

Венедикт -

На правах рукописи

ВОЛКОВА АННА НИКОЛАЕВНА

**СИНТЕЗ НОВЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ
ТРИТЕРПЕНОИДОВ ЛУПАНОВОГО РЯДА**

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Шульц Эльвира Эдуардовна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук
Глушков Владимир Александрович
старший научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт технической
химии Уральского отделения Российской
академии наук, г. Пермь

кандидат химических наук
Слынько Николай Мефодьевич
старший научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, г.
Новосибирск

Ведущая организация:

**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Иркутский институт химии им. А. Е.
Фаворского Сибирского отделения
Российской академии наук**

Защита диссертации состоится «27» февраля 2015 г. в 9 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 003.049.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук по адресу 630090, г. Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИОХ СО РАН и на сайте по адресу: <http://web.nioch.nsc.ru/nioch2013/ru/>. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.ed.gov.ru/>. Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 9, ученому секретарю диссертационного совета Д 003.049.01; e-mail: dissovet@nioch.nsc.ru/

Автореферат разослан « » января 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор химических наук

Шульц Эльвира Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Природные тритерпеноиды лупанового ряда (бетулин, лупеол) представляют важную группу биологически активных соединений с широким спектром биологического действия. Эти соединения проявляют низкую токсичность по отношению к животным даже при высоких концентрациях, однако низкая растворимость в воде и неблагоприятные параметры адсорбции и метаболизма являются серьезным препятствием для дальнейшего изучения и использования этих веществ в медицинской практике. Доступными производными бетулина являются бетулиновая и бетулоновая кислоты, для которых на сегодняшний день разработаны препаративные методы синтеза на основе бетулина. Бетулиновая кислота проявляет противоопухолевую активность по отношению к различным типам опухолевых клеток и относится к группе противораковых веществ – “митоканов”, биологической мишенью которых являются митохондрии. В последнее время проводятся интенсивные исследования по синтезу производных бетулина и бетулиновой кислоты путем модификации функциональных групп в положениях С-3 и С-28 лупанового остова и получены новые агенты (гликозиды, О-ацильные производные, амиды, карбаматы), которые по противоопухолевой и противовирусной активностям значительно превосходят бетулиновую кислоту. Вместе с тем, следует отметить, что трансформациям по другим положениям лупанового остова (С-2, С-17, С-19 и С-30) уделено значительно меньше внимания и имеющихся данных по взаимосвязи «структура-активность» недостаточно. В связи с вышесказанным разработка методов направленных превращений лупановых тритерпеноидов представляет важную и актуальную задачу.

Настоящая работа выполнялась в соответствии с планами научно-исследовательских работ, проводимых в НИОХ СО РАН по приоритетному направлению 5.6 "Химические проблемы создания фармакологически активных веществ нового поколения", в рамках проектов РФФИ (№ 09-03-00183, 12-03-00535) и грантов Президента Российской Федерации для Государственной поддержки ведущих научных школ (№ НШ-4861.2008.3, НШ-7005.2010.03, НШ-3986.2012.3, НШ-2625.2014.3).

Цель работы. Цель настоящего исследования заключается в разработке селективных методов модификации доступных бетулина и бетулоновой кислоты и синтезе новых азотсодержащих производных лупановых тритерпеноидов, потенциально ценных для медицины*.

В соответствии с поставленной целью выполнение работы сводилось к решению следующих задач:

* Соискатель выражает искреннюю признательность своему непосредственному куратору к.х.н. *Петренко Наталье Ивановне* за внимание и поддержку при выполнении данной работы.

- * получение новых амидов бетулоновой кислоты, содержащих фрагменты различных аминов, α -аланина и его метилового эфира, а также аминов спин-меченых соединений.
- * синтез цианэтильных производных тритерпеноидов лупанового ряда и исследование возможности их превращений в производные, содержащие (1,2,4-оксадиазол-3-ил)этоксильный или (1,2,3,4-тетразол-5-ил)этоксильный заместители в положениях С-3 и (или) С-28 лупанового остова.
- * разработка метода синтеза производных тритерпеноидов, содержащих фрагменты 1,3,4-оксадиазолов в положении С-17.
- * модификация лупановых тритерпеноидов по положению С-30 с использованием методов каталитических превращений (CuAAC реакции) и получение 1,2,3-триазольных тритерпеноидов.
- * синтез 19-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-20,29,30-тринорлупанов реакцией ацилирования тритерпеноидов в присутствии кислоты Льюиса.

Научная новизна и практическая значимость работы. В ходе настоящей работы получено 84 не описанных ранее в литературе производных тритерпеноидов лупанового ряда. Синтезированы новые амиды бетулоновой кислоты, содержащие фрагменты различных аминов, α -аланина и его метилового эфира, а также аминов спин-меченых соединений. Получены цианэтильные производные тритерпеноидов лупанового ряда, на основе которых осуществлен синтез соответствующих амидоксимов, а также гетероциклических производных, содержащих (1,2,4-оксадиазол-3-ил)этоксильный и (1,2,3,4-тетразол-5-ил)этоксильный заместители в положениях С-3 и С-28. На основе превращений хлорангидрида бетулоновой кислоты и хлорангидрида 3β -О-ацетилбетулиновой кислоты предложены эффективные способы синтеза соответствующих гетероциклических производных, содержащих 1,3,4-оксадиазольный цикл в положении С-17. Осуществлен региоселективный синтез 30-[4-арил(алкил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил]луп-20(29)-енов, основанный на катализируемой солями меди(I) реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения 30-азидолуп-20(29)-енов к терминальным алкинам. Показано, что ацилирование луп-20(29)-енов в присутствии кислоты Льюиса и последующая обработка полученных пирилиевых солей аммиаком представляет рациональный способ синтеза 19-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-20,29,30-тринорлупанов. Установлено параллельное протекание реакции ацилирования по кольцу А метилового эфира бетулоновой кислоты с образованием соединений, обладающих фенантро[1,2-g]хроменовой и хризено[1,2-g]хроменовой структурами.

Разработаны удобные методы синтеза широкого ряда производных лупановых тритерпеноидов, содержащих гетероциклические заместители [(1,2,4-оксадиазол-3-

ил)этоксильный, (1,2,3,4-тетразол-5-ил)этоксильный] в положениях С-3 и С-28, 1,3,4-оксадиазольный цикл в положении С-17 и 1,2,3-триазольный цикл в положении С-30, а также пиридианоаннелированный фрагмент по атомам С-20,29,30.

Методами ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопии подтверждено строение всех впервые полученных веществ и установлена регио- и стереонаправленность изучаемых реакций. Методом РСА определены геометрия и структурные параметры азида диацетата бетулина.

На базе медицинского факультета НГУ осуществлено первичное тестирование модифицированных лупановых тритерпеноидов и выявлены перспективные для дальнейшего изучения ингибиторы роста опухолевых клеток человека. В лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН в результате экспериментов *in vivo* выявлены амиды бетулоновой кислоты с комплексной биологической активностью (противовоспалительной, гепатопротекторной и антиоксидантной), которые могут быть перспективны для коррекции нарушений, вызванных токсическими, метаболическими, воспалительными и другими патогенными факторами.

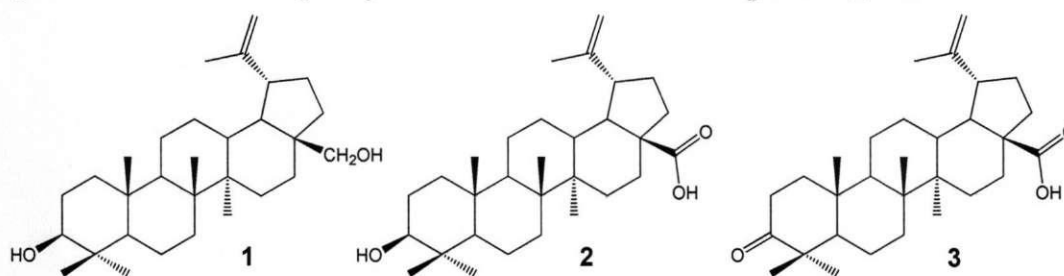
Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на III Международной научной конференции «Химия, структура и функции биомолекул» (Минск, Республика Беларусь, 2008), VII Всероссийской конференции с молодежной научной школой «Химия и медицина, Орхимед-2009» (Уфа, 2009), второй Российско-Корейской конференции "Current issues of natural products chemistry and biotechnology" (Новосибирск, 2010), XIII молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2010), Международной конференции "Current Topics in Organic Chemistry" (Новосибирск, 2011), четвертой Российско-Корейской конференции "Current issues of natural products chemistry and biotechnology" (Новосибирск, 2012), Уральском научном форуме «Современные проблемы в органической химии» (Екатеринбург, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, получен патент РФ, опубликовано 9 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 177 страницах машинописного текста, содержит 9 рисунков, 76 схем и 5 таблиц. Работа состоит из введения, литературного обзора на тему «Химические трансформации бетулина и его производных: успехи создания селективных противоопухолевых и анти-ВИЧ агентов», обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы, включающего 225 наименований, и 4 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объектами исследования являются тритерпеноиды лупанового ряда – бетулин **1**, бетулиновая кислота **2**, бетулоновая кислота **3** и их производные.

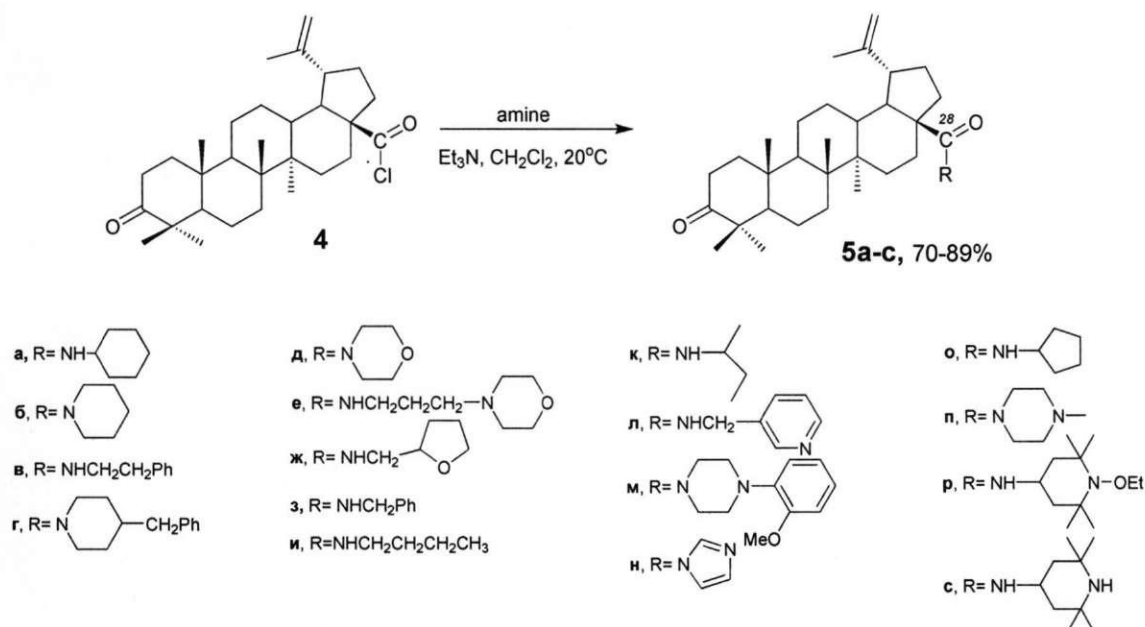


1. Синтез амидов бетулоновой кислоты

Известно, что производные бетулиновой и бетулоновой кислот с азотсодержащими заместителями в положении С-28 (в том числе амиды) обладают разнообразной биологической активностью. В связи с этим с целью поиска новых биологически активных соединений нами осуществлен синтез новых амидов бетулоновой кислоты для последующего изучения их фармакологических свойств. Выбор аминов был обусловлен их доступностью и возможностью получения продуктов с селективным фармакологическим действием (использование фармакофорных аминов).

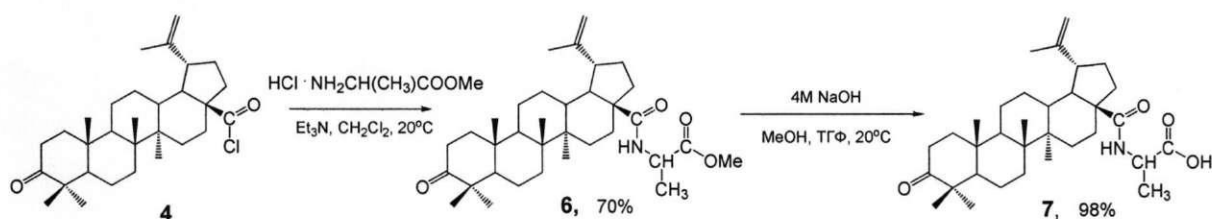
Так, взаимодействием хлорангидрида бетулоновой кислоты **4** с различными аминами получены амиды **5a-c**, содержащие в положении С-28 вторичные или третичные аминогруппы (схема 1). Следует отметить, что вскоре после выполнения данного блока нашего исследования появилось сообщение о высокой цитотоксичности амида **5н** в отношении клеток HepG2, Jurkat и HeLa (IC_{50} 0.8, 1.4 и 2.0 мкМ соответственно) [Santos R.C., et al., Bioorg. Med. Chem., 2009, 17, 6241], что подтверждает целесообразность работы в данном направлении.

Схема 1



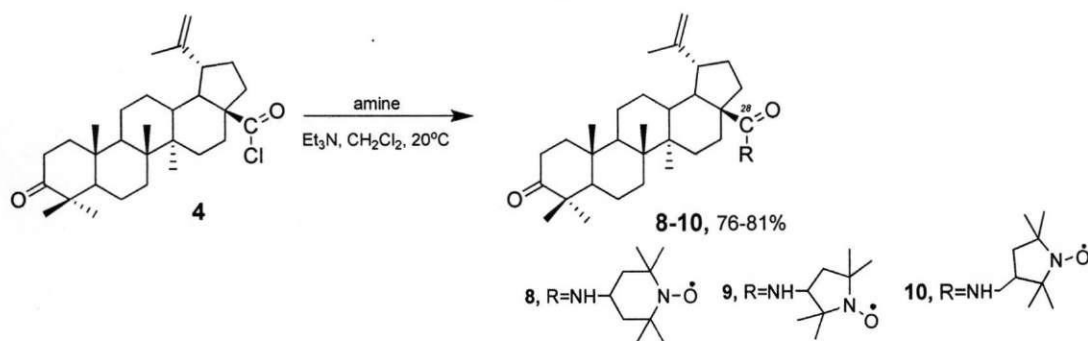
Ранее в лаборатории медицинской химии НИОХ СО РАН были получены β -аланинамиды бетулоновой кислоты, которые проявили себя как эффективные агенты-корректоры, снижающие побочное действие цитостатиков. В связи с этим нами были синтезированы α -аланинамидные производные бетулоновой кислоты **6** и **7** для сравнения их фармакологических свойств со свойствами соответствующих β -аланинамидов (схема 2). Кроме того, повышенный интерес к синтезу соединений **6** и **7** вызван имеющимися в литературе данными о значительной цитотоксической активности α -аланинамида бетулиновой кислоты в отношении меланомы человека MEL-2 (EC_{50} 1.5 мг/мл) и эпидермоидной карциномы мыши KB (EC_{50} 4.6 мг/мл). α -Аланинамид **7** гладко получен щелочным гидролизом метилового эфира α -аланинамида **6**.

Схема 2



В последнее время синтезу спин-меченых производных природных соединений уделяется значительное внимание, поскольку спин-меченые биологически активные соединения можно использовать в качестве контрастирующих агентов в биомедицинских и фармакокинетических исследованиях современными методами ЭПР-спектроскопии и МРТ для наблюдения за их распределением и локализацией в живых системах. Известно, что амиды глицирретовой кислоты, содержащие пиперидиновый или пирролидиновый нитроксильные радикалы в положении C-30, проявили цитотоксическую активность, в 2-4 раза превышающую активность самой глицирретовой кислоты. В данной работе нами были синтезированы спин-меченые амиды бетулоновой кислоты **8-10** (схема 3).

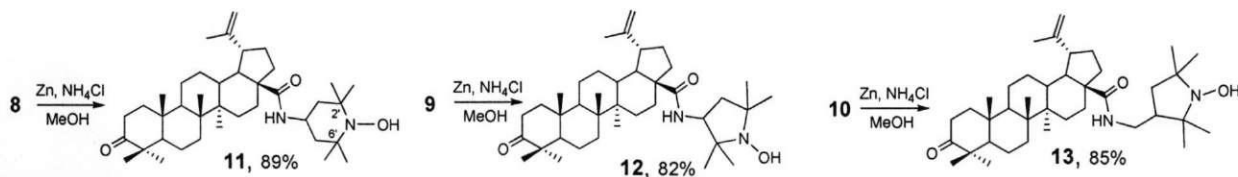
Схема 3



Парамагнитная природа амидов **8-10** не позволяет получить спектральные характеристики этих соединений с помощью спектров ЯМР, которые необходимы для подтверждения строения полученных амидов **8-10**. Гидроксиламины **11-13**

были получены восстановлением соответствующих спин-меченых амидов бетулоновой кислоты **8-10** действием активированного цинка в метаноле в присутствии хлористого аммония (схема 4). Следует отметить, что полученные гидроксиламины **11-13** также представляют интерес в качестве биологически активных соединений.

Схема 4



Таким образом, нами осуществлен синтез новых амидов бетулоновой кислоты, содержащих фрагменты различных аминов, α -аланина и его метилового эфира, а также аминов спин-меченых соединений. Найдены условия селективного восстановления нитроксидов в соответствующие гидроксиламины.

2. Синтез и химические превращения цианэтильных производных тритерпеноидов лупанового ряда

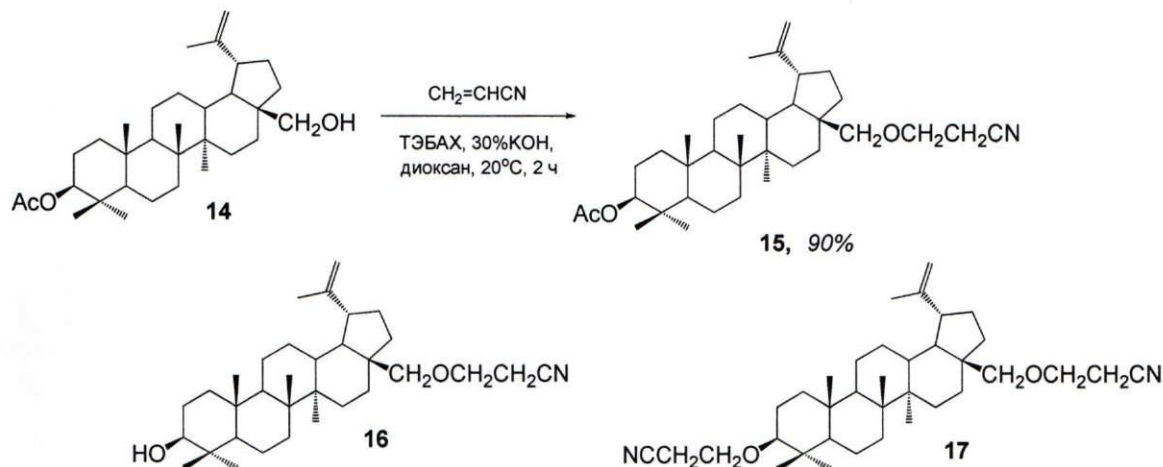
Известно, что перенос функциональной группы из положения С-28 с увеличением длины цепи в бетулиновой и бетулоновой кислотах приводит к увеличению цитотоксической активности и селективности *in vitro* к различным типам опухолевых клеток. Для синтеза производных тритерпеноидов с отнесенными функциональными группами в боковой цепи мы использовали методологию цианэтилирования. Ранее в лаборатории медицинской химии НИОХ СО РАН была показана возможность цианэтилирования тритерпеноидов лупанового ряда на примере бетулина **1** и 3β -О-ацетилбетулина **14**. В данной работе продолжено исследование реакции цианэтилирования тритерпеноидов лупанового ряда и получены новые цианэтильные производные с целью изучения их фармакологических свойств и использования их в качестве базовых соединения для синтеза новых производных с отнесенными функциональными группами.

2.1. Синтез цианэтильных производных тритерпеноидов лупанового ряда

В качестве исходных веществ были использованы различные тритерпеноиды, содержащие как спиртовые, так и NOH-группы. Так, нами показано, что цианэтилирование 3β -ацетилбетулина **14**, содержащего первичную OH-группу в положении С-28, легко приводит к образованию цианэтильного производного **15** (схема 5). Реакцию проводили в диоксане при комнатной температуре в присутствии щелочи (30%-ный KOH) и ТЭБАХ. Добавление ТЭБАХ к реакционной смеси значительно уменьшает время реакции (с 24 ч до 2-3 ч) и, как следствие, повышает чистоту получаемого продукта **15**, поскольку при проведении

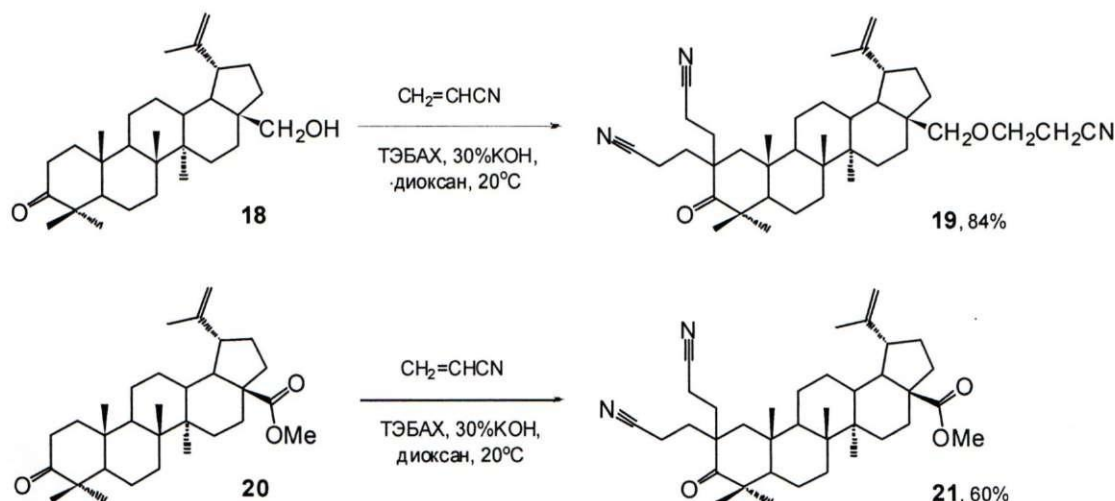
реакции в течение суток, которые требуются при цианэтилировании соединения **14** в отсутствие ТЭБАХ, наблюдается, пусть и незначительное, образование побочных продуктов **16** и **17** вследствие гидролиза ацетатной группы.

Схема 5



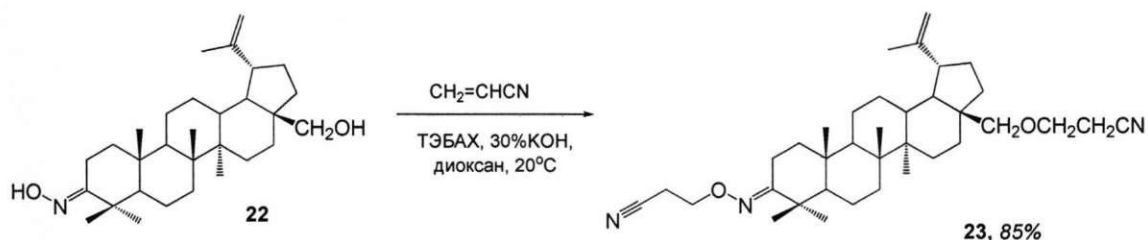
При цианэтилировании 3-кетобетулина **18** в описанных выше условиях в качестве единственного продукта реакции получено соединение **19** с выходом 84%, т.е. происходит не только цианэтилирование ОН-группы, но и присоединение двух цианэтильных групп в α -положение к кетогруппе (схема 6), что согласуется с литературными данными по цианэтилированию кетонов. В результате реакции цианэтилирования метилового эфира бетулоновой кислоты **20**, как и следовало ожидать, образуется 2-дицианэтильное производное **21**. Следует отметить, что получение соединений **19** и **21** представляет определенный интерес в связи с выявленной высокой цитотоксической активностью в отношении ряда опухолевых клеток 2-цианпроизводных 3-кетобетулина, а также 2-аллил- и 2-диаллилзамещенных производных бетулоновой кислоты.

Схема 6



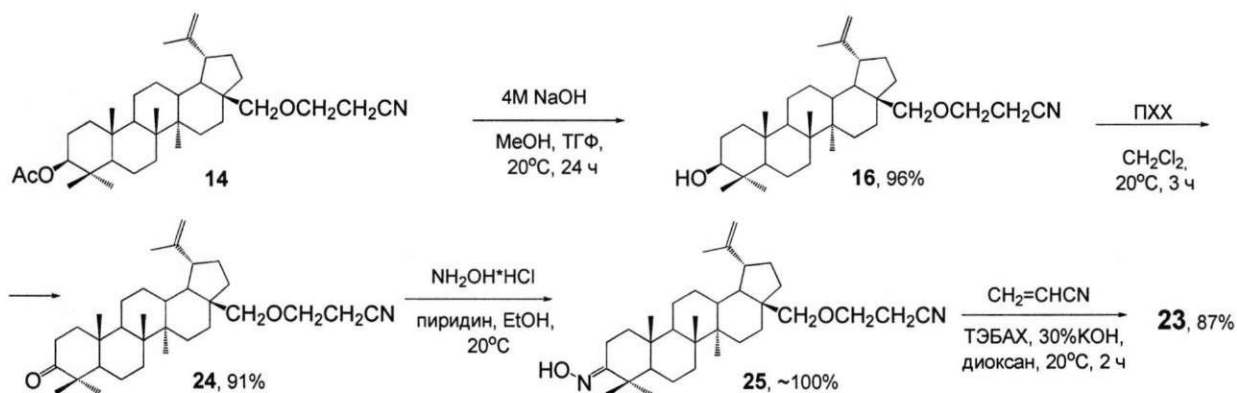
Взаимодействие акрилонитрила с оксимом 3-кетобетулина **22**, содержащим одновременно ОН- и NOH-группы в своем составе, приводит к цианэтилированию обеих групп и образованию соединения **23** с выходом 85% (схема 7).

Схема 7



Таким образом, 3-кето- и 3-гидроксииминопроизводные **24** и **25**, содержащие цианэтоксильные группы в положении С-28, не могут быть получены напрямую реакцией цианэтилирования 3-кетобетулина **18** и оксима 3-кетобетулина **22** (см. схема 6 и 7). Соединения **24** и **25** синтезированы нами путем химической модификации 3 β -ацетилбетулина **14**, уже содержавшего цианэтоксильную группу в положении С-28 (схема 8). Так, щелочной гидролиз 3 β -ацетилпроизводного **14** гладко приводит к образованию 3 β -гидроксипроизводного **16**, окислением которого ПХХ получено 3-кетопроизводное **24**. Реакцией 3-кетосоединения **24** с гидрохлоридом гидроксилamina синтезировано 3-гидроксииминопроизводное **25**. Цианэтилирование оксима **25** приводит к соединению **23**, которое ранее было получено цианэтилированием соединения **22** (см. схема 7).

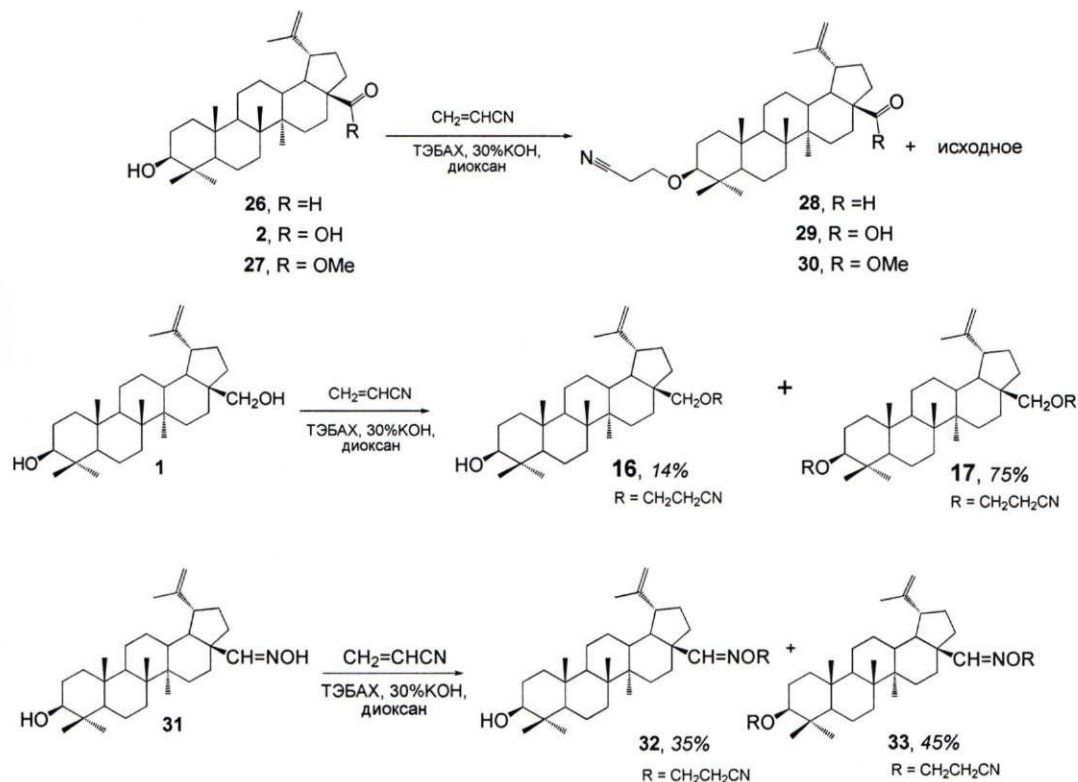
Схема 8



При цианэтилировании тритерпеноидов, содержащих вторичную ОН-группу в положении С-3, в стандартных условиях (диоксан, комнатная температура, 30%-ная КОН, ТЭБАХ) всегда образуется смесь соединений – целевого цианэтильного продукта и исходного тритерпеноида. Состав реакционной смеси зависит от типа заместителя, расположенного в положении С-28 (схема 9). Так, при цианэтилировании бетулинового альдегида **26**, бетулиновой кислоты **2** и ее метилового эфира **27** образуется смесь исходного вещества и продуктов реакции **28**, **29** и **30**, которые были выделены из реакционной смеси с выходом 36%, 53% и 57% соответственно. Цианэтилирование бетулина **1** и оксима бетулинового альдегида **31**, содержащих кроме ОН-группы в положении С-3 дополнительно первичную ОН- или НОН-группы в положении С-28, приводит к смеси моно- и дзамещенных цианэтильных производных **16** и **17**, **32** и **33** соответственно. Увеличение времени реакции, повышение температуры реакционной смеси, а так

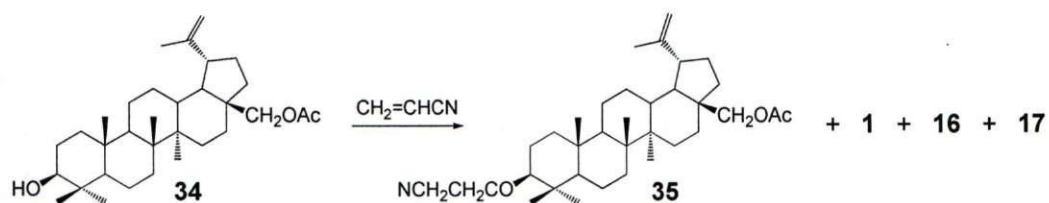
же увеличение количества акрилонитрила не приводило к полной конверсии вторичной ОН-группы в положении С-3, что согласуется с предварительными данными по цианэтилированию бетулина **1**. Степень конверсии вторичной ОН-группы варьирует от 45% до 75% в зависимости от условий проведения реакции и структуры исходного соединения.

Схема 9



Цианэтилирование 28-О-ацетилбетулина **34** в стандартных условиях приводит к образованию продукта **35** с выходом 64%, а также, вследствие частичного гидролиза АсО-группы и реакции цианэтилирования продуктов гидролиза, к получению соединений **1**, **16** и **17** с выходом 22%, 5% и 9% соответственно (по данным ХМС). При замене диоксана на хлористый метилен выход продукта реакции **35** повышается до 88% (по данным ХМС) вследствие замедления гидролиза АсО-группы. Содержание соединений **16** и **17** в реакционной смеси составляет 5% и 7% соответственно, а наличие бетулина **1** в реакционной смеси не зафиксировано.

Схема 10



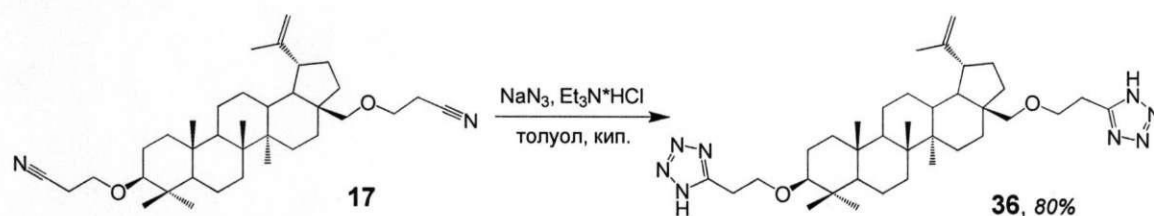
Таким образом, нами предложены эффективные способы синтеза цианэтильных производных тритерпеноидов лупанового ряда как реакцией цианэтилирования тритерпеноидов, так и путем химической трансформации

соединений, уже содержащих в своей структуре цианэтильную группу. Высокие выходы цианэтильных производных обусловили наш интерес к их дальнейшей модификации с получением гетероциклических производных лупановых тритерпеноидов.

2.2. Синтез тетразольных производных тритерпеноидов лупанового ряда

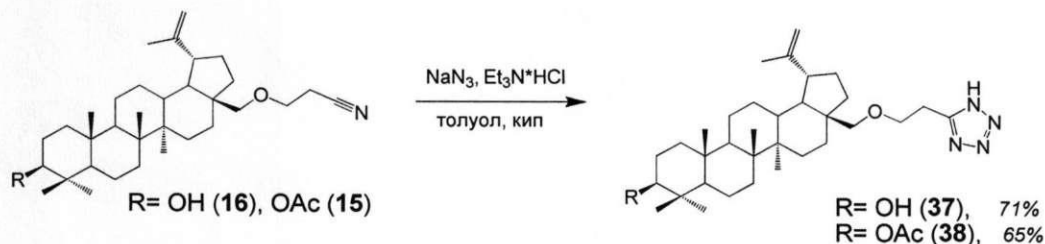
Гетероароматическая система тетразола издавна привлекает внимание исследователей. Тетразольный цикл является фрагментом многих современных лекарственных препаратов антибактериального, антиаллергенного и противовоспалительного действия. Основным способом получения тетразолов является реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения нитрилов к азидам. Перебрав ряд различных методик, описанных в литературе, мы получили искомое тетразольное производное **36**, причем с хорошим выходом (80%), при кипячении соединения **17** и азида натрия в толуоле в присутствии гидрохлорида триэтиламина в течение 20 ч (схема 11).

Схема 11



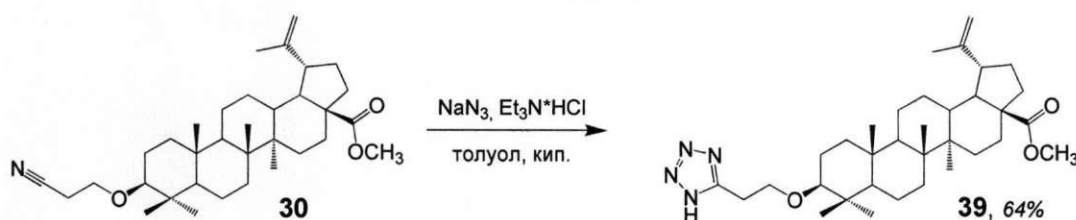
Взаимодействием азида натрия с другими цианэтильными производными бетулина (соединения **15** и **16**) в условиях, найденных нами для соединения **17**, были получены соответствующие тетразольные производные **37** и **38** (схема 12).

Схема 12



Аналогичное превращение наблюдается и для соединения **30** (схема 13). Так, кипячение соединения **30** с азидом натрия в толуоле в присутствии гидрохлорида триэтиламина приводит к образованию соответствующего тетразольного производного **39**, выход которого составил 64%.

Схема 13

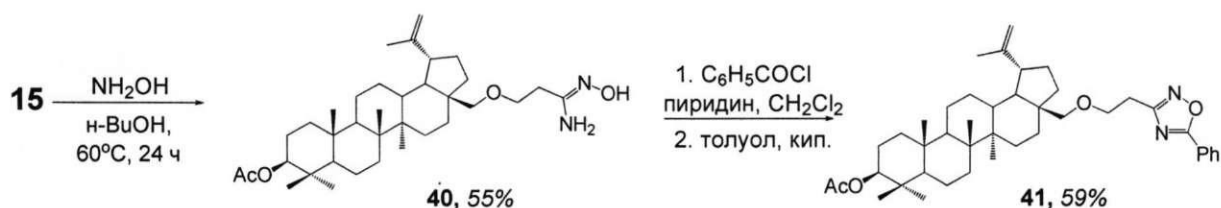


Таким образом, нами предложена методика синтеза производных лупановых тритерпеноидов, содержащих (1,2,3,4-тетразол-5-ил)этоксильный заместитель в положении С-3 и(или) С-28, на основе реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения азиды натрия к цианэтильным производным бетулина, его ацетатного аналога и метилового эфира бетулиновой кислоты.

2.3. Синтез производных лупановых тритерпеноидов, содержащих фрагменты 1,2,4-оксадиазолов

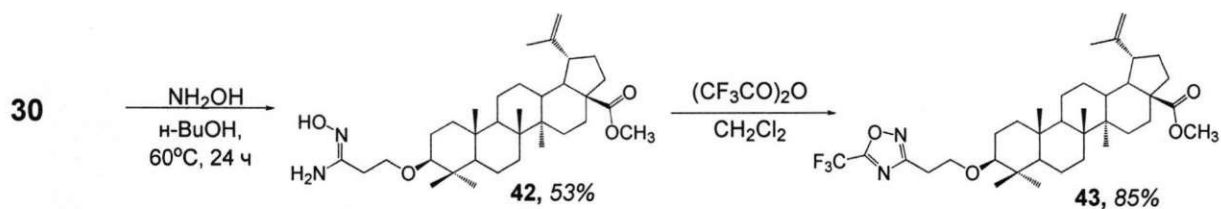
Полученные в данной работе 3β -О-ацетил-28-О-(2-цианэтил)бетулин **15** и метиловый эфир 3β -О-(2-цианэтил)бетулиновой кислоты **30** также были использованы для синтеза гетероциклических производных лупанов, содержащих 1,2,4-оксадиазольный цикл. Введение указанного структурного фрагмента в молекулу тритерпеноидов представляет интерес в связи с фармакологическими (противовоспалительными, противовирусными, противоопухолевыми) свойствами соединений, содержащих 1,2,4-оксадиазольный заместитель. Ключевыми предшественниками указанных гетероциклов являются амидоксимы, основным способом получения которых является взаимодействие нитрилов с солянокислым гидроксиламином в присутствии основания. При использовании стандартной методики амидоксимирования в применении к лупановому нитрилу **15** соответствующий амидоксим **40** образовывался в незначительном количестве (~10%). Выход амидоксима **40** удалось увеличить до 59% при нагревании нитрила **15** со свободным основанием и замене этилового спирта на н-бутиловый спирт. При взаимодействии полученного амидоксима **40** с бензоилхлоридом в присутствии пиридина с последующим кипячением реакционной смеси в толуоле был синтезирован 1,2,4-оксадиазол **41** с выходом 59% (схема 14).

Схема 14



Аналогично был получен амидоксим **42**, взаимодействие которого с трифторуксусным ангидридом гладко приводит к образованию оксадиазола **43** (схема 15).

Схема 15



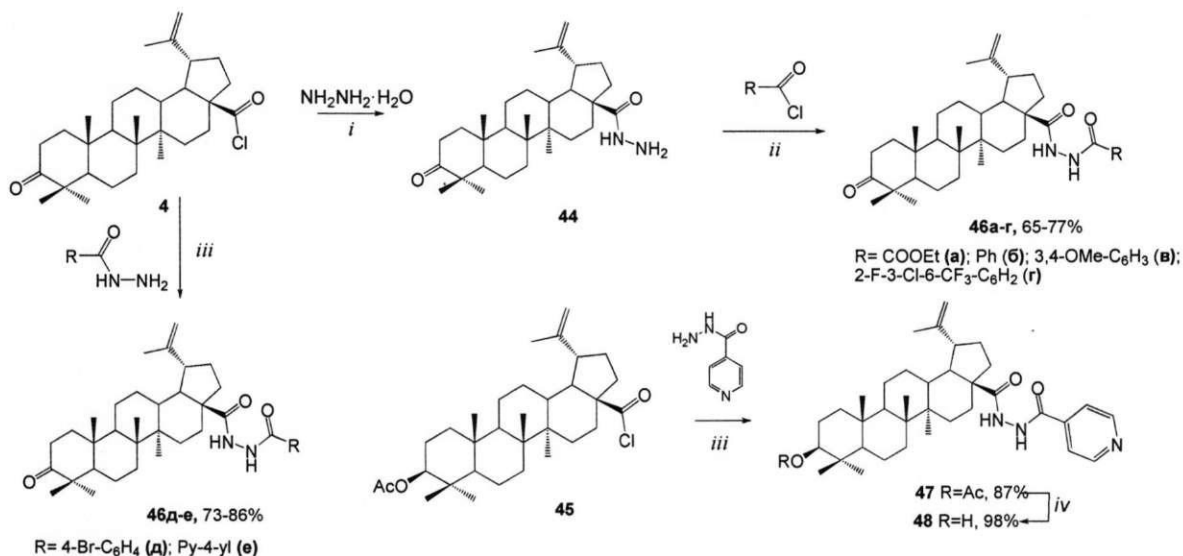
Таким образом, нами впервые получены амидоксимы тритерпеноидов лупанового ряда и показана возможность их использования для синтеза гетероциклических производных, содержащих в своем составе 1,2,4-оксадиазольный цикл.

3. Синтез производных лупановых тритерпеноидов, содержащих фрагменты 1,3,4-оксадиазолов в положении С-17

Соединения, содержащие структурный фрагмент 1,3,4-оксадиазола, также обладают широким спектром биологических активностей, включая противовоспалительную и анальгетическую, противомикробную и противотуберкулезную, противоопухолевую и анти-ВИЧ активности. Кроме того, известно, что соединения, содержащие 1,3,4-оксадиазольное кольцо, которое устойчиво к гидролизу при физиологических значениях pH, представляют возможность биоизостерической замены гидроксамовых эфиров в ряду МЕК ингибиторов (получение метаболитически более стабильных и эффективных ингибиторов).

В данной работе осуществлен синтез новых производных бетулоновой и бетулиновой кислот, содержащих фрагмент 1,3,4-оксадиазола в положении С-17. В качестве исходных соединений нами были использованы хлорангидрид и гидразид бетулоновой кислоты (соединения **4** и **44** соответственно), а также хлорангидрид 3β-О-ацетилбетулиновой кислоты **45**. Так, конденсацией гидразида бетулоновой кислоты **44** с хлорангидридами кислот синтезированы ацилгидразиды **46а-г**, содержащие этоксикарбонильный или арильные заместители (схема 16). Ацилгидразиды **46д,е** получены взаимодействием хлорангидрида бетулоновой кислоты **4** в качестве ацилирующего агента с гидразидом *n*-бромбензойной и

Схема 16

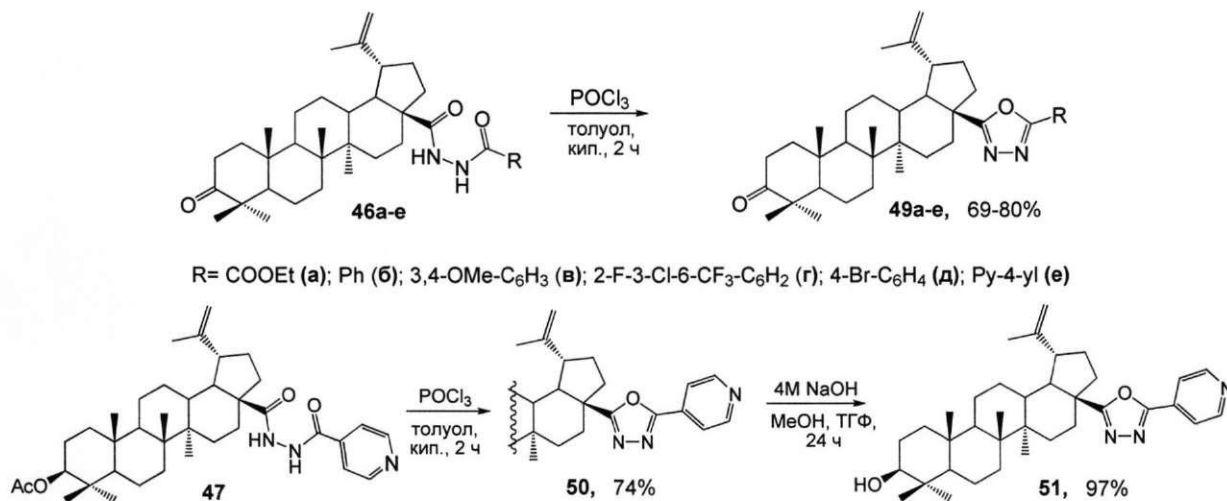


Условия реакций: i) CH₂Cl₂ и ТГФ, 0-20°C, 30 мин.; ii) Et₃N, CH₂Cl₂, 20 °C, 24 ч; iii) Et₃N, CH₂Cl₂ и ДМФА, 20 °C, 24 ч; iv) 4M NaOH, MeOH и ТГФ, 0-20°C, 24 ч.

изоникотиновой кислот.

Из ацилгидразидов **46a-e**, **47** были получены соответствующие 1,3,4-оксадиазольные производные **49a-e**, **50** (схема 17). Щелочной гидролиз соединения **50** гладко приводит к соответствующему гетероциклическому производному бетулиновой кислоты **51**.

Схема 17



Таким образом, нами синтезированы новые производные лупановых тритерпеноидов, содержащие 1,3,4-оксадиазольные фрагменты в положении С-17. Показана возможность использования как хлорангидрида, так и гидразида бетулоновой кислоты для синтеза ацилгидразидов.

4. Синтез 30-(4-арил(алкил)-1,2,3-триазол-1-ил)лупанов

Несмотря на доступность галогензамещенных лупановых тритерпеноидов, а также продуктов окислительных превращений, в частности тритерпеновых 30-гидрокси- и 30-формилпроизводных, направления модификаций по положению С-30 весьма ограничены.

В связи с этим представляет интерес синтез и исследование новых производных лупановых тритерпеноидов, содержащих различные заместители в положении С-30, в том числе 1,2,3-триазольный фрагмент. Известно, что соединения с таким структурным фрагментом проявляют антибактериальную и противоопухолевую активности. В ряду 1,2,3-триазолилзамещенных соединений также найдены селективные ингибиторы протеазы ВИЧ-1 и тирозинкиназы.

В качестве исходных соединений использовали диацетат бетулина **52** и метиловый эфир 3β-ацетилбетулиновой кислоты **53**. На их основе получили новые производные, содержащие фрагменты различных 1,2,3-триазолов в положении С-30. Ключевыми предшественниками 1,2,3-триазолов являются азиды, одним из способов получения которых является взаимодействие бромпроизводных соединений с азидом натрия.

Взаимодействием 30-бромпроизводных **54** и **55**, синтезированных по методике, разработанной ранее в лаборатории медицинской химии НИОХ СО РАН, с азидом натрия получили соответствующие производные диацетата бетулина **56** и метилового эфира 3 β -ацетилбетулиновой кислоты **57**, содержащие азидную группу в положении С-30 (Схема 18). Для азида диацетата бетулина **56** получены данные рентгеноструктурного анализа*. Пространственное строение соединения **56** показано на рис. 1.

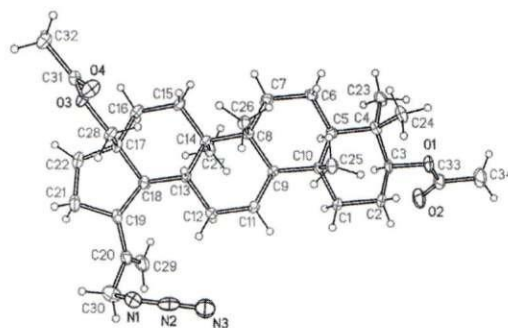
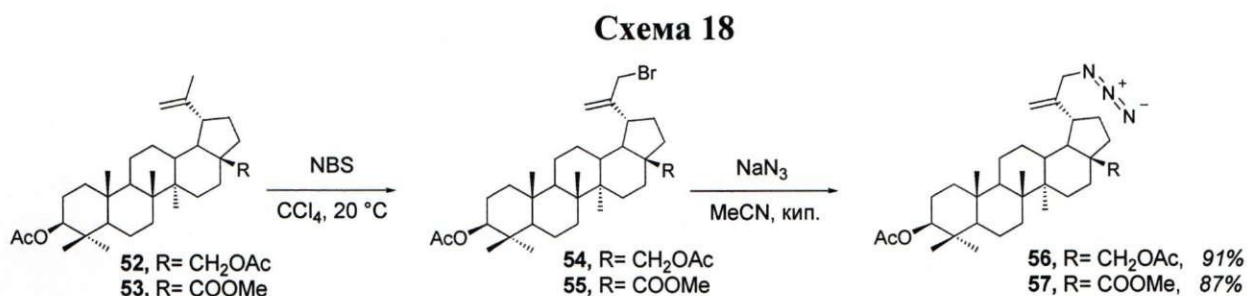
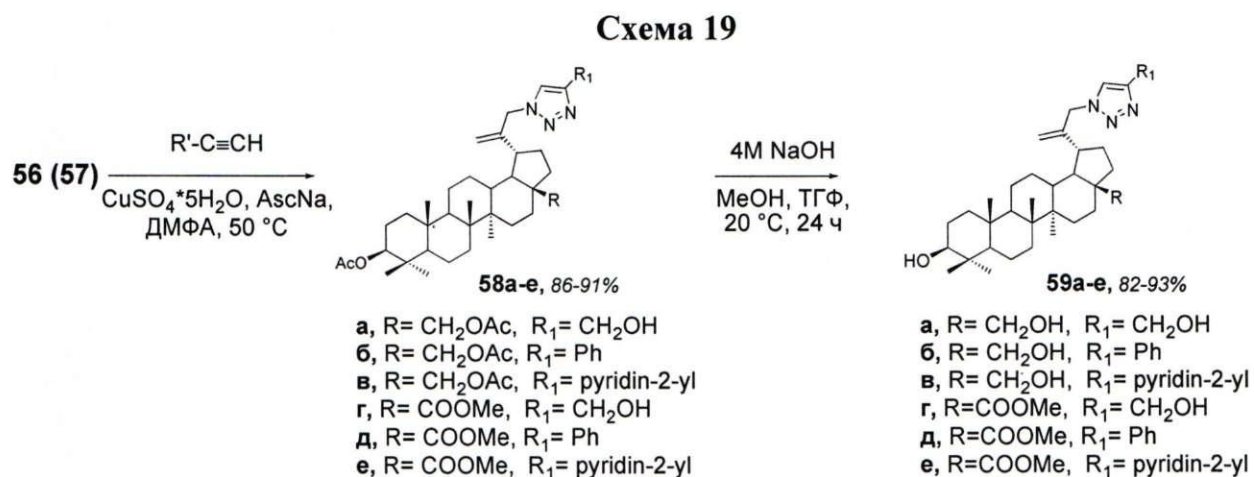


Рис. 1. Пространственное строение соединения **56** по данным РСА



Нами показано, что Cu-катализируемой реакцией 1,3-диполярного циклоприсоединения полученных в работе азидов **56** и **57** к терминальным ацетиленам гладко образуются целевые 1,2,3-триазольные производные **58a-e** (схема 19). Реакцию проводили в среде диметилформамида при нагревании реакционной смеси до 50 $^{\circ}\text{C}$ в присутствии медного купороса и натриевой соли аскорбиновой кислоты.

Щелочным гидролизом соединений **58a-e** получены новые триазольные производные **59a-e**.



* Автор выражает глубокую благодарность научному сотруднику группы РСА лаборатории физических методов исследования НИОХ СО РАН Т.В. Рыбаловой за проведение рентгено-структурного анализа соединения **56** и расшифровку результатов.

Данные спектров ЯМР полученных продуктов указывают на то, что все синтезированные триазолы **58a-e** образуются в виде одного структурного изомера. Так, в спектре ЯМР ^1H наблюдается один однопротонный сигнал (7.50-8.18 м.д.), соответствующий протону триазольного цикла при C-5'. В спектрах ЯМР ^{13}C наблюдаются сигналы C-4',5' триазольного цикла в области 147.70-149.53 м.д. и 119.91-122.67 м.д. соответственно.

Анализ двумерного спектра ЯМР ^{13}C - ^1H (COLOC) 1,2,3-триазольного производного **58a**, в котором наблюдается кросс-пик между сигналами H-30 (4.89 м.д.) и C-5' (122.07 м.д.), свидетельствует об образовании 4-замещенного 1,2,3-триазола, что подтверждает региоселективность, характерную для Cu-катализируемых реакций 1,3-диполярного циклоприсоединения.

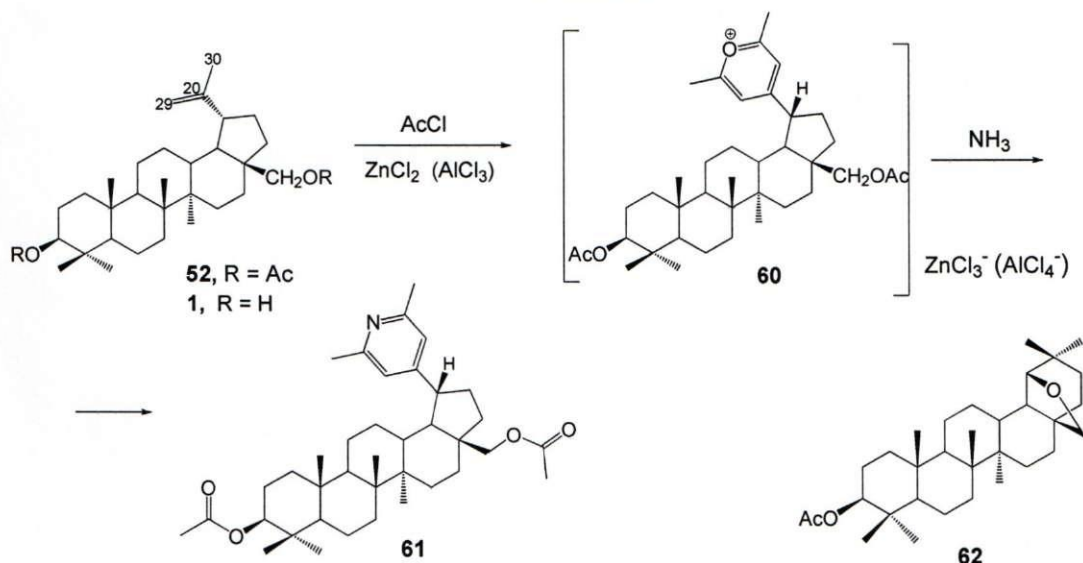
Таким образом, нами впервые осуществлено введение 1,2,3-триазолильного заместителя в положение C-30 лупанового остова и показано, что Cu(I)-катализируемая реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения 30-азидолуп-20(29)-енов к терминальным алкинам представляет эффективный способ синтеза 30-замещенных производных тритерпеноидов.

5. Синтез 19-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-20,29,30-тринорлупанов

В данной работе осуществлен синтез производных тритерпеноидов лупанового ряда, содержащих фрагмент пиридина по положениям C-20,29,30 лупанового остова. Известно, что эффективным способом получения пиридинов является двойное ацилирование олефинов в присутствии кислоты Льюиса с последующей обработкой полученных пирилиевых солей аммиаком.

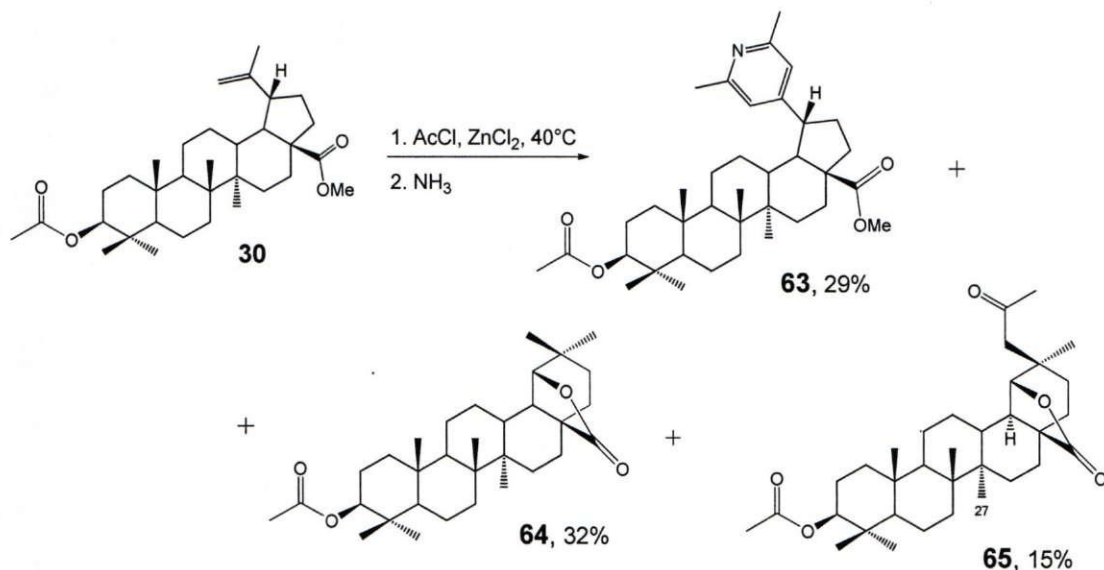
Нами найдено, что взаимодействие диацетата бетулина **52** с хлористым ацетилом в присутствии кислоты Льюиса (ZnCl_2 , AlCl_3) с последующей обработкой соли пирилия **60** аммиаком приводит к образованию 3 β ,28-диацетокси-19-(2,6-диметилпиридил)-20,29,30-тринорлупана **61** (схема 20). В качестве второго основного продукта из реакционной смеси был выделен продукт перегруппировки Вагнера-Меервейна – 3 β -О-ацетилаллобетулин **62**. Варьируя условия реакции (соотношение реагентов и температуру реакции), а также перебрав различные кислоты Льюиса (SnCl_4 , InCl_3 , $\text{In}(\text{OTf})_3$ и $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) нами было найдено, что наилучший выход целевого 20,29,30-тринорлупана **61** (46%) получается при использовании 4-х кратного избытка ZnCl_2 и проведении реакции при 40°C (соотношение **61**:**62** составляет 1.5:1 по данным ЯМР ^1H). Взаимодействие бетулина **1** с хлористым ацетилом (4экв. ZnCl_2 , 40°C, 5 ч, обработка аммиаком при 0°C) приводит к образованию 20,29,30-тринорлупана **61** с выходом 24% (схема 20).

Схема 20



Аналогичное превращение наблюдается для метиловых эфиров 3β-ацетилбетулиновой и бетулоновой кислот. Так, из реакционной смеси, полученной при взаимодействии 3β-ацетилбетулиновой кислоты **30** с хлористым ацетилом, были выделены в индивидуальном виде соединение **63** и продукты перегруппировки Вагнера-Меервейна **64** и **65** (схема 21). Образование производного **64** согласуется с литературными данными по перегруппировке бетулиновой кислоты **2** и ее метилового эфира **27** в кислых условиях, в том числе в присутствии кислот Льюиса, в то время как продукт **65**, содержащий ацетильную группу в положении С-29, выделен нами впервые.

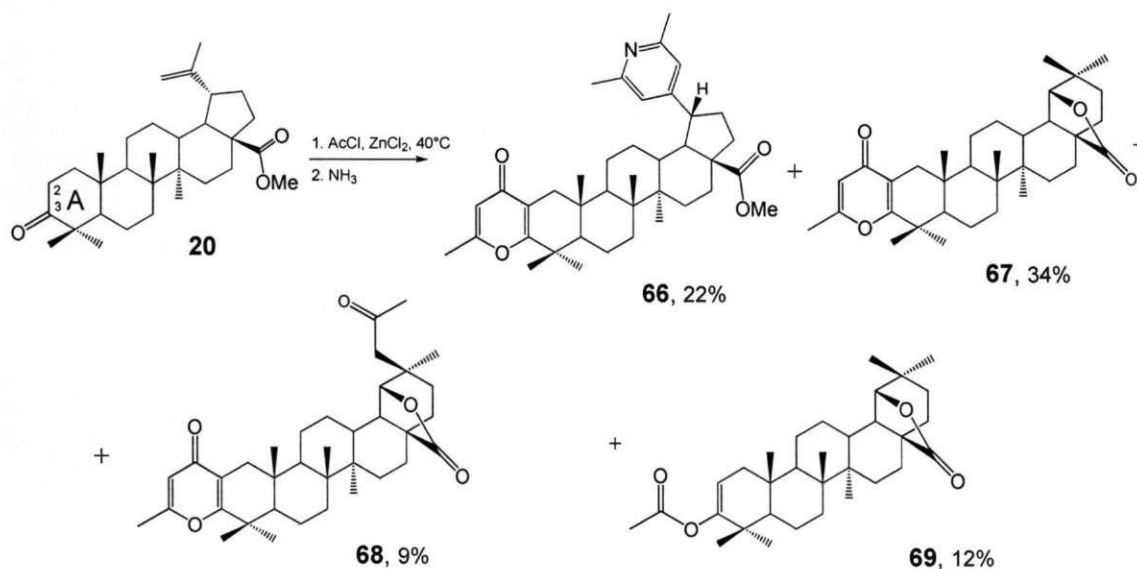
Схема 21



Наличие кетогруппы в положении С-3 метилового эфира бетулоновой кислоты **20** обуславливает реализацию еще одного направления реакции, приводящего к образованию 4-оксопиранового цикла, аннелированного с кольцом А по связи С-2—С-3 тритерпенового остова (схема 22). Из реакционной смеси, полученной при взаимодействии метилового эфира бетулоновой кислоты **20** с хлористым ацетилом

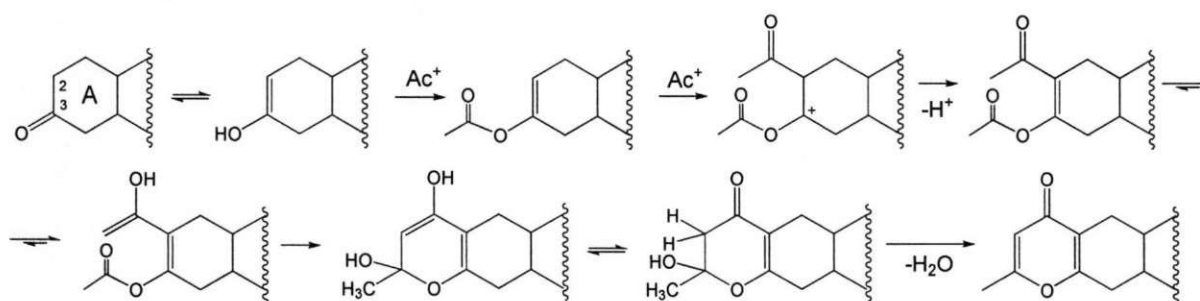
в присутствии ZnCl_2 , были выделены соединения **66**, **67**, **68** и **69** с выходом 22%, 34%, 9% и 12% соответственно.

Схема 22



Предположительно, образование соединения **66**, обладающего октадекагидроциклопента[7,8]фенантро[1,2-g]хроменовой структурой, и соединений **67** и **68**, обладающих октадекагидрохризено[1,2-g]хроменовой структурами, происходит в результате енолизации 3-кетогруппы с последующим ацилированием гидроксигруппы, затем ацилирования двойной связи по положению С-2, циклизации и дегидратации в присутствии кислоты Льюиса (схема 23). Подтверждением данной схемы реакции является выделение из реакционной смеси соединения **69**.

Схема 23



Характерной особенностью ИК-спектров соединений **67** и **68** является наличие интенсивных полос поглощения при 1764, 1771 и 1672, 1673 cm^{-1} , соответствующих валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$ групп лактонового и пиранового циклов соответственно, что подтверждает 4-оксопирановую структуру. Более того, в ИК-спектре соединения **66** присутствует только полоса поглощения $\text{C}=\text{O}$ группы пиран-4-она при 1668 cm^{-1} , а в ИК-спектре соединения **69** только полоса поглощения $\text{C}=\text{O}$ группы лактона при 1772 cm^{-1} . Данные двумерного спектра ЯМР ^{13}C - ^1H (COLOC) производного **67**, в котором наблюдается кросс-пик между сигналами С-13 (180.35 м.д.) и Н-14 (2.81 м.д.) и отсутствует кросс-пик между

сигналами Н-14 и метильной группы пиранового цикла, также свидетельствуют об образовании 4-оксопиранового цикла. Конфигурация заместителей при С-20 в соединении **65** установлена на основании двумерного спектра ЯМР ^1H - ^1H (NOESY), в котором сигнал Н-18 имеет кросс-пики с сигналами Ме-30 и Ме-27 и не имеет взаимодействия с Н-29.

Таким образом, нами впервые исследовано превращение лупановых тритерпеноидов в присутствии кислоты Льюиса в производные 19-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-20,29,30-тринорлупанового типа. Установлено параллельное протекание перегруппировки Вагнера-Меервейна с получением производных аллобетулина, а также реакции ацилирования по кольцу А метилового эфира бетулоновой кислоты с образованием соединений, обладающих октадекагидроциклопента[7,8]фенантро[1,2-*g*]хромоеновой и октадекагидрохризено[1,2-*g*]хромоеновой структурами.

6. Результаты исследования биологической активности некоторых синтезированных соединений

Не только выявленные закономерности изучаемых реакций, но и сами синтезированные в работе соединения могут быть значимы в качестве потенциальных фармакологических агентов*.

6.1. Цитотоксичность производных лупановых тритерпеноидов

На кафедре фундаментальной медицины медицинского факультета НГУ для ряда синтезированных в работе производных лупановых тритерпеноидов (43 соединения), а также для бетулиновой кислоты **2** и бетулоновой кислоты **3** получены данные о цитотоксичности в отношении клеточных культур СЕМ-13 (клетки Т-клеточных лейкозов человека), U-937 (клетки моноцитов человека) и МТ-4 (клетки Т-клеточной лейкемии человека).

В результате исследований найдено, что цитотоксическую активность проявляют производные различных классов соединений (амиды, амидоксимы, гетероциклические производные). Наиболее перспективными соединениями для дальнейшего изучения в качестве потенциальных противоопухолевых агентов являются амиды бетулоновой кислоты – α -аланинамиды **6** и **7**, нитроксиламид **8** и его восстановленное производное **5с**. Обращает внимание значительная цитотоксичность амидоксима 3 β -О-ацетилбетулина **40**. Интерес для дальнейшего изучения представляют также 30-(4-*R*-триазол-1-ил)луп-20(29)-ены **58б,в**, проявившие значительную цитотоксичность и селективность действия на модели лимфоидных опухолевых клеток человека МТ-4.

* Автор выражает глубокую благодарность д.м.н., проф. Покровскому А.Г., д.б.н. Сорокиной И.А., д.м.н. Жуковой Н.А., к.б.н. Баеву Д.С. и д.б.н., проф. Толстиковой Т.Г. за проведенные исследования биологической активности соединений, а также полезные консультации и обсуждения.

6.2. Острая токсичность и противовоспалительная активность α -аланинамидов бетулоновой кислоты

В лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН определена острая токсичность амидов бетулоновой кислоты, содержащих фрагмент α -аланина (α -аланинамиды **6** и **7**), а также изучены их противовоспалительные свойства. α -Аланинамиды **6** и **7** обладают умеренным противовоспалительным действием, но уступают эталонному препарату индометацину. Полученные данные о токсичности позволяют отнести исследуемые соединения **6** и **7** к малотоксичным веществам ($LD_{50} > 5000$ мг/кг).

6.3. Гепатопротекторные и антиоксидантные свойства амидов бетулоновой кислоты

Исследования антиоксидантных и гепатопротекторных свойств соединений **6** и **7**, а также нитроксиламинов **8-10** проводились в лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН. Гепатопротекторное действие амида **6** не уступает эталонному веществу дигидрокверцетину (ДКВ), а по величине антиоксидантного эффекта α -аланинамиды **6** и **7** превосходят ДКВ в ~ 2 и ~ 3.2 раза соответственно. Производные **8** и **10** проявляют умеренный антихолестатический эффект, который уступает эффекту референсного препарата – липоевой кислоты, которая понижает оба маркера холестаза.

Следует отметить, что дополнительное исследование гепатопротекторных свойств соединения **8** в модели острого CCl_4 -гепатита показало наличие у него достоверного антицитолитического и антихолестатического действия, а введение этого соединения мышам линии C57Bl/6j с перевиваемой карциномой легких не стимулирует рост опухолевого трансплантата и увеличивает продолжительность жизни животных-опухоленосителей.

ВЫВОДЫ

1. Осуществлен синтез новых амидов бетулоновой кислоты, содержащих фрагменты различных аминов, в том числе α -аланина и его метилового эфира, а также аминов спин-меченых соединений. Предложены и апробированы условия селективного восстановления спин-меченых амидов бетулоновой кислоты до соответствующих гидроксиламинов.
2. Осуществлена реакция цианэтилирования тритерпеноидов лупанового ряда. Получены данные по влиянию структуры тритерпеноида на состав и выход продуктов реакции. Синтезированы производные лупановых тритерпеноидов, содержащие (1,2,4-оксадиазол-3-ил)этоксильный или (1,2,3,4-тетразол-5-ил)этоксильный заместители в положениях C-3 и C-28.

3. Разработан удобный подход к синтезу гетероциклических производных бетулоновой и бетулиновой кислот, содержащих 1,3,4-оксадиазольный заместитель в положении С-17.
4. Предложен способ региоселективного синтеза 30-[4-арил(алкил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил]луп-20(29)-енов, основанный на катализируемой солями меди(I) реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения 30-азидолуп-20(29)-енов к терминальным алкинам.
5. Показано, что ацилирование луп-20(29)-енов в присутствии кислоты Льюиса и последующая обработка полученных пирилиевых солей аммиаком представляет рациональный способ синтеза 19-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-20,29,30-тринорлупанов. Установлено параллельное протекание реакции ацилирования по кольцу А метилового эфира бетулоновой кислоты с образованием соединений, обладающих фенантро[1,2-*g*]хроменовой и хризено[1,2-*g*]хроменовой структурами.
6. На базе медицинского факультета НГУ осуществлено первичное тестирование *in vitro* 43 новых производных тритерпеноидов лупанового ряда и выявлены перспективные для дальнейшего изучения ингибиторы роста опухолевых клеток человека. В лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН в результате экспериментов *in vivo* выявлены амиды бетулоновой кислоты с комплексной биологической активностью (противовоспалительной, гепатопротекторной и антиоксидантной), которые могут быть перспективны для коррекции нарушений, вызванных токсическими, метаболическими, воспалительными и другими патогенными факторами.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих сообщениях:

1. Антимонова (Волкова) А.Н., Узенкова Н.В., Петренко Н.И., Шакиров М.М., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Синтез амидов бетулоновой кислоты // Химия природных соединений. – 2008. – № 3. – С. 259-264.
2. Антимонова (Волкова) А.Н., Узенкова Н.В., Петренко Н.И., Шакиров М.М., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Синтетические трансформации высших терпеноидов. XXIV. Синтез цианэтильных производных тритерпеноидов лупанового ряда и 1,2,4-оксадиазолов на их основе // ЖОрХ. – 2011. – Т. 47. – Вып. 4. – С. 586-596.
3. Антимонова (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Полиенко Ю.Ф., Шакиров М.М., Иртегова И.Г., Покровский М.А., Шерман К.М., Григорьев И.А., Покровский А.Г., Толстиков Г.А. Синтетические трансформации высших терпеноидов. XXX. Синтез и цитотоксическая активность амидов бетулоновой

кислоты, содержащих фрагменты нитроксильных радикалов // Биоорганическая химия. – 2013. – Т. 39. – № 2. – С. 206-211.

4. Сорокина И.В., Баев Д.С., Жукова Н.А., Толстикова Т.Г., Антимонина (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Григорьев И.А. Нитроксильные производные бетулоновой кислоты с гепатопротекторной активностью // Биоорганическая химия. – 2013. – Т. 39. – № 6. – С. 749-752.
5. Антимонина (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шакиров М.М., Рыбалова Т.В., Фролова Т.С., Шульц Э.Э., Кукина Т.П., Синицына О.И., Толстиков Г.А. Синтез и исследование мутагенных свойств тритерпеноидов лупанового ряда, содержащих фрагменты 1,2,3-триазолов в положении С-30 // Химия природных соединений. – 2013. – № 4. – С. 564-570.
6. Антимонина (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шакиров М.М., Шульц Э.Э. Синтез 19-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-20,29,30-тринорлупанов // Химия природных соединений. – 2014. – № 4. – С. 268-273.
7. Антимонина (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шакиров М.М., Покровский М.А., Покровский А.Г., Шульц Э.Э. Синтез и цитотоксическая активность тритерпеноидов лупанового ряда, содержащих фрагменты 1,3,4-оксадиазолов // Химия природных соединений. – 2014. – № 6 – С. 883-889.
8. Сорокина И.В., Толстикова Т.Г., Жукова Н.А., Баев Д.С., Толстиков Г.А., Антимонина (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Николин В.П., Попова Н.А. Средство для коррекции цитостатической полихимиотерапии с противовоспалительной активностью. Патент РФ № 2425680 (10.08.2011). Б.И. № 22.

Основные результаты диссертации доложены на конференциях:

1. Антимонина (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Синтез 2,6-диметил-20,29,30-трис-нор-пиридиллупана // Тезисы докладов III Международной научной конференции «Химия, структура и функции биомолекул». – Минск. Республика Беларусь. – 2008. – С. 16.
2. Антимонина (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Химические модификации производных бетулина: синтез 1,2,4-оксадиазолов // Тезисы докладов VII Всероссийской конференции с молодежной научной школой «Химия и медицина, Орхимед-2009». – Уфа. – 2009. – С. 114-115.
3. Antimonova (Volkova) A.N., Petrenko N.I., Shults E.E., Tolstikov G.A. Synthesis of C-20 pyridine analogs of lupane-type triterpenoids // Book of abstracts of the 2nd Annual Russian-Korea Conference on "Current issues of natural products chemistry and biotechnology". – Novosibirsk. Russia. – 2010. – P. 49.
4. Антимонина (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А.

Химическая модификация производных бетулина: синтез тетразольных производных тритерпеноидов // Тезисы докладов XIII Молодежной школы-конференции "Актуальные проблемы органической химии". – Новосибирск. – 2010. – С. 85.

5. Antimonova (Volkova) A.N., Chernov S.V., Petrenko N.I., Shults E.E., Tolstikov G.A. Chemical modifications of betulin derivatives: synthesis of 28-nor-17-(1,3,4-oxadiazolil)lupanes // Book of abstracts of the international conference "Current Topics in Organic Chemistry". – Novosibirsk. Russia. – 2011. – P. 92.
6. Antimonova (Volkova) A.N., Petrenko N.I., Shults E.E., Pokrovsky A.G., Tolstikov G.A. Development of 20-(1,2,3-triazol-1-ylmethyl)lupanes and their cytotoxicity // Book of abstracts of the 4th Annual Russian-Korea Conference on "Current issues of natural products chemistry and biotechnology". – Novosibirsk. Russia. – 2012. – P. 26.
7. Antimonova (Volkova) A.N., Shults E.E., Grigor'ev I.A., Tolstikov G.A. Synthesis and Cytotoxicity of Betulonic Acid Amides Containing a Nitroxyl Radical Residue // 4th Annual Russian-Korea Conference on "Current issues of natural products chemistry and biotechnology". – Novosibirsk. Russia. – 2012. – P. 73.
8. Sorokina I.V., Bessergeneva E.P., Zhukova N.A., Baev D.S., Tolstikova T.G., Antimonova (Volkova) A.N., Petrenko N.I., Shults E.E., Grigor'ev I.A. Nitroxide derivative of betulonic acid with hepatoprotective activity // 4th Annual Russian-Korea Conference on "Current issues of natural products chemistry and biotechnology". – Novosibirsk. Russia. – 2012. – P. 151.
9. Антимоновa (Волкова) А.Н., Петренко Н.И., Покровский М.А., Шульц Э.Э. Гетероциклические производные тритерпеноидов лупанового ряда: модификации по изопропенильной группе // Тезисы докладов Уральского научного форума "Современные проблемы в органической химии". – Екатеринбург. – 2014. – С. 111.