchesi, E.; Mari, L.; Massarenti, C.; Navacchia, M. L.; Sforza, F.; Varanini, K.; Capobianco, M. L. Synthesis and In Vitro Cytotoxicity of Deoxyadenosine–Bile Acid Conjugates Linked with 1,2,3-Triazole. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 3559–3567.

(38) Iida, T.; Namegawa, K.; Nakane, N.; Iida, K.; Hofmann, A. F.; Omura, K. Chemical Synthesis of Uncommon Natural Bile Acids: The 9 α -Hydroxy Derivatives of Chenodeoxycholic and Lithocholic Acids. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64* (9), 1397–1402.

(39) Nguyen Thi, T. H.; Cardová, L.; Dvořáková, M.; Ročková, D.; Drašar, P. Synthesis of Cholic Acid-Based Calixpyrroles and Porphyrins. *Steroids* **2012**, *77* (8–9), 858–863.

(40) Májer, F.; Sharma, R.; Mullins, C.; Keogh, L.; Phipps, S.; Duggan, S.; Kelleher, D.; Keely, S.; Long, A.; Radics, G.; Wang, J.; Gilmer, J. F. New Highly Toxic Bile Acids Derived from Deoxycholic Acid, Chenodeoxycholic Acid and Lithocholic Acid. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (1), 256–268.

(41) Bhattarai, K. M.; Davis, A. P.; Perry, J. J.; Walter, C. J.; Menzer, S.; Williams, D. J. A New Generation of “Cholaphanes”: Steroid-Derived Macrocyclic Hosts with Enhanced Solubility and Controlled Flexibility. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (24), 8463–8473.

(42) Hajdaś, G.; Kawka, A.; Koenig, H.; Kułaga, D.; Sosnowska, K.; Mrówczyńska, L.; Pospieszny, T. Click chemistry as a method for the synthesis of steroid bioconjugates of bile acids derivatives and sterols. *Steroids* **2023**, *199*, No. 109282.

(43) Kawka, A.; Hajdaś, G.; Kułaga, D.; Koenig, H.; Kowalczyk, I.; Pospieszny, T. Molecular structure, spectral and theoretical study of new type bile acid–sterol conjugates linked via 1,2,3-triazole ring. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1273*, No. 134313.

(44) Wang, W.; Zhu, Y.; Abraham, N.; Li, X.-Z.; Kimber, M.; Zhou, T. The Ribosome-Binding Mode of Trichothecene Mycotoxins Rationalizes Their Structure–Activity Relationships. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (4), 1604.

(45) Tretiakova, P.; Voegelé, R. T.; Soloviev, A.; Link, T. I. Successful Silencing of the Mycotoxin Synthesis Gene *TRIS* in *Fusarium culmorum* and Observation of Reduced Virulence in VIGS and SIGS Experiments. *Genes* **2022**, *13* (3), 395.

(46) Liew, M. X. X.; Nakajima, Y.; Maeda, K.; Kitamura, N.; Kimura, M. Regulatory Mechanism of Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, No. 1148771.

(47) Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (W1), W296–W303.

(48) Oufensou, S.; Dessi, A.; Dallochio, R.; Balmás, V.; Azara, E.; Carta, P.; Migheli, Q.; Delogu, G. Molecular Docking and Comparative Inhibitory Efficacy of Naturally Occurring Compounds on Vegetative Growth and Deoxynivalenol Biosynthesis in *Fusarium culmorum*. *Toxins* **2021**, *13* (11), 759.



The banner features a collage of scientific images and text. On the left, a woman in a lab coat is shown. The central text reads: "CAS Insights™ Accelerating your scientific progress by providing unique perspectives and perspectives on the intersection of science, technology, and innovation." Below this is a yellow button that says "Subscribe today". To the right, there are several smaller text boxes: "Solving—advancing new applications on the promise of graphene", "Webinar: Emerging areas in biomaterials reshaping medicine and human health", and "Discover the latest scientific research and trends with CAS Insights. Subscribe for email updates on new articles, reports, and webinars at the intersection of science and innovation." At the bottom right is the CAS logo, which includes the text "CAS A division of the American Chemical Society" and a stylized molecular structure icon.

Poznań 14.01.2026 r.

Oświadczenie


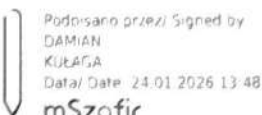
Oświadczamy, że w artykule „Click chemistry as a method for the synthesis of steroid bioconjugates of bile acids derivatives and sterols” opublikowanym w czasopiśmie *Steroids*, 2023, 199, 1-12 wkład wymienionych autorów w przygotowanie publikacji jest następujący:

Lp.	Imię i nazwisko	Wkład merytoryczny autora	Podpis
1	Dr inż. Anna Kawka	Współudział w syntezie związków, dyskusja wyników	
2	Dr inż. Hanna Koenig	Diskusja wyników, współudział w interpretacji wyników i opracowaniu oryginalnego manuskryptu	
3	Dr inż. Damian Kułaga	Wykonanie i opisanie wyników dokowania molekularnego	 Podpisano przez/ Signed by: DAMIAN KURAGA Data/ Date: 24.01.2026 13:48 mSzafir
4	Dr Katarzyna Sosnowska	Wykonanie badań aktywności hemolitycznej	
5	Prof. UAM dr hab. Lucyna Mrówczyńska	Wykonanie badań aktywności hemolitycznej, dyskusja wyników	
6	Prof. dr hab. Tomasz Pospieszny	Diskusja wyników, wykonanie obliczeń semiempirycznych i określenie potencjału biologicznego, współudział w opracowaniu oryginalnego manuskryptu, autor korespondencyjny.	

Poznań 14.01.2026 r.

Oświadczenie

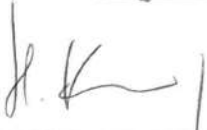

Oświadczamy, że w artykule „Synthesis, Hemolytic Activity, and *In Silico* Studies of New Bile Acid Dimers Connected with a 1,2,3-Triazole Ring” opublikowanym w czasopiśmie *ACS Omega*, 2024, 9(37), 39277-39286 wkład wymienionych autorów w przygotowanie publikacji jest następujący:

Lp.	Imię i nazwisko	Wkład merytoryczny autora	Podpis
1	Dr inż. Hanna Koenig	Diskusja wyników, współudział w interpretacji wyników i opracowaniu oryginalnego manuskryptu	
2	Dr inż. Damian Kułaga	Wykonanie i opisanie wyników dokowania molekularnego	 Podpisano przez/ Signed by DAMIAN KUŁAGA Data/ Date: 24.01.2026 13:48 mSzofir
3	Dr Katarzyna Sosnowska	Wykonanie badań aktywności hemolitycznej	<i>Katarzyna Sosnowska - KaKa</i>
4	Prof. UAM dr hab. Lucyna Mrówczyńska	Wykonanie badań aktywności hemolitycznej, dyskusja wyników	<i>Lucyna Mrówczyńska</i>
5	Prof. dr hab. Tomasz Pospieszny	Diskusja wyników, wykonanie obliczeń semiempirycznych i określenie potencjału biologicznego, współudział w opracowaniu oryginalnego manuskryptu	<i>T. Pospieszny</i>

Poznań 14.01.2026 r.

Oświadczenie



Oświadczamy, że w monografii „Changing the game: innovative applications of steroid conjugates” opublikowanej w książce *Na pograniczu chemii, biologii i fizyki - rozwój nauk. Tom 6* wkład wymienionych autorów w przygotowanie publikacji jest następujący:

Lp.	Imię i nazwisko	Wkład merytoryczny autora	Podpis
1	Dr inż. Hanna Koenig	Dyskusja wyników, współudział w interpretacji wyników i opracowaniu oryginalnego manuskryptu	
2	Prof. dr hab. Tomasz Pospieszny	Dyskusja wyników, współudział w interpretacji wyników i opracowaniu oryginalnego manuskryptu	

Poznań 14.01.2026 r.

Oświadczenie




Oświadczamy, że w artykule „Recent Advances in Steroid Discovery: Structural Diversity and Bioactivity of Marine and Terrestrial Steroids” opublikowanym w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(7), 3203 wkład wymienionych autorów w przygotowanie publikacji jest następujący:

Lp.	Imię i nazwisko	Wkład merytoryczny autora	Podpis
1	Dr inż. Hanna Koenig	Dyskusja wyników, współudział w interpretacji wyników i opracowaniu oryginalnego manuskryptu	
2	Prof. dr hab. Tomasz Pospieszny	Dyskusja wyników, współudział w interpretacji wyników i opracowaniu oryginalnego manuskryptu	

Poznań 14.01.2026 r.

Oświadczenie

Oświadczamy, że w artykule „Formylated Bile Acid Steroid Conjugates: Synthesis, Antifungal Properties, and in silico studies” opublikowanym w czasopiśmie *ACS Omega*, 2025, 49, 60152-60161 wkład wymienionych autorów w przygotowanie publikacji jest następujący:

Lp.	Imię i nazwisko	Wkład merytoryczny autora	Podpis
1	Mgr. Vladislav Maliugin	Współdział w syntezie związków	Vladislav Maliugin
2	Dr inż. Hanna Koenig	Dyskusja wyników, współdział w interpretacji wyników i opracowaniu oryginalnego manuskryptu	
3	Dr inż. Damian Kułaga	Wykonanie i opisanie wyników dokowania molekularnego	 Podpisano przez/ Signed by: DAMIAN KUŁAGA Data/ Date: 24.01.2026 13:48 mSzofir
4	Prof. UPP dr hab. Justyna Starzyk	Wykonanie badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej	
5	Prof. dr hab. Tomasz Pospieszny	Dyskusja wyników, wykonanie obliczeń semiempirycznych, współdział w opracowaniu oryginalnego manuskryptu	