

УДК 547.3:54.057:547.318

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-4-45-49

**СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ
3-АМИНО-3,4-СЕКО-4(23),12(13)-ДИЕНОВ РЯДА ОЛЕАНАНА И УРСАНА**

© Г.В. Гиниятуллина, И.И. Авзалова

Тритерпеноиды являются растительными метаболитами, представляющими большой интерес в связи с доступностью и широким спектром биологической активности (антидиабетической, противовирусной, антимикробной, противовоспалительной, противоопухолевой, антиоксидантной, гепатопротекторной и др.). Показано, что тритерпеноиды подавляют ключевые стадии инициации и прогресса опухолевых клеток, в частности, ингибируют клеточную пролиферацию, выживание, метастазирование, ангиогенез и индуцируют апоптоз или усиливают апоптоз, индуцированный другими противоопухолевыми агентами. Бетулиновая кислота проявляет противоопухолевую активность по отношению к различным типам опухолевых клеток и относится к группе противораковых веществ – «митоканов», биологической мишенью которых являются митохондрии.

Производные олеаноловой и урсоловой кислот находятся в фокусе внимания многих научных групп в мире, занимающихся поиском новых противоопухолевых агентов на основе тритерпеноидов. Так, 2-циано-3,12-диоксоолеана-1,9(11)-диен-28-овая кислота, ее метиловый эфир и имидазол активны в отношении клеток лейкемии, множественной миеломы, рака молочной железы, легких, остеосаркомы и находятся на стадии клинических испытаний. 3-Амино-урсоловая кислота проявляет цитотоксичность в отношении клеток HL-60, Bel-7402, Hela. В настоящей работе нами осуществлен синтез и представлены данные о цитотоксичности двух производных олеаноловой и урсоловой кислот, полученных в результате восстановления продуктов перегруппировки Бекмана второго рода – 2-циано-3,4-секо-4(23),12(13)-диенов ряда олеанана и урсана. Изучение противоопухолевой активности в Национальном институте рака (США) показало, что данные соединения вызывали торможение роста или гибель раковых клеток человека девяти типов. Наиболее чувствительным к действию этих соединений были клеточные линии лейкемии, меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака толстой кишки, молочной и предстательной железы, центральной нервной системы и почки. Таким образом, синтезированные соединения являются перспективными для дальнейших исследований.

Ключевые слова: тритерпеноиды, 3-амино-3,4-секо-4(23),12(13)-олеанандиен, 3-амино-3,4-секо-4(23),12(13)-урсандиен, восстановление, противоопухолевая активность.

Введение. Значительную группу биологически активных растительных метаболитов составляют азотсодержащие тритерпеноиды. Производные лактама олеаноловой кислоты обеспечивают транспорт биологически активных соединений глубоко в ткани, усиливая их действие, и могут быть использованы в косметологии [1]. А-Секонитрил лупеола проявляет антималярийную активность в отношении *Plasmodium falciparum* [2]. Ацетат 3,4-секо-3-амино-28-гидрокси-4(23),20(29)-лупадиена показывает незначительную активность в отношении бактерий *Micobacterium tuberculosis* штамма H37Rv [3]. В настоящей работе сообщается

о синтезе и цитотоксичности 3-амино-3,4-секо-4(23),12(13)-диенов ряда олеанана и урсана.

Результаты и их обсуждение. 2-Циано-3,4-секо-4(23),12(13)-диены **1** и **2** являются доступными продуктами перегруппировки Бекмана второго рода [4, 5]. В результате их восстановления алюмогидридом лития при кипячении в ТГФ синтезированы А-секо-3-амино-эритродиол **3** и уваол **4** (рис.). Структура соединений установлена спектральными методами. Так, в спектрах ЯМР отсутствовали сигналы при δ 117–118 м.д. CN-группы и появлялись сигналы углеродных атомов CH_2NH_2 -групп при

ГИНИЯТУЛЛИНА Гульнара Владимировна – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: gulnaravlg@gmail.com

АВЗАЛОВА Ильмира Ильфаковна, Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: avzalova2012@yandex.ru

δ 45.9 и 44.2 м.д., протоны метиленовых групп резонировали при δ 3.12 (3.20) и δ 3.39 (3.40) м.д. в виде дублетов.

В Национальном институте рака США в соответствии с соглашением между NCI и УФИХ УФИЦ РАН проведено экспериментальное исследование противоопухолевой активности *in vitro* (цитотоксичности) соединений **3** и **4** по отношению к клеткам 60 линий девяти различных опухолей человека [6, 7]. В соответствии с результатами первичного тестирования соединения **3** и **4** проявили активность в отношении всех девяти типов раковых клеток, вызывая не только торможение роста, но и их гибель (табл.). Наиболее чувствительными оказались клеточные линии лейкемии, меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака толстой кишки, молочной и предстательной железы, центральной нервной системы и почки. Из тестированных линий опухолевых клеток в отношении 39 и 45 линий соединения **3** и **4** обладали цитотоксическим действием. На основании результатов тестирования можно сделать вывод о том, что 3-амино-3,4-секо-4(23),12(13)-олеан- и урсандиены перспективны для углубленного изучения противоопухолевой активности и представляют интерес для дальнейших модификаций.

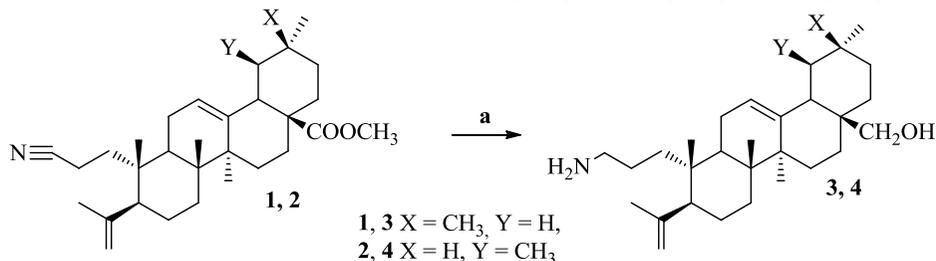
Экспериментальная часть. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре «Bruker AM-300» (Германия, 300 и 75.5 МГц соответственно, δ , м.д., КССВ, Гц) в CDCl_3 , внутренний стандарт тетраметилсилан. Элементный анализ осуществляли на CHNS-анализаторе EuroEA-3000, основной стандарт ацетанилид. 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. Вещества обнаруживали 10% раствором серной кислоты с последующим нагреванием при 100–120°C в течение 2–3 мин.

Колоночную хроматографию проводили на нейтральной Al_2O_3 (Реахим, РФ).

Общая методика синтеза соединений 3 и 4. К раствору 0.57 г (1 ммоль) соединения **1** или **2** в сухом тетрагидрофуране при интенсивном перемешивании прибавляли 467.4 мг (12.3 ммоль) LiAlH_4 , смесь кипятили 6 ч. К реакционной смеси прибавляли 3 мл H_2O , осадок $\text{Al}(\text{OH})_3$ отфильтровывали, водный слой экстрагировали хлороформом (3×60 мл). Сушили CaCl_2 , упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на Al_2O_3 , элюенты – CHCl_3 , CHCl_3 – EtOH (50:1, 25:1, 10:1).

3,4-Секо-3-амино-28-гидрокси-олеан-4(23),12(13)-диен 3. Выход 0.35 г (81%) вещества белого цвета. R_f 0.16. Найдено, %: С 81.25, Н 11.31, N 2.84. $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{NO}$ (Mг 441.739). Вычислено, %: С 81.57, Н 11.64, N 3.17. Спектр ЯМР ^1H (δ , м. д.): 0.74, 0.93, 0.97 (3с, 9Н, 3 CH_3), 1.20–2.00 (м, 29Н, CH_2 , CH , OH , NH_2), 1.61 (с, 3Н, Н24), 1.69 (с, 3Н, Н30), 2.47–2.63 (м, 2Н, Н3), 3.12 и 3.39 (оба д, 2Н, Н28, J 8.8 Гц), 4.53 (д, 2Н, Н23, J 18.2 Гц), 5.20 (т, 1Н, Н12, J 3.5 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м. д.): 14.7, 16.7, 18.3, 19.0, 22.6, 23.4, 23.8, 24.1, 25.6, 27.6, 29.5, 30.1, 31.4, 32.5, 33.8, 37.2, 39.2, 40.4, 40.8, 42.1, 45.9 (С3), 46.3, 48.6, 55.2, 60.7 (С5), 76.9 (С28), 115.6 (С23), 122.1 (С12), 144.0 (С13), 147.4 (С4).

3,4-Секо-3-амино-28-гидрокси-урсан-4(23),12(13)-диен 4. Выход 0.37 г (85%) вещества белого цвета. R_f 0.18. Т. пл. 195°C. $[\alpha]_D^{20} +54^\circ$ (с 0.05, CHCl_3). Найдено, %: С 81.32, Н 11.40, N 2.78. $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{NO}$ (Mг 441.739). Вычислено, %: С 81.57, Н 11.64, N 3.17. Спектр ЯМР ^1H (δ , м. д.): 0.79, 0.92, 1.01 (3с, 9Н, 3 CH_3), 1.20–2.00 (м, 29Н, CH_2 , CH , OH , NH_2), 1.64 (с, 3Н, Н24), 1.67 (с, 3Н, Н30), 2.62–2.86 (м, 2Н, Н3), 3.20 и 3.40 (оба д, 2Н, Н28, J 8.8 Гц), 4.71 (д, 2Н, Н23, J 18.2 Гц), 5.10 (т, 1Н, Н12, J 3.4 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м. д.): 15.5, 16.7, 17.3, 18.3, 20.6, 21.1, 23.8, 25.1, 25.2, 26.6, 27.5, 29.8, 30.1, 31.4, 32.5, 33.8, 37.2, 39.2, 40.4, 40.8, 42.1, 44.2 (С3), 46.3, 48.6, 54.7, 58.1 (С5), 69.9 (С28), 115.4 (С23), 123.3 (С12), 139.2 (С13), 148.7 (С4).



Реагенты и условия: а. LiAlH_4 , ТГФ, 60°C, 6 ч, выходы: 81–85%

Рис. Синтез соединений **3** и **4**

Результаты тестирования цитотоксической активности соединений 3 и 4 в концентрации 100 мкМ по отношению к клеткам рака человека 60 линий*

Линия клеток	Процент роста		Линия клеток	Процент роста	
	3	4		3	4
Рак легкого			Лейкоз		
A549/ATCC	-71.01	-31.64	RPMI-8226	-47.53	-33.67
EKVX	97.45	74.13	SR	-52.06	-35.35
HOP-62	63.95	-63.11	Рак почки		
NCI-H226	95.95	84.53	786-0	32.64	39.28
NCI-H322M	54.64	43.66	A498	80.45	72.54
NCI-H23	68.73	60.88	ACHN	-40.83	63.37
NCI-H460	-93.18	-81.91	CAKI-1	40.30	22.37
NCI-H522	-40.06	-41.77	RXF 393	31.57	21.74
HOP-92	42.47	4.60	SN12C	-59.66	-4.38
Рак толстой кишки			TK-10	-45.79	-68.29
COLO 205	-56.77	-57.21	UO-31	47.68	34.08
HCC-2998	-76.03	-93.35	Меланома		
HCT-116	-79.56	-57.79	LOX IMVI	-97.25	-98.96
HCT-15	-71.59	-39.11	MALME-3M	-45.75	-79.10
HT29	-52.80	-44.55	M14	-65.49	-46.23
KM12	-53.92	-41.29	MDA-MB-435	-83.98	-60.30
SW-620	-81.94	-74.75	SK-MEL-2	-35.71	-24.68
Рак молочной железы			SK-MEL-28	-88.39	-35.27
MCF7	-41.45	0.96	SK-MEL-5	55.37	67.13
MDA-MB-231/ATCC	27.03	3.87	UACC-257	-85.22	-56.72
HS 578T	43.36	25.30	UACC-62	98.79	79.36
BT-549	64.61	55.32	Рак предстательной железы		
T-47D	-26.46	-34.06	PC-3	21.25	10.96
MDA-MB-468	-56.34	-54.70	DU-145	44.02	28.36
Рак яичника			Рак центральной нервной системы		
IGROV1	8.73	30.01	SF-268	67.60	59.03
OVCAR-3	-42.00	20.07	SF-295	90.60	77.15
OVCAR-4	-21.79	5.39	SF-539	-61.50	13.04
OVCAR-5	26.02	60.57	SNB-19	79.46	72.26
OVCAR-8	-85.07	-48.50	SNB-75	39.72	18.50
NCI/ADR-RES	49.11	14.06	U251	-86.77	-74.34
SK-OV-3	82.80	14.09	<p><i>Примечание.</i> * Приведены значения выживаемости клеток, культивированных в присутствии 100 мкМ изученных соединений, в процентах по сравнению с контрольными клетками (без добавления испытуемых соединений в среду культивирования). Отрицательные значения соответствуют гибели клеток.</p>		
Лейкоз					
CCRF-CEM	-18.36	0.72			
HL-60(TB)	-68.92	-45.20			
K-562	-47.70	1.75			
MOLT-4	-35.93	-10.56			

Методика тестирования противоопухолевой активности *in vitro* соединений **3**, **4** и информация о коллекциях клеточных линий NCI приведены на сайте https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm.

Работа выполнена по теме Госзадания № АААА-А19-119020890014-7. Авторы благодарят NCI за тестирование противоопухолевой активности соединений **3** и **4**.

Литература

1. Zaprutko L., Partyka D., Bednarczyk-Cwynar B. Triterpenoids. Part 21: Oleanolic acid azaderivatives as percutaneous transport promoters // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004. V. 14. P. 4723–4726.
2. Kumar S., Misra N., Raj K., Srivastava K., Puri S.K. Novel class of hybrid natural products derived from lupeol as antimalarial agents // *Nat. Prod. Res.* 2008. V. 22. P. 305–319.
3. Kazakova O.B., Giniyatullina G.V., Tolstikov G.A. Synthesis of A-secomethylenamino- and substituted amidoximotriterpenoids // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2011. V. 37. P. 619–625.
4. Kazakova O.B., Medvedeva N.I., Kukovinets O.S., Tolstikov G.A., Khusnutdinova E.F., Zaprutko L., Bednarczyk-Cwynar B., Paryzek Z. Chemoselective oxidation of oleanolic acid derivatives with ozone // *Chem. Nat. Compounds.* 2010. V. 46. P. 397–399.
5. Dalla-Vechia L., Dassonville-Klimpt A., Grellier P., Sonnet P., Gosmann G., Gnoatto S.C.B. The Beckmann rearrangement applied to ursolic acid with antimalarial activity in medicinal chemistry studies // *Lett. Org. Chem.* 2012. V. 9. P. 92–95.
6. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks P.A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay // *Cancer Res.* 1988. V. 48. P. 589–601.
7. Grever M.R., Schepartz S.A., Chabner B.A. The National Cancer Institute: Cancer drug discovery and development program // *Seminars in Oncology.* 1992. V. 19. P. 622–638.

References

1. Zaprutko L., Partyka D., Bednarczyk-Cwynar B. Triterpenoids. Part 21: Oleanolic acid azaderivatives as percutaneous transport promoters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, vol. 14, pp. 4723–4726.
2. Kumar S., Misra N., Raj K., Srivastava K., Puri S.K. Novel class of hybrid natural products derived from lupeol as antimalarial agents. *Nat. Prod. Res.*, 2008, vol. 22, pp. 305–319.
3. Kazakova O.B., Giniyatullina G.V., Tolstikov G.A. Synthesis of A-secomethylenamino- and substituted amidoximotriterpenoids. *Rus. J. Bioorg. Chem.*, 2011, vol. 37, pp. 619–625.
4. Kazakova O.B., Medvedeva N.I., Kukovinets O.S., Tolstikov G.A., Khusnutdinova E.F., Zaprutko L., Bednarczyk-Cwynar B., Paryzek Z. Chemoselective oxidation of oleanolic acid derivatives with ozone. *Chem. Nat. Compd.*, 2010, vol. 46, pp. 397–399.
5. Dalla-Vechia L., Dassonville-Klimpt A., Grellier P., Sonnet P., Gosmann G., Gnoatto S.C.B. The Beckmann rearrangement applied to ursolic acid with antimalarial activity in medicinal chemistry studies. *Lett. Org. Chem.*, 2012, vol. 9, pp. 92–95.
6. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks P.A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 1988, vol. 48, pp. 589–601.
7. Grever M.R., Schepartz S.A., Chabner B.A. The National Cancer Institute: Cancer drug discovery and development program. *Seminars in Oncology*, 1992, vol. 19, pp. 622–638.



**SYNTHESIS AND ANTICANCER ACTIVITY
OF OLEANANE AND URSANE 3-AMINO-3,4-SECO-4 (23),12(13)-DIENES**

© G.V. Giniyatullina, I.I. Avzalova

Ufa Institute of Chemistry – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Triterpenoids are plant metabolites which are of great interest with the availability and a wide range of biological activity (antidibetic, antiviral, antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor, antioxidant, hepatoprotective and etc.). Triterpenoids have been shown to suppress key stages of tumor cell initiation and progress, in particular, inhibit cell proliferation, survival, metastasis, angiogenesis and induce apoptosis or enhance apoptosis induced by other antitumor agents. Betulinic acid exhibits antitumor activity against various types of tumor cells and belongs to the group of anticancer substances – “mitocans”, the biological target of which are mitochondria.

Derivatives of oleanolic and ursolic acids are in the focus of attention of many scientific groups in the world search for new antitumor agents based on triterpenoids. 2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9(11)-diene-28-oic acid, its methyl ester and imidazolide are active against leukemia cells, multiple myeloma, breast, lungs, osteosarcoma and are at the stage of clinical trials. 3-Amino-ursolic acid exhibits cytotoxicity against HL-60, Bel-7402, Hela cells. In this work, we present the synthesis and data on the cytotoxicity of two derivatives of oleanolic and ursolic acids obtained as a result of the reduction of Beckmann rearrangement type 2 products – 2-cyano-3,4-seco-4(23),12(13)-dienes of oleanane and ursane type. A study of antitumor activity at the National Cancer Institute (USA) showed that these compounds caused growth inhibition or death of nine types of human cancer cells. The most sensitive to the action of these compounds were the cell lines of leukemia, melanoma, non-small cell lung cancer, colon cancer, CNS cancer, prostate cancer, breast cancer and renal cancer. Thus, the synthesized compounds are promising for further studies.

Key words: triterpenoids, 3-amino-3,4-seco-4(23),12(13)-oleanandien, 3-amino-3,4-seco-4(23),12(13)-ursandien, reduction, cytotoxic activity.