

DOI: 10.33184/dokbsu-2019.6.9

Синтез и цитотоксичность 2-(3-пиридин-3-илметилен)-олеаноновой кислоты и ее морфолинамида

А. В. Петрова^{1*}, О. С. Куковинец², З. Р. Зилеева³, Т. В. Иванова³¹Уфимский институт химии УФИЦ РАН

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

²Башкирский государственный университет

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

³Уфимский институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

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

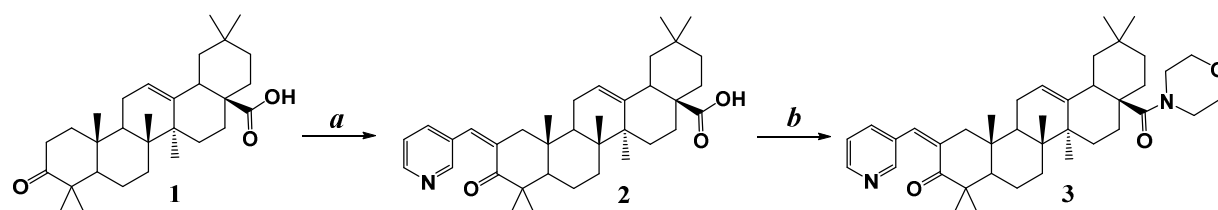
*Email: pnastyu08@mail.ru

Путем последовательных реакций (конденсация Кляйзена-Шмидта, амидирование хлорангидридным методом) синтезированы новые производные олеаноновой кислоты, содержащие в своей структуре фрагменты 3-пиридин-3-илметилена в положении С2 и морфолина в С28, и изучена их цитотоксичность.

Ключевые слова: олеаноловая кислота, синтез, цитотоксичность.

Пентациклический тритерпеноид олеаноловая кислота обладает широким спектром биологической активности, но большой молекулярный вес и низкая растворимость в воде уменьшают ее биодоступность, тем самым ограничивая применение в клинической медицине. Различные модификации направлены на улучшение этих качеств, например окисление положения С3, этерификация С3/С28 или амидирование по положению С28, лактонизация и др. усиливают цитотоксичность [1–3]. Модификации олеаноловой кислоты привели к производным таким как CDDO, которые в разы эффективнее нативной кислоты как противовоспалительные и противоопухолевые агенты [4, 5].

В данной работе представлен синтез двух новых производных олеаноновой кислоты по положениям С2 и С28 и изучена их противоопухолевая активность. Олеаноновую кислоту, полученную окислением реактивом Джонса нативной олеаноловой кислоты согласно [6], конденсировали по реакции Кляйзена-Шмидта с 3-пиридинкарбоксальдегидом в присутствии 40%-ного раствора КОН с образованием 2-(пиридин-3-илметилена)-производного **2** с выходом 95%. Далее его конъюгацией с морфолином через стадию хлорангидрида синтезировали амид **3** с выходом 87%.



Реагенты и условия: а. 3-пиридинкарбоксальдегид, 40% КОН в EtOH, EtOH, 20 °С; б. *i.* (COCl)₂, Et₃N, CH₂Cl₂, 20 °С; *ii.* Морфолин, Et₃N, CH₂Cl₂, Δ.

Изучение цитотоксичности соединений **2** и **3** проведено в отношении клеток эмбриональной почки человека HEK293, аденокарциномы легких A-549, карциномы молочной железы MCF-7, нейробластомы SH-SY5Y в опытах *in vitro* (Таблица). Установлено, что соединения **2** и **3** обладают цитотоксической активностью в отношении как условно-нормальных клеток, так и клеточных линий опухолевого происхождения. Отметим более выраженную способность соединения **2** подавлять жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с его *N*-морфолинамидом **3**.

Таким образом, впервые осуществлен синтез новых бензилиденопроизводных олеаноловой кислоты. Изучение цитотоксичности показало, что соединение **2** и **3** обладают активностью в отношении раковых клеток, при этом соединение **2** подавляет жизнеспособность опухолевых клеток более эффективно.

Таблица. Цитотоксическая активность соединений **2**, **3** *in vitro*

Соединение	IC ₅₀ , мкМ			
	HEK293	A-549	MCF-7	SH-SY5Y
2	20.81 ± 3.32	21.78 ± 4.48	71.59 ± 12.76 (p=0.00002)	23.28 ± 5.52
3	26.55 ± 3.13	>100	>100	16,83±2,37 (p=0.0008)

Примечания. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (N=2).

^a – различия значений IC₅₀, определенных для клеточных линий опухолевого происхождения относительно значений IC₅₀, определенных для условно-нормальных клеток (HEK293); однофакторный парный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Даннета.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали на спектрометре “Bruker AM-300” (Германия, 300 и 75.5 МГц соответственно, δ, м.д., КССВ, Гц) в CDCl₃, внутренний стандарт тетраметилсилан. Элементный анализ осуществляли на CHNS-анализаторе EuroEA-3000, основной стандарт ацетанилид. Температуры плавления определяли на микростолике “Voetius”. 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 °C в течение 2–3 мин.

3-Оксо-2-(пиридин-3-илметил)-олеан-12(13)-ен-28-овая кислота (2). К раствору 0.45 г (1 ммоль) олеаноновой кислоты в 20 мл EtOH добавляли 0.15 мл (1.5 ммоль) 3-

пиридинкарбоксальдегида и 2.5 мл 40% раствора КОН в EtOH. Реакционную смесь перемешивали 8 ч, выливали в H₂O/H⁺ (80 мл), осадок отфильтровывали, промывали H₂O до нейтральной pH, сушили на воздухе. Выход 0.52 г (95%). Rf 0.25. Т. пл. 137 °С. [α]_D²⁵ +35° (с 0.01, CHCl₃). Найдено, %: С 79.63 Н 9.15; N 2.45. C₃₆H₄₉NO₃ (М 543.78). Вычислено, %: С 79.51; Н 9.08; N 2.58. Спектр ЯМР ¹H: 0.80, 0.90, 1.01, 1.11, 1.19, 1.35, 1.40 (7с, 21H, 7CH₃), 1.25–3.20 (м, 22H, СН и СН₂), 5.21 (с, 1H, H-12), 7.35 (м, 1H, Ar-CH), 7.41 (с, 1H, винил), 7.73 (д, 1H, J = 8 Hz, Ar-CH), 8.52 (д, 1H, J = 4.0 Hz, Ar-CH), 8.73 (с, 1H, Ar-CH). Спектр ЯМР ¹³C: 15.5, 16.7, 17.5, 17.7, 18.5, 20.3, 21.3, 24.5, 29.7, 29.9, 30.6, 32.2, 34.2, 36.3, 38.7, 39.6, 42.4, 44.2, 45.2, 45.3, 45.3, 46.0, 53.1, 55.1, 55.1, 123.4, 124.8 (C-12), 128.3, 131.8, 133.6, 137.1 (C-2), 144.4 (C-13), 149.1, 151.0, 178.2 (CON), 207.4 (C-3).

3-Оксо-2-(пиридин-3-илметил)-олеан-12(13)-ен-28-морфолинамид (3). К раствору 0.54 г (1 ммоль) соединения **2** в 20 мл сухого CH₂Cl₂ добавляли по каплям 0.1 мл (1.2 ммоль) (COCl)₂, Et₃N (2 капли) и перемешивали при комнатной температуре 2 ч. Растворитель упаривали в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли 20 мл сухого CH₂Cl₂ 0.09 мл (1 ммоль) морфолина, Et₃N (2 капли), кипятили с обратным холодильником 3 ч. Реакционную смесь промывали 5% раствором HCl (2 × 50 мл), водой (50 мл), сушили над CaCl₂, растворитель упаривали в вакууме водоструйного насоса. Выход 0.43 г (87%). Rf 0.20. Т. пл. 175 °С. [α]_D²⁵ +47° (с 0.01, CHCl₃). Найдено, %: С 78.39; Н 9.21; N 4.57. C₄₀H₅₆N₂O₃ (М 612.88). Вычислено, %: С 78.45; Н 9.29; N 4.47. Спектр ЯМР ¹H: 0.80, 0.90, 1.01, 1.11, 1.19, 1.35, 1.40 (7с, 21H, 7CH₃), 1.39–2.97 (м, 25H, СН и СН₂), 3.41–3.71 (м, 4H, 2CH₂), 5.20 (с, 1H, H-12), 7.36 (м, 1H, Ar-CH), 7.43 (с, 1H, винил), 7.75 (д, 1H, J = 8 Hz, Ar-CH), 8.55 (д, 1H, J = 4.0 Hz, Ar-CH), 8.71 (с, 1H, Ar-CH). Спектр ЯМР ¹³C: 15.5, 16.7, 17.5, 17.7, 18.5, 20.3, 21.3, 22.3, 23.6, 24.5, 28.2, 29.7, 29.9, 30.6, 32.2, 34.2, 36.3, 38.7, 39.3, 39.6, 42.4, 44.2, 45.2, 45.3, 45.3, 46.0, 53.1, 55.1, 55.1, 123.3, 124.8 (C-12), 131.4, 134.0, 135.3, 136.2 (C-2), 144.4 (C-13), 149.3, 151.7, 176.1 (CON), 206.7 (C-3).

Клетки линии НЕК293, А-549, МСF-7, SH-SY5Y культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 мМ L-глутамина 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® Multimode Plate Readers» (Perkin Elmer, США). Значение концентрации соединений IC₅₀ определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism v.5.02» (GraphPad Software Inc., 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-А19-119020890014-7.

Литература

1. Fontana G., Bruno M., Notarbartolo M., Labbozzetta M., Poma P., Spinella A., Rosselli S. Cytotoxicity of oleanolic and ursolic acid derivatives toward hepatocellular carcinoma and evaluation of NF- κ B involvement // *Bioorg. Chem.* 2019. V. 90. 103054.
2. Wang R., Li Y., Huai X-D., Zheng Q-X., Wang W., Li H-J., Huai Q-Y. Design and preparation of derivatives of oleanolic and glycyrrhetic acids with cytotoxic properties // *Drug Design, Dev. and Ther.* 2018. V. 12. P. 1321–1336.
3. Wang R., Yang W., Fan Y., Dehaen W., Li Y., Li H., Wang W., Zheng Q., Huai Q. Design and synthesis of the novel oleanolic acid-cinnamic acid ester derivatives and glycyrrhetic acid-cinnamic acid derivatives with cytotoxic properties // *Bioorg. Chem.* 2019. 102951.
4. Mathis B. J., Cui T. CDDO and its role in chronic diseases // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 929. P. 291–314.
5. Ayeleso T. B., Matumba M. G., Mukwevho E. Oleanolic acid and its derivatives: biological activities and therapeutic potential in chronic disease. // *Molecules.* 2017. V. 22. E1915.
6. Heller L., Schwarz S., Perl V., Kowitsch A., Siewert B., Csuk R. Incorporation of a Michael acceptor enhances the antitumor activity of triterpenic acids // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. V. 101. P. 391–399.

Статья рекомендована к печати кафедрой Технической химии и материаловедения Башкирского Государственного университета (д-р. хим. наук, проф. А. А. Мухамедзянова)

Synthesis and cytotoxicity of 2-(3-pyridine-3-ylmethylene)-oleanolic acid and its morpholinamide

A. V. Petrova^{1*}, O. S. Kukovinets², Z. R. Zileeva³, T. V. Ivanova³

¹*Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Science*

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

²*Bashkir State University*

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

³*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences*

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

*Email: pnastya08@mail.ru

By successive reactions (Claisen-Schmidt condensation, amidation via the acid chloride method), new derivatives of oleanolic acid containing fragments of 3-pyridine-3-ylmethylene in position C2 and morpholine in C28 were synthesized, and their cytotoxicity was studied.

Keywords: oleanolic acid, synthesis, cytotoxicity.