



УДК 547.92.057

НОВЫЕ $\Delta 8(14)$ -15-КЕТОСТЕРИНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ОКСИГЕНИРОВАННУЮ БОКОВУЮ ЦЕПЬ

© 2005 г. Г. Ю. Флегентов*, Е. А. Пийр*, Н. В. Медведева*, Я. В. Ткачев**,
В. П. Тимофеев**, А. Ю. Мишарин**

*Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, 119992,
Москва, Погодинская ул., 10;

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
Поступила в редакцию 30.04.2004 г. Принята к печати 03.09.2004 г.

Новые аналоги 3β -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (15-кетостерина), содержащие модифицированную цепь при C17: (22S,23S,24S)- и (22R,23R,24S)- 3β -гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5 α -холест-8(14)-ен-15-оны, а также (22RS,23 ξ ,24S)-24-метил-5 α -холест-8(14)-ен-3 β ,22,23-триол-15-он синтезированы из (22E)-(24S)-3 β -ацетокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-она. Абсолютная конфигурация C22 и C23 в оксидопроизводных определена на основании спектров ЯМР. Синтезированные 22,23-эпоксидсодержащие соединения эффективно ингибировали биосинтез холестерина в клетках гепатомы HepG2 (IC_{50} 0.9 ± 0.2 и 0.7 ± 0.2 мкМ соответственно), их активность значительно превосходила таковую для 15-кетостерина (IC_{50} = 4.0 ± 0.5 мкМ), (22E)-(24S)-3 β -гидрокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-она (IC_{50} = 3.1 ± 0.4 мкМ) и синтезированного 3β ,22,23-триола (IC_{50} 6.0 ± 1.0 мкМ).

Ключевые слова: оксистерины, ингибиторы биосинтеза холестерина, метаболизм холестерина, клетки гепатомы Hep G2.

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические $\Delta 8(14)$ -15-кетостерины, подавляющие биосинтез холестерина и обладающие гипохолестеринимическим эффектом, быстро метаболизируют *in vivo* [1]. На основании работ [2–5] мы ранее предположили, что $\Delta 8(14)$ -15-кетостерины, содержащие модифицированную C17-цепь, устойчивую к окислительному разрыву при C24 в клетках печени, могут представлять интерес в качестве регуляторов метаболизма холестерина и провели синтез (22E)-(24S)-3 β -гидрокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-она (а также соответствующих 3 α -эпимера и 3,15-диола) из эргостерина [6]. (22E)-(24S)-3 β -Гидрокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-он эффективно ингибировал биосинтез холестерина и холестерилловых эфиров в клетках гепатомы человека Hep G2 [7].

Присоединение кислородсодержащих реагентов по 22,23-двойной связи в молекуле $\Delta 8(14)$,22-15-кетостеринов дает возможность простого получения новых биологически активных соединений. Целью данной работы является синтез новых $\Delta 8(14)$ -15-кетостеринов: (22S,23S,24S)-3 β -гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5 α -холест-8(14)-ен-

15-она (IV), (22R,23R,24S)-3 β -гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (V) и (22RS,23 ξ ,24S)-24-метил-5 α -холест-8(14)-ен-3 β ,22,23-триол-15-она (IX) (схема 1); отнесение абсолютной конфигурации введенных хиральных центров C22 и C23 в соединениях (IV) и (V); оценка соединений (IV), (V) и (IX) в качестве ингибиторов биосинтеза холестерина в клетках Hep G2 (стандартной клеточной модели для изучения метаболизма липидов в печени человека).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение соединений (IV), (V) и (IX) представлено на схеме 1. Ранее, проводя 14 α ,15 α -эпоксицирование (22E)-(24S)-3 β -ацетокси-24-метил-5 α -холеста-7,14,22-триена с помощью CPBA (15 мин при 0 $^{\circ}$ C), мы нашли, что 22,23-двойная связь в этих условиях устойчива [6]. Однако при 1.5-часовом кипячении (22E)-(24S)-3 β -ацетокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-она (I) в хлороформе с избытком CPBA с выходом 80% была получена смесь (1 : 1) ацетатов изомерных (SS)- и (RR)-22,23-эпоксидов (II) и (III). Соединения (II) и (III) были разделены хроматографически, а затем превращены в целевые продукты (IV) и (V) кипячением с K_2CO_3 в водном MeOH.

Очевидно, что при эпоксицировании (22E)-(24S)-3 β -ацетокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-она (I) образуются два продукта с 22S,23S- и

Сокращения: CPBA – мета-хлорнадбензойная кислота; FSC – эмбриональная сыворотка теленка; PBS – фосфат-содержащий физиологический раствор.

#Автор для переписки (тел.: (095) 246-33-75; эл. почта: alexander.misharin@ibmc.msk.ru).

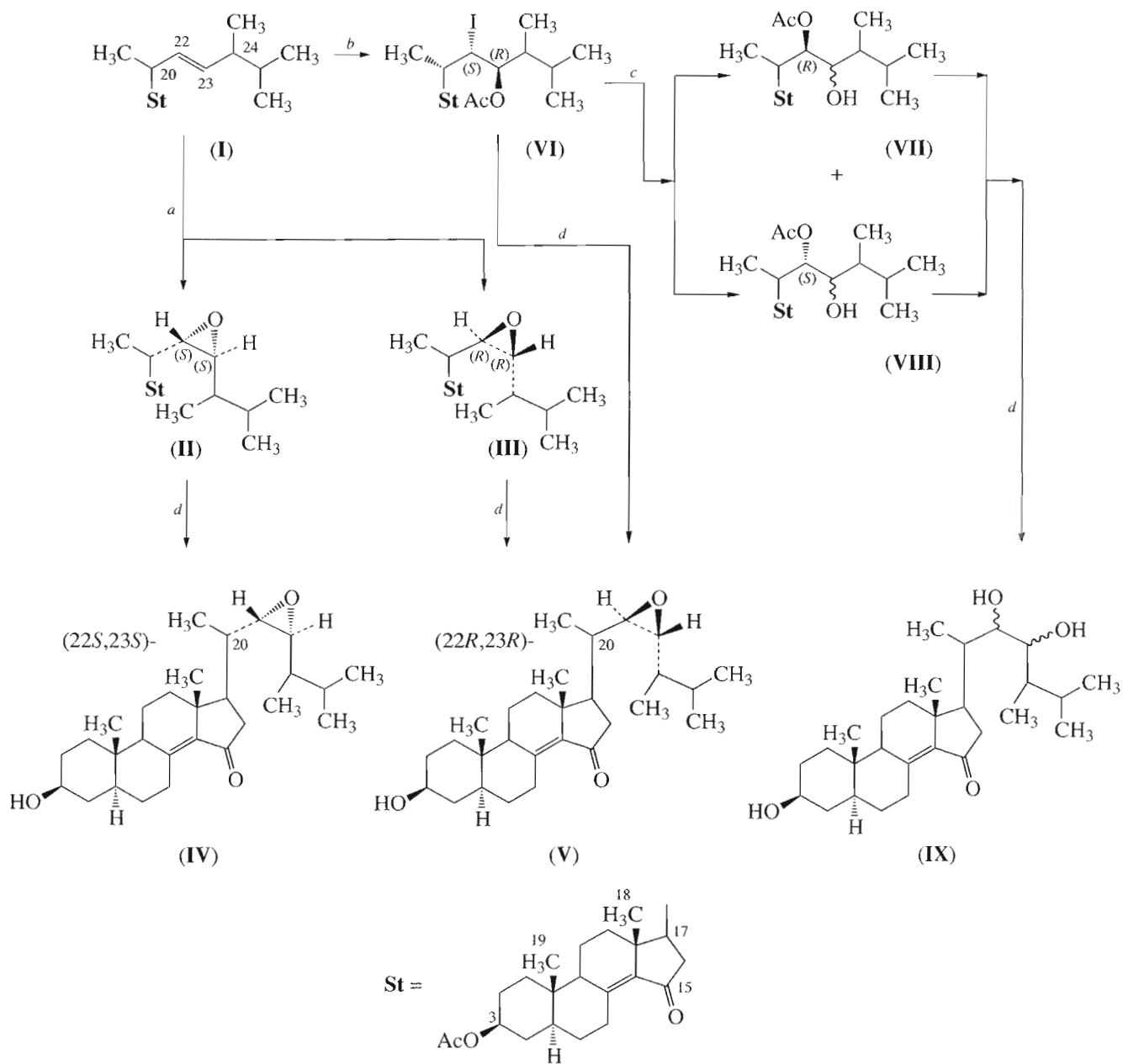


Схема 1. *a* – CPBA/CHCl₃, NaHCO₃, кипячение, 90 мин; *b* – I₂, AcOAg/95% водная AcOH, 20 мин; *c* – AcOAg/95% водная AcOH, кипячение, 120 мин; *d* – K₂CO₃/MeOH–H₂O, кипячение, 20 мин.

22*R*,23*R*-конфигурацией эпоксидных групп. Отнесение конфигурации этих хиральных центров проводили сравнением экспериментально полученных значений $J_{H_{20},H_{22}}$ и $J_{H_{23},H_{24}}$ в соединениях (IV) и (V) со значениями тех же КССВ, рассчитанных с использованием программы “NuserChem 6.0” для энергетически выгодных конформеров (22*S*,23*S*,24*S*)-3β-гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5α-холест-8(14)-ен-15-она (рисунок, *a*) и (22*R*,23*R*,24*S*)-3β-гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5α-холест-8(14)-ен-15-она (рисунок, *б*). Из рисунка следует, что в обоих изомерах энергетичес-

ки выгодной является конформация, в которой эпоксидный кислород ориентирован анти-перипланарно относительно C17, при этом значения двугранных углов HC20C22(S)H и HC20C22(R)H и соответствующих КССВ достоверно различаются. Сравнение экспериментальных и рассчитанных значений $J_{H_{20},H_{22}}$ и $J_{H_{23},H_{24}}$ в обоих изомерах позволило приписать соединениям (II) и (IV) конфигурацию 22*S*,23*S*, а соединениям (III) и (V) – конфигурацию 22*R*,23*R*.

Для введения C22,C23-диольной группировки мы использовали гидроксилирование (22*E*)-22,23-

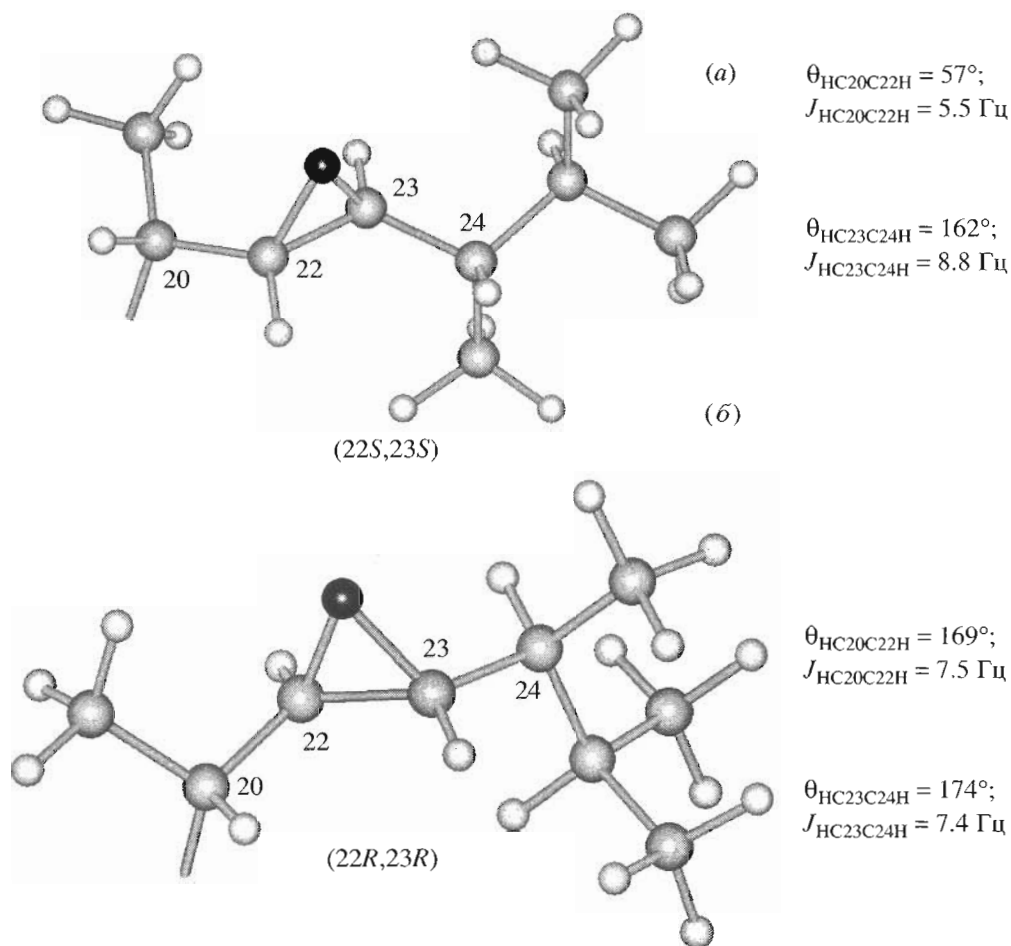


Рисунок. Энергетически выгодные конформации фрагментов C20-C28, значения указанных двугранных углов и КССВ, рассчитанные для (22*S*,23*S*,24*S*)-3β-гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5α-холест-8(14)-ен-15-она (а) и (22*R*,23*R*,24*S*)-3β-гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5α-холест-8(14)-ен-15-она (б).

двойной связи соединения (I) по методу Вудварда. Взаимодействие соединения (I) с йодом в присутствии AsOAg во влажной AsOH при 20°C привело к соединению (VI) с выходом 70%. О наличии в полученном соединении (VI) остатка йода свидетельствовал его масс-спектр с интенсивным пиком молекулярного иона при m/z 640, о положении атома йода при C22 – спектр ^1H -ЯМР (см. “Эксперимент. часть”). Данные двойного ^1H - ^1H -резонанса при насыщении H23 (4.11, м) и значение КССВ $J_{\text{H22,H23}}$ 9.9 Гц указывало на *транс*-ориентацию йода при C22 и ацетоксигруппы при C23. Обработка соединения (VI) K_2CO_3 в водном MeOH, сопровождающееся дезацетилированием, приводила к единственному продукту – эпоксиду (V), что однозначно доказывало 22*S*,23*R*-конфигурацию заместителей в соединении (VI).

Нагревание соединения (VI) с AsOAg в AsOH приводило к смеси двух основных (выделенных из реакционной смеси в виде одной фракции с выходом 65%) и нескольких минорных продуктов.

Среди продуктов реакции мы не обнаружили соединений с тремя ацетильными группами, обычно образующихся на этой стадии. Анализ основной фракции методами ТСХ и ВЭЖХ показал наличие двух продуктов (VII) и (VIII) в соотношении (1 : 1), которые не удалось разделить препаративно. Спектр ^1H -ЯМР этой смеси выявил наличие в каждом из соединений двух ацетильных групп (синглеты 2.01 и 2.07; 2.01 и 2.10), двух протонов при ацетоксигруппе (мультиплеты 4.72 и 4.85; 4.72 и 5.01) и одного протона при свободной гидроксильной группе (3.72, м), что позволило приписать соединениям (VII) и (VIII) структуру (22*R*)- и (22*S*)-моноацетатов 22,23-диола. При обработке K_2CO_3 в водном MeOH смесь продуктов (VII) и (VIII) превращалась в рацемический (22*RS*,23ξ)-триол (IX). Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР триола (IX) приведены в табл. 1 и 2.

Возможный путь превращения соединения (VI) в смесь (VII) и (VIII), объясняющий рацемизацию при C22, иллюстрирует схема 2. Образую-

Таблица 1. Данные спектров ¹H-ЯМР соединений (IV), (V) и (IX): δ, м. д. (J, Гц)

Номер атома	(IV)	(V)	(IX)
1	1.20 м; 1.72 м	1.24 м; 1.72 м	1.23 м; 1.69 м
2	1.38 м; 1.85 м	1.39 м; 1.84 м	1.37 м; 1.84 м
3	3.63 м	3.63 м	3.64 м
4	1.28 м; 1.62 м	1.30 м; 1.64 м	1.28 м; 1.66 м
5	1.46 м	1.42 м	1.46 м
6	1.32 м; 1.46 м	1.30 м; 1.45 м	1.30 м; 1.47 м
7	1.58; 4.11 м	1.56 м; 4.16 м	1.53 м; 4.13 м
8	—	—	—
9	1.86 м	1.86 м	1.86 м
10	—	—	—
11	1.54 м; 1.65 м	1.56 м; 1.68 м	1.53 м; 1.68 м
12	1.25 м; 2.10 м	1.26 м; 2.07 м	1.23 м; 2.12 м
13	—	—	—
14	—	—	—
15	—	—	—
16	2.10 м; 2.38 м	2.33 м; 2.50 м	2.16 м; 2.32 м
17	1.45 м	1.45 м	1.45 м
18	0.70 с	0.70 с	0.71 с
19	0.95 с	0.95 с	0.99 с
20	1.60 м	1.58 м	1.57 м
21	1.16 д (J 6.6)	1.08 д (J 6.6)	1.08 д (J 6.6)
22	2.33 дд (J 1.8 и 8.1)	2.46 дд (J 2.2 и 7.5)	3.55 м*
23	2.61 дд (J 1.8 и 6.2)	2.54 дд (J 2.2 и 7.5)	3.68 м*
24	1.46 м	1.46 м	1.48 м
25	1.50 м	1.51 м	1.51 м
26	0.91 д (J 6.5)*	0.91 д (J 6.5)*	0.85 д (J 6.5)*
27	0.92 д (J 6.5)*	0.93 д (J 6.5)*	0.89 д (J 6.5)*
28	0.95 д (J 6.6)	0.96 д (J 6.6)	0.94 д (J 6.6)

* Отнесение может быть попарно противоположным.

щийся на первой стадии карбкатион внутримолекулярно атакуется кислородом соседней ацетоксигруппы с образованием двух энантиомерных ацилиевых интермедиатов, которые под действием нуклеофила (молекулы воды или ацетата) дают продукты (VII) и (VIII). Представленные данные не позволяют однозначно охарактеризовать место нуклеофильной атаки в интермедиатах, однако эксперименты по взаимодействию соединения (VI) с различными нуклеофилами в сухом DMF свидетельствовали о присоединении нуклеофильного реагента к карбонильному углероду и разрыву связи между карбонильным углеродом и кислородом при C23. Последнее должно приводить к сохранению 23R-конфигурации, однако, поскольку независимые доказательства отсутствуют, конфигурация C23 в соединениях (VII)–(IX) в данной работе обозначена как неопределенная (ξ).

Первичная оценка способности соединений (IV), (V) и (IX) регулировать метаболизм холестерина была проведена в клетках гепатомы Нер G2. При краткосрочной инкубации в бессывороточной среде соединения (IV), (V) и (IX) подавляли биосинтез холестерина из [¹⁴C]ацетата [8] пропорционально концентрации в культуральной среде, не влияя на биосинтез жирных кислот и триглицеридов. Соединения (IV) и (V) оказались очень сильными ингибиторами биосинтеза холестерина в клетках Нер G2 при 3-часовой инкубации (табл. 3), их активность значительно превосходила таковую для 3β-гидрокси-5α-холест-8(14)-ен-15-она и (22E)-(24S)-3β-гидрокси-24-метил-5α-холеста-8(14),22-диен-15-она, использованных в том же опыте для сравнения. Ингибиторная активность соединения (IX) была заметно слабее.

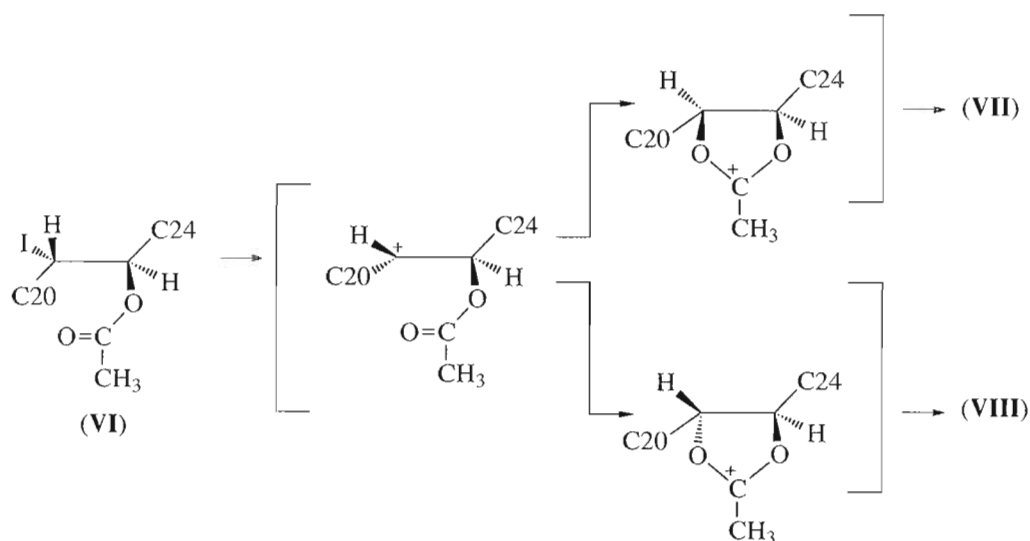


Схема 2. Возможный путь образования соединений (VII) и (VIII) из соединения (VI).

При 24-часовой инкубации с клетками в бессывороточной среде соединения (IV), (V) и (IX) подавляли биосинтез слабее, чем при 3-часовой предын-

кубации. Соединения (V) и (IX) в высоких концентрациях в клетках Нер G2 были цитотоксичны, а соединение (V) не проявляло токсического эффекта в концентрациях до 30 мкМ.

Таблица 2. Химические сдвиги в спектрах ^{13}C -ЯМР (δ , м. д.) соединений (IV), (V) и (IX)

Номер атома	(IV)	(V)	(IX)
1	36.73	36.75	36.75
2	31.18	31.29	30.77
3	71.73	71.12	71.10
4	37.15	37.30	37.34
5	44.90	44.38	44.35
6	29.30	29.31	29.32
7	27.84	27.42	27.84
8	151.69	150.94	151.49
9	50.51	51.09	48.14
10	37.94	38.96	38.09
11	19.73	19.12	19.33
12	38.50	38.37	39.00
13	42.60	42.28	40.73
14	139.55	139.64	139.64
15	207.18	207.54	207.17
16	43.81	42.08	42.67
17	51.68	51.17	51.11
18	13.65	13.68	13.10
19	12.43	13.09	10.02
20	31.81	31.40	30.10
21	21.00	20.63	22.82
22	62.89*	63.64*	73.83*
23	61.75*	60.87*	70.95*
24	31.20	31.29	31.39
25	29.30	29.85	29.84
26	19.72*	19.80*	19.00*
27	19.36*	19.60*	19.79*
28	17.09	16.91	15.18

* Отнесение может быть попарно противоположным.

Таким образом, эпоксиды (IV) и (V), эффективно подавляющие биосинтез холестерина в клетках Нер G2, заслуживают внимания как потенциальные регуляторы метаболизма липидов в печени. Можно также полагать, что дальнейшие исследования этих соединений будут полезны для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе биологической активности $\Delta 8(14),15$ -кетостероидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовались реактивы и растворители фирм "Aldrich", "Merck", "Sigma" и "МедХим-Лаб", $[1-^{14}\text{C}]$ лейцин и $[1-^{14}\text{C}]$ ацетат Na фирмы "Amersham", культуральный пластик и среды фирмы "Costar", FCS фирмы "Gibco BRL". Клетки гепатомы человека линии Нер G2 получены из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC, Salisbury). (22E)-(24S)-3 β -Ацетокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-он (I) и (22E)-(24S)-3 β -гидрокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-он синтезированы по методу [6], 3 β -гидрокси-5 α -холеста-8(14)-ен-15-он – по методу [12].

Спектры поглощения регистрировали на приборе "Yanaco UO 2000" в EtOH; масс-спектры – на приборе "Kratos MS-890" в режиме электронного удара при энергии ионизации 70 эВ; спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР – на приборе АМХИИ-400 (Bruker) в CDCl_3 ; приведены значения химических сдвигов (δ , м. д.) и КССВ (Гц); значения δ CHCl_3 в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР: 7.25 и 77.16 соответственно. Отнесение сигналов скелетных протонов в соединениях (IV), (V) и (IX) проводилось на основании

двумерных гетероядерных спектров (HSQC), а также сопоставлением экспериментальных спектров с литературными данными для родственных соединений [6, 12–17].

ТСХ проводили на пластинках HPTLC Kieselgel UV₂₅₄ и PSC Kieselgel UV₂₅₄ фирмы “Merck”; аналитическую ВЭЖХ – на приборе Du Pont 8800 со спектрофотометрическим детектированием при 258 нм на колонке Octadecyl Si (4.6 мм × 25 см, 5 мкм, Serva), со скоростью потока 1 мл/мин в линейном градиенте MeOH–H₂O (85 : 15)/MeOH; колоночную хроматографию – на силикагеле L 40/100 фирмы “Chemapol”. Прохождение реакций контролировали ТСХ в системах: толуол–EtOAc (9 : 1), гексан–EtOAc (3 : 1) и (3 : 2).

Измерение радиоактивности проводили на счетчике фирмы “ЛКВ” в толуольном сцинтилляторе или в диоксановом сцинтилляторе ЖС-8. Концентрацию клеточного белка определяли модифицированным методом Лоури [18]. Токсичность соединений в клетках Нер G2 оценивали по включению [¹⁴C]лейцина в клеточный белок как описано в работе [10].

(22S,23S,24S)-3β-Ацетокси-24-метил-22,23-оксидо-5α-холест-8(14)-ен-15-он (II) и (22R,23R,24S)-3β-ацетокси-24-метил-22,23-оксидо-5α-холест-8(14)-ен-15-он (III). Смесь ацетата (I) (92 мг, 0.2 ммоль), сухого NaHCO₃ (400 мг) и 160 мг 60% CPBA (0.4 ммоль CPBA) в 5 мл CHCl₃ кипятили 90 мин, затем разбавляли 30 мл CHCl₃, добавляли 10 мл насыщенного раствора Na₂S₂O₃ и 10 мл насыщенного раствора NaHCO₃, перемешивали 10 мин, хлороформный слой промыли насыщенным раствором NaHCO₃, сушили Na₂SO₄ и упаривали. Остаток разделяли хроматографией на силикагеле в системе толуол–EtOAc (9 : 1). Оба изомера (II) и (III) выделены в виде бесцветных стеклообразных пленок с выходом по 40 мг (0.08 ммоль, 40%), (22S,23S,24S)-Изомер (II): ¹H-ЯМР: 0.72 (3 H, c);

0.91 (3 H, д, J 6.5); 0.92 (3 H, д, J 6.5); 0.95 (3 H, c); 0.95 (3 H, д, J 6.5); 1.17 (3 H, д, J 6.8); 2.02 (3 H, c); 2.39 (1 H, дд, J 1.9 и 6.2); 2.42 (1 H, м); 2.65 (1 H, дд, J 1.9 и 8.1); 4.11 (1 H, м); 4.72 (1 H, м). МС, m/z (I, %): 470 (100, M⁺); 301 (42); 151 (31); 149 (48). (22R,23R,24S)-Изомер (III): ¹H-ЯМР: 0.72 (3 H, c); 0.91 (3 H, д, J 6.5); 0.92 (3 H, д, J 6.5); 0.95 (3 H, c); 0.95 (3 H, д, J 6.5); 1.17 (3 H, д, J 6.7); 2.02 (3 H, c); 2.47 (1 H, дд, J 2.2 и 7.5); 2.53 (1 H, дд, J 2.2 и 7.5); 4.16 (1 H, м); 4.72 (1 H, м). МС, m/z (I, %): 470 (100, M⁺); 301 (30); 151 (22); 149 (35).

(22S,23R,24S)-3β,23-Диацетокси-22-йодо-24-метил-5α-холест-8(14)-ен-15-он (VI). К раствору ацетата (I) (46 мг, 0.1 ммоль) в 3 мл AcOH добавляли 0.15 мл воды, вносили AcOAg (43 мг, 0.25 ммоль) и при интенсивном перемешивании по каплям прибавляли нагретый до 45°C раствор 30 мг (0.11 ммоль) I₂ в 1 мл AcOH. Через 20 мин осадок отделяли, промывали толуолом (3 × 15 мл), фильтрат объединяли с толуольным экстрактом, добавляли 10 мл воды, толуольный слой промывали насыщенным раствором NaHCO₃, водой, сушили Na₂SO₄ и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке в системе гексан–EtOAc (3 : 1). Соединение (VI) (46 мг, 0.07 ммоль, 70%) выделено в виде прозрачного масла, закристаллизовавшегося при стоянии; т. пл. 68°C; ¹H-ЯМР: 0.71 (3 H, c); 0.83 (3 H, д, J 6.5); 0.85 (3 H, д, J 6.5); 0.88 (3 H, д, J 6.8); 1.00 (3 H, c); 1.02 (3 H, д, J 6.5); 2.02 (3 H, c); 2.06 (3 H, c); 4.07–4.15 (2 H, м); 4.72 (1 H, м); 5.45 (1 H, дд, J 9.8 и 1.9); МС, m/z (I, %): 640 (36, M⁺); 454 (42); 452 (36); 301 (100); 254 (85).

(22R,23ξ,24S)-3β,22-Диацетокси-24-метил-5α-холест-8(14)-ен-15-он-23-ол (VII) и (22S,23ξ,24S)-3β,22-диацетокси-24-метил-5α-холест-8(14)-ен-15-он-23-ол (VIII). Смесь соединения (VI) (35 мг, 0.055 ммоль), AcOAg (43 мг, 0.25 ммоль) и 3 мл AcOH кипятили 2 ч, осадок отделяли, промывали толуолом (3 × 10 мл), фильтрат объединяли с толуольным экстрактом, добавляли 10 мл воды,

Таблица 3. Влияние соединений (IV), (V), (IX) и родственных Δ8(14)-15-кетостероидов на биосинтез холестерина в клетках Нер G2

Соединение	Ингибирование биосинтеза холестерина (IC ₅₀ , мкМ)		Токсичность при 24-часовой инкубации
	3-часовая инкубация	24-часовая инкубация	
(IV)	0.9 ± 0.2	8.2 ± 1.5	нетоксичен при 30 мкМ*
(V)	0.7 ± 0.2	6.0 ± 1.5	токсичен при 30 мкМ*
(IX)	6.0 ± 1.0	ингибирование 40% при 10 мкМ	токсичен при 20 мкМ*
(22E)-(24S)-3β-Гидрокси-24-метил-5α-холеста-8(14), 22-диен-15-он	3.1 ± 0.4	9.0 ± 2.5	нетоксичен при 30 мкМ*
15-Кетостерин	4.0 ± 0.5	16.0 ± 4.0 [9]	выживаемость 80% при 70 мкМ** [11]

* По включению [¹⁴C]лейцина в белок [10].

** Оценка токсичности с использованием MST.

толуольный слой промыли насыщенным раствором NaHCO_3 , водой, сушили Na_2SO_4 и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке в системе гексан– EtOAc (3 : 2), а затем фракцию, содержащую продукты (VII) и (VIII), подвергали дополнительной очистке ТСХ в той же системе. Смесь соединений (VII) и (VIII) выделена в виде белой воскообразной пленки; выход 19 мг (0.035 ммоль, 65 %). ^1H -ЯМР: 0.71 и 0.72 (3 H, оба с); 0.77 и 0.81 (3 H, оба д, J 6.6); 0.82 и 0.83 (3 H, оба д, J 6.5); 0.90 и 0.94 (3 H, оба д, J 6.8); 0.97 (3 H, с); 2.02 (3 H, с), 2.07 и 2.10 (3 H, оба с); 3.72 (1 H, м); 4.11 и 4.12 (1 H, оба м); 4.72 (1 H, м); 4.85 и 5.01 (1 H, оба м).

Удаление ацетатных защитных групп в соединениях (II), (III) и в смеси соединений (VII) и (VIII) проводили кипячением в течение 20 мин с 10-кратным избытком K_2CO_3 в смеси $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (2 : 1). После экстракции CHCl_3 продукты (IV) и (V) выделяли колоночной хроматографией в системе гексан– EtOAc (3 : 2), продукт (IX) – ТСХ в системе гексан– EtOAc (1 : 1). Выход определяли по оптическому поглощению при 258 нм; данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР см. табл. 1 и 2. (22*S*,23*S*,24*S*)-3 β -Гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (IV), выход 95%, УФ-спектр: λ_{max} 258.0 нм (17300); (22*R*,23*R*,24*S*)-3 β -гидрокси-24-метил-22,23-оксидо-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (V), выход 92%, УФ-спектр: λ_{max} 258.0 нм (17360); (22*R*,23 ξ ,24*S*)-24-метил-5 α -холест-8(14)-ен-3 β ,22,23-триол-15-он (IX), выход 90%, УФ-спектр: λ_{max} 258.0 нм (16200).

Ингибирование биосинтеза холестерина соединениями (IV), (V) и (IX) в клетках Hep G2 [8]. Клетки Hep G2, выращенные в 24-луночных планшетах (содержание клеточного белка 0.2 мг/ячейку), культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2 в среде ОрбиМЕМ: F12 (1 : 1) с 10% FCS, а перед проведением эксперимента выдерживали 24 ч в бессывороточной среде. Исследуемые соединения добавляли к культуральной среде в этанольном растворе (содержание EtOH во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 0.4%).

Клетки инкубировали с соединениями (IV), (V), (IX), (22*E*)-(24*S*)-3 β -гидрокси-24-метил-5 α -холеста-8(14),22-диен-15-оном или 3 β -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-оном в различных концентрациях в бессывороточной среде (в первом опыте в течение 3 ч, во втором опыте в течение 24 ч), после чего вносили [$1\text{-}^{14}\text{C}$]ацетат (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию еще 3 ч. Затем клетки промывали PBS при 4°C, липиды экстрагировали смесью гексан–изопропанол (3 : 2), клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Экстракты концентрировали в токе азота, липиды анализировали ТСХ в системе гексан– Et_2O – AcOH (70 : 29 : 1). После окрашивания парами йода зоны, соответствующие холестерину, холестерилловым эфирам, триглицери-

дам и свободным жирным кислотам, собирали с пластинки и переносили во флаконы для счета радиоактивности. Все эксперименты проведены в четырех повторах.

Уровень биосинтеза холестерина, холестерилловых эфиров, триглицеридов и жирных кислот выражали как количество [^{14}C] (имп./мин), включенное в соответствующую фракцию за 3 ч инкубации с [$1\text{-}^{14}\text{C}$]ацетатом, нормированное на 1 мг клеточного белка; контрольное значение (21600 ± 1600 имп./мин/1 мг) принимали за 100%. Значения IC_{50} получали из графика зависимости уровня биосинтеза холестерина от концентрации исследуемых соединений в культуральной среде.

Авторы благодарны А.П. Плешковой (ИНЭОС им. Н.А. Несмеянова РАН) за регистрацию масс-спектров и В.Л. Флорентьеву (ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН) за любезное предоставление программы “HyperChem 6.0”.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-04-48700) и программы “Молекулярная и клеточная биология” Президиума Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schroeffer G.J. // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. P. 361–554.
2. Muri-Boberg K., Einarsson K., Bjorkhem I. // *J. Lipid Res.* 1990. V. 31. P. 1083–1088.
3. Muri-Boberg K., Lund E., Olund J., Bjorkhem I. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 7967–7985.
4. Bjorkhem I. // *J. Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 455–471.
5. Fernandez C., Suarez Y., Ferruelo A.J., Gomez-Coronado N.M., Lasuncion M.A. // *Biochem. J.* 2002. V. 366. P. 109–119.
6. Мишарин А.Ю., Тимофеев В.П. // *Биоорган. химия.* 2004. Т. 30. С. 84–88.
7. Пийр Е.А., Медведева Н.В., Каширина Н.М., Шевелев А.Я., Мишарин А.Ю. // *Биоорган. химия.* 2004. Т. 30. С. 547–551.
8. Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Brown M.S. // *Methods Enzymol.* 1979. V. 98. P. 241–261.
9. Киселева А.Ф., Горюнова Л.Е., Медведева Н.В., Алки К., Мишарин А.Ю. // *Биохимия.* 1999. Т. 64. С. 456–463.
10. Kanduch A.A., Chen H.W. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 6057–6061.
11. Misharin A.Yu., Kisseleva A.F., Alquier C., Shatalov N.A. // *Med. Chem. Res.* 1999. V. 9. P. 61–68.
12. Wilson W.K., Wang K.-S., Kistic A., Schroeffer G.J. // *Chem. Phys. Lipids.* 1988. V. 48. P. 7–17.
13. Swaminathan S., Siddiqui A.U., Gerst N., Pinkerton F.D., Kistic A., Kim L.J., Wilson W.K., Schroeffer G.J. // *J. Lipid Res.* 1995. V. 36. P. 767–786.
14. Siddiqui A.U., Swaminathan S., Su X., Wilson W.K., Schroeffer G.J. // *Chem. Phys. Lipids.* 1997. V. 86. P. 95–119.

15. Li S., Pang J., Wilson W.K., Schroepfer G.J. // Chem. Phys. Lipids. 1999. V. 99. P. 33–71.
16. Мишарин А.Ю., Штейншнейдер А.Я. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 611–617.
17. Ramyrez J.A., Teme Centurion O.M., Gros E.G., Galagovsky L.R. // Steroids. 2000. V. 65. P. 329–337.
18. Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Folbert N.E. // Analyt. Biochem. 1978. V. 87. P. 206–211.

New $\Delta^8(14)$ -Ketosterols with an Oxygenated Side Chain

H. Yu. Flegentov*, **E. A. Piir***, **N. V. Medvedeva***,
Ya. V. Tkachev**, **V. P. Timofeev****, and **A. Yu. Misharin****

#Phone: +7 (095) 246-3375; e-mail: alexander.misharin@ibmc.msk.ru

*Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119992 Russia

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 117990 Russia

New analogues of 3β -hydroxy- 5α -cholest-8(14)-en-15-one (15-ketosterol) with modified 17-chains [(22*S*,23*S*,24*S*)- and (22*R*,23*R*,24*S*)- 3β -hydroxy-24-methyl-22,23-oxido- 5α -cholest-8(14)-en-15-ones and (22*RS*,23*ξ*,24*S*)-24-methyl- 5α -cholesta- 3β ,22,23-triol-15-one] were synthesized from (22*E*,24*S*)- 3β -acetoxy-24-methyl- 5α -cholesta-8(14),22-dien-15-one. The chiralities of their 22 and 23 centers were determined by NMR spectroscopy. The isomeric 22,23-epoxides effectively inhibited cholesterol biosynthesis in hepatoma Hep G2 cells (IC_{50} 0.9 ± 0.2 and 0.7 ± 0.2 μ M, respectively), and their activities significantly exceeded those of 15-ketosterol (IC_{50} 4.0 ± 0.5 μ M), (22*E*,24*S*)- 3β -hydroxy-24-methyl- 5α -cholesta-8(14),22-dien-15-one (IC_{50} 3.1 ± 0.4 μ M), and the 3β ,22,23-triol synthesized (IC_{50} 6.0 ± 1.0 μ M). The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cholesterol biosynthesis inhibitors, cholesterol metabolism, hepatoma Hep G2 cells, oxysterols