

С. Н. Морозкина*, С. С. Селиванов, С. И. Селиванов, А. С. Дроздов,
Н. Д. Ещенко, А. Г. Шавва

**СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
6-ОКСА-8 α -АНАЛОГОВ СТЕРОИДНЫХ ЭСТРОГЕНОВ, СОДЕРЖАЩИХ
МЕТИЛЬНУЮ ГРУППУ ПРИ С-4**

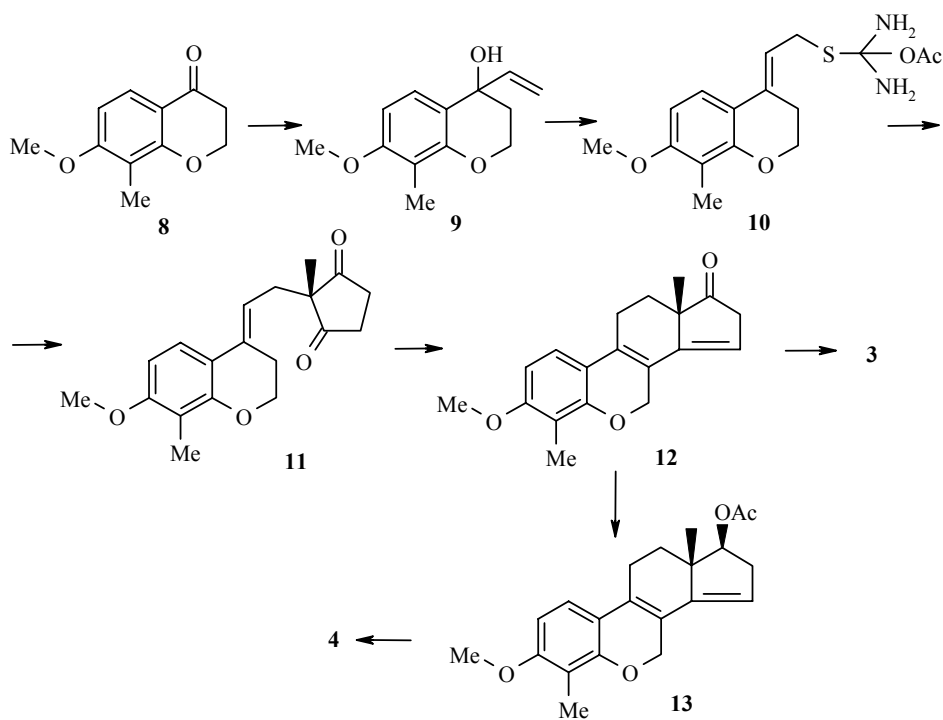
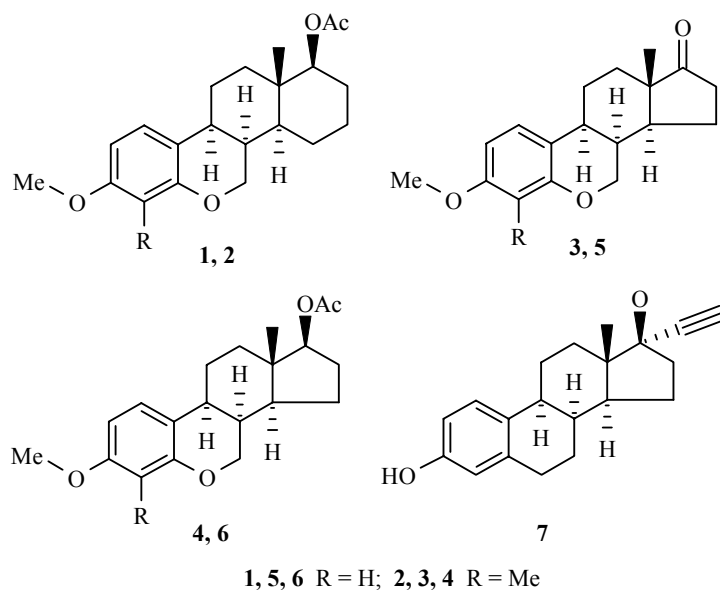
Синтезированы 4-метилзамещенные 6-окса-8 α -аналоги стероидных эстрогенов, проведено полное отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C этих соединений. Показано, что введение метильной группы в положение 4 стероидов данного стереохимического ряда приводит к потере утеротропного и гипертриглицеридемического действия модифицированных соединений. Стероиды с такими свойствами могут оказаться перспективными для создания на их основе векторов для транспорта в органы-мишени эстрогенов других классов соединений и ингибиторов ферментов, ответственных за метаболизм гормонов.

Ключевые слова: 6-окса-8 α -аналоги стероидных эстрогенов, их биологические свойства, спектроскопия ЯМР.

В последнее десятилетие ведется поиск ингибиторов ферментов, ответственных за метаболизм стероидных гормонов. Важным условием для отбора новых потенциальных препаратов является отсутствие у них гормонального действия [1–4]. Для решения подобных задач необходимо знать, какие модификации в структуре стероидных гормонов или их аналогов приводят к резкому снижению гормональной активности или ее полному исчезновению. Важно также, чтобы отобранные соединения не проявляли побочных эффектов, типичных для эстрогенов. В частности, у них должно отсутствовать гипертриглицеридемическое действие, поскольку последнее является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [5].

Ранее было показано, что в опытах на овариэктомированных крысах стероид **1** проявляет заметную гипертриглицеридемическую активность, тогда как у аналога **2** она отсутствует [6]. Представлялось интересным выяснить, приведет ли введение метильной группы в положение 4 других 6-окса-8 α -аналогов стероидных эстрогенов к нивелированию негативного влияния таких веществ на содержание триглицеридов.

В качестве модельных соединений для исследования избрали 4-метил-6-окса-8 α -аналоги эстрогенов **3** и **4**, поскольку в перспективе получение оптически активных стероидов проще в случае соединений с пятичленным кольцом D. Биологические свойства этих веществ было необходимо сравнить со свойствами "эталонных" веществ **5** и **6**, не имеющих заместителя в положении 4, а также 17 α -этинилэстрадиолом **7**, часто применяемым в клинической практике. Синтез целевых стероидов представлен на схеме.



Изотиуруниевую соль **10** получают обычным методом [7, 8], ее конденсация с 2-метилциклопентан-1,3-дионом легко приводит к получению секосоединения **11**, циклодегидратация которого позволяет получить с высоким выходом 6-оксаэстрапентаен **12**. Каталитическое гидрирование этого соединения в бензоле в присутствии никеля Ренея с последующим окислением продуктов реакции реактивом Саретта позволяет получить стероид **3** с выходом 39% в расчете на изотиуруниевую соль **10**.

Таблица 1

Исследование эстрогенной, остеопротекторной и гиполипидемической активности стероидов 5 и 6 при пероральном введении овариектомизированным крысам

Группа подопытных крыс	Изменение массы тела за время опыта, г	Масса матки, мг /100 г массы тела	Вес золы от бедренной кости/"Влажный" вес бедренной кости	Содержание холестерина в сыворотке крови, мг/дл	Содержание триглицеридов в сыворотке крови, мг/дл
Ложнооперированные	29.0 ± 3.2*	154 ± 4**	0.432 ± 0.007*	57.2 ± 1.9*	57 ± 3**
Овариектомизированные	62.0 ± 5.2	32 ± 1	0.403 ± 0.005	68.4 ± 2.4	38 ± 2
Овариектомизированные, получавшие стероид 7	11.0 ± 2.9**	157 ± 8**	0.422 ± 0.005*	30.0 ± 1.7**	98 ± 9**
препарат 5	45.5 ± 3.8*	72 ± 3**	0.425 ± 0.006*	51.9 ± 1.7*	77 ± 6**
препарат 6	24.6 ± 3.8	115 ± 5**	0.423 ± 0.006*	37.2 ± 2.9**	76 ± 8**

Знаки * и ** означают достоверное различие с группой овариектомизированных крыс ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно). Среднеквадратичные ошибки и достоверность различий вычислены по программе ANOVA.

Исследование эстрогенной, остеопротекторной и гиполипидемической активности стероидов 3 и 4 при пероральном введении овариэктомированным крысам

Группа подопытных крыс	Изменение массы тела за время опыта, г	Масса матки, мг /100 г массы тела	Вес золы от бедренной кости/ "Влажный" вес бедренной кости	Содержание холестерина в сыворотке крови, мг/дл	Содержание триглицеридов в сыворотке крови, мг/дл
Ложнооперированные	36±3*	156.7 ± 14.5**	0.419 ± 0.006*	47.4 ± 1.4*	59.9 ± 5.1*
Овариэктомированные	65±4	18.9 ± 0.6	0.397 ± 0.006	64.3 ± 2.2	37.8 ± 1.5
Овариэктомированные, получавшие стероид 7	9±5*	172.8 ± 7.2**	0.421 ± 0.008*	29.6 ± 2.6*	102.6 ± 8.8*
стероид 3	64±5	19.3 ± 0.9	0.396 ± 0.005	65.8 ± 2.3	43.3 ± 2.9
стероид 4	62±4	19.9 ± 1.0	0.390 ± 0.005	60.6 ± 2.7	42.7 ± 3.3

Знаки * и ** означают достоверное различие с группой овариэктомированных крыс ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно). Среднеквадратичные ошибки и достоверность различий вычислены по программе ANOVA.

Соединение **4** синтезируют восстановлением эстрапентаена **12** боргидридом натрия, ацелированием продуктов реакции уксусным ангидридом в пиридине с последующим гидрированием ацетата **13** в ТГФ в присутствии Pd/C.

Анализ спектров аналогов **3** и **4** методами спектроскопии ЯМР DQF-COSY, HSQC без развязки от ядер ^{13}C , COLOC и NOESY в соответствии с работой [9] позволил провести полное отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C указанных стероидов и доказать таким образом их пространственное строение. "Эталонные" соединения **5** и **6** синтезировали предложенным ранее методом [10].

Некоторые биологические свойства аналогов **3–6** изучали в опытах на овариэктомированных крысах линии Wistar в условиях работ [6, 9] (табл. 1 и 2). Легко видеть, что стероиды **5** и **6** обладают остеопротекторным и гипохолестеринемическим действием при пониженной утеротропной и гипертриглицеридемической активности, что является преимуществом по сравнению с применяемым в клинике 17α -этинил-эстрадиолом (**7**). Синтезы на основе этих соединений могут представлять интерес при поиске новых остеопротекторов.

Из данных табл. 2 следует, что введение метильной группы в положение 4 б-окса-8 α -аналогов стероидных эстрогенов с пятичленным кольцом D приводит к нивелированию у модифицированных веществ гипертриглицеридемического действия, поэтому в дальнейшем следует экспериментально оценить возможность их использования для транспорта в органы-мишени эстрогенов соединений других классов, а также в качестве ингибиторов различных ферментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Масс-спектры снимали на приборе MX-1321 при температуре ионизационной камеры 200–210 °С. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C получали при 295 К на спектрометре Bruker DPX-300 (300 и 75 МГц соответственно). Для регистрации спектров ЯМР ^1H всех соединений кроме изотиуруниевой соли **10** использовали растворы 5–7 мг вещества в 0.6 мл CDCl_3 , а для ЯМР ^{13}C – 30–50 мг в том же объеме. Спектр ЯМР ^1H соединения **10** снимали в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Химические сдвиги измеряли по отношению к ТМС путем присвоения сигналу растворителя ($\text{CDCl}_3\text{--CHCl}_3$, 99.9:0.1) стандартных значений 7.26 (^1H) и 76.90 м. д. (^{13}C) с точностью не хуже ± 0.01 м. д. Гомоядерные КССВ измеряли с точностью ± 0.02 Гц из спектров ЯМР ^1H , полученных после дополнительной обработки линий с помощью преобразования Лоренца–Гаусса.

8-Метил-7-метоксисхроман-4-он (8) синтезируют в условиях, предложенных в работе [11] для получения аналогичных веществ. Т. пл. 100–101 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2.06 (3H, с, 8- CH_3); 2.74 (2H, т, $J = 6.4$, H-3); 3.88 (3H, с, CH_3O); 4.52 (2H, т, $J = 6.4$, H-2); 6.58 (1H, д, $J = 8.7$, H-6); 7.79 (1H, д, $J = 8.7$, H-5). Найдено, %: С 68.77; Н 6.35. $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$. Вычислено, %: С 68.74; Н 6.29.

4-(8'-Метил-7'-метоксисхроманилиден)этилизотиурунийацетат (10). К раствору винилмагнийбромида, приготовленному из 6.3 г магния в 145 мл ТГФ, прибавляют по каплям в течение 1 ч при 30 °С раствор 12.7 г соединения **8** в 80 мл ТГФ. Реакционную смесь оставляют при комнатной температуре на 12 ч, затем

выдерживают 1 ч при 40 °С. К винилкарбинолу **9**, полученному после обычной обработки, добавляют 3.6 г измельченной тиомочевины и 55 мл безводной уксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивают 4 ч при комнатной температуре, целевое соединение осаждают добавлением 400 мл диэтилового эфира. Получают 18.0 г (80%) изотиурониевой соли **10**; т. пл. 136–138 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.77 (3H, с, CH_3COO); 1.94 (3H, с, $8'\text{-CH}_3$); 2.64 (2H, т, $J = 5.8$, H-3); 3.75 (3H, с, CH_3O); 3.80 (2H, д, $J = 7.8$, CH_2); 4.14 (2H, т, $J = 5.8$, H-2); 5.97 (1H, т, $J = 7.8$, =CH); 6.57 (1H, д, $J = 8.3$, H-6); 7.40 (1H, д, $J = 8.3$, H-5). Найдено, %: C 56.50; H 6.65; N 8.45. $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$. Вычислено, %: C 56.79; H 6.55; N 8.28.

4-Метил-3-метокси-6-окса-8,14-секоэстра-1,3,5(10),9(11)-тетраен-14,17-дион (11). Добавляют 4.7 г изотиурониевой соли **10**, 4.7 г 2-метилциклопентан-1,3-диона к 100 мл смеси этанол–вода, 1:1, и перемешивают 36 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывают, промывают метанолом, сушат на воздухе. Получают 3.8 г (87%) секостероида **11**, т. пл. 75–77 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.18 (3H, с, 18- CH_3); 2.06 (3H, с, 4- CH_3); 2.54–2.80 (8H, м), 3.82 (3H, с, CH_3O); 4.18 (2H, т, $J = 5.7$, H-7); 5.67 (1H, т, $J = 8.2$, H-11); 6.47 (1H, д, $J = 8.8$, H-2); 7.26 (1H, д, $J = 8.8$, H-1). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 8.0, 19.3, 25.6, 34.2, 35.5, 55.6, 56.9, 66.4, 103.4, 111.9, 113.7, 115.1, 121.1, 132.8, 153.2, 158.1, 216.9. Найдено, %: C 72.47; H 7.28. $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$. Вычислено, %: C 72.59; H 7.05.

4-Метил-3-метокси-6-оксаэстра-1,3,5(10),8,14-пентаен-17-он (12). К раствору 3.3 г секостероида **11** в 70 мл метанола добавляют 6 мл конц. HCl, кипятят 30 мин, затем реакционную смесь оставляют на 1 сут при 5 °С. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой, а затем метанолом. Выход соединения **12** 2.9 г (93%); т. пл. 165–167 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.17 (3H, с, H-18); 1.57–1.67 (1H, м), 2.03–2.11 (1H, м), 2.08 (3H, с, 4- CH_3); 2.44–2.78 (1H, м), 2.95 (1H, д, $J_1 = 3.0$ и $J_2 = 23.4$), 3.34 (1H, д, $J = 23.4$), 3.85 (3H, с, CH_3O); 4.83 (1H, д, $J = 13.4$), 5.02 (1H, д, $J = 13.4$), 5.74 (1H, т, $J = 5.0$, H-15); 6.50 (1H, д, $J = 8.6$, H-2); 7.07 (1H, д, $J = 8.6$, H-1). Найдено, %: C 77.11; H 7.03. $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$. Вычислено, %: C 77.00; H 6.80.

4-Метил-3-метокси-6-окса-8 α -эстра-1,3,5(10)-триен-17-он (3). К раствору 2.9 г эстрапентаена **12** в 270 мл бензола добавляют 5 г никеля Ренея, гидрирование проводят при температуре 80–120 °С и давлении 80–180 атм в течение 40 мин. После обычной обработки продукты реакции окисляют реактивом Саретта, приготовленного из 2.5 г триоксида хрома и 25 мл пиридина. Целевое соединение получают после двукратной кристаллизации из метанола, выход 1.4 г (48%); т. пл. 152–154 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6.90 (H-1); 6.47 (H-2); 4.06 (H-7 β); 4.30 (H-7 α); 2.51 (H-8 α); 2.62 (H-9 α); 1.98 (H-11 α); 1.71 (H-11 β); 1.43 (H-12 α); 1.84 (H-12 β); 2.19 (H-14 α); 2.17 (H-15 α); 1.98 (H-15 β); 2.45 (H-16 α); 1.92 (H-16 β); 0.92 (H-18); 3.80 (CH_3O); 2.06 (4- CH_3). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 126.6 (C-1), 103.3 (C-2), 156.6 (C-3), 113.7 (C-4), 152.9 (C-5), 64.4 (C-7), 37.2 (C-8), 37.3 (C-9), 119.4 (C-10), 28.2 (C-11), 31.7 (C-12), 46.7 (C-13), 46.7 (C-14), 21.4 (C-15), 35.6 (C-16), 219.6 (C-17), 16.5 (C-18), 8.2 (4- CH_3), 55.7 (OCH_3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 300 (100), 285 (3.5), 243 (3), 215 (44), 202 (10), 201 (13.5), 189 (7), 188 (5.5), 176 (67), 175 (63), 161 (10.5). Найдено, %: C 75.85; H 8.28. $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3$. Вычислено, %: C 75.97; H 8.05.

17 β -Ацетокси-4-метил-3-метокси-6-окса-8 α -эстра-1,3,5(10)-триен (4). К раствору 5 г соединения **12** в 180 мл смеси диоксан–вода, 1:1, добавляют 0.5 г боргидрида натрия, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре 3 ч. Избыток восстановителя разлагают уксусной кислотой, продукт реакции ацетируют уксусным ангидридом в обычных условиях [9]. Полученное соединение **13** сушат, а затем гидрируют в присутствии 5% Pd/C в ТГФ. Стероид **4** очищают кристаллизацией из метанола, выход 3.2 г (55%); т. пл. 164.5–167

°C.

Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6.90 (H-1); 6.46 (H-2); 4.07 (H-7 β); 4.25 (H-7 α); 2.37 (H-8 α); 2.58 (H-9 α); 1.88 (H-11 α); 1.66 (H-11 β); 1.34 (H-12 α); 1.75 (H-12 β); 1.80 (H-14 α); 1.72 (H-15 α); 1.64 (H-15 β); 2.22 (H-16 α); 1.51 (H-16 β); 4.63 (H-17 α); 0.84 (H-18); 3.79 (CH_3O); 2.07 (4- CH_3); 2.05 (OCOCH_3). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 126.6 (C-1), 103.1 (C-2), 156.6 (C-3), 113.6 (C-4), 153.1 (C-5), 64.2 (C-7), 36.2 (C-8), 37.4 (C-9), 119.9 (C-10), 28.4 (C-11), 36.7 (C-12), 41.5 (C-13), 45.5 (C-14), 22.2 (C-15), 26.9 (C-16), 82.2 (C-17), 13.6 (C-18), 8.2 (4- CH_3), 55.7 (OCH_3), 21.1 (OCOCH_3), 170.9 (OCOCH_3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 344 (100), 301 (4), 285 (11), 269 (4), 243 (2), 227 (4), 215 (5), 202 (25), 189 (8), 176 (37), 175 (33), 161 (8), 151 (13). Найдено, %: C 73.17; H 8.37. $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$. Вычислено, %: C 73.23; H 8.19.

Метилловый эфир 6-окса-8 α -эстрона (5) получают предложенным ранее методом [10], т. пл. 148.5–150 °C (т. пл. 148–150 °C [10]). Стероид плавится без депрессии температуры плавления в пробе смешения с заведомо известным соединением. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.93 (3H, H-13); 1.43 (1H, H-12 β); 1.68 (1H, H-11 β); 1.84 (1H, H-12 β); 1.90 (2H, H-15 α , H-15 β); 1.96 (1H, H-14 α); 2.00 (1H, H-11 α); 2.18 (1H, H-16 α); 2.45 (1H, H-16 β); 2.54 (1H, H-8 α); 2.60 (1H, H-9 α); 3.75 (3H, OCH_3); 4.07 (1H, H-7 β); 4.22 (1H, H-7 α); 6.38 (1H, H-4); 6.49 (1H, H-2); 6.99 (1H, H-1). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 129.45 (C-1), 107.37 (C-2), 158.85 (C-3), 100.84 (C-4), 154.79 (C-5), 71.92 (C-7), 43.27 (C-8), 39.04 (C-9), 119.13 (C-10), 29.05 (C-11), 32.42 (C-12), 46.73 (C-13), 48.37 (C-14), 24.26 (C-15), 36.33 (C-16), 220.40 (C-17), 16.20 (C-18), 55.12 (CH_3O). Найдено, %: C 75.46; H 7.79. $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Вычислено, %: C 75.50; H 7.74.

17 β -Ацетокси-3-метокси-6-окса-8 α -эстра-1,3,5(10)-триен (6) получают предложенным ранее методом [10], т. пл. 115–116 °C (т. пл. 115–116 °C [10]). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 130.04 (C-1), 107.24 (C-2), 158.76 (C-3), 101.28 (C-4), 155.14 (C-5), 64.04 (C-7), 36.05 (C-8), 36.89 (C-9), 119.45 (C-10), 28.05 (C-11), 36.56 (C-12), 41.34 (C-13), 45.29 (C-14), 22.08 (C-15), 26.68 (C-16), 81.94 (C-17), 13.50 (C-18), 55.10 (CH_3O), 20.99 (OCOCH_3), 170.83 (OCOCH_3). Найдено, %: C 72.75; H 8.11. $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$. Вычислено, %: C 72.70; H 7.93.

Исследование утеротропной, остеопротекторной и гипохолестеринемической активностей модельных соединений, их влияние на вес тела подопытных животных проводят на овариэктомированных крысах линии Wistar в соответствии с работой [9]. Стероиды **3–6** вводят в течение 35 дней перорально в оливковом масле в дозе 5 мг/кг веса тела в сутки, 17 α -этинилэстрадиол (**7**) – в дозе 0.1 мг/кг веса тела в сутки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Lawrence, N. Vicker, G. M. Allan, A. Smith, M. F. Mahon, H. J. Tutill, A. Purohit, M. J. Reed, B. V. L. Potter, *J. Med. Chem.*, **48**, 2759 (2005).
2. M. Numazawa, M. Ando, Y. Watari, T. Tominaga, Y. Hayata, A. Yoshimura, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **96**, 51 (2005).
3. E. P. Schreiner, A. Billich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 4999 (2004).
4. B. V. L. Potter, M. J. Reed, G. K. Packham, M. P. Leese, US Pat. Appl. Publ. US 2004 5314; *Chem. Abstr.*, **140**, 94191 (2004).
5. E. Koren, C. Corder, G. Mueller, H. Centurion, G. Hallum, J. Fesmire, W. McConathy, P. Alaupovic, *Atherosclerosis*, **122**, 105 (1996).
6. А. Г. Шавва, С. Н. Морозкина, И. В. Ищенко, И. И. Елисеев, Г. Л. Старова, С. И. Селиванов, Ш. Н. Абусалимов, С. С. Селиванов, И. Ю. Каменева, Н. Д. Ещенко, *Биоорганическая химия*, **33**, 310 (2007).

7. Ш. Н. Абусалимов, С. К. Никольская, Г. Л. Старова, С. И. Селиванов, А. Г. Шавва, *ЖОрХ*, **42**, 50 (2006).
8. С. И. Селиванов, Г. Л. Старова, Ш. Н. Абусалимов, А. Г. Шавва, *ЖОрХ*, **42**, 215 (2006).
9. В. Н. Белов, В. Ю. Дудкин, Е. А. Урусова, Г. Л. Старова, С. И. Селиванов, С. В. Николаев, Н. Д. Ещенко, С. Н. Морозкина, А. Г. Шавва, *Биоорган. химия*, **33**, 315 (2007).
10. С. И. Селиванов, С. Б. Цогоева, А. Г. Шавва, *ЖОрХ*, **34**, 1350 (1998).
11. W. Bridge, A. J. Crocker, T. Cubin, A. Robertson, *J. Chem. Soc.*, 1530 (1937).

Санкт-Петербургский государственный
университет, химический факультет,
Санкт-Петербург 198504, Россия
e-mail: Alexander.Shavva@gmail.com
e-mail: i_norik@mail.ru

Поступило 01.04.2009