



УДК 542.91:547.92

ЗАВИСИМОСТЬ ПРОГЕСТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ В РЯДУ  
ПРЕГНА- $D'_6$ -ПЕНТАРАНОВ ОТ КОНФОРМАЦИИ  
17 $\beta$ -АЦЕТИЛЬНОЙ БОКОВОЙ ЦЕПИКамерницкий А. В., Левина И. С., Куликова Л. Е.,  
Корхов В. В.\*, Никитина Г. В.\*, Боль М.\*\*

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;

\* Институт акушерства и гинекологии Академии медицинских наук СССР,  
Ленинград;\*\* Центральный институт микробиологии и экспериментальной  
терапии Академии наук ГДР, Йена

Синтезирован 2 $\beta$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон и проведен его теоретический конформационный анализ методом ММ2. Показано, что 20-кетогруппа находится в необычной для прегнанов конформации с торсионным углом C13—C17—C20—O20, равным  $-32,1^\circ$ . Указанная конформация стабильнее обычной конформации (с аналогичным углом, равным  $130,3^\circ$ ) на 5,4 кДж/моль. Исследование биологической активности синтезированного соединения показало, что в отличие от высокоактивного 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона он полностью лишен прогестагенного действия. Высказано предположение о том, что сильные пространственные затруднения повороту боковой цепи и 20-карбонильной группы делают крайне энергетически невыгодным занятие последней конформации, необходимой для связывания с прогестероновым рецептором и далее для проявления соединением биологического действия.

Стероид-рецепторное взаимодействие, являющееся первым этапом в стимулировании гормональной экспрессии генов, с энергетической стороны обуславливается двумя слагаемыми: гидрофобным связыванием стероидного скелета и взаимодействием полярных групп, ведущим к образованию водородных связей. Для прогестерона одним из двух полярных центров молекулы, участвующих в связывании с рецептором, является 20-карбонильная группа. Рассчитано, что ее вклад в общую энергию связывания составляет приблизительно  $1/4$  часть [1], причем эта группа, входя в состав боковой цепи прегнановых стероидов, представляет собой наиболее конформационно лабильный элемент лиганда.

Согласно структурно-энергетической модели стероид-рецепторного взаимодействия [2], необходимым условием осуществления этого взаимодействия должно быть наличие возможности поворота 20-карбонильной группы в реакционную конформацию с затратой энергии, меньшей, чем энергия, выделяющаяся при образовании двух водородных связей. Если это так, то создание пространственных затруднений повороту боковой цепи должно сказаться на биологической активности стероида.

Ранее было показано [3], что введение метильной группы в циклогексеновое кольцо  $D'$  молекулы прегна- $D'_6$ -пентарана (I) в *цис*-1,3-положение к 20-карбонильной группе приводит к «необычной» конформации этой группы (заслоненное положение к связи C13—C17; конформация B на рис. 1), нехарактерной для большинства стероидов ряда прегнана [4—6].

Представляло интерес проверить влияние такого заместителя на прогестагенную активность в ряду 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона (II). С этой целью мы осуществили синтез 2 $\beta$ '-метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона (III), провели его теоретический конформационный анализ и изучили гормональное действие в сравнении с деметильным аналогом (II) и 16 $\beta$ -метилпрогестероном (IV).

Исходным соединением для синтеза пентарана (III) служил ацетат 16-дегидропрегненолона (V), конденсация которого с *транс*-пипериленом

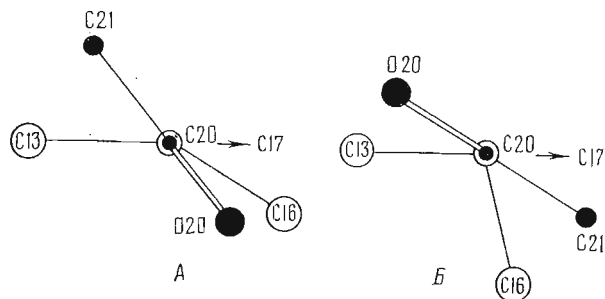


Рис. 1. Проекция Ньюмана двух возможных конформаций 17 $\beta$ -боковой цепи: «обычной» (А) и «необычной» (Б)

в присутствии 0,1 мол.-экв. безв.  $\text{AlCl}_3$  [7] привела к циклоаддукту (I) (схема). Каталитическое гидрирование последнего над 5%  $\text{Pd/CaCO}_3$  дало циклогексановое производное (VIa). Последующее щелочное омыление 3 $\beta$ -ацетата и окисление полученного спирта (VIb) по Опенауэру позволило получить желаемый 2' $\beta$ -метилпентаран (III). 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Конфигурация дополнительного кольца  $D'$  и *цис*-расположение 2' $\beta$ -метильной и 17 $\beta$ -ацетильной групп в соединении (III) следуют из его спектральных характеристик и данных рентгеноструктурного анализа, полученных для 3 $\beta$ -ацетата (I) [3].

16 $\beta$ -Метилпрогестерон (IV) получен из 16-метилпрегна-5,16-диен-3 $\beta$ -ол-20-она гидрированием  $\Delta^{16}$ -связи над никелем Ренея и последующим окислением 3 $\beta$ -спирта по Опенауэру [8].

Был проведен теоретический конформационный анализ пентаранов (I)–(III), причем полученные методом MM2 [9] результаты для стероидов (I), (II) достаточно хорошо согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа [3, 6]. В табл. 1 приведены некоторые торсионные углы исследованных соединений. Расчеты обеих конформаций А и Б (рис. 1) 17 $\beta$ -боковой цепи 2' $\beta$ -метилпентарана (III) показали, что конформация Б с торсионным углом C16–C17–C20–O20, равным  $-142,8^\circ$ , стабильнее «обычной» конформации А с тем же торсионным углом, равным

Таблица 1

Значения некоторых торсионных углов (град) исследованных соединений (I)–(IV)

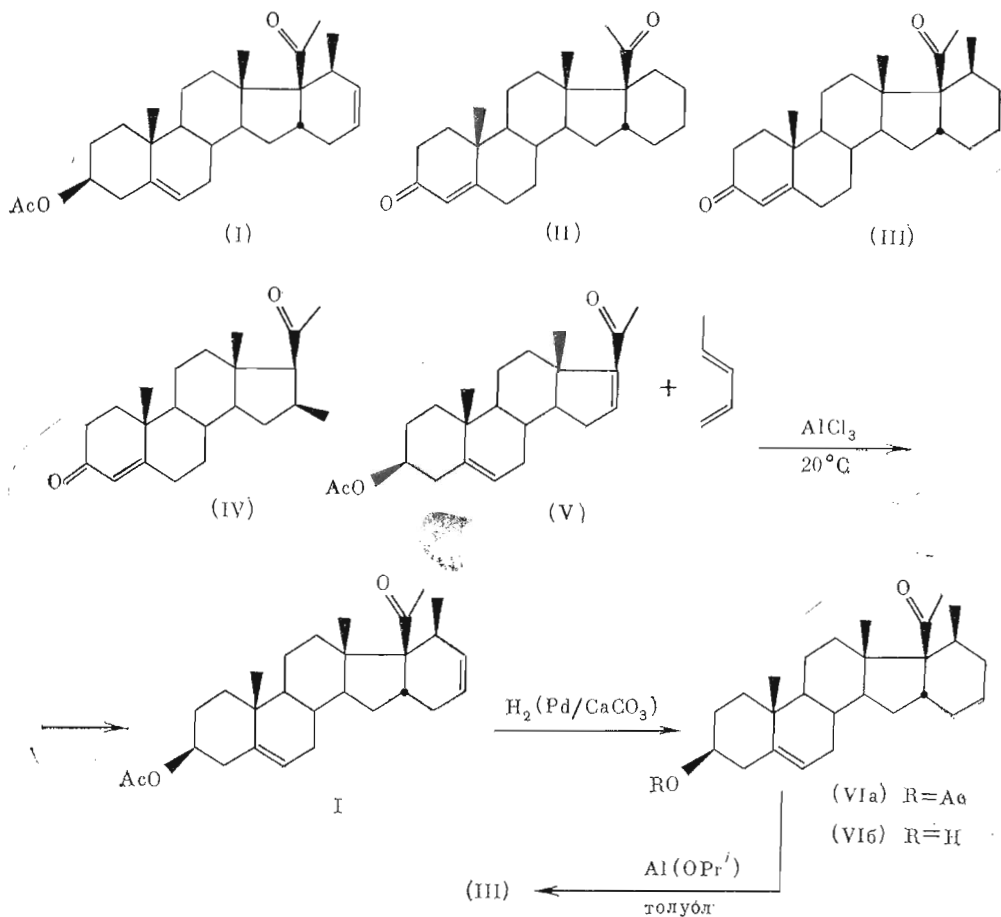
Торсионный угол	I		II		III		IV
	Конформация Б (экспер. [3])	Конформация А (экспер. [4])	Конформация А (расч.)	Конформация А (расч.)	Конформация Б (расч.)	Конформация Б (экспер. [10])	
C13–C17–C20–O20	-17,3	+109,4	+119,9	+130,3	-32,1	+19	
C16–C17–C20–O20	-132,9	-2,8	+6,5	+20,7	-142,8		

Таблица 2

Прогестагенная активность исследованных соединений

Соединение	Тест Клауберга — Мак-Фейла				Сохранение бластоцистов (суточная доза в/м 0,2 мг/кг), %
	способ введения	диапазон исследованных доз, мг/кг	ED <sub>50</sub> , мг/кг	относительная активность	
Прогестерон (II)	в/м	4–0,025	0,26	1	60
	»	0,4–0,0008	0,11	2,36	79
(III)	Внутрь	0,4–0,004	1,83	0,14	0
	в/м	0,4–0,0008	316	–	0
(IV)	Внутрь	4–0,004	Не активен	»	0
	в/м	0,4–0,004	»	»	0

+20,7°, на 5,4 кДж/моль. Наглядное представление о стабильной конформации пентарана (III) дает рис. 2 (выполнено по программе PLUTO [11]). Два минимума (*A* и *B*) энергии напряжения 17 $\beta$ -ацетильной боковой цепи молекулы (III) представлены на рис. 3.



Прогестагенную активность пентаранов (II) и (III) и 16 $\beta$ -метилпрогестерона (IV) определяли по двум тестам: трансформации пролиферации эндометрия (тест Клауберга — Мак-Фейла) и тесту сохранения беременности у овариэктомированных животных (табл. 2). Как видно из табл. 2, наличие метильной группы в соединении (III) рядом с 17 $\beta$ -боковой цепью полностью снимает прогестагенное действие пентарана: стероид (III) не проявляет активности в тесте Клауберга — Мак-Фейла и не способен поддерживать беременность у животных, лишенных эндогенного прогестерона. 16 $\beta$ -Метилпрогестерон (IV) также оказался лишенным прогестагенного действия.

Полученные данные свидетельствуют, что создание сильных пространственных затруднений повороту боковой цепи и 20-карбонильной группы делает крайне энергетически невыгодным занятие последней реакционной конформации, пространственно близкой конформации *A* [12, 13]. В самом деле, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон (II), имеющий стабильную конформацию *A* [6], обладает высокой прогестагенной активностью. В то же время 2' $\beta$ -метильный аналог (III) и 16 $\beta$ -метилпрогестерон (IV) полностью ее лишены. Нельзя, однако, не учитывать также и то, что дополнительная метильная группа может не только влиять на конформацию 20-карбонильной группы, но и создавать определенные пространственные затруднения для образования водородной связи между прогестероновым рецептором и измененной «биоактивной» молекулой (с 17 $\beta$ -ацетильной группой в обычной конформации).

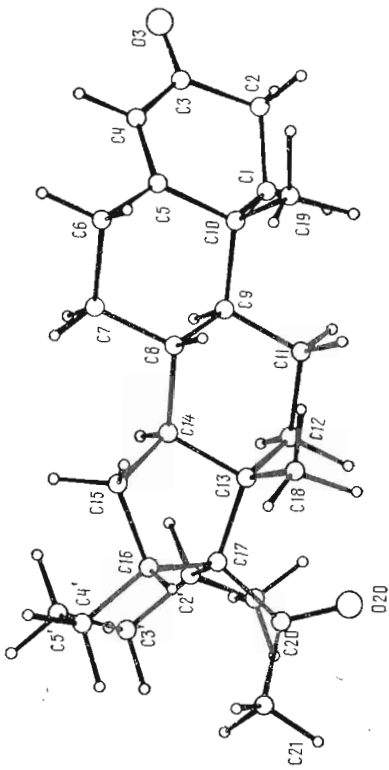


Рис. 2

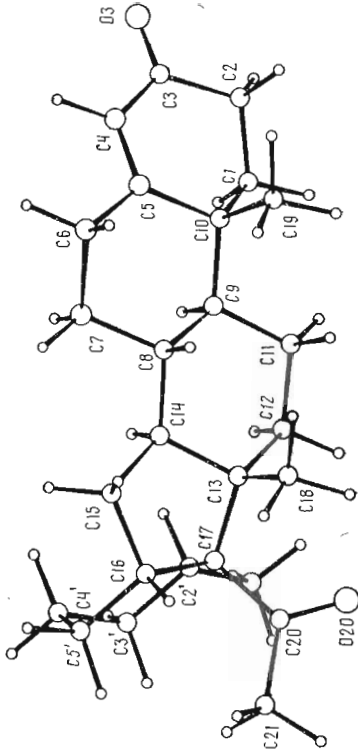


Рис. 2. Молекула 2 $\beta$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона (III)

Рис. 3. Энергетический профиль вращения 17 $\beta$ -боковой цепи молекулы 2 $\beta$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона (III)

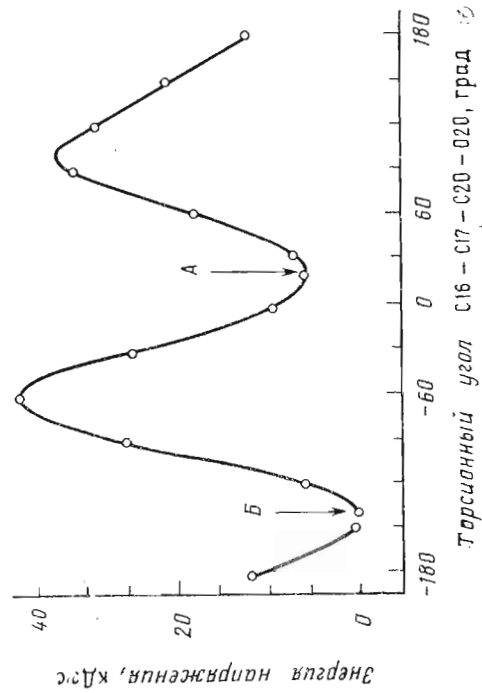


Рис. 3

## Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на блоке Кофлера. ИК-спектры измеряли на приборе UR-10 (ГДР) в KBr, оптическое вращение — на поляриметре Perkin — Elmer 141 (США) в диоксане при  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ . Спектры ПМР снимали на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) в  $\text{CDCl}_3$  (внутренний стандарт — тетраметилсилан). Для хроматографии применяли силикагель L 40/100 мкм (ЧССР). ТСХ осуществляли на микропластинках с  $\text{SiO}_2$  марки LSL<sub>254</sub> 5/40 мкм (ЧССР), проявление — УФ-светом и/или парами иода.

**2 $\beta$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион (III).** 1,41 г ацетата (I) [7] гидрировали в 20 мл диоксана над 0,20 г 5% Pd-CaCO<sub>3</sub>. Полученный после фильтрования реакционной смеси и упаривания диоксана кристаллический продукт (VIa) (т. пл. 192–196°С; спектр ПМР ( $\delta$ , м. д.): 0,81 (3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0,88 (д, 3H, 2' $\beta$ -CH<sub>3</sub>, J 7 Гц), 2,03 (ос, 3H, 3-OAc), 2,16 (с, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 5,36 (м, 1H, 6-CH)) растворяли в 100 мл MeOH, добавляли раствор 0,47 г KOH в 3,5 мл H<sub>2</sub>O и кипятили 30 мин. После охлаждения реакционную смесь подкисляли разбавленной HCl, упаривали MeOH до 1/4 объема, добавляли воду и продукт реакции (спирт (VIb)) отфильтровывали и сушили на воздухе. Последний окисляли без дополнительной очистки: раствор 1 г спирта (VIb) в 12 мл циклогексана и 70 мл абс. толуола кипятили с медленной отгонкой до получения прозрачного дистиллата. Затем к реакционной смеси добавляли раствор 1 г изопропилата алюминия в 30 мл абс. толуола и кипятили 4 ч при медленной отгонке растворителя. По охлаждению реакционную смесь промывали 40% AcOH, раствором NaHCO<sub>3</sub> и водой. Органический слой сушили сульфатом магния и растворитель удаляли. Остаток хроматографировали на колонке с 80 г SiO<sub>2</sub>, элюирование осуществляли системой гексан — эфир, 4:1. Выделено 0,76 г (76%)  $\Delta^4$ -3-кетона (III) с т. пл. 199–202°С (ацетон — петр. эфир). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1620, 1670, 1690. Спектр ПМР ( $\delta$ , м. д.): 0,82 (с, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0,88 (д, 3H, 2' $\beta$ -CH<sub>3</sub>; J 7 Гц), 1,18 (с, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 2,15 (с, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 5,71 (ушир. с, 1H, 4-CH). Найдено, %: C 81,70; H 9,90. C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: C 81,62; H 10,01.

**16 $\beta$ -Метилпрогестерон (IV).** Раствор 1,52 г 16-метилпрегна-5,16-диен-3 $\beta$ -ол-20-она (т. пл. 183–186°С; 192–195°С [8]) в 250 мл MeOH гидрировали над 1,2 г свежеприготовленного никеля Ренея до прекращения поглощения водорода. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток (1,50 г) кристаллизовали из MeOH. Получено 0,68 г 16 $\beta$ -метилпрегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-она, т. пл. 195–198°С (198–200°С [8]). Спектр ПМР ( $\delta$ , м. д.): 0,97 (с, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1,02 (с, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 1,06 (д, 3H, 16-CH<sub>3</sub>, J 7 Гц), 2,12 (с, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 5,36 (м, 1H, 6-CH). Этот продукт окисляли по Опенауэру, аналогично описанному выше (0,6 г изопропилата алюминия, 8 мл циклогексана, 90 мл толуола). Получено 0,21 г  $\Delta^4$ -3-кетона (IV) (очищен хроматографированием на колонке с 10 г SiO<sub>2</sub>, элюирование — системой гексан — эфир, 4:1; затем 3-кратная кристаллизация из MeOH), т. пл. 201–205°С,  $[\alpha]_D^{20} +120,5^\circ$  (с 2); [8]: т. пл. 202–204°С,  $[\alpha]_D^{20} 133^\circ$ . Спектр ПМР ( $\delta$ , м. д.): 0,98 (с, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1,06 (д, 3H, 16-CH<sub>3</sub>, J 7 Гц), 1,28 (с, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 2,09 (с, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 5,72 (ушир. с, 1H, 4-CH).

**Прогестагенная активность.** Для определения прогестагенной активности использован модифицированный метод Клауберга [14]. Неполовозрелым кроликам-самкам массой 600–800 г, предварительно обработанным монобензоатом эстрадиола (по 2,5 мкг в подсолнечном масле в течение 5 сут), вводили испытуемые соединения внутримышечно (в/м) или внутривентрикулярно (внутри). Суточные дозы соединений вводили в течение 5 дней, начиная с 7-х сут от начала опыта. На следующий день после последнего введения препарата животных забивали и после стандартной гистологической обработки исследовали степень секреторных изменений эндометрия; оценку проводили по 4-балльной системе Мак-Фейла [15]. В качестве стандарта использовали прогестерон в/м. Для контроля использовали группу животных, получавших только подсолнечное масло. Экспериментальные данные обработаны регрессионным методом; биологическая активность оценивалась по ED<sub>50</sub> (доза 50%-ного эффекта), соответствующей индексу Мак-Фейла, равному 2.

**Тест сохранения беременности.** Половозрелые крольчихи массой 3,15 $\pm$ 0,075 кг спаривались в период эструса, а через 18 ч производилась двусторонняя овариэктомия. При операции определяли количество лопнувших фолликулов. В день овариэктомии и в течение 6 последующих дней вводили испытуемые соединения в/м в дозе 0,2 мг/кг в масляном растворе. На 7-е сут животных забивали, извлекали матку, промывали физиологическим раствором и подсчитывали количество blastocyst. Степень сохранения беременности оценивали по проценту вымытых blastocyst по отношению к числу проовулировавших фолликулов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kontula K., Jänne O., Vinko R., de Jader E., de Wissner J., Zeelen F. // Acta endocrinol. 1975. V. 78. № 5. P. 574–592.
2. Камерницкий А. В. // Пробл. эндокринологии. 1987. Т. 33. № 2. С. 87–94.
3. Капульский А. Е., Шибанова Т. А., Симонов В. И., Левина И. С., Куликова Л. Е., Камерницкий А. В. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 7. С. 979–983.
4. Duax W. L., Norton D. A. // Atlas of Steroid Structure. N. Y.: Plenum Press, 1975. V. 1.
5. Duax W. L., Griffin J. F., Roher D. C., Swenson D. C., Weeks C. M. // J. Steroid Biochem. 1981. V. 15. № 1. P. 41–47.

6. Цейкинский В. М., Рыбаков В. Б., Симонов В. И., Камерницкий А. В., Куликова Л. Е., Левина И. С. // Биорган. химия. 1980. Т. 6. № 2. С. 259–266.
7. Ахрем А. А., Куликова Л. Е., Левина И. С., Тuroв Ю. А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1972. № 6. С. 1358–1363.
8. Romo J., Lere J., Romero M. // Bol. inst. quim. univ. nacl. auton. Mex. 1952. V. 4. P. 125; C. A. 1954. V. 48. 9400a.
9. Allinger N. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. P. 8127–8133.
10. Weeks C. M., Strong P., Osawa Y. // Cryst. Struct. Commun. 1976. V. 5. № 8. P. 745–747.
11. Motherwell S., Clegg W. // Computer program PLUTO. Cambridge. UK. 1976.
12. Duax W. L., Cody V., Griffin J. F., Rohrer D. C., Weeks C. M. // J. Toxicol. Env. Health. 1978. V. 4. P. 205–227.
13. Suroouj E., Lepicard G., Mornon J.-P., Ojasso T., Raynaud J.-P. // J. Med. Chem. 1983. V. 26. № 3. P. 1320–1323.
14. Cekan Z., Seda M., Mikuláskova J. // Steroids. 1966. V. 8. № 2. P. 205–218.
15. McPhail M. K. // J. Physiol. 1934. V. 83. P. 145–157.

Поступила в редакцию  
28.I.1987

После доработки  
1.X.1987

**RELATIONSHIP BETWEEN PROGESTAGENIC ACTION  
AND CONFORMATION OF 17 $\beta$ -ACETYL SIDE CHAIN  
IN THE D<sub>6</sub>-PENTARANE SERIES**

KAMERNITZKY A. V., LEVINA I. S., KULIKOVA L. E., KCRKHOV V. V.\*,  
NIKITINA G. V.\*, BOHL M.\*\*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow; \* Institute  
of Obstetrics and Gynecology, Academy of Medical  
Sciences of the USSR, Leningrad; \*\* Central Institute  
of Microbiology and Experimental Therapy, Academy  
of Sciences of GDR, Jena*

The synthesis of 2 $\beta$ -methyl-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -cyclohexanoprogesterone and its MM2 conformational analysis have been performed. The acetyl side chain was shown to have an unusual conformation with the torsion angle C13–C17–C20–O20 being  $-32,1^\circ$ . This conformation is by 5,4 kJ·mol<sup>-1</sup> more stable than the usual one with the torsion angle  $130,3^\circ$ . 2 $\beta$ -Methyl-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -cyclohexanoprogesterone proved to be inactive as a progestogen (pregnancy maintenance and McPhail tests). The lack of the activity may be due to the additional methyl group in D'-ring causing a change of the conformation of the 17 $\beta$ -acetyl side chain, thus hindering the formation of the conformation necessary for binding to the progesterone receptor.