

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)
Уфимский институт химии – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
(УфИХ УФИЦ РАН)

На правах рукописи

Закирова Лиана Марселевна

**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 24-НОР-
ТРИТЕРПЕНОИДОВ**

Направление 04.06.01 – Химические науки
Специальность 02.00.03 – Органическая химия

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа – 2024

Работа выполнена в Уфимском Институте химии – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Научный руководитель:

Казакова Оксана Борисовна
доктор химических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник научно-исследовательской группы
медицинской химии Уфимского
Института химии - обособленного
структурного подразделения
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального
исследовательского центра Российской
академии наук

Рецензенты:

Миннибаева Эльза Макмуновна
кандидат химических наук, доцент
кафедры технической химии и
материаловедения, ФГБОУ ВО
УУНиТ

Орлов Андрей Владимирович
кандидат химических наук, научный
сотрудник лаборатории
биоорганической химии и катализа
Уфимского Института химии -
обособленного структурного
подразделения Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского
центра Российской академии наук

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Тритерпеноиды служат богатым источником биологически активных соединений, которые могут быть использованы в медицине для получения лекарственных препаратов. На их основе синтезированы разнообразные производные по циклам А, В и Е, которые проявили цитотоксическую, противовирусную, противомикробную, противовоспалительную и другие типы активности.

Одним из новых способов получения биологически активных производных тритерпенов является удаление метильной группы в цикле А тритерпеноидов. Так, удаление метильной группы в С-4 в молекуле CDDO приводит к 24-нор-аналогам с высокой противоопухолевой активностью и способностью ингибировать продукцию оксида азота в активированных макрофагах. Помимо этого 26-нор-германикол и 26-нор-лупеол представлены как новый класс антагонистов андрогенных рецепторов и в 6 раз активнее лупеола.

Соответствие паспорту заявленной специальности. Тема и содержание научно-квалификационной работы соответствуют паспорту специальности 02.00.03 – «Органическая химия» ВАК РФ: п.1 (выделение и очистка новых соединений), п.3 (развитие рациональных путей синтеза сложных молекул), п.7 (выявление закономерностей типа «структура-свойство»).

Степень разработанности проблемы. Впервые о синтезе 24-нор-тритерпеноидов было упомянуто в 1960-х годах. В последующие годы были предложены различные способы их получения с выходами, диапазон которых варьируется от 30% до 90%.

В большинстве работ по теме 24-нор-тритерпеноидов, опубликованных ранее, в основном речь идет об их синтезе. Можно выделить лишь одну работу, где сообщается о синтезе 24-нор-аналога CDDO с высокой противоопухолевой активностью. Такие аспекты как химические модификации 24-нор-тритерпеноидов, их реакционная способность по сравнению с нативными аналогами, а также их биологическая активность не были рассмотрены. Это говорит о том, что данное направление в химии тритерпеноидов является мало изученным и открывает новые возможности для исследовательской деятельности.

Цель научно-квалифицированной работы: синтез, превращения и изучение биологических свойств производных 24-нор-тритерпеноидов.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Синтез 24-нор-тритерпеноидов из нативных тритерпеноидов;
2. Синтетические превращения 24-нор-тритерпеноидов по циклу А (реакции Бекмана, Байера-Виллигера, Фишера, Кляйзена-Шмидта и др.);
3. Синтез новых 2-оксо-тритерпеноидов и их модификация;
4. Сравнение реакционной способности нативных, 24-нор- и 2-оксо- тритерпеноидов;
5. Изучение биологической активности производных 24-нор-тритерпеноидов.

Научная новизна. В ходе исследовательской работы отлажены методики синтеза 24-нор-тритерпеноидов, позволяющие получить их с высокими выходами, а также установлен механизм их получения.

Для достижения поставленных целей были исследованы спектральные различия, различия в реакционной способности и биологической активности 24-нор-тритерпеноидов по сравнению с нативными аналогами. Установлено, что 3-оксо-24-нор-аллобетулин теряет селективность в реакциях оксимирования и образует смесь *Z/E* изомеров по сравнению с производными нативной структуры, которые образуют только *E*-изомеры. Изучение реакции альдольной конденсации 3-оксо-24-нор-аллобетулина показало, что проведение реакции в инертных условиях приводит к образованию 2-*E*-арилиден-3-оксо-производных, а в обычных условиях происходит автоокисление до 4 α -гидрокси-группы с обращением конфигурации метильной группы при С4. Далее наблюдается восстановление 3-оксо-группы до 3 β ,4 α -

диола по реакции Меервейна-Пондорфа-Верлея. В отличие от реакции Фишера нативного аллобетулина с фенилгидразином с образованием 3,2-индола, продуктом индолизации 3-оксо-24-нор-аллобетулина стал 3Н-индол (индоленин), структура которого подтверждена методом РСА. Реакция сопровождается изменением конфигурации метильной группы при С4. С другой стороны, 3,2-индол 24-нор-аллобетулина был также синтезирован, но с использованием сильного кислотного катализатора (гидрохлорида фенилгидразина в АсОН или фенилгидразина в МеОН с добавлением нескольких капель НСl). Исследование ингибирующей активности в отношении α -глюкозидазы показало, что 24-нор-производные более активны, чем нативные аллобетулины.

Теоретическая значимость. Исследованы реакции, позволяющие модифицировать скелетную структуру 24-нор-тритерпеноидов. Установлены различия в реакционной способности 24-нор-тритерпеноидов и нативных тритерпеноидов, а также механизмы исследуемых реакций.

Методология и методы исследования. Стандартные методы многостадийного органического синтеза. Очистку растворителей проводили методами фракционной перегонки, вакуумной перегонки и ректификации. Для очистки полученных веществ применяли методы экстракции, колоночной хроматографии, перекристаллизации и вакуумной перегонки. Интерпретацию полученных результатов проводили с привлечением методов физико-химического анализа, таких как ИК-спектроскопия, ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопия, хроматомасс-спектрометрия, тонкослойная хроматография.

Положения, выносимые на защиту. Синтез, модификации и сравнение реакционной способности 24-нор-тритерпеноидов и нативных тритерпеноидов. Исследование биологической активности новых производных 24-нор-тритерпеноидов.

Личный вклад автора состоит в поиске и изучении научной литературы по теме научного исследования; осуществлении синтетических экспериментов; разработке и оптимизации методик синтеза; подготовке образцов полученных соединений для дальнейших исследований методами физико-химического анализа; интерпретация данных анализов; подготовка результатов экспериментов к публикации в научных журналах; представление работы на научных конференциях. Все данные и результаты, представленные в научно-квалификационной работе, принадлежат автору и получены им лично.

Степень достоверности. Достоверность представленных результатов гарантируется высоким методическим уровнем выполнения работы и базируется на значительном объеме экспериментальных данных, полученных с использованием современного аналитического оборудования и анализа полученных результатов.

Апробация работы. Данные научной работы представлены на конкурсе на лучшие научно-исследовательские работы Уфимского института химии УФИЦ РАН (Уфа, 2022), на II Всероссийской молодежной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Уфимского Института химии УФИЦ РАН (Уфа, 2021), на XII Всероссийской научной конференции “Химия и технология растительных веществ” (Киров, 2022), III Всероссийской молодежной научно-практической конференции “Современные достижения химии в работах молодых ученых” (Уфа, 2023), на International Scientific and Technical Conference “Actual problems of the chemistry of Natural Compounds” (Ташкент, 2023), на 6-ой Российской конференции по медицинской химии “MedChem-2024” (Нижний Новгород, 2024).

Публикации. По материалам научного исследования опубликовано 6 статей, рекомендованные ВАК РФ, в том числе 5 публикаций, входящих в международные базы цитирования Web of Science и Scopus, тезисы 5 докладов на Международных и Всероссийских конференциях.

Структура и объем научно-квалификационной работы. Научно-квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы на тему «Синтез, биологическая активность и модификации по циклу А аллобетулина», обсуждения результатов, экспериментальной

части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Объем работы составляет 159 страниц машинописного текста. Работа содержит 60 схем, 19 рисунков и 7 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава (литературный обзор) посвящена обзору синтеза, биологической активности и модификации по циклу А аллобетулина.

Во второй главе (обсуждение результатов) представлены результаты синтеза новых 24-нор-тритерпеноидов, 2-оксо-тритерпеноидов и их химические трансформации. Были рассмотрены различия в реакционной способности вновь синтезированных производных 24-нор-тритерпеноидов и их нативных аналогов. Исследована биологическая активность новых производных 24-нор-тритерпеноидов.

В третьей главе приведены методики синтеза 2-оксо-тритерпеноидов, 24-нор-тритерпеноидов и их производных. Приведены физико-химические характеристики полученных соединений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью данной работы является синтез, превращения и изучение биологических свойств производных 24-нор-тритерпеноидов.

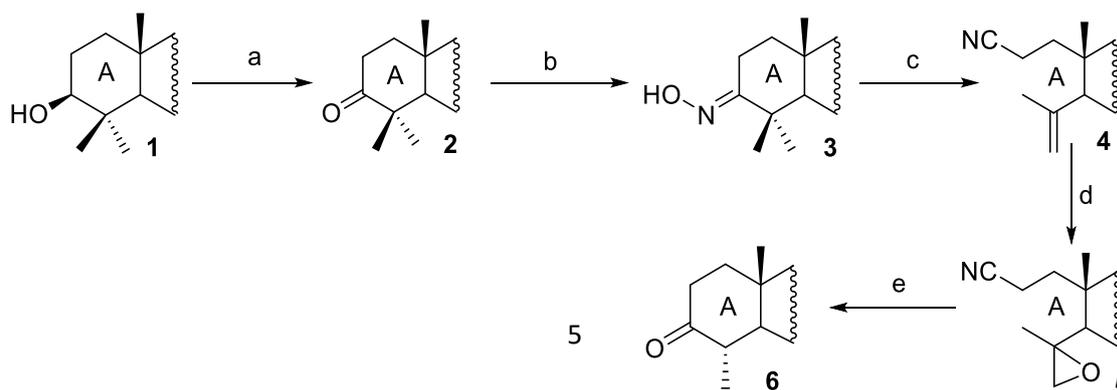
1. Синтез 24-нор-тритерпеноидов

Тритерпеноиды образуют огромный класс природных пентациклических соединений. Недавно показано, что удаление C^{24} метильной группы в структуре CDDO (2-циано-3,12-диоксоолеан-1,9 (11)-диен-28-оевая кислота) привело к 24-нор-аналогам с улучшенными фармакокинетическими свойствами, высокой противоопухолевой активностью и способностью ингибировать продукцию оксида азота в активированных макрофагах. С этой точки зрения, синтез 24-нор-тритерпеноидов является перспективным направлением для развития исследований по скелетным трансформациям и биологической активности.

Существуют несколько методов синтеза 24-нор-тритерпеноидов. Так в одном из наиболее ранних методов 3-оксо-24-нор-аллобетулин получали из 23-гидрокси-аллобетулина путем окисления CrO_3 в пиридине. В другом способе 3-оксо-24-нор-аллобетулин был синтезирован из эпоксида, который подвергался изомеризации до альдегида. Дальнейшее окисление альдегида и гидролиз нитрильной группы приводили к дикислоте, нагревание которой с уксусным ангидридом в присутствии KCN давало целевой 24-нор-аллобетулин. Перечисленные выше методы синтеза 24-нор-тритерпеноидов не являются универсальными и имеют ряд недостатков таких как низкий выход целевого продукта и использование токсичных реагентов.

Позже был предложен наиболее оптимальный метод получения 24-нор-тритерпеноидов с увеличением выхода до 90%. Основное отличие заключалось в прямой циклизации эпоксинитрила в присутствии $BF_3 \cdot Et_2O$ в кипящем толуоле. Общая схема получения 24-нор-тритерпеноидов по данному методу представлена на схеме 1.

Схема 1.

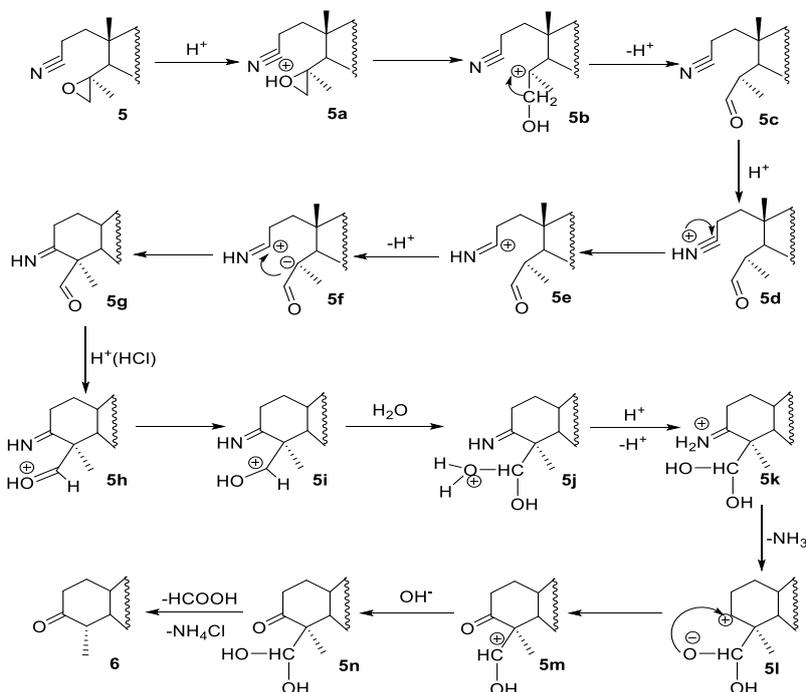


Реагенты и условия: а. CrO_3 , H_2SO_4 , $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, 23°C , 24 ч.; б. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, пиридин, кипячение, 8 ч.; с. SOCl_2 , 1,4-диоксан, 23°C , 24 ч.; д. CH_2Cl_2 , *m*-CPBA, 5°C , 24 ч.; е. $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, толуол, кипячение, 48 ч.

Окислением гидроксильной группы соединения **1** реактивом Джонса синтезировано 3-оксо производное **2**, кипячение которого с гидроксиламином гидрохлоридом в пиридине приводит с количественным выходом к оксиму **3**. Реакцией Бекмана 2-го рода соединения **3** с тионил хлоридом в среде 1,4-диоксана получали секонитрил **4**, эпоксицирование двойной связи $\text{C}^4\text{-C}^{23}$ которого приводит к эпоксиду **5**. Прямой циклизацией эпоксинитрила **5** в присутствии $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ в толуоле синтезировали 24-нор-производное **6** (Схема 1).

Возможный механизм последней стадии синтеза 24-нор-производного сводится к образованию промежуточного альдегида **5с** после раскрытия эпоксида в кислых условиях, который вступает в катализируемую кислотой внутримолекулярную реакцию Кляйзена с получением альдегида-имина **5g**. Последующий кислотный гидролиз через стадию протонирования и присоединения воды приводит к образованию 24-нор-кетона **6** (Схема 2).

Схема 2.

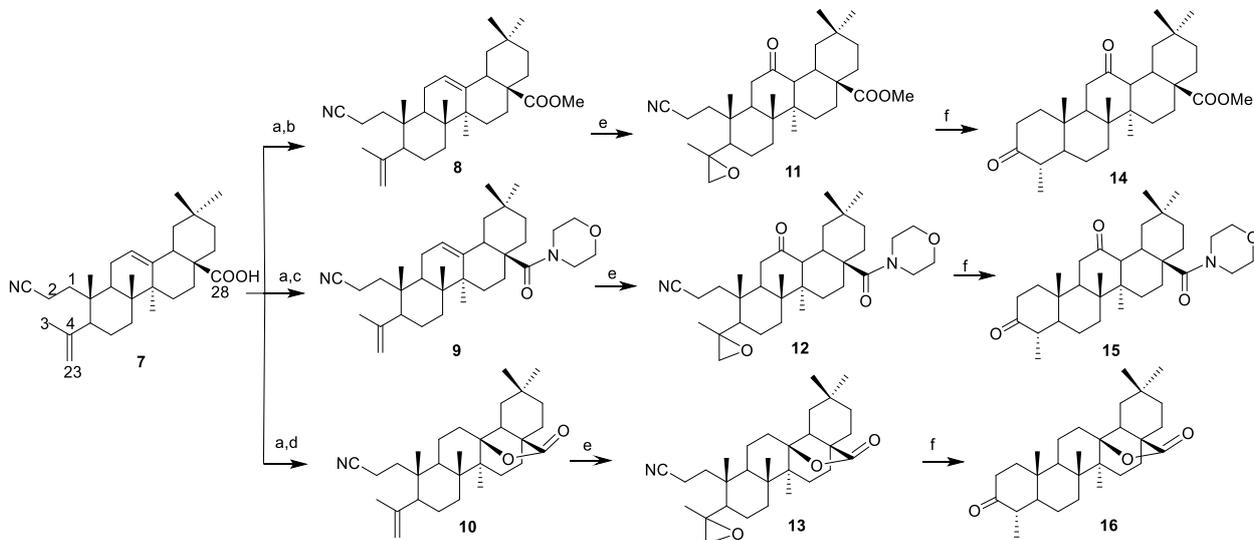


В развитие исследований по скелетным трансформациям тритерпеноидов нами осуществлен синтез серии 24-нор-олеанов исходя из 2-циано-3,4-секо-4(23)-ен-олеаноловой кислоты **7** – доступного продукта перегруппировки Бекмана второго рода 3-оксима олеаноловой кислоты (ОА).

Для синтеза 24-нор-производных ОА использовали тритерпеноиды **8-10**, получаемые из соединения **7** хлорангидридным методом по описанным в литературе методикам (Схема 3). Эпоксицирование двойной связи $\text{C}^4(\text{C}^{23})$ проводили 2.2 экв (для соединений **11**, **12**) или 1.1 экв (для соединения **13**) *m*-CPBA в среде CH_2Cl_2 при 0°C в течение 12 ч с образованием эпоксидов **11-13** с выходами 71-79%. О нахождении в реакционной массе эпоксидов в виде смеси α - и β -изомеров в соотношении 9:1 судили по расщеплению характеристических сигналов атомов углерода в спектрах ЯМР ^{13}C , в которых наблюдались удвоенные сигналы углеродных атомов C^4 и C^{23} , а также в спектрах ЯМР ^1H мультиплетные сигналы протонов метиленовой группы C^{24} наблюдались в области δ 2.56-2.62 м.д. для α -изомера и в области δ 2.75-2.80 м.д. для β -изомера.

Обработка изомерной смеси эпоксидов **11-13** эфиром трифторида бора при кипячении в толуоле согласно описанному выше методу приводила к соединениям **14-16** с выходами 80-85% после хроматографической очистки.

Схема 3.



Реагенты и условия: a. $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , 23°C , 2 ч; b. MeOH, кипячение, 2 ч; c. морфолин, CH_2Cl_2 , 22°C , 4 ч; d. TsOH, CHCl_3 , 22°C , 6 ч; e. *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , 0°C , 12 ч; f. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, толуол, 110°C , 12 ч.

На рис. 1 представлены ключевые HMBC и NOESY корреляции для соединения **14**. Значение вицинальной КССВ $J = 12.6$ Гц между протонами H^{24} и H^5 , соответствующее их трансoidalному расположению, свидетельствует о β -ориентации H^{24} при атоме C^4 . Наличие NOE между протоном H^{24} и протонами группы C^{25}H_3 подтверждает β -ориентацию H^{24} . Анализ HMBC кросс-пиков позволил отнести кето-группу при $\delta_{\text{C}} 212.73$ м.д. в положение C^3 , а сигнал при $\delta_{\text{C}} 211.01$ м.д. в положение C^{12} . Аналогичные взаимодействия в цикле А наблюдались в спектрах ЯМР соединений **15** и **16**.

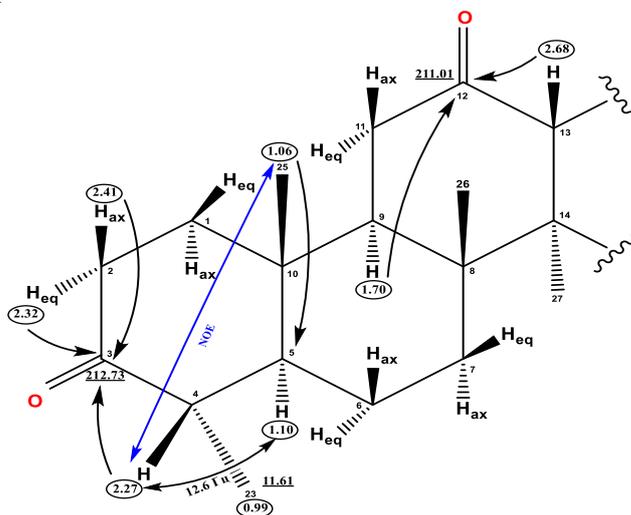
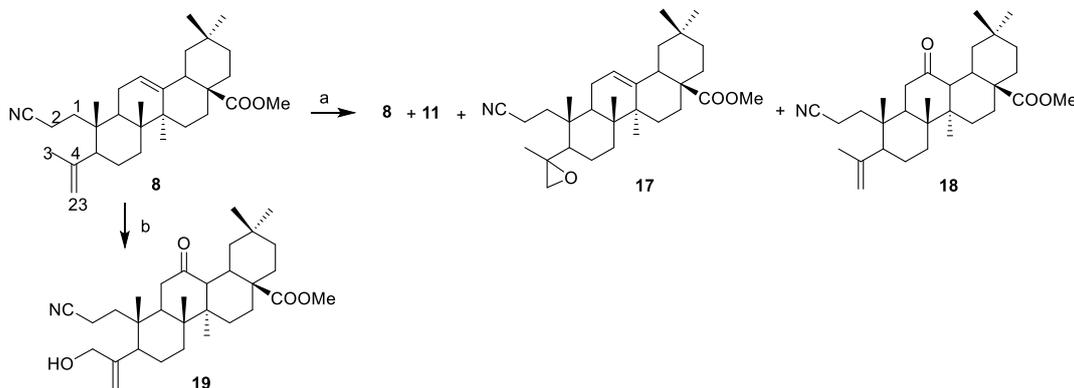


Рисунок 1. Основные корреляции в циклах А, В и С в спектрах $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ HMBC и $\{^1\text{H}, ^1\text{H}\}$ NOESY соединения **14**

При проведении опытов мы заметили чувствительность реакции окисления к условиям. Так, взаимодействие соединения **8** с 1.1 экв *m*-CPBA при 0°C в течение 2 ч проходило региоселективно с образованием приблизительно равных количеств 4(23)-эпоксида **17** (38%) и 12-оксо-производного **18** (43%), следовых количеств продукта полного окисления связей $\text{C}^{12(13)}$ и $\text{C}^{4(23)}$ **11** и неполной конверсией (возврат соединения **8** – 15%)

(Схема 4). О региоселективном окислении соединения **8** озоном сообщалось ранее. Взаимодействие соединения **8** с 2 экв *m*-CPBA при комнатной температуре в течение 12 ч приводило к количественному образованию 12-оксо-24-гидрокси-4(23)-ен-производного **19**.

Схема 4.



Реагенты и условия: а. экв. *m*-CPBA, 0°C, 2 ч; выходы: соединение **8** (15%), соединение **11** (3%), соединение **17** (38%), соединение **18** (43%); б. 2 экв. *m*-CPBA, 23°C, 12 ч.

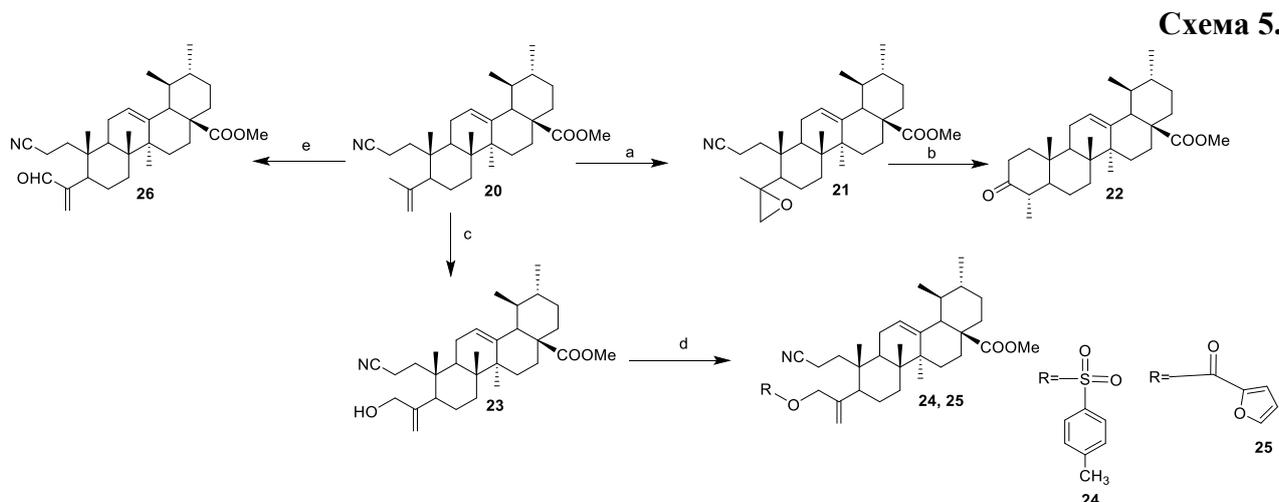
В спектре ЯМР ^{13}C соединения **17** отсутствуют сигналы углеродных атомов двойной связи $\text{C}^4\text{-C}^{23}$, сигналы атомов углеродов оксирановой связи $\text{C}^4\text{-C}^{23}$ проявляются при δ 55.5 и 51.9 м.д. Спектр ЯМР ^{13}C соединения **18** содержит сигнал атома углерода кето-группы C^{12} при δ 211.8 м.д. Для соединения **19** присутствие функциональных групп в положении C^4 , C^{10} и C^{12} подтверждено на основании двумерных корреляционных спектров. Цианоэтильная группа в положении C^{10} подтверждается НМВС кросс пиком метильной группы H^{25} с атомом C^1 (δ_{C} 34.24 м.д.) и НМВС взаимодействием протонов при C^1 и C^2 с циано-группой при δ_{C} 119.76 м.д. Для положения C^4 наблюдаются НМВС кросс-пики с протонами двойной связи и протонами метиленовой группы C^{24} , сигналы метиленовой группы C^{24} проявляются при δ 4.0 и 4.1 м.д. в виде двух дублетов.

Далее нами впервые был синтезирован 24-нор-тритерпеноид урсанового ряда - 3-оксо-24-нор-урсолат **22**. Для его синтеза использовали метил 2-циано-3,4-секо-12 (13), 4(23)-диен-урсолат **20**, который был получен из урсоловой кислоты в несколько стадий по описанным в литературе методикам (Схема 5). Эпоксидирование двойной связи $\text{C}^4(\text{C}^{23})$ соединения **20** проводили 2.2 экв *m*-CPBA в среде CH_2Cl_2 при 0°C в течение 8 ч с образованием эпоксида **21** с выходам 68 %. О нахождении в реакционной массе эпоксидов в виде смеси α - и β -изомеров в соотношении 5:1 судили по расщеплению характеристических сигналов атомов углерода в спектрах ЯМР ^{13}C , в которых наблюдались удвоенные сигналы углеродных атомов C^4/C^{23} и C^5/C^{23} , а также в спектрах ЯМР ^1H дублетные сигналы протонов метиленовой группы C^{23} наблюдались в области δ 2.64-2.71 м.д. для α -изомера и в области δ 2.41-2.43 м.д. для β -изомера.

Обработка изомерной смеси эпоксида **21** эфиром трифторида бора при кипячении в толуоле согласно описанному выше методу приводила к соединению **22** с выходом 71 % после хроматографической очистки.

С другой стороны, аллильное окисление диена **20** 2 экв. *m*-CPBA при комнатной температуре в течение 8 часов позволило получить 24-гидрокси-12(13),4(23)-диен **23** с выходом 78% (Схема 5). Последующее ацилирование соединения **23** фурил- или п-тозилхлоридом в пиридине привело к образованию сложных эфиров **24** или **25**. Кроме того, окислением соединения **20** с помощью SeO_2 в 1,4-диоксане синтезировали 24-альдегид **26** (88 %).

Стоит отметить, что при окислении *m*-CPBA и SeO₂ C12(13) двойная связь остается инертной, в отличие от аналогичной реакции на олеаноловой кислоте, рассмотренной выше. Полученные результаты полностью согласуются с данными по окислению урсолов.



Реагенты и условия: а. *m*-CPBA, CH₂Cl₂, 0°C, 8 ч.; б. BF₃·Et₂O, толуол, 110°C, 24 ч.; в. *m*-CPBA, CH₂Cl₂, 23°C, 8 ч.; д. Фурил хлорид или TsCl, пиридин, кипячение, 6 ч.; е. SeO₂, 1,4-диоксан, кипячение, 4 ч.

Значение вицинальной КССВ $J = 12.8$ Гц между протонами H²⁴ и H⁵ свидетельствует о β-ориентации H²⁴ при атоме C⁴ в соединении **22**. Наличие NOE между протоном H²⁴ и протонами группы C²⁵ также подтверждает β-ориентацию H²⁴. Анализ НМВС кросс-пиков позволил отнести кето-группу при δ_C 213.41 м.д. в положение C³.

В соединении **23** наличие цианоэтильной группы в положении C-3 подтверждали НМВС кросс-пиком метильной группы H-25 с атомом C-1 (δ_C 34.73) и НМВС взаимодействием протонов при C-1 и C-2 с цианогруппой при δ_C 120.22. Для положения C-4 наблюдаются НМВС кросс-пики с протонами двойной связи и протонами метиленовой группы C-24. Сигналы метиленовой группы C-24 наблюдались при δ_H 4.02 и 4.07 в виде двух дублетов. Наличие альдегидной группы в положении C-24 соединения **26** подтверждается химическим сдвигом при δ_C 195.11 в спектре ЯМР ¹³C и синглетом при δ_H 9.48 в спектре ЯМР ¹H.

Наличие тозилного фрагмента в структуре соединения **24** было подтверждено наличием дублетных сигналов при δ_H 7.36 и 7.77 и синглетного сигнала при δ_H 2.45 в спектре ЯМР ¹H. Структура соединения **25** была установлена на основании спектра ЯМР ¹³C, где химический сдвиг при δ_C 158 соответствует карбонильной группе при C-24, а химические сдвиги при δ_C 144.94, 118.31, 111.97 и 146,62 соответствуют сигналам ароматического кольца.

2. Модификации 24-нор-тритерпеноидов

2.1. Влияние протона Н-4 на ход реакций на примере 3-оксо-24-нор-аллобетулина

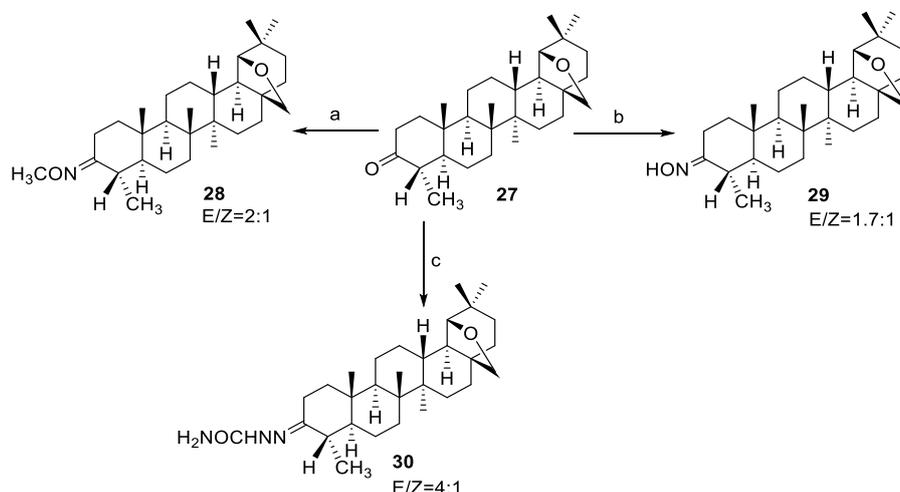
Перспективным объектом для изучения реакционной способности и фармакологической активности является 24-нор-аллобетулин, получаемый из аллобетулина в несколько стадий. Наличие протона Н-4 в структуре 3-оксо-24-нор-аллобетулина влияет на ход реакций оксимирования, альдольной конденсации в сравнении с исходной структурой.

2.1.1. Синтез 3-оксим-, 3-метоксиоксим- и 3-семикарбазон-24-нор-аллобетулина

Синтез новых имино-производных 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** представлен на схеме 6. 3-оксо-24-нор-аллобетулин **27** получали из аллобетулина в несколько стадий по

методу, описанному в разделе 1. Метоксиоксим **28** и оксим **29** были синтезированы при взаимодействии соединения **27** с гидросиламин или метоксигидросиламин гидрохлоридами в пиридине при кипячении с хорошими выходами. Реакция кетона **27** с гидросилидом семикарбазида в присутствии ацетата натрия в этаноле при кипячении привела к образованию семикарбазона **30** (88%). Все полученные соединения **28**, **29** и **30** были обнаружены в виде смеси *E/Z*-изомеров, что следовало из анализа спектров ЯМР.

Схема 6.



Реагенты и условия: а. $\text{CH}_3\text{ONH}_2 \cdot \text{HCl}$, пиридин, кипячение, 8 ч.; б. $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ пиридин, кипячение, 8 ч.; в. $\text{NH}_2\text{NHCONH}_2 \cdot \text{HCl}$, AcONa , EtOH , кипячение.

Структуры соединений **28**, **29** и **30** определяли с использованием двумерных корреляционных методик ЯМР спектроскопии. Наличие смеси *E/Z*-изомеров соединения **28** в соотношении 2:1 и **30** в соотношении 4:1 установлено на основании удвоенных сигналов ЯМР ^{13}C . Так, для *E*-изомера наблюдался перекрестный пик CH_3ON - и NNHCONH_2 -протонов с экваториальным протоном в положении С-2 (δ_{H} 3.81/3.03 для соединения **28** и δ_{H} 8,61/2,53 для соединения **30**). Отнесение к *Z*-конфигурации сделано на основе наблюдаемого NOE-взаимодействия CH_3ON - и NNHCONH_2 -групп с метиновым протоном Н-4 (δ_{H} 3.82/2.51 для соединения **28** и δ_{H} 8,49/2,15 для соединения **30**). Стоит отметить, что аналогичные производные аллобетулина образуют только *E*-изомеры.

Оксим **29** был также получен в виде смеси *E/Z*-изомеров. Расширенный сигнал NOH -группы не позволил наблюдать NOESY взаимодействия для соотнесения к *E*- или *Z*-изомерам как было в случае с метоксиоксимом **28** и семикарбазоном **30**. Однако, спектральная картина (положение сигналов) была аналогична метоксиоксиму, что позволило отнести сигналы в спектрах ^1H и ^{13}C к *E*- и *Z*-изомерам оксима **29** и определить соотношение *E/Z*-изомеров как 1,7:1. Стоит отметить, что метоксиоксим аллобетулина был выделен ранее как *E*-изомер, что свидетельствует о различной реакционной способности нативного и 24-нор-аллобетулина, обусловленной стерическими факторами.

Так, для полученных 3-оксима **29** и 3-метокси-оксима **28** 24-нор-аллобетулина нам удалось выделить индивидуальные *E*-изомеры путем кристаллизации из смесей их *E/Z*-изомеров. Структура этих соединений подтверждена методом рентгеноструктурного анализа (Рис. 2, 3). Молекулы 24-нор-аллобетулинов **29** и **28** имеют обычную геометрию, все шестичленные циклы находятся в конформации кресла. Такая же геометрия установлена и в близком аналоге - 3*E*-метоксиоксиме аллобетулина, отличающегося от соединения **28** только наличием второго метила в положении С4. Стерический фактор между заместителями в 3- и 4-положениях приводит к удлинению связи С3-С4 до 1.529(3) Å в 3*E*-метоксиоксиме аллобетулина по сравнению с 1.505(4) Å в соединении **28**. Большая погрешность длины связи

C3-C4 1.520(13) Å в соединении **28** не позволяет провести сравнение. В упаковке молекул соединения **28** имеются классические водородные связи O1-H...O2 с параметрами H...O 0.82, O...O 2.754(10) Å, угол O-H...O 159°, с их участием образуются зигзагообразные цепочки молекул параллельно оси *b*. В упаковке молекул соединения **29** классические водородные связи отсутствуют, можно выделить слабо сокращенные (-0.07 Å) контакты C23-H...O1, образующие цепочки молекул параллельно оси *a*.

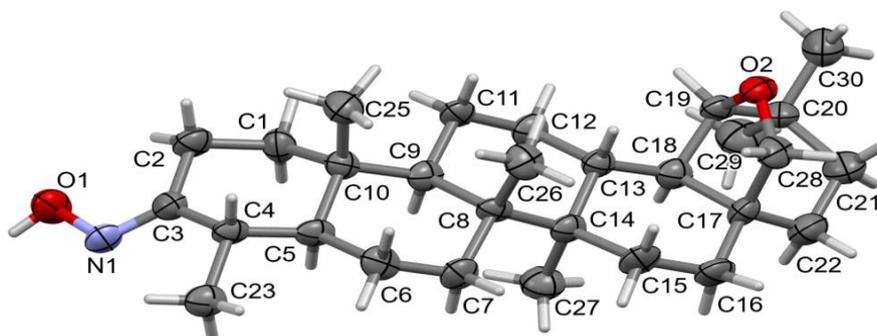


Рисунок 2. Молекулярная структура 3*E*-оксима 24-нор-аллобетулина **29**

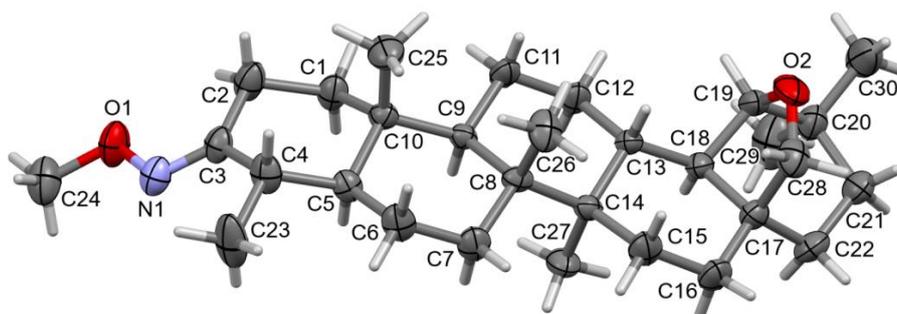


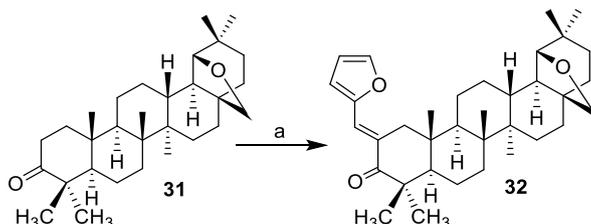
Рисунок 3. Молекулярная структура 3*E*-метоксиоксима 24-нор-аллобетулина **28**

2.1.2. Синтез бензилиденовых производных 24-нор-аллобетулина

Как известно, бензилидиновые производные различных тритерпеноидов могут быть синтезированы с помощью реакции Кляйзена-Шмидта. Все способы проведения данной реакции для тритерпеноидов схожи между собой, разница может заключаться лишь во времени проведения реакции и количестве необходимого альдегида. Общая методика заключается в том, что тритерпен растворяют в этаноле, затем в раствор добавляют необходимый ароматический альдегид и все перемешивают при комнатной температуре. Время реакции составляет от 2 до 24 часов, а выход - от 81 до 92 %.

Реакция 3-оксо-аллобетулина **31** с фурфуралем в этаноле в присутствии 40% раствора КОН/EtOH в качестве основания в течение 12 часов привела к ожидаемому и ранее известному 2*E*-фурфурилиден-производному **32** с выходом 81% (Схема 7).

Схема 7.



Реагенты и условия: а. фурфураль, 40% КОН/EtOH, EtOH, к.т., 12 ч.

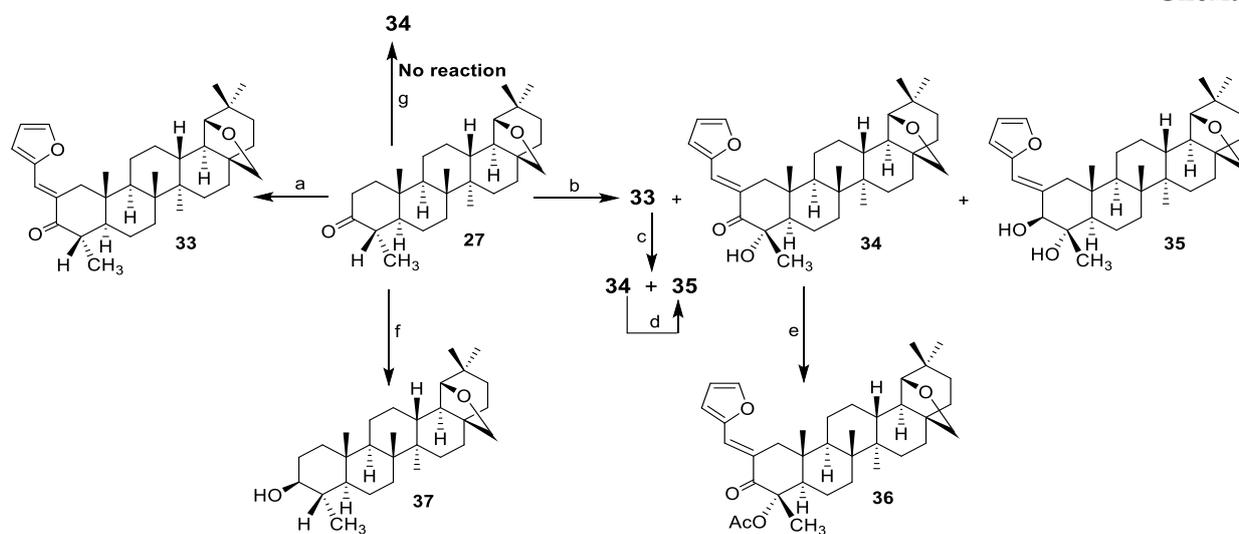
При проведении реакции 3-оксо-24-нор-аллобетулин **27** с фурфуралем в течение 4 ч, мы наблюдали полную конверсию **27** и образование 2Е-фурфурилиден-производного **33** (Схема 8). Далее, при увеличении времени реакции от 4 до 24 ч мы наблюдали образование двух побочных продуктов **34** и **35** помимо ожидаемого соединения **33**. Также при постепенном увеличении времени реакции до 48 ч образовывалась смесь соединений **34** и **35** с увеличением их выхода, в то время как выход соединения **33** уменьшался (Табл. 1). Увеличение выхода соединений **34** и **35** также наблюдалось при добавлении двойного избытка щелочного раствора.

Образование смеси соединений **34** и **35** также наблюдалось при выдерживании соединения **33** в 40% растворе КОН/ЕtОН в течение 12 ч. 3,4-дигидрокси-производное **35** синтезировано при кипячении 3-оксо-4-гидрокси-производного **34** в 40% растворе КОН/ЕtОН в течение 24 ч (Схема 8).

Далее мы решили проверить реакционную способность 3-оксо-группы производных аллобетулина **31** и **27**. При обработке 3-оксо-аллобетулина **31** 40%-ным раствором КОН/ЕtОН при кипячении реакции не наблюдалось. Кипячение соединения **27** в этаноле в присутствии 40% раствора КОН/ЕtОН в течение 24 ч привело к образованию ранее полученного нами 3β-гидрокси-24-нор-аллобетулина **37** (Схема 8). Это превращение подтверждает возможность образования 3,4-дигидрокси-производного **35** из 3-оксо-4-гидрокси-производного **34**. Очевидно, что восстановление оксо-группы в **27** или **34** до 3β-гидрокси- **35** или **37** можно объяснить процессом, который подобен реакции Меервейна-Понндорфа-Верлея.

Кроме того, 3-оксо-4-ацетокси-производное **36** синтезировали путем кипячения соединения **34** в ледяной уксусной кислоте.

Схема 8.



Реагенты и условия: а. фурфураль, 40% КОН/ЕtОН, ЕtОН, к.т., 4 ч; б. фурфураль, 40% КОН/ЕtОН, ЕtОН, к.т., 24 ч; с. 40% КОН/ЕtОН, ЕtОН, к.т., 12 ч; д. 40% КОН/ЕtОН, ЕtОН, кипячение, 24 ч; е. Ледяная АсОН, кипячение, 2 ч; ф. 40% КОН/ЕtОН, ЕtОН, кипячение, 24 ч; (г) 40% КОН/ЕtОН, ЕtОН, к.т., 24 ч, аргон.

Таблица 1. Зависимость выхода соединений **33**, **34** и **35** от времени реакции

Время реакции	Выход		
	Соединение 33	Соединение 34	Соединение 35
8 ч	70 %	14 %	11 %
12 ч	51 %	28 %	14 %
24 ч	22 %	39 %	33 %
48 ч	12 %	43 %	39 %

Структуры полученных соединений были подтверждены с помощью спектров ЯМР спектроскопии. Наличие фурфурилиденового фрагмента в соединениях **32**, **33** и **34** подтверждается характерными сигналами метилиденовой группы с δ_H 7.3, δ_C 12 и δ_C 131, а также HMBC кросс-пиками метилиденового протона с C-1, C-2, C-3 кольца А и C-2', C-3' фуранового кольца. Для этих соединений *E*-конфигурация двойной связи C-1'-C-2 была установлена на основании наблюдаемых NOESY кросс-пиков между протоном H-3' фуранового кольца и протоном H_{eq}-1.

В спектре ЯМР 1H соединения **33** метильный сигнал H₃-23 (δ_H 1,18) наблюдали в виде дублета с константой $^3J = 7,0$ Гц. Сигнал метинового протона H-4 (δ_H 2,11) представлен дублет-квартета с константами $^3J = 10,8$ и $7,0$ Гц, последняя из которых соответствует трансаксиальному взаимодействию с протоном H-5, что явно указывает на β -ориентацию протона H-4. Кроме того, этот факт был подтвержден NOESY-взаимодействием между метилом H₃-25 (δ_H 0,84) и H-4 (δ_H 2,11) (Рис. 4, Табл. 2).

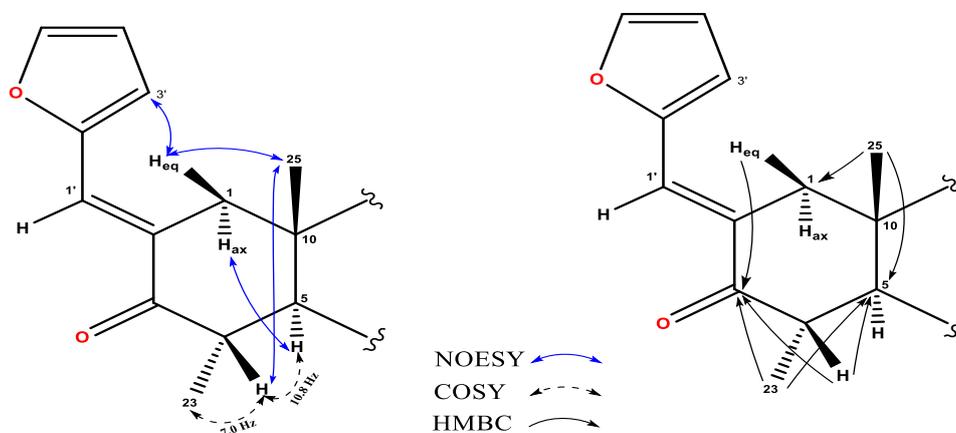


Рисунок 4. NOESY, COSY и HMBC взаимодействия А кольца для 2*E*-фурфурилиден-3-оксо-24-нор-аллобетулина **33**.

Таблица 2. Значения HSQC, COSY, NOESY и HMBC корреляций А кольца для соединения **33**.

Значение (δ , м.д.)	HSQC	COSY	NOESY	HMBC
H _{ax} -1 (2.17)	44.28	H _{eq} -1, H-1'	H-5, H-9	C-2, C-3, C-5, C-25
H _{eq} -1 (3.24)		H _{ax} -1, H-1'	H _{eq} -11, H ₃ -25, H-3'	C-2, C-3, C-5, C-10, C-25, C-1'
H-4 (2.11)	43.91	H-5, H ₃ -23	H _{ax} -6, H ₃ -23, H ₃ -25	C-2, C-3, C-5, C-6, C-23
H-5 (1.30)	49.28	H-4, H _{ax} -6, H _{eq} -6	H _{ax} -1, H-9	-

H ₃ -23 (1.18)	15.46	H-4	H _{eq} -6	C-3, C-4, C-5
H ₃ -25 (0.84)	15.54	-	H-4, H _{eq} -1, H _{ax} -11, H ₃ -26	C-1, C-5, C-9, C-10
H-1' (7.35)	124.44	H _{ax} -1, H _{eq} -1	-	-

Для 3-оксо-4 α -гидроксипроизводного **34** наличие гидрокси-группы в положении С-4 было установлено на основании слабополюного сдвига четвертичного углерода С-4 (δ_C 76.15) и HMBC взаимодействий гидроксильного протона (δ_H 3.14) и метильной группы H₃-24 (δ_H 1.27) с углеродами С-3, С-4 и С-5 кольца А (Рис. 5, табл. 3). Положение оксо-группы при С-3 было также подтверждено спектрами HMBC. Так, наблюдались перекрестные пики HMBC между метилиденовым протоном H-1' (δ_H 7.29) и метиленовым протоном H_{eq}-1 (δ_H 3.57) с сигналом при δ_C 205.75. NOESY-взаимодействие между H₃-24 (δ_H 1,27) и H₃-25 (δ_H 0,94) указывали на то, что H₃-24 имеет β -ориентацию. Кроме того, существует NOESY-взаимодействие между гидроксильным протоном и метиновым протоном H-5 (δ_H 3,14 / 1,79). Таким образом, гидроксильная группа при С-4 имеет α -конфигурацию и стереохимия С-4 была определена как S.

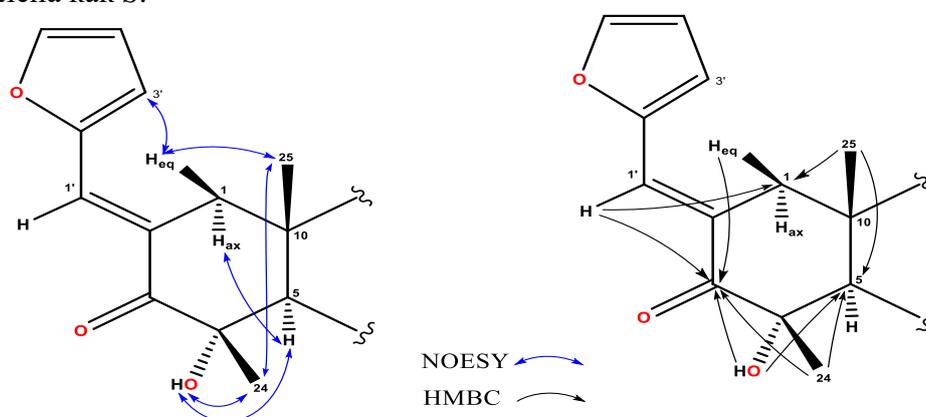


Рисунок 5. NOESY и HMBC взаимодействия А кольца для 2E-фурфурилиден-3-оксо-4 α -гидрокси-23-нор-аллобетулина **34**.

Таблица 3. Значения HSQC, COSY, NOESY и HMBC корреляций А кольца для соединения **34**.

Значение (δ , м.д.)	HSQC	COSY	NOESY	HMBC
H _{ax} -1 (2.06)	43.63	H _{eq} -1, H-1'	H-5, H-9	C-2, C-5, C-9, C-10, C-25, C-1'
H _{eq} -1 (3.57)		H _{ax} -1, H-1'	H _{eq} -11, H ₃ -25, H-3'	C-2, C-3, C-5, C-10, C-25, C-1'
ОН-С-4 (3.14)	-	-	H-5, H ₃ -24	C-3, C-4, C-5
H-5 (1.79)	53.25	H _{ax} -6, H _{eq} -6	H _{ax} -1, H-9, ОН-С4	C-4, C-10, C-24, C-25
H ₃ -24 (1.27)	23.93	-	H _{ax} -6, H ₃ -25, ОН-С4	C-3, C-4, C-5
H ₃ -25 (0.94)	16.94	-	H _{eq} -1, H _{ax} -11 H ₃ -24, H ₃ -26	C-1, C-5, C-9, C-10
H-1' (7.29)	125.38	H _{ax} -1, H _{eq} -1	-	C-1, C-2, C-3, C-2'

Для соединения **35** положение С-3 определяли на основании HMBC взаимодействий метилиденового протона H-1' (δ_H 6.50) и метиленовых протонов С-2 (δ_H 3.56 и 1.48) с метиновым углеродом при δ_C 82.00 (δ_H 4.00). Для четвертичного углерода при δ_C 77,70 наблюдаются HMBC кросс пики протонов H-3, H-5 и H₃-24, что указывает на положение С-4. Значения химического сдвига для положения С-3 δ_C 82,00 (δ_H 4,00) и δ_C 77,70 для четвертичного С-4 указывают на образование 3,4-дигидрокси-производного. Гидрокси-группы при С-3 и С-4 в спектре ЯМР ¹H представлены чрезвычайно уширенными сигналами при δ_H 1,8 и 2,3, что подтверждается обменными кросс-пиками в спектре NOESY.

Стереохимическая конфигурация С-3 и С-4 хиральных центров 3,4-дигидроксипроизводного **35** была установлена путем анализа спектра NOESY. На основании NOESY-взаимодействий H_{ax-1} (δ_H 1,48) и $H-5$ (δ_H 1,33) с $H-3$ (δ_H 4,00) определили, что $H-3$ имеет α -конфигурацию, а гидроксильная группа при С-3 имеет β -ориентацию. NOESY-корреляция метильных групп H_3-24 / H_3-25 (δ_H 1,01 / 0,76) указывала на α -ориентацию гидроксильной группы при С-4. Приведенные выше данные позволили предположить, что соединение **35** является 3 β ,4 α -дигидрокси-производным.

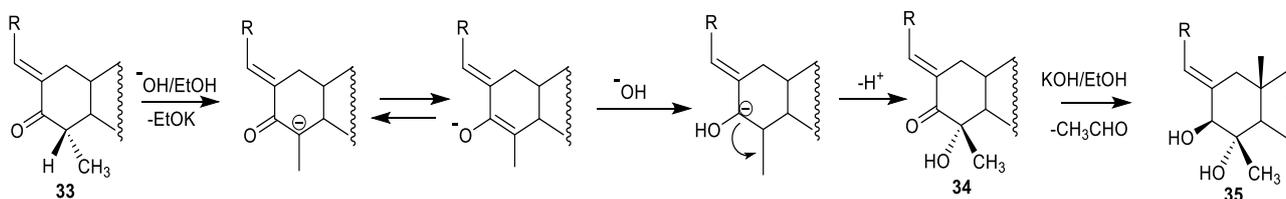
Для 3-оксо-4 α -ацетокси-производного **36** наличие ацетильной группы в положении С-4 было установлено на основании сдвига четвертичного углерода С-4 (δ_C 83,35), С-3 (δ_C 198,03) и С-5 (δ_C 50,22) относительно аналогичных положений в соединении **34**. α -ориентация ацетокси-группы была установлена на основании NOESY-взаимодействий между протонами H_3-24 (δ_H 1,37) и H_3-25 (δ_H 0,87).

Интересно отметить, что аналогичные продукты реакции, такие как **34** и **35**, были синтезированы из фриеделина. Они были получены в три этапа путем силилирования, окисления и восстановления на последнем этапе. В более поздних исследованиях по теме химических превращений фриеделина были предложены более простые и удобные методы синтеза высокоселективных производных фриделана по кольцу А, используя при этом доступные исходные материалы.

Для того чтобы понять механизм образования **34** и **35**, а также выяснить, влияет ли на реакцию кислород воздуха, соединения **33** выдерживали в 40%-ном растворе КОН/EtOH в течение 24 ч в инертных условиях (в условиях аргона). Последующий анализ смеси показал, что реакции не происходит.

Таким образом, вероятный механизм этого неожиданного превращения в соединения **34** и **35** включает стадию енолизации, катализируемую основанием, то есть свободный протон Н-4 отщепляется от карбонильной группы в α -положении (Схема 9). Затем под действием кислорода воздуха образовывался гидропероксид, который далее превращался в стабильное 4-гидроксипроизводное **34**. Образование соединения **34** происходило в соответствии с работой, где катализируемое основаниями автоокисление фриеделина в присутствии трет-бутоксидка калия и сухого кислорода давало несколько продуктов, аналогичных соединениям **34** и **35**. В то же время α -гидроксилирование 3-оксо-тритерпеноидов также наблюдалось при атмосферном кислороде в щелочных условиях. На последней стадии в присутствии основания происходит восстановление кето-группы соединения **34** по типу реакции Меервейна-Пондорфа-Верлея с получением соединения **35**.

Схема 9.

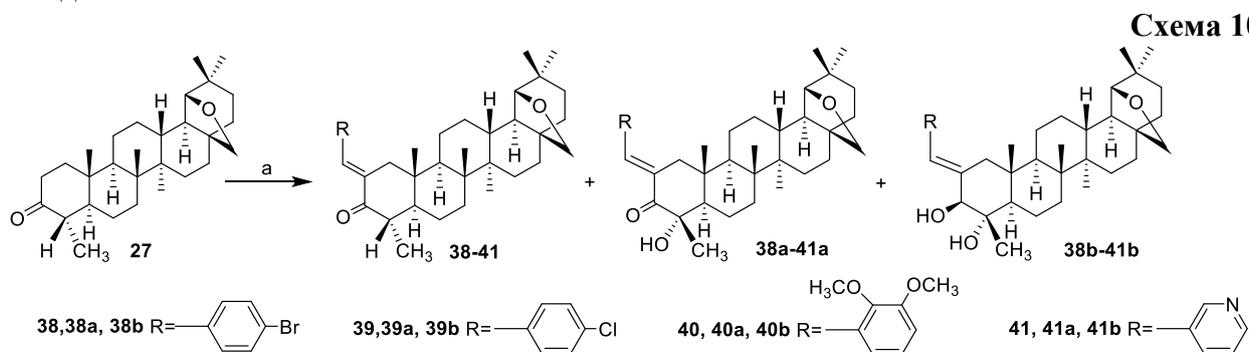


Приведенные выше рассуждения позволяют сравнить реакционную способность 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** и 2Е-фурфурилен-производного **33**. Так, в отсутствие заместителя в положении С-2 соединения **27** в щелочных условиях происходит прямое восстановление до 3 β -гидрокси-24-нор-аллобетулина **37**. В то время как С-2-замещенное соединение **33** в тех же условиях под действием кислорода воздуха сначала давало 3-оксо-4-гидрокси-производное **34**, и только после этого было восстановлено до 3,4-дигидрокси-производного **35**. Это утверждение позволяет сделать вывод о том, что наличие заместителя

в положении С-2 3-оксо-24-нор-аллобетулина влияет на ход реакции, что свидетельствует о хемоселективности процесса.

При сравнении аналогичной реакции для 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** и фриеделина реакционная способность **27** выше, чем у фриеделина, так как для него характерно образование аналогичных продуктов реакции, как и для соединения **33**, за счет щелочного автоокисления.

Основываясь на результатах взаимодействия 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** с фурфуралем, мы изучили ход реакций с другими ароматическими альдегидами. Синтез новых арилиденовых производных 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** представлен на схеме 10. Конденсация Кляйзена–Шмидта кетона **27** с соответствующим альдегидом (4-бромбензальдегид, 4-хлорбензальдегид, 2,3-диметоксибензальдегид и 3-пиридинкарбоксальдегид) в этаноле привела к образованию, кроме ожидаемых 2*E*-арилиден-производных **38-41**, к арилиденовым 3-оксо-4*α*-гидрокси- **38a-41a** и 3*β*,4*α*-дигидрокси- **38b-41b** производным как и в случае с фурфуралем (Схема 10). Таким образом, независимо от использованного альдегида продуктами реакции всегда являются 2*E*-бензилиден-3-оксо-24-нор-аллобетулин **38-41**, 2*E*-бензилиден-3-оксо-4*α*-гидрокси-23-нор-аллобетулин **38a-41a** и 2*E*-бензилиден-3*β*,4*α*-дигидрокси-23-нор-аллобетулин **38b-41b**, которые образуются последовательно.



Реагенты и условия: а. RCHO, 40% KOH/EtOH, EtOH, 24 ч, 25 °С.

Структуры соединений **38**, **38a**, **38b**, **39**, **39a**, **39b**, **40**, **40a**, **40b**, **41**, **41a**, **41b** определяли с использованием двумерных корреляционных методик ЯМР спектроскопии и подробно рассмотрены на примере 4-хлор-бензилиден-производных **39**, **39a**, **39b**. Присутствие бензилиденового фрагмента в соединениях **39**, **39a**, **39b** подтверждается характерными сигналами метилиденовой группы при δ_{H} 7.3 м.д., δ_{C} 125 м.д. и δ_{C} 131 м.д. Для этих соединений *E*-конфигурация двойной связи С-1'-С-2 была установлена на основании NOESY кросс-пиков между протоном Н-3' бензилиденового кольца и протоном Н_{eq}-1.

NOESY взаимодействие между метилом С-25 (δ_{H} 0.79) и протоном Н-4 (δ_{H} 2.14) подтверждают β -ориентацию протона Н-4 в соединении **39**.

Для 3-оксо-4*α*-гидрокси-производного **39a** наличие гидроксильной группы в положении С-4 было установлено на основании слабопольного сдвига четвертичного углерода С-4 (δ_{C} 76.70) и HMBC взаимодействий гидроксильного протона (δ_{H} 3.14) и метильной группы Н₃-24 (δ_{H} 1.04) с С-3, С-4 и С-5 углеродными атомами кольца А. NOESY взаимодействие между метильными группами Н₃-24 / Н₃-25 (δ_{H} 1.01 / 0.76) подтвердило α -ориентацию гидроксильной группы при С-4. β -ориентацию метильной группы С-24 определили по NOESY взаимодействию между гидроксильным протоном и метиновым протоном Н-5 (δ_{H} 3.14 / 1.79).

Значения химических сдвигов δ_{C} 82.00 (δ_{H} 4.00) для положения С-3 и δ_{C} 77.70 для четвертичного С-4 указывают на образование 3,4-дигидрокси-производного **39b**. β -ориентацию гидроксильной группы при С-3 определили по NOESY взаимодействию протонов Н_{ax}-1 (δ_{H} 1.44) и Н-5 (δ_{H} 1.33) с протоном Н-3 (δ_{H} 4.05). β -ориентацию метильной

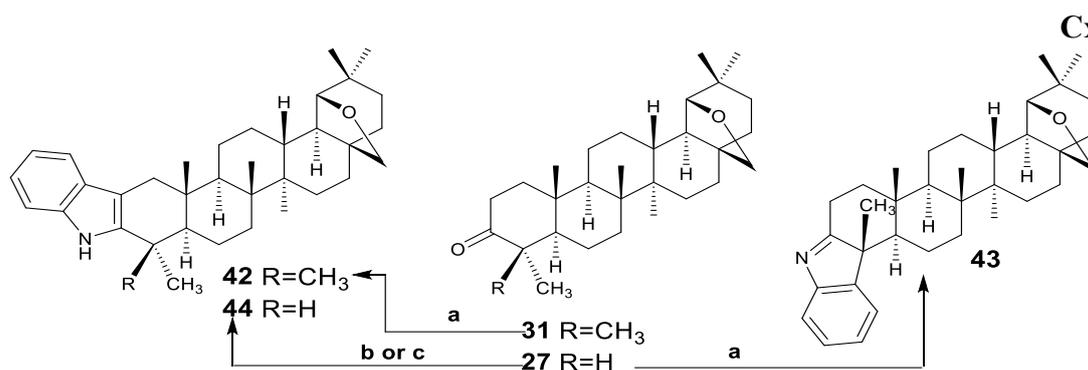
группы С-24 и α -ориентацию гидроксильной группы при С-4 определяли по аналогии с соединением **3a**.

Таким образом, в структурах соединений **38a**, **38b**, **39a**, **39b**, **40a**, **40b**, **41a**, **41b** произошли перегруппировки с участием протона при С-4 и обращение конфигурации метильной группы при С-24, что также было доказано на примере соединений **34** и **35**.

2.1.3. Синтез индолов по Фишеру 24-нор-аллобетулина

Реакция получения индолов по Фишера - один из важных методов синтеза биологически активных индолов. Эта реакция довольно проста и осуществляется путем кипячения кетона или альдегида с арилгидразином в присутствии кислотного катализатора. Ранее аллобетулин уже использовался в качестве исходного соединения для синтеза индолов по методу Фишера, например, реакция с фенилгидразином давала [3,2b]-индоло-аллобетулин. Известен синтез 3,2-индолов из 5 β H-нор-аллобетулона, 28-оксо-аллобетулона, обладающих высокой биологической активностью, а также 2,3-индолов из региоизомерного 2-оксо-аллобетулина. Данных о вовлечении 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** в реакцию Фишера не публиковалось. Кроме того, мы не нашли данных о синтезе 3H-индолов на основе тритерпеноидов. Известно лишь, что эти гетероциклы могут быть получены из несимметричных кетонов, а их выход зависит от температуры реакции, природы и концентрации кислотного катализатора.

Синтез индолов из соответствующих 3-оксо-аллобетулина **31** и 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** представлен на схеме 11. Кипячение соединений **31** и **27** с фенилгидразином в уксусной кислоте привело к известному 3,2-индолу **42** и новому 3H-индолу **43**, что демонстрирует различия в реакционной способности исходных соединений. При проведении реакции 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** с гидрохлоридом фенилгидразина в AcOH или в метаноле с добавлением нескольких капель HCl был получен 3,2-индоло-24-нор-аллобетулин **44**, что говорит о том, что присутствие сильной кислоты способствует дальнейшему протонированию реакции. В результате мы наблюдали региоспецифическую реакцию индолизации 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27**. Следует отметить, что тритерпеновая фузидовая кислота, имеющая одну метильную группу при С-4, при реакции с фенилгидразином в EtOH-AcOH (10:0.1) образовывала один 3,2-индол.

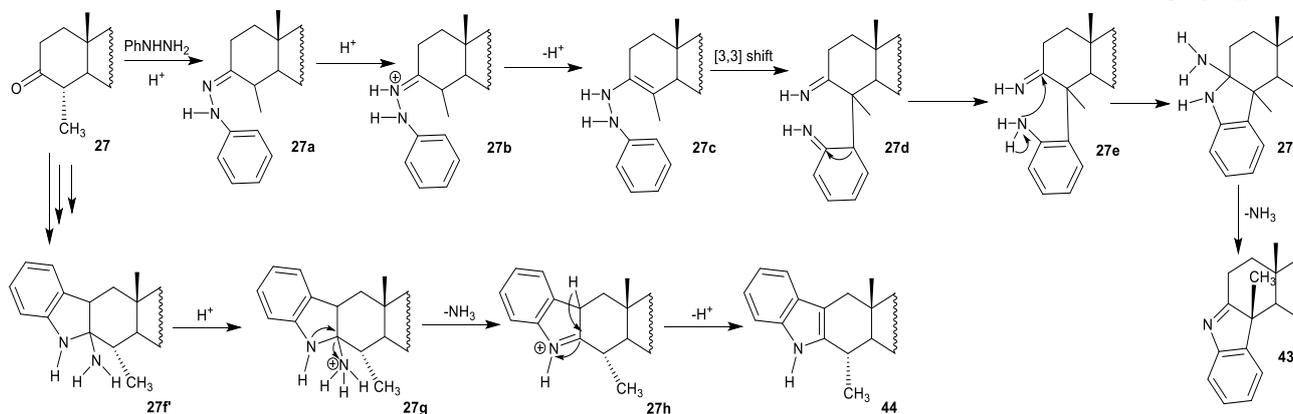


Реагенты и условия: а. PhNHNH₂, AcOH, кипячение, 3 ч; б. PhNHNH₂·HCl, AcOH, кипячение, 3 ч; в. PhNHNH₂, MeOH, HCl (несколько капель), кипячение, 3 ч.

Возможный механизм образования 3H-индола **43** заключается в таутомеризации гидразона **27a** в енгидразин **27c** (схема 12). Затем происходит циклическая [3,3]-сигматропная перегруппировка с образованием имида **27d**, который после ароматизации бензольного кольца превращается в циклический аминаль **27f**. Аминаль под действием кислотного катализатора отщепляет NH₃, в результате чего образуется 3H-индол **43**. Механизм образования 3,2-индола **44** аналогичен 3H-индолу **43** до стадии образования аминаля **27f**. Дальнейшее протонирование под действием сильного кислотного катализатора

образует **27g**, после чего происходит отщепление NH_3 и ароматизация пиррольного кольца с образованием **44**.

Схема 12.



Структура всех индолов была подтверждена методом ЯМР спектроскопии. Образование индольной системы сопряженной с циклом А в положении С2-С3 соединений **42** и **44** подтверждается НМВС кросс-пиками метиленовых протонов при С-1 с четвертичными углеродами индольного кольца при δ_{C} 106,98, δ_{C} 140,95, δ_{C} 128,36 для соединения **42** и при δ_{C} 108,43, δ_{C} 136,12, δ_{C} 128,57 для соединения **44**. Кроме того, наблюдаются НМВС кросс-пики гем-диметильных групп С-23 и С-24 соединения **42** (δ_{H} 1,30 и 1,20) с положением С-3. В спектрах NOESY соединения **42** наблюдается кросс-пик ароматического протона Н-2' (δ_{H} 7.43) с экваториальными протонами в положении С-1 (δ_{H} 2.87). Также наблюдается NOE-взаимодействие NH-протона соединения **42** (δ_{H} 7.78 ppm) и **44** (δ_{H} 7.78) с протонами гемдиметильных групп С-23 и С-24 (Н-4 и С-24 в случае индола **44**). β -конфигурация Н-4 (соединение **44**) следует из значений констант спин-спиновой взаимодействия протонов при С-4 и С-5. Кроме того, NOE-взаимодействие Н-4 с протонами метильной группы при С-25 также указывает на β -конфигурацию Н-4.

Образование индольной системы сопряженной с циклом А в положении С3-С4 (соединение **43**) подтверждается наличием двух метиленовых групп (δ_{C} 26,42 и 44,47), двух четвертичных углеродов, участвующих в сопряжении (δ_{C} 58,06 и 192,23), двух метильных групп (δ_{C} 16,23 и 16,54), метинового углерода (δ_{C} 56,24) и четвертичного углерода (δ_{C} 38,38). Наблюдаются НМВС перекрестные пики протонов Н-5 и Н-23 с сигналами при С-3 (δ_{C} 192.23) и С-4 (δ_{C} 58.06), а также НМВС взаимодействия метиленовых протонов при С-1 и С-2 с δ_{C} 192.23 и ароматического протона Н-5' (δ_{H} 7.40) с С-4. В спектре NOESY ароматический протон Н-5' (δ_{H} 7,40) взаимодействует с Н-5 (δ_{H} 0,76) и метиленовыми протонами при С-7 (δ_{H} 1,93), что указывает на их пространственную сближенность. Перекрестный пик NOESY между Н-23 и Н-25 (δ_{H} 1,27/1,21) указывает на β -ориентацию метильной группы С-23.

О различии в реакционной способности нативного аллобетулина и 24-нор-аллобетулина сообщалось нами ранее, а инверсия конфигурации при С4 у 24-нор- и 23-нор-аллобетулинов была продемонстрирована в ходе катализируемого основаниями автоокисления 2Е-фурфурилен-3-оксо-24-нор-аллобетулина.

Кроме того, структуры 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** и 3Н-индола **43** были подтверждены рентгеноструктурным анализом (Рис. 6, 7). Все неароматические шестичленные циклы соединений **27** и **43** находятся в конформации кресла. Интересно отметить, что в аллобетулоне (близком аналоге соединения **27**) цикл А (С1 - С10) находится в конформации искаженной лодочки. В упаковке молекул кристалла **27** можно выделить цепи вдоль оси с, образованные взаимодействиями С2-Н2А...О2 (Н...О 2.56, С - О 3.235(4))

Å). В кристалле **43** также можно выделить цепи вдоль оси *b*, образованные за счет C33-N33...O1 взаимодействий (H...O 2.60, C - O 3.510(4) Å).

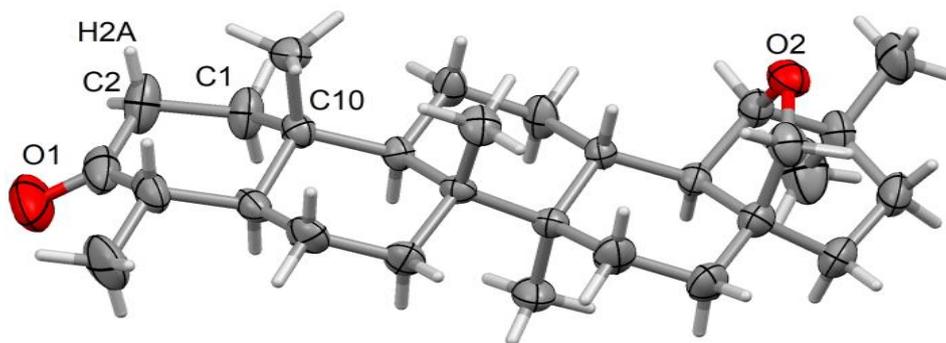


Рисунок 6. Молекулярная структура 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27**

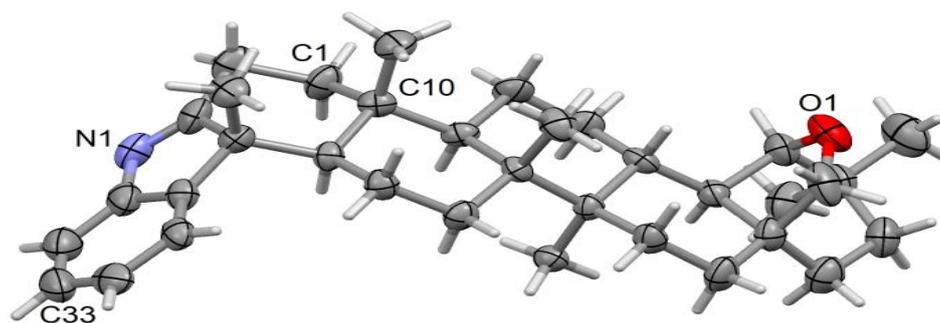


Рисунок 7. Молекулярная структура 3H-индол-23-нор-аллобетулина **43**

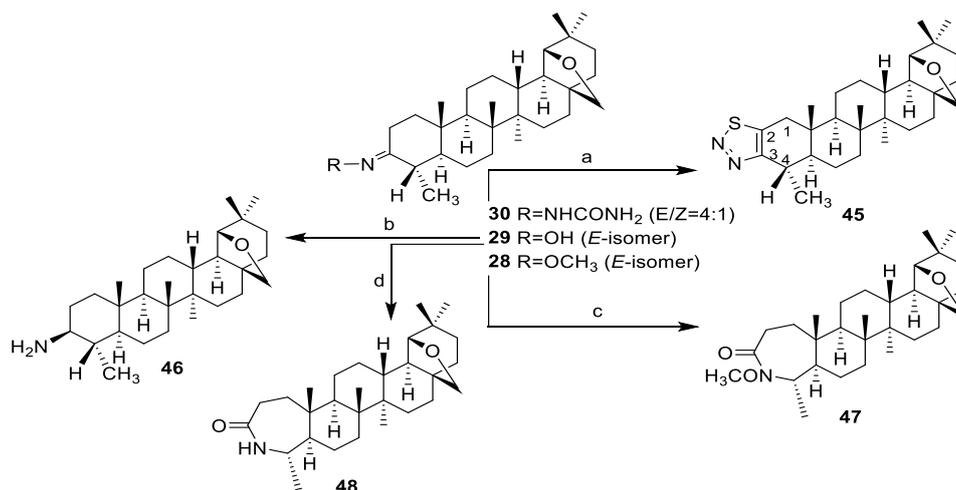
2.2. Реакции, протекающие без влияния протона Н-4 на примере 3-оксо-24-нор-аллобетулина

2.2.1. Синтез имино-производных 24-нор-аллобетулина

Синтез новых имино-производных 3-оксо-24-нор-аллобетулина **27** представлен на схеме 13. Соединения **28**, **29** и **30** были получены в предыдущем разделе из соединения **27**. Реакция Харда-Моури соединения **30** с тионилхлоридом в хлористом метиле позволила получить 1,2,3-тиадиазол **45** (73%) (Схема 13). В результате восстановления *E*-оксима **29** алюмогидридом лития при кипячении в диоксане получили 3β-амин **46** (56%), а окисление озоном *E*-метокси-оксима **28** в хлористом метиле при 0 °С привело к метокси-лактаму **47** (72%) (Схема 13). Перегруппировка Бекмана оксима **29** привела к лактаму **48** с выходом 78%.

β-Конфигурация NH₂-группы в соединении **46** была установлена на основании константы спин-спинового взаимодействия (*J*=4.3 Гц) протонов при С-2 и С-3 в спектре ЯМР ¹H, что соответствует данным об установлении конфигурации 3β -амино-аллобетулина. Структура соединения **47** установлена на основании спектра ЯМР ¹³C, где химический сдвиг при 171.82 м.д. соответствует кето группе при С-3, а 62.67 м.д. соответствует метокси-группе С-1'. Структура соединения **45** подтверждена на основании характеристичных сигналов в спектре ЯМР ¹³C при 146.99 м.д. (С-2) и 162.01 м.д. (С-3). Структура соединения **48** установлена на основании спектра ЯМР ¹³C и ¹⁵N, где химический сдвиг при 177.99 м.д. соответствует кето группе при С-3, а 142.40 м.д. соответствует NH-группе.

Схема 13.

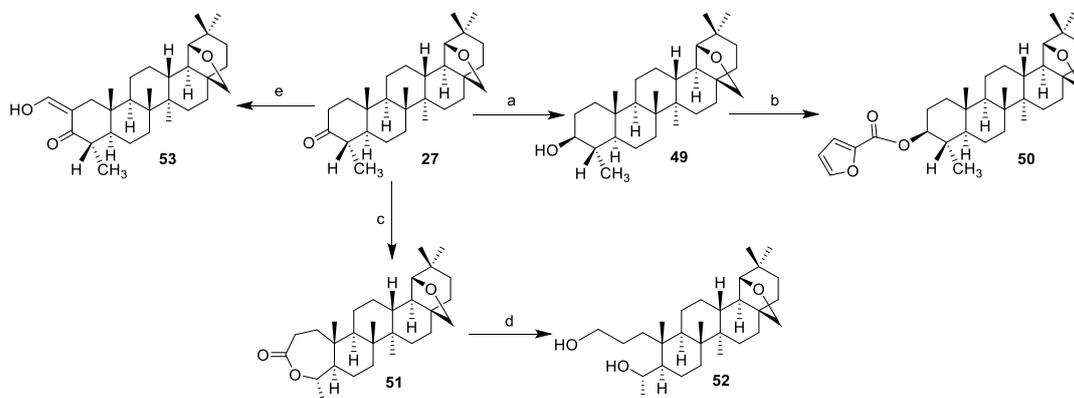


Реагенты и условия: а. SOCl_2 , CH_2Cl_2 , 23°C , 24 ч.; б. NaBH_4 , MeOH , кипячение, 8 ч; с. O_3 , CH_2Cl_2 , -40°C ; д. SOCl_2 , 1,4 - диоксан, к.т., 24 ч.

2.2.2. Синтез 3-гидрокси-, 3 - фурилл- производных, лактона, 3,4-секо-диола 24-нор-аллобетулина

В качестве исходного соединения для синтеза новых производных 24-нор-аллобетулина использовали 3-оксо-24-нор – аллобетулин **27**. β -гидрокси-производное **49** получали восстановлением соединения **27** NaBH_4 в метаноле. Дальнейшее ацилирование соединения **49** фурилл хлоридом в пиридине при кипячении приводило к образованию эфира **59** (86%). Окислением по Байеру-Виллигеру соединения **27** *m*-CPBA синтезировали лактон **51**, обработка которого LiAlH_4 позволило получить 3,4-секо-диол **52**. Кетоальдегид **53** получали добавлением к суспензии метилата натрия в бензоле раствора соединения **27** в бензоле при перемешивании (Схема 14).

Схема 14.



Реагенты и условия: а. NaBH_4 , MeOH , 22°C , 16 ч.; б. фурилл хлорид, пиридин, кипячение, 6 ч.; с. *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , к.т., 24 ч.; д. NaBH_4 , MeOH , кипячение, 6 ч.; е. NaOMe , HCOOC_2H_5 , бензол, к.т., 24 ч.

β -конфигурация гидроксильной группы соединения **49** была подтверждена взаимодействием протонов при C-2 (δ_{H} 1.58) и C-3 (δ_{H} 3.18) с $J = 11.4$ Гц, что указывает на их транс-расположение. Структура соединения **50** установлена на основании спектра ЯМР ^{13}C , где химический сдвиг при 158.69 м.д. соответствует кето группе при C-1', а химические сдвиги при 146.05 м.д., 117.48 м.д., 111.73 м.д. и 145.19 м.д. соответствуют сигналам ароматического кольца. Структура соединения **51** подтверждена на основании характеристичных сигналов в спектре ЯМР ^{13}C при 175.84 м.д. (C-3) и 74.87 м.д. (C-4).

Наличие гидроксильных групп в положении С-3 и С-4 3,4-секо-диола **52** подтверждается химическим сдвигом при 67.38 м.д. и 63.10 м.д. в спектре ЯМР ¹³С. Наличие формильной группы в положении С-1' соединения **53** подтверждается химическим сдвигом при 187.71 м.д. в спектре ЯМР ¹³С.

3. Синтез 2-оксо-тритерпеноидов

Большинство модификаций природных тритерпенов может быть осуществлено с помощью функциональных групп в положениях С-3, С-28, С-30 или в кольцах А, С и Е. Значительная часть превращений проведена с использованием 3-гидрокси- или 3-оксогруппы. Ее функциональность определяется двумя метиленовыми протонами в положении С-2, но в то же время положение С-4, замещенное двумя диметильными группами, является инертным. Введение различных заместителей повышает их водорастворимость и биологическую активность, например, для известной молекулы CDDO (2-циано-3,12-диоксоолеан-1,9-диен-28-ой кислоты) продемонстрирована противовоспалительная, антидиабетическая и цитотоксическая активность.

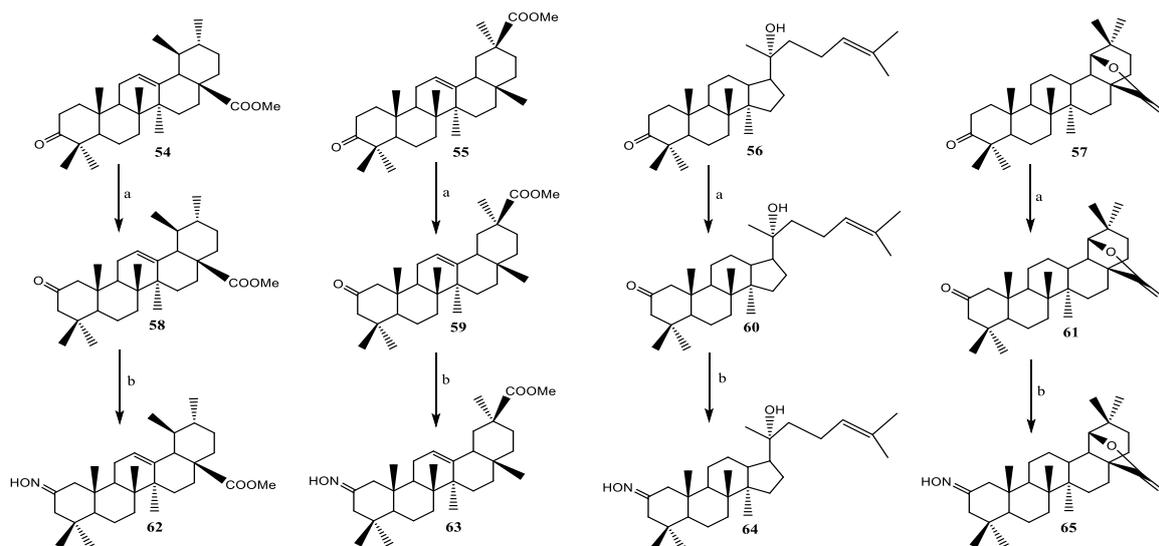
Синтез и модификация 2-оксо-тритерпеноидов - относительно новый подход, примером которого является аллобетулин. В настоящее время простым одноступенчатым способом синтеза 3-оксо-тритерпеноидов является реакция Виллгеродта-Киндлера. В качестве примера можно привести 2-оксо-аллобетулин, 2-оксо-бетулиновую и 2-оксо-олеаноловую кислоты в виде метиловых эфиров. Более сложный путь получения 2-оксо-тритерпеноидов включает несколько этапов через окисление, восстановление и изомеризацию бетулина под действием р-TsCl до 2-оксо-производного.

Как видно, структура 2-оксо-тритерпеноидов отличается от 3-оксо-тритерпеноидов наличием двух реакционных центров при С-1 и С-3, находящихся в α-положении к карбонильной группе, где возможна последующая функционализация.

Недавно мы показали, что наличие даже одного протона в α-положении к 3-оксо-группе 24-нор-аллобетулина влияет на его реакционную способность. Во-первых, 24-нор-аллобетулины являются более эффективными ингибиторами α-глюкозидазы, чем нативный. Во-вторых, в ходе конденсации Кляйзена-Шмидта 3-оксо-24-нор-аллобетулина происходит автоокисление в положении С-4 с инверсией конфигурации при С-4. Более того, недавние исследования превращений фриеделина (близкого природного аналога 24-нор-аллобетулина) предложили более простые и удобные методы синтеза высокоселективных производных фриеделана с А-кольцом, используя доступные вещества в качестве исходных.

Реакционная способность 2-оксо-тритерпеноидов практически не изучена, за исключением производных 2-оксоаллобетулина. Во всех случаях реакции (синтез Фишера-индола, перегруппировка Кляйзена, бромирование енола, окисление Байера-Виллигера) с 2-оксоаллобетулином протекали только в положении С-3, за исключением перегруппировки Бекмана в положении С-1, 1,2,3-тиа- и селено-диазольные производные 2-оксоаллобетулина также протекали в положении С-3.

В качестве исходных соединений использовали метил 3-оксо-урсолат **54**, метил 3-оксо-11-деоксо-глицирретат **55**, диптерокарпол **56** и 3,28-диоксо-аллобетулин **57**. 2-оксопроизводные **58-61** были получены по реакции Виллгеродте-Киндлера кипячением 3-оксо-тритерпеноидов **54-57** с серой в морфолине с выходами 42%, 41%, 38% и 31%, соответственно (Схема 15). В ходе исследования мы заметили, что выход 2-оксо-производных зависит от типа тритерпенового скелета, что может быть объяснено стерическими факторами.



Реагенты и условия: а. S, морфолин, кипячение; б. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc , EtOH , кипячение.

Структуры всех соединений была подтверждены методом ЯМР-спектроскопии. В А кольце спектра ЯМР ^{13}C соединений **54-57** наблюдается 6 сигналов углерода: 2 метиленовых и 1 метиленовый сигнал в области 56 м.д. и 3 три четвертичных сигнала в областях 39, 43 и 212 м.д. Положения атомов углерода С-1 и С-3 были определены благодаря наличию НМВС-взаимодействий протонов метильных групп С-23, С-24 с атомом С-3 и протонов метильной группы С-25 с С-1. НМВС кросс- пики протонов метиленовых групп С-1 и С-3 с карбонильным атомом углерода указывают на то, что этот атом углерода находится в положении С-2.

Взаимодействием 2-оксо-тритерпеноидов **58-61** с гидроксиламином гидрохлоридом синтезированы оксимы **62-65** с количественными выходами. Соединения **62-65** были выделены в виде эквимольных смесей син- и антиизомеров, но не были разделены колоночной хроматографией.

В спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H соединения **63** наблюдаются двойные сигналы кольцевых атомов А, В, С и присоединенных к ним метильных групп, что указывает на наличие двух изомеров. Различие химических сдвигов протонов метильных групп С-23, С-24 и С-25, а также их НМВС-взаимодействий с ближайшими атомами углерода (С-3, С-4, С-5 и С-1, С-9, С-10, соответственно) позволяет достоверно отнести сигналы в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H атомов кольца А к каждому из изомеров. Эта информация, а также данные HSQC-, НМВС-, COSY- и NOESY-корреляций позволяют провести полное отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H для каждого изомера. Е-изомер отличается химическими сдвигами атомов углерода С-1 (δ_{C} 46,15 м.д.) и С-3 (δ_{C} 39,54 м.д.), в то время как для Z-изомера наблюдается противоположная картина: С-1 (δ_{C} 38,85 м.д.) и С-3 (δ_{C} 46,85 м.д.).

Средние выходы 2-оксо-тритерпеноидов можно объяснить образованием побочных продуктов - 2-морфолино-1(2)-ен-3-оксо-производных с выходами 30-35%. Как сообщалось в литературе ранее, фракционная дистилляция позволяет предотвратить образование морфолино-производного, удаляя морфолин из реакционной массы.

4. Биологическая активность синтезированных тритерпеноидов

4.1. Ингибирующая активность α -глюкозидазы

Влияние производных аллобетулина на ферменты изучено недостаточно хорошо. Секо-кислота и дикислота аллобетулона проявили низкую цитотоксичность (мышиние

эмбриональные фибробласты NIH 3T3) и оказались хорошими ингибиторами ацетилхолинэстеразы смешанного типа. Азепанобетулин показал ингибитор смешанного типа для бутирилхолинэстеразы с селективностью 2,7, который был в 4,5 раза активнее стандартного гидробромида галантамина. 2,3-индолоаллобетулин ингибировал α -глюкозидазу с IC_{50} 70,6 мкМ (по сравнению с акарбозой 397,6 мкМ). 3-Оксо-21 β -ацетил-20 β ,28-эпокси-18 α ,19 β -урсаны, полученные перегруппировкой аллобетулона, и его бис-фурфурилиденовое производное оказались хорошими ингибиторами α -глюкозидазы с IC_{50} 28,0 и 4,0 мкМ (по сравнению с акарбозой 178,25 мкМ).

Исследование ингибирующей активности α -глюкозидазы показало, что 24-нор-аллобетулины (значения IC_{50} от 0,49 до 178,0 мкМ) более активны, чем нативные производные аллобетулина (значения IC_{50} от 30,78 до >256 мкМ). Соединение-лидер 3-оксо-24-нор-аллобетулин **27** оказалось наиболее активным (IC_{50} 0,49 мкМ), более чем в 60 раз активнее акарбозы (IC_{50} 181 мкМ). Например, 24-нор-аллобетулин **49** и 24-нор-лактам **48** были в 4,4 и 2,7 раза активнее, чем родственные производные аллобетулина. В ряду 24-нор-аллобетулинов оксим **29** проявил активность, сходную с активностью акарбозы, а С2-бромбензилиден **38** (IC_{50} 39,69 мкМ) был аналогичен родственному производному (IC_{50} 30,78 мкМ). Аллобетулин, 3-оксо-аллобетулин **31**, оксим и метоксиоксим аллобетулина были неактивны.

Видно, что удаление метильной группы С-24 значительно увеличивало антидиабетический эффект до 500 раз (в случае 3-оксо-аллобетулинов **31** и **27**). Учитывая эти данные, можно сделать вывод, что 24-нор-аллобетулины являются новыми и перспективными ингибиторами α -глюкозидазы на основе тритерпеноидов.

4.2. Противоопухолевая активность

Соединения **22**, **23** и **26** были протестированы в рамках программы National Cancer Institute (NCI) Developmental Therapeutics Program (www.dtp.nci.nih.gov) на противораковую активность *in vitro*. Противоопухолевые исследования проводились в соответствии с протоколом NCI США, который был описан в других источниках. Соединение **23** способствовало полной гибели раковых клеток во всех клеточных линиях меланомы и рака толстой кишки и проявляло высокую цитотоксическую активность против всех клеточных линий лейкемии, немелкоклеточного рака легких, рака яичников, рака простаты и рака молочной железы, подавляя их рост от 74 до 99 %. Соединение **26** вызывало полную гибель раковых клеток во всех клеточных линиях меланомы и демонстрировало высокую противоопухолевую активность против всех клеточных линий лейкемии, рака толстой кишки, простаты и рака молочной железы, подавляя их рост от 78 до 99 %. Соединение **22** не проявило цитотоксической активности.

Выводы

1. Синтезирован ряд 24-нор-тритерпеноидов, из которых морфолинамид 3,12-диоксо-24-нор-олеаноловая кислота и метил 3-оксо-24-нор-урсолат являются новыми.
2. Наблюдали образование смесей *Z/E* изомеров иминопроизводных 24-нор-аллобетулина, в то время как иминопроизводные 3-оксо-аллобетулина образуют только *E*-изомер.
3. Изучена реакция альдольной конденсации 3-оксо-24-нор-аллобетулина. Установлено, что проведение реакции в инертных условиях приводит к образованию 2-*E*-арилиден-3-оксо-производных, а в обычных условиях происходит автоокисление до 4 α -гидрокси-группы с обращением конфигурации метильной группы при С4. Далее наблюдается восстановление 3-оксо-группы до 3 β ,4 α -диола по реакции Меервейна-Пондорфа-Верлея.
4. В отличие от реакции Фишера нативного аллобетулина с фенилгидразином с образованием 3,2-индола, продуктом индолизации 3-оксо-24-нор-аллобетулина стал 3Н-индол (индоленин), структура которого подтверждена методом РСА. Реакция сопровождается изменением

конфигурации метильной группы при С4. С другой стороны, 3,2-индол 24-нор-аллобетулина был также синтезирован, но с использованием сильного кислотного катализатора (гидрохлорида фенилгидразина в AcOH или фенилгидразина в MeOH с добавлением нескольких капель HCl).

5. Проведена модификация цикла А 3-оксо-24-нор-аллобетулина с получением: 3 β -амина, 3-фууроил-производного, 1,2,3-тиадиазола, семичленного лактона, метокси-лактама.

6. Исследование ингибирующей активности в отношении α -глюкозидазы показало, что 24-нор-производные более активны, чем нативные аллобетулины.

7. С использованием реакции Вильгеродте-Киндлера синтезированы новые 2-оксо-тритерпеноиды. Оксимы 2-оксо-тритерпеноидов и 3-оксо-24-нор-аллобетулина образуются в виде смесей *Z/E* изомеров в отличие от оксимов 3-оксо-тритерпеноидов, которые образуют только *E*-изомеры.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. **Закирова Л.М.**, Третьякова Е.В., Байкова И.П., Казакова О.Б. Синтез 24-нор-производных олеаноловой кислоты // Журнал органической химии, 2021, том 57, №9, с. 1252-1259. DOI: 10.31857/S0514749221090032
2. **Zakirova L.M.**, Baikova I.P., Smirnova I.E., Tretyakova E.V., Lobov A.N., Nguyen H.T.T., Kazakova O.B. 24-Nor-allobetulin possess strong α -glucosidase inhibitory activity // Natural Product Research, 2022, Vol. 37, No. 22, pp. 3806-3814. DOI: 10.1080/14786419.2022.2154347
3. **Zakirova L.**, Baikova I., Lobov A., Kukovinets O., Kazakova O. An unexpected conversion of 2*E*-furfurylidene-3-oxo-24-nor-allobetulin to 23-nor-allobetulin // Steroids, 2024, Vol. 203, pp. 109379. DOI: 10.1016/j.steroids.2024.109379
4. **Zakirova L.**, Baikova I., Lobov A., Gatilov Y., Polovyanenko D., Kazakova O. A regiospecific fischer indole reaction with 3-oxo-24-nor-allobetulin // Journal of heterocyclic chemistry, 2024. DOI: 10.1002/jhet.4877
5. **Zakirova L.**, Baikova I., Lobov A., Kazakova O. Ursolic acid-based 24-nor- and A-seco-24-oxo-triterpenoids // Natural Product Research, 2024. DOI: 10.1080/14786419.2024.2394093
6. **Закирова Л.М.**, Байкова И.П. Синтез и структура метил 2-оксо-11-дезоксо-глицирретата // Материалы II Всероссийской молодежной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Уфимского Института химии УФИЦ РАН / г. Уфа, 25–28 мая 2021 г. / стр. 20-22.
7. **Закирова Л.М.**, Байкова И.П. Синтез новых гетероциклических производных 24-нор-аллобетулина // Материалы XII Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» / г. Киров, 29 ноября-02 декабря 2022 г. / стр. 64.
8. **Закирова Л.М.** Синтез метил 3-оксо-24-нор-урсолата // Материалы III Всероссийской молодежной научно-практической конференции «Современные достижения химии в работах молодых ученых» / г. Уфа, 30 мая-2 июня 2023 г. / стр.37.
9. **Zakirova L.M.**, Baikova I.P. An approach to the oxo-, epoxy- and hydroxy-derivatives of 2*E*-benzylidene-24-nor-allobetulin // International Scientific and Technical Conference «Actual problems of the chemistry of Natural Compounds» / Tashkent, March 15-16, 2023 / p.53.
10. **Закирова Л.М.** Синтез и биологическая активность новых арилиденовых производных 24-нор-аллобетулина // Сборник тезисов 6-ой Российской конференции по медицинской химии «МедХим – Россия 2024» / г. Нижний Новгород, 1-4 июля 2024 г. / стр. 226.