



УДК 547.597.057:616–006.8

СИНТЕЗ ЦИКЛОПРОПАНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНОВОЙ И БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТ И ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2005 г. А. В. Сымон*, Н. Н. Веселова*, А. П. Каплун**, Н. К. Власенкова**, Г. А. Федорова*, А. И. Лютик*, Г. К. Герасимова**, 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

Поступила в редакцию 19.07.2004 г. Принята к печати 30.09.2004 г.

Новые циклопропановые производные бетулина синтезированы присоединением дихлор- или дибромкарбенов по двойной связи диацетата бетулина с последующим деблокированием гидроксильных групп. Из 20,29-дигидро-20,29-дихлорметиленбетулина получали циклопропановое производное бетулина под действием лития в *трет*-бутиловом спирте. Указанные соединения превращали в соответствующие производные бетулиновой кислоты окислением хромовым ангидридом. Восстановлением кетогруппы натрийборгидридом получены соответствующие производные бетулиновой кислоты. Наибольшей цитотоксичностью по отношению к клеткам меланомы человека линий Colo 38 и Вго, а также к клеткам карциномы яичника человека линии СаОv обладает 20,29-дигидро-20,29-дихлорметиленбетулиновая кислота (IC₅₀ 10 мкМ). 20,29-Дигидро-20,29-дибромметиленбетулиновая кислота при концентрации 10 мкМ подавляла рост клеток меланомы Вго и карциномы яичника СаОv практически на 50%. Остальные циклопропановые производные бетулиновой и бетулоновой кислот проявили активность ко всем трем опухолевым линиям клеток в концентрациях, превышающих 10 мкМ.

Ключевые слова: бетулиновая кислота, бетулоновая кислота, циклопропановые производные бетулиновой и бетулоновой кислот, меланома.

ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько десятилетий возросло число людей, страдающих от меланомы. Средняя продолжительность жизни у пациентов с метастатической меланомой 6–10 месяцев [1, 2]. Для лечения метастатической меланомы, не поддающейся хирургическому удалению, в настоящее время наиболее применяемым препаратом является дакарбазин. Также применяется его комбинированная терапия с такими препаратами, как кармустин, цисплатин, тамоксифен, интерферон α и интерлейкин 2. Однако эффективность лечения невысока, и, кроме того, большинство препаратов обладает высокой токсичностью [3].

При скрининге более чем 2500 растительных экстрактов на противоопухолевую активность было обнаружено [4], что экстракт из коры *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) проявляет селективную цитотоксичность против клеток меланомы человека. Действующим веществом оказалась бетулиновая кислота (I). Это вещество малотоксично для организма в отличие от большинства современных

противоопухолевых препаратов. Было обнаружено, что бетулиновая кислота (I) способна ингибировать рост клеток меланомы человека путем включения механизма апоптоза [4].

Проведенный нами анализ взаимосвязи структура–активность для ряда тритерпенов, обладающих противоопухолевым и противовоспалительным действием показал, что увеличение объема без значительного уменьшения гидрофобности в области изопропенильной группы может привести к получению производных бетулиновой кислоты с большей противоопухолевой активностью*.

Наиболее простым способом увеличения объема в области изопропенильной группы без значительного уменьшения гидрофобности является присоединение малополярных групп. Для этой цели нами было выбрано циклопропановое.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исключения побочных реакций на стадии присоединения карбенов, которые могут протекать по обоим гидроксилам бетулина (II), в качестве исходного соединения нами был выбран диацетат бетулина (III) (схема). Синтез проводили с помощью стандартных методик дихлор- и ди-

* Неопубликованные данные.

Сокращения: IC₅₀ – концентрация исследуемого препарата, вызывающая гибель 50% клеток в культуре; ТЕВА – тринэтилбензиламмоний хлорид.

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

бромциклопропанилирования олефинов по методу Макоши [5] с использованием в качестве источника карбена трихлорацетата натрия или бромформа, а в качестве катализатора межфазного переноса – ТЕВА. Для получения дибром- и дихлорпроизводных бетулина (V) и (IX) соответствующие циклопропановые производные диацетата бетулина (IV) и (VIII) без очистки дезацетилировали путем щелочного гидролиза. В спектрах ¹H-ЯМР обоих циклопропановых производных бетулина (V) и (IX) отсутствуют сигналы олефиновых протонов δ 4.67 и δ 4.57 м. д., присутствующие в исходном диацетате бетулина (III).

Соединение (XII) было получено из производного бетулина (IX) под действием литгия в *трет*-бутиловом спирте. После перекристаллизации полученного соединения из изопропилового спирта в области сильного поля (δ 0.24 м. д.) ¹H-ЯМР-спектра появился мультиплет четырех протонов циклопропанового кольца.

Производные бетулина (V), (IX), (XII) были превращены в соответствующие циклопропановые производные бетулоновой кислоты (VI), (X), (XIII) окислением CrO₃ в уксусной кислоте [6]. Для получения циклопропановых производных бетулиновой кислоты 3-кетогруппу восстанавливали NaBH₄. Соединения (VII), (XI), (XIV) выделялись хроматографией на силикагеле, что позволило очистить целевые продукты от 3α эпимеров, получающихся при восстановлении и имеющих большую хроматографическую подвижность, чем 3β эпимеры [7]. Гомогенность синтезированных веществ по данным ВЭЖХ составила не менее 98%; их строение было подтверждено данными элементного анализа и масс-спектра. Так, в масс-спектрах 20,29-дигидро-20,29-метиленбетулоновой кислоты (XIII) и 20,29-дигидро-20,29-метиленбетулиновой кислоты (XIV) присутствуют сигналы молекулярных ионов (469 [M]⁺ и 471 [M]⁺). В спектре 20,29-дигидро-20,29-дихлорметиленбетулоновой кислоты (X) наблюдались сигналы нескольких молекулярных ионов, содержащих изотопы хлора в различном сочетании: 537.5 [M(³⁵Cl,³⁵Cl)]⁺, 539.5 [M(³⁵Cl,³⁷Cl)]⁺, 541.5 [M(³⁷Cl,³⁷Cl)]⁺. В спектре 20,29-дигидро-20,29-дихлорметиленбетулиновой кислоты (XI) наблюдались молекулярные ионы, соответствующие продуктам дегидратации: 521.5 [M(³⁵Cl,³⁵Cl) – H₂O]⁺, 523.5 [M(³⁵Cl,³⁷Cl) – H₂O]⁺, 525.5 [M(³⁷Cl,³⁷Cl) – H₂O]⁺. В используемых условиях съёмки масс-спектра для 20,29-дигидро-20,29-дибромметиленбетулоновой кислоты (VI) был обнаружен слабый сигнал молекулярного иона 626.5 [M(⁷⁹Br, ⁸¹Br)]⁺; для 20,29-дигидро-20,29-дибромметиленбетулиновой кислоты (VII) молекулярный ион не наблюдался.

Изучение цитотоксической активности производных бетулиновой и бетулоновой кислот проводилось на культурах опухолевых клеток человека различного гистогенеза: меланома (линии Colo 38 и Bro) и карцинома яичника (CaOv). Цитотоксичес-

кая активность циклопропановых производных бетулиновой и бетулоновой кислот в отношении клеток опухолей человека (IC₅₀, мкМ)

Клетка	Соединение						
	(I)	(XIII)*	(XIV)	(X)*	(XI)*	(VI)	(VII)*
Colo 38	8	>10	>10	>10	10	>10	>10
Bro	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10
CaOv	9	>10	>10	>10	10	>10	>10

* Вещество плохо растворимо в DMSO.

кий эффект оценивали с помощью МТТ-теста [8]. В соответствии с принятыми в РОНЦ РАМН критериями в системе скрининга для веществ с известной молекулярной массой, исследуемое соединение считают активным при IC₅₀ ≤ 10 мкМ. Используемые клетки были стандартно чувствительны к цитостатику доксорубину (IC₅₀ 0.5 мкМ).

Из результатов, представленных в таблице, следует, что только 20,29-дигидро-20,29-дихлорметиленбетулиновая кислота (XI) проявила цитотоксическую активность в отношении исследуемых культур клеток, сравнимую с цитотоксичностью бетулиновой кислоты (I). Причем в отношении линии Bro производное (XI) более токсично, чем бетулиновая кислота (I).

Для сравнения цитотоксичности полученных соединений была исследована выживаемость раковых клеток при концентрации 10 мкМ. Как видно из рисунка, наиболее активны дибром-(VII) и дихлор-(XI) циклопропановые производные бетулиновой кислоты. Для клеток линий Bro и CaOv выживаемость составляет около 50%, в то время как для клеток Colo 38 дибромпроизводное (VII) малоэффективно, а дихлорпроизводное (XI) подавляет их рост на 50%. Ранее было показано, что бетулоновая кислота значительно активнее бетулиновой кислоты [9, 10].

Однако для синтезированных циклопропановых производных бетулоновой кислоты цитотоксичность по отношению к исследуемым линиям клеток меньше, чем для аналогичных производных бетулиновой кислоты.

Таким образом, ни одно из синтезированных соединений не показало цитотоксическую активность, превышающую активность бетулиновой кислоты. Однако полученные результаты требуют уточнения. Дело в том, что растворимость синтезированных соединений крайне мала и, по нашим данным, составляет: в воде примерно 0.001 мг/мл (~2 мкМ), а в DMSO – около 0.01 мг/мл. Другими словами, при инкубировании исследуемых соединений в концентрациях больших 2 мкМ с клеточными культурами значительная часть вещества, скорее всего, выпадала в осадок, что и не позволило проявить синтезированным производным бетулиновой и бетулоновой кислот максимальной активности. По-

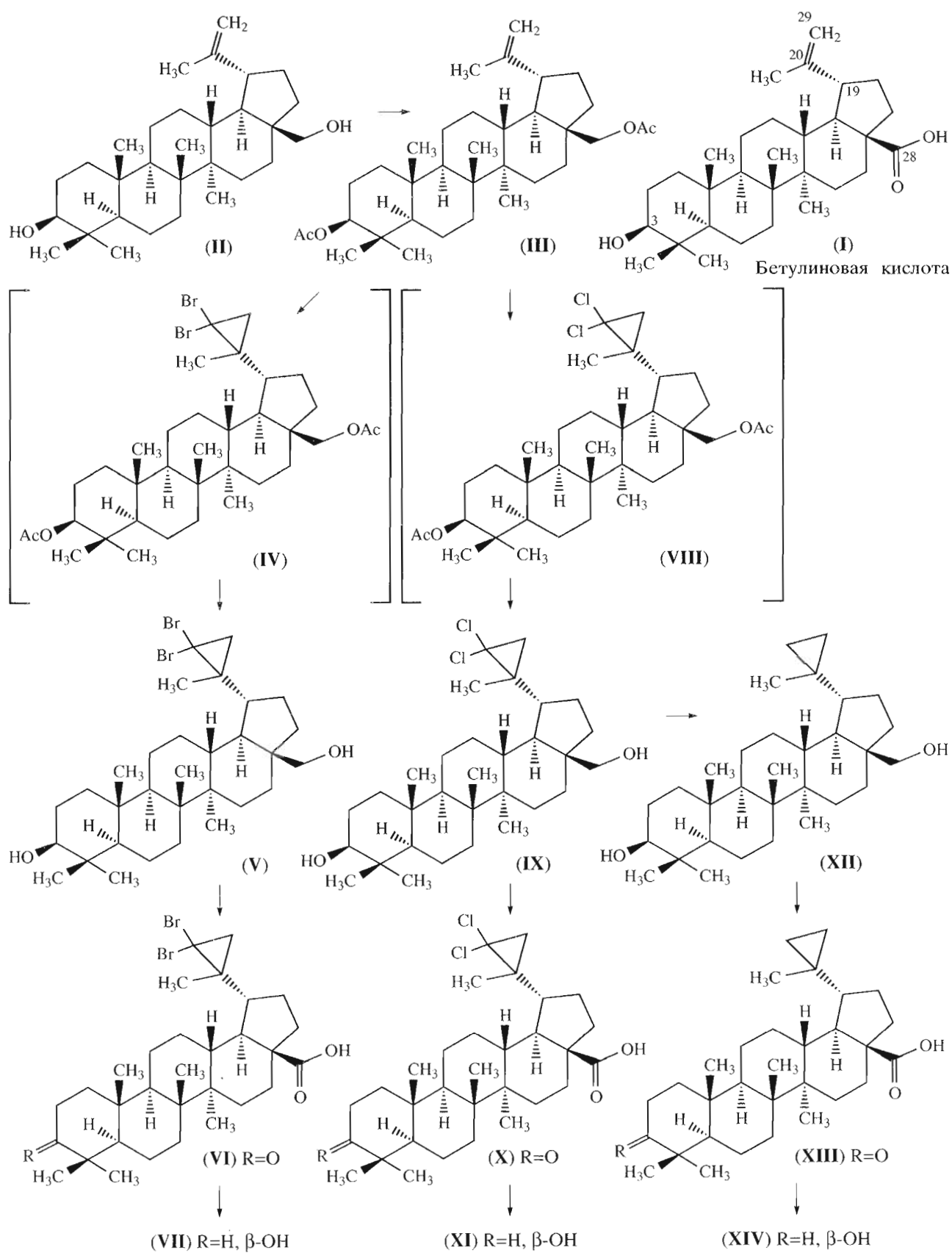


Схема.

этому дальнейшие исследования для определения истинного цитотоксического эффекта должны быть направлены на поиск способов солиubilизации синтезированных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации не ниже "х. ч". Бетулин (II) выделен из коры березы [11], т. пл. 256–258°C (лит. данные т. пл. 258°C [11]).

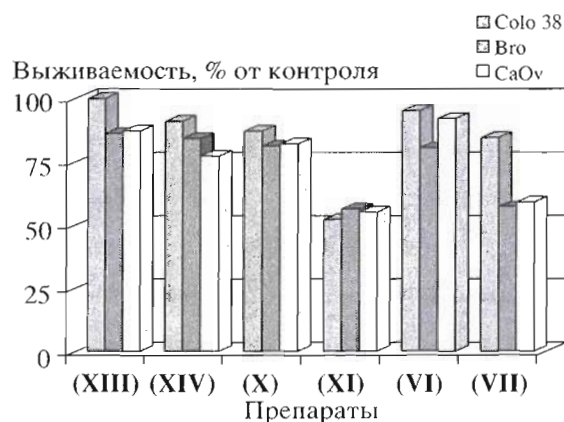
Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker DPX-300 (Германия) в CDCl₃ при рабочей частоте 300 МГц. Химические сдвиги (δ, м. д.) приведены относительно Me₄Si. Масс-спектры снимали на приборе KRATOS MS890 (EI 70 эВ, 250°C). Оптическую плотность измеряли на сканирующем спектрометре Multiskan MCC/340 (LabSystem, Финляндия) при 540 нм. Элементный анализ проводили на элементном анализаторе CHNS EA 1112 (Thermo Finigan, Италия). Температуру плавления определяли на приборе ПТП(М) ОАО "Химлаборприбор".

ТСХ осуществляли на пластинках "Сорбтон Диол" (Хромдет-Экология, Россия) в системах: хлороформ (А), хлороформ–метанол, 10 : 0.2 (Б), хлороформ–метанол, 10 : 0.5 (В). Тритерпены обнаруживали на пластинках 50% серной кислотой с последующим нагреванием. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 60/100 мкм (Merck, Германия).

Цитотоксичность производных бетулиновой и бетулоновой кислот определяли в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина на культурах клеток опухолей человека: меланомы (линии Colo 38, Bro) и карциномы яичника (CaOv).

Диацетат бетулина (III). К 20.0 г (45.2 ммоль) бетулина (II) добавляли 170 мл уксусного ангидрида и нагревали до полного растворения. После охлаждения выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции и сушили в вакуум-эксикаторе над P₂O₅. После перекристаллизации из изопропилового спирта получили 15.3 г (64.3%) диацетата (III) в виде белых игольчатых кристаллов; т. пл. 223–224°C (лит. данные т. пл. 223–224°C [12]); R_f 0.59 (А); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 4.67 (1 H, м, =CH₂), 4.57 (1 H, м, =CH₂), 4.44 (1 H, м, H₃), 4.22 (1 H, д, J 10.7 Гц, H₂₈), 3.82 (1 H, д, J 10.7 Гц, H₂₈), 2.42 (1 H, м, H₁₉), 2.05 (3 H, с, CH₃CO), 2.02 (3 H, с, CH₃CO), 1.66, 1.00, 0.94, 0.82, 0.82, 0.81 (все 3 H, с, CH₃).

20,29-Дигидро-20,29-дибромметиленбетулин (V). К перемешиваемому раствору 5.00 г (9.50 ммоль) диацетата бетулина (III) в 12 мл дихлорметана добавляли 23.7 мг (0.120 ммоль) ТЕВА, раствор 7.60 г (190 ммоль) NaOH в 20 мл воды, 0.1 мл этанола и 1.66 мл (19.0 ммоль) бромформа. Смесь перемешивали (1000 об/мин) при комнатной температуре в течение 20 ч. Затем к реакционной смеси прибавили еще 23.7 мг (0.120 ммоль) ТЕВА, раствор 7.6 г



Выживаемость клеток опухолей человека при действии производных бетулиновой кислоты (10 мкМ).

(190 ммоль) NaOH в 20 мл воды, 1.66 мл (19.0 ммоль) бромформа и перемешивали при комнатной температуре 20 ч. Растворители упаривали, образовавшийся остаток растворяли в смеси 60 мл THF и 30 мл метанола, добавляли раствор 1.90 г (47.5 ммоль) NaOH в 10 мл воды и перемешивали при комнатной температуре. Через 16 ч реакционную смесь нейтрализовали 20% HCl и упаривали досуха. Полученный остаток растворяли в хлороформе и промывали водой (3 × 100 мл). Хлороформный слой сушили Na₂SO₄, упаривали досуха; полученное кристаллическое вещество перекристаллизовывали из смеси дихлорметан–пропан-2-ол. Получили 3.10 г (53.1%) производного бетулина (V) в виде бледно-желтых кристаллов; т. пл. 162–164°C; R_f 0.16 (А); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 3.70 (1 H, д, J 10.2 Гц, H₂₈), 3.21 (1 H, д, J 10.2 Гц, H₂₈), 3.18 (1 H, м, H₃), 2.40 (1 H, м, H₁₉), 1.24, 0.98, 0.97, 0.94, 0.80, 0.74 (все 3 H, с, CH₃). Найдено, %: С 60.82, Н 8.83. C₃₁H₅₀Br₂O₂. Вычислено, %: С 60.59, Н 8.20.

20,29-Дигидро-20,29-дибромметиленбетулоновая кислота (VI). К перемешиваемому раствору 2.00 г (3.25 ммоль) производного бетулина (V) в 36 мл ледяной уксусной кислоты добавляли раствор 1.46 г (14.6 ммоль) CrO₃ в 3 мл воды и 45 мл ледяной уксусной кислоты. Через 10 мин к реакционной смеси прибавляли 100 мл 10% NaCl. Продукты реакции экстрагировали эфиром (2 × 100 мл). Объединенные эфирные экстракты промывали 10% NaCl (4 × 80 мл). После выпаривания эфира продукт реакции очищали колоночной хроматографией на силикагеле. Элюировали смесью хлороформ–ацетонитрил (10 : 0.1). Получили 1.50 г (73.7%) кислоты (VI) в виде белого порошка; т. пл. 228.5–230.5°C; R_f 0.18 (Б); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.24, 1.05, 1.00, 0.97, 0.91, 0.90 (все 3 H, с, CH₃). Масс-спектр, m/z: 626.5 [M(⁷⁹Br, ⁸¹Br)]⁺. Найдено, %: С 59.01, Н 7.40, Br 25.91. C₃₁H₄₆Br₂O₃. Вычислено, %: С 59.43, Н 7.40, Br 25.51.

20,29-Дигидро-20,29-дибромметиленбетулиновая кислота (VII). К раствору 0.300 г (0.480 ммоль) кислоты (VI) в 40 мл метанола и 10 мл THF при пе-

ремешивании в течение 3 ч добавляли 4 раза по 24 мг (0.63 ммоль) NaBH_4 . Затем к реакционной смеси прибавляли 20 мл 10% HCl и 10 мл воды. Выпавший гелеобразный осадок фильтровали, промывали водой и сушили над P_2O_5 . Продукт реакции очищали колоночной хроматографией на силикагеле. Элюировали смесью хлороформ–ацетонитрил (10 : 0.1). Получили 0.250 г (82.9%) кислоты (VII) в виде белого порошка; т. пл. 202–204°C; R_f 0.49 (B); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 3.17 (1 H, м, H3), 1.24, 0.97, 0.95, 0.89, 0.80, 0.74 (все 3 H, с, CH_3). Найдено, %: C 58.99, H 7.68, Br 25.29. $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{Br}_2\text{O}_3$. Вычислено, %: C 59.24, H 7.70, Br 25.43.

20,29-Дигидро-20,29-дихлорметиленбетулин (IX).

К раствору 5.20 г (9.90 ммоль) диацетата бетулина (III) в 10 мл хлороформа при комнатной температуре добавляли 38 мг (0.2 ммоль) ТЕВА, 3.67 г (19.8 ммоль) трихлорацетата натрия, реакционную смесь нагревали до 80°C и перемешивали при 1200 об/мин в течение 2 сут. Далее смесь охлаждали до комнатной температуры, промывали 2 раза водой и упаривали. Получали 5.00 г продукта, который без дальнейшей очистки растворяли в смеси 50 мл THF и 13 мл метанола. К раствору добавляли 9 мл 4 н. NaOH, перемешивали при комнатной температуре 17 ч, добавляли 20% HCl до pH 7 и упаривали досуха. Полученные кристаллы растворяли в 100 мл хлороформа и промывали водой (3 × 100 мл). Органический слой сушили Na_2SO_4 и упаривали. Остаток перекристаллизовывали из смеси дихлорметан–изопропанол. Получили 3.50 г (67.3%) производного бетулина (IX) в виде белых кристаллов; т. пл. 201–202.5°C, R_f 0.16 (A); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 3.71 (1 H, д, J 10.7 Гц, H28), 3.21 (1 H, д, J 10.7 Гц, H28), 3.19 (1 H, м, H3), 2.30 (1 H, м, H19), 1.21, 0.99, 0.98, 0.95, 0.81, 0.74 (все 3 H, с, CH_3). Найдено, %: C 70.63, H 9.54. $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{Cl}_2\text{O}_2$. Вычислено, %: C 70.84, H 9.59.

20,29-Дигидро-20,29-дихлорметиленбетулоновая кислота (X). К перемешиваемому раствору 3.40 г (6.50 ммоль) производного бетулина (IX) в 100 мл ледяной уксусной кислоты добавляли раствор 2.90 г (29.3 ммоль) CrO_3 в 60 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл воды при комнатной температуре. Через 10 мин к реакционной смеси прибавляли 200 мл 10% NaCl. Продукты реакции экстрагировали эфиром (2 × 130 мл). Объединенные эфирные экстракты промывали 10% NaCl (4 × 150 мл). После упаривания эфира продукт реакции очищали колоночной хроматографией на силикагеле. Элюировали смесью хлороформ–метанол (10 : 0.5). Получили 2.14 г (61.2%) кислоты (X) в виде белого порошка; т. пл. 253–254.5°C; R_f 0.60 (B); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.21, 1.05, 1.00, 0.98, 0.92, 0.91 (все 3 H, с, CH_3). Масс-спектр, m/z : 537.5 [$M(^{35}\text{Cl},^{35}\text{Cl})^+$], 539.5 [$M(^{35}\text{Cl},^{37}\text{Cl})^+$], 541.5 [$M(^{37}\text{Cl},^{37}\text{Cl})^+$]. Найдено, %: C 69.09, H 8.54. $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{Cl}_2\text{O}_3$. Вычислено, %: C 69.26, H 8.62.

20,29-Дигидро-20,29-дихлорметиленбетулиновая кислота (XI). К раствору 1.50 г (2.79 ммоль) кислоты (X) в 250 мл метанола в течение 1 ч при пере-

мешивании добавляли порциями 280 мг (7.41 ммоль) NaBH_4 . Через 1.5 ч реакционную смесь разбавляли 40 мл 10% HCl и 100 мл горячей воды. Выпавший гелеобразный осадок отфильтровывали, промывали 250 мл воды и сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Продукт реакции очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюировали смесью хлороформ–метанол–муравьиная кислота (10 : 0.1 : 0.05). Получили 1.10 г (73.1%) кислоты (XI) в виде белого порошка; R_f 0.39 (B); т. пл. 236–237.5°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 3.11 (1 H, м, H3), 1.21, 0.97, 0.94, 0.91, 0.80, 0.73 (все 3 H, с, CH_3). Масс-спектр, m/z : 521.5 [$M(^{35}\text{Cl},^{35}\text{Cl}) - \text{H}_2\text{O}^+$], 523.5 [$M(^{35}\text{Cl},^{37}\text{Cl}) - \text{H}_2\text{O}^+$], 525.5 [$M(^{37}\text{Cl},^{37}\text{Cl}) - \text{H}_2\text{O}^+$]. Найдено, %: C 68.87, H 9.04, Cl 13.35. $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{Cl}_2\text{O}_3$. Вычислено, %: C 69.00, H 8.97, Cl 13.14.

20,29-Дигидро-20,29-метиленбетулин (XII).

К раствору 1.92 г (3.65 ммоль) производного бетулина (IX) в 20 мл сухого THF при перемешивании добавляли 3.20 г (464 ммоль) мелко нарезанного лития и прибавляли по каплям 86 мл сухого *трет*-бутилового спирта в течение 1 ч. Через 18 ч к реакционной смеси добавляли 110 мл 10% HCl и 40 мл THF, верхнюю органическую фазу сушили Na_2SO_4 и упаривали. После перекристаллизации из изопропилового спирта получали 1.20 г (72.0%) производного бетулина (XII) в виде белых кристаллов; т. пл. 233–234.5°C; R_f 0.26 (A). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 3.70 (1 H, д, J 10.7 Гц, H28), 3.18 (1 H, д, J 10.7 Гц, H28), 3.14 (1 H, м, H3), 0.98, 0.97, 0.94, 0.88, 0.81, 0.74 (все 3 H, с, CH_3), 0.24 (4 H, м, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$). Масс-спектр, m/z : 457 [M^+]. Найдено, %: C 81.37, H 11.52. $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$. Вычислено, %: C 81.52, H 11.47.

20,29-Дигидро-20,29-метиленбетулоновая кислота (XIII). К суспензии 2.00 г (4.40 ммоль) производного бетулина (XII) в 47 мл ледяной уксусной кислоты одной порцией при перемешивании прибавляли раствор 1.97 г (19.7 ммоль) CrO_3 в 4 мл воды и 61 мл ледяной уксусной кислоты, при этом производное бетулина (XII) растворялось. Через 10 мин к реакционной смеси добавляли 150 мл 10% NaCl. Продукты реакции экстрагировали эфиром 2 раза по 90 мл. Эфирный экстракт промывали 10% NaCl (4 × 100 мл). Далее эфирный слой упаривали. Продукт реакции очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя хлороформом. Получили 1.20 г (58.2%) кислоты (XIII) в виде белого порошка; т. пл. 278–280°C; R_f 0.40 (B). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.04, 1.00, 0.97, 0.93, 0.91, 0.89 (все 3 H, с, CH_3), 0.28 (4 H, м, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$). Масс-спектр, m/z : 469 [M^+]. Найдено, %: C 79.45, H 10.33. $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Вычислено, %: C 79.44, H 10.32.

20,29-Дигидро-20,29-метиленбетулиновая кислота (XIV). К перемешиваемому раствору 1.00 г (2.12 ммоль) кислоты (XIII) в 150 мл метанола добавляли в течение 1 ч порциями 220 мг (5.80 ммоль) NaBH_4 . Далее реакционную смесь разбавляли 100 мл 10% HCl и 15 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в ваку-

ум-эксикаторе над P_2O_5 . Продукт реакции очищали колоночной хроматографией на силикагеле. Элюировали смесью хлороформ–метанол (10:0.1). Получили 0.920 г (92.2%) кислоты (XIV) в виде белого порошка; т. пл. 282–284°C; R_f 0.33 (В). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 3.16 (1 H, м, H3), 0.98, 0.95, 0.91, 0.89, 0.82, 0.74 (все 3 H, с, CH_3), 0.26 (4 H, м, CH_2-CH_2). Масс-спектр, m/z : 471 $[M]^+$. Найдено, %: С 79.15, Н 10.97. $C_{31}H_{50}O_3$. Вычислено, %: С 79.10, Н 10.71.

Определение цитотоксичности производных 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), содержащей 10% FBS (эмбриональная сыворотка коровы "Gibco DRL"), 2 mM *L*-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% CO_2 – 95% воздуха при 37°C.

Клеточную суспензию помещали в 96-луночные планшеты, к культурам опухолевых клеток в фазе экспоненциального роста добавляли исследуемые вещества в концентрациях 10, 5, 1, 0.5, 0.1 мкМ и инкубировали 72 ч. Выживаемость клеток определяли с помощью МТТ-теста [8]. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в DMSO и измеряли оптическое поглощение на сканирующем спектрометре при 540 нм. Выжившую часть клеток определяли в процентах по соотношению величины поглощения в опытных образцах и в контроле (опухолевые клетки в среде роста без исследуемых препаратов).

Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ (грант НШ-2329.2003.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sober A.J., Koh H.K., Tran N.-L.T., Washington C.V., Jr. // *Melanoma and Other Skin Cancers* / Eds Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L. New York: McGraw-Hill, 1998. P. 543–549.
2. Двойрин В.В., Михайловский А.В. // *Вопросы онкологии*. 1997. Т. 43. С. 263–268.
3. McClay E.F., McClay M.E. // *J. Clin. Oncol.* 1994. V. 12. P. 617.
4. Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W., et. al. // *Nat. Med.* 1995. № 1. P. 1046–1051.
5. Демлов Э.В., Демлов С.С. // *Межфазный катализ*. Пер. с англ. М.: Мир, 1987. С. 297, 337.
6. 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.
7. Сьмон А.В., Каплун А.П., Власенкова Н.К., Герасимова Г.К., Ле Банг Шон, Литвин Е.Ф., Козлова Л.М., Суркова Е.Л., Швец В.И. // *Биоорганическая химия*. 2003. Т. 29. С. 202–207.
8. Alley C.M., Scudiero D.A., Monks A. // *Cancer Res.* 1988. V. 48. P. 589–601.
9. Kim D.S., Pezzuto J.M., Pisha E. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998. V. 8. P. 1707–1712.
10. Ле Банг Шон, Посыпанова Г.А., Колибаба Л.Г., Сьмон А.В., Андия-Правдивый Ю.Э., Каплун А.П., Суркова Е.Л., Швец В.И. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2002. № 4. С. 31–34.
11. Jaaskelainen P. // *Paperi ja Puu*. 1981. V. 63. P. 599–603.
12. Sun I.C., Wang H.-K., Kashiwada Y., Shen J.-K., Cosentino L.M., Chen C.-H., Yang L.-M., Lee K.-H. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 4648–4657.

Synthesis and Antitumor Activity of Cyclopropane Derivatives of Betulinic and Betulonic Acids

A. V. Symon*, N. N. Veselova*, A. P. Kaplun**#, N. K. Vlasenkova**, G. A. Fedorova*, A. I. Lyutik*, G. K. Gerasimova**, and V. I. Shvets*

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

* Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology,
pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

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

New cyclopropane derivatives of betulin were synthesized by attachment of dichlorocarbenes or dibromocarbenes to the double bond of betulin diacetate, followed by the deprotection of hydroxyl groups. The betulin cyclopropane derivative was obtained from 20,29-dihydro-20,29-dichloromethylenebetulin by treatment with lithium in *tert*-butanol. These compounds were converted into the corresponding derivatives of betulonic acid by oxidation with chromium trioxide. The reduction of oxo group with sodium borohydride led to the corresponding derivatives of betulonic acid. 20,29-Dihydro-20,29-dichloromethylenebetulinic acid proved to be the most cytotoxic toward human melanoma of the Colo 38 and Bro lines and human ovarian carcinoma of the CaOv line (IC_{50} 10 μ M). 20,29-Dihydro-20,29-dibromomethylenebetulinic acid inhibited the growth of the Bro melanoma cell line and the CaOv carcinoma cell line practically by 50% at a concentration of 10 μ M. The other derivatives of betulinic and betulonic acids were active toward all of the three cancer cell lines at concentrations higher than 10 μ M. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: betulinic acid, betulonic acid, cyclopropane derivatives, melanoma