



УДК 547.057+616–006.81

## ЭПИМЕРИЗАЦИЯ ГИДРОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ В ТРИТЕРПЕНАХ ЛУПАНОВОГО РЯДА

© 2003 г. А. В. СЫМОН\*, А. П. Каплун\*\*, Н. К. Власенкова\*\*, Г. К. Герасимова\*\*,  
Ле Банг Шон\*, Е. Ф. Литвин\*\*\*, Л. М. Козлова\*\*\*, Е. Л. Суркова\*, В. И. Швец\*

\* Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
119571, Москва, просп. Вернадского, 86;

\*\* РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва;

\*\*\* Институт органической химии РАН им. Н.Д. Зелинского, Москва

Поступила в редакцию 14.01.2002 г. Принята к печати 25.03.2002 г.

Исследованы два пути получения 3 $\alpha$ -бетулиновой кислоты и родственных соединений из 3 $\beta$ -эпимеров: реакцией бимолекулярного замещения и стереоселективным восстановлением 3-кетопроизводных. Попытки замещения ацилоксигруппы в 3-*O*-тозиллупеоле на формилоксигруппу или гидроксигруппы в бетулине на бензоилоксигруппу привели к продуктам  $\Delta^{2,3}$ -элиминирования; ожидаемых продуктов бимолекулярного замещения не наблюдалось. Каталитическое гидрирование бетулоновой кислоты над никелем Ренея привело к восстановлению лишь двойной связи изопропенильной группы; использование 5% Ru/C давало смесь эпимеров дигидробетулиновой кислоты (60 : 40). Практически такая же смесь эпимеров бетулиновой кислоты была получена при восстановлении бетулоновой кислоты L-Селектридом. Цитотоксическая активность 3 $\alpha$ -бетулиновой кислоты по сравнению с 3 $\beta$ -эпимером увеличилась в отношении клеток меланомы Вго и уменьшилась в отношении клеток меланомы MS.

Ключевые слова: бетулиновая кислота; эпимеризация; меланома.

### ВВЕДЕНИЕ

За последние 40 лет рост заболеваемости меланомой составил 300% [1]. Для лечения меланомы используются цитостатики – дакарбазин, цисплатин – и цитокины –  $\alpha_2$ -интерферон, интерлейкин-2. Однако они не дают полного излечения [2]. Кроме того, известные противоопухолевые цитостатики обладают высокой токсичностью, а в процессе лечения часто развивается лекарственная устойчивость опухолей, что также снижает эффективность их применения. В связи с этим поиск новых соединений, обладающих противоопухолевой активностью остается актуальной задачей.

В 1995 г. было обнаружено, что бетулиновая кислота (**Xb**) избирательно инициирует апоптоз в клетках меланомы человека [3]. Было показано, что она в 3 раза эффективнее тормозит рост опухолевых клеток, чем дакарбазин, обладая при этом низкой токсичностью (опыты *in vivo*). Установлено также, что некоторые производные бетулиновой кислоты обладают высокой анти-ВИЧ-активностью [4–6].

Нами было показано, что бетулоновая кислота (**VII**) обладает в 18 раз большей цитотоксичностью по отношению к клеткам меланомы MS, чем бетулиновая кислота (**Xb**) [7]. Аналогичные результаты были получены в Иллинойском университете [8].

Проведенный нами анализ взаимосвязи структура–активность ряда тритерпенов показал, что биологическая активность, как правило, увеличивается при переходе от 3 $\beta$ -гидрокси- к 3-кетогруппе, а затем к 3 $\alpha$ -гидроксигруппе. Мы предположили, что и для антимеланомной активности в ряду бетулиновой кислоты эта закономерность будет соблюдаться, то есть 3 $\alpha$ -бетулиновая кислота может проявлять большую активность. Цель настоящей работы – проверка данной гипотезы, для чего и была поставлена задача: разработать удобный метод получения 3 $\alpha$ -бетулиновой кислоты (**Xa**). К настоящему времени известна только работа [9], в которой авторы выделяли эпибетулиновую кислоту экстракцией из коры кустарника *Picramnia pentandra* sw., произрастающего в США, при этом из 0.9 кг коры было выделено 0.8 г 3 $\alpha$ -бетулиновой кислоты.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были исследованы два пути получения 3 $\alpha$ -бетулиновой кислоты (**Xa**): 1) эпимеризация соеди-

Сокращения: IC<sub>50</sub> – концентрация исследуемого препарата, вызывающая 50% гибель клеток в культуре; Td – время удвоения клеток.

# Автор для переписки (эл. почта: alex.kaplun@mtu-net.ru; тел.: (095) 434-83-55).

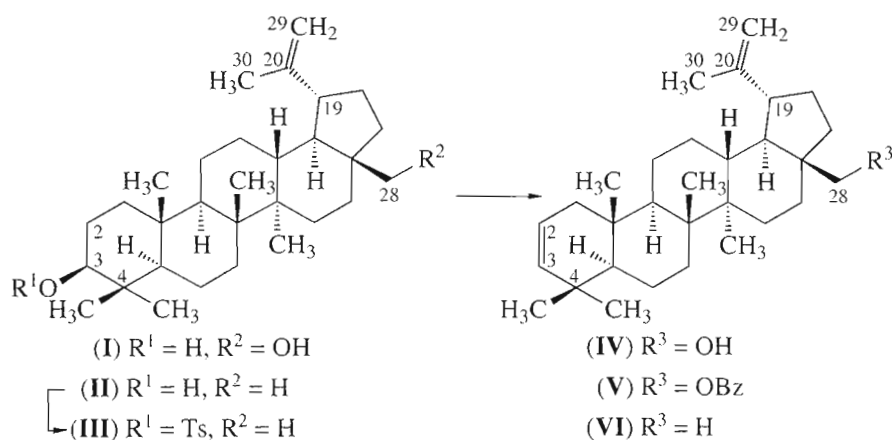


Схема 1.

нений 3 $\beta$ -ряда; 2) восстановление бетулоновой кислоты (VII). Для эпимеризации исследовали две реакции, оказавшиеся эффективными в случае холестан-3 $\beta$ -ола: замещение тозилокси- на формилоксигруппу [10] и замещение HO-группы на бензоилоксигруппу по Мицунобу [11]. В нашем случае оба метода привели почти целиком к продуктам  $\Delta^{2,3}$ -элиминирования (схема 1; табл. 1). Из 3-*O*-тозиллупеола (III) образовался 3-дезоксиде-2,3-дегидролупеола (VI); из бетулина (I) 3-дезоксиде-2,3-дегидробетулина (IV) и бензоат 3-дезоксиде-2,3-дегидробетулина (V). В  $^1H$ -ЯМР-спектрах соединений наблюдались сигналы дополнительной двойной связи в районе  $\delta$  5.39–5.28 м.д., отсутствовали сигналы протонов при C3. В спектре же соединения (V) сигналы метиленовых протонов  $CH_2O$  сдвинулись в более слабое поле на 0.65 и 0.75 м.д. по сравнению с соответствующими сигналами в исходном бетулине (I).

Кольцо А у соединений лупанового ряда, в отличие от веществ холестанового ряда, содержит гемдиметильную группировку при C4. Стерические и электронные эффекты, обусловленные этой структурной особенностью, делают более веро-

ятными реакции элиминирования и препятствуют реакции бимолекулярного замещения. В связи с этим, вероятно, любые варианты бимолекулярного замещения в положении 3 лупанового ряда малоперспективны.

Каталитическое гидрирование бетулоновой кислоты (VII) над никелем Ренея вплоть до температуры 50°C и давления 50 атм. приводило к восстановлению лишь двойной связи изопропенильной группы с образованием 20,29-дигидробетулоновой кислоты (VIII). В  $^1H$ -ЯМР-спектре данного соединения наблюдаются два характерных дублета метильных протонов при C30 (0.88 м.д.) и C29 (0.76 м.д.). В то же время сигнал от протона при C3 не появился. При использовании более активного катализатора, 5% Ru/C, образовывалась смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -эпимеров 20,29-дигидробетулиновой кислоты (IXa), (IXb) в соотношении 60 : 40 (по данным  $^1H$ -ЯМР-спектра) (схема 2; табл. 1). О восстановлении кетогруппы бетулоновой кислоты говорит появление в ИК-спектре характерного сигнала OH-группы (3430  $cm^{-1}$ ). Кроме того, в  $^1H$ -ЯМР-спектре вещества появились сигналы протонов изопропиальной группы, а также протонов

Таблица 1. Эпимеризация гидроксильной группы в тритерпенах лупанового ряда

Исходные вещества	Условия реакции		Продукты реакции	Выход, %
(I)	Ph <sub>3</sub> P, PhCO <sub>2</sub> H, EtCO <sub>2</sub> N=NCO <sub>2</sub> Et/THF	20°C/10 ч	(IV)	44
			(V)	16
(III)	DMF	78°C/23 ч	(VI)	17
(VII)	H <sub>2</sub> /Ni(Ренея)/ <i>i</i> Pr	50°C/50 атм.	(VIII)	95
	H <sub>2</sub> /5% Ru/C/MeOH	80°C/80 атм.	(IXa)	45
			(IXb)	29
	L-Селектрид/THF	-80°C/5 ч	(Xa)	38
			(Xb)	19

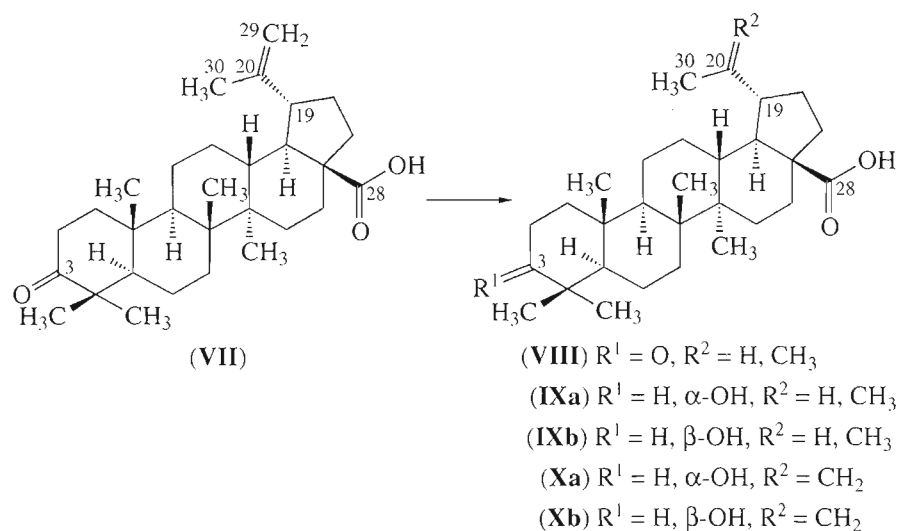


Схема 2.

при С3, соответствующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -эпимеру: 3.29, 3.15 м.д.

Получить эпибетулиновую кислоту (**Xa**) нам удалось при использовании стерически затрудненного гидрида, три-втор-бутилборгидрида лития (L-Селектрид). Восстановление бетулоновой кислоты (**VII**) в этом случае приводит к смеси эпимеров (**Xa**), (**Xb**) в соотношении 62 : 38 (по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра) (схема 2; табл. 1). Следует отметить, что хроматографическая подвижность эпибетулиновой (**Xa**) и бетулоновой кислоты (**VII**) близки, тогда как разница в подвижности эпимеров бетулиновой кислоты (**Xa**), (**Xb**) довольно значительная.

Изучение цитотоксической активности эпимеров бетулиновой кислоты (**Xa**), (**Xb**) проводилось на культурах опухолевых клеток человека различного гистогенеза: меланомы (линии MS, Bro), карциномы яичника (CaOv). Цитотоксический эффект оценивали с помощью МТТ-теста [12]. Используемые клетки были стандартно чувствительны к цитостатику доксорубину ( $IC_{50}$  от 0.1 до 0.5 мкМ).

По результатам исследования (табл. 2) бетулиновая кислота (**Xb**) проявила цитотоксичность

**Таблица 2.** Цитотоксическая активность эпимеров бетулиновой кислоты относительно клеток опухолей человека ( $IC_{50}$ , мкМ)

Клетки	Эпибетулиновая кислота ( <b>Xa</b> )	Бетулиновая кислота ( <b>Xb</b> )
CaOv	>10	5
MS	>10	5
Bro	>10	>10

( $IC_{50} = 5$  мкМ) по отношению к двум клеточным культурам: MS и CaOv, но не показала активности по отношению к клеткам меланомы Bro ( $IC_{50} > 10$  мкМ). Эпибетулиновая кислота (**Xa**) не обнаружила ожидаемого увеличения активности ( $IC_{50} > 10$  мкМ). Однако при концентрации 10 мкМ эпимер (**Xa**) показал низкую цитотоксическую активность ко всем трем культурам опухолевых клеток, выживаемость которых составляла 70–75% (табл. 3).

Таким образом, мы не выявили ожидаемого увеличения цитотоксичности эпибетулиновой кислоты (**Xa**) в отношении клеток меланомы человека MS по сравнению с цитотоксической активностью бетулиновой кислоты (**Xb**). Однако спектр биологической активности эпимера (**Xa**) несколько изменился по сравнению с активностью кислоты (**Xb**), так как выявлена цитотоксическая активность вещества (**Xa**) по отношению к линии клеток меланомы Bro, которые не чувствительны к бетулиновой кислоте.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали диизопропилазодикарбоксилат и L-Селектрид (Aldrich), остальные реактивы отече-

**Таблица 3.** Выживаемость клеток опухолей человека при действии эпибетулиновой и бетулиновой кислот (10 мкМ) (в % от контроля)

Клетки	Эпибетулиновая кислота ( <b>Xa</b> )	Бетулиновая кислота ( <b>Xb</b> )
CaOv	75	52
MS	70	52
Bro	70	100

ственного производства квалификации не ниже "х. ч."

Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ) в  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  и ацетоне- $d_6$  при рабочей частоте 200.13 МГц. Химические сдвиги ( $\delta$ ) приведены относительно  $\text{Me}_4\text{Si}$ . ИК-спектры регистрировали на приборе Hitachi 270-30 data processor (Япония) в области  $\nu$  800–3600  $\text{cm}^{-1}$  в вазелиновом масле. Оптическое поглощение измеряли на сканирующем спектрометре Multiskan MCC/340 (LabSystem, Финляндия) при 540 нм.

ТСХ осуществляли на пластинках "Сорбтон Диол" (Хромдет-Экология, Россия) в системах: хлороформ (А), хлороформ–метанол–муравьиная кислота, 100 : 2 : 0.5 (Б), хлороформ–метанол–30% аммиак, 40 : 1 : 0.1 (В). Тритерпены обнаруживали на пластинках с помощью реактива, содержащего анисовый альдегид [13]; этот реагент был модифицирован нами (смесь 1.85 мл *n*-анисового альдегида, 95 мл спирта, 7.5 мл серной кислоты, 0.75 мл уксусной кислоты). Для обнаружения карбонилсодержащих веществ использовали спиртовой раствор 2,4-динитрофенилгидразина. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 60/100 мкм (Merck, ФРГ).

Бетулин (I) и лупеол (II) выделены из коры березы [14]. Бетулоновая кислота (VII) получена по методике [7].

Изучение сравнительной цитотоксичности эпимеров бетулиновой кислоты проводилось в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина на культурах клеток опухолей человека: меланомы (линии MS, Bro) и карциномы яичника (CaOv).

**Попытка эпимеризации бетулина (I) по Мицунобу.** К 2 мл сухого THF при перемешивании добавили 0.20 г (0.45 ммоль) бетулина (I), 0.26 г (0.99 ммоль)  $\text{Ph}_3\text{P}$ , раствор 0.12 г (0.99 ммоль)  $\text{PhCOOH}$  в 2 мл сухого THF и раствор 0.20 г (0.99 ммоль) диизопропилазодикарбоксилата в 2 мл сухого THF. Смесь перемешивали 10 ч при 20°C и упаривали. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя хлороформом. Получили 0.083 г (44%) 3-дезоксидегидробетулина (IV) в виде масла;  $R_f$  0.50 (А). ИК: 3470 (ОН), 1660 (C=C).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.37 (2H, м, CH=CH–), 4.66 (1H, д, =CH<sub>2</sub>), 4.56 (1H, д, =CH<sub>2</sub>), 3.81 (1H, м, H<sub>28</sub>), 3.26 (1H, м, H<sub>28</sub>), 2.36 (1H, м, H<sub>19</sub>), 1.66 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 1.23 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.94 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.80 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.74 (3H, с, CH<sub>3</sub>); и 0.037 г (16%) 28-бензоата 3-дезоксидегидробетулина (V) в виде масла;  $R_f$  0.69 (А); ИК: 3030, 3050 (C–H аром.), 1720 (C=O в PhCOOR), 1650 (C=C), 1590 (C=C аром.), 1280 (C–O в RCOOR).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.03 (2H, м, аром. протоны), 7.50 (3H, м, аром. протоны), 5.35 (2H, м, CH=CH), 4.70 (1H, д, =CH<sub>2</sub>), 4.59 (1H, д, =CH<sub>2</sub>), 4.50 (1H, д, H<sub>28</sub>), 4.12

(1H, д, H<sub>28</sub>), 2.38 (1H, м, H<sub>19</sub>), 1.66 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 1.23 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.94 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.80 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.74 (3H, с, CH<sub>3</sub>).

**3-О-Тозиллупеол (III).** К 0.94 мл пиридина добавляли 0.080 г (0.19 ммоль) лупеола (II), 0.075 г (0.39 ммоль) тозилхлорида при 20°C и перемешивали 24 ч. Затем к реакционной смеси добавляли воду до начала выпадения осадка. Осадок отфильтровывали, растворяли в хлороформе, промывали 3 раза по 5 мл 5% HCl и сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Раствор упаривали, остаток сушили над  $\text{P}_2\text{O}_5$  в вакууме. Получили 0.090 г (85%) тозиллупеола (III) в виде масла;  $R_f$  0.63 (А).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.34 (4H, м, аром. протоны), 4.66 (1H, д, =CH<sub>2</sub>), 4.56 (1H, д, =CH<sub>2</sub>), 4.18 (1H, м, H<sub>3</sub>), 2.31 (1H, м, H<sub>19</sub>), 2.21 (3H, м, CH<sub>3</sub>Ar), 1.66 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 1.23 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.94 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.92 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.80 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.74 (3H, с, CH<sub>3</sub>).

**Попытка эпимеризации 3-О-тозиллупеола (III) в DMF.** 0.080 г (0.14 ммоль) тозилата (III) растворяли в 3.2 мл неперегнанного DMF и нагревали 23 ч при 78°C. Раствор упаривали и хроматографировали на силикагеле, элюируя смесью гексан–хлороформ (1 : 1). Получили 0.010 г (17%) 3-дезоксидегидробетулина (VI) в виде масла;  $R_f$  0.67 (А).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.35 (2H, м, CH=CH), 4.67 (1H, м, =CH<sub>2</sub>), 4.55 (1H, м, =CH<sub>2</sub>), 2.38 (1H, м, H<sub>19</sub>), 1.66 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 1.23 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.94 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.80 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.74 (3H, с, CH<sub>3</sub>).

**Каталитическое гидрирование бетулоновой кислоты (VII).** А. Гидрирование над никелем Ренея под давлением. К 0.500 г (1.05 ммоль) натриевой соли бетулоновой кислоты (VII), растворенной в 40 мл изопропилового спирта, добавили 2 г никеля Ренея, перемешивали при 20°C под давлением  $\text{H}_2$  50 атм. в течение 17 ч. Затем подняли температуру в реакционной смеси до 50°C, давление  $\text{H}_2$  в автоклаве оставили 50 атм. Через 17 ч катализатор отфильтровали, растворитель упарили. Осадок смешивали в делительной воронке с 70 мл эфира и 30 мл 10% соляной кислоты, встряхивали до полного растворения кристаллов, эфирный слой отделяли, промывали водой, сушили сульфатом натрия и упаривали. Получили 0.450 г (95%) дигидробетулоновой кислоты (VIII) в виде бесцветных кристаллов; т. пл. 250–253°C (по лит. данным т. пл. 251–254°C [15]);  $R_f$  0.42 (В). ИК: 1703 (C=O в RCOOR), 1687 (C=O в COOH);  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 1.07 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 1.03 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.97 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, д, CH<sub>3</sub>), 0.84 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.75 (3H, д, CH<sub>3</sub>).

Б. Гидрирование в присутствии 5% Ru/C. Раствор 0.20 г (0.44 ммоль) бетулоновой кислоты (VII) в 15 мл метанола гидрировали над 0.10 г 5% Ru/C при 40 атм. и 20°C. Через 22 ч давление  $\text{H}_2$  подняли до 70 атм., температуру до 50°C. По истечении 7 ч перемешивание и нагревание отключи-

ли, автоклав оставили на 15 ч при 20°C и под давлением H<sub>2</sub>. Затем давление H<sub>2</sub> было повышено до 80 атм., а температура до 80°C. После 4.5 ч перемешивание и нагревание были отключены, автоклав оставили под давлением H<sub>2</sub> на 15 ч. Далее реакционную смесь отфильтровали от катализатора, упарили и хроматографировали на силикагеле, элюируя хлороформом. Получали 0.090 г (45%) 3 $\alpha$ -20,29-дигидробетулиновой кислоты (**IXa**) в виде бесцветных кристаллов; т. пл. 297–300°C (по лит. данным т. пл. 298–301°C [9]); R<sub>f</sub> 0.39 (B); ИК: 3500 (ОН в СНОН), 1690 (С=О в СООН); <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 3.31 (1 H, м, H3 $\beta$ ), 1.04 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.97 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.93 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3 H, д, CH<sub>3</sub>), 0.84 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.77 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.74 (3 H, д, CH<sub>3</sub>). Дальнейшее элюирование дало 0.06 г (29%) 3 $\beta$ -20,29-дигидробетулиновой кислоты (**IXb**) в виде бесцветных кристаллов; R<sub>f</sub> 0.26 (B); т. пл. выше 310–313°C (по лит. данным т. пл. 312–314°C [16]); ИК: 3500 (ОН в СНОН), 1690 (С=О в СООН); <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 3.15 (1 H, м, H3 $\alpha$ ), 1.06 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.98 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.95 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3 H, д, CH<sub>3</sub>), 0.84 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.78 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.76 (3 H, д, CH<sub>3</sub>).

**3 $\alpha$ -Бетулиновая кислота (Xa).** К охлажденному до –80°C раствору 0.33 г (0.73 ммоль) бетулиновой кислоты (**VII**) в 10 мл сухого THF в атмосфере аргона добавили 5.6 мл 1 М раствора (5.6 ммоль) L-Селектрида в THF и перемешивали в течение 5 ч. К реакционной смеси прибавили 18 мл 2 н. раствор NaOH и 4 мл 38% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и перемешивали 1 ч. THF из смеси упарили, к выпавшему осадку добавили 15 мл 10% HCl и 20 мл эфира. Смесь перемешивали до полного растворения осадка. Эфирный слой отделяли и упаривали. 254 мг остатка хроматографировали на силикагеле, элюируя хлороформом. Получили 127 мг (38%) 3 $\alpha$ -бетулиновой кислоты (**Xa**) в виде бесцветных кристаллов с т. пл. 278–281°C (по лит. данным т. пл. 279–283°C [9]); R<sub>f</sub> 0.38 (B), <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>-ацетон-d<sub>6</sub> (1 : 1)): 4.64 (1 H, м, =CH<sub>2</sub>), 4.51 (1 H, м, =CH<sub>2</sub>), 3.29 (1 H, м, H3 $\beta$ ), 2.99 (1 H, м, H19), 1.62 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.94 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.88 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.86 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.78 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.75 (3 H, с, CH<sub>3</sub>). Дальнейшее элюирование дало 0.063 г (19%) 3 $\beta$ -бетулиновой кислоты (**Xb**) в виде бесцветных кристаллов с т. пл. 291–293°C (по лит. данным т. пл. 291–292°C [17]); R<sub>f</sub> 0.31 (B); <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD, 3 : 1): 4.71 (1 H, м, =CH<sub>2</sub>), 4.59 (1 H, м, =CH<sub>2</sub>), 3.15 (1 H, м, H3 $\alpha$ ), 3.01 (1 H, м, H19), 1.67 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.96 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.94 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.93 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.81 (3 H, с, CH<sub>3</sub>), 0.74 (3 H, с, CH<sub>3</sub>).

**Цитотоксичность эимеров бетулиновой кислоты.** Культуры клеток меланомы человека линии MS (время удвоения Td 36 ч), Bro (Td 48 ч) и культуру карциномы яичника человека линии CaOv (Td 40 ч) выращивали в виде монослоя в среде роста DMEM (Sigma) с добавлением 10% FBS (эмбриональная сыворотка коровы "Gibco DRL"),

2 mM L-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> – 95% воздуха при 37°C.

Клеточную суспензию помещали в 96-луночные планшеты, к культурам опухолевых клеток в фазе экспоненциального роста добавляли исследуемые вещества в разведении, инкубировали 72 ч. Выживаемость клеток определяли с помощью МТТ-теста [12]. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в DMSO и измеряли оптическое поглощение на сканирующем спектрометре при 540 нм. Выжившую часть клеток определяли в процентах по соотношению величин парциального поглощения в опытных образцах и контроле (опухолевые клетки в среде роста без исследуемых препаратов).

Работа поддержана грантами РФФИ № 00-04-48363, 01-04-06098 (MAC), Минвуза РФ № 203.05.04.003.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sober A.J., Koh H.K., Tran N.-L.T., Washington Jr., C.V. // *Melanoma and other Skin Cancers* / Eds A.S. Fauci, E. Braunwald, K.J. Isselbacher, J.D. Wilson, J.B. Martin, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo. Harrison's Principles of Internal Medicine. New York: McGraw-Hill, 1998. P. 543–549.
2. Atkins M.B. // *Current Opinion in Oncology*. 1997. V. 9. P. 205–213.
3. Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W., Fong H.H., Kinghorn A.D., Brown D.M. // *Nat. Med.* 1995. V. 1. P. 1046–1051.
4. Sun I.C., Wang H.-K., Kashiwada Y., Shen J.-K. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 4648–4657.
5. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L.M., Chen C.H., Garrett P.E., Lee K.H. // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 1016–1017.
6. Kanamoto T., Kashiwada Y., Kanbara K., Gotoh K., Yoshimori M., Goto T., Sano K., Nakashima H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. P. 1225–1230.
7. Ле Банг Шон, Каплун А.П., Шпилевский А.А., Андия-Правдивый Ю.Э., Алексеева С.Г., Григорьев В.Б., Швец В.И. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 787–793.
8. Kim D.S., Pezzuto J.M., Pisha E. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998. V. 8. P. 1707–1712.
9. Herz W., Santhanam P.S., Wahlberg I. // *Phytochemistry*. 1972. V. 11. P. 3061–3063.
10. Chang F.C., Blickenstaff R.T. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 2906.
11. Mitsunobu O. // *Synthesis*. 1981. № 1. P. 1–29.
12. Alley C.M., Scudiero D.A., Monks A. // *Cancer Res.* 1988. V. 48. P. 589–601.
13. Kritchevsky D., Martak D.S., Rothblat G.H. // *Anal. Biochem.* 1963. V. 5. P. 388–392.
14. Jaaskelainen P. // *Paperi ja Puu*. 1981. V. 63. P. 599–603.
15. Wahhab A., Ottosen M., Bachelor F.W. // *Can. J. Chem.* 1991. V. 69. P. 570–577.



16. Otsuca H., Fujioka S., Komiya T., Goto M., Hiramatsu Y., Fujimura H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. P. 3099–3104.
17. Kim D., Chen Z., Nguyen T., Pezzuto J.M., Qiu S., Lu Z.Z. // Synthetic Commun. 1997. V. 27. P. 1607–1612.

## Epimerization of Hydroxyl Group in the Lupan Series Triterpenoids

A. V. Symon\*, A. P. Kaplun<sup>#</sup>, N. K. Vlasenkova\*\*, G. K. Gerasimova\*\*,  
Le Bang Shon\*, E. F. Litvin\*\*\*, L. M. Kozlova\*\*\*, E. L. Surkova\*, and V. I. Shvets\*

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 434-8355; e-mail: alex.kaplun@mtu-net.ru

\* Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

\*\* Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

\*\*\* Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, GSP Moscow, 119992 Russia

Two methods of obtaining of 3 $\alpha$ -betulinic acid and related compounds from their 3 $\beta$ -epimers were studied: the reaction of bimolecular substitution and the stereoselective reduction of 3-ketoderivatives. The substitution of acyloxy by formyloxy group in 3-*O*-tosyllupeol or of the betulin hydroxyl by benzyloxy group resulted only in  $\Delta^{2,3}$ -elimination products, with none of the expected products of bimolecular substitution being found. The catalytic hydrogenation of betulonic acid over Raney nickel resulted only in reduction of the isopropenyl double bond, whereas the use of 5% Ru/C gave a 60 : 40 mixture of epimers of dihydrobetulinic acid. Practically the same mixture of betulinic acid epimers was obtained when reducing betulonic acid with L-Selectride. The cytotoxic activity of 3 $\alpha$ -betulinic acid increased toward melanoma Bro cells and decreased toward melanoma MS cells. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* betulinic acid, epimerization, melanoma