УДК 547.92

ХЕМОСЕЛЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ 14β-(ИЗОКСАЗОЛ-3-ИЛ)-МЕТИЛСТЕРОИДОВ ЭСТРАНОВОГО РЯДА И ИХ ТРАНСФОРМАЦИИ С РАСКРЫТИЕМ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОГО ЯДРА

© 2019 г. А. В. Барановский[a, *], А. С. Ладыко[a], В. А. Шатская[b], А. М. Щербаков[b, **]

[a] *ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», 220141, Беларусь, г. Минск, ул. Купревича 5/2*
**e-mail: baranovsky@iboch.by*

[b] *НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115522, Россия, г. Москва, Каширское ш. 24, стр. 15*
***e-mail: alex.scherbakov@gmail.com*

Поступила в редакцию 16 мая 2018 г.
После доработки 23 мая 2018 г.
Принята к публикации 1 декабря 2018 г.

Выполнен синтез стероидов с изоксазольным, изоксазолиновым, енаминокарбонильным заместителем при С-14 и конденсированным по С-14—С-15 пирролидиновым циклом. Оценено влияние растворителей на результат диполярного циклоприсоединения и сольволиз мостиковых нитростероидов. Цитостатические свойства аналогов эстрона проанализированы на опухолевых клетках различного генеза. Выявлена активность соединений в отношении клеток рака молочной железы, рака кишечника, рака предстательной железы и рака легкого.

Ключевые слова: эстрадиол, диполярное циклоприсоединение, гидрогенолиз, нитрилоксиды, енаминокетоны, лактамы, ЯМР, культуры клеток опухолей человека.

DOI: 10.1134/S0514749219020125

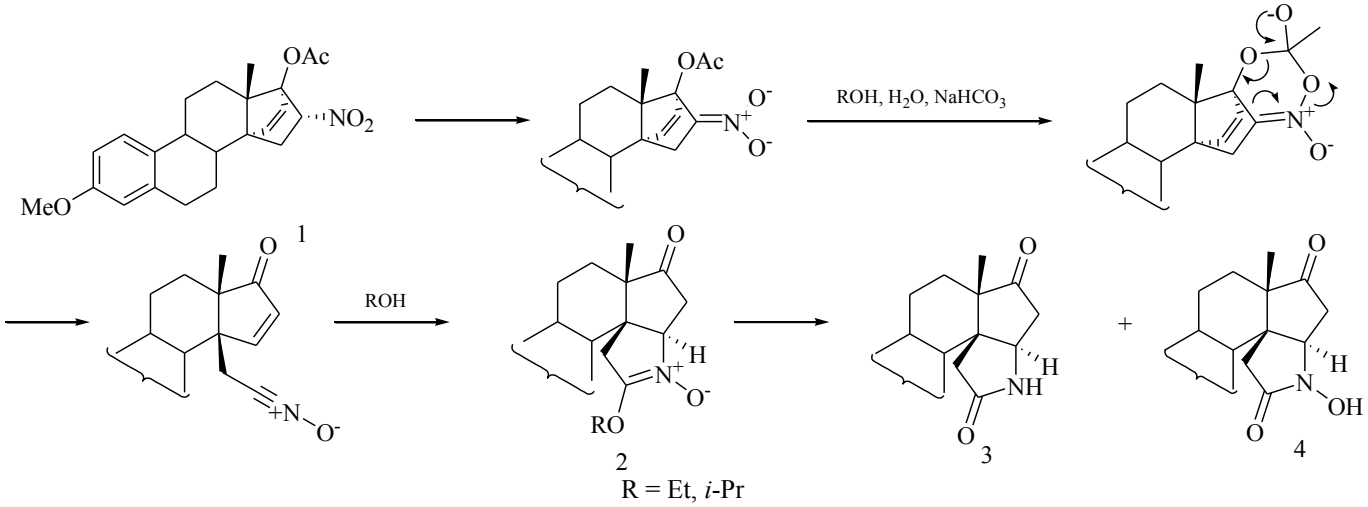
Ранее [1] было показано, что сольволиз нитростероидов типа **1** протекает через образование алкоксинитронов **2** (схема 1) и замена этанола на изопропанол приводит к лактаму **3** без примеси *N*-гидроксилактама **4**. Такое заключение было сделано на основе аналитического эксперимента под контролем ВЭЖХ-МС. Для подтверждения полученных данных осуществлен препаративный синтез лактама в модифицированных условиях и исследовано влияние растворителей на выход продуктов диполярного циклоприсоединения к нитростероиду **6** (изоксазолов и изоксазолинов). Во второй части исследования выполнено раскрытие гетероциклического ядра изоксазолов с целью получения 14β-функционализированной цепи и изучены цитостатические свойства новых аналогов эстрона.

Синтез нитроаддукта **6** (схема 2) выполнен из эстрона **5** по ранее описанному методу [2] с некоторыми модификациями, в частности, при получении смеси Δ^{14}- и Δ^{15}-кетонов в качестве растворителя использовали диметилацетамид [3] вместо ДМФА, что существенно сократило время реакции и улучшило суммарный выход продуктов.

Для оценки выхода лактама проведена реакция нитроаддукта **6** с $NaHCO_3$ в смеси изопропанол-вода (95:5). В результате, после кипячения смеси в течение 24 ч и последующей хроматографической очистки, был выделен единственный продукт реакции – лактам **7**. По сравнению с аналогичной реакцией в 96% этаноле, выход продукта оказался значительно выше (90% против 42%). Таким образом, полученный результат полностью подтвердил выводы о механизме реакции сольволиза и результаты аналитического эксперимента.

Успех реакции получения лактама стимулировал исследовать влияние растворителя и на формирование изоксазолов и изоксазолинов. Как было показано [4], в абсолютном этаноле выход изоксазолов не превышал 50–60%, а изоксазолинов 70% в наиболее удачных экспериментах.

Схема 1.

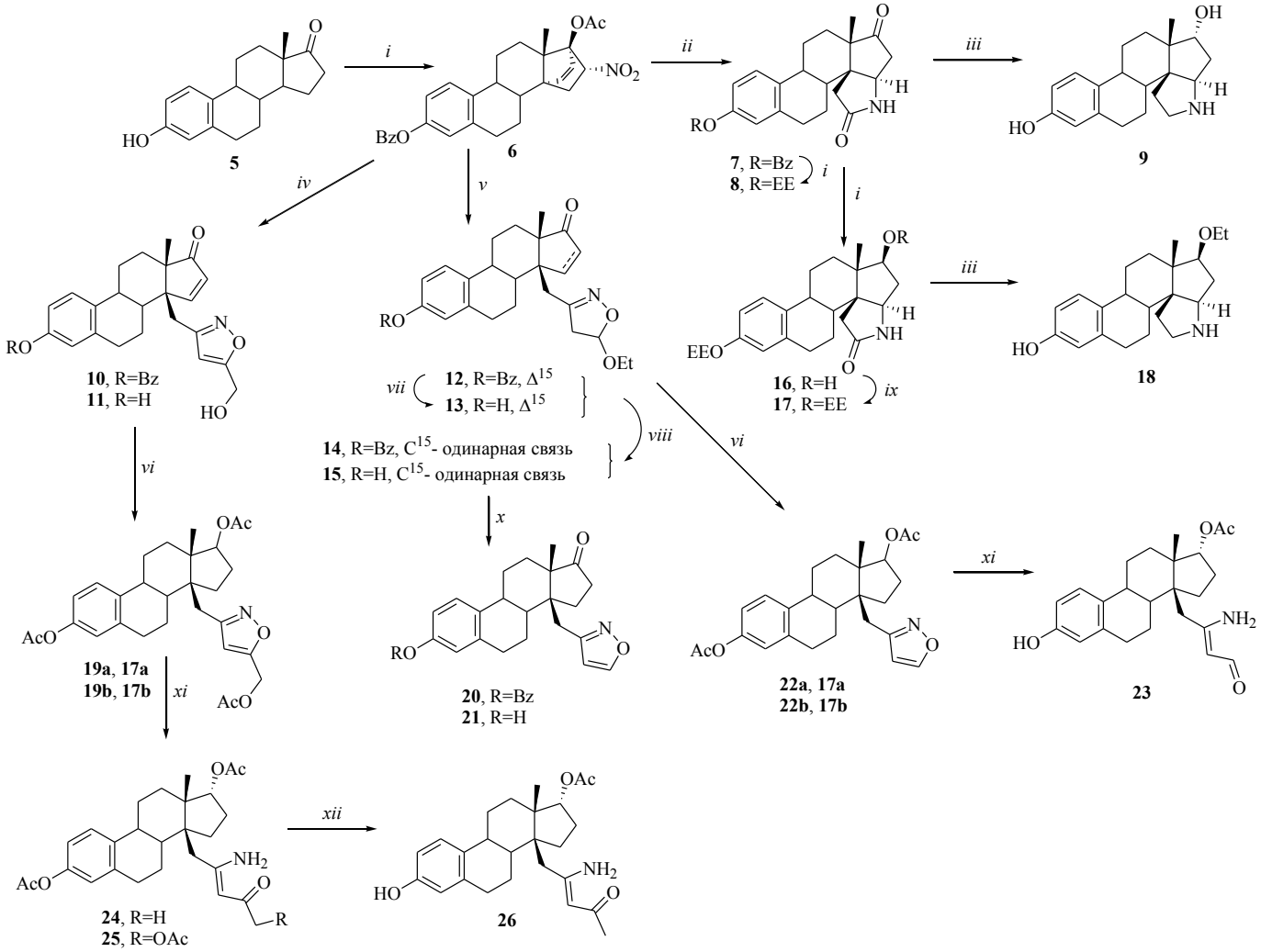


Замена этанола на смесь изопропанол-вода (95:5) при присоединении винилэтилового эфира дало увеличение выхода изоксазолинов **12** на 15–20%, при некотором сокращении времени реакции. Однако более полезным данный подход оказался в синтезе изоксазолов **10** и **11**, где в этаноле наблюдалось образование лактама при достаточно умеренном выходе целевого продукта (50%). При применении системы изопропанол–вода после 6 часов кипячения суммарный выход изоксазолов **10**, **11** составил 71%. В реакционной смеси не были обнаружены лактам **7** или его 3-гидроксипроизводное, а выделен только исходный нитроаддукт **6** (26%). Таким образом, конверсия нитроаддукта **6** в данной реакции составила 98%, причем, следует отметить, что гидролиза защитной группы при С-3 в нитросоединении **6** не наблюдалось. Снижение концентрации воды в системе до 1% не привело к положительным результатам: время реакции увеличилось до 18 ч, суммарный выход изоксазолов составил 59% при 95% конверсии. Чтобы еще более снизить вероятность нуклеофильного присоединения спирта-растворителя к нитрилоксиду, вместо изопропилового спирта был использован более стерически затрудненный *трет*-бутиловый спирт в присутствии 5% воды. Однако, реакция соединения **6** с пропаргиловым спиртом в этом случае протекала медленно и выход продукта оказался ниже, чем при реакции в изопропаноле, был выделен исходный стероид, а образования лактама не было зафиксировано. Следовательно, опираясь на полученные резу-льтаты, наиболее оптимальной для диполярного присоединения пропаргилового спирта является система изопропанол–вода 95:5. Этот вариант дает наиболее высокие выходы изоксазолов, а непрореагировавший исходный стероид **6** может быть использован повторно в присоединении.

Полученные в результате циклоприсоединения и сольволиза стероиды были изучены в ряде реакций, включающих раскрытие гетероциклического ядра и модификацию цикла D для получения новых аналогов эстрона и эстрадиола.

Синтез производных с пирролидиновым циклом осуществлен из лактама **7**. Защитная группа при С-3 в лактаме **7** была заменена на этоксиэтильную [5] для повышения растворимости в органических растворителях, и *EE*-эфир **8** был превращен в смесь диола **9** и его 17β-эпимера при кипячении с диизобутилалюминий гидридом (DIBAH) [6, 7] в толуоле. Реакция выполнялась последовательно: предполагалось, что на первом этапе будет селективно восстановлена карбонильная группа при низкой температуре, а затем при кипячении произойдет деоксигенирование и восстановление *EE*-эфира. К сожалению, селективность восстановления кетонной функции была неприемлема даже при –78°С: соотношение спиртов составило 2:1 в пользу 17α-эпимера, что, очевидно связано с координацией электрофильного реагента с лактамным циклом. С целью улучшения соотношения в пользу 17β-эпимера, схема синтеза была изменена. Карбонильная группа в *EE*-эфире **8** была восстановлена трис-(*трет*-бутокси)алюминий гидридом [5] и образовавшийся 17β-спирт **16** был превращен в бис-*EE*-эфир **17**. Его

Схема 2.



i: ссылка [5]; *ii*: $NaHCO_3$, *i*-PrOH, H_2O, Δ; *iii*: DIBAH, PhMe, Δ; *iv*: пропаргиловый спирт, $NaHCO_3$, *i*-PrOH, H_2O, Δ; *v*: CH_2=CHOEt, $NaHCO_3$, *i*-PrOH, H_2O, Δ; *vi*: 1) $NaBH_4$, THF, MeOH; 2) Ac_2O, $HClO_4$ EtOAc; *vii*: KOH, MeOH, H_2O; *viii*: HCO_2NH_4, Pd/C, EtOH; *ix*: CH_2=CHOEt, Et_2O, PPTS; *x*: TsOH, MeCN; *xi*: H_2, Ni/Ra, MeOH; *xii*: $NaHCO_3$, MeOH, H_2O.

деоксигенирование сопровождалось восстановлением защитных групп, которое, однако, протекало разными путями. Результатом восстановления заместителя при С-3 оказалась свободная 3-гидроксигруппа, а восстановление 17-эфирной группы остановилось на стадии этилового эфира [8]. Таким образом, продуктом восстановления лактама **17** оказалось 17β-этоксипроизводное **18**.

Изучение химических свойств изоксазолилстероидов **10** и **11** было сконцентрировано на восстановительных трансформациях их гетероциклического цикла. Наличие Δ^{15}-связи в стероидах внесло определенные сложности при раскрытии гетероцикла или селективного ее гидрирования. При попытках гидрирования (Pd/C, H_2; Ni/Ra, H_2; Pd/C, HCO_2NH_4) реакция протекала не селективно: наряду с насыщением двойной связи наблюдалось раскрытие цикла и внутримолекулярная циклизация по Михаэлю продуктов раскрытия с образованием разнообразных конденсированных производных по С-14–С-15. Неэффективным оказалось и раскрытие изоксазольного цикла стероида **10** под действием гексакарбонила молибдена: реакция протекала сложно, давая после гидролиза смесь продуктов. Таким образом, возникла необходимость выведения двойной связи стероидов **10** и **11** из сопряжения для осуществления намеченной цели. Известно, что боргидрид натрия способен восстановить сопряженные системы с образо-

ванием насыщенных спиртов [9, 10]. Этот процесс наблюдался и в случае восстановления стероида **10**, приводя преимущественно к 17α-эпимеру (соотношение 17α-эпимеров–17β-эпимеров составило 1.5:1 по данным интегрирования в спектре ЯМР). В условиях восстановления происходил и гидролиз защитной группы при C^3, поэтому образовавшаяся смесь продуктов была проацетилирована в триацетаты **19a**, **b**, которые удалось частично разделить и доказать конфигурацию центра С-17 эпимеров (установлена методом NOESY: у 17α-производного наблюдался кросс-пик между протонами при С-17 и С-14', сигнал 17β-Н в спектре ЯМР ^{1}Н 17α-эпимера **19a** представляет форму дублета дублетов с КССВ 7.5 и 9.0 Гц, сигнал 17α-Н в спектре ЯМР ^{1}Н 17β-эпимера **19b** обнаруживается в виде дублета дублетов с КССВ 2.5 и 8.0 Гц). Гидрирование триацетата **19a** над никелем Ренея привело к несколько неожиданному результату: наряду с раскрытием изоксазольного цикла наблюдался гидрогенолиз ацетоксиметильной группы, находящейся при С-5 изоксазолинового цикла – продуктом реакции оказался енаминокетон **24**, структура которого была доказана методами корреляционной спектроскопии ЯМР. Примеры такого превращения для 5-ацетоксиметилизоксазолов не описаны, однако наблюдались в ряду 5-ациламинометилизоксазолов [11]. Когда изоксазол **19a** был подвергнут гидрированию в присутствии 5% палладия на угле была получена смесь енаминокетонов **24** и **25**. Попытка повторного гидрирования смеси не привела к удалению ацетильной группы в енаминокетоне **25**. Вероятно, гидрогенолиз является конкурентной реакцией, которая возможна при наличии гетероцикла, аналогично гидрогенолизу бензиловых эфиров [12]. Селективный гидролиз защитной группы при С-3 соединения **24** привел к формированию гидроксиацетата **26**.

Изоксазолины **12** и их 3-гидроксипроизводные **13**, в отличие от изоксазолов, устойчивы в условиях каталитического гидрирования над палладиевыми катализаторами и их восстановление приводило к стероидам **14** и **15** соответственно. Для соединения **14**, в результате повторного хроматографирования удалось выделить индивидуальные изомеры [4], но установить конфигурацию хирального центра С-5' методами двумерной спектроскопии ЯМР не удалось (табл 5, 6). Под действием TsOH из изоксазолинового цикла стероида **14** происходит элиминирование этанола [13–16] с образованием изоксазолов **20** и **21** с высоким суммарным выходом. Изоксазолы **20** и **21** исследовались в реакциях гидрирования (Ni/Ra, Pd/C), однако и здесь, в отсутствие Δ^{15}-связи, однозначные результаты не были получены. Судя по имеющимся данным, после раскрытия изоксазольного цикла, енаминокарбонильная система вступает в реакции с участием 17-карбонила по альдольному типу с образованием мостиковых структур. Во избежание этих осложнений, карбонильная группа при С-17 в стероиде **20** была восстановлена под действием трис-*трет*-бутоксиалюминий гидрида. Восстановление протекало неселективно, соотношение эпимеров по С-17 было близко к 1:1, поэтому, в дальнейшем, для синтеза спиртов использовали Δ^{15}-изоксазолины **12**, которые восстанавливали натрий боргидридом.

Сопряженное восстановление эпимеров **12** натрий боргидридом, как и в случае стероида **10**, приводит преимущественно к 17α-спиртам (1.5:1) и сопровождается гидролизом защитной группы при С-3. Смесь четырех диастереомеров (по С-17 и С-5') без разделения была ацетилирована в кислых условиях, где, наряду с ацетилированием, протекала и ароматизация гетероцикла. Из образовавшейся смеси двух эпимеров **22** был выделен 17α-эпимер **22a**. При анализе COSY спектров изоксазолов **20–22** была обнаружена одна характерная закономерность: протон при $C^{5'}$ изоксазольного цикла имел интенсивный кросс-пик с протонами при С-14^1, а взаимодействие с протоном при С-4' не наблюдалось. Отнесение сигналов ядер изоксазольного цикла основывалось на величине химических сдвигов и анализе спектров HMBC и NOESY стероидов **20–22**. Енаминоальдегид **23** был получен в результате гидрирования изоксазола **22a** над никелем Ренея.

Стероиды **11**, **13**, **15** и **21** были протестированы на их цитостатическую активность в отношении ряда линий злокачественных клеток человека. В исследование включены рак молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и T-47D, рак кишечника HCT 116, рак предстательной железы 22Rv1 и рак легкого A549. Цитостатическая активность соединений анализировалась в концентрациях от 6 до 50 мкМ. При низких концентрациях от 6 до 25 мкМ цитостатическое действие стероидов **11**, **13**, **15** и **21** было маловыраженным. В таблице 1 представлен

Таблица 1. Выживаемость опухолевых клеток, обработанных синтезированными соединениями (50 мкМ, 72 ч роста с соединением). Указана выживаемость в процентах относительно контрольных клеток ± стандартное отклонение.

Соединение	MCF-7	MDA-MB-231	T-47D	HCT 116	22Rv1	A549
11	105 ± 10	90 ± 9	75 ± 8	87 ± 7	88 ± 9	97 ± 10
13	82 ± 7	101 ± 11	64 ± 7	76 ± 8	95 ± 10	102 ± 10
15	97 ± 8	89 ± 9	57 ± 6	76 ± 8	76 ± 8	97 ± 10
21	95 ± 9	82 ± 9	49 ± 5	74 ± 8	89 ± 9	83 ± 9

процент выживаемости клеток, обработанных соединениями в концентрации 50 мкМ. Среди исследованных стероидов соединение **13** было более активно в отношении клеток гормонозависимого рака молочной железы MCF-7. Рост клеток трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 ингибировало на 18% соединение **21**, другие стероиды были менее активны. Стероиды **13**, **15**, **21** демонстрировали схожую активность на клетках HCT 116, вызывая приблизительно 25%-ное торможение роста этой линии. Как видно из представленных данных, стероиды **11**, **13**, **15** не показали активности на клетках рака легкого, а **21** вызывало торможение роста этой опухоли. Стероид **15** был активен в клетках рака предстательной железы. Наиболее интересной и специфической активностью исследованные соединения обладают в клетках гормонозависимого рака молочной железы T-47D. Выживаемость этой клеточной линии составила от 49 до 75%. Наиболее активным оказался стероид **21**, ингибирующий рост клеток T-47D на 51%. Соединения **13** и **15** также проявили достаточно высокую активность (табл. 1), стероид **11** был менее активен.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления определены на автоматическом аппарате для определения температуры плавления WRS-2 Bestscope и не корректировались. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C получены на спектрометре AVANCE 500 (Bruker-Biospin) с рабочей частотой 500.03 и 125.73 МГц для ядер ^{1}H и ^{13}C, соответственно, с использованием 5-мм широкополосного датчика (BBO) с Z-градиентом. Спектры регистрировались при температуре образца 293 К для растворов в $CDCl_3$ или CD_3OD, в качестве внутреннего стандарта использовался остаточный сигнал растворителя δ 7.26 (^{1}H, $CDCl_3$), 3.31 (^{1}H, CD_3OD), 77.16 (^{13}C, $CDCl_3$), 49.00 (^{13}C, CD_3OD) м.д. Корреляционные спектры (HSQC, COSY, TOCSY, HMBC, NOESY) зарегистрированы и обработаны с использованием стандартного программного обеспечения фирмы Bruker-Biospin, ИК спектры получены на ИК-Фурье спектрометре Perkin Elmer Spectrum 100 в пленке или таблетках KBr. Масс-спектры регистрировались на комплексе ВЭЖХ Accela с масс-детектором LCQ-Fleet в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) или электроспрея (ESI), детектирование положительных ионов. Отношения *m/z* и относительные интенсивности (%) приведены для наиболее интенсивных пиков. Масс-спектры высокого разрешения регистрировались на масс-спектрометре 6550 iFunnel Q-TOF (Agilent Technologies) в режиме ESI. Подготовка растворителей осуществлялась по общепринятой практике [17], все реакции проводили в атмосфере аргона. Протекание реакций контролировали методом ТСХ на пластинках Merck (Kieselgel 60 F_{254}). Хроматографическое разделение реакционных смесей осуществляли на силикагеле 40/60 (Kieselgel 60, Merck).

3-Бензоилокси-2'-оксопирролидино-[4',5':14β,15β]-эстра-1,3,5(10)-триен-17-он 7. К раствору 0.272 г (0.56 ммоль) нитросоединения **6** в 45 мл изопропанола добавили 0.470 г (5.6 ммоль) $NaHCO_3$ и 2.5 мл воды. Смесь дегазировали и кипятили 24 ч, после чего охладили и нейтрализовали насыщенным раствором NH_4Cl. Органическую фазу экстрагировали хлороформом, экстракт высушили над Na_2SO_4. Остаток после упаривания очищали на колонке с силикагелем (EtOAc). Получили 0.216 г (90%) соединения **7**. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м.д. ($CDCl_3$): 1.13 с (1H, C^{18}-H_3), 2.13 д (1H, *J* 17.5 Гц, H^{14i}), 2.18 д.д (1H, *J* 19.5, 3.5 Гц, H^{16}), 2.26 д (1H, *J* 17.5 Гц, H^{14i}), 2.43 м (1H, $H^{11\alpha}$), 2.75 тд (1H, *J* 11.0, 2.0 Гц, $H^{9\alpha}$), 2.91 м (2H, H^6), 3.18 д.д (1H, *J* 19.5, 9 Гц, H^{16}), 4.24 д.д (*J* 9.0, 3.5 Гц, $H^{15\alpha}$), 6.89 уш.с (1H, NH),

Таблица 2. Параметры спектров ЯМР ^{13}C и ^{1}H соединений **9**, **17**, **18**.

№ атома	**9** (CD_3OD)		**17**[a] ($CDCl_3$)		**18**[b] (CD_3OD)	
	^{13}C	^{1}H	^{13}C	^{1}H	^{13}C	^{1}H
1	128.15	7.14	127.26	7.19	128.06	7.11
2	114.27	6.59	115.33	6.80	114.24	6.59
3	156.12	–	155.13	–	156.18	–
4	115.75	6.50	117.24	6.71	115.79	6.51
5	138.20	–	137.86	–	138.30	–
6	31.74	2.83	31.11	2.84	31.84	2.84
7	25.97	1.42(α), 1.85(β)	24.06	1.41(α), 1.92(β)	26.31	1.37(α), 1.90(β)
8	45.03	1.45(β)	44.84/44.95	1.45(β)	45.08	1.40(β)
9	41.40	2.43(α)	38.50	2.48(α)	41.22	2.34(α)
10	131.56	–	132.72	–	131.54	–
11	27.45	2.34(α), 1.27(β)	26.88/26.97	2.25(α), 1.40(β)	27.49	2.24(α), 1.32(β)
12	31.43	1.43(α), 1.66(β)	36.05/36.09	1.32(α), 1.54(β)	37.88	1.30(α), 1.55(β)
13	48.08	–	47.42	–	50.13	–
14	60.70	–	56.00	–	61.65	–
15	59.93	4.20(α)	58.08	3.95(α)	63.45	4.20(α)
16	35.75	2.28, 2.08	40.21	1.82, 2.54	35.67	2.76, 1.85
17	78.23	4.14(β)	84.90/87.66	3.64/3.80 (α)	89.29	3.35(α)
18	19.66	1.12	16.96	1.07/1.14	17.47	1.17
14^1	32.66	1.93, 2.20	40.44/40.62	1.86, 3.41	32.60	1.80, 2.78
14^2	45.30	3.35, 3.49	170.99/171.16	–	44.97	3.45, 3.59

[a] Сигналы *EE*-групп: **^{13}C** – 15.36 ($CH_2\underline{CH_3}$-3), 15.48/15.57 ($CH_2\underline{CH_3}$-17), 19.98/20.38 (CH_3-17), 20.52 (CH_3-3), 58.98/59.49 ($\underline{CH_2}CH_3$-17), 61.61 ($\underline{CH_2}CH_3$-3), 97.29/100.91 (CH-17), 99.73 (CH-3); **^{1}H** – 1.17-1.19 ($CH_2\underline{CH_3}$-3 и $CH_2\underline{CH_3}$-17), 1.28/1.30 (CH_3-17), 1.47 (CH_3-3), 3.45/3.59/3.50/3.57 ($\underline{CH_2}CH_3$-17), 3.53/3.77 ($\underline{CH_2}CH_3$-3), 4.66/4.70 (CH-17), 5.33 (CH-3).

[b] Сигналы этоксигруппы: **^{13}C** – 15.69 ($CH_2\underline{CH_3}$), 66.31 ($\underline{CH_2}CH_3$); **^{1}H** – 1.20 ($CH_2\underline{CH_3}$), 3.35 и 3.60 ($\underline{CH_2}CH_3$).

6.95 д (1H, *J* 2.5 Гц, H^4), 7.01 д.д (1H, *J* 8.5, 2.5 Гц, H^2), 7.35 д (1H, *J* 8.5 Гц, H^1), 7.5 т (2H, *J* 7.5 Гц, $H^м$), 7.63 т (1H, *J* 7.5 Гц, H^n), 8.18 д (2H, *J* 7.5 Гц, H^o). Спектр ЯМР ^{13}C, δ, м.д.: 15.6 (C^{18}), 23.8 (C^7), 26.6 (C^{11}), 30.8 (C^6), 33.2 (C^{12}), 38.7 (C^9), 40.6 (C^{14i}), 43.3 (C^{16}), 43.4 (C^8), 51.4 (C^{15}), 53.5 и 53.7 (C^{13} и C^{14}), 119.5 (C^2), 121.9 (C^4), 127.4 (C^1), 128.7 ($C^м$), 129.6 (C^u), 130.3 (C^o), 133.8 (C^n), 136.1 и 137.7 (C^5 и C^{10}), 149.2 (C^3), 165.6 (CO-Ph), 177.4 (C^{14ii}), 216.8 (C^{17}). Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 430.1 (100) $[M+H]^+$. Найдено, %: C 76.02; H 6.41; N 3.11; *M* 429.5. $C_{27}H_{27}NO_4$. Вычислено, %: C 75.50; H 6.34; N 3.26.

3,17α-Дигидроксипирролидино-[2',3':14β,15β]-эстра-1,3,5(10)-триена гидрохлорид 9. К 0.12 г (0.3 ммоль) эфира **8** (был получен из лактама **7** по описанному методу [5]) при –70°C добавили 3.75 мл (4.5 ммоль) 1.2 M раствора DIBAH в толуоле, образовавшийся раствор перемешивали 10 мин, затем охлаждающую баню убрали и оставили реакционную смесь нагреваться при перемешивании до комнатной температуры в течение 1 ч. После восстановления 17-карбонильной группы (ВЭЖХ-МС), раствор кипятили 6 часов, охладили до комнатной температуры и медленно вылили в 20 мл охлажденной воды. Образовавшуюся суспензию интенсивно перемешивали 30 мин,

Таблица 3. Параметры спектров ЯМР ^{13}C соединений **10**, **11**, **13**, **14**, **15**, **20** в $CDCl_3$.

№ атома	**10**[a]	**11**	**13**[b]	**14**[c] верхний	**14**[c] нижний	**15**[d]	**20**[e]
1	128.60	128.46	128.57	126.61	126.66	127.38/127.41	126.58
2	119.60	113.56	113.70/113.74	119.10	119.07	113.91	119.11
3	148.58	153.18	153.44	149.16	149.13	156.18	149.15
4	121.18	114.40	114.52	121.61	121.65	115.79	121.61
5	137.27	137.08	137.13/137.23	138.33	138.43	138.81/138.83	138.34
6	30.50	30.37	30.54/30.66	30.32	30.27	31.31/31.38	30.22
7	24.81	24.81	25.11	24.36	24.28	25.50/25.61	24.16
8	41.84	42.06	42.13/42.29	42.21	41.75	43.76/44.06	42.32
9	33.53	33.14	33.04/33.10	38.82	38.69	39.44/39.54	38.81
10	138.72	133.01	133.03	137.85	137.85	132.43	137.91
11	27.65	27.61	27.78	25.24	25.40	26.42/26.55	25.15
12	28.24	28.25	28.04/28.13	33.01	32.88	34.33	33.25
13/14	52.51	52.38	52.39	49.35	49.25	50.27/50.36	48.83
13/14	54.65	54.54	54.96, 54.92	53.11	53.25	54.22/54.29	53.02
15	164.64	164.52	164.88	24.23	24.94	25.06/25.48	24.20
16	132.32	132.05	132.03/132.07	33.42	33.44	34.15/34.22	33.53
17	213.61	213.56	213.84	221.46	221.44	224.42/224.55	221.36
18	23.27	23.00	23.06/23.18	15.85	16.30	16.31/16.58	15.90
14^1	29.76	29.74	31.37/31.43	34.53	34.80	35.14/34.83	33.07
14^2	160.66	160.58	156.80/156.87	156.99	156.92	159.22/159.32	160.01
14^3	103.35	103.24	46.30	46.60	46.29	46.85/47.25	106.28
14^4	171.63	171.29	101.77	101.74	101.89	103.01/103.35	158.38
14^5	56.75	56.61	–	–	–	–	–

[a] Сигналы бензоилоксигруппы: 128.67 (Ph-3), 129.72 (Ph-1), 130.27 (Ph-2), 133.68 (Ph-4), 165.58 (PhCO).
[b] Сигналы этоксигруппы: 15.14 (CH_3), 63.75 (CH_2).
[c] Верхний изомер – сигналы этоксигруппы: 15.14 (CH_3), 63.55 (CH_2); сигналы бензоилоксигруппы: 128.70 (Ph-3), 130.31 (Ph-2), 129.84 (Ph-1), 133.67 (Ph-4), 165.55 (PhCO). Нижний изомер – сигналы этоксигруппы: 15.18 (CH_3), 63.67 (CH_2); сигналы бензоилоксигруппы: 128.69 (Ph-3), 129.85 (Ph-1), 130.31 (Ph-2), 133.66 (Ph-4), 165.55 (PhCO).
[d] Растворитель CD_3OD; сигналы этоксигруппы: 15.41/15.44 (CH_3), 64.29/64.39 (CH_2).
[e] Сигналы бензоилоксигруппы: 128.69 (Ph-3), 129.79 (Ph-1), 130.29 (Ph-2), 133.69 (Ph-4), 165.56 (PhCO).

после чего воду отделили центрифугированием (15 мин, 5000 об/мин). Осадок трижды сонифицировали с 10 мл этанола, отделяя этанол центрифугированием. Водную и этанольную фракции объединили, упарили, осадок растворили в метаноле, профильтровали, фильтрат упарили, осадок промыли хлористым метиленом и высушили. Получили 0.079 г смеси эпимеров, которую растворили в смеси 5 мл метанола и 1 мл 2М соляной кислоты и раствор перемешивали 5 ч, после чего растворитель упарили. Остаток растворили в 3 мл ДМФА и стероид осадили 6 мл эфира. Получили 0.04 г (38%) стероида **9** в виде аморфного порошка. ИК спектр (KBr), ν, см$^{-1}$: 3335, 2945, 2860, 1620, 1585. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C см. табл. 2. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %):

Таблица 4. Параметры спектров ЯМР ^{13}C соединений **19**, **21–24**, **26** в $CDCl_3$.

№ атома	**21**	**19a**[a]	**19b**[b]	**22a**[c]	**23**[d]	**24**[e]	**26**[f]
1	126.60	126.66	126.72	126.62	126.53	126.42	126.58
2	113.08	118.79	118.79	118.76	113.08	118.86	113.06
3	153.97	148.65	148.65	148.62	154.10	148.77	154.01
4	115.17	121.39	121.46	121.35	115.12	121.42	115.10
5	138.17	138.30	138.30	138.39	137.93	138.24	137.99
6	30.25	30.20	30.25	30.21	30.43	30.40	30.53
7	24.26	24.59	25.10	24.60	26.25	26.00	26.26
8	42.66	42.00	41.35	42.10	43.59	43.25	43.70
9	38.46	38.62	38.25	38.63	39.21	39.53	39.33
10	132.24	138.40	138.40	138.45	132.80	138.59	132.98
11	25.19	25.45	26.01	25.43	24.91	24.75	24.91
12	33.27	30.96	36.44	30.96	30.64	30.64	30.66
13/14	48.79	46.11	48.65	46.11	46.74	46.67	46.72
13/14	53.04	50.26	50.88	50.28	51.75	51.46	51.49
15	24.09	27.98	30.82	27.84	26.13	26.13	26.14
16	33.59	26.57	29.56	26.57	26.74	26.80	26.82
17	222.08	82.76	83.38	82.80	82.89	82.88	82.96
18	15.85	19.45	16.52	19.38	19.49	19.39	19.50
14^1	32.92	33.24	32.85	33.01	43.62	43.69	43.79
14^2	160.06	162.67	163.08	161.40	166.67	164.22	164.55
14^3	106.30	105.70	105.84	106.01	99.09	98.24	98.28
14^4	158.43	166.31	165.98	158.07	187.20	196.54	196.64
14^5	-	56.48	56.51	-	-	29.64	29.56

[a] Сигналы ацетоксигрупп: 20.79 (14^5-CH_3), 21.25 (3-CH_3 и 17-CH_3), 170.39 (14^5-CO), 169.99 (3-CO), 171.16 (17-CO).
[b] Сигналы ацетоксигрупп: 20.79 (14^5-CH_3), 21.55 (17-CH_3), 21.25 (3-CH_3), 170.39 (14^5-CO), 169.99 (3-CO), 170.66 (17-CO).
[c] Сигналы ацетоксигрупп: 21.24 (3-CH_3 и 17-CH_3), 169.97 (3-CO), 171.20 (17-CO).
[d] Сигналы ацетоксигруппы: 21.27 (17-CH_3), 171.38 (17-CO).
[e] Сигналы ацетоксигрупп: 21.27 (3-CH_3 и 17-CH_3), 170.01 (3-CO), 171.30 (17-CO).
[f] Сигналы ацетоксигруппы: 21.29 (17-CH_3), 171.33 (17-CO).

314.0 (100) $[M+H]^+$. ВРМС: $M_{найд.}$ 314.2114. $C_{20}H_{28}NO_2^+$. $M_{выч.}$ 314.2115.

3,17β-бис(1-этоксиэтокси)-2'-оксопирролидино-[4',5':14β,15β]-эстра-1,3,5(10)-триен 17. К смеси 0.1 г (0.25 ммоль) стероида **16** (получен из лактама **8** [5]), 0.02 г (0.08 ммоль) пиридиний тозилата и молекулярных сит 4А в 2 мл ТГФ добавили 2 мл винилэтилового эфира и затем перемешивали 48 ч. После окончания реакции смесь разбавили хлористым метиленом, промыли раствором $NaHCO_3$, высушили над Na_2SO_4 и упарили. Остаток (0.147 г) очистили методом препаративной ТСХ (этилацетат–гексан, 5:1). Получили 0.070 г (59%) соединения **17** (масло). Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C см. табл. 2. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 494.8 (40) $[M+Na]^+$, 472.7 (20) $[M+H]^+$, 400.7 (100) [*M*+H–винилэтиловый эфир]$^+$, 382.8 (45) [*M*+H-винилэтиловый эфир–H_2O]$^+$, 310.5 (65) [*M*+H–2(винилэтиловый эфир)–H_2O]$^+$.

Таблица 5. Параметры спектров ЯМР ^{1}H соединений **10**, **11**, **13**, **14**, **15**, **20** в $CDCl_3$.

№ атома	**10**[a]	**13**[b]	**14**[c] **верхний**	**14**[c] **нижний**	**15**[d]	**20**[e]
1	7.15	6.91	7.34	7.33	7.14	7.34
2	6.93	6.59	7.00	7.00	6.60	7.01
4	6.85	6.48	6.96	6.95	6.54	6.96
6	2.79	2.69	2.93	2.92	2.83	2.92
7α	1.34	1.26	1.58	1.57	1.52	1.57
7β	2.24	2.12	2.10	2.09	2.10	2.14
8	1.97	2.09	1.75	1.83	1.60/1.68	1.70
9	2.35	2.24	2.74	2.75	2.67	2.74
11α	2.32	2.25	2.38	2.37	2.36	2.38
11β	1.36	1.33	1.47	1.46	1.35	1.45
12α[f]	1.92	1.92	1.69	1.68	1.74	1.67
12β[f]	1.61	1.78	1.45	1.44	1.33	1.44
15α	7.42	7.38	2.26	2.27	2.34/2.34	2.26
15β	–	–	1.98	1.92	1.85/1.89	1.99
16α	6.31	6.28	2.51	2.53	2.50	2.44
16β	–	–	2.31	2.31	2.33	1.89
17α/β	–	–	–	–	–	–
18	1.21	1.09/1.10	1.14	1.12	1.15/1.18	1.20
14^1	3.08, 3.19	2.71/2.73, 2.88/2.90	2.38, 2.59	2.40, 2.55	2.44/2.47, 2.61/2.66	2.68, 2.98
14^3	6.16	2.81 3.09	2.71, 3.05	2.77, 3.01	2.82, 3.16/3.19	6.21
14^4	–	5.49	5.44	5.45	5.51	8.33
14^5	4.77	–	–	–	–	–

[a] Сигналы бензоилоксигруппы: 7.49 (*м*-Ph), 7.62 (*п*-Ph), 8.17 (*о*-Ph).
[b] Сигналы этоксигруппы: 1.18 (CH_3), 3.55 и 3.85 (CH_2).
[c] Верхний изомер – сигналы этоксигруппы: 1.19 (CH_3), 3.52 и 3.84 (CH_2); сигналы бензоилоксигруппы: 7.51 (*м*-Ph), 7.63 (*п*-Ph), 8.20 (*о*-Ph). Нижний изомер – сигналы этоксигруппы: 1.20 (CH_3), 3.54 и 3.84 (CH_2); сигналы бензоилоксигруппы: 7.51 (*м*-Ph), 7.63 *п*-Ph), 8.20 (*о*-Ph).
[d] Растворитель CD_3OD; сигналы этоксигруппы: 1.20 (CH_3), 3.57 и 3.81(CH_2).
[e] Сигналы бензоилоксигруппы: 7.51 (*м*-Ph), 7.64 (*п*-Ph), 8.20 (*о*-Ph).
[f] В ссылке [4] для Δ^{15}-производных конфигурация протонов при С-12 указана неверно.

3-Гидрокси-17β-этоксипирролидино-[2',3':14β,15β]-эстра-1,3,5(10)-триена гидрохлорид 18. К 0.07 г (0.15 ммоль) эфира **17** добавили 1.5 мл (1.8 ммоль) 1.2 М раствора DIBAH в толуоле, образовавшийся раствор кипятили 4 ч, охладили до комнатной температуры и медленно вылили в 10 мл охлажденной воды. Образовавшуюся суспензию интенсивно перемешивали 30 мин, после чего воду отделили центрифугированием (15 мин, 5000 об/мин). Осадок трижды сонифицировали с 10 мл метанола, отделяя метанол центрифугированием. Водную и метанольную фракции объединили, упарили, осадок растворили в метаноле, профильтровали, фильтрат упарили, осадок промыли хлористым метиленом и высушили. Остаток после высушивания (0.055 г) растворили в смеси 1 мл метанола и 0.2 мл 5М соляной кислоты, раствор перемешивали 1 ч, после чего добавили 10 мл эфира. Выпавшее масло отделили,

Таблица 6. Параметры спектров ЯМР ^{1}H **19**, **21–24**, **26** соединений в $CDCl_3$.

№ атома	**21**	**19a**[a]	**19b**[b]	**22a**[c]	**23**[d]	**24**[e]	**26**[f]
1	7.15	7.31	7.30	7.30	7.15	7.28	7.16
2	6.67	6.86	6.84	6.85	6.66	6.86	6.66
4	6.60	6.80	6.79	6.80	6.57	6.80	6.57
6	2.83	2.85	2.85	2.87	2.77	2.83	2.78
7α	1.51	1.38	1.37	1.39	1.38	1.40	1.36
7β	2.09	2.09	2.10	2.09	2.03	2.09	2.04
8	1.61	1.68	1.77	1.68	1.51	1.54	1.51
9	2.66	2.62	2.60	2.62	2.55	2.60	2.54
11α	2.31	2.30	2.27	2.28	2.27	2.29	2.26
11β	1.40	1.34	1.41	1.34	1.32	1.37	1.32
12α	1.62	1.64	1.51	1.61	1.62	1.64	1.63
12β	1.40	1.64	1.51	1.61	1.62	1.64	1.63
15α	2.22	2.16	2.04	2.14	2.09	2.09	2.08
15β	1.95	1.55	1.68	1.57	1.73	1.76	1.75
16α	2.42	1.61	2.48	1.59	1.66	1.65	1.66
16β	1.83	2.25	1.79	2.23	2.34	2.34	2.35
17α/β	-	4.99	4.90	4.98	5.11	5.14	5.12
18	1.20	1.03	0.95	1.03	1.06	1.05	1.06
14^1	2.65, 2.98	2.75, 2.92	2.95, 3.16	2.78, 2.96	2.09, 2.30	2.06, 2.26	2.04, 2.25
14^3	6.21	6.21	6.16	6.26	5.09	5.12	5.11
14^4	8.32	-	-	8.33	9.05	-	-
14^5	-	5.15	5.15	-	-	2.06	2.06

[a] Сигналы ацетоксигрупп: 2.05 (17-CH_3), 2.13 (14^5-CH_3), 2.29 (3-CH_3).
[b] Сигналы ацетоксигрупп: 2.12 (17-CH_3 и 14^5-CH_3), 2.29 (3-CH_3).
[c] Сигналы ацетоксигрупп: 2.04 (17-CH_3), 2.28 (3-CH_3).
[d] Сигналы ацетокси- и аминогрупп: 2.06 (17-CH_3), 5.38 и 10.11 (NH_2).
[e] Сигналы ацетокси- и аминогрупп: 2.07 (17-CH_3), 2.28 (3-CH_3), 5.06 и 10.00 (NH_2).
[f] Сигналы ацетокси- и аминогрупп: 2.06 (17-CH_3), 5.01 и 10.02 (NH_2).

промыли эфиром до pH 7 и высушили. Получили 0.036 г (64%) стероида **18**. Т. пл. 284–287°C (эфир). Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 2. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 342.5 (100) $[M+H]^+$. ВРМС: $M_{найд.}$ 342.2424. $C_{22}H_{32}NO_2^+$. $M_{выч.}$ 342.2428.

Присоединение пропаргилового спирта к нитроаддукту 6. *а*. К раствору 0.100 г (0.21 ммоль) нитросоединения **6** в 15.2 мл изопропанола добавили 0.172 г (2.05 ммоль) $NaHCO_3$, 0.35 мл пропаргилового спирта и 0.8 мл (5%) воды. Смесь дегазировали и кипятили 6 ч. Затем реакционную смесь охладили, разбавили 10 мл $CHCl_3$ и отфильтровали гидрокарбонат натрия. Фильтрат упарили и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (толуол–этилацетат, 5:1). Получили в порядке элюирования 0.026 г (26%) исходного нитросоединения **6**, 0.044 г (43%) соединения **10** и 0.022 г (28%) соединения **11**. Конверсия – 98%.

б. К раствору 0.180 г (0.37 ммоль) нитросоединения **6** в 50 мл изопропанола добавили 0.31 г (3.69 ммоль) $NaHCO_3$, 0.48 мл пропаргилового

спирта и 0.67 мл воды (39.12 ммоль, 1%). Смесь дегазировали, заполнили аргоном и кипятили 18 ч. Затем реакционную смесь охладили, упарили, добавили насыщенный раствор NH_4Cl и органическую фазу экстрагировали $CHCl_3$. Экстракт высушили над Na_2SO_4, растворитель упарили и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (толуол–этилацетат, 5:1). Получили в порядке элюирования 0.067 г (37%) нитросоединения **6**, 0.09 г (50%) **3-бензоилокси-14β-[(5'-гидроксиметил)-изоксазол-3'-илметил]-эстра-1,3,5(10),15-тетраен-17-она 10.** ИК спектр (пленка), ν, см$^{-1}$: 3350, 2935, 2870, 1730, 1700, 1610, 755. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 3, 5. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 484.1 (100) $[M+H]^+$, 466.2 (59) $[M+H–H_2O]^+$. Найдено, %: C 74.71; H 5.96; N 2.77; M 483.6. $C_{30}H_{29}NO_5$. Вычислено, %: C 74.52; H 6.05; N 2.90; и 0.013 г (9%) **3-гидрокси-14β-[(5'-гидроксиметил)-изоксазол-3'-илметил]-эстра-1,3,5(10),15-тетраен-17-она 11**. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м.д. ($CDCl_3$): 1.24 с (3H, C^{18}-H_3), 3.12 д (1H, *J* 15.5 Гц, H^{14i}), 3.21 д (1H, *J* 15.5 Гц, H^{14i}), 4.81 с (2H, H^{14v}), 6.20 с (1H, H^{14iii}), 6.33 д (1H, *J* 6 Гц, H^{16}), 6.53 д (1H, *J* 2.5, H^4), 6.64 д.д (1H, *J* 8.5, 2.5 Гц, H^2), 7.01 д (1H, *J* 8.5 Гц, H^1), 7.45 д (1H, *J* 6 Гц, H^{15}). Спектр ЯМР ^{13}C см. табл. 3. Масс-спектр (APCI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 380.2 (95) $[M+H]^+$, 362.3 (100) $[M+H–H_2O]^+$. Конверсия 95%.

3-Бензоилокси-14β-(5'-этоксиизоксазолин-3'-илметил)эстра-1,3,5(10),15-тетраен-17-он 12. К раствору 1.00 г (2.05 ммоль) нитросоединения **6** в 152 мл изопропанола добавили 1.725 г (20.53 ммоль) $NaHCO_3$, 3.94 мл винилэтилового эфира и 8 мл воды. Смесь дегазировали, заполнили аргоном и кипятили 12 ч, затем реакционную смесь охладили, разбавили 60 мл $CHCl_3$ и отфильтровали гидрокарбонат натрия. Фильтрат упарили и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (толуол–этилацетат, 3:1). Получили 0.935 г (91%) смеси изоксазолинов **12**. Т. пл. 121–122°C (EtOH). ИК спектр (пленка), ν, см$^{-1}$ 2840, 1720, 1695, 1425, 1295, 935. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м.д. ($CDCl_3$): 1.11 и 1.12 два с (3H, C^{18}-H_3), 1.17 два т (3H, *J* 7, $C\underline{H}_3CH_2O$), 2.30 м (1H, $H^{9\alpha}$), 2.73 д (1H, *J* 16 Гц, H^{14i}), 2.80 м (3H, H^6 и H^{14iii}), 2.91 два д (1H, *J* 16 Гц, H^{14i}), 3.08 два д (1H, *J* 6.5, 1.5 Гц, H^{14iii}), 3.55 м (1H, $CH_3C\underline{H}_2O$), 3.85 м (1H, $CH_3C\underline{H}_2O$), 5.48 два м (1H, H^{14iv}), 6.30 д (1H, *J* 6 Гц, H^{16}), 6.86 д (1H, *J* 2 Гц, H^4), 6.94 д.д (1H, *J* 2.5, 8.5 Гц, H^2), 7.15 д (1H, *J* 8.5 Гц, H^1), 7.39 два д (1H, *J* 6 Гц, H^{15}), 7.49 уш.т (2H, *J* 8 Гц, $H^м$), 7.62 м (1H, H^n), 8.17 м (2H, H^o). Спектр ЯМР ^{13}C, δ, м.д.: 15.2 ($\underline{C}H_3CH_2O$), 23.1 и 23.2 (C^{18}), 25.0 (C^7), 27.7 (C^{11}), 28.0 и 28.1 (C^{12}), 30.6 и 30.7 (C^6), 31.3 и 31.4 (C^{14i}), 33.4 и 33.5 (C^9), 41.8 и 42.0 (C^8), 46.3 (C-14^3), 52.3 (C^{13}), 54.87 и 54.93 (C^{14}), 63.69 и 63.71 ($CH_3\underline{C}H_2O$), 101.8 (C^{14iv}), 119.57 и 119.59 (C^2), 121.1 (C^4), 128.6 (C^1), 128.7 ($C^м$), 129.8 (C^u), 130.3 (C^o), 132.2 и 132.3 (C^{16}), 133.6 (C^n), 137.2 и 137.3 (C^{10}), 138.8 и 138.8 (C^5), 148.5 (C^3), 156.6 и 156.7 (C^{14ii}), 164.6 (C^{15}), 165.5 (COPh), 213.4 (C^{17}). Масс-спектр (APCI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 500.1 (100) $[M+H]^+$. ВРМС: $M_{найд.}$ 500.2435. $C_{31}H_{34}NO_5^+$. $M_{выч.}$ 500.2431.

3-Гидрокси-14β-(5'-этоксиизоксазолин-3'-илметил)эстра-1,3,5(10),15-тетраен-17-он 13. К раствору 0.083 г (0.17 ммоль) стероида **12** в 2 мл этанола и 0.2 мл воды добавили 0.011 г (0.2 ммоль) KOH. Полученную смесь перемешивали 1 ч и нейтрализовали 10% уксусной кислотой, затем растворители упарили до минимального объема без нагревания. К остатку добавили раствор NaCl, органическую фазу экстрагировали хлороформом и высушили над Na_2SO_4. После удаления растворителя остаток очищали на колонке с силикагелем (толуол–этилацетат, 5:1). Получили 0.054 г (80%) стероида **13**. ИК спектр (KBr), ν, см$^{-1}$: 3365, 2930, 1705, 1695, 1610, 1090, 760. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 3, 5. Масс-спектр (APCI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 396.0 (100) $[M+H]^+$, 350.2 (11) $[M+H–EtOH]$. ВРМС: $M_{найд.}$ 396.2174. $C_{24}H_{30}NO_4^+$. $M_{выч.}$ 396.2169.

3-Бензоилокси-14β-(5'-этоксиизоксазолин-3'-илметил)эстра-1,3,5(10)-триен-17-он 14. К раствору 1.30 г (2.61 ммоль) соединения **12** в 80 мл этанола добавили 0.60 г (9.37 ммоль) HCO_2NH_4 и 0.2 г 5% палладия на угле. Смесь дегазировали, заполнили аргоном и перемешивали 3 ч при 40–50°C, затем охладили, отфильтровали катализатор и фильтрат упарили. Остаток очищали на колонке с силикагелем (толуол–этилацетат, 3:1). Получили 1.161 г (89%) смеси изоксазолинов **14**. Изомеры были разделены для аналитических целей методом препаративной ТСХ. IR (пленка) ν, см$^{-1}$: 2930, 2865, 1734, 1265, 1065, 710. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 3, 5. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 524.2 (31) $[M+Na]^+$, 502.2 (100) $[M+H]^+$.

3-Гидрокси-14β-(5'-этоксиизоксазолин-3'-илметил)эстра-1,3,5(10)-триен-17-он 15. По вышеприведенной методике для соединения **14** из 0.112 г (0.28 ммоль) смеси изоксазолинов **13** получили 0.070 г (63%) смеси изоксазолинов **15** в

виде масла. ИК спектр (пленка), ν, см$^{-1}$: 3385, 2930, 2865, 1730, 1090, 755. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 3, 5. Масс-спектр (APCI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 398.1 (100) [*M*+H]$^+$. Найдено, %: C 72.76; H 7.83; N 3.41; *M* 397. $C_{24}H_{31}NO_4$. Вычислено, %: C 72.52; H 7.86; N 3.52.

3-Бензоилокси-14β-(изоксазол-3'-илметил)-эстра-1,3,5(10)-триен-17-он 20. К раствору 0.60 г (1.20 ммоль) стероида **14** в 10 мл MeCN добавили 0.057 г (0.33 ммоль) *n*-TsOH. Смесь дегазировали, заполнили аргоном и перемешивали 2,5 ч при 80°C. После кипячения смесь охладили, нейтрализовали насыщенным раствором $NaHCO_3$, органическую фазу экстрагировали этилацетатом и высушили над Na_2SO_4. После удаления растворителя остаток упарили и разделяли на колонке с силикагелем (толуол–этилацетат, 3:1). Получили в порядке элюирования 0.388 г (71%) изоксазола **20**. ИК спектр (пленка), ν, см$^{-1}$: 2930, 2865, 1735, 1495, 1265, 1065, 755. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 3, 5. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 456.0 (100) [*M*+H]$^+$, 438 (18) [*M*+H–H_2O]$^+$. ВРМС: $M_{найд.}$ 456.2169. $C_{29}H_{30}NO_4^+$. $M_{выч.}$ 456.2169; и 0.085 г (20%) изоксазола **21**.

3-Гидрокси-14β-(изоксазол-3'-илметил)эстра-1,3,5(10)-триен-17-он 21. К раствору 0.30 г (0.66 ммоль) соединения **20** в 10 мл 96% этанола добавили 0.277 г (3.3 ммоль) $NaHCO_3$. Смесь дегазировали, заполнили аргоном и перемешивали 3 ч при 60°C, затем охладили и растворитель упарили. Остаток разбавили водой и органическую фазу экстрагировали этилацетатом. Экстракт высушили над Na_2SO_4, упарили растворитель и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (толуол–этилацетат, 3:1). Получили 0.209 г (90%) изоксазола **21** в виде масла. ИК спектр (пленка), ν, см$^{-1}$: 3360, 2930, 2865, 1725, 760. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 4, 6. Масс-спектр (APCI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 352.2 (100) [*M*+H]$^+$, 334.5 (22) [*M*+H–H_2O]. ВРМС: $M_{найд.}$ 352.1903. $C_{22}H_{26}NO_3^+$. $M_{выч.}$ 352.1907.

14β-(5'-Ацетоксиметилизоксазол-3'-илметил)-3,17-диацетоксиэстра-1,3,5(10)-триен 19. К раствору 0.134 г (0.28 ммоль) соединения **10** в 10 мл ТГФ добавили 0.10 г (2.64 ммоль) $NaBH_4$ и 2 мл метанола. Раствор перемешивали при комнатной температуре 1 ч, затем к нему добавили 10 мл насыщенного раствора NH_4Cl после чего органическую фазу экстрагировали $CHCl_3$ и высушили над Na_2SO_4. После удаления растворителя остаток очищали на колонке с силикагелем и получили смесь триолов (0.095 г, 89%), изомерных по C^{17} в соотношении 17α–17β 1,5:1 (Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 384.2 (75) [*M*+H]$^+$, 366.1 (100) [*M*+H–H_2O]$^+$), Триолы (0.095 г, 0.25 ммоль) растворили в 12 мл этилацетата и добавили 0.153 мл (1.62 ммоль) уксусного ангидрида и 5 мкл 60% хлорной кислоты. Образовавшийся раствор перемешивали при комнатной температуре 0.5 ч, затем нейтрализовали 10 мл насыщенным раствором $NaHCO_3$ и органическую фазу проэкстрагировали этилацетатом. Экстракт высушили над Na_2SO_4, растворитель упарили и остаток очищали на колонке с силикагелем (толуол–этилацетат, 1:1). Получили 0.124 г (97%) смеси триацетатов **19**. ИК спектр (пленка), ν, см$^{-1}$: 2940, 2865, 1750, 1245, 1215, 1020, 755. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 532.2 (23) [*M*+Na]$^+$, 450.1 (100) [*M*+H–AcOH]$^+$. Эпимеры **19a** (17α-ацетат) и **19b** (17β-ацетат) были частично разделены методом препаративной ТСХ. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 4, 6.

3,17-Диацетокси-14β-(изоксазол-3'-илметил)-эстра-1,3,5(10)-триен 22. По вышеприведенной методике для стероида **19**, из 0.20 г (0.40 ммоль) смеси стероидов **12** получили 0.147 г (84% из стероидов **12**) смеси изоксазолов **22** в соотношении 17α–17β 1.3:1 (по данным интегрирования в спектре ЯМР). Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 460.2 (17) [*M*+Na]$^+$,438.0 (9) [*M*+H]$^+$, 378.2 (100) [*M*+H–AcOH]$^+$. 17α-Изомер **22a** был частично отделен методом препаративной ТСХ. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 4, 6. ВРМС: $M_{найд.}$ 378.2059. $C_{24}H_{28}NO_3^+$. $M_{выч.}$ 378.2064 [*M*+H–AcOH]$^+$.

14β-(2'-амино-4'-оксобут-2'-енил)-17α-ацетокси-3-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен 23. К раствору 0.020 г (46 мкмоль) соединения **22a** в 5 мл MeOH добавили 0.03 г суспезии никеля Ренея в метаноле. Смесь дегазировали, заполнили водородом и перемешивали 16 ч при комнатной температуре в атмосфере водорода. Катализатор отфильтровали, а фильтрат упарили. Остаток делили методом препаративной ТСХ (петролейный эфир–этилацетат, 5:3). Получили 0.009 г (50%) соединения **23**. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 4, 6. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 420.2 (9) [*M*+Na]$^+$, 398.2 (100) [*M*+H]$^+$. ВРМС: $M_{найд.}$ 398.2328. $C_{24}H_{32}NO_4^+$. $M_{выч.}$ 398.2326.

14β-(2'-амино-4'-оксопент-2'-енил)-3,17α-диацетоксиэстра-1,3,5(10)-триен 24. По вышеприведенной методике для соединения **23**, из 0.015 г

(29 мкмоль) стероида **19a** получили 0.009 г (69%) соединения **24**. ИК спектр (пленка), ν, см$^{-1}$: 3405, 3185, 2925, 2855, 1730, 1605, 1520, 1250, 755. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 4, 6. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 454.4 (100) $[M+H]^+$. ВРМС: $M_{найд.}$ 454.2581. $C_{27}H_{36}NO_5^+$. $M_{выч.}$ 454.2588.

14β-(2'-амино-4'-оксопент-2'-енил)-17α-ацетокси-3-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен 26. К раствору 0.006 г (13 мкмоль) соединения **24** в 5 мл MeOH добавили 1 мл насыщенного раствора $NaHCO_3$. Смесь перемешивали 8 ч при 40°C, затем реакционную смесь охладили и упарили. Остаток разделяли методом препаративной ТСХ (петролейный эфир–этилацетат, 1:1). Получили 0.002 г (37%) соединения **26**. ИК спектр (пленка), ν, см$^{-1}$: 3380, 3190, 2930, 2865, 1715, 1610, 1520, 1250, 755. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C см. табл. 4, 6. Масс-спектр (ESI), *m/z* ($I_{отн}$, %): 412.1 (100) $[M+H]^+$. ВРМС: $M_{найд.}$ 412.2477. $C_{25}H_{34}NO_4^+$. $M_{выч.}$ 412.2482.

Исследование цитотоксической активности. Клетки рака молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и T-47D, рака кишечника HCT 116, рака предстательной железы 22Rv1 и рака легкого A549 получены из коллекции ATCC.

Культивирование клеток проводили в стандартной среде DMEM (Hyclone) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят (Hyclone), 0.1 мг/мл пирувата натрия (Santa Cruz), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Для проведения экспериментов использовали клеточный инкубатор NU-5840E (NuAir) с поддержанием необходимых условий (37°C, атмосфера, содержащая 5% CO_2, при относительной влажности 85–90%).

Для проведения биологических испытаний стероиды **11**, **13**, **15** и **21** растворяли в ДМСО в концентрации 10 мМ и хранили при –20 С до проведения исследований. Опухолевые клетки рассевали на 24-луночное плато (Corning) по 40000 клеток в лунку и через 24 ч. вносили соединения в интервале концентраций от 6 до 50 мкМ. К контрольным клеткам добавляли соответствующий объем растворителя (ДМСО), при этом его конечная концентрация в среде не превышала 0.5%.

Через 72 часа роста с соединениями среду удаляли и вносили к клеткам МТТ реагент (AppliChem) на 2 ч. Тест выполнен в модификации, описанной ранее [18]. После окончания инкубации клетки лизировали в 100% ДМСО (AppliChem); встряхивали плато для растворения образовавшихся кристаллов формазана и оптическую плотность (ОП) полученных растворов анализировали на спектрофотометре MultiScan FC (ThermoFisher) при 571 нм. Далее из значений ОП вычитали ОП в лунках, не содержащих клеток; за 100% принимали ОП растворов, полученных в контрольных образцах. Эксперимент повторяли трижды.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнялась при финансовой поддержке БРФФИ (грант № X17-013), РНФ (грант № 14-15-00362, эксперименты с клеточными культурами) и гранта Президента РБ (2016).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baranovsky A.V., Bolibrukh D.A., Schneider B. *Steroids*. **2015**, *104,* 37. doi 10.1016/j.steroids.2015.08.009
2. Барановский А.В., Бильдюкевич В.Н., Голубева М.Б., Кузьмицкий Б.Б., Мамчиц Ю.Ю. *Биоорг. Химия.* **2016**, *42*, 94. [Baranovsky A.V., Bil'dyukevich V.N., Golubeva M.B., Kuzmitsky B.B., Mamchits Yu. Yu. *Russ. J. Bioorg. Chem*. **2016**, *42*, 83.] doi 10.1134/S1068162015060023
3. Pataki J., Siade G. *J. Org. Chem*. **1972**, *37*, 2127.
4. Baranovsky A.V., Bolibrukh D.A., Khripach V.A., Schneider B. *Arkivoc*. **2008**, *9*, 29. doi 10.3998/ark.5550190.0009.904
5. Барановский А.В., Голубева М.Б. *ХПС*. **2016**, 730. [Baranovskii A.V, Golubeva M.B. *Chem. Nat. Comp*. **2016**, *52*, 856.] doi 10.1007/s10600-016-1796-z
6. Nicolaou K. C., Hao J, Reddy M.V., Rao P.B., Rassias G., Snyder S.A., Huang X., Chen D.Y.-K., Brenzovich W.E., Giuseppone N., Giannakakou P, O'Brate A. *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 12897. doi 10.1021/ja040093a
7. Kopka I.E., Lin L.S., Jewell J.P., Lanza T.J., Fong T.M., Shen C.-P., Lao Z.J., Ha S., Castonguay L.G., Van der Ploeg L., Goulet M.T., Hagmann W.K. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2010**, *20*, 4757. doi 10.1016/j.bmcl.2010.06.127
8. Brewster J.H. Comprehensive organic synthesis. Ed. B.M. Trost. Oxford–New York–Seoul–Tokyo: Pergamon Press. **2007**, *8*, 211.
9. Singh V., Vedantham P., Sahu P.K. *Tetrahedron*. **2004**, *60*, 8161. doi 10.1016/j.tet.2004.06.096
10. Fajkos J. *Chem. Listy*. **1957**, *51*, 1894.

11. Yermolina M.V., Wang J.-Z., Caffrey M., Rong L.-J.L., Wardrop D.J. *J. Med. Chem*. **2011**, *54*, 765. doi 10.1021/jm1008715
12. Entwistle I.D., Wood W.W. Comprehensive organic synthesis. Ed. B.M. Trost. Oxford–New York–Seoul–Tokyo: Pergamon Press. **2007**, *8*, 955.
13. Grundmann C., Grunanger P. The nitrile oxides. New York: Springer-Verlag. **1971**.
14. Херузе Ю.И., Галишев В.А., Петров А.А. *ЖОрХ*. **1988**, *24*, 944.
15. Schmitt D.C., Lam L., Johnson J.S. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5136. doi 10.1021/ol202002r
16. Васильев Н.В., Савостин В.С., Коломиец А.Ф., Сокольский Г.А. *ХГС*. **1989**, *25*, 663. [Vasil'ev N.V., Savostin V.S., Kolomiets A.F., Sokol'skii G.A. *Chem. Heterocycl. Compd*. **1989**, *25*, 555.] doi 10.1007/BF00482506
17. Armarego W.L.F., Chai C.L.L. Purification of Laboratory Chemicals, 5th Ed. Oxford: Butterworth-Heinemann. **2003**.
18. Scherbakov A.M., Komkov A.V., Komendantova A.S., Yastrebova M.A., Andreeva O.E., Shirinian V.Z., Hajra A., Zavarzin I.V., Volkova Y.A. *Front Pharmacol*. **2018**, *8*, 979. doi 10.3389/fphar.2017.00979

Chemoselective Synthesis of the 14β-(Isoxazol-3-yl)methyl Estrane Steroidsand Their Transformation with the Cleavage of Heterocyclic Nucleus

A. V. Baranovsky[a, *], A. S. Ladyko[a], V. A. Shatskaya[b], and A. M. Scherbakov[b]

[a] *Institute of bioorganic chemistry of the NAS, 220147, Belarus, Minsk, ul. Kuprevicha 5/2*
**e-mail: baranovsky@iboch.by*

[b] *N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115522, Russia, Moscow, Kashirskoe shosse 24*
***e-mail: alex.scherbakov@gmail.com*

Received May 16, 2018
Revised May 23, 2018
Accepted December 1, 2018

Synthesis of steroids bearing an isoxazole, isoxazoline, enaminocarbonyl substituent at C-14 and a fused C-14 – C-15 pyrrolidine ring was fulfilled. The influence of solvents on the result of dipolar cycloaddition and the solvolysis of bridged nitrosteroids was evaluated. The cytostatic properties of estrone analogues were analyzed on tumor cells of various origins. The activity of the compounds to breast cancer, intestinal cancer, prostate cancer and lung cancer cells was revealed.

Keywords: estradiol, dipolar cycloaddition, hydrogenolysis, nitrile oxides, enamino ketones, lactams, NMR, human tumor cell cultures