



УДК 547.92.057

СИНТЕЗ С24-ФУНКЦИОналиЗИРОВАННЫХ ОКСИСТЕРИНОВ

© 2002 г. В. А. Хрипач[#], В. Н. Жабинский,
О. В. Константинова, Н. Б. Хрипач, А. П. АнтончикИнститут биоорганической химии НАН Беларуси,
220141, Минск, ул. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 03.07.2001 г. Принята к печати 13.08.2001 г.

Описан синтез (24S)-24,25-эпоксихолестерина, (24S)-24-гидроксихолестерина и 24-кетохолестерина. Данные соединения относятся к оксистеринам и рассматриваются как модуляторы метаболизма холестерина. Ключевой реакцией стереоселективного введения функциональности при С24 использовано асимметрическое гидроксילирование ацетата десмостерина по Шарплесу.

Ключевые слова: стероиды; оксистерины; холестерин; асимметрическое гидроксילирование.

ВВЕДЕНИЕ

Отличительная особенность современного этапа исследований стероидов – значительное увеличение интереса к производным окислительной трансформации холестерина – оксистеринам. Первоначально такие соединения, имеющие дополнительную кислородсодержащую функцию, рассматривались только как продукты автоокисления холестерина или как интермедиаты в ходе биосинтеза стероидных гормонов или желчных кислот. Исследования последних лет значительно расширили представления о роли оксистерин в регуляции биохимических процессов в живой клетке, в особенности об их участии в регуляции гомеостаза холестерина [1, 2].

Важное место в ряду оксистерин занимают производные с циклической частью холестерина и боковой цепью типа (I)–(III), содержащие функциональную группировку при С24.

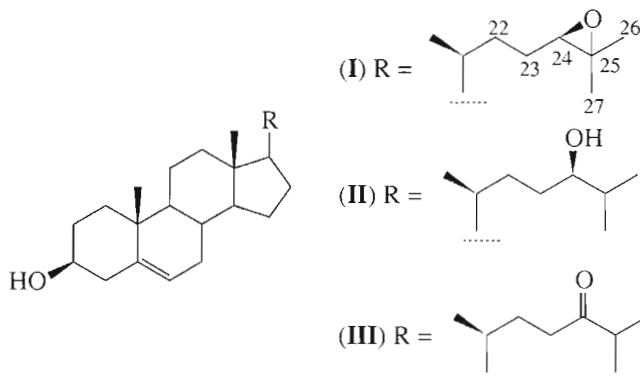
Так, (24S)-24,25-эпоксихолестерин (I) активирует ядерный LXR α -рецептор и участвует в регуляции транскрипции гена, кодирующего 7 α -гидроксилазу. Данный фермент катализирует скоростьопределяющую стадию биосинтеза желчных кислот из холестерина [3]. Поддержание необходимого уровня холестерина в мозге осуществляется путем превращения его избытка в (24S)-24-гидроксихолестерин, который легко переходит из центральной нервной системы в плазму крови [4].

Цель настоящего исследования – разработка общего подхода к синтезу оксистерин (I)–(III), позволяющего получить их в препаративных количествах с использованием дешевых реагентов и доступного стероидного сырья.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Удобным исходным соединением для синтеза соединений (I)–(III) является кислота (IV). При ее использовании для этой цели требуется только введение углеродного фрагмента С25–С27 боковой цепи и функциональной группировки при С24. На первом этапе кислота (IV) была превращена в эфир (V). Обработка последнего изопропилмагний хлоридом в присутствии боргидрида лития дала изомерную по С24 смесь спиртов (VI). Окисление спиртов (VI) оксидом хрома в пиридине с последующим снятием тетрагидропиранильной защиты привело к 24-кетохолестерину (III) (схема 1).

Следующей задачей настоящей работы являлось получение (24S)-24-гидроксихолестерина (II), что в принципе могло быть достигнуто кислотным гидролизом эфира (V) и разделением спиртов, изомерных по С24. К сожалению, эта смесь, как и смесь соответствующих 24,25-эпоксидов, практически неразделима [5]. Поэтому схема синтеза соединений (I) и (II) должна была включать стадию стереоселективного построения С24-центра. Нами для этой цели использована реакция



[#] Автор для переписки (тел.: (375-17) 2-64-86-47; эл. почта: khripach@iboch.bas-net.by).

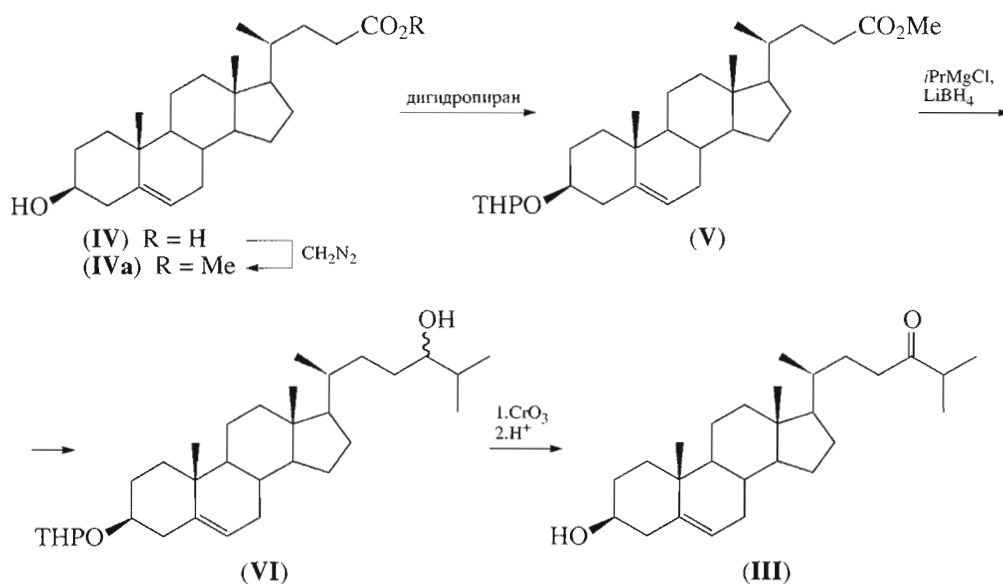


Схема 1.

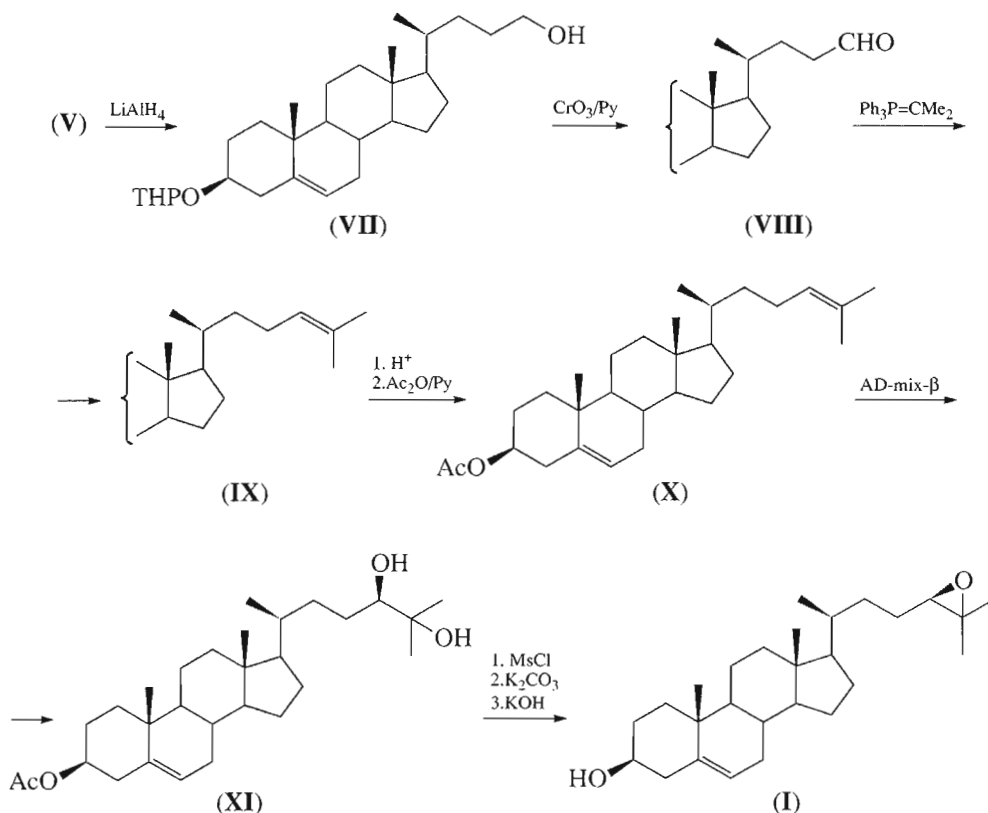


Схема 2.

асимметрического гидросилирования по Шарплесу в присутствии алкалоидов хинидинового ряда [6]. Показано [7, 8], что гидросилирование Δ^{22} -связи в таких условиях протекает с преимущественным образованием необходимого (24*R*)-изомера (XI).

Взаимодействие 3-ацетоксидиола (XI) с метансульфонилхлоридом протекало с образованием соответствующего производного по O24. Формирование эпоксидного цикла достигнуто обработкой основанием. При этом после омыления аце-

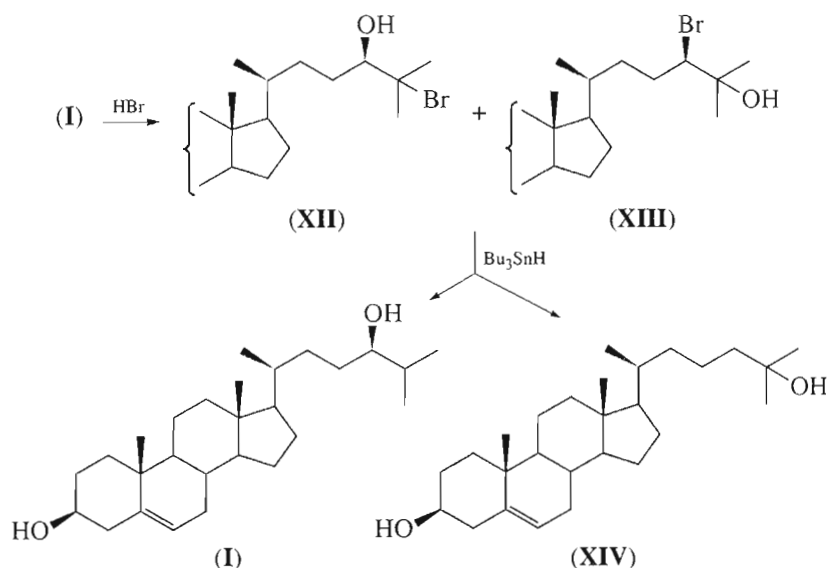


Схема 3.

тильной группы при ОЗ получен целевой (24*S*)-24,25-эпоксистерин (I).

Были изучены два метода перехода от соединения (I) к (24*S*)-24-гидроксистерину (II). Первый из них состоял в восстановлении (24*S*)-24,25-эпоксистерина (I) литием в жидком аммиаке. Реакция протекала с образованием как С24-, так и С25-спирта, причем выход целевого продукта (II) оказался довольно низким. Лучшие результаты получены при реализации двухстадийного перехода (I) → (II). Раскрытие эпоксидного цикла в соединении (I) протекало с образованием смеси бромгидринов (II) и (III) в соотношении примерно 1 : 1. С практической точки зрения удобнее оказалось разделять С24- и С25-гидроксипроизводные после удаления атома брома, что осуществлялось путем радикального дебромирования смеси бромгидринов (II) и (III).

Таким образом, предлагаемый подход позволяет осуществить препаративный синтез (24*S*)-24,25-эпоксистерина (I), (24*S*)-24-гидроксистерина (II) и 24-кетохолестерина (III) с использованием 3β-гидроксистерин-5-еновой кислоты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали перегнанные растворители и реагенты отечественного производства, а также 3β-гидроксистерин-5-еновую кислоту (Steraloids, США), дигидропиран, боргидрид лития, Admix-β, метансульфонилхлорид и трибутилоловогидрид (Aldrich, США).

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck). Для обнаружения пятен на пластинках использовали их опрыскивание этанольным раствором, содержащим анисовый альдегид (5%) и серную

кислоту (5%), с последующим нагреванием. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (Art. 7734) (Merck, Германия). Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали на импульсном фурье-спектрометре Bruker AC-200 (200 МГц) (Германия) в дейтерохлороформе. Приведены химические сдвиги (δ, м.д.) и константы спин-спиновой взаимодействия (J, Гц). Температуры плавления определены на приборе Voetius (Германия).

Метилловый эфир 3β-гидроксистерин-5-ен-24-овой кислоты (IVa). К раствору 3.77 г (10 ммоль) кислоты (IV) в 100 мл смеси диэтиловый эфир–тетрагидрофуран, 2 : 1, прибавляли при перемешивании раствор диазометана в диэтиловом эфире (получен из 6.5 г диазальда по методике [9]) до тех пор, пока реакционная смесь не приобретала устойчивую желтую окраску. Реакционную смесь выдерживали 40 мин при комнатной температуре, продували аргоном и упаривали в вакууме. Выход 3.88 г (100%). ¹H-ЯМР: 0.68 (3H, с, 18-CH₃), 0.94 (3H, д, J 6.1, 21-CH₃), 1.02 (3H, с, 19-CH₃), 3.54 (1H, м, H3), 3.65 (3H, с, COCH₃), 5.36 (1H, д, J 4.7, H6).

Метилловый эфир 3β-тетрагидропиранилхол-5-ен-24-овой кислоты (V). К перемешиваемой суспензии 3.88 г (10 ммоль) метилового эфира (IVa) в 20 мл дигидропирана прибавляли 0.2 мл конц. соляной кислоты. Реакционную смесь выдерживали 12 ч при комнатной температуре, затем добавляли 2 мл пиридина и летучие вещества отгоняли в вакууме, получая в остатке соединение (V), которое использовали далее без дополнительной очистки. Выход 4.73 г (100%). ¹H-ЯМР: 0.67 (3H, с, 18-CH₃), 0.92 (3H, д, J 6.1, 21-CH₃), 1.00 (3H, с, 19-CH₃), 3.52 (2H, м, CH₂O из THP), 3.65 (3H, с, COCH₃), 3.90 (1H, м, H3), 4.71 (1H, уш.с, CH из THP), 5.36 (1H, уш.с, H6).

3 β -Тетрагидропиранил-24-гидроксихол-5-ен (VI). Раствор 7.3 г (15.4 ммоль) эфира (V) в 100 мл тетрагидрофурана прибавляли к охлажденной до -25°C смеси 0.92 г (42.3 ммоль) боргидрида лития и изопропилмагний хлорида (полученного из 9.8 г (0.4 моль) магния и 25.2 г (0.25 ммоль) изопропилхлорида) в 100 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь выдерживали при -18°C в течение 20 ч, затем обрабатывали избытком NH_4Cl и разбавляли 200 мл воды, экстрагировали этилацетатом. Экстракт сушили Na_2SO_4 , упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем. Выход 5.5 г (73%). ^1H -ЯМР: 0.68 (3H, с, 18- CH_3), 1.01 (3H, с, 19- CH_3), 3.31 (1H, м, H24), 3.51 (2H, м, CH_2O из ТНР), 3.89 (1H, м, H3), 4.72 (1H, уш.с, CH из ТНР), 5.35 (1H, уш.с, H6).

3 β -Гидроксихолест-5-ен-24-он (III). К раствору 5.0 г (50 ммоль) CrO_3 в 100 мл пиридина прибавляли раствор 3.0 г спирта (VI) в 50 мл пиридина. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 12 ч, затем разбавляли 200 мл эфира и отфильтровывали через слой силикагеля. Фильтрат упаривали, дважды соупаривали с толуолом и растворяли в 50 мл смеси метанол-тетрагидрофуран, 2 : 1. К смеси прибавляли 2 мл 36% соляной кислоты, выдерживали при комнатной температуре 30 мин, прибавляли 12 мл пиридина, и растворитель упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Выход 1.8 г (73%). Т. пл. $134\text{--}136^{\circ}\text{C}$. ^1H -ЯМР: 0.67 (3H, с, 18- CH_3), 0.91 (3H, д, J 6.4, 21- CH_3), 1.01 (3H, с, 19- CH_3), 1.09 (6H, д, J 6.5, 26- и 27- CH_3), 3.62 (1H, м, H3), 5.34 (1H, м, H6). ^{13}C -ЯМР: 11.9 к, 18.3 к, 18.4 к, 18.5 к, 19.4 к, 21.1 т, 24.3 т, 28.1 т, 29.9 т, 31.6 с, 31.9 т, 35.4 д, 36.5 с, 37.3 т, 39.8 т, 40.8 д, 42.3 т, 42.4 т, 50.1 д, 55.9 д, 56.7 д, 71.8 д, 121.6 д, 140.8 с, 215.5 с.

3 β -Тетрагидропиранил-24-гидроксихол-5-ен (VII). К раствору 4.73 г (10 ммоль) метилового эфира (V) в 100 мл диэтилового эфира прибавляли при перемешивании порциями 0.55 г (10 ммоль) LiAlH_4 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем избыток реагента разлагали по стандартной методике. Белый осадок отфильтровывали и тщательно промывали эфиром. Фильтрат упаривали, получая спирт (VII), который использовали далее без дополнительной очистки. Выход 4.35 г (98%). ^1H -ЯМР: 0.68 (3H, с, 18- CH_3), 0.94 (3H, д, J 6.7, 21- CH_3), 1.00 (3H, с, 19- CH_3), 3.50 (2H, м, CH_2O из ТНР), 3.60 (2H, уш.т, H23), 3.90 (1H, м, H3), 4.72 (1H, уш.с, CH из ТНР), 5.36 (1H, уш.с, H6).

3 β -Тетрагидропиранилхол-5-ен-24-аль (VIII). К смеси 50 мл пиридина и 150 мл хлороформа при комнатной температуре постепенно прибавляли 7 г (70 ммоль) CrO_3 . Смесь перемешивали 30 мин, затем прибавляли раствор 4.44 г (10 ммоль) соединения (VII) в 25 мл хлороформа. Через 12 ч к реакционной смеси прибавляли 20 мл изопропанола и еще через 30 мин приливали 300 мл диэтилового эфира. Полученную смесь отфильтровывали

вали через слой силикагеля, и растворитель упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир-этилацетат, 5 : 1. Выход 3.8 г (86%). ^1H -ЯМР: 0.66 (3H, с, 18- CH_3), 0.91 (3H, д, J 6.1, 21- CH_3), 0.99 (3H, с, 19- CH_3), 3.50 (2H, м, CH_2O из ТНР), 3.90 (1H, м, H3), 4.70 (1H, уш.с, CH из ТНР), 5.31 (1H, уш.с, H6), 9.74 (1H, с, H23).

3 β -Тетрагидропиранилхолеста-5,24-диен (IX). К охлажденной до 0°C суспензии 4.31 г (10 ммоль) изопропилтрифенилфосфонийиодида в 100 мл тетрагидрофурана добавляли при перемешивании в токе азота 4 мл 2.5 М раствора бутиллития (10 ммоль). Через 0.5 ч к полученному интенсивно красному раствору прибавляли раствор 2.2 г (5 ммоль) альдегида (VIII) в тетрагидрофуране. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 ч и затем прибавляли 0.4 мл йодистого метила. Выпавший осадок отфильтровывали, тщательно промывали и растворитель упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир-этилацетат, 10 : 1. Выход 1.8 г (77%). ^1H -ЯМР: 0.67 (3H, с, 18- CH_3), 0.93 (3H, д, J 6.7, 21- CH_3), 1.00 (3H, с, 19- CH_3), 1.60 (3H, с) и 1.67 (3H, с, 26- и 27- CH_3), 3.50 (2H, м, CH_2O из ТНР), 3.90 (1H, м, H3), 4.71 (1H, уш.с, CH из ТНР), 5.08 (1H, уш.т, H24), 5.34 (1H, уш.с, H6).

3 β -Ацетоксихолест-5,24-диен (X). К раствору 1.8 г (3.85 ммоль) соединения (IX) в 30 мл смеси тетрагидрофуран-метанол, 2 : 1, прибавляли 0.5 мл конц. соляной кислоты. Смесь выдерживали 1 ч при комнатной температуре, затем обрабатывали 2 мл пиридина и растворители отгоняли в вакууме. Остаток соупаривали с толуолом, растворяли в 20 мл пиридина и обрабатывали 0.5 мл (5 ммоль) уксусного ангидрида и 10 мг диметиламинопиридина. Реакционную смесь выдерживали 12 ч при комнатной температуре и обрабатывали обычным образом. Вещество выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью петролейный эфир-этилацетат, 10 : 1. Выход 1.4 г (85%). ^1H -ЯМР: 0.61 (3H, с, 18- CH_3), 0.86 (3H, д, J 6.7, 21- CH_3), 0.95 (3H, с, 19- CH_3), 1.53 (3H, с) и 1.61 (3H, с, 26- и 27- CH_3), 1.96 (3H, с, 3- COCH_3), 4.53 (1H, м, H3), 5.02 (1H, т, J 6.7, H24), 5.30 (1H, д, J 4.2, H6).

3 β -Ацетокси-24,25-дигидроксихолест-5-ен (XI). К раствору 2.13 г (5 ммоль) олефина (X) в 100 мл смеси *трет*-бутанол-вода, 5 : 4, добавляли 4 г $\text{AD-mix-}\beta$ и 0.35 г метансульфонамида. Реакционную смесь перемешивали 50 ч при комнатной температуре, затем обрабатывали 4 г сульфита натрия, выдерживали 1 ч, и *трет*-бутиловый спирт отгоняли в вакууме. Остаток разбавляли раствором бикарбоната натрия, и продукт экстрагировали хлороформом. Органический слой промывали последовательно 0.1 н. раствором серной кислоты, водой, раствором бикарбоната натрия, снова водой, сушили и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролей-

ный эфир–этилацетат, 2 : 1. Выход 2.0 г (87%); т. пл. 159–161°C. ¹H-ЯМР: 0.69 (3H, с, 18-CH₃), 0.93 (3H, д, J 6.1, 21-CH₃), 1.02 (3H, с, 19-CH₃), 1.15 (3H, с) и 1.20 (3H, с, 26- и 27-CH₃), 2.03 (3H, с, 3-COCH₃), 2.88 (2H, уш.с, 24- и 25-OH), 3.31 (1H, м, H24), 4.59 (1H, м, H3), 5.37 (1H, д, J 4.2, H6). ¹³C-ЯМР: 11.9 к, 18.6 к, 19.3 к, 21.0 т, 21.4 к, 23.2 к, 24.2 т, 26.4 к, 27.7 т, 28.1 т, 28.2 т, 31.8 т, 31.8 д, 32.9 т, 35.7 д, 36.5 с, 36.9 т, 38.0 т, 39.7 т, 42.3 с, 50.0 д, 56.2 д, 56.6 д, 73.1 с, 74.0 д, 78.7 д, 122.6 д, 139.6 с, 170.6 с.

(24S)-24,25-Эпоксистерин (I). К перемешиваемому раствору 2.3 г (5 ммоль) соединения (XI) в 30 мл смеси хлороформ–пиридин, 8 : 1, прибавляли при 0°C 1.2 мл (15 ммоль) метансульфохлорида. Реакционную смесь выдерживали 3 ч при комнатной температуре и затем разбавляли раствором бикарбоната натрия. Продукт реакции экстрагировали хлороформом. Органический слой тщательно промывали раствором бикарбоната натрия, водой, и растворители отгоняли в вакууме. Остаток соупаривали с толуолом, растворяли в 30 мл смеси метанол–вода, 10 : 1, и обрабатывали 3 г (22 ммоль) карбоната калия. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре 12 ч и 3 ч при 40°C и разбавляли водой (100 мл). Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой и сушили. Выход 1.8 г (86%), т. пл. 159–161°C (лит. [8] т. пл. 156–157°C). ¹H-ЯМР: 0.68 (3H, с, 18-CH₃), 0.94 (3H, д, J 6.1, 21-CH₃), 1.00 (3H, с, 19-CH₃), 1.27 (3H, с) и 1.30 (3H, с, 26- и 27-CH₃), 2.69 (1H, т, J 6.0, H24), 3.51 (1H, м, H3), 5.37 (1H, уш.д, J 5.0, H6). ¹³C-ЯМР: 11.9 к, 18.6 к, 18.7 к, 19.4 к, 21.1 т, 24.3 т, 24.9 к, 25.6 т, 28.2 т, 31.6 т, 31.9 д, 31.9 т, 32.5 т, 35.7 д, 36.5 с, 37.2 т, 39.8 т, 42.2 с, 42.3 т, 50.0 д, 56.0 д, 56.7 д, 58.2 с, 64.9 д, 71.6 д, 121.5 д, 140.8 с.

(24S)-24-Гидроксистерин (II). Раствор 1.5 г (3.6 ммоль) эпоксида (I) в 50 мл смеси хлороформ–уксусная кислота, 1 : 1, обрабатывали 5 мл 45% бромистоводородной кислоты. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре 1.5 ч, затем разбавляли хлороформом и органический слой промывали последовательно водой, раствором бикарбоната натрия, снова водой, высушивали и упаривали. Полученную смесь бромидов растворяли в 30 мл бензола, добавляли 2 мл (7 ммоль) Bu₃SnH и 20 мг азо-бисизобутиронитрила. Реакционную смесь кипятили 1 ч, после ох-

лаждения разбавляли этилацетатом, промывали водой, сушили и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир–этилацетат, 8 : 1. Вначале получали (24S)-24-гидроксистерин (II). Выход 0.68 г (45%); т. пл. 178–180°C (лит. [10] т. пл. 176°C). ¹H-ЯМР: 0.61 (3H, с, 18-CH₃), 0.82 (3H, д, J 6.1, 21-CH₃), 0.84 (3H, д, J 6.7) и 0.87 (3H, д, J 6.7, 26- и 27-CH₃), 0.94 (3H, с, 19-CH₃), 3.24 (1H, м, H24), 3.45 (1H, м, H3), 5.28 (1H, д, J 4.9, H6). ¹³C-ЯМР: 11.9 к, 16.7 к, 18.8 к, 19.0 к, 19.4 к, 21.1 т, 24.3 т, 28.2 т, 30.7 т, 31.6 т, 31.9 т, 31.9 д, 32.2 т, 33.1 д, 35.9 д, 36.5 с, 37.2 т, 39.8 т, 42.3 с, 42.3 т, 50.1 д, 56.0 д, 56.7 д, 71.8 д, 77.4 д, 121.7 д, 140.8 с. Последующее элюирование дало 25-гидроксистерин (XIV). Выход 0.66 г (44%); т. пл. 178–180°C (лит. [10] т. пл. 180°C). ¹H-ЯМР: 0.61 (3H, с, 18-CH₃), 0.86 (3H, д, J 6.7, 21-CH₃), 0.94 (3H, с, 19-CH₃), 1.15 (6H, с, 26- и 27-CH₃), 3.46 (1H, м, H3), 5.28 (1H, д, J 4.8, H6). ¹³C-ЯМР: 11.9 к, 18.7 к, 19.4 к, 20.8 т, 21.1 т, 24.3 т, 28.2 т, 29.2 к, 29.3 к, 31.6 т, 31.9 т, 31.9 д, 35.7 д, 36.4 с, 36.4 т, 37.2 т, 39.8 т, 42.3 с, 42.3 т, 44.4 т, 50.1 д, 56.1 д, 56.7 д, 71.1 с, 71.8 д, 121.7 д, 140.8 с.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schroeffer G.J., Jr. // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. P. 361–554.
2. Wolf G. // *Nutr. Rev.* 1999. V. 57. P. 196–198.
3. Peet D.J., Turley S.D., Ma W., Janowski B.A., Lobaccaro J.A., Hammer R.E., Mangelsdorf D.J. // *Cell.* 1998. V. 93. P. 693–704.
4. Lund E.G., Guileyardo J.M., Russell D.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 7238–7243.
5. Saucier S.E., Kandutsch A.A., Gayen A.K., Nelson J.A., Spencer T.A. // *J. Lipid Res.* 1990. V. 31. P. 2179–2185.
6. Kolb H.C., van Nieuwenhze M.S., Sharpless K.B. // *Chem. Rev.* 1994. V. 94. P. 2483–2547.
7. Corey E.J., Grogan M.J. // *Tetrahedron Lett.* 1998. V. 39. P. 9351–9354.
8. Tomkinson N.C.O., Willson T.M. // *J. Org. Chem.* 1998. V. 63. P. 9919–9923.
9. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th ed. / Eds Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G., Tatchell A.R. Longman Scientific and Technical, 1989. P. 432.
10. Fieser L., Fieser M. *Steroids.* London: Chapman and Hall, Ltd, 1959.

Synthesis of 24-Functionalized Oxysterols

V. A. Khripach[#], V. N. Zhabinskii, O. V. Konstantinova, N. B. Khripach, and A. P. Antonchick

[#]Phone: (375-17) 264-8647; e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

The syntheses of (24S)-24,25-epoxycholesterol, (24S)-hydroxycholesterol, and 24-ketocholesterol are described. The compounds belong to oxysterols, which can be considered to be the modulators of cholesterol metabolism. The asymmetric hydroxylation of desmosterol acetate according to Sharpless was used as the key reaction in the stereoselective introduction of functionality in position 24. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: asymmetric hydroxylation, cholesterol, oxysterols, steroids