

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
“ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ”

УДК 547.92.057+547.924

ЕРМОЛОВИЧ
ЮРИЙ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

**ФОРМИРОВАНИЕ БОКОВОЙ ЦЕПИ СТЕРОИДОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИГМАТРОПНЫХ ПЕРЕГРУППИРОВОК**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Минск, 2015

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель: **Жабинский Владимир Николаевич,**
доктор химических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси

Официальные оппоненты: **Поткин Владимир Иванович,**
доктор химических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий отделом органической химии Института физико-органической химии НАН Беларуси

Пашковский Феликс Сигизмундович,
кандидат химических наук, заведующий лабораторией химии простагландинов Института биоорганической химии НАН Беларуси

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Белорусский государственный университет»

Защита состоится «16» июня 2015 г. в 13.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» по адресу: 2200141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2 в зале заседаний Ученого Совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я.Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «12» мая 2015 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук



С.В.Бабицкая

ВВЕДЕНИЕ

Наличие боковой цепи является ключевой особенностью целого ряда природных стероидных соединений, таких как brassinosteroids, эйдистероиды, морские стеринны, холестерин и его метаболиты, холевые кислоты и ряд других. Безусловно, соответствующим образом функционализированные боковые цепи, характерные для вышеперечисленных групп стероидов, в значительной мере определяют физико-химические и биологические свойства стероидной молекулы в целом.

Особенностью большинства стероидов является их достаточно низкое содержание в природных объектах, что значительно усложняет, а иногда делает невозможным выделение требуемых соединений для практических целей. Одним из очевидных решений данной проблемы является частичный либо полный химический синтез. Часто для стероидных соединений (в особенности, для боковой цепи) характерна достаточно сложная химическая структура с большим количеством функциональных групп и стереоцентров, что существенно усложняет задачу химического синтеза. Несмотря на то, что на настоящий момент в химии стероидов существует значительное количество методов формирования боковых цепей, для множества подходов характерны определенные недостатки: невысокие выходы, недостаточная стереоселективность, небольшой круг субстратов, использование дорогостоящих реактивов и т.д. Практические потребности в стероидных соединениях постоянно требуют усовершенствования старых методов синтеза, а также разработки новых.

Среди наиболее удачных и при этом достаточно перспективных методов формирования стероидных боковых цепей следует выделить сигматропные перегруппировки (в частности, перегруппировку Кляйзена и ее модификации). Реакции данного типа в большинстве случаев характеризуются мягкостью условий протекания, хорошими выходами целевых продуктов и высокой стереоселективностью. Потенциал сигматропных перегруппировок в химии стероидов все еще далеко не исчерпан.

Данная работа посвящена изучению особенностей протекания различных вариантов перегруппировки Кляйзена и разработке новых стереоселективных методов формирования стероидных боковых цепей на ее основе. В качестве целевых соединений выбраны метаболиты холестерина с карбоксильной группой при С-25 и brassinosteroids в связи с высокой практической полезностью данных стероидов, а также их относительно малой синтетической доступностью.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг. (раздел 2 «Супрамолекулярная химия, химический синтез новых веществ и материалов с заданной структурой, функциональными и физико-химическими свойствами. Новые химические продукты и технологии», пункт 2.2 «Биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты»). Диссертационная работа является частью плановых исследований Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, выполненных в рамках ГП «Импортозамещающая фармпродукция», подпрограмма «Фармсубстанции и готовые лекарственные средства», задание Ф14 «Разработать и освоить технологию производства фармсубстанции оригинального отечественного препарата антихолестеринемического действия – декрехола на основе эпибрасиностероидов» (№ ГР 20102263, 2010-2015 гг.); ГПОФИ «Создание биорациональных химических средств защиты растений новых поколений» (Биорациональные пестициды-2), задание 1.09 «Разработка научных основ получения и применения фитолектинов в качестве антистрессовых биорациональных пестицидов» (№ ГР 20093016, 2009-2013 гг.); по проектам БРФФИ: X10P-118 «Стероидные гормоны растений и их новые синтетические производные, как регуляторы пролиферации и апоптоза в клетках карциномы простаты» (№ ГР 20102599, 2010-2012 гг.), X13K-094 «Роль фосфатидной кислоты в реализации биологического действия природных брасиностероидов и их синтетических аналогов в процессе адаптации метаболизма растений к действию стрессов» (№ ГР 20131432, 2013-2015 гг.), X14P-139 «Разработка методологии регио- и стереоселективного оксигенирования природных изопреноидов – путь к получению новых типов физиологически активных веществ» (№ ГР 20131434, 2013-2015 гг.).

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – разработка методов синтеза боковой цепи стероидных соединений с использованием [3,3]-сигматропных перегруппировок.

Поставленная цель достигалась решением следующих задач:

1. Разработка эффективных методов синтеза 27C-стероидов с использованием перегруппировки Джонсона-Кляйзена при построении боковой цепи.
2. Исследование перегруппировки Ирланда-Кляйзена для стереоселективного формирования хирального центра при C-25.

3. Создание стереонаправленных методов построения боковых цепей стероидов на основе последовательного применения сигматропной перегруппировки и асимметрического алкилирования.

Объекты исследования – brassinостероиды, холестеновые и дафахроновые кислоты. Предметом изучения являлась разработка методов синтеза указанных соединений.

Научная новизна:

1. Предложен улучшенный метод синтеза 28-норбрасинолида из стигмастерина, включающий использование перегруппировки Джонсона-Кляйзена смеси изомерных по С-22 аллилвиниловых эфиров для построения стероидной боковой цепи, введение диольных функций в результате дигидроксилирования по Шарплессу, что в итоге привело к существенному увеличению выхода целевого соединения и уменьшению количества синтетических стадий по сравнению с более ранними литературными методами.
2. Разработан эффективный метод получения стероидных 22С-альдегидов из коммерчески доступных brassinостероидов эргостанового ряда, особенностью которого является использование боратов в качестве региоселективной временной защиты 22,23-диольной функции.
3. Впервые выполнен синтез трех биосинтетических предшественников 28-норбрасинолида: 28-нортеастерона, 28-норсекастерина, 28-норсекастерона.
4. В результате 1,4-переноса хиральности в ходе перегруппировок Джонсона-Кляйзена и Ирланда-Кляйзена стероидных пропаргилвиниловых и аллилвиниловых эфиров осуществлен синтез стереоизомерных холестеновых и дафахроновых кислот.
5. Разработан новый стереонаправленный метод формирования С24-С28-фрагмента боковой цепи стероидов в результате последовательного применения перегруппировки Кляйзена и асимметрического алкилирования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Усовершенствованный метод синтеза 28-норбрасинолида из стигмастерина с использованием для построения углеродного скелета боковой цепи перегруппировки Джонсона-Кляйзена смеси изомерных по С-22 стероидных аллилвиниловых эфиров.
2. Использование коммерчески доступных brassinостероидов эргостанового ряда при получении 27С-brassinостероидов, в том числе содержащих дейтериевую метку.

3. Синтез стереоизомерных по С-25 холестеновых и дафахроновых кислот в результате 1,4-переноса хиральности в ходе перегруппировки Кляйзена стероидных пропаргилвиниловых и аллилвиниловых эфиров.
4. Методология асимметрического алкилирования при формировании стероидного С-25-стереоцентра на примере синтеза метаболитов брассинолида и холестерина.

Личный вклад соискателя заключается в проведении экспериментальной части работы, разработке методик, установлении структуры полученных соединений, анализе литературных данных. Постановка задач, интерпретация результатов и подготовка материалов для научных публикаций осуществлялась совместно с д.х.н., доц. В.Н. Жабинским и акад. НАН Беларуси, проф. В.А. Хрипачом. Синтез 27С-брассиностероидов из 24-эпикастастерона проводился при участии студентки химического факультета БГУ И.Д. Альшаковой. Биологические исследования биосинтетических предшественников 28-норбрассинолида проводились в Институте биомедицинской химии им. Ореховича РАН (Москва).

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены в виде докладов на III, IV и V Междунар. конф. «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2008, 2012, 2014), науч.-практ. конф. «Биологически-активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новый Свет, 2011), 4th Annual Russian-Korean conf. (Novosibirsk, 2012), 18th European Symposium on Organic Chemistry (Marseille, 2013), 22nd Conf. on Isoprenoids (Praha, 2014).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 1 глава в коллективной монографии и 6 статей в международных научных изданиях общим объемом 8.6 авторских листа, а также тезисы 7 докладов. Получены 2 патента РБ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из оглавления, перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения и библиографического списка. В главе 1 приводится обзор литературных данных по синтезу брассиностероидов и их аналогов за последние 15 лет. Глава 2 посвящена обсуждению результатов собственных исследований. Глава 3 содержит экспериментальные данные. Работа изложена на 138 страницах, содержит 22 рисунка, 68 схем и 1 таблицу. Список цитируемой литературы включает 247 ссылок.

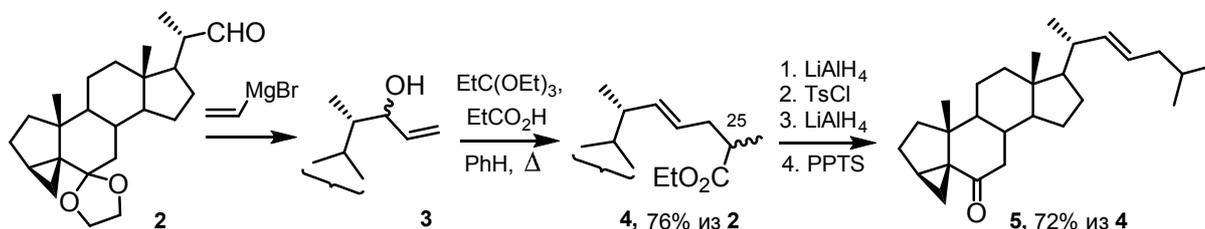
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез 27С-брассиностероидов и их потенциальных биосинтетических предшественников с использованием перегруппировки Джонсона-Кляйзена

Обнаружение в растительных источниках ряда 27С-брассиностероидов свидетельствует о важной роли данных производных в развитии растений. Некоторые из них (в частности, 28-норбрассинолид) в плане биологической активности в растениях в некоторых тестах не уступают брассинолиду. Известно, что БС оказывают влияние не только на растения (как типичные фитогормоны), но также и на живые организмы за пределами растительного царства. Дополнительным стимулом к более подробному изучению 27С-БС служит тот факт, что данные соединения имеют такой же углеродный скелет, как и холестерин – основной стерин млекопитающих.

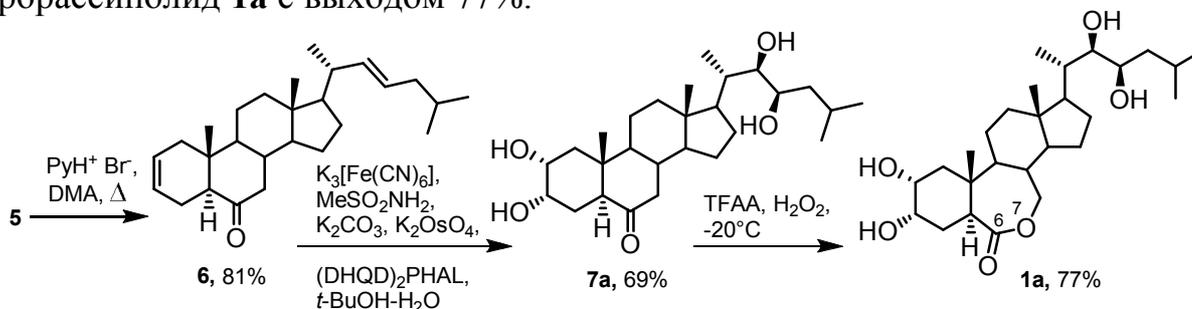
1.1 Усовершенствованный синтез 27С-брассиностероидов из стигмастерина

В качестве исходного соединения в синтезе 28-норбрассинолида **1a** использовали стероидный 22-альдегид **2**, полученный из недорого коммерчески доступного стигмастерина (70%, 5 стадий). Реакция **2** с винилмагнийбромидом в THF дала смесь аллиловых спиртов **3**. Эту смесь не разделяли на индивидуальные вещества, т.к. оба изомера вступают в перегруппировку Кляйзена с образованием одних и тех же продуктов. Перегруппировка Кляйзена смеси **3** с триэтилортопропионатом и каталитическими количествами пропионовой кислоты в бензоле дала диастереомерную смесь эфиров **4**. Следует отметить, что необходимости разделять смесь **4** не было, поскольку как 25*R*-, так и 25*S*-изомеры в результате последовательных стадий гидридного восстановления сложного эфира, тозилирования, восстановления промежуточного тозилата и регенерации карбонильной группы при С-6 дали индивидуальное соединение **5**.



Ведение Δ^2 -связи было достигнуто в одну стадию в результате кипячения соединения **5** в DMA в присутствии пиридиний бромид. Далее диенон **6** подвергли каталитическому дигидроксилированию по Шарплессу с хиральным лигандом (DHQD)₂PHAL с последующим хроматографическим разделением образовавшихся диастереомерных 2 α ,3 α ,22*R*,23*R*- и 2 α ,3 α ,22*S*,23*S*-тетраолов (соотношение 3.3:1 соответственно). Выход целевого 28-норкастастерона **7a**

составил 69%. Лактонная группировка в цикле В была сформирована в результате окисления по Байеру-Виллигеру. Реакция привела к смеси региоизомерных лактонов (6.7:1 в пользу 7-окса-6-оксопроизводного на основании спектра ПМР). В результате колоночной хроматографии и кристаллизации удалось выделить целевой продукт синтеза – 28-норбрассинолид **1a** с выходом 77%.



Таким образом, был разработан усовершенствованный метод синтеза 28-норбрассинолида из стигмастерина с использованием перегруппировки Джонсона-Кляйзена в качестве ключевой стадии при построении стероидной боковой цепи. Отличительные особенности нового метода по сравнению с литературными:

- 1) проведение ряда синтетических стадий без хроматографической очистки промежуточных соединений, что значительно упрощает процесс;
- 2) введение гидроксильных групп в результате дигидроксилирования по Шарплессу с использованием (DHQD)₂PHAL, что приводит к преимущественному образованию природного 2α,3α,22R,23R-тетраола;
- 3) окисление по Байеру-Виллигеру без предварительной защиты гидроксильных групп.

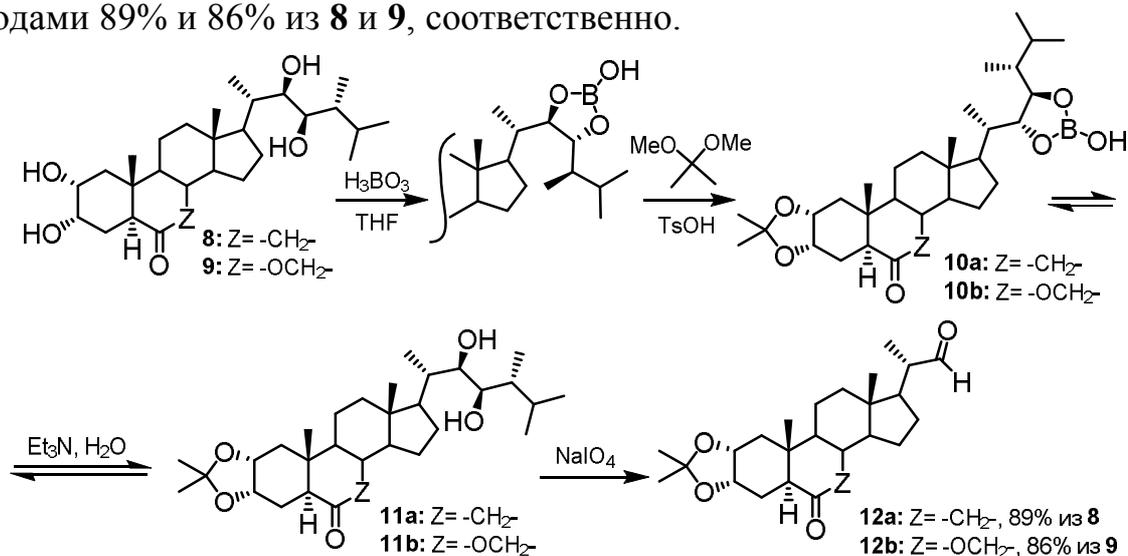
Суммарный выход 28-норбрассинолида составил 16% (14 стадий), в то время как в более ранних методах выход целевого соединения – менее 10%.

1.2 Синтез 27С-брассиностероидов из 24-эпикастастерона

Существующие методы синтеза 27С-брассиностероидов из коммерчески доступных стероидов включают в себя достаточно большое число стадий. Это связано с необходимостью формирования требуемой функционализации в циклической части брассиностероида в дополнение к стадиям построения боковой цепи. Решением данной проблемы может быть синтез целевых БС из соединений, уже содержащих необходимые функциональные группы в циклах А и В. В последние годы, в связи с применением 24-эпибрассинолида **9** в сельском хозяйстве, данный стероид и его синтетический предшественник 24-эпикастастерон **8** стали доступны в достаточно больших количествах. Это позволило рассмотреть использование данных соединений в качестве исходных в синтезе других малодоступных БС, отличающихся не только набором функциональных групп, но и углеродным скелетом. Для проверки данной

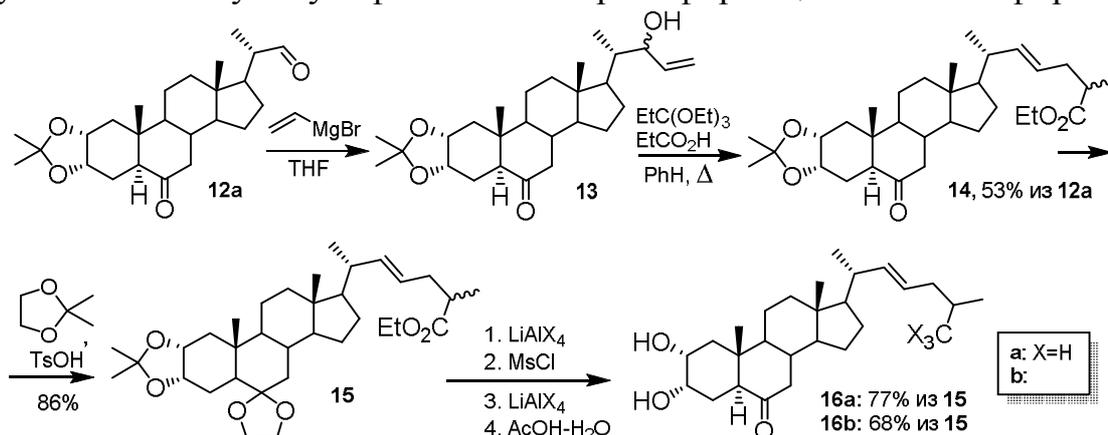
возможности был осуществлен синтез некоторых 27С-брасиностероидов, в том числе содержащих изотопную метку.

Важным интермедиатом в синтезе целевых 27С-БС является стероидный 22-альдегид, на основе которого возможно дальнейшее наращивание боковой цепи. Наиболее очевидным способом трансформации соединений **8** и **9** в соответствующий 22-альдегид является окислительное расщепление 22,23-диольной функции с помощью NaIO_4 , что, в свою очередь, подразумевает дифференциацию диольных групп в молекуле. В ходе настоящей работы было обнаружено, что подходящим вариантом для временной защиты 22,23-диольной группы является эфир борной кислоты, получаемый в результате прибавления к раствору **8** или **9** в THF эквимолярного количества H_3BO_3 . Далее в реакционную смесь последовательно добавили избыток 2,2-диметоксипропана, каталитическое количество *n*-толуолсульфокислоты и, после образования 2,3-ацетонида, триэтиламин, воду и периодат натрия. В данных условиях 22,23-борат **10** находится в равновесии с исходным диолом. Последний подвергается окислительному расщеплению, сдвигая равновесие в сторону образования альдегида **12**. С помощью данного метода целевые альдегиды **12a** и **12b** были получены в три стадии (one-pot) с суммарными выходами 89% и 86% из **8** и **9**, соответственно.



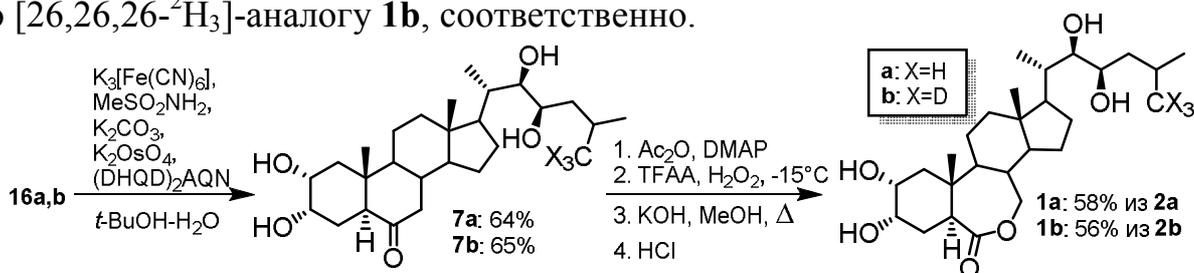
Так как конечной целью данного этапа работы являлся синтез как 28-норбрасинолида **1a**, так и 28-норкастастерона **7a**, а также их тридейтерированных аналогов, то в качестве исходного соединения был выбран именно 22-альдегид **12a**, полученный из 24-эпикастастерона **8**. В ходе работы удалось подобрать условия, при которых соединение **12a** реагировало с винилмагнийбромидом исключительно по альдегидной группе с образованием смеси диастереомерных по С-22 аллиловых спиртов **13**. Перегруппировка Джонсона-Кляйзена обоих изомерных спиртов приводит к диастереомерной смеси сложных эфиров **14**. На этой стадии было критично защитить 6-кетогруппу (т.к. далее планировалось применить сильные восстановители), что

было сделано в результате кипячения **14** в 2,2-диметил-1,3-диоксолане в присутствии *n*-толуолсульфокислоты. Трансформацию сложноэфирной



функции соединения **15** в метильную группу осуществляли в результате трехстадийной последовательности реакций, включавшей гидридное восстановление сложноэфирной группы, мезилирование и восстановление промежуточного мезилата. Схожая методика применялась в синтезе меченых аналогов. Атомы дейтерия при С-26 были введены в результате использования алюмодейтерида лития. Снятие обеих защитных групп под действием 80%-й уксусной кислоты привело к соединениям **16a** и **16b**.

Асимметрическое дигидроксилирование по Шарплессу **16a** и **16b** с использованием хирального лиганда (DHQD)₂AQN привело к 28-норкастастерону **7a** и [26,26,26-²H₃]-28-норкастастерону **7b**. Их последовательное ацилирование, окисление по Байеру-Виллигеру и снятие ацетатных защитных группировок привело к целевым 28-норбрасинолиду **1a** и его [26,26,26-²H₃]-аналогу **1b**, соответственно.



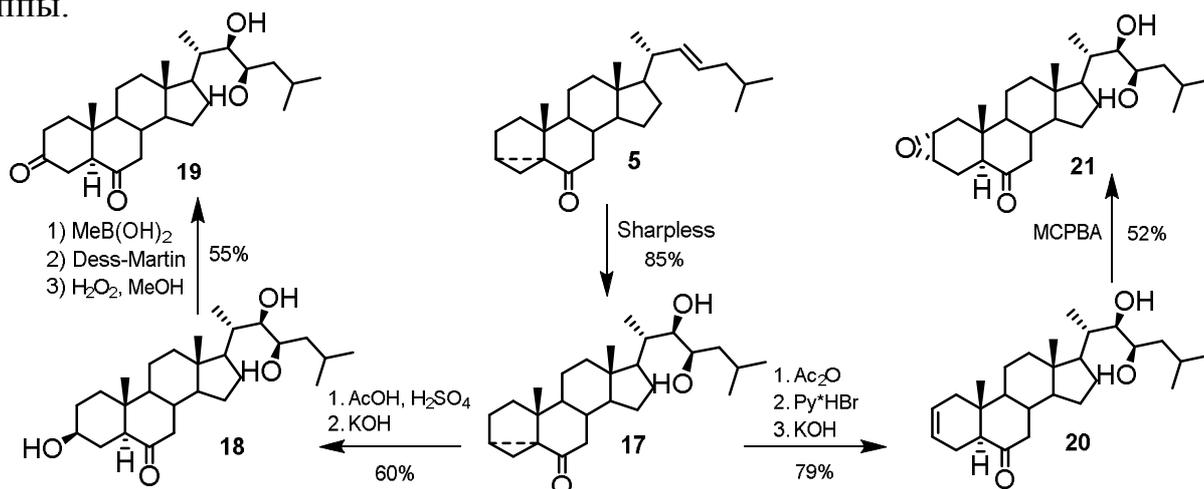
Таким образом, в ходе исследования был разработан простой и эффективный метод получения стероидных 22С-альдегидов из доступных БС эргостанового ряда. На его основе осуществлен синтез 28-норкастастерона, 28-норбрасинолида и их изотопномеченых аналогов – полезных инструментов при изучении метаболизма БС.

1.3 Синтез потенциальных биосинтетических предшественников 28-норбрасинолида

В связи со все более расширяющимся применением брасиностероидов в сельском хозяйстве особую актуальность приобретает изучение их биосинтеза и метаболизма в растениях. К настоящему времени эти вопросы достаточно

подробно изучены только для ограниченного круга БС (в первую очередь для 28С-БС с кампестановым углеродным скелетом). Этого нельзя сказать в отношении БС с другим стероидным скелетом, в частности, холестановым.

Значительный интерес для исследований биосинтеза 28-норбрасинолида представляют производные **18**, **19**, **20** и **21** с частично функционализированным циклом А и полностью функционализированной боковой цепью. Для их синтеза в качестве исходного соединения был использован полученный ранее Δ^{22} -кетон **5**. Боковая цепь 28-норбрасинолида была сформирована в результате асимметричного дигидроксилирования **5** по Шарплессу, протекающего с образованием 22*R*,23*R*-диола в качестве основного продукта. Для введения в цикл А 3 β -гидроксильной группы диол **17** кипятили в уксусной кислоте в присутствии каталитических количеств H_2SO_4 . Гидролиз промежуточного 3 β -ацетата в растворе КОН в метаноле привел к 24-нортеастерону **18**. 3-Дегидро-28-нортеастерон **19** был получен из **18** в результате трех последовательных стадий, включающих защиту диольной группы в виде метилбороната, окисление 3 β -гидроксифункции в 3-кетон по Дессу-Мартину и снятие защитной группы.



Трехстадийная трансформация **17** в 28-норсекастерол **20** была проведена через промежуточный диацетат с суммарным выходом 67%. Эпоксид **21** получен в результате окисления **20** *m*-хлорнадбензойной кислотой в $CHCl_3$.

Исследования, проведенные в Институте биомедицинской химии РАМН (Москва) показали, что соединения **19**, **20** и **21** обладают противоопухолевой активностью в отношении клеток LNCaP и MCF-7.

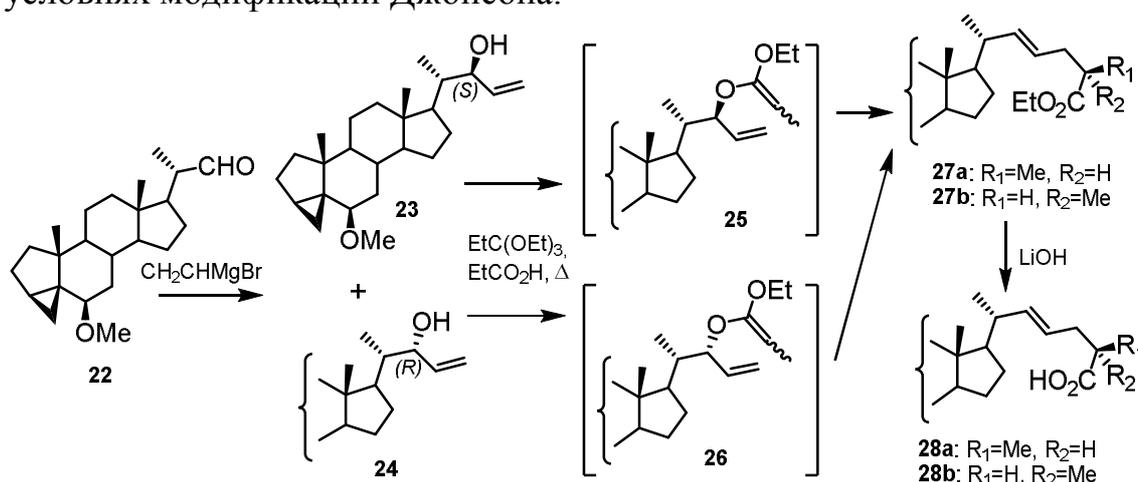
2. Перегруппировка Кляйзена в синтезе (25*R*)- и (25*S*)-холестеновых кислот и их аналогов

Использование 1,4-переноса хиральности в ходе сигматропной перегруппировки было бы особенно полезно в синтезе ряда стероидов с 26-карбоксильной группой и хиральным центром при C-25, таких как холестеновые и дафахроновые кислоты. Уровень данных соединений в

сыворотке крови человека может использоваться как маркер некоторых заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма холестерина.

2.1 Перегруппировка Джонсона-Кляйзена стероидных аллилвиниловых эфиров

В первую очередь был исследован наиболее простой вариант перегруппировки Кляйзена, состоящий в перегруппировке енольных эфиров **25**, **26** в условиях модификации Джонсона.



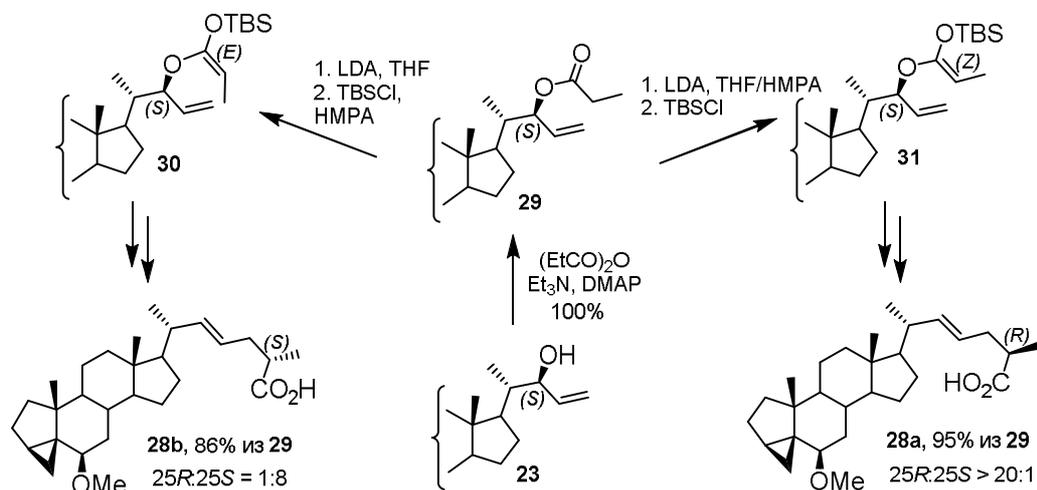
Исходные аллиловые спирты **23** и **24** были получены в 4 стадии из коммерчески доступного стигмастерина через промежуточный альдегид **22**. Кипячение индивидуальных аллиловых спиртов **23** и **24** в бензоле в присутствии триэтилортопропионата и пропионовой кислоты в каждом случае привело к неразделимой смеси сложных эфиров **27a** и **27b**. Омыление эфиров **27a,b** протекало без изменения конфигурации при С-25. Соотношение **28a/28b** составило 1.5:1 для продукта перегруппировки аллилового спирта **23** и 1:1.6 для продукта перегруппировки соединения **24**. Таким образом, было показано, что стереоселективность перегруппировки Джонсона-Кляйзена слишком мала для использования данной реакции для формирования хирального центра при С-25.

2.2 Перегруппировка Ирланда-Кляйзена аллилвиниловых эфиров

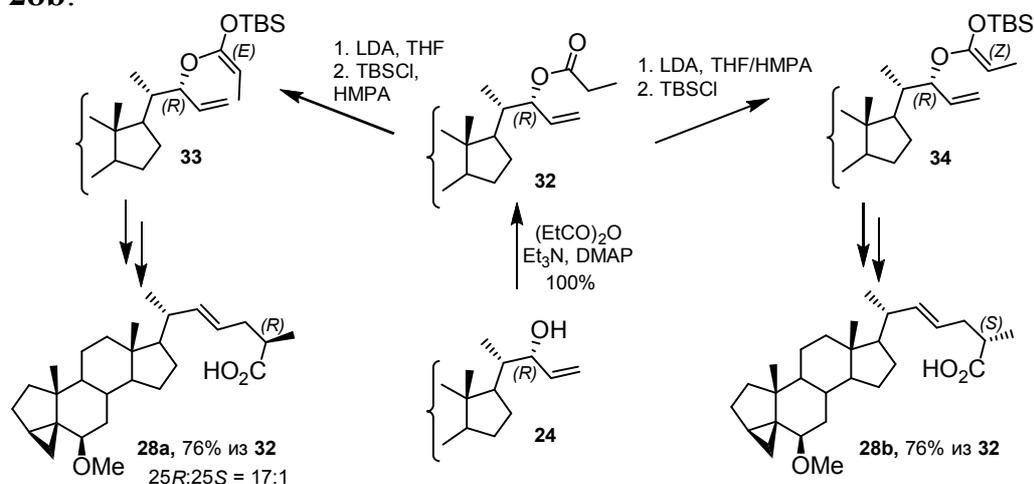
Далее для формирования стереоцентра при С-25 было предложено воспользоваться перегруппировкой Ирланда-Кляйзена. Анализ литературных данных показал, что для данной реакции, протекающей в более мягких условиях, можно ожидать большей селективности в плане 1,4-переноса хиральности.

Ацилирование **23** пропионовым ангидридом дало с количественным выходом сложный эфир **29**. Его енолизация диизопропиламидом лития привела к соответствующим енолятам в виде (*Z*)- и (*E*)-изомеров, причём их соотношение зависело от того, какой растворитель (THF либо смесь THF/НМРА) взят для енолизации. Дальнейшая обработка TBSCl привела к (*E*)-

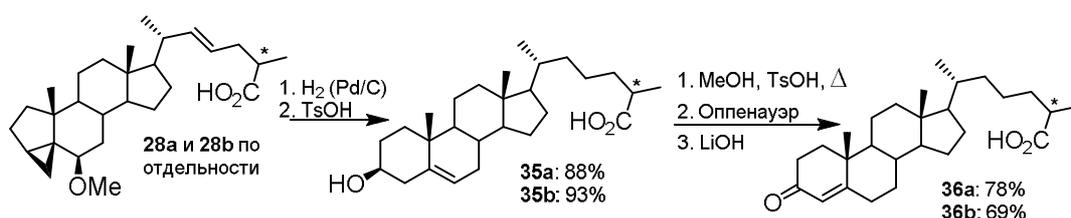
и (*Z*)-силиловым эфирам енолов **30** и **31** соответственно. Перегруппировка Ирланда-Кляйзена **31** с последующим основным гидролизом промежуточного TBS-эфира кислоты привело к преимущественному образованию соединения **28a** (др (*25R*)- / (*25S*)-изомеров составило > 20:1). Из силилового эфира енола **30** в результате такой же последовательности реакций была получена в качестве основного продукта (*25S*)-кислота **28b**.



Аналогичные трансформации (*22R*)-пропионата **32** в зависимости от условий енолизации также привели либо к (*25R*)-кислоте **28a**, либо к (*25S*)-кислоте **28b**.

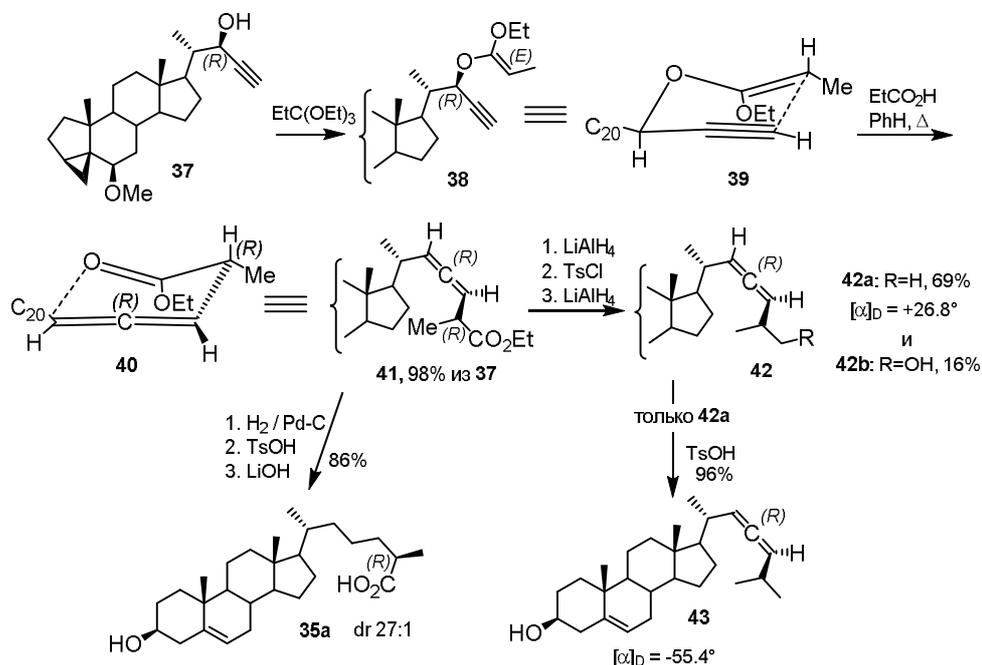


Превращение соединений **28a,b** в холестеновые кислоты **35a,b** было осуществлено с хорошим выходом в результате каталитического гидрирования двойной связи с последующей регенерацией 3β-гидрокси-Δ⁵-системы. Дальнейшее окисление метиловых холестеновых кислот по Оппенауэру с последующим омылением привело к Δ⁴-дафахроновым кислотам **36a,b**.

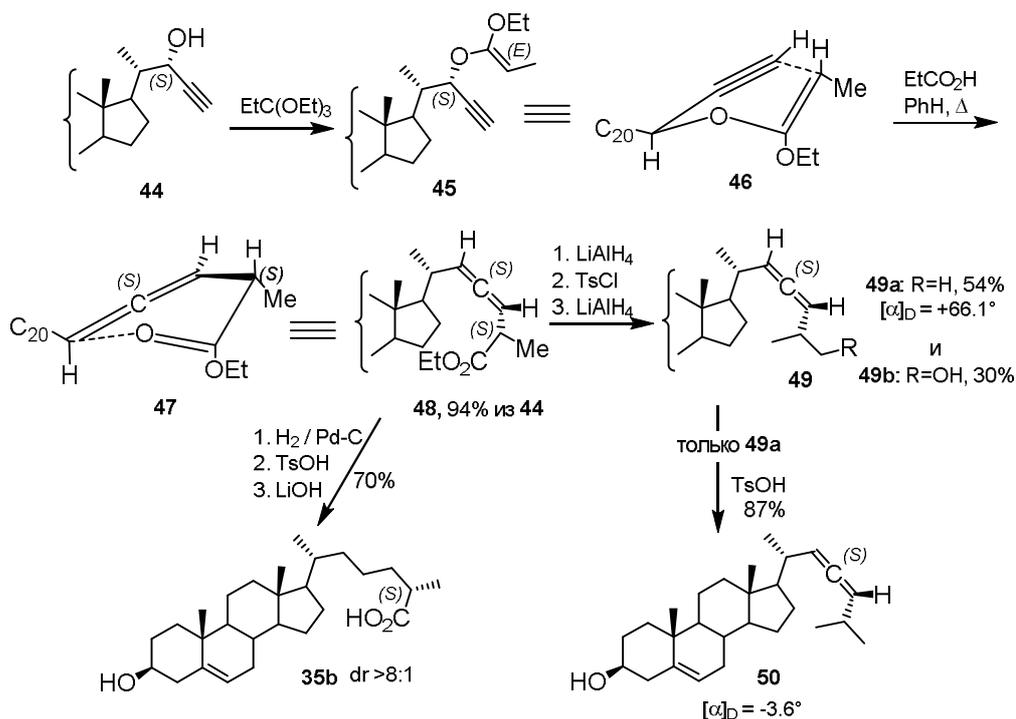


2.3 Перегруппировка Джонсона-Кляйзена пропаргилвиниловых эфиров

Нагревание пропаргилового спирта **37** с триэтилортопропионатом и каталитическими количествами пропионовой кислоты в бензоле привело к аллену **41** с почти количественным выходом.



Конфигурация C-25 была определена на основании спектров ЯМР продукта, полученного из **41** в результате последовательных реакций гидрирования, кислотной регенерации стероидной циклической части и омыления сложного эфира. Образовавшийся продукт по своим спектральным характеристикам полностью совпал с (25*R*)-холестеновой кислотой **35a**, полученной из аллиловых спиртов **23** и **24**, что таким образом подтвердило (25*R*)-конфигурацию аллена **41**. Ортоэфирная перегруппировка Кляйзена енольного эфира **45** протекала аналогичным образом с образованием аллена **48**.



Для установления стереохимии при С-25 аллен **48** был превращен в холестеновую кислоту (методом, описанным для **41**). Спектр ЯМР полученной таким образом кислоты **35b** оказался полностью идентичен спектру (25*S*)-холестеновой кислоты, полученной из аллиловых спиртов **23** и **24**, из чего следует, что исходный аллен **48** имел (25*S*)-конфигурацию. Экспериментальное подтверждение (23*R*)- и (23*S*)-конфигурации соответственно алленов **41** и **48** произведено на основании правила Лауэ-Брюстера. В соответствии с этим правилом, (23*R*)-аллены **42a** и **43** должны иметь более отрицательные значения углов оптического вращения, чем их эпимеры **49a** и **50**, что и было выявлено на практике.

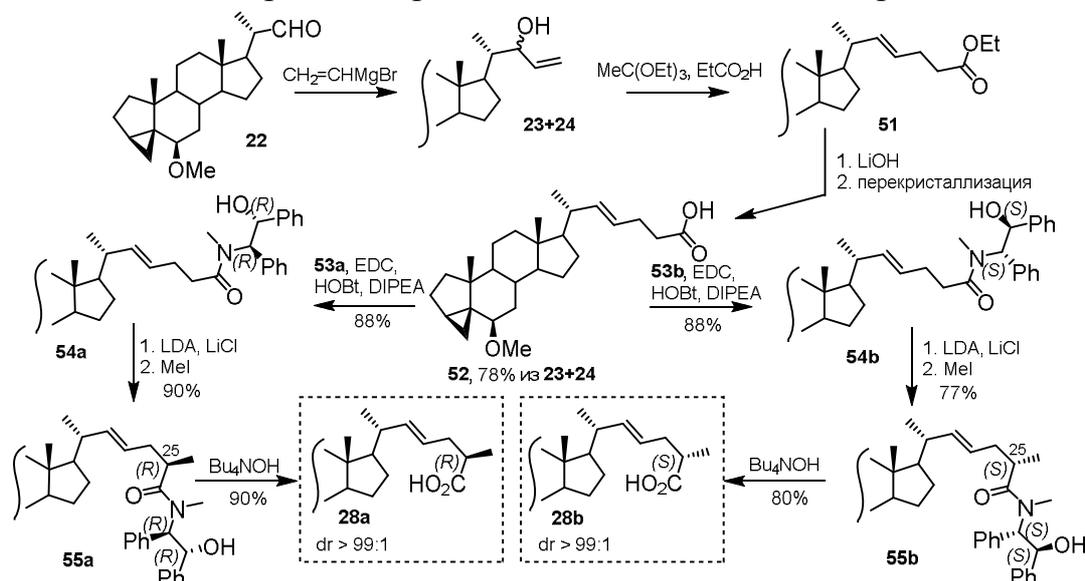
Таким образом, нами было разработано несколько вариантов использования перегруппировки Кляйзена для селективного формирования стереоцентра С-25 в кислотах холестанового ряда на основе 1,4-переноса хиральности в ходе перегруппировок Джонсона-Кляйзена и Ирланды-Кляйзена.

3. Формирование стероидного С25-стереоцентра в результате асимметрического алкилирования

В ходе данного исследования был предложен новый альтернативный метод синтеза стероидов с окисленной 26-метильной группой и стереоцентром при С-25 (на примере синтетических предшественников холестеновых кислот и 26-гидроксибрасиностероидов), в основе которого лежит последовательное использование перегруппировки Кляйзена и асимметрического алкилирования. Одним из последних достижений в области асимметрического алкилирования является использование псевдоэфенаминов в качестве хиральных вспомогательных соединений.

3.1 Синтез производных холестеновых кислот

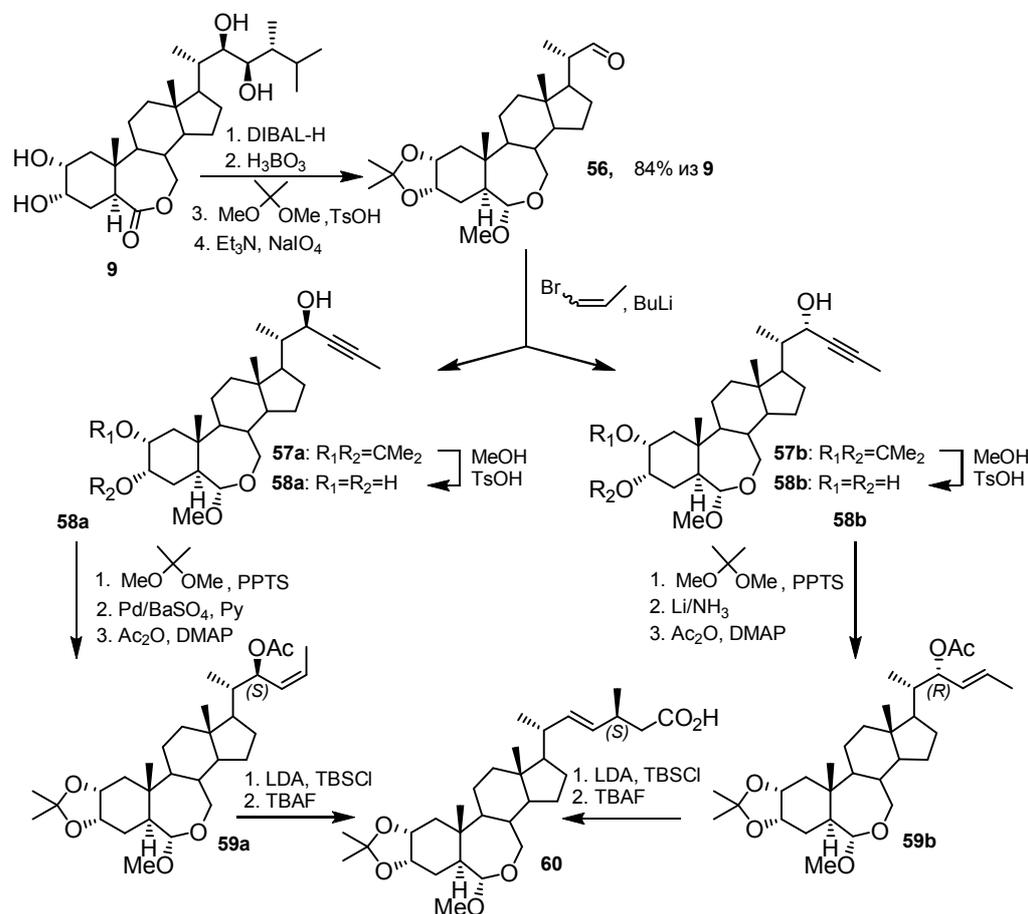
Присоединение винилмагний бромида к альдегиду **22** привело к образованию смеси стереоизомерных по С-22 аллиловых спиртов **23+24**. Для



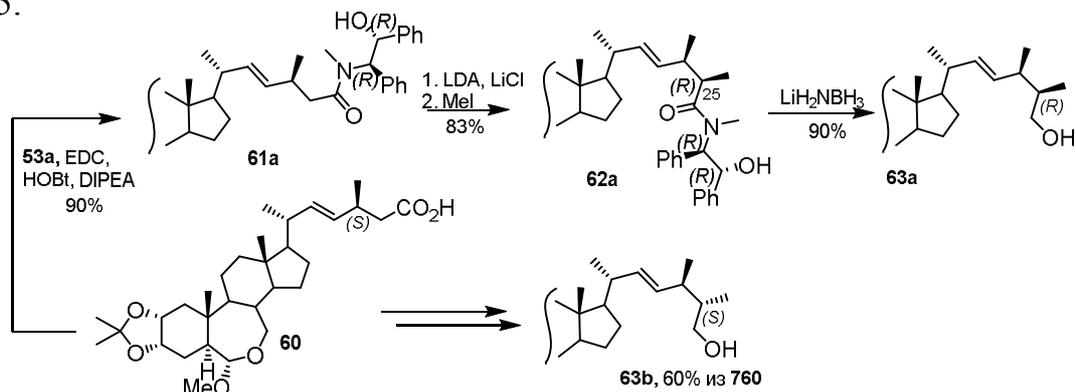
построения C-24 – C-26-фрагмента стероидной боковой цепи данную смесь без разделения на индивидуальные соединения подвергли перегруппировке Джонсона-Кляйзена с триэтилортоацетатом и пропионовой кислотой. Гидролиз продукта перегруппировки **51** привел к кислоте **52**, последующая реакция амидирования которой (1*R*,2*R*)- и (1*S*,2*S*)-псевдоэфенаминами **53a** и **53b** дала соответствующие амиды **54a** и **54b**. Присоединение MeI к енолятам **54a** и **54b**, образованным под действием LDA в присутствии LiCl, с дальнейшим основным гидролизом продуктов алкилирования (протекал без эпимеризации при C-25) привело к целевым кислотам **28a,b** с высоким уровнем диастереоселективности (*dr* > 99:1).

3.2 Синтез 26-гидроксипроизводных брассинолида

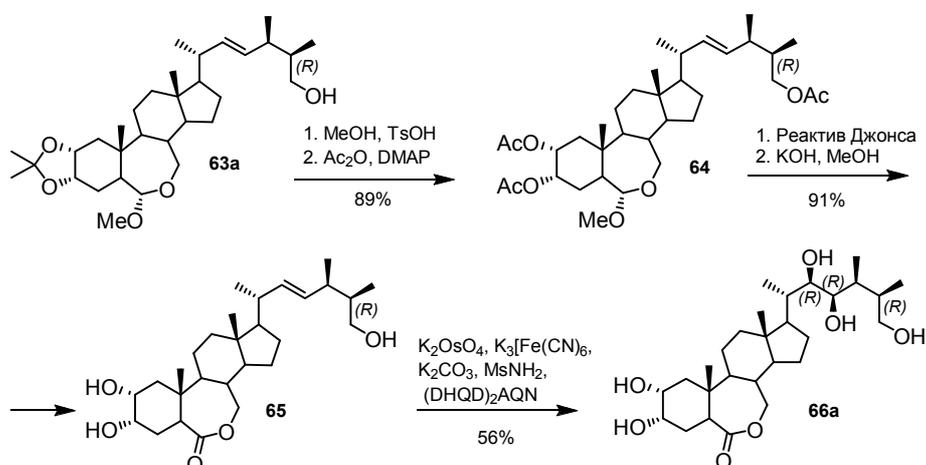
Исходный 24-эпибрассинолид **9** в результате четырехстадийного превращения был трансформирован в соответствующий защищенный альдегид **56**. Для наращивания стероидной боковой цепи к **56** был присоединен метилацетиленид лития (полученный *in situ* в результате взаимодействия (*Z/E*)-1-бромпропена и BuLi), что привело к смеси изомерных 22-пропаргиловых спиртов (**57a:57b** = 2.7:1), которые в свою очередь были трансформированы в соответствующие производные **59a,b**. На их основе происходило дальнейшее удлинение боковой цепи и формирование стереоцентра при C-24 с помощью перегруппировки Ирланда-Кляйзена. Продуктом перегруппировки **59a** и **59b** в обоих случаях явилась кислота **60**.



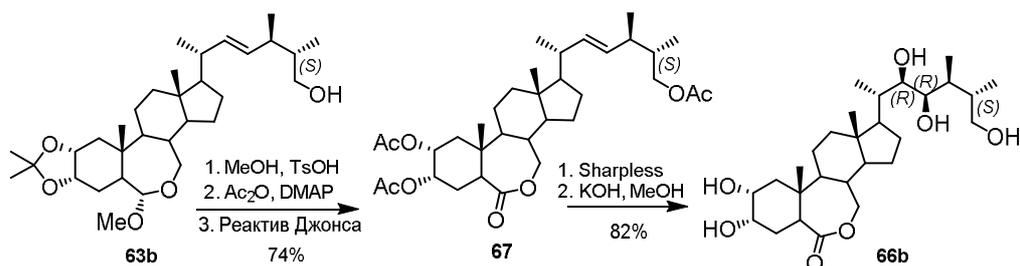
Электрофильное присоединение MeI к енолятам, генерированным из амидного производного **61a** (условия реакции аналогичны алкилированию **54a** и **54b**), привело к метилированному продукту **62a**. Его восстановление амидотригидроборатом лития (получен *in situ* под действием LDA на комплекс $\text{VH}_3 \cdot \text{NH}_3$) позволило получить 26-гидроксипроизводное **63a**. Его эпимер по C-25 был получен аналогичным методом. Анализ спектров ^1H и ^{13}C ЯМР каждого из полученных спиртов показал отсутствие следов соответствующего эпимера по C-25.



Окисление реактивом Джонса соединения **64** (получен из **63a**) при 0°C с последующим гидролизом ацетатных группировок дало триол **65**. Дигидроксилирование Δ^{22} -связи соединения **65** по Шарплессу привело к целевому (25*R*)-26-гидроксибрассинолиду **66a**.



Второе целевое соединение – (25*S*)-26-гидроксибрассинолид **66b** – был получен по слегка видоизмененной методике, позволившей более эффективное отделение конечного продукта от имеющего одинаковую хроматографическую подвижность хирального лиганда $(\text{DHQD})_2\text{AQN}$.



Таким образом, разработан новый метод построения боковых цепей стероидов, содержащих асимметрический центр при С-25. Контролируемое введение заместителя при С-24 и Δ^{22} -связи производится в результате перегруппировки Кляйзена соответствующих аллиловых спиртов. Формирование требуемой конфигурации при С-25 осуществляется с помощью реакции асимметрического алкилирования псевдоэфенаминовых амидов стероидных С26-кислот. Достоинствами метода являются хорошие выходы целевых соединений и высокий уровень диастереоселективности ($dr \geq 99:1$). Разработанная методология применена для получения синтетических предшественников холестеновых кислот, а также 26-гидроксибрассиностероидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Предложен улучшенный метод синтеза 28-норбрассинолида из стигмастерина, включающий использование перегруппировки Джонсона-Кляйзена смеси изомерных по С-22 аллилвиниловых эфиров для построения стероидной боковой цепи [2, 8, 15].
2. Разработан эффективный метод получения из доступных БС эргостанового ряда стероидных 22С-альдегидов – удобных интермедиатов в синтезе минорных брассиностероидов. С помощью данного метода получены 28-норкастастерон, 28-норбрассинолид и их изотопномеченные аналоги. Данный метод использован в синтезе брассинолида, криптолида, Δ^{25} - и Δ^{28} -брассиностероидов [5, 7, 14].
3. Осуществлен синтез ряда биосинтетических предшественников 28-норбрассинолида, включая 28-нортеастерон, 3-дегидро-28-нортеастерон, 28-норсекастерол и 2,3-диэпи-28-норсекастерон. Полученные соединения проявили противоопухолевую активность в отношении клеток карциномы простаты (LnCaP) и карциномы молочной железы линии (MCF-7) [3, 9, 14].
4. Исследован 1,4-перенос хиральности в ходе перегруппировок Джонсона-Кляйзена и Ирланда-Кляйзена стереоизомерных стероидных аллилвиниловых и пропаргилвиниловых эфиров на примере синтеза холестеновых и дафахроновых кислот [4, 10, 11, 13, 16].
5. Разработан новый стереонаправленный метод формирования С24-С28-фрагмента боковой цепи стероидов в результате последовательного применения перегруппировки Кляйзена и асимметрического алкилирования. На его основе осуществлено получение стереоизомерных по С-25 26-

гидроксипроизводных брассинолида и синтетических предшественников холест-5-ен-26-овых кислот [6, 12, 13].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Разработанные в данном исследовании новые эффективные методы формирования стероидных боковых цепей на основе сигматропных перегруппировок могут использоваться для получения целого ряда малодоступных диастереомерно чистых стероидных соединений с полезными свойствами, в частности: 28-норбрассинолида [15], а также его биосинтетических предшественников и изотопномеченых аналогов; (25*R*)-холест-5-ен-26-вой кислоты [16] и ее (25*S*)-изомера; стереоизомерных по С-25 26-гидроксibrассиностероидов с кампестановым углеродным скелетом и дафахроновых кислот.

28-Норбрассинолид представляет интерес в качестве антистрессового адаптогена и регулятора роста растений.

Биосинтетические предшественники 28-норбрассинолида, тридейтерированные 28-норбрассинолид и 28-норкастастерон, а также 26-гидроксипроизводные брассинолида могут быть использованы в исследованиях биосинтеза и метаболизма брассиностероидов. Кроме того, некоторые биосинтетические предшественники 28-норбрассинолида, обладающие противоопухолевой активностью, являются перспективными претендентами на роль лекарственных средств для лечения рака.

Холестеновые и дафахроновые кислоты могут применяться в медицинской практике в качестве маркеров нарушений метаболизма холестерина в человеческом организме.

Список публикаций соискателя

Глава в коллективной монографии:

1. Khripach, V. A. Synthetic aspects of brassinosteroids / V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, Y. V. Ermolovich // Studies in natural products chemistry / ed.: Atta-ur-Rahman. – Amsterdam, 2015. – Vol. 44 – P. 309-352.

Статьи в журналах:

2. Khripach, V. A. An improved synthesis of 28-norbrassinolide / V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, Y. V. Ermolovich // Synth. Commun. – 2010. – Vol. 40, № 18. – P. 2780-2787.

3. Синтез и биологическая активность биосинтетических предшественников 24¹-норбрассинолида / В. А. Хрипач, В. Н. Жабинский, Ю. В. Ермолович, О. В. Гулякевич, А. Р. Мехтиев, П. А. Каралкин // Биоорган. химия. – 2012. – Т. 38, № 4. – С. 499-508.

4. Ermolovich, Y. V. 1,4-Chirality transfer *via* the ester enolate Claisen rearrangements in the preparation of (25*R*)- and (25*S*)-cholestenoic acids / Y. V.

Ermolovich, V. N. Zhabinskii, V. A. Khripach // *Steroids*. – 2013. – Vol. 78 – P. 683–692.

5. The development and use of a general route to brassinolide, its biosynthetic precursors, metabolites and analogues / A. L. Hurski, Y. V. Ermolovich, V. N. Zhabinskii, V. A. Khripach // *Org. Biomol. Chem.* – 2015. – № 13 – P. 1446-1452.

6. Ermolovich Y. V. Formation of steroidal C-25 chiral center via asymmetric alkylation methodology / Y. V. Ermolovich, V. N. Zhabinskii, V. A. Khripach // *Org. Biomol. Chem.* – 2015. – № 13 – P. 776-782.

7. A new synthesis of brassinosteroids with a cholestane framework based on a highly functionalized starting material / I. D. Alshakova, Y. V. Ermolovich, V. N. Zhabinskii, V. A. Khripach // *Steroids*. – 2015. – Vol. 97 – P. 72-77.

Тезисы докладов:

8. Ермолович, Ю. В. Новый синтез 28-норбрассинолида / Ю. В. Ермолович, В. Н. Жабинский, В. А. Хрипач // *Химия, структура и функция биомолекул : материалы III Международной конференции, г. Минск, 1–3 октября 2008 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси ; редкол.: Ф. А. Лахвич [и др.]. – Минск : Право и экономика, 2008. – С. 102.*

9. Синтез и биологическая активность потенциальных биосинтетических предшественников 28-норбрассинолида / В.А.Хрипач, В.Н.Жабинский, Ю.В.Ермолович, О. В.Гулякевич, А. Ю.Мишарин, А. Р.Мехтиев, П.А.Каралкин // *Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения : тезисы докладов научно-практической конференции, Новый Свет, АР Крым, 23–28 мая 2011 г. / Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко ; редкол.: В. С. Мартынюк [и др.]. – Киев : Издатель В. С. Мартынюк, 2011. – С. 197-198.*

10. Ермолович, Ю. В. Новый стереоселективный синтез (25*R*)- и (25*S*)-холестеновых кислот и их аналогов / Ю. В. Ермолович, В. Н. Жабинский, В. А. Хрипач // *Химия, структура и функция биомолекул : материалы IV Междунар. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения академика А. А. Ахрема, Минск, 17–19 окт. 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси ; редкол.: Ф. А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2011. – С. 75–76.*

11. Ermolovich, Y. V. Claisen rearrangement of propargyl vinyl ethers in the synthesis of (25*R*)- and (25*S*)-cholestenoic acids / Y. V. Ermolovich, V. N. Zhabinskii, V. A. Khripach // *Current Issues of Natural Products Chemistry and Biotechnology : Abstracts of 4th Annual Russian-Korean Conference, Novosibirsk, 18–21 September 2012 / Novosibirsk Institute of Organic Chemistry ; ed.: K. P. Volcho [et al.]. – Novosibirsk, 2012 – P. 89.*

12. Ermolovich, Y. Pseudoephensamines as chiral auxiliaries in asymmetric alkylation of steroidal acids / Y. Ermolovich, V. Zhabinskii, V. Khripach // *Abstracts*

of 18th European Symposium on Organic Chemistry, Marseille, 7–12 July 2013 / Universite Aix Marseille ; ed.: J.–A. Rodriguez [et al.]. – Marseille, 2013. – P. 137.

13. Ермолович, Ю. В. Формирование боковых цепей стероидов со стереоцентром при С-25 / Ю. В. Ермолович, В. Н. Жабинский, В. А. Хрипач // Химия, структура и функции биомолекул : материалы V международной научной конференции, посвященной 40-летию Института биоорганической химии и 85-летию НАН Беларуси, Минск, 4–6 июня 2014 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси ; редкол.: Ф. А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 76.

14. Ermolovich Y. Synthesis and bioactivity of 28-norbrassinolide and its biosynthetic precursors / Y. Ermolovich, I. Alshakova, A. Mekhtiev, V. Zhabinskii, V. Khripach // Abstracts of 22nd Conference on Isoprenoids, Prague, September 7–10, 2014 / ICT Prague ; ed.: P. Drasar [et al.]. – Prague, 2014. – P. 107-108.

Патенты:

15. Способ получения 28-норбрассинолида : пат. 14910 Респ. Беларусь : МПК С07J75/00 (2006), С07J63/00 (2006) / В. А. Хрипач, В. Н. Жабинский, Ю. В. Ермолович ; дата публ.: 30.10.2011.

16. Способ получения (25R)-холест-5-ен-26-овой кислоты : пат. 14910 Респ. Беларусь : МПК С07J75/00 (2006), С07J9/00 (2006) / В. А. Хрипач, В. Н. Жабинский, Ю. В. Ермолович ; дата публ.: 30.08.2014.



РЕЗЮМЕ

Ермолович
Юрий Вячеславович

Формирование боковой цепи стероидов с использованием сигматропных перегруппировок

Ключевые слова: brassinостероиды, холестеновые кислоты, дафахроновые кислоты, перегруппировка Джонсона-Кляйзена, перегруппировка Ирланда-Кляйзена, аллены, изотопномеченные соединения.

Цель работы: разработка методов синтеза стероидных соединений с боковой цепью с использованием [3,3]-сигматропных перегруппировок.

Объекты исследования: brassinостероиды, холестеновые и дафахроновые кислоты.

Предмет исследования: формирование боковых цепей brassinостероидов, холестеновых и дафахроновых кислот с использованием сигматропных перегруппировок.

Методы исследования: современные методы препаративного органического синтеза, 1D и 2D ЯМР-, ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, элементный анализ.

Полученные результаты и их новизна: Предложен усовершенствованный метод синтеза 28-норбрасинолида из стигмастерина с использованием перегруппировки Джонсона-Кляйзена. Из коммерчески доступных brassinостероидов эргостанового ряда разработан эффективный метод получения стероидных 22С-альдегидов – удобных интермедиатов в синтезе минорных brassinостероидов. С помощью данного метода получены 28-норкастастерон, 28-норбрасинолид и их изотопномеченные аналоги. Впервые выполнен синтез трех биосинтетических предшественников 28-норбрасинолида: 28-нортеастерона, 28-норсекастерина, 28-норсекастерона. В результате 1,4-переноса хиральности в ходе перегруппировок Джонсона-Кляйзена и Ирланда-Кляйзена стероидных пропаргилвиниловых и аллилвиниловых эфиров осуществлен синтез стереоизомерных холестеновых и дафахроновых кислот. Разработан новый стереонаправленный метод формирования С24-С28-фрагмента боковой цепи стероидов в результате последовательного применения перегруппировки Кляйзена и асимметрического алкилирования.

Область применения: органическая химия, химия природных соединений.

SUMMARY

Ermolovich
Yuri Vyacheslavovich

Formation of steroidal side chains *via* sigmatropic rearrangements

Key words: brassinosteroids, cholestenoic acids, dafachronic acids, Johnson-Claisen rearrangement, Ireland-Claisen rearrangement, allenes, isotopically labeled compounds.

The aims of the study: to develop methods for the synthesis of steroidal side chain by the use of [3,3]-sigmatropic rearrangements.

The object of the research: brassinosteroids, cholestenoic acids, dafachronic acids.

The subject of the research: formation of the side chains of brassinosteroids, cholestenoic acids, dafachronic acids using sigmatropic rearrangements.

Methods of investigation: modern methods of preparative organic synthesis, 1D- and 2D-NMR-, IR-spectroscopy, mass spectrometry, elemental analysis.

Obtained results and their novelty: An improved synthesis of 28-norbrassinolide from stigmasterol using the Johnson-Claisen rearrangement has been elaborated. The effective synthesis of 22C-aldehydes (useful intermediates for the preparation of minor brassinosteroids) from commercially available brassinosteroids of ergostane series has been developed. Based on this methodology 28-norcastasterone, 28-norbrassinolide and their labeled analogues have been prepared. The first synthesis of three biosynthetic precursors of 28-norbrassinolide (28-norcastasterone, 28-norsecasterol, 28-norsecasterone) has been accomplished. Cholestenoic and dafachronic acids with a high level of diastereomeric purity have been obtained as a result of 1,4-chirality transfer *via* Johnson-Claisen and Ireland-Claisen rearrangements of steroidal propargylvinyl and allylvinyl ethers. A novel approach for the preparation of C-24-C-28 fragment of steroidal side chain *via* successive Claisen rearrangement and asymmetric alkylation has been performed.

Fields of application: organic chemistry, chemistry of natural compounds.

РЭЗІЮМЭ

Ермаловіч
Юрый Вячаслававіч

**Фармаванне бакавога ланцуга стэроідаў з
выкарыстаннем сігматропных перагруповак**

Ключавыя словы: брасінастэроіды, халестэнавыя кіслоты, дафахронавыя кіслоты, перагрупоўка Джонсана-Кляйзена, перагрупоўка Ірланда-Кляйзена, аллены, ізатопназначаныя злучэнні.

Мэта работы: распрацоўка метадаў сінтэзу стэроідных злучэнняў с бакавым ланцугом з выкрыстаннем [3,3]-сігматропных перагруповак.

Аб'екты даследавання: брасінастэроіды, халестэнавыя і дафахронавыя кіслоты.

Прадмет даследавання: фармаванне бакавога ланцуга брасінастэроідаў, халестэнавых і дафахронавых кіслот з выкарыстаннем сігматропных перагруповак.

Метады даследавання: сучасныя метады прэпаратыўнага арганічнага сінтэзу, 1D і 2D ЯМР-, ІЧ-спектраскапія, масс-спектраметрыя, элементны аналіз.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Прапанававаны палепшаны метады сінтэзу 28-норбрасіналіду са стыгмастэрыну з выкарыстаннем перагрупоўкі Джонсана-Кляйзена. З камерцыйна даступных брасінастэроідаў эргастанавага шэрагу распрацаваны эфектыўны метады атрымання стэроідных 22С-альдэгідаў – інтэрмедыятаў у сінтэзе мінорных брасінастэроідаў. З дапамогай дадзенага метада атрыманы 28-норкастэрон, 28-норбрасіналід і іх ізатопназначаныя аналагі. Упершыню здзейснены сінтэз трох біясінтэтычных папярэднікаў 28-норбрасіналіду: 28-нортэастэрону, 28-норсекастэрыну, 28-норсекастэрону. У выніку 1,4-пераносу хіральнасці падчас перагруповак Джонсана-Кляйзена і Ірланда-Кляйзена стэроідных прапаргілвінілавых і алілвінілавых этэраў здзейснены сінтэз стэрэаізамерных халестэнавых і дафахронавых кіслот. Распрацаваны новы стэрэанакіраваны метады фармавання С24-С28-фрагменту бакавога ланцуга стэроіда ў выніку паслядоўнага выкарыстання перагрупоўкі Кляйзена і асіметрычнага алкілявання.

Галіна выкарыстання: арганічная хімія, хімія прыродных злучэнняў.