

17 β -Pirazolil- és -pirazolinil-szteroidok szintézise

IVÁNYI Zoltán, GÖRBE Tamás, SZABÓ Nikolett, KISS Anita, WÖLFLING János és
SCHNEIDER Gyula*

Szegedi Tudományegyetem, Szerves Kémiai Tanszék, Dóm tér 8., 6720 Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

A 17 β -helyzetű, *exo*-heterociklusos szteroidok fogalma sokáig a természetes eredetű, kardiotóniás hatású, öttagú butenolid gyűrűt tartalmazó digitoxigeninre, illetve a hattagú pentadienolid szerkezetű bufalinra szorítkozott. A vegyületeknek a gyógyászatban történő felhasználását korlátozza az a tény, hogy a terápiás és a toxikus érték között kicsi a különbség, amely a túladagolás veszélyét jelenti. Az első módosítások a laktongyűrű kapcsolódási helyének megváltoztatására irányultak, de ezek a származékok sem bizonyultak jobbnak a természetes anyagoknál. További átalakítást jelentett a laktongyűrű oxigénjének heteroatommal való cseréje. Így a természetes kardenolidoknak aminolízissel történő átalakítása N-tartalmú laktámokhoz vezetett, amelyek kardenamid megjelölést kaptak. Ezek kardiotóniás hatása kedvezőbb volt, ugyanakkor kitént, hogy a 3 β -hidroxil funkciót hordozó származékok a 17 α -hidroxiláz/C_{17,20}-liáz enzim hatásának visszaszorításában is szerepet játszanak. A Δ^4 -3-ketoszteroid elemet tartalmazók az 5 α -reduktáz gátlásával tűnnek ki. Ezek az enzimek csökkentik a C₁₇-hidroxiszteroidok képződését, végső soron a dihidrotesztoszteron keletkezését, és ezzel visszaszorítják az androgénfüggő betegségek, így a *benignus prostatica hyperplasia* és a *prostatic carcinoma* kialakulását.¹

A C₁₇-es helyzetű *exo*-heterociklusokkal végzett vizsgálatok bizonyították, hogy a heteroatom nemkötő elektronpárjával koordinálódni képes az enzim aktív centrumában lévő vasatomhoz, és ezzel fejti ki a hatását². Miután az elektrondonor atomot (O, N, S) tartalmazó heterociklus kulcsfontosságú feltétele az enzimhatásnak, számos közlemény számol be a C₁₇-*exo*-heterociklusok szintéziséről és a kapott vegyületek biológiai vizsgálatáról.³⁻⁵

A Szegedi Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékének Szteroidkémiai Kutatócsoportjában korábban 17 β -tetrahydrooxazinil-, -dihydrooxazinil-, oxazolidonil-, illetve oxazolinil-szteroidokat állítottunk elő.⁶⁻⁹ Az így készült vegyületek figyelemreméltó enzimgátló aktivitást mutattak. A kutatási program folytatásaként a két N-atomot tartalmazó 17 β -pirazolil-, és -pirazolinil-szteroidok előállítását és vizsgálatát tűztük ki célul.

2. 17 β -Pirazolil-szteroidok

A szubsztituált pirazolok előállításának széles körben alkalmazott módja az 1,3-dikarbonil funkciót tartalmazó vegyületek és a dinukleofil jellegű hidrazin származékok reakciója. Megfelelően szubsztituált kiindulási anyagok esetén ebben az átalakulásban elméletileg két regioizomer keletkezésére van lehetőség. A reakciót

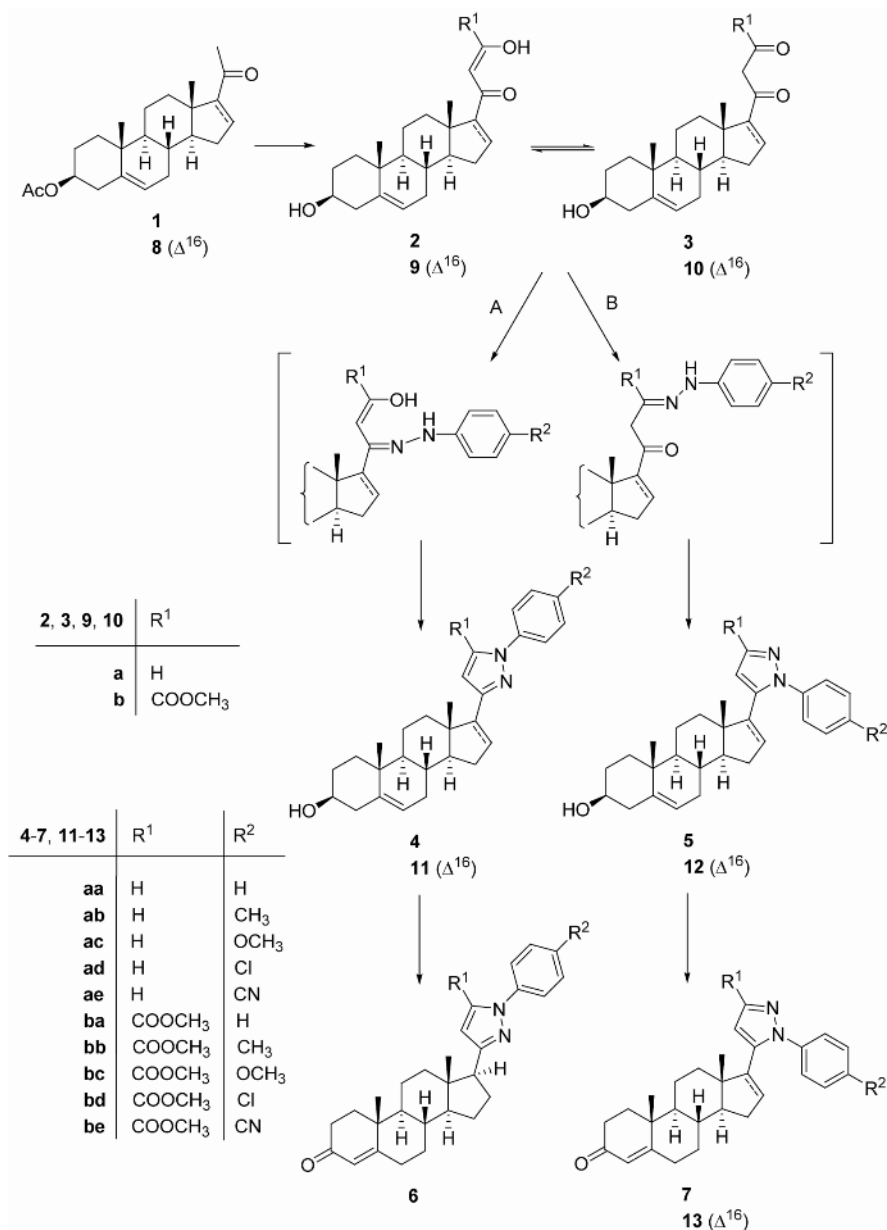
Doorenbos és Milevich a 17 β -pirazolil-szteroidok szintézisére alkalmazta.¹⁰ Munkájuk során a 3 β -hidroxil-21-hidroximetilidénpregn-5-én-20-ont (**2a**) reagáltatták hidrazinnal és annak szubsztituált származékaival. Amíg a metilhidrazinnal végzett átalakításaiknál az elméletileg várható két regioizomer képződött, addig a fenilhidrazin alkalmazásakor a 17 β -(1-fenil-5-pirazolil)androszt-5-én-3 β -ol (**5aa**) volt az egyetlen izolálható termék. Az *exo*-heterociklusos szteroidok előállítására vonatkozó korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy a fenilcsoport, illetve a *p*-szubsztituált fenilcsoport számos esetben beleszól a gyűrűzárási folyamatokba. Ezzel egyidejűleg a biológiai hatásban is szubsztituensfüggés mutatkozik.^{8,9} Ezen korábbi tapasztalatok alapján azt kívántuk megvizsgálni, hogy a fenilhidrazinnal és szubsztituált származékaival végzett gyűrűzárási reakciók valamelyikében az 5'-pirazolil-androsztének (**5aa-ae**) mellett megjelennek-e a 3'-pirazolil izomerek (**4aa-ae**) (1. ábra).

Kísérleteink során a 3 β -acetoxipregn-5-én-20-on (**1**) metilketon oldalláncának etil-formiáttal, nátrium-metilát jelenlétében végzett Claisen kondenzációjával jutottunk a 3 β -hidroxil-21-hidroximetilidénpregn-5-én-20-onhoz (**2a**). A **2a** szüntön ekvivalens az enol-oxo tautóméria folytán mind a 21-formil-20-on (**3a**), mind a 21-hidroximetilidén-20-on formában (**2a**) jelen lehet. A deuterokloroformban mért ¹H-NMR spektrum a **2a** forma túlsúlyát igazolja az egyensúlyi elegyben, míg savas közegben a dikarbonil forma (**3a**) is jelentős mennyiségben kimutatható.¹⁰ A 17 β -(1-fenil-5-pirazolil)androszt-5-én-3 β -ol (**5aa**) előállítására a **2a** kiindulási anyag ecetsavas oldatát 1,1 ekvivalens fenilhidrazinnal, szobahőmérsékleten, 24 órán át reagáltattuk. Azt találtuk, hogy ellentétben az irodalmi megfigyelésekkel¹⁰, az alkalmazott kísérleti körülmények között két termék képződött. Bár ezek R_f értékei kevéssé különböztek, kromatográfiásan elválaszthatók voltak. A poláris termék az NMR vizsgálatok alapján a 17 β -(1-fenil-5-pirazolil)androszt-5-én-3 β -olnak (**5aa**) bizonyult, fizikai állandói az irodalomban leírtakkal megegyeztek.

A kevéssé poláris anyagot az NMR spektrumai alapján a 17 β -(1-fenil-3-pirazolil)androszt-5-én-3 β -olként (**4aa**) azonosítottuk.¹¹

A fenilhidrazin *p*-szubsztituált származékaival végzett gyűrűzárások sajátos eredményt mutattak. Azt találtuk, hogy az elektront vonzó szubsztituensek közül a *p*-Cl (-I_S; +K) és a *p*-CN (-I_S; -K) a keletkezett regioizomerek közül a polárisabb izomerek (**5ad**, **5ae**) képződését segítették. Az elektront küldő szubsztituensek közül a *p*-OCH₃ (-I_S; +K) és a *p*-CH₃ (+I_S; +K(H)) a kevéssé poláris izomerek (**4ab**, **4ac**) mennyiségét növelte. A *p*-helyzetű szubsztituens hatását a ható reagens erősségének megváltozásával értelmezhetjük.

* Főszerző. Tel.: +36 62 544276; e-mail: schneider@chem.u-szeged.hu



1. Ábra.

Az elektront vonzó szubsztituens gyengíti a terminális aminocsoport bázicitását, így az elsődleges reakció a láncvégi formilcsoporttal következik be, amelyet a gyűrűvé zárás követ, és az 1,5-diszubsztituált terméket kapjuk (1. ábra, **B** út). Az elektront küldő szubsztituensek alkalmazása esetén a nitrogénatomok nukleofilítása megnő, és így az aminocsoportnak lehetősége van a kisebb reaktivitású, láncközi C-20-as karbonillal reagálni, majd a gyűrűzárást követően számottevő mennyiségű 1,3-diszubsztituált termékre számíthatunk (1. ábra, **A** út).

A D-gyűrűben telített fenilpirazolil származékok (**4ae** és **5ae**) esetében megkíséreltük a reakciókörülmények változtatásával a regioizomerek arányát befolyásolni. Oldószerként diklórmetánt használva, a bórtrifluorid-diéterát katalízissal végzett átalakítások esetében a termékarány az irodalomban eddig ismeretlen 1,3-diszubsztituált származékok (**4ae**) felé tolódott el¹² (Táblázat).

Táblázat. Regioizomerek arányának szubsztituens- és oldószerfüggése.

Szubsztituens	Izomerek aránya (4:5)	
	CH ₃ COOH/CH ₃ COOK	CH ₂ Cl ₂ /BF ₃ OEt ₂
H	1:5	5:1
CH ₃	1:2	27:1
OCH ₃	2:7	12:1
Cl	1:7	7:2
CN	1:7	1:3

A kidolgozott szintézismódszert kiterjesztettük a pirazolil-gyűrűn metoxikarbonil-csoporttal szubsztituált *exo*-heterociklusos szteroidok előállítására. Az ehhez szükséges 3β-hidroxi-21-metoxalilpregn-5-én-20-on (**3b**) szinten ekvivalenst ugyancsak a 3β-acetoxipregn-5-én-20-onból (**1**) kiindulva, dimetil-oxállal végzett *Claisen* kondenzációval

állítottuk elő. A fenilhidrazinnal, valamint annak *p*-helyzetben szubsztituált származékaival ecetsavban történő gyűrűzárási reakció itt is a regioizomerek keverékét adja, melyek aránya azonban nagymértékben az 1,5-diszubsztituált pirazolil származékok (**5ba-be**) felé tolódik el. A metoxikarbonil-csoport hidrolízisével a vízdékonyságot jelentősen megnövelő karboxilcsoport alakítható ki, amely az élő szervezetben történő felszívódást segíti.

Az irodalmi adatok szerint a D gyűrűben Δ^{16} kettőskötést is tartalmazó androszta-5,16-dién vázas *exo*-heterociklusos szteroidok enzimgátló aktivitása a megfelelő androszt-5-én származékokénál lényegesen nagyobb lehet.⁴ Ez a megfigyelés vezetett arra, hogy a jó kitermelést nyújtó szintézismódszert a 3 β -acetoxipregna-5,16-dién-21-on (**8**) esetében is alkalmazzuk. Dimetil-oxaláttal, nátrium-metilát jelenlétében, toluolban végrehajtott *Claisen* kondenzáció során a Δ^{16} kettőskötésen lejátszódó *Michael* addíciót is tapasztaltunk, amely a nemkívánt 16 β -metoxipregna-5-én-20-on megjelenéséhez vezetett. A katalizátort kálium-*tert*-butiláttal helyettesítve már jó termeléssel tudtuk a 3 β -hidroxi-21-metoxalilpregna-5,16-dién-20-on (**10b**) kiindulási vegyületet előállítani. Megállapítottuk, hogy a **10b** vegyületre kiterjesztett átalakítások is regioizomerek keverékéhez, így a 17 β -(1-fenil-3-metoxikarbonil-5-pirazolil)androszt-5,16-dién (**12ba**) és a 17 β -(1-fenil-5-metoxikarbonil-3-pirazolil)androszta-5,16-diénhez (**11ba**) vezet. Ugyanakkor megállapítható volt, hogy az 5'-pirazolil vegyület (**12ba**) jóval nagyobb mennyiségben képződött, mint a 3'-pirazolil regioizomer (**11ba**). A jelenség lehetséges magyarázata, hogy mind a **3b**, mind a **10b** kiindulási anyagok metoxikarbonil-csoportjának elektront vonzó tulajdonsága megnöveli a láncvégi karbonilcsoport nukleofililitását. Ennek az a következménye, hogy a fenilhidrazin NH₂-csoportjának a gyűrűzárási irányát meghatározó támadása ezen a szénatomon könnyebben megy végbe, így az 5'-pirazolil regioizomer kerül túlsúlyba a termékelegyenben.¹³

Amíg a 3 β -hidroxi-21-metoxalilpregna-5,15-dién-20-on (**10b**) előállítása a kálium-*tert*-butiláttal katalizált *Claisen* kondenzációval kényelmesen megoldható volt, a módszer a 21-hidroximetilidénpregna-5,16-dién-3 β -ol-20-on (**9a**) előállításánál nem járt eredménnyel. Az irodalomban több próbálkozást találunk a vegyület szintézisére, amelyek azonban csak rossz termeléssel, nehezen tisztítható formában voltak kivitelezhetők.^{4,10} Munkánk során sikerült az érzékeny kiindulási vegyületet (**9a**) piridinben, alacsony hőmérsékleten, közel 95 %-os termeléssel előállítani. A kétszeres telítetlenséget mutató kiindulási vegyület (**9a**) fenilhidrazinnal végzett átalakítása rossz hozammal játszódott le. A regioizomerek közül megkaptuk a 17 β -(1-fenil-5-pirazolil)androszta-5,16-dién-3 β -olt (**12aa**), míg a másik izomer (**11aa**) csak nyomokban volt kimutatható. Ugyanakkor a reakcióelegyenben megjelent egy erősen apoláris vegyület, amely az NMR mérések alapján a 17 β -(1-fenil-5-pirazolil)androszta-5,16-dién-3 β -formiátnak bizonyult. A formiátképződést úgy értelmeztük, hogy az érzékeny kiindulási anyagunk (**9a**) ecetsavas közegben *retro-Claisen* kondenzációval részben a kiindulási vegyületté (**8**), részben hangyasav-ecetsav vegyes anhidriddé alakult. Ez utóbbi a keletkezett termék (**12aa**) 3 β -OH csoportjával reagálva a megfelelő formiáthoz vezetett.

A **4aa-ae**, **5aa-ae**, **5ba-be**, **12aa-ae** és a **12ba-be** vegyületek *Oppenauer* oxidációja kielégítő hozammal szolgáltatotta a megfelelő Δ^4 -3-ketoszteroidokat (**6aa-ae**, **7aa-ae**, **7ba-be**, **13aa-ae** és **13ba-be**).

Az általunk előállított *exo*-heterociklusos szteroidok szerkezetét ¹H-, és ¹³C-NMR spektrumaikkal jellemeztük. Így a **4aa-ae** és az **5aa-ae** ¹H-NMR spektrumában a 3 ppm eltolódás alatti alifás tartományban az androsztánváz jelei közül az anguláris metilcsoportnak megfelelő 3-as intenzitású szingulettel emelkednek ki. Mindkét spektrumon megfigyelhetjük a 3-as helyzetű hidrogénnek megfelelő multiplettet, valamint a kettős kötés 6-os szénatomjához kapcsolódó hidrogén jelét. A gyűrűzárási reakciót a spektrum aromás tartományában megjelenő, összesen hét proton bizonyítja, amelyek közül kettő a heteroaromás gyűrűhöz, öt pedig a fenilcsoporthoz rendelhető. Ezek a jelek mindkét regioizomer esetén megfigyelhetők, sorrendjük azonban különböző a két spektrum esetén, amely a fenilcsoportnak a molekulán belül elfoglalt különböző helyzetével értelmezhető. A 3'-pirazolil származékoknál a heteroaromás gyűrű 4'-H jele $\delta = 6,23-6,34$ ppm-nél, míg az 5'-H alacsonyabb térerőnél, $\delta = 7,72-7,90$ ppm-nél jelentkezik. Az 5'-pirazolil származékoknál a 4'-H jele 6,24-6,35 ppm, míg a 3'-H jele 7,57-7,67 között jelentkezik. A megfelelő, D-gyűrűben telítetlen származékok esetén megfigyelhető a 17-es hidrogén jelének az eltűnése. Helyette új jel figyelhető meg, amely a 16-os helyzetű kettőskötés jelenlétét bizonyítja. A metoxikarbonil-pirazolilandroszt-5-én (**4ba**, **5ba** és a metoxikarbonil-pirazolilandroszta-5,16-dién (**11ba** és **12ba**) esetén az észtercsoportnak megfelelő szingulett 3,77, illetve a 3,91 ppm-nél könnyen azonosítható.

3. 17 β -Pirazolinil szteroidok

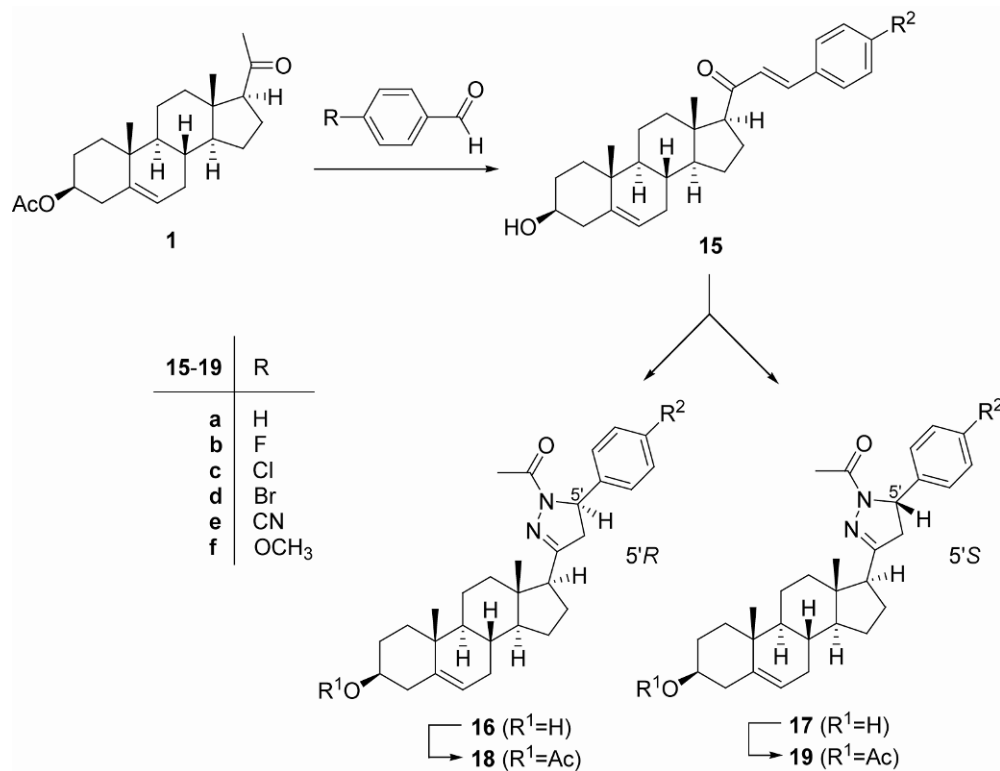
A 17 β -pirazolil-szteroid származékok előállítását követően azok részlegesen telített pirazolin gyűrűt tartalmazó *exo*-heterociklusok szintézisét tűztük ki célul. A részlegesen telített gyűrűrendszer ugyancsak tartalmaz fenil szubsztituens szerkezeti elemet, azzal a különbséggel, hogy a 17 β -pirazolil szteroidoknál *N*-fenil, míg a pirazolinil szteroidoknál *C*-fenil származékok szintézise valósul meg.

A pirazolil gyűrűrendszer kialakítására számos lehetőség kínálkozik.^{14,15} Az androsztánvázás pirazolil-szteroidok szintézisét *Banday* és munkatársai az E-21-benzilidén-3 β -hidroxipregna-5-én-20-onból (**15a**) és a fenilcsoporton szubsztituált származékaiból kiindulva valósították meg.¹⁶ Az ecetsavban, hidrazin-hidrát jelenlétében végzett átalakítással jutottak a kívánt 17 β -pirazolil-szteroidhoz. A pirazolil gyűrűrendszer kialakulásakor egy új kiralitáscentrum jön létre, és így az 5'*R* és 5'*S* epimerek képződésére van lehetőség. A vonatkozó irodalom erről nem tesz említést.

Tekintettel arra, hogy az általunk szintetizált *exo*-heterociklusos szteroidok antiproliferációs vizsgálata tiszta diasztereomerek felhasználásával történik, megvizsgáltuk a fenti reakció sztereokémiai irányítottóságát, az esetleg képződő izomerek jelenlétét.¹⁷ A 3 β -hidroxi-benzilidénpregna-5-én-20-on (**15a-f**) ecetsavas közegben, hidrazin-hidrát jelenlétében 2 óra forralás után teljes átalakulást mutatott. A *tert*-butil-metil-éterrel végzett vékonyréteg-kromatográfiás

vizsgálat két termék (**16a-f** és **17a-f**) együttes jelenlétét mutatta. A kritikus izomerpár kromatográfiás elválasztása ebben a fázisban nem volt megoldható. A nyers termék piridin/ecetsav-anhidrid eleggyel történő acetilezése a megfelelő 3 β -acetátokat (**18a-f** és **19a-f**) szolgáltatta. Ezek kromatográfiás elválasztása *tert*-butil-metil-éter/hexán eleggyel megvalósítható volt. Az elválasztott acetátokat *Zemplén* szerinti dezacetilezéssel visszaalakítottuk a megfelelő 3 β -hidroxi származékokká (**16a-f** és **17a-f**). Az elválasztott vegyületek szerkezetét NMR spektroszkópiával bizonyítottuk. A mérések alapján a nagyobb mennyiségben keletkezett poláris termék az (*5'S*)-17 β -(1-acetil-5-fenil-

3-pirazolinil)androszt-5-én-3 β -ol (**17a**) és szubsztituált származékai (**17b-f**), míg a kisebb mennyiségű, kevésbé poláris termék ezek *5'R* epimerjei (**16a-f**). Az elválasztás előtti termékelegyből végzett ¹H-NMR spektroszkópiai mérések alapján megállapítható volt, hogy epimerek aránya *5'R/5'S* = 1:2 értéknek adódott, függetlenül attól, hogy a különbözőképpen szubsztituált anyagok közül melyikkel végezzük a gyűrűzárási reakciót. A nyers termékelegy vizsgálata azt is igazolta, hogy a pirazolingyűrű NH-csoportjának acetileződése még az ecetsavas reakcióelegyben végbement. Ez tehát nem az elválasztás érdekében, ecetsav-anhidriddel végzett acetilezés eredménye (2. ábra).



2. Ábra.

A **16** és **17** epimerek képződése a telítetlen ketonok és a hidrazin származékok reakciójának általánosan elfogadott mechanizmusa szerint értelmezhető.^{18,19} A reakció első lépése a hidrazin nitrogénjének támadása a karbonilcsoportra. Az általunk vizsgált molekula esetén a C-20-as karbonilcsoporton végbemenő nukleofil támadás iránya függhet a C-18-as anguláris metilcsoport szterikus hatásától. Ennek következtében a kialakuló új kiralitáscentrum konfigurációjára az említett β térállású metilcsoport aszimmetrikus indukciót gyakorol (3. ábra).

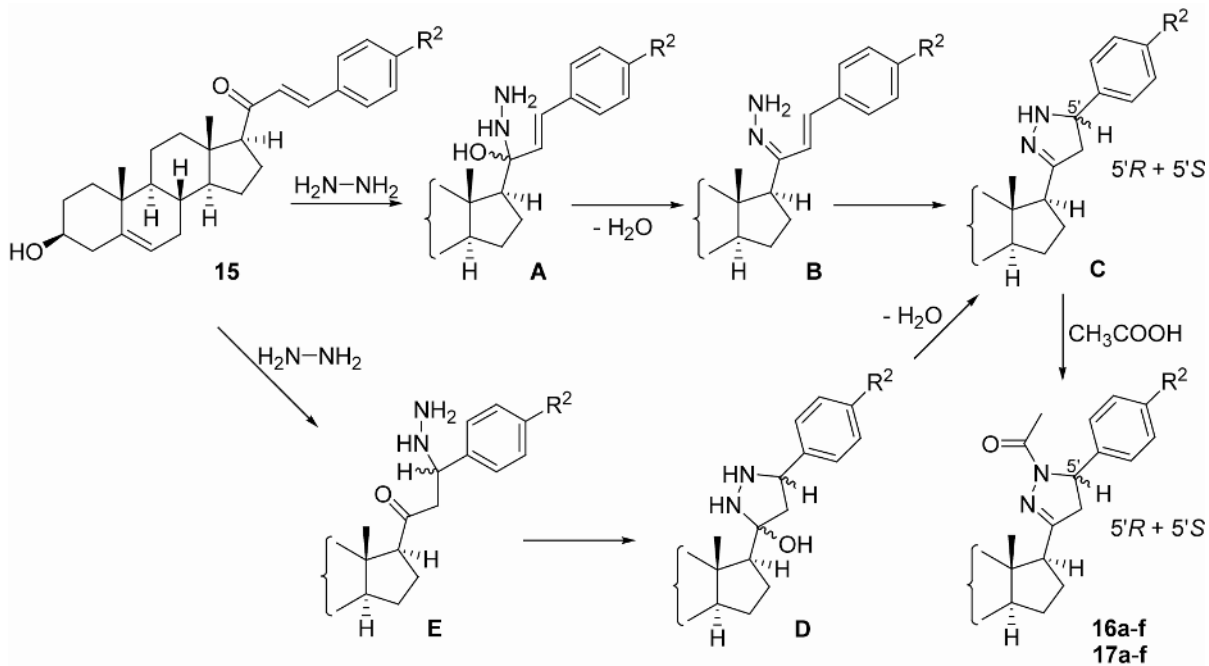
Amennyiben a reakciósor az **A-B-C** utat követi, úgy a vízkilépéssel járó **B** hidrazon képződésekor az említett kiralitáscentrumot elveszítjük, így az nem gyakorol hatást a gyűrűzárási kialakuló aszimmetriacentrum konfigurációjára. Miután az epimerek arányában minden esetben eltérést tapasztaltunk, a reakció lefutását a hidroxipirazolidin átmeneti terméken (**D**) keresztül haladó **A-D-C** utat valószínűsítjük. Ennek során a C-20-as kiralitáscentrum a gyűrűzárási során megmarad, így a kettőskötés egyik oldala a *Michael* addíció szempontjából kedvezményezetté válik. Az

általunk vizsgált rendszerben a hidrazin nitrogénje nagyobb valószínűséggel támad a kedvezményezett α oldalról, így a gyűrűzárási során az *5'S* termék képződik nagyobb arányban.

A reakció lefutásának egy másik lehetőségeként a *Michael* addíció megelőzné a karbonil szénatomon történő hidrazon képződést. Ez alapján az **E-D-C** reakcióút is vezethet a **16a-f** és **16a-f** termékek képződéséhez. Az elemi lépések ilyen jellegű változása a szekunder aminokkal katalizált folyamatoknál figyelhető meg.¹⁵

Az elválasztott izomerek NMR spektrumainak összehasonlításakor kitévő, hogy a 4-CH₂-csoport protonjai az *5'R* és az *5'S* izomer sorozatokban jellegzetes különbségeket mutatnak. A jelenség kétdimenziós NMR spektroszkópiai vizsgálatával (H,H-COSY, HSQC, NOESY) sikerült az izomerek szerkezetigazolását megvalósítanunk.

A szintetizált vegyületek mind antiproliferációs, mind pedig 5 α -reduktáz enzimgátlási vizsgálatra kerültek.²⁰



3. Ábra.

4. Összefoglalás

Kutatómunkánk során 17β-pirazolil-, és -pirazolinil-szteroidok szintézisét valósítottuk meg. A 3β-hidroxi-pregn-5-én-20-on lánchosszabbításával nyert 3β-hidroxi-21-hidroximetilidénpregn-5-én-20-on fenilhidrazinnal és annak p-szubsztituált származékaival gyűrűzárási reakciót végeztünk. A 17β-pirazolil származékok képződésekor az irodalmi adatokkal ellentétben két regioizomer képződését tapasztaltuk, amelyek kritikus izomer párt képeztek. Az izomerek 3β-acetát formájukban kromatográfiásan minden esetben elválaszthatók voltak. A regioizomerek képződésénél a fenilhidrazin szubsztituenseitől függő nagyfokú hatás érvényesült.

A 17β-pirazolinil-szteroidok előállítását a 3β-hidroxi-pregn-5-én-20-on átalakításával kapott 21-benzilidénpregn-5-én-20-on, valamint ennek p-helyzetben szubsztituált származékainak hidrazin-hidráttal történő reakciójával végeztük. A 17β-pirazolinil-szteroidok képződésekor az irodalmi adatokkal ellentétben 5'R és 5'S epimerek 1:2 arányú keveréke keletkezett, melyek kromatográfiásan elválaszthatók voltak.

Mind az elválasztott regioizomerek, mind az izolált epimerek antiproliferációs, valamint 5α-reduktáz enzimgátlási vizsgálatra kerültek.

Köszönetnyilvánítás

A munka az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA K 101659), és az Európai Unió (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0047) támogatásával készült.

Hivatkozások

1. Schneider, G.; Wölfling, J. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 1381–1403.

- Njar, V. C. O.; Brodie, A. M. H. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, *5*, 163–180.
- Ling, Y. Z.; Li, J. S.; Liu, Y.; Kato, K.; Klus, G. T.; Brodie, A. M. H. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3297–3304.
- Njar, V. C. O.; Kato, K.; Nnane, I. P.; Grogorjeev, D. N.; Long, B. J.; Brodie, A. M. H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 902–912.
- Zhu, N.; Ling, Y.; Lei, X.; Handratta, V.; Brodie, A. M. H. *Steroids* **2003**, *68*, 603–611.
- Wölfling, J.; Hackler, L.; Mernyák, E.; Schneider, G.; Tóth, I.; Szécsi, M.; Julesz, J.; Sohár, P.; Csámpai, A. *Steroids* **2004**, *69*, 451–460.
- Wölfling, J.; Oravec, E. A.; Ondré, D.; Mernyák, E.; Schneider, G.; Tóth, I.; Szécsi, M.; Julesz, J. *Steroids* **2006**, *73*, 809–816.
- Ondré, D.; Wölfling, J.; Iványi, Z.; Schneider, G.; Tóth, I.; Szécsi, M.; Julesz, J. *Steroids* **2008**, *73*, 1375–1384.
- Ondré, D.; Wölfling, J.; Tóth, I.; Szécsi, M.; Julesz, J.; Schneider, G. *Steroids* **2009**, *74*, 1025–1032.
- Doorenbos, N. J.; Milevich, I. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3193–3199.
- Iványi, Z.; Wölfling, J.; Görbe, T.; Szécsi, M.; Wittmann, T.; Schneider, G. *Steroids* **2010**, *75*, 450–456.
- Iványi, Z. *Magyar Kémikusok Lapja* **2010**, *LXV*, 391–393.
- Iványi, Z.; Szabó, N.; Wölfling, J.; Szécsi, M.; Julesz, J.; Schneider, G. *Steroids* **2012**, *77*, 1152–1159.
- Pelc, B.; Hodkova, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1969**, *34*, 442–450.
- Lévai, A. *J. Heterocyclic Chem.* **2002**, *39*, 1–13.
- Banday, A. H.; Mir, B. P.; Lone, I. H.; Suri, K. A.; Kumar, H. M. S. *Steroids* **2010**, *75*, 805–809.
- Iványi, Z.; Szabó, N.; Huber, J.; Wölfling, J.; Zupkó, I.; Szécsi, M.; Wittmann, T.; Schneider, G. *Steroids* **2012**, *77*, 566–574.
- Amr, E.; Abdel-Latif, N. A.; Abdalla, M. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 373–384.
- Catsoulacos, P.; Stassinopoulou, C. I. *Heterocyclic Chem.* **1978**, *15*, 313–314.
- Frank, É.; Schneider, G. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *137*, 301–315.

Synthesis of 17 β -pyrazolyl and -pyrazolinyl steroids

1. 17 β -Pyrazolyl steroids

Until recently, an unsaturated lactone ring at position 17 β of steroidal nucleus was considered an essential feature for digitalis-like cardiotonic activity, the ring being a butenolide as in digitoxigenine or a pentadienolide as in bufalin. Various studies have now shown that these natural ring systems can be replaced by other groups without loss of the activity. A cardenolide analog in which the lactone ring is replaced by a nitrogen-containing unsaturated heterocycle was to be almost as active as the parent compound. Pharmacological examinations have shown that the cardiotonic activity of the 17 β -*exo*-heterocyclic steroids is weaker than that of the parent compound, although the ratio of the therapeutic effect to the toxic effect is favorable. Beside cardiotonic activity, a large number of *exo*-heterocyclic steroids display a potential as inhibitors of human cytochrome P450_{17 α} , the enzyme responsible for the conversion of C₂₁ steroids to the related C₁₉ steroids (androgens).

The *Claisen*-condensation of pregnenolone acetate (**1a**) with ethyl formate in the presence of sodium methoxide lead to a 1,3-dicarbonyl compound, the 3 β -hydroxy-21-hydroxymethylidene-pregn-5-en-20-one (**2a**). The reaction of this compound with phenylhydrazine or its substituted derivatives – despite of the earlier literature observations – led to regioisomeric *N*-phenyl pyrazoles (**4aa–ae** and **5aa–ae**). After chromatographic separation of the regioisomers, we pointed out that their ratio depended on the electronic character of the *p*-substituent of the phenylhydrazine. Substituents with an electron-withdrawing character (Cl and CN) afforded predominantly 5'-pyrazolyl derivatives (**5ad–ae**). Electron-donating substituents (CH₃ and OCH₃) gave mainly 3'-pyrazolyl compounds (**4ab–4ac**). An electron-withdrawing substituent in the *para* position in phenylhydrazine decreases the electron density and the nucleophilicity at the N atom. The favored step in this case is the reaction of phenylhydrazine with the more reactive free C-21 aldehyde group of **3a** in the equilibrium mixture. The second step is the ring-closure process, resulting in 5'-pyrazolyl derivatives. Substituents with an electron-donating character increase the electron density and nucleophilicity of the substituted phenylhydrazine, which react with both the C-20 keto and C-21 formyl groups in **2a** and **3a**, resulting predominantly in **4aa–ae** derivatives. We performed experiments to influence the isomeric ratios, and it was found, that when the reaction is carried out in dichloromethane with *Lewis* acid catalyst, the ratio of the 3'-pyrazolyl isomer (**4aa–ae**) significantly increased.

The method was then applied for the preparation of Δ^{16} - (**11aa–ae** and **12aa–ae**), and methoxycarbonylpyrazolyl derivatives (**4ba–be** and **5ba–be**), and for a series in which the two structural elements are combined (**12ba–be**). The synthesis of 3 β -hydroxy-21-hydroxymethylidene-pregna-5,16-dien-20-one (**9a**) was carried out in pyridine with ethyl formate, in the presence of sodium methoxyde at low temperature. The synthesis of the synthon equivalent with methoxycarbonyl group (**9b**) was performed by a *Claisen*-condensation with dimethyl oxalate. In the product mixtures from ring closing reactions of these synthon equivalents the 5'-pyrazolyl regioisomers predominated, the corresponding 3'-pyrazolyl ones formed in lesser or undetectable amounts.

Oppenauer oxidation of the 3 β -hydroxy compounds **4aa–ae**, **5aa–ae**, **5ba–be**, **12aa–ae** and **12ba–be** lead to the corresponding Δ^4 -3-ketosteroids **6aa–ae**, **7aa–ae**, **7ba–be**, **13aa–ae** and **13ba–be** without any degradation of the *exo*-heterocyclic system (Fig. 1).

The structures of the newly synthesized steroidal pyrazoles were determined by NMR spectroscopy. In the ¹H NMR spectra, the signals of the phenyl (or *p*-substituted phenyl) group appear in the aromatic region. In the case of the 3'-pyrazolyl steroids, 4'-H on the heteroaromatic ring resonates at $\delta = 6.23$ – 6.34 ppm, while the

signal of 5'-H can be found at lower fields: $\delta = 7.72$ – 7.90 ppm. 4'-H of the 5-pyrazolyl derivatives can be observed at 6.24–6.35 ppm, and 3'-H at 7.57–7.67 ppm. The ¹³C NMR spectra of the synthesized steroids also contain the signals of the heteroaromatic ring, one for C-4' at ~ 127 ppm, and the C-3' signal at ~ 139 ppm. In 3'-pyrazolyl-, and 5'-pyrazolyl steroids, the multiplet at ~ 3.50 ppm can be assigned to 3-H. In the *Oppenauer*-products 4- (sp²) H is to be found at $\delta = 5.69$ – 5.74 ppm (singlet) in the ¹H NMR spectra, and the 3-H signal disappears, while the C-3-s resonate at ~ 199.5 ppm (¹³C). In the spectra of the methoxycarbonyl pyrazoles a singlet is at 3.77 ppm in the ¹H NMR spectra of the 3'-pyrazolyl, and at 3.91 ppm in that of the 5'-pyrazolyl series.

2. 17 β -Pyrazolinyl steroids

The reactions between α,β -unsaturated ketones and hydrazines are widely used for the preparation of substituted 2-pyrazolines. To obtain pyrazolinylandrostene derivatives and to study the stereochemistry of their formation, we reacted *E*-21-benzylidene-3 β -hydroxypregn-5-en-20-one (**15a–f**) with hydrazine hydrate in acetic acid. The consumption of the starting material was monitored by TLC. Regardless of the starting material, the ring-closure reaction afforded (in contrast with the literature data) a mixture of two steroidal pyrazoline epimers. The spots were distinguishable only when methyl *tert*-butyl ether was used as eluent. The more polar of these two spots was more intense, and the ¹H NMR spectra of the crude mixtures revealed that the product ratio was 1:2. For easier separation, the product mixture was acetylated. For all of the substituted pyrazolines, the two products could be fully separated by column chromatography. After separation, 2D NMR spectra demonstrated that the minor products were the 5*R* epimers (**18a–f**), while the major products were the 5*S* epimers (**19a–f**) of the corresponding phenylpyrazolinylandrostene derivatives. After separation of the acetylated pyrazoline products (**18a–f** and **19a–f**), they were hydrolyzed by the method of *Zemplén* to obtain the 3 β -hydroxy derivatives (**16a–f** and **17a–f**). Their NMR spectra were also taken, and it was proven that the pyrazoline ring with the *N*-acetyl group remained unchanged under the mild conditions of deacetylation (Fig 2.).

For the formation of the epimers (**16a–f** and **17a–f**) three mechanistic pathways may be suggested. According to a widely accepted interpretation (**A–B–C**), the nucleophilic attack of the hydrazine nitrogen takes place on the carbonyl group of the enone, and intermediate **A** is formed containing a chiral carbon atom (C-20). In the case of the present molecules, the direction of the nucleophilic attack may be affected by the steric hindrance of the angular 18-CH₃, and one side of the carbonyl group therefore becomes more favorable. Then with the elimination of the one molecule of water, a hydrazone **B** is formed, with the loss of the C-20 asymmetric center. Intramolecular *Michael* addition of the NH₂ group of **B** to the double bond leads to pyrazoline **C**. This step is probably not affected by the steric effect of the angular 18-CH₃, as it is several bonds away from it, and this should therefore result in an approximately 1:1 ratio of the epimers. The acetylation of **C** by the solvent leads to the formation of the *N*-acetyl products **16a–f** and **17a–f**. Another possible mechanistic pathway (**A–D–C**) starts with the formation of **A**, but without the elimination of water a ring-closure step takes place next, furnishing a hydroxypyrazolidine intermediate **D**. As the asymmetric center at C-20 is still present in the ring closure step, its configuration determines the configuration of the new chiral carbon atom (C-5'). As the two epimers of intermediate **A** may not be present in 1:1 ratio because of the steric effects mentioned above, the 5*S* and 5*R* epimers of **C** (and therefore **16a–f** and **17a–f**) may not form in equal quantities, which is in agreement with our experimental findings. According to some statements in the literature, the *Michael* addition of the hydrazine derivative can be regarded as the first step, but this mechanism (**E–D–C**) needs special experimental evidence (Fig. 3).