

DOI: 10.33184/dokbsu-2019.6.8

## Синтез и цитотоксичность новых производных 20-оксо-29-нор-лупанов

З. И. Галимова<sup>1</sup>, Л. З. Тимербаева<sup>1</sup>, А. А. Федорова<sup>1</sup>, З. Р. Зилеева<sup>2</sup>,  
Т. В. Иванова<sup>2</sup>, Э. Ф. Хуснутдинова<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

<sup>3</sup>Институт химии РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

\*Email: [elmah@inbox.com](mailto:elmah@inbox.com)

Осуществлен синтез новых производных платановой кислоты полученных модификацией С2, С3 и С30-положений тритерпенового остова. Изучение цитотоксичности выявило потенциальную противоопухолевую активность для С2-моно- и С2,С30-дипиридиниледенопроизводных метилплатаноата.

**Ключевые слова:** тритерпеноиды, платановая кислота, противоопухолевая активность.

Разработка противоопухолевых агентов на основе тритерпеноидов является актуальным направлением медицинской химии. Так, для производных платановой кислоты (29-нор-20-оксолупаны) отмечена цитотоксичность в отношении различных клеточных линий, а также противовирусная и противовоспалительная активности [1–3]. Представляется актуальным расширение ранее синтезированного ряда [4–6] производных 20-оксо-луп-производных.

Первоначально на основе бетулина **1** получали диацетоксибетулин **2**, аллильное бромирование которого с использованием NBS в среде ССl<sub>4</sub> приводило к 30-бром-лупану **3** (Схема). Озонолиз соединения **3** в среде хлористого метилена при –40 °С приводил к 30-бром-20-оксо-производному **4**. Платановую **6** и 30-гидрокси-20-оксо-лупановую **7** кислоты получали путем окисления бетулоновой кислоты **5** озоном. Взаимодействие метилового эфира платановой кислоты с 3-пиридинкарбальдегидом в условиях реакции Кляйзена-Шмидта позволило получить С2,С30-бис- и С30-моно-пиридинилденпроизводные **9** и **10**. Структура соединений установлена с использованием ЯМР спектроскопии. Так, в спектрах соединений **9** и **10** характерным был сигнал С3-оксо-функции при 207 м.д. (ЯМР <sup>13</sup>С), а также сигналы ароматических фрагментов в области 6.71–7.78 м.д. (ЯМР <sup>1</sup>Н).

Изучение цитотоксичности соединений **4**, **6**, **7**, **9**, **10** проведено в отношении клеток эмбриональной почки человека НЕК293, аденокарциномы легких А-549, карциномы

молочной железы MCF-7, нейробластомы SH-SY5Y в опытах *invitro* (табл. 1). Установлено, что соединения **4**, **6**, **7** не проявили противоопухолевой активности в отношении раковых клеток. Для соединения **9** выявлена высокая цитотоксическая активность в отношении раковых клеток со значением  $IC_{50}$  в пределах от 1.46 мкМ до 2.39 мкМ. При этом аналог с моно-С2-пиридилиденовым фрагментом **10** был менее активным со значением  $IC_{50}$  в пределах 21.33–23.34 мкМ. При этом, соединения **9** и **10** были активнее в несколько раз в отношении нормальной клеточной линии человека HEK293.

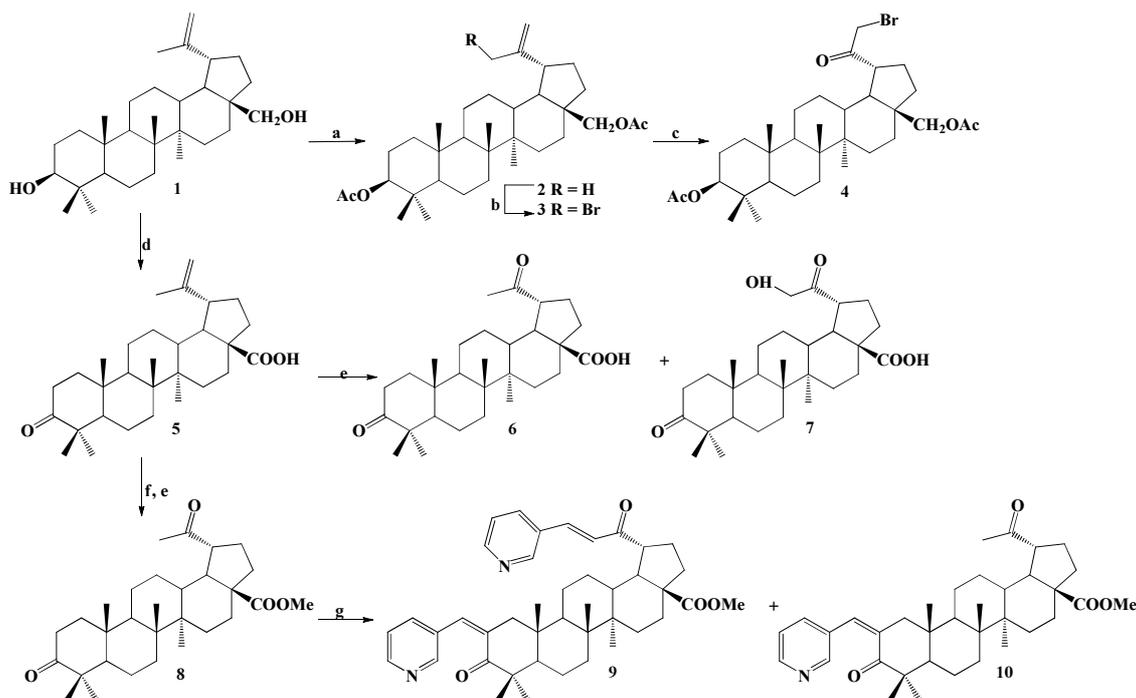


Схема. Условия и реагенты. а.  $Ac_2O$ , пиридин,  $\Delta$ ; б. NBS,  $CCl_4$ , rt; в.  $O_3$ ,  $CH_2Cl_2$ ,  $-40^\circ C$ ; д.  $CrO_3$ ,  $H_2SO_4$ ; е.  $CH_2N_2$ ,  $Et_2O$ ; ф.  $C_5H_4NCHO$ ,  $EtOH$ ,  $KOH$ , rt.

Таблица. Цитотоксическая активность соединений **4**, **6**, **7**, **9**, **10** *in vitro*

Соединение	$IC_{50}$ , мкМ			
	HEK293	A-549	MCF-7	SH-SY5Y
<b>4</b>	>100	>100	>100	$73.38 \pm 1.86$ ( $p=0.000009$ )
<b>6</b>	>100	>100	>100	>100
<b>7</b>	>100	>100	>100	>100
<b>9</b>	$0.6 \pm 0.05$	$1.46 \pm 0.25$	$4.7 \pm 0.47$ ( $p=0,00001$ )	$2.39 \pm 0.48$ ( $p=0,0008$ )
<b>10</b>	$6.14 \pm 0.47$	$21.33 \pm 2.07$ ( $p=0.00002$ )	$22.63 \pm 0.36$ ( $p=0.000013$ )	$23.34 \pm 3.91$ ( $p=0.000012$ )

Примечания. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартное отклонение ( $N=2$ ).

<sup>a</sup> – различия значений  $IC_{50}$ , определенных для клеточных линий опухолевого происхождения относительно значений  $IC_{50}$ , определенных для условно-нормальных клеток (HEK293); однофакторный парный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Даннета.

Таким образом, впервые осуществлен синтез новых производных платановой кислоты, модифицированной по положению С2, С3 и С30. Изучение цитотоксичности показало, что соединения **9** и **10** эффективно подавляют жизнеспособность опухолевых клеток.

### Экспериментальная часть

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали на спектрометре “Bruker AM-300” (Германия, 300 и 75.5 МГц соответственно,  $\delta$ , м.д., КССВ, Гц) в  $\text{CDCl}_3$ , внутренний стандарт тетраметилсилан. Элементный анализ осуществляли на CHNS-анализаторе EuroEA-3000, основной стандарт ацетанилид. Температуры плавления определяли на микростолике “Boetius”. Оптическое поглощение измеряли на поляриметре “Perkin-Elmer 241 MC” (Германия) в трубке длиной 1 дм. ТСХ-анализ проводили на пластинках Сорбфил (ЗАО Сорбполимер, Россия), используя систему растворителей хлороформ-этилацетат, 40:1. Вещество обнаруживали 10% раствором серной кислоты с последующим нагреванием при 100–120 °С в течение 2–3 мин. Соединение **4** описано в [7], **6** и **7** в [8].

### Общая методика синтеза соединений **9** и **10**.

К раствору 0.54 г (1 ммоль) соединения **8** в 20 мл этанола добавляли 0.14 мл (1.5 ммоль) 3-пиридинкарбальдегида, 2.5 мл 40%-ого раствора КОН. Реакционную массу перемешивали в течение 7 ч, далее смесь выделяли в 100 мл 5% раствора HCl. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной среды, остаток сушили на воздухе, очищали с использованием колоночной хроматографии на  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , элюируя петролейный эфир → хлористый метилен с получением соединения **9** (67%) и **10** (30%).

**Метилловый эфир 2,30-ди(4-пиридинилидено)-3,20-диоксо-29-нор-луп-28-овой кислоты 9.** Выход 0.43 г (67%). Rf 0.2. Т. пл. 110 °С.  $[\alpha]_D^{25} +36^\circ$  (с 0.01,  $\text{CHCl}_3$ ). Найдено для  $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{N}_2$  (648.87), %: С, 77.85; Н, 8,14; N, 4.21. Вычислено, %: С, 77.74; Н, 8.08; N, 4.32. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м.д.: 0.72–1.21 (15H, 5с, 5 $\text{CH}_3$ ), 1.13–2.92 (24H, м, CH,  $\text{CH}_2$ ), 3.75 (3H, с,  $\text{CH}_3$ -28), 6.79–8.75 (м, 10H,  $\text{CH}_{\text{аром}}$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м.д.: 15.8, 16.2, 20.3, 21.8, 22.3, 26.1, 27.8, 29.0, 29.4, 31.4, 33.0, 36.4, 37.6, 40.4, 42.4, 44.6, 45.2, 48.4, 48.6, 50.1, 51.5, 51.8, 52.7, 56.4, 123.3, 123.7, 128.3, 128.4, 130.4, 131.7, 133.3, 134.4, 136.3, 136.7, 139.0, 149.0, 150.1, 151.1, 151.3, 176.5 (C-28), 203.3 (C-20), 207.6 (C-3).

**Метилловый эфир 2-(4-пиридинилидено)-3,20-диоксо-29-нор-луп-28-овой кислоты 10.** Выход 0.43 г (30%). Rf 0.4. Т. пл. 146 °С.  $[\alpha]_D^{25} +6^\circ$  (с 0.01,  $\text{CHCl}_3$ ). Найдено для  $\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{N}$  (559.78), %: С, 77.30; Н, 8,91; N, 2.43. Вычислено, %: С, 77.24; Н, 8.82; N, 2.50. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м.д.: 0.75–1.21 (15H, 5с, 5 $\text{CH}_3$ ), 1.13–2.92 (26H, м, CH,  $\text{CH}_2$ ), 2.11 (3H, с, H-30), 3.72 (3H, с,  $\text{CH}_3$ -28), 6.76–8.76 (м, 5H,  $\text{CH}_{\text{аром}}$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м.д.: 28.9, 29.4, 30.1, 33.1, 36.6, 37.4, 38.2, 40.4, 42.3, 45.2, 48.7, 49.2, 51.5, 55.2, 56.5, 122.9, 123.3, 123.8, 130.5, 131.7, 131.8, 133.3, 134.3, 135.2, 136.4, 136.5, 138.8, 139.7, 148.6, 149.1, 150.0, 151.1, 151.5, 176.6 (C-28), 207.6 (C-3), 212.3 (C-20).

Клетки линии НЕК293, A-549, MCF-7, SH-SY5Y культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 мМЛ-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина сульфата. После 24 ч культивирования в каждую лунку вносили исследуемые соединения в конечных концентрациях 1, 10, 100 мкМ (в 0.1% ДМСО) и инкубировали в течение 48 ч. По окончании инкубации к клеткам добавляли коммерческий реагент «PrestoBlue®» (Invitrogen, США) в количестве 1/9 объема культуры. Флуоресценцию красителя измеряли при длине волны 590 нм, используя мультипланшетный анализатор «2300 EnSpire® MultimodePlateReaders» (PerkinElmer, США). Значение концентрации соединений IC<sub>50</sub> определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения «GraphPadPrism v.5.02» (GraphPadSoftwareInc., США). Данные, полученные в 2-х независимых экспериментах, выражали в виде среднего значения 3-х измерений для каждой концентрации ± стандартное отклонение, по отношению к значениям контроля (0.1% ДМСО), принятого за 100%.

*Работа выполнена по теме Госзадания № АААА-А17-117011910023-2.*

## Литература

1. Kim J. Y., Koo H. M., Kim D. S. H. L. Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001. No. 11. P. 2405–2408.
2. Sarek J., Biedermann D., Hajduch M. Triterpenoids derivatives for cancer treatment and preparation thereof. // Patent CZ 301158, filing date 01.09.2008.
3. Mai T. T., Nguyen N. T. N. A new lupanetriterpene from *Tetracerascandens* L., xanthine oxidase inhibitor. // Nat. Prod. Res. 2013. No. 27. P. 61–67.
4. Kazakova O. B., Yamansarov E. Yu., Kukovinets O. S., Medvedeva N. I., Kazakov D. V., Kornilov O. K., Suponitskii K. Yu. Anomalous ozonolysis product of 3 $\beta$ ,28-di-O-acetyl-29-norlupan-20-one-O-methyloxime. // Chem. Nat. Comp. 2011. No. 47. P. 738–740.
5. Kazakova O. B., Khusnutdinova E. F., Kukovinets O. S., Zvereva T. I., Tolstikov G. A. Effective synthesis of 2,3-seco-2,3-dicarboxylatanic acid. // Chem. Nat. Comp. 2010. No. 46. P. 393–396.
6. Flekhter O. B., Giniyatullina G. V., Galin F. Z., Baschenko N. Zh., Makara N. S., Zarudii F. S., Boreko E. I., Savinova O. V., Pavlova N. I., Starikova Z. A., Tolstikov G. A. Synthesis and pharmacological activity of 20-keto-29-norlupane derivatives. Chem. Nat. Comp. 2005. No. 41. P. 706–709.
7. Хуснутдинова Э. Ф., Петрова, А. В., Казакова, О. Б., Бармашов А. Е. Синтез и цитотоксичность С3- и С-28-модифицированных тритерпеновых кислот. // Биоорганическая химия. 2019. Т. 45. №6. С. 658–663.
8. Khusnutdinova E. F., Petrova A. V., Ha Nguyen Thi Thu, Anh Le Thi Tu, Tra Nguyen Thanh, Cham Ba Thi, Babkov D. A., Kazakova O. B. Structural modifications of 2,3-indolobetulinic acid: design and synthesis of highly potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. // Bioorg. Chem. 2019. Vol. 88. No. 102957.

Статья рекомендована к печати кафедрой технической химии и материаловедения Башкирского государственного университета (д-р. техн. наук, доц. А. А. Мухамедзянова)

## **Synthesis and cytotoxicity of new derivatives of 20-oxo-29-nor-lupanes**

Z. I. Galimova<sup>1</sup>, L. Z. Timerbaeva<sup>1</sup>, A. A. Fedorova<sup>1</sup>, Z. R. Zileeva<sup>2</sup>,  
T. V. Ivanova<sup>2</sup>, E. F. Khusnutdinova<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup>*Bashkir State University*

*32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

<sup>2</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences*

*71 Oktyabrya Avenue, 450054, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

<sup>3</sup>*Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Science*

*71 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*\*Email: elmah@inbox.com*

The new platanic acid derivatives modified at the C2, C3 and C30-positions of triterpene core were synthesized for the first time. The study of cytotoxicity against cancer cell lines showed higher potency of C2-mono- and C2,C30-dipiridinylidenoerivatives of methyl platanate.

**Keywords:** triterpenoids, platanic acid, anticancer activity.