



Synthèse chimique et évaluation biologique de dérivés stéroïdiens pour lutter contre les maladies sensibles aux estrogènes

Mémoire

Maxime Lespérance

Maîtrise en médecine moléculaire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Maxime Lespérance, 2018

**Synthèse chimique et évaluation biologique de dérivés
stéroïdiens pour lutter contre les maladies sensibles
aux estrogènes**

Mémoire

Maxime Lespérance

Sous la direction de :

Donald Poirier, directeur de recherche

Résumé

Depuis quelques années, de plus en plus de personnes reçoivent un diagnostic pour des maladies prolifératives induites par des hormones estrogéniques. On dénombre parmi eux de nombreux cancers, tel que le cancer du sein, mais également une maladie comme l'endométriose. Même si les thérapies couramment utilisées sont plus efficaces, plusieurs problèmes persistent dont : la résistance aux médicaments ainsi que les effets indésirables liés au manque d'efficacité et au caractère destructif de plusieurs de ces traitements. Il est donc essentiel de développer de nouvelles alternatives au traitement pour offrir des options thérapeutiques plus sélectives et plus efficaces au traitement actuel de ces maladies. L'hormonothérapie représente une avenue intéressante, puisqu'elle pourrait ralentir, voir bloquer la progression de ces maladies en limitant certains effets secondaires liés aux traitements actuellement utilisés. En fait, l'enzyme 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 (17 β -HSD1) est une cible clé pour ce type de traitement, puisqu'elle régule la formation de l'estradiol, l'estrogène le plus puissant. Ainsi, une inhibition de cette enzyme diminuerait les niveaux d'hormones estrogéniques intracrines qui lient et activent les récepteurs des estrogènes. En se basant sur plusieurs travaux effectués dans ce domaine, plusieurs dérivés stéroïdiens ont été synthétisés dans le but d'obtenir de puissants inhibiteurs pour l'enzyme 17 β -HSD1. Dans un premier temps, on compte de nombreux dérivés benzyles fonctionnalisés qui furent ajoutés au niveau du carbone 16 du noyau stéroïdien. Ces modifications ont permis d'obtenir une série d'analogues de notre composé de tête (PBRM). Ensuite, un groupe oxirane fut ajouté en position 3 afin d'en évaluer l'activité par rapport à l'inhibiteur PBRM. Les travaux réalisés ont permis d'approfondir et de découvrir des informations cruciales sur l'inhibition de l'enzyme. Quelques composés synthétisés ont permis d'obtenir des activités inhibitrices intéressantes qui serviront de point de départ lors de futurs travaux. Ces découvertes permettront de mieux cibler certaines fonctionnalisations utiles pour la conception d'inhibiteurs permettant de traiter certaines maladies sensibles aux estrogènes.

Abstract

For the last few years, there has been an increase in the number of people who receives a diagnosis of estrogenic proliferation induced disease. Among them, there are breast cancers and endometriosis. Although commonly used therapies are effective, several problems persist, including the development of drug resistance, adverse effects associated with the lack of efficacy and destructiveness of these therapies. It is therefore essential to develop alternative treatments to provide more selective and effective therapies. Hormone therapy is an interesting avenue because it could slow down or block the progression of diseases by limiting some of the side effects associated with the current treatments. In fact, the enzyme 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17β -HSD1) is a key target for this purpose, since it regulates the formation of the more potent estrogen, estradiol. Thus, inhibition of this enzyme would decrease the levels of intracrine estrogens that bind and activate the estrogen receptors. Based on several studies in this field, several steroidal derivatives have been synthesized in order to provide a potent inhibitor for 17β -HSD1. First of all, numerous functionalized C16-benzyl estrane derivatives were synthesized. These modifications allowed obtaining a series of analogs of our leading 17β -HSD1 inhibitor (PBRM). Then, an oxirane group was added in position 3 of the steroid backbone to evaluate its activity compare to the inhibitor PBRM. The work achieved allowed to increase and discover crucial information on the enzyme. Some synthesized compounds have revealed interesting inhibitory activity, which will serve as a starting point for future work. All the discoveries will provide a better targeting of certain functionalizations in the development of estrogen-sensitive disease treatment.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Liste des schémas	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
Avant-Propos	xiv
Introduction	1
1. Les stéroïdes comme outils thérapeutiques contre les maladies sensibles aux hormones	1
1.1 Caractéristique d'un stéroïde	1
1.1.1 Hormones stéroïdiennes	2
1.1.2 Régulation	2
1.2 Maladies hormono-dépendantes	4
1.2.1 Cancer	5
1.2.1.1 Cause de cancer	5
1.2.2 Maladies sensibles aux androgènes	6
1.2.3 Maladies sensibles aux estrogènes	8
1.2.3.1 Cancer du sein	8
1.2.3.2 Endométriose	12
1.3 Traitement de maladies hormono-dépendantes	13
1.3.1 Dérivés d'hormones régulatrices	14
1.3.2 Antihormones	18
1.3.2.1 Anti-androgènes	19
1.3.2.2 Anti-estrogènes	21
1.3.3 Inhibiteurs des enzymes de la stéroïdogénèse	23
1.3.3.1 La P450c17	24
1.3.3.2 L'aromatase (P450arom)	25

1.3.3.3	Stéroïde sulfatase	27
1.3.3.4	5 α -Réductase.....	28
1.3.3.5	17 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD).....	30
1.4	Aperçu des projets	36
Chapitre 1	38
	Résumé	39
	Synthesis of a Series of Estrane Derivatives as Inhibitors of 17 β -HSD1 for the Treatment of Estrogen-Dependent Diseases	40
Chapitre 2	73
	Résumé	74
	Synthesis of C3-Epoxy-estrane Derivatives Targeted by Molecular Modeling as Competitive Inhibitors of 17 β -HSD1	75
Conclusion générale	98
Bibliographie	100

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Structure des glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, progestérone, androgènes et estrogènes, formés à partir du cholestérol	1
Figure 2. Régulation hormonale des stéroïdes sexuels.....	3
Figure 3. Les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, ainsi que les stéroïdes formés	4
Figure 4. Altérations cellulaires favorisant la cancérogenèse	6
Figure 5. Composés androgéniques.....	7
Figure 6. Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate	8
Figure 7. Composés estrogéniques	9
Figure 8. Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein.....	10
Figure 9. Stratégies pour réduire le niveau des hormones stéroïdiennes	14
Figure 10. Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires	15
Figure 11. Antagonistes de GnRHR commercialisés	16
Figure 12. Agonistes de GnRHR commercialisés.....	18
Figure 13. Antagonistes du récepteur des androgènes commercialisés	20
Figure 14. Antagoniste pur du récepteur des estrogènes commercialisé.....	21
Figure 15. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) commercialisés	23
Figure 16. Rôle de l'enzyme P450c17	24
Figure 17. Inhibiteurs stéroïdiens de l'enzyme P450c17	25
Figure 18. Rôle de l'enzyme aromatase	25
Figure 19. Inhibiteurs stéroïdiens irréversibles de l'aromatase.....	26
Figure 20. Inhibiteurs non-stéroïdiens réversibles de l'aromatase.....	26
Figure 21. Rôle de l'enzyme stéroïde sulfatase.....	27
Figure 22. Sélection d'inhibiteurs de l'enzyme stéroïde sulfatase	28
Figure 23. Rôle de l'enzyme 5 α -réductase	29
Figure 24. Inhibiteurs de l'enzyme 5 α -réductase	29
Figure 25. Rôle de l'enzyme 17 β -HSD	30

Figure 26. Liste d'inhibiteurs stéroïdiens connus de l'enzyme 17 β -HSD1.....	31
Figure 27. Liste d'inhibiteurs non-stéroïdiens connus de l'enzyme 17 β -HSD1	32

Chapitre 1

Figure 1. Representation of compound PBRM in the active site of 17 β -HSD1	43
Figure 2. Representation of the estrane derivatives forming three series of potential 17 β -HSD1 inhibitors.....	66
Figure 3. 17 β -HSD1 inhibition percentage of compounds of series 1 and 2 in T-47D cells	67
Figure 4. 17 β -HSD1 inhibition percentages of compounds of series 3 in T-47D cells	68

Chapitre 2

Figure 1. Structures of known 17 β -HSD1 inhibitors CC-156 and PBRM as well as those targeted as potential inhibitors of enzyme 17 β -HSD1	78
Figure 2. Docking results of compounds CC-156, PBRM, 15 -(R), 15 -(S), 11 -(R) and 11 -(S) ...	88
Figure 3. 17 β -HSD1 inhibition of a series of potential inhibitors.....	92
Figure 4. Inhibition of 17 β -HSD1 in T-47D cells at increasing concentrations of compounds 11 and 15 and reference inhibitors PBRM and CC-156.....	93
Figure 5. Effect of inhibitors on the growth of estrogen-starved estrogen-sensitive T-47D cells	94

Liste des schémas

Chapitre 1

Scheme 1. Synthesis of compounds 5, 7a-c, 8-10	63
Scheme 2. Synthesis of compounds 11-13, 15	64
Scheme 3. Synthesis of compounds 16	65
Scheme 4. Synthesis of compounds 23, 25a-c	65

Chapitre 2

Scheme 1. Synthesis of epoxides 4, 5, 7 and 8	90
Scheme 2. Synthesis of epoxides 11 and 15	90

Liste des abréviations

17 β -HSD : 17 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase

17 β -HSD1 : 17 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase type 1

ACN : Acétonitrile

ACTH : Hormone corticotrope

AR : Récepteur des androgènes

cm : Centimètre

DCM : Dichlorométhane

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHEAS : Déhydroépiandrostérone sulfaté

DHT : Dihydrotestostérone

DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine

DMAP : 4-Diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E1 : Estrone

E1S : Estrone sulfaté

E2 : Estradiol

EDD : *Estrogen-dependent disease*

ER : Récepteur des estrogènes

ER α : Récepteur alpha des estrogènes

EtOAc : Acétate d'éthyle

EtOH : Éthanol

FBS : *Fetal bovine serum*

FSH : Hormone folliculo-stimulante

g : Gramme

GnRH : Gonadotrophine hypophysaire

GnRHR : Récepteur des gonadotrophines hypophysaires

h : Heure

HBTU : 3-[Bis(diméthylamino)méthylumyl]-3*H*-benzotriazol-1-oxide hexafluorophosphate

HCl : Acide chlorhydrique

HER2 : *Human epidermal growth factor receptor 2*

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance (*High pressure liquid chromatography*)

Hz : Hertz

IC₅₀ : Concentration à 50 % d'activité

IR : Infrarouge

K₂CO₃ : Carbonate de potassium

L : Litre

LCMS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid chromatography-mass spectrometry*)

LH : Hormone lutéinisante

LRMS : *Low-resolution mass spectra*

M : Molaire

m-CPBA : Acide métachloroperbenzoïque

MeOH : Méthanol

mg : Miligramme

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

MHz : Mégahertz

min : Minute

mL : Millilitre

mm: Millimètre

mmol : Millimolaire

NADP : *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NADPH : *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)*

ng : Nanogramme

nm : Nanomètre

nmol : Nanomolaire

NMR : Résonance magnétique nucléaire (*Nuclear magnetic resonance*)

PBRM : 3- $\{[3-(2\text{-bromoéthyl})-17\beta\text{-hydroxy-estra-1(10),2,4\text{-trièn-16}\beta\text{-yl}]méthyl\}$ benzamide

ppm : Partie par million

PREG : Prégnénone

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

SAR : *Structure activity relationship*

SERM : *Selective estrogen receptor modulator*

TBAF : Tétrabutylammonium fluoride

THF : Tétrahydrofurane

THP : Tétrahydropyranyl

TLC : Chromatographie sur couche mince (*Thin layer chromatography*)

Tr : Triphénylméthyl

µg : Microgramme

µL : Microlitre

µM : Micromolaire

v : Volume

w : Poid (*weight*)

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier mon directeur de recherche de maîtrise, le Dr. Donald Poirier, pour toutes les précieuses connaissances qu'il m'a partagé dans les dernières années. Je le remercie tout particulièrement pour sa patience et sa diplomatie.

J'aimerais également remercier mes collègues que j'ai eu l'immense privilège de côtoyer durant les dernières années. Pour tous les échanges de connaissances, professionnels et ceux un peu moins, un grand merci. Je tiens à souligner particulièrement René Maltais, mon superviseur au laboratoire qui, malgré nos discussions parfois tumultueuses, m'a appris tant et m'a inculqué plusieurs valeurs propre au travail d'équipe dans un cadre professionnel. Jenny Roy et Marie-Claude Trottier qui étaient, à leur manière indispensable pour moi durant ces années.

Je voudrais également porter mes remerciements à mes amis et ma famille qui m'ont supporté et encouragé, surtout ces derniers temps. Et finalement, à mon amour qui m'a tant aidé à sa manière par sa présence et son support.

Avant-Propos

Ce mémoire de maîtrise, intitulé «Synthèse chimique et évaluation biologique de dérivés stéroïdiens pour lutter contre les maladies sensibles aux estrogènes», et présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de maître ès sciences, est rédigé sous la forme d'insertion d'articles.

Le premier article, intitulé «Synthesis of a Series of Estrane Derivatives as Inhibitor of 17 β -HSD1 for the Treatment of Estrogen-Dependent Diseases» et dont je suis le premier auteur, est en voie d'être soumis dans un journal scientifique. Ma contribution à ce manuscrit a été de concevoir et de synthétiser chacune des séries de composés présentés. Le Dr. René Maltais a apporté sa contribution en préparant une des molécules rapportées. L'évaluation biologique fut réalisée par la Dr. Jenny Roy. Ensuite, j'ai effectué la rédaction de l'article avec mon directeur de recherche, le Dr. Donald Poirier, qui a conceptualisé l'étude, participé à l'interprétation des résultats et effectué la révision du manuscrit.

Le deuxième article, intitulé «Synthesis of C3-Epoxy-estrane Derivatives Targeted by Molecular Modeling as Competitive Inhibitor of 17 β -HSD1» et dont je suis le premier auteur, est en voie d'être soumis dans le journal Steroids. Ma contribution à ce manuscrit a été de concevoir et de synthétiser les composés présentés. J'ai également rédigé l'article avec mon directeur de recherche, le Dr. Donald Poirier, qui a conceptualisé l'étude, participé à l'interprétation des résultats et effectué la révision du manuscrit. Le Dr. Xavier Barbeau a effectué les études de modélisation moléculaire qui ont permis de cibler les dérivés époxydes. L'évaluation biologique de ces derniers, soit l'activité inhibitrice et l'estrogénicité, fut réalisée par la Dr. Jenny Roy.

Introduction

1. Les stéroïdes comme outils thérapeutiques contre les maladies sensibles aux hormones

1.1 Caractéristique d'un stéroïde

La structure de base des stéroïdes est composée de quatre cycles d'atome de carbone, dont trois cyclohexanes et un cyclopentane. L'ensemble de ces cycles porte le nom de noyau hexadécahydrocyclopenta[a]phénanthrène ou stérane. À cette structure de base s'ajoute des chaînes carbonées à diverses positions, c'est la variation du nombre de carbones qui détermine à quelle famille le stéroïde appartient. En outre, les cholestanes contiennent 27 carbones, les pregnanes 21 carbones, les androstanes 19 carbones et enfin les estranes 18 carbones. C'est d'un précurseur stéroïdien commun, le cholestérol endogène et exogène, que découle chacune de ces familles (Fig. 1).¹

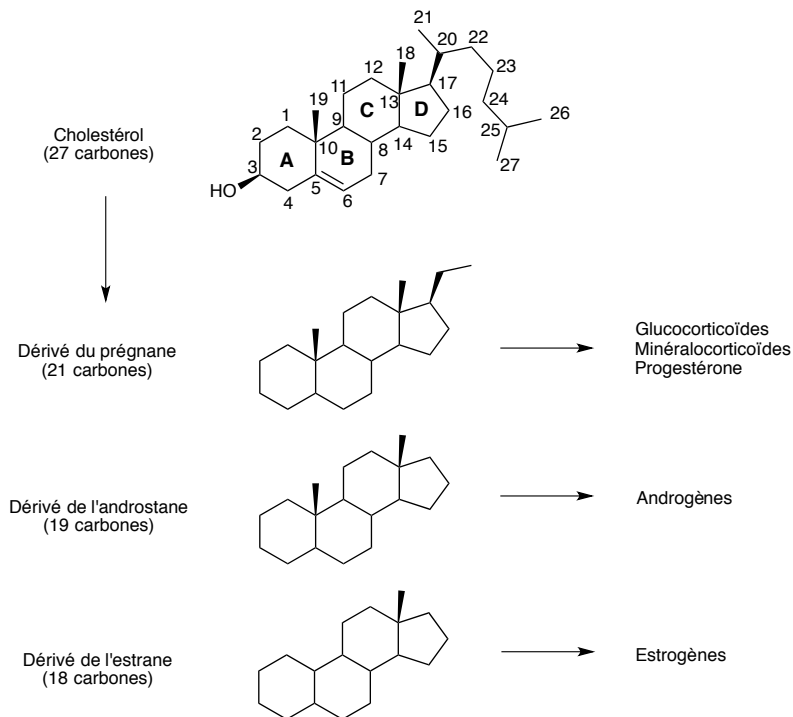


Figure 1 : Structure des glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, progestérone, androgènes et estrogènes, formés à partir du cholestérol. La numérotation des carbones et des cycles est illustrée avec le cholestérol. Figure tirée et adaptée de «Biosynthèse et sécrétion des hormones stéroïdiennes» de Labrie F. et al.²

1.1.1 Hormones stéroïdiennes

Les stéroïdes représentent une vaste famille de produits naturels qui jouent un rôle crucial dans l'homéostasie d'un point de vue hormonale.³ Ils sont divisés en trois sous-groupes d'hormones; les stéroïdes sexuels, les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Les stéroïdes sexuels sont composés de la progestérone, des androgènes et des estrogènes qui ont comme rôle le développement respectif des caractères sexuels masculins et féminins et de la reproduction, mais également celui du développement des os. Les glucocorticoïdes quant à eux agissent dans la régulation du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, ils influent sur la réponse immunitaire. Les minéralocorticoïdes de leur côté régulent le niveau hydrosodé, c'est-à-dire l'équilibre eau-sel dans le corps. Plusieurs dérivés stéroïdiens sont utilisés en thérapeutique dont la plupart lors d'hormonothérapie.

1.1.2 Régulation

La régulation des hormones stéroïdiennes s'effectue par l'entremise des cascades réactionnelles et de boucles de rétroaction toutes contrôlées par l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH). Activée par cette dernière, l'hypophyse produit trois hormones régulatrices; l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone corticotrope (ACTH). Chacune possède un organe ciblé et elles permettent la production des hormones stéroïdiennes (Fig. 2). La LH est responsable de la formation de la testostérone et des estrogènes par le biais des cellules de Leydig et des follicules présents dans les gonades respectives. La FSH, elle, régule la spermatogénèse chez l'homme et également la progestérone et les estrogènes chez la femme. Ces hormones sont produites par les cellules de Sertolli et par le corps jaune, respectivement. Finalement, l'ACTH dicte aux surrénales la formation de la déhydroépiandrostérone (DHEA) qui produit à son tour la progestérone.⁴

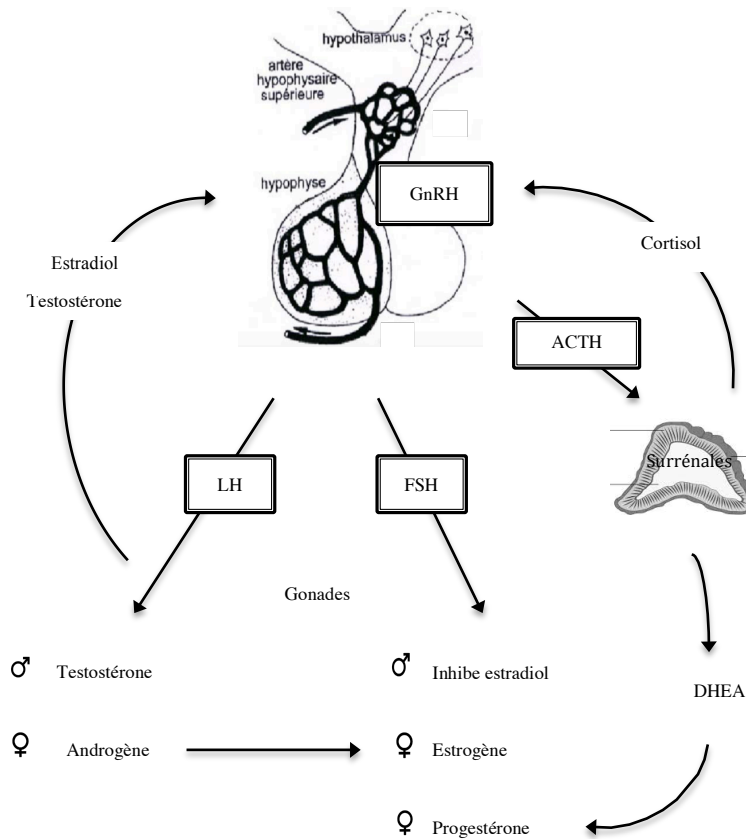


Figure 2 : Régulation hormonale des stéroïdes sexuels. Figure tirée et adaptée de «All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissue by the mechanism of intracrinology after menopause» de Labrie, F.⁵

S'il s'agit de ces hormones régulatrices qui balancent les taux d'hormones stéroïdiennes du corps, celles-ci sont toutefois obtenues à partir du cholestérol grâce à un processus impliquant divers enzymes regroupant ce que l'on nomme la stéroïdogénèse (Fig. 3). On retrouve une dizaine de groupes d'enzymes impliquées dans la formation des différentes hormones stéroïdiennes. Ayant toutes un rôle menant à la différenciation des stéroïdes ce qui conduit aux trois grandes catégories d'hormones stéroïdiennes; les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les hormones sexuelles. Au niveau de ces dernières, lesquelles nous intéressent particulièrement dans le cadre de cette recherche, on retrouve l'ensemble des enzymes permettant la modification moléculaire de la DHEA, qui est le précurseur pour chacune des hormones sexuelles tant les androgènes, les estrogènes que les progestatifs.

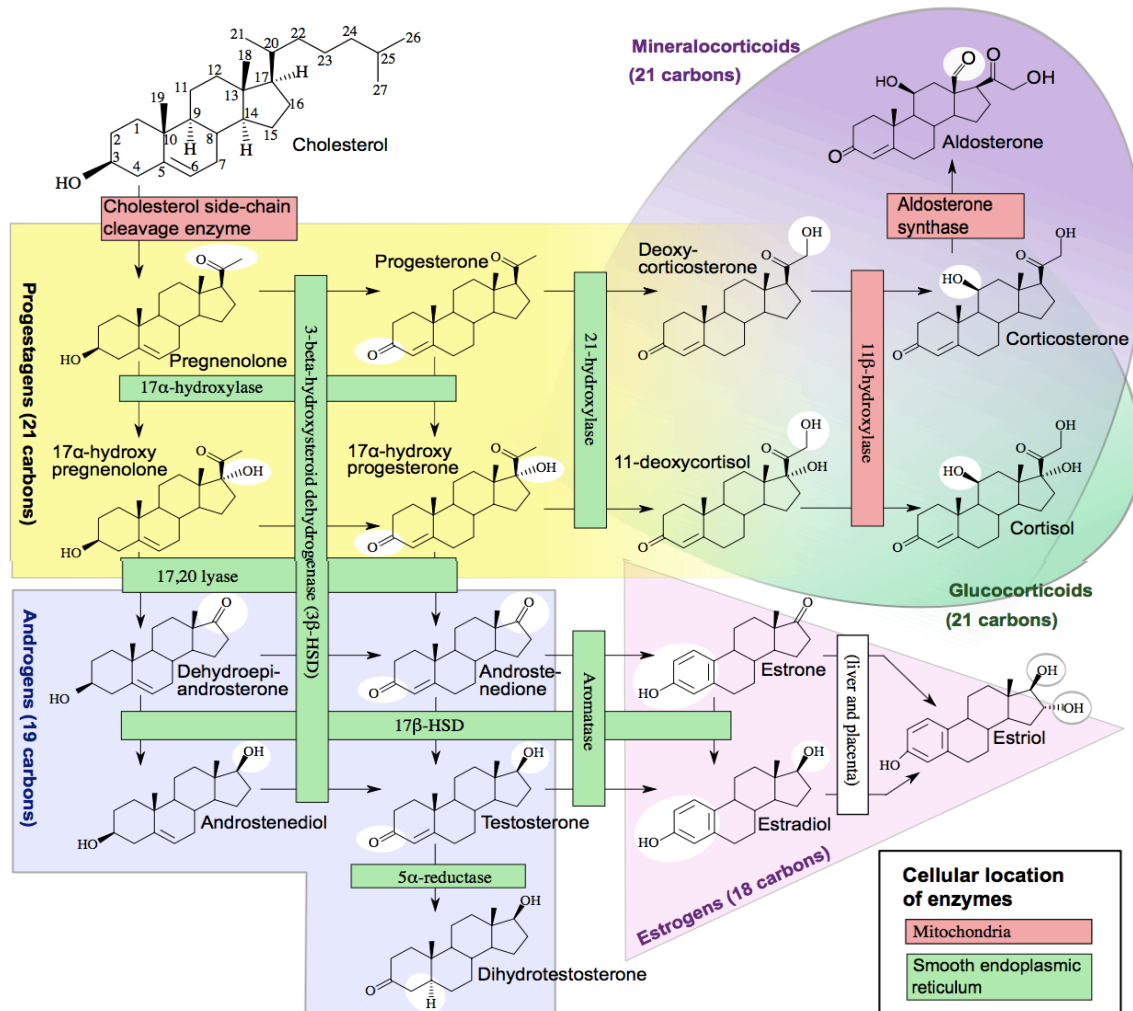


Figure 3 : Les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, ainsi que les stéroïdes formés. Figure tirée de <http://www.vetopsy.fr/endocrinologie/hormones-sexuelles/testosterone.php>⁶

1.2 Maladies hormono-dépendantes

On définit une maladie comme hormono-dépendante lorsque la régulation des hormones sexuelles augmente son incidence ou favorise sa progression. En général, ce type de désordre découle d'un dérèglement des cellules ayant une affinité pour une famille d'hormones sexuelles. Cela explique pourquoi on divise généralement cette catégorie de maladie en deux types; 1) androgéno-dépendante, celle dont les cellules sont sensibles aux androgènes et 2) estrogéno-

dépendante, celle dont les cellules sont sensibles aux estrogènes et à la progestérone. Plusieurs cancers sont notamment classés comme une maladie hormono-dépendante puisque les hormones sexuelles induisent une prolifération cellulaire qui accroît la taille des tumeurs.

1.2.1 Cancer

Le cancer est un terme général décrivant un ensemble de plus de 200 maladies distinctes partageant toutes les mêmes caractéristiques pour des cellules d'un organisme donné. C'est-à-dire, un dérèglement du processus de croissance et de division cellulaire lié à une insensibilité aux signaux et mécanismes antiprolifératifs, la capacité de détruire et d'envahir les tissus avoisinant pour former des métastases, la capacité anormale à susciter l'angiogenèse et l'incapacité de faire de l'apoptose.⁷⁻⁹ Hanahan et Weinberg⁸ illustre bien toutes ces altérations progressives impliquées dans la cancérogenèse (Fig. 4).

1.2.1.1 Cause de cancer

Tout cancer est induit par des facteurs, interne et/ou externe, qui peuvent agir ensemble ou de façon séquentielle. Les facteurs internes qui déclenchent ou favorisent la carcinogénèse sont les mutations héréditaires, les hormones, les conditions immunes et les mutations qui se produisent à partir de métabolisme. L'on parle de facteur externe dans le cas de tabagisme, d'organismes infectieux, de produits chimiques et de radiation.¹⁰ De nombreux chercheurs suggèrent que la plupart, sinon tous les cancers, ont acquis des capacités fonctionnelles identiques au cours de leur développement. Il semble évident, cependant, que différentes stratégies régissent de telles fonctionnalisations. Ces altérations d'ordre génomique concernent deux types de gènes : les gènes suppresseurs de tumeur et les oncogènes.

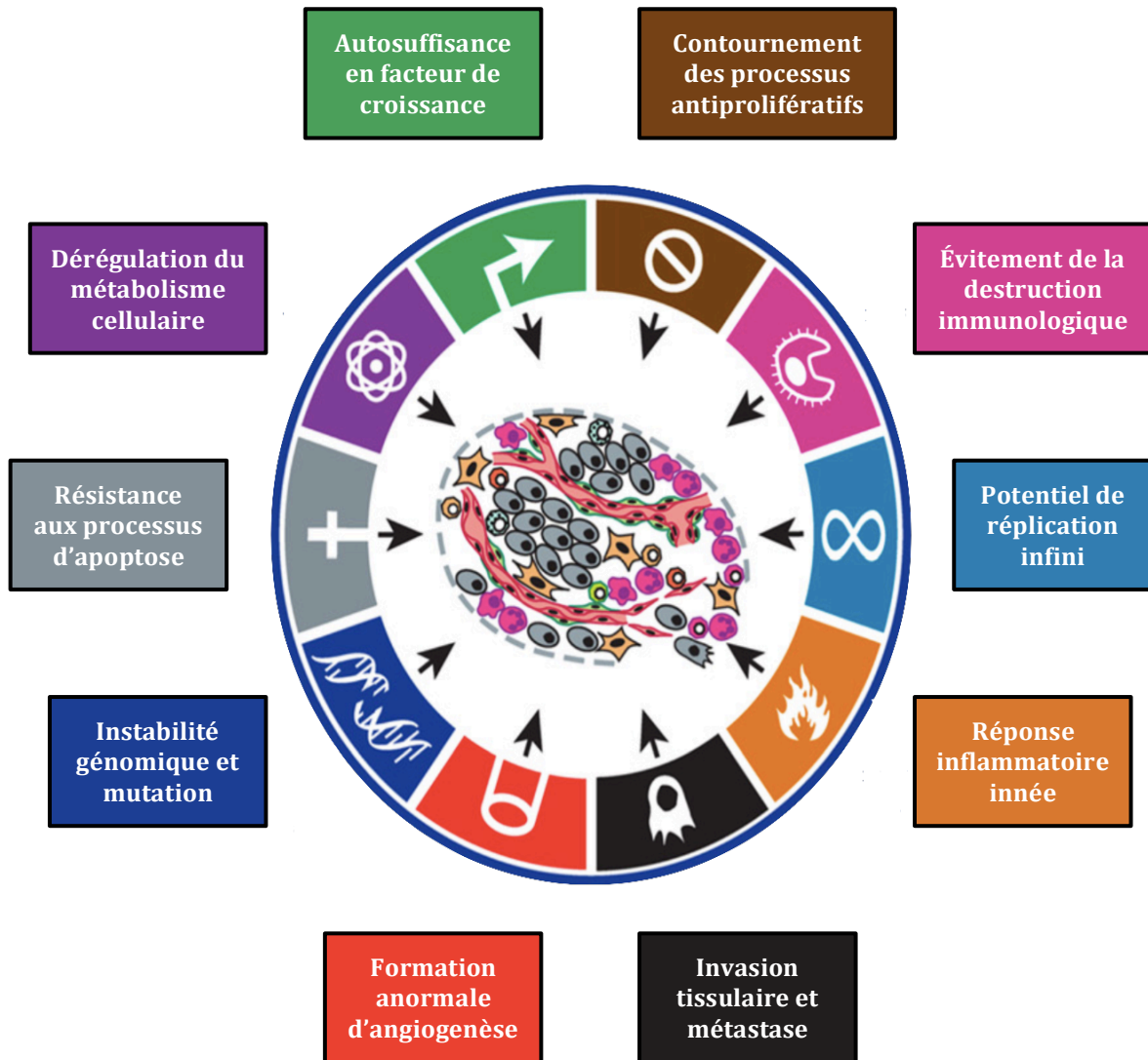


Figure 4 : Altérations cellulaires favorisant la cancérogénèse. Figure tirée et adaptée de «The Hallmarks of Cancer : The Next Generation» de Hanahan et Weinberg⁸

1.2.2 Maladies sensibles aux androgènes

Dans cette catégorie, on parle généralement du cancer de la prostate qui est typiquement une maladie sensible aux androgènes. Les cellules de la prostate peuvent subir des changements qui rendent leur mode de croissance ou leur comportement anormal. Ces changements engendrent des affections non cancéreuses, comme la prostatite et l'hyperplasie bénigne de la prostate, mais

également des affections cancéreuses comme dans le cas du cancer de la prostate. Le cancer constitue une tumeur maligne qui prend naissance dans les cellules de la prostate et se propage parfois en métastases à tout le corps.¹¹ En une haute concentration, les hormones androgéniques comme la testostérone ou la dihydrotestostérone (DHT) (Fig. 5), cette dernière étant la plus puissante, induisent une prolifération cellulaire et donc un développement plus rapide des tumeurs.

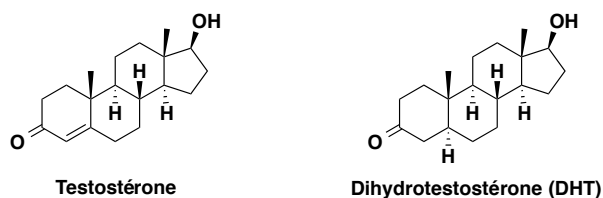
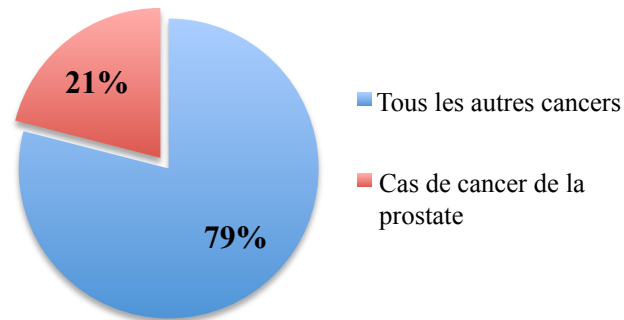


Figure 5 : Composés androgéniques

En 2016, la Société canadienne du Cancer estimait que 21600 nouveaux cas de cancer de la prostate seraient diagnostiqués. Ces chiffres font du cancer de la prostate le plus répandu chez les hommes au Canada.¹² Il se développe habituellement lentement et la tumeur peut souvent être retirée complètement par chirurgie ou traitée avec succès grâce à différents plans d'intervention allant de la chimiothérapie à la radiothérapie et bien sûr à des traitements à base d'hormonothérapie.¹¹ Malgré des traitements de plus en plus adaptés, cette maladie demeure très meurtrière puisqu'elle représente la troisième cause de décès par cancer chez les Canadiens. Un diagnostic tardif serait, dans bien des cas, responsable des décès (Fig. 6).

**Pourcentage de tous les nouveaux cas de cancer
estimés en 2016 chez les hommes**



**Pourcentage de tous les décès par cancer estimés en
2016 chez les hommes**

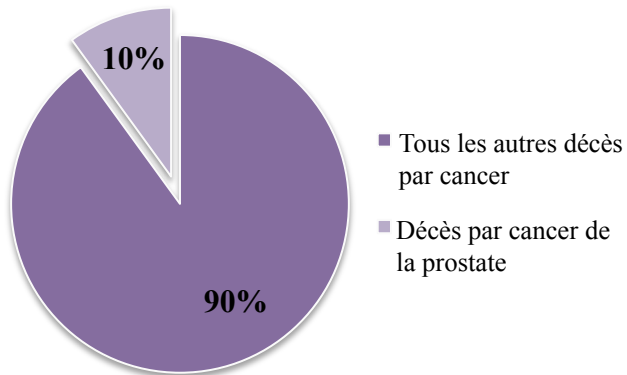


Figure 6 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate. Figure tirée et adaptée de la Société Canadienne du Cancer¹²

1.2.3 Maladies sensibles aux estrogènes

1.2.3.1 Cancer du sein

Les cellules localisées au niveau du sein peuvent subir des changements qui rendent leur mode de croissance ou leur comportement anormal. Ces changements engendrent des affections ou maladies non cancéreuses, comme l'hyperplasie atypique, des kystes et des papillomes

intracanalaires mais également des maladies cancéreuses comme dans le cas du cancer du sein. Les tumeurs malignes localisées au niveau des cellules du sein sont sensibles au taux d'estrogènes dans le corps. Les hormones hautement estrogéniques telles l'estradiol (E2) influent sur la croissance de ces cellules mammaires. On va alors définir un composé estrogénique par son affinité pour le récepteur des estrogènes et à sa capacité d'activer ces derniers. Une hormone telle que E2 lie favorablement ce récepteur, et ce, plus fortement que son précurseur, l'estrone (E1). Il est donc le ligand naturel le plus puissant du corps humain.

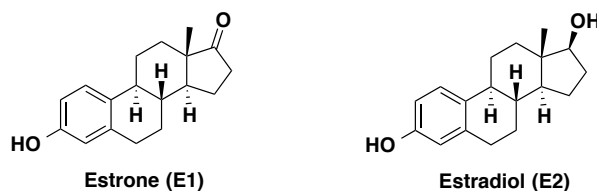
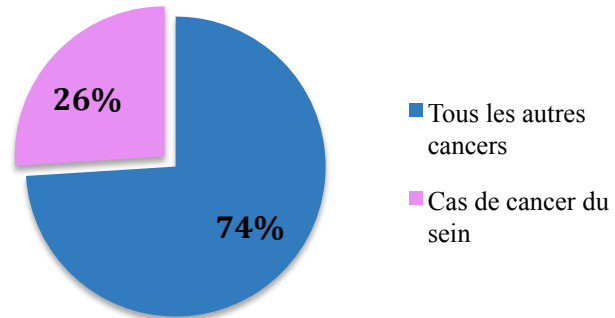


Figure 7 : Composés estrogéniques

Le cancer du sein est de loin le type de cancer le plus connu, et ce, grâce à de nombreuses campagnes de sensibilisation. Cette notoriété tient également du fait que ce cancer est le plus répandu chez les femmes au Canada. La Société canadienne du Cancer en dénombrait pas moins de 27 500 nouveaux cas en 2016. Malgré des percées majeures dans le diagnostic et les traitements, cette maladie demeure très meurtrière puisqu'elle représente la deuxième cause de décès par cancer chez les Canadiennes. Un diagnostic tardif serait, dans bien des cas, un facteur imputable de décès (Fig. 8).^{13 14}

La plupart des cancers possèdent un large éventail de traitements possibles. Ceux-ci sont parfois employés seuls, mais bien souvent l'on bénéficie d'une multithérapie maximisant les chances de rémission. Chaque personne atteinte est prise en charge par un plan de traitement personnalisé déterminé grâce à plusieurs paramètres dont le type de cancer, pour ne nommer que celui-ci.

**Pourcentage de tous les nouveaux cas de cancer
estimés en 2016 chez les femmes**



**Pourcentage de tous les décès par cancer estimés en
2016 chez les femmes**

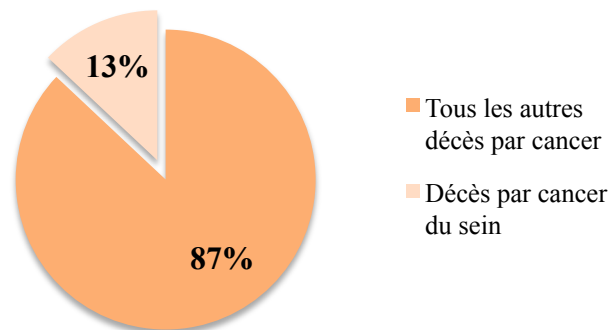


Figure 8 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein. Figure tirée et adaptée de la Société Canadienne du Cancer¹⁴

Les principaux traitements disponibles pour éradiquer le cancer, pour celui du sein notamment, sont les suivants :

- La chirurgie : Consiste en une intervention physique permettant de retirer une tumeur. Elle peut également servir à préciser un diagnostic ou le niveau d'invasion d'une tumeur. Les ganglions lymphatiques sont souvent ciblés par ce type d'intervention

puisqu'ils permettent de déterminer le stade du cancer et donc de planifier le traitement approprié.

- La radiothérapie : Processus où l'on irradie une partie ciblée du corps avec un rayon de particule à haute énergie. Cette action induit une destruction des cellules locales ciblées. Il est donc impératif de concentrer le rayonnement sur la cible tumorale en particulier. C'est pourquoi la radiothérapie est couramment administrée suite à une tumorectomie (exérèse tumorale) afin d'éradiquer toutes les cellules cancéreuses ayant résisté à l'intervention chirurgicale.
- La chimiothérapie : Traitement médicamenteux qui attaque les cellules subissant une prolifération rapide. De par leur nature, les cellules cancéreuses sont ciblées par ce type de traitement. Toutefois, le manque de sélectivité des agents anticancéreux est responsable de plusieurs effets secondaires bien connus de cette thérapie. Notamment la perte de cheveux, puisque les cellules responsables de la pilosité comptent parmi les cellules se répliquant le plus rapidement du corps, avec les cellules de la peau et de l'intestin.
- L'hormonothérapie : Cette thérapie consiste en la formation d'un environnement non propice à la prolifération cellulaire. Contrairement aux autres méthodes décrites auparavant, celle-ci ne vise pas l'attaque de cellules cancéreuses directement. Cette technique est particulièrement prometteuse dans le cas des cancers hormono-dépendants tels que le cancer du sein. L'idée est de diminuer voire d'éliminer l'effet des hormones sur les récepteurs cellulaires et qui produisent une prolifération cellulaire.
- Les thérapies biologiques (pharmacogénomique) : Ce type de traitement exploite les anomalies biologiques des cellules tumorales. Dans ce type de thérapie, dite personnalisée, les cancers sont étudiés pour leur fonctionnement à l'échelle du génome et non seulement limités à un seul gène. Ce qui a pour incidence un meilleur indice thérapeutique et un ciblage rationnel des cellules tumorales.¹⁵ Ce type de traitement peut être utilisé seul ou en association avec des agents chimiothérapeutiques. À titre

d'exemple, dans le cas du cancer du sein, notamment, il est désormais prescrit d'effectuer un test du marqueur d'expression HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*) afin d'en déterminer le taux au niveau des cellules mammaires. Le résultat du dépistage de ce récepteur permettra de cibler l'utilisation d'une thérapie biologique puisqu'un composé nommé trastuzumab (Herceptin) offre un pourcentage d'efficacité intéressant chez les patients présentant un haut taux du récepteur HER2.^{16 17}

1.2.3.2 Endométriose

L'endométriose est une maladie où la muqueuse utérine se développe à l'extérieure de la paroi utérine. On observe le plus fréquemment le tissu endométrial proliférant dans la cavité péritonéale ou au niveau des ovaires. Il arrive, dans des cas plus exceptionnels, que les cellules formant l'endomètre se développent dans les organes digestifs tels que le rectum, la vessie ou les reins. Le développement de la maladie est rapide et, à un stade avancé, elle provoque des douleurs pelviennes et peut aller jusqu'à causer l'infertilité. L'endométriose affecte entre 6 et 10 % de la population nord-américaine féminine.¹⁸

Actuellement, aucun remède ne garantit de guérison. L'hystérectomie permet en outre d'éliminer les tissus malsains, mais n'assure en rien une disparition définitive des nouvelles cellules endométriales, suite à l'intervention chirurgicale. Le seul traitement médicamenteux employé pour traiter cette affection est un agoniste de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH). L'agoniste leuproréline, administré sous la forme de sel d'acétate, interrompt l'action de l'hormone GnRH en liant son récepteur et en le désensibilisant ce qui cause une diminution des taux d'estrogènes et d'androgènes.¹⁹ Cependant, plusieurs effets secondaires sont liés à la prise de ce médicament ce qui en limite l'utilisation. Sinon certains traitements hormonaux à base de progestérone, telle que les médicaments contraceptifs, sont actuellement utilisés afin de réduire les inconforts reliés à l'endométriose. Ils agissent en bloquant la production des hormones de l'hypophyse lesquelles sont stimulantes pour les ovaires, ce qui réduit également les saignements. Cette maladie est encore bien peu comprise d'où l'absence de traitement efficace. Cependant, il est de notoriété que la plupart des lignées

cellulaires formant le tissu endométrial sont sensibles aux estrogènes. Il est donc probable que l'on soit en mesure de ralentir voir bloquer leur prolifération par le biais d'un inhibiteur de la biosynthèse des estrogènes.

1.3 Traitement de maladies hormono-dépendantes

De par sa nature, une maladie hormono-dépendante, ou possédant une sensibilité aux hormones, sera influencée par une modification du taux d'hormones auxquelles ses cellules sont associées. Il existe essentiellement trois méthodes afin de faire varier un niveau intracrine d'hormones sexuelles (Fig. 9). Dans un premier temps, il est possible d'influencer en amont et d'agir sur les hormones régulatrices (GnRH, LH, FSH et ACTH). Cela produit en général énormément d'effet secondaire dû aux nombreux impacts découlant de cette action. Il est également possible de bloquer directement les récepteurs de ces hormones par le biais d'une antihormone. Une telle inhibition cause en général des répercussions puisqu'on ne peut garantir la sélectivité des récepteurs inactivés. Finalement, une inhibition au niveau d'une enzyme de la stéroïdogénèse permet de réduire les niveaux d'hormones auxquelles la maladie est sensible. Cette méthode présente donc moins d'effets secondaires, mais elle est aussi moins agressive envers la maladie.

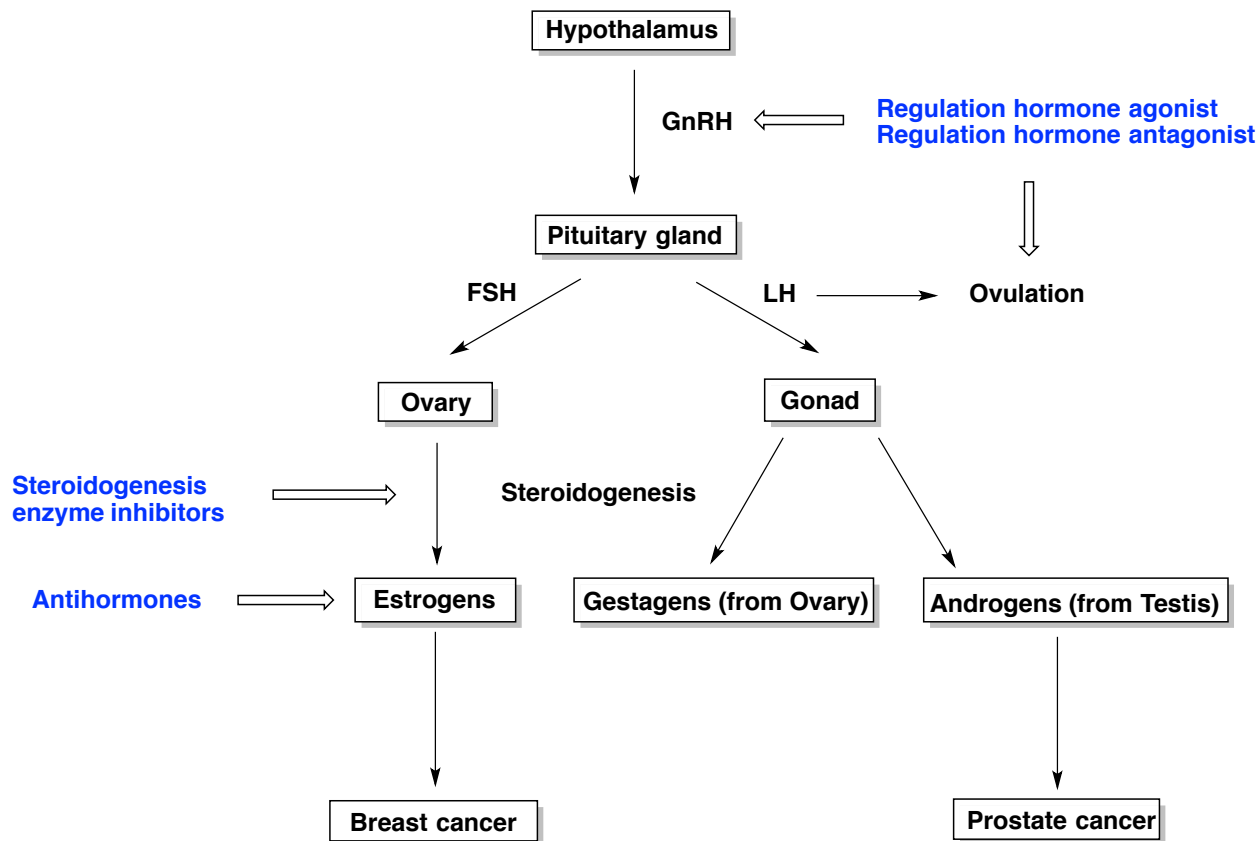
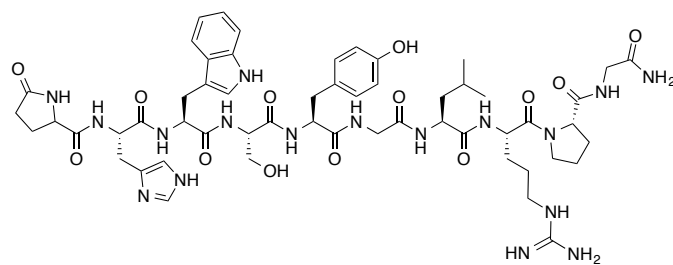


Figure 9 : Stratégies pour réduire le niveau des hormones stéroïdiennes. Figure tirée et adaptée de Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs⁴

1.3.1 Dérivés d'hormones régulatrices

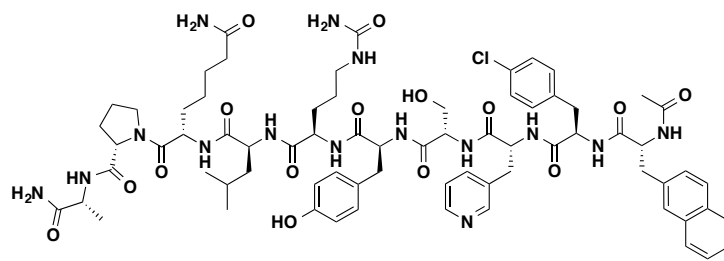
L'hormone GnRH est à la base de toute la régulation des hormones stéroïdiennes. C'est pour cette raison que celle-ci représente une cible thérapeutique de premier ordre. De nombreux composés commerciaux découlent de cette hormone et visent à en modifier son action. On retrouve deux types d'approches différentes qui permettent d'agir en diminuant les taux d'hormones viciés; les antagonistes et les agonistes du récepteur de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRHR).



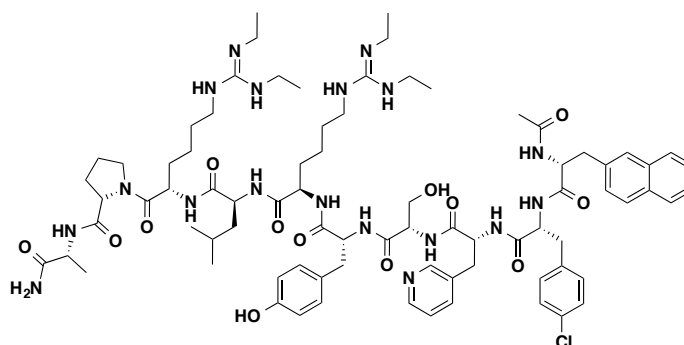
GnRH Hormone

Figure 10 : Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires. Figure tirée de Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs⁴

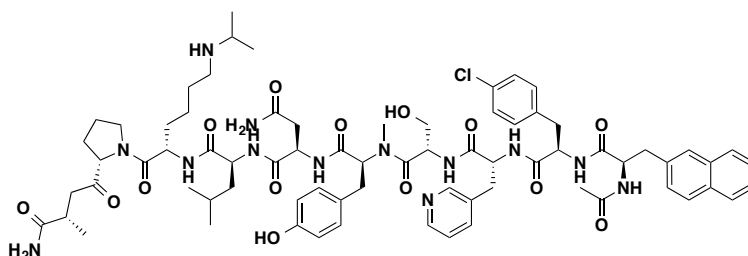
Les antagonistes de GnRHR lient compétitivement et de façon réversible le récepteur de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires située au niveau de la glande pituitaire (hypophyse). Ce type de composés inhibe la libération de l'hormone lutéinisante et de l'hormone folliculo-stimulante causant une diminution rapide et immédiate de la testostérone relâchée par les testicules chez les hommes et des estrogènes relâchés par les ovaires chez les femmes. Cette diminution des taux d'hormones sexuelles a pour effet de limiter les interactions des tissus affectés avec des composés qui leur sont sensibles et qui causent leur développement. Les premiers antagonistes de l'hormone GnRH possédaient une tendance à libérer des histamines ainsi qu'une faible solubilité. Des modifications au niveau de la structure peptidique de l'hormone ont permis d'obtenir des antagonistes compétitifs qui palliaient à ces problèmes. Les premiers candidats efficaces furent le cétrorélix et le ganirélix. Ceux-ci possédaient notamment une modification au niveau de la glycine, le septième acide aminé de cette chaîne peptidique, qui améliorait sa solubilité en générant des liaisons hydrogènes supplémentaires. Ensuite, l'abarélix, avec une modification supplémentaire au niveau du neuvième acide aminé de la chaîne, l'arginine, conquiert les marchés pharmaceutiques. De nos jours, le dégarélix est celui qui est employé comme traitement dans le cas avancé de cancer de la prostate en raison de son caractère cytotoxique puissant.⁴



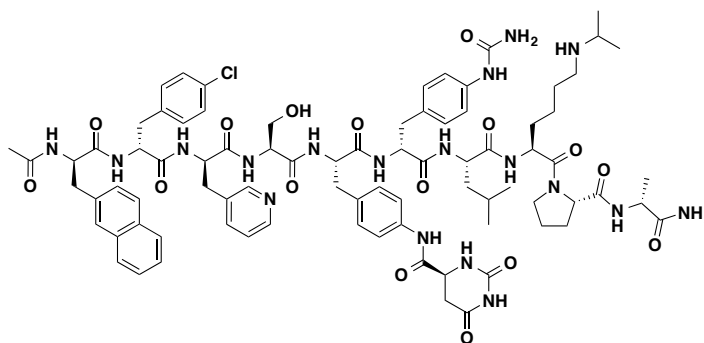
Cétrorélix



Ganirélix



Abarélix



Dégarélix

Figure 11 : Antagonistes de GnRHR commercialisés. Figure tirée et adaptée de Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs⁴

Les agonistes de GnRHR sont également des composés visant une diminution des taux d'hormones sexuelles, mais contrairement aux antagonistes leur action est indirecte. En fait, l'agoniste lie et active les récepteurs situés dans l'hypophyse et induit une libération de LH et de FSH qui, à leur tour, conduisent à la mise en circulation de la testostérone et d'estrogènes. En d'autres mots, ils miment l'action de l'hormone GnRH. Une activation répétée de ces récepteurs cause toutefois leur désensibilisation et les rend incapables d'activer la sécrétion des hormones subséquentes. C'est pourquoi un traitement à base d'un agoniste de GnRHR s'accompagne, pour une courte période, d'une antihormone ou d'un inhibiteur agissant immédiatement sur la formation problématique des hormones sexuelles, le temps que la désensibilisation s'effectue. Une telle stimulation continue est possible grâce à certaines modifications au niveau de la structure de l'hormone. Normalement une hydrolyse rapide entre l'acide aminé six et sept s'effectue ce qui garantit une métabolisation rapide de l'hormone et donc limite son temps d'activation des récepteurs. C'est donc en modifiant la glycine située au niveau de l'acide aminé six et du C-terminal que les recherches se sont concentrées et ont permis de découvrir quelques composés plus stables et plus hydrophiles (Fig. 12). Chacun d'eux est prescrit pour le traitement du cancer de la prostate majoritairement, mais le goséréline, lui, a également fait ses preuves pour le traitement du cancer du sein avec une sensibilité aux estrogènes, chez les femmes préménopausées. Ce traitement est un gros avantage comparativement à l'ovariectomie normalement pratiquée dans ces cas. En effet, une fois la rémission compléte l'arrêt du traitement permet de récupérer la perte osseuse subite par une insuffisance d'estrogènes.⁴

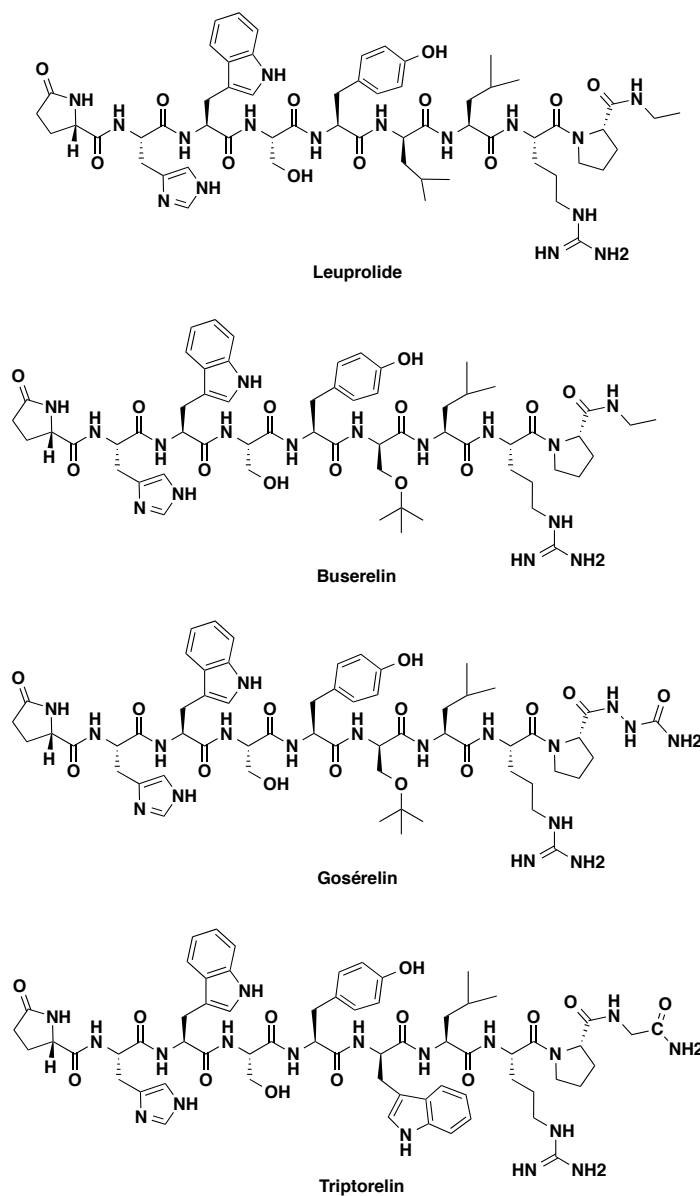


Figure 12 : Agonistes de GnRHR commercialisés. Figure tirée de Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs⁴

1.3.2 Antihormones

Une antihormone est un composé antagoniste de l'hormone elle-même. Celle-ci lie le récepteur duquel elle possède une affinité ou peut également moduler l'interaction de l'hormone avec son

récepteur spécifique. Cela crée une compétition entre le ligand naturel et l'antihormone pour l'activation du récepteur et donc de la prolifération cellulaire spécifique à ce type de récepteur.²⁰

1.3.2.1 Anti-androgènes

C'est à partir des années 1960 que des substances ayant pour propriétés la prévention des effets biologiques que produisaient les androgènes fut découverte. En 1964, Lerner définissait déjà un anti-androgène comme «un composé qui inhibe l'activité des androgènes à un ou plusieurs sites corporels indépendamment de la route d'administration ou de la dose». ²¹ Aujourd'hui, grâce à la découverte d'un récepteur spécifique aux androgènes on a raffiné la définition à «tous composés qui sont en compétition avec la testostérone ou le DHT pour la liaison sur le site actif du récepteur». ²²

Les anti-androgènes peuvent être prescrits pour traiter un éventail de maladies et de désordres. Chez les hommes, on emploie fréquemment les antagonistes du DHT pour traiter le cancer de la prostate. Chez les femmes, par contre, les antagonistes sont plutôt utilisés pour diminuer les niveaux d'hormones mâles qui causent des symptômes d'hyper-androgénie, tels l'hirsutisme ou l'aménorrhée. Au niveau de l'environnement, certaines espèces végétales produisent des anti-androgènes qui possèdent des effets néfastes sur le développement des organes de reproduction chez les fœtus exposés in utero, ainsi que leur progéniture. Puisque beaucoup de produits chimiques industriels, tels que les pesticides et les insecticides, présentent des effets anti-androgéniques, la question des antihormones environnementales est devenue un sujet des plus préoccupantes.

Actuellement, on retrouve que quelques composés prescrits pour leur pouvoir antagoniste. Les plus connus sont le flutamide, le bicalutamide, le nilutamide et l'acétate de cyprotérone (Fig. 10). Les trois premiers sont vendus sous les noms commerciaux de Eulexin, Casodex et Anandron, respectivement, pour le traitement du cancer de la prostate majoritairement. Le dérivé de cyprotérone, quant à lui, est un ingrédient actif, qui lorsque combiné à l'éthinylestradiol forme le médicament vendu sous le nom de Minerva ou Diane-35.

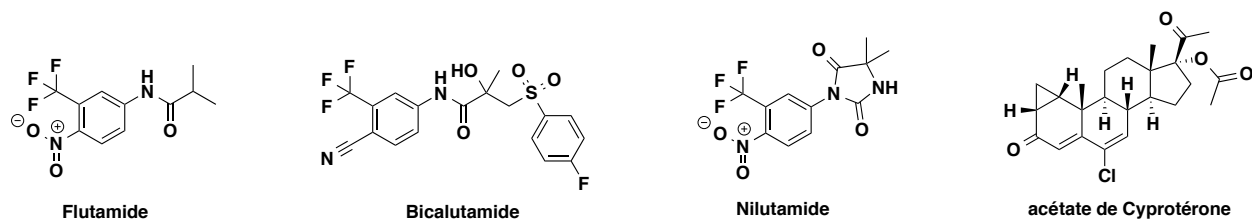


Figure 13 : Antagonistes du récepteur des androgènes commercialisées

Le flutamide (Eulexin) est un composé synthétique anti-androgénique non stéroïdien. Étant un antagoniste sélectif, il rivalise avec les ligands androgéniques tels que la testostérone et le DHT pour lier le récepteur des androgènes (AR). Par conséquent, il n'influe pas sur le taux d'androgènes, mais il bloque leurs actions. Ce composé a d'abord été prescrit comme traitement précoce du cancer de la prostate avant d'être remplacé par le bicalutamide, un composé présentant une plus faible tolérance et un profil pharmacocinétique plus sécuritaire. Chez les femmes, Eulexin fut également utilisé dans le traitement de maladies reliées à de l'hyperandrogénisme, comme l'hirsutisme et le syndrome des ovaires polykystiques. Depuis 1995, le bicalutamide a été introduit sur le marché des produits pharmaceutiques et il est aujourd'hui le traitement de première ligne pour les cancers de la prostate hormono-dépendants. Cet antagoniste sélectif du AR est également utilisé pour les castrations chimiques, chez les femmes, pour les maladies hyper-androgéniques ainsi que pour la différenciation sexuelle des transgenres. Le nilutamide, quant à lui, est un médicament prescrit uniquement dans les cas avancés de cancer de la prostate. Cet anti-androgène puissant possède un profil présentant une importante tolérance et une toxicité pour les interstices pulmonaires, causant des fibroses pulmonaires, ce qui explique son utilisation dans les stades tardifs de la maladie. L'utilisation du nilutamide, réduit la progression du cancer de la prostate métastatique ce qui augmente la durée de vie des patients atteints, sans pour autant présenter un espoir de rémission.

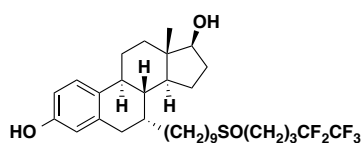
Le cyprotérone est le seul composé anti-androgène stéroïdien. Il est prescrit sous la forme d'une prodrogue, le dérivé acétate, qui facilite sa solubilité dans l'eau et dont sa métabolisation permet de relarguer le composé actif. Le cyprotérone agit comme un antagoniste sélectif du RA, mais il possède également un profil d'anti-gonadotrope. Lorsque combiné à l'éthinylestradiol, le cyprotérone possède un grand pouvoir contraceptif. C'est pour cette utilisation qu'il est

majoritairement employé, dans un deuxième temps, pour le traitement de l'acné chez les jeunes femmes.

1.3.2.2 Anti-estrogènes

La découverte de substances ayant des propriétés pouvant prévenir les effets biologiques que produisent les estrogènes découle d'une étude des relations structure-activité (SAR) effectuée par Wakeling et Bowler.²³⁻²⁶ On identifie comme anti-estrogène, tout composé qui compétitionne les ligands naturels des récepteurs des estrogènes (ER), c'est-à-dire, l'estrone et majoritairement son métabolite actif, et plus puissant, l'estradiol. Aujourd'hui on distingue deux classes d'antagonistes du ER; les «selective estrogen receptor modulators» ou (SERMs) et les anti-estrogènes purs. Ces derniers sont des antagonistes de chacun des récepteurs permettant de lier des molécules estrogéniques indépendamment des tissus. Contrairement aux anti-estrogènes purs, les SERMs possèdent une activité propre à chaque tissu possédant des ER. Ils peuvent autant agir à titre d'antagoniste sur le tissu mammaire que d'agoniste sur l'endomètre, par exemple.

Actuellement, peu d'anti-estrogènes purs sont prescrits et bien peu de recherche est mise de l'avant pour découvrir de nouveaux composés. On dénombre présentement essentiellement le Fulvestrant comme anti-estrogène pur viable sur le marché pharmaceutique (Fig. 14). Commercialisé sous le nom de Faslodex, il est prescrit dans le traitement du cancer du sein métastatique hormono-sensible chez les femmes post-ménopausées. Son mécanisme d'action implique un blocage des ER en plus de causer une dégradation de ces derniers.



Fulvestrant

Figure 14 : Antagoniste pur du récepteur des estrogènes commercialisé

Les SERMs sont des composés qui inhibent l'action des estrogènes, mais différemment des anti-estrogènes purs. Puisqu'une inhibition complète des estrogènes cause bien souvent de nombreux effets secondaires, il est souhaitable de pouvoir moduler l'action de ces molécules puissantes et ainsi de limiter les effets secondaires aux tissus atteints. Il existe plusieurs médicaments faisant parti de cette classe de composés et qui possèdent les effets antagonistes des estrogènes sur des tissus variés. Par exemple, le clomifène, qui fut le premier SERM commercialisé, est une molécule qui possède une activité antagoniste sur l'hypothalamus et qui fut employée comme anovulant. Toutefois, sa utilisation fut proscrite dû à de nombreux effets secondaires. Les SERMs qui ont suivi ont été obtenus essentiellement à partir du noyau du clomifène auquel on apporte des modifications structurelles. On retrouve ensuite le tamoxifène qui fut approuvé par la FDA au courant des années 1970 et qui est utilisé comme traitement du cancer du sein dû à son caractère anti-estrogène dans le tissu mammaire. Il est par contre estrogénique au niveau des os et du tissu utérin. Le torémifène qui se veut une amélioration du tamoxifène possède les mêmes caractéristiques, mais produit moins d'adduits nocifs dans l'ADN du foie, lesquels peuvent induire le cancer. Le raloxifène, quant à lui, a fait son apparition au courant de l'année 1997 et est un anti-estrogène dans les tissus mammaires et utérins, tout en étant également estrogénique dans les os. Il est donc employé pour traiter l'ostéoporose chez les femmes post-ménauposées ainsi que le cancer du sein. Finalement, de nombreux composés ont fait leur apparition dans les dernières années et possèdent tous leurs caractéristiques. L'orméloxifène est prescrit comme contraceptif puisqu'il est un antagoniste des tissus mammaires ainsi qu'utérins et un agoniste dans l'os. Il cause une désynchronisation des menstruations. Le lasofoxifène et l'ospémifène sont également de bons antagonistes des tissus mammaires et utérins, et ils sont employés pour traiter l'atrophie vaginale et la dyspareunie. ⁴

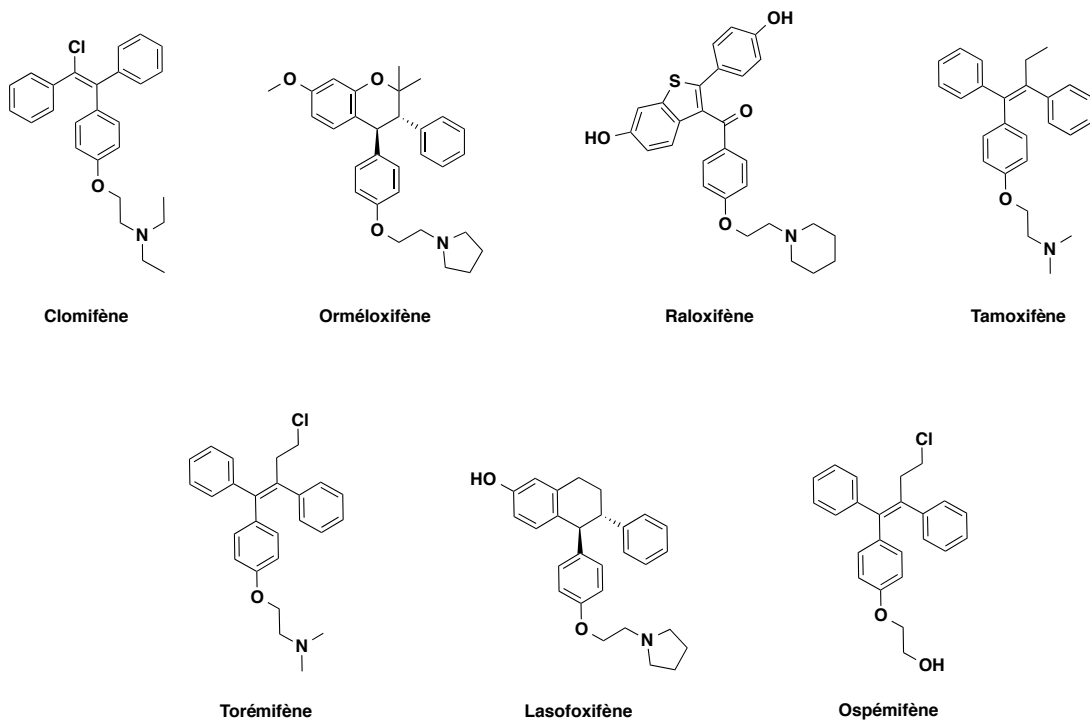


Figure 15 : Selective estrogen receptor modulators (SERMs) commercialisés

1.3.3 Inhibiteurs des enzymes de la stéroïdogénèse

La stéroïdogénèse regroupe l'ensemble des métabolisations que subit le cholestérol pour former chacune des hormones pouvant lier un récepteur stéroïdien et induisant une action distincte (Fig. 3). Puisque l'on sait aujourd'hui que les stéroïdes sexuels ne sont pas uniquement formés dans les gonades, une chirurgie visant l'ablation des gonades ne neutralise pas toutes les hormones produites. Il faut donc trouver des alternatives permettant de cibler l'ensemble de la formation de ces stéroïdes. De nombreuses enzymes sont impliquées à chaque étape de la métabolisation du cholestérol. L'utilisation d'un inhibiteur d'une enzyme de la stéroïdogénèse pourrait permettre de contrôler efficacement et sélectivement l'action des stéroïdes sexuels qui sont formés localement dans un tissu.

1.3.3.1 La P450c17

Cette enzyme membranaire est exprimée tant dans les surrénales que les testicules et produit deux transformations au niveau du premier métabolite du cholestérol, la prégnénolone (PREG). Il s'agit tout d'abord d'une 17 α -hydroxylase permettant d'obtenir le 17 α -hydroxy-prégnénolone qui peut soit servir de précurseur à la synthèse des glucocorticoïdes tel le cortisol ou subir la transformation d'une 17,20-lyase. Cette deuxième transformation permet de produire une coupure entre les carbones 17 et 20 menant à la formation de la déhydroépiandrostérone (DHEA), qui est le précurseur des androgènes (Fig. 16). La P450c17 est donc une cible thérapeutique de choix pour diminuer la concentration des androgènes. Il faut toutefois considérer qu'une inhibition complète de cette enzyme empêche la formation des glucocorticoïdes. Le défi avec les inhibiteurs de la P450c17 est donc de trouver un composé qui inhibe uniquement la réaction de lyse, soit la deuxième transformation enzymatique.

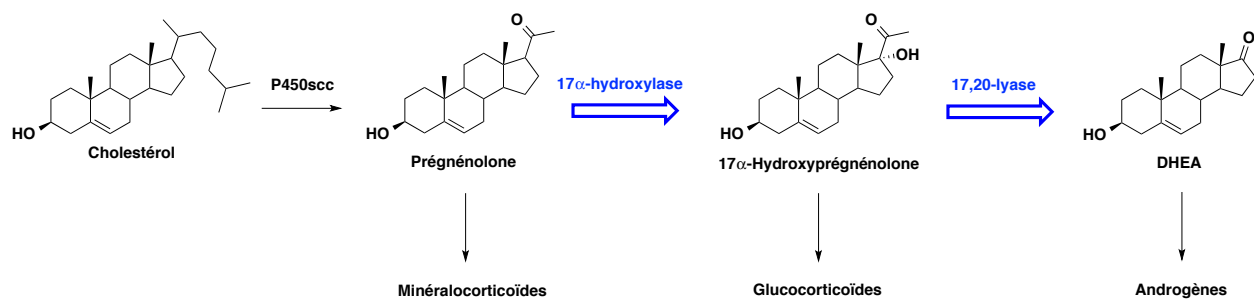


Figure 16 : Rôle de l'enzyme P450c17 (17 α -hydroxylase et 17,20-lyase). Figure tirée et adaptée du diagramme de la stéroïdogénèse⁶

Les inhibiteurs stéroïdiens de l'enzyme P450c17 ont généralement une structure résultante d'une modification de la position 17 du stéroïde. Ils miment ainsi le substrat naturel (17 α -hydroxyprégnénolone) et maximise l'interaction avec le groupement hème-fer de l'enzyme.²⁷ De fait, les composés illustrés à la figure 17 représentent deux des inhibiteurs stéroïdiens les plus connus et conçus pour être sélectifs pour la 2^e transformation (17,20-lyase). L'abiratérone est un composé administré sous forme d'acétate, une prodrogue, ce qui permet de faciliter le premier passage hépatique en évitant la glucuronidation et les processus de détoxification qui élimineraient ce médicament. Le galetérone, quant à lui, est un composé inhibant la 17,20-lyase

et agissant comme antagoniste du AR. Cet inhibiteur est actuellement testé dans une étude clinique de phase III pour le cancer de la prostate résistant à la castration.

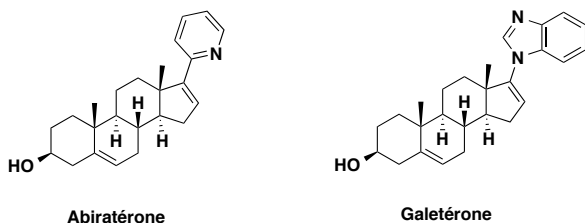


Figure 17 : Inhibiteurs stéroïdiens de l'enzyme P450c17

1.3.3.2 L'aromatase (P450arom)

L'aromatation d'un stéroïde est un processus chimique régulé par l'enzyme P450arom ou aromatase et effectué dans les ovaires et les tissus périphériques. Cette enzyme membranaire permet la formation d'un composé estrogénique à partir d'un androgène. L'aromatation du 4-androstène-3,17-dione permet d'obtenir l'estrone tandis que l'aromatation de la testostérone conduit à l'estradiol (Fig. 18). Il s'agit donc d'une cible thérapeutique idéale puisqu'un inhibiteur de cette enzyme produira une diminution de la concentration des estrogènes E1 et E2 et donc une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses qui sont sensibles aux estrogènes.²⁷

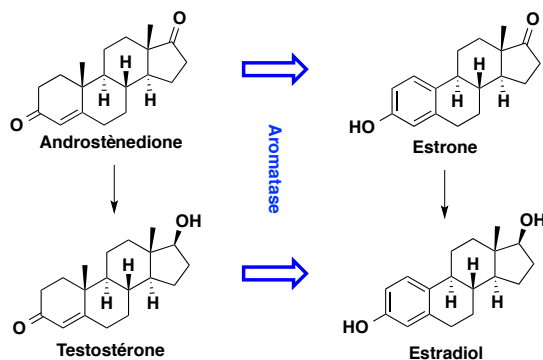


Figure 18 : Rôle de l'enzyme aromatase. Figure tirée et adaptée du diagramme de la stéroïdogénèse⁶

On retrouve deux lignes directrices qui ont permis de produire des composés pour inhiber l'aromatase. La première approche fut de dériver le substrat naturel de l'enzyme, soit le 4-androstène-3,17-dione afin d'occuper le site catalytique et ainsi l'empêcher de jouer son rôle. De fait, on obtient des dérivés stéroïdiens capables de causer une alkylation de l'enzyme (Fig. 19). On appelle ces derniers des inhibiteurs irréversibles puisqu'ils se lient d'une façon irréversible avec l'enzyme, généralement sur le site catalytique. Le composé formestane fut prescrit à titre de traitement du cancer du sein au stade avancé durant de nombreuses années. Dû à un profil toxicologique trop important relié à sa faible sélectivité, il fut remplacé par l'exémestane. Ces deux inactivateurs sont en général l'alternative à un traitement à l'anti-estrogène tamoxifène qui échoue.^{4 28}

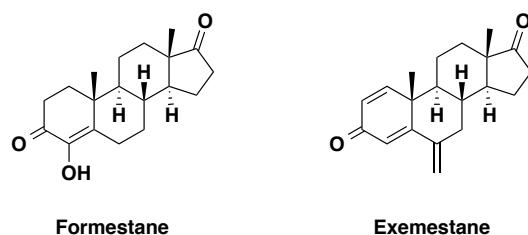


Figure 19 : Inhibiteurs stéroïdiens irréversibles de l'aromatase

La deuxième approche cible une inhibition compétitive-réversible de l'enzyme. Cette approche a permis d'obtenir des molécules non-stéroïdiennes possédant un hétéroatome pour interagir avec la porphyrine (hème-fer) de l'enzyme (P450arom) (Fig. 20). L'azote présent sur l'hétéroatome permet, grâce à son caractère de bon ligand, une coordination avec la porphyrine. À l'instar du substrat naturel, où un atome d'oxygène assure la liaison, l'oxydation de l'azote n'est pas possible et ne déclenche donc pas la cascade enzymatique permettant l'aromatation.^{28 29}

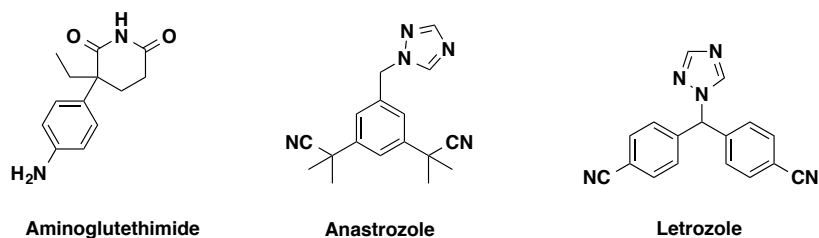


Figure 20 : Inhibiteurs non-stéroïdiens réversibles de l'aromatase

1.3.3.3 Stéroïde sulfatase

L'enzyme stéroïde sulfatase possède un rôle très important au niveau de la stéroïdogénèse. Elle permet la transformation des formes inactives d'hormone en leur homologue actif pour leur récepteur correspondant. On retrouve cette enzyme lors de l'hydrolyse du groupement sulfate de la déhydroépiandrostérone sulfaté (DHEAS) et de l'estrone sulfaté (E1S) (Fig. 21). Il s'agit donc d'une cible judicieuse pour réduire l'incidence de molécules tant androgéniques que estrogéniques.

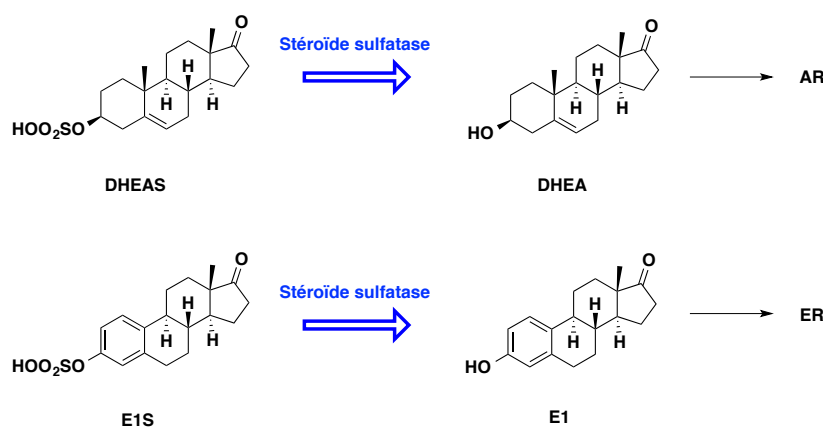


Figure 21 : Rôle de l'enzyme stéroïde sulfatase. Figure tirée et adaptée du diagramme de la stéroïdogénèse⁶

Les composés qui inhibent l'enzyme stéroïde sulfatase possèdent une structure moléculaire caractéristique. Que ce soit les composés stéroïdiens ou non-stéroïdiens, ils ont généralement une modification de la structure au niveau du carbone 3 ou pseudo 3 qui correspond à l'ajout d'un groupement sulfamate. Il fut découvert qu'un tel groupement produit une alkylation du site actif de l'enzyme ce qui permet de créer des composés qui inactivent l'enzyme (Fig. 22). L'inactivateur le plus connu est l'estrone sulfamate (EMATE), un composé qui possède un puissant potentiel inactivateur. Par contre, son principal défaut est qu'il possède une estrogénicité résiduelle.³⁰ L'inactivateur **1** correspond à l'inhibiteur obtenu à la suite d'une deuxième génération de modification de EMATE. Ce composé combine un groupement t-butylbenzyl en

position 17, typique des puissants inhibiteurs réversibles de cette enzyme, avec un groupement sulfamate en position 3. Cela a permis de diminuer modérément l'estrogénicité de ce composé, mais d'en augmenter son action inhibitrice.³¹ Afin d'éliminer tout caractère estrogénique, un méthoxy a également été ajouté en position 2 du cycle A pour former le EM-1913.^{32, 33} Le coumate est un inhibiteur non-stéroïdien qui n'a pas l'inconvénient d'être estrogénique.⁴

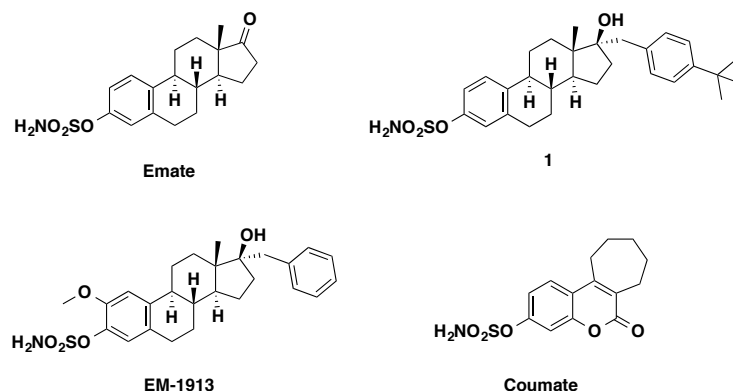


Figure 22 : Sélection d'inhibiteurs de l'enzyme stéroïde sulfatase

1.3.3.4 5 α -Réductase

Cette enzyme membranaire qui est exprimée dans les tissus périphériques, tels que la peau et la prostate, produit le métabolite le plus androgénique du corps, le DHT. À l'aide d'un cofacteur NADPH, cette enzyme réduit la liaison double de la testostérone (Fig. 23). Il existe deux isoformes de l'enzyme 5 α -réductase, la première se concentre majoritairement au niveau des tissus périphériques et la deuxième dans la prostate. On distingue deux types de traitement basés sur des inhibiteurs de l'enzyme 5 α -réductase, chacun cible une des deux isoformes respectivement. Un inhibiteur du type I est employé dans le traitement de l'alopecie, l'acné ou l'hirsutisme. Tandis qu'un inhibiteur du type II représente un bon traitement pour le cancer de la prostate et l'hyperplasie bénigne de la prostate.⁴ De tous les inhibiteurs utilisés en clinique, les plus connus sont le minoxidil (inhibiteur de l'isoforme I), le finastéride (inhibiteur des isoformes I et II) et le dutastéride (inhibiteur de l'isoforme II) (Fig. 24).

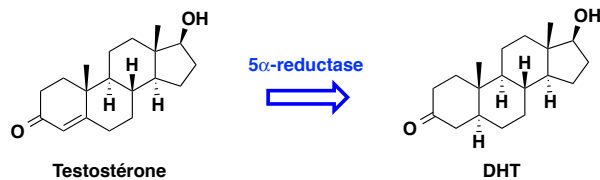


Figure 23 : Rôle de l'enzyme 5α-réductase. Figure tirée et adaptée du diagramme de la stéroïdogénèse⁶

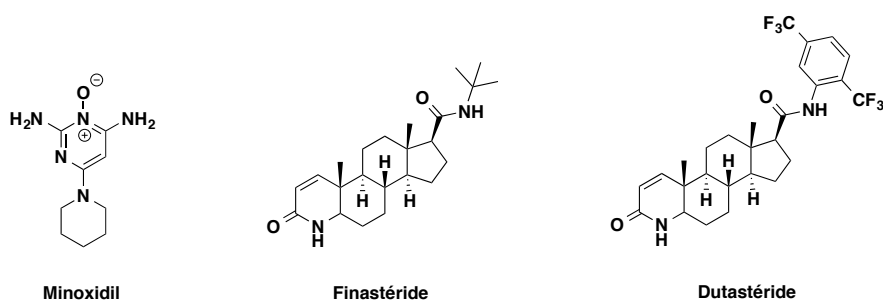


Figure 24 : Inhibiteurs de l'enzyme 5α-réductase

Bien qu'un traitement basé sur un inhibiteur de l'enzyme 5α-réductase diminue considérablement le taux des androgènes, il ne limite toutefois pas toute l'incidence androgénique puisque la testostérone n'est pas ciblée. Ce qui peut être un avantage lorsque l'on veut abaisser uniquement les taux d'androgènes sans en bloquer toute l'action. Par contre, dans le stade avancé de cancer de la prostate, on désire empêcher toute action des androgènes pour s'assurer d'éliminer tout risque de progression de la maladie. Le finastéride, qui fut le premier inhibiteur de sa classe à atteindre le marché, possède la caractéristique intéressante d'être un inhibiteur irréversible. Plus récemment, le dutastéride a envahi le marché puisqu'il possède un trait unique qui en fait un composé des plus intéressants pour palier à l'effet résiduel de la testostérone. Ce composé, en plus d'être un inhibiteur de l'enzyme 5α-réductase, agit comme un antagoniste du AR.

1.3.3.5 17 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD)

Les 17 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases sont une classe d'enzymes comportant 15 isoformes. Bien que la participation relative de chaque isoforme ne soit pas encore connue,³⁴ l'on peut toutefois affirmer qu'il existe deux actions propres à cette classe enzymatique ciblant en particulier le carbone 17 du noyau stéroïdien; la réduction et l'oxydation. La réduction, étant la première, est un processus transformant la cétone en hydroxy. Elle est catalysée par la présence de son cofacteur le NADPH. La deuxième action, l'oxydation, consiste en la formation d'une cétone en position 17. Celle-ci est catalysée par la présence du cofacteur NADP. De telles transformations permettent donc la formation de la testostérone, de l'estradiol et de l'androstènediol au même titre que l'androstènedione, l'estrone et le DHEA (Fig. 25). Puisque que les 17 β -HSDs sont impliquées dans la dernière étape de la biosynthèse des stéroïdes sexuels, elles constituent une cible thérapeutique particulièrement intéressante pour contrôler l'incidence de certaines hormones sexuelles.^{27, 35} En outre, puisque les hormones comportent une affinité bien plus importante pour leurs récepteurs respectifs sous la forme 17 β -hydroxylée, l'approche qui est envisagée par plusieurs est une inhibition des isoformes réductrices tel que les types 1, 3, 5, 7, 12 et 15.^{1, 36-39} Alors qu'il serait plutôt souhaitable de produire une activation ou, tout au plus, un maintien des fonctions oxydatives, correspondant aux types 2, 4, 6, 8, 9, 10 et 11.

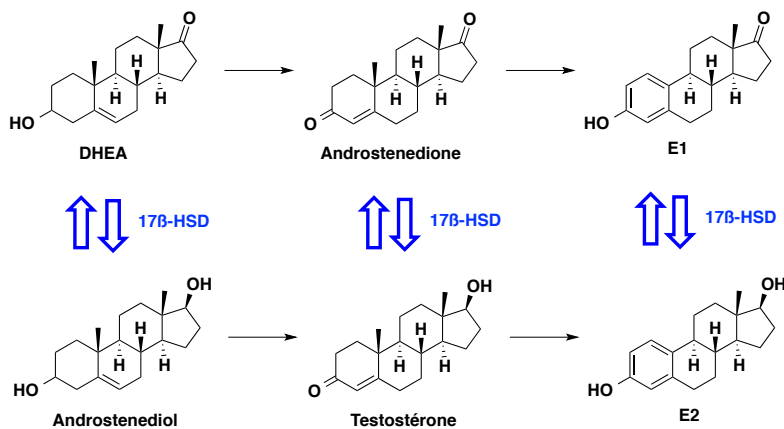


Figure 25 : Rôle de l'enzyme 17 β -HSD. Figure tirée et adaptée de la stéroïdogénèse⁶

Parmi les 17β -HSDs réductrices, le type 1 fut la première isoforme découverte.^{40, 41} Puisque mon projet de recherche cible particulièrement la 17β -HSD1, je passerai sous silence les autres isoformes. La 17β -HSD1 régule majoritairement la réduction de l'estrone (E1) en estradiol (E2), mais également, bien qu'à un taux inférieur, la transformation de DHEA en androstènediol.²⁷ Ce dernier se trouve à être un stéroïde possédant une faible activité estrogénique,⁴² mais ses répercussions deviennent non négligeable après la ménopause.⁴³ Pour cette raison, de tels inhibiteurs enzymatiques seraient mieux adaptés comme traitement que certains qui sont actuellement prescrit contre le cancer du sein, à titre d'exemple, les inhibiteurs d'aromatase qui n'influent pas sur l'incidence de l'androstènediol. Les premiers travaux sur la 17β -HSD1 ont commencé il y a un demi-siècle et, depuis, plusieurs inhibiteurs probants ont été découverts et rapportés dans la littérature, mais aucun ne s'est hissé aux phases cliniques.^{1, 36-39} Compte tenu du grand nombre d'inhibiteurs connus, il n'est pas pertinent d'en faire une liste exhaustive, mais plutôt une liste représentative autant des inhibiteurs stéroïdiens que non-stéroïdiens (Fig. 26 et 27).

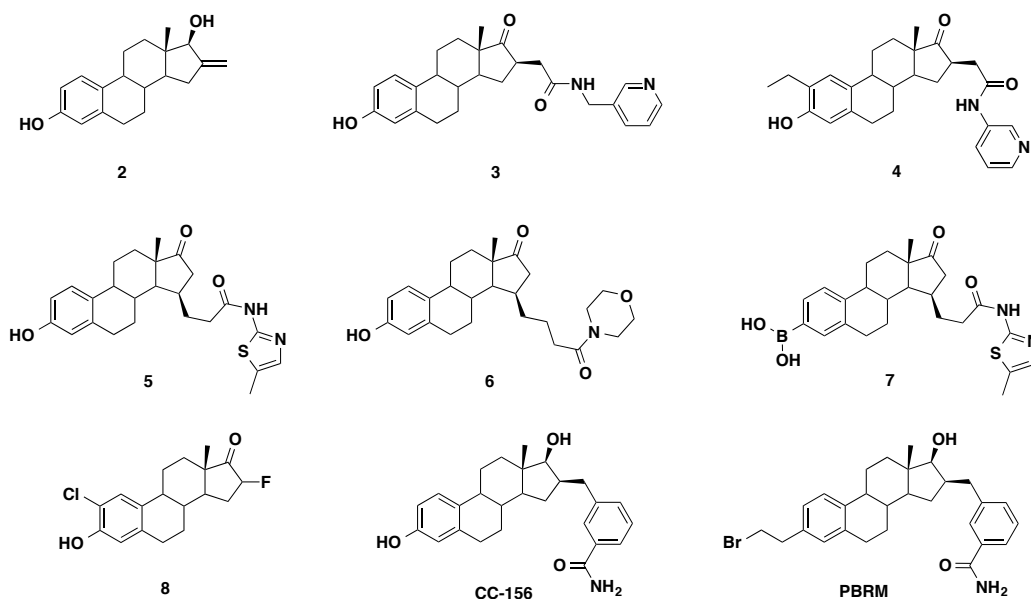


Figure 26 : Liste d'inhibiteurs stéroïdiens connus de l'enzyme 17β -HSD1

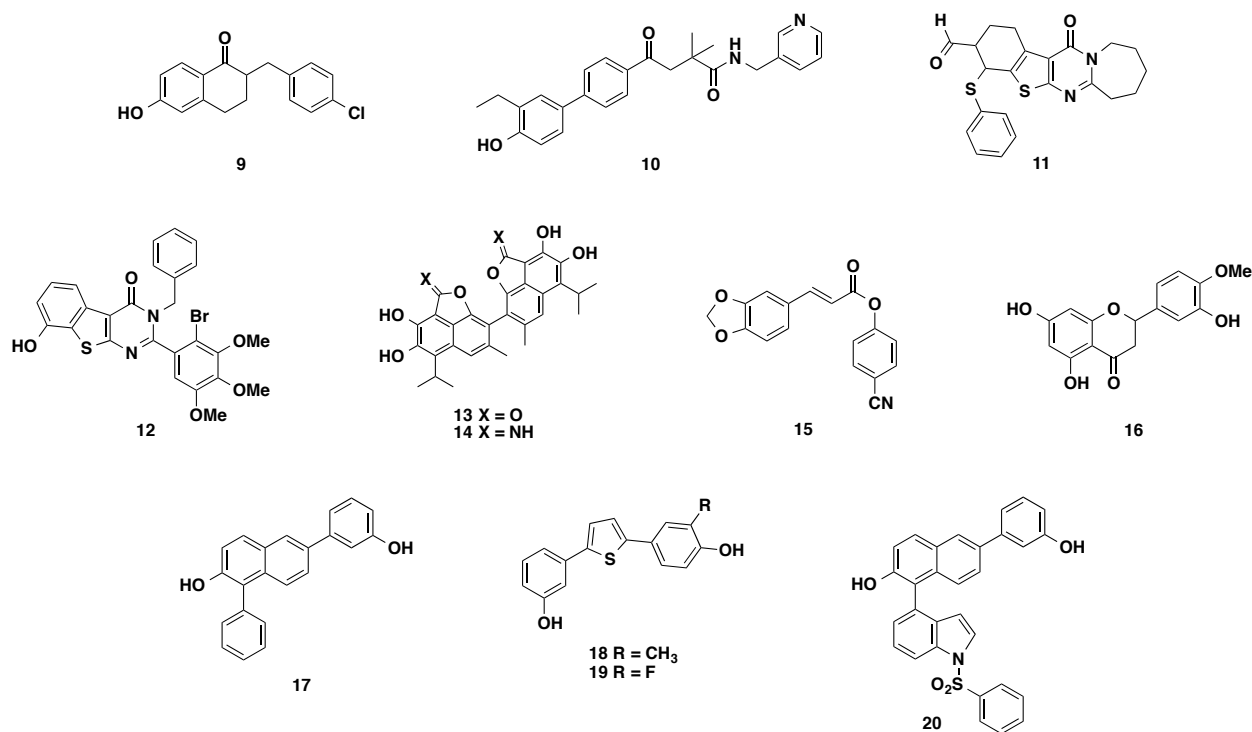


Figure 27 : Liste d'inhibiteurs non-stéroïdiens connus de l'enzyme 17β-HSD1

Une des premières molécules connues pour inhiber la transformation de E1 en E2 est l'inhibiteur **2** obtenu par le groupe de recherche du Dr. Covey (Fig. 26). Cette molécule a été brevetée vers la fin des années 1980. Ce composé possédait une excellente activité inhibitrice en ce qui a trait aux essais enzymatiques *in vitro*. Les essais *in vivo*, par contre, ont présenté des résultats plutôt insatisfaisants quant à son pouvoir inhibiteur. Il semblerait que l'oxydation nécessaire à l'obtention d'un puissant inhibiteur ne peut être accomplie *in vivo* dû au pouvoir réducteur de l'enzyme.^{1, 44}

L'inhibiteur **9** breveté par l'University College Cardiff Consultants, et dont les travaux ont été dirigés par le Dr. Smith, est le premier composé rapporté dont le noyau est non-stéroïdien (Fig. 27). Ce composé était originalement conçu pour inhiber l'isoforme 3 de la 17β-HSD. Des essais sur des microsomes humains ont permis de constater qu'une inhibition de 98 % était obtenue à une concentration de 2 μM. Compte tenu de ce résultat, le composé a également été testé pour le type 2 de l'enzyme en utilisant la fraction microsomale du placenta humaine et, finalement, le type 1 en utilisant la fraction cytosolique du placenta humain. À concentration identique de 200

μM , une inhibition de 74 % et 60 % respectivement a été obtenue pour les deux isoformes. Ainsi, le composé **9** n'est pas sélectif pour l'isoforme 1 de la $17\beta\text{-HSD}$.^{1, 45}

La compagnie Sterix Ltd. a élaboré plusieurs molécules présentant une activité inhibitrice pour l'enzyme $17\beta\text{-HSD1}$. Le composé **3** fut le premier rapporté par cette compagnie (Fig. 26). L'ajout d'une chaîne pyridyl-acétamide en position 16 a permis l'obtention d'un puissant inhibiteur de l'isoforme 1 avec un IC_{50} de 27 nM. Toutefois, la sélectivité, quant à l'isoforme de type 2, était plutôt décevante.^{1, 46-48} C'est pour palier à ce manque, que le groupe de recherche dirigé par le Dr. Potter et subventionné par Sterix Ltd., a développé le dérivé stéroïdien **4** (Fig. 26). L'ajout d'une chaîne éthyle en position 2 permet de conserver la même activité inhibitrice soit un IC_{50} de 27 nM, mais décuple la sélectivité de ce dernier. En effet, le pourcentage d'inhibition du type 2 était de 5 % pour une concentration de 10 μM , comparativement à une inhibition de 99 % du type 1 à la même concentration. Par contre, une légère affinité pour le $\text{ER}\alpha$ a été observée. Des tests biologiques *in vivo* ont été accomplis pour ce composé et ont démontré qu'il diminue la croissance tumorale causée par E2. Les essais ont également démontrés qu'il n'agit pas à titre d'anti-estrogène.^{1, 48} Plus récemment, la compagnie Sterix s'est tournée vers les composés non-stéroïdiens afin de réduire l'affinité pour le récepteur des estrogènes, laquelle se traduisait par une estrogénicité. L'inhibiteur **10** mime toutefois de façon évidente les fonctionnalisations de l'inhibiteur stéroïdien **4** obtenu par le groupe du Dr. Potter (Fig. 26 et 27). La perte du noyau stéroïdien a permis de réduire l'activité estrogénique, mais cause néanmoins une diminution importante de l'activité inhibitrice. Une valeur d' IC_{50} de 1,8 μM a été obtenue soit environ un facteur 66 fois inférieure.^{1, 49}

L'inhibiteur non-stéroïdien **11** a été breveté par le groupe de recherche du Dr. Vihko (Fig. 27). Ce composé a été sélectionné parmi plus de 1000 molécules testées. Il est celui qui a présenté la meilleure activité inhibitrice sur des cellules intactes de lignées MCF-7. À concentration de 1 μM , il inhibe 80 % de l'activité $17\beta\text{-HSD1}$.^{1, 50}

Subventionné par la compagnie Forendo Pharma, le laboratoire du professeur Thole a mis au point l'inhibiteur **5** pour le type 1 (Fig. 26). Ce composé est un dérivé de E1 auquel un groupe méthyl thiazole fut ajouté en position 15 du noyau stéroïdien. Cet inhibiteur de la $17\beta\text{-HSD1}$

inhibe 50 % de l'activité enzymatique à une concentration de seulement 10 nM. De plus, il n'a aucun effet sur l'isoforme de type 2 et il n'a pas d'affinité pour le récepteur des estrogènes. Des essais *in vivo* ont été effectués sur ce composé et ils ne démontrent pas d'estrogénicité.⁵¹⁻⁵³

La compagnie Solvay Pharmaceuticals a présenté plusieurs molécules présentant une activité inhibitrice pour la 17 β -HSD1. Dans un premier volet, on retrouve une molécule non-stéroïdienne intéressante, l'inhibiteur **12** (Fig. 27). Ce composé présente une bonne activité inhibitrice pour le type 1 de l'enzyme avec une valeur d'IC₅₀ de 5 nM. La sélectivité par rapport au type 2 est 20 fois supérieure. En plus, des tests de proliférations cellulaires n'ont pas montré d'activité estrogénique. Des essais *in vivo* sur des rongeurs ont permis de conclure que l'inhibiteur réduit jusqu'à 54 % la taille des tumeurs induites par E1.^{1, 37} Dans un deuxième volet, la compagnie Solvay Pharmaceuticals présente deux composés stéroïdiens comme inhibiteur de la 17 β -HSD1, les composés **6** et **7** (Fig. 26). Tous deux dérivent de E1 et possèdent une fonctionnalisation en position 15. Le premier composé possède un groupement morpholine (**6**) et le deuxième un groupement thiazole (**7**). Le composé **6**, quoiqu'il présente une activité inhibitrice plutôt moyenne avec une valeur d'IC₅₀ de 1 μ M, a été sélectionné par la compagnie Solvay pour passer aux essais biologiques *in vivo*. Ceux-ci ont permis d'obtenir une réduction tumorale induite par E2 de 60 % en quatre semaines de traitement.⁵² Tandis que l'ajout d'un acide boronique en position 3 du noyau stéroïdien (**7**) permet d'améliorer, que très faiblement, l'activité inhibitrice de la molécule comparativement à son précurseur, le composé **5**. Le composé **7** produit une inhibition de 82 % à une concentration de 100 nM. De plus, chacune des autres caractéristiques est conservée, soit la spécificité pour l'isoforme 1 et aucune activité estrogénique.⁵³

Par la suite, le laboratoire, dirigé par Vander Jagt, a présenté deux composés ayant une activité inhibitrice intéressante pour l'enzyme ciblée, les inhibiteurs **13** et **14** (Fig. 27). Ces deux composés présentent une activité inhibitrice très similaire pour le type 1 de l'enzyme 17 β -HSD. Leur pourcentage d'inhibition varie entre 80 et 90 % dans chacun des réplicas à une concentration de 25 μ M. Leurs valeurs de Ki sont de 2,2 et 4,3 μ M, respectivement.^{1, 54}

Le groupe de recherche dirigé par Hillish, et subventionné par Schering Aktiengesellschaft, a présenté le composé stéroïdien **8** pour inhiber la 17 β -HSD1 (Fig. 26). Ce dernier présente une

substitution halogénique aux positions 2 et 16. Ce composé s'est avéré être un bon inhibiteur avec une valeur d'IC₅₀ de 35 nM.^{1, 55, 56}

Le laboratoire de recherche du Dr. Rizner a développé des inhibiteurs non-stéroïdiens de la 17β-HSD1. Deux sont particulièrement intéressants. Le premier, le composé **15**, correspond à un produit synthétique dont l'inhibition, évaluée par le biais d'un essai enzymatique sur des cellules intactes, est de 70 % à une concentration de 6 μM. Le second, le composé **16**, correspond à un flavonoïde synthétique (Diosmetin) donc l'activité inhibitrice est évaluée à 90 %, toujours dans les mêmes conditions de l'essai *in vitro* (Fig. 27).⁵⁷

Les recherches menées par le groupe du Dr. Hartmann s'orientent principalement vers des inhibiteurs non-stéroïdiens ce qui facilite leur accessibilité à une diversité structurale. Ces inhibiteurs sont conçus par des études de modélisation moléculaire afin de valider leur affinité pour le site de l'enzyme cible tout en n'ayant qu'une faible probabilité d'activer le récepteur des estrogènes et ainsi d'avoir une activité estrogénique. L'inhibiteur de première génération **17**, mime le substrat naturel de la 17β-HSD1 (E1) en ne présentant aucune affinité pour le récepteur des estrogènes (Fig. 27). Son activité inhibitrice est excellente avec une valeur d'IC₅₀ de 20 nM. Cependant, la sélectivité pour le type 1 par rapport au type 2 n'est pas optimale.^{1, 58} En tentant d'optimiser ce paramètre, le groupe du Dr. Hartmann a présenté les composés **18** et **19**. Ces inhibiteurs de deuxième génération possèdent un noyau thiophène qui permet de réduire l'affinité pour l'isoforme 2. Ces deux composés permettent, tout de même, de conserver une bonne activité inhibitrice pour la 17β-HSD1 (IC₅₀ de 8 et 46 nM, respectivement). De plus, ils permettent d'obtenir une meilleure sélectivité pour le type 1 par rapport au type 2 (facteur de 118 et 49, respectivement). Dans un cas comme dans l'autre, l'affinité pour le ERα est très faible (< 0.1 %).^{1, 59, 60} Comme troisième génération de composés, le groupe du Dr. Hartmann a développé l'inhibiteur **20**. Ce dernier possède la forme typique du composé **17** de première génération, mais possède le noyau thiophène des inhibiteurs **18** et **19**, ce qui favorise la sélectivité. Le composé **20** permet d'obtenir une valeur intéressante d'activité inhibitrice pour la 17β-HSD1 (IC₅₀ de 15 nM). En plus, cet inhibiteur possède une sélectivité vis-à-vis du type 2 (IC₅₀ de 403 nM). L'affinité pour le ERα est très faible (< 0.1 %).^{1, 61}

Dans le groupe de recherche du Dr. Poirier, plusieurs essais d'optimisation de l'inhibition de la 17 β -HSD1 ont été accomplis, en plus de se concentrer sur une amélioration de la sélectivité du type 1 face aux autres isoformes. L'inhibiteur **CC-156** représente encore aujourd'hui un des plus puissants inhibiteurs connus de l'enzyme (Fig. 26). Ce composé est un excellent inhibiteur de la 17 β -HSD1 avec un IC₅₀ de 27 nM. Il est actif en cellule intacte, ce qui laisse croire qu'il traverse la membrane cellulaire. Cependant, des tests de prolifération cellulaire sur les cellules T47-D, connues pour exprimer les ER, ont démontré qu'il présentait une activité estrogénique. L'affinité pour ER α , qui est le récepteur prédominant, est impliquée dans l'estrogénicité. Néanmoins, le **CC-156** possède une sélectivité pour l'isoforme 1 qui a été grandement améliorée comparativement aux travaux précédents.⁶² En tentant de pallier au problème d'estrogénicité du **CC-156**, le groupe de recherche du Dr. Poirier a développé le composé **PBRM** (Fig. 26). Ce dernier présente un groupement 2-bromoéthyl en position 3 du noyau stéroïdien ce qui permet de réduire l'affinité pour le récepteur des estrogènes. Cet ajout a permis d'éliminer toute activité estrogénique en conservant une bonne activité inhibitrice (IC₅₀ de 68 nM) pour la 17 β -HSD1, mais qui est tout de même 2,5 fois inférieure. Contrairement aux inhibiteurs réversibles développés par les autres groupes de recherche, la molécule **PBRM** est un inhibiteur irréversible qui provoque l'alkylation d'un acide aminé du site enzymatique. Ce composé est l'un des rares dont les tests *in vivo* ont été effectués et qui corroborent les résultats obtenus *in vitro*.⁶³⁻⁶⁵

1.4 Aperçu des projets

C'est en se basant sur les travaux précédents, et particulièrement ceux du groupe du Dr. Poirier, que s'appuie l'ensemble de mes travaux de recherche. Le but était l'élaboration d'un puissant inhibiteur pour l'isoforme 1 de l'enzyme 17 β -HSD afin de contrer la prolifération des cellules cancéreuses sensibles aux estrogènes. Présentement, un des meilleurs candidats à ce titre est le PBRM avec son profil d'inhibiteur irréversible non estrogénique. Ce dernier, quoique très prometteur, possède des lacunes au niveau de son affinité pour l'enzyme. C'est dans cette optique d'amélioration de son affinité pour la 17 β -HSD1, et par conséquent de l'activité inhibitrice, et tout en conservant les autres paramètres, que mes travaux ont été effectués. Ces travaux ont pour objectifs de modifier les deux groupements fonctionnels du PBRM.

Tout d'abord, des modifications de fonctionnalisation au niveau de la chaîne benzyle en position 16 visent une amélioration de l'affinité pour le site enzymatique, tout en maintenant la sélectivité et l'absence d'estrogénicité des composés. En outre, nous voulons obtenir un inhibiteur plus puissant que le PBRM. De plus, nous voulons déterminer l'influence de l'asparagine-152 et la leucine-95, deux acides aminés situés à proximité du cycle D du noyau stéroïdien et pouvant favoriser la formation d'interaction inhibant l'enzyme. De telles modifications et leurs résultats seront présentés dans le premier chapitre.

Dans le deuxième chapitre, nous allons investiguer une alternative pour former une liaison covalente dans le site enzymatique. L'objectif est d'obtenir un composé ayant un profil inhibiteur supérieur au PBRM tout en conservant le caractère irréversible. L'ajout d'un groupement époxyde en position 3, en remplacement du groupement 2-bromoéthyl, permettrait de valider cette hypothèse de travail.

Chapitre 1

Résumé

L'enzyme 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 (17 β -HSD1) est impliquée dans la biosynthèse du plus puissant estrogène, l'estradiol. Cette enzyme est connue pour jouer un rôle pivot dans la progression des maladies sensibles aux estrogènes, tels que le cancer du sein et l'endométriose. C'est pour cette raison qu'inhiber la 17 β -HSD1 représente une avenue intéressante pour contrer la croissance des tumeurs sensibles aux estrogènes. Des études antérieures ont permis d'identifier le 3- $\{[3-(2\text{-bromoéthyl})-17\beta\text{-hydroxy-estra-1(10),2,4\text{-trièn-}16\beta\text{-yl]méthyl}\}$ benzamide (PBRM) comme un inhibiteur prometteur de la 17 β -HSD1. En se basant sur ce dernier, nous étions donc intéressés à développer un composé possédant une activité inhibitrice encore plus importante. Pour ce faire, nous devons déterminer l'influence d'un groupement fonctionnel en C16 et sa capacité à interagir avec deux acides aminés (Asn-152 et Leu-95) présents à proximité de la chaîne en C16 du noyau estradiol. Les activités inhibitrices des composés d'une première série ont été évaluées par un essai enzymatique et comparées à celles des composés de la deuxième série. Les résultats ont démontré qu'une liaison à l'Asn-152 était favorisée par rapport à une liaison à la Leu-95 pour obtenir une bonne activité inhibitrice. Toutefois, aucun produit n'a permis d'obtenir une amélioration quant à l'activité inhibitrice lorsque comparé au PBRM. Notre troisième série de composés a été synthétisée pour cibler une liaison avec Asn-152. Avec des valeurs IC₅₀ de 0.5 et 0.7 μ M, les composés **25b** et **25c** ont présenté la meilleure probabilité d'interaction avec le site catalytique de l'enzyme, mais ces composés demeurent moins puissants que l'inhibiteur PBRM.

Synthesis of a Series of Estrane Derivatives as Inhibitors of 17 β -HSD1 for the Treatment of Estrogen-Dependent Diseases

Maxime Lespérance,¹ Jenny Roy,¹ René Maltais¹ and Donald Poirier^{1*}

¹ Laboratory of Medicinal Chemistry, Oncology and Nephrology Unit, CHU de Québec – Research Center (CHUL, T4) and Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, Québec G1V4G2, Canada

Abstract: 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) is responsible for the last step in the biosynthesis of the most potent estrogen in the human body, estradiol. This enzyme is known to play a pivotal role in the progression of estrogen-dependent diseases, such as breast cancer and endometriosis. Therefore the inhibition of 17 β -HSD1 represents a promising avenue to modulate the growth of estrogen-sensitive tumors. A previous study identified PBRM 3-{[3-(2-bromoethyl)-17 β -hydroxy-estra-1(10),2,4-trien-16 β -yl]methyl}benzamide as the first non-estrogenic steroidal irreversible inhibitor of 17 β -HSD1. We were therefore interested in developing a PBRM analog with a better inhibition potency. To do so, we needed to figure out the impact of binding in a specific area of the enzyme catalytic site. Two amino acids, Asn-152 and Leu-95, were thus found at a small distance from the C16 β -side chain of PBRM and, consequently, they represent potential amino acids to target. In our study we synthesized three series of PBRM analogs by changing the nature of the C16 β -side chain, but keeping the 2-bromoethyl group at position C3. We also determined their 17 β -HSD1 inhibitions in T-47D cells (transformation of estrone into estradiol) and demonstrated that Asn-152 has to be targeted to produce an enzyme inhibition. However, we did not obtain any stronger inhibitor than PBRM. Compounds **25b** and **25c** were found to be more likely to bind the catalytic site and showed a promising but quite weak inhibitory activity with estimated IC₅₀ values of 0.5 and 0.7 μ M, respectively (about 10 times less potent than PBRM).

1. Introduction

Estradiol (E2) is known as the most potent estrogen in the human body and is responsible for the development and differentiation of estrogen-sensitive tissues.^{1,2} Beside its physiological effects, E2 is also involved in the apparition and progression of estrogen-dependent diseases (EDD), such as breast cancer,^{3,4} ovarian tumor,⁵ endometriosis,^{6,7} endometrial hyperplasia⁸ and uterine leiomyoma.⁹ Current hormonal therapies use antiestrogens¹⁰, selective estrogen receptor modulators or aromatase inhibitors^{11,12} to block the estrogen receptor or the biosynthesis of estrogens.

As the aromatase and steroid sulfatase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) is involved in the formation of estrogens. This latter drives the reduction of estrone (E1) into E2. For this reason the inhibition of this enzyme seems a promising avenue to treat the EDDs, by reducing the levels of E2. In fact, some work has been done in the past to inhibit this key enzyme.¹³⁻¹⁵ Many compounds have been synthesized and shown interest according to their inhibitory activity,¹⁶⁻²¹ but no inhibitor reach the stage of clinical trials. Compound CC-156 was reported as the best 17 β -HSD1 inhibitor synthesized by our research group (Figure 1).²² However this compound has demonstrated some estrogenic effects, which has been eliminated with the outcome of PBRM.²³⁻²⁵ This new steroid derivative occurs to be the first irreversible non-estrogenic steroidal inhibitor of 17 β -HSD1. Nevertheless, the enzymatic assay demonstrated a lower affinity for the enzyme compare to the reversible and potent inhibitor CC-156. Hence, the design of a new generation of PBRM analogs that would have an optimal binding for the catalytic site is crucial.

The development of PBRM already demonstrated that a 2-bromoethyl group in C3 position of an estrane nucleus produces a covalent bond with an amino acid of the catalytic site that inactivates 17 β -HSD1.²³⁻²⁵ Moreover, the presence of a benzylamide group at position 16 β seems important for the reduction of the estrogenicity of such estrane derivatives as well as to promote the formation of interaction with the enzyme. Therefore we kept the bromoethyl moiety in new designed inhibitors and we focused on the modification of the benzylamide side chain in order to maximize the interactions enzyme-inhibitor and, consequently, the inhibitory activity. Based on

the crystal structure of CC-156 complexed with 17 β -HSD1,²⁶ we suspected that two amino acids could be targeted in our inhibitor design strategy. In fact, asparagine (Asn)-152 and leucine (Leu)-95 are potentially crucial due to their proximity with the C16 β -benzylamide ring of the estrane nucleus. Thus, Asn would lead to polar interactions due to its amide group whereas Leu possesses an isobutyl residue that would lead to an apolar (hydrophobic) interaction. Maintaining the 2-bromoethyl side chain at C3, we designed and synthesized different PBRM analogs for potentially targeting each of these two amino acids and promoting a polar or an apolar binding (Figure 2).

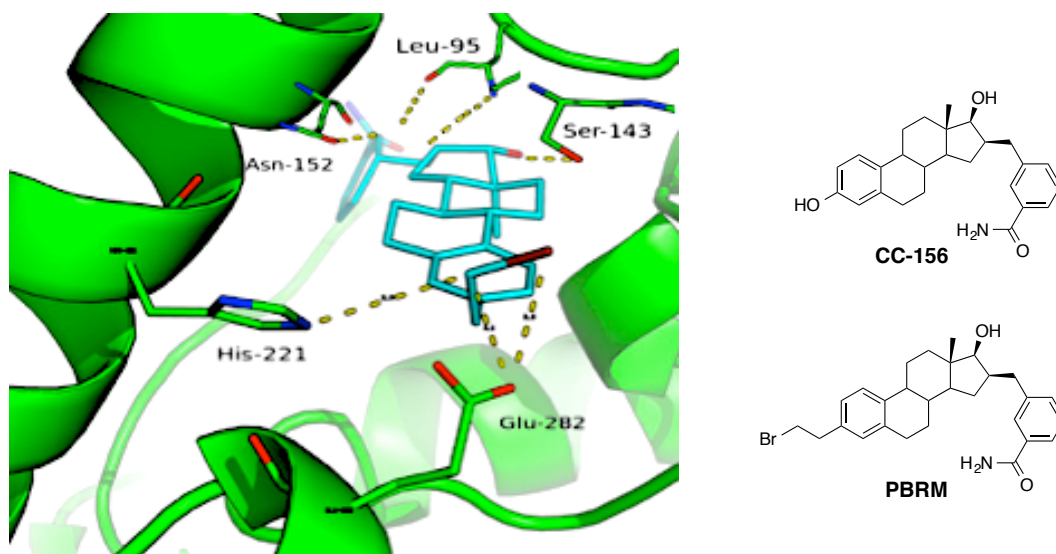


Figure 1: Structures of 17 β -HSD1 inhibitors CC-156 (A) and PBRM (B) as well as the representation of PBRM in the active site of 17 β -HSD1. Coordinates are from PDB 3HB5.²⁶ The thick cyan sticks represent PBRM, the green ribbons represent the enzyme and the small green sticks represent the amino acids.

2. Experimental

2.1 General

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). The usual solvents were obtained from Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada) and were used as received. Anhydrous acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), dimethylformamide (DMF)

and tetrahydrofuran (THF) were obtained from Sigma-Aldrich. Thin-layer chromatography (TLC) and flash-column chromatography were performed on 0.20-mm silica gel 60 F254 plates (E. Merck; Darmstadt, Germany) and with 230-400 mesh ASTM silica gel 60 (Silicycle, Québec, QC, Canada), respectively. Microwave experiments were conducted on a Biotage Initiator microwave instrument (Charlotte, NC, USA). Infrared spectra (IR) were recorded on a Horizon MB 3000 ABB FTIR spectrometer (Québec, QC, Canada) and the significant band reported in cm^{-1} . Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at 400 MHz for ^1H and 100.6 MHz for ^{13}C on a Bruker Avance 400 digital spectrometer (Billerica, MA, USA). The chemical shifts (δ) were expressed in ppm and referenced to chloroform (7.26 and 77.0 ppm), acetone (2.06 and 29.2 ppm) or methanol (MeOH) (3.31 and 49.0 ppm) for ^1H and ^{13}C NMR, respectively. Low-resolution mass spectra (LRMS) were recorded on a Shimadzu Prominence apparatus (Kyoto, Japan) equipped with a LCMS-2020 mass spectrometer (APCI probe). The purity of final compounds to be tested was determined with a Shimadzu HPLC apparatus equipped with SPD-M20A photodiode array detector, a Setima HPC18 reversed-phase column (250 mm x 4.6 mm) and a solvent gradient of MeOH: water. The wavelength of the UV detector was 190 nm.

2.2 Chemistry

Synthesis of starting compounds

3-Hydroxybenzaldehyde, 3-(hydroxymethyl)benzaldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde, 3,4-dihydroxybenzaldehyde and 3,5-dihydroxybenzaldehyde had their hydroxyl protected into a tetrahydropyranyl ethers (THP). Their synthesis was performed according to the procedure reported by Bernady et al.²⁷ in a yield ranging from 85 to 96 %. NMR data agree with those reported.²⁷

The sulfonamide group of 3-formylbenzenesulfonamide was protected into a triphenylmethyl (Trityl; Tr) derivative. Its formation was performed according to the general procedure reported by Behloul et al.²⁸ in a yield of 95 %. NMR data agree with those reported.²⁸

The hydroxyl-ethyl derivative **2** was prepared from estrone as previously reported by Maltais et al.²⁵ and the NMR data agree with those published.²⁵

General procedure for aldolization (aldol condensation)

To a stirring solution the steroidal ketone **2** (0.3 mmol) in EtOH (0.04 M) was added the appropriate 3-formyl benzyl derivative (0.6 mmol) and an aqueous KOH (10 %) solution (15 % v/v). The solution was heated at reflux for 0.5 to 2 h. The resulting solution was diluted with water, neutralized with aqueous HCl (10 %) and extracted with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried with MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude compound was purified by flash-column chromatography to give the corresponding enone.

General procedure for C17 reduction of enone

To a solution of enone (0.25 mmol) in MeOH (0.03 M) was added NaBH₄ (0.38 mmol), and the mixture was stirred at room temperature. After 1 h, the resulting solution was concentrated under vacuo, diluted with EtOAc, washed with water, washed with brine and dried with MgSO₄. The organic phase was evaporated under reduced pressure and the crude compound was purified by flash-column chromatography to give the corresponding allylic alcohol.

General procedure for catalytic hydrogenation of the allylic alcohol

To a solution of allylic alcohol (0.2 mmol) in EtOH (0.03 M) under an argon atmosphere at room temperature was added palladium on charcoal (10 % w/w). The reaction vessel was flushed three times with hydrogen and stirred for 24 h at room temperature. The resulting solution was filtered on Celite and then evaporated under reduced pressure. The crude compound was purified by flash-column chromatography using DCM/MeOH (95:5) as eluent to give the desired alcohol.

General procedure for bromination

To a solution of 3-(2-hydroxy-ethyl) derivative (0.08 mmol) in DCM (0.03 M) at 0 °C was added triphenylphosphine (0.32 mmol), imidazole (0.32 mmol) and carbon tetrabromide (0.32 mmol). The reaction mixture was allowed to slowly warm to room temperature over 2 h. The resulting mixture was poured into water and extracted with DCM. Silica gel basified with triethylamine was added and the solvent was removed under reduce pressure. The resulting dry pack was flush

with a solution of diethyl ether/hexanes (7:3). The collected filtrate was evaporated to give the crude bromo-ethyl-steroid derivative, which was purified by flash-column chromatography.

General procedure for the hydrolysis of protective group

To a solution of a tetrahydropyranyl (THP)-protected hydroxyl or trityl (Tr)-protected sulfonamide (0.05 mmol) in acetone (0.002 M) was added a solution of aqueous HCl (10 %) (0.002 M). The mixture was stirred at room temperature until completion (~ 1 h). The acetone was removed under reduced pressure and the suspension was extracted with DCM. The organic phase was washed 3 times with water and evaporated. The resulting crude compound was purified by flash-column chromatography using an isocratic solution of EtOAc/hexanes (3:7).

Synthesis of **2**

The hydroxyl-ethyl derivative **2** was prepared from estrone as previously reported by Maltais et al.²⁵ and the NMR data agree with those published.²⁵

Synthesis of **3a** [(13S,16R,17S)-3-(2-hydroxyethyl)-13-methyl-16-[[3-(tetrahydropyran-2-ylloxymethyl)phenyl]methyl]-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **3a** was obtained from **2** by following the general procedures for aldolization, C17 reduction and catalytic hydrogenation. Yield: 165.3 mg, 16 % (for 3 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 10.5, 5.1 Hz, 3H), 7.15 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.79 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.50 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.84 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.63 – 3.52 (m, 1H), 3.10 (dd, J = 13.2, 4.7 Hz, 1H), 2.86 – 2.77 (m, 4H), 2.53 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 2.46 – 2.38 (m, 1H), 2.34 (dd, J = 13.3, 2.7 Hz, 1H), 2.24 (s, 1H), 2.00 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 1.92 – 1.82 (m, 2H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.67 (dd, J = 14.8, 4.8 Hz, 2H), 1.60 – 1.44 (m, 5H), 1.36 (dd, J = 12.8, 3.6 Hz, 1H), 1.27 (s, 1H), 1.13 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 0.88 (s, 3H).

Synthesis of **3b** [(13S,16R,17S)-3-(2-hydroxyethyl)-13-methyl-16-[(3-tetrahydropyran-2-yloxyphenyl)methyl]-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **3b** was obtained from **2** by following the general procedures for aldolization, C17

reduction and catalytic hydrogenation. Yield: 113 mg, 56 % (for 3 steps). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.20 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 6.93 – 6.84 (m, 2H), 5.43 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 3.94 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 3.88 – 3.80 (m, 3H), 3.72 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.62 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 13.5, 5.0$ Hz, 1H), 2.82 (d, $J = 6.5$ Hz, 4H), 2.54 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 2.41 (dd, $J = 18.1, 6.8$ Hz, 1H), 2.34 (dd, $J = 14.3, 3.8$ Hz, 1H), 2.24 (s, 1H), 2.01 (dd, $J = 12.3, 2.9$ Hz, 2H), 1.91 – 1.84 (m, 3H), 1.65 (dd, $J = 13.1, 7.1$ Hz, 3H), 1.50 (dd, $J = 14.6, 5.5$ Hz, 3H), 1.41 – 1.29 (m, 2H), 1.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 1.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 0.87 (s, 3H).

Synthesis of **3c** [1-[3-[[[(13S,16R,17S)-17-hydroxy-3-(2-hydroxyethyl)-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]phenyl]-N-trityl-methanesulfonamide]

Compound **3c** was obtained from **2** by following the general procedures for aldolization, C17 reduction and catalytic hydrogenation. Yield: 236 mg, 39 % (for 3 steps). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.33 – 7.30 (m, 7H), 7.19 – 7.17 (m, 9H), 7.07 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 6.98 (dd, $J = 19.9, 10.9$ Hz, 3H), 5.76 (s, 1H), 3.85 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H), 3.10 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 2.97 (dd, $J = 13.4, 4.5$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 2.39 (dd, $J = 54.9, 13.2$ Hz, 3H), 2.27 – 2.17 (m, 2H), 1.96 (s, 1H), 1.73 (s, 1H), 1.55 (s, 3H), 1.47 – 1.27 (m, 6H), 1.06 (m, 2H), 0.83 (s, 3H).

Synthesis of **4** [(13S,16R,17S)-3-(2-hydroxyethyl)-16-[[3-(hydroxymethyl)phenyl]methyl]-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **4** was obtained from **3a** by following the general procedure for the hydrolysis of protective group. Yield: 73.3 mg, 86 %. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.27 (s, 1H), 7.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.08 – 7.03 (m, 4H), 6.98 (s, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.08 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 12.2, 5.9$ Hz, 4H), 2.62 – 2.53 (m, 1H), 2.46 – 2.39 (m, 1H), 2.28 (dd, $J = 15.0, 7.6$ Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.03 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 1.87 (s, 1H), 1.82 (s, 1H), 1.64 (s, 1H), 1.55 (dd, $J = 6.5, 2.8$ Hz, 2H), 1.36 (dd, $J = 14.1, 3.1$ Hz, 2H), 1.29 (s, 1H), 1.16 (dd, $J = 8.9, 4.3$ Hz, 2H), 0.91 (s, 3H).

Synthesis of **5** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-16-[[3-(bromomethyl)phenyl]methyl]-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **5** was obtained from **4** by following the general procedure for bromination. Yield: 43.2 mg, 59 %. IR (cm⁻¹): ν 3425 (O-H), 2924 (C=C), 1494 (O-H), 1211 (C-O), 555 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 7.34 (s, 1H), 7.29 – 7.17 (m, 4H), 7.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.85 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.63 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.17 (dd, J = 13.0, 3.5 Hz, 1H), 3.07 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.81 – 2.80 (m, 2H), 2.41 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.25 – 2.17 (m, 1H), 2.02 – 1.97 (m, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 1H), 1.70 (dd, J = 9.5, 4.8 Hz, 1H), 1.46 (s, 2H), 1.35 (dd, J = 12.9, 4.0 Hz, 1H), 1.29 (dd, J = 12.2, 3.8 Hz, 1H), 1.20 (s, 1H), 1.16 – 1.13 (m, 1H), 0.90 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 143.56, 141.37, 139.70, 137.42, 136.99, 129.99, 129.77, 128.10, 128.02, 126.80, 126.56, 124.55, 82.15, 82.10, 49.63, 45.28, 45.15, 43.10, 39.59, 39.12, 38.66, 34.23, 32.96, 30.86, 30.13, 28.21, 26.94, 13.19. LRMS for C₂₈H₃₃⁷⁹Br₂ [M + H – H₂O]⁺ = 529.20. HPLC purity of 95.6 % (retention time = 22.8 min).

Synthesis of **6a** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-13-methyl-16-[[3-(tetrahydropyran-2-yloxymethyl)phenyl]methyl]-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **6a** was obtained from **3a** by following the general procedure for bromination. Yield: 110.0 mg, 86 % ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 10.5, 5.1 Hz, 3H), 7.16 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.79 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.50 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.55 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.63 – 3.52 (m, 1H), 3.10 (m, 3H), 2.86 – 2.77 (m, J = 2H), 2.53 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 2.46 – 2.38 (m, 1H), 2.34 (dd, J = 13.3, 2.7 Hz, 1H), 2.24 (s, 1H), 2.00 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 1.92 – 1.82 (m, 2H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.67 (dd, J = 14.8, 4.8 Hz, 2H), 1.60 – 1.44 (m, 5H), 1.36 (dd, J = 12.8, 3.6 Hz, 1H), 1.27 (s, 1H), 1.13 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 0.88 (s, 3H).

Synthesis of **6b** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-13-methyl-16-[[3-(tetrahydropyran-2-yloxyphenyl)methyl]-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **6b** was obtained from **3b** by following the general procedure for bromination. Yield: 83 mg, 76 % ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.20 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.92 – 6.83 (m, 2H), 5.43 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 5.13 (s, 1H), 3.95 (t, J = 10.1 Hz, 1H), 3.86 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 3.62 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 3.55 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 3.08 (dt, J = 12.8, 6.4 Hz, 3H), 2.83 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 2.54 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 2.39 (dd, J

= 20.8, 7.3 Hz, 1H), 2.36 – 2.30 (m, 1H), 2.24 (t, $J = 10.9$ Hz, 1H), 2.01 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.87 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H), 1.70 – 1.61 (m, 3H), 1.55 – 1.45 (m, 2H), 1.31 (dd, $J = 19.5, 10.0$ Hz, 2H), 1.13 (s, 1H), 0.87 (s, 3H).

Synthesis of **6c** [1-[3-[[[(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]phenyl]-N-trityl-methanesulfonamide]

Compound **6c** was obtained from **3c** by following the general procedure for bromination. Yield: 59.2 mg, 89 %. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.33 – 7.30 (m, 7H), 7.19 – 7.17 (m, 9H), 7.01 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 6.94 (dd, $J = 16.7, 10.9$ Hz, 3H), 5.76 (s, 1H), 3.52 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.10 (m, 3H), 2.97 (dd, $J = 13.4, 4.5$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 2.39 (dd, $J = 54.9, 13.2$ Hz, 3H), 2.27 – 2.17 (m, 2H), 1.96 (s, 1H), 1.73 (s, 1H), 1.55 (s, 3H), 1.47 – 1.27 (m, 6H), 1.06 (m, 2H), 0.83 (s, 3H).

Synthesis of **7a** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-16-[[3-(hydroxymethyl)phenyl]methyl]-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **7a** was obtained from **6a** by following the general procedure for the hydrolysis of protective group. Yield: 19.2 mg, 25 % IR (cm^{-1}): ν 3279 (O-H), 2924 (C=C), 1154 (C-O), 1011 (C-O), 555 (C-Br). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.31 – 7.23 (m, 3H), 7.22 – 7.14 (m, 2H), 6.99 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.86 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 3.55 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.83 – 2.80 (m, 1H), 2.54 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 2.46 – 2.39 (m, 1H), 2.33 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 2.24 (t, $J = 10.9$ Hz, 1H), 2.06 – 1.97 (m, 1H), 1.88 – 1.82 (m, 1H), 1.80 – 1.75 (m, 1H), 1.60 – 1.42 (m, 3H), 1.40 – 1.24 (m, 3H), 1.11 (dd, $J = 11.5, 7.7$ Hz, 2H), 0.88 (s, 3H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, acetone- d_6) δ 143.56, 143.19, 139.70, 137.42, 136.99, 129.99, 128.77, 128.10, 127.83, 126.80, 126.25, 124.55, 82.15, 82.10, 64.80, 49.63, 45.28, 45.15, 43.10, 39.59, 39.12, 38.66, 34.23, 32.96, 30.13, 28.21, 26.94, 13.19. LRMS for $\text{C}_{28}\text{H}_{34}^{79}\text{BrO}$ [$\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}$] $^+$ = 467.15. HPLC purity of 98.0 % (retention time = 20.1 min).

Synthesis of **7b** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-16-[[3-(hydroxyphenyl)methyl]-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **7b** was obtained from **6b** by following the general procedure for the hydrolysis of protective group. Yield: 18.0 mg, 35 %. IR (cm⁻¹): ν 3279 (O-H), 2932 (C=C), 1582 (C=C), 1242 (C-O), 1011 (C-O), 563 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 8.10 (s, 1H), 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.06 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.69 (dd, J = 9.0, 4.6 Hz, 2H), 6.62 (dd, J = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 4.77 (s, 1H), 3.82 (dd, J = 9.6, 5.2 Hz, 1H), 3.81 – 3.76 (m, 1H), 3.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.12 – 3.02 (m, J = 12.2, 5.8 Hz, 3H), 2.87 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 2.78 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 2.49 – 2.36 (m, 1H), 2.35 – 2.25 (m, 2H), 2.24 – 2.14 (m, 1H), 2.03 (dt, J = 4.3, 2.2 Hz, 3H), 2.01 – 1.94 (m, J = 11.6, 7.3, 4.3 Hz, 1H), 1.84 – 1.78 (m, 1H), 1.72 – 1.65 (m, 1H), 1.43 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 1.33 (dd, J = 12.7, 3.3 Hz, 1H), 1.29 – 1.26 (m, 1H), 1.13 – 1.10 (m, 1H), 0.88 (d, J = 5.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 145.28, 139.72, 137.44, 137.00, 130.00, 129.89, 126.80, 126.25, 120.81, 116.50, 113.18, 82.14, 82.01, 49.60, 45.28, 45.14, 42.96, 39.60, 39.14, 38.65, 38.61, 34.24, 32.96, 30.14, 28.22, 26.94, 13.16. LRMS for C₂₇H₃₂⁷⁹BrO [M + H – H₂O]⁺ = 451.10. HPLC purity of 97.3 % (retention time = 19.9 min).

Synthesis of **7c** [[3-[[[(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]phenyl]methanesulfonamide]

Compound **7c** was obtained from **6c** by following the general procedure for the hydrolysis of protective group. Yield: 24.3 mg, 77 %. IR (cm⁻¹): ν 3479 (N-H), 3371 (O-H), 2924 (C=C), 1435 (C=C), 1335 (S=O), 1157 (S=O), 1080 (C-O), 494 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (s, 1H), 7.78 – 7.73 (m, 1H), 7.44 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 7.23 (s, 1H), 6.99 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.88 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 3.55 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.19 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.10 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.83 (dd, J = 9.7, 6.2 Hz, 2H), 2.49 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 2.33 (d, J = 13.3 Hz, 1H), 2.24 (s, 1H), 1.99 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 1.82 (dd, J = 9.1, 6.3 Hz, 1H), 1.76 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 1.53 – 1.47 (m, 2H), 1.38 – 1.33 (m, 1H), 1.28 (dd, J = 13.5, 9.1 Hz, 2H), 1.12 (dd, J = 10.6, 4.8 Hz, 2H), 0.87 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 145.06, 139.65, 137.39, 137.02, 133.23, 130.01, 129.49, 126.99, 126.82, 126.26, 124.02, 81.97, 81.84, 49.64, 45.27, 45.16, 42.97, 39.58, 39.10, 38.60, 38.53, 34.24, 32.86, 30.12, 30.03, 28.19, 26.92, 13.16. LRMS for C₂₈H₃₄⁷⁹BrO₂S [M + H – NH₂ – OH]⁺ = 516.05. HPLC purity of 97.2 % (retention time = 17.6 min).

Synthesis of **8** [3-[[[(13S,16R)-3-(2-bromoethyl)-13-methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-6H-cyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]benzoic acid]

To a round bottom flask containing **7a** (70 mg, 0.15 mmol) was added acetone (5.8 mL). The mixture was cooled to 0 °C and a fresh solution of Jones' reagent was added (0.1 mL). The solution was stirred for 72 h (progression monitored by TLC). After completion of the reaction the residual Jones' reagent was quenched with isopropanol and the organic solvent was removed under reduced pressure. EtOAc and water were poured into the suspension and the mixture was extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the crude carboxylic acid **8** (70 mg), which was used without purification for the next step. IR (cm⁻¹): ν 3387 (O-H), 2939 (C=C), 1728 (C=O) 1690 (C=O), 1497 (C=C), 1026 (C-O), 555 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 – 7.94 (m, 2H), 7.49 – 7.40 (m, 2H), 7.26 – 7.20 (m, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.54 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.30 (dd, *J* = 13.7, 4.1 Hz, 1H), 3.09 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.89 – 2.83 (m, 2H), 2.76 (dd, *J* = 13.7, 9.9 Hz, 1H), 2.50 (dd, *J* = 8.1, 3.9 Hz, 1H), 2.40 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 2.27 (s, 1H), 2.04 – 1.94 (m, 2H), 1.63 – 1.46 (m, 4H), 1.39 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 1.29 – 1.23 (m, 1H), 0.93 (s, 1H), 0.74 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 141.65, 139.18, 137.36, 137.22, 134.52, 131.56, 131.03, 130.06, 129.38, 128.36, 126.91, 126.22, 51.62, 51.60, 49.65, 49.01, 45.32, 39.55, 38.49, 37.67, 34.23, 32.91, 30.03, 28.39, 27.42, 26.40, 14.09, 14.07. LRMS for C₂₉H₃₆⁷⁹BrO₄ [M + H + MeOH]⁺ = 529.15. HPLC purity of 94.7 % (retention time = 21.1 min).

Synthesis of **9** [3-[[[(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]benzoic acid]

Compound **9** was obtained from **8** by following the general procedure for C17 reduction. Yield 40 mg, 80 %. IR (cm⁻¹): ν 3394 (O-H), 2932 (C=C), 1697 (C=O), 1497 (C=C), 1026 (C-O), 494 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 7.92 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 3.87 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.63 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.23 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.79 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 2.50 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 2.34 (ddd, *J* = 13.0, 6.9, 3.8 Hz, 1H), 2.25 – 2.16 (m, 1H), 2.09 (s, 1H), 2.00 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 1.85 – 1.78 (m, 1H), 1.70 (s, 1H), 1.51 – 1.43 (m, 2H), 1.35 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 1.28 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 1.18 – 1.11 (m, 2H), 0.90 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 168.06, 144.30, 139.70, 137.44, 137.01, 134.26,

131.56, 130.78, 130.00, 129.11, 127.69, 126.80, 126.26, 82.01, 49.62, 45.28, 45.15, 43.14, 39.60, 39.11, 38.64, 38.48, 34.23, 32.86, 30.13, 28.20, 26.95, 13.17. LRMS for $C_{28}H_{32}^{79}BrO_2$ [$M + H - H_2O$] $^+$ = 481.10. HPLC purity of 94.4 % (retention time = 21.5 min).

Synthesis of **10** [methyl 3-[[[(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]benzoate]

To a solution of compound **9** (30 mg, 0.06 mmol) in MeOH (1 mL) was added a solution of trimethylsilyldiazomethane 2 M in hexanes (184 μ L, 0.37 mmol). The mixture was stirred at room temperature and the progression was followed by TLC. After 1 h, a second amount of trimethylsilyldiazomethane 2 M in hexanes (184 μ L, 0.37 mmol) was added. After 3 h, the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, concentrated under reduced pressure and purified by flash-column chromatography with hexanes/EtOAc (7:3) to yield 11.4 mg (37 %) of **10**. IR (cm^{-1}): ν 3448 (O-H), 2924 (C=C), 1720 (C=O), 1443 (O-H), 1281 (C-O), 555 (C-Br). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91 (s, 1H), 7.87 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.99 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.87 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.55 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.15 (dd, J = 13.1, 4.5 Hz, 1H), 3.09 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.85 – 2.78 (m, 2H), 2.54 (dt, J = 8.2, 5.2 Hz, 1H), 2.50 – 2.42 (m, 1H), 2.39 – 2.29 (m, 1H), 2.24 (s, 1H), 2.04 – 1.97 (m, 1H), 1.82 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 1.74 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 1.62 – 1.44 (m, 4H), 1.39 – 1.27 (m, 2H), 1.16 – 1.08 (m, 2H), 0.88 (s, 3H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$) δ 167.50, 142.58, 139.11, 137.11, 136.26, 133.62, 130.27, 129.96, 129.37, 128.49, 127.19, 126.01, 125.74, 82.29, 52.25, 48.81, 44.55, 44.46, 41.80, 39.15, 38.10, 37.81, 37.57, 33.13, 32.20, 29.58, 27.47, 26.14, 12.71. LRMS for $C_{30}H_{40}^{79}BrO_4$ [$M + H + MeOH$] $^+$ = 543.2. HPLC purity of 97.1 % (retention time = 22.2 min).

Synthesis of **11** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-13-methyl-16-(3-pyridylmethyl)-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **11** was obtained from **2** by following the general procedures for aldolization, C17 reduction, catalytic hydrogenation and bromination. Yield: 83 mg, 32 % (for 4 steps). IR (cm^{-1}): ν 3394 (O-H), 2925 (C=C), 1628 (C=N), 1080 (C-O), 563 (C-Br). 1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 8.47 (s, 1H), 8.38 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 2H), 7.02 (d, J =

8.0 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 3.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.63 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.16 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.81 (dd, $J = 18.9, 7.8$ Hz, 3H), 2.43 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 2.37 – 2.30 (m, 1H), 2.21 (td, $J = 11.4, 4.0$ Hz, 1H), 2.00 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 1.83 (ddd, $J = 9.0, 5.5, 2.8$ Hz, 1H), 1.71 (s, 1H), 1.47 (dd, $J = 12.1, 9.2$ Hz, 2H), 1.39 – 1.21 (m, 3H), 1.14 (dd, $J = 8.9, 3.9$ Hz, 2H), 0.90 (s, 3H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ 149.72, 148.17, 143.32, 139.81, 137.17, 135.76, 132.82, 127.81, 126.79, 126.24, 124.98, 84.25, 50.45, 50.33, 45.47, 43.81, 36.71, 36.56, 36.39, 35.08, 29.98, 29.63, 29.27, 28.22, 27.66, 15.12. LCMS for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}^{79}\text{BrON}$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 455.95$. HPLC purity of 97.4 % (retention time = 19.6 min).

Synthesis of **12** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-13-methyl-16-[(1-oxidopyridin-1-ium-3-yl)methyl]-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **11** (60 mg, 0.11 mmol) was dissolved in anhydrous DCM (4 mL) and the solution was cooled to 0 °C. *m*-CPBA (22 mg, 0.13 mmol) was added and the mixture was allowed to warm to room temperature over 2 h, then poured into water and extracted with DCM. The organic phases were washed with aq NaHCO_3 . The organic phase was filtrated on a biotage phase separator and evaporated under reduced pressure. The crude product was first purified by flash-column chromatography with DCM/MeOH (96:4) containing 0.5 % trimethylamine (TEA) and next by preparative TLC using DCM/MeOH (96:4) containing 0.5 % TEA to afford 13.6 mg (44 %) of **12**. IR (cm^{-1}): ν 3412 (O-H), 2924 (C=C), 1643 (C=N), 1443 (N-O), 1157 (C-O), 555 (C-Br). ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 8.08 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 10.1, 3.9$ Hz, 1H), 7.22 (t, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 3.87 (dd, $J = 9.4, 5.4$ Hz, 1H), 3.63 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.42 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 2.32 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 2.21 (dd, $J = 4.4, 2.2$ Hz, 1H), 1.97 (s, 1H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.59 – 1.41 (m, 3H), 1.39 – 1.25 (m, 4H), 1.17 (dd, $J = 5.7, 2.8$ Hz, 1H), 1.09 (ddd, $J = 7.4, 5.3, 3.1$ Hz, 1H), 0.88 (s, 3H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 145.50, 141.92, 138.49, 136.37, 136.14, 136.06, 133.07, 129.14, 125.92, 85.78, 72.29, 48.18, 45.44, 43.99, 43.85, 43.82, 43.78, 38.06, 37.76, 37.35, 34.21, 32.84, 31.39, 28.96, 26.98, 12.66. LRMS for $\text{C}_{27}\text{H}_{37}^{79}\text{BrO}_3\text{N}$ $[\text{M} + \text{H} + \text{MeOH}]^+ = 502.15$. HPLC purity of 92.4 % (retention time = 17.1 min).

Synthesis of **13** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-13-methyl-16-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl]-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **13** was obtained from **2** by following the general procedures for aldolization, C17 reduction, catalytic hydrogenation and bromination. Yield: 128 mg, 18 % (for 4 steps). IR (cm⁻¹): ν 3425 (O-H), 2932 (C=C), 1458 (C-H), 1126 (C-O), 733 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.45 (s, 2H), 3.85 (d, J = 12.1 Hz, 9H), 3.55 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.10 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.87 – 2.81 (m, 2H), 2.53 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 2.36 (dd, J = 13.5, 10.9 Hz, 2H), 2.28 – 2.20 (m, 1H), 2.00 (dt, J = 12.2, 2.8 Hz, 1H), 1.92 – 1.82 (m, 2H), 1.58 (dd, J = 12.1, 8.5 Hz, 2H), 1.56 – 1.46 (m, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.17 – 1.09 (m, 2H), 0.87 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 144.26, 139.53, 138.79, 137.26, 136.10, 130.81, 129.84, 129.58, 129.20, 127.03, 125.86, 125.57, 81.78, 49.49, 45.14, 44.99, 42.83, 39.44, 38.98, 38.50, 38.30, 34.64, 34.08, 32.77, 29.21, 28.05, 26.80, 13.02. LRMS for C₃₀H₄₀⁷⁹BrO₄ [M + H]⁺ = 544.85. HPLC purity of 98.0 % (retention time = 20.7 min).

Synthesis of **14** [3-[(13*S*)-3-(2-hydroxyethyl)-13-methyl-17-oxo-6,7,8,9,11,12,13,14,15,17-decahydro-16*H*-cyclopenta[α]phenanthren-16-ylidene)methyl]benzotrile]

To a solution of **2** (1.0 g, 3.35 mmol) in EtOH (50 mL) was added 3-cyanobenzaldehyde (1.32 g, 10.05 mmol) and aq NaOH (10 %) (15 % v/v). The solution was stirred at room temperature for 20 min, diluted with water, neutralized with aq HCl (10 %) and extracted with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried with MgSO₄, and evaporated under reduced pressure. The crude compound was purified by flash-column chromatography using EtOAc/hexanes (3:7) to give 1.17 g (85 %) of **14**.

Synthesis of **15** [3-[[[(13*S*,16*R*,17*S*)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]benzotrile]

Compound **15** was obtained from **14** by following the general procedures for C17 reduction, catalytic hydrogenation and bromination. IR (cm⁻¹): ν 3474 (O-H), 2916 (C=C), 2222 (C \equiv N), 1434 (O-H), 1080 (C-O), 555 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 7.67 (s, 1H), 7.58 (m, 2H), 7.49 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.64 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.22 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 3.08 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.51 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 2.33 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.06 (m, 3H), 1.82 (m, 1H), 1.72 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 1.48 (m, 2H), 1.34 (m, 2H), 1.17 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 0.91 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 145.67, 139.61, 137.37, 136.98, 134.49, 133.12, 130.04, 130.02, 129.98,

126.79, 126.23, 119.66, 112.84, 81.89, 49.59, 45.21, 45.13, 42.80, 39.57, 39.05, 38.56, 38.16, 34.22, 32.72, 30.22, 29.45, 28.16, 26.89, 13.12. LRMS for $C_{28}H_{31}^{79}BrN$ $[M + H - H_2O]^+ = 461$. HPLC purity of 94.2 % (retention time = 21.2 min).

Synthesis of **16** [3-[[[(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl)methyl]-N-(5-methylthiazol-2-yl)benzamide]

Compound **9** (20 mg, 0.04 mmol) was dissolved in benzene (1 mL), thionyl chloride (13 μ L, 0.18 mmol) was added and the mixture was heated to reflux under argon atmosphere. After 5 h, the solution was cooled to room temperature and benzene was evaporated under reduced pressure. The resulting oil containing residual thionyl chloride was submit to a benzene wash which was remove under reduce pressure. The resulting solid was solubilized in DCM (1 mL) and argon was bubbled in the mixture for 5 min before adding DIPEA (41 μ L, 0.24 mmol) and 5-methylthiazol-2-amine (4.6 mg, 0.04 mmol). The mixture was stirred at room temperature, under argon atmosphere for 16 h and then poured into water and extracted with DCM. The organic phase was filtrated on a biotage phase separator and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by flash chromatography with an isocratic EtOAc/hexanes (1:1) eluting system to afford 8 mg (24 %) of **16**. IR (cm^{-1}): ν 3425 (O-H), 2924 (C=C), 1558 (C=O), 1311 (C-N), 1003 (C-O), 563 (C-Br). 1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 8.06 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 3.91 – 3.85 (m, 1H), 3.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.31 – 3.23 (m, 1H), 3.07 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.78 – 2.76 (m, 1H), 2.55 – 2.47 (m, 1H), 2.41 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H), 2.34 (dd, $J = 13.2, 3.6$ Hz, 1H), 2.23 – 2.18 (m, 1H), 1.99 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H), 1.91 – 1.78 (m, 1H), 1.71 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.62 – 1.50 (m, 1H), 1.51 – 1.43 (m, 2H), 1.29 (s, 3H), 1.20 – 1.13 (m, 2H), 0.91 (s, 3H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, acetone- d_6) δ 164.86, 139.69, 137.87, 137.03, 133.90, 133.37, 130.02, 129.37, 129.03, 127.30, 126.82, 126.32, 126.27, 126.05, 81.94, 63.52, 49.69, 48.23, 45.32, 45.19, 42.99, 39.60, 39.15, 38.65, 38.55, 37.38, 34.24, 32.80, 28.61, 28.21, 26.96, 11.33. LRMS for $C_{32}H_{38}^{79}BrN_2O_2S$ $[M + H]^+ = 594.90$. HPLC purity of 89.7 % (retention time = 22.7 min).

Synthesis of **18** [3-(1,3-dioxolan-2-yl)benzaldehyde]

To a solution of compound **17** (2.0 g, 14.9 mmol) in benzene (112 mL) was added tosylic acid (283 mg, 1.5 mmol) and ethylene glycol (828 μ L, 14.9 mmol). The mixture was heated to reflux for 4 h and the water formed was removed with a Dean Stark. The resulting solution was cooled to room temperature and poured into a funnel containing DCM. Water (100 mL) was added followed by few drops of sodium hydroxide aqueous solution until the pH reached 8. The compound was extracted with DCM and the combined organic layer was washed with water. ^1H NMR analysis indicated approximately 35 % of starting material **17**, 15 % of the bis-ketal and 50 % of the desired compound **18**, which was isolated by flash-column chromatography using EtOAc/hexanes (3:7) to provide 1.45 g (54 %) of **18**. ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 10.08 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.96 – 7.92 (m, 1H), 7.79 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.19 – 3.97 (m, 4H).

Synthesis of **19** [[3-(1,3-dioxolan-2-yl)phenyl]methanol]

To a solution of compound **18** (1.45 g, 8.1 mmol) in EtOH (40 mL) at 0 $^\circ\text{C}$ was added NaBH_4 (586 mg, 12.2 mmol). The mixture was allowed to warm to room temperature over 1 h. The resulting solution was concentrated under vacuo, diluted with EtOAc, washed with water, washed with brine and dried with MgSO_4 . The organic phase was evaporated under reduced pressure and the crude compound was purified by flash-column chromatography using EtOAc/hexanes (3:7) to give 943 mg (65 %) of **19**. ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 7.52 (s, 1H), 7.41 – 7.31 (m, 3H), 5.75 (s, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.11 – 3.92 (m, 4H).

Synthesis of **20** [2-[3-(bromomethyl)phenyl]-1,3-dioxolane]

To a solution of compound **19** (920 mg, 5.1 mmol) in DCM (51 mL) at 0 $^\circ\text{C}$ was added triphenylphosphine (2.74 g, 10.2 mmol), imidazole (695 mg, 10.2 mmol) and carbon tetrabromide (3.38 g, 10.2 mmol). The reaction was allowed to slowly warm to room temperature over 1 h. The resulting mixture was poured into water and extracted with DCM. Solvent was removed under reduce pressure to afford the crude product. Purification by flash-column chromatography using diethylether/hexanes (7:3) afforded 479 mg (39 %) of **20**. ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 7.56 (s, 1H), 7.48 (dt, J = 6.9, 1.9 Hz, 1H), 7.43 – 7.36 (m, 2H), 5.74 (s, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.12 – 3.99 (m, 4H).

Synthesis of **21** [2-[3-(1,3-dioxolan-2-yl)phenyl]acetonitrile]

In a microwave vial, compound **20** (280 mg, 1.2 mmol) was dissolved in a mixture of DCM/water (5.6 mL : 1.7 mL). Tetra-*n*-butylammonium bromide (11 mg, 0.03 mmol) and potassium cyanide (188 mg, 2.9 mmol) were added. The flask was sealed and heated at 120 °C for 3 h. The reaction was allowed to cool to room temperature and the progression of the reaction was monitored by TLC. The solution was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried with MgSO₄ and concentrated under reduce pressure to 1/6 of the initial volume. The resulting oil was purified with a pad of silica gel using DCM as eluent to afford 179 mg (83 %) of **21**. ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 7.55 (s, 1H), 7.48 (dt, *J* = 6.9, 2.1 Hz, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 2H), 5.74 (s, 1H), 4.12 – 3.99 (m, 4H), 3.83 (s, 2H), 1.99 (s, 1H).

Synthesis of **22** [2-(3-formylphenyl)acetonitrile]

To a mixture of compound **21** (179 mg, 0.95 mmol) in acetone (25 mL) was added a 10 % aq HCl (25 mL). The solution was stirred for 1 h at room temperature and the progression of the reaction was followed by TLC. After completion, the mixture was poured into water and the compound was extracted with EtOAc. The organic layer was dried with MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford 133 mg (97 %) of **22**. ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 10.03 (s, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 5.74 (s, 1H), 3.83 (s, 2H), 1.99 (s, 1H).

Synthesis of **23** [2-[3-[[[(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]phenyl]acetamide]

Compound **23** was obtained from **22** by following the general procedures for aldolization, C17 reduction, catalytic hydrogenation and bromination. Yield: 15.8 mg, 10 % (for 4 steps) IR (cm⁻¹): ν 3379 (O-H), 2924 (C=C), 1666 (C=O), 1265 (C-N), 1072 (C-O), 563 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 7.22 (dd, *J* = 13.2, 7.3 Hz, 3H), 7.12 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 7.03 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 3.82 (s, 1H), 3.63 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 3.31 (s, 1H), 3.09 (s, 2H), 3.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.87 – 2.78 (m, 4H), 2.55 – 2.43 (m, 1H), 2.42 – 2.30 (m, 2H), 2.21 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 2.03 – 1.96 (m, 1H), 1.85 – 1.77 (m, 1H), 1.71 (s, 1H), 1.46 (dd, *J* = 12.7, 9.3 Hz, 2H), 1.27 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.14 (dd, *J* = 7.1, 2.7 Hz, 2H), 0.90 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 173.04, 143.82, 139.72, 137.45, 137.14, 137.02, 130.63, 130.02, 129.02, 128.95, 127.91, 127.14, 126.27, 82.15, 49.65, 49.09, 45.94, 45.31, 43.57, 43.08, 41.80, 39.61, 39.16, 38.61,

34.24, 30.16, 28.21, 26.97, 13.19. LRMS for C₂₉H₃₁⁷⁹BrO₂ [M + H - NH₂]⁺ = 493.95. HPLC purity of 100 % (retention time = 19.5 min).

Synthesis of **24a** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-13-methyl-16-[(4-tetrahydropyran-2-yloxyphenyl)methyl]-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **24a** was obtained from **2** by following the general procedures for aldolization, C17 reduction, catalytic hydrogenation and bromination. Yield: 49 mg, 17 % (for 4 steps). ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 8.04 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.03 (dd, *J* = 10.4, 8.1 Hz, 3H), 6.95 (s, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.74 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.94 (ddd, *J* = 15.4, 14.0, 6.7 Hz, 1H), 3.89 – 3.81 (m, 1H), 3.62 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.51 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 3.43 – 3.17 (m, 1H), 3.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.87 – 2.77 (m, 3H), 2.53 (s, 1H), 2.34 (s, 1H), 2.20 (s, 1H), 1.96 (s, 1H), 1.81 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 1.66 (dd, *J* = 8.9, 5.7 Hz, 2H), 1.57 – 1.35 (m, 7H), 1.29 (s, 1H), 1.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 0.91 (s, 3H).

Synthesis of **24b** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-16-[[3,4-di(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]methyl]-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **24b** was obtained from **2** by following the general procedures for aldolization, C17 reduction, catalytic hydrogenation and bromination. Yield: 90 mg, 34 % (for 4 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.06 – 7.02 (m, 1H), 7.02 – 6.93 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.80 – 6.69 (m, 1H), 5.44 – 5.37 (m, 1H), 4.09 – 3.99 (m, 2H), 3.83 (m, 1H), 3.56 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.11 (t, *J* = 11.2 Hz, 2H) 3.00 (dt, *J* = 9.8, 4.8 Hz, 1H), 2.86 – 2.78 (m, 4H), 2.46 (t, *J* = 11.3 Hz, 1H), 2.37 – 2.27 (m, 2H), 2.27 – 2.18 (m, 1H), 1.96 (dd, *J* = 18.0, 7.5 Hz, 3H), 1.86 (ddd, *J* = 12.4, 8.5, 5.6 Hz, 5H), 1.67 (dd, *J* = 20.8, 8.5 Hz, 7H), 1.56 – 1.42 (m, 3H), 1.38 – 1.28 (m, 2H), 1.10 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 0.84 (s, 3H).

Synthesis of **24c** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-16-[[3,5-di(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]methyl]-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **24c** was obtained from **2** by following the general procedures for aldolization, C17 reduction, catalytic hydrogenation and bromination. Yield: 74 mg, 36 % (for 4 steps). ¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (s, 1H), 7.01 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.65 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.57 (s, 2H), 5.40 (dd, $J = 6.9, 3.1$ Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.61 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 3.52 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H), 3.09 (t, $J = 13.4$ Hz, 2H), 3.01 (dd, $J = 13.5, 5.4$ Hz, 1H), 2.81 (m, 2H), 2.53 (s, 1H), 2.35 (s, 2H), 2.22 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 2.02 – 1.96 (m, 3H), 1.86 – 1.82 (m, 4H), 1.72 – 1.60 (m, 7H), 1.47 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.43 – 1.29 (m, 5H), 1.11 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 0.84 (s, 3H).

Synthesis of **25a** [(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-16-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol]

Compound **25a** was obtained from **24a** by following the general procedure for the hydrolysis of protective group. Yield: 35.6 mg, 98 %. IR (cm⁻¹): ν 3279 (O-H), 2932 (C=C), 1582 (C=C), 1242 (C-O), 1011 (C-O), 563 (C-Br). ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 8.3$ Hz, 3H), 6.95 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 3.82 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.63 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.06 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 2.83 (d, $J = 13.6$ Hz, 4H), 2.40 (s, 1H), 2.30 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 2.20 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 2.01 – 1.96 (m, 1H), 1.87 – 1.79 (m, 1H), 1.69 (s, 1H), 1.44 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.36 – 1.27 (m, 2H), 1.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 0.88 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 156.08, 139.72, 137.42, 136.97, 134.15, 130.54, 130.40, 129.98, 126.78, 126.24, 115.80, 82.19, 49.58, 45.26, 45.13, 43.29, 39.59, 39.13, 38.66, 37.68, 34.22, 32.94, 30.03, 28.19, 26.94, 13.18. LRMS for C₂₇H₃₂⁷⁹BrO [M + H – H₂O]⁺ = 451.15. HPLC purity of 97.1 % (retention time = 20.0 min).

Synthesis of **25b** [4-[[[(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]benzene-1,2-diol]

Compound **25b** was obtained from **24b** by following the general procedure for the hydrolysis of protective group. Yield: 13.0 mg, 78 % IR (cm⁻¹): ν 3394 (O-H), 2924 (C=O), 1026 (C-O), 1257 (C-O). ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 7.61 (s, 2H), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.71 (dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, 2H), 6.54 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J = 9.7, 4.9$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 3.63 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.31 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 3.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.02 (dd, $J = 13.7, 4.2$ Hz, 1H), 2.84 – 2.77 (m, 2H), 2.42 – 2.30 (m, 2H), 2.22 (dd, $J = 16.2, 9.3$ Hz, 2H), 1.98 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 1.88 – 1.79 (m, 1H), 1.73 – 1.68 (m, 1H), 1.50 – 1.41 (m, 2H), 1.36 – 1.28 (m, 2H), 1.14 – 1.08 (m, 2H), 0.87 (s, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 145.64, 143.65, 139.75, 137.46, 137.00, 135.22, 130.00, 126.80,

126.25, 120.89, 120.79, 116.61, 115.86, 87.77, 82.21, 82.08, 49.59, 49.08, 46.15, 45.30, 45.14, 43.21, 39.60, 39.47, 39.17, 38.68, 37.94, 34.24, 33.01, 30.16, 28.23, 26.96, 13.17. LRMS for $C_{27}H_{32}^{79}BrO_2$ $[M + H - H_2O]^+ = 467.15$. HPLC purity of 98.6 % (retention time = 20.1 min). [0.1 % of acetic acid was added to the standard condition].

Synthesis of **25c** [5-[[[(13S,16R,17S)-3-(2-bromoethyl)-17-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[α]phenanthren-16-yl]methyl]benzene-1,3-diol]

Compound **25c** was obtained from **24c** by following the general procedure for the hydrolysis of protective group. Yield: 4.5 mg, 89 % IR (cm^{-1}): ν 3418 (O-H), 2924 (C=C), 1149 (C-O). 1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 7.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.06 – 6.02 (m, 1H), 5.99 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J = 9.1, 5.2$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.61 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.30 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 3.10 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.02 (dd, $J = 13.7, 4.2$ Hz, 1H), 2.84 – 2.77 (m, 2H), 2.42 – 2.32 (m, 2H), 2.22 (dd, $J = 16.2, 9.3$ Hz, 2H), 1.98 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 1.88 – 1.77 (m, 1H), 1.73 – 1.68 (m, 1H), 1.50 – 1.41 (m, 2H), 1.36 – 1.28 (m, 2H), 1.12 – 1.08 (m, 2H), 0.87 (s, 3H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, acetone- d_6) δ 145.72, 142.99, 140.12, 137.16, 137.01, 135.15, 129.67, 126.80, 126.25, 121.03, 120.89, 116.61, 115.86, 87.77, 82.21, 82.08, 49.59, 49.08, 46.15, 45.30, 45.14, 43.21, 39.60, 39.47, 39.17, 38.29, 37.94, 34.24, 33.01, 30.16, 27.81, 26.46, 13.17. LRMS for $C_{27}H_{32}^{79}BrO_2$ $[M + H - H_2O]^+ = 469.00$. HPLC purity of 96.5 % (retention time = 17.5 min).

2.3 Biology

17 β -HSD1 inhibition assay

T-47D breast cancer cells were grown in RPMI medium supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2 nM), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 μ g/mL) and 17 β -estradiol (E2) (1 nM). The cells were seeded in a 24-well plate (3000 cells/well). T-47D cells were suspended in the RPMI medium supplemented with insulin (50 ng/mL). A 5 % (v/v) FBS treated with dextran-coated charcoal was used to remove the endogenous steroids. Stock solution of each compound to be tested was previously prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted with culture medium to achieve appropriate concentrations prior to use. After 24 h of

incubation, a diluted solution was added to the cells to obtain the appropriate final concentration (0.1 or 1 μ M for screening and ranging from 1 nM to 5 μ M for IC₅₀ value determination). The final concentration of DMSO in the well was adjusted to 0.1 %. Additionally, a solution of [¹⁴C]-estrone (E1) (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, USA) was added to obtain a final concentration of 60 nM. Cells were incubated for 24 h, and each inhibitor was assessed in triplicate. After incubation, the culture medium was removed and labeled steroids ([¹⁴C]-E1 and [¹⁴C]-E2) were extracted with diethyl ether. The organic phase was evaporated to dryness with nitrogen. Residues were dissolved in DCM, dropped on silica gel thin layer chromatography plates (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA), and eluted with toluene/acetone (4:1) as solvent system. Substrate [¹⁴C]-E1 and metabolite [¹⁴C]-E2 were identified by comparison with reference steroids (E1 and E2) and quantified using the Storm 860 system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). The percentage of transformation and the percentage of inhibition were calculated as follow: % transformation = $100[\text{¹⁴C}]\text{-E2}/([\text{¹⁴C}]\text{-E1} + [\text{¹⁴C}]\text{-E2})$ and % of inhibition = $100(\% \text{ transformation without inhibitor} - \% \text{ transformation with inhibitor})/ \% \text{ transformation without inhibitor}$.

3. Results and Discussion

3.1 Chemistry

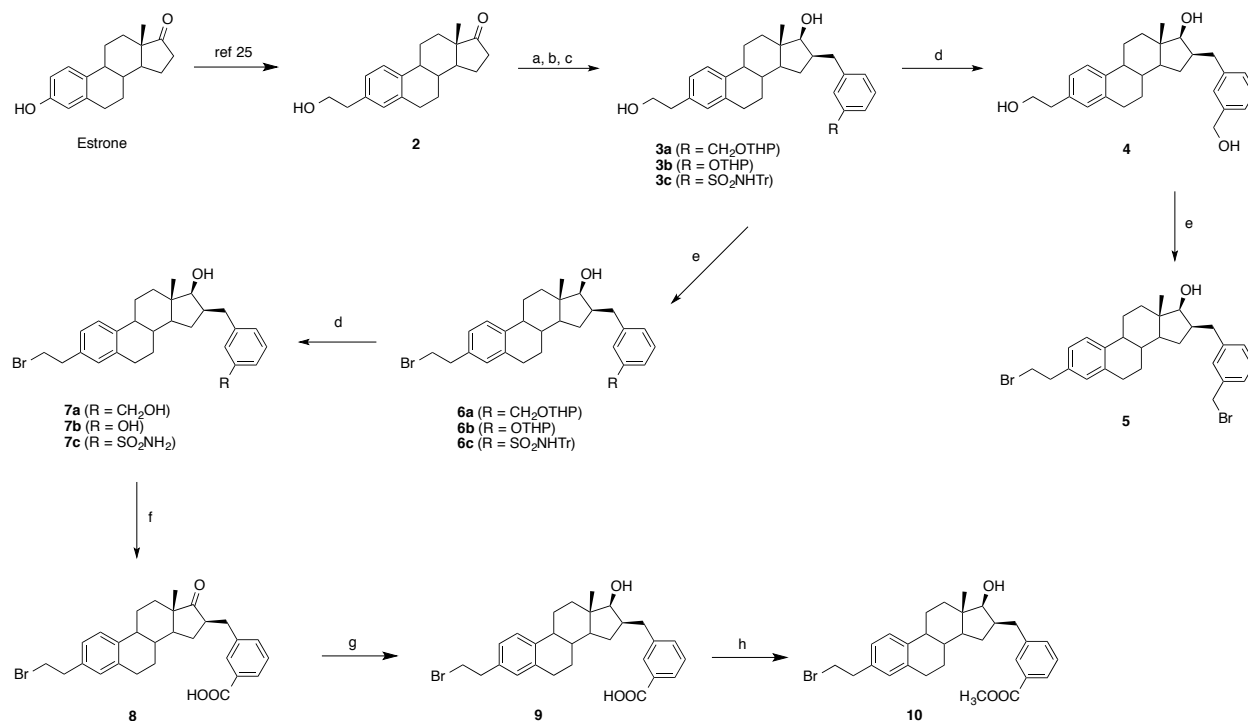
Although the 17 β -HSD1 inhibitor PBRM has proven to be a promising compound for lowering the estrogen rate and decreasing the proliferation of estrogen-dependent tumors, its potency and binding affinity could be increased. There so, we investigated the effect of modifying the benzylamide side chain at the C16 β position of the steroidal nucleus. Modifying that part of the inhibitor could allow better interactions with Asn-152 or Leu-95, two amino acids present in the enzyme catalytic site and involved in the inhibition pattern. Hopefully, we would like to obtain new inhibitors with stronger affinity for the enzyme. The C3-bromoethyl moiety of the inhibitor being directly involved in the irreversible bonding in the catalytic site,²⁵ we kept this reactive moiety in the inhibitors designed. Three series of potential inhibitors were thus designed by adding on the 3-(2-bromoethyl)-17 β -hydroxy-estra-1(10),2,4-triene a new C16 β benzyl derivative

that would either target Asn-152 or Leu-95. Compounds **7a**, **7b**, **7c**, **8**, **9**, **11** and **12** were synthesized for targeting Asn-152, compounds **5**, **10**, **13** and **15** for targeting Leu-95 and compounds **16**, **23**, **25a**, **25b** and **25c** for targeting Asn-152 (Figure 2).

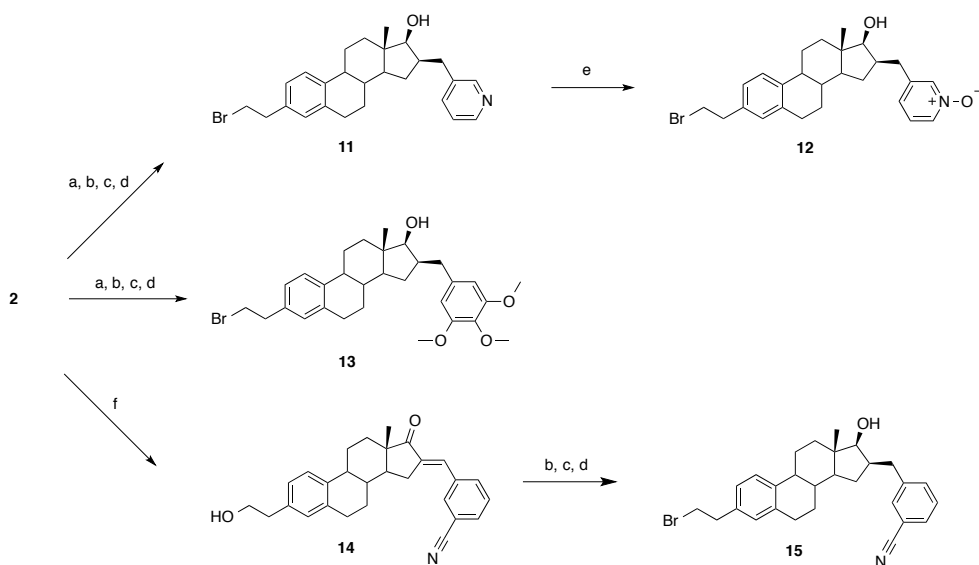
As reported in Schemes 1-4, all new compounds were obtained from estrone, the natural substrate of 17 β -HSD1. The modification at C3, which leads to 3-(2-hydroxyl-ethyl) estrane derivative **2**, was performed according to the procedure reported by Maltais et al.²⁵ This common intermediate was taken forward into the introduction of the C16 β -benzyl derivative side chain. This functionalization was performed with a standard procedure, that we used to obtain the series of compounds. An aldolique condensation first produced an enone, which was reduced into an enol, and this latter was reduced by a catalytic hydrogenation. In order to afford compounds **3a-c**, the appropriate 3-formyl benzyl derivative was first protected with the corresponding tetrahydropyranyl (THP) or triphenyl methyl (Tr) group. For compound **3a**, bromination was performed on this protected compound to give **6a** and the deprotected (hydroxylated) compound **4** afforded the final compound **5**. Compound **7a** was obtained from **6a** after THP cleavage with an acidic treatment. For **3a-c** the bromination conditions were selected to avoid cleavage of the sensitive protecting group and bromination of the resulting alcohol. Thus, the Appel reaction using P(Ph)₃ and CBr₄ was favored over reaction using N-bromosuccinimide or bromine for the formation of **6a-c** from **3a-c**. Different bases were also added to the standard procedure to eliminate the acidity of the bromoform generated. Imidazole was favoured over DIPEA, pyridine, K₂CO₃ and DMAP, which produced lower yields of bromo derivatives. Similarly as for **7a**, compounds **7b** and **7c** were obtained from **6b** and **6c** after hydrolysis. An oxidation of the alcohol **7a** with Jones reagent was performed to afford the acid **8**. This later was then reduced with NaBH₄ and esterified to provide **9** and **10**, respectively.

Starting from compound **2**, the pyridinyl group was added on the steroid nucleus with the standard C16 β -functionalization procedure. The bromination was thereafter performed on the intermediate to afford the final compound **11**. An oxidation using *m*-CPBA afforded the pyridine-N-oxide derivative **12**. The same strategy (C16-functionalization followed by bromination) afforded **13**. A slight modification in the aldolization procedure was managed to afford the nitrile derivative **15**. Instead of using potassium hydroxide as the deprotonating agent, we opted for

sodium hydroxide, which is a milder nucleophile and is less likely to hydrolyse the nitrile. The reaction was also run in a lower temperature to avoid this side reaction. The enol intermediate **14** obtained from **2** was carried forward with the two general procedures of reduction and bromination.



Scheme 1: Synthesis of compounds **5**, **7a-c**, **8-10**. Reagents and conditions: (a) KOH, EtOH, reflux, (i) 3-[[[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]methyl]-benzaldehyde, (ii) 3-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-benzaldehyde or (iii) 3-formyl-*N*-tritylbenzenesulfonamide; (b) NaBH₄, MeOH, rt; (c) H₂, Pd/C (10 %), MeOH, rt; (d) acetone/ HCl (aq) (1:1); (e) PPh₃, CBr₄, imidazole, DCM, rt; (f) CrO₃, H₂SO₄, acetone, H₂O, 0°C; (g) NaBH₄, MeOH, rt; (h) TMSCHN₂, MeOH, rt;



Scheme 2: Synthesis of compounds **11-13** and **15**. Reagents and conditions: (a) KOH, EtOH, reflux, (i) 3-pyridinecarboxaldehyde, (ii) 3,4,5-trimethoxy-benzaldehyde; (b) NaBH₄, MeOH, rt; (c) H₂, Pd/C (10 %), MeOH, rt; (d) PPh₃, CBr₄, imidazole, DCM, rt; (e) *m*-CPBA; (f) 3-cyanobenzaldehyde, NaOH, EtOH, rt.

Compound **16** was obtained from a Schotten-Baumann acylation (Scheme 3). The first step is a chlorination of the carboxylic acid derivative **9** followed by the addition of thiazolamine. A synthesis starting from **9** and involving HBTU as activating agent was firstly attempted and demonstrated a good efficiency regarding the activation step. However, because bromide is a good leaving group, we only observed the substitution in C3 with the thiazolamine. Compound **23** was promising because it is a PBRM analog with a methylene spacer that could interact more efficiently with Asn-152. This compound was obtained via our standard C16 β -functionalization of compound **2** followed by a bromination of the C3-side chain. The building block (compound **22**) that was added to the steroid nucleus was previously synthesized from isophthalaldehyde (**17**) in 5 steps. Instead of performing a selective reduction of a bis-aldehyde, we opted for a selective protection. A mono-ketalization was first performed using the procedure reported by Zhang et al²⁹ and the remaining formyl group was reduced into **19**. This alcohol was then brominated to give **20** before to be substituted by a nitrile to give **21**. For the cyanidation, a phase transfer reaction using a mixture of an organic solvent and water³⁰ was preferred over a procedure using only a solvent like ethanol. Compounds **25a-c** were designed to be close analogs of **7b**, one of the best inhibitor synthesized in series 1. In fact, modifying the orientation of the hydroxyl group or

3.2 Biology

All final compounds had their 17 β -HSD1 inhibitory activity evaluated *in vitro*. Those enzymatic assays were carried out in T-47D intact cells, a human breast cancer cell line expressing 17 β -HSD1 and transforming efficiently E1 into E2. The inhibition percentages of the first series of compounds (Figure 3) show clearly that none of these PBRM analogs occurs to be a better inhibitor than PBRM or the two other inhibitors used as references. At both concentrations tested, compounds **5**, **7a**, **7b**, **7c**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13** and **15** showed a lower inhibitory potency than PBRM. With those data we were able to discriminate either Asn-152 or Leu-95 has to be targeted to obtain a better inhibition. It is clear that compounds promoting a polar binding via a hydrogen bond (such as series 1) are more likely to form a better inhibitor than those of the series 2. According to those results, the best inhibitors are compounds **7b**, **8**, **9** and **12**.

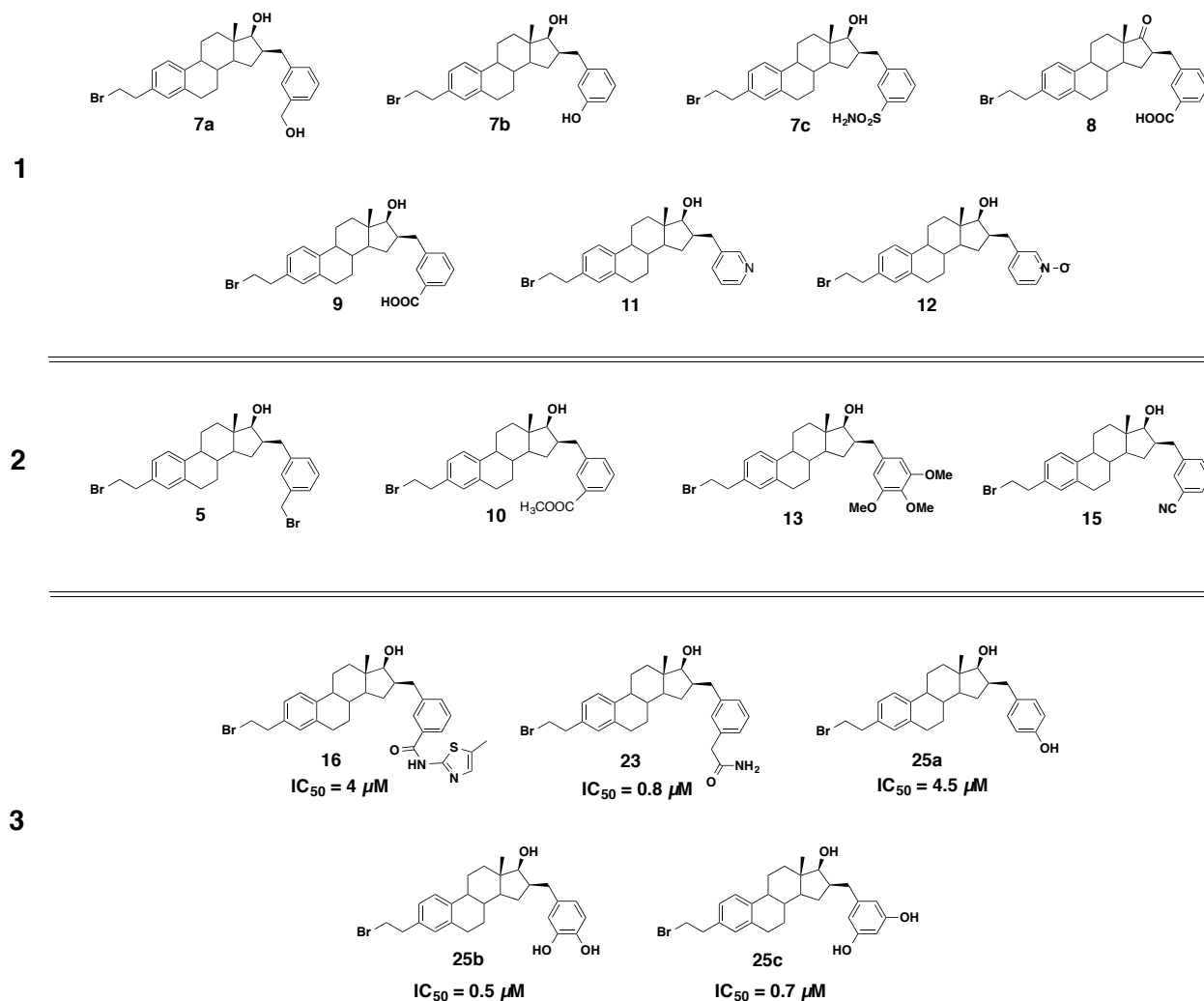


Figure 2 : Representation of the estrane derivatives forming three series of potential 17 β -HSD1 inhibitors. 1) Molecules targeting Asn-152 (aiming for a polar binding with the enzyme), 2) Molecules targeting Leu-95 (aiming for an apolar binding with the enzyme) and 3) Molecules targeting Asn-152 (aiming for a polar binding with the enzyme).

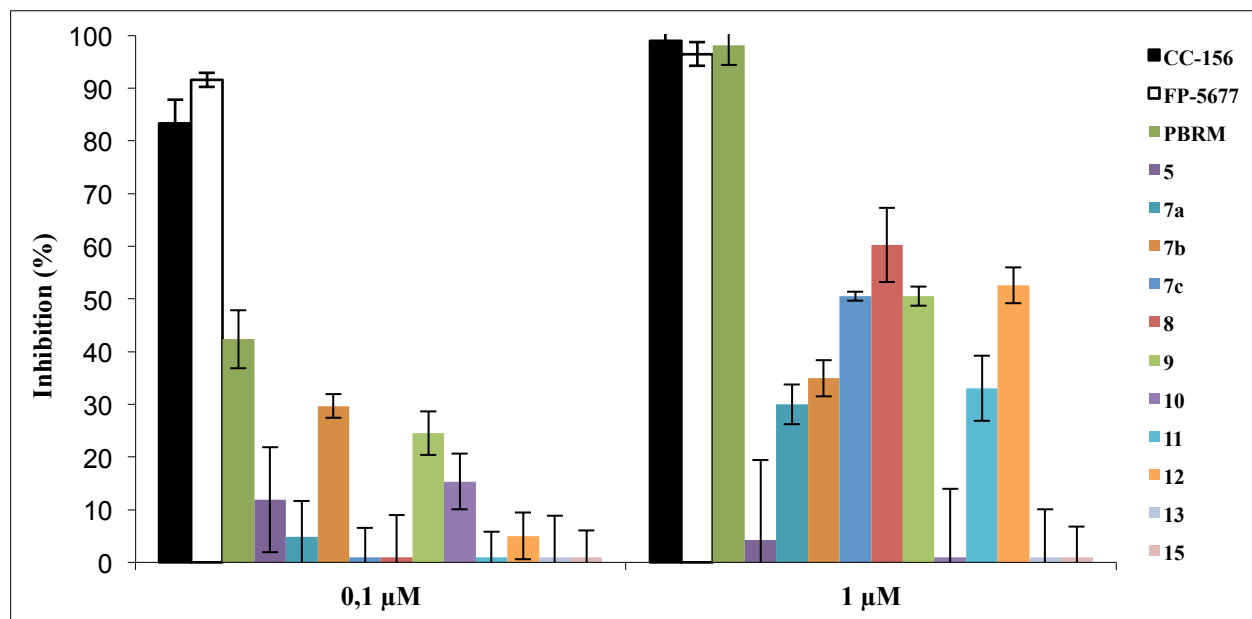


Figure 3 17 β -HSD1 inhibition percentages of compounds of series 1 and 2 in T-47D cells. Inhibition values were determined for the transformation of [14 C]-E1 (60 nM) into [14 C]-E2 by 17 β -HSD1 in T-47D intact cells incubated 24 h. The experiment was performed in triplicate (\pm SD). The inhibitors were tested at two concentrations of 0.1 and 1 μ M.

The inhibition percentages of the third series of compounds were reported in figure 4. Clearly, none of these PBRM analogs occurs to be a better inhibitor than PBRM or the two other reference inhibitors. Although compounds **16**, **23**, **25a**, **25b** and **25c** showed an improvement of the inhibitory activity in comparison with the compounds of the series 1 and 2, their inhibition percentages remain lower than those obtained with PBRM. Their IC_{50} values have been estimated and are presented in figure 2. According to those results, our best inhibitors are the dihydroxybenzyl derivatives **25b** and **25c** (IC_{50} = 0.5 and 0.7 μ M), which possess a better inhibition profile than the mono hydroxybenzyl derivative **25a** (IC_{50} = 4.5 μ M). Compound **23**,

with an acetamide group, showed also a good 17 β -HSD1 inhibition ($IC_{50} = 0.8 \mu\text{M}$). However, with an IC_{50} value of $0.07 \mu\text{M}$, PBRM remain our leading 17 β -HSD1 inhibitor.

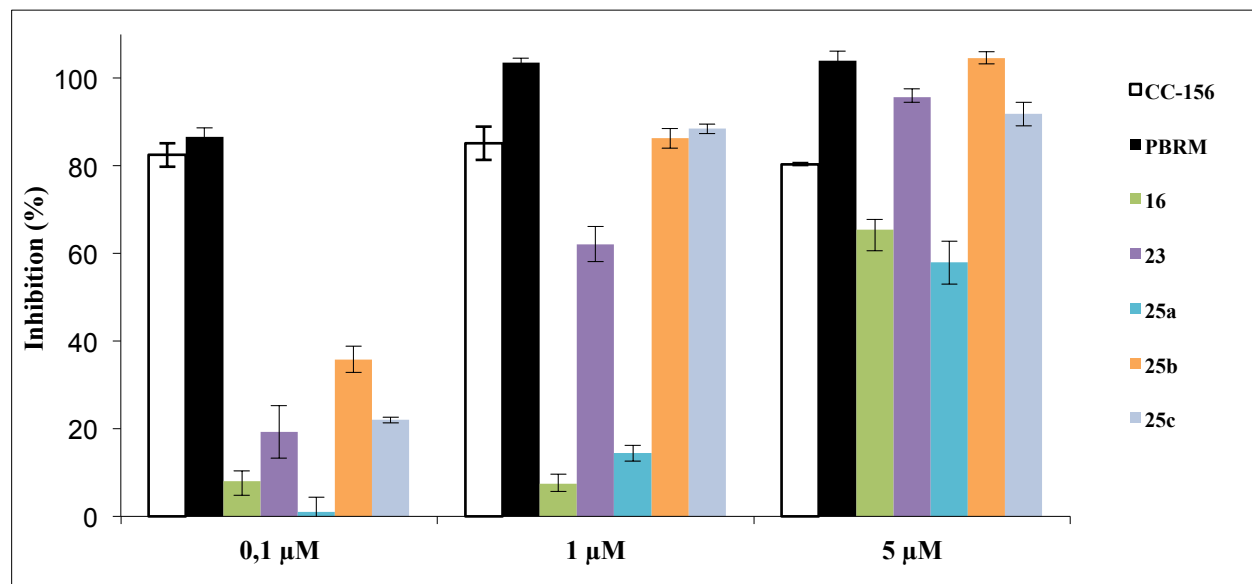


Figure 4 17 β -HSD1 inhibition percentages of compounds of series 3 in T-47D cells. Inhibition values were determined for the transformation of [^{14}C]-E1 (60 nM) into [^{14}C]-E2 by 17 β -HSD1 in 3000 T-47D intact cells incubated 24 h. The experiment was performed in triplicate (\pm SD). The inhibitors were tested at three concentrations of 0.1, 1 and 5 μM .

3.3 Conclusion

We have successfully synthesized three series of estrane derivatives, which differ from the potent 17 β -HSD1 inhibitor PBRM only by their C16-side chain. Unfortunately, they occur to have a poor inhibitory activity. In fact, we did not succeed in increasing the inhibitory activity of PBRM, our lead compound. On the other hand, it seems better to target Asn-152 instead of Leu-95. In fact, compounds with hydrophobic (apolar) C16 β -side chain are clearly weaker 17 β -HSD1 inhibitors than those with a side chain having a polar group, such hydroxyls. Molecular docking studies would be necessary in order to rationalize our inhibitory results and then to suggest the synthesis of new PBRM analogs.

Acknowledgements We thank Amorchem (Montréal, QC, Canada) and Mitacs (Montréal, QC, Canada) for their financial support. We appreciated the collaboration of Ms. Marie-Claude Trottier for NMR and LC-MS analyses.

4. References

1. Messinger, J.; Hirvela, L.; Husen, B.; Kangas, L.; Koskimies, P.; Pentikainen, O.; Saarenketo, P.; Thole, H., New inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Molecular and cellular endocrinology* **2006**, *248* (1-2), 192-8.
2. Cornel, K. M.; Kruitwagen, R. F.; Delvoux, B.; Visconti, L.; Van de Vijver, K. K.; Day, J. M.; Van Gorp, T.; Hermans, R. J.; Dunselman, G. A.; Romano, A., Overexpression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increases the exposure of endometrial cancer to 17beta-estradiol. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2012**, *97* (4), 591-601.
3. Miyoshi, Y.; Ando, A.; Shiba, E.; Taguchi, T.; Tamaki, Y.; Noguchi, S., Involvement of up-regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. *International journal of cancer* **2001**, *94* (5), 685-9.
4. Jansson, A., 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes and breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **2009**, *114* (1-2), 64-7.
5. Blomquist, C. H.; Bonenfant, M.; McGinley, D. M.; Posalaky, Z.; Lakatua, D. J.; Tuli-Puri, S.; Bealka, D. G.; Tremblay, Y., Androgenic and estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase in human ovarian epithelial tumors: evidence for the type 1, 2 and 5 isoforms. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **2002**, *81* (4-5), 343-51.
6. Smuc, T.; Hevir, N.; Ribic-Pucelj, M.; Husen, B.; Thole, H.; Rizner, T. L., Disturbed estrogen and progesterone action in ovarian endometriosis. *Molecular and cellular endocrinology* **2009**, *301* (1-2), 59-64.
7. Dizerega, G. S.; Barber, D. L.; Hodgen, G. D., Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression. *Fertility and sterility* **1980**, *33* (6), 649-53.
8. Salonemi, T.; Jarvensivu, P.; Koskimies, P.; Jokela, H.; Lamminen, T.; Ghaem-Maghani, S.; Dina, R.; Damdimopoulou, P.; Makela, S.; Perheentupa, A.; Kujari, H.; Brosens, J.; Poutanen, M., Novel hydroxysteroid (17beta) dehydrogenase 1 inhibitors reverse estrogen-induced endometrial hyperplasia in transgenic mice. *The American journal of pathology* **2010**, *176* (3), 1443-51.
9. Kasai, T.; Shozu, M.; Murakami, K.; Segawa, T.; Shinohara, K.; Nomura, K.; Inoue, M., Increased expression of type I 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase enhances in situ production of estradiol in uterine leiomyoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2004**, *89* (11), 5661-8.
10. Adamo, V.; Iorfida, M.; Montalto, E.; Festa, V.; Garipoli, C.; Scimone, A.; Zanghi, M.; Caristi, N., Overview and new strategies in metastatic breast cancer (MBC) for treatment of tamoxifen-resistant patients. *Annals of oncology* **2007**, *18 Suppl 6*, 53-7.
11. Miller, W. R.; Bartlett, J. M.; Canney, P.; Verrill, M., Hormonal therapy for postmenopausal breast cancer: the science of sequencing. *Breast cancer research and treatment* **2007**, *103* (2), 149-60.
12. Bush, N. J., Advances in hormonal therapy for breast cancer. *Seminars in oncology nursing* **2007**, *23* (1), 46-54.
13. Pasqualini, J. R., The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochimica et biophysica acta* **2004**, *1654* (2), 123-43.

14. Srungboonmee, K.; Songtawee, N.; Monnor, T.; Prachayasittikul, V.; Nantasenamat, C., Probing the origins of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitory activity via QSAR and molecular docking. *European journal of medicinal chemistry* **2015**, *96*, 231-7.
15. Bey, E.; Marchais-Oberwinkler, S.; Negri, M.; Kruchten, P.; Oster, A.; Klein, T.; Spadaro, A.; Werth, R.; Frotscher, M.; Birk, B.; Hartmann, R. W., New insights into the SAR and binding modes of bis(hydroxyphenyl)thiophenes and -benzenes: influence of additional substituents on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) inhibitory activity and selectivity. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52* (21), 6724-43.
16. Poirier, D., 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* **2010**, *20* (9), 1123-45.
17. Vinh, T. K.; Nicholls, P. J.; Kirby, A. J.; Simons, C., Evaluation of 7-hydroxy-flavones as inhibitors of oestrone and oestradiol biosynthesis. *Journal of enzyme inhibition* **2001**, *16* (5), 417-24.
18. Poirier, D., Inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Current medicinal chemistry* **2003**, *10* (6), 453-77.
19. Allan, G. M.; Vicker, N.; Lawrence, H. R.; Tutill, H. J.; Day, J. M.; Huchet, M.; Ferrandis, E.; Reed, M. J.; Purohit, A.; Potter, B. V., Novel inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: templates for design. *Bioorganic medicinal chemistry* **2008**, *16* (8), 4438-56.
20. Lawrence, H. R.; Vicker, N.; Allan, G. M.; Smith, A.; Mahon, M. F.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V., Novel and potent 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48* (8), 2759-62.
21. Brozic, P.; Kocbek, P.; Sova, M.; Kristl, J.; Martens, S.; Adamski, J.; Gobec, S.; Lanisnik Rizner, T., Flavonoids and cinnamic acid derivatives as inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Molecular and cellular endocrinology* **2009**, *301* (1-2), 229-34.
22. Laplante, Y.; Cadot, C.; Fournier, M. A.; Poirier, D., Estradiol and estrone C-16 derivatives as inhibitors of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: blocking of ER+ breast cancer cell proliferation induced by estrone. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16* (4), 1849-60.
23. Maltais, R.; Ayan, D.; Poirier, D., Crucial role of 3-bromoethyl in removing the estrogenic activity of 17beta-HSD1 Inhibitor 16beta-(m-carbamoylbenzyl)estradiol. *ACS medicinal chemistry letters* **2011**, *2* (9), 678-81.
24. Ayan, D.; Maltais, R.; Roy, J.; Poirier, D., A new nonestrogenic steroidal inhibitor of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I blocks the estrogen-dependent breast cancer tumor growth induced by estrone. *Molecular cancer therapeutics* **2012**, *11* (10), 2096-104.
25. Maltais, R.; Ayan, D.; Trottier, A.; Barbeau, X.; Lague, P.; Bouchard, J. E.; Poirier, D., Discovery of a non-estrogenic irreversible inhibitor of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from 3-substituted-16 beta-(m-carbamoylbenzyl)-estradiol derivatives. *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57* (1), 204-22.
26. Mazumdar, M.; Fournier, D.; Zhu, D. W.; Cadot, C.; Poirier, D.; Lin, S. X., Binary and ternary crystal structure analyses of a novel inhibitor with 17beta-HSD type 1: a lead compound for breast cancer therapy. *The Biochemical journal* **2009**, *424* (3), 357-66.

27. Bernady, K. F.; Floyd, M. B.; Poletto, J. F.; Weiss, M. J., Prostaglandins and congeners. 20. synthesis of prostaglandins via conjugate addition of lithium trans-1-alkenyltrialkylalanate reagents - novel reagents for Conjugate 1,4-Additions. *Journal of organic chemistry* **1979**, *44* (9), 1438-47.
28. Behloul, C.; Guijarro, D.; Yus, M., Detritylation of N-tritylamines via a naphthalene-catalyzed lithiation process. *Synthesis-stuttgart* **2004**, (8), 1274-80.
29. Zhang, L.; Whitfield, W. A.; Zhu, L., Unimolecular binary half-adders with orthogonal chemical inputs. *Chemical communications* **2008**, (16), 1880-2.
30. Edwards, P.; Large, M.; Imperial chemical industries plc, (*Substituted aralkyl*) heterocyclic compounds, United States, US4935437, **1990**.

Chapitre 2

Résumé

L'enzyme 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 (17 β -HSD1) représente une cible thérapeutique importante puisqu'elle joue un rôle pivot dans la progression de maladies sensibles aux estrogènes, tel que le cancer du sein et l'endométriose. Cette enzyme est responsable de la dernière étape de la biosynthèse du plus puissant estrogène, l'estradiol (E2). Puisque son inhibition permettrait d'entraver la croissance des tumeurs sensibles aux estrogènes, nous étions intéressés par le développement d'un inhibiteur de l'enzyme 17 β -HSD1. Basé sur une étude de modélisation moléculaire, nous avons identifié deux dérivés époxydés en C3 du noyau estrane qui pourraient lier compétitivement et irréversiblement l'enzyme. Ces composés stéroïdiens ont été synthétisés en utilisant une route efficace et leur activité inhibitrice a été évaluée par un essai enzymatique. Le premier inhibiteur, le composé **15**, était plus propice à former une liaison avec le site catalytique. Il a provoqué une inhibition intéressante quoique plutôt faible avec une valeur IC₅₀ de 1.3 μ M. Malheureusement, l'inhibition obtenue avec le deuxième composé, soit l'époxyde **11**, était encore plus faible et sa valeur IC₅₀ n'a pu être déterminée. Lorsque testé sur les cellules T-47D sensibles aux estrogènes, les composés **11** et **15** étaient faiblement estrogéniques, mais beaucoup moins que l'estradiol.

Synthesis of C3-Epoxy-estrane Derivatives Targeted by Molecular Modeling as Competitive Inhibitors of 17 β -HSD1

Maxime Lespérance,¹ Xavier Barbeau,² Jenny Roy¹ and Donald Poirier¹

¹Laboratory of Medicinal Chemistry, Oncology and Nephrology Unit, CHU de Québec – Research Center (CHUL, T4) and Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, Québec G1V4G2, Canada

²Département de Chimie, Institut de Biologie Intégrative et Des Systèmes (IBIS), and Centre de Recherche sur la Fonction, la Structure et l'Ingénierie des Protéines (PROTEO), Laval University, Quebec City, Québec G1V4G2, Canada

Abstract: 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) represents a promising target since it is known to play a pivotal role in the progression of estrogen-dependent diseases like breast cancer and endometriosis. This enzyme is responsible for the last step in the biosynthesis of the most potent estrogen, estradiol (E2). Its inhibition would prevent the growth of estrogen-sensitive tumors. Based on molecular modeling (docking) experiments, we identified two promising C3 epoxy-estrane derivatives that would bind competitively and irreversibly the enzymatic catalytic site. They have been synthesized in a short and efficient route and their inhibitions over 17 β -HSD1 have been determined by an enzymatic assay. Compound **15** was more likely to bind the catalytic site and showed an interesting, but quite weak, inhibitory activity with a IC_{50} value of 1.3 μ M (for the transformation of estrone (60 nM) into E2 in T-47D cells). Compound **11** produced a lower inhibition rate and the IC_{50} value cannot be determined. Both compounds were also slightly estrogenic when tested in estrogen-sensitive T-47D cells, although much less than the estrogenic hormone E2.

1. Introduction

The development and differentiation of hormone-sensitive tissues are directly regulated by sexual steroids before menopause. Estrogen-sensitive breast and endometrial tissues are stimulated by the estrogen estradiol (E2) synthesized in the granulosa cells of the ovaries. E2 is known as the most potent estrogen in the human body. Beside his physiological effects, it is also involved in the apparition and progression of estrogen-dependent diseases (EDDs).

The enzyme 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) drives the reduction of estrone (E1) into E2.^{1,2} For this reason the inhibition of this enzyme seems a promising avenue to treat the EDDs. In fact, some work has been done in the past to inhibit this key enzyme³ and many compounds have been synthesized and shown interesting inhibitory activities.⁴⁻⁶ As example, compound CC-156 was synthesized by our research group and was reported as a very potent reversible 17 β -HSD1 inhibitor.⁷ Regarding less of its inhibiting activity, this compound has demonstrated some estrogenic effects, which has been eliminated with the outcome of the inhibitor PBRM.⁸⁻¹⁰ This steroid derivative occurs to be the first irreversible non-estrogenic steroidal inhibitor of 17 β -HSD1. However the enzymatic assay demonstrated a lower affinity for the enzyme compare to the precursor CC-156. Hence, the design of a new generation of PBRM related analogs, that would have an optimal binding for the enzyme catalytic site, is crucial.

Molecular docking is a relevant method, which anticipates the favoured orientation of a substrate against the receptor to make a stable complex. The main objective of molecular docking is to computationally simulate the molecular identification process and accomplish an optimized conformation so that the free energy of the overall system is minimized. It has been used in multiple works to either target promising compounds¹¹⁻¹⁴ or as a support to rationalize the biological results.^{10, 13, 14} In our case, a docking study with 17 β -HSD1 has established a potential greater affinity for the two steroid derivatives represented by compounds **11** and **15** (Figure 1). Both compounds possess an epoxide group, which is expected to alkylate 17 β -HSD1 by the formation of a covalent bond. In order to provide additional structure-activity relationships (SARs), compounds **4**, **5**, **7** and **8** have also been included in our study.

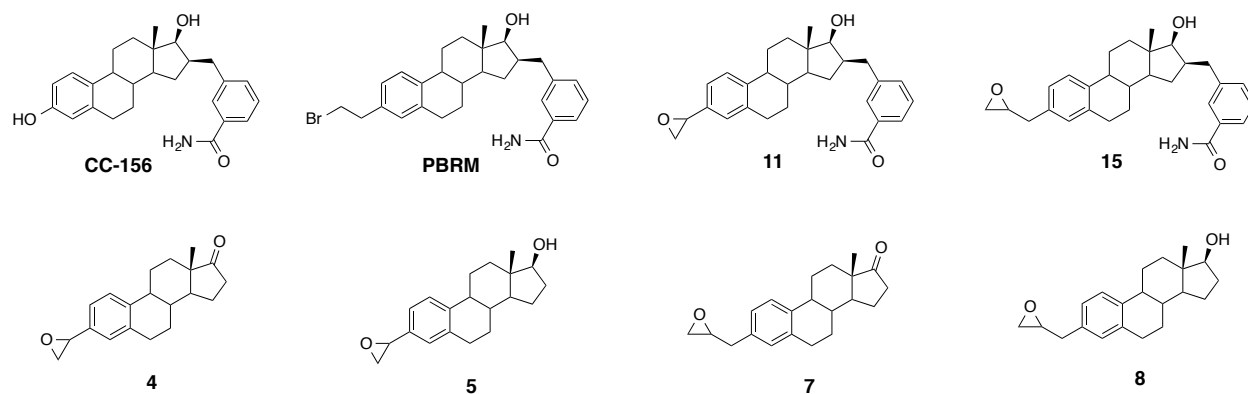


Figure 1 : Structures of known 17 β -HSD1 inhibitors CC-156 and PBRM as well as those targeted as potential inhibitors of enzyme 17 β -HSD1.

2. Experimental

2.4 General

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). The usual solvents were obtained from Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada) and were used as received. Anhydrous acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), dimethylformamide (DMF) and tetrahydrofuran (THF) were obtained from Sigma-Aldrich. Thin-layer chromatography (TLC) and flash-column chromatography were performed on 0.20-mm silica gel 60 F254 plates (E. Merck; Darmstadt, Germany) and with 230-400 mesh ASTM silica gel 60 (Silicycle, Québec, QC, Canada), respectively. Microwave experiments were conducted on a Biotage Initiator microwave instrument (Charlotte, NC, USA). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at 400 MHz for ^1H and 100.6 MHz for ^{13}C on a Bruker Avance 400 digital spectrometer (Billerica, MA, USA). The chemical shifts (δ) were expressed in ppm and referenced to chloroform (7.26 and 77.0 ppm), acetone (2.06 and 29.2 ppm) or methanol (MeOH) (3.31 and 49.0 ppm) for ^1H and ^{13}C NMR, respectively. Low-resolution mass spectra (LRMS) were recorded on a Shimadzu Prominence apparatus (Kyoto, Japan) equipped with a LCMS-2020 mass spectrometer (APCI probe). The purity of final compounds to be tested was determined with a Shimadzu HPLC apparatus equipped with SPD-M20A photodiode array detector, a Setima HPC18 reversed-phase column (250 mm x 4.6 mm) and a solvent gradient of MeOH: water. The

wavelength of the UV detector was 190 nm.

2.5 Docking

Docking simulations were performed using MOE 2015 and the docking protocol was previously described.¹⁰ The crystal structure coordinates of 17 β -HSD1 complexed with inhibitor CC-156 and/or cofactor NADP, were taken from PDB ID 3HB5.¹⁵ Solvent was removed and the protein complex was prepared using the LigX tool, included in MOE, to adjust H and to minimize the energy of the system. His221 was mutated to Ala and Glu282 were moved with the *rotamer explorer* tool to increase their exposition to the solvent. Docking simulations were performed using the *rigid receptor* protocol and default parameters. Validation of the docking protocol was carried out by a self-docking of CC-156, leading to an RMSD of 0.41 Å between the docked and the crystallographic structures. Because all compounds (Figure 1) share their core structure with CC-156, no further optimization of the docking protocol was considered. All compounds were built in MOE based on compound CC-156, hydrogens were readjusted and molecules were energy-minimized prior to docking using the same protocol as for compound CC-156.

2.6 Chemistry

Synthesis of **2** from estrone (**1**)

In an anhydrous round bottom flask was introduced a solution of estrone (20.0 g, 74 mmol) in DCM (1.6 L). The solution was brought to 0°C under argon atmosphere and trimethylamine (TEA) (30.0 mL, 222 mmol) and triflic anhydride (14.9 mL, 88.8 mmol) were added dropwise. The mixture was stirred under argon at 0°C for 1 h, then poured into water and extracted with DCM. The organic phase was filtrated on a biotage phase separator and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by flash chromatography with hexanes/EtOAc (8:2) to afford 29.0 g (99 %) of 3-(trifluoromethanesulfonate)estra-1(10),2,4-trien-17-one (**2**). NMR data are identical to those found in the literature.¹⁶

Synthesis of **4** from **2**

The vinyl derivative **3** was prepared from **2** as previously reported by Yasu et al.¹⁷ in 58 % yield after chromatography with hexanes/EtOAc (8:2). This compound was next treated with Oxone as previously reported by Maltais et al.¹⁰ to give **4** in 67 % yield after chromatography with hexanes/EtOAc (8:2) and 0.5 % TEA. NMR data agree with those reported by us.¹⁰ HPLC purity of 99.9 % (retention time = 13.2 min).

Synthesis of **5** from **4**

To a solution of **4** (28 mg, 0.09 mmol) in MeOH (5 mL) was added NaBH₄ (11 mg, 0.29 mmol). The mixture was stirred at 0°C for 30 min, then evaporated under reduced pressure, poured into water and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography with hexanes/EtOAc (8:2) to yield 19.8 mg (70 %) of 3-((17β)-3-(oxiran-2-yl)-17-hydroxyestra-1(10),2,4-triene (**5**). ¹H NMR (acetone-d₆) δ 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1-CH), 7.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 2-CH), 6.98 (s, 4-CH), 3.78 (dd, *J*₁ = 3.9 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, CHOCH₂), 3.68 (m, 17α-CH), 3.62 (d, *J* = 5.1 Hz, 17β-OH), 3.06 (dd, *J*₁ = 5.6 Hz, *J*₂ = 4.1 Hz, 1H of CH₂OCH), 2.84 – 2.81 (m, 6-CH₂), 2.75 (m, 1H of CH₂OCH), 2.38 – 2.30 (m, 11α-CH), 2.21 (td, *J*₁ = 11.8 Hz, *J*₂ = 4.0 Hz, 9-CH), 2.04 – 1.98 (m, 12β-CH), 1.95 – 1.90 (m, 7β-CH), 1.72 – 1.64 (m, 15α-CH), 1.50–1.17 (residual CH and CH₂), 0.78 (s, 18-CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 139.08, 137.11, 134.83, 123.70, 122.90, 121.61, 81.23, 53.86, 52.26, 47.14, 45.47, 43.51, 36.72, 34.65, 31.11, 30.39, 28.21, 27.65, 23.15, 15.03. LRMS for C₂₀H₂₅O₁ [M + H – H₂O]⁺ = 281.3. HPLC purity of 96.7 % (retention time = 14.4 min).

Synthesis of **6** from **2**

In a microwave biotage vial (2-5 mL) were added **2** (376 mg, 0.9 mmol), 2-propenylboronic acid pinacol ester (872 μL, 4.7 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (68 mg, 0.09 mmol), K₃PO₄ (988 mg, 4.7 mmol) and DMF (4 mL). The reaction mixture was sealed and stirred at 120°C for 50 min under microwave radiation. The mixture was then neutralized by addition of aqueous NaHCO₃ solution and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography

with hexanes/EtOAc (8:2) to afford 143 mg (52 %) of 3-allylestra-1(10),2,4-trien-17-one (**6**). ^1H NMR (acetone- d_6) δ 7.22 (d, $J = 7.9$ Hz, 1-CH), 6.96 (d, $J = 8.0$ Hz, 2-CH), 6.91 (s, CH-4), 5.95 (m, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.12 – 4.98 (m, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 3.31 (d, $J = 6.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 2.94 – 2.83 (m, 6- CH_2), 2.51 – 2.38 (m, 16 β -CH and 11 α -CH), 2.35 – 2.18 (m, 9-CH), 2.14 – 2.07 (m, 16 α CH and 12 β -CH), 1.93 – 1.77 (m, 7 β -CH and 15 α -CH), 1.73 – 1.37 (m, residual CH and CH_2), 1.31 – 1.04 (m, 14-CH and 15 β -CH), 0.91 (s, 18- CH_3). ^{13}C NMR (100.6 MHz, acetone- d_6) δ 219.5, 139.2, 139.0, 138.1, 137.3, 129.8, 126.7, 126.2, 115.6, 51.2, 48.4, 45.1, 40.3, 38.0, 32.6, 32.4, 30.4, 27.0, 26.3, 21.9, 14.1

Synthesis of **7** from **6**

To a solution of **6** (130 mg, 0.44 mmol) in a mixture of acetone and ACN (1:2) (93 mL) was added a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (62 mL) and Oxone (324 mg, 0.53 mmol). The solution was stirred at room temperature until it cannot process any further (3 h). The solvent was then evaporated under reduced pressure. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to afford **7** in 37 % as evaluated by ^1H NMR. The mixture of **6** and **7** was then treated to completion using the same conditions reported above. The solvent was then evaporated and the mixture purified by flash chromatography with hexanes/EtOAc (9:1) to yield 35 mg (26 %) of 3-(oxiran-2-ylmethyl)estra-1(10),2,4-trien-17-one (**7**). ^1H NMR (acetone- d_6) δ 7.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 1-CH), 7.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 2-CH), 7.00 (s, 4-CH), 3.09 – 3.03 (m, CHOCH_2), 2.91-2.86 (m, 6- CH_2), 2.74 (dd, $J_1 = 5.6\text{Hz}$, $J_2 = 3.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CHOCH}_2$), 2.70 (dd, $J_1 = 5.2$ Hz, $J_2 = 3.9$ Hz, 1H of CHOCH_2), 2.49 – 2.43 (m, 16 β -CH), 2.42 (dd, $J_1 = 4.9$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, 11 α -CH), 2.33 – 2.24 (m, 9-CH), 2.10 – 2.02 (m, 16 α -CH and 12 β -CH), 1.89 – 1.86 (m, 7 β -CH), 1.70-1.40 (15 α -CH, 11 β -CH, 8 β -CH, 12 α -CH, 7 α -CH, 14 α -CH, 14 α -CH and 15 β -CH), 0.91 (s, 18- CH_3). ^{13}C NMR (100.6 MHz, acetone- d_6) δ 219.94, 142.08, 138.75, 136.82, 130.47, 129.15, 126.26, 51.91, 50.24, 48.99, 46.94, 45.47, 41.93, 37.21, 36.72, 31.54, 30.40, 28.22, 27.44, 22.60, 16.88. LRMS for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 311.2$. HPLC purity as a mixture of two isomers: 97.3 % (retention time = 13.6 and 14.4 min, respectively).

Synthesis of **8** from **7**

To a solution of **7** (35 mg, 0.11 mmol) in MeOH (6 mL) was added NaBH₄ (64 mg, 1.69 mmol). The mixture was stirred at 0°C for 30 min, then evaporated under reduced pressure, poured into water and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography with hexanes/EtOAc (8:2) yielded 31 mg (92 %) of 3-{(17β)-3-(oxiran-2-ylmethyl)-17-hydroxyestra-1(10),2,4-triene. (**8**) ¹H NMR (acetone-d₆) δ 7.26 (d, *J* = 7.0 Hz, 1-CH), 7.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 2-CH), 6.99 (s, 4-CH), 3.68 (m, 17α-CH), 3.62 (d, *J* = 5.1 Hz, 17β-OH), 3.15 – 3.07 (m, CHOCH₂), 2.84 – 2.81 (m, 6-CH₂), 2.74 (dd, *J*₁ = 5.6 Hz, *J*₂ = 3.1 Hz, CH₂CHOCH₂), 2.70 (dd, *J*₁ = 5.2 Hz, *J*₂ = 3.9 Hz, 1H of CHOCH₂), 2.38 – 2.30 (m, 11α-CH), 2.21 (td, *J*₁ = 11.8 Hz, *J*₂ = 4.0 Hz, 9-CH), 2.04 – 1.98 (m, 12β-CH), 1.95 – 1.90 (m, 7β-CH), 1.72 – 1.64 (m, 15α-CH), 1.50–1.17 (residual CH and CH₂), 0.90 (s, 18-CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 139.35, 137.34, 135.65, 130.30, 127.11, 126.21, 81.79, 52.89, 51.04, 46.82, 45.24, 44.04, 39.78, 39.10, 37.77, 31.34, 31.02, 28.07, 27.04, 23.80, 11.61. LRMS for C₂₁H₂₇O₂ [M + H – H₂O]⁺ = 295.2. HPLC purity as a mixt of two isomers: 92 % (retention time = 24.3 and 24.8 min respectively).

Synthesis of **10** from **9**

To a solution of **9**¹⁰ (100 mg, 0.2 mmol) in DMSO (20 mL, 0.01M) was added tetrabutyl ammonium fluoride hydrate (TBAF) (265 mg, 1.01 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 4 h, then quenched with water and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude compound was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (96:4) to afford 73.5 mg (88 %) of (3-{[(16β,17β)-17-hydroxy- 3-ethenylestra-1(10),2,4-trien-16-yl]methyl} benzamide) (**10**). ¹H NMR (acetone-d₆) δ 7.84 (s, 2''-CH), 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 4''-CH), 7.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 6''-CH), 7.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 5''-CH), 7.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 1-CH), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2-CH), 7.12 (s, 4-CH), 6.67 (dd, *J*₁ = 17.7 Hz, *J*₂ = 10.9 Hz, CH=CH₂), 5.76 – 5.62 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H of CH₂=CH), 5.14 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H of CH₂=CH), 3.87 (d, *J* = 9.3 Hz, 17α-CH), 3.22 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H of 1'-CH₂), 2.81 (m, 6-CH₂), 2.50 – 2.41 (m, 1H of 1'-CH₂ and 16β-CH), 2.38 – 2.29 (m, 11α-CH), 2.23 (td, *J*₁ = 11.5 Hz, *J*₂ = 3.9 Hz, 9-CH), 1.98 (dd, *J*₁ = 22.7 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz, 12β-CH), 1.86 – 1.78 (m, 7β-CH), 1.69 (t, *J* = 6.9 Hz, 15α-CH), 1.55 – 1.39 (m, 11β-CH and 8β-CH),

1.37 – 1.24 (m, 12 α -CH and 7 α -CH), 1.18 – 1.12 (m, 14-CH and 15 β -CH), 0.91 (s, 18-CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 144.02, 141.11, 137.76, 137.54, 135.69, 135.66, 132.56, 128.89, 127.62, 126.34, 125.57, 124.21, 112.93, 82.01, 49.56, 45.43, 43.09, 39.11, 38.59, 32.78, 30.44, 30.15, 29.84, 29.58, 28.21, 26.93, 13.22.

Synthesis of **11** from **10**

To a solution of **10** (30 mg, 0.07 mmol) in a mixture of acetone and ACN (1:2) (21.6 mL) was added a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (14.4 mL) and oxone (54 mg, 0.09 mmol). The solution was stirred at 0°C until it cannot process any further (4 h). The solvent was then evaporated under reduced pressure. The mixture was dissolved into EtOAc and water and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford **11** in 54 % as evaluated by ¹H NMR. The mixture of **10** and **11** was then treated using the same conditions reported above to obtain 92 % of completion (evaluated by ¹H NMR). Purification by flash chromatography with hexanes/acetone (4:6) and LCMS (condition: MeOH/H₂O (7:3), retention time = 13.4 min) yielded 12.2 mg (38 %) of (3-[[16 β ,17 β]-17-hydroxy-(oxiran-2-yl)estra-1(10),2,4-trien-16-yl] methyl} benzamide) (**11**). ¹H NMR (acetone-d₆) δ 7.83 (s, 2''-CH), 7.75 (d, J = 7.6 Hz, 4''-CH), 7.41 (d, J = 7.7 Hz, 6''-CH), 7.35 (t, J = 7.5 Hz, 5''-CH), 7.28 (d, J = 8.1 Hz, 1-CH), 7.04 (d, J = 7.9 Hz, 2-CH), 6.97 (s, 4-CH), 6.55 (s broad, NH₂), 3.86 (d, J = 8.8 Hz, 17 α -CH), 3.78 (dd, J ₁ = 4.0 Hz, J ₂ = 2.6 Hz, CH₂OCH₂), 3.22 (d, J = 9.5 Hz, 1H of 1'-CH₂), 3.05 (dd, J ₁ = 5.6 Hz, J ₂ = 4.1 Hz, 1H of CH₂OCH), 2.89 (m, 6-CH₂), 2.75 (m, 1H of CH₂OCH), 2.50 – 2.41 (m, 1'-CH₂ and 16 α -CH), 2.37 (d, J = 3.5 Hz, 11 α -CH), 2.21 (m, 9-CH), 1.90 (d, J = 4.4 Hz, 12 β -CH), 1.82 (m, 7 β -CH), 1.69 (t, J = 7.1 Hz, 15 α -CH), 1.51 – 1.44 (m, 11 β -CH and 8 β -CH), 1.38 – 1.25 (m, 12 α -CH and 7 α -CH), 1.17 – 1.14 (m, 14-CH and 15 β -CH), 0.91 (s, 18-CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 154.23, 144.02, 132.62, 129.05, 128.92, 128.79, 127.92, 126.93, 126.26, 125.87, 125.57, 123.58, 115.01, 82.06, 71.06, 57.15, 52.33, 50.92, 49.62, 45.34, 45.15, 43.05, 41.87, 39.06, 38.56, 36.57, 32.82, 26.97. LRMS for C₂₈H₃₄NO₃ [M + H]⁺ = 432.3. HPLC purity of 96.4 % (retention time = 13.4 min).

Synthesis of **13** from **12**

To a solution of CC-156 (**12**)⁷ (2.67 g, 6.58 mmol) in DMF (20 mL) was added Cs₂CO₃ (5.36 g, 16.45 mmol), followed by 4-nitrophenyl trifluoromethanesulfonate (2.31 g, 8.55 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature 1 h, neutralized by addition of aqueous NaHCO₃ solution and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography hexanes/EtOAc (1:1) to afford 2.75 g (78 %) of (3-{[(16β,17β)-17-hydroxy-3-(trifluoromethanesulfonate)estra-1(10),2,4-trien-16-yl]methyl} benzamide) (**13**). ¹H NMR (MeO-d₄): δ 7.76 (s, 2''-CH), 7.71 (d, *J* = 7.5 Hz, 4''-CH), 7.43 (m, 6''-CH, 5''-CH and 1-CH), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 2-CH), 7.03 (s, 4-CH), 3.86 (d, *J* = 9.4 Hz, 17α-CH), 3.33 (s, 17β-OH), 3.16 (dd, *J* = 12.8 Hz, 1H of 1'-CH₂), 2.88 (m, 6-CH₂), 2.61-2.47 (m, 16α-CH, 1H of 1'-CH₂, and 11α-CH), 2.47 (m, 9-CH), 2.07 (d, *J* = 12.5 Hz, 12β-CH), 1.90-1.74 (m, 7β-CH), 1.69 (t, *J* = 7.5 Hz, 15α-CH), 1.66 (15α-CH, 11β-CH, 8β-CH, 12α-CH, 7α-CH, 14α-CH, 14α-CH and 15β-CH), 0.92 (s, 18-CH₃).

Synthesis of **14** from **13**

In a microwave biotage vial (0.5-2 mL) were added **13** (50 mg, 0.09 mmol), 2-propenylboronic acid pinacol ester (87 μL, 0.47 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (6.8 mg, 0.01), K₃PO₄ (99 mg, 0.47 mmol) and DMF (0.4 mL). The reaction mixture was sealed and stirred at 120°C for 50 min under microwave radiation. The mixture was then neutralized by addition of aqueous NaHCO₃ solution and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography with hexanes/acetone (7:3) to afford 25 mg (63 %) of (3-{[(16β,17β)-17-hydroxy-3-allylestra-1(10),2,4-trien-16-yl]methyl} benzamide) (**14**). ¹H NMR (acetone-d₆) δ 7.84 (s, 2''-CH), 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 4''-CH), 7.47 (s broad, 1H of NH₂), 7.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 6''-CH), 7.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 5''-CH), 7.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 1-CH), 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2-CH), 6.86 (s, 4-CH), 6.63 (s broad, 1H of NH₂), 5.94 (m, CH=CH₂), 5.12 – 4.96 (m, CH₂=CH), 3.86 (d, *J* = 9.3 Hz, 17α-CH), 3.29 (d, *J* = 6.8 Hz, CH₂CH=CH₂), 3.22 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H of 1'-CH), 2.79 (m, 6-CH₂), 2.56 – 2.40 (m, 1H of 1'-CH₂ and 16α-CH), 2.38 – 2.28 (m, 11α-CH), 2.21 (dd, *J*₁ = 14.4 Hz, *J*₂ = 7.3 Hz, 9-CH), 2.04 – 1.93 (m, 12β-CH), 1.85 – 1.75 (m, 7β-CH), 1.73 – 1.64 (m, 15α-CH), 1.55 – 1.38 (m, 11β-CH)

and 8 β -CH), 1.39 – 1.10 (m, 12 α -CH, 7 α -CH, 14-CH and 17 β -CH), 0.90 (d, J = 8.8 Hz, 18-CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 206.2, 139.0, 138.9, 137.8, 137.3, 135.2, 132.6, 128.9, 126.7, 126.2, 125.6, 115.5, 111.7, 82.1, 49.6, 45.3, 40.4, 38.6, 32.9, 32.5, 30.4, 29.8, 29.6, 29.3, 28.3, 27.0, 26.9, 21.9, 13.2.

Synthesis of **15** from **14**.

To a solution of **14** (25 mg, 0.06 mmol) in a mixture of acetone and ACN (1:2) (12.3 mL) was added a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (8.2 mL) and Oxone (72 mg, 0.12 mmol). The solution was stirred at 0°C until it cannot process any further. The solvent was then evaporated under reduced pressure. The mixture was dissolved into EtOAc and water and extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford **15** in 45 % as evaluated by ¹H NMR. The mixture of **14** and **15** was then treated using the same conditions reported above to obtain 75 % completion (evaluated by ¹H NMR). The mixture was next treated with NaBH₄ (28 mg, 0.74 mmol) in MeOH (5 mL) to reduce the 17-carbonyl formed by the use of oxone in excess. Purification by LCMS (condition: MeOH/H₂O (7:3), retention time = 13.6 min) yielded 19.8 mg (76 %) of (3-{[(16 β ,17 β)-17-hydroxy-(oxiran-2-ylmethyl)estra-1(10),2,4-trien-16-yl] methyl} benzamide) (**15**). ¹H NMR (acetone-d₆) δ 7.84 (s, 2''-CH), 7.75 (d, J = 7.6 Hz, 4''-CH), 7.42 (d, J = 7.5 Hz, 6''-CH), 7.36 (t, J = 7.5 Hz, 5''-CH), 7.23 (d, J = 8.0 Hz, 1-CH), 7.03 (d, J = 8.1 Hz, 2-CH), 6.96 (s, 4-CH), 6.55 (s broad, 1H of NH₂), 3.90 – 3.85 (m, 17 α -CH and 17 β -OH), 3.22 (d, J = 9.4 Hz, 1H of 1'-CH₂), 3.08 – 3.01 (m, CH₂OCH), 2.80 (d, 6-CH₂), 2.75 – 2.67 (m, 1H of CHOCH₂ and CH₂CHOCH₂), 2.52 – 2.41 (m, 16 α -CH, 1H of CHOCH₂ and 1H of 1'-CH₂), 2.34 (d, J = 13.4 Hz, 11 α -CH), 2.22 (t, J = 11.2 Hz, 9-CH), 1.99 (d, J = 4.4 Hz, 12 β -CH), 1.85 – 1.78 (m, 7 β -CH), 1.68 (d, J = 7.2 Hz, 15 α -CH), 1.52-1.44 (m, 11 β -CH and 8 β -CH), 1.39 – 1.24 (m, 12 α -CH and 7 α -CH), 1.18 – 1.13 (m, 14-CH and 15 β -CH), 0.92 (s, 18-CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, acetone-d₆) δ 144.04, 139.35, 137.32, 135.66, 135.26, 132.62, 130.28, 128.92, 128.78, 127.10, 126.18, 125.57, 82.10, 81.96, 52.88, 49.64, 46.83, 45.28, 45.19, 43.07, 39.18, 39.09, 38.65, 38.57, 32.84, 30.15, 28.23, 26.98, 13.18. LRMS for C₂₉H₃₆NO₃ [M + H]⁺ = 446.3. HPLC purity of 99.6 % (retention time = 13.6 min).

2.7 Biology

17 β -HSD1 inhibition assay

T-47D breast cancer cells were grown in RPMI medium supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2 nM), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 μ g/mL) and 17 β -estradiol (E2) (1 nM). The cells were seeded in a 24-well plate (3000 cells/well). T-47D cells were suspended in the RPMI medium supplemented with insulin (50 ng/mL). A 5 % (v/v) FBS treated with dextran-coated charcoal was used to remove the endogenous steroids. Stock solution of each compound to be tested was previously prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted with culture medium to achieve appropriate concentrations prior to use. After 24 h of incubation, a diluted solution was added to the cells to obtain the appropriate final concentration (0.1 or 1 μ M for screening and ranging from 1 nM to 5 μ M for IC₅₀ value determination). The final concentration of DMSO in the well was adjusted to 0.1 %. Additionally, a solution of [¹⁴C]-estrone (E1) (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, USA) was added to obtain a final concentration of 60 nM. Cells were incubated for 24 h, and each inhibitor was assessed in triplicate. After incubation, the culture medium was removed and labeled steroids ([¹⁴C]-E1 and [¹⁴C]-E2) were extracted with diethyl ether. The organic phase was evaporated to dryness with nitrogen. Residues were dissolved in DCM, dropped on silica gel thin layer chromatography plates (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA), and eluted with toluene/acetone (4:1) as solvent system. Substrate [¹⁴C]-E1 and metabolite [¹⁴C]-E2 were identified by comparison with reference steroids (E1 and E2) and quantified using the Storm 860 system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). The percentage of transformation and the percentage of inhibition were calculated as follows: % transformation = $100[\text{¹⁴C}]\text{-E2}/([\text{¹⁴C}]\text{-E1} + [\text{¹⁴C}]\text{-E2})$ and % of inhibition = $100(\% \text{ transformation without inhibitor} - \% \text{ transformation with inhibitor}) / \% \text{ transformation without inhibitor}$.

Cell proliferation assay (estrogenic activity)

Quantification of cell growth was determined using CellTiter 96[®] Aqueous Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Nepean, Ontario, Canada) following the manufacturer's instructions. T-47D cells were suspended in RPMI supplemented with insulin (50 ng/mL) and 5 % (v/v) dextran-coated charcoal to remove the remaining estrogen present in the serum and

medium. Aliquots (100 μ L) of the cell suspension were seeded in 96-well plates (3000 cells/well). After 48 h, the culture medium was changed to a new one containing the inhibitor or a reference compound, and it was replaced every 2 days. After 8 days of treatment, 20 μ L of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) solution was added to each well and the plate incubated at 37 $^{\circ}$ C for 4 h. The absorbance at 490 nm was then measured with a Thermo max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the cell growth expressed in percentage (%). The cell proliferation of control (only medium) was fixed as 100 %.

3. Results and Discussion

3.1 Docking

A previous study with 17 β -HSD1 inhibitor CC-156 leads to a better knowledge of its crystal structure in the enzyme catalytic site.¹⁵ Due to the high inhibitory effect of this drug, those data have therefore been used for a docking experiment. From this study, we targeted two estrane derivatives (compounds **11** and **15**), which we believed could strongly bind the catalytic site of 17 β -HSD1. Moreover, the C16-benzyl amide group was proven to be helpful to decrease the estrogenic activity of E2-based inhibitors.¹⁰ For this reason, we added the benzyl amide group in the design of the potential inhibitors **11** and **15**. Those targeted compounds possess also an epoxide functionality, which has the potential to generate a covalent bond with a reactive amino acid residue of 17 β -HSD1. This kind of chemical bonding would lead to an irreversible inhibition, such as the one obtained with the 2-bromoethyl group at position C3 of PBRM.

To get around the force field limitations that do not allow for a covalent reaction between the epoxide moiety and His-221 residue, this latter amino acid was mutated into an alanine, which has a smaller residue (methyl instead of an imidazolyl group). The docking of CC-156, PBRM, **15**-(R), **15**-(S), **11**-(R) and **11**-(S) showed a similar general orientation of the structure of CC-156 (Figure 2). The RMSD between the four steroidal rings of CC-156 and the docked compounds PBRM, **15**-(R), **15**-(S), **11**-(R) and **11**-(S) are 0.22, 0.21, 0.29, 0.23, 0.27 and 0.32 \AA ,

respectively. The distances between the NH of the reconstituted His-221 side chain and the reactive CH₂ of the epoxide are 1.8, 1.1, 1.2 and 2.1 Å for **15**-(R), **15**-(S), **11**-(R) and **11**-(S), respectively. Except for compound **11**-(S), which is not oriented for a nucleophilic attack, the proximity to His221 suggests the possibility of a covalent reaction. These results demonstrate that without the conformational limitations of His-221 and Glu-282, the epoxide moieties of compounds **11** and **15** are well positioned in the enzyme pocket with respect to the crystal structure of CC-156, and at proximity of His 221, to potentially form a covalent bond.

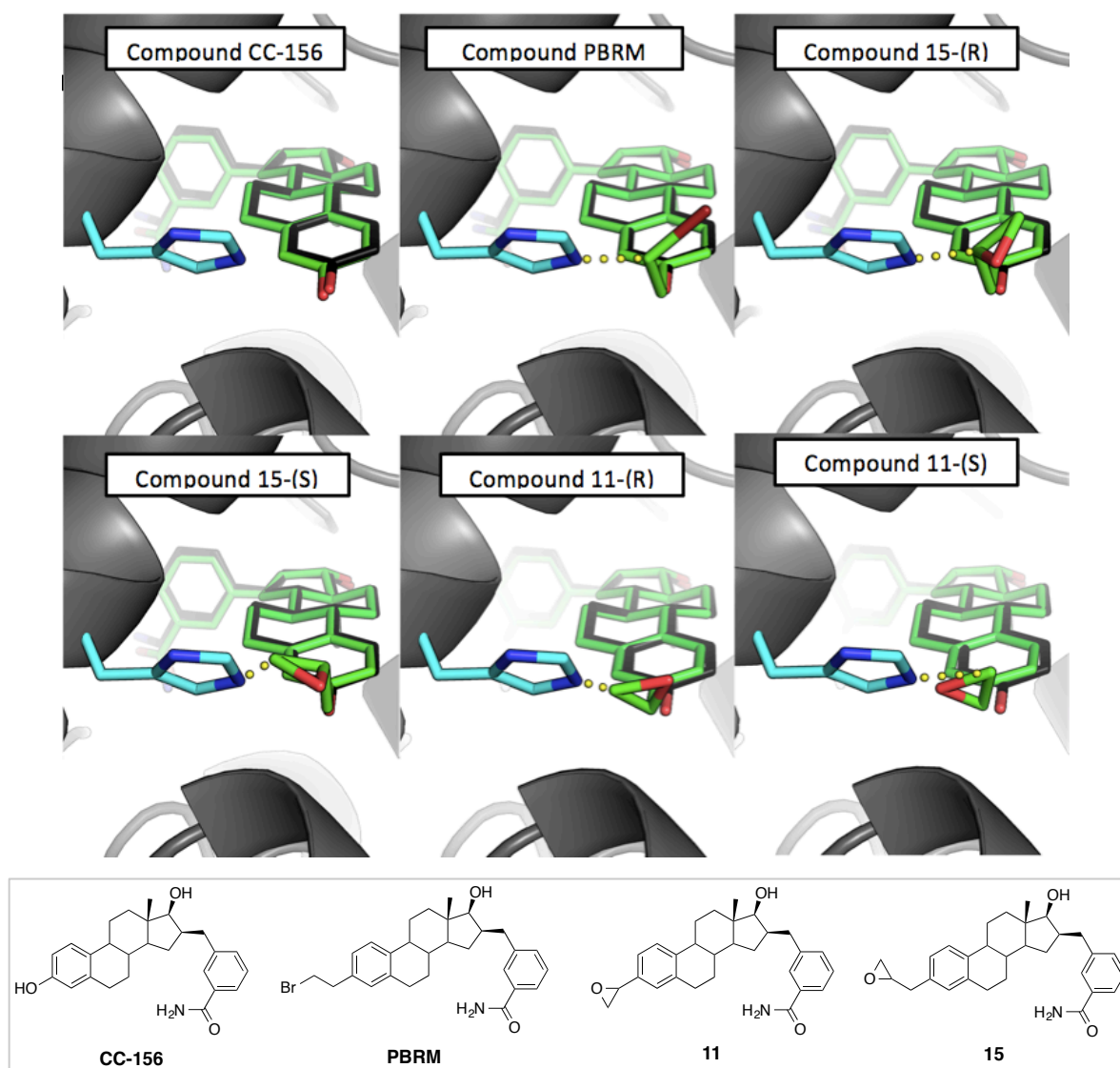


Figure 2 : Docking results of compounds CC-156, PBRM, **15**-(R), **15**-(S), **11**-(R) and **11**-(S) (green sticks). 17 β -HSD1 is in gray cartoon. His221 is in cyan sticks. Crystal structure of CC-156 is show as reference in black sticks.

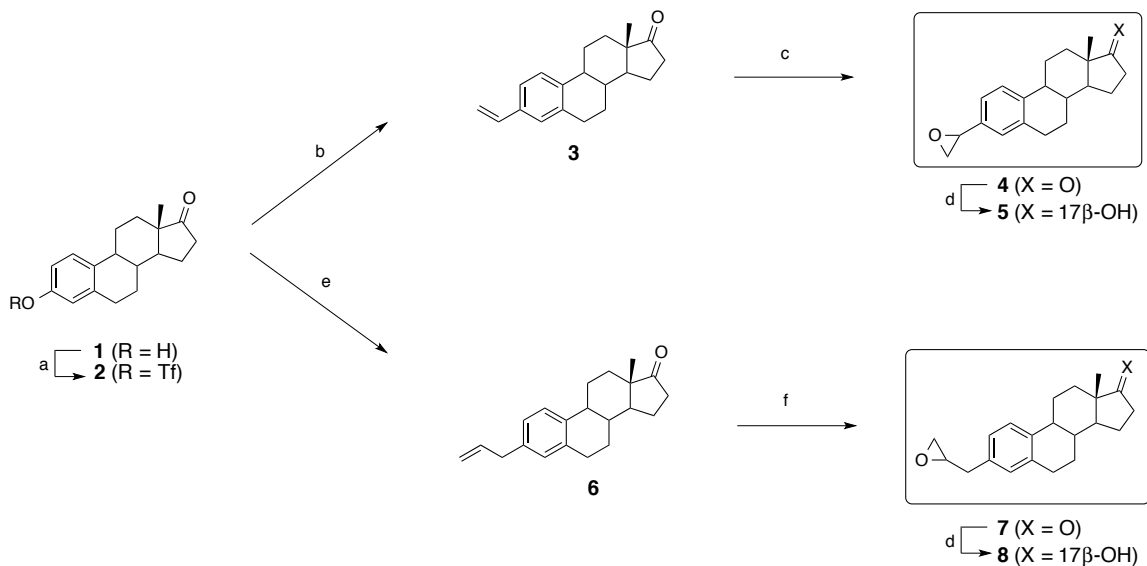
3.2 Chemistry

In addition to the synthesis of compounds **11** and **15**, which were suggested by the docking study, we synthesized the epoxide analogs without a 16 β -benzylamide side chain (compounds **4**, **5**, **7** and **8**). Their short synthetic routes were reported in Figure 3 and involved the activation of the C3 hydroxyl group of E1 in the triflate derivative **2**. This later was then submitted to the conditions of a Suzuki coupling reaction to give the vinyl and allyl derivatives **3** and **6**. These olefins were next treated with Oxone to afford the corresponding oxiranes **4** and **7**. Reduction of the C17 ketone of **4** and **7** was performed with sodium borohydrate (NaBH₄) to form the alcohols **5** and **8**.

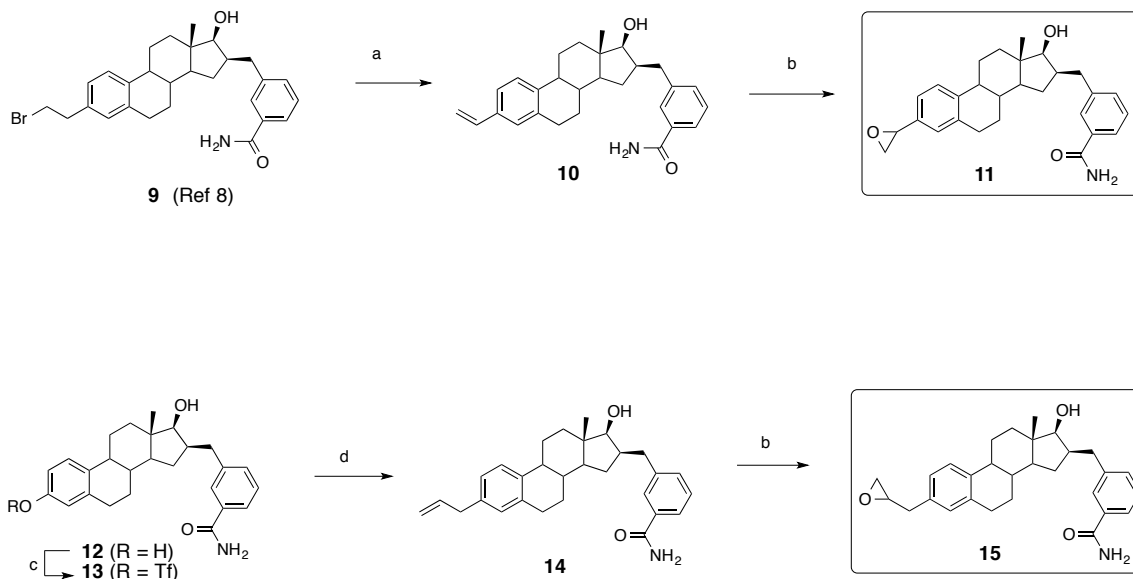
The targeted oxirane derivatives **11** and **15** were obtained using the synthetic routes reported in Figure 4. The first synthesis used PBRM (**9**) as starting material. The vinyl intermediate **10** was thus obtained by a treatment of **9** with tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in DMSO. Reagent and conditions were based on those previously reported¹⁸ and optimised to provide an elimination product and to avoid the fluoride derivative. Therefore, the epoxidation of the olefinic bond of **10** leads to the desired compound **11**. The synthesis of **15** needs the substitution of the C3-hydroxyl group of **12** into the triflate **13**. The triflate is a good leaving group that allows the formation of the corresponding allyl derivative **14** through a Suzuki coupling. Afterwards, the epoxidation of the olefinic bond leads to the desired compound **15**.

To afford the oxiranes and avoid the formation of side products, all vinyl and allyl derivatives were treated with Oxone instead of *m*-chloroperbenzoic acid or other peracids. Interestingly, we discovered that the yield for the epoxidation can be increase with successive treatments with Oxone. In fact, by a first treatment with Oxone in presence of sodium bicarbonate and an organic solvent we were not able to force progression over 15 to 20 % in every case. Isolating and resubmitting the compound mixture to a second treatment with Oxone allowed us to obtain up to 54 % yield of the epoxide. At that point, a third treatment did not increase the yield of epoxide. Although the steroid is fully soluble at that concentration in acetone/acetonitrile (1:2, v/v), we think the reactive mixture formed with Oxone, sodium bicarbonate and the organic solvents allowed only a small amount of the substrate in solution. Different ratios of reagent and solvents

were tried to solve that issue but without success. In the end, two treatments with Oxone, sodium bicarbonate and acetone/acetonitrile (1:2, v/v) provided the best results.



Scheme 1 : Synthesis of epoxides **4**, **5**, **7** and **8**. Reagents and conditions: (a) triflic anhydride, TEA, DCM, 0°C, argon; (b) potassium vinyltrifluoroborate, PdCl₂, PPh₃, Cs₂CO₃, THF/H₂O (9:1), 80°C, argon; (c) Oxone, acetone/ACN (1:2), NaHCO₃, rt; (d) NaBH₄, MeOH, 0°C; (e) 2-propenylboronic acid pinacol ester, Pd(dppf)Cl₂, DMF, K₃PO₄, microwaves, 120° C; (f) Oxone, acetone/ACN (1:2), NaHCO₃, 0°C.



Scheme 2 : Synthesis of epoxides **11** and **15**. Reagents and conditions: (a) TBAF, DMSO, rt; (b) Oxone, acetone/ACN (1:2), NaHCO₃, 0°C; (c) triflic anhydride, TEA, DCM, 0°C, argon; (d) 2-propenylboronic acid pinacol ester, Pd(dppf)Cl₂, DMF, K₃PO₄, microwaves, 120° C.

3.3 Biological

All oxirane compounds had their biological activities (17 β -HSD1 inhibitory activity and estrogenic activity) evaluated *in vitro*. Those assays were carried out in human breast cancer T-47D intact cells, which express 17 β -HSD1 and are sensitive to estrogenic compounds. The inhibition percentages of the synthesized compounds are reported in Figure 5 and showed clearly that none of the molecule occurs to be a better inhibitor compare with PBRM or CC-156 (our control inhibitors). At all concentrations tested, both oxiranes **11** and **15** showed an inhibition percentage at least 4 times lower than PBRM, the analog compound with a 2-bromoethyl side chain at steroid position 3 instead of an epoxide.

Compounds **4**, **5**, **7** and **8** were also evaluated in order to extend our SAR study regarding their epoxide group at C3 and the functionality (ketone or alcohol) at C17. Although our previous work^{7,9,10} tended to demonstrate that C17-ketone estrane derivatives were better inhibitors than the C17-hydroxy one, this is not relevant in our case. In fact, the inhibition assay did not show any probing pattern that could explain if C17 ketone or the corresponding reduce form (alcohol) bind more efficiently the targeted enzyme site. The epoxy-estrane derivatives **4** and **5** demonstrated that the hydroxyl form give a better 17 β -HSD1 inhibition. However, the epoxy-methylen-estrane series (compounds **7** and **8**) showed the opposite result. We were also interested to determine which of the steroid-epoxides, directly linked or spaced to the steroid A-ring by a methylene group, present the best characteristic to form a potent inhibitor. Clearly, compounds **4**, **5** and **11**, with the epoxide group directly linked, have a lower inhibiting activity than the corresponding compounds **7**, **8** and **15**, with the epoxide spaced by a methylene group.

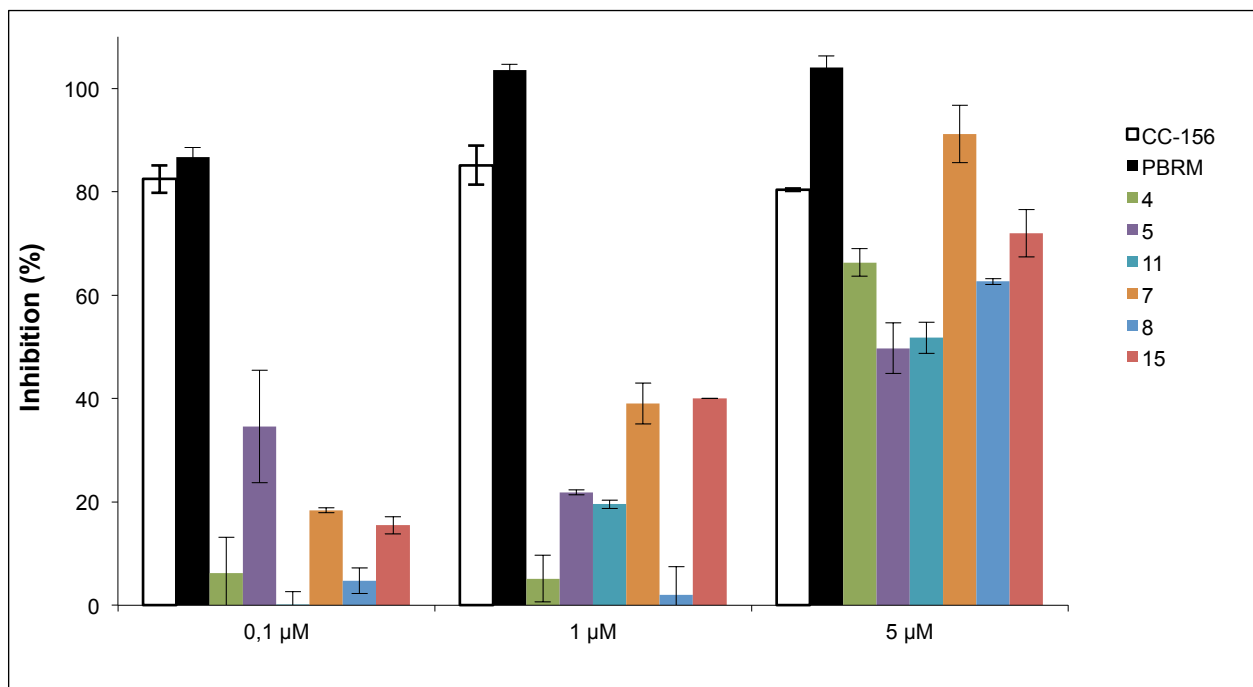


Figure 3 : 17β-HSD1 inhibition of a series of potential inhibitors. Inhibition was determined by the transformation of [¹⁴C]-E1 (60 nM) into [¹⁴C]-E2 by 17β-HSD1 in 3000 T-47D intact cells incubated 24 h. The experiment was performed in triplicate (±SD). The inhibitors were tested at three concentrations of 0.1, 1 and 5 μM.

We investigated further the inhibitory activity of our targeted compounds **11** and **15** at several increasing concentrations, which allowed us to draw the inhibiting curve and to determine their IC₅₀ values, the concentration that inhibited 50 % of the enzyme activity (Figure 6). With such values, we were able to compare easily the inhibitory potency of a compound with the others. As we observed in our previous work,⁸⁻¹⁰ PBRM is a weaker inhibitor than CC-156 (IC₅₀ values of 50.4 nM and 16.9 nM, respectively). There so, we were trying to increase the inhibitory activity of PBRM by changing its 2-bromoethyl side chain by an oxiranyl group. Our strategy, supported by molecular modeling, obviously failed since compound **15** presents a IC₅₀ value of 1300 nM, which is almost 26 times higher (less potent) than the IC₅₀ value of PBRM. For compound **11**, IC₅₀ value cannot be determinate due to its very low inhibitory potency observed at the concentrations used.

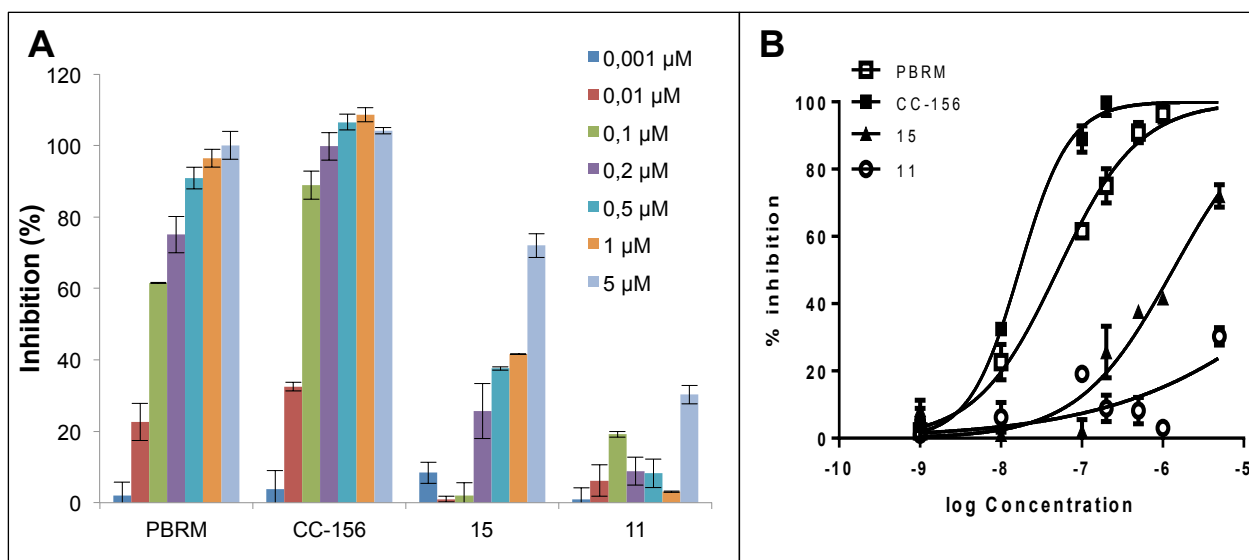


Figure 4 : Inhibition of 17β-HSD1 in T-47D cells at increasing concentrations of compounds **11** and **15** and reference inhibitors PBRM and CC-156. (A) 17β-HSD1 inhibition determined by the transformation of [¹⁴C]-E1 (60 nM) into [¹⁴C]-E2 in 3000 T-47D intact cells incubated 24 h. The experiment was performed in triplicate (±SD). The inhibitors were tested at seven increasing concentrations of 0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 5 μM. (B) Curves of 17β-HSD1 inhibition used for the determination of IC₅₀ values. IC₅₀ represents the concentration that inhibited 17β-HSD1 activity by 50 %.

On the other hand, we were also concerned about the estrogenic activity of our compounds. In fact, we did not want them to induce a proliferation of estrogen-sensitive cells, such as breast cancer T-47D cells. Since functionalization of the carbon C16 tends to decrease the proliferation of cells, we were pretty convinced that our targeted compounds **11** and **15** would not present an estrogenic activity. However, according to the cell proliferation assay (Figure 7), they both possess a slight tendency to induce an estrogenic activity. Each compound was tested at three concentrations and demonstrated a prozone effect, suggesting a possible cytotoxic effect at the highest concentration of 5 μM. It is even obvious that the functionalization at C16 lower the cell proliferation. In fact, epoxide estrane derivatives **4**, **5**, **7** and **8** (without C16 side chain) are more estrogenic when compared to their benzamide analog compounds **11** and **15**. This relation correlated with the result previously observed with PBRM and CC-156⁷⁻¹⁰ and can be explained with the structural similarity of the synthesized compounds with the natural estrane nucleus.

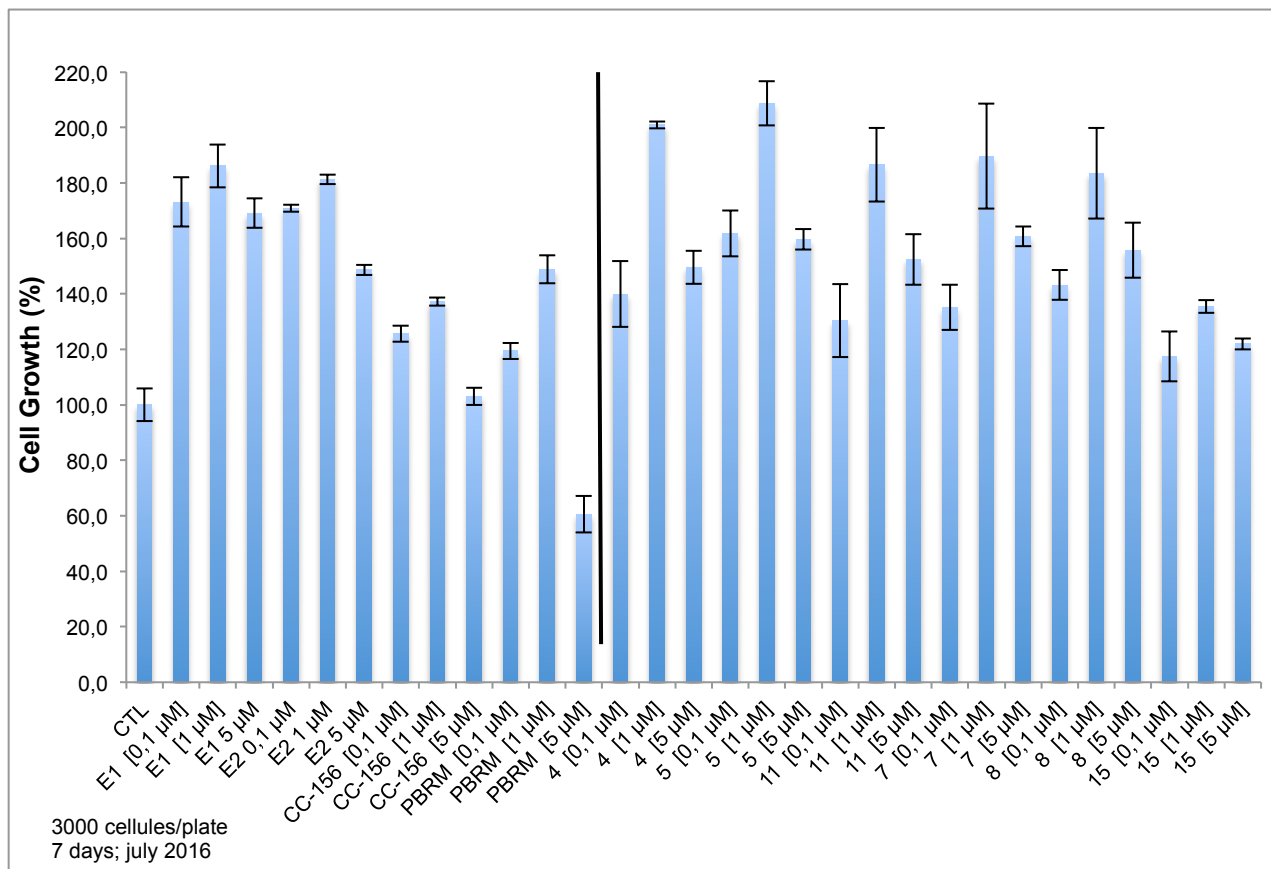


Figure 5 : Effect of inhibitors on the growth of estrogen-starved estrogen-sensitive T-47D cells after 7 days of treatment. Control fixed at 100 %.

3.4 Conclusion

We have successfully synthesized a series of C3-epoxide estrane derivatives structurally related to the potent 17β -HSD1 inhibitors PBRM and CC-156. In fact, two of these epoxides, compounds **11** and **15**, were initially identified as potential inhibitors, but from the enzymatic assay results, they occur to have a poor inhibitory activity in contrary with what the docking study suggested. The oxirane obtained from the allylic compound is however a better 17β -HSD1 inhibitor than the oxirane obtained from the vinylic compound. The results suggest that the oxiranyl group did not alkylate the enzyme and it is more likely that the inhibition observed with compound **15** ($IC_{50} = 1300$ nM) is the result of a reversible inhibition instead of an irreversible inhibition. An enzymatic kinetic study will be however necessary to confirm this hypothesis. In

summary, introducing an oxiranyl group in replacement of the 2-bromoethyl side chain at C3 of PBRM did not improve its inhibitory potency.

Acknowledgements We thank Amorchem (Montréal, QC, Canada) and Mitacs (Montréal, QC, Canada) for their financial support. We appreciated the collaboration of Ms. Marie-Claude Trottier for NMR and LC-MS analyses.

References

1. Henn, C.; Einspanier, A.; Marchais-Oberwinkler, S.; Frotscher, M.; Hartmann, R. W., Lead optimization of 17beta-HSD1 inhibitors of the (hydroxyphenyl)naphthol sulfonamide type for the treatment of endometriosis. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55* (7), 3307-18.
2. Cornel, K. M.; Kruitwagen, R. F.; Delvoux, B.; Visconti, L.; Van de Vijver, K. K.; Day, J. M.; Van Gorp, T.; Hermans, R. J.; Dunselman, G. A.; Romano, A., Overexpression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increases the exposure of endometrial cancer to 17beta-estradiol. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2012**, *97* (4), 591-601.
3. Bey, E.; Marchais-Oberwinkler, S.; Negri, M.; Kruchten, P.; Oster, A.; Klein, T.; Spadaro, A.; Werth, R.; Frotscher, M.; Birk, B.; Hartmann, R. W., New insights into the SAR and binding modes of bis(hydroxyphenyl)thiophenes and -benzenes: influence of additional substituents on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) inhibitory activity and selectivity. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52* (21), 6724-43.
4. Poirier, D., Inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Current medicinal chemistry* **2003**, *10* (6), 453-77.
5. Poirier, D., 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* **2010**, *20* (9), 1123-45.
6. Pasqualini, J. R., The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochimica et biophysica acta* **2004**, *1654* (2), 123-43.
7. Laplante, Y.; Cadot, C.; Fournier, M. A.; Poirier, D., Estradiol and estrone C-16 derivatives as inhibitors of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: blocking of ER+ breast cancer cell proliferation induced by estrone. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16* (4), 1849-60.
8. Maltais, R.; Ayan, D.; Poirier, D., Crucial role of 3-bromoethyl in removing the estrogenic activity of 17beta-HSD1 Inhibitor 16beta-(m-carbamoylbenzyl)estradiol. *ACS medicinal chemistry letters* **2011**, *2* (9), 678-81.
9. Ayan, D.; Maltais, R.; Roy, J.; Poirier, D., A new nonestrogenic steroidal inhibitor of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I blocks the estrogen-dependent breast cancer tumor growth induced by estrone. *Molecular cancer therapeutics* **2012**, *11* (10), 2096-104.
10. Maltais, R.; Ayan, D.; Trottier, A.; Barbeau, X.; Lague, P.; Bouchard, J. E.; Poirier, D., Discovery of a non-estrogenic irreversible inhibitor of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from 3-substituted-16 beta-(m-carbamoylbenzyl)-estradiol derivatives. *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57* (1), 204-22.
11. Moller, G.; Deluca, D.; Gege, C.; Rosinus, A.; Kowalik, D.; Peters, O.; Droescher, P.; Elger, W.; Adamski, J.; Hillisch, A., Structure-based design, synthesis and in vitro characterization of potent 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors based on 2-substitutions of estrone and D-homo-estrone. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. **2009**, *19* (23), 6740-4.
12. Lengauer, T.; Rarey, M., Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology* **1996**, *6* (3), 402-6.
13. Chaudhary, K. K.; Mishra, N., A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. *JSM chemistry* **2016**, *4* (3), 1029-33.
14. Ferreira, L. G.; dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D., Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **2015**, *20* (7), 13384-421.

15. Mazumdar, M.; Fournier, D.; Zhu, D. W.; Cadot, C.; Poirier, D.; Lin, S. X., Binary and ternary crystal structure analyses of a novel inhibitor with 17beta-HSD type 1: a lead compound for breast cancer therapy. *The Biochemical journal* **2009**, *424* (3), 357-66.
16. Furuya, T.; Strom, A. E.; Ritter, T., Silver-mediated fluorination of functionalized aryl stannanes. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (5), 1662-3.
17. Yasu, Y.; Koike, T.; Akita, M., Intermolecular aminotrifluoromethylation of alkenes by visible-light-driven photoredox catalysis. *Organic letters* **2013**, *15* (9), 2136-9.
18. Berube, M.; Kamal, F.; Roy, J.; Poirier, D., A dehydrohalogenation methodology for synthesizing terminal olefins under mild conditions. *Synthesis-stuttgart* **2006**, (18), 3085-91.

Conclusion générale

L'enzyme 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 (17β -HSD1) représente une cible thérapeutique intéressante puisqu'elle est connue pour jouer un rôle majeur dans la progression de maladies sensibles aux estrogènes, tels le cancer du sein et l'endométriose. Cette enzyme est responsable de la biotransformation du plus puissant estrogène chez la femme, l'estradiol. Ainsi, son inhibition permettrait d'altérer la prolifération des cellules qui constituent les tissus estrogéno-sensibles. Conséquemment, plusieurs travaux ont porté sur la découverte d'inhibiteurs de cette enzyme. Notre groupe de recherche a notamment développé l'inhibiteur CC-156 qui se trouve à être un inhibiteur compétitif et puissant de la 17β -HSD1. Toutefois, ce dernier possédait une activité estrogénique indésirable et il a été remplacé par l'inhibiteur PBRM qui est venu pallier à ce problème, et ce, en éliminant l'estrogénicité sans trop affecter l'activité inhibitrice. Nos efforts ont, par conséquent, été concentrés sur le développement d'une nouvelle génération d'analogues du PBRM comme inhibiteur de la 17β -HSD1. Idéalement, cet inhibiteur posséderait une conformation optimale pour lier le site catalytique de l'enzyme.

Dans le premier chapitre, nous rapportons la synthèse chimique et l'évaluation biologique (activité inhibitrice) d'analogues du PBRM. Bien que le PBRM soit très intéressant comme inhibiteur, il possède comme lacune une faible affinité pour l'enzyme. Le travail consistait donc à améliorer cette facette du PBRM. Des modifications de la chaîne benzylamide en position 16 visait une amélioration de l'affinité tout en conservant les autres paramètres intéressants, comme la stabilité métabolique et la non estrogénicité. Afin de déterminer l'influence d'une liaison entre la chaîne en C16 et les acides aminés Asn-152 et Leu-95, deux classes d'inhibiteurs potentiels ont été synthétisés. Par la suite, leur activité inhibitrice a été déterminée à l'aide d'un essai enzymatique dont les résultats ont permis d'identifier l'Asn-152 pour de futurs travaux. Dans les séries de composés présentés, aucun n'a permis d'obtenir une activité inhibitrice supérieure à celle du PBRM (10 fois inférieure). Toutefois, plusieurs groupements fonctionnels sont désormais connus pour favoriser des liaisons intéressantes et prometteuses dans une région spécifique du site catalytique de la 17β -HSD1.

Dans le cadre des travaux réalisés au deuxième chapitre, nous avons investigué une stratégie alternative à l'utilisation du groupement 2-bromoéthyle pour former une liaison covalente avec le

site catalytique de l'enzyme. Le but visé était l'obtention d'un composé ayant un profil inhibiteur supérieur à celui du PBRM, et ce, tout en conservant son caractère irréversible et sa non estrogénicité. Basé sur une expérience de modélisation moléculaire, deux composés possédant une chaîne époxyde en position 3 du noyau stéroïdien ont été ciblés. Ces derniers ont été synthétisés afin d'évaluer leur activité inhibitrice par le biais d'un essai enzymatique, ainsi que leur pouvoir estrogénique. L'époxyde le plus actif a présenté un potentiel inhibiteur bien inférieur aux attentes puisqu'il était environ 26 fois moins puissant que le PBRM. De plus, il possédait une faible estrogénicité non souhaitable.

En résumé, des travaux visant l'obtention d'un puissant inhibiteur de l'enzyme 17 β -HSD1, dans une optique de remède aux maladies estrogéno-sensibles, ont été menées et présentées dans le cadre de ce mémoire. Actuellement, un des meilleurs candidats à ce titre est le 3-{{3-(2-bromoéthyl)-17 β -hydroxy-estra-1(10),2,4-trièn-16 β -yl}méthyl}benzamide (PBRM) avec son profil d'inhibiteur irréversible et non estrogénique. Ce dernier, quoique très prometteur, possède des lacunes au niveau de son potentiel d'inhibition. C'est dans l'optique d'améliorer son activité inhibitrice, tout en conservant ses autres propriétés biologiques, que des travaux ciblant la modification de deux groupements fonctionnels majeurs du PBRM, ceux en positions 16 et 3, ont été effectués. Quoique notre objectif principal n'ait pas été atteint, les résultats obtenus permettent d'envisager plusieurs stratégies alternatives pour l'élaboration de futurs inhibiteurs de la 17 β -HSD1 comme candidats au traitement de maladies sensibles aux estrogènes.

Bibliographie

1. Poirier, D., 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* **2010**, *20* (9), 1123-45.
2. Labrie, F.; Bélanger, A.; Luu-The, V., Biosynthèse et sécrétion des hormones stéroïdiennes: In Chanson, P., ed *Traité d'endocrinologie*, médecine-sciences, Paris, Flammarion médecine-sciences, **2007**, 13-9.
3. Maltais, R.; Tremblay, M. R.; Ciobanu, L. C.; Poirier, D., Steroids and combinatorial chemistry. *ACS combinatorial science*, **2004**, *6* (4), 443-56.
4. Avenado, C.; Menendez, J. C., *Medicinal chemistry of anticancer drugs*. Elsevier: Amsterdam, **2008**, p 459.
5. Labrie, F., All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **2015**, *145*, 133-8.
6. <http://www.vetopsy.fr/endocrinologie/hormones-sexuelles/testosterone.php>.
7. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57-70.
8. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646-74.
9. Negrini, S.; Gorgoulis, V. G.; Halazonetis, T. D., Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2010**, *11* (3), 220-8.
10. AmericanCancerSociety, Cancer facts & figures. *Atlanta: american cancer society* **2012**.
11. <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/?region=on>.
12. <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/statistics/?region=on>.
13. <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/?region=qc>.
14. <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/statistics/?region=qc>.
15. Fayette, J.; Soria, J. C., [Targeted molecular therapy: the example of Iressa (ZD1839)]. *Medical sciences* **2003**, *19* (11), 1052-4.
16. <http://www.herceptin.com/adjuvant/index.jsp>.
17. <http://www.erbitux.com/main.aspx>.
18. Bulletti, C.; Coccia, M. E.; Battistoni, S.; Borini, A., Endometriosis and infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics* **2010**, *27* (8), 441-7.
19. Valle, R. F.; Sciarra, J. J., Endometriosis: treatment strategies. *Women's health and disease: gynecologic and reproductive issue* **2003**, *997*, 229-39.
20. Labrie, F.; Labrie, C.; Belanger, A.; Simard, J.; Gauthier, S.; Luu-The, V.; Merand, Y.; Giguere, V.; Candas, B.; Luo, S.; Martel, C.; Singh, S. M.; Fournier, M.; Coquet, A.; Richard, V.; Charbonneau, R.; Charpenet, G.; Tremblay, A.; Tremblay, G.; Cusan, L.; Veilleux, R., EM-652 (SCH 57068), a third generation SERM acting as pure antiestrogen in the mammary gland and endometrium. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology* **1999**, *69* (1-6), 51-84.
21. Lerner, L. J., Hormone antagonists: inhibitors of specific activities of estrogen and androgen. *Recent progress in hormone research* **1964**, *20*, 435-90.
22. Hughes, A.; Hasan, S. H.; Oertel, G. W.; Voss, H. E.; Bahner, F.; Neumann, F.; Steinbeck, H.; Gräf, K. J.; Brotherton, J.; Horn, H. J.; Wagner, R. K., Androgens II and Antiandrogens. *Handbook of experimental pharmacology* **1974**, *35* (2), 234-484.

23. Bowler, J.; Lilley, T. J.; Pittam, J. D.; Wakeling, A. E., Novel steroidal pure antiestrogens. *Steroids* **1989**, *54* (1), 71-99.
24. Wakeling, A. E.; Bowler, J., Steroidal pure antioestrogens. *The Journal of endocrinology* **1987**, *112* (3), 7-10.
25. Wakeling, A. E.; Bowler, J., Novel antioestrogens without partial agonist activity. *Journal of steroid biochemistry* **1988**, *31* (4B), 645-53.
26. Wakeling, A. E.; Bowler, J., Biology and mode of action of pure antioestrogens. *Journal of steroid biochemistry* **1988**, *30* (1-6), 141-7.
27. Poirier, D., New Cancer Drugs Targeting the Biosynthesis of Estrogens and Androgens *Drug development research* **2008**, *69* (6), 304-18.
28. Lombardi, P., *Current pharmaceutical design*. Bentham Science: Hilversum, **1995**; Vol. 1, p 23.
29. Li, J. J., *Aromatase Inhibitors for breast cancer: exemestane (Aromasin), anastrozole (Arimidex) and letrozole (Femara)*. In *The art of drug synthesis*. John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, **2006**.
30. Purohit, A.; Williams, G. J.; Howarth, N. M.; Potter, B. V.; Reed, M. J., Inactivation of steroid sulfatase by an active site-directed inhibitor, estrone-3-O-sulfamate. *Biochemistry* **1995**, *34* (36), 11508-14.
31. Maltais, R.; Poirier, D., Steroid sulfatase inhibitors: a review covering the promising 2000-2010 decade. *Steroids* **2011**, *76* (10-11), 929-48.
32. Ciobanu, L. C.; Luu-The, V.; Martel, C.; Labrie, F.; Poirier, D., Inhibition of estrone sulfate-induced uterine growth by potent nonestrogenic steroidal inhibitors of steroid sulfatase. *Cancer research* **2003**, *63* (19), 6442-6.
33. Poirier, D.; Roy, J.; Maltais, R.; Ayan, D., A potent inhibitor of steroid sulfatase (EM-1913) blocks tumor growth in nude mice (MCF-7 xenograft). *Current enzyme inhibition* **2015**, *11* (1), 65-73.
34. Laplante, Y.; Rancourt, C.; Poirier, D., Relative involvement of three 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 7 and 12) in the formation of estradiol in various breast cancer cell lines using selective inhibitors. *Molecular and cellular endocrinology* **2009**, *301* (1-2), 146-53.
35. Poirier, D., Advances in development of inhibitors of 17beta hydroxysteroid dehydrogenases. *Anticancer agents in medicinal chemistry* **2009**, *9* (6), 642-60.
36. Poirier, D., Inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Current medicinal chemistry* **2003**, *10* (6), 453-77.
37. Messinger, J.; Hirvela, L.; Husen, B.; Kangas, L.; Koskimies, P.; Pentikainen, O.; Saarenketo, P.; Thole, H., New inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Molecular and cellular endocrinology* **2006**, *248* (1-2), 192-8.
38. Allan, G. M.; Bubert, C.; Vicker, N.; Smith, A.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V., Novel, potent inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Molecular and cellular endocrinology* **2006**, *248* (1-2), 204-7.
39. Brozic, P.; Lanisnik Risner, T.; Gobec, S., Inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15* (2), 137-50.
40. Luu The, V.; Labrie, C.; Zhao, H. F.; Couet, J.; Lachance, Y.; Simard, J.; Leblanc, G.; Cote, J.; Berube, D.; Gagne, R.; et al., Characterization of cDNAs for human estradiol 17 beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta. *Molecular endocrinology* **1989**, *3* (8), 1301-9.

41. Peltoketo, H.; Isomaa, V.; Maentausta, O.; Vihko, R., Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS letters* **1988**, *239* (1), 73-7.
42. Simard, J.; Vincent, A.; Duchesne, R.; Labrie, F., Full oestrogenic activity of C19-delta 5 adrenal steroids in rat pituitary lactotrophs and somatotrophs. *Molecular and cellular endocrinology* **1988**, *55* (2-3), 233-42.
43. Poulin, R.; Labrie, F., Stimulation of cell proliferation and estrogenic response by adrenal C19-delta 5-steroids in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Cancer research* **1986**, *46* (10), 4933-7.
44. Douglas, F.; Covey, R.J. A., Washington University, *Open D ring hormone analogs*, United States, WO1987006462, **1987**.
45. Smith, H. J.; Ahmadi, P. M.; Nicholls, P. J.; Greer, V., University college Cardiff consultants limited, *Benzyl tetralins, formulation and uses thereof*, United Kingdom, WO2001042181, **2001**.
46. Vicker, N.; Gillian, M.; Allan, G. M.; Bubert, C.; Sophie M.; Fischer, D. S.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Barry V.; Potter, B. V., Sterix limited *17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors*, United Kingdom, WO 2004085457, **2004**.
47. Allan, G. M.; Lawrence, H. R.; Cornet, J.; Bubert, C.; Fischer, D. S.; Vicker, N.; Smith, A.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Day, J. M.; Mahon, M. F.; Reed, M. J.; Potter, B. V., Modification of estrone at the 6, 16, and 17 positions: novel potent inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49* (4), 1325-45.
48. Lawrence, H. R.; Vicker, N.; Allan, G. M.; Smith, A.; Mahon, M. F.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V., Novel and potent 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48* (8), 2759-62.
49. Allan, G. M.; Vicker, N.; Lawrence, H. R.; Tutill, H. J.; Day, J. M.; Huchet, M.; Ferrandis, E.; Reed, M. J.; Purohit, A.; Potter, B. V., Novel inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: templates for design. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16* (8), 4438-56.
50. Lilienkampf, A.; Karkola, S.; Alho-Richmond, S.; Koskimies, P.; Johansson, N.; Huhtinen, K.; Vihko, K.; Wahala, K., Synthesis and biological evaluation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) inhibitors based on a thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one core. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52* (21), 6660-71.
51. Messinger, J.; Husen, B.; Koskimies, P.; Hirvela, L.; Kallio, L.; Saarenketo, P.; Thole, H., Estrone C15 derivatives--a new class of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. *Molecular and cellular endocrinology* **2009**, *301* (1-2), 216-24.
52. Josef Messinger, J.; Schoen, U.; Thole, H. H.; Husen, B.; Koskimies, P.; Unkila, M., Solvay pharmaceuticals, *Substituted estratrien derivatives as 17beta HSD inhibitors*, United States, US 20080255075, **2008**.
53. Messinger, J.; Thole, H. H.; Husen, B.; Steen, B. V.; Schneider, G.; Hulshof, J. B.; Koskimies, P.; Johansson, N.; Adamski, J., Solvay pharmaceuticals, *Novel 17beta-hydroxy dehydrogenase type I inhibitors*, United States, US 20050192263, **2005**.
54. VanderJagt, D. L.; Royer, R. E.; Deck, L. M. *11-Beta hydroxysteroid dehydrogenase type I inhibitors as anti-obesity/anti-diabetes compounds and 17-beta hydrosteroid dehydrogenase type I inhibitors as useful agents for the treatment of cancers, especially breast cancer*, United States, US20050228038, **2005**.
55. Adamski, J.; Bothe, U.; Elger, W.; Gege, C.; Hillisch, A.; Moeller, G.; Peters, O.; Regenhardt, W.; Rosinus, A.; Schneider B., Schering Aktiengesellschaft, *Novel 2-*

- substituted estradiol-17-ones as inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase of type 1*, Germany, WO 2006003013, **2006**.
56. Bulman, P. C.; Hussain, F.; Maggs, J. L.; Morgan, P.; Park, B. K., 2-Halogenation of estrone derivatives. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2059.
 57. Brozic, P.; Kocbek, P.; Sova, M.; Kristl, J.; Martens, S.; Adamski, J.; Gobec, S.; Lanisnik Rizner, T., Flavonoids and cinnamic acid derivatives as inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Molecular and cellular endocrinology* **2009**, *301* (1-2), 229-34.
 58. Marchais-Oberwinkler, S.; Kruchten, P.; Frotscher, M.; Ziegler, E.; Neugebauer, A.; Bhoga, U.; Bey, E.; Muller-Vieira, U.; Messinger, J.; Thole, H.; Hartmann, R. W., Substituted 6-phenyl-2-naphthols. Potent and selective nonsteroidal inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1): design, synthesis, biological evaluation, and pharmacokinetics. *Journal of medicinal chemistry*, **2008**, *51* (15), 4685-98.
 59. Bey, E.; Marchais-Oberwinkler, S.; Negri, M.; Kruchten, P.; Oster, A.; Klein, T.; Spadaro, A.; Werth, R.; Frotscher, M.; Birk, B.; Hartmann, R. W., New insights into the SAR and binding modes of bis(hydroxyphenyl)thiophenes and -benzenes: influence of additional substituents on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) inhibitory activity and selectivity. *Journal of medicinal chemistry*, **2009**, *52* (21), 6724-43.
 60. Kruchten, P.; Werth, R.; Bey, E.; Oster, A.; Marchais-Oberwinkler, S.; Frotscher, M.; Hartmann, R. W., Selective inhibition of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17betaHSD1) reduces estrogen responsive cell growth of T47-D breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **2009**, *114* (3-5), 200-6.
 61. Henn, C.; Einspanier, A.; Marchais-Oberwinkler, S.; Frotscher, M.; Hartmann, R. W., Lead optimization of 17beta-HSD1 inhibitors of the (hydroxyphenyl)naphthol sulfonamide type for the treatment of endometriosis. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55* (7), 3307-18.
 62. Laplante, Y.; Cadot, C.; Fournier, M. A.; Poirier, D., Estradiol and estrone C-16 derivatives as inhibitors of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: blocking of ER+ breast cancer cell proliferation induced by estrone. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16* (4), 1849-60.
 63. Ayan, D.; Maltais, R.; Roy, J.; Poirier, D., A new nonestrogenic steroidal inhibitor of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I blocks the estrogen-dependent breast cancer tumor growth induced by estrone. *Molecular cancer therapeutics* **2012**, *11* (10), 2096-104.
 64. Ayan, D.; Maltais, R.; Hospital, A.; Poirier, D., Chemical synthesis, cytotoxicity, selectivity and bioavailability of 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2014**.
 65. Maltais, R.; Ayan, D.; Trottier, A.; Barbeau, X.; Lague, P.; Bouchard, J. E.; Poirier, D., Discovery of a non-estrogenic irreversible inhibitor of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from 3-substituted-16 beta-(m-carbamoylbenzyl)-estradiol derivatives. *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57* (1), 204-22.