

ФИО соискателя Церфас Мария Олеговна

Название диссертации *Синтез новых стероидных антиэстрогенов путем направленной модификации кольца D природного гормона эстрогена*

Шифр специальности –1.4.3. – органическая химия

Химические науки

Шифр диссертационного совета 24.1.092.01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института <http://zioc.ru/>

09 апреля 2024 года

Дата приема к защите

17 апреля 2024 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

18 апреля 2024 года

На правах рукописи



Церфас

Мария Олеговна

СИНТЕЗ НОВЫХ СТЕРОИДНЫХ АНТИЭСТРОГЕНОВ
ПУТЕМ НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ КОЛЬЦА D
ПРИРОДНОГО ГОРМОНА ЭСТРОНА

1.4.3 - органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Работа выполнена в лаборатории химии стероидных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)»

Научный руководитель: **Левина Инна Соломоновна** – д.х.н., вед.н.с. лаборатории химии стероидных соединений № 22 Института органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

Официальные оппоненты: **Абрамов Игорь Геннадьевич**, д.х.н., профессор, заведующий кафедрой "Общая и физическая химия" федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный технический университет», специальность 1.4.3 — органическая химия.

Латышев Геннадий Владимирович, к.х.н., ведущий научный сотрудник кафедры органической химии Химического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский Государственный университет имени М.И. Ломоносова», специальность 1.4.3 — органическая химия.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет».

Защита диссертации состоится «19» июня 2024 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.092.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук» по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук» и на официальном сайте Института по адресу <http://zioc.ru>. Автореферат размещён на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу <https://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Автореферат разослан «...» 2024 г.

Ваш отзыв в двух экземплярах, заверенный гербовой печатью, просим направлять по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 47, ученому секретарю Диссертационного совета ИОХ РАН.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 24.1.092.01
доктор химических наук

 Газиева Г. А.

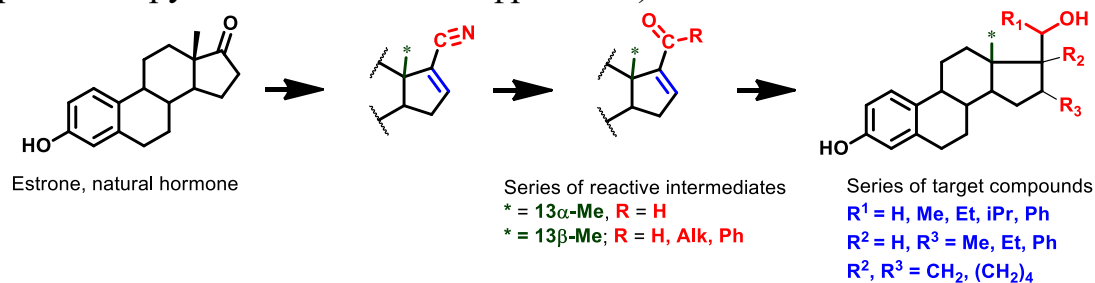
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Большие возможности функционализации стероидов позволяют направленно регулировать их биологические эффекты, поскольку модификации, вносящие даже минимальные изменения в молекулу стероида, могут как существенно увеличивать присущие исходной молекуле биологические свойства, так и подавлять их. По этой причине разработка новых стероидных терапевтических агентов путем направленной модификации стероидного ядра является **актуальным** направлением медицинской химии. Одной из областей исследований является создание новых антигормональных средств для лечения онкологических заболеваний. Так, рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний среди женщин во всем мире. Подавляющее большинство РМЖ представлено гормонозависимыми новообразованиями, рост клеток которых зависит от эстрогенов — женских половых гормонов. В здоровом организме эффекты эстрогенов сбалансированы и являются положительными, но пролиферативная активность эстрогенов в опухолевых клетках способствует их интенсивному росту и распространению. Главный элемент сигнального пути эстрогенов — рецептор эстрогенов α (ER α). Поскольку именно с этим рецептором связывают инициацию и прогрессирование РМЖ, существует необходимость в перспективных стратегиях разработки и синтеза новых антиэстрогенов, которые связываются с ER α и, в конечном итоге, ингибируют пролиферативную активность клеток опухолей. Однако эффективность существующих средств зачастую ограничена возможной резистентностью, связанной с мутациями рецептора, недостаточной тканевой селективностью, низкой биодоступностью и побочными действиями на нетаргетные ткани. Поэтому поиск новых противоопухолевых соединений для антиэстрогенной терапии продолжает оставаться **актуальной задачей**.

Ранее в лаборатории химии стероидных соединений ИОХ РАН была получена серия новых 3-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триенов с 17-гидроксиэтильной боковой цепью и 16 α ,17 α - трех- или шестичленным карбоциклом (или без него), проявивших цитотоксическую и ингибирующую ER α активности. Было показано, что увеличение объема 16,17-замещения в кольце D приводит к возрастанию антиэстрогенной активности, а наличие 17-гидроксиэтильной боковой цепи является критически важным для манифестации биологических эффектов этих соединений. Вместе с тем

влияние 17-боковой цепи таких стероидов на их биологические свойства требует специального исследования.

Исходя из этих предпосылок **предметом** настоящего исследования является синтез новых 3-гидрокси-17-(1'-гидроксиалкил(/алкиларил))-эстра-1,3,5(10)-триенов, содержащих и не содержащих дополнительные алкильные и/или циклоалкильные заместители в 16- и/или 16,17-положениях и изучение взаимосвязи между их структурой и биологической активностью. Подход к синтезу библиотеки целевых стероидов основывается на создании и дальнейшей модификации производных эстра-1,3,5(10)-триена, содержащих активированную двойную связь в 16,17-положении, сопряженную с модифицируемой электроноакцепторной группой в 17-положении (нитрильная группа или ацильный фрагмент).



Целью настоящего исследования является создание нового типа противоопухолевых стероидов - новых стероидных антиэстрогенов путем модификации кольца D природного гормона эстрона.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- разработать эффективные методы синтеза серий 3-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триенов природной (13 β) и эпимерной 13 α -конфигураций, с вынесенной в развитую 17-боковую цепь второй гидроксильной группой и содержащих (либо не содержащих) в 16- и/или 16,17-положениях простые углеводородные – алкильные (циклоалкильные) и алкиларильные – заместители;
- изучить *in vitro* их противоопухолевую активность (антипролиферативная активность, влияние на транскрипционную активность эстрогенного рецептора).

Научная новизна и практическая значимость проведенных исследований заключается в том, что впервые:

- ✓ создан класс новых 3-гидрокси-17-(1'-гидроксиалкил(/алкиларил))-эстра-1,3,5(10)-триенов и изучены взаимосвязи между их структурой и биологической активностью;
- ✓ разработана стратегия синтеза ключевых 3-метокси-17-ацилэстра-1,3,5(10)-триенов, основанная на реакциях 1,2- и 1,4-присоединения реактивов Гриньяра

к 3-метокси- Δ 16-17-карбонитрилу и реакции алкилирования литиевых енолятов 16,17-замещенных и незамещенных 3-метокси-17-ацетил-эстра-1,3,5(10)-триенов;

- ✓ впервые осуществлены синтезы 17-формил-, пропионил-, изобутирил-, бензоил-эстра-1,3,5(10),16-тетраенов, их производных, содержащих и не содержащих дополнительный трех- и шестичленный 16,17-карбоцикл, исходя из которых получены целевые 3-гидрокси-17-(1'-гидроксиалкил(/алкиларил))-эстра-1,3,5(10)-триены;
- ✓ все целевые соединения показали высокую антипролиферативную активность в отношении эстроген-зависимой линии клеток РМЖ, демонстрируя при этом широкий спектр воздействия на рецептор эстрогенов α – от эстрогенного, смешанного эстрогенного-антиэстрогенного, до антиэстрогенного эффектов.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: «VIII Молодежная конференция ИОХ РАН» (Москва 2019), «Ломоносов-2020» (Москва, 2020), «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Нижний Новгород, 2020), «ESMO 2020» (Париж, 2020), «IX Молодёжная конференция ИОХ РАН» (Москва, 2021), «Medchemschool 2021» (Новосибирск, 2021), «ESMO 2021» (2021), «МедХим-Россия 2021» (Волгоград, 2021), «VIII Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи - 2022»» (Санкт-Петербург, 2022).

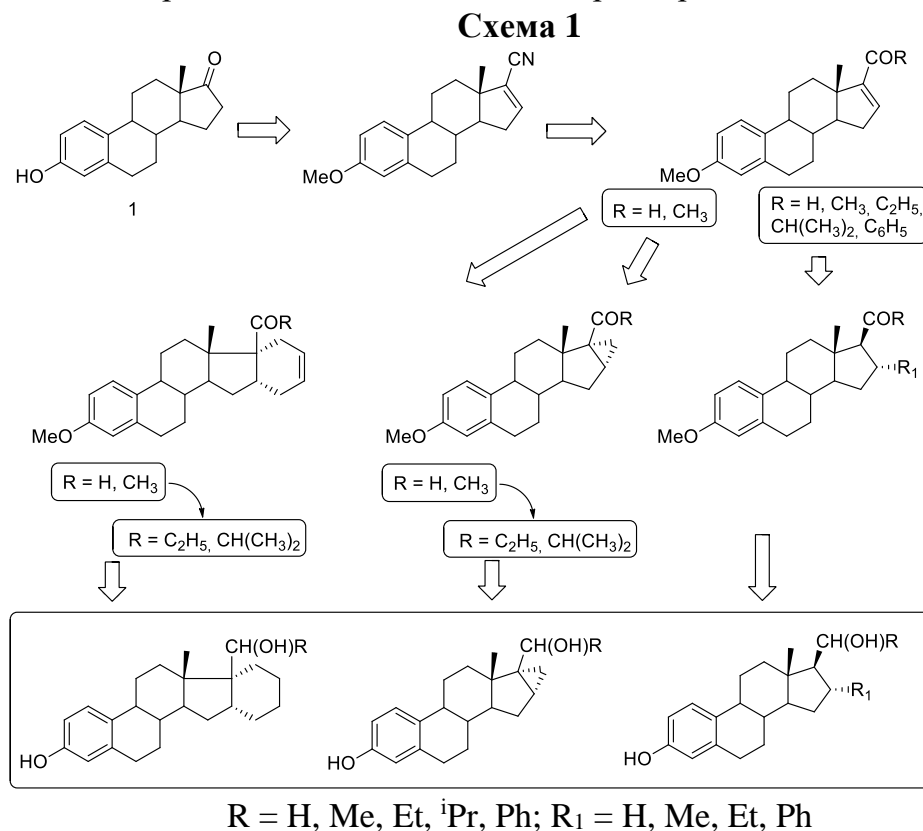
Основные результаты работы **опубликованы** в 3 статьях в научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ

Личный вклад автора состоял в поиске и систематизации литературных сведений, планировании и проведении экспериментов, анализе составов реакционных смесей и строения продуктов реакций (спектроскопия ЯМР, масс-спектрометрия, хромато-масс-спектрометрия), интерпретации экспериментальных данных (в том числе биологических испытаний).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, посвященного современным методам модификации эстроновых стероидов, обсуждения результатов, заключения, экспериментальной части, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Материал диссертации изложен на 162 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы, 19 рисунков и 74 схемы, список цитируемой литературы насчитывает 221 наименование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В качестве основной последовательности синтеза целевых соединений использованы реакции нитрильной группы 3-метоксиэстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбонитрила с диизобутилалюминийгидридом и реактивами Гриньяра для получения 17-ацильных стероидов, содержащих активированную двойную 16,17-связь. Для введения дополнительных углеводородных заместителей в кольцо D активированную двойную связь сопряженных карбонильных соединений (17-формил- и 17-ацетил-3-метоксиэстра-1,3,5(10),16-тетраенов), модифицировали с использованием реакций Дильса-Альдера, Кори-Чайковского, гидрирования, а также реакции сопряженного присоединения реактивов Гриньяра (схема 1). Для построения углеродного скелета стерически затрудненных стероидов, содержащих дополнительный циклогексановый и циклопропановый карбоциклы и объемную изопропильную группу в 17-боковой цепи, использована методика алкилирования их доступных 17-ацетильных аналогов метилиодидом в присутствии сильного основания. После построения указанными способами углеродного скелета новых соединений метиловый эфир в положении 3 расщепляется с высвобождением свободной фенольной группы, характерной для высокоаффинных лигандов ER α , а ненасыщенные фрагменты и кетогруппа в 17-боковой цепи восстанавливаются. Аналогичная схема применена для синтеза некоторых производных 13 α -эстрона.



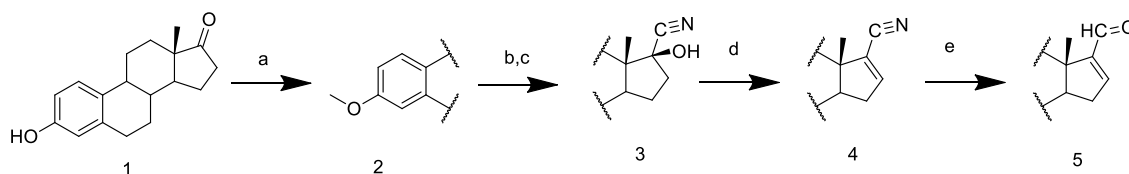
Полученный в соответствии с представленной схемой набор дигидроксистероидов исследовали на цитотоксическую активность в отношении эстрогензависимой линии клеток РМЖ человека MCF-7 (МТТ-тест) и оценивали их эффект на транскрипционную активность ER α в этих клетках методом ген-репортерного анализа.

1 Синтез 3-гидрокси-17 β -гидроксиметилэстра-1,3,5(10)-триена и его 16,17-циклогексано- и -циклопропано- производных (13 β -ряд)

1.1 Синтез 3-метоксиэстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбальдегида

Реакция полученного из эстраона **1** метилового эфира **2** с триметилсилилцианидом (TMSCN) приводит с высоким выходом к продукту присоединения TMSCN по 17-кетогруппе. Последующий кислый гидролиз с хорошим выходом дает циангидрин **3**, при дегидратации которого смесью POCl₃ и пиридина получен сопряженный нитрил **4**. Его реакция с диизобутилалюминийгидридом (DIBAL-H) при температурах -18 °С – -11 °С проходит практически мгновенно, промежуточный альдимин далее гидролизуют и выделяют целевой альдегид **5** (схема 2).

Схема 2

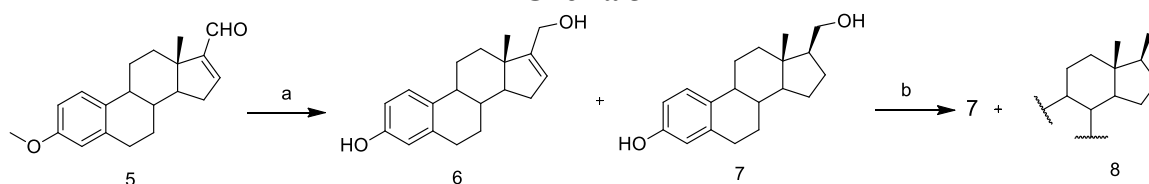


Реагенты и условия: а) диметилсульфат, NaH, ТГФ-ацетонитрил 6-12ч, 75%; б) TMS-CN, ZnI₂ CH₂Cl₂, кипячение 2 ч, колич.; в) этанол, вода, HCl, кипячение 4 ч, 80%; д) POCl₃, пиридин, кипячение 14 ч, 85%; е) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -18°С, далее MeOH, водн. HCl, 68%

1.2 Синтез 3-гидрокси-17 β -гидроксиметилэстра-1,3,5(10)-триена и его 16,17-циклогексано- и -циклопропано- производных. Реакции Дильса-Альдера и Кори-Чайковского 3-метоксиэстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбальдегида с бутадиеном и диметилсульфонийметилидом

Попытка гидрирования двойной 16,17-связи сопряженного альдегида **5** оказалась неудачной, поэтому сначала было проведено восстановление-деметилирование 3-метокси-17-карбальдегидного стероида **5**, а полученное при этом аллильное производное далее гидрировали (схема 3).

Схема 3

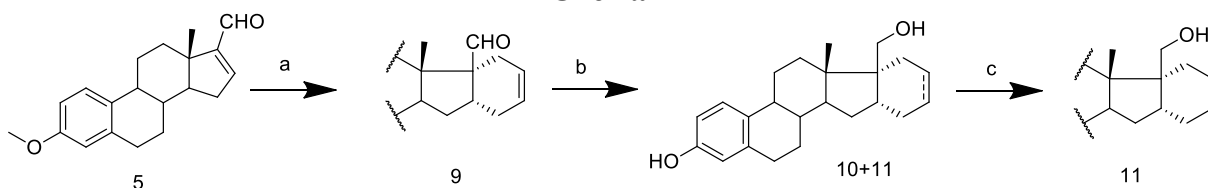


Реагенты и условия: а) DIBAL-H, толуол, кипячение 5 ч, 93% на смесь **6** и **7** (2:1); б) 1 атм. H₂, Pd/C, ТГФ-этанол, 43% **7** и 30% **8**

Восстановление-деметилирование карбальдегида **5** DIBAL-H привело к смеси 3-гидрокси-17-гидроксиметилэстра-1,3,5(10),16-тетраена **6** и -эстра-1,3,5(10)-триена **7** (2 : 1 по ЯМР ^1H). О наличии второго продукта свидетельствуют дополнительные синглет 18-метильной группы при δ_{H} 0.61 м.д. и триплет гидроксильной группы при δ_{H} 4.21 м.д., и заниженные величины интегральной интенсивности протонов, соответствующих аллильному фрагменту в спектре ЯМР ^1H . Частичное восстановление двойной связи объяснимо присоединением по ней гидрида алюминия в достаточно жестких условиях (продолжительное кипячение с гидридом алюминия в толуоле), тогда как последующий гидролиз при обработке реакционной смеси приводит к разложению промежуточных алюминийорганических соединений с образованием продукта восстановления двойной связи. Поскольку стероиды **6** и **7** обладали одинаковой хроматографической подвижностью, их разделение с помощью колоночной хроматографии оказалось затруднительным. Каталитическое гидрирование этой смеси привело к образованию целевого 3-гидрокси-17-гидроксиметилэстра-1,3,5(10)-триена **7** с выходом 43% после колоночной хроматографии. Кроме него в сравнимом количестве из реакционной смеси был выделен продукт гидрогенолиза аллилового спирта **6** – 3-гидрокси-17 β -метилэстра-1,3,5(10)-триен **8** (схема 3).

3-Метокси-17-формил-16 α ,17 α -циклогекс-3',4'-еноэстра-1,3,5(10)-триен **9** был получен катализируемой хлоридом алюминия реакцией Дильса-Альдера Δ^{16} -17-карбальдегида **5** с бутадиеном. Реакция проходит гладко за 2 ч, что объясняется высокой реакционной способностью сопряженного альдегида (схема 4).

Схема 4



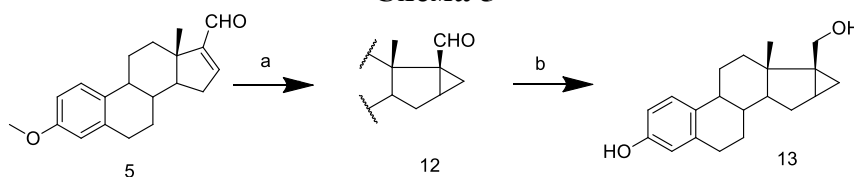
Реагенты и условия: а) бутадиен, AlCl_3 , CH_2Cl_2 , 25°C , 2 ч, 67%; б) DIBAL-H, толуол, кипячение 5 ч, 85%; в) 1 атм. H_2 , Pd/C, ТГФ-этанол, 67%

Каталитическое гидрирование двойной связи в циклоаддукте **9** в стандартных условиях (1 атм. H_2 , 10% палладий на угле, ТГФ, 25°C) привело к сложной смеси продуктов, поэтому вначале было проведено восстановление-деметилирование аддукта **9** до 17-гидроксиметильного производного **10**. При этом наблюдалось частичное восстановление двойной связи в циклогексеновом фрагменте аддукта с образованием гидрированного продукта **11**, как и в случае восстановления-деметилирования самого сопряженного альдегида **5**. Для получения целевого продукта **11** смесь ненасыщенного и насыщенного

гидроксиметильных производных **10** и **11** гидрировали, в результате чего был получен целевой дигидроксистероид **11** с выходом 67%.

Реакция Кори-Чайковского ненасыщенного альдегида **5** с диметилсульфонийметилидом привела к соответствующему циклопропановому стероиду **12** (схема 5). После стандартной обработки была получена достаточно сложная смесь, из которой продукт **12** был выделен с итоговым выходом 39%. Его восстановление-деметилование кипячением в толуольном растворе DIBAL-H привело к целевому дигидроксистероиду **13** с выходом 50% (схема 5).

Схема 5



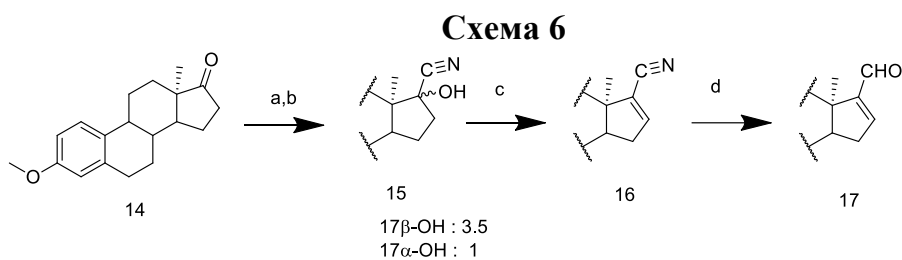
Реагенты и условия: а) Me_3SOI , NaH , ТГФ-ДМСО, 25°C , 24 ч, 39%; б) DIBAL-H, толуол, кипячение 6 ч, 50%

Методики деметилирования фенилметильных эфиров обычно включают использование сильных кислот Бренстеда или Льюиса, например раствора HBr в лед. AcOH , либо раствора VBr_3 в хлористом метиле, однако использование таких реагентов приводит к разрушению циклопропанового фрагмента. DIBAL-H оказался в данном случае достаточно мягким деметилирующим агентом, в значительной степени сохраняющим циклопропановый фрагмент, и позволил, объединив стадии восстановления 17-карбальдегида и деметилирования, получить целевой продукт с приемлемым выходом.

2.1 Синтез 3-метокси-13 α -эстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбальдегида и 17-гидроксиметильных производных 3-гидрокси-13 α -эстра-1,3,5(10)-триена

2.1.1 Стереохимические особенности реакций 13 α -стероидов по сравнению с аналогами с природной конфигурацией на примере синтеза 3-метокси-13 α -эстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбальдегида.

Описанный в разделе 1.1 подход к синтезу 3-гидрокси-17-гидроксиметильных эстратриенов природного 13 β -ряда был использован для синтеза аналогичных структур эпимерного 13 α -ряда (схема 6). В качестве исходного соединения для получения 13 α -серии был использован метиловый эфир 13 α -эстрона **14**, полученный с выходом 90% эпимеризацией метилового эфира эстрона **2** при кипячении с *o*-фенилендиамином в уксусной кислоте.



Реагенты и условия: а) TMS-CN, ZnI₂, CH₂Cl₂, кипячение 2 ч, колич.; с) этанол, вода, HCl, кипячение 4 ч, 83%; d) POCl₃, пиридин, кипячение 7 ч, 70%; e) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -18°C, далее водн. HCl, MeOH, 39%

Реакция метилового эфира 13α-эстрона **14** с TMSCN и последующий кислотный гидролиз промежуточных силиловых эфиров с высокими выходами привели к циангидрину **15** в виде смеси эпимеров с преобладанием 17β-гидрокси-17α-карбонитрила. Его дегидратация с высоким выходом дает сопряженный нитрил **16**, из которого по стандартной методике реакцией с DIBAL-H был получен 3-метокси-13α-эстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбальдегид **17**.

Следует отметить, что для метилового эфира эстрона **2** реакция с TMSCN дает соотношение 17α- и 17β-нитрилов равное 8 : 1 (по спектру ¹H ЯМР неочищенного силилового эфира), тогда как для его 13α-аналога **14** стереоселективность этой реакции оказалась ниже (3.5 : 1), что обусловлено различными конформациями молекул исходных стероидных кетонов. В случае эстрона с природной 13β-конfigurацией 18-метильная группа сильно затрудняет атаку нуклеофила по карбонильной группе с β-стороны по сравнению с α-стороной, тогда как для 13α-эпимера возможности для атаки с β- и α-стороны различаются уже не так сильно (рис. 1).

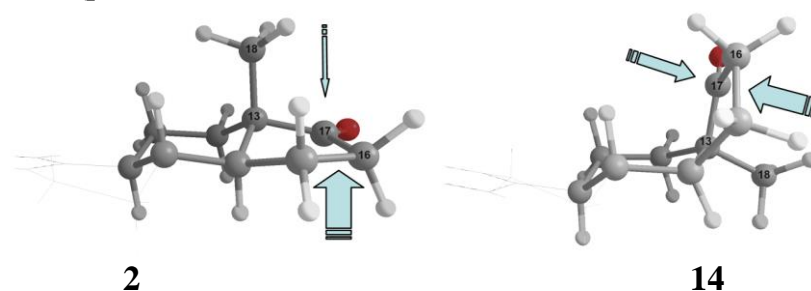
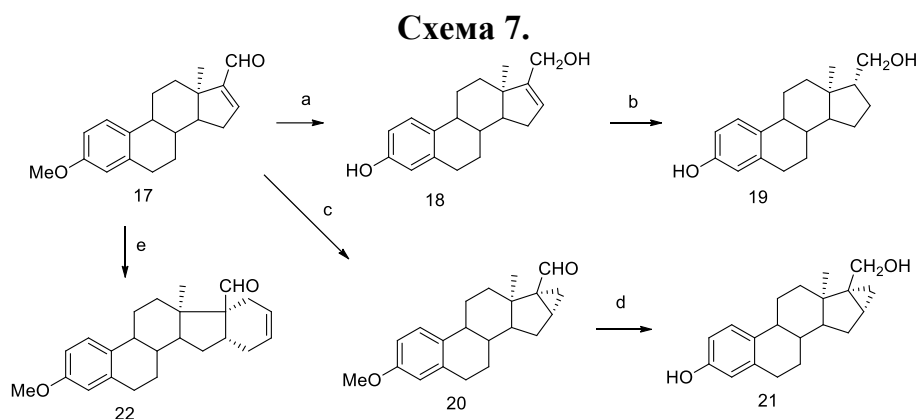


Рис. 1 Конформации колец С и D в метиловых эфирах эстрона **2** и 13α-эстрона **14**. Стрелками показаны направления нуклеофильной атаки кетогруппы.

2.1.2 Синтез 3-гидрокси-17α-гидроксиметил-13α-эстра-1,3,5(10)-триена и 3-гидрокси-17β-гидроксиметил-16α,17α-циклопропано-13α-эстра-1,3,5(10)-триена.

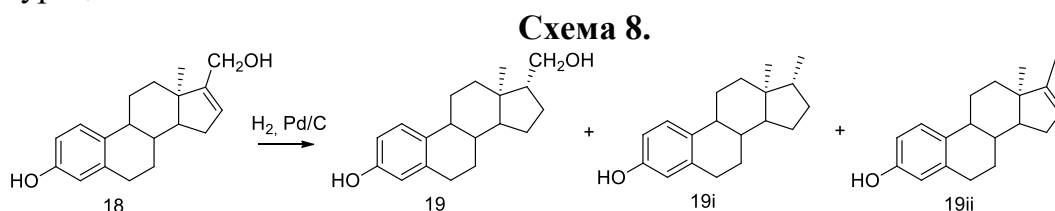
Реакция Дильса-Альдера 3-метокси-13α-эстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбальдегида с бутадиеном

Для получения 17-гидроксиметильных производных стероидов ряда 13α-эстра-1,3,5(10)-триена использована методология, разработанная для аналогичных соединений природного (13β) ряда (схема 7).



Реагенты и условия: а) DIBAL-H, толуол, кипячение 7.5ч, 76% **18**; б) 1 атм. H₂, Pd/C, ТГФ-этанол, 30%; с) Me₃SOI, NaH, ТГФ-ДМСО, 25°С, 4 ч, 27%; д) DIBAL-H, толуол, кипячение 3 ч, 52% **21**; е) бутadiен, AlCl₃, CH₂Cl₂, 25°С, 3.5 ч, 3%

Так, кипячением исходного альдегида **17** с DIBAL-H в толуоле был получен аллиловый спирт **18**. В отличие от такой же реакции сопряженного альдегида 13β-ряда, в данном случае не наблюдалось какого-либо восстановления аллильной двойной связи. Последующее гидрирование двойной связи аллилового спирта **18** привело к смеси продуктов (схема 8), из которой был хроматографически выделен основной продукт – 3-гидрокси-17α-гидроксиметил-13α-эстра-1,3,5(10)-триен **19**, структура которого подтверждена РСА. Примечательно, что в результате гидрирования двойной 16,17-связи 13α-эстратетраенов среди получающихся продуктов преобладают соединения с 17α-конфигурацией, тогда как гидрирование аналогичных 13β-стероидов приводит исключительно к продуктам с 17β-конфигурацией.



При этом образование побочных продуктов - фенолов **19i** и **19ii** свидетельствует о гидрогенолизе связи С-О аллилового спирта в данных условиях гидрирования (1 атм. H₂, 10% Pd/C, ТГФ - этанол, 25°С).

Реакция Кори-Чайковского альдегида **17** с диметилсульфосонийметилидом привела к соответствующему циклопропановому стероиду **20**, восстановление-деметилирование которого DIBAL-H позволило получить целевой циклопропановый дигидроксистероид **21** (схема 7). В отличие от реакции гидрирования 17-замещенных 13α-эстратетраенов, их циклопропанирование по Кори-Чайковскому приводит к преобладающим продуктам с β-конфигурацией 17-боковой цепи.

Циклогексеновый стероид **22** (схема 7) был выделен с низким выходом в результате тщательного хроматографического разделения смеси и многократной перекристаллизации продукта катализируемой кислотой Льюиса (AlCl_3) реакции Дильса-Альдера между сопряженным альдегидом **17** и бутадиеном. Полная конверсия исходного альдегида достигается за 4-5 часов, но при этом образуется большое число побочных продуктов. Анализ фракций методом ВЭЖХ-МС показал наличие в них изомерных соединений, обладающих при одинаковой молекулярной массе разной хроматографической подвижностью, а также различных продуктов полиприсоединения бутадиена к стероиду **17**. Вероятно, что в случае 13α -стероида мы наблюдаем пониженную селективность циклоприсоединения в сочетании со стерическими затруднениями (рис. 1), приводящую к продуктам как α -, так и β -атаки вместе с высокой степенью алкилирования ароматического ядра стероида и продуктами полиприсоединения. Для реакций 13α - Δ^{16} -17-формильного стероида, лимитирующей стадией которых является присоединение реагента по менее затрудненному для α -атаки 16-положению (реакция Кори-Чайковского), этот фактор оказывается менее значимым, соответственно, реакционная способность стероида и α -подход реагента в основном сохраняются.

Таким образом, структурные и конформационные особенности стероидов с 13α -конфигурацией – цис-сочленение колец C и D – и обусловленная этим конформационная лабильность данного фрагмента, проявляющаяся в ходе гидрирования, – снижают стереоселективность реакций по кольцу D и могут оказывать разнонаправленное влияние на реакционную способность стероида.

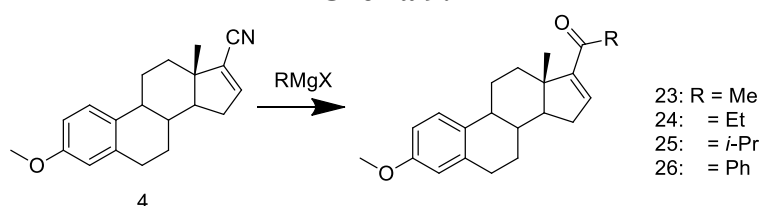
2.2 Реактивы Гриньяра в модификации 3-метоксиэстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбонитрила (сопряженного нитрила)

Несколько лет назад нами была разработана эффективная методика синтеза Δ^{16} -17-ацетильного стероида эстранового ряда. В основе этой методики лежит реакция метилмагнийиодида с сопряженным стероидным нитрилом – 3-метоксиэстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбонитрилом **4**. При этом в литературе отсутствуют примеры такой реакции на сопряженных стероидных нитрилах для отличных от метилмагнийиодида или бромида реактивов Гриньяра. Более того, количество примеров как 1,2-, так и 1,4-присоединения реактивов Гриньяра к сопряженным нестероидным нитрилам является достаточно ограниченным. В этой связи одной из задач данной работы являлось исследование взаимодействия сопряженного стероидного нитрила **4** с этил-, изопропил- и фенилмагнийгалогенидами.

2.2.1 Синтез сопряженных 17-ацилстероидов

Подход к синтезу сопряженных 17-ацилстероидов базируется на тщательном соблюдении разработанной ранее методики взаимодействия реактива Гриньяра с сопряженным стероидным нитрилом **4** (схема 9). Согласно методике, реактив Гриньяра в эфире или 2-метилтетрагидрофуране добавляют к толуольному раствору стероида и выдерживают при температурах от 60 °С до 75 °С до полной конверсии исходного нитрила. После этого при пониженной температуре и интенсивном перемешивании разлагают избыток реактива Гриньяра и магниевые соли полученного стероидного имида. Дальнейший гидролиз промежуточного имида уже проводится в кислой среде при повышенной температуре.

Схема 9.



Реагенты и условия: RMgX (≥ 2.2 моль-экв.) = MeMgI в эфире, EtMgI в эфире, $i\text{-PrMgBr}$ в 2-Ме-ТГФ, PhMgBr в эфире, толуол, 60-75 °С

Соблюдение этих условий позволило получить из сопряженного нитрила **4** в реакции с метилмагниййодидом, этилмагниййодидом, изопропилмагнийбромидом и фенилмагнийбромидом, соответственно, Δ^{16} -ацилстероиды **23** (выход 73%), **24** (выход 45%), **25** (выход 35%) и **26** (выход 63%). Сопряженные карбонильные стероиды являются основными продуктами в данных условиях реакции, несмотря на использование избыточного количества реактива Гриньяра (от двух мольных эквивалентов). В то же время относительное понижение выхода в реакции с изопропилмагнийбромидом свидетельствует о протекании ряда побочных процессов, в том числе сопряженного 1,4-присоединения реактива Гриньяра к исходному нитрилу **4**.

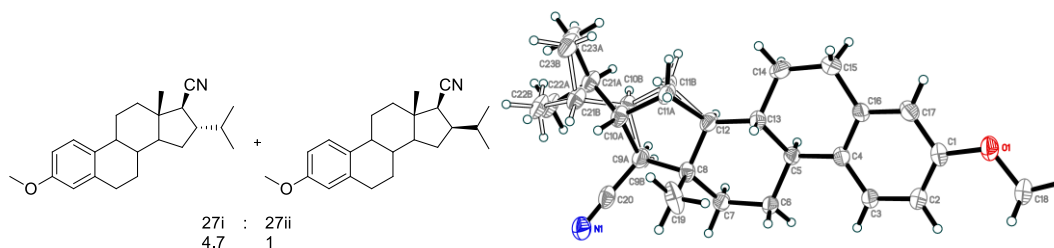


Рис. 2 Продукты **27i** и **27ii** сопряженного присоединения изопропилмагнийбромид к нитрилу **4**. Вид молекулы 16 ξ -изопропил-3-метокси-17 β -цианоэстра-1,3,5(10)-триена **27** в кристалле по данным РСА, представляющий чередование молекул 16 α - и 16 β -изопропил-17 β -карбонитрилов в узле элементарной ячейки кристалла.

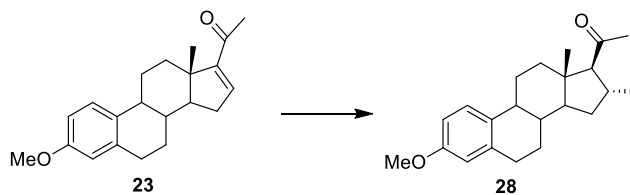
Доказательством тому служит выделенный хроматографически с выходом приблизительно 5% продукт 1,4-присоединения изопропилмагнийбромид к нитрилу **4**, представляющий собой смесь эпимерных 16 α - и 16 β -изопропил-17 β -

карбонитрилов **27i** и **27ii**, сокристаллизующихся в соотношении приблизительно 4.7:1 (рис. 2).

2.2.2 Последовательное присоединение метилмагнийиодида к сопряженному нитрилу с образованием 16 α -метил-17 β -ацетильного стероида

Высокая активность сопряженной 16,17-связи в 17-ацильных стероидах позволяет получить ряд 16 α -замещенных продуктов, биологическая активность которых вызывает интерес. Ранее в нашей лаборатории исходя из 3-метокси-17-ацетилэстра-1,3,5(10),16-тетраена **23** были получены два 3-гидрокси-17 β -(1'-гидроксиэтил)стероида – с аннелированным 16,17-циклопропановым фрагментом и стероид без дополнительных заместителей в 16,17-положениях, которые оказались эффективными цитотоксическими агентами, модуляторами и супрессорами ER α . В представленной работе к этим двум соединениям был добавлен аналог, содержащий 16 α -метильный фрагмент. Для получения предшественника такого стероида 3-метокси-17-ацетилэстра-1,3,5(10),16-тетраен **23** ввели в реакцию сопряженного 1,4-присоединения метилмагнийиодида в присутствии CuCl (схема 10), в результате с выходом 51% был получен 17 β -ацетил-16 α -метилстероид **28**.

Схема 10.

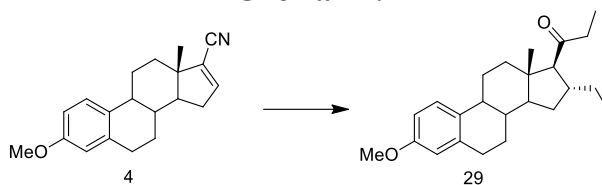


Реагенты и условия: MeMgI в эфире (10 моль-экв.), CuCl (0.3 моль-экв.), ТГФ, 25 °С, 51 %

2.2.3 Реакция реактивов Гриньяра с сопряженным стероидным нитрилом, приводящая к 16-замещенным 17-ацильным соединениям

Как показано в разделе 2.2.1, реакция сопряженного нитрила **4** с реактивами Гриньяра в неполярном растворителе (смесь толуол-диэтиловый эфир) приводит к преобладающим продуктам 1,2-присоединения – Δ^{16} -17-ацилстероидам. Отклонения от стандартной методики приводят к отчетливому снижению выхода целевых продуктов. В то же время в реакции сопряженного нитрила **4** с этилмагнийиодидом замена толуола на тетрагидрофуран в условиях, применяемых нами обычно для синтеза Δ^{16} -17-ацилстероидов (избыток эфирного раствора реактива Гриньяра, кипячение), неожиданно с выходом 50 % привела к двойному – 1,2- и 1,4-присоединению (схема 11). Методами масс-спектрометрии в составе реакционной смеси кроме основного продукта **29** среди прочих обнаруживались как продукты 1,4-присоединения к исходному сопряженному нитрилу **4**, так и продукт 1,2-присоединения **24**.

Схема 11.

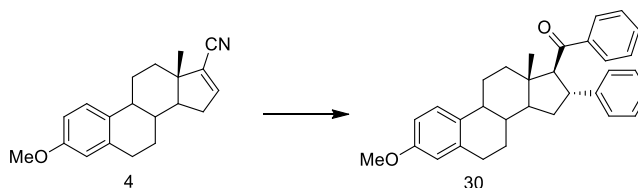


Реагенты и условия: EtMgI в эфире, ТГФ, 55-60 °С, 4 ч, 50%

В аналогичной реакции нитрила **4** с раствором изопропилмагнийбромида в тетрагидрофуране была получена сложная смесь продуктов, основными идентифицированными компонентами которой по данным масс-спектрометрии являлись, предположительно, эпимерные 16-изопропил-17-карбонитрилы **27**. Они же были выделены в виде смеси после продолжительного кипячения (72 ч) нитрила **4** с избытком изопропилмагнийбромида в присутствии CuBr.

В случае фенилмагнийбромида продукт двойного присоединения удалось выделить с выходом 45%, проведя реакцию нитрила **4** с большим избытком магнийорганического реагента в смеси толуол – диэтиловый эфир при 65-70 °С в присутствии 0.5 моль-экв. безводного бромида магния (схема 12).

Схема 12.

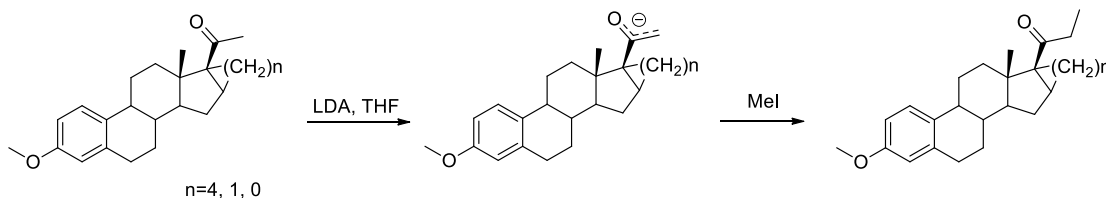


Реагенты и условия: PhMgBr в эфире, MgBr₂, толуол, 65-70 °С, 4 ч, 45%

2.3 Метилирование 16,17-циклоалкано-17-ацетилстероидов с целью получения стерически затрудненных 17-ацилстероидов

Для получения стерически затрудненных целевых стероидов 13β-ряда с «развитой» боковой цепью в 17-положении и дополнительным 16,17-карбоциклом было изучено алкилирование метилиодидом литиевых енолятов 3-метокси-17β-ацетил-эстра-1,3,5(10)-триенов (схема 13).

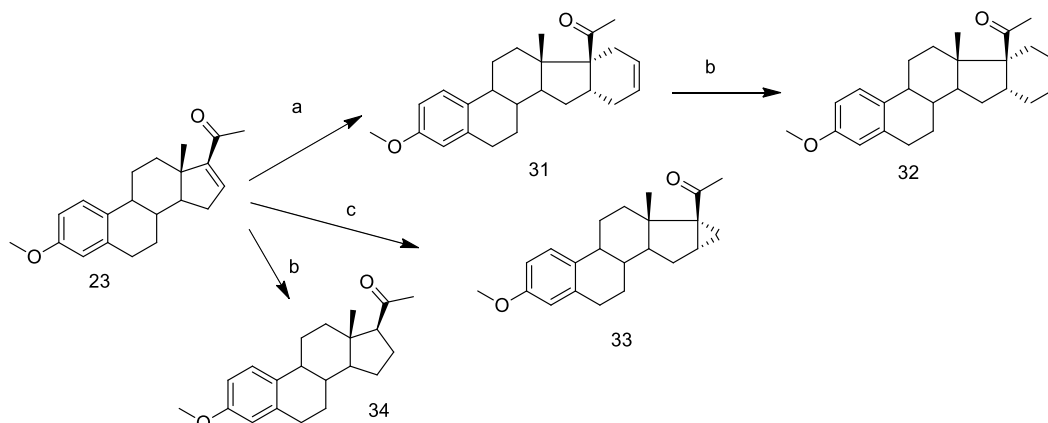
Схема 13



Исходные 17β-ацетилстероиды были синтезированы из Δ¹⁶-17-ацетилстероида **23**. Так, 17β-ацетил-3-метокси-16α,17α-циклогексаноэстра-1,3,5(10)-триен **32** был получен гидрированием аддукта **31** из катализируемой AlCl₃ реакции циклоприсоединения бутадиена к стероиду **23**, 17β-ацетил-3-метокси-16α,17α-циклопропаноэстра-1,3,5(10)-триен **33** - реакцией Кори-Чайковского

стероида **23** с диметилсульфоксонийметилидом, а незамещенный стероид **34** – каталитическим гидрированием стероида **23** (схема 14).

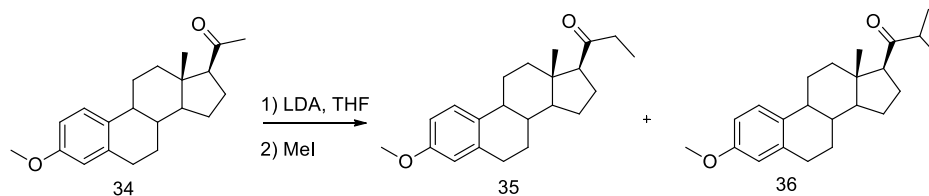
Схема 14



Реагенты и условия: а) бутadiен, AlCl_3 , CH_2Cl_2 , 24 ч, 25 °С, 60%; б) 1 атм. H_2 , 10% Pd/C , ТГФ, 95%; в) Me_3SOI , NaN , ТГФ-ДМСО, 25°С, 24 ч, 59%

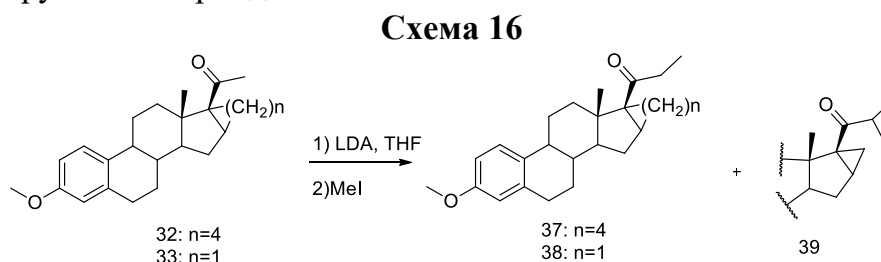
Монометилирование 17-ацетилстероидов проводили в тетрагидрофуране при комнатной температуре с использованием 30% избытка метилиодида, изначально добавленного в раствор стероида, и порционным добавлением диизопропиламида лития. После полной конверсии исходного стероида проводили стандартную экстрактивную обработку, колоночную хроматографию и/или кристаллизацию полученных продуктов. Количественные оценки при анализе состава смесей производились на основе интенсивности характеристических сигналов в спектрах ЯМР ^1H и с учетом интенсивности пиков в масс-спектрах высокого разрешения с электрораспылительной ионизацией (ESI). В случае стероида **34** наблюдалось алкилирование 17-ацетильной группы с образованием смеси моно- и диметилированных стероидов в соотношении 1:1.5 (по спектру ЯМР ^1H выделенной смеси стероидов) и суммарным практическим выходом 72% (схема 15). При этом полной конверсии монометилированного стероида **35** в дважды метилированный продукт **36** при этом достигнуто не было.

Схема 15.

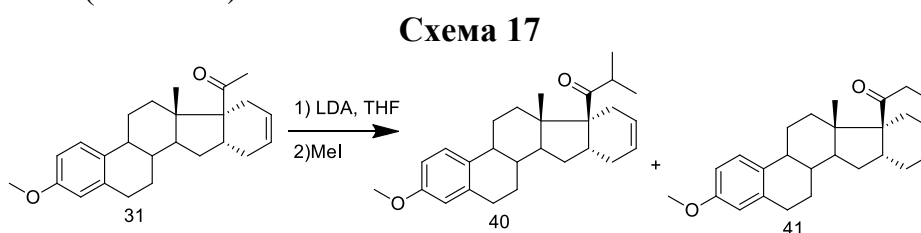


Алкилирование стероида **32** при соотношении реагентов 1: 1.3: 1.6 (стероид, метилиодид, LDA) дало соответствующий 17-пропионилэстратриен **37** с выходом 69%. В случае циклопропильного стероида селективность алкилирования оказалась ниже: в ходе реакции наблюдалось параллельное алкилирование исходного стероида **33** и получающегося из него продукта моноалкилирования **38**, и с

выходом 58 % была получена смесь 17-пропионил- и 17-изобутирил-16 α ,17 α -циклопропаностероидов **38** и **39** в соотношении 4 : 1 по ЯМР ^1H (схема 16). Таким образом, стерические факторы существенно влияют на степень алкилирования 17-ацетильной группы в стероиде.



Для получения диалкилированных стероидов использовались большие избытки основания и алкилирующего агента, однако во всех случаях введение второй метильной группы происходило не полностью. Так, для получения циклопропанового диметилированного стероида **39** исходный стероид, метилиодид и основание использовались в соотношении 1 : 4 : 6 при увеличенном времени реакции, но соотношение моно- и диметилированных продуктов при этом составило приблизительно 1:1. Эта реакция сопровождалась накоплением большого числа неидентифицированных побочных продуктов. В результате после хроматографического разделения были выделены моно - и диметилированные стероиды **38** и **39** с выходами 16 % и 17 %, соответственно. Метилирование циклогексенового стероида **31** (предшественник и аналог стероида **32**) в аналогичных условиях позволило получить после хроматографического разделения моно- и диметилированные стероиды **40** и **41** с выходами 15 % и 25 %, соответственно (схема 17).



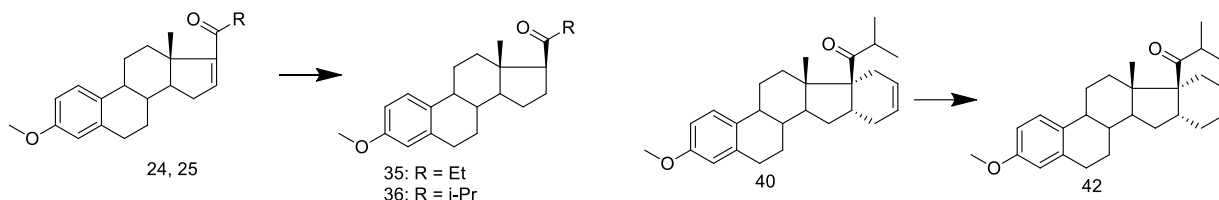
2.4 Синтез целевых 16- и 16,17-замещенных 3-гидрокси-17 β -(1'-гидроксиалкил)-эстра-1,3,5(10)-триенов из соответствующих 3-метокси-17-ацилстероидов

Синтез целевых дигидроксистероидов в целом включал в свою последовательность модификацию активированной Δ^{16} -связи ранее полученных стероидов: каталитическое гидрирование двойных связей Δ^{16} -17-ацилстероидов **24**, **25**, **26**, циклопропанирование бензоильного стероида **26**, гидрирование двойных связей алкилированного аддукта **40**. Полученные при этом вещества, как и продукты **28**, **29**, **30** присоединения реактивов Гриньяра, а также продукты **38**, **39**

алкилирования 17 β -ацетилстероидов, далее предполагалось деметилировать и восстановить.

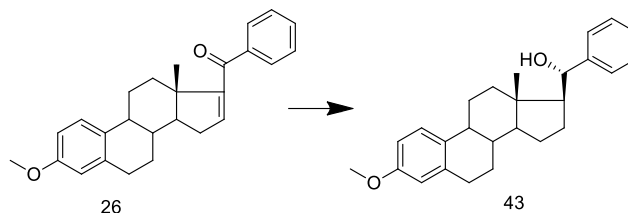
Каталитическое гидрирование Δ^{16} -17-ацилстероидов и аддукта **40** проходит с хорошими выходами (схема 18). Исключение составлял Δ^{16} -17-бензоильный стероид **26**, гидрирование которого с выходом 66% привело к восстановлению как Δ^{16} -связи, так и карбонильной группы (схема 19).

Схема 18



Реагенты и условия: 1 атм. H₂, 10 % Pd/C, ТГФ, 50-100 %

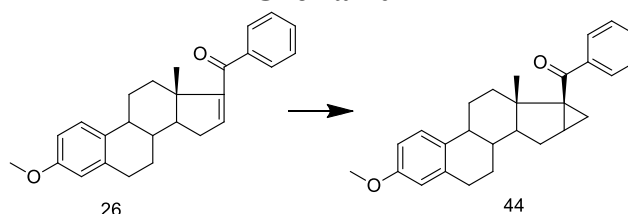
Схема 19



Реагенты и условия: 1 атм. H₂, 10% Pd/C, ТГФ, 66 %

В то же время стероид **26** вступает в реакцию Кори-Чайковского с диметилсульфоксонийметилидом и с выходом 66 % дает 16,17-циклопропаностероид **44** (схема 20).

Схема 20



Реагенты и условия: Me₃SOI, NaN, ТГФ-ДМСО, 25°C, 6 ч, 66 %;

Таким образом, была подготовлена серия 16,17-замещенных 3-метокси-17 β -ацилстероидов, являющихся непосредственными предшественниками указанных в задачах исследования 3-гидрокси-17 β -(1'-гидроксиалкил(/алкиларил))-эстратриенов.

Основным подходом к синтезу целевых дигидроксистероидов являлось использование диизобутилалюминийгидрида для одновременного восстановления 17-ацильной группы и расщепления метилового эфира в положении 3 стероида. При оценке результатов этой стадии отмечается некоторое снижение выходов в случае стерически затрудненных стероидов (схема 21 и таблица 1).

Схема 21

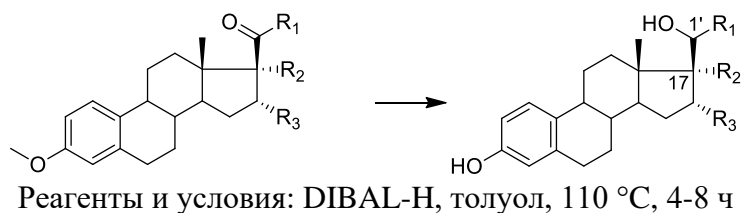


Таблица 1. Условия и продукты реакции 3-метокси-17-ацилстероидов с диизобутилалюминийгидридом (по схеме 21).

Исходный стероид	Заместители R ₁ , R ₂ , R ₃	Продолжит. кипячения	Продукт*, выход
28	Me, H, Me	8	45 (1' <i>R</i>), 35 %
30	Ph, H, Ph	8	46 (1' <i>S</i>), 10%
35	Et, H, H	7.5	47 (1' <i>R</i> /1' <i>S</i>) 5:1, 51 %
36	<i>i</i> -Pr, H, H	7.5	48 (1' <i>R</i> /1' <i>S</i>) 4:1, 68 %
38	Et, -CH ₂ -	4.5	49 (1' <i>S</i>), 39 %
39	<i>i</i> -Pr, -CH ₂ -	4.5	50 (1' <i>S</i>), 32 %
42	<i>i</i> -Pr, -(CH ₂) ₄ -	6.5	51 (1' <i>S</i>), 13 %
44	Ph, -CH ₂ -	4	52 (1' <i>R</i>), 24 %

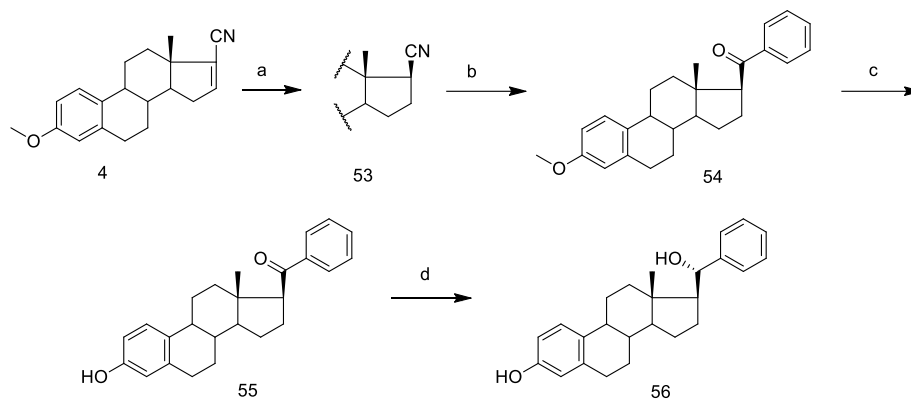
* В скобках дана конфигурация 1'-центра 17β-боковой цепи полученного стероида. В случае смеси (*R*)- и (*S*)-изомеров дано их соотношение.

Структура соединений **45**, **49**, **50** и **52** была подтверждена РСА.

Попытки деметилирования 3-метокси-17-(фенилгидроксиметил)-стероида **43** ВBr₃ или DIBAL-H с целью получения конечного 3-гидроксистероида оказались безуспешными и приводили к осмолению реакционной смеси. Поэтому для синтеза целевого стероида **56**, содержащего фенильный фрагмент в 17β-боковой цепи, была выбрана последовательная схема, включающая гидрирование сопряженного нитрила **4** и реакцию полученного насыщенного нитрила **53** с фенилмагнибромидом (схема 22). Бензоильный стероид **54** затем деметилировали кипячением в смеси HBr-AcOH с добавкой NaI. Полученный продукт **55** восстановили LiAlH₄ в ТГФ, в результате чего был получен целевой 3-гидрокси-17β-((1'*S*)-гидрокси(фенил)метил)-эстра-1,3,5(10)-триен **56**, структура которого подтверждена РСА (схема 22).

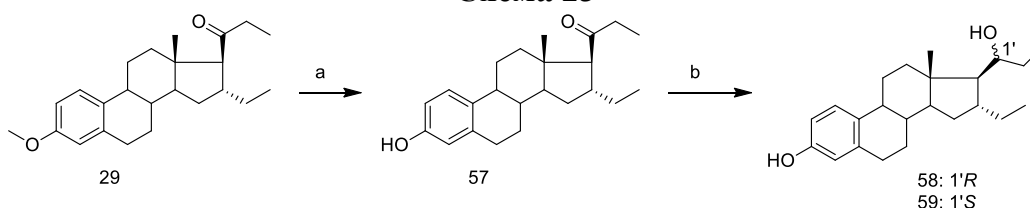
Постадийное деметилирование–восстановление смесью HBr-AcOH применялось также для получения целевых дигидроксистероидов из соответствующих 3-метокси-16α-этил-17β-пропионилэстра-1,3,5(10)-триена **29** и 3-метокси-17β-пропионил-16α,17α-циклогексаноэстра-1,3,5(10)-триена **37** (схема 23 и схема 24).

Схема 22



Реагенты и условия: а) 1 атм. H_2 , 10% Pd/C, ТГФ, 50 %; б) PhMgBr в эфире, толуол, 65-70 °С, 4 ч, 83 %; с) 48 % водн. HBr, AcOH, NaI, 3 ч, 55 %; д) $LiAlH_4$, ТГФ, 20 ч, 19 %.

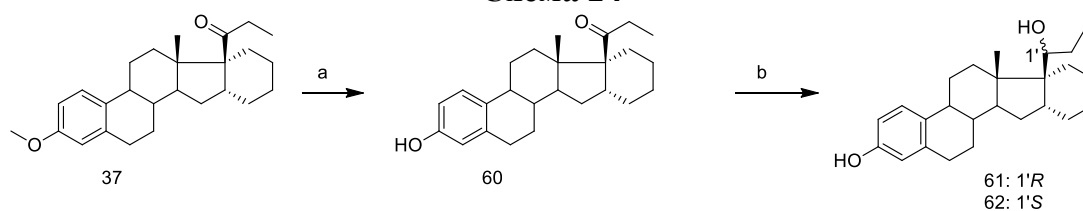
Схема 23



Реагенты и условия: а) 48 % водн. HBr, AcOH, NaI, 2.5 ч, 51 %; б) $LiAlH_4$, ТГФ, 0.5 ч, 16 % (1'R)-изомера и 31 % (1'S)-изомера

Промежуточный фенольный стероид **57** был выделен и охарактеризован, его восстановление $LiAlH_4$ привело к образованию двух диастереомерных стероидов **58** и **59**, которые были выделены хроматографически. В случае циклогексаностероида промежуточный стероид **60** сразу восстановили $LiAlH_4$ и дигидроксистероиды **61** и **62**, различающиеся конфигурацией гидроксильной боковой цепи, были выделены с выходами 51 % для (1'R)-изомера и 8 % для (1'S)-изомера, соответственно (схема 24).

Схема 24



Реагенты и условия: а) 48 % водн. HBr, AcOH, NaI, 2.5 ч; б) $LiAlH_4$, ТГФ, 0.5 ч, 51 % (1'R)-изомера и 8 % (1'S)-изомера

Конфигурации возникающего при восстановлении ацильной группы асимметрического центра были определены на основании ЯМР 1H спектров, исходя из аналогии с подтвержденными структурами, содержащими 17 β -(1'-гидроксиэтильный) фрагмент, и подтверждены для ряда соединений (**45**, **49**, **50**, **52**, **56**) методом однокристалльного РСА.

2.5 Оценка биологической активности целевых соединений


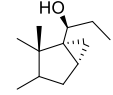
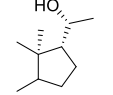

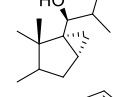
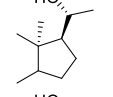

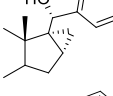
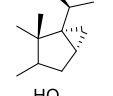

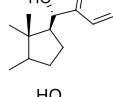
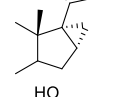

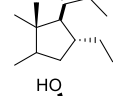
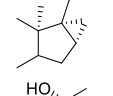

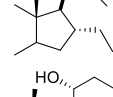
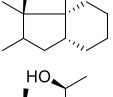

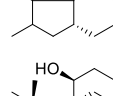
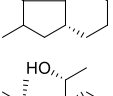

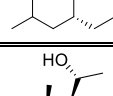
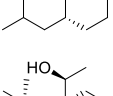

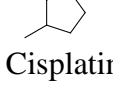
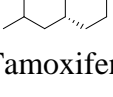
Биологические испытания были проведены в лаборатории онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (рук. к.б.н. А. М. Щербаков). Изучены две важнейшие биологические характеристики синтезированных стероидов: антипролиферативная активность (цитотоксичность), оценивающая потенциал соединения как противоопухолевого средства, и влияние на транскрипционную активность ER α , являющееся показателем эстрогенной/антиэстрогенной активности по активации/ингибирования экспрессии эстрогензависимых репортерных генов.

2.5.1 Антипролиферативные свойства целевых соединений (цитотоксичность)

Целевые соединения были испытаны *in vitro* на их антипролиферативную активность в отношении клеток гормонозависимого РМЖ линии MCF-7 и нормальных клеток эпителия молочной железы MCF-10A. Цитотоксичность оценивалась с помощью МТТ-теста, в качестве препаратов сравнения были использованы цисплатин и тамоксифен. Величины IC₅₀ для испытанных соединений приведены в таблице 2. Для обобщений в рамках оценки взаимосвязей «структура-активность» использовались также ранее полученные нами данные для соединений **63-72**.

Активность большинства соединений находилась в пределах IC₅₀ 1-10 мкМ. Три стероида **13**, **45**, **62** показали высокую активность со значением IC₅₀ равным 1 мкМ и ниже. Наибольшая активность выявлена для соединения **62** (0.6 мкМ). Соединения **48**, **52**, **56** были наименее активными. При этом ингибирование клеточного роста MCF-7 исследуемыми соединениями оказалось вполне сопоставимо с таковым для известного антиэстрогена тамоксифена и химиотерапевтического агента цисплатина, а соединение-лидер **62** показал на порядок большую активность.

Таблица 2. Величины IC₅₀ (концентраций полумаксимального ингибирования пролиферации) целевых соединений для клеток MCF-7 и MCF-10A.

Соединение	Ключевой фрагмент структуры	IC ₅₀ , мкМ		Соединение	Ключевой фрагмент структуры	IC ₅₀ , мкМ		Соединение	Ключевой фрагмент структуры	IC ₅₀ , мкМ	
		MCF-7	MCF-10A			MCF-7	MCF-10A			MCF-7	MCF-10A
7		5.5 ± 0.8	19.2 ± 2.3	49		< 1.6		64		6.0 ± 0.7	13.2 ± 1.5
11		7.1 ± 0.9	8.6 ± 1.0	50		2.6 ± 0.3		65		10.9 ± 1.5	24.0 ± 2.7
13		1.0 ± 0.2	2.5 ± 0.3	52		16.8 ± 1.8		66		0.87 ± 0.09	3.1 ± 0.4
19		6.1 ± 0.9	> 25	56		10.4 ± 0.9	> 25	67		0.47 ± 0.08	3.1 ± 0.4
21		4.7 ± 0.6	8.6 ± 0.9	58		2.5 ± 0.3		68		2.3 ± 0.4	7.5 ± 0.8
45		1.0 ± 0.2	2.6 ± 0.03	59		5.3 ± 0.5		69		6.8 ± 0.7	> 25
46		7.2 ± 0.8	10.7 ± 1.1	61		7.5 ± 0.8	> 25	70		4.6 ± 0.5	23.0 ± 2.5
47		6.2 ± 0.6		62		0.6 ± 0.07	0.4 ± 0.05	71		11.0 ± 1.2	>25
48		17.5 ± 1.5		63		0.15 ± 0.03	5.9 ± 0.5	72		13.9 ± 1.6	>25
				Cisplatin		7.4 ± 0.9	11.9 ± 2.1	Tamoxifen		5.3 ± 0.8	> 25

Рассмотрение взаимосвязи структуры и антипролиферативной активности для впервые полученных соединений, дополненное сведениями о ранее синтезированных стероидах **63-72**, выявило ряд основных тенденций. Так, соединения 13 α -ряда проявили меньшую активность по сравнению со своими изомерными аналогами природного 13 β -ряда. Наибольшая активность оказалась характерна для стероидов, содержащих малые заместители как в 17-боковой цепи (17-гидроксиметильные и 17-(1'-гидроксиэтильные)), так и в 16,17-положениях стероидного ядра (16-метил- и 16,17-циклопропаностероиды, стероиды без заместителей в кольце D). Исключением в этом ряду является стероид **62** – 3-гидрокси-17 β -(1'(S)-гидроксипропил)-16 α ,17 α -циклогексаноэстра-1,3,5(10)-триен, который был на порядок активнее своих 17-гидроксиметильных и 17-гидроксиэтильных гомологов и своего 1'(R)-изомера. Различия активности 1'(R)- и 1'(S)-изомеров остальных исследованных соединений были не столь существенны. Исследования активности целевых соединений на модели нормальных клеток молочной железы человека MCF-10A проводились оценочно, на ограниченном числе соединений. Большая часть рассмотренных соединений (15 из 20) показала более чем двукратную разницу величин IC₅₀ для клеток MCF-10A и MCF-7.

2.5.2 Влияние целевых соединений на транскрипционную активность рецептора эстрогенов α (активация и ингибирование ER α); взаимосвязь структуры целевых соединений и их эстрогенной и антиэстрогенной активности

Исследование влияния целевых дигидроксистероидов на транскрипционную активность ER α проведено методом ген-репортерного анализа на клетках MCF-7. Для оценки агонистической активности исследуемых соединений трансфицированные клетки обрабатывали испытуемыми соединениями в концентрации 10 нМ и 100 нМ, инкубировали в течение 24 ч и измеряли активность репортерных белков. Для оценки соединений как антагонистов рецептора трансфицированные клетки обрабатывали испытуемыми соединениями в концентрации 100 нМ, 1000 нМ и 10⁴ нМ и 17 β -эстрадиолом (индуктор активности ER α) в концентрации 10 нМ, также инкубировали в течение 24 ч и измеряли активность репортерных белков. В качестве веществ сравнения использовались 17 β -эстрадиол (агонист – активатор транскрипционной активности) и тамоксифен (SERM, в данном случае ингибитор эстрадиол-индуцированной транскрипционной активности).

Ряд синтезированных соединений (**7**, **13**, **21** и **68**) в концентрации 10 нМ проявили высокую агонистическую активность. Часть соединений демонстрировала средний уровень активности (**11**, **19**, **45**). Наименьшую

способность активировать рецептор показали соединения **46** и **62**. Минимальные агонистические эффекты в концентрации 100 нМ показали **46** и **62**. 3-Метоксистероид **43** у которого отсутствует критически важный для связывания с ER α фенольный фрагмент, использовался в качестве отрицательного контроля (рис.3).

Из полученных данных следует, что с ростом объема заместителей в кольце D агонистическая активность падает – хорошими агонистами оказались 17-гидроксиметильные стероиды, которые либо не содержат заместителей в 16,17-положениях, либо содержат «компактный» циклопропановый фрагмент. Худшими агонистами оказались стероиды с объемными заместителями в кольце D – стероиды **62** и **46**.

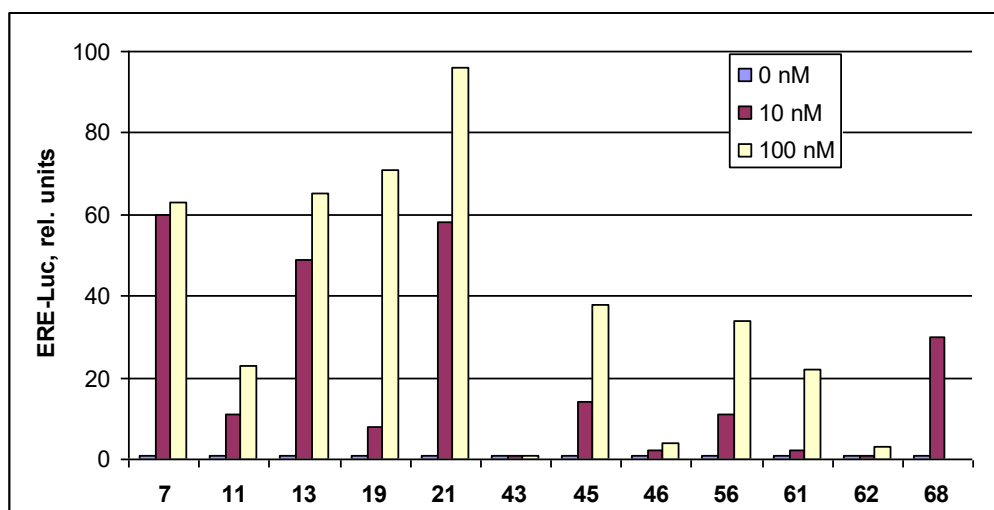


Рис. 3 Исследование активности ER α в клетках MCF-7 под действием исследуемых соединений (данные репортерного анализа, за 100 % принята активность под действием 10 нМ эстрадиола)

Тест на ингибирование эстрадиол-индуцированной транскрипционной активности ER α проведен на образцах стероидов, показавших минимальный эстрогенный эффект – соединениях **61** и **62** и 3-метоксистероиде **43**, а также на стероиде **19** с сильным доза-зависимым эстрогенным эффектом. Было найдено, что соединения **61** и **62** в концентрации 1000 нМ частично ингибировали активность ER α . Увеличение концентрации до 10⁴ нМ выявило значительное угнетение транскрипционной активности соединениями **19**, **61** и **62** (рис. 4).

Таким образом, изученные соединения демонстрируют широкий спектр воздействия на ER α – от агонистического, смешанного агонистического-антагонистического, до антагонистического.

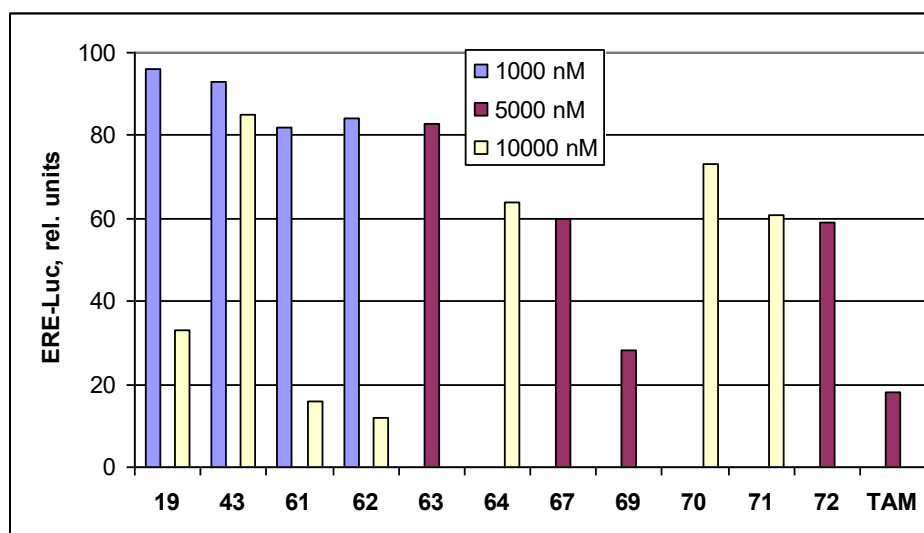


Рис. 4 Анализ активности люциферазы (ERE-Luc) в присутствии 10 нМ эстрадиола (E2) и исследуемых соединений в концентрациях 10^3 нМ, $5 \cdot 10^3$ нМ, 10^4 нМ. В качестве антиэстрогена сравнения использован тамоксифен (ТАМ) в концентрации $5 \cdot 10^3$ нМ. Активность люциферазы после обработки клеток E2 (без анализируемых соединений) приняли за 100 %

Можно утверждать, что в ряду исследованных дигидроксистероидов обнаруживается корреляция увеличения объема углеводородных заместителей в 17-гидроксиалкильной (алкиларильной) боковой цепи и кольце D с одной стороны, и ослаблением эстрогенных и усилением антиэстрогенных свойств изученных соединений – с другой.

В целом, сочетание антигормональных и цитотоксических свойств наиболее активных из синтезированных стероидов позволяет рассматривать их в качестве эффективных ингибиторов пролиферации на модели рака MCF-7 и перспективных для дальнейшего исследования как антиэстрогенов.

Выводы

Впервые получен класс новых 3-гидрокси-17-(1'-гидроксиалкил(алкиларил))-эстра-1,3,5(10)-триенов, содержащих и не содержащих дополнительные алкильные и/или циклоалкильные заместители в 16- и/или 16,17-положениях и изучены взаимосвязи между их структурой и биологической активностью.

Разработана стратегия синтеза целевых стероидов, основанная на модификации производных эстра-1,3,5(10)-триена, содержащих активированную двойную связь в 16,17-положении, сопряженную с электроноакцепторной группой в 17-положении.

Разработаны эффективные синтезы ключевых 3-метокси-17-ацилэстра-1,3,5(10)-триенов на основе 1,2- и 1,4-присоединения реактивов Гриньяра к 3-метокси- Δ^{16-17} -карбонитрилу и реакции алкилирования литиевых енолятов 16,17-замещенных и незамещенных 3-метокси-17-ацетилэстра-1,3,5(10)-триенов.

Впервые осуществлены синтезы 17-формил-, пропионил-, изобутирил-, бензоилэстра-1,3,5(10),16-тетраенов, а также их производных, содержащих и не содержащих дополнительный трех- и шестичленный 16,17-карбоцикл, исходя из

которых получены целевые 3-гидрокси-17-(1'-гидроксиалкил(/алкиларил))-эстра-1,3,5(10)-триены.

Предложен способ получения целевых 3-гидрокси-17-(1'-гидроксиалкил(/алкиларил))-эстра-1,3,5(10)-триенов одновременным восстановлением кетогруппы в 17-боковой цепи и деметилированием 3-метоксигруппы соответствующих 3-метокси-17-ацилстероидов с помощью диизобутилалюминийгидрида.

Показаны различия в реакционной способности стероидов 13 α - и 13 β -рядов, обусловленные их конформационными особенностями.

7. Все целевые соединения показали высокую антипролиферативную активность в отношении эстроген-зависимой линии клеток рака молочной железы, демонстрируя при этом широкий спектр воздействия на рецептор эстрогенов α – от эстрогенного, смешанного эстрогенного-антиэстрогенного, до антиэстрогенного эффектов. Обнаружена корреляция между увеличением объема углеводородных заместителей в 17-гидроксиалкильной (алкиларильной) боковой цепи и в стероидном кольце D, и ослаблением эстрогенных и усилением антиэстрогенных свойств изученных соединений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Церфас М. О. Ключевые структуры в синтезе стероидных противоопухолевых агентов. синтез 16-дегидро-17-карбальдегидов ряда 13 β - и 13 α -эстратриенов / М. О. Церфас, Ю. В. Кузнецов, И. С. Левина, И. В. Заварзин // Изв. АН. Сер. хим. – 2019. - № 12. - С. 2350-2354
2. Церфас М. О. Ключевые структуры в синтезе стероидных противоопухолевых агентов. методы наращивания боковой прегнановой цепи в положении 17 β 3-метокси-19-норпрегна-1,3,5(10)-триен-20-онов, содержащих и не содержащих дополнительный 16 α ,17 α -карбоцикл / М. О. Церфас, Ю. В. Кузнецов, В. В. Князев, И. С. Левина, И. В. Заварзин // Изв. АН. Сер. хим. – 2022. - № 8. - С. 1806-1817
3. Scherbakov A. M. Antiproliferative effects of 13 α / β -steroids on triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells: unraveling intracellular signaling without ER α / A. M. Scherbakov, Y. V. Kuznetsov, M. A. Yastrebova, A. I. Khamidullina, D.V. Sorokin, M. O. Tserfas, I. S. Levina // Braz. J. Pharm. Sci. – 2023. – V. 59. – E22540
4. Церфас М. О. Подходы к синтезу новых модифицированных стероидных антиэстрогенов / М.О. Церфас, А. С. Черкасова, Ю.В. Кузнецов, И.С. Левина // «VIII Молодежная конференция ИОХ РАН» - Москва – 2019 - С. 175
5. Церфас М. О. «Разветвляющийся» подход к синтезу новых стероидных антиэстрогенов / М.О. Церфас, Ю.В. Кузнецов, И.С. Левина, И.В. Заварзин // Тезисы докладов конференции Ломоносов-2020 – Москва – 2020 - С. 957
6. Церфас М. О. Синтез новых стероидных антиэстрогенов путем направленной модификации природного гормона эстрона / М.О. Церфас, Ю.В. Кузнецов, И.С. Левина, И.В. Заварзин // Сборник тезисов докладов Шестой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» - Нижний Новгород – 2020 - С. 113

7. Scherbakov A.M. Novel ER α degrader, 3,20(R)-dihydroxy-19-norpregnatriene, inhibits MCF-7 cell growth through p21/CDK2/CDK4 pathway / A. M. Scherbakov, I. S. Levina, Y. V. Kuznetsov, M. O. Tserfas, I. V. Zavarzin // «ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress 2020» - Paris – *Ann. Oncol.* 2020 – V.31(S1) – P. 58.

8. Церфас М.О. "Разветвляющийся" подход к модификации кольца D природного гормона эстрогена - синтез новых стероидных антиэстрогенов / М.О. Церфас, Ю.В. Кузнецов, И.С. Левина, И.В. Заварзин // IX Молодёжная конференция ИОХ РАН – Москва – 2021 – С. 43

9. Церфас М.О. Бифункциональные стероиды в «разветвляющемся» подходе к синтезу новых стероидных антиэстрогенов / М.О. Церфас, Ю.В. Кузнецов, И.С. Левина, И.В. Заварзин // Всероссийская конференция «Medchemschool 2021» - Новосибирск - 2021 – С. 139.

10. Scherbakov A.M. The design and development of novel pentaranes: Paving the way to EMT inhibition in triple-negative breast cancer cells / D.I. Salnikova., D.V. Sorokin., Y.V. Kuznetsov, M.O. Tserfas, I.V. Zavarzin, I.S. Levina // «ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress 2021» - *Ann Oncol.* – 2021 – V. 32(S5). – P. 364.

11. Церфас М.О. Синтез 16,17-замещенных дигидроксиэстратриенов – новых стероидных антиэстрогенов / М.О. Церфас, Ю.В. Кузнецов, И.С. Левина, И.В. Заварзин // Международная конференция «МедХим-Россия 2021» - Волгоград - 2021 – С. 519

12. Щербаков А.М. Исследование противоопухолевой активности новых 3,20-дигидрокси-19-норpregна-1,3,5(10)-триенов природного и 13 α -рядов на клетках трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231: поиск молекулярных мишеней / А.М. Щербаков, Ю.В. Кузнецов, М.О. Церфас, М.А. Ястребова, А.И. Хамидуллина // Материалы VIII Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи - 2022» - Санкт-Петербург - 2022 - С.76-77