

Кузнецов Юрий Владимирович

«Новые стероидные антиэстрогены. 3,20-Дигидрокси-19-норпрегнатиены: синтез, молекулярное моделирование и биологическая оценка»

02.00.03

Химические науки

Шифр диссертационного совета Д 002 222 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/>

10 декабря 2018 года

Дата приема к защите

19 декабря 2018 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК vak3.ed.gov.ru

26 декабря 2018 года

На правах рукописи



Кузнецов
Юрий Владимирович

НОВЫЕ СТЕРОИДНЫЕ АНТИЭСТРОГЕНЫ. 3,20-ДИГИДРОКСИ-19-
НОРПРЕГНАТРИЕНЫ: СИНТЕЗ, МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2018

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., в.н.с. лаборатории химии стероидных соединений № 22 Института органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

Официальные оппоненты: **Андрей Федорович Миронов** – д.х.н., проф. кафедры химии и технологии биологически активных соединений Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова Московского технологического университета.

Пржевальский Николай Михайлович – д.х.н., проф. кафедры химии факультета почвоведения, агрохимии и экологии Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А.Тимирязева.

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

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 <http://zioc.ru>

Защита диссертации состоится «27» февраля 2019 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.222.01 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.

Автореферат разослан «14» января 2019 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 002.222.01
доктор химических наук, профессор РАН



Дильман А.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Разработка эффективных лекарственных средств для лечения гормонозависимых форм рака является важным направлением медицинской химии. Одной из областей интенсивных исследований является поиск новых стероидных антагонистов стероидных гормонов, в частности, эстрогенов. Эстрогены, главным из которых является эстрадиол, играют существенную роль в развитии женской репродуктивной системы и регулируют важные физиологические процессы. В то же время пролиферативные эффекты эстрогенов в некоторых тканях органов-мишеней могут быть патологическими (неконтролируемая пролиферация). Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самым распространенных онкологических заболеваний во всем мире. Большинство злокачественных опухолей молочной железы (65-75%) представлено гормонозависимыми новообразованиями, в которых пролиферация опухолевых клеток в значительной степени зависит от эстрогенов. Исходя из этого, основными стратегиями гормональной терапии РМЖ являются блокирование биосинтеза эстрогенов и ингибирование (либо разрушение) рецепторов, опосредующих биологическую активность эстрогенов. Однако эффективность существующих лекарств ограничена возможной резистентностью, недостаточной тканевой селективностью и различными побочными действиями на нетаргетные ткани, низкой биодоступностью. Поэтому поиск новых противоопухолевых агентов для антиэстрогенной терапии является **актуальной задачей**, решение которой основывается на совместных достижениях химии, биологии и медицины.

Целью настоящего исследования является создание новых биологически активных 3,20-дигидрокси-19-норпрегна-1,3,5(10)-триенов природного и 13 α -рядов как содержащих, так и не содержащих дополнительный карбоцикл в 16 α ,17 α -положениях.

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

- разработать эффективные подходы к синтезу 3,20-дигидрокси-19-норпрегна-1,3,5(10)-триенов, получить целевые соединения и доказать их структуры;
- оценить возможности их связывания с рецептором эстрогенов α методом молекулярного моделирования;
- изучить *in vitro* их биологические эффекты как потенциальных антиэстрогенов и выявить перспективные соединения-лидеры для последующего углубленного анализа их биологической активности.

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

- разработан эффективный синтез 3-метокси-19-норpregна-1,3,5(10),16-тетраен-20-она, как ключевого исходного соединения и его неизвестного ранее 13 α -аналога;
- разработаны методы синтеза 3-метокси-16 α ,17 α -циклогексано- и -циклопропано-19-норpregна-1,3,5(10)-триен-20-онов 13 β - и 13 α -рядов реакциями Дильса-Альдера и Кори-Чайковского, соответственно, и 3-метокси-13 β - и 13 α -19-норpregна-1,3,5(10)-триен-20-онов каталитическим гидрированием 16,17-двойной связи исходных стероидов;
- разработан новый способ одновременного восстановления 20-кетогруппы и деметилирования исходных 3-метокси-20-кетостероидов с помощью диизобутилалюминийгидрида (DIBALH) и синтезированы целевые 3,20-дигидроксиды-19-норpregнатриены 13 β - и 13 α -рядов;
- методом молекулярного моделирования показано, что все целевые соединения связываются с эстрогенным рецептором α , но их комплексы с рецептором могут иметь различные конформации, определяющие их биологические эффекты;
- обнаружена высокая антипролиферативная активность (цитотоксичность) 3,20-дигидроксидов-19-норpregнатриенов в отношении эстроген-зависимой линии клеток РМЖ;
- найдено, что большинство 3,20-дигидроксидов-19-норpregнатриенов способны ингибировать рецептор эстрогенов;
- выявлены четыре соединения-лидера для последующего углубленного анализа их биологической активности.

Настоящая работа представляет собой комплексное исследование, направленное на разработку эффективного синтеза новых стероидных противоопухолевых агентов - 3,20-дигидроксидов-19-норpregна-1,3,5(10)-триенов эпимерных 13 β - и 13 α -рядов, как содержащих, так и не содержащих дополнительный карбоцикл в 16,17-положениях, и имеющее практическое значение для такой актуальной области медицины как гормональная терапия онкологических заболеваний.

Апробация результатов. Результаты работы были **представлены** на российских и международных конференциях: The 24th Conference on Isoprenoids (Białystok, Poland, 2018), VI Международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, Белоруссия, 2018), The 23rd Conference on Isoprenoids (Minsk, Belarus, 2016), конференция «Медицинская и биоорганическая химия» кластера конференций по органической химии "Оргхим-2016" (Репино, Россия, 2016).

Основные результаты работы **опубликованы** в 3 статьях в научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ, а также в патенте 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 и молекулярного моделирования).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, посвященного современным методам модификации эстрогеновых стероидов, обсуждения результатов, заключения, экспериментальной части, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Материал диссертации изложен на 169 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц, 24 рисунка и 73 схемы, список цитируемой литературы насчитывает 292 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Предметом настоящего исследования является новая серия стероидных антиэстрогенов, содержащих 3-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триеновый скаффолд с природной 13 β - и эпимерной 13 α -конфигурациями, с 17-(1'-гидрокси)этильной боковой цепью, и содержащих либо не содержащих дополнительный конденсированный в положениях 16,17 трех- или шестичленный карбоцикл. Эти соединения могут рассматриваться как производные 19-норpregна-1,3,5(10)-триенов, поскольку содержат pregнановую боковую цепь в положении 17. Логическими **предпосылками** для выбора предмета исследования явились проведенные ранее в нашей лаборатории исследования аналогов прогестерона с дополнительным шестичленным кольцом, конденсированным с циклом D стероидной молекулы (pregна-D'-пентараны), которые оказались высокоэффективными прогестинами. Докинг pregна-D'-пентаранов в лиганд-связывающий домен (LBD) рецептора прогестерона показал, что, несмотря на больший объем этих молекул по сравнению с прогестероном, они хорошо размещаются в LBD (рис. 1). Аналогично, лиганд-связывающий домен рецептора эстрогенов (LBD ER) имеет значительно больший объем по сравнению с эндогенным лигандом и также содержит субкарман, расположенный в 16 α ,17 α -области кольца D. На основании проведенного нами молекулярного моделирования аналогичных pregна-D'-пентаранам стероидов с ароматическим кольцом A мы предположили, что они могут разместиться в лиганд-связывающем кармане эстрогенного рецептора и, соответственно, проявить эстрогенную либо антиэстрогенную активность (рис. 1).

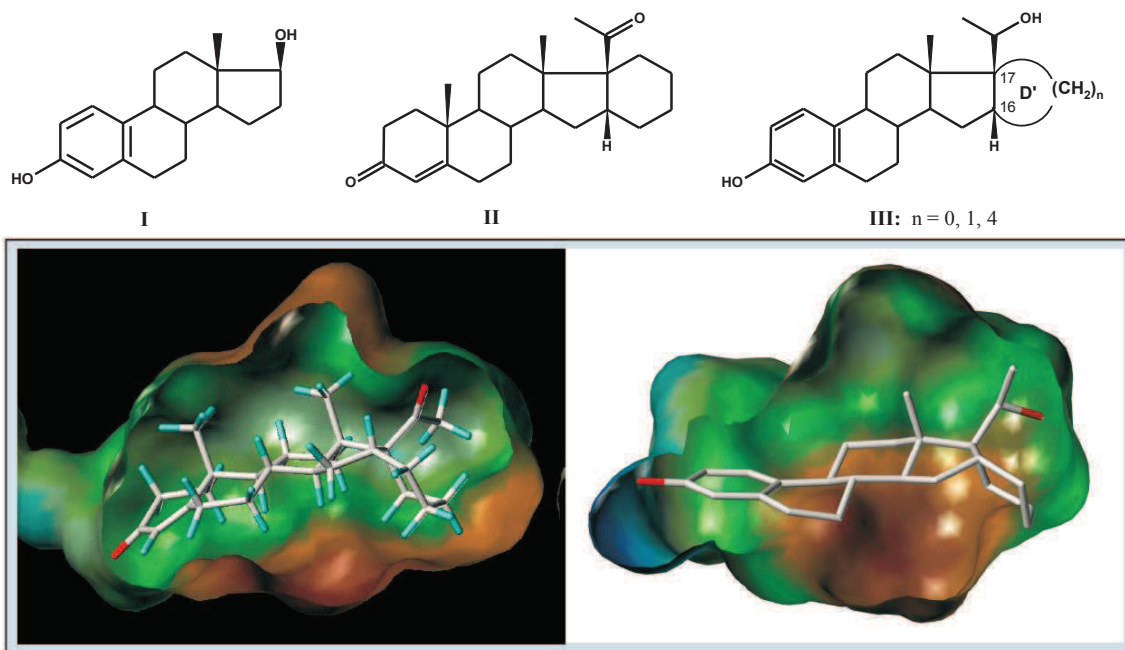


Рис. 1 Структуры эстрадиола (I), пентациклического аналога прогестерона – прегна-D'-пентарана (II) и группы 3,20-дигидрокси-19-норпрегнатриенов с природной 13β -конфигурацией (III), а также расчетные положения стероидов II и III ($n=4$) в лиганд-связывающем кармане (LBP) рецепторов прогестерона и эстрогенов, соответственно. Положение лигандов и гидрофобные градиенты внутри LBP приведены по результатам расчетов в программе DOCK 6.5.

В настоящей работе осуществлен синтез 3,20-дигидрокси-19-норпрегнатриенов с 13β - и 13α -конфигурациями стероидной молекулы, как содержащих, так и не содержащих дополнительный 16,17-сопряженный шести- и трехчленный карбоцикл. Ключевыми соединениями для их синтеза являются 3-метокси-19-норпрегна-1,3,5(10),16-тетраен-20-он и его эпимерный 13α -аналог.

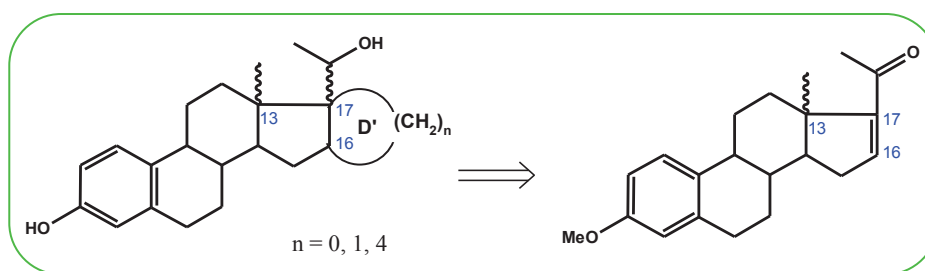


Рис. 2 Ретросинтетическая схема получения 3,20-дигидрокси-19-норпрегнатриенов из 3-метокси-19-норпрегнатетраенона

Соединения 13α -ряда представляет дополнительный интерес благодаря их структурным особенностям, влияющим на реакционную способность и определяющим биологическую активность.

1 Синтез 3,20-дигидрокси-19-норpregна-1,3,5(10)-триенов 13 β -ряда

1.1 Эффективный синтез 3-метокси-19-норpregна-1,3,5(10),16-тетраен-20-она

Ключевым соединением для синтеза 3,20-дигидрокси-19-норpregна-1,3,5(10)-триенов 13 β -ряда является 3-метокси-19-норpregна-1,3,5(10),16-тетраен-20-он **5**. В литературе описан ряд способов получения этого соединения, однако все они достаточно сложны, требуют использования достаточно редких реактивов и не всегда эффективны для препаративного синтеза.

В настоящей работе исследована реакция метилмагнийгалогенидов с 3-метоксиэстра-1,3,5(10),16-тетраен-17-карбонитрилом **4**, включая два пути получения циангидрина **3** из метилового эфира эстрона **1**, с его последующей дегидратацией (схема 1).

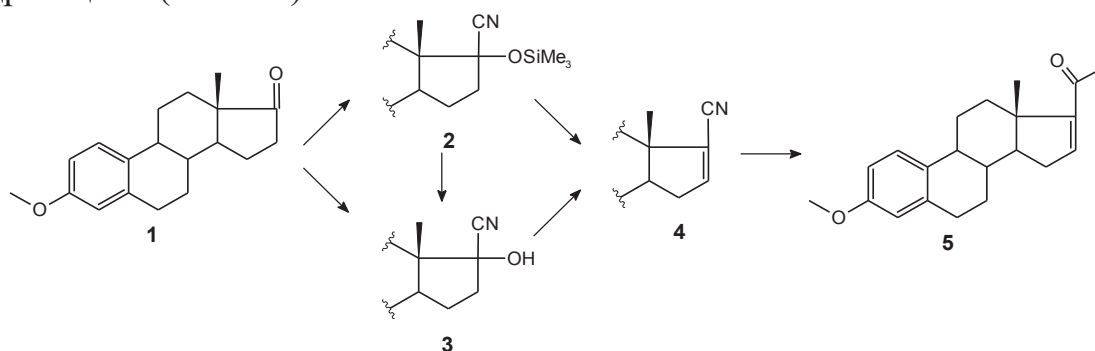


Схема 1. Получение 3-метокси-19-норpregна-1,3,5(10),16-тетраен-20-она **5** из метилового эфира эстрона **1**.

Ранее для получения циангидрина **3** использовалась система KCN или NaCN-AcOH-этанол. Недостатком этого способа является то, что реакция протекает в гетерогенной среде, с не полностью растворившимися исходными реагентами. Это затрудняет контроль и требует продолжительного (до нескольких суток) перемешивания реакционной смеси, при этом выход и качественные характеристики продукта варьируют от опыта к опыту. Напротив, реакция метилового эфира эстрона **1** с триметилсилилцианидом (TMSCN) и иодидом цинка в качестве катализатора приводит с высоким выходом к ожидаемому продукту **2** присоединения TMSCN по 17-кетогруппе. Последующий кислый гидролиз также с хорошим выходом дает циангидрин **3**. Преобладающим продуктом присоединения TMSCN по кетогруппе в положении 17 является 17 α -циано-17 β -триметилсилоксипроизводное, что вполне ожидаемо, учитывая наименьшие стерические затруднения при атаке с противоположной стороны к 18-метильной группе.

Реакция дегидратации стероидного циангидрина **3** или его силильного производного **2** кипячением в смеси POCl₃-пиридин является известным методом модификации стероидных соединений, в том числе эстранового ряда.

Наши попытки получить сопряженный нитрил **4** из силилированного циангидрина **2** с использованием добавки безводных CsF или KF показали, что такая реакция требует продолжительного кипячения: за 7 ч кипячения реакционной смеси в присутствии CsF выход нитрила составил 26%, кипячение в течение 16 часов с KF приводит к получению нитрила с выходом 48%. Попытка получить сопряженный нитрил из соответствующего триметилсилилциангидрина без добавления доноров фторид-иона дала выход лишь 14%. Поэтому для синтеза сопряженного нитрила **4** использовали циангидрин, полученный кислотным гидролизом продукта присоединения TMSCN к метиловому эфиру эстрона. В этой реакции последовательно происходит образование хлорфосфата и, затем, его элиминирование (схема 2). Поскольку пиридин и POCl₃ берутся в большом избытке, то единственным фактором, влияющим на выход реакции, является продолжительность кипячения на этапе элиминирования. Так, кипячение в течение 6, 12 и 20 часов привело к получению сопряженного нитрила **4** с выходами 53%, 82% и 68%, соответственно.

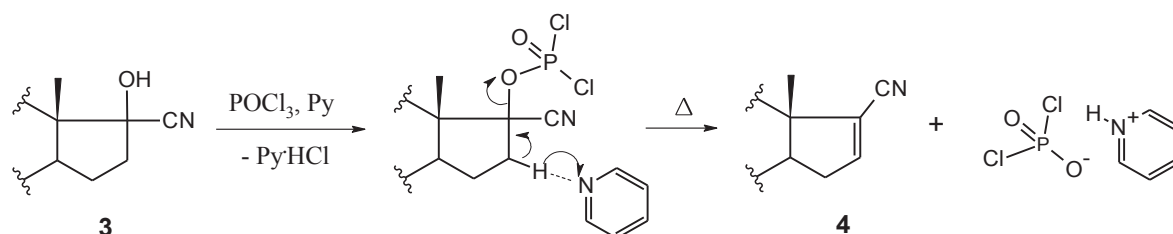


Схема 2. Механизм дегидратации циангидрина **3**.

Представленных в литературе сведений по реакции метилмагнийбромидом или иодида с сопряженным нитрилом **4** оказалось недостаточно, чтобы сделать выводы об оптимальных условиях получения целевого 3-метокси-19-норпрегна-1,3,5(10),16-тетраен-20-она **5**, поэтому было проведено расширенное исследование по поиску оптимальных условий данной реакции.

Поскольку двухстадийный механизм этого процесса включает взаимодействие реактива Гриньяра с сопряженным нитрилом **4** и последующий гидролиз образовавшегося при этом имина (схема 3), требовалось найти оптимальные условия для обеих стадий, сочетающие высокий итоговый выход и приемлемое время процесса. В качестве исходных магнийорганических соединений использовались MeMgBr и MeMgI, в экспериментах варьировались соотношение реагентов, температура реакционной смеси, состав растворителя и условия (время, температура, перемешивание) гидролиза промежуточного имина. Были практически оценены литературные способы проведения реакции и обработки реакционной смеси, в результате чего были найдены оптимальные условия проведения реакции сопряженного нитрила **4** с метилмагниййодидом: соотношение нитрила и MeMgI приблизительно 1:2.2, кипячение в растворителе – смеси толуола и диэтилового эфира в приблизительном

соотношении 1.6:1, с т. кип. 60-65°C, - из расчета приблизительно 7.5 мл на 1 ммоль исходного нитрила.

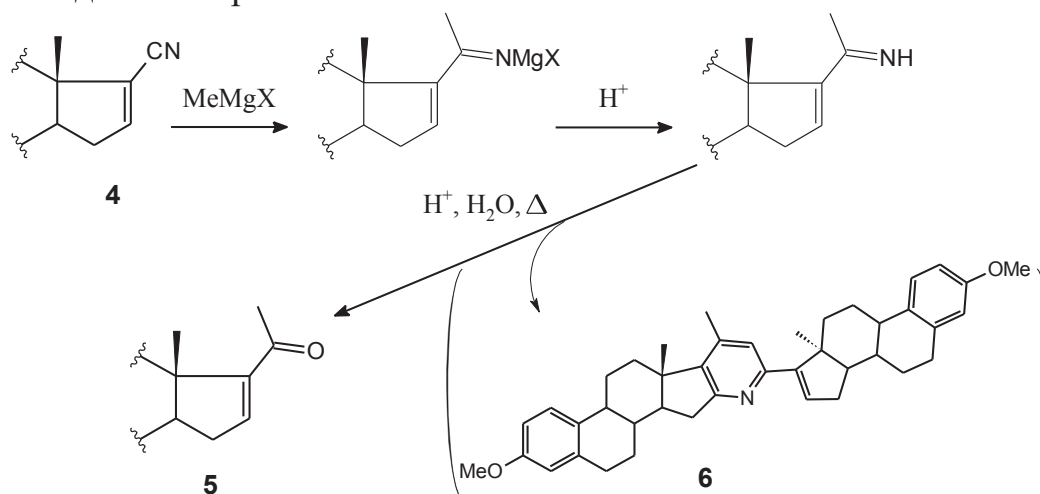


Схема 3. Реакция сопряженного нитрила **4** с метилмагнийгалогенидами.

Мы не выявили существенной разницы между MeMgBr и MeMgI в этой реакции. Также было установлено, что обычно указываемый в литературе 4-х и более кратный избыток реактива Гриньяра не повышает выход конечного продукта.

Для разложения промежуточного имина была выбрана схема с добавлением уксусной кислоты для разложения магниевой соли при контролируемой температуре (не выше 15°C) и интенсивном перемешивании реакционной смеси, с последующим кипячением в присутствии разбавленной соляной кислоты. Превышение температуры либо локальный перегрев в процессе прибавления уксусной кислоты приводят к падению выхода целевого продукта и увеличению числа побочных соединений, среди которых обнаружен продукт димеризации **6** («димер»). Структура этого вещества была определена методами ЯМР и подтверждена рентгеноструктурным анализом (рис.3).

Возможный механизм образования димерного продукта включает присоединение по Михаэлю нуклеофильного фрагмента имина к активированной двойной связи получающегося кетона или протонированного имина с последующей катализируемой кислотой конденсацией альдольного типа (схема 4). Полученный дигидропиридиновый фрагмент претерпевает ароматизацию.

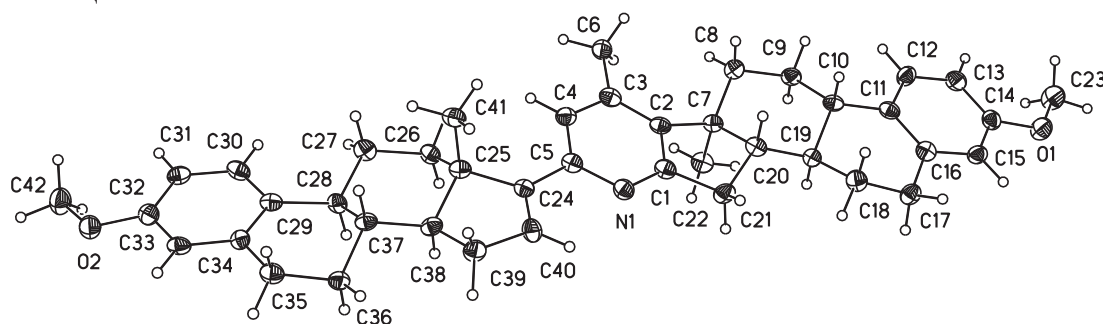


Рис. 3 Общий вид молекулы «димера» **6** в кристалле.

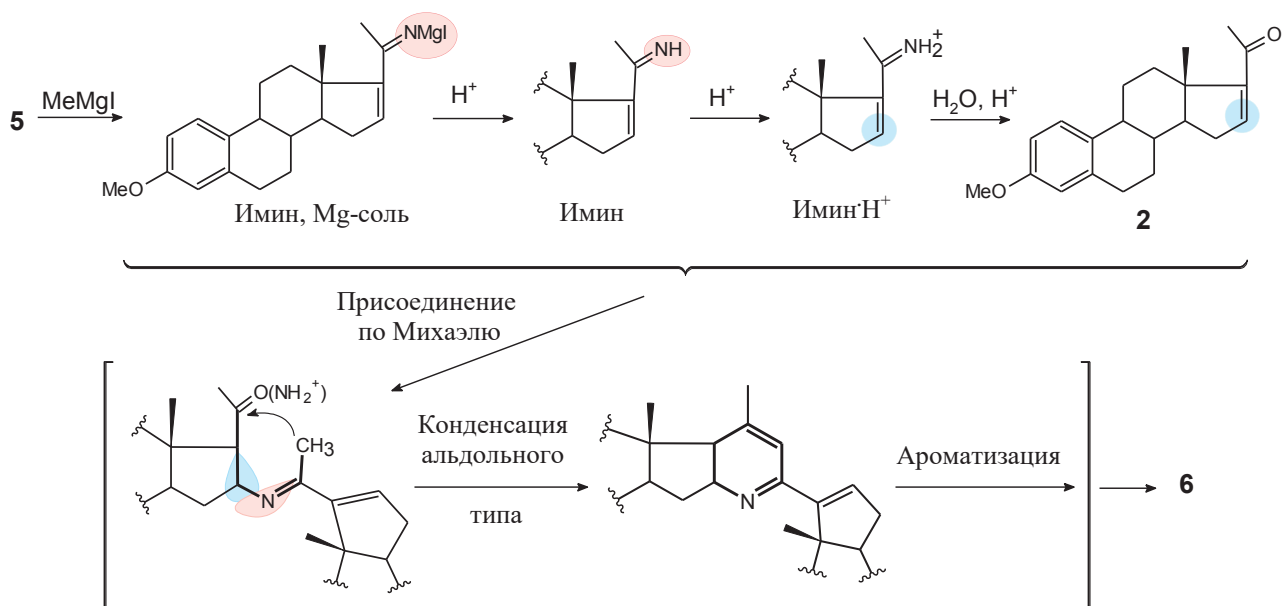


Схема 4. Предположительный механизм образования «димера» **6** в реакции сопряженного нитрила **5** с метилмагниййодидом.

Таким образом, разработан эффективный препаративный способ синтеза 3-метокси-19-норпрегна-1,3,5(10),16-тетраен-20-она (**2**) - ключевого соединения для серии биологически активных стероидов эстранового и прегнанового рядов. Предложены условия синтеза целевого соединения с высоким выходом при отсутствии побочных продуктов.

1.2 Синтез моно- и дигидроксипроизводных прегнатриенов 13 β -ряда с дополнительным шестичленным карбоциклом 5

Катализируемая кислотой Льюиса (AlCl_3) реакция Дильса-Альдера сопряженного кетона **5** и бутадиена позволила с высоким выходом получить пентациклический стероид **7**, содержащий дополнительный 16 α ,17 α -циклогексеновый фрагмент. Стероид **7** гидрировали в присутствии 10% Pd/C (схема 5). Гидрированный аддукт **8** деметилировали смесью 48%-ной HBr/NaI в ледяной уксусной кислоте, что с высоким выходом привело к 3-гидроксистероиду **9**. Добавка эквимольного количества NaI как источника активного нуклеофила в стандартную систему для деметилирования позволило значительно сократить время реакции (с 6 до 3 часов).

Восстановлением 20-кетогруппы стероида **9** LiAlH_4 в ТГФ были получена смесь 3,20-диолов, из которой был выделен только один энантиомер **10a** с 20(R)-конфигурацией. В то же время кипячение 3-метокси-20-кетостероида **8** в толуольном растворе диизобутилалюминийгидрида (DIBALH) привело к одновременному восстановлению 20-кетогруппы и деметилированию и позволило получить диастереоизомерную смесь 3,20-диолов с повышенным содержанием 20(S)-изомера **10b**. Индивидуальные изомеры **10a** и **10b** были выделены из смеси с помощью обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

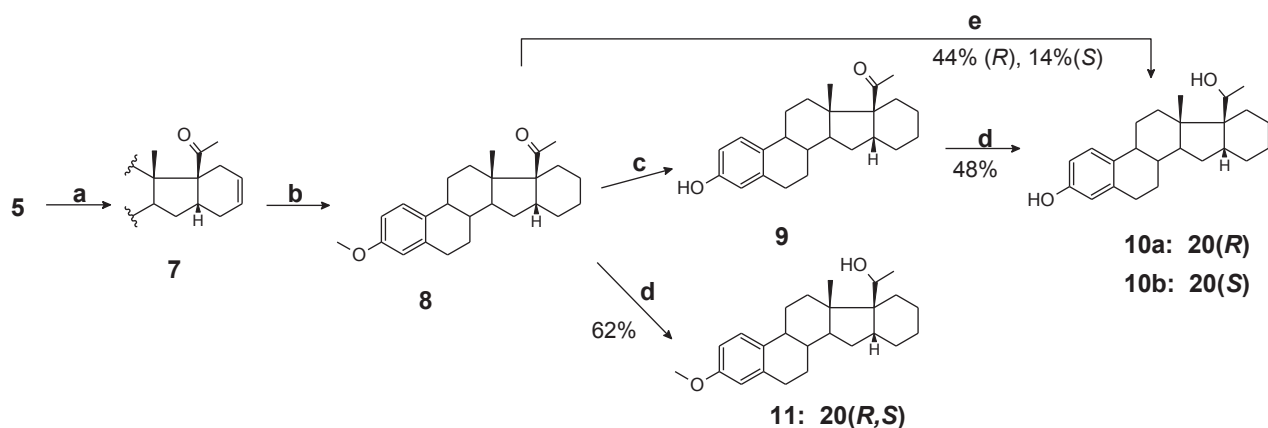


Схема 5. Синтез пентациклических стероидов, содержащих дополнительное 16 α ,17 α -циклогексановый фрагмент и функциональные группы в положениях 3 и 20. Реагенты и условия: (а) бутadiен, AlCl₃, CH₂Cl₂, 25°C, 68%; (b) H₂, 10% Pd/C, диоксан, 93%; (с) HBr (48%), AcOH, NaI, кипячение, 3.5 ч, 77%; (d) LiAlH₄, ТГФ, 25°C; (е) DIBAH, толуол, кипячение, 6 ч.

Абсолютная конфигурация нового хирального центра C20 была установлена методами спектроскопии ЯМР. Кроме того, соединение **10a** позднее было исследовано методом рентгеноструктурного анализа (РСА), подтвердившим приписанную ему 20(R)-конфигурацию (рис. 4).

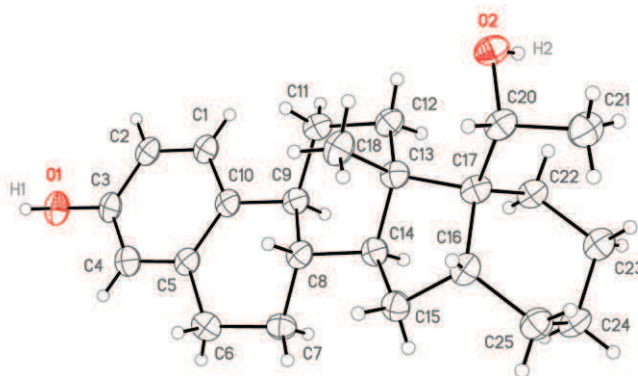


Рис. 4 Общий вид молекулы **10a** в кристалле.

3-Метокси-20-гидроксистероид **11** был получен в виде смеси 20(R) и 20(S) изомеров восстановлением 20-кетостероида **8** LiAlH₄ или DIBAH при комнатной температуре. Сравнительное исследование восстановления 20-кетогруппы этими реагентами показало различные соотношения продуктов реакции. Так, соотношение 20(R) и 20(S) изомеров составило 4.3 : 1 для LiAlH₄ и 2.3 : 1 для DIBAH (по спектрам ЯМР ¹H).

1.3 Синтез 3,20-дигидроксипрегнатриеном с дополнительным трехчленным карбоциклом и без дополнительного карбоцикла

Для оценки влияния размера дополнительного кольца D' стероида на биологические свойства были синтезированы 3,20-дигидроксистероиды, содержащие дополнительное циклопропановое кольцо D' в 16 α ,17 α -положении

(схема 6) и стероиды **16** и **17**, не содержащие дополнительного карбоцикла D' (схема 7).

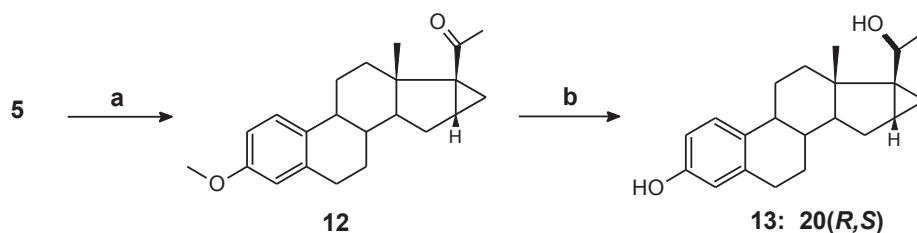


Схема 6. Синтез 3,20-дигидрокси-16 α ,17 α -циклопропано-19-норpregна-1,3,5(10)-триенов **13**. Реагенты и условия: (а) Me₃SOI, NaN, ДМСО/ТГФ, 25°C, 24 ч, 59%; (b) DIBAL, толуол, кипячение, 6 ч, 32%.

Соединение **12** было синтезировано реакцией Кори-Чайковского кетона **5** с триметилсульфониййодидом. Соответствующий 3,20-дигидроксистероид **13** был синтезирован в одну стадию из соединения **12** кипячением с толуольным раствором DIBAL. В этих условиях циклопропановый фрагмент, который может не сохраниться при деметилировании сильными кислотами, остается незатронутым. Стероид **13** был выделен в виде смеси 20(*R*) и 20(*S*) изомеров. Тем не менее, использование методик двумерного ЯМР ¹H/¹H COSY, TOCSY, NOESY и ¹H/¹³C HSQC, HMBC позволило провести отнесение сигналов для обоих изомеров.

Гидрированием кетона **5** был получен кетон **14**. Деметилирование последнего смесью HBr/NaI/AcOH и последующее восстановление получившегося при этом 3-гидрокси-20-кетостероида **15** LiAlH₄ привело к 3,20-дигидроксистероиду **16**, который выделен в виде единственного 20(*R*)-изомера (схема 7), структура которого была определена методами ЯМР и подтверждена PCA (рис. 5).

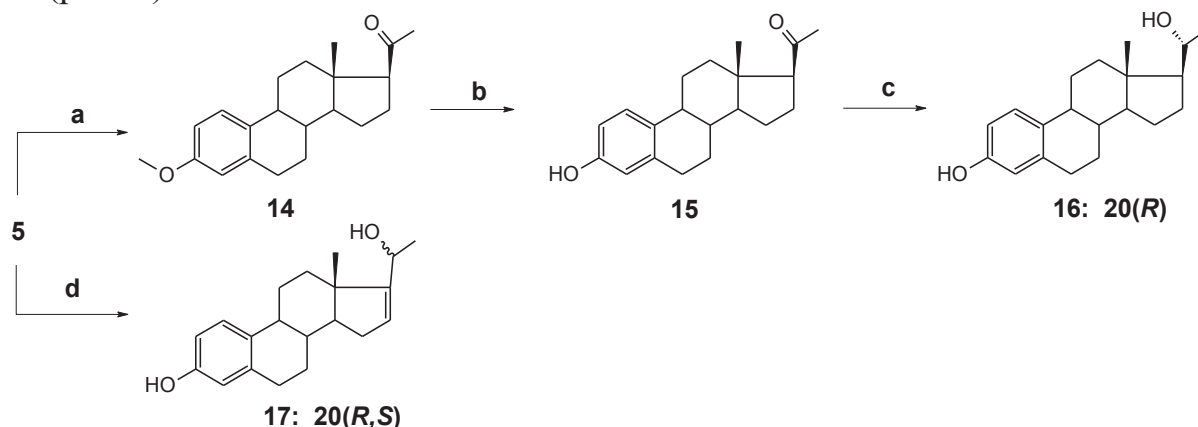


Схема 7. Синтез 3,20-дигидрокси-19-норpregна-1,3,5(10)-три- и 1,3,5(10),16-тетраенов. Реагенты и условия: (а) H₂, 10% Pd/C, диоксан, 91%; (b) HBr (48%), AcOH, NaI, кипячение, 3.5 ч, 53%; (с) LiAlH₄, ТГФ, 25°C, 40%; (d) DIBAL, толуол, кипячение, 6 ч, 47%.

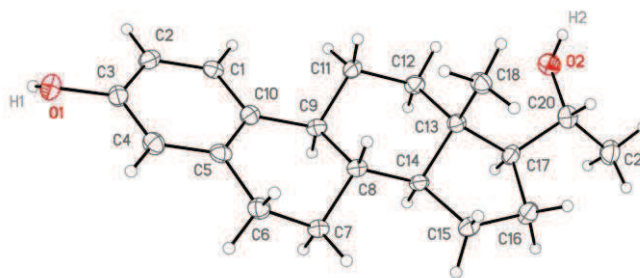


Рис. 5 Общий вид молекулы **16** в кристалле.

Сравнительное исследование восстановления 16,17-незамещенного 3-метоксикетона **14** LiAlH_4 и DIBАН показало, что в данном случае (ср. соединение **11**), стереоселективность восстановления 20-кетогруппы несколько выше, а различие в соотношениях 20(*R*)/(*S*) изомеров, полученных при восстановлении кетогруппы этими восстановителями, - меньше (4.6 : 1 и 3.9 : 1 для LiAlH_4 и DIBАН, соответственно).

3,20-Дигидроксистероид **17**, содержащий двойную связь в положении 16, был синтезирован одновременным восстановлением-деметилением кетона **5** под действием DIBАН.

2 Синтез 3,20-дигидрокси-13 α -19-норpregна-1,3,5(10)-триенов

2.1 Синтез ключевых исходных соединений

3,20-Дигидрокси-13 α -19-норpregна-1,3,5(10)-триены были синтезированы по общей методологии, описанной для 3,20-дигидрокси-19-норpregнатриенов с природной 13 β -конфигурацией стероидного ядра (разделы 1.1-1.3). В качестве исходного соединения для синтеза 3,20-дигидрокси-13 α -19-норpregнатриенов был использован 3-метилловый эфир 13 α -эстроны **18**. Его реакция с TMSCN в присутствии безводного ZnI_2 дала соответствующий силилциангидрин **19** в виде эпимерной смеси 17 α - и 17 β -карбонитрилов в соотношении 3.5 : 1 (тогда как для эстроны с природной 13 β -конфигурацией это соотношение составляло 8 : 1). Структура преобладающего 17 α -карбонитрила подтверждена результатами РСА (рис. 6). Кислотным гидролизом эпимерной смеси силилированных циангидринов **19** были получены циангидрины **20** (также в виде смеси эпимеров), дегидратация которых с использованием POCl_3 в пиридине дала сопряженный нитрил **21**. Реакция последнего с MeMgI дала ключевой промежуточный продукт - сопряженный кетон **22** (схема 8).

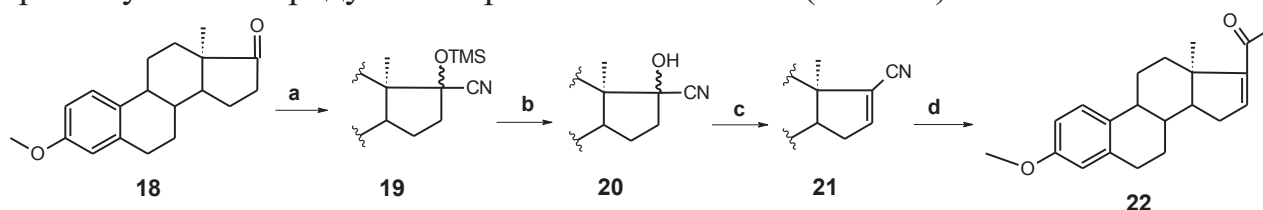


Схема 8. Синтез ключевого кетона **22**. Реагенты и условия: (а) TMSCN , ZnI_2 , CH_2Cl_2 , кипячение, 95%; (б) HCl (aq.), EtOH , кипячение, 89%; (с) POCl_3 , пиридин, кипячение, 7 ч, 83%; (д) MeMgI , Et_2O , толуол, 65°C, 6 ч, AcOH , H_2O , 5°C, HCl (aq.), кипячение, 2 ч, 77% (на две стадии).

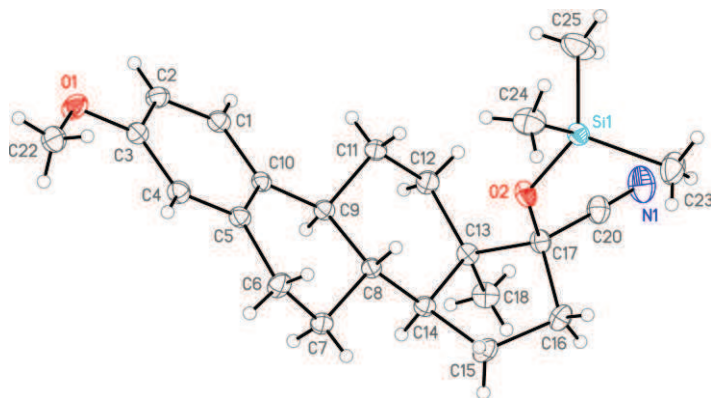


Рис. 6 Общий вид молекулы *3-метокси-17β-триметилсилокси-13α-эстра-1,3,5(10)-триен-17α-карбонитрила* (преобладающий эпимер в смеси силилциангидринов **19**).

Следует отметить, что дегидратация смеси циангидринов в ряду 13α-стероидов протекает значительно быстрее, чем для стероидов с природной 13β-конфигурацией. Так, полная конверсия циангидрина в 13α-ряду происходит менее чем за 7 часов кипячения в дегидратирующей смеси, тогда как в 13β-ряду – за 12 часов. Возможной причиной является облегчение процесса бимолекулярного элиминирования E2 (см. схему 2) за счет преобладающей конформации цикла D в мажорном 13α-стероидном 17α-карбонитриле, способствующей транс-ориентации уходящей 17β-фосфатной группы по отношению к протону в положении 16α (рис. 7).

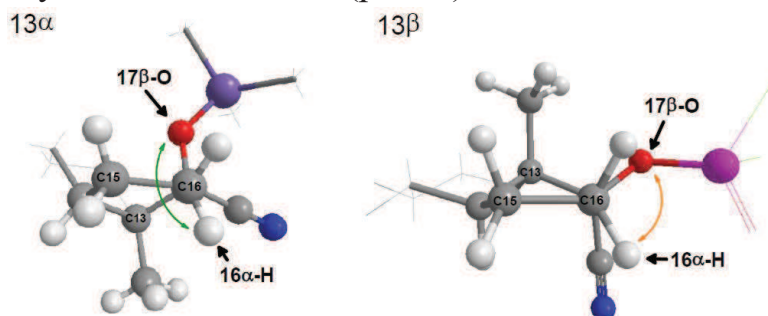


Рис. 7 Конформации кольца D, обуславливающие расположение уходящих групп при дегидратации 17-циангидринов в случаях 13α- и 13β-конфигурации стероидного ядра (проекция вдоль оси C16-C17).

2.2 Особенности катализируемой кислотами Льюиса реакции Дильса-Альдера в ряду 13α-19-норпрегнатриенов и синтез 3,20-дигидрокси-16α,17α-циклогексано-13α-19-норпрегнатриенов

Соединение **23**, содержащее дополнительный шестичленный цикл D', получено катализируемой безводным AlCl_3 реакцией Дильса-Альдера бутадиена с ключевым кетоном **22** под давлением 600 МПа (схема 9). Попытки провести циклоприсоединение, катализируемое кислотами Льюиса (AlCl_3 , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, TiCl_4 , AlBr_3), без использования высокого давления были неудачными. Структура соединения **23** была подтверждена РСА (рис. 8).

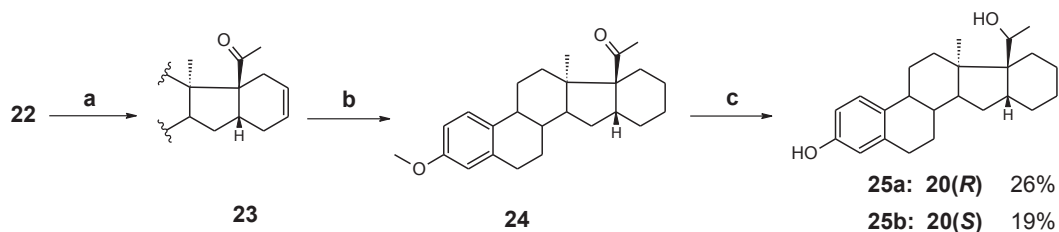


Схема 9. Синтез стероидов 13 α -ряда, содержащих дополнительный 16 α ,17 α -циклогексановый фрагмент и функциональные гидроксильные группы в положениях 3 и 20. Реагенты и условия: (а) бутадиен, AlCl_3 , CH_2Cl_2 , 25 $^\circ\text{C}$, 600 МПа, 68%; (b) H_2 , 10% Pd/C, диоксан, 83%; (с) DIBAL, толуол, кипячение, 6 ч.

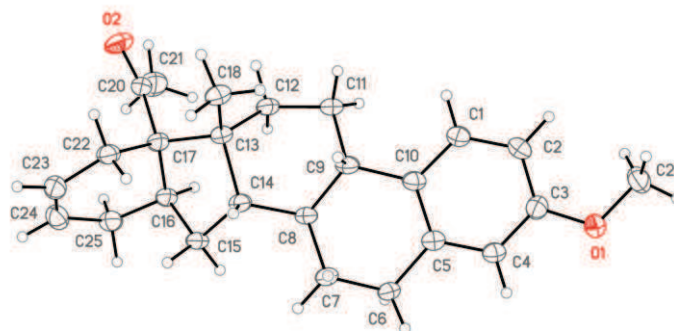


Рис. 8 Общий вид молекулы аддукта **23** в кристалле.

Низкая реакционная способность кетона **22** как диенофила по сравнению с его аналогом с природной 13 β -конфигурацией, вероятно, объясняется меньшей степенью сопряжения в Δ^{16} -20-кето-фрагменте диенофила при его связывании с кислотой Льюиса за счет специфических структурных особенностей молекулы 13 α -стероида. Действительно, положение сигналов протона H16 в спектрах ЯМР специально приготовленных смесей 13 α -кетона **22** или его 13 β -аналога **5** с хлоридом алюминия в CDCl_3 показывает меньшую степень дезэкранирования этого протона в случае 13 α -диенофила по сравнению с 13 β -диенофилом (см. таблицу 1).

Таблица 1. Изменения химических сдвигов протона H16 сопряженных нитрилов и кетонов 13 α - и 13 β -рядов при образовании комплексов с AlCl_3 .

Соединение	δ_{H16}	$\Delta \delta_{\text{H16}}$
13 α -кетон 22	6.64	1.08
13 α -кетон 22 + AlCl_3	7.72	
13 β -кетон 5	6.76	1.34
13 β -кетон 5 + AlCl_3	8.10	

Аддукт **23** гидрировали при атмосферном давлении в присутствии 10% Pd/C. Восстановление-деметилование полученного при этом соединения **24** кипячением в толуольном растворе DIBAL привело к получению диастереоизомерной смеси 3,20-диолов **25a,b** (схема 9). Индивидуальные изомеры **25a** и **25b** были разделены колоночной хроматографией на силикагеле. Абсолютная конфигурация нового хирального центра C20 и конформация

стероидного кольца С были установлены методами спектроскопии ЯМР. Оба изомера характеризуются наличием в спектре NOESY кросс-пиков CH₃-18/H11 α , свидетельствующих о «ванна-подобной» конформации кольца С.

2.3 Синтез 3,20-дигидрокси-13 α -19-норpregнатриенов с дополнительным трехчленным карбоциклом и без дополнительного карбоцикла

Аналогично серии pregнатриенов с природной конфигурацией стероидного ядра был проведен синтез 3,20-дигидроксистероидов **26** и **27**, содержащих дополнительное циклопропановое кольцо D' в положении 16 α ,17 α (схема 10), и стероидов **29a** и **29b**, не содержащие дополнительного карбоцикла D' (схема 11).

Соединение **26** было получено по реакции Кори-Чайковского сопряженного кетона **22** и триметилсульфонийиодида. Далее, в одну стадию из соединения **26** кипячением с толуольным раствором DIBAH был получен стероид **27**, выделенный в виде смеси 20(R) и 20(S) изомеров. Использование методик 2D ЯМР позволило провести отнесение сигналов для 20(R)- и 20(S)-изомеров **27**, подтвердить α -конфигурацию дополнительного цикла и «ванна-подобную» конформацию цикла С.

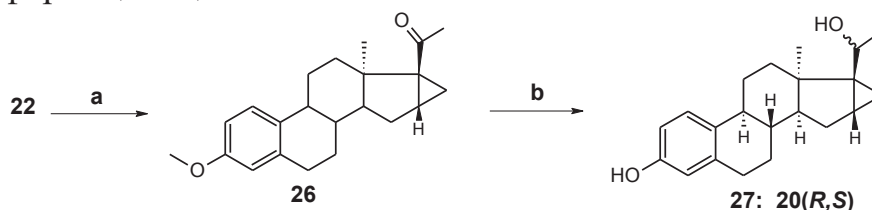


Схема 10. Синтез 3,20-дигидрокси-16 α ,17 α -циклопропано-13 α -19-норpregна-1,3,5(10)-триена **27** (смесь R,S-изомеров). Реагенты и условия: (а) Me₃SOI, NaH, ДМСО/ТГФ, 25°C, 24 ч, 50%; (b) DIBAH, толуол, кипячение, 6 ч, 24%.

Гидрирование сопряженного кетона **22** дало смесь эпимерных кетонов **28a** и **28b** в соотношении 2 : 1. Преобладающий кетон **28a** был выделен кристаллизацией. Рентгеноструктурное исследование показало, что C17 центр этого кетона имел неожиданную α -конфигурацию (рис. 9).

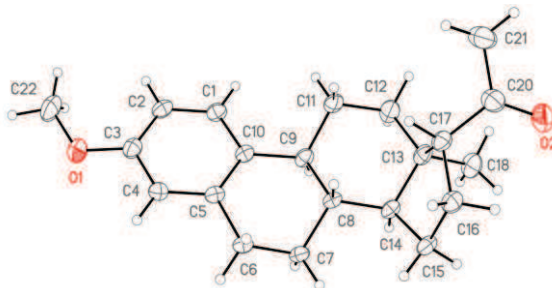


Рис. 9 Общий вид молекулы **28a** в кристалле.

Восстановление-деметилование смеси соединений **28a** и **28b** (DIBAH) привело к смеси 3,20-дигидроксистероидов. Преобладающие в этой смеси соединения **29a** (с 20(S),17 α -конфигурацией) и **29b** (с 20(R),17 β -конфигурацией) были выделены колоночной хроматографией с последующей

перекристаллизацией. Присутствие двух других возможных диастереомеров зафиксировано в спектрах ЯМР реакционной смеси, но сами они выделены не были.

Соединение **29a** также было получено из кетона **28a** деметилированием НВ и восстановлением 20-кетогруппы LiAlH_4 как было описано в разделе 1.3.

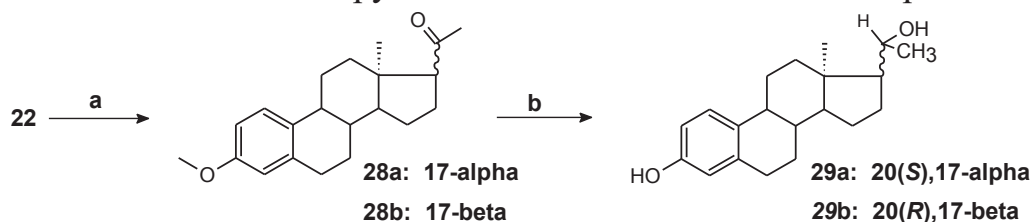


Схема 11. Синтез соединений **29a** и **29b**. Реагенты и условия: (a) H_2 , 10% Pd/C, ТГФ или диоксан; (b) DIBALH, толуол, кипячение, 6 ч.

Кросс-пики в спектрах NOESY соединения **29a** свидетельствует о 20(S),17 α -конфигурации боковой цепи и конформации «кресло» кольца С стероида и о 20(R),17 β -конфигурации боковой цепи и «ванна-подобной» конформации кольца С в соединении **29b**, соответственно (рис. 10).

Таким образом, исследование конформаций методами ЯМР (в растворах) и РСА (в кристаллах) показало, что конформация кольца С во всех вышеупомянутых 13 α -стероидах определяется заместителями в 17-положении. В соединениях **25a**, **25b**, **27** и **29b** с 17 β -боковой цепью и/или дополнительным кольцом D' кольцо С принимает «ванна-подобную» конформацию, тогда как в соединении **29a** с 17 α -боковой цепью кольцо С находится в классической конформации «кресло».

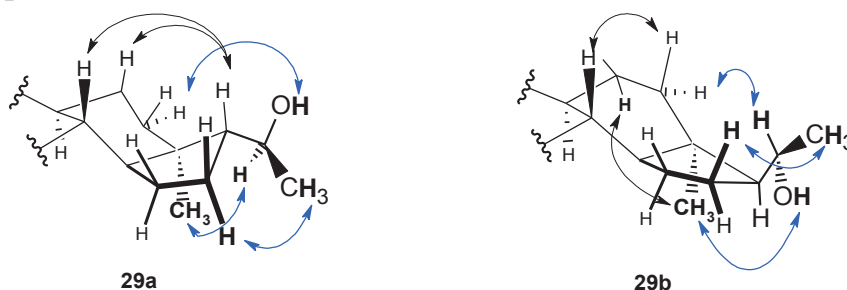


Рис. 10 Определение структуры соединений **29a** и **29b** методом 2D NOESY. Показаны наиболее значимые взаимодействия и фрагменты молекулы.

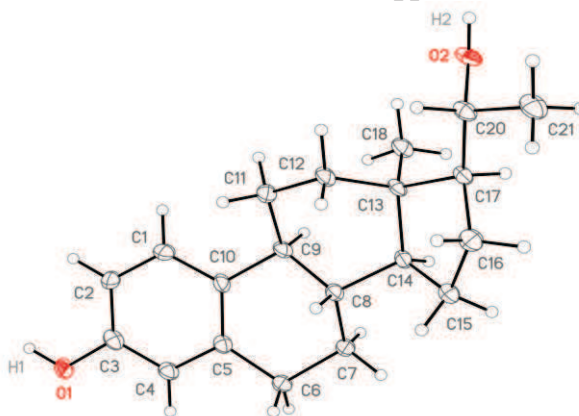


Рис. 11 Общий вид молекулы **29b** в кристалле.

3 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 эстрогенного рецептора α ($ER\alpha$), являющееся показателем гормонального/антигормонального действия.

3.1 Антипролиферативные свойства целевых соединений (цитотоксичность)

Соединения **8 – 11, 13, 15 – 17** ряда 13 β -стероидов и соединения **25a,b, 27, 29a,b** ряда 13 α -стероидов были испытаны *in vitro* на их антипролиферативную активность в отношении эстроген-положительной линии клеток РМЖ MCF-7, мультирезистентной клеточной линии NCI/ADR-RES, а также нормальных клеток эпителия молочной железы линии MCF-10A. Цитотоксичность оценивалась с помощью спектрофотометрического МТТ-теста, в качестве цитотоксических препаратов сравнения были использованы цисплатин и тамоксифен. Величины концентраций полумаксимального ингибирования клеточного роста IC₅₀ для испытанных соединений приведены в таблице 2.

Полученные данные в целом показывают, что для проявления значимой активности соединение должно содержать свободную фенольную группу, при этом дополнительный 20-гидроксил увеличивает имеющуюся активность, но сам по себе активности не обуславливает.

3,20-Дигидроксистероиды 13 α -ряда демонстрируют несколько пониженную антипролиферативную активность по сравнению с 13 β -рядом, хотя она остается высокой и сравнима с активностью широко применяемых противоопухолевых препаратов – тамоксифена и цисплатина. Для соединений обоих 13 β - и 13 α -рядов уменьшение размера дополнительного цикла D' до его полного отсутствия ведет к повышению антипролиферативной активности, более резко выраженному для соединений 13 β -ряда.

Важной характеристикой полученных 3,20-дигидрокси-19-норпрегнатиенов 13 α - и 13 β -рядов является значительно пониженная активность в отношении нормальных клеток эпителия молочной железы MCF-10A. Положительным результатом является обнаружение активности некоторых 3,20-дигидрокси-13 α -19-норпрегнатиенов в отношении линии раковых клеток NCI/ADR-RES, устойчивых к действию химиотерапевтических препаратов цисплатина и доксорубина.

Таблица 2. Величины IC_{50} (концентрации полумаксимального ингибирования) соединений по отношению к ряду клеточных линий.

Соединение	Величина IC_{50} , μM		
	Клеточная линия		
	MCF-7	NCI/ADR-RES	MCF-10A
8	НД	-	НД
9	15.8 ± 1.4	-	НД
10a	6.8 ± 0.7	-	НД
10b	4.6 ± 0.5	-	23.0 ± 2.5
11*	НД	-	НД
13*	0.21 ± 0.03	-	3.1 ± 0.4
15	НД	-	НД
16	0.15 ± 0.03	-	5.9 ± 0.5
17*	4.6 ± 0.4	-	19.1 ± 1.8
25a	11.0 ± 1.2	16.9 ± 1.9	НД
25b	13.9 ± 1.6	15.4 ± 1.7	НД
27*	3.0 ± 0.4	3.8 ± 0.6	7.5 ± 0.8
29a	6.0 ± 0.7	8.2 ± 0.9	13.2 ± 1.5
29b	10.9 ± 1.5	18.6 ± 2.0	24.0 ± 2.7
Тамоксифен	5.3 ± 0.8	-	НД
Цисплатин	7.4 ± 0.9	НД	11.9 ± 2.1

Примечания к таблице:

НД – величина 50% ингибирования клеточного роста не была достигнута при концентрациях ниже $25 \mu M$ ($IC_{50} > 25 \mu M$);

* – соединения испытывались в виде смеси 20(R,S)-изомеров.

3.2 Влияние целевых соединений на транскрипционную активность ER α

Влияние соединений **8** – **11**, **13**, **15** – **17**, **25a,b**, **27**, **29a,b** на транскрипционную активность ER α оценивалась методом ген-репортерного анализа на эстроген-зависимых клетках MCF-7. Для оценки **агонистической** активности исследуемых соединений трансфицированные клетки обрабатывали испытываемыми соединениями в концентрации 10 нМ, инкубировали в течение 24 ч и измеряли активность репортерных белков – люциферазы и β -галактозидазы – конечных продуктов процесса, начальной стадией которого является транскрипция соответствующих репортерных генов. Для оценки соединений как **антагонистов** рецептора трансфицированные клетки обрабатывали испытываемыми соединениями в концентрации 5 мкМ (13 β -стероиды) или 10 мкМ (13 α -стероиды) и эстрадиолом (E2) (индуктор активности ER α) в концентрации 10 нМ, инкубировали в течение 24 ч и измеряли активность репортерных белков. В качестве веществ сравнения использовались E2 и тамоксифен (селективный модулятор ER α – в данном случае ингибитор эстрадиол-индуцированной транскрипционной активности в клетках MCF-7).

Из всех исследованных соединений агонистическую активность проявил только 3,20-дигидроксид-16,17-циклопропано-13 α -19-норпрегнатриен **27**, причем эта активность была достаточно высока и составляла около 30 % от активности эстрадиола в условиях эксперимента. Соединения **8**, **11**, **15** и **17** не проявили ни агонистической, ни антагонистической активности, соединения **16**, **25a**, **25b**, **29a** и **29b** снижали эстрадиол-индуцированную активность до 60 – 85% от контроля (E2), а соединения **9**, **10a**, **10b** и **13** демонстрировали ингибирование до уровня 25 – 55% от контроля (рис. 12).

Результаты оценки транскрипционной активности с точки зрения наличия функциональных групп (фармакофорных фрагментов) в испытуемых соединениях согласуются с результатами определения антипролиферативной активности: соединение должно содержать свободную фенольную группу, при этом дополнительный 20-гидроксил увеличивает имеющуюся активность, но сам по себе активности не обуславливает. В тоже время соединения с дополнительным шестичленным циклом **9** и **10a,b** демонстрируют наибольшее ингибирование транскрипционной активности по сравнению с соединениями без дополнительного цикла **15** и **16**, а соединение **13** (циклопропановое производное) занимает промежуточное положение.

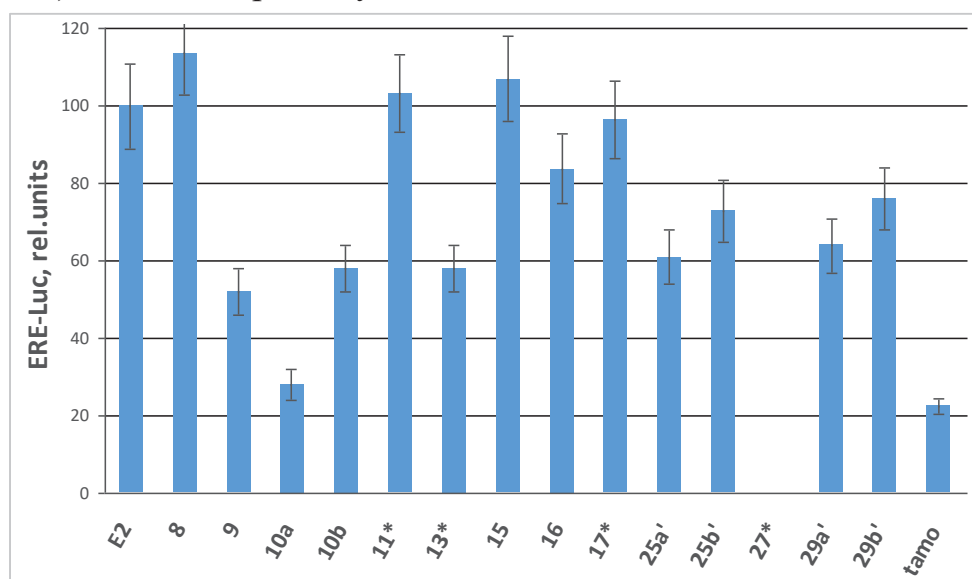


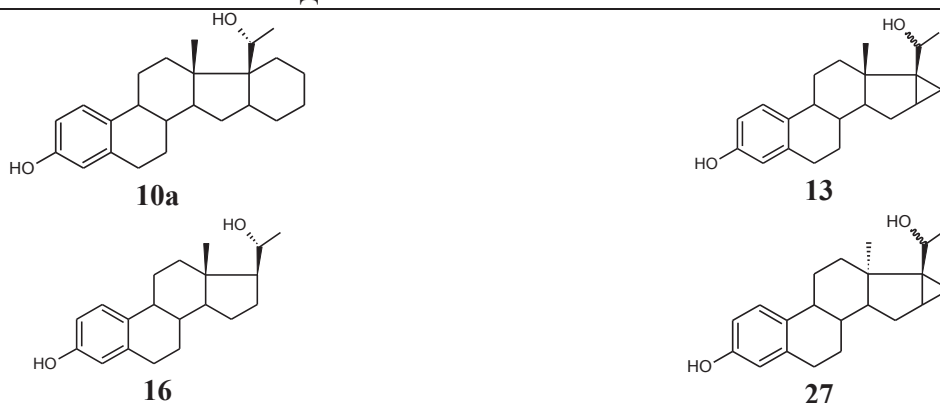
Рис. 12 Влияние синтезированных соединений на транскрипционную активность ER α в клетках MCF-7.

3,20-Дигидроксистероиды 13 α -ряда в меньшей степени ингибируют рецептор по сравнению с подобными соединениями 13 β -ряда, более того, 3,20-дигидроксид-16 α ,17 α -циклопропано-13 α -19-норпрегнатриен **27** показал значительную активацию транскрипционной активности ER α при высокой антипролиферативной активности в отношении MCF-7 и мультирезистентных клеток NCI/ADR-RES.

Наиболее эффективным ингибитором ER α оказался 3,20(*R*)-дигидроксид-16 α ,17 α -циклогексано-19-норпрегна-1,3,5(10)-триен **10a**.

Таким образом, по результатам биологических испытаний можно считать, что большинство полученных 3,20-дигидрокси-19-норпрегнатиенов представляют собой антиэстрогены. Серьезный интерес для дальнейших биологических исследований вызывают соединения **10a**, **13**, **16**, продемонстрировавшие высокую антипролиферативную и антиэстрогенную активности, и соединение **27**, сочетающее высокую антипролиферативную активность с активацией рецептора (структуры см. в таблице 3).

Таблица 3. Соединения-лидеры, предполагаемые для углубленного биологического исследования.



В заключение можно констатировать, что для 3,20-дигидроксистероидов обоих – 13 β - и 13 α -рядов – цитотоксичность растет с уменьшением размера дополнительного цикла D', в то время как наибольшее ингибирование ER α демонстрируют соединения с шестичленным дополнительным кольцом – в наибольшей степени – соединения 13 β -ряда. Учитывая, что цитотоксичность целевых соединений в отношении ER α (+) клеток РМЖ реализуется многими путями, можно сделать вывод о том, что с увеличением размера дополнительного кольца возрастает вклад ингибирования рецептора, тогда как вклад других механизмов, опосредующих цитотоксичность, уменьшается.

4 Молекулярное моделирование взаимодействия 3,20-дигидрокси-19-норпрегнатиенов 13 β - и 13 α -рядов с ER α

С целью выяснения закономерностей проявленной биологической активности нами проведено молекулярное моделирование взаимодействия 3,20-дигидрокси-19-норпрегнатиенов 13 β - и 13 α -рядов с ER α .

Общепризнано, что эстрогены и селективные модуляторы ER проявляют свое действие, связываясь с ER. Далее, в зависимости от конформации лиганд-рецепторного комплекса, происходит "рекрутирование" коактиваторных либо корепрессорных белков, что в конечном итоге проявляется в эффектах *in vivo*.

Базовые требования высокой аффинности лигандов-агонистов к ER α хорошо известны: две гидроксильных группы располагаются на концах почти планарного гидрофобного ядра таким образом, что фенольный гидроксил образует водородную связь с аминокислотными остатками глутамата (Glu353) и аргинина (Arg394), в то время как второй гидроксил (17 β -ОН) связывается с

имидазольным остатком гистидина (His524). Все остальные контакты в комплексе являются гидрофобными.

Для оценки возможных взаимодействий лиганд-рецептор и вероятного влияния лиганда на конформацию рецепторного комплекса, в дальнейшем определяющую его транскрипционную активность, был проведен «гибкий» и «жесткий» докинг исследуемых соединений в лиганд-связывающий домен (LBD) ER α с расчетом скоринговой функции в программе AutoDock Vina.

«Гибкая» модель подразумевала пластичность аминокислотных остатков лиганд-связывающего кармана (LBP). В «жесткой» модели конформации белка и аминокислотных остатков LBP оставались «замороженными» - такими, какими они были в исходной структуре лиганд-рецепторного комплекса (pdb: 1QKU), выбранного для докинга.

Моделирование в режиме «гибкого» докинга показало, что все исследуемые соединения с высокой эффективностью могут аккомодироваться в LBP ER α . При этом соединения с шестичленным дополнительным циклом (**8-10, 25**) характеризуются большей аффинностью (таблица 4), что, вероятно, связано с увеличением гидрофобного взаимодействия. «Гибкий» докинг показал водородные связи фенольного гидроксила с остатками Arg394 и Glu353 и смещение лигандов в сторону фенольного гидроксила относительно расчетного положения эстрадиола. В то же время 20-ОН группа в большинстве структур не образует водородной связи с остатком His524. Водородная связь 20-ОН - His524 обнаруживается только в одном из конформеров комплекса рецептора и 20(R)-изомера соединения **27** для модельной структуры 1QKU.

«Жесткий» докинг показывает, что все соединения хуже вписываются в соответствующую структуру лиганд-рецепторного комплекса, чем базовый лиганд – эстрадиол (таблица 4). При этом расчетные величины энергий связывания не демонстрируют каких-либо четких корреляций. Более интересными являются предсказываемые в этой модели положения лигандов в LBP: осевая ориентация всех молекул совпадает с ориентацией базового лиганда –эстрадиола (фенольный гидроксил ориентирован в сторону остатков Arg394 и Glu353, а 20-гидроксил – в сторону His524), при этом большинство лигандов оказываются перевернутыми вдоль продольной оси по сравнению с эстрадиолом, и только 20(R) и 20(S)-изомеры **27**, а также молекула **29b** – в LBP лежат подобно эстрадиолу и способны образовать водородную связь 20-ОН с остатком His524. Учитывая относительно высокие значения скоринг-функции для этих лигандов, можно предположить, что они в меньшей степени искажают и в большей степени стабилизируют исходно заданную агонистическую конформацию лиганд-рецепторного комплекса (1QKU), а следовательно, могут являться агонистами ER α в отличие от остальных исследованных соединений. На рис. 13 приведен наглядный пример расположения молекул агониста (**27**) и наиболее характерных антагонистов (**10a** и **13**) в LBP ER α .

Таблица 4. Расчетные аффинности (скоринговые функции) исследованных соединений по отношению к LBD ER α в агонистической (1QKU) конформации (соединения расположены по уменьшению размера дополнительного цикла).

Соединение конфигурации C17(C20)	ADV score (ккал/моль)		Примечание
	гибк.	жестк.	
E2	-12	-10.7	17 β -эстрадиол
8	-13.9	-7	3-метокси-20-кето
9	-14.2	-10.1	3-гидрокси-20-кето
10a (<i>R</i>)	-13.7	-9	3,20-дигидрокси
10b (<i>S</i>)	-13.6	-9.2	3,20-дигидрокси
25a (<i>R</i>)	-14.4	-9.4	3,20-дигидрокси
25b (<i>S</i>)	-14.5	-8.6	3,20-дигидрокси
11 (<i>R</i>)	-13.3	-6.3	3-метокси-20-гидрокси
11 (<i>S</i>)	-13.2	-6.3	3-метокси-20-гидрокси
13 (<i>R</i>)	-12.7	-9.6	3,20-дигидрокси
13 (<i>S</i>)	-12.8	-10.3	3,20-дигидрокси
27 (<i>R</i>)	-13.4	-9.8	3,20-дигидрокси
27 (<i>S</i>)	-12.9	-9.6	3,20-дигидрокси
15	-12.6	-10	3-гидрокси-20-кето
16 (<i>R</i>)	-12.3	-9.2	3,20-дигидрокси
29a (α . <i>S</i>)	-13.1	-8.9	3,20-дигидрокси
29b (β . <i>R</i>)	-12.5	-9.3	3,20-дигидрокси
17 (<i>R</i>)	-12.5	-9.7	3,20-дигидрокси- Δ^{16}
17 (<i>S</i>)	-12.5	-10.2	3,20-дигидрокси- Δ^{16}

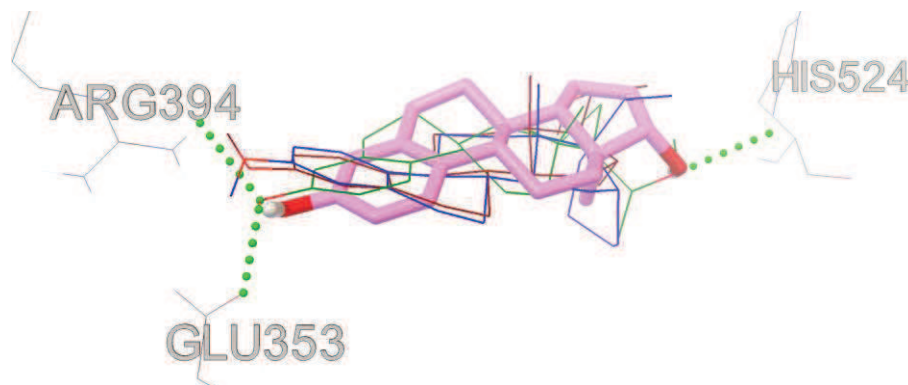


Рис. 13 Расположение лигандов **10a** (синий), **13** (коричневый) и **27** (зеленый) – 20(*R*)-изомеры – и ключевых аминокислотных остатков относительно положения молекулы эстрадиола (розовый) в LBP ER α (1QKU). Зелеными пунктирными линиями обозначены водородные связи лиганда **27** и ключевых аминокислотных остатков во фрагменте. Для соединения **27** с циклопропановым дополнительным кольцом расчетное положение 20-гидроксильной группы практически совпадает с положением 17-гидроксильной группы эстрадиола (E2), в то время как в антагонистах **10a** и **13** 20-гидроксил этих лигандов и 17-гидроксильная группа E2 расположены далеко друг от друга.

Действительно, сопоставление результатов докинга с результатами биологических испытаний показало, что увеличение объема лиганда в области кольца D обусловило конформацию комплекса, отличную от агонистической, и вследствие этого, антитранскрипционную (антиэстрогенную) активность.

Подытоживая можно сделать вывод, что лиганд-рецепторные комплексы ER α с агонистом и соединениями, проявившими антагонистическую активность, имеют различные конформации, что влияет на их дальнейшие взаимодействия с корегуляторами и приводит к противоположным эффектам на транскрипционную активность ER α .

Таким образом, проведено комплексное исследование по созданию и разработке эффективного синтеза серии новых стероидных противоопухолевых агентов - 3,20-дигидрокси-19-норpregна-1,3,5(10)-триенов эпимерных 13 β - и 13 α -рядов, проведено компьютерное моделирование лиганд-рецепторных взаимодействий в отношении ER α , изучены *in vitro* их биологические эффекты как потенциальных антиэстрогенов и выявлены перспективные соединения-лидеры для последующего углубленного анализа их противоопухолевой активности.

ВЫВОДЫ

1. Создан новый тип стероидных антиэстрогенов, содержащих 3-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триеновый скелет природной и эпимерной 13 α -конфигурации с 1'-гидроксиэтильной боковой цепью в 17-положении и содержащих либо не содержащих дополнительный конденсированный в положениях 16 α ,17 α трех- или шестичленный карбоцикл.

2. Разработаны эффективные синтезы ключевых 3-метокси-19-норpregна-1,3,5(10),16-тетраен-20-онов 13 β - и 13 α -рядов.

3. Разработаны методы синтеза и получены 3-метокси-16 α ,17 α -циклогексано- и -циклопропано-19-норpregна-1,3,5(10)-триен-20-оны 13 β - и 13 α -рядов реакциями Дильса-Альдера и Кори-Чайковского, соответственно, и 3-метокси-13 β - и 13 α -19-норpregна-1,3,5(10)-триен-20-оны каталитическим гидрированием 16,17-двойной связи ключевых исходных стероидов.

4. Предложен способ получения целевых 3,20-дигидрокси-19-норpregнатриенов 13 β - и 13 α -рядов одновременным восстановлением 20-кетогруппы и деметилированием соответствующих 3-метокси-20-кетостероидов с помощью диизобутилалюминийгидрида.

5. Методами спектроскопии ЯМР и рентгеноструктурного анализа установлены абсолютные конфигурации возникающего асимметрического центра C20 и конформации кольца C (кресло/ванна) в целевых эпимерных 3,20-гидрокистероидах 13 β - и 13 α -ряда.

6. Методом молекулярного моделирования показано, что все целевые соединения связываются с ER α , но их комплексы с рецептором могут иметь различные конформации, определяющие их биологические эффекты.

7. Целевые соединения показали высокую антипролиферативную активность (цитотоксичность) в отношении эстроген-зависимой линии клеток рака молочной железы и способность ингибировать эстрогенный рецептор.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kuznetsov, Yu. V. New estrogen receptor antagonists. 3,20-Dihydroxy-19-norpregna-1,3,5(10)-trienes: Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation / Yu. V. Kuznetsov, I. S. Levina, A. M. Scherbakov, O. E. Andreeva, I. V. Fedyushkina, A. S. Dmitrenok, A. S. Shashkov, I. V. Zavarzin // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – V. 143. – P. 670–682.
2. Kuznetsov, Yu. V. 3,20-Dihydroxy-13 α -19-norpregna-1,3,5(10)-trienes. Synthesis, structures, and cytotoxic, estrogenic, and antiestrogenic effects / Yu. V. Kuznetsov, I. S. Levina, A. M. Scherbakov, O. E. Andreeva, A. S. Dmitrenok, O. R. Malyshev, I. V. Zavarzin // *Steroids* – 2018. – V. 137. – P. 1-13.
3. Кузнецов Ю. В. Эффективный способ синтеза 3-метокси-19-норpregна-1,3,5(10),16-тетраен-20-она / Ю. В. Кузнецов, И. С. Левина, А. С. Шашков, И. В. Заварзин // *Изв. РАН, сер. хим.* – 2018. – № 11. – С. 2112-2120.
4. Kuznetsov, Yu. V. New steroidal estrogen receptor modulators. Design, synthesis, and biological evaluation / Yu. V. Kuznetsov, I. S. Levina, A. M. Scherbakov, I. V. Zavarzin // *24th Conference on Isoprenoids – Białystok* – 2018. – P. 50.
5. Levina, I. S. Selective modulators of estrogen and progesterone receptors: steroidal agonists and antagonists / I. S. Levina, Yu. V. Kuznetsov // *VIth International Conference “Chemistry, Structure and Function of Biomolecules – Minsk* – 2018. – P. 19-20.
6. Kuznetsov, Yu. V. Steroid hormone antagonists. Synthesis and biological evaluation of novel pentacyclic steroids with aromatic ring A / Yu. V. Kuznetsov, A. M. Scherbakov, I. V. Fedyushkina, I. V. Zavarzin, I. S. Levina // *23rd Conference on Isoprenoids – Minsk* – 2016. – P. 90-91.
7. Кузнецов, Ю. В. Синтез и биологическая активность пентациклических стероидов с ароматическим кольцом А / Ю. В. Кузнецов, А. М. Щербаков, И. В. Федюшкина, И. С. Левина, И. В. Заварзин // *Тезисы докладов Кластера конференций по органической химии «ОргХим-2016» - Репино* – 2016. – С. 601.
8. Патент № 2601423, РФ, МПК C07J53/00, A61K31/56, A61P35/00. 16 α ,17 α -Циклогекса-17 β -(2'-гидроксиэтил)-13 β -метилгона-1,3,5(10)-триен-3-ол и способ его получения / Ю. В. Кузнецов, И. С. Левина, И. В. Заварзин, Л. Е. Куликова, И. В. Федюшкина, А. М. Щербаков, О. Е. Андреева, Л. Б. Ясная; ИОХ РАН. – RU2015146999/04; заявл. 02.11.2015; опубл. 10.11.2016, бюл. изобр. № 31. – 9 с.: илл.