



УДК 547.918:547.914.4.057

СИНТЕЗ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРАЗИДОВ И ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗАЛЬГИДРАЗИДОВ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ

© 2003 г. О. Б. Флехтер^{*,#}, Е. И. Бореко^{**}, Л. Р. Нигматуллина^{*},
Н. И. Павлова^{**}, С. Н. Николаева^{**}, О. В. Савинова^{**},
В. Ф. Еремин^{**}, Л. А. Балтина^{*}, Ф. З. Галин^{*}, Г. А. Толстик^{*}

^{*}Институт органической химии Уфимского научного центра РАН,
450054, Уфа, просп. Октября, 71;

^{**}Государственное учреждение научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Поступила в редакцию 02.04.2002 г. Принята к печати 01.10.2002 г.

Синтезированы новые азотсодержащие производные бетулиновой и бетулоновой кислот – гидразиды и *N'*-бензальгидразиды. Ингибирование ими вирусов гриппа А, герпеса простого I типа, энтеровируса ЕСНО6 и ВИЧ-1 исследовано в экспериментах *in vitro*. Наиболее высокой активностью в отношении вируса гриппа обладал 3-оксим бетулоновой кислоты. Бетулоновая кислота, 4-хлорбензальгидразид бетулиновой кислоты, бензальгидразид 3-оксима бетулоновой кислоты и гидразид бетулиновой кислоты ингибировали размножение вируса герпеса. Гидразид бетулиновой кислоты был активен также в отношении ВИЧ-1. Исследованные производные бетулиновой кислоты характеризуются слабой активностью в отношении энтеровируса ЕСНО6.

Ключевые слова: бензальгидразиды; бетулиновая кислота, гидразиды; лупановые тритерпеноиды, противовирусная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Бетулиновая кислота и ее производные – это новый класс ингибиторов вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1). Они блокируют стадию слияния ВИЧ с клеткой [1–4]. Химическая модификация бетулиновой кислоты – перспективный подход к дизайну новых высокоэффективных противовирусных агентов. Так, ряд ω -аминоалкановых амидов бетулиновой кислоты проявили анти-ВИЧ-активность в наномолярных концентрациях [5]. Среднеэффективные концентрации порядка 0.35–0.86 нМ оказались характерными для 3-*O*-(3',3'-диметил)сукцинилпроизводных бетулиновой и дигидробетулиновой кислот [2, 6]. В то же время противовирусные свойства самой бетулиновой кислоты в отношении ВИЧ-1 весьма умеренны ($EC_{50} = 1.4$ мкМ) [3]. Бетулин, бетулиновая и бетулоновая кислоты (как и другие тритерпеноиды групп олеанана, урсана и даммарана) обладают противовирусными свойствами также и в отношении вирусов герпеса простого и Эпштейн–Барр [3, 7–11]. Среди лупановых тритерпеноидов только бетулин исследован в экспериментах с вирусами гриппа и было установлено, что он не подавляет их размножение [9]. О влиянии бетулино-

вой кислоты и ее производных на другие виды вирусов в литературе не сообщалось. В последние годы обнаружена также уникальная способность бетулиновой кислоты ингибировать рост меланомы человека и других опухолей [12, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В продолжение работ по химической модификации лупановых тритерпеноидов [14–16] мы осуществили синтез новой группы азотсодержащих производных бетулиновой кислоты (I), 3-кетобетулиновой (бетулоновой) кислоты (II) и 3-оксима бетулоновой кислоты (III) и изучили влияние некоторых из этих соединений на размножение вирусов гриппа А (A/FPV/Rostock/34), герпеса простого I типа (ВПП-1) и энтеровируса ЕСНО6 *in vitro*.

Бетулиновая кислота (I) была получена нами по модифицированной методике [17] в две стадии – путем окисления бетулина реактивом Джонса с последующим восстановлением бетулоновой кислоты (II) $NaBH_4$ в среде изопропанола; соотношение 3 β /3 α -эпимеров при этом составило 97 : 3, а выход – 95%.

Как известно, гидразиды кислот и их производные нашли широкое применение в медицине в качестве антиинфекционных препаратов [18]. Ги-

[#] Автор для переписки (факс: (3472) 356066; эл. почта: obf@anrb.ru).

Противовирусная активность производных бетулиновой кислоты

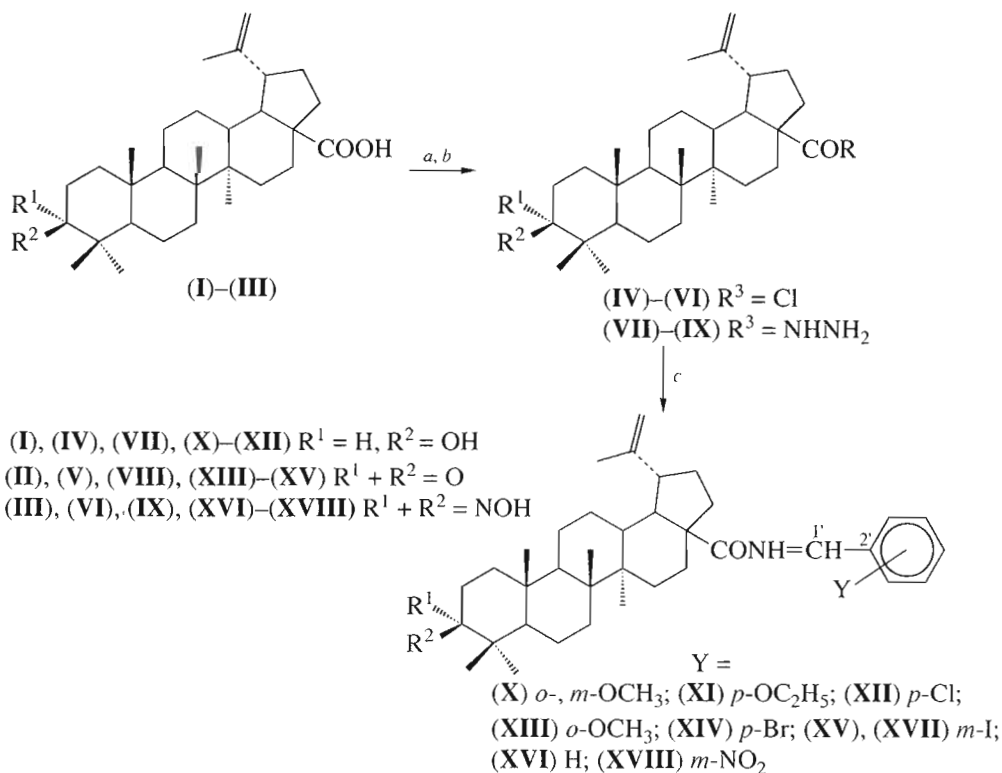
Соединение	Вирус гриппа А		Вирус герпеса простого I типа		Вирус ЕСНО6	
	EC ₅₀ (I ₉₅), мкМ	МПК/EC ₅₀	EC ₅₀ (I ₉₅), мкМ	МПК/EC ₅₀	EC ₅₀ (I ₉₅), мкМ	МПК/EC ₅₀
(II)	5.73 (12.22–2.68)	9.58	2.50 (2.76–2.28)	43.86	73.32 (77.11–69.69)	3.0
(III)	2.17 (2.47–1.89)	392.16	81.56 (85.69–77.64)	1.30	4.19 (4.64–3.79)	6.09
(VII)	н.и.	н.и.	9.96 (11.26–8.79)	21.32	н.и.	н.и.
(IX)	2.04 (2.13–1.98)	25.25	>51.60	<1	0.68 (127.14–0.004)	37.87
(XII)	71.96 (146.25–35.44)	4.69	5.16 (5.89–4.54)	32.68	50.73 (60.77–42.34)	6.65
(XVI)	15.40 (30.13–7.86)	11.34	7.70 (9.85–6.03)	181.41	406.80 (722.67–229.00)	<1

Обозначения: н. и. – не исследовали; I₉₅ – доверительный интервал для 95% вероятности.

дразиды лупановых кислот и их производные в литературе не описаны.

Мы получили гидразиды (VII)–(IX) взаимодействием хлорангидридов бетулиновой, бетулоновой и 3-оксима бетулоновой кислот (IV)–(VI) с гидразингидратом в эфире с выходами 91–95%. Исходные хлорангидриды (IV)–(VI) образуются с количественными выходами при обработке соответствующих кислот (I)–(III) оксалилхлоридом в безводном бензоле при 0°C. При кипячении гидразидов (VII)–(IX) с эквимольным количеством ароматического альдегида в этаноле в течение 6 ч получены бензальгидразиды (X)–(XVIII) (выход 87–92%). Строение полученных соединений

подтверждено данными ИК-, УФ- и ЯМР-спектров. Так, в спектрах ¹³C-ЯМР атомы углерода при связи C=N резонируют при 141–145 м. д., амидной группы CONH – при 172–175 м. д., ароматических углеродов – при 110–160 м. д. В спектрах ¹H-ЯМР сигналы протонов групп N–CH–Ar и CONH проявляются в области слабого поля при 8–9 м. д. в виде синглетов. ИК-спектры всех гидразидов характеризуются широкими полосами поглощения NH₂-группы в области 3500–3000 см⁻¹, а CONH-группа дает полосы поглощения при 1680 и 1550 см⁻¹. В УФ-спектрах бензальгидразидов имеются высокоинтенсивные максимумы поглощения в об-



a: (COCl)₂/C₆H₆; b: NH₂NH₂ · H₂O/(C₂H₅)₂O; c: EtOH, YC₆H₄CHO

Схема.

ласти 282–284 и 290–295 нм, типичные для хромофоров ароматических бензальгидразидов.

Наиболее высокой противовирусной активностью в отношении вируса гриппа обладал 3-оксим бетулоновой кислоты (III). В диапазоне концентраций этого соединения от 851.6 (максимальная переносимая концентрация, МПК) до 12.8 мкМ титр вируса снижался на величину от 3.52 до 1.98 lg БОЕ/мл, а в присутствии 6.4 мкМ вещества (III) – на 0.96 lg БОЕ/мл по сравнению с контролем. Соответственно среднеэффективная концентрация (EC₅₀) для соединения (III) среди исследованных веществ имеет самое низкое значение, а отношение МПК/EC₅₀ – самое высокое (таблица).

Гидразид 3-оксима бетулоновой кислоты (IX) проявил менее выраженную активность в экспериментах с вирусом гриппа. Снижение титра вируса при его присутствии в концентрациях 51.6 и 25.8 мкМ составило 1.10 и 1.06 lg БОЕ/мл по сравнению с контролем соответственно. Соединения (XII) и (XVI) оказались практически неактивными в отношении данного вируса.

В то же время соединения (II), (VII), (XIII) и (XVI) способны подавлять размножение вируса простого герпеса. Так, бетулоновая кислота (II) была высокоактивна в интервале концентраций от 109.7 (МПК) до 6.6 мкМ, снижение титра вируса составило от 3.00 до 1.59 lg ТЦИД₅₀ по сравнению с контролем. Аналогичная активность наблюдалась и для соединения (XVI) (снижение титра вируса от 2.00 до 1.36 lg ТЦИД₅₀/мл), но в более широком интервале концентраций от 1397.3 (МПК) до 10.5 мкМ. Соединение (XII) оказалось менее активным, в его присутствии титр ВГП-1 снижался на величину 1–2 lg ТЦИД₅₀/мл в интервале концентраций от 168.8 (МПК) до 20.2 мкМ. 3-Оксим бетулоновой кислоты (III) и ее гидразид (IX) неактивны в отношении данного вируса.

Исследованные производные бетулиновой кислоты малоэффективны в отношении энтеровируса ЕСНО6. Так, 3-оксим бетулоновой кислоты (III) снижал его титр на величину 1.27–1.22 lg ТЦИД₅₀/мл в диапазоне концентраций от 25.5 (МПК) до 6.4 мкМ. Бетулоновая кислота (II) была эффективна только в МПК (21.9 мкМ, снижение титра вируса на 1.93 lg ТЦИД₅₀/мл). Снижение титра вируса в присутствии соединения (XII) происходило в присутствии 337.5 (МПК)–42.2 мкМ, однако было наименее выраженным (0.92–0.4 lg ТЦИД₅₀/мл). Соединения (IX) и (XVI) были неактивны.

В экспериментах с ВИЧ-1 установлены выраженные противовирусные свойства соединения (VII) (EC₅₀, вычисленная по снижению количества антигенсодержащих клеток методом непрямой

иммунофлюоресценции 0.23 (0.40–0.15) мкМ, отношение МПК/EC₅₀ = 20).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ТСХ проводили на пластинках Silufol (Chemapol, Чехия), используя систему растворителей хлороформ–метанол, 20 : 1. Вещества обнаруживали 20% раствором фосфорновольфрамовой кислоты в этаноле с последующим нагреванием при 100–120°C в течение 2–3 мин.

Спектры ¹³C- и ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (75.5 и 300 МГц соответственно) в дейтерохлороформе, внутренний стандарт – SiMe₄; приведены химические сдвиги в миллионных долях и константы спин-спинового взаимодействия (J) в герцах. ИК-спектры (ν, см⁻¹) снимали на спектрометрах Specord M80 и UR-20 в пасте с вазелиновым маслом. УФ-спектры (λ, нм (ε, М⁻¹ см⁻¹)) записаны на спектрофотометре Specord M40 в смеси метанол–хлороформ (1 : 1). Температуры плавления определяли на микронагревательном столике Voetius. Бетулин выделяли по методике [19], бетулиновую, бетулоновую и 3-оксим бетулоновой кислоты получали согласно работам [17, 20].

Получение хлорангидридов лупановых кислот (IV)–(VI). К 1 ммоль кислоты (I)–(III) в 10 мл безводного бензола при перемешивании прибавляли по каплям 0.3 мл оксалилхлорида, и смесь перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре в течение 2 ч. Растворитель упаривали в вакууме. Выход 95–97%.

Хлорангидрид (IV); аморфный порошок кремового цвета; ИК-спектр: 1810 (СОСl). Найдено, %: С 76.00, Н 9.72, Cl 7.90. С₃₀H₄₇O₂Cl. Вычислено, %: С 75.82, Н 9.99, Cl 7.46.

Хлорангидрид (V); аморфный порошок желтого цвета; ИК-спектр: 1820 (СОСl). Найдено, %: С 76.57, Н 9.43, Cl 8.02. С₃₀H₄₅O₂Cl. Вычислено, %: С 76.14, Н 9.60, Cl 7.49.

Хлорангидрид (VI); аморфный порошок серого цвета; ИК-спектр: 1825 (СОСl). Найдено, %: С 74.22, Н 9.39, N 2.70, Cl 7.42. С₃₀H₄₆O₂NCl. Вычислено, %: С 73.80, Н 9.52, N 2.87, Cl 7.26.

Общая методика синтеза гидразидов (VII)–(IX). К 1 ммоль хлорангидрида кислоты (IV), (V) или (VI) в 10 мл эфира при перемешивании и охлаждении до 0 ± 5°C прибавляли по каплям 1.5 мл 100% гидразингидрата. Выпавший при охлаждении (5–7°C) осадок гидразида отфильтровывали, промывали серным эфиром (2 × 20 мл) и сушили.

Гидразид 3β-гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (VII). Из 0.47 г (1 ммоль) хлорангидрида бетулиновой кислоты (IV) получили 0.44 г (93%) гидразида (VII); R_f 0.31; т. пл. 285°C; ИК-спектр: 3470, 3300 (NH₂), 1732, 1680, 1560 (CONH), 1478, 1430, 1382, 1368, 1320, 1296, 1254, 1244, 1200, 1112,

1088, 1032, 990, 912, 888, 824, 760; ^1H -ЯМР: 0.76, 0.82, 0.87, 0.92, 0.97 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.10–2.00 (22 H, м, CH_2 , CH), 1.69 (3 H, с, CH_3), 2.27–2.56 (3 H, м, H13, H16), 3.09 (1 H, дт, J 3.6 и 11.5, H19), 3.14–3.22 (1 H, м, H3), 4.61 и 4.75 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 6.99 (1 H, уш. сигнал, CONH), 9.30 (2 H, уш. сигнал, NH_2); ^{13}C -ЯМР: 14.7, 15.4, 16.2, 18.3, 19.4, 20.9, 21.5, 22.9, 25.6, 27.4, 28.0, 29.5, 30.8, 33.3, 34.4, 37.2, 37.9, 38.2, 38.9, 40.2, 40.8, 42.4, 46.9, 50.3, 50.6, 55.0, 79.0 (C3), 109.6 (C29), 150.6 (C20), 177.2 (CONH). Найдено, %: C 76.74, H 10.62, N 5.85. $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2\text{N}_2$. Вычислено, %: C 76.53, H 10.73, N 5.95.

Гидразид 3-кето-луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (VIII). Из 0.47 г (1 ммоль) хлорангидрида бетулоновой кислоты (V) выделили (после перекристаллизации сырого продукта из хлороформа) 0.38 г (80%) вещества (VIII) в виде белого порошка; ИК-спектр: 3470 (NH_2), 1727, 1696, 1680, 1560 (CONH), 1480, 1434, 1398, 1372, 1330, 1280, 1242, 1214, 1191, 1118, 1078, 1024, 988, 920, 888, 824, 760; ^1H -ЯМР: 0.84, 0.91, 0.97, 1.01, 1.06 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.10–2.00 (21 H, м, CH_2 , CH), 1.68 (3 H, с, CH_3), 2.34–2.52 (3 H, м, H13, H16), 3.08 (1 H, дт, J 3.6 и 11.5, H19), 4.60 и 4.73 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 6.99 (1 H, уш. сигнал, CONH), 9.27 (2 H, уш. сигнал, NH_2); ^{13}C -ЯМР: 14.6, 16.0, 16.1, 19.4, 19.6, 21.0, 21.3, 25.6, 26.6, 29.4, 30.8, 33.2, 33.7, 34.1, 37.0, 37.9, 38.2, 39.6, 40.7, 42.5, 46.8, 47.3, 50.1, 50.3, 54.9, 55.3, 109.5 (C29), 177.2 (CONH), 218.0 (C3).

Гидразид 3-оксима луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (IX). Из 0.47 г (1 ммоль) хлорангидрида 3-оксима бетулоновой кислоты (VI) получили 0.46 г (94%) гидразида (IX); R_f 0.29; т. пл. $>300^\circ\text{C}$. ИК-спектр: 3030 (NH_2), 1732, 1680, 1650 (C=N–OH), 1555 (CONH), 1478, 1432, 1386, 1360, 1322, 1278, 1244, 1210, 1199, 1128, 1074, 1020, 992, 912, 888, 824, 760; ^1H -ЯМР: 0.86, 0.92, 0.96, 1.04, 1.13 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.20–2.00 (21 H, м, CH_2 , CH), 1.69 (3 H, с, CH_3), 2.35–2.56 (3 H, м, H13, H16), 3.03–3.17 (1 H, м, H19), 4.62 и 4.75 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 6.99 (1 H, уш. сигнал, CONH), 9.15 (2 H, уш. сигнал, NH_2), 9.21 (1 H, уш. сигнал, NOH); ^{13}C -ЯМР: 14.6, 15.8, 16.1, 19.1, 19.4, 21.2, 21.5, 22.9, 25.6, 27.4, 29.4, 30.8, 33.3, 34.0, 37.2, 37.9, 38.2, 38.7, 40.2, 40.8, 42.5, 46.8, 50.2, 50.3, 55.0, 55.6, 109.6 (C29), 150.5 (C20), 167.3 (C3), 177.3 (CONH). Найдено, %: C 74.59, H 10.03, N 8.80. $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_2\text{N}_3$. Вычислено, %: C 74.47, H 10.23, N 8.69.

Общая методика синтеза бензальгидразидов (X)–(XVIII). Смесь 1 ммоль гидразида (VII), (VIII) или (IX) и 1 ммоль ароматического альдегида в 20 мл этанола кипятили 6 ч. После охлаждения выливали в 50 мл 5% HCl, осадок отфильтровывали и промывали водой до нейтральной среды. Целевой продукт очищали методом колоночной хроматографии на окиси алюминия, со-

единения (XIII)–(XVIII) элюировали хлороформом, а соединения (X)–(XII) – ацетоном.

N' -(2,3-Диметоксибензаль)гидразид 3 β -гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (X). Из 0.47 г гидразида (VII) и 0.17 г 2,3-диметоксибензальдегида получили 0.57 г (92%) вещества в виде белого порошка; R_f 0.37; т. пл. 300–303 $^\circ\text{C}$; УФ-спектр: 295 (lg ϵ 4.61); ИК-спектр: 1680 (CONH), 1652, 1605 (Ar), 1550 (CONH), 1480, 1440, 1388, 1320, 1295, 1254, 1210, 1185, 1136, 1080, 1018, 998, 920, 888, 824, 766; ^1H -ЯМР: 0.82, 0.88, 0.91, 0.96, 1.04 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.10–2.00 (22 H, м, CH_2 , CH), 1.69 (3 H, с, CH_3), 2.33–2.58 (3 H, м, H13, H16), 2.88–2.99 (1 H, м, H19), 3.11 (1 H, дд, J 4.7 и 10.7, H3), 3.77 и 3.79 (2×3 H, 2 с, 2 OCH_3), 4.52 и 4.67 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 6.84 и 6.88 (2×1 H, 2 д, J 7.9, 2 H аром.), 6.99 (1 H, т, J 7.9, H аром.), 8.91 (1 H, с, N=CH–Ar), 9.04 (1 H, с, CONH); ^{13}C -ЯМР: 14.6, 15.3, 16.1, 18.2, 19.4, 20.9, 25.6, 27.3, 27.9, 29.6, 30.7, 33.1, 34.3, 37.1, 37.1, 37.4, 38.7, 38.8, 40.7, 40.7, 42.4, 46.3, 50.5, 50.6, 55.1, 55.3, 55.7 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 78.9 (C3), 109.4 (C29), 113.5, 118.6, 124.3, 127.6, 148.1, 152.4 (C аром.), 141.7 (C1'), 150.8 (C20), 172.5 (CONH). Найдено, %: C 75.80, H 9.43, N 4.47. $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{O}_4\text{N}_2$. Вычислено, %: C 75.67, H 9.46, N 4.52.

N' -(4-Этоксibenзаль)гидразид 3 β -гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (XI). Из 0.47 г гидразида (VII) и 0.14 мл *n*-этоксibenзальдегида получили 0.54 г (89%) продукта в виде белого порошка; R_f 0.36; т. пл. 303–305 $^\circ\text{C}$; УФ-спектр: 290 (lg ϵ 3.92); ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1732, 1660 (CONH), 1630 (Ar), 1590, 1550 (CONH), 1484, 1460, 1390, 1318, 1296, 1266, 1200, 1178, 1132, 1080, 1054, 1024, 992, 932, 888, 832, 756; ^1H -ЯМР: 0.75, 0.81, 0.87, 0.91, 0.96, 0.99 (18 H, 6 с, 6 CH_3), 1.10–2.00 (22 H, м, CH_2 , CH), 1.66 (3 H, с, CH_3), 2.45–2.68 (3 H, м, H13, H16), 2.93–3.07 (1 H, м, H19), 3.11 (1 H, дд, J 4.7 и 10.7, H3), 4.00–4.14 (2 H, м, OCH_2CH_3), 4.61 и 4.76 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 6.88 (2 H, д, J 7.9, H аром.), 7.64 (2 H, д, J 7.9, H аром.), 8.16 (1 H, с, N=CH–Ar), 8.87 (1 H, уш. сигнал, CONH); ^{13}C -ЯМР: 14.7, 15.3, 16.1, 16.4, 18.3, 19.5, 21.0, 22.3, 25.7, 27.4, 28.0, 29.6, 30.8, 33.4, 34.4, 37.2, 37.5, 38.7, 38.8, 40.8, 40.9, 42.5, 46.5, 50.5, 50.6, 55.3, 55.4, 64.0 (OCH_2CH_3), 79.0 (C3), 109.5 (C29), 114.6, 114.6, 126.5, 126.5, 129.0 (C3), 160.7 (C аром.), 142.6 (C1'), 150.7 (C20), 172.6 (CONH). Найдено, %: C 77.82, H 9.49, N 4.56. $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{O}_3\text{N}_2$. Вычислено, %: C 77.68, H 9.71, N 4.65.

N' -(4-Хлорбензаль)гидразид 3 β -гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (XII). Из 0.47 г гидразида (VII) и 0.14 г *n*-хлорбензальдегида получили 0.53 г (90%) вещества в виде белого порошка; R_f 0.41; т. пл. 270–273 $^\circ\text{C}$; УФ-спектр: 290 (lg ϵ 3.94); ИК-спектр: 1698, 1660 (CONH), 1652, 1605 (Ar), 1555 (CONH), 1517, 1483, 1426, 1394, 1317, 1265,

1244, 1196, 1155, 1116, 1070, 1032, 998, 924, 890, 822, 756; ^1H -ЯМР: 0.70, 0.76, 0.85, 0.93, 1.02 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.10–2.00 (21 H, м, CH_2 , CH), 1.70 (3 H, с, CH_3), 2.48–2.65 (3 H, м, H13, H16), 2.93–3.04 (1 H, м, H19), 3.16 (1 H, дд, J 4.6 и 10.7, H3), 4.55 и 4.68 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 7.48 (2 H, д, J 8.4, H аром.), 7.67 (1 H, д, J 8.3, аром. 2H), 8.28 (1 H, с, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ar}$), 8.55 (1 H, уш. сигнал, CONH); ^{13}C -ЯМР: 14.4, 15.0, 15.9, 18.5, 19.2, 21.0, 25.7, 27.6, 28.1, 29.2, 30.8, 33.4, 34.1, 37.2, 37.3, 37.3, 38.9, 39.4, 40.7, 40.9, 42.2, 46.2, 50.5, 50.7, 55.0, 55.4, 78.6 (C3), 109.9 (C29), 128.9, 129.0, 129.4, 129.4 (C-Cl), 134.2, 134.6 (C аром.), 144.8 (C1'), 150.9 (C20), 172.6 (CONH). Найдено, %: C 75.04, H 8.91, N 4.68, Cl 6.15. $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{O}_2\text{N}_2\text{Cl}$. Вычислено, %: C 74.89, H 9.02, N 4.72, Cl 5.97.

***N'*-(2-Метоксибензаль)гидразид 3-кетолуп-20(29)-ен-28-овой кислоты (XIII).** Из 0.47 г гидразида (VIII) и 0.14 г *o*-метоксибензальдегида получили 0.40 г (69%) вещества в виде кремового порошка; R_f 0.53; т. пл. 193–195°C; УФ-спектр: 282 ($\lg \epsilon$ 4.47); ИК-спектр: 1696, 1680 (CONH), 1662, 1600 (Ar), 1555 (CONH), 1518, 1490, 1436, 1320, 1292, 1243, 1206, 1136, 1088, 1040, 992, 890, 828, 756; ^1H -ЯМР: 0.83, 0.88, 0.92, 1.00, 1.05 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.10–2.00 (21 H, м, CH_2 , CH), 1.70 (3 H, с, CH_3), 2.38–2.52 (3 H, м, H13, H16), 2.97–3.08 (1 H, м, H19), 3.88 (3 H, д, OCH_3), 4.60 и 4.75 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 6.78–7.00 (2 H, м, H аром.), 7.28–7.40 (2 H, м, H аром.), 7.60 (1 H, д, J 7.8, H аром.), 7.67 (1 H, д, J 7.8, H аром.), 8.55 (1 H, с, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ar}$), 9.40 (1 H, уш., CONH); ^{13}C -ЯМР: 14.6, 15.9, 16.2, 19.4, 19.6, 21.0, 21.5, 25.6, 26.6, 29.6, 30.8, 33.1, 33.7, 34.1, 36.9, 37.5, 37.8, 39.6, 40.7, 42.5, 46.3, 47.3, 50.1, 50.3, 55.0, 55.2 (OCH_3), 55.6, 109.5 (C29), 110.9, 120.8, 127.6, 131.8, 132.8 (C аром.), 142.8 (C1'), 150.5 (C20), 157.9 (C аром.), 174.8 (CONH), 218.1 (C3). Найдено, %: C 77.93, H 9.18, N 4.90. $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{O}_3\text{N}_2$. Вычислено, %: C 77.76, H 9.29, N 4.77.

***N'*-(4-Бромбензаль)гидразид 3-кетолуп-20(29)-ен-28-овой кислоты (XIV).** Из 0.47 г гидразида (VIII) и 0.20 г *p*-бромбензальдегида получили 0.32 г (51%) аморфного вещества кремового цвета; R_f 0.45; УФ-спектр: 294 ($\lg \epsilon$ 4.33); ИК-спектр: 1726, 1700, 1660 (CONH), 1625 (Ar), 1550 (CONH), 1520, 1488, 1460, 1415, 1392, 1318, 1296, 1260, 1215, 1162, 1140, 1098, 1028, 990, 916, 888, 830, 766; ^1H -ЯМР: 0.91, 0.94, 0.95, 0.99, 1.01 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.10–2.00 (21 H, м, CH_2 , CH), 1.69 (3 H, с, CH_3), 2.43–2.51 (3 H, м, H13, H16), 3.00–3.14 (1 H, м, H19), 4.58 и 4.72 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 7.50–7.62 (2 H, м, H аром.), 7.28–7.40 (2 H, м, H аром.), 7.60 (1 H, д, J 7.8, H аром.), 7.67 (1 H, д, J 7.8, H аром.), 8.55 (1 H, с, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ar}$), 9.40 (1 H, уш. сигнал, CONH); ^{13}C -ЯМР: 14.4, 16.2, 16.5, 19.2, 19.7, 20.9, 21.6, 25.5, 26.9, 29.2, 30.5, 33.3, 34.0, 34.3, 37.0, 37.7,

38.5, 39.0, 40.5, 42.5, 46.7, 47.9, 49.9, 50.0, 54.7, 55.3, 109.5 (C29), 124.0 (C-Br), 130.9, 131.0, 131.4, 131.4, 134.6 (C аром.), 142.1 (C1'), 149.9 (C20), 174.3 (CONH), 218.3 (C3). Найдено, %: C 69.81, H 7.94, N 4.28, Br 12.76. $\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{O}_2\text{N}_2\text{Br}$. Вычислено, %: C 69.89, H 8.10, N 4.41, Br 12.57.

***N'*-(3-Иодбензаль)гидразид 3-кетолуп-20(29)-ен-28-овой кислоты (XV).** Из 0.47 г гидразида (VIII) и 0.24 г *m*-йодбензальдегида получили 0.39 г (57%) вещества в виде белого порошка; R_f 0.48; т. пл. 178–180°C; УФ-спектр: 292 ($\lg \epsilon$ 4.40); ИК-спектр: 1727, 1696, 1672, 1660 (CONH), 1610 (Ar), 1540 (CONH), 1514, 1480, 1464, 1418, 1393, 1320, 1300, 1263, 1210, 1158, 1131, 1089, 1044, 992, 918, 890, 824, 766; ^1H -ЯМР: 0.83, 0.85, 0.89, 0.91, 1.01 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.10–2.00 (21 H, м, CH_2 , CH), 1.70 (3 H, с, CH_3), 2.54–2.70 (3 H, м, H13, H16), 3.12–3.23 (1 H, м, H19), 4.61 и 4.75 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 7.20 (1 H, т, J 7.8, H аром.), 7.28 (1 H, с, H аром.), 7.60 (1 H, д, J 7.8, H аром.), 7.67 (1 H, д, J 7.8, H аром.), 8.55 (1 H, с, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ar}$), 9.40 (1 H, уш. сигнал, CONH); ^{13}C -ЯМР: 14.6, 15.9, 16.3, 19.4, 19.6, 21.0, 21.5, 25.6, 26.6, 29.6, 30.7, 33.1, 33.7, 34.1, 36.9, 37.5, 38.4, 39.6, 40.7, 42.5, 46.2, 47.3, 50.0, 50.1, 54.9, 55.0, 94.1 (C-I), 109.5 (C29), 128.0, 130.4, 136.1, 136.9, 138.8 (C аром.), 145.1 (C1'), 150.9 (C20), 173.3 (–CONH–), 218.0 (C3). Найдено, %: C 64.94, H 7.75, N 3.97, I 18.53. $\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{O}_2\text{N}_2\text{I}$. Вычислено, %: C 65.08, H 7.54, N 4.10, I 18.59.

***N'*-(Бензаль)гидразид 3-оксима луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (XVI).** Из 0.48 г гидразида (IX) и 0.15 мл бензальдегида получили 0.52 г (91%) производного в виде белого порошка; R_f 0.42; т. пл. 264–267°C; УФ-спектр: 292 ($\lg \epsilon$ 4.44); ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1726, 1675 (CONH), 1650 (C=N–OH), 1600 (Ar), 1560 (CONH), 1512, 1484, 1460, 1441, 1394, 1330, 1297, 1263, 1205, 1165, 1138, 1090, 1042, 992, 920, 886, 818, 760; ^1H -ЯМР: 0.87, 0.90, 0.94, 0.99, 1.01 (15 H, 5 с, 5 CH_3), 1.20–2.00 (21 H, м, CH_2 , CH), 1.70 (3 H, с, CH_3), 2.31–2.67 (3 H, м, H13, H16), 2.85–3.05 (1 H, м, H19), 4.59 и 4.73 (2×1 H, уш. сигнал, H29), 7.25–7.37 и 7.58–7.70 (5 H, 2 м, H аром.), 8.38 (1 H, уш. сигнал, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ph}$), 8.52 (1 H, уш. сигнал, CONH), 9.50 (1 H, уш. сигнал, =N–OH); ^{13}C -ЯМР: 14.0, 15.1, 15.8, 16.2, 18.5, 18.7, 21.1, 22.4, 25.5, 27.0, 29.6, 30.5, 32.2, 33.7, 36.9, 37.1, 37.4, 38.4, 39.5, 40.6, 42.1, 46.3, 50.1, 54.4, 55.0, 55.4, 108.9 (C29), 126.8, 128.4, 128.4, 129.4, 129.4, 134.9 (C аром.), 145.8 (C1'), 150.8 (C20), 163.9 (C3), 172.7 (CONH). Найдено, %: C 77.97, H 9.53, N 7.22. $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{O}_2\text{N}_3$. Вычислено, %: C 77.70, H 9.36, N 7.35.

***N'*-(3-Иодбензаль)гидразид 3-оксима луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (XVII).** Из 0.48 г гидразида (IX) и 0.24 г *m*-йодбензальдегида получили 0.61 г (87%) вещества в виде белого порошка; R_f 0.36; т. пл. 198–202°C; УФ-спектр: 294

(lg ϵ 4.38); ИК-спектр: 1680 (CONH), 1660 (C=N-OH), 1605 (Ar), 1565 (CONH), 1488, 1461, 1392, 1317, 1288, 1244, 1206, 1195, 1139, 1080, 1038, 988, 920, 890, 820, 768; ^1H -ЯМР: 0.86, 0.88, 0.92, 0.98, 1.03 (15 H, 5 c, 5 CH₃), 1.10–2.00 (22 H, м, CH₂, CH), 1.70 (3 H, с, CH₃), 2.45–2.72 (3 H, м, H13, H16), 2.92–3.04 (1 H, м, H19), 4.62 и 4.76 (2 \times 1 H, уш. сигнал, H29), 7.12 (1 H, т, J 7.4, H аром.), 7.62 (1 H, д, J 7.4, H аром.), 7.70 (1 H, д, J 7.4, H аром.), 8.15 (1 H, уш. сигнал, -N=CH-Ar), 8.80 (1 H, уш. сигнал, CONH), 9.55 (1 H, уш. сигнал, =N-OH); ^{13}C -ЯМР: 14.3, 15.6, 15.9, 16.9, 18.9, 19.2, 21.1, 22.7, 25.5, 27.1, 29.5, 30.5, 32.5, 33.8, 37.0, 37.2, 38.5, 39.9, 40.6, 42.2, 46.1, 49.8, 50.1, 55.0, 55.3, 55.5, 94.1 (C-I), 109.3 (C29), 126.4, 130.1, 136.0, 136.2, 138.5 (C аром.), 144.7 (C1'), 150.6 (C20), 164.5 (C3), 173.5 (CONH). Найдено, %: C 63.81, H 7.46, N 5.92, I 17.85. C₃₇H₅₂O₂N₃I. Вычислено, %: C 63.68, H 7.53, N 6.02, I 18.19.

N¹-(2-Нитробензаль)гидразид 3-оксима луп-20(29)-ен-28-овой кислоты (XVIII). Из 0.48 г гидразида (IX) и 0.15 г *o*-нитробензальдегида получили 0.53 г (88%) вещества в виде белого порошка; *R_f* 0.39; т. пл. 216–218°C; УФ-спектр: 284 (lg ϵ 4.20); ИК-спектр: 1727, 1680 (CONH), 1655 (C=N-OH), 1610 (Ar), 1555 (CONH), 1480, 1426, 1386, 1372, 1323, 1280, 1255, 1240, 1195, 1128, 1090, 1028, 988, 920, 890, 824, 756; ^1H -ЯМР: 0.83, 0.84, 0.89, 0.95, 1.01 (15 H, 5 c, 5 CH₃), 1.20–2.00 (21 H, м, CH₂, CH), 1.70 (3 H, с, CH₃), 2.36–2.52 (3 H, м, H13, H16), 2.94–3.05 (1 H, м, H19), 4.60 и 4.74 (2 \times 1 H, уш. сигнал, H29), 7.29–7.38 (1 H, м, H аром.), 7.71, 8.13, 8.23 (3 \times 1 H, уш. сигнал, H аром.), 8.51 (1 H, уш. сигнал, -N=CH-Ar), 9.45 (1 H, уш. сигнал, CONH), 9.53 (1 H, уш. сигнал, =N-OH); ^{13}C -ЯМР: 13.9, 15.7, 16.3, 18.6, 18.9, 21.1, 22.4, 22.7, 25.5, 27.0, 29.6, 30.5, 32.4, 33.7, 37.0, 37.1, 38.0, 38.4, 39.5, 40.6, 42.2, 46.3, 50.0, 50.1, 55.2, 55.4, 108.9 (C29), 121.0, 123.6, 129.9, 132.5, 137.1 (C аром.), 148.6 (C-NO₂), 144.9 (C1'), 150.8 (C20), 163.9 (C3), 172.5 (CONH). Найдено, %: C 74.14, H 8.61, N 9.25. C₃₇H₅₂O₃N₄. Вычислено, %: C 73.95, H 8.74, N 9.33.

Противовирусные свойства определяли в экспериментах на культурах клеток с вирусами герпеса простого I типа (ВГП-1), гриппа А/FPV/Rostock/34 (H7N1), иммунодефицита человека I типа (штамм zmb) и энтеровирусом ЕСНО6. Исследования выполняли методами редукции бляшек на культуре первичных фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) с FPV и ингибирования цитопатического эффекта ВГП-1 и ЕСНО6 на культуре клеток рабдомиосаркомы человека (RD) [21]. Эксперименты с ВИЧ-1 выполняли на культуре клеток Molt4/8 (МТТ-тест и определение инфекционности) с регистрацией антигенсодержащих клеток методом непрямой иммунофлюоресценции [22]. Изучаемые соединения предварительно раство-

ряли в 10% этаноле и затем в среде поддержки до получения требуемых концентраций. Критерием противовирусного действия считали снижение титра вируса в присутствии соединений в сравнении с контролем. Вычисляли также концентрацию 50% подавления размножения вируса (среднеэффективная концентрация, ЕС₅₀) и отношение максимальной переносимой концентрации (МПК) к ЕС₅₀. МПК соединений для неинфицированных культур клеток определяли после инкубации в течение 72 ч.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ (проекты № 00-03-81174, 01-03-33131, 02-03-81007, Б99Р-031, Б02Р-016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mayaux J.F., Bousseau A., Pauwels R., Huet T., Henin Y., Dereu N., Evers M., Soler F., Poujade C., De Clercq E., Le Pecq J.-B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 3564–3568.
2. *Hashimoto F., Kashiwada Y., Cosentino L.M., Chen C.H., Garret P.E., Lee K.H.* // Bioorg. Med. Chem. 1997. V. 5. P. 2133–2143.
3. *Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R.E., Cosentino L.M., Ballas L.M., Jiang J.B., Janzen W.P., Chen I.S., Lee K.H.* // J. Nat. Prod. 1994. V. 57(2). P. 243–247.
4. *De Clercq E.* // Clin. Microbiol. Rev. 1995. V. 8(2). P. 200–239.
5. *Soler F., Poujade C., Evers M., Carry J.-C., Henin Y., Bousseau A., Huet T., Pauwels R., De Clercq E., Mayaux J.F., Pecq J.-B.L., Dereu N.* // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 1069–1083.
6. *Lee K.-H., Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L.M., Manak M.* Betulinic Acid and Dihydrobetulinic Acid Derivatives and Uses Therefor. US Patent 5.679.828. October 21, 1997.
7. *Kashiwada Y., Nagao T., Hashimoto A., Ikeshiro Y., Okabe H., Cosentino L.M., Lee K.H.* // J. Nat. Prod. 2000. V. 63(12). P. 1619–1622.
8. *Carlson R.M., Krasutsky P.A., Karim M.R.U.* Use of Betulin and Analogs Thereof to Treat Herpesvirus Infection. US Patent 5.750.578. May 12, 1998.
9. *Платонов В.Г., Зорина А.Д., Гордон М.А., Чижов Н.П., Балькина Л.В., Михайлов Ю.Д., Иванен Д.Р., Тран Ким Кви, Шавва А.Г.* // Хим.-фарм. журн. 1995. Т. 29(2). С. 42–46.
10. *Kurokawa M., Basnet P., Ohsugi M., Hozumi T., Kadot S., Namba T., Kawana T., Shiraki K.* // J. Pharm. Exp. Ther. 1999. V. 289(1). P. 72–78.
11. *Ryu S.Y., Lee C.-K., Lee C.O., Kim H.S., Zee O.P.* // Arch. Pharm. Res. (Seoul) 1992. V. 15(3). P. 242–245 / Cited by Hwang S.-M. Process for Preparing an Anti-viral Medicinal Product from Plant Extracts. US Patent 6.214.350. April 10, 2001.
12. *Pisha E., Chai H., Lee I.-S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordel G.A., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Kinghorn A.D., Brown D.M., Wani M.C., Wall M.E., Hicken T.J., Das Gupta T.K., Pezzuto J.M.* // Nat. Med. 1995. V. 1(10). P. 1046–1051.

13. Fulda S., Jeremias I., Steiner H.H., Pietsch T., Debatin K.-M. // *Int. J. Cancer*. 1999. V. 82. P. 435–441.
14. Флехтер О.Б., Карачурина Л.Т., Поройков В.В., Нигматуллина Л.Р., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Спирихин Л.В., Байкова И.П., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. // *Биоорганич. химия*. 2000. Т. 26. С. 215–223.
15. Флехтер О.Б., Карачурина Л.Т., Нигматуллина Л.Р., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Спирихин Л.В., Байкова И.П., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. // *Хим.-фарм. журн.* 2000. Т. 34. С. 3–5.
16. Флехтер О.Б., Нигматуллина Л.Р., Карачурина Л.Т., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. // *Хим.-фарм. журн.* 2000. Т. 34. С. 17–20.
17. Pezzuto J.M., Kim D.S.H.L. Methods of Manufacturing Betulinic Acid. US Patent. 5.804.575. Sept. 8, 1998.
18. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Медицина, 1993. Т. II. С. 612.
19. Флехтер О.Б., Карачурина Л.Т., Нигматуллина Л.Р., Сапожникова Т.А., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Галин Ф.З., Спирихин Л.В., Толстиков Г.А., Плясунова О.А., Покровский А.Г. // *Биоорганич. химия*. 2002. Т. 28. С. 543–550.
20. Valterova E., Klinot J., Vystrcil A. // *Collect. Czech. Chem. Comm.* 1983. V. 48. P. 649–661.
21. Бореко Е.И., Павлова Н.И., Зайцева Г.В., Михайлопуло И.А. // *Вопр. вирусол.* 2001. № 5. С. 40–42.
22. Pauwels R. Development of New Agents Against the Human Immunodeficiency Virus (Evaluation Methods, Structure-activity Relationships and Mechanism of Action). Leuven, Katolique Universitat, 1990. 158 p.

Synthesis and Antiviral Activity of Hydrazides and Substituted Benzalhydrazides of Betulinic Acid and Its Derivatives

O. B. Flekhter*#, E. I. Boreko, L. R. Nigmatullina*, N. I. Pavlova**, S. N. Nikolaeva**,
O. V. Savinova**, V. F. Eremin**, L. A. Baltina*, F. Z. Galin*, and G. A. Tolstikov***

Fax: +7 (3472) 35-6066, e-mail: obf@anrb.ru

* Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, pr. Oktyabrya 71, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

** Belarussian Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ul. K. Tsetkin 4, Minsk, 220050 Belarus

New nitrogen-containing derivatives of betulinic and betulonic acids, hydrazides and *N'*-benzalhydrazides, were synthesized. Their antiviral activities toward of influenza A virus, herpes simplex type I virus, enterovirus ECHO6, and HIV-1 were studied *in vitro*. Betulinic acid 3-oxime was found to have the highest activity against the influenza virus. Betulonic acid, betulonic acid 4-chlorobenzalhydrazide, betulonic acid 3-oxime benzalhydrazide, and betulonic acid hydrazide inhibited the replication of herpes simplex type I virus. Betulinic acid hydrazide also showed antiviral activity toward HIV-1. All the derivatives of betulinic acid under study displayed a low antiviral activity toward enterovirus ECHO6. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: benzalhydrazides; betulinic acid, hydrazides; lupane triterpenoids, antiviral activity