

УДК 547.926'891.2.057:543.6: 615.015.11

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-4-64-67

**ТРИТЕРПЕНОИДЫ С АЗЕПАНОВЫМ ЦИКЛОМ  
КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ**

© Т.В. Лопатина, А.В. Петрова, З.И. Галимова, З.Р. Зилеева, Т.В. Иванова

Тритерпеновые соединения являются перспективными веществами для направленного конструирования новых фармакологически активных соединений. Исследования последних двух десятилетий показали, что растительные тритерпеноиды, имеющие обеспеченную сырьевую базу в России, неуклонно входят в число агентов, на основе которых предстоит разработать высокоэффективные препараты для лечения опасных вирусных инфекций, гепатитов и злокачественных опухолей. Бетулиновая кислота, избирательно действующая на клетки меланомы, находится на II фазе клинических испытаний при диспластических новообразованиях кожи. Интерес к тритерпеноидам как агентам, способным преодолевать лекарственную устойчивость к традиционной химиотерапии, подтверждается синергическим эффектом бетулиновой кислоты с различными химиопрепаратами, направленными на повышение апоптоза и подавление клоногенного окружения клеток опухоли. Бетулиновая кислота также усиливает цитотоксический эффект винкристина на клетки меланомы, повышает апоптотическую активность индуктора внешнего пути апоптоза TRAIL. Это свидетельствует о том, что тритерпеноиды потенциально являются эффективными средствами дополнительной противоопухолевой терапии. В серии предшествующих работ было показано, что замена нативного карбоциклического цикла А на азепановый в структуре тритерпеноидов приводит в появлении высокой противоопухолевой, противотуберкулезной и антидиабетической активности. В настоящей работе представлены результаты по синтезу новых азепанотритерпеноидов и их влиянии на раковые клетки. Установлено, что изученные соединения обладают цитотоксической активностью в отношении как условно-нормальных клеток, так и клеточных линий опухолевого происхождения, при этом азепаноэритродиол более выражено подавляет жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с клетками линии НЕК293.

Ключевые слова: тритерпеноиды, азепаны, противоопухолевая активность.

**Введение.** Результаты исследований последних лет выявили молекулярные мишени тритерпеновых соединений в клетке, что позволило обосновать политаргетный механизм их действия. Показано, что, взаимодействуя с белком KEAP1, тритерпеноиды активируют гены сигнального пути Nrf2, кодирующие семейство цитопротекторных белков, включая ферменты синтеза глутатиона, хинонредуктазу, каталазу, супероксиддисмутазу, гемоксигеназу, тиоредоксин, а также подавляют индукцию ЦОГ2 и NO-синтазы. Противовоспалительная активность агентов также связана с ингибированием

белков сигнального пути NF/В, регулирующего процессы воспаления, апоптоза и дифференцировки. Большое количество публикаций посвящено синтезу азотсодержащих тритерпеноидов, многие из которых обладают противоопухолевой активностью. Например, гидрофильность и противоопухолевая активность повышаются при введении в положение С28 заместителей с амидной связью или кватернизированных ионных заместителей. Показано, что азепанобетулин **1**, азепаноэритродиол **4** и азепаноуваол **5** (рис.) обладают высокой противотуберкулезной активностью [1]. Также в литературе представ-

ЛОПАТИНА Татьяна Владимировна, Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: ltviotch@yandex.ru

ПЕТРОВА Анастасия Валерьевна, Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: Pnastya08@mail.ru

ГАЛИМОВА Зарема Ирековна, Башкирский государственный университет,

e-mail: Galimova07zarema@gmail.com

ЗИЛЕЕВА Зульфия Рустамовна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: Zileeva81@list.ru

ИВАНОВА Татьяна Викторовна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

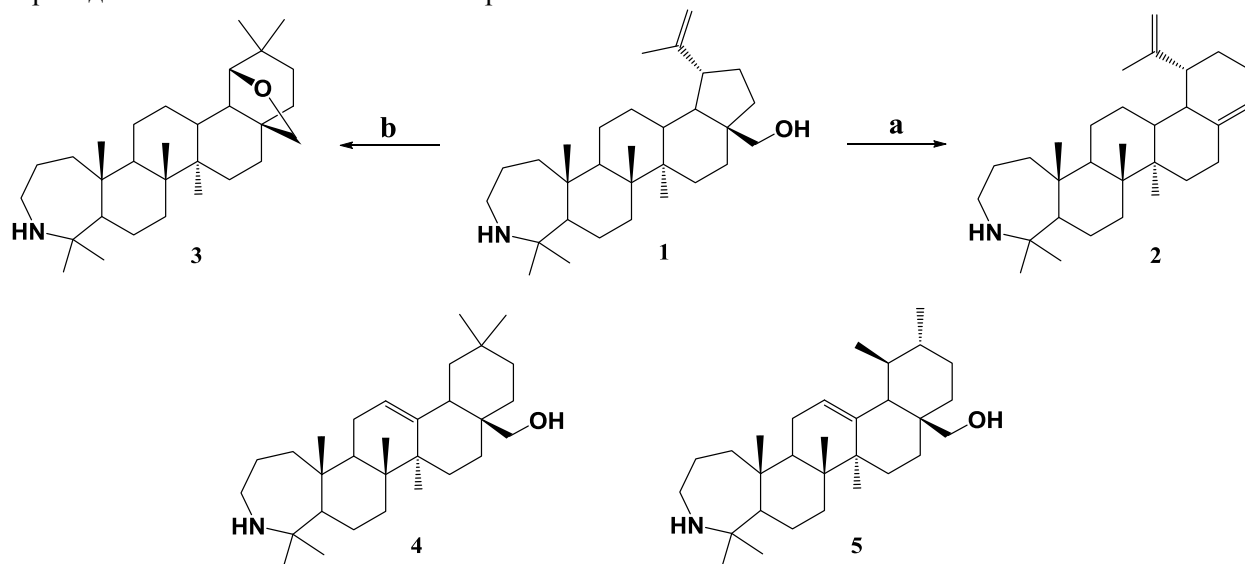
e-mail: ivandatanya1992@gmail.com

лены синтеза соединений **1** и **4** из бетулина и олеаноловой кислоты и данные их цитотоксичности по отношению к девяти типам раковых клеток [2, 3].

**Результаты и их обсуждение.** В настоящей работе в результате перегруппировок А-азепанобетулина **1** по циклу Е синтезированы новые А-азепано-22(17→28)абео-луп-17(28), 20(29)-диен **2** и азепаноаллобетулин **3** (рис.).

Изучение цитотоксичности соединений **2** – **4** проведено в отношении клеток эмбриональ-

ной почки человека Нек23, аденокарциномы легких А-549, карциномы молочной железы МСF-7, нейробластомы SH-SY5Y в опытах *in vitro* (табл.). Установлено, что соединения **2** – **4** обладают цитотоксической активностью в отношении как условно-нормальных клеток, так и клеточных линий опухолевого происхождения. Отметим более выраженную способность азепаноэритродиола **4** подавлять жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с клетками линии НЕК293.



Реагенты и условия: **a.** POCl<sub>3</sub>, пиридин, кипячение, 5 ч; **b.** p-TsOH, CHCl<sub>3</sub>, кипячение, 4 ч

Рис. Синтез новых А-азепано-22(17→28)абео-луп-17(28),20(29)-диена **2** и азепаноаллобетулина **3**; азепаноэритродиол **4** и азепаноуваол **5**

Т а б л и ц а

Цитотоксическая активность соединений **2** – **4** *in vitro*

Соединение	IC <sub>50</sub> , мкМ			
	НЕК293	А-549	МСF-7	SH-SY5Y
<b>2</b>	20.97 ± 5.78	14.00 ± 1.12 (p=0.02) <sup>a</sup>	13.37 ± 1.89 (p=0.02) <sup>a</sup>	10.34 ± 2.29 (p=0.002) <sup>a</sup>
<b>3</b>	29.68 ± 2.48	35.46 ± 1.90 (p=0.02) <sup>a</sup>	15.87 ± 1.05 (p=0.0001) <sup>a</sup>	35.78 ± 2.95 (p=0.01) <sup>a</sup>
<b>4</b>	12.29 ± 0.14	4.52 ± 1.12 (p=0.00004) <sup>a</sup>	4.39 ± 0.07 (p=0.00004) <sup>a</sup>	4.63 ± 1.27 (p=0.00005) <sup>a</sup>
<b>5</b>	8.69 ± 0.71	7.43 ± 0.35	4.86 ± 0.05 (p=0.0002) <sup>a</sup>	3.72 ± 1.41 (p=0.00004) <sup>a</sup>

*Примечания.* Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (N=2). <sup>a</sup> – различия значений IC<sub>50</sub>, определенных для клеточных линий опухолевого происхождения относительно значений IC<sub>50</sub>, определенных для условно-нормальных клеток (НЕК293); однофакторный парный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Даннета.

**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 микросталике «Voetius». Углы оптического вращения измеряли на поляриметре «Perkin-Elmer 241 MC» (Германия) в трубке длиной 1 дм. ТСХ-анализ проводили на пластинках Сорбфил (ПТСХ-АФ-А, 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  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Реахим, РФ). Соединения **1**, **4** и **5** получали по описанной ранее методике [1].

**3-Дезоксо-3-гомо-3-аза-22(17→28)абео-луп-20(29),17(22)-диен (2).** К раствору 1 ммоль (0.44 г) соединения **1** в 15 мл пиридина добавляли 1 мл  $\text{POCl}_3$  и кипятили с обратным холодильником 5 ч. Реакционную массу выливали в 50 мл охлажденного раствора 5%  $\text{HCl}$ , осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили на воздухе. Продукт реакции хроматографировали на колонке с  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , элюируя последовательно  $\text{CHCl}_3$  и смесью  $\text{CHCl}_3$ – $\text{EtOH}$  (200 : 1). Выход 0.36 г (85%). Т.пл. 243 °C,  $[\alpha]_D^{20} +210^\circ$  (с 0.05,  $\text{CHCl}_3$ ). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м.д.: 0.98, 1.00, 1.18, 1.50, 1.58, 1.70 (18H, с, 6 $\text{CH}_3$ ), 1.15–2.20 (25H, м, CH,  $\text{CH}_2$ ), 2.95–3.05 (1H, м, H-3a), 3.25–3.35 (1H, м, H-3b), 4.65 и 4.72 (2H, оба с, H-29), 5.35 (1H, с, H-22). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м.д.: 14.5, 16.4, 16.6, 21.5, 22.1, 22.4, 23.1, 23.2, 23.9, 27.2, 27.8, 28.6, 32.6, 33.3, 33.5, 40.1, 40.6, 40.8, 40.9, 41.2, 42.4, 44.6, 46.7, 47.5, 54.5, 63.1 (C-3), 108.8 (C-29), 118.7 (C-22), 141.3 (C-17), 150.9 (C-20). Найдено для  $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{N}$  (423.73), %: C, 85.15; H, 11.59; N, 3.42. Вычислено, %: C, 85.04; H, 11.66; N, 3.31.

**3-Дезоксо-3а-гомо-3а-аза-19 $\beta$ ,28-эпокси-18 $\alpha$ -олеанан (3).** Смесь 1 ммоль соединения **1** (0.44 г) и каталитического количества  $p$ -TsOH (17.2 мг) в 25 мл безводного  $\text{CHCl}_3$  нагревали с обратным холодильником 4 ч, растворитель упаривали в вакууме, продукт реакции хроматографировали на колонке с  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , элюируя последовательно  $\text{CHCl}_3$  и смесью  $\text{CHCl}_3$ – $\text{EtOH}$  (100 : 1). Выход 0.38 г (86%).  $[\alpha]_D^{20} +54^\circ$  (с 0.05,  $\text{CHCl}_3$ ), Т.пл. 261°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),

$\delta$ , м.д.: 3.62 и 3.45 (2H, оба д, H-28,  $J = 7.7$  Hz), 3.41 (1H, с, H-19), 3.21–3.16 (1H, м, H3b), 2.91–2.82 (1H, м, H3a), 2.02–1.16 (26H, м, CH,  $\text{CH}_2$ ), 1.42, 1.29, 1.01, 0.92, 0.81, 0.74, 0.69 (21H, 7с, 7 $\text{CH}_3$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м.д.: 90.0 (C-19), 72.4 (C-28), 63.0 (C-3), 54.5 (C-9), 48.2 (C-18), 46.6 (C-4), 41.6 (C-5), 41.2, 40.9, 39.9, 36.5, 36.1, 34.4, 33.0, 32.5, 31.5, 28.6, 27.7, 26.6, 26.2, 25.8, 24.4, 22.9, 22.8, 22.0, 21.6, 19.9, 16.2, 15.9, 13.1. Найдено для  $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{NO}$  (441.74), %: C, 81.60; H, 11.54; N, 3.16. Вычислено, %: C, 81.57; H, 11.64; N, 3.17.

**Экспериментальная биологическая часть.** Клетки линии НЕК293 (линия эмбриональной почки человека;  $3 \times 10^4$  клеток на лунку), А-549 (линия аденокарциномы легкого;  $1.2 \times 10^4$  клеток на лунку), MCF-7 (карцинома молочной железы;  $1.2 \times 10^4$  клеток на лунку), SH-SY5Y (линия нейробластомы человека;  $3 \times 10^4$  клеток на лунку) культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 mM  $L$ -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<sup>®</sup>» (Invitrogen, США) в количестве, рекомендованном производителем (1/9 объема культуры). Флуоресценцию красителя (степень редукции красителя) измеряли при длине волны 590 нм, используя мультипланшетный анализатор «2300 EnSpire<sup>®</sup> Multi-mode Plate Readers» (Perkin Elmer, США). Значение концентрации соединений, вызывающее 50%-е подавление жизнеспособности клеток ( $\text{IC}_{50}$ ), 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  $\pm$  стандартное отклонение, по отношению к значениям контроля (0.1% ДМСО), принятого за 100%.

**Заключение.** Таким образом, проведена модификация азепанобетулина по циклу E с образованием двух новых тритерпеновых производных. Все изученные азепанотритерпеноиды обладают цитотоксической активностью в

отношении раковых клеток, при этом азепаноэритродиол подавлял жизнеспособность опухолевых клеток более эффективно, чем условно-нормальных.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-33-00364) и Госзадания ИБГ УФИЦ РАН № АААА-А16-116020350033-8.*

#### Литература

1. Medvedeva N.I., Kazakova O.B., Lopatina T.V., Smirnova I.E., Giniyatullina G.V., Baikova I.P., Kataev V.E. Synthesis and antimycobacterial activity of triterpenic A-ring azepanes // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 143. P. 464–472.

2. Казакова О.Б., Гиниятуллина Г.В., Медведева Н.И., Лопатина Т.В., Байкова И.П., Толстиков Г.А., Апрышко Г.Н. Синтез и цитотоксичность тритерпеновых семичленных циклических аминов // *Биорг. химия.* 2014. Т. 40. С. 217–225.

3. Лопатина Т.В., Медведева Н.И., Байкова И.П., Исхаков А.С., Казакова О.Б. Синтез и цитотоксичность О- и N-ацильных производных азепанобетулина // *Биорг. хим.* 2019. Т. 45. С. 419–429.

#### References

1. Medvedeva N.I., Kazakova O.B., Lopatina T.V., Smirnova I.E., Giniyatullina G.V., Baikova I.P., Kataev V.E. Synthesis and antimycobacterial activity of triterpenic A-ring azepanes // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 143. P. 464–472.

2. Kazakova O.B., Giniyatullina G.V., Medvedeva N.I., Lopatina T.V., Baikova I.P., Tolstikov G.A., Apryshko G.N. Synthesis and cytotoxicity of triterpenic seven-membered cyclic amines. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2014, vol. 40, pp. 217–225.

3. Lopatina T.V., Medvedeva N.I., Baikova I.P., Iskhakov A.S., Kazakova O.B. Synthesis and cytotoxicity of O- and N-acyl derivatives of azepanobetulin. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2019, vol. 45, pp. 419–429.

---

## TRITERPENOIDS WITH THE AZEPANE CYCLE AS EFFECTIVE ANTITUMOR AGENTS

© T.V. Lopatina<sup>1</sup>, A.V. Petrova<sup>1</sup>, Z.I. Galimova<sup>2</sup>, Z.R. Zileeva<sup>3</sup>, T.V. Ivanova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ufa Institute of Chemistry – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

<sup>2</sup>Bashkir State University,  
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

<sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
71, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Triterpene compounds are promising substances for the directed construction of new pharmacologically active compounds. Studies of the last two decades have shown that plant triterpenoids, which have a rich raw material base in Russia, are steadily among the agents on the basis of which it is necessary to develop highly effective drugs for the treatment of dangerous viral infections, hepatitis, and malignant tumors. Betulinic acid, which selectively acts on melanoma cells, is in phase II clinical trials for dysplastic skin neoplasms. The interest in triterpenoids as agents capable of overcoming drug resistance to traditional chemotherapy is confirmed by the synergistic effect of betulinic acid with various chemotherapy drugs aimed at increasing apoptosis and suppressing the clonogenic environment of the tumor cells. Betulinic acid also enhances the cytotoxic effect of vincristine on melanoma cells, increases the apoptotic activity of the TRAIL inducer of the external apoptosis pathway. This suggests that triterpenoids can potentially be an effective means of additional antitumor therapy. In a series of previous publications, it was shown that the replacement of the native carbocyclic ring A with azepane in the structure of triterpenoids leads to the appearance of high antitumor, anti-tuberculosis and antidiabetic activity. This paper presents the results on the synthesis of new azepanotriterpenoids and their effect on cancer cells. It was established that the studied compounds possess cytotoxic activity against both conditionally normal cells and cell lines of tumor origin, while azepanoerythrodiol more pronouncedly suppressed the viability of tumor cells compared to cells of the HEK293 line.

Key words: triterpenoids, azepanes, antitumor activity.