



УДК 547.92:542.91

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ В-НОР-8-ИЗОАНАЛОГОВ СТЕРОИДНЫХ ЭСТРОГЕНОВ

© 2002 г. А. Г. Шавва[#], С. И. Селиванов, Г. Л. Старова, Т. Р. Бороноева, И. В. Ищенко,
И. А. Глуздинов, А. Н. Шарецкий, В. Г. Исаева, Б. П. Суринов

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет,
198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский просп., 26

Поступила в редакцию 20.07.2001 г. Принята к печати 15.01.2002 г.

На основании результатов по связыванию В-нор-8-изоаналогов эстрадиола с рецепторами эстрогенов из матки крысы предложена модель соответствующих лиганд-рецепторных комплексов. Ее использование помогло выбрать микромодификации этой группы стероидов, приводящие к резкому снижению гормональной активности. На примере 16,16-диметил-*D*-гомо-В-нор-8-эстрона показана возможность синтеза аналогов эстрогенов, лишенных утеротропной активности, но сохранивших иммуносупрессивное действие.

Ключевые слова: аналоги эстрогенов; лиганд-рецепторный комплекс; утеротропная активность; иммуносупрессивное действие.

ВВЕДЕНИЕ

Модифицированные стероидные эстрогены с низкой утеротропной активностью могут сохранять ряд полезных свойств, присущих природным гормонам: нормализовать содержание холестерина в крови [1], оказывать нейропротекторное действие [2, 3], благоприятно влиять на гипоталамические функции [4, 5], проявлять иммуносупрессивную активность [6] и т.д. На основе таких веществ можно синтезировать ингибиторы метаболизма стероидных гормонов, потенциальная область применения которых – лечение ряда онкологических заболеваний [7–9]. Необходимым условием практического использования препаратов эстрогенной природы является полное отсутствие у них гормонального действия, так как выявлена определенная связь между риском индукции опухолей молочной железы и гормональной активностью [10].

Биологические свойства В-нор-8-изоаналогов стероидных эстрогенов практически не изучены. Известно лишь, что их утеротропная активность значительно ниже, чем у соответствующих соединений с шестичленным кольцом В [1, 11], но в то же время они сохраняют гипохолестеринемическое действие [1]. Это указывает на перспективность изучения биологической активности данной группы стероидов, особенно если есть основания полагать, что их эффекты не опосредуются рецепторами эстрогенов [2–9].

Ранее мы исследовали относительную конкурентную активность 8-изоэстрадиола (**Ia**) и стероидов (**IIa**) и (**IIIa**) по отношению к рецепторам эстрогенов из матки крысы [12]. Мы решили получить аналогичную информацию о соединениях (**Ib**), (**IIb**) и (**IIIb**) В-нор-ряда для выяснения особенностей связывания и причин сильного снижения утеротропной активности у В-нор-8-изоаналогов эстрогенов по сравнению со стероидами типа (**Ia**). В дальнейшем мы надеялись найти такие модификации В-нор-8-изоаналогов, которые приводили бы к полному исчезновению утеротропной активности у новых аналогов, и приступить к последовательному изучению их биологических свойств.

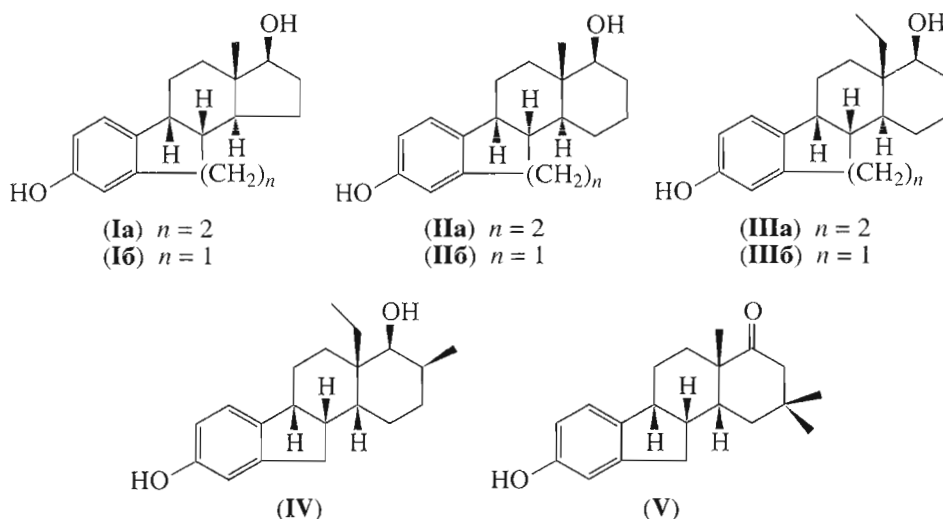
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

8-Изоэстрадиол (**Ia**) и В-нор-8-изоэстрадиол (**Ib**) были синтезированы как предложено в публикациях [13] и [11] соответственно.

Синтез новых соединений (**IIb**) и (**IIIb**), представленный на схеме 1, был осуществлен по широко известной схеме Торгова–Ананченко [14]. Все стадии проходили без осложнений, строение целевых соединений доказано методами спектроскопии ¹H- и ¹³C-ЯМР и масс-спектрометрии.

Рассмотрение величин относительной конкурентной активности (ОКА), приведенных в табл. 1, показывает, что в ряду стероидов (**Ia**)–(**IIIa**) связывание с рецепторами эстрогенов из матки крысы падает, тогда как те же модификации структу-

[#] Автор для переписки (тел.: (812) 428-68-09; факс: (812) 428-69-39; эл. почта: nmr@paloma.spbu.ru).



ры (расширение кольца *D* и последующая замена метильной группы в положении 13 на этильную) в ряду *B*-нор-аналогов (**Ib**)–(**IIIb**) приводят к увеличению ОКА.

Согласно расчетам по программе FLEXX, природный гормон эстрадиол и 8-изоэстрадиол (**Ia**) связываются с α -рецептором эстрогенов в одном и том же кармане [15]. Кольца *C* и *D* обоих стероидов занимают одно и то же положение в лиганд-рецепторном комплексе, а гидроксильные груп-

пы обоих соединений образуют водородные связи с одними и теми аминокислотными остатками рецептора. Это обеспечивает высокую специфичность связывания 8-изоэстрадиола (**Ia**) и, как следствие, его высокую гормональную активность [16]. Для анализа данных, представленных в табл. 1, самым важным является заключение об одинаковом расположении колец *C* и *D* эстрадиола (**I**) и 8-изоэстрадиола (**Ia**) в гормон-рецепторном комплексе: кольца *C* и *D* соединений группы (**Ia**)–(**IIIa**) расположены в лиганд-рецепторном

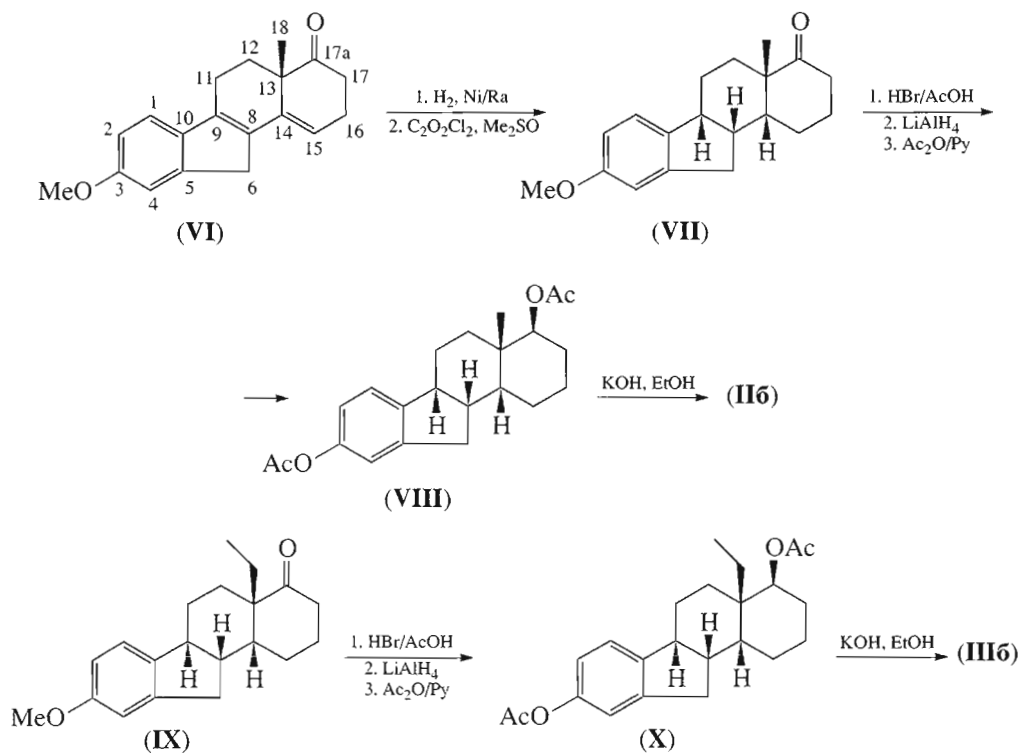


Схема 1.

Таблица 1. Относительная конкурентная активность (ОКА) 8-изоаналогов эстрадиола к рецепторам эстрогенов из матки крысы

Соединение	(Ia) [12]	(IIa) [12]	(IIIa) [12]	(Iб)	(IIб)	(IIIб)
ОКА	1.00	0.32	0.13	0.017	0.027	0.047

комплексе наиболее выгодным образом для связывания с рецептором.

Предварительный анализ пространственных структур (Ia) и (Iб), оптимизированных методом AM1 [17], показывает, что у первого из них расстояние между атомами кислорода составляет 10.85–10.86 Å, а у второго – 10.1–10.2 Å. У природного гормона эстрадиола это расстояние (очень важное для эффективного связывания с рецепторами эстрогенов) около 10.93 Å [18]. Структуры (Ia) и (Iб) не удается наложить таким образом, чтобы совпало расположение в пространстве и колец C и D, и гидроксильных групп (напомним, что в рамках анализа структура рецептора считается жесткой). Поэтому сродство *B*-нор-8-изоаналогов эстрогенов к рецепторам эстрогенов, как и их утеротропная активность, должно быть намного ниже, чем у природного эстрадиола или 8-изоаналогов эстрогенов. Это и демонстрирует табл. 1. Поскольку 3-гидроксильная группа стероидов важнее для связывания с рецептором, чем 17 (или 17а)-гидроксильная группа [19], то для объяснения изменения величин ОКА, приведенных в табл. 1, следует допустить, что именно фенольная гидроксильная группа у соединений (Iб)–(IIIб) играет решающую роль в связывании с рецепторами эстрогенов. Следовательно, гидроксильные группы при C17 (или C17а) *B*-нор-8-изоаналогов стероидных эстрогенов не смогут образовывать водородные связи с His527 рецептора эстрогенов в отличие

от 8-изоаналогов [15]. Поскольку гормонсвязывающий участок рецептора сильно гидрофобен [19, 20], введение небольшого гидрофобного заместителя в кольцо D может даже слегка повысить сродство к рецептору. Это и наблюдалось в эксперименте. Ввиду ограниченности объема лигандсвязывающего участка рецептора (в частности, в районе колец C и D) можно было попытаться получить *B*-нор-8-изоаналоги эстрогенов, не обладающие гормональной активностью, путем введения заместителей именно в кольцо D.

Для проверки этого предположения мы синтезировали аналоги (IV) и (V) (схема 2). Исходными веществами для синтеза послужили известные соединения (XI) [21] и (XIII) [22]. Получение целевых продуктов (IV) и (V) проходило без осложнений. Величина ОКА у стероида (IV) оказалась 0.0012, а у соединения (V) – менее 0.0005.

В опытах на овариэктомированных крысах 16,16-диметил-*D*-гомо-*B*-нор-8-изоэстрон (V) при пероральном введении в течение 7 сут в дозе 50 мг/кг в сут утеротропного действия не проявил. Этот результат позволил приступить к оценке биологической активности указанного соединения, не опосредованной, вероятно, ядерными рецепторами эстрогенов.

Мы обратили внимание на то, что существующие иммунодепрессанты, как правило, токсичны. Тем не менее они занимают важное место в про-

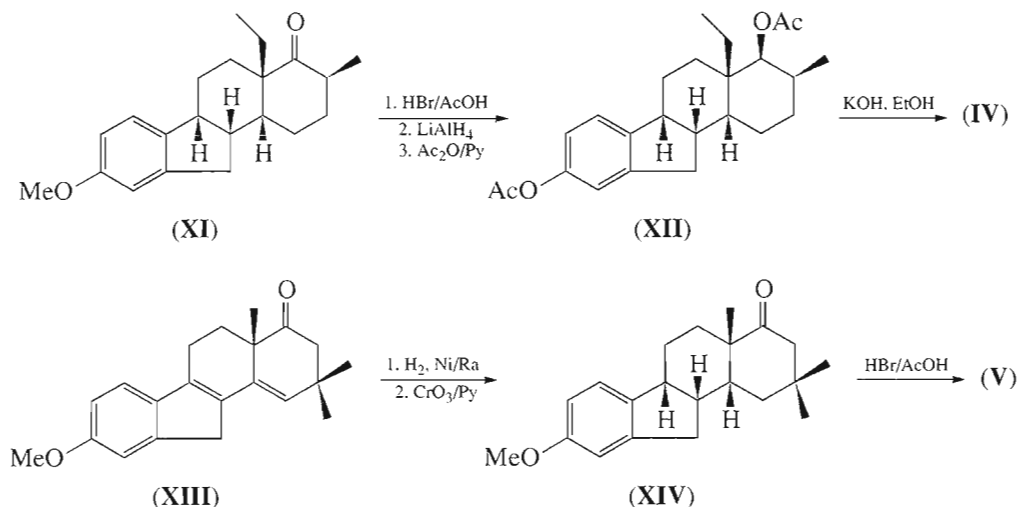
**Схема 2.**

Таблица 2. Влияние соединения (V) на содержание анти-телообразующих клеток (% к контролю) в селезенке мышей (1×10^3) в индуктивную (однократное введение до иммунизации) и продуктивную (однократное введение через 3 сут после иммунизации) фазы антителиогенеза

Группа животных	Индуктивная фаза	Продуктивная фаза
Контроль	100 ± 21	100 ± 11.7
Препарат, 5 мг/кг	17.8 ± 7*	73.9 ± 3.1
Препарат, 15 мг/кг	14.4 ± 5.2*	67.9 ± 7.7*

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

филаксии и лечении аллергических и аутоиммунных заболеваний [23, 24]. В этом отношении перспективными являются препараты на основе стероидов [25], особенно аналоги эстрогенов [26]. Результаты исследований, приведенные в патенте [6], ясно указывают на отсутствие корреляции между гормональными и иммуносупрессивными свойствами модифицированных стероидных эстрогенов. Поэтому в первую очередь мы решили оценить иммуносупрессивную активность стероида (V). В работе использованы основные методики оценки иммуномодулирующих свойств фармакологических препаратов [27].

Исследование влияния соединения (V) на основные иммунные реакции у экспериментальных животных обнаружило наличие у него иммуносупрессивных свойств. Так, его введение до иммунизации эритроцитами барана в 6–7 раз угнетало образование в селезенке мышей анти-телообразующих клеток (АОК), синтезирующих тимусзависимые гуморальные антитела (табл. 2). Препарат

Таблица 3. Влияние соединения (V) на антигениндуцированную супрессорную активность клеток селезенки мышей

Группа животных	Содержание анти-телообразующих клеток $\times 10^6$ спленоцитов	Индекс супрессии (% к контролю)
Контроль	354 ± 14	–
Контроль (индукция супрессии без препарата)	124 ± 19	0.65 ± 0.05 (100 ± 7.7)
Препарат, 5 мг/кг (после индукции супрессии)	55 ± 7.1*	0.85 ± 0.02 (131 ± 3.1)*
Препарат, 15 мг/кг (после индукции супрессии)	92 ± 12	0.74 ± 0.03 (114 ± 4.6)

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

тормозил и более резистентную продуктивную фазу антителиогенеза – его введение через трое суток после иммунизации примерно в 1.5 раза понижало содержание АОК в селезенке (табл. 2).

Мы установили, что стероид (V) обладает противоаллергическими свойствами. Он практически полностью ($\log_2 = 0$; в контроле – 5) угнетал синтез аллергенспецифических IgE-реагинов у мышей, выявляемых в реакции пассивной кожной анафилаксии на крысах.

Препарат (V) стимулировал активность антигензависимых супрессоров селезенки, регулирующих гуморальный иммунный ответ. Спленоциты от мышей, гипериммунизированных эритроцитами барана и получавших препарат, существенно снижали образование анти-телообразующих клеток. Индекс супрессии при этом повышался до 114–131% по сравнению с контролем (табл. 3).

Соединение (V) практически не влияло на развитие иммунных реакций – реакцию гиперчувствительности замедленного типа и реакцию трансплантат-против-хозяина [26].

Таким образом, 16,16-диметил-D-гомо-V-нор-8-изоэстрон (V) обладает выраженной иммуноде-

Таблица 4. Координаты ($\times 10^4$) и тепловые параметры ($\text{Å}^2 \times 10^3$) базисных атомов соединения (XIV). $U(\text{eq})$ равен $1/3$ суммы проекций тензора U_{ij} на ортогональные оси

Атом	x	y	z	$U(\text{eq})$
O1	-202(3)	4139(2)	2603(2)	70(1)
O2	9719(3)	-616(2)	8562(2)	82(1)
C1	5405(4)	2562(2)	3226(3)	56(1)
C2	3607(4)	3067(2)	2640(2)	58(1)
C3	1686(4)	3645(2)	3102(3)	52(1)
C3a	-228(5)	3946(3)	1588(3)	79(1)
C4	1546(4)	3754(2)	4131(3)	53(1)
C5	3333(4)	3261(2)	4697(2)	47(1)
C6	3539(4)	3224(2)	5810(3)	58(1)
C8	5993(4)	2868(2)	5899(2)	47(1)
C9	6911(4)	2075(2)	5067(2)	47(1)
C10	5276(4)	2643(2)	4259(2)	48(1)
C11	7125(4)	609(2)	5545(2)	52(1)
C12	8201(4)	75(2)	6583(2)	52(1)
C13	6976(4)	761(2)	7415(2)	43(1)
C14	6870(4)	2243(2)	6981(2)	43(1)
C15	5888(4)	3013(2)	7794(2)	52(1)
C16	7033(4)	2504(2)	8820(2)	49(1)
C16aα	5764(5)	3194(3)	9649(3)	77(1)
C16aβ	9286(4)	2746(2)	8635(3)	68(1)
C17	7234(4)	1030(2)	9253(2)	54(1)
C17a	8150(4)	297(2)	8424(2)	52(1)
C18	4780(4)	407(2)	7742(2)	57(1)

Таблица 5. Длины ковалентных связей (r , Å) стероида (XIV)

Связь	r	Связь	r
O1–C3	1.383(3)	C9–C10	1.502(4)
O1–C3a	1.424(4)	C9–C11	1.533(3)
O2–C17a	1.217(3)	C11–C12	1.523(4)
C1–C10	1.386(4)	C12–C13	1.524(3)
C1–C2	1.395(4)	C13–C17a	1.525(4)
C2–C3	1.382(3)	C13–C18	1.552(3)
C3–C4	1.390(4)	C13–C14	1.556(3)
C4–C5	1.375(4)	C14–C15	1.525(3)
C5–C10	1.394(3)	C15–C16	1.532(4)
C5–C6	1.487(4)	C16–C16a β	1.534(3)
C6–C8	1.552(4)	C16–C16a α	1.531(4)
C8–C14	1.520(4)	C16–C17	1.537(3)
C8–C9	1.556(4)	C17–C17a	1.509(4)

прессивной активностью по отношению к гуморальному звену системы иммунитета, включая аллергические реакции, при отсутствии утеротропного действия. Это позволяет рекомендовать данное соединение и стероиды подобного строения для дальнейших исследований.

Учитывая полученные результаты, представлялось интересным выяснить особенности пространственной структуры стероида (V). Мы выполнили рентгеноструктурное исследование монокристалла метилового эфира (XIV) этого стероида. Кристаллы этого стероида относятся к триклинной сингонии, пространственная группа $P\bar{1}$, $a = 6.5130$ (11), $b = 11.0554$ (19), $c = 13.247$ (2) Å, $\alpha = 73.076$ (4)°, $\beta = 81.431$ (4)°, $\gamma = 74.141$ (3)°, $Z = 2$, $D_x = 1.068$ г/см³.

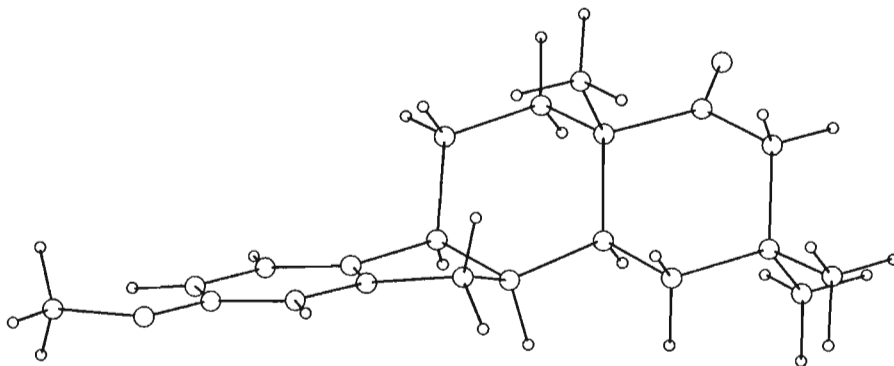
Координаты атомов стероида (XIV), длины валентных связей и величины валентных и двугранных углов приведены соответственно в табл. 4, 5, 6 и 7.

Молекулярная структура стероида (XIV) изображена на рисунке. Он имеет плоское кольцо A,

Таблица 6. Валентные углы ϕ (град) соединения (XIV)

Угол	ϕ	Угол	ϕ
C3–O1–C3a	118.4(2)	C11–C12–C13	111.5(2)
C10–C1–C2	120.5(3)	C17a–C13–C12	111.2(2)
C3–C2–C1	119.3(3)	C17a–C13–C18	105.9(2)
O1–C3–C2	123.9(3)	C12–C13–C18	109.6(2)
O1–C3–C4	115.4(3)	C17a–C13–C14	106.3(2)
C2–C3–C4	120.7(3)	C12–C13–C14	108.35(19)
C5–C4–C3	119.4(3)	C18–C13–C14	115.38(18)
C4–C5–C10	121.0(3)	C8–C14–C15	113.9(2)
C4–C5–C6	128.7(2)	C8–C14–C13	114.8(2)
C10–C5–C6	110.2(3)	C15–C14–C13	113.1(2)
C5–C6–C8	103.9(2)	C14–C15–C16	113.5(2)
C14–C8–C6	119.3(2)	C16a β –C16–C15	111.3(2)
C14–C8–C9	114.8(2)	C16a β –C16–C16a	108.1(2)
C6–C8–C9	103.6(2)	C15–C16–C16a	110.1(2)
C10–C9–C11	111.6(2)	C16a β –C16–C17	108.5(2)
C10–C9–C8	102.4(2)	C15–C16–C17	109.7(2)
C11–C9–C8	112.1(2)	C16a α –C16–C17	109.1(2)
C1–C10–C5	119.0(3)	C17a–C17–C16	112.5(2)
C1–C10–C9	130.1(2)	O2–C17a–C17	121.7(3)
C5–C10–C9	110.7(3)	O2–C17a–C13	122.4(3)
C12–C11–C9	113.5(2)	C17–C17a–C13	115.9(2)

кольцо B – в форме 8 α -конверта и кольца C и D в конформации кресла. Метильная группа в положении 13 имеет β -ориентацию, а атомы водорода в положениях 8, 9 и 14 расположены под плоскостью кольца (α). Сужение кольца B до пятичленного приводит к тому, что конформации изученного соединения и стероида с шестичленным кольцом B отличаются весьма значительно. Так, заметно изменяется “скрученность” молекулы. Если у 8-изоаналогов эстрадиола угол между плоскостями колец A и C около 72° [28], то в стероиде (V) он составляет только 64°. Это приводит к тому, что расстояние между O3- и O17a-атомами у аналога (V) составляет только 10.207 (4) Å, тогда как у 8-изоаналогов эстрадиола оно имеет ве-



Пространственная структура молекулы 3-метокси-16,16-диметил-D-гомо-B-нор-8-изоэстра-1,3,5(10)-триен-17а-она (XIV).

Таблица 7. Двугранные углы (град) соединения (XIV)

Угол	Град	Угол	Град
C10-C1-C2-C3	-0.3(4)	C11-C12-C13-C17a	-175.6(2)
C3a-O1-C3-C2	5.7(3)	C11-C12-C13-C18	67.6(3)
C3a-O1-C3-C4	-173.8(2)	C11-C12-C13-C14	-59.1(3)
C1-C2-C3-O1	-177.9(2)	C6-C8-C14-C15	-54.1(3)
C1-C2-C3-C4	1.5(4)	C9-C8-C14-C15	-177.9(2)
O1-C3-C4-C5	178.5(2)	C6-C8-C14-C13	78.6(3)
C2-C3-C4-C5	-1.0(4)	C9-C8-C14-C13	-45.3(3)
C3-C4-C5-C10	-0.7(3)	C17a-C13-C14-C8	172.9(2)
C3-C4-C5-C6	-177.6(2)	C12-C13-C14-C8	53.2(3)
C4-C5-C6-C8	-166.9(2)	C18-C13-C14-C8	-70.0(3)
C10-C5-C6-C8	15.9(3)	C17a-C13-C14-C15	-54.1(3)
C5-C6-C8-C14	-156.9(2)	C12-C13-C14-C15	-173.8(2)
C5-C6-C8-C9	-27.7(2)	C18-C13-C14-C15	63.0(3)
C14-C8-C9-C10	160.9(2)	C8-C14-C15-C16	-170.4(2)
C6-C8-C9-C10	29.1(2)	C13-C14-C15-C16	56.2(3)
C14-C8-C9-C11	41.1(3)	C14-C15-C16-C16aβ	68.4(3)
C6-C8-C9-C11	-90.7(3)	C14-C15-C16-C16aα	-171.7(2)
C2-C1-C10-C5	-1.3(4)	C14-C15-C16-C17	-51.7(3)
C2-C1-C10-C9	173.9(2)	C16β-C16-C17-C17a	-71.7(3)
C4-C5-C10-C1	1.8(3)	C15-C16-C17-C17a	50.1(3)
C6-C5-C10-C1	179.3(2)	C16α-C16-C17-C17a	170.8(2)
C4-C5-C10-C9	-174.3(2)	C16-C17-C17a-O2	125.3(3)
C6-C5-C10-C9	3.2(3)	C16-C17-C17a-C13	-55.3(3)
C11-C9-C10-C1	-76.1(3)	C12-C13-C17a-O2	-8.1(3)
C8-C9-C10-C1	163.7(2)	C18-C13-C17a-O2	110.9(3)
C11-C9-C10-C5	99.5(2)	C14-C13-C17a-O2	-125.9(2)
C8-C9-C10-C5	-20.7(2)	C12-C13-C17a-C17	172.5(2)
C10-C9-C11-C12	-162.0(2)	C18-C13-C17a-C17	-68.5(2)
C8-C9-C11-C12	-47.8(3)	C14-C13-C17a-C17	54.7(2)
C9-C11-C12-C13	58.8(3)		

личину порядка 10.94–10.97 Å [28]. Напомним, что у природного гормона эстрадиола расстояние между кислородами гидроксильных 3 и 17 равно примерно 10.93 Å [18]; эта величина считается оптимальной для эффективного связывания с рецепторами эстрогенов. Указанные различия (наряду с наличием двух метильных групп при C16) служат причиной резкого снижения эстрогенной активности *D*-гомо-*B*-нор-8-изоаналогов эстрогенов по сравнению с 8-изоэстрадиолом. Гормональная активность значительно снижалась также и при введении в положение 16 двух метильных групп в 8-изоаналоги эстрогенов [29].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Масс-спектры получали на приборе MX-1321 при температуре ионизационной камеры 200–210°C.

Спектры ЯМР измеряли при 295 К на спектрометре DPX-300 фирмы Bruker с рабочими частото-

тами 300.130 и 75.468 МГц для ядер ¹H и ¹³C соответственно. Для регистрации спектров ¹H-ЯМР использовались растворы 5–7 мг вещества в 0.6 мл CDCl₃, а для ¹³C-ЯМР – 30–50 мг в том же объеме. Химические сдвиги измерены по отношению к Me₄Si путем присвоения сигналу остаточного хлороформа в растворителе (CDCl₃/CHCl₃ = 99.9/0.1) стандартных значений 7.26 м.д. (¹H) и 76.90 м.д. (¹³C) с точностью не менее ±0.01 м.д. Гомоядерные КССВ измерены с точностью ±0.02 Гц из спектров ¹H-ЯМР, полученных после дополнительной обработки линий с помощью Лоренц-Гауссова преобразования.

8-Изоэстрадиол (Ia) получали известным методом [13], т. пл. 188.5–190°C (лит. т. пл. 185.5–186.8°C [30]). Полученное соединение плавилось без депрессии температуры плавления в пробе смешения с заведомо известным препаратом.

В-Нор-8-изоэстрадиол (Iб) синтезировали по методу, предложенному в работе [11], т. пл. 194.5–196°C (лит. т. пл. 189–190°C); масс-спектр, *m/z*

($I_{\text{отн}}$): 258 (100), 214 (52), 199 (85), 186 (14.5), 185 (13.5), 172 (25), 158 (28.5), 146 (36), 132 (85); спектр ^1H -ЯМР (DMSO, δ , м.д., J , Гц): 0.73 (3H, с, C13-CH₃), 6.48 (1H, д, J 8.07, H2), 6.56 (1H, с, H4), 6.93 (1H, д, J 8.03, H1), 8.95 (1H, с, 3-OH). Найдено, %: C 79.14; H 8.71. C₁₇H₂₂O₂. Вычислено, %: C 79.03; H 8.58.

D-Гомо-В-нор-8-изоэстрадиол (Пб). а) 3-О-Метил-D-гомо-В-нор-8-изоэстрон (VII). К раствору 10 г соединения (VI) [31] в 270 мл бензола прибавляли 10 г никеля Ренея, и смесь гидрировали в течение 30 мин при 70–90°C и давлении 100–120 атм. После обычной обработки растворитель удаляли на роторном испарителе, остаток растворяли 800 мл хлористого метилена, и раствор охлаждали до –60°C (раствор А). К перемешиваемому раствору 35 мл оксалилхлорида в 900 мл хлористого метилена быстро прибавляли по каплям 70 мл диметилсульфоксида при температуре –55°C, и смесь перемешивали 5 мин (раствор Б). К раствору Б при сильном перемешивании прибавляли при –60°C раствор А, а через 25 мин – 175 мл триэтиламина. Реакционную смесь оставляли на 12 ч, позволяя ей медленно нагреваться до 20°C, а затем обрабатывали равным объемом воды. Органический слой отделяли и промывали водой до нейтральной реакции. После обычной обработки продукты реакции хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир–этилацетат (6 : 1). После кристаллизации из метанола получали 4.3 г (42%) целевого соединения (VII), т. пл. 92–92.5°C (лит. т. пл. 91.5–92°C [30]); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., CDCl₃): 7.10 (H1), 6.70 (H2), 6.77 (H4), 2.80 (H6 α), 2.97 (H6 β), 2.56 (H8), 2.88 (H9), 1.28 (H11 α), 1.84 (H11 β), 1.58 (H12 α), 1.73 (H12 β), 1.82 (H14), 1.95 (H15 β), 1.62 (H15 α), 1.71 (H16 α), 2.11 (H16 β), 2.70 (H17 β), 2.26 (H17 α), 1.22 (C13-CH₃), 3.78 (OCH₃); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., CDCl₃): 123.9 (C1), 111.8 (C2), 158.5 (C3), 110.5 (C4), 143.4 (C5), 33.6 (C5), 45.0 (C8), 44.0 (C9), 140.8 (C10), 26.4 (C11), 31.3 (C12), 48.2 (C13), 44.8 (C14), 25.8 (C15), 26.3 (C16), 37.7 (C17), 215.4 (C17a), 17.5 (C18), 55.3 (OCH₃). Найдено, %: C 80.36; H 8.77. C₁₉H₂₄O₂. Вычислено, %: C 80.24; H 8.51.

б) Диацетат D-гомо-В-нор-8-изоэстрадиола (VIII). К раствору 5 г стероида (VII) в 150 мл уксусной кислоты прибавляли 75 мл 48% бромистоводородной кислоты. Реакционную смесь кипятили 6 ч, а затем выливали в 1 л воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой до нейтральной реакции и сушили в вакууме при 80°C. Полученное вещество растворяли в 100 мл THF, прибавляли по каплям 20 мл 1 М раствора алюмогидрида лития в THF и смесь кипятили 2 ч. После обычной обработки продукт реакции растворяли в 50 мл пиридина, прибавляли 75 мл уксусного ангидрида и реакционную смесь нагревали на кипящей водяной бане 3 ч, а затем охлаждали до комнатной температуры и выливали в воду со льдом при сильном перемешивании.

Выпавший осадок промывали на фильтре водой до нейтральной реакции, сушили и кристаллизовали из метанола. Выход стероида (VIII) 3.7 г (59%), т. пл. 178–179.5°C; масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$): 356 (12), 314 (100), 272 (2.5), 254 (6), 239 (4), 225 (3), 212 (4), 199 (18), 185 (3.5), 171 (4.5), 159 (5.5), 145 (15.5), 132 (33); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., CDCl₃): 7.15 (H1), 6.81 (H2), 6.89 (H4), 2.90 (H6 β), 2.71 (H6 α), 2.49 (H8), 2.94 (H9), 1.27 (H11 β), 1.72 (H11 α), 1.16 (H12 α), 1.63 (H12 β), 1.57 (H14), 4.51 (H17a α), 1.03 (C13-CH₃), 2.03 (17a-OCOCH₃) и 2.28 (3-OCOCH₃); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., CDCl₃): 123.9 (C1), 119.0 (C2), 149.1 (C3), 118.0 (C4), 143.9 (C5), 33.1 (C6), 44.1 (C8), 44.5 (C9), 146.3 (C10), 26.1 (C11), 25.5 (C12), 37.8 (C14), 43.4 (C14), 25.8 (C15), 24.2 (C16), 27.1 (C17), 81.2 (C17a), 12.4 (C18), сигналы ацетильных групп. Найдено, %: C 74.38; H 7.93. C₂₂H₂₈O₄. Вычислено, %: C 74.13; H 7.92.

в) D-Гомо-В-нор-8-изоэстрадиол (Пб). К раствору 2 г диацетата (VIII) в 100 мл бензола прибавляли раствор 4 г едкого калия в 100 мл спирта, и смесь кипятили 3 ч. После обычной обработки целевой продукт (Пб) получали кристаллизацией из смеси метанол–вода; выход 1.2 г (78.5%); т. пл. 229.5–230.5°C; масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$): 272 (100), 230 (6.5), 199 (70), 185 (6), 171 (7), 159 (11.5), 157 (9), 146 (20.5), 144 (18), 132 (62.5); ^1H -ЯМР (δ , м.д., J , Гц, DMSO): 0.81 (3H, с, C13-CH₃), 6.46 (1 H, дд, $J_{1,2}$ 8.1, $J_{2,4}$ 2.1, H2), 6.55 (1 H, д, $J_{2,4}$ 2.1, H4), 6.92 (1 H, д, $J_{1,2}$ 8.1, H1). Найдено, %: C 79.36; H 8.90. C₁₈H₂₄O₂. Вычислено, %: C 79.37; H 8.88.

18-Метил-D-гомо-В-нор-8-изоэстрадиол (Шб). а) Диацетат 18-метил-D-гомо-В-нор-8-изоэстрадиола (X) получали из 2 г метилового эфира 18-метил-D-гомо-В-нор-8-изоэстрола (IX) [21] в условиях, описанных выше при синтезе стероида (VIII); выход 1.36 г (55%), т. пл. 178–179.5°C; ^1H -ЯМР (δ , м.д., J , Гц, CDCl₃): 0.93 (3 H, т, J 7.5, C18-CH₃) 4.59 (1 H, дд, $J_{17a,17\alpha}$ 10.0, $J_{17a,17\beta}$ 5.8, H17a α), 6.81 дд (1 H, $J_{1,2}$ 8.1, $J_{2,4}$ 2.4, H2), 6.89 (1 H, д, $J_{2,4}$ 2.4, H4), 7.15 (1 H, д, $J_{1,2}$ 8.1, H1). Найдено, %: C 74.33; H 8.31. C₂₃H₃₀O₄. Вычислено, %: C 74.56; H 8.16.

б) 18-Метил-D-гомо-В-нор-8-изоэстрадиол (Шб) получали из 1 г диацетата (X) в условиях, описанных при синтезе соединения (Пб); выход 0.75 г (97%), т. пл. 221–223°C. Найдено, %: C 79.36; H 9.24. C₂₃H₃₀O₄. Вычислено, %: C 79.68; H 9.15.

17 α ,18-Диметил-D-гомо-В-нор-8-изоэстрадиол (IV). а) Диацетат 17 α ,18-диметил-D-гомо-В-нор-8-изоэстрадиола (XI) получали из 1 г метилового эфира (XI) [21] в условиях, описанных при получении стероида (VIII); выход 0.89 г (72%), т. пл. 139–141°C (из метанола); спектр ^1H -ЯМР соответствовал ожидаемому. Найдено, %: C 74.96; H 8.57. C₂₄H₃₂O₄. Вычислено, %: C 74.97; H 8.39.

б) Целевое соединение (IV) получали из 0.82 г диацетата (XI) в условиях синтеза вещества (Пб); после кристаллизации из водного спирта выход 0.45 г (70%), т. пл. 262–268°C (разл.); масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$): 300 (88), 271 (4), 253 (4), 244 (8.5), 213

(100), 197 (4.5), 185 (8.5), 171 (7.5), 159 (13), 145 (36), 144 (29), 132 (76); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., DMSO): 0.84–0.90 (6 H, м, 18- CH_3 и 17- CH_3), 6.48 (1 H, д, H2), 6.54 (1 H, с, H4), 6.93 (1 H, д, H1); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., DMSO): 9.8 и 19.8 (сигналы метильных групп), 19.7, 25.3, 26.8, 31.8, 33.5 и 34.1 (сигналы метиленовых групп), 33.7, 43.7, 44.0, 44.6 (сигналы метиновых групп), 86.0 (C17a-ОН), 111.6, 112.9, 123.9, 138.9, 143.3, 155.9 (сигналы ядер ^{13}C ароматического кольца). Найдено, %: 74.89; H 8.50. $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_4$. Вычислено, %: C 74.97; H 8.39.

16,16-Диметил-*D*-гомо-*B*-нор-8-изоэстрон (V).

а) Метиловый эфир 16,16-диметил-*D*-гомо-*B*-нор-8-изоэстрола (XIV). К раствору 12 г метилового эфира (XIII) [22] в 270 мл бензола прибавляли 10 г никеля Ренея, и гидрирование проводили в стальном автоклаве при давлении 100–180 атм. при температуре 90–130°C в течение 30 мин. После охлаждения автоклава до комнатной температуры катализатор отфильтровывали, растворитель удаляли на роторном испарителе, остаток растворяли в 130 мл пиридина и к полученному раствору прибавляли реактив Саретта, приготовленный из 9 г хромового ангидрида и 200 мл пиридина. Через 24 ч к реакционной смеси медленно приливали 100 мл этанола, после обычной обработки [32] целевое соединение (XIV) получали кристаллизацией сначала из метанола, а затем из смеси хлороформ–метанол; выход 4.5–4.7 г (37–39%), т. пл. 131–133°C; масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$): 312 (100), 297 (2), 227 (27), 213 (44), 199 (9), 185 (6), 171 (10), 158 (13), 146 (29); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., CDCl_3): 7.10 (H1), 6.71 (H2), 6.77 (H4), 2.78 (H6 α), 2.97 (H6 β), 2.49 (H8), 2.90 (H9), 1.28 (H11 α), 1.67 (H11 β), 1.58 (H12 α), 1.67 (H12 β), 1.98 (H14), 1.35 (H15 α), 1.90 (H15 β), 1.98 (H17 α), 2.64 (H17 β), 1.19 (C18- CH_3), 0.97 (C16- $\text{CH}_3\alpha$), 1.13 (C16- $\text{CH}_3\beta$), 3.78 (OCH $_3$); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., CDCl_3): 123.9 (C1), 111.7 (C2), 158.5 (C3), 110.5 (C4), 143.5 (C5), 33.4 (C6), 44.9 (C8), 43.9 (C9), 140.8 (C10), 25.5 (C11), 31.0 (C12), 47.1 (C13), 39.6 (C14), 39.8 (C15), 35.1 (C16), 50.9 (C17), 214.9 (C17a), 17.2 (C18), 26.7 (C16- $\text{CH}_3\alpha$), 32.4 (C16- $\text{CH}_3\beta$), 55.2 (OCH $_3$). Найдено, %: C 80.61; H 9.18. $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_2$. Вычислено, %: C 80.72; H 9.03.

б) Целевое соединение (V) получали гидролизом 800 мг его метилового эфира (XIV) при действии смеси бромистоводородной и уксусной кислот в стандартных условиях [32]. Продукт реакции очищали кристаллизацией из смеси этилацетат–гексан (1 : 1); выход 600 мг (79%), т. пл. 212–214°C; масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$): 298 (100), 280 (12), 265 (5), 213 (37), 199 (30), 185 (12), 171 (13), 157 (15); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., J, Гц, DMSO): 0.84, 1.06 и 1.08 (по 3 H, с, метильные группы в кольце D), 6.48 (1 H, д, J 8.07, H2), 6.58 (1 H, с, H4), 6.93 (1 H, д, J 8.0, H1), 9.00 (1 H, с, 3-ОН). Найдено, %: C 80.61; H 9.18. $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$. Вычислено, %: C 80.49; H 8.78.

Величины относительной конкурентной активности (ОКА) стероидов (Iб), (IIб) и (IIIб) рассчиты-

вали по соотношению концентраций немеченых аналогов стероидных эстрогенов, вызывающих 50% ингибирование специфического связывания [^3H]эстрадиола с рецепторами из матки крысы [12]. Эталонным соединением служил 8-изоэстрадиол (Iа), конкурентную активность которого принимали за единицу. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Определение влияния стероида (V) на способность мышей к антителигенезу. Мышей линии СВАхС57В1/6 F1 (самцы, 22–25 г) иммунизировали внутривентриально эритроцитами барана в дозе 1×10^8 сразу после введения препаратов (индуктивная фаза антителигенеза) или через 3 сут (продуктивная фаза). Через 5 сут мышей забивали декапитацией под эфирным наркозом. Содержание антителиобразующих клеток (АОК) определяли по методу Каннингема [33].

Изучение влияния аналога (V) на антигенспецифические супрессорные клетки селезенки мышей. Мышей гипериммунизировали введением эритроцитов барана в дозе 5×10^9 в 0.2 мл среды 199. Через 10 сут селезенку гомогенизировали в среде 199, суспензию спленоцитов вводили сингенным животным внутривенно в дозе 10^7 вместе с эритроцитами барана в дозе 1×10^8 . В контроле вместе с эритроцитами барана вводили спленоциты не иммунизированных мышей. Через 4 сут определяли содержание АОК в селезенке по методу Каннингема и рассчитывали индекс супрессии (ИС) по формуле:

$$\text{ИС} = (\text{число АОК в контроле} - \text{число АОК в опыте}) / \text{число АОК в контроле}.$$

Изучение влияния 16,16-диметил-*D*-гомо-*B*-нор-8-изоэстрола (V) на синтез аллергенспецифических IgE-антител. Препарат вводили орально в дозе 5 мг/кг. Через 1 сут мышей сенсibilizировали овальбумином (10 мкг внутривентриально). Через 21 сут вводили разрешающую дозу овальбумина (10 мкг внутривентриально); через 7 сут мышей забивали, получали сыворотку крови и вводили внутривенно в область живота крысам популяции Вистар в последовательных двукратных разведениях; через 24 ч вводили смесь овальбумина и синьки Эванса внутривенно; через 48 ч проводили учет реакции (логарифм титра разведений сыворотки) по наличию покрашенного участка кожной поверхности.

Пероральное введение препарата осуществляли в виде его суспензии в оливковом масле.

Достоверность реакций между опытными и контрольными группами оценивали с помощью критерия Стьюдента. В каждой из групп использовали по шесть животных.

Структура метилового эфира 16,16-диметил-*D*-гомо-*B*-нор-8-изоэстрола (XIV) решена прямыми методами рентгеноструктурного анализа и уточнена с учетом анизотропии тепловых колебаний неводородных атомов до $R = 0.0549$ на основании

рефлексов, собранных на автодифрактометре SMART CCD (3924 ненулевых независимых отражения, $[I \geq 2\sigma(I)]$). Расчеты проводились с использованием комплексов программ CSD [34] и SHELXL 97 [35].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент США 3546292 (1970) // РЖХим. 1971. 13Н467П.
2. Патент США 5554601 (1996) // С.А. 1996. V. 125. 294029с.
3. PCT Int. Appl. WO 98 31381 // С.А. 1998. V. 129. P. 131266w.
4. Патент США 5633392 (1997) // С.А. 1997. V. 127. P. 17859a.
5. Патент США 5962443 (1999) // С.А. 1999. V. 131. 257739п.
6. PCT Int. Appl. WO 97 08188 // С.А. 1997. V. 126. 225448x.
7. Peltoketo H., Ghosh D., Vihko P. // Curr. Top. Steroid Res. 1998. V. 1. P. 111–117.
8. Purohit A., Woo L.W.L., Potter B.V.L., Reed M.J. // Cancer Res. 2000. V. 60. P. 3394–3396.
9. Purohit A., Hejaz H.A.M., Woo L.W.L., van Strien A.E., Potter B.V.L., Reed M.J. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1999. V. 60. P. 227–238.
10. Schafer J.I.M., Liu H., Tonetti D.A., Jordan V.C. // Cancer Res. 1999. V. 59. P. 4308–4313.
11. Heidepriem H., Rufer C., Kosmol H., Schröder E., Kieslich K. // Liebigs Ann. Chem. 1968. Bd. 712. S. 155–167.
12. Шавва А.Г., Бороньева Т.Р., Злобина И.В., Бурова Е.Б., Мартынов В.Ф. // Вест. Ленингр. ун-та. 1981. Серия 4. № 16. С. 117–119.
13. Корхов В.В., Макушева В.П., Лупанова Г.Е., Елисеев И.И., Жуковский Е.А., Бороньева Т.Р., Мартынов В.Ф., Шавва А.Г. // Хим.-фарм. журн. 1986. Т. 20. С. 574–578.
14. Торгов И.В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1982. № 2. С. 299–317.
15. Шавва А.Г., Власова К.В., Цогоева С.Б., Егоров М.С., Якуценя П.П. // Биоорган. химия. 2002. Т. 28. С. 236–241.
16. Gonzalez F.B., Neef G., Eder U., Wiechert R., Schilling E., Nishino Y. // Steroids. 1982. V. 40. P. 171–187.
17. Dewar M.J.S., Zoebish E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. P. 3902–3909.
18. Hylaridis M.D., Duesler E.N., Mettler F.A., Leon A.A. // Acta Cryst. 1988. V. C44. P. 709–712.
19. Anstead G.M., Carlson K.E., Katzenellenbogen J.A. // Steroids. 1997. V. 62. P. 268–303.
20. Gao H., Katzenellenbogen J.A., Garg R., Hansch C. // Chem. Rev. 1999. V. 99. P. 723–744.
21. Злобина И.В., Нерсисян Г.Г., Прокопьев А.А., Мартынов В.Ф., Шавва А.Г. // Вест. Ленингр. ун-та. 1986. Сер. 4. № 3. С. 91–95.
22. Егоров М.С., Гриненко Е.В., Балькина Л.В., Зорина А.Д., Селиванов С.И., Шавва А.Г. // Журн. орг. хим. 2001. Т. 37. С. 849–857.
23. Нелиус Д., Штоббе Г., Фаульхабер Г.-Д. Иммуносупрессивная химиотерапия. М.: Медицина, 1984. 288 с.
24. Клиническая иммунология и аллергология / Ред. Йегерс Л. М.: Медицина, 1986. Т. 1. С. 242.
25. Петров Р.В., Манько В.Н. Иммунодепрессоры. М.: Медицина, 1971.
26. Schuur A.H.W.M., Verheul H.A.M. // J. Steroid. Biochem. 1990. V. 35. P. 157–172.
27. Хаитов Р.М., Гуцин И.С., Пинегин Б.В., Зебреев А.И. // Ведомости фармакол. комитета. 1999. № 1. С. 31–36.
28. Старова Г.Л., Елисеев И.И., Абуалимов Ш.Н., Цогоева С.Б., Шавва А.Г. // Кристаллография. 2001. Т. 47. С. 72–75.
29. Рыженков В.Е., Прокопьев А.А., Каменева И.Ю., Нерсисян Г.Г., Шавва А.Г. // Вопр. мед. химии. 1987. № 2. С. 65–68.
30. Патент США 3407217 (1968) // С.А. 1969. V. 70. P88089q.
31. Крылова Е.Б., Мартынов В.Ф., Шавва А.Г. // Журн. орг. хим. 1978. Т. 14. С. 2518–2523.
32. Никитина Г.В., Корхов В.В., Шавва А.Г. // Хим.-фарм. журн. 1983. № 5. С. 1315–1319.
33. Cunnham A.G. // Nature (London). 1965. V. 207. P. 1106–1107.
34. Acselrud L.G., Griun Yu.N., Zavalii P.Yu., Pehsky V.K., Fundamensky V.S. // Collect. Abstr. XII Europ. Crystallogr. Meet. Moscow: Nauka, 1989. V. 3. P. 155.
35. Sheldrik G.M. 1997. SHELXL 97. University of Göttingen, Germany.

The Synthesis and Properties of *B*-Nor-8-Isoanalogues of Steroid Estrogens

A. G. Shavva[#], S. I. Selivanov, G. L. Starova, T. R. Boronoeva, I. V. Ishchenko,
I. A. Gluzdikov, A. N. Sharetskii, V. G. Isaeva, and B. P. Surinov

[#]Phone: (812) 428-6809; fax: (812) 428-6939; e-mail: nmr@paloma.spbu.ru

Chemical Faculty, St. Petersburg State University, Universitetskii pr. 26, Staryi Petergof, St. Petersburg, 198504 Russia

The study of the binding of estradiol *B*-nor-8-isonalogues to estrogen receptors from the rat uterus helped create the proposed model of the corresponding ligand–receptor complexes. The use of this model ensured the choice of such micromodifications in this steroid group that sharply decreased their hormonal activity. By the example of 16,16-dimethyl-*D*-homo-*B*-nor-8-isoestrone, we demonstrated the possibility of the synthesis of the estrogen analogues devoid of uterotrophic activity but retaining immunosuppressive activity. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: estrogen analogues, immunosuppressive action, ligand–receptor complex, uterotrophic activity