

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
“ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ”**

УДК 547.92 : 547.315.2 : 543.429.23

**Болибрух
Дмитрий Александрович**

**АДДУКТЫ ДИЛЬСА-АЛЬДЕРА СТЕРЕОИДНЫХ 14,16-ДИЕНОВ
В СИНТЕЗЕ С-14-ПРОИЗВОДНЫХ СТЕРЕОИДОВ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Минск, 2009

ВВЕДЕНИЕ

Стероидные соединения играют исключительно важную роль в жизни растений, животных и человека. Стероидные гормоны оказывают непосредственное влияние на развитие организма. Именно они регулируют процессы размножения, взросления, роста и старения. Различие в их физиологическом действии связано как с пространственным строением углеродного скелета, так и с наличием кислород- и азот-содержащих заместителей в структуре стероидной молекулы.

Поэтому так важно точно знать структуру стероидного гормона. Исторически это и было первостепенной задачей химиков-исследователей. Одновременно ввиду низкого содержания стероидных соединений в природных объектах встал вопрос получения данных веществ методами химического синтеза. Задача усложнялась тем, что для осуществления полного синтеза стероидов требовалась разработка сложных синтетических схем, включающих регио- и стереоспецифические реакции, что в конечном итоге приводило к низким выходам продуктов. Хорошей альтернативой данному подходу стали методы частичного синтеза. Такой подход давал также большие возможности для модификации структуры стероидных соединений. Некоторые из полученных таким образом аналогов проявили значительную биологическую активность и нашли впоследствии применение в медицине и фармакологии.

Основными проблемами при получении модифицированных стероидных соединений остаются разработка методов регио- и стереоселективного синтеза; разработка методов модификации стероидной молекулы в положениях, удаленных от функциональных групп.

Настоящее исследование посвящено разработке методов синтеза стероидных соединений, модифицированных по положению С-14. Введение заместителя в положение С-14 стероидной молекулы требует эффективных методов удаленной функционализации цикла D. Данная проблема была успешно решена в представленной работе с применением реакции циклоприсоединения по Дильсу-Альдеру нитроэтилена и винилфенилсульфона к стероидным 14,16-диенам. Полученные аддукты были затем трансформированы в С-14-замещенные стероиды.

Полученные вещества могут найти применение в медицине в качестве высокоспецифичных антагонистов эстрадиолового рецептора, при разработке препаратов для лечения гиперхолестеринемии и в биологии в качестве гаптенa в иммунохимическом анализе стероидов.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Стероидные соединения уже на протяжении многих десятилетий находят применение при лечении гормональных расстройств, в терапии онкозаболеваний, в качестве антихолестеринемических, противорахитических, кардио- и иммуотропных агентов. Однако развитие исследований сдерживается ограниченной доступностью стероидов, содержание которых в организмах растений и животных невелико, и основной путь для производства препаратов на основе стероидов – это направленный органический синтез. Кроме того, как показывают исследования, модифицированные стероидные гормоны проявляют большую биологическую активность, чем их природные прототипы. Это одна из причин, обуславливающих необходимость скрининга обширных рядов стероидных соединений. Первым этапом такого исследования является химический синтез.

Разработка подходов к синтезу аналогов стероидов с заместителем в положении С-14 открывает широкие возможности для будущих плодотворных химических и биохимических исследований в этой области. Труднодоступные до настоящего времени С-14-замещенные стероиды могут найти применение и в медицинской практике (для разработки противораковых и противогрибковых препаратов, препаратов для лечения гиперхолестеринемии) и в биохимии (в качестве гаптенных для иммунохимического анализа стероидов).

Связь работы с крупными научными программами, темами. Работа соответствует приоритетному направлению фундаментальных и прикладных научных исследований в Республике Беларусь – органический синтез новых веществ, и проводилась в рамках Государственных программ ориентированных фундаментальных исследований «Биорациональные пестициды», задание 4.10 «Создание базы данных и установление критериев для структурного анализа методом ЯМР полиоксигенированных стероидов, в том числе brassinosteroidов и их аналогов – новых биорациональных средств защиты и повышения урожайности растений», № ГР 20052816 (2004-2008) и «Физиологически активные вещества», задание 2.03 «Качественный и количественный анализ природных биорегуляторов и ксенобиотиков методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения», № ГР 20062209 (2006-2010); научных грантов НАН Беларуси по теме «Синтез и спектральные свойства С-14-замещенных стероидов» (2007), Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований по теме «Синтез и установление структуры органических молекул методами ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P » № Х09М-094 (2009-

2011) и проекта ИНТАС для молодых ученых по теме «14-Substituted steroids as novel haptens and physiologically active substances» № 06-1000014-5620 (2007-2008).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлся синтез аддуктов Дильса-Альдера и их применение для получения стероидных соединений, содержащих функционализированный фрагмент в положении С-14. Основными задачами исследования были разработка подходов к синтезу стероидных 14,16-диенов и 14 α -, 14 β -замещенных стероидов, исследование механизма трансформации нитростероидных соединений. Объектом настоящего исследования являлись стероидные 14,16-диены и их реакции. Предметом исследования являлась разработка методов синтеза соединений, содержащих функционализированную углеродную цепь в положении 14 α или 14 β .

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- Новый метод синтеза нитростероидных соединений с использованием реакции Дильса-Альдера стероидных 14,16-диенов и нитроэтилена в качестве активного диенофила.

- Метод получения 14 β -изоксазолилметил- и 14 β -изоксазолинилметил-стероидов при взаимодействии мостиковых 16-нитростероидов с олефинами или ацетиленами в мягких основных условиях.

- Новый подход к синтезу стероидов, содержащих функционализированный углеродный заместитель в положении С-14, заключающийся в трансформации 14,17-этан- и 14,17-этен-16-нитростероидов.

- Новый подход к формированию углеродной цепи в положении 14 α стероидов, включающий введение и последующие трансформации 14 α -формильной группы.

- Установление структуры новых азот-содержащих стероидов и продуктов их трансформаций с привлечением методов органического синтеза, спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии и рентгеноструктурного анализа, позволившее предложить механизм образования стероидных нитрилоксидных интермедиатов.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении экспериментальной части работы, в осуществлении планирования синтетических схем, в интерпретации полученных результатов. Постановка задач, решение методологических проблем, подготовка материалов для научных публикаций осуществлялись совместно с чл.-корр. НАН Беларуси, проф., д.х.н. В.А. Хрипачом, к.х.н. А.В. Барановским, д-ром Б. Шнайдером (ФРГ), проф.

Дж.Р. Буллом (ЮАР). Работа по рентгеноструктурному анализу выполнялась совместно с к.х.н. А.С. Ляховым (Белгосуниверситет, г. Минск).

Апробация основных результатов работы. Основные результаты диссертации представлены на II и III Международных конференциях «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2006 и 2008), Международной конференции по ВЭЖХ-ЯМР «Challenges in Biological Systems» (Йена, 2008), Международной юбилейной конференции в честь основания Института химии Молдавской академии наук (Кишинев, 2009).

Результаты исследований по синтезу стероидных нитрилоксидов внедрены в учебный процесс на химическом факультете Белорусского государственного университета.

Отдельные этапы исследования вошли в цикл работ по теме «Нитрилоксидный подход к синтезу С-14-замещенных стероидов – потенциальных биологически активных веществ и перспективных гаптеннов» и были отмечены премией НАН Беларуси имени академика В.Ф. Купревича для молодых ученых (2008 г.).

Опубликованность результатов. Изложенные в диссертации результаты составили предмет 3 статей в международных научных изданиях и тезисов 5 докладов, всего 46 стр. (5.7 авт. листов).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения; обзора литературы по теме диссертации; обсуждения результатов исследований, экспериментальной части, заключения и списка использованных литературных источников (160 источников). Работа изложена на 114 стр., содержит 5 таблиц, 51 схему, 4 рисунка, 1 приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Стероидные соединения, содержащие функционализированную углеродную цепь в положении С-14, привлекают внимание исследователей по нескольким причинам.

В отношении подобных структур эстранового ряда показана высокая специфичность связывания с эстрадиоловым рецептором в реакциях конкурентного ингибирования с участием природного лиганда. Это делает возможным их применение в медицинской практике в качестве антагонистов эстрогенов. Производные ланостерина, содержащие заместитель в положении С-14 могут служить ингибиторами 14 α -деметилазы. Развитие исследований в данном направлении открывает перспективу разработки противогрибковых средств и препаратов для лечения гиперхолестеринемии. Благодаря удаленности положения С-14 стероидной молекулы от основных функциональных групп цикла А и боковой цепи в положении С-17 (основных

антигенных детерминант стероидов), представляется возможным использование С-14-замещенных стероидов в качестве удобных гаптенных в иммунохимическом анализе. Влияние линкера в положении С-14 на антигенные свойства стероида (в комплексе с белком-носителем) сведено к минимуму.

Однако развитие исследований по данным направлениям сдерживается ограниченной доступностью С-14-замещенных стероидов, связанной с отсутствием эффективных методов их синтеза.

Основными проблемами при получении С-14-замещенных стероидов остаются 1) разработка методов регио- и стереоселективного синтеза; 2) эффективность подхода, предполагающая доступность исходного субстрата, хорошие выходы в реакциях, минимальное количество стадий; 3) разработка методов, позволяющих получать соединения с заданным типом функциональности по положению С-14.

Настоящее исследование посвящено разработке методов синтеза стероидных соединений, модифицированных по положению С-14.

1 С-14-производные эстранового ряда

В основу подхода к синтезу 14-замещенных эстранов положена реакция Дильса-Альдера стероидного 14,16-диена и диенофила и последующие трансформации полученных аддуктов. В настоящей работе в качестве диенофила использовали нитроэтилен, а полученные стероидные нитроаддукты превращали в С-14-замещенные стероиды.

1.1 Синтез бициклических производных

Разработанный подход к синтезу стероидов с заместителем в положении С-14 включал присоединение к стероидному 14,16-диенил-17-ацетату нитроэтилена в качестве активного диенофила. Полученный нитростероидный аддукт оказался лабильным и под действием мягких кислотных или основных агентов подвергался расщеплению по связи С16-С17 с последующими перегруппировками.

1.1.1 14 β ,17 β -этно- и 14 β ,17 β -этан-16 α -нитроэстра-1,3,5(10)-триен-17 β -ил ацетаты

Диенилацетат **1** легко вступает во взаимодействие с нитроэтиленом при кипячении в бензоле (Схема 2.1). Полученный 16 α -нитроаддукт **2** является основным изомером (выход 86%).

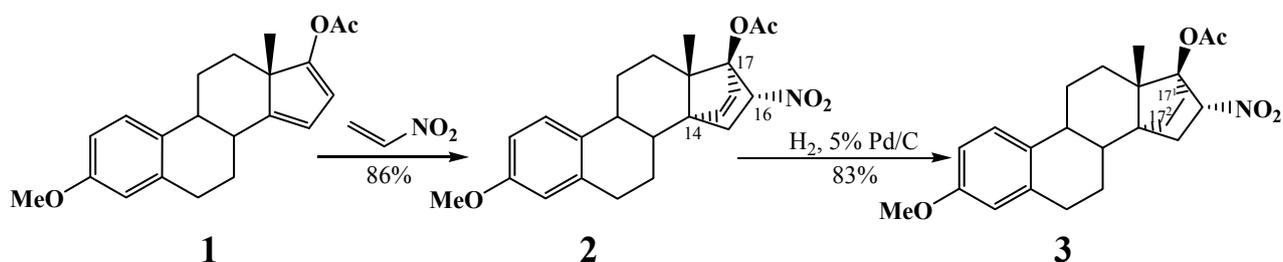


Схема 2.1

Восстановление C17¹-C17² двойной связи соединения **2** дает нитростероид **3**. Спектральные данные (по величине эффекта Оверхаузера в спектрах ЯМР NOESY) по нитроаддуктам **2** и **3** говорили о присоединении нитроэтилена на стадии реакции Дильса-Альдера по типу «голова к голове» и с β-стороны стероидной молекулы (эндоциклический аддукт).

1.1.2 14β,15β-циклостероиды

Нитростероид **2** благодаря наличию напряженности C14-C17-мостиковой структуры обладает повышенной реакционной способностью. Под действием основных агентов соединение **2** претерпевает трансформации с разрывом углерод-углеродной C16-C17 связи и образованием 14β,15β-циклических структур. Так при кипячении с гидрокарбонатом натрия в водном этаноле были выделены два основных компонента с выходом 40% и 23%.

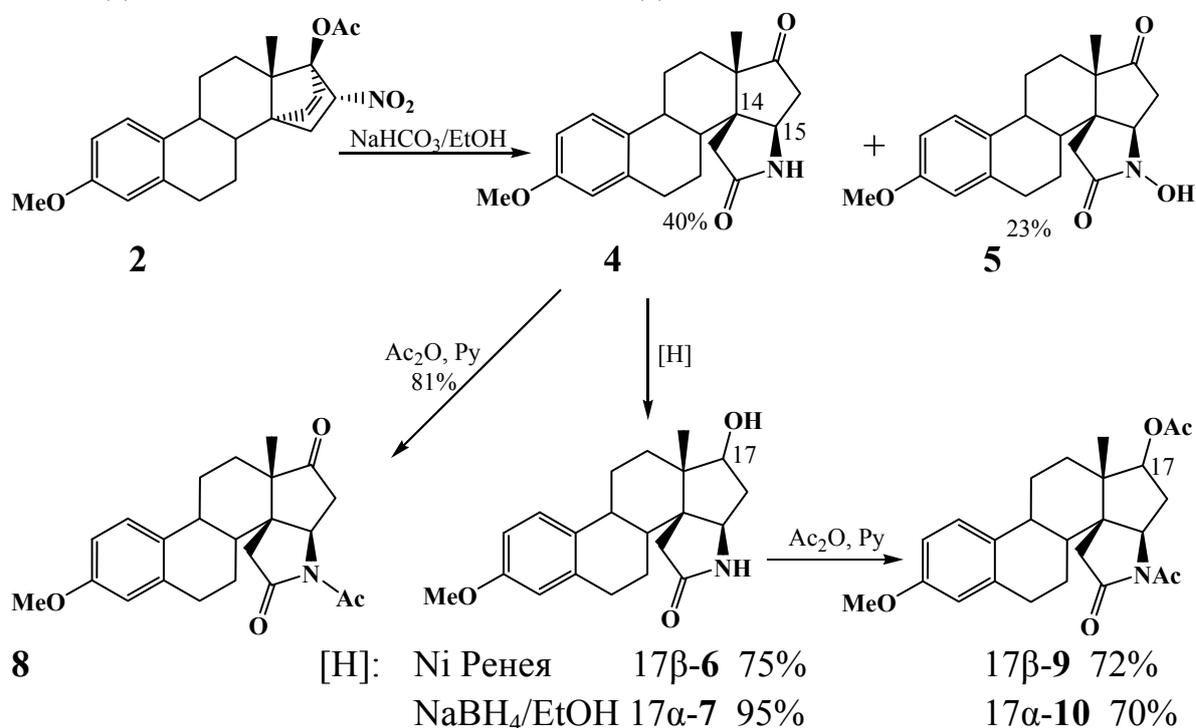


Схема 2.2

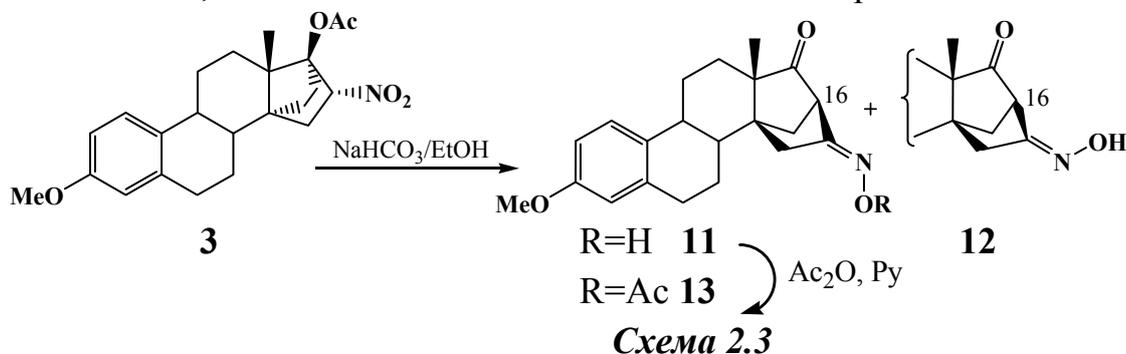
После ряда экспериментов, мы пришли к выводу, что полученные в результате гидролиза соединения были лактамом **4** и гидроксамовой кислотой **5**. Элементный анализ вещества, полученного при гидрировании стероида **4** на

никеле Ренея, полностью соответствовал спирту **6**. Восстановление боргидридом натрия, наоборот, давало преимущественно продукт с противоположной конфигурацией при С-17 – спирт **7**. Как лактам **4**, так и 17-спирты **6** и **7** ацетируются, давая соответственно моно – и диацетилпроизводные **8**, **9** и **10**. Методами двумерной спектроскопии ЯМР было выполнено полное отнесение сигналов в спектрах полученных соединений. Для исчерпывающего подтверждения структуры лактама **4** был выполнен его рентгеноструктурный анализ.

1.1.3 14 β ,16 β -циклостероиды

Поведение восстановленного нитроаддукта **3** в условиях, способствующих разрыву С16-С17 связи, также подверглось тщательному анализу. Основными продуктами в данном случае оказались 14 β ,16 β -циклостероиды.

Было предположено, что гидролиз нитросоединения **3** должен протекать по схеме, аналогичной для аддукта **2**, однако образование аналога лактама **4** объективно невозможно из-за отсутствия Δ^{15} -связи. В результате взаимодействия соединения **3** с гидрокарбонатом натрия в водном этаноле была выделена смесь двух изомерных продуктов с выходом 40%. Проведенные ЯМР-исследования продуктов **11** и **12**, а также рентгеноструктурный анализ ацетата **13** показали, что соединения **11** и **12** являются изомерными оксимами.



Их получение можно объяснить образованием нитрилоксида в процессе сольволиза нитростероида **3**.

1.2 Синтез 14 β -производных эстранового ряда

Исходя из полученных результатов по синтезу стероидов с мостиковыми фрагментами становится очевидным тот факт, что наличие реакционноспособных групп в углеродной цепи в положении С-14 приводит к их взаимодействию с функциональностью цикла D. Так, в случае с амидной или нитрилоксидной группами происходит циклизация с участием Δ^{15} -связи с образованием 14 β ,15 β -циклостероидов, при отсутствии двойной связи циклизация протекает по α -положению к С-17-карбонильной группе с образованием 14 β ,16 β -циклостероидов. Было предположено, что в качестве

интермеdiатов данных трансформаций могут выступать стероидные нитрилоксиды, Такое предположение, однако, требовало доказательств. Таковыми могли бы стать химические превращения с участием нитрилоксидов, такие, как реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения или восстановление окисей нитрилов под действием трифенилфосфина.

1.2.1 Сольволиз с расщеплением C16-C17-связи

Сольволиз ацетата **2** в слабословных условиях (NaHCO_3) протекал, по-видимому, согласованно с расщеплением C16-C17 связи и последующим образованием нитрилоксидного интермедиата. Можно предположить, что на первой стадии происходило образование шестичленного переходного состояния с участием аци-формы 16-нитро-группы. Данные, полученные при помощи *real-time* ЯМР спектроскопии также говорят в пользу данного факта. Сформированный цикл затем раскрывался с одновременным разрывом связи C16-C17 и отщеплением ацетокси-группы.

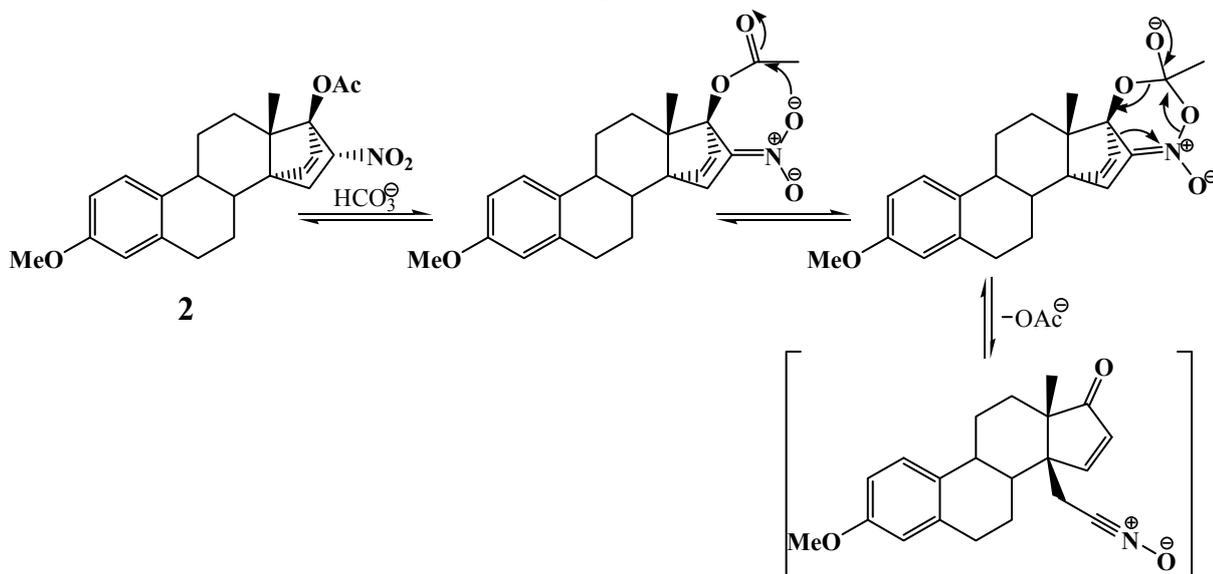


Схема 2.4

Однако ввиду малого времени жизни активной нитрилоксидной частицы ее присутствие не было зафиксировано спектроскопическими методами.

Полученные из нитростероидов **2** и **3** *in situ* стероидные нитрилоксиды реагировали с трифенилфосфином с образованием нитрилов **14**, **15**.

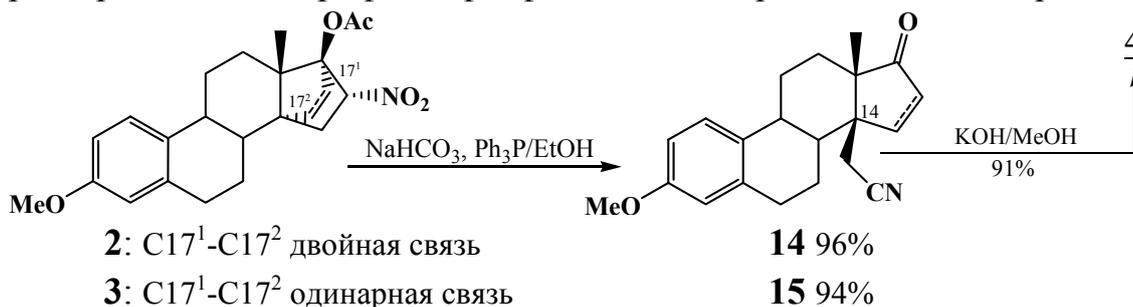


Схема 2.5

Характерно, что использование раствора щелочи в метаноле приводило к гидролизу нитрила **14** с образованием амида. Анализ спектров ^1H и ^{13}C ЯМР, а также данных ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии для полученного соединения показал идентичность его строения с циклическим амидом – лактамом **4**.

Данный факт хорошо согласуется с теоретическими предположениями и доказывает, что продукт, полученный при сольволизе нитростероида **2** действительно является лактамом. Механизм образования лактама **4** из стероида **2** включает стадию восстановления образующегося *in situ* нитрилоксида. Анализ минорных продуктов реакции, выполненный с привлечением ВЭЖХ-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения, дает основания предполагать, что в качестве восстановителя может выступать этанол, присутствующий в реакционной среде в качестве растворителя.

1.2.2 1,3-Диполярное циклоприсоединение ацетиленов

Стероидные нитрилоксида являются исключительно активными частицами, способными вступать в реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения с диполярофилами.

Так реакция нитроаддукта **2** с пропаргиловым спиртом протекала с образованием соответствующего изоксазола **16** с выходом 50% (Схема 2.6). При использовании в данном превращении ТГП-защищенного пропаргилового спирта удалось увеличить выход соответствующего изоксазола **17** до 65%. Восстановленный нитроаддукт **3** в реакцию с ТГП-защищенным пропаргиловым спиртом с образованием изоксазола не вступал (выход изоксазола **18** в реакции с пропаргиловым спиртом был 49%).

Фенилацетилен в качестве диполярофила реагировал с нитростероидами **2** и **3** с образованием соответствующих изоксазолов **20** и **21** (с выходами 50% и 68%). Реакция пропаргилбромида со стероидом **2** была менее эффективной ввиду образования кроме ожидаемого изоксазола **21** (выход 27%) также продуктов нуклеофильного замещения брома, среди которых были спирт **16** (выход 35%), его этоксипроизводное **22** (выход 18%) и ацетат **23** (5%). Результаты реакции нитростероидов **2** и **3** с 3,3-диэтоксипропином были несколько хуже и соответствующие изоксазолы **24** и **25** были выделены с выходами 28% и 40%.

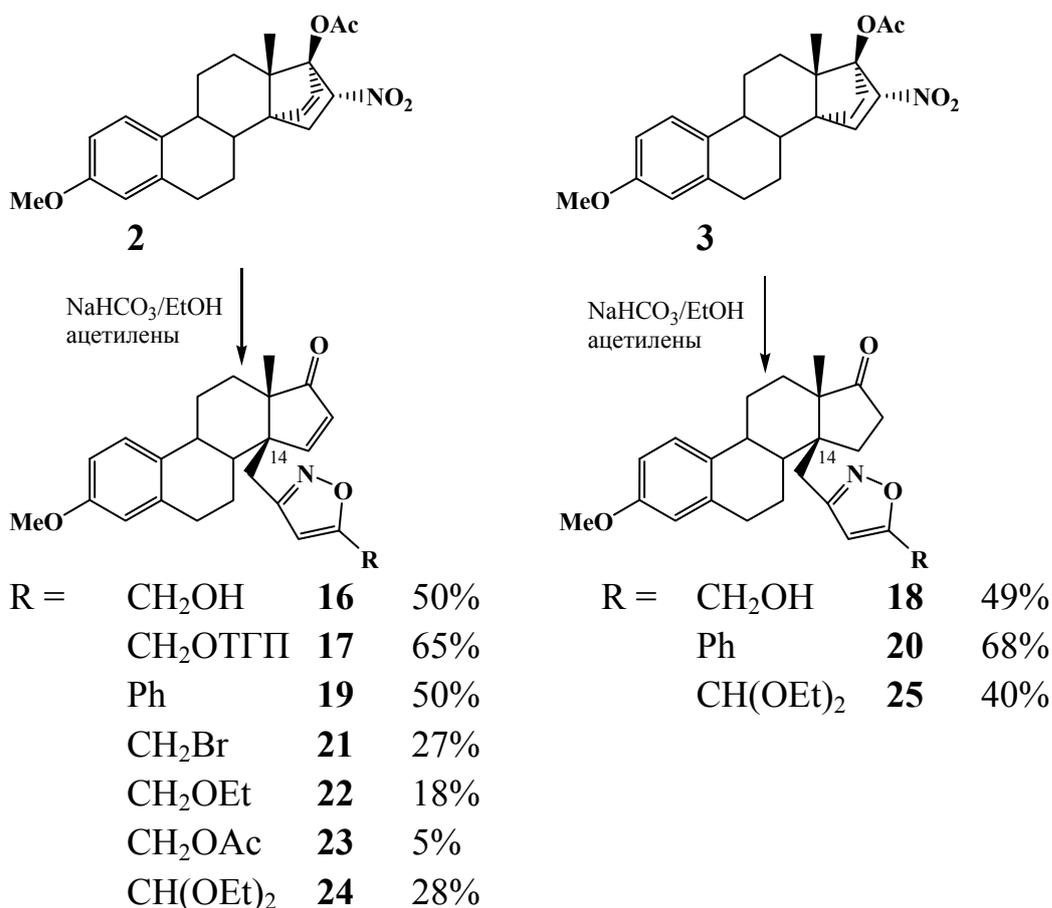


Схема 2.6

Во всех реакциях с участием нитростероида **2** отмечалось образование в качестве побочного продукта лактама **4**. Этот факт несомненно повлиял также и на выходы изоксазолов, полученных из стероида **2**, которые оказывались в среднем ниже, чем в случае нитроаддукта **3**.

1.2.3 1,3-Диполярное циклоприсоединение виниловых эфиров

При взаимодействии простых виниловых эфиров, таких как этилвиниловый или бутилвиниловый эфиры, с нитростероидами **2** и **3** были получены соответствующие изоксазолины **26-29** в виде смесей (1:1) диастереомеров по положению C-5' гетероцикла (Схема 2.7). Выходы (69-79%) в данном случае оказались выше, чем при реакциях с образованием изоксазолов.

При реакции нитростероида **2** с этилвиниловым эфиром было зафиксировано образование изоксазола **30** (6%). Его появление можно объяснить отщеплением этанола с формированием ароматического изоксазольного цикла.

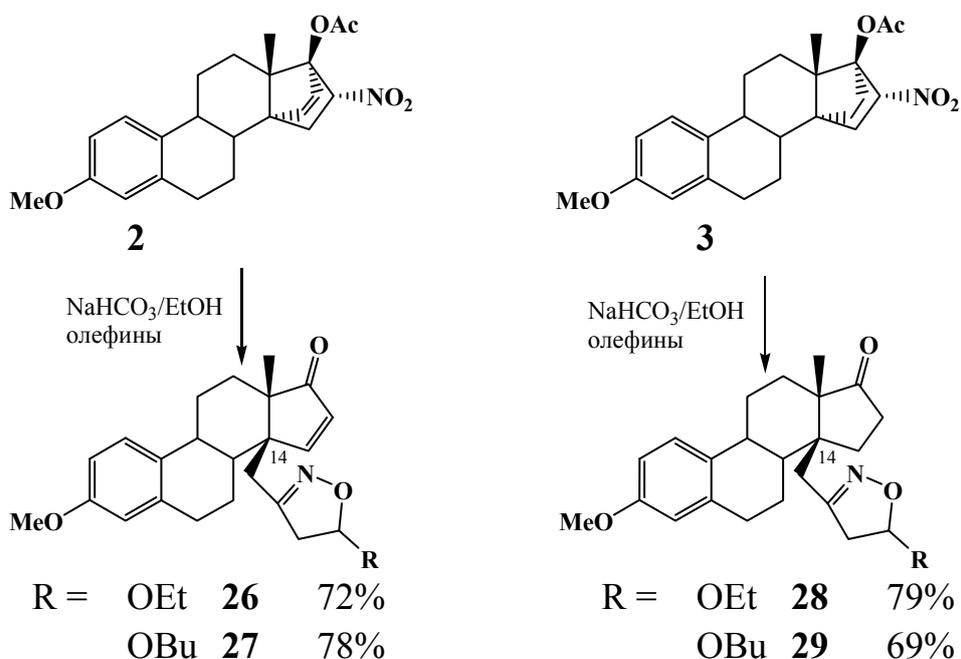


Схема 2.7

В случае 2-хлорэтилвинилового эфира изоксазол **30** оказывался основным продуктом (45%) наряду с изоксазолином **31** (16%). Примечательно, что при синтезе изоксазолинов не было отмечено образования ни лактама **4**, ни оксимов **11** и **12**.

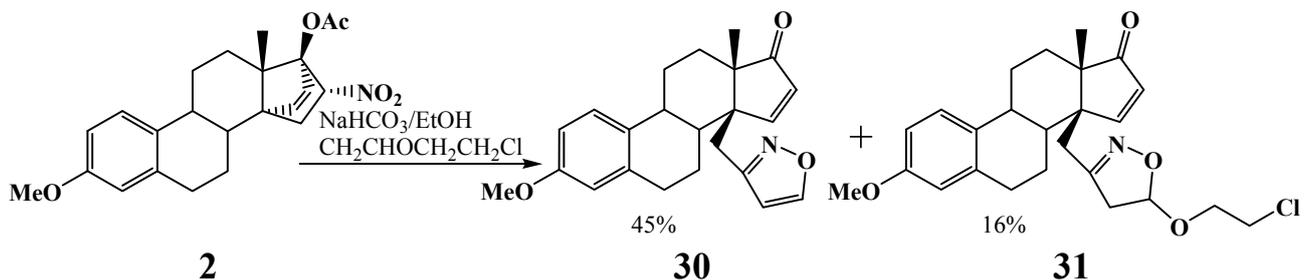


Схема 2.8

В пользу участия окисей нитрилов при слабоосновном сольволизе 17-ацетокси-16-нитросоединений **2** и **3** говорит факт 1,3-диполярного циклоприсоединения с участием ацетиленов и олефинов. Предложенный механизм (Схема 2.4) описывает наиболее вероятное течение реакции образования нитрилоксида в случае нитростероида **2**. В качестве побочного продукта реакции циклоприсоединения образуется лактам **4**, структура которого была доказана как химическими трансформациями, так и рентгеноструктурным анализом.

2 С-14-Производные андростанового ряда

Среди методов синтеза С-14-замещенных стероидов, содержащих углеродную цепь в положении С-14, можно выделить два подхода. Первый включает функционализацию и последующие трансформации 14 α -метильной группы производных ряда ланостана, окисление и удаленную

функционализацию положения С-14. Второй подход предполагает непосредственное введение алкильного заместителя в положение С-14, активированное наличием $\Delta^{14(15)}$ связи. Подход, использованный в нашей работе предполагает введение заместителя в положение С-14 при реакции Дильса-Альдера стероидных 14,16-диенил ацетатов и нитроэтилена или винилфенилсульфона в качестве диенофилов.

2.1 Синтез 14 β -производных ряда андростана

Целью данного этапа нашей работы был синтез производных андростана, содержащих функционализированный фрагмент в положении 14 β . Предполагалось проверить возможность применения нитрилоксидного подхода к синтезу 14 β -производных стероидов в андростановом ряду. Наличие углеродной цепи в положении С-14 дает возможность использовать синтезированные соединения в качестве гаптенных в иммуноферментном анализе. Учитывая все вышесказанное, были разработаны подходы к синтезу 14 β -замещенных стероидов.

2.1.1 Синтез 14,16-диен-17-ил ацетатов

С целью получения 14 β -замещенных стероидов мы предприняли синтез диенольного эфира **32**.

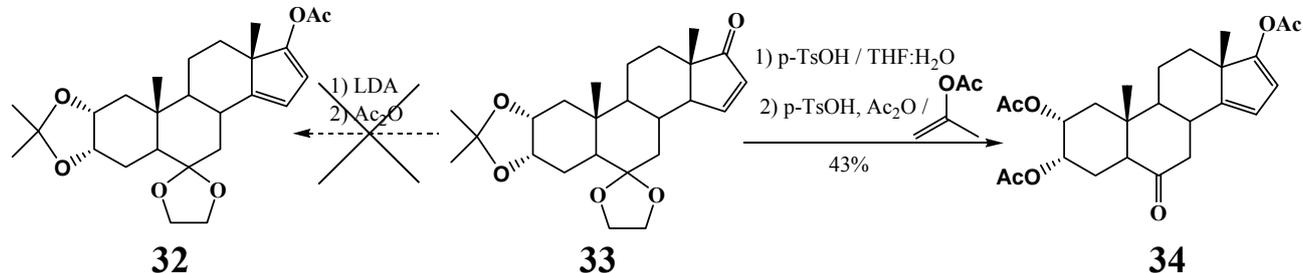


Схема 2.9

Исходным соединением выступал сопряженный кетон **33**, который содержал характерную для природных брассиностероидов и защищенную функциональность в циклах А/В. Его подвергли трансформациям с целью синтеза диенилацетата **32**. Однако условия, применявшиеся для получения диенилацетатов эстранового ряда, оказались неприменимыми из-за лабильности защитных групп и приводили к диенилацетату **34** с выходом 43%. Использование для енолизации органических оснований (LDA, Et₃N, 1,8-бис(диметиламино)нафталин, 2,6-ди(*трет*-бутил)-4-метилпиридин и др.) с последующим ацетилированием не дало положительных результатов. Разработанная нами двухстадийная методика предполагала предварительную перегруппировку Δ^{15} -связи сопряженного кетона **33** в Δ^{14} -связь под действием основания с дальнейшей енолизацией 17-карбонильной функции (Схема 2.10).

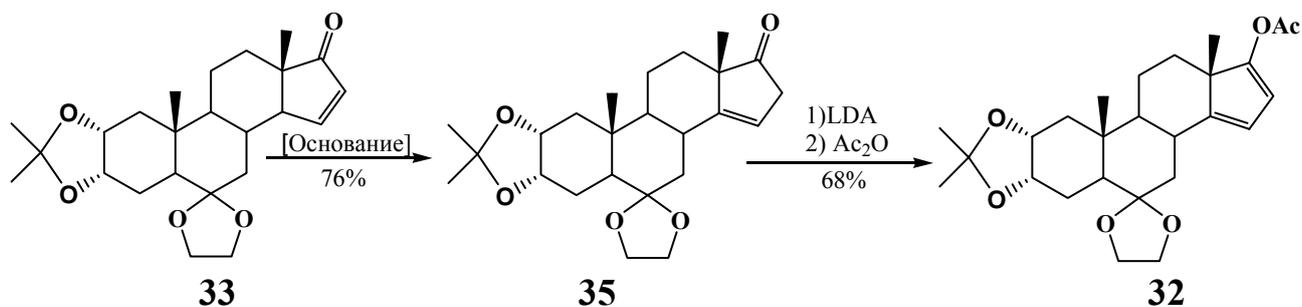


Схема 2.10

Наилучшие результаты получены в случае диизопропиламина: выход кетона **35** составил 95% при 80%-ной конверсии исходного стероида **33**. Полученный кетон **35** далее был успешно трансформирован в диенилацетат **32** с выходом 68% при действии LDA и последующем ацетилировании (Ac_2O).

2.1.2 Синтез и трансформации 16-нитростероидов ряда андростана

Разработанный подход к синтезу 14β -производных эстранового ряда был применен для соединений ряда андростана, содержащих в циклах А/В функциональность, характерную для brassinosteroidов.

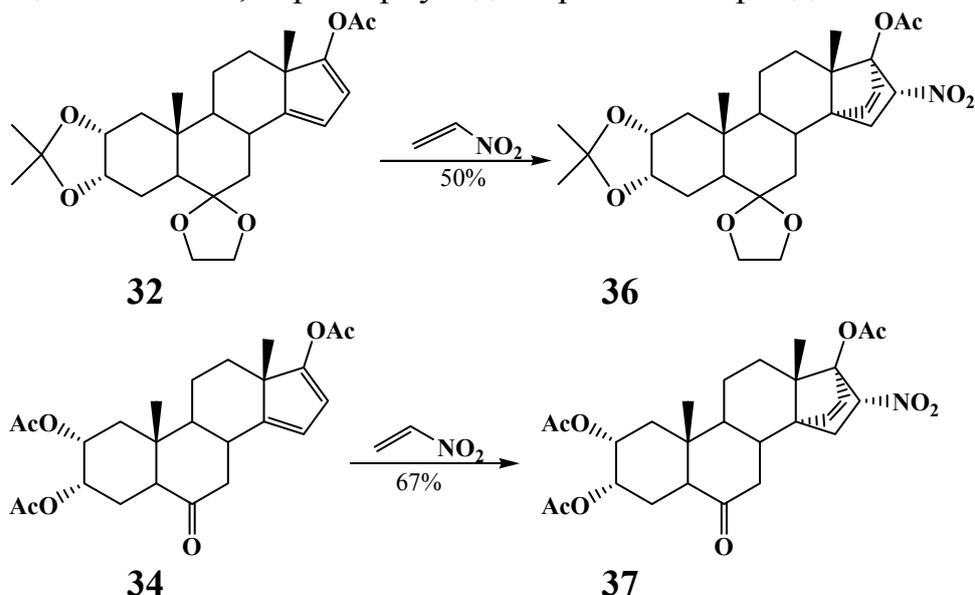


Схема 2.11

Исходя из диенилацетатов **32** и **34** по реакции Дильса-Альдера с нитроэтиленом были получены нитростероидные аддукты **36** и **37**. Выходы в отличие от нитроаддуктов эстранового ряда оказались значительно ниже (50-67% против 80-86%), что может быть связано со стерическим фактором.

Как и в случае с эстрановыми стероидами, присоединение проходило с β -стороны стероидной молекулы и по типу «голова к голове» с образованием одного изомера. Стереохимический результат реакции был установлен на основании данных по ядерному эффекту Оверхаузера, наблюдаемому в спектрах NOESY между протонами при C-15, C-16 и протонами C-18

метильной группы, а также между протонами C14-C17-мостика и α -протонами циклов В и С.

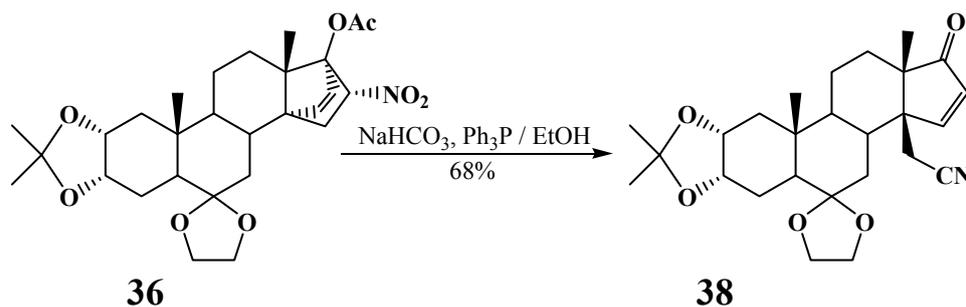


Схема 2.12

Восстановительное расщепление C16-C17-связи нитроаддукта **36** под действием гидрокарбоната натрия в присутствии трифенилфосфина привело к нитрилу **38**.

2.2 Синтез 14 α -производных ряда андростана

Большинство природных стероидов содержат заместитель (протон, гидроксигруппа и др.) в положении 14 α , что соответствует транс-сочленению циклов С и D. Для синтезированных в настоящей работе 14 β -производных эстрана с цис-сочленением циклов С и D характерна пространственная ориентация, при которой плоскость цикла D значительно отклонена от плоскости стероидного скелета. Учитывая значительное влияние пространственной структуры на свойства биомолекул, одно из направлений нашего исследования посвящено получению 14 α -производных стероидов.

2.2.1 Синтез 14 α ,17 α -диформил-17 β -ацетоксипроизводного андростана

Ключевой стадией в синтезе как 14 β -, так и 14 α -производных стероидов являлось раскрытие C14-C17 фрагмента, полученного в результате циклоприсоединения низкомолекулярного диенофила к стероидному диенилацетату. Причем разрыв С-С связи при последующих трансформациях может происходить как во вновь сформированном цикле, так и по двойной связи цикла D. В первом случае результатом разрыва C16-C17 связи будет формирование дополнительной цепи в положении C-14 с β -ориентацией. Данный подход был продемонстрирован на примере нитростероидных аддуктов. Во втором случае расщепление C17¹-C17² двойной связи дает аддукты с заместителями в положениях 14 α и 17 α . В данном случае перспективным выглядит подход с использованием винилфенилсульфона в качестве диенофила, где фенилсульфонильная группа в последующем отщепляется амальгамированными металлами, а двойная связь расщепляется с образованием диальдегида.

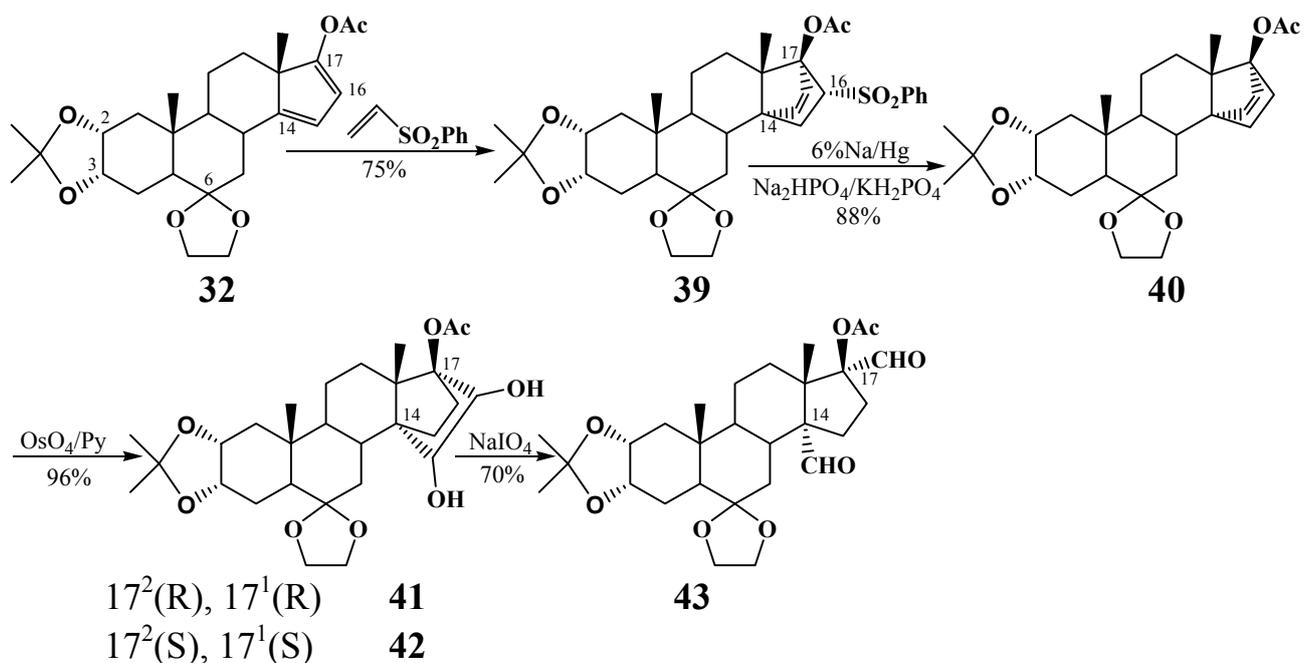


Схема 2.13

Реакция циклоприсоединения диенилацетата **32** с винилфенилсульфоном протекала с β -стороны и с образованием одного основного *эндо*-аддукта **39** (выход 65-75% после перекристаллизации). Причем пространственное расположение групп в цикле D оказалось таким же, как и для нитростероидного аддукта **2**, что подтверждено данными спектра NOESY. Фенилсульфонильную группу стероида **39** удаляли действием амальгамы натрия в смеси ТГФ/метанол в присутствии фосфатного буфера для предотвращения снятия ацетатной защиты 17β -гидроксильной группы. В полученном продукте **40** требовалось расщепить $C17^1$ - $C17^2$ двойную связь с образованием диальдегида. Наиболее эффективным оказался двухстадийный вариант дигидроксилирования с помощью OsO_4 с дальнейшим расщеплением диола под действием NaIO_4 . Смесь соответствующих спиртов **41**, **42** была получена с количественным выходом и использовалась в реакции с NaIO_4 без разделения. Выход реакции составил 50-70%, что связано с нестабильностью стероида **43**. Пространственное строение спиртов **41**, **42** было установлено при использовании данных спектров ЯМР NOESY, для доказательства строения стероидов **39-43** были привлечены также данные масс-спектрометрии и ИК-спектроскопии.

2.2.2 Синтез 14α -формил-17-кетопроизводного андростана

Второй вариант введения заместителя в положение 14α включал последовательность реакций, приводившую к 14α -формильному продукту **44** (Схема 2.14).

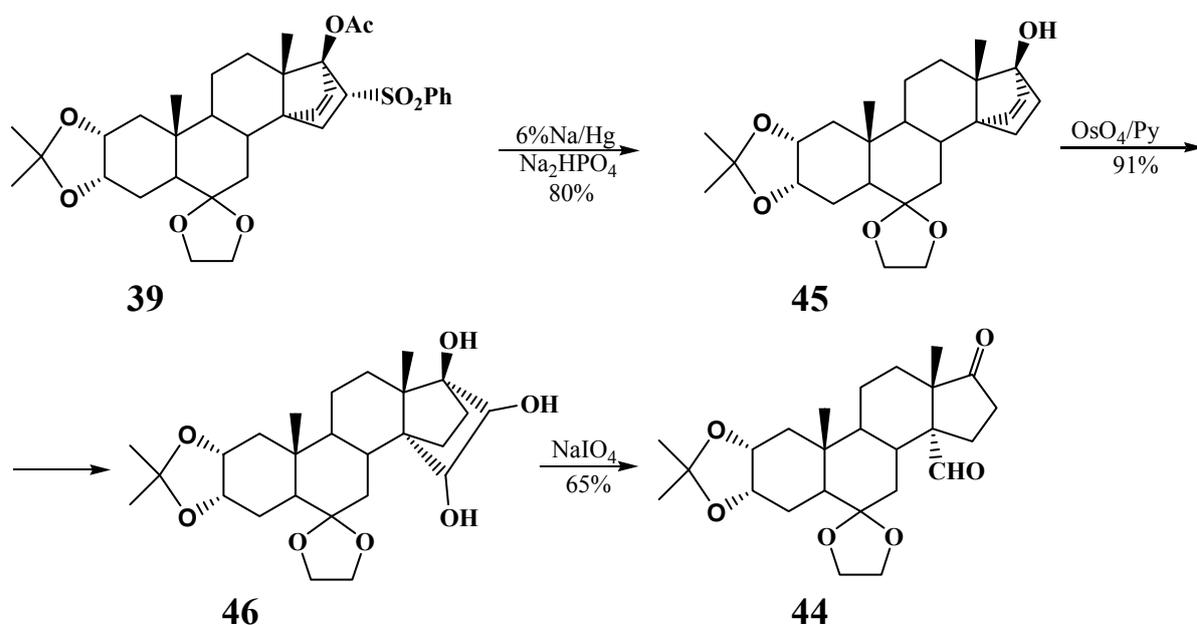


Схема 2.14

Последний был синтезирован в три стадии исходя из фенилсульфона **39**. Согласно приведенной схеме превращений после десульфонилирования стероида **39** и гидролиза в условиях этой реакции 17-ацетоксигруппы был получен спирт **45**. Последний был трансформирован в хроматографически неразделимую смесь триолов **46** дигидроксилированием под действием OsO_4 . Наилучшие результаты, как и в случае олефина **40**, были получены при использовании эквимольных количеств тетраоксида осмия. Расщепление триола **46** до 14 α -формил-17-кетостероида **45** проходило в течение 5 минут под действием двух эквивалентов NaIO_4 (выход 40-65%).

2.2.3 Функционализация положения 14 α

Имея в виду возможность последующего применения синтезированных С-14-замещенных стероидов в иммунохимическом анализе, мы предприняли несколько попыток формирования углеродной цепи в положении 14 α с требуемой функциональностью.

В качестве исходного соединения для исследования был выбран 14 α -формил-17-кетостероид **44**, который содержит сформированную и защищенную циклическую часть, характерную для основных представителей brassinosteroidов и карбонильную функцию в положении С-17, пригодную для построения боковой цепи brassinosteroidов. Ввиду ожидаемой реакционной способности альдегидной группы стероида **44** предполагалось в дальнейших трансформациях превратить 14 α -формильную функцию в гидроксильную либо карбоксильную с последующей их защитой.

Однако, в результате экспериментов была выявлена устойчивость альдегидной функции стероида **44** к действию окислительных (Ag_2O , Oxone®,

KMnO₄/дибензо-18-краун-6, PDC и др.) или восстановительных ((tBuO)₃LiAlH, NaBH₄ и др.) агентов. Такую неожиданную стабильность альдегидной группы соединения **44** в окислительно-восстановительных реакциях можно объяснить влиянием стерического фактора, а именно: наличием объемного циклического стероидного фрагмента.

Альтернативный подход к наращиванию цепи в положении 14 α включал реакцию Виттига-Хорнера между альдегидом **44** и илидами фосфора с последующим восстановлением образующейся двойной связи стероида **47** водородом. Указанная последовательность реакций приводила к стероиду **48**.

В процессе реакции дикетона **44** с триэтилфосфоацетатом наряду с основным продуктом реакции по альдегидной группе – стероидом **47** (выход 50%) – образовывалось до 30% продукта реакции Виттига по 17-карбонильной группе. Применение других фосфониевых соединений (таких, как триэтилфосфопропионат или триэтил-4-фосфонокротонат) не привело к продуктам присоединения по 14 α -формильной группе.

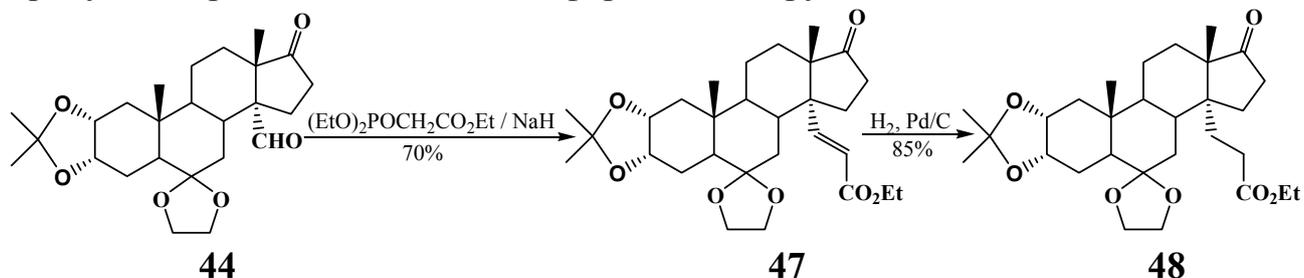


Схема 2.15

Хороших результатов удалось добиться, модифицировав методику для реакции Виттига стероида **44** с триэтилфосфоацетатом и заменив применяемый ранее в качестве растворителя ТГФ на бензол. Выход целевого продукта **47** при этом увеличился до 70%, а образования побочного продукта не наблюдалось.

Таким образом, были получены стероидные соединения со сформированной алкильной цепью в положении 14 α , содержащие в циклах А и В функциональность, характерную для brassinosteroidов. Наличие 17-карбонильной группы позволяет осуществить построение боковой цепи brassinosteroidов известными методами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации:

1. Осуществлен синтез 16-нитростероидных соединений с использованием реакции Дильса-Альдера стероидных 14,16-диенов и нитроэтилена в качестве активного диенофила, что позволило получить ключевые продукты для синтеза С-14-замещенных стероидов [1, 5, 7].

2. Разработан метод трансформации мостиковых 16-нитростероидов в 14 β -изоксазолметил- и 14 β -изоксазолинметил-производные путем реакции с олефинами или ацетиленами в мягких основных условиях. Процесс предполагает участие стероидных нитрилоксидных интермедиатов, взаимодействующих с диполярфилами по механизму 1,3-диполярного циклоприсоединения и позволяет эффективно вводить требуемую функциональность в положение С-14 стероидной молекулы, являющееся труднодоступным для большинства модифицирующих реагентов [3, 5].
3. Разработаны новые подходы к формированию углеродной цепи стероидов в положениях 14 α и 14 β [7, 8].
4. Исследованы пути трансформации мостиковых 16-нитростероидов с привлечением методов ВЭЖХ-ЯМР спектроскопии и спектроскопии ЯМР в реальном времени. Предложен механизм процесса, включающий образование стероидных нитрилоксидных интермедиатов [2, 6].
5. Получены детальные ЯМР характеристики новых С-14-замещенных стероидов с привлечением методов двумерной спектроскопии ЯМР и выполнено полное отнесение сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР [1-3, 7, 8].

Рекомендации по практическому использованию результатов.

Результаты исследований могут найти применение:

- в практике тонкого органического синтеза для получения новых стероидных соединений с заместителем в положении С-14;
- в медицине в качестве высокоспецифичных антагонистов эстрадиолового рецептора, при разработке препаратов для лечения гиперхолестеринемии;
- в биохимии и сельском хозяйстве в качестве удобных гаптенных для иммунохимического анализа стероидов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Baranovsky, A. V. Synthesis of 3-methoxy-16 α -nitro-14,17-ethenoestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl acetate and fragmentation-mediated pathways to 14 β ,15 β -fused N-heterocycles and 14 β -functionalised alkyl derivatives / A. V. Baranovsky, D. A. Bolibrukh, J. R. Bull // European Journal of Organic Chemistry – 2007. – №3. – P. 445–454.
2. Baranovsky, A. V. Synthesis and molecular structure of 14,15-pyrrolidino- and 14,16-ethano derivatives of estrone / A. V. Baranovsky, D. A. Bolibrukh, J. R. Bull, A. S. Lyakhov, V. A. Khripach // Steroids – 2008. – Vol. 73. – P. 585–593
3. Baranovsky, A. V. A new approach to heterocycle-modified steroids via nitrile oxide intermediates / A. V. Baranovsky, D. A. Bolibrukh, V. A. Khripach, B. Schneider // ARKIVOC – 2007. – № 9. – P. 29–41 with suppl.

Тезисы докладов:

4. Болибрух, Д.А. Структура, синтез и спектральные свойства 3-метокси-2'-оксопирролидино-[4',5':14 β ,15 β]-эстра-1,3,5(10)-триен-17-она / Д. А. Болибрух, А. В. Барановский, В. А. Хрипач // Сборник трудов 2-ой международной конференции "Химия, структура и функции биомолекул" – Минск. – 2006. – С. PR-20

5. Барановский, А. В. Метод введения изоксазольного фрагмента в положение С-14 стероидов / А. В. Барановский, Д. А. Болибрух, В. А. Хрипач // Сборник трудов 2-ой международной конференции "Химия, структура и функции биомолекул" – Минск. – 2006. – С. PR-15

6. Baranovsky, A. V. HPLC-SPE-NMR-analysis of 3-methoxy-14,17-etheno-16 α -nitroestra-1,3,5(10)-trien-17 β -yl acetate solvolysis products / A. V. Baranovsky, D. A. Bolibruch, V. A. Khripach, B. Schneider // International Conference on LC-NMR and Related Techniques "Challenges in Biological Systems" – Jena. – 2008. – P. 24

7. Барановский, А. В. Получение 14,16-диенил-17-ацетатов – ключевых соединений в синтезе 14-замещенных стероидов андростанового ряда / А. В. Барановский Д. А. Болибрух, Б. Шнайдер, В. А. Хрипач // Сборник трудов 3-ей международной конференции "Химия, структура и функции биомолекул" – Минск. – 2008. – С. 32

8. Baranovsky, A. V. A way to synthesis of c14 α -substituted oxygenated androstanes / A. V. Baranovsky, D. A. Bolibruch, V. A. Khripach, B. Schneider // The International Conference dedicated to the 50th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry, of the Moldavian Academy of Sciences. – Chişinău. – 2009. – P. 125

РЕЗЮМЕ

Болибрух Дмитрий Александрович
Аддукты Дильса-Альдера стероидных 14,16-диенов в
синтезе С-14-производных стероидов

Ключевые слова: стероиды, brassinosteroids, нитрилоксиды, нитросоединения, диенилацетаты, 1,3-диполярное циклоприсоединение, изоксазолы, изоксазолины, расщепление С-С связи, скелетные перегруппировки, реакция Дильса-Альдера, реакция Виттига-Хорнера, спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

Целью настоящей работы являлся синтез стероидных соединений ряда андростана и эстрана, содержащих алкильную цепь в положении С-14.

Методы исследования и аппаратура: химический синтез, ЯМР- и ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ.

В результате проведенных исследований осуществлен синтез 16 α -нитростероидных соединений ряда эстрана и андростана с использованием реакции Дильса-Альдера стероидных 14,16-диенов и нитроэтилена, разработан новый метод генерирования стероидных нитрилоксидных интермедиатов. Получены 14 β -изоксазоллил- и 14 β -изоксазолинилметильные производные стероидов. Разработаны подходы к формированию алкильных цепей в положениях 14 α - и 14 β . Методами спектроскопии ЯМР исследованы механизмы новых скелетных перегруппировок нитростероидов и пути формирования нитрилоксидных интермедиатов.

Область применения: органическая химия, химия природных соединений, спектроскопия ЯМР.

РЭЗЮМЭ

Балібрух Дзмітрый Аляксандравіч
Адукты Дыльса-Альдера стэроідных 14,16-дыенаў
у сінтэзе С-14-вытворных стэроідаў

Ключавыя словы: стэроіды, брасінастэроіды, вокісі нітрылаў, нітразлучэння, дыенілацетаты, 1,3-дыпалярнае цыкладалучэнне, ізаксазолы, ізаксазаліны, расшчапленне С-С сувязі, шкілетныя перагрупоўкі, рэакцыя Дыльса-Альдэра, рэакцыя Віціга-Хорнэра, спектраскапія ядзернага магнітнага рэзанансу.

Мэтай вызначаннай працы з'яўляўся сінтэз стэроідных злучэнняў шэрагу андрастана і эстрана, утрымоўваючых алкільны ланцуг у становішчы С-14.

Метады даследавання і апаратура: хімічны сінтэз, ЯМР- і ІЧ-спектраскапія, мас-спектраметрыя, рэнтгенаструктурны аналіз.

У выніку праведзеных даследаванняў ажыццёўлены сінтэз 16 α -нітрастэроідных злучэнняў шэрагу эстрана і андрастана з выкарыстаннем рэакцыі Дыльса-Альдэра стэроідных 14,16-дыенаў і нітраэтылена, распрацаваны новы метады генеравання стэроідных інтэрмедыятных вокісяў нітрылаў. Атрыманы 14 β -ізаксазаліл- і 14 β -ізаксазалінілметыльныя вытворныя стэроідаў. Распрацаваны падыходы да фармавання алкільных ланцугоў у становішчах 14 α - і 14 β . Метадамі спектраскапіі ЯМР даследаваны механізмы новых шкілетных перагруповак нітрастэроідаў і шляхі фармавання інтэрмедыятаў вокісей нітрылаў.

Галіна выкарыстання: арганічная хімія, хімія прыродных злучэнняў, спектраскапія ЯМР.

SUMMARY

Bolibrukh Dmitry Alexandrovich
Diels-Alder cycloadducts of 14,16-dienes in the synthesis
of C-14-substituted steroids

Key words: steroids, brassinosteroids, nitrile oxides, nitro compounds, dienyl acetates, 1,3-dipolar cycloaddition, isoxazols, isoxazolines, C-C bond cleavage, skeleton transformations, Diels-Alder reaction, Wittig-Horner reaction, nuclear magnetic resonance spectroscopy.

The purpose of the present work is synthesis of androstane and estrane steroids with the alkyl chain at C-14 position.

Methods and apparatuses: chemical synthesis, NMR- and IR-spectroscopy, mass-spectrometry, X-ray structure analysis.

As a result of accomplished research synthesis of 16 α -nitro steroids via Diels-Alder cycloaddition of 14,16-dienes and nitrothene was carried out and new method for the generation of steroid nitrile oxide intermediates was developed. 14 β -Isoxazolyl- and 14 β -isoxazolinylmethyl derivatives of steroids were obtained. Approach for the construction of alkyl chains at 14 α - and 14 β -position was elaborated. By usage of NMR spectroscopy the mechanism of new skeleton rearrangements and the ways of nitrile oxide formation were studied.

Areas of application: organic chemistry, chemistry of natural compounds, NMR spectroscopy.

* * * * *

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю члену-корреспонденту НАН Беларуси, д.х.н., профессору В.А. Хрипачу, к.х.н. А.В. Барановскому, доктору Б. Шнайдеру (Институт химической экологии общества Макса Планка, г. Йена, ФРГ) за постоянное внимание и помощь в работе. Благодарю М.А. Аверькову, проф. Дж.Р. Булла, к.х.н. А.С. Ляхова, доктора А. Сватоша, принявших участие в проведении совместных исследований. Выражаю признательность сотрудникам Лаборатории химии стероидов, Лаборатории физико-химических методов исследования (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) и Лаборатории ЯМР/биосинтез (Институт химической экологии общества Макса Планка, г. Йена, ФРГ), в которых была выполнена данная работа, за оказанное содействие и дружескую атмосферу. Выражаю глубокую признательность моим преподавателям, родителям и моей жене.