

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В. Н. Каразіна

Кафедра органічної хімії

УДК 541.35

Д о з а х и с т у д о п у с к а ю



Завідувач кафедри

«__» ____ 2023 р. д.х.н., проф. А. О. Дорошенко

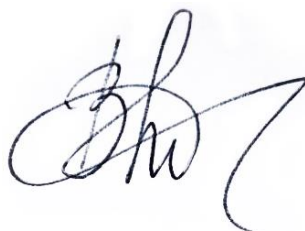
**СИНТЕЗ СПОЛУК-ГІБРИДІВ БЕТУЛОНОВОЇ КИСЛОТИ ЗІ 3-
СПРОПРОЛІДИН-2-ОКСІНДОЛЬНИМИ ФРАГМЕНТАМИ У
СТРУКТУРІ**



Кваліфікаційна робота магістра
II курсу хімічного факультету
**ГОРБАЧОВОЇ НАДІЇ
МИХАЙЛІВНИ**

Науковий керівник

д.х.н., професор



В.В. Ліпсон

ХАРКІВ 2023

РЕФЕРАТ

Магістерська робота викладена на 57 сторінках, містить 41 літературних джерел, 16 рисунків, 5 таблиць та 29 схем.

Метою роботи є синтез нових похідних бетулонової кислоти зі 3-спіропіролідін-2-оксіндольними фрагментами у структурі для подальшого скринінгу антибактеріальних та фунгіцидних властивостей.

Дана робота містить відомості про сполуки-гібриди природних пентациклічних тритерпеноїдів лупанового ряду - бетулонової та бетулінової кислот, їх фармакологічні властивості, способи синтезу кон'югатів шляхом об'єднання окремих молекул в єдину систему за допомогою клік-реакції, дані щодо хімічних властивостей окремих представників 3-спіропіролідін-2-оксіндолів, а також антибактеріальну активність цільових сполук.

Проведене дослідження розширює уявлення щодо можливостей використання природних потенційно біологічно активних речовин у синтезі сполук фармацевтичного призначення.

Ключові слова: СПРООКСІНДОЛИ, БЕТУЛІН, БЕТУЛОНОВА КИСЛОТА, СПОЛУКИ-ГІБРИДИ, КОН'ЮГАТИ.

ABSTRACT

The master's thesis is laid out on 57 pages, contains 41 literary sources, 16 figures, 5 tables and 29 diagrams.

The aim of the work is the synthesis of new derivatives of betulonic acid with 3-spiropyrrolidine-2-oxindole fragments in the structure for further screening of antibacterial and fungicidal properties.

This work contains information on hybrid compounds of natural pentacyclic triterpenoids of the lupan series - betulonic and betulinic acids, their pharmacological properties, methods of synthesizing conjugates by combining individual molecules into a single system using a click reaction, data on the chemical properties of individual representatives 3 -spiropyrrolidine-2-oxindoles, as well as the antibacterial activity of the target compounds.

The conducted research expands the understanding of the possibilities of using natural potentially biologically active substances in the synthesis of pharmaceutical compounds.

Key words: SPIROOXINDOLE, BETULIN, BETULONIC ACID, HYBRID COMPOUNDS, CONJUGATES.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ.....	5
ВСТУП.....	6
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	8
1.1 Сполуки-гібриди на основі природних тритерпеноїдів лупанового ряду і їх біологічна активність.....	8
1.1.1 Синтез сполук-гібридів у положенні C ²	11
1.1.2 Синтез сполук-гібридів у положенні C ³	14
1.1.3 Синтез сполук-гібридів у положенні C ²⁸	20
1.1.4 Синтез сполук-гібридів у положенні C ³⁰	27
1.2 Висновки.....	28
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	29
2.1.1 Виділення бетуліну (1) із кори берези.....	29
2.1.2 Синтез бетулонової кислоти (2).....	29
2.1.3 Синтез пропаргілбетулонату (3).....	31
2.1.4 Синтез спірооксіндолів (7a-d).....	32
2.1.5 Синтез ацетилхлоридів спірооксіндолів (9a-d)	35
2.1.6 Синтез азидів спірооксіндолів (10a-d)	38
2.1.7 Синтез сполук-гібридів бетулонової кислоти (11a-d)	40
2.2 Випробування антибактеріальної активності синтезованих сполук.....	43
3.ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	46
ВИСНОВКИ.....	52
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	53

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

Скорочення	Повна назва
AFC	4'-азидо-2'-дезоксид-2'-фтор- β -D-арабіноцитидин
AFU	4'-азидо-2'-дезоксид-2'-фтор- β -D-арабінуридін
AZT	азидотимідин
DCC	N,N'-дициклогексилкарбодіміду
DCM	дихлорметан
DIPEA	N,N'-діізопропілетиламін
DMAP	4-диметиламінопіридин
DME	диметиловий ефір
DMF	диметилформамід
DMSO	диметилсульфоксид
EDC-Cl	N-(3-(диметиламіно)пропіл)-N'-етилкарбодіміду гідрохлорид
Et ₂ O	диетиловий ефір
Et ₃ B	триетилборан
Et ₃ N	триетиламін
EtOH	етиловий спирт
GalNAc	N-ацетил-D-галактозамін
GluNAc	N-ацетил-D-глюкозамін
MeOH	метанол
NBS	N-бромсукцинімід
r.t.	кімнатна температура
TBTA	трис(бензилтриазолілметил)амін
TBTU	O-(бензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуронію тетрафторборат
t-BuOH	трет-бутиловий спирт
t-BuOK	калій трет-бутоксид
д	дублет
м	мультиплет
мх	мікрохвилі
с	синглет
ТШХ	тонкошарова хроматографія

ВСТУП

Фармакологічне застосування пентациклічних тритерпенів зростає протягом 21-го століття, завдяки використанню багатоцільових властивостей цих рослинних метаболітів. Тритерпеноїди лупанового ряду є об'єктами активного вивчення з-за наявності серед їх похідних протипухлинного ефекту у поєднанні з низькою токсичністю, а також антибактеріальними, протизапальними, ранозагоювальними, протівірусними та гепатопротекторними властивостями. Утім більшість природних сполук за рівнем активності поступаються синтетичним активним фармацевтичним інгредієнтам відповідного профілю. Тому їх використовують для створення сполук-гібридів або кон'югатів, які є ковалентним поєднанням в одній структурі молекулярних об'єктів природного і синтетичного походження і модулюють або доповнюють фармакологічні властивості один одного внаслідок чого виявляють нові якості. При цьому вихідні сполуки повинні впливати, що найменше на дві різні, але патогенетично зв'язані між собою ланки захворювання, а кон'югат має бути сконструйованим таким чином, щоб реалізувати в організмі свої специфічні ефекти за обома напрямками [1].

Об'єднання різних фрагментів в одній молекулі може здійснюватися як шляхом формування конденсованої системи, так і сполученням за допомогою лінкера. У випадку використання розвинених молекулярних платформ, зокрема тритерпеноїдних, переважно використовують різноманітні лінкери. Це дозволяє одержати більш конформаційно гнучкі структури.

Метою цієї роботи є синтез нових похідних бетулонової кислоти зі 3-спіропіролідін-2-оксіндольними фрагментами у структурі для подальшого скринінгу антибактеріальних та фунгіцидних властивостей.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. екстракція бетуліну із природньої сировини;
2. перетворення бетуліну на бетулонову кислоту;
3. синтез пропаргілбетулонату;
4. синтез спірооксиндолів;

5. синтез ацетилхлоридів;
6. синтез азидопохідних спірооксіндолів;
7. синтез цільовльових сполук.

Об'єкти дослідження: реакції циклоприєднання нестабілізованих азометинілідів до N-заміщених малеїнімідів, ацетилювання, азидування, азид-алкінового циклоприєднання азидів на основі спірооксіндолів до пропаргілового естеру бетулонової кислоти.

Предмет дослідження: бетулонова кислота та її пропаргіловий естер, 3-спіропіролідін-2-оксіндоли та їх похідні, кон'югати бетулонової кислоти зі спірооксіндольним фрагментами у структурі.

Методи дослідження: органічний синтез, тонкошарова хроматографія (ТШХ), колонкова хроматографія, набір фізико-хімічних і спектральних методів доведення будови органічних сполук - ЯМР ^1H спектроскопія, мас-спектрометрія.

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Сполуки-гібриди на основі природних тритерпеноїдів лупанового ряду і їх біологічна активність

Біологічно активні природні речовини з масиву вторинних метаболітів рослин характеризуються унікальним структурним різноманіттям, складністю просторової будови, значною кількістю стереогенних центрів і часто виступають стартовими об'єктами у дизайні нових лікарських засобів [1]. Втім для створення інноваційних препаратів виникає потреба в модифікації природних молекул, оскільки вони не виявляють необхідного рівня специфічного фармакологічного ефекту, характеризуються низькою біодоступністю або не задовольняють критеріям нешкідливості. Прикладом затребуваних базових структур природного походження у пошуку ліків є пентациклічні тритерпеноїди лупанового ряду (рис. 1.1), зокрема, бетулінова **2** та бетулонова **6** кислоти. Свою назву ця група сполук одержала завдяки великому вмісту у корі берез *Betula verrucosa*, *Betula pubescens*, *Betula alba* (10-40 % від сухої маси) [2].

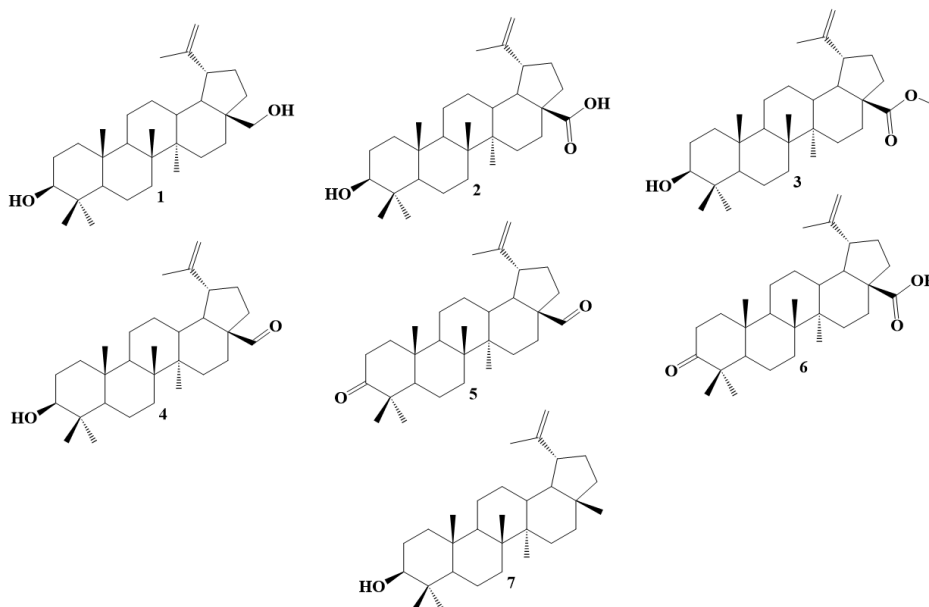


Рисунок 1.1 Тритерпеноїди лупанового ряду (**1** бетулін, **2** бетулінова кислота, **3** метилбетулінат, **4** бетуліновий альдегід, **5** бетулоновий альдегід, **6** бетулонова кислота, **7** лупеол).

Ці сполуки, завдяки доступності й відновлюваності природних джерел, енантімерній чистоті, наявності у молекулах декількох реакційних центрів та низькій токсичності є привабливими об'єктами для подальшої хімічної модифікації. Вони знаходять своє використання у дизайні протипухлинних, протизапальних, антипаразитарних ліків та засобів корекції вікових нейродегенеративних розладів [3, 4]. Більшість з таких новоутворених систем на базі лупанової молекулярної платформи – це кон'югати, сполуки-гібриди або так звані хімери – тобто є ковалентним поєднанням в одній структурі молекулярних об'єктів природного і синтетичного походження, які модулюють або доповнюють фармакологічні властивості один одного внаслідок чого виявляють нові якості. При цьому вихідні сполуки повинні впливати, що найменше на дві різні, але патогенетично зв'язані між собою ланки захворювання, а кон'югат має бути сконструйованим таким чином, щоб реалізувати в організмі свої специфічні ефекти за обома напрямками [5,6].

На сьогодні існує два основні підходи у конструюванні гібридів. Один з них передбачає введення до складу відомої сполуки природного походження фрагмента також природної молекули, наприклад короткого пептиду, який забезпечить доставку до певної мішені, або структурного залишку з антиоксидантними властивостями, на кшталт альфа-токоферолу або дигідрозінгерону, здатного знизити токсичність та позитивно вплинути на певні патогенетичні ланки захворювання [7,8]. Інший підхід полягає у ковалентному поєднанні природної сполуки з синтетичною з метою посилення специфічних властивостей обох компонентів. В цьому випадку часто формують кон'югати з природних речовини з наявною але недостатньою для клінічного використання активністю і гетероциклічних сполук, яким також притаманні аналогічні, але більш виразні властивості.

Об'єднання різних фрагментів в одній молекулі може здійснюватися як шляхом формування конденсованої системи, так і сполученням за допомогою лінкера. У випадку використання розвинених молекулярних платформ, зокрема тритерпеноїдних, переважно використовують різноманітні лінкери. Це дозволяє одержати більш конформаційно гнучкі структури.

Серед відомих способів побудови гібридів переважає лінійна стратегія, яка полягає у поступовій модифікації природної молекули шляхом постадійних реакцій

[2]. При цьому суттєво зростає «ціна» невдачі на останніх етапах синтезу цільової сполуки. Тоді як серед беззаперечних переваг багатокомпонентних взаємодій можна відмітити їх високу ефективність (економія часу, матеріалів та ресурсів), варіабельність та доступність вихідних компонентів, що, в свою чергу, впливає на рівень складності та різноманітності цільових сполук [9]. Клік-процеси також є вкрай ефективними, вони охоплюють широкий загаль реакцій, є стереоспецифічними та толерантними до найрізноманітніших субстратів, відбуваються з високими виходами та низькою кількістю побічних продуктів [10].

Виходячи із завдань даної магістерської роботи нижче ми розглядаємо способи синтезу сполук-гібридів, які поєднують лінійний підхід з формуванням гетероциклічних фрагментів шляхом багатокомпонентних перетворень і сполученням одержаних у такий спосіб структур в єдину молекулу клік-реакцією. На рис.1.2 зображена загальна схема утворення кон'югатів, які містять терпен, з'єднаний за допомогою лінкера з іншою молекулою.

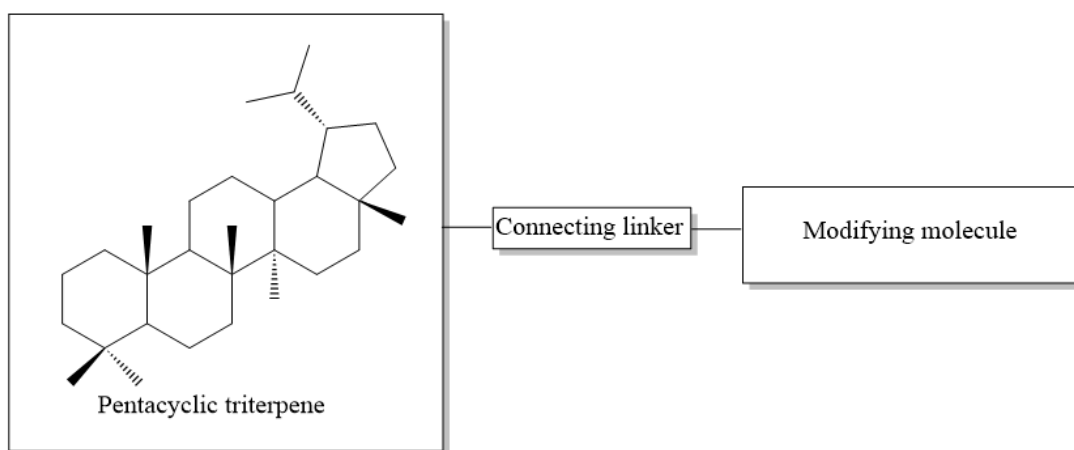


Рисунок 1.2 Графічне зображення тритерпенових кон'югатів.

Сполуки-гібриди бетуліну та його похідних можна отримати за різними положеннями пентациклічної системи. Наприклад, бетулонова кислота має 4 основні молекулярні реакційні центри, які знаходяться у положеннях C^2 , C^3 , C^{20} , C^{28} і є легкодоступними місцями для проведення хімічної модифікації (рис. 1.3) [11].

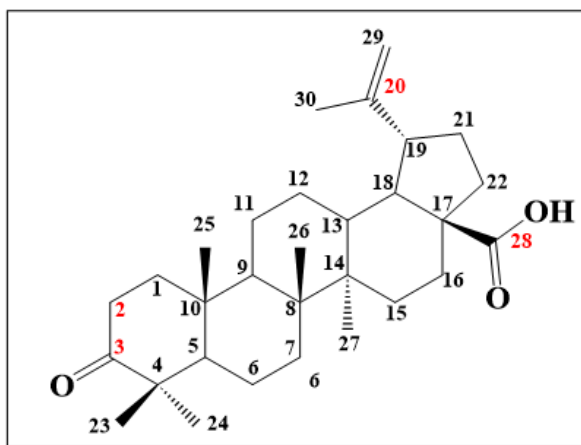
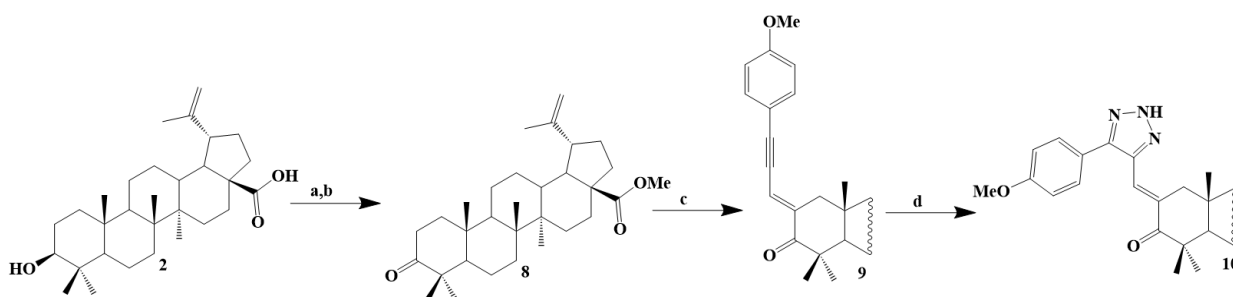


Рисунок 1.3 Основні молекулярні реакційні центри.

1.1.1 Синтез сполук-гібридів у положенні C²

Синтез С-2-заміщених похідних бетулінової кислоти **2** розпочинається із окислення гідроксильної групи та введення захисту до карбоксильної групи, з утворенням метоксибетулонату **8** (схема 1.1). Сполуку **8** можна використати для синтезу 1,2,3-триазолпохідної **10**, шляхом 1,3-диполярного циклоприєднання азиду натрію у два етапи. Перший етап включає реакцію альдольної конденсації сполуки **8** з 3-(4-метоксифеніл)пропіоальдегідом у присутності *t*-BuOK (калій трет-бутоксид). Цільовий ненасичений кетон **9** утворюється з виходом 93%. Другий етап - 1,3-циклоприєднання кетону **9** з азидом натрію під СВЧ-опроміненням, у результаті чого утворюється продукт **10** [12,13].

Схема 1.1

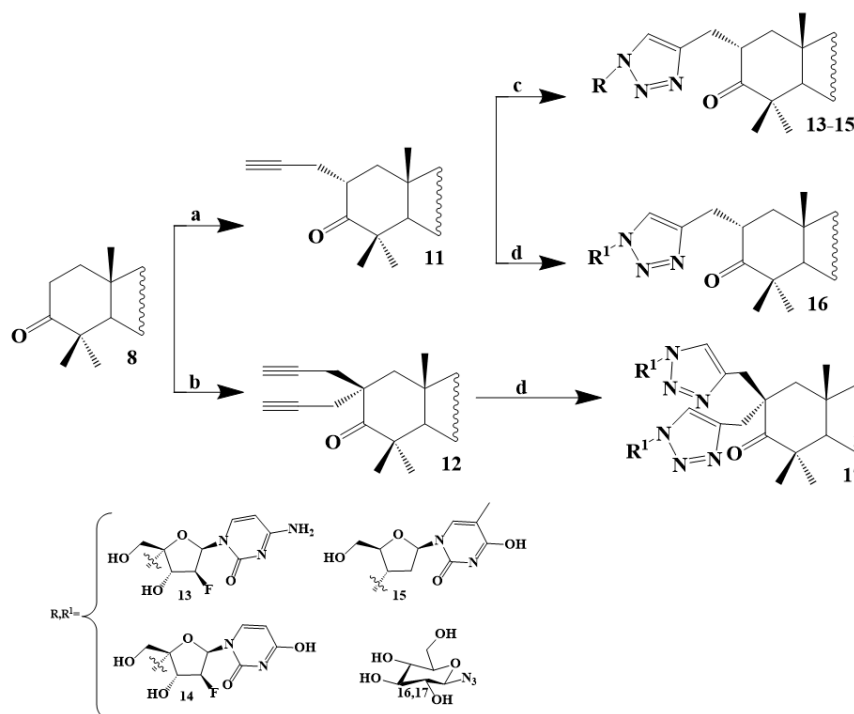


*a) CrO₃, H₂SO₄, ацетон, 0–20 °C; b) діазометан, Et₂O (діетиловий ефір), 0–20 °C; c) 3-(4-метоксифеніл)пропіоальдегід, *t*-BuOK, EtOH (етиловий спирт), r.t.*

(кімнатна температура), 2 год.; d) азид натрію, сухий DMF (діметилформамід), 160 °C, МХ (мікрохвилі), 30 хв.

Із метоксибетулонату **8** отримують пропаргілпохідні. Пропаргіловий фрагмент вводять або обробкою сполуки **8** пропаргілбромідом у DMF з утворенням кетону **11**, або обробкою пропаргілбромідом у присутності *t*-BuOK, що веде до похідної **12**. Пропаргілові кетони **11**, **12** у реакції кон'югації з азидоглюкопіранозою утворювали 1,2,3-триазолвмісні β-d-глюкопіранозиди **16**, **17** з виходами 76-91% (схема 1.2). Також сполуку **11** вводили у реакцію з AFC (4'-азидо-2'-дезоксид-2'-фтор-β-D-арабіноцитидин), AFU (4'-азидо-2'-дезоксид-2'-фтор-β-D-арабінуридін) та AZT (азидотимідин) в присутності CuI, DIPEA (N,N-диізопропілетиламін) та суміші розчинників H₂O/*t*-BuOH (трет-бутиловий спирт)/CH₃CN і одержували похідні **13**, **14** і **15** відповідно. Отримані сполуки є перспективними базовими структурами для синтезу нових біологічно активних терпеноїдів, з потенційними протипухлинними властивостями [12,14, 15].

Схема 1.2

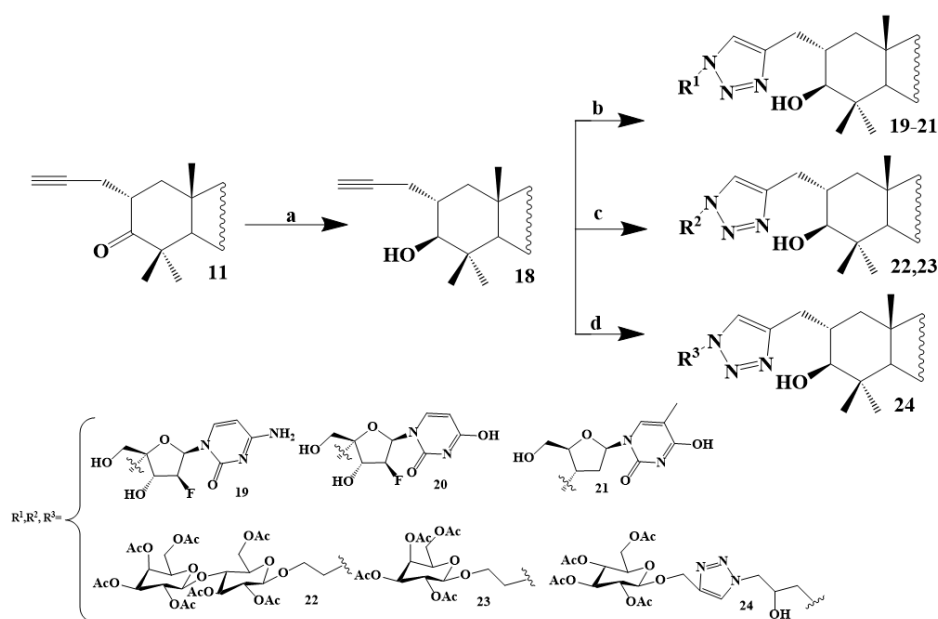


a) $KN(SiMe_3)_2$, Et_3B (триетилборан), пропаргіл бромід, DMF, *r.t.*, Ar; *b)* *t*-BuOK, пропаргіл бромід, DME (диметиловий ефір), *r.t.*, Ar, 1 год; *c)* AFC/AFU/AZT,

CuI, *DIPEA*, $H_2O/t\text{-BuOH}/CH_3CN$; d) азид глюкопіранозиду, *t*-BuOH, порошок *Cu*, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 40 °C.

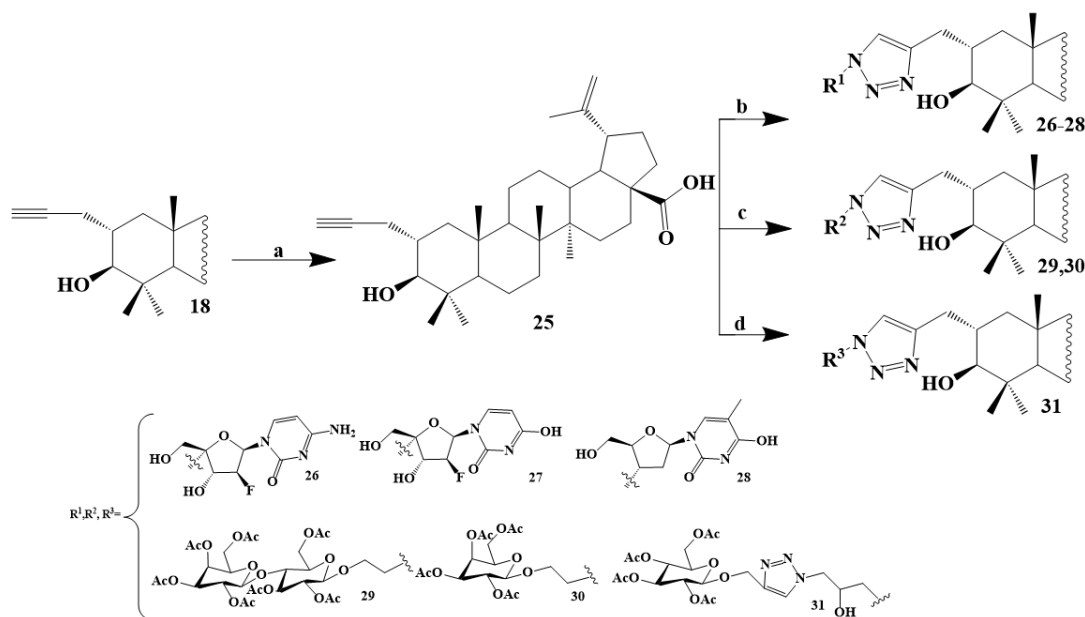
Кетогрупу сполуки **11** відновлювали $NaBH_4$ і $CsCl$ у суміші $MeOH$ (метанол)/THF в атмосфері аргону до вторинної OH-групи (схема 1.3) для подальшого введення у «клік»-реакцію отриманого проміжного продукту **18** з азидонукліазидами AFC, AFU та AZT [12, 15, 16].

Схема 1.3



a) $NaBH_4$, $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, $MeOH/THF$ (1:1), 20- 30 °C, Ar; b) AFC або AFU, або AZT, *CuI*, *DIPEA*, $H_2O/t\text{-BuOH}/CH_3CN$; c) азидоетилглікозиди перацетатів лактози або галактози, порошок *Cu*, *t*-BuOH, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 40 °C; d) RN_3 , *CuI*, *t*-BuOH, 70 °C, 23 год.

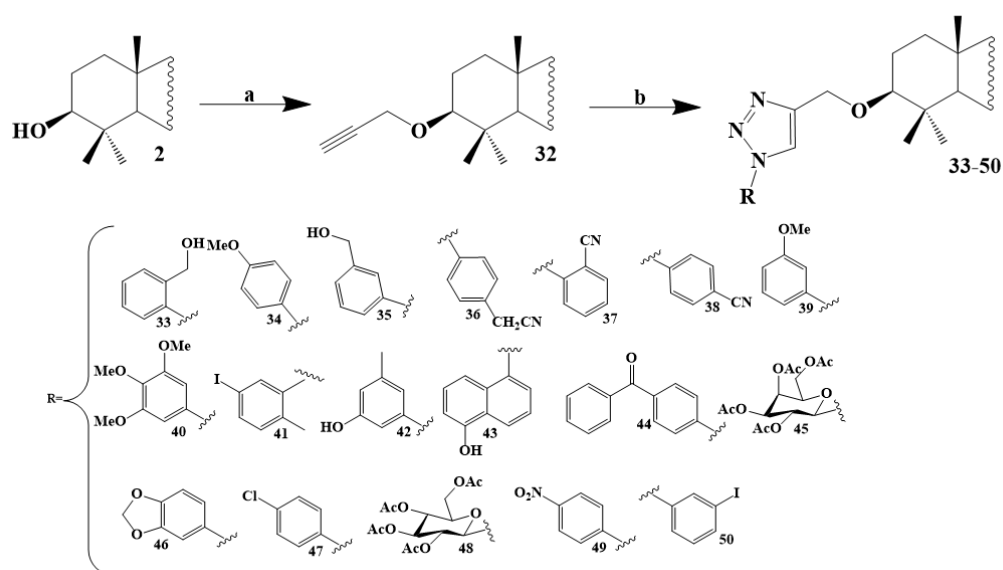
Зняття захисної метокси групи з метилбетулоноату **8** проводили використовуючи LiI при кип'ятінні у DMF (схема 1.4). Далі з кислоти **25** синтезували сполуки **26-28** обробкою AFC, AFU та AZT у присутності *CuI*, *DIPEA* у суміші розчинників $H_2O/t\text{-BuOH}/CH_3CN$. Кон'югати **29-31** були одержані за аналогічною «клік»-реакцією з азидоетилглікозидами галактози та перацетатами лактози [12, 15, 16].



*a) LiI, DMF, флегма, Ar; b) AFC або AFU, або AZT, CuI, DIPEA, H₂O/*t*-BuOH/CH₃CN; c) азидоетилглікозиди перацетатів лактози або галактози, порошок Cu, *t*-BuOH, CuSO₄·5H₂O, 40 °C; d) RN₃, CuI, *t*-BuOH, 70 °C, 23 год.*

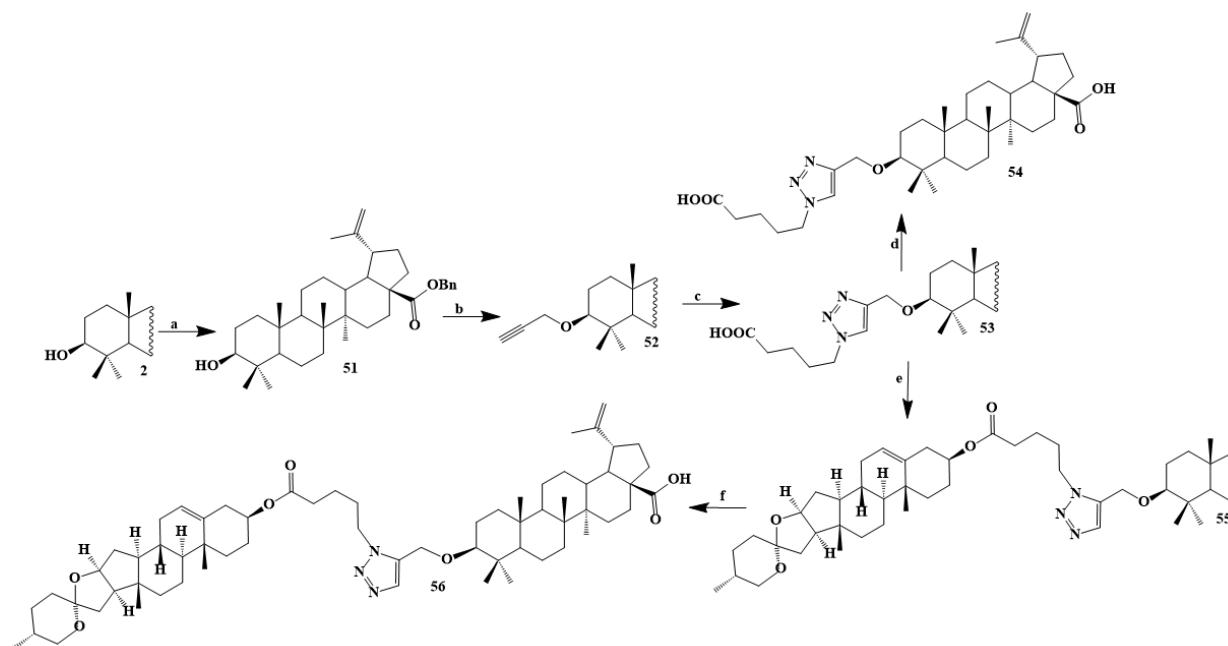
1.1.2 Синтез сполук-гібридів у положенні C³

Стратегія введення гетероциклічних фрагментів до положення C³ бетулінової кислоти розглянута у дослідженні [17], була здійснена синтезом похідних 1,2,3-триазолу з 3-пропаргілоксибетуліновою кислотою **32** і відповідним азидом (схема 1.5). У такий спосіб створена бібліотека з 18 похідних триазолу. Загальні виходи синтезованих сполук становили від 92 до 98 %. Сполука **2** та її похідні **33-50** виявили протипухлинну активність різного ступеня. Кон'югати **35, 37, 43, 45, 47-49**, впливали на лінії клітини лейкемії HL-60 [17].



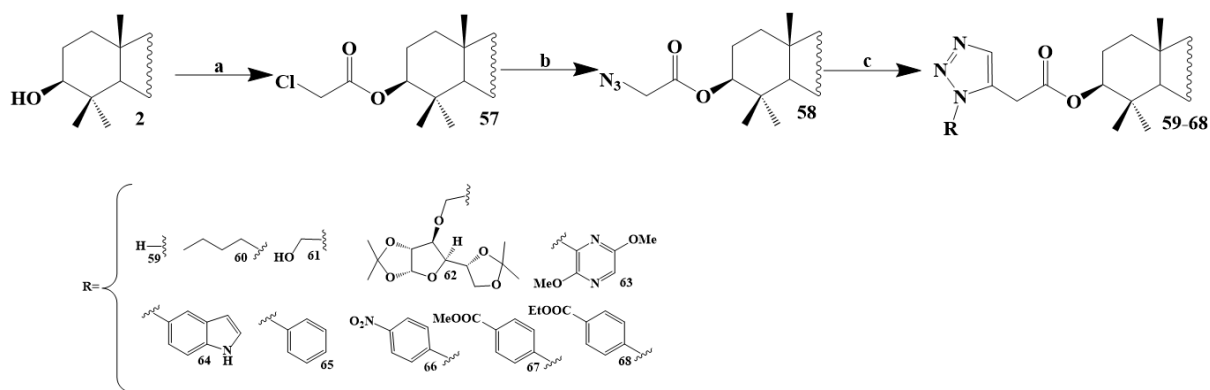
a) пропаргіл бромід, NaH, сухий THF, r.t., (вихід 76%); b) RN₃, t-BuOH:H₂O(1:1), CuSO₄, аскорбат натрію.

У роботі [18] повідомляється про синтез пропаргілового етеру бензилбетулінату та подальшим 1,3-диполярним циклоприєднанням до нього азидавалеріанової кислоти (схема 1.6). Зняття бензильної захисної групи проводили за допомогою гідрогенолізу Pd/C-каталізаторі. Кон'югат **55** виявив селективну цитотоксичність по відношенню до клітин Т-лімфобластного лейкозу на відміну від кон'югату **56**, який такої активності не проявив. Вихідна бетулінова кислота **2** і проміжні продукти **51** і **52** також не виявили цитотоксичності в досліджуваних лініях ракових клітин [18, 19].



a) бензилбромід, K_2CO_3 , DMF; *b)* пропаргіл бромід, NaH, THF; *c)* азидовалеріанова кислота, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, TBTA (трис(бензилтриазолілметил)амін), аскорбат натрію, суміш H_2O/CH_2Cl_2 ; *d)* H_2 (Pd/C), 130 кПа, суміш CH_5OH/THF ; *e)* діосгенін, DCC (N,N' -дициклогексилкарбодіімід), CH_2Cl_2 ; *f)* H_2 (Pd/C), 130 кПа, суміш CH_5OH/THF .

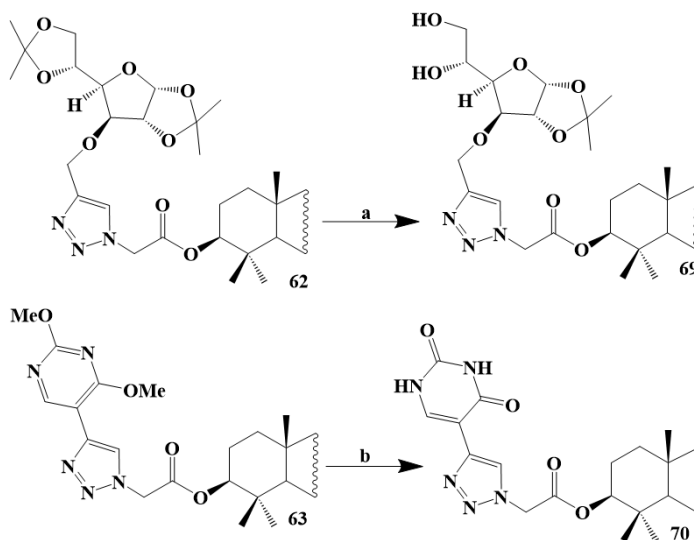
Триазольний фрагмент у положенні C^3 можна сформувати обробкою OH-групи хлорацетилхлоридом і подальшою заміною атома хлора на азидну групу. Так, сполуку **57** одержали (схема 1.7) обробкою бетулінової кислоти **2** хлорацетилхлоридом в присутності DIPEA і DMAP (4-диметиламінопіридин) (каталітична кількість). Азидування з використанням NaN_3 привело до виділення проміжної сполуки **58**. Після цього 1,3-диполярним циклоприєднанням азиду **58** з алкінами синтезували 1,2,3-триазольні похідні **59-68** високими виходами (80-90%). Сполука **59** є потужним інгібітором клітинної лінії HT-29 з IC_{50} 14,9 мкМ [20].



a) хлорацетилхлорид, *DIPEA*, *DMAP*, *THF*, 2 год., *r.t.* (вихід 86%); *b)* азид натрію (NaN_3), *DMF*, 70 °C, 4 години, (вихід 77%); *c)* RN_3 , аскорбат натрію, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *DMSO* (диметилсульфоксид), 2-18 год, (вихід 70-98%).

Для хемоселективного зняття ізопропіладенової захисної групи сполуки **62** піддали дії оцтової кислоти у діоксані за кімнатної температури протягом 1 години (схема 1.8). Обробка сполуки **63** триметилсилілхлоридом і йодидом натрію при кімнатній температурі привела до похідної урацилу **70** з хорошими виходами [20].

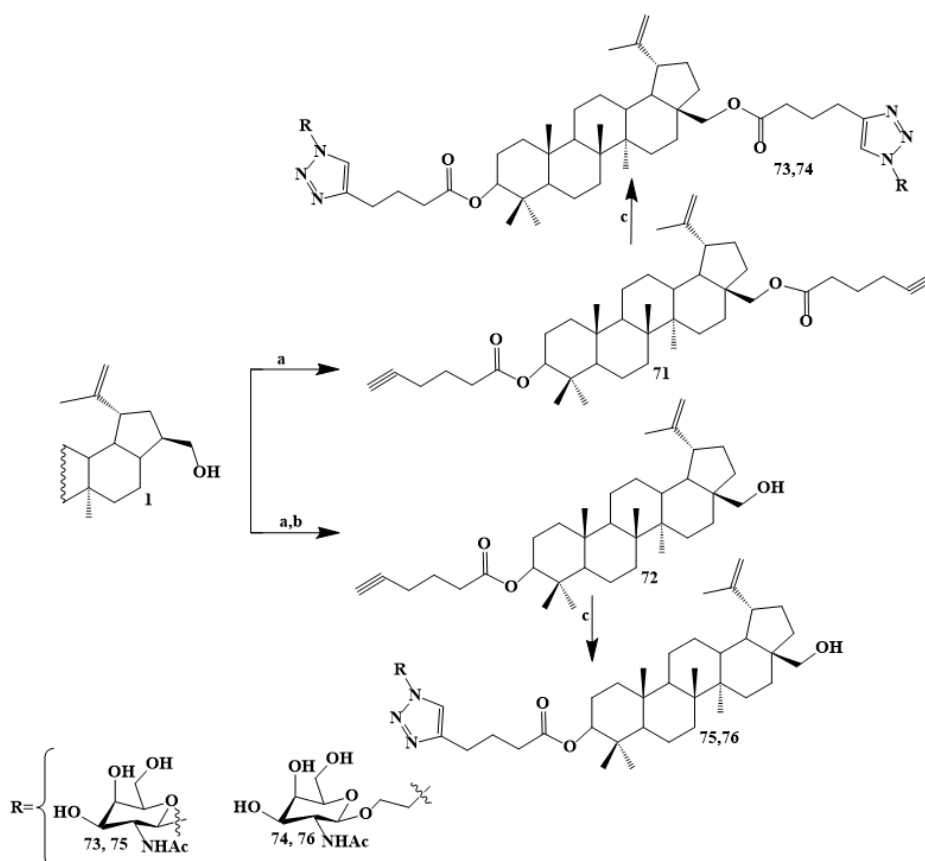
Схема 1.8



a) $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:1), 1,4-діоксан, *r.t.*, 1 год.; *b)* Me_3SiCl , NaI , CH_3CN , *r.t.*, 12 год.

Утворення естерів бетуліну з 5-гексиноювою кислотою як лінкера наведено на схемі 1.9. Реакцію естерифікації з гекс-5-іноїлхлоридом 5-гексиноювої кислоти у піридині в присутності DMAP. Нагрівання впливає на регіоселективність взаємодії, при 115 °С утворюється дієфір **71**, а моноєфір **72** синтезували шляхом повної естерифікації бетуліну з подальшим м'яким лужним деацетилюванням одного лінкерного фрагмента за допомогою KOH/MeOH при С²⁸. Кінцеву стадію кон'югації здійснювали шляхом взаємодії алкінів **71**, **72** з двома азидними похідними N-ацетил-D-галактозаміну у DMF. Каталіз проводили з використанням CuI у присутності DIPEA. В результаті отримали глікотритерпеноїди **73**, **74**, **75** та **76** з азидоцукром з виходом 61–76%. Проведені експерименти показали, що кон'югати **73**, **74**, **75** та **76** є менш токсичними щодо певних культур ракових клітин порівняно з бетуліном [21].

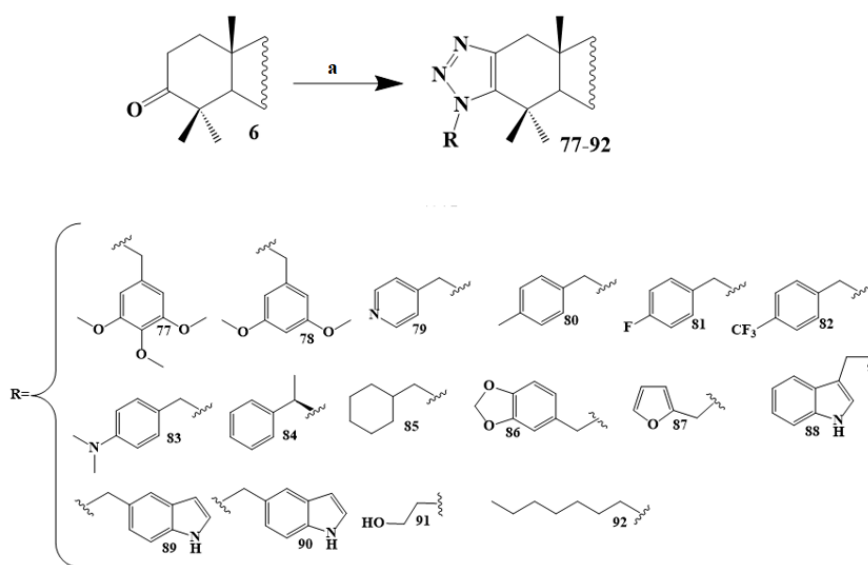
Схема 1.9



a) 5-hexynoic acid chloride, піридин/DMAP, 115°C (вихід до 78%); b) 0,1N KOH/MeOH; c) CuI, DMF, DIPEA, азидопохідні N-ацетил-D-галактозаміну (вихід 61-76 %).

Синтез 1,2,3-триазоло-конденсованих похідних бетулонової кислоти із первинних амінів і кетонів подано на схемі 1.10. Метод триазолізації було застосовано до бетулонової кислоти **6** як джерела кетону з використанням первинних амінів і 4-нітрофенілазиду. Це привело до серії 16-ти похідних бетулонової кислоти **77-92**, більшість з яких виділено з високим виходом (~80%). У той час як вихідні сполуки бетулін **1** і бетулонова кислота **6** були практично неактивними, майже всі 1,2,3-триазоло-конденсовані похідні відповідної кислоти виявилися високоефективними інгібіторами CoV [22].

Схема 1.10

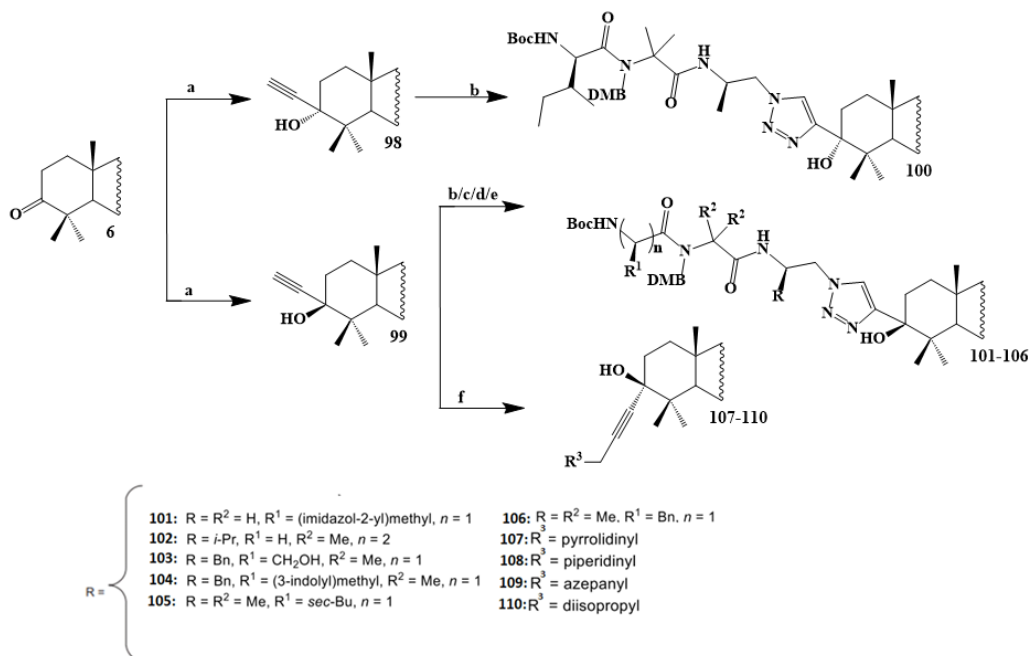


a) RN_3 , 4-нітрофенілазид, толуол, 100 °C, 24 год.

На схемі 1.11 наведено синтез кон'югатів бетулонової кислоти з пептидоміметиками, об'єднаними за допомогою 1,2,3-триазольного лінкера. Вихідні діастереоізомери бетулонової кислоти **98** та **99** з алкіноювою групою в положенні C^3 отримано реакцією етинілмагній броміду з бетулоновою кислотою **6**. Далі сполуки **98** та **99** обробляли $R-R^1-R^2-R^2$ -азидопептидами у різних умовах, утворюючи цільові кон'югати **100** та **101-106** з 60–88 % і 73% виходами відповідно. Сполуки **107-110** одержали реакцією Манніха, каталізованою міддю з декількома ациклічними і циклічними вторинними амінами у присутності водного формаліну у ДМСО (схема 1.11). Тривалість реакції становила від однієї до декількох діб. Гідроксипропаргіламіни **107-110** були одержані з виходами 13%–64%. Усі синтезовані сполуки перевіряли на протизапальну активність. Зокрема, було

встановлено, що кон'югати **101**, **103**, **104**, **105** виявляють високі протизапальні властивості [23, 24].

Схема 1.11



a) $\text{HC}\equiv\text{CMgBr}$, THF, r.t., NH_4Cl ; b) $R\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^2$ -азидопептид; CuCl (15 mol%), toluene; c) $R\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^2$ -азидопептид; натрій аскорбат (40 mol%), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10 mol%), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (10:1), 40 °C; d) $R\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^2$ -азидопептид; CuCl (15 mol%), бутанол-1, 115 °C; e) $R\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^2$ -азидопептид; натрій аскорбат (40 mol%), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10 mol%), THF/ H_2O (10:1); f) $(\text{R}^2)_2\text{NH}$, CuI , DMSO, формалін, 40 °C.

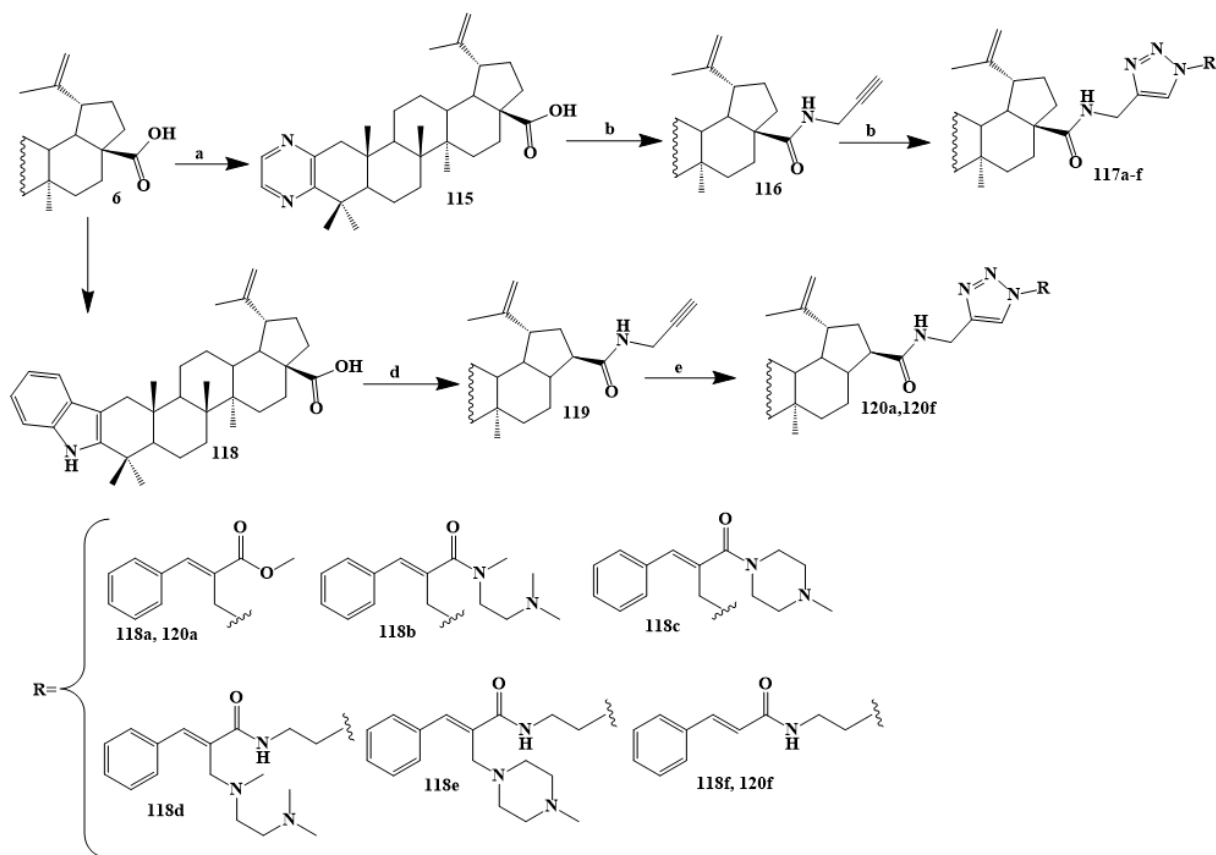
1.1.3 Синтез сполук-гібридів у положенні C²⁸

P. Suman зі співавторами синтезували триазольні похідні бетуліну об'єднані пептидним зв'язком з азидами. Взаємодія кислоти **6** з пропаргіламіном з використанням TBUTU (О-(бензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуронію тетрафторборат) і основи Хюніга, привела до утворення N-пропаргілбетулонамиду **111** (схема 1.12). Азида RN_3 були використані для «клік»-сполучення з амідом **111**. Відповідне похідне триазолу **112a** було отримано з 89% виходом. Реакція **112a** з борогідридом натрію привело до відновлення СО-групи у циклі А. З метою підвищення гідрофільності сполуки **113a** вона була перетворена на естер янтарної

Послідовність перетворень бетулінової кислоти, що привела до триазольних похідних піразинілбетулінової кислоти **117a-f** через проміжний пропаргіл бромід наведено на смемі отримані пептидним сполученням з азидами вказані на схемі 1.13. Вихідна піразинілбетулінова кислота **115** одержана за допомогою циклоприєднання бетулонової кислоти **2** до етилендіаміну (схема1.13). Сполучення **115** з пропаргіламіном було здійснено з використанням TBUTU та основи Хюніга для отримання **116**. В аналогічній схемі синтезу бетулонову кислоту **2** перетворювали на індолілбетулінову кислоту **118** в умовах реакції Фішера. Реакція **118** з пропаргіламіном давала N-пропаргіліндолілбетулінамід **119**. Взаємодія останнього з метил α -азидометилциннаматом та N-2-азидоетилциннамамідом привела до триазолів **120a** та **120f** відповідно. Встановлено, що сполуки **116**, **117b-f** проявляють

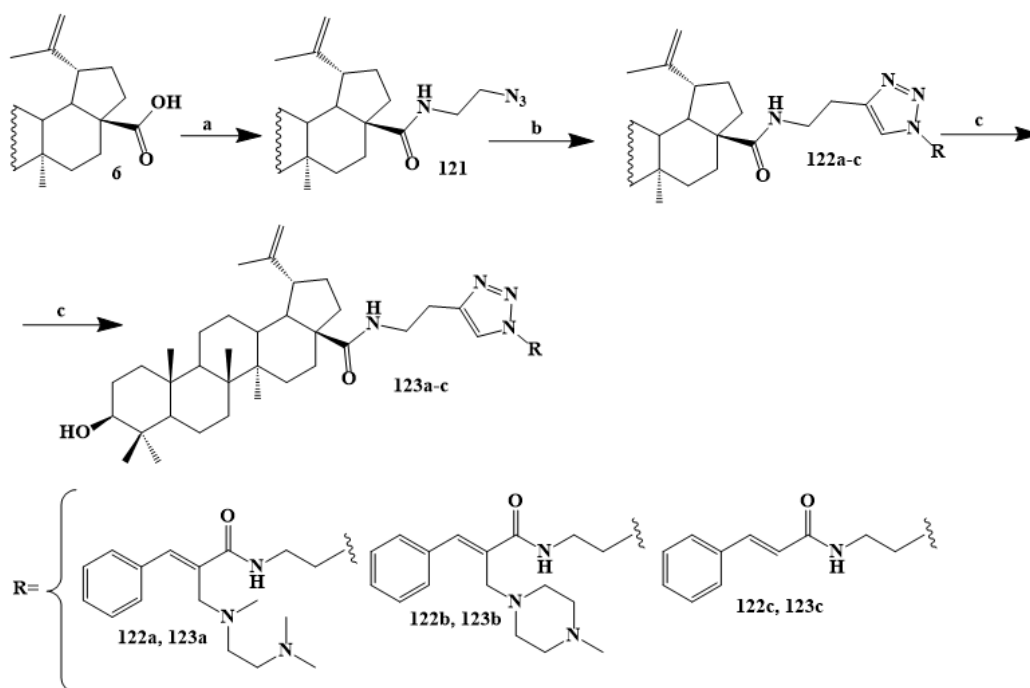
високу протипухлинну активність на відміну від **119**, **120a**, **120f** які виявилися неактивними [25].

Схема 1.13



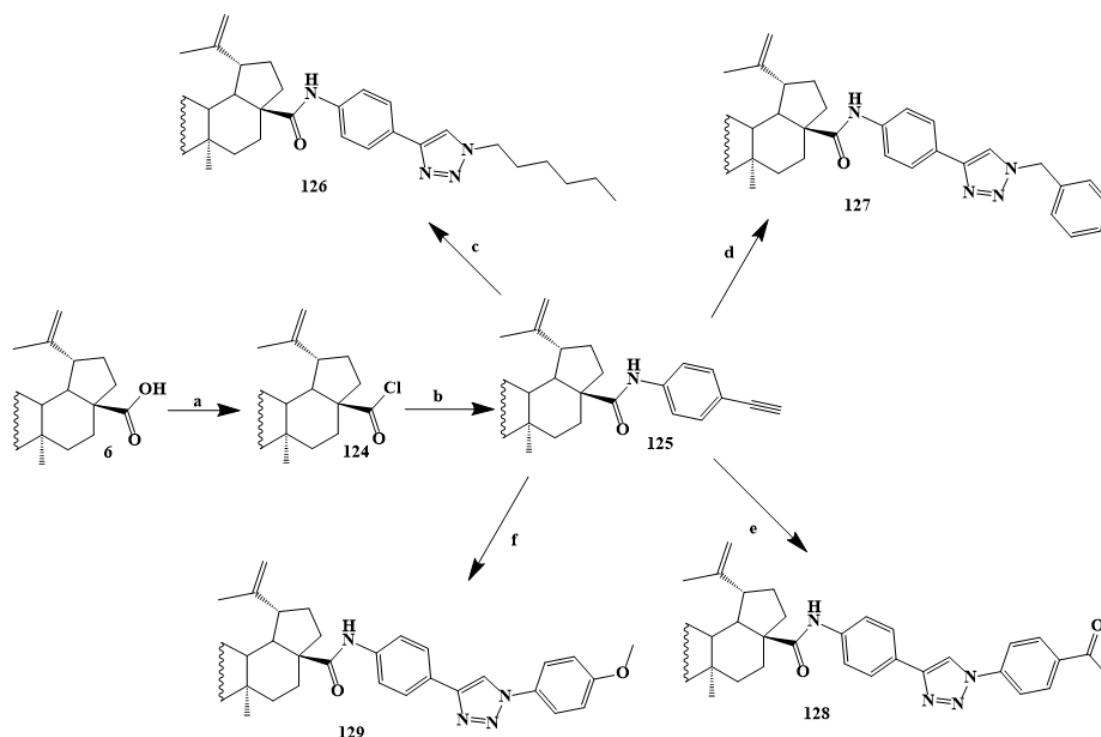
a) етилендіамін, сірка, морфолін, кипіння зі зворотним холодильником, 24 години, 71%; b) фенілгідразин, CH_3COOH , кипіння зі зворотним холодильником, 4 години, 45%; c) пропаргіламін, $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, TBTU, DMF, 0-25 °C, 14-20 год, 71-80%; d) RN_3 ; (d) *N*-(2-азидоетил) (E)-2-(*N*-метилпиперазин-1-ілметил)-3-феніл акриламід), CuSO_4 , аскорбат натрію, $t\text{-BuOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 25 °C, 12-15 год, 80-88%.

Азидну функцію можна сформувати на базі бетулонової кислоти шляхом взаємодії її з 2-азидоетиламіном (схема 1.14). Сполучення аміду **121** з *N*-пропаргіл- α -(діалкіламінометил)циннамідами і *N*-пропаргілциннамідом веде до утворення триазолів **122a-c**. Відновлення **122a-c** борогідридом натрію дозволяє одержати похідні триазолу **123a-c** з виходами 86-91% [25].



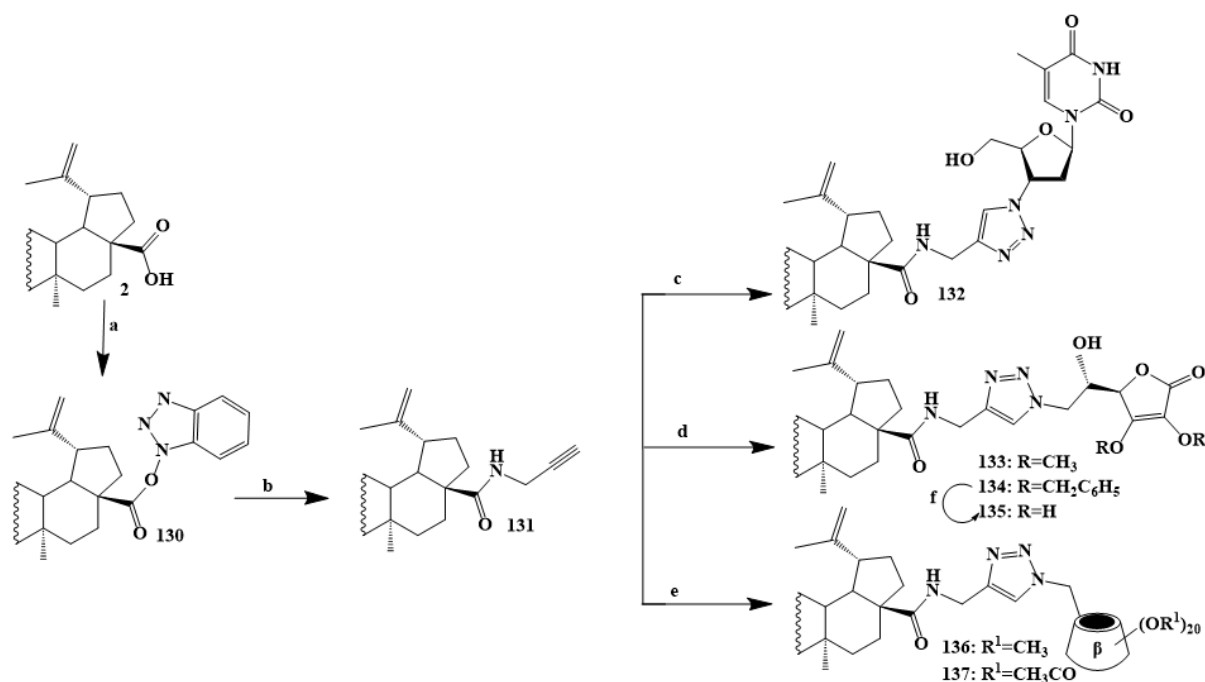
a) 2-азидоетиламін, *DIPEA*, *TBTU*, *DMF*, 0-25 °C, 20 год, 74%; b) акрилалкіні(*N*-пропаргілом *a*-(діалкіламінометил)циннамід *a-b* і *N*-пропаргілциннамід *c*), CuSO_4 , аскорбат натрію, *t*-BuOH:H₂O (1:1), 25 °C, 12-15 год, 79-86%; c) NaBH_4 , CH_3OH , 0-25 °C, 2-3 години, (вихід 86-91%).

Існує й інший синтез амідів бетулонової кислоти, який базується на утворенні хлорангідриду цієї кислоти як ключового проміжного продукту та наступним його амінуванням. Синтез починається із взаємодії бетулонової кислоти **6** із оксалілхлоридом, що веде до утворення хлорангідриду **124** (схема 1.15) [26]. Амід **125** отримують з виходом 55% шляхом взаємодії ацилхлориду **124** з 4-амінофенілацетиленом у присутності триетиламіну [27]. Далі **125** оброблюють арилазидами в толуолі або н-бутанолі у присутності CuCl , що веде до 4-заміщених 1,2,3-триазолів **126-129** з виходом 67-88% [28]. Основними видами активності похідних **126-129** є протизапальна та протипухлинна дія.



*a) (CO₂)Cl₂, піридин, CHCl₃, флегма, 20 год.; b) 4-амінофенілацетиленом, Et₃N (триетиламін), сухий бензен, 70-80 °C, Ar, 16-18 год.; c) *n*-гексилазид, CuCl, r.t., 10 год.; d) бензилазид, CuCl, кімнатна температура, 10 год.; e) *n*-ацетилфенілазид, CuCl, 80-90 °C, 3 години; f) *n*-метоксифенілазид, CuCl, 80-90 °C, 3 год.*

На схемі 1.16 подано ще один спосіб утворення пропаргілпохідних бетулінової кислоти за допомогою двостадійного синтезу. На першій стадії проміжну сполуку **130** отримують шляхом активації карбоксильної групи бетулінової кислоти **2** за допомогою TBVTU, а на другій стадії сполуку **130** обробляли пропаргіламіном в основному середовищі і одержують амід **131** [24]. Цей амід **131** у «клік»-реакції з AZT в присутності CuI та *t*-BuOH під час тривалого нагрівання (70 °C) приведе до гібриду **132** [28]. У присутності натрій аскорбатом у розчині тетрагідрофуран-вода за наявності CuSO₄, синтезують сполуки **133** та **134** за участю аміду 131 та азиду аскорбінової кислоти. Бензильні захисні групи знімають шляхом відновлення на Pd/C-каталізаторі [29]. Кон'югати з β-циклодекстрином **136** та **137** також отримані в результаті клік-реакції з пропаргілбромідом [24].

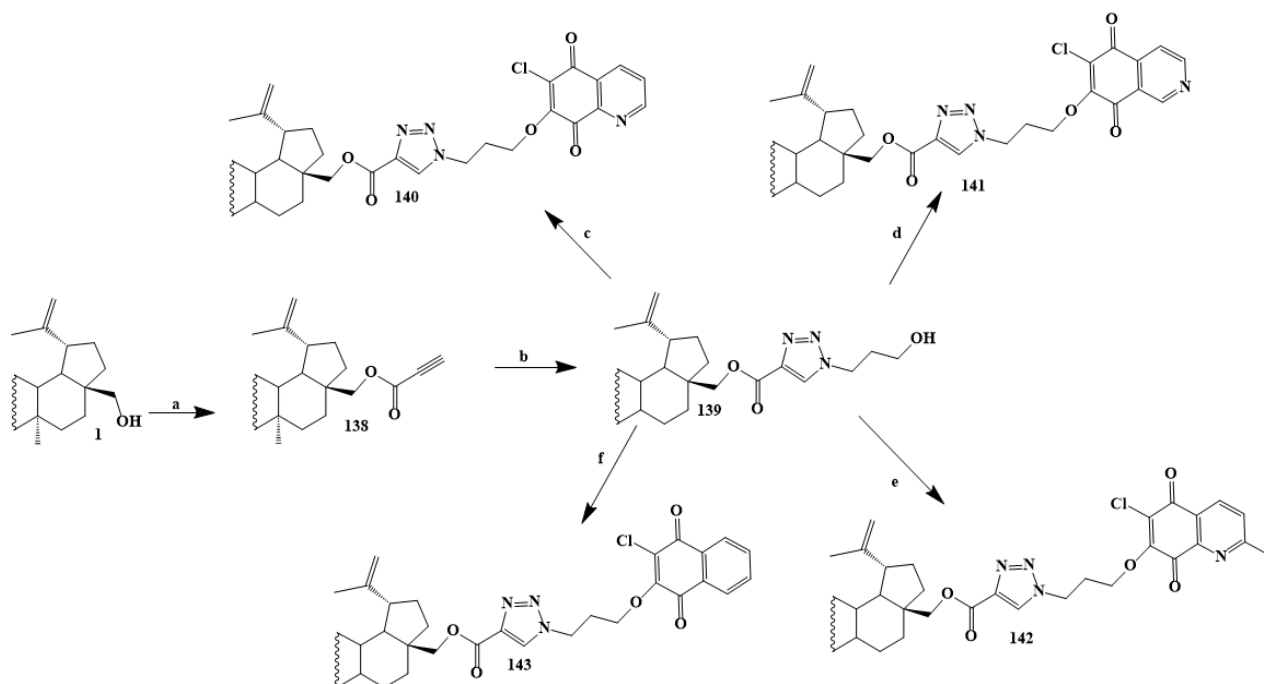


*a) TBTU, DIPEA, THF; b) K_2CO_3 , DMF, 1 год; c) AZT, CuI, *t*-BuOH, 70 °C, 12 год; d) $CuSO_4$, THF- H_2O (1:1), Na-L-аскорбат; e) β -циклодекстрин, $CuSO_4$, THF- H_2O (1:1), Na-L-аскорбат; f) H_2 , Pd/C, 300 кПа, MeOH.*

У літературних джерелах є відомості щодо гібридів бетуліну з хіноліндіоном, у яких гетероциклічний фрагмент поєднаний з лупановою платформою за допомогою тріазольного лінкера. Першим етапом синтезу є модифікація бетуліну **1** шляхом введення пропіноїльної групи за допомогою пропіолової кислоти в присутності DCC і DMAP у дихлорметані (DCM) (схема 1.17).. В результаті одержано естер **138**, який перетворили на похідне триазолу **139** у реакції з 3-азидопропанолом у присутності купрум(I) йодиду та DCM.

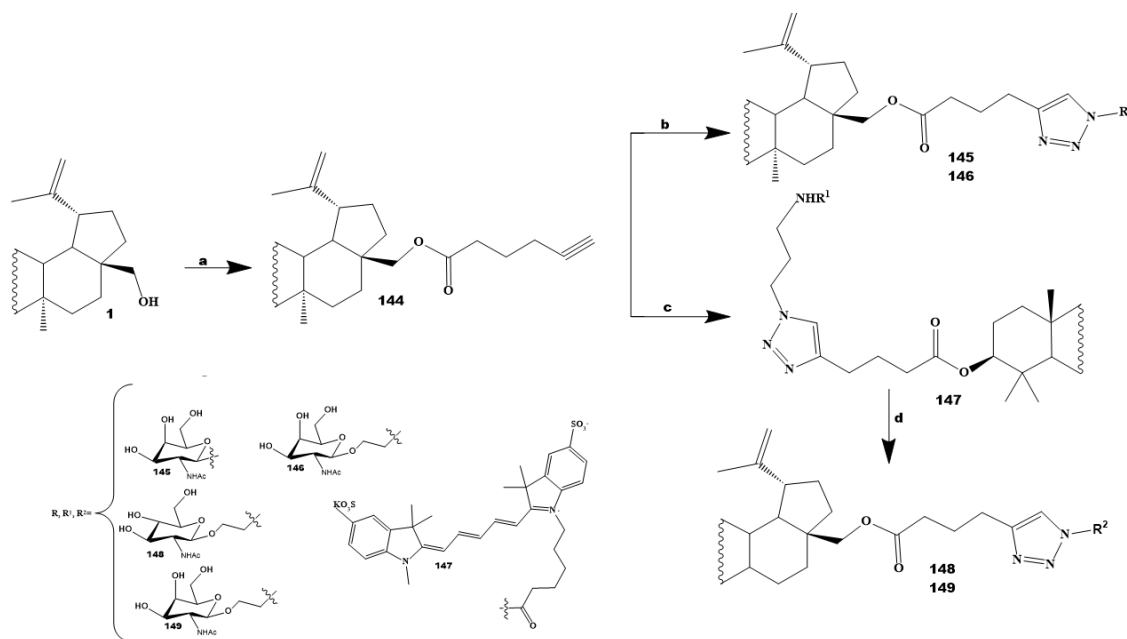
В результаті нуклеофільного заміщення атома хлору у дихлорпохідних сформовано кон'югати **140-143** [30].

Схема 1.17



a) DCC, DMAP, DCM; b) 3-азидопропанол; CuI, DCM, r.t.; c) 5,8-хіноліндіон, K₂CO₃, THF, r.t.; b) 5,8-ізохіноліндіон, K₂CO₃, THF, r.t.; c) 2-метил-5,8-хіноліндіон, K₂CO₃, THF, r.t.; d) 1,4-нафтохіонон, K₂CO₃, THF, r.t.

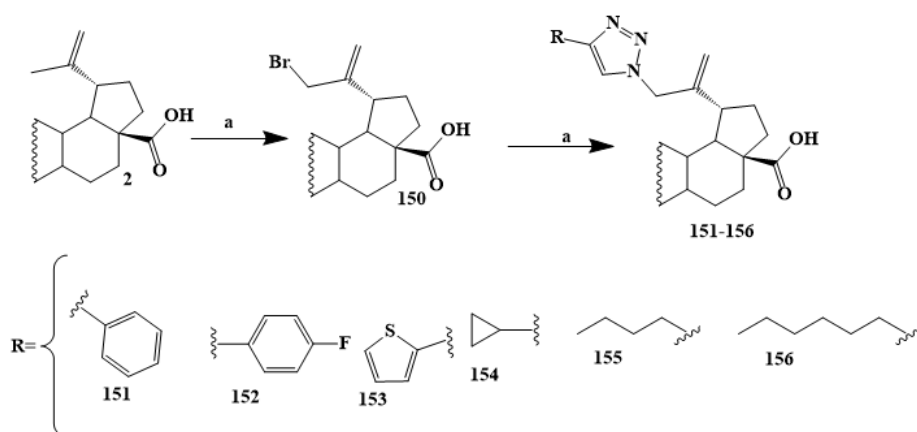
На схемі 1.18 зображено утворення естерів бетуліну, що містять залишкову частину 5-гексинової кислоти у якості лінкера. Синтез починається реакцією естерифікації бетуліну **1** із хлорангідридом 5-гексинової кислоти в піридині у присутності DMAP. Далі естер **144** оброблюють азидами N-ацетил-D-галактозаміну (GalNAc). у присутності DMF, CuI, DIPEA, з утворенням глікотритерпеноїдів **145** та **146** з виходами 61–76%, або вводять в «клік»-реакцію з азидпохідними GalNAc або GluNAc (N-ацетил-D-глюкозамін) та сульфо-ціанін-5-карбоною кислотою (SulfoCy5 COOH), яку вводять з метою одержання флуоресцентної мітки у складі молекули. Флюорісцентно-мічені кон'югати були використані у дослідженнях *in vivo* з метою оцінки здатності глікозильованих сполук проникати у клітини печінки вражені пухлинним процесом [21].



a) 5-hexynoic acid chloride, піридин/DMAP, 115°C; b) CuI, DMF, DIPEA, GalNAc-RN₃; c) SulfoCy5-COOH, EDC-Cl N-(3-(диметиламіно)пропіл)-N'-етилкарбодіміду гідрохлорид), DMAP; d) CuI, DMF, DIPEA, GalNAc-RN₃/ GluNAc-RN₃.

1.1.4 Синтез сполук-гібридів у положенні C³⁰

W. Shi зі співавторами у своїх дослідженнях активували положення C³⁰ бетулінової кислоти шляхом бромовання N-бромбутанімідом у THF. Шлях синтезу сполук, кон'югованих у положенні C³⁰ бетулінової кислоти, наведено на схемі 1.19. Бетулінову кислоту **2** піддають аліловому бромованню з використанням NBS (N-бромсукцинїмід), у THF. Бромопохідну **150** вводили у реакцію з кінцевими алкінами та азидом натрію у трет-бутанолі у присутності Cu та CuSO₄, в результаті отримано сполуки **151-156** [31].



a) NBS, THF, r.t.; б) алкіни RH, Cu, CuSO₄, NaN₃, t-BuOH, 75 °C, 65 – 88%.

1.2 Висновок

Проведений нами аналіз даних літератури свідчить про широке використання бетулонової і бетулінової кислот у синтезі різноманітних сполук-гібридів медичного призначення, в яких природна молекулярна платформа з'єднана з гетероциклічним фрагментом або пептидомеметиком за допомогою 1,2,3-триазольного лінкера. Втім, відомості щодо кон'югатів зазначених кислот зі спіропіролідиноксіндольними сполуками в літературних джерелах відсутні. Тому синтез сполук-гібридів на основі бетулонової кислоти зі спіропіролідиноксіндолами має теоретичне і практичне значення.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1.1 Виділення бетуліну (1) із кори берези

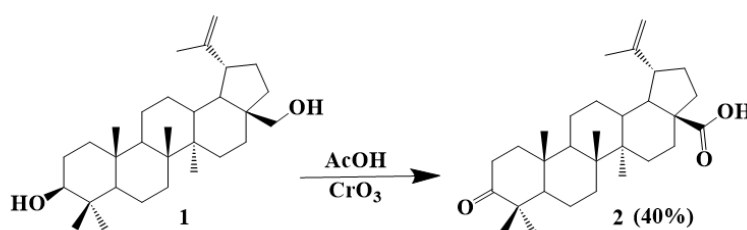
У апарат Сокслета поміщають 150 г берести берези, подрібненої до розміру часток приблизно 3-5 мм. Кожну порцію по 10-15 г сировини змішують з 30-50 мл хлороформу. До апарату Сокслета приєднують зворотній холодильник і круглодонною колбою об'ємом 2 л, в яку заздалегіть заливають 1 л хлороформу. Розпочинають нагрів розчинника у колбі і відстежують його проходження через шар берести у Сокслеті. Екстракцію проводять протягом 8-10 год. Після закінчення з круглодонної колби, яка містить екстракт видаляють до 75 % розчинника при зниженому тиску. Світло-жовтий аморфний осад бетуліну, що утворився відфільтровують, промивають на фільтрі гексаном, сушать за кімнатної температури. Сухий порошок бетуліну (50-60 г) перекристалізують з 2-пропанолу (0,5-0,6 л), фільтрують, промивають гексаном, сушать за кімнатної температури. Вихід бетуліну становить 45-50 г, $T_{пл.} = 256-257\text{ }^{\circ}\text{C}$ [32].

2.1.2 Синтез бетулонової кислоти (2)

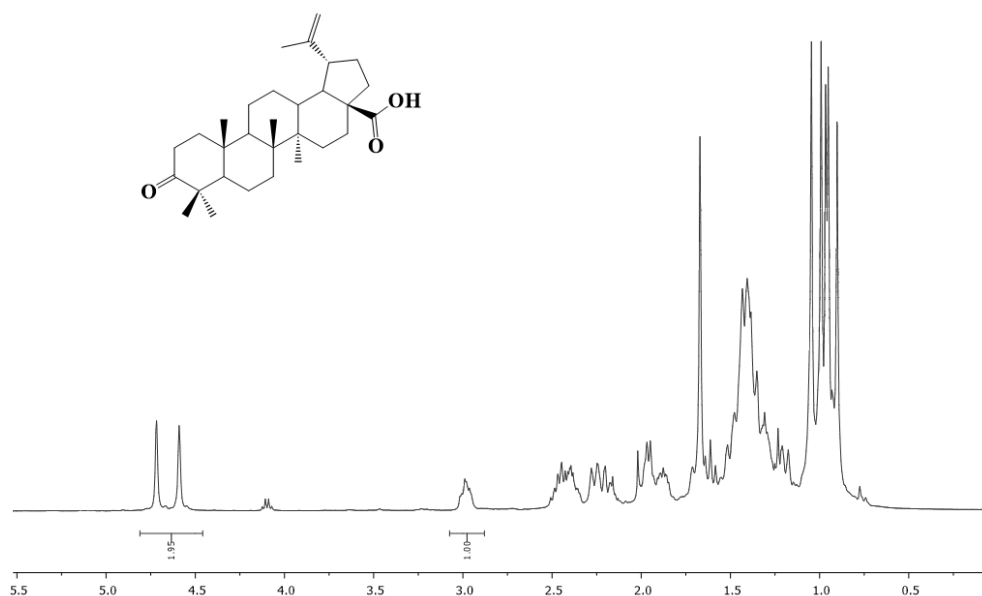
У суміші 200 мл ацетатної кислоти та 15 мл води охолодженій до $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ розчиняють 10 г (0.1 моль) оксиду хрому (VI) і при інтенсивному перемішуванні додають невеликими порціями 10 г (0.023 моль) бетуліну **1** (Схема 2.1), не допускаючи підвищення температури. Через 30 хв після того, як додали весь бетулін, прибирають охолодження, додають 15 мл 2-пропанолу та продовжують перемішування при кімнатній температурі ще 30 хв. Контролюють реакцію за ТШХ (тонкошарова хроматографія). Для вилучення бетулонової кислоти реакційну суміш виливають у стакан з 750 мл води. Утворений осад фільтрують, промивають H_2O та сушать. Сухий аморфний порошок розчиняють у 200 мл метанолу, 20 мл води та додають 20 г КОН. Розчин кип'ятять 2 год, його колір поступово змінюється з темно-зеленого на жовтий. Після закінчення процесу осад, що утворився, відфільтровують

та промивають метанолом на фільтрі. Прозорий жовтий фільтрат виливають у 10%-й водний розчин хлоридної кислоти при інтенсивному перемішуванні. Білий аморфний осад бетулонової кислоти фільтрують, промивають H_2O та сушать за кімнатної температури. Очищують колонковою хроматографією на силікагелі, елюент: хлороформ-етилацетат (9:1). Вихід після очищення – 40% ($T_{пл.} = 219–221$ °C) [33].

Схема 2.1



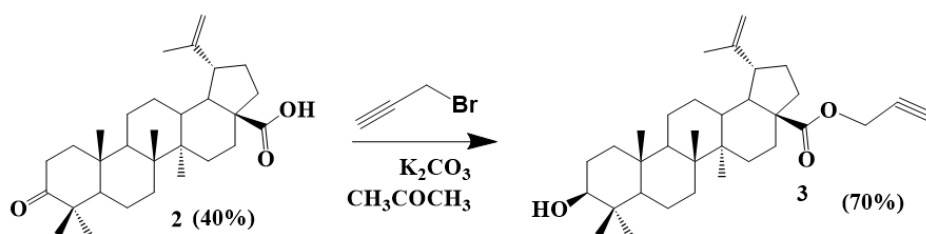
1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ , м.ч.: 4.69 (с, 1H, $C^{29}H$), 4.57 (с, 1H, $C^{29}H$), 3.05 – 2.91 (м, 1H, $C^{19}H$), 1.67 (с, 3H), 1.05 (с, 3H), 0.99 (с, 3H), 0.97 (с, 3H), 0.95 (с, 3H), 0.90 (с, 3H)*6 CH_3 .

Рисунок 2.1 Спектр ЯМР 1H бетулонової кислоти у $CDCl_3$.

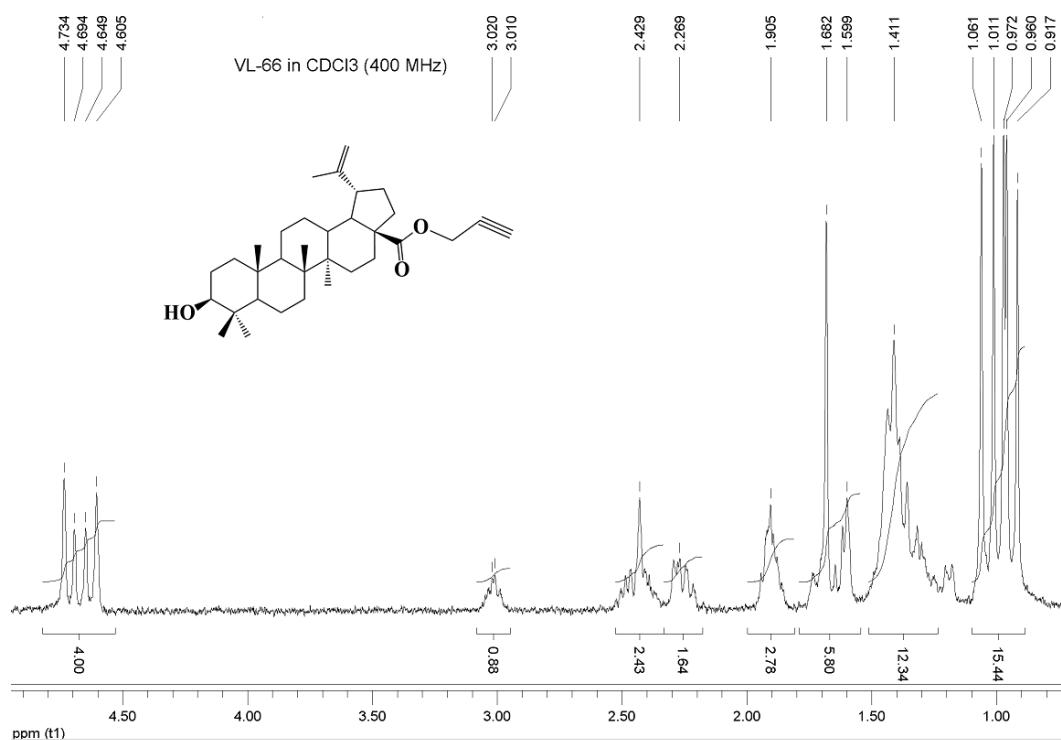
2.1.3 Синтез пропаргілбетулонату (3)

Суміш із 1.5 г (3,3 ммоль) бетулонової кислоти, 0.982 г (6.6 ммоль) пропаргілброміду, 1.38 г (10 ммоль) K_2CO_3 у 60 мл ацетону перемішують на протязі 6 год. Реакційну суміш фільтрують, потім розчинник відганяють під вакуумом до утворення 1.2 г пропаргілбетулоноату ($T_{пл.} = 165-167\text{ }^{\circ}C$) (Схема 2.2) [34].

Схема 2.2



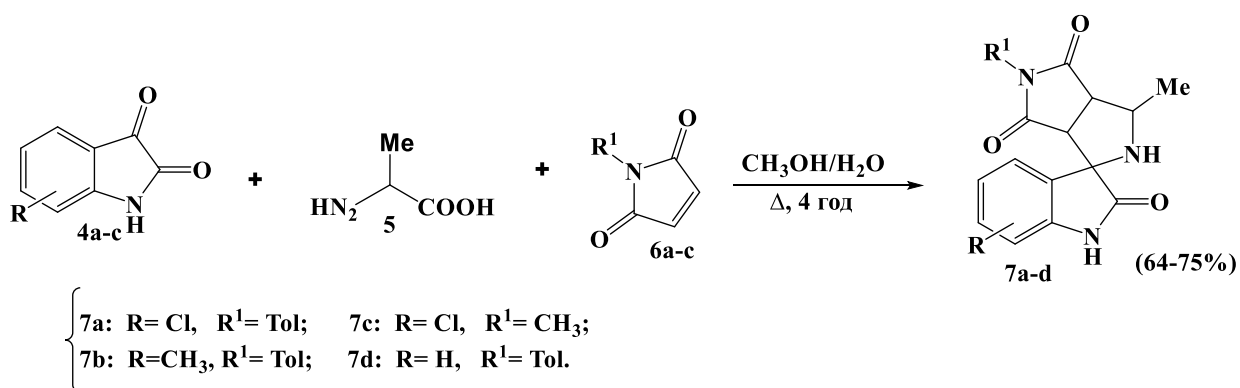
1H NMR (400 МГц, $CDCl_3$) δ , м.ч.: 4.59–4.72 (м, 4H, $2H^{29} + 2H\text{ OCH}_2$), 2.99 (м, 1H, H^{19}), 1.67 с, 1.04 с, 0.99 с, 0.94 с, 0.95 с, 0.90 с (18H, 6CH₃).

Рисунок 2.2 Спектр ЯМР 1H пропаргілбетулонату у $CDCl_3$.

2.1.4 Синтез спірооксіндолів (7a-d)

Суміш відповідного ізатину **4a/4b/4c** (1,0 ммоль), α -амінокислоти **5** (1,0 ммоль) та диполярфілу **6a/6b/6c** (1,0 ммоль) у 4 мл суміші метанол: вода (3:1) (Схема 2.3) кип'ятили протягом 3-8 годин, перебіг реакції контролювали за ТПХ (хлороформ-метанол) і за зміною забарвлення реакційного середовища (червоне-жовте). Розчин охолоджували, осад, що утворився, відфільтровували, промивали метанолом та кристалізували [35].

Схема 2.3



3'-Метил-5'-(*n*-толіл)-5-хлоро-2',3',3a',6a'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (7a). Вихід 72%. $T_{\text{пл.}} = 220^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (400 МГц, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) $\delta = 10.56$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.34 – 6.81 (м, 7H; Ar-H) 4.27 (дд, $J_{\text{H,H}} = 4$ Гц, 1H; 3'-H), 3.89 (д, $J_{\text{H,H}} = 4$ Гц, 1H; 2'-NH), 3.55 (т, $J_{\text{H,H}} = 8$ Гц, 1H; 3a'-CH), 3.47 (д, $J_{\text{H,H}} = 8$ Гц, 1H; 6a'-CH), 2.36 (с, 3H; Ar-CH₃), 1.26 м.ч. (д, $J_{\text{H,H}} = 8$ Гц, 3H; 3'-CH₃).

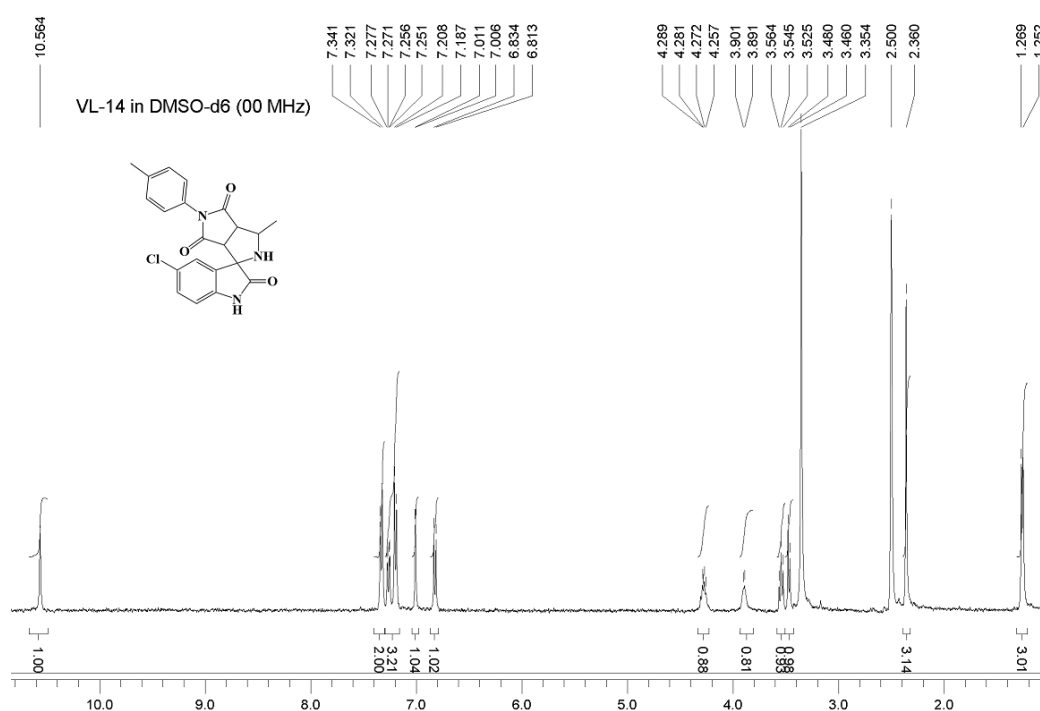


Рисунок 2.3 Спектр ЯМР ^1H сполуки **7a** у DMSO-d₆.

3',5-Диметил-5'-(*n*-толіл)-2',3',3a',6a'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (7b). Вихід 75 %. $T_{\text{пл.}} = 205^\circ\text{C}$ ^1H ЯМР (400 МГц, [D₆] DMSO) $\delta = 10.32$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.34 – 6.68 (м, 7H; Ar-H), 4.28 (дд, $J_{\text{H,H}} = 4$ Гц, 1H; 3'-H), 3.73 (д, $J_{\text{H,H}} = 4$ Гц, 1H; 2'NH), 3.53 (т, $J_{\text{H,H}} = 8$ Гц, 1H; 3a'-CH), 3.40 (д, $J_{\text{H,H}} = 8$ Гц, 1H; 6a'-CH), 2.36 (с, 3H; Ar-CH₃), 2.16 (с, 3H; CH₃-ізатин), 1.23 м.ч. (д, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Гц, 3H; 3'-CH₃).

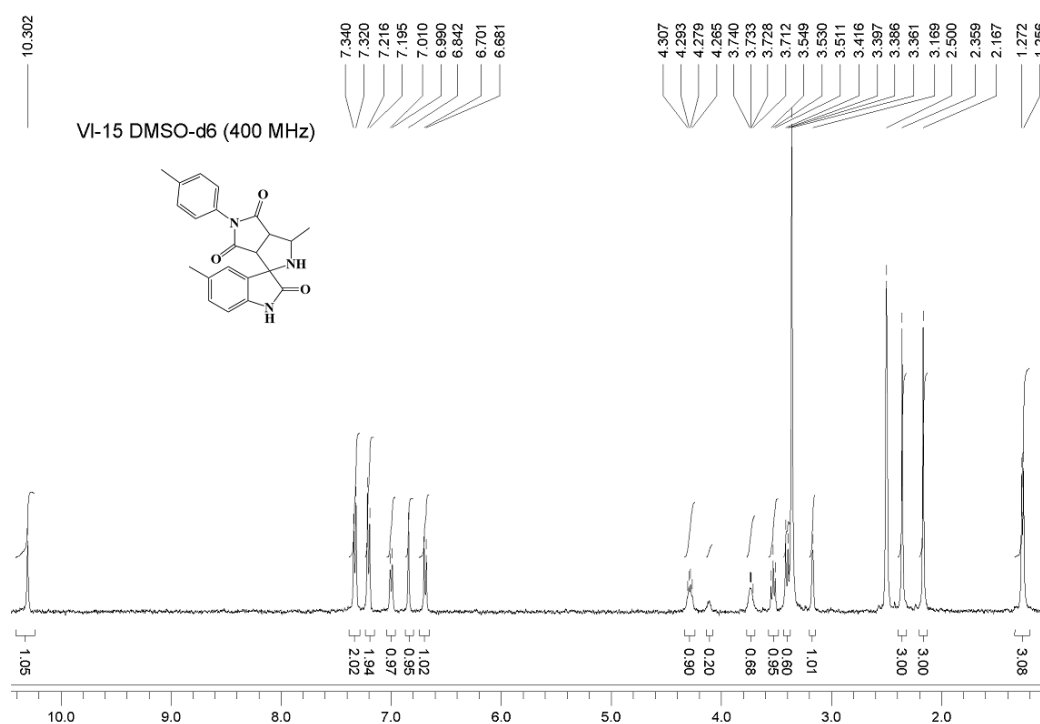


Рисунок 2.4 Спектр ЯМР ^1H сполуки **7b** у DMSO-d₆.

3',5'-Диметил-5-хлоро-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'Н-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'(5'Н)-трион (7с). Вихід 64 %. $T_{пл} = 204^{\circ}C$ 1H ЯМР (400 МГц, $[D_6]$ DMSO) $\delta = 10.50$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.27 – 6.79 (м, 3H; Ar-H), 4.22 (дд, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; 3'-H), 3.70 (д, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; 2'NH), 3.37 (т, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; 3а'-CH), 3.31 (д, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; 6а'-CH), 2.87 (с, 3H; CH₃-ізатин), 1.18 м.ч. (д, $J_{H,H} = 8$ Гц, 3H; 3'-CH₃).

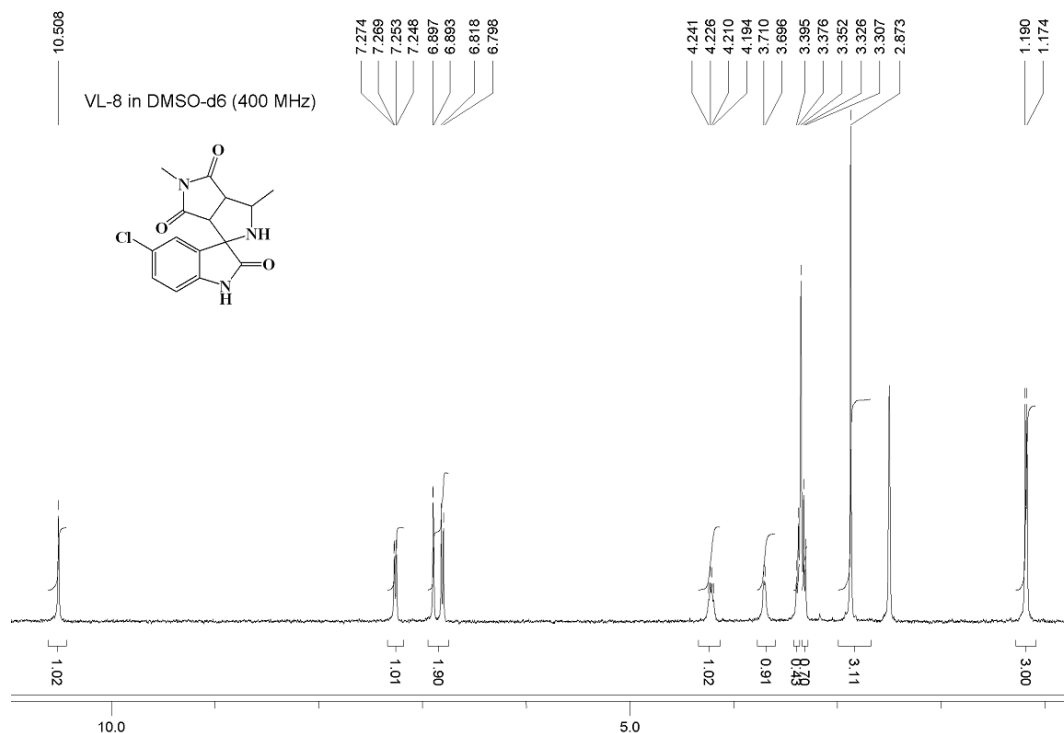


Рисунок 2.5 Спектр ЯМР 1H сполуки 7с у DMSO-d₆.

3'-Метил-5'-(*n*-толіл)-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'Н-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'(5'Н)-трион (7d). Вихід 70 %. $T_{пл} = 210^{\circ}C$ 1H ЯМР (400 МГц, $[D_6]$ DMSO) $\delta = 10.41$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.31 – 6.88 (м, 8H; Ar-H), 4.34 (дд, $J_{H,H} = 4$ Гц, 1H; 3'-H), 3.77 (д, $J_{H,H} = 4$ Гц, 1H; 2'NH), 3.53 (т, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; 3а'-CH), 3.43 (д, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; 6а'-CH), 2.36 (с, 3H; Ar-CH₃), 1.27 м.ч. (д, $J_{H,H} = 6.6$ Гц, 3H; 3'-CH₃).

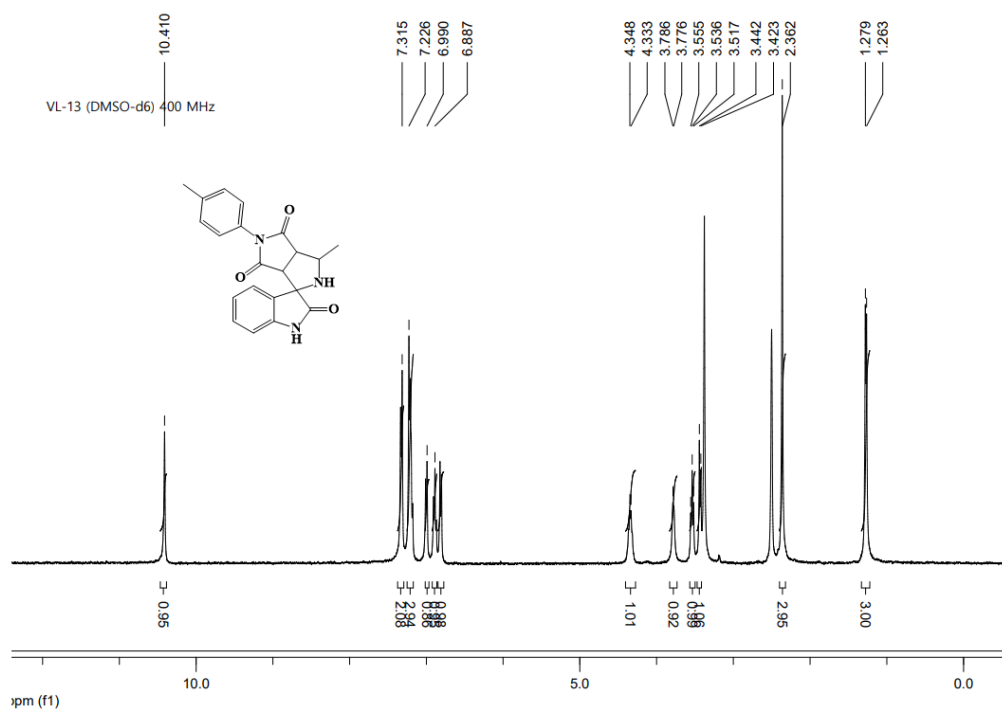
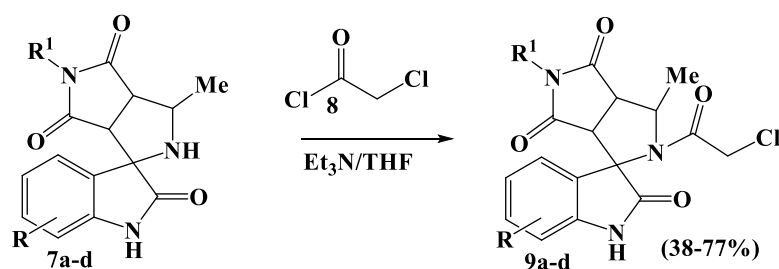


Рисунок 2.6 Спектр ЯМР ^1H сполуки **7d** у DMSO-d₆.

2.1.5 Синтез ацетилхлоридів спірооксіндолів (9a-d)

У 10 мл тетрагідрофурану при охолодженні розчиняють 1.5 ммоль відповідного спіропіролідін-3,2'-оксоіндолу **9a-d** (схема 2.4). До одержаного розчину по краплях додають 0.4 мл 2-хлороацетилхлориду, та дуже повільно 0.8 мл триетиламіну. Суміш залишають перемішуватися на ніч. Наступного дня розчин фільтрують, маточний розчин упарюють досуха, додають невелику кількість метанолу (1-2 мл) та нагрівають до розчинення осаду. Після охолодження випадають прозорі кристали, які відфільтровують та сушать на повітрі [36].

Схема 2.4



3'-Метил-5'-(*n*-толіл)-5-хлоро-2'-(2-хлороацетил)-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (9а). Вихід 63%. Т. пл. 250°C. ¹H ЯМР (400 МГц, [D₆] DMSO) δ=10.83 (с, 1H; NH-ізатин), 7.30 – 6.86 (м, 7H; Ar-H), 5.01 (м, 1H; 3'-H), 4.59 (м, 1H; CH_aH_b), 4.47 (м, 1H; CH_aH_b), 4.15 (м, 1H; 3а'-CH) 3.89 (м, 1H; 6а'-CH), 2.37 (с, 3H; Ar-CH₃), 1.53 (м, 3H; 3'-CH₃). Мас-спектр, *m/z*: 472 [M(³⁵Cl)]⁺, 473 [M(³⁵Cl+³⁷Cl)]⁺, 474 [M(³⁷Cl)]⁺.

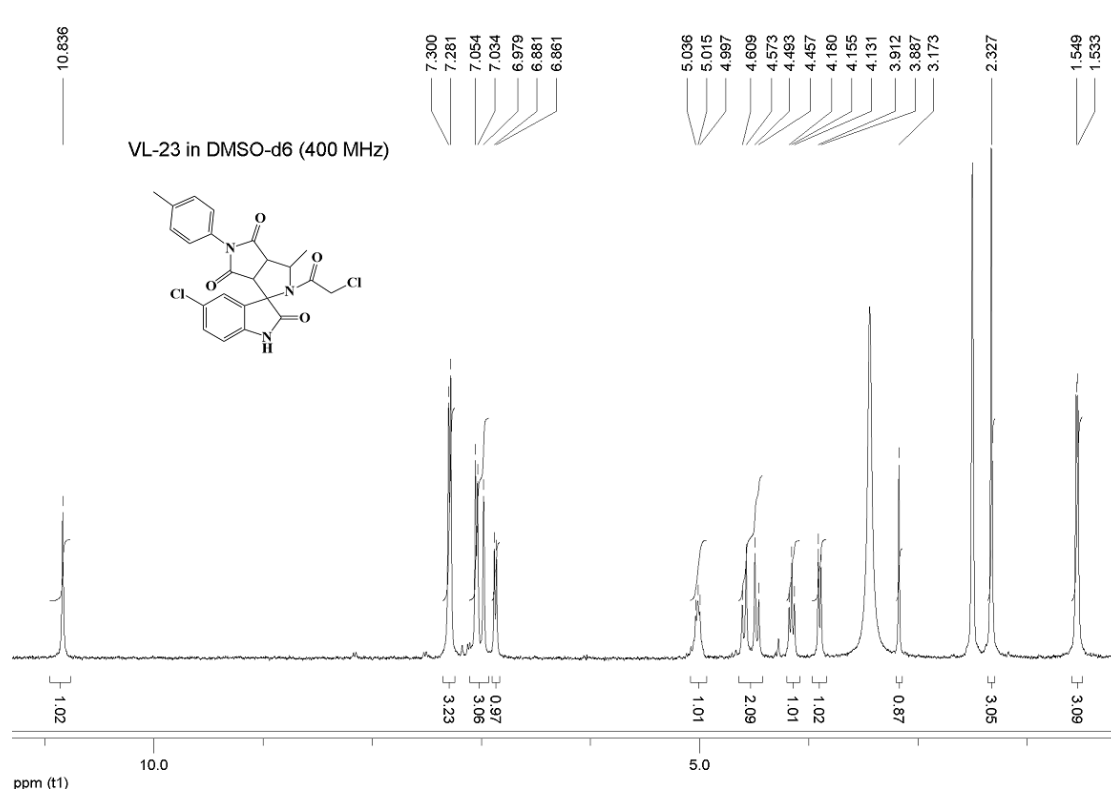


Рисунок 2.7 Спектр ЯМР ¹H сполуки **9а** у DMSO-d₆.

3',5-Диметил-5'-(*n*-толіл)-2'-(2-хлороацетил)-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (9б). Вихід 38%. Т. пл. 250°C. ¹H ЯМР (400 МГц, [D₆] DMSO) δ=10.56 (с, 1H; NH-ізатин), 7.28 – 6.71 (м, 7H; Ar-H), 5.01 – 4.96 (м, 1H; 3'-H), 4.52 (д, *J*_{H,H} = 12 Гц, 1H; CH_aH_b), 4.42 (д, *J*_{H,H} = 12 Гц, 1H; CH_aH_b), 4.18 (т, *J*_{H,H} = 12 Гц, 1H; 3а'-CH), 3.81 (д, *J*_{H,H} = 12 Гц, 1H; 6а'-CH), 2.31 (с, 3H; Ar-CH₃), 2.20 (с, 3H; CH₃-ізатин), 1.58 м.ч. (д, *J* = 8 Гц, 3H; 3'-CH₃).

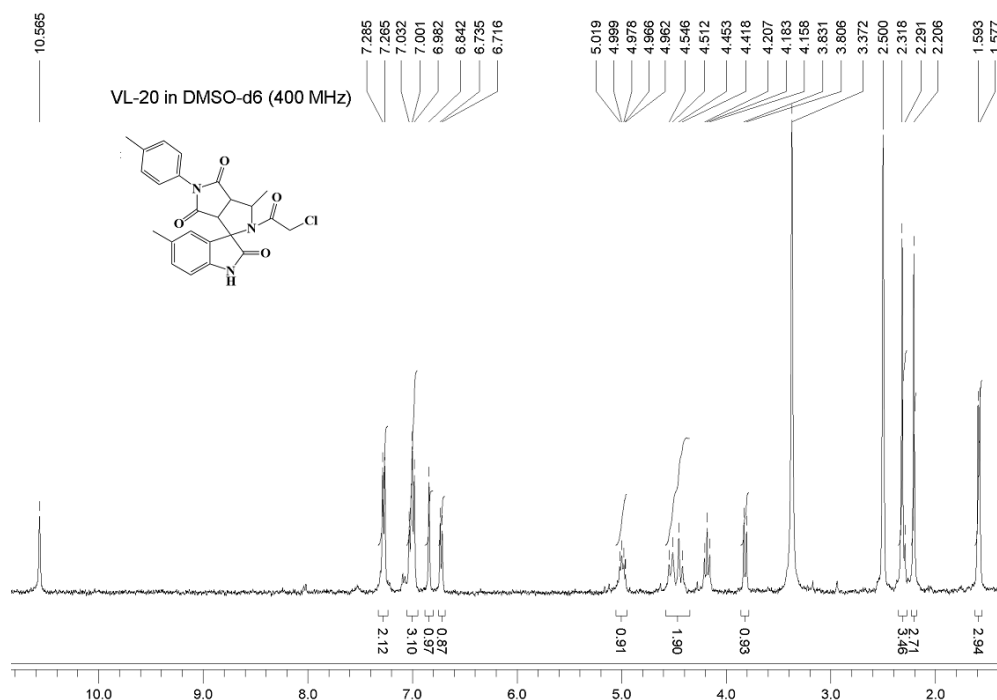


Рисунок 2.8 Спектр ЯМР ^1H сполуки **9b** у DMSO-d₆.

3',5'-Диметил-5-хлоро-2'-(2-хлороацетил)-2',3',3a',6a'-тетрагідро-4'H-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'(5'H)-трион (9c). Вихід 77 %. $T_{\text{пл.}} = 255^\circ\text{C}$ ^1H ЯМР (400 МГц, [D₆] DMSO) $\delta = 10.76$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.28 – 6.84 (м, 7H; Ar-H), 4.93– 4.88 (м, 1H; 3'-H), 4.55 (д, $J_{\text{H,H}} = 12$ Гц, 1H; CH_aH_b), 4.2 (д, $J_{\text{H,H}} = 12$ Гц, 1H; CH_aH_b), 3.96 (т, $J_{\text{H,H}} = 8$ Гц, 1H; 3a'-CH), 3.75 (д, $J_{\text{H,H}} = 8$ Гц, 1H; 6a'-CH), 2.78 (с, 3H; 5'-CH₃), 1.37 м.ч. (д, $J = 8$ Гц, 3H; 3'-CH₃).

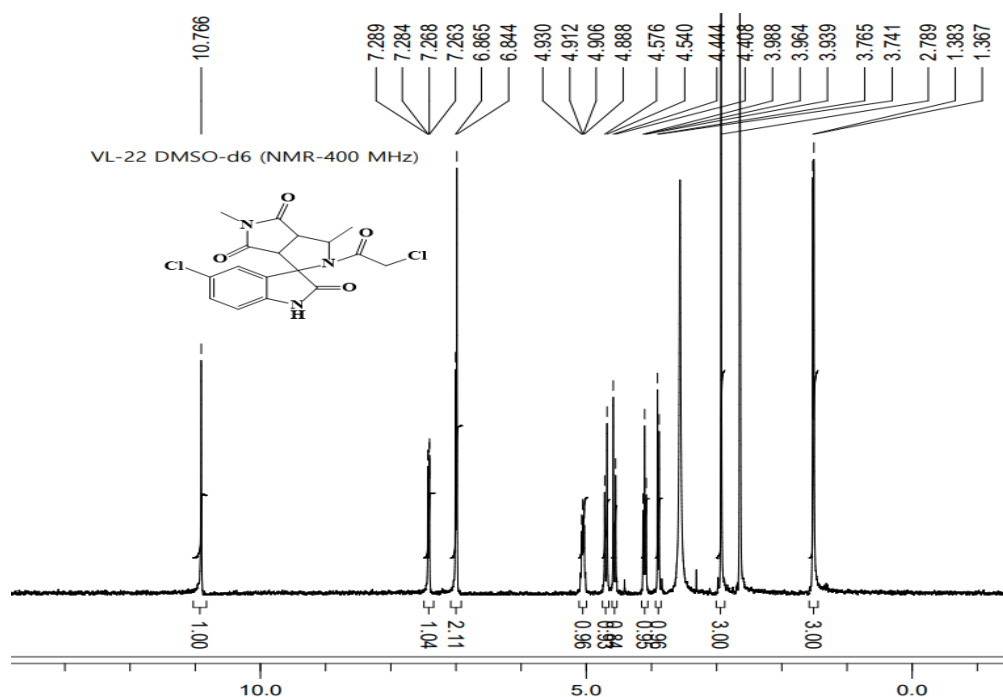


Рисунок 2.9 Спектр ЯМР ^1H сполуки **9c** у DMSO-d₆.

3'-Метил-5'-(*n*-толіл)-2'-(2-хлороацетил)-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (9d). Вихід 45%. $T_{пл}$ 245°C. 1H ЯМР (400 МГц, $[D_6]$ DMSO) δ =10.40 (с, 1H; NH-ізатин), 7.33 – 6.79 (м, 7H; Ar-H), 4.34– 4.31 (м, 1H; 3'-H), 3.56 (д, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; CH_aH_b), 3.52 (д, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; CH_aH_b), 3.41 (т, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; 3а'-CH), 2.36 (с, 3H; Ar-CH₃), 1.26м.ч. (д, $J = 8$ Гц, 3H; 3'-CH₃).

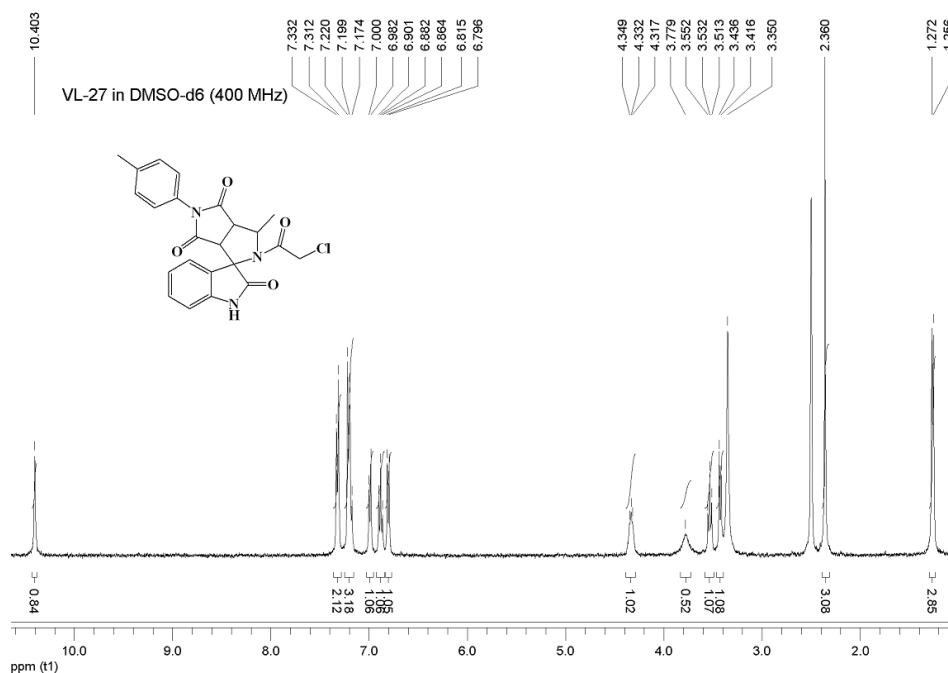
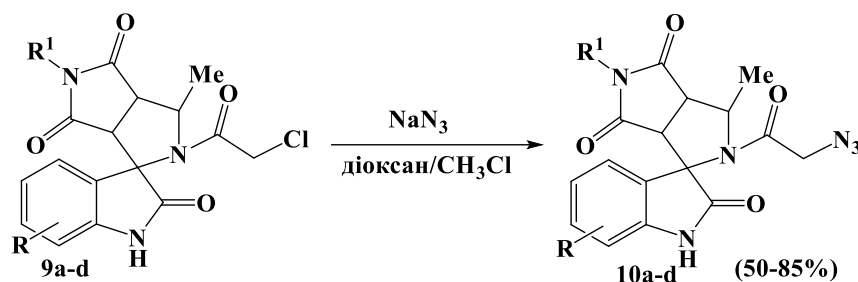


Рисунок 2.10 Спектр ЯМР 1H сполуки **9d** у DMSO- d_6 .

2.1.6 Синтез азидів спірооксіндолів (10a-d)

Спіропіролідін-3,2'-спірооксіндол 30 (0.75 ммоль) розчиняють у 5 мл суміші диоксан-ацетонітрил (1:1) (за необхідності додати суміші розчинника до повного розчинення похідної 30), додають 0.85 ммоль натрію азиду та кип'яють зі зворотнім холодильником 8-24 год (Схема 2.5). Проходження реакції контролюють за ТШХ (хлороформ:метанол). Після завершення реакції розчин фільтрують, упарюють маточний розчин, додають метанол, фільтрують одержаний осад, промивають невеликою кількістю метанолу та води. Осад сушать на повітрі [37].



2'-(2-Азидоацетил)-3'-метил-5'-(*n*-толіл)-7-хлоро-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (10а). Вихід 85%. $T_{\text{пл}} = 255^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (400 МГц, $[\text{D}_6]$ DMSO) $\delta = 10.82$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.30 – 6.87 (м, 7H; Ar-H), 4.94-4.90 (м, 1H; 3'-H), 4.23 (с, 2H; CH_2), 4.17 (т, $J_{\text{H,H}} = 12$ Гц, 1H; 3а'-CH), 4.01 (д, $J_{\text{H,H}} = 12$ Гц, 1H; 6а'-CH), 2.33 (с, 3H; Ar- CH_3), 1.50 м.ч. (д, $J_{\text{H,H}} = 8$ Гц, 3H; 3'- CH_3). Мас-спектр, m/z : 479 $[\text{M}^{(35)\text{Cl}}]^+$, 480 $[\text{M}^{(35)\text{Cl}+^{37}\text{Cl}}]^+$, 481 $[\text{M}^{(37)\text{Cl}}]^+$.

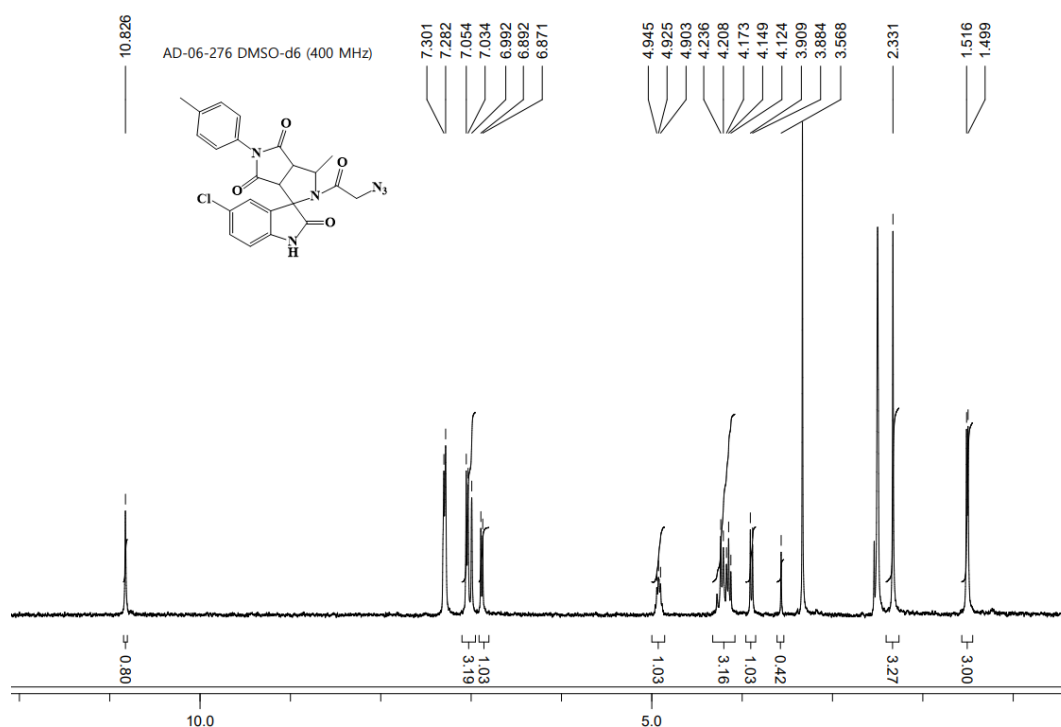


Рисунок 2.11 Спектр ЯМР ^1H сполуки **10а** у DMSO- d_6 .

2'-(2-Азидоацетил)-3',5-диметил-5'-(*n*-толіл)-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (10b). Вихід 59%. $T_{\text{пл}} = 260^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (400 МГц, $[\text{D}_6]$ DMSO) $\delta = 10.53$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.28 – 6.67 (м, 7H; Ar-H), 4.87 (дд, $J_{\text{H,H}} = 12$, 6.6 Гц, 1H; 3'-H), 4.25 – 4.05 (м, 3H; CH_2 ; 3а'-CH), 3.79 (д, $J_{\text{H,H}} = 10.0$ Гц, 1H; 6а'-CH), 2.29 (с, 3H; Ar- CH_3), 2.18 (с, 3H; CH_3 -ізатин), 1.51 м.ч. (д, $J_{\text{H,H}} = 6.8$ Гц, 3H; 3'- CH_3).

2'-(2-Азидоацетил)-3'-метил-5'-(*n*-толіл)-7-хлоро-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (10с). Вихід 85%. $T_{пл} = 255^{\circ}C$. 1H ЯМР (400 МГц, $[D_6]$ DMSO) $\delta = 10.82$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.30 – 6.87 (м, 7H; Ar-H), 4.94-4.90 (м, 1H; 3'-H), 4.23 (с, 2H; CH₂), 4.17 (т, $J_{H,H} = 12$ Гц, 1H; 3а'-CH), 4.01 (д, $J_{H,H} = 10.1$ Гц, 1H; 6а'-CH), 2.33 (с, 3H; Ar-CH₃), 1.50 м.ч. (д, $J_{H,H} = 8$ Гц, 3H; 3'-CH₃). Мас-спектр, m/z : 479 $[M(^{35}Cl)]^+$, 480 $[M(^{35}Cl+^{37}Cl)]^+$, 481 $[M(^{37}Cl)]^+$.

2'-(2-Азидоацетил)-3',5-диметил-5'-(*n*-толіл)-2',3',3а',6а'-тетрагідро-4'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2,4',6'(5'*H*)-трион (10d) Вихід 55%. Т. пл. $250^{\circ}C$. Вихід 59%. Т. пл. $260^{\circ}C$. 1H ЯМР (400 МГц, $[D_6]$ DMSO) $\delta = 10.66$ (с, 1H; NH-ізатин), 7.27 – 6.83 (м, 8H; Ar-H), 4.89 (дд, $J_{H,H} = 8$ Гц, 1H; 3'-H), 4.50-4.49 (м, 3H; CH₂), 4.19-4.15 (т, $J_{H,H} = 12.0$ Гц, 3H; 3а'-CH), 3.85 (д, $J_{H,H} = 8.0$ Гц, 1H; 6а'-CH), 2.31 (с, 3H; CH₃), 1.52 (д, $J_{H,H} = 8$ Гц, 3H; 3'-CH₃).

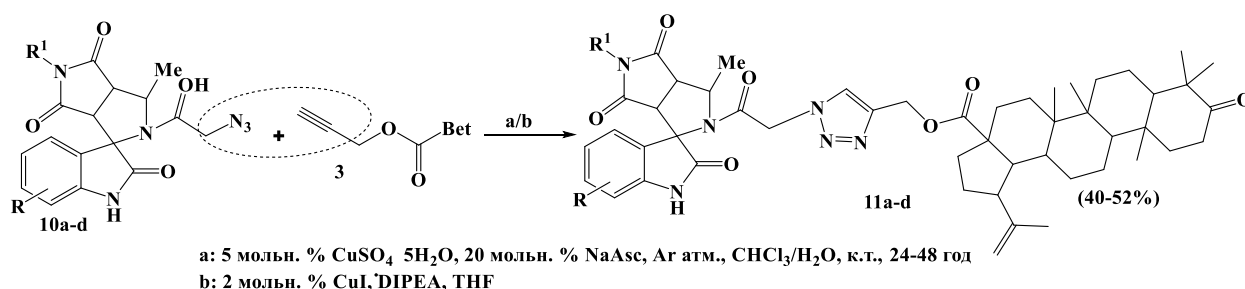
2.1.7 Синтез сполук-гібридів бетулонової кислоти (11a-d)

Метод А: Азид **10a** (0.5 ммоль) розчиняють у мінімальній кількості хлороформу (20-40 мл), додають пропаргілбетулонат (0.5ммоль) і перемішують. Наважку сульфату купруму 8 мг (5 мол.%) розчиняють у 2 мл води, та додавали до водного розчину 24 мг (20 мол.%) натрій аскорбату (Схема 2.6). Утворений жовтий комплекс додають у розчин вихідних сполук у хлороформі та залишали за кімнатної температури при інтенсивному перемішуванні протягом 8-48 годин. Контроль реакції проводили за ТШХ. По закінченню реакції органічну фазу відокремлювали на ділильній воронці, сушили сульфатом натрію та упарювали. Залишок очищали колонковою хроматографією з використанням суміші хлороформ-метанол 10:1 (20:1) у ролі елюента.

Метод Б: Азид **10b-d** (0.5 ммоль) розчиняють у мінімальній кількості тетрагідрофурану (10% мольних), додають пропаргілбетулонат (0.55ммоль) і перемішують. До одержаного розчину додають купрум(I) йодид (10 мг) та DIPEA (20% мольних) та залишають за кімнатної температури при інтенсивному перемішуванні протягом 8-48 годин (Схема 2.6). Контроль реакції проводили за ТШХ (елюент хлороформ-метанол(10:1 або 20:1)). Присутність азиду **10** контролюють наступним способом: пластинку ТШХ після проведення тонкошарової

хроматографії занурюють у 10% розчин трифенілфосфіну у дихлорометані на 30 секунд, після чого пластинку обережно висушують за температури не вище 60°C і занурюють у спиртовий розчин нінгідріну. За наявності азиду спостерігається характерне забарвлення плями, що відповідає позитивному аналітичному сигналу нінгідрінової проби на аміногруппу, що утворюється з азидної. Продукт азид-алкінового циклоприєднання характерного забарвлення не дає. Після повного проходження реакції одержаний розчин упарюють досуха, розчиняють у хлороформі (10 мл), додають розчин 1М хлороводневої кислоти (2 мл) і перемішують протягом 30 хвилин. Органічний шар відділяють, упарюють та очищають за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (елюент хлороформ-метанол(10:1)) [38].

Схема 2.6



(1-(2-(5-Хлоро-3'-метил-2,4',6'-триоксо-5'-(*n*-толіл)-3',3а',4',5',6',6а'-гексагідро-2'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2'-іл)-2-оксоетил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-іл)метил-3-оксолуп-20(29)-ен-28-карбоксилат (11а). Вихід 40%.
T_{пл.} = 250°C. ¹H ЯМР (400 МГц, [D₆]ДМСО) δ=10.71 (с, 1H; NH-ізатин), 8.30 (с, 1H; CH-триазол), 7.99 – 6.81 (м, 7H; H-Ar), 5.68 (м, 1H; 3'-CH), 5.68 (м, 1H; CH₂), 5.11 (м, 1H; CH₂), 4.68-4.57 (д, 2H, CH₂=), 4.22 (т, 1H, J=12 Гц, 3а'-CH), 3.93 (д, 1H, J= 12 Гц, 6а'-CH), 2.93 (м, 1H, C¹⁹H), 2.33 (с, 3H, CH₃-Tol), 1.73 (с, 3H, C³⁰H₃), 0.97, 0.93, 0.85, 0.78, 0.73 (с, 15H, 5 CH₃).

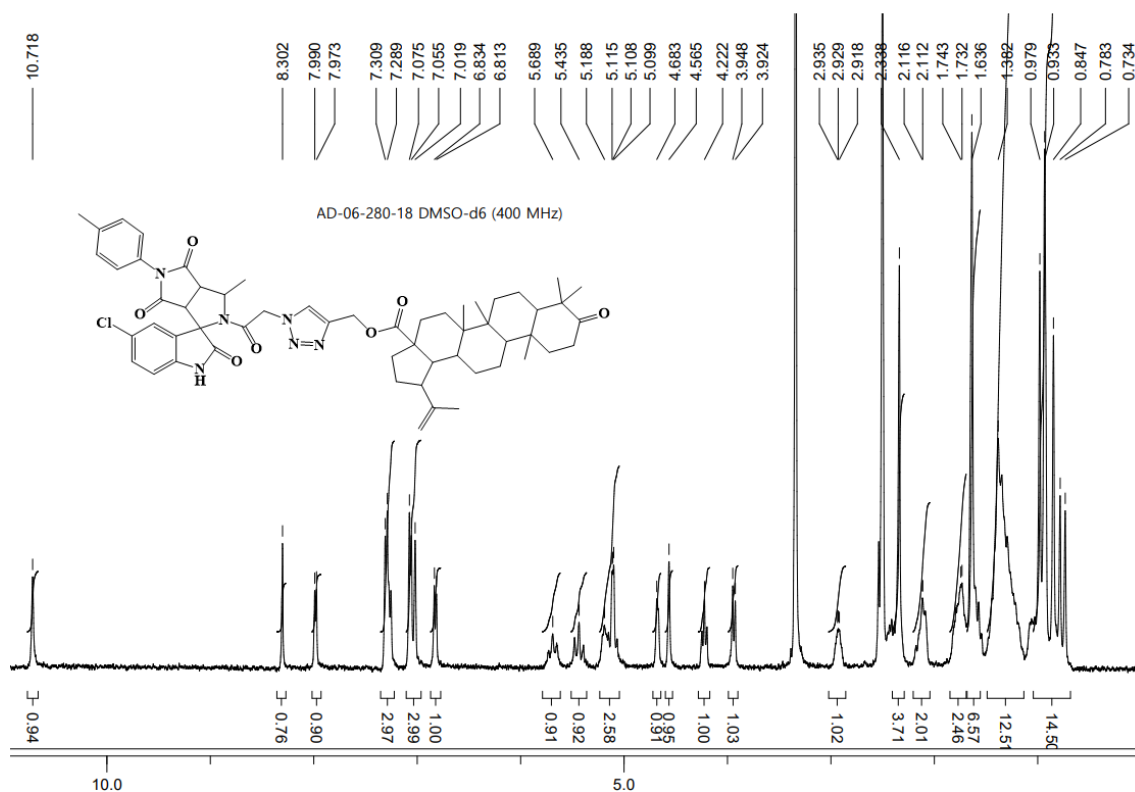


Рисунок 2.12 Спектр ЯМР ^1H сполуки **11a** у DMSO- d_6 .

(1-(2-(3',5-Диметил-2,4',6'-триоксо-5'-(*n*-толіл)-3',3a',4',5',6',6a'-гексагідро-2'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2'-іл)-2-оксоетил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-іл)метил-3-оксолуп-20(29)-ен-28-карбоксилат (11b). Вихід 50%. Т. пл. 248°C. ^1H ЯМР (400 МГц, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) δ =10.42 (с, 1H; NH-ізатин), 7.98 – 7.84 (д, 1H; CH-триазол), 7.31 – 6.52 (м, 7H) ; H-Ar, 5.61 (м, 1H; CH_aH_b), 5.37 (м, 1H; CH_aH_b), 5.11-5.06 (м, 3H; 3'-H+CH₂), 4.64 (с, 1H; C²⁹H_aH_b-бет), 4.53 (с, 1H; C²⁹H_aH_b-бет), 4.22 (т, $J_{\text{H,H}} = 10.1$ Гц, 1H; 3a'-CH), 3.83 (д, $J_{\text{H,H}} = 10.0$ Гц, 1H; 6a'-CH), 2.89 (с, 1H; C¹⁹H), 2.29 (с, 3H, Ar-CH₃), 2.18 (с, 3H, CH₃-ізатин), 1.60 (с, 3H; C³⁰CH₃), 0.95(с, 3H; CH₃), 0.90 (с, 6H; 2CH₃), 0.81 м.ч. (с, 3H; CH₃). Мас-спектр, m/z : 951 $[\text{M}]^+$.

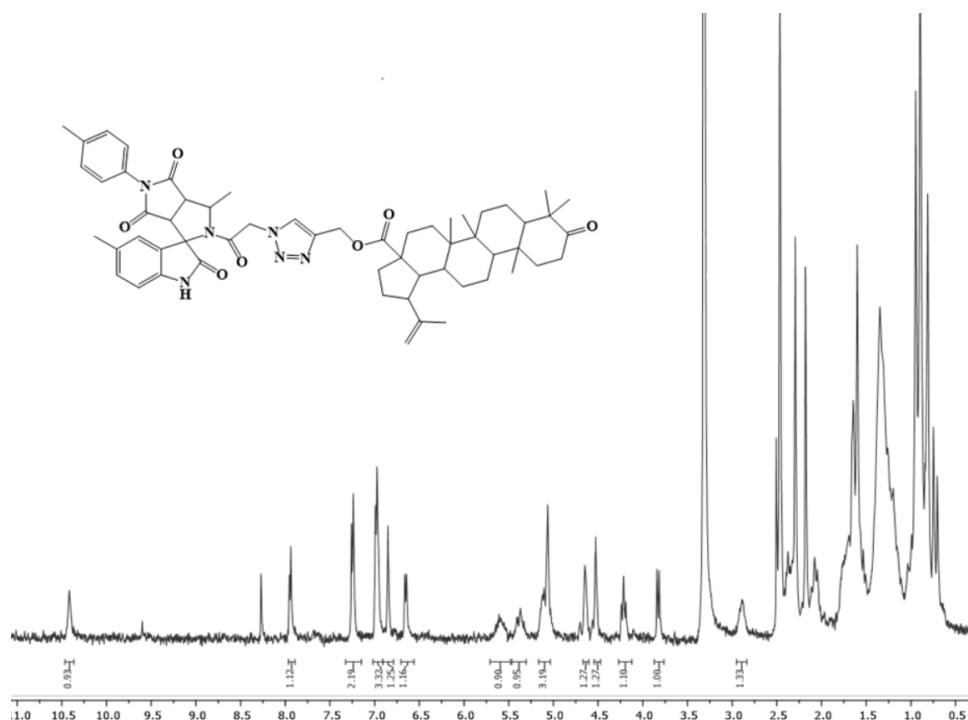


Рисунок 2.13 Спектр ЯМР ^1H сполуки **11b** у DMSO-d_6 .

(1-(2-(3'-Метил-2,4',6'-триоксо-5'-(*n*-толіл)-3',3a',4',5',6',6a'-гексагідро-2'*H*-спіро[індолін-3,1'-піроло[3,4-*c*]пірол]-2'-іл)-2-оксоетил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-іл)метил-3-оксолуп-20(29)-ен-28-карбоксилат (11d). Вихід 45%. $T_{\text{пл.}} = 255^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (400 МГц, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) $\delta = 10.71$ (с, 1H; NH-ізатин), 8.30 (с, 1H; CH-триазол), 7.86 – 6.98 (м, 7H; H-Ar), 5.58 (м, 1H; 3'-CH), 4.74 (м, 1H; CH_2), 4.15 (м, 1H; CH_2), 4.08-4.01 (д, 2H, $\text{CH}_2=$), 3.98 (т, 1H, $J=10$ Гц, 3a'-CH), 3.63 (д, 1H, $J=10$ Гц, 6a'-CH), 2.73 (м, 1H, C^{19}H), 2.37 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{-Tol}$), 1.44 (с, 3H, C^{30}H_3), 0.98, 0.95, 0.87, 0.75, 0.72 (с, 15H, 5 CH_3).

Випробування антибактеріальної активності синтезованих сполук

Спектр антибактеріальних властивостей сполук **2**, **7b**, **11b** оцінювали, виходячи зі значень мінімальної концентрації, яка пригнічувала ріст мікроорганізмів (МПК) мікрометодом серійних двократних розведень у бульйоні Мюллера-Хінтона (Biolife Italiana Srl., Italy). Випробування проводили в одноразових полістирольних 96-лункових планшетах для імунологічних досліджень (Biosigma, Italy) з використанням механічних 8-канальних дозаторів Proline Plus. Аналізи виконували

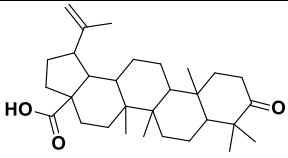
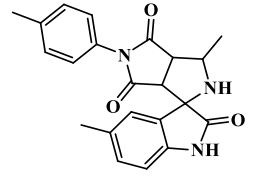
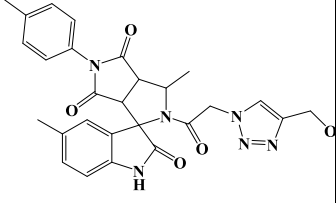
у відповідності з рекомендаціями CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute USA) [39-41].

До лунок планшету вносили досліджувані сполуки, концентрація яких в загальному об'ємі середовища 200 *мкл* складала 500; 250; 125; 62,5; 31,25 та 15,6 *мкг/мл*. Колекційні референтні штами бактерій: грам-негативні культури – *Escherichia coli* (штам ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (штам ATCC 27853) та грам-позитивні культури – *Bacillus subtilis* (штам ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (штам ATCC 25923) були використані як тест системи. Для приготування інокуляту з ізольованих колоній мікроорганізмів, що знаходились в експоненціальній фазі зростання, готували суспензію за стандартом McFarland 0.5 у фізіологічному розчині. Суспензію розводили у бульйоні Мюллера-Хінтона до концентрації 10^5 КУО/*мл* та вносили по 100.0 *мкл* до лунок планшету, які містили 100.0 *мкл* відповідних розведень досліджуваних сполук, і в одну лунку з 100.0 *мкл* поживного бульйону без препаратів як "негативний контроль". Стерильність середовища контролювали за спеціально виділеними для цієї мети лунками мікротитрувального планшета, в які не вносять розчини сполук і мікробну суспензію, інокульовані планшети інкубували 18-24 год при 37 °C. Кожен експеримент повторювали тричі.

Облік результатів проводили візуально та спектрофотометрично, порівнянням зростання мікроорганізму у присутності досліджуваної сполуки із зростанням культури у лунці без неї. За мінімальну бактериостатичну концентрацію (МПК) приймали ту найменшу кількість речовини, вираженої в *мкг/мл*, в присутності якої відбувалося пригнічення росту культури (відсутній видимий ріст мікроорганізмів). Висіваючи вміст пробірок з відсутністю ознак росту на м'ясопептонний агар у чашках Петрі, визначали мінімальну бактерицидну концентрацію. Оптичну щільність середовища в процесі зростання культур вимірювали за допомогою мікропланшетного фотометра Sunrise RC (Tecan Austria GmbH, Austria) при довжині хвилі 620 *нм*.

Як еталон порівняння використано препарат хінолінового ряду – нітроксолін. Проведені додаткові дослідження за представленого діапазону концентрацій не виявили мінімальної бактерицидної концентрації для цих структур. Результати експериментів подані у табл. 2.1 З наведених даних випливає, що досліджувані сполуки поступаються за активністю референс-речовині – нітроксоліну.

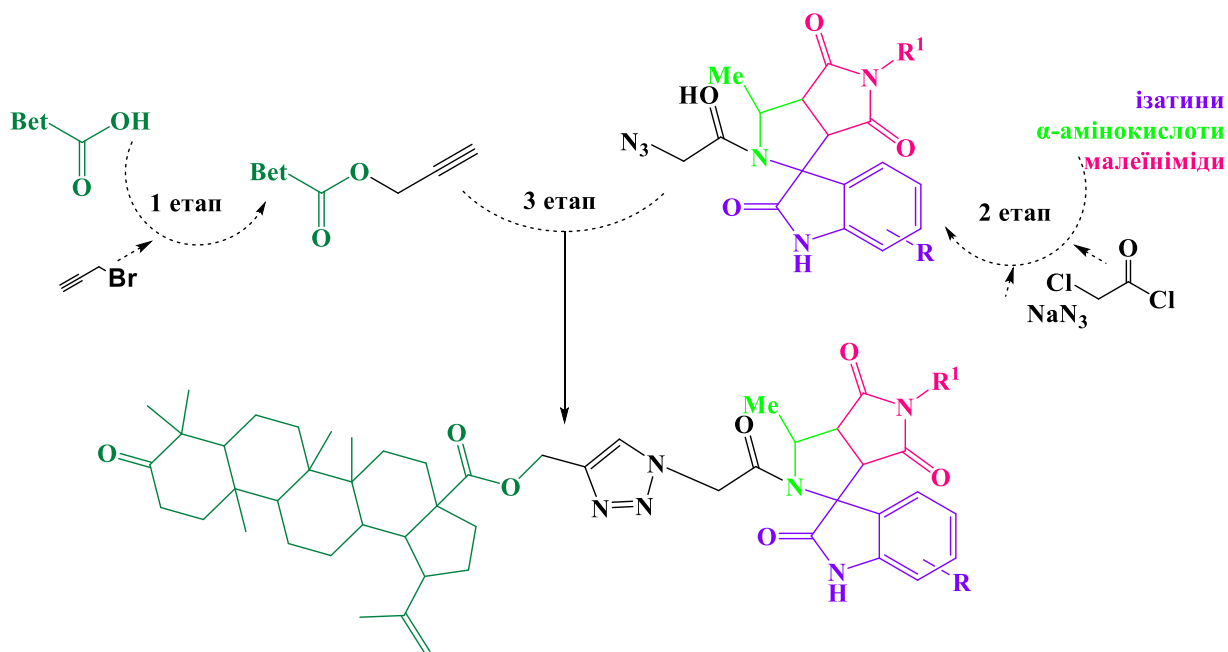
Табл. 2.1 – Антимікробна активність сполук

№	Шифр	Формула сполуки	МПК/МБК (мкг/мл)	Штами бактерій			
				<i>Escheri chia coli</i>	<i>Pseudo monas aerugin osa</i>	<i>Bacill us subtilis</i>	<i>Staphyloc occus aureus</i>
1	2		МПК	-	-	-	-
			МБК	-	-	-	-
2	7b		МПК	125	250	250	500
			МБК	-	-	-	-
3	11b		МПК	62,5	-	250	-
			МБК	-	-	-	-
4	Еталон	Нітроксолін	МПК	15,6	62,5	31,25	1,9
			МБК	15,6	62,5	31,25	1,9

3.ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ефективним методом створення нових гібридних молекул, похідних бетулонової кислоти та спіропіролідін-3,2'-оксоіндолів, є використання методології «клік-хімії», яка дозволяє одержати цільові сполуки з високими виходами, що є важливим при проведенні багатостадійного синтезу. Азид-алкінове циклоприєднання, що каталізується іонами міді(I), є прийнятним для широкого спектру субстратів та дозволяє оптимізувати умови, використовуючи різноманітні розчинники та каталітичні системи. Виходячи з цього ми визначили наступний шлях побудови цільових кон'югатів (Схема 3.1).

Схема 3.1



Проведення мідь(I)-каталізованого азид-алкінового циклоприєднання для обраних реагентів потребує введення термінального потрійного зв'язку у молекулу бетулонової кислоти та азидної групи у спіропіролідін-3,2'-оксоіндоли, які попередньо синтезують у реакції 1,3-диполярного циклоприєднання ізатинів, α -амінокислот та малеїнімідів.

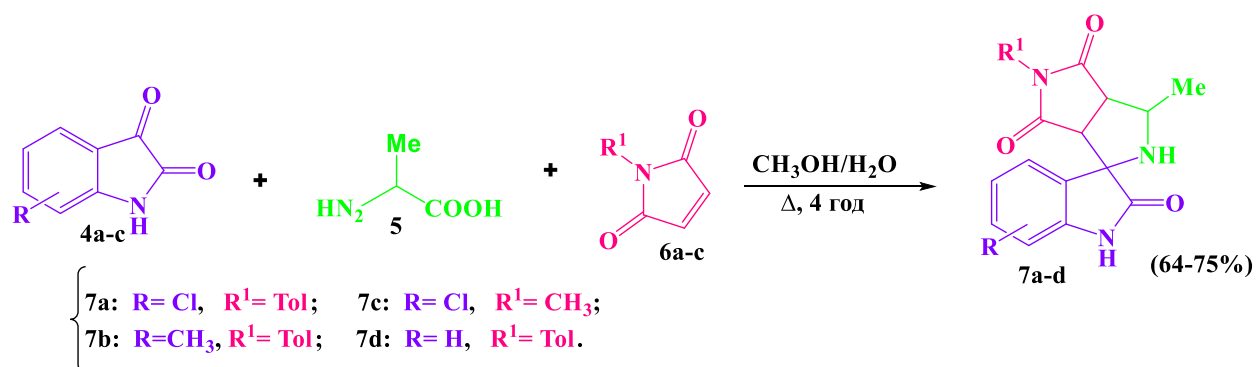
На першому етапі було виділено бетулін **1** з природної сировини – кори берези шляхом екстракції хлороформом в апараті Сокслета протягом 8-10 год. Одержаний лупанойд **1** кристалізували з 2-пропанолу. Бетулонову кислоту **2** синтезували

окисненням бетуліну **1** хромовим ангідридом в ацетатній кислоті і очищали колонковою хроматографією на силікагелі, елюент: хлороформ-етилацетат (9:1). Далі кислоту **2** перетворювали на пропаргіловий естер **3** кип'ятінням з пропаргілбромідом в ацетоні у присутності K_2CO_3 .

Синтез спіропіролідін-3,2'-оксоіндолів за реакцією 1,3-диполярного циклоприєднання є зручним методом створення цільових сполук шляхом конденсації ізатину, α -амінокислоти та диполярофілу, у ролі якого було обрано похідні малеїміду. Цей метод дозволяє варіювати вихідні амінокислоти, ізатини та 1,3-диполярофіли у широкому діапазоні що значно розширює молекулярне різноманіття одержуваних речовин.

Отже, синтез нових похідних спіропіролідін-3,2'-оксоіндолів проводили за реакцією 1,3-диполярного циклоприєднання відповідних ізатинів **4a-c**, α -амінокислоти **5** та малеїнімідів **6a-c** при кип'ятінні у водно-спиртовій суміші (Схема 3.2). Реакція є регіоселективною та веде до утворення енантіомерної суміші спіропіролідін-3,2'-оксоіндолів **7a-d** з високими виходами (Таблиця 3.1).

Схема 3.2

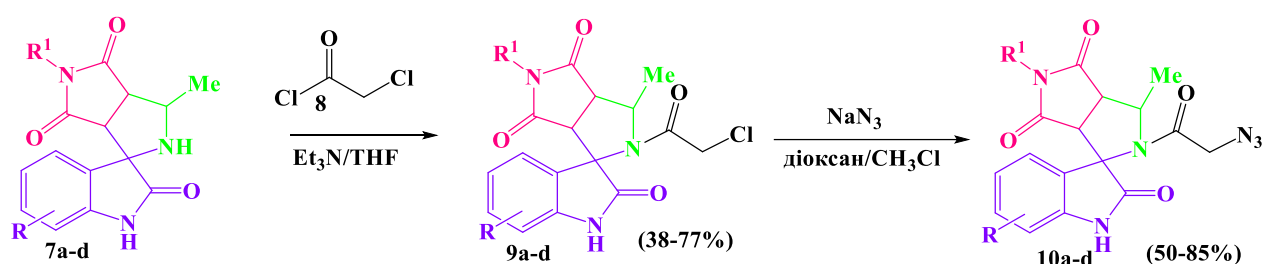


Таблиця 3.1 Деякі характеристики спірооксіндолів 7.

№	R	R ¹	Вихід, %	T _{пл} , °C
7a	5-Cl	Tol	72	220
7b	5-CH ₃	Tol	75	205
7c	5-Cl	CH ₃	64	204
7d	5-H	Tol	70	210

Ацилювання спірооксіндолів може проходити за амінним або за амінім і амідним атомами азоту та зазвичай проводиться за умов основного каталізу, що є несприятливим для фрагмента ізатину. Тому, ми використовували у ролі розчинника THF, у якому вихідні сполуки добре розчинні. А каталізатором виступав триетиламін. Продукти реакції **9** було одержано при охолодженні на льодяній бані з помірними виходами. Подальше нуклеофільне заміщення хлору на азидну групу у сполуках **9** (Схема 3.3, Таблиця 3.2) проведено з використанням NaN₃ у системі ацетонітрил-діоксан із одержанням ряду нових азидопохідних спіропіролідін-3,2'-оксіндолів **10**. Використання чистого ацетонітрилу, що є звичайним розчинником для даної реакції, було неефективним, адже хлороацетати **9** у ньому є низькорозчинними.

Схема 3.3

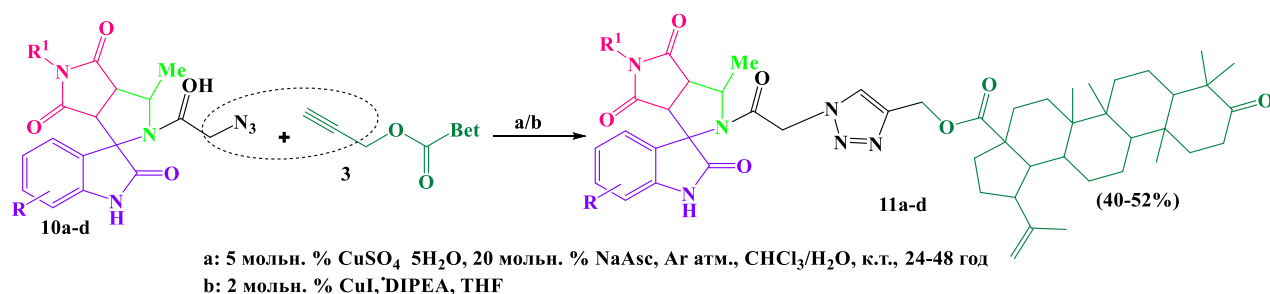


Таблиця 3.2 Деякі характеристики сполук **9**, **10**.

Спірооксоіндол, 7			Хлоропохідна, 9			Азид, 10		
№	R	R ¹	№	Вихід, %	T _{пл.} , °C	№	Вихід, %	T _{пл.} , °C
7a	5-Cl	Tol	9a	63	250	10a	85	255
7b	5-CH ₃	Tol	9b	38	250	10b	59	260
7c	5-Cl	CH ₃	9c	77	255	10c	50	260
7d	5-H	Tol	9d	45	245	10d	55	250

Наступне мідь-каталізоване азид-алкінове циклоприєднання за участю азидів **10** та естеру бетулонової кислоти **3** було проведено гетерофазно у системі CHCl₃-H₂O (Схема 3.4). Джерелом Cu(I) було обрано CuSO₄·5H₂O, що відновлювався від Cu(II) до Cu(I) натрій аскорбатом. Для сповільнення окиснення міді(I) реакцію проводили в інертній атмосфері. Однак було виявлено, що процес проходить не дуже добре і вкрай чутливий до розчинності азидів **10**: у випадках малорозчинної сполуки **10a** доводилося використовувати надлишок розчинника; реакція проходила дуже повільно і цільовий кон'югат **11a** одержано з невисоким виходом 40% (табл.3.3). Тому для подальших синтезів ми обрали систему тетрагідрофуран купрум(I) йодид (10 мг) та DIPEA, що дозволило підвищити вихід сполук-гібридів.

Схема 3.4



Таблиця 3.3 Деякі характеристики сполук **11**.

Сполука-кон'югат, 11				
№	R	R ¹	Вихід, %	T _{пл.} , °C
11a	5-Cl	Tol	40	250
11b	5-CH ₃	Tol	50	248
11c	5-Cl	CH ₃	52	255
11d	5-H	Tol	45	255

Аналіз складу та будови сполук **7-11** було зроблено на основі даних спектроскопії ¹H ЯМР та мас-спектрометрії. Так, для спіропіролідін-3,2'-оксоіндолів **7** характерним була наявність сигналу протону амідної групи ізатину при δ 10.30 – 10.56 м.ч. Сигнал протону 3' є мультиплетом, та розташований при δ 4.22 – 4.34 м.ч.; сигнал вторинної аміногрупи – дублет біля δ 3.70 – 3.89 м.ч.; сигнали протонів 3a' та 6a' розташовані у діапазоні 3.31 – 3.53 м.ч. (див. рис. 2.3- 2.6).

Ацилювання сполук **7** приводить до зникнення сигналів аміногрупи 2'NH, та появи двох дублетів, що відповідають діастереотопним протонам CH_aN_b хлороацетатної групи, розташованих при 4.59 – 3.52 м.ч. При цьому спостерігається незначне зміщення сигналів протонів 3a', 6a' та 3' у слабке поле (3' 5.01 – 3.41 м.ч., 3a' та 6a' 3.75 – 4.18 м.ч.). Введення азидної групи значним чином на картину одержаних спектрів не впливає: спостерігається зміщення протонів метиленового фрагмента лінкерної групи у область 4.03 – 4.50 м.ч. та їх зближення, в результаті чого, на спектрах ¹H ЯМР вони виглядають як єдиний мультиплет (Рис. 2.7 – 2.11).

Молекули-гібриди **11** у спектрах ¹H ЯМР мають характерні сигнали спіропіролідін-3,2'-оксоіндолів та лупанової платформи. Так, на прикладі сполуки **11a** (Рис.2.12) присутні сигнал амідного протону ізатину при 10.71 м.ч, сигнали протонів 3', 3a', 6a' при 5.68, 4.22 та 3.93 м.ч., відповідно. Протони метильних груп лупанової пдatformи розташовані у діапазоні 1.73 – 0.73 м.ч. Характерною відмінністю спектрів вихідних сполук та утвореного продукту є поява сигналу СН-групи з δ 8.30 м.ч, що відповідає протону у 1,2,3-триазольному фрагменті.

Результати дослідження антибактеріальної активності окремих з синтезованих сполук свідчать про те, що сполуки **7b**, **11b** гальмують ріст тест-мікроорганізмів, проявляючи слабку антимікробну дію (Таблиця 2.1).

Досліджувані сполуки пригнічували як грам-негативні культури (штами *E.coli*, *Ps. aeruginosa*), так і грам-позитивні (штам *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). Найбільш ефективно гальмування росту *E. coli* відбувалося під впливом похідних спіроксоіндолів **7b**, **11b**. Сполука **11b** проявляє бактеріостатичний вплив при 62,5 мкг/мл, а сполука **7b** при 125 мкг/мл (МПК). По відношенню до *Pseudomonas aeruginosa* був виявлений слабкий бактеріостатичний вплив на рівні 250-500 мкг/мл у сполуки **7b**.

Відносно *B. subtilis* антибактеріальну активність виявлено у сполук **7b**, **11b**, вони пригнічують ріст даного штаму при 250 мкг/мл. Втім субстанції, що досліджувались, суттєво поступаються за дією референс-речовини – нітроксоліну.

ВИСНОВКИ

Виходячи з даних літературних джерел, сплановано і реалізовано шлях синтезу сполук-гібридів, які об'єднують у структурі природну лупанову молекулярну платформу з фрагментом спіропіролідін оксіндолів.

1. Розроблено селективний метод ацилювання спіропіролідін-3,2'-оксоіндолів, одержаних у результаті реакції 1,3-диполярного циклоприєднання ізатинів, α -аланіну та похідних малеїніміду і синтезовано нові гетероциклічні азиди на їх основі.

2. У «клік»-реакції пропаргілового естеру бетулонової кислоти та нових гетероциклічних азидів синтезовано не описані раніше кон'югати бетулонової кислоти фрагментом 3-спіропіролідін-2-оксіндолів

3. Досліджено властивості одержаних молекул-гібридів *in vitro* по відношенню до чотирьох штамів бактерій (*B. Subtilis*, *E. Coli*, *S. Aureus*, *Ps. Aeruginosa*).



ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Guo Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharm. Sin. B* **2017**, 7(2), 119-136.
2. Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность. *Химия в интересах устойчивого развития* **2005**, 13, 1-30.
3. Bębenek E., Chrobak E., Marciniak K., Kadela-Tomanek M., Trynda J., Wietrzyk J., Boryczka S. Biological activity and in silico study of 3-modified derivatives of betulin and betulinic aldehyde. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (6), 1372 -1380.
4. Periasamy G., Teketelew G., Gebrelibanos M., Sintayehu B., Gebrehiwot M., Karim A., Geremedhin G. Betulinic acid and its derivatives as anti-cancer agent : a review. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2014**, 6 (3), 47-58.
5. Rosini M., Andrisano V., Bartolini M., Bolognesi M. L., Hrelia P., Minarini A., Tarozzi A., Melchiorre C. Rational approach to discover multipotent anti-Alzheimer drugs. *J Med Chem.* **2005**, 48 (2), 360–363.
6. Cavalli A., Bolognesi M. L., Minarini A., Rosini M., Tumiatti V., Recanatini M., Melchiorre C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J Med Chem.* **2008**, 51 (3), 347–372.
7. Tatsuzaki J., Taniguchi M., Bastow K. F., Nakagawa-Goto K., Morris-Natschke S. L., Itokawa H., Lee K.-H. Anti-tumor agents 255: Novel glycyrrhetic acid–dehydrozingerone conjugates as cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15 (18), 6193–6199.
8. Nakagawa-Goto K., Yamada K., Nakamura S., Chen T.-H., Chiang P.-C., Bastow K. F., Lee K.-H. Antitumor agents. 258. Syntheses and evaluation of dietary antioxidant—taxoid conjugates as novel cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (18), 5204–5209.
9. Domling A., Wang W., Wang K. Chemistry and biology of multicomponent reactions. *Chem. Rev.* **2012**, 112 (6), 3083-3135.
10. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.

11. Shi W., Tang N., Yan W.-D. Synthesis and cytotoxicity of triterpenoids derived from betulin and betulinic acid via click chemistry. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2014**, 17 (2), 159–169.
12. Borkova L., Hodon J., Urban M. Synthesis of betulinic acid derivatives with modified a-rings and their application as potential drug candidates. *Asian J. Org. Chem.* **2018**, 7 (8), 1542–1560.
13. Sousa J.L.C., Albuquerque H.M.T., Silvestre A.J.D., Silva A.M.S. Decoration of a-ring of a lupane-type triterpenoid with different oxygen and nitrogen heterocycles. *Molecules* **2022**, 27, 4904.
14. Spivak A. Y., Gubaidullin R. R., Galimshina Z. R., Nedopekina D. A., Odinson V. N. Effective synthesis of novel C(2)-propargyl derivatives of betulinic and ursolic acids and their conjugation with β -d-glucopyranoside azides via click chemistry. *Tetrahedron* **2016**, 72 (9), 1249–1256.
15. Wang Q., Li Y., Zheng L., Huang X., Wang Y., Chen C.-H., Lee K.-H. Novel betulinic acid–nucleoside hybrids with potent anti-hiv activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, 11 (11), 2290–2293.
16. Spivak A. Y., Galimshina Z. R., Nedopekina D. A., Odinson V. N. Synthesis of new c-2 triazole-linked analogs of triterpenoid pentacyclic saponins. *Chem. Nat. Compd.* **2018**, 54 (2), 315–323.
17. Majeed R., Sangwan P. L., Chinthakindi P. K., Khan I., Dangroo N. A., Thota N., Hamid A., Sharma P. R., Saxena A. K., Koul S. Synthesis of 3-O-propargylated betulinic acid and its 1,2,3-triazoles as potential apoptotic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 63, 782–792.
18. Özdemir Z., Rybková M., Vlk M., Šaman D., Rárová L., Wimmer Z. Synthesis and pharmacological effects of diosgenin–betulinic acid conjugates. *Molecules* **2020**, 25 (15), 3546.
19. Zhong Y., Liang N., Liu Y., Cheng M.-S. Recent progress on betulinic acid and its derivatives as antitumor agents: a mini review. *Chin J Nat Med* **2021**, 19 (9), 641–647.
20. Chakraborty B., Dutta D., Mukherjee S., Das S., Maiti N. C., Das P., Chowdhury C. Synthesis and biological evaluation of a novel betulinic acid derivative as

an inducer of apoptosis in human colon carcinoma cells (HT-29). *Eur. J. Med. Chem* **2015**, 102, 93–105.

21. Yamansarov E. Y., Lopatukhina E. V., Evteev S. A., Skvortsov D. A., Lopukhov A. V., Kovalev S. V., Majouga A. G. Discovery of bivalent galnac-conjugated betulin as a potent asgpr-directed agent against hepatocellular carcinoma. *Bioconjugate Chem.* **2021**, 32 (4), 763–781.

22. Stevaert A., Krasniqi B., Van Loy B., Nguyen T., Thomas J., Vandeput J., Naesens L. Betulonic acid derivatives interfering with human coronavirus 229e replication via the nsp15 endoribonuclease. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (9), 5632–5644.

23. Govdi A. I., Sokolova N. V., Sorokina I. V., Baev D. S., Tolstikova T. G., Mamatyuk V. I., Nenajdenko V. G. Synthesis of new betulinic acid–peptide conjugates and in vivo and in silico studies of the influence of peptide moieties on the triterpenoid core activity. *Med. Chem. Comm.* **2015**, 6 (1), 230–238.

24. Sousa J. L. C., Freire C. S. R., Silvestre A. J. D., Silva A. M. S. Recent developments in the functionalization of betulinic acid and its natural analogues: a route to new bioactive compounds. *Molecules* **2019**, 24 (2), 355.

25. Suman P., Patel A., Solano L., Jampana G., Gardner Z. S., Holt C. M., Jonnalagadda S. C. Synthesis and cytotoxicity of Baylis-Hillman template derived betulinic acid-triazole conjugates. *Tetrahedron* **2017**, 73 (29), 4214–4226.

26. Vasilevsky S. F., Govdi A. I., Shults E. E., Shakirov M. M., Sorokina I. V., Tolstikova T. G., Alabugin I. V. Efficient synthesis of the first betulonic acid–acetylene hybrids and their hepatoprotective and anti-inflammatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (14), 5164–5169.

27. Vasilevsky S. F., Govdi A. I., Sorokina I. V., Tolstikova T. G., Baev D. S., Tolstikov G. A., Alabugin I. V. Rapid access to new bioconjugates of betulonic acid via click chemistry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (1), 62–65.

28. Hodon J., Borkova L., Pokorny J., Kazakova A., Urban M. Design and synthesis of pentacyclic triterpene conjugates and their use in medicinal research. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 182, 111653.

29. Wang H., Xu R., Shi Y., Si L., Jiao P., Fan Z., Xiao S. Design, synthesis and biological evaluation of novel l-ascorbic acid-conjugated pentacyclic triterpene derivatives as potential influenza virus entry inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 110, 376–388.

30. Kadela-Tomanek M., Jastrzębska M., Marciniec K., Chrobak E., Bębenek E., Latocha M., Boryczka S. Design, synthesis and biological activity of 1,4-quinone moiety attached to betulin derivatives as potent DT-diaphorase substrate. *Bioorg. Chem.* **2021**, 106, 104478.
31. Shi W., Tang N., Yan W.-D. Synthesis and cytotoxicity of triterpenoids derived from betulin and betulinic acid via click chemistry. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2014**, 17 (2), 159–169.
32. Лабораторні роботи з хімії природних низькомолекулярних сполук: навчально-методичний посібник / В.В. Ліпсон, М.Л. Бабак, О.М. Семененко. – Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2017. – 56 с.
33. Melnikova N., Burlova I., Kiseleva T., Klabukova I., Gulenova M., Kislitsin A., Vasin V., Tanaseichuk B. A practical synthesis of betulonic acid using selective oxidation of betulin on aluminium solid support. *Molecules* **2012**, 17 (10), 11849–11863.
34. Govdi A. I., Vasilevsky S. F., Sokolova N. V., Sorokina I. V., Tolstikova T. G., Nenajdenko V. G. Betulonic acid–peptide conjugates: synthesis and evaluation of anti-inflammatory activity. *Mendeleev Commun.* **2013**, 23 (5), 260–261.
35. Pavlovskaya T. L., Red'kin R. G., Yaremenko F. G., Shishkina S. V., Shishkin O. V., Musatov V. I., Lipson V. V. Synthesis and chemical properties of new derivatives of 3a',6a'-dihydro-2'H-spiro-[indole-3,1'-pyrrolo[3,4-c]pyrrole]-2,4',6'(1H,3'H,5'H)-trione. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2013**, 49 (6), 882–896.
36. Soyer Z., Kılıc F. S., Erol K., Pabuccuoglu V. The synthesis and anticonvulsant activity of some ω -phthalimido-*N*-phenylacetamide and propionamide derivatives. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2004**, 337 (2), 105–111.
37. Cegielska B., Kacprzak K. M. Simple and convenient protocol for staining of organic azides on tlc plates by ninhydrin. A new application of an old reagent. *Chem. Anal. (Warsaw)* **2009**, 54 (4), 807–812.
38. Giguère D., Patnam R., Bellefleur M.-A., St-Pierre C., Sato S., Roy R. Carbohydrate triazoles and isoxazoles as inhibitors of Galectins-1 and -3. *Chem. Commun.* **2006**, 22, 2379–2381.
39. Cornaglia G., Hryniewicz W., Jarlier V., Kahlmeter G., Mittermayer H., Strachounski L., Baquero F. European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, 10(4), 349–383.

40. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. <http://shop.clsi.org/microbiology-documents/M07-M100-PK.html>

41. ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases; 2006. <https://www.iso.org/standard/41630.html>