

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



*Syntéza nových derivátů lupanu
v poloze 20 nebo 30*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Denisa Olejníková

Studijní obor:

Bioorganická chemie a chemická
biologie

Vedoucí práce:

Mgr. Jan Pokorný

Olomouc 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 17. 5. 2018

.....

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu Mgr. Janu Pokornému za cenné rady, trpělivé vedení a ochotnou pomoc při zpracování bakalářské práce.

Také bych chtěla poděkovat mému odbornému konzultantovi doc. RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. za veškerou výpomoc a věcné rady.

V neposlední řadě děkuji ostatním členům týmu doc. RNDr. Milana Urbana, Ph.D. za rady a pomoc, které mi během řešení problémů poskytli a také své rodině za psychickou podporu.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory projektů studentské grantové soutěže na UP s registračním číslem IGA_LF_2018_032.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Denisa Olejníková
Název práce:	Syntéza nových derivátů lupanu v poloze 20 nebo 30
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra organické chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Jan Pokorný
Odborný konzultant:	doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018

Abstrakt:

Předložená bakalářská práce se zabývá syntézou nových derivátů triterpenů modifikovaných v poloze C-30 pomocí Wittigovy reakce.

Teoretická část shrnuje základní rozdělení terpenů a jejich zástupce, přehled derivátů kyseliny betulinové modifikovaných v poloze C-30 a základní princip Wittigovy reakce.

V experimentální části bylo nejprve nutné optimalizovat metodu Wittigovy reakce na molekule triterpenů. Celkem bylo připraveno 10 nových sloučenin, které byly charakterizovány běžnými fyzikálně-chemickými metodami (^1H a ^{13}C NMR, IR, HRMS, teplota tání) a byly testovány na cytotoxické aktivity na osmi nádorových a dvou nenádorových buněčných liniích.

Klíčová slova: triterpeny, cytotoxicita, Wittigova reakce, kyselina 30-oxobetulinová

Počet stran: 74

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Denisa Olejníková
Title: Synthesis of new lupane derivatives modified at position 20 or 30
Type of thesis: Bachelor's
Department: Department of Organic Chemistry
Advisor: Mgr. Jan Pokorný
Advisor consultant: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.
The year of presentation: 2018

Abstract:

The bachelor thesis deals with the synthesis of new derivatives of triterpenes modified in the position C-30 by Wittig reaction.

Theoretical part includes basic division of terpenes and their representatives, an overview of betulinic acid derivatives modified at C-30 and the basic principle of Wittig reaction.

In the experimental section, at first, it was necessary to optimize the Wittig method for the triterpene molecule. In total, 10 new compounds were prepared and characterized by common physical-chemistry methods (^1H and ^{13}C NMR, IR, HRMS, melting point) and were tested for cytotoxic activity on eight tumor cell lines and two non-tumor lines.

Keywords: triterpenes, cytotoxic, Wittig reaction, 30-oxobetulinic acid

Number of pages: 74

Number of appendixes: 1

Jazyk: Czech

Seznam použitých zkratek

DMAP	N,N-dimethylaminopyrimidin
<i>t</i> -BuOK	2-methyl-2-propoxid draselný
THF	tetrahydrofuran
DCM	dichlormethan
MeOH	methanol
DMSO	dimethylsulfoxid
CuTc	thiofenyl-2-karboxylát měďný
DMA	diaminodifenylmethan
GLYM	2-methoxyethanol
BuLi	<i>n</i> -butyllithium
Et ₂ O	diethylether
IC ₅₀	nejnižší koncentrace, která usmrtí 50 % nádorových buněk
EC ₅₀	nejnižší koncentrace, která vyvolá určitý efekt u 50 % testovaných organismů dané populace
GI ₅₀	nejnižší koncentrace, která způsobí snížení proliferace v 50 % nádorových buněk
t.t.	teplota tání
rt	laboratorní teplota

Seznam nádorových buněčných linií

A549	lidský adenokarcinom plic
BJ	lidský nenádorový fibroblast
CCRF-CEM	lidská T-lymfoblastická leukemie
CEM-DNR	lidská T-lymfoblastická leukémie, daunorubicin rezistentní
HCT-116	lidský karcinom tlustého střeva
HCT-116 _{p53}	lidský karcinom tlustého střeva se změnou exprese p53
HIV-1	virus lidské imunodeficiency
K562	lidská chronická myeloidní leukémie
K562-TAX	lidská chronická myeloidní leukémie, taxol rezistentní
MDA-MB-231	lidský adenokarcinom prsu
MEL-1, 2, 4	zvířecí (hlodavčí) akutní erytroidní leukémie
MRC-5	lidský nenádorový fibroblast
P-388	zvířecí leukemické buňky rezistentních vůči Menogarilu
PC-3	lidský karcinom prostaty
SK-MEL-2	lidský maligní melanom F
U2OS	lidský osteosarkom

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
Seznam nádorových buněčných linií	7
Úvod	10
Cíle bakalářské práce	11
Teoretická část	12
1. Terpeny – obecné vlastnosti a rozdělení	12
1.1 Monoterpeny	12
1.2 Seskviterpeny	13
1.3 Diterpeny	14
1.4 Sesterterpeny	14
1.5 Triterpeny	15
1.5.1 Lupanová skupina.....	16
1.5.2 Skupina oleananu a ursanu	17
1.6 Tetraterpeny	18
1.7 Polyterpeny.....	18
2. Současný stav studované problematiky.....	19
2.1 Kyslíkaté deriváty	19
2.2 Dusíkaté deriváty.....	22
2.3 Další deriváty	24
3. Wittigova reakce.....	26
3.1 Klasická Wittigova reakce	26
3.2 Modifikace Wittigovy reakce.....	28
Výsledky a diskuze	30
4. Příprava výchozích sloučenin.....	30
4.1 Benzylester kyseliny betulínové.....	30
4.2 Benzylester kyseliny 30-oxobetulínové	30
4.3 Kyselina 30-oxobetulínová	31
5. Příprava fosfoniových solí.....	31
6. Optimalizace reakčních podmínek	32
6.1 Konjugát VI.....	33

6.2 Konjugát VII	34
6.3 Konjugát VIII	35
6.4 Konjugát IX.....	35
7. Příprava finálních derivátů kys. betulínové.....	36
7.1 Konjugát X	37
7.2 Konjugát XI.....	37
7.3 Konjugát XII	38
7.4 Konjugát XIII	38
7.5 Konjugát XIV	39
7.6 Konjugát XV	39
7.7 Konjugát XVI.....	40
7.8 Konjugát XVII.....	40
7.9 Konjugát XVIII	41
7.10Konjugát XIX.....	41
8. Testování cytotoxické aktivity	43
Závěr	44
Experimentální část	45
1. Obecný úvod k experimentální části	45
2. Příprava výchozích látek	46
3. Příprava fosfoniových solí.....	48
4. Příprava derivátů odvozených od benzylesteru kyseliny betulínové	50
5. Příprava finálních produktů odvozených od kyseliny betulínové	52
Literatura	60
Přílohy	64

Úvod

Terpeny představují jednu z nejpočetnějších skupin přírodních látek, které se podle počtu izoprenových jednotek rozdělují na mono-, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra- a poly-terpeny. Z farmakologického hlediska je zajímavá především podtřída triterpenů, která je odvozena od několika desítek skeletálních typů. Nejvíce budou diskutováni zástupci skeletálních typů lupanu, oleananu a ursanu, a to zejména pro jejich zajímavé biologické vlastnosti.

Řada léčivých bylin, obsahujících triterpeny, byla využívána již v tradiční medicíně na léčbu různých onemocnění. V dnešní době se několik vědeckých skupin z celého světa zabývá navrhováním nových semisyntetických derivátů přírodních triterpenů za účelem zlepšení jejich farmakologických aktivit, snížení lipofility a zvýšení rozpustnosti ve vodných médiích. Příkladem slibného derivátu kyseliny betulinové je kyselina 30-oxobetulinová, která vykazuje významnou cytotoxickou aktivitu na několika nádorových buněčných liniích. Bohužel, její vysoká toxicita vůči nenádorovým buněčným liniím nedává této sloučenině možnost postoupit do klinického testování. Motivem této bakalářské práce bylo modifikovat kyselinu 30-oxobetulinovou v poloze 30 s cílem zachovat vysokou cytotoxickou aktivitu a současně snížit toxicitu vůči nenádorovým buňkám.

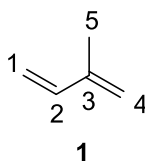
Cíle bakalářské práce

1. Vypracování literární rešerše na téma deriváty kyseliny betulinové modifikované v poloze 30.
2. Příprava výchozích sloučenin a reakčních činidel potřebných pro Wittigovu syntézu.
3. Příprava série nových derivátů kyseliny betulinové modifikovaných v poloze 30.
4. Plná charakterizace připravených derivátů pomocí fyzikálních (bod tání) a spektrálních dat (NMR, HRMS, IR).
5. Příprava vzorků na biologické testování cytotoxické aktivity.

Teoretická část

1. Terpeny – obecné vlastnosti a rozdělení

Terpeny jsou organické sloučeniny převážně rostlinného původu. Jejich základní stavební jednotkou je pětiuhlíkatá sloučenina izopren (**1**, obrázek 1), proto se také řadí mezi izoprenoidy.¹



Obrázek č. 1: Struktura izoprenu (**1**).

Terpenické uhlovodíky lze popsat molekulovým vzorcem $(C_5H_8)_n$, kde n určuje počet izoprenových jednotek v molekule.² Struktura terpenů vzniká spojováním těchto jednotek, přičemž dle jejich počtu se terpeny dále dělí na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, sesterterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny. Následující kapitoly se budou podrobněji zabývat jednotlivými skupinami terpenů.

Obecně jsou terpeny sekundárními metabolity vyšších rostlin, což jsou látky, které se neúčastní hlavních metabolických drah. Jejich významnou funkcí je chránit rostlinu před škůdci, parazity a chorobami.³ Kromě rostlin jsou také syntetizovány mikroorganismy, houbami, plísněmi, mořskými živočichy a řasami.²

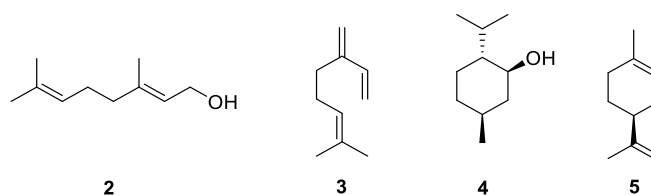
Pro lidskou populaci jsou zvláště zajímavé kvůli jejich rozličným biologickým aktivitám. Velmi sledovaná je například antivirová,⁴ antibakteriální,^{5,6} antimalarická,⁷ neuroprotektivní⁸ a cytotoxická aktivita.^{9,10}

1.1 Monoterpeny

Monoterpeny jsou obvykle těkavé přírodní látky s charakteristickou vůní. Jejich struktura je tvořena ze dvou izoprenových jednotek, mají tedy ve své molekule deset atomů uhlíku (odtud označení C-10-izoprenoidy). Hlavním producentem monoterpenů jsou rostliny, ale také bakterie, některé druhy hmyzu¹¹ a mořský fytoplankton.¹² Monoterpeny jsou součástí celé řady rostlinných silic, které našly největší uplatnění v kosmetice

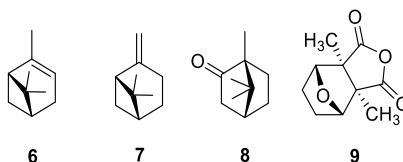
a parfumerii. Řada monoterpenů má také pozitivní vliv na lidské zdraví.¹³ V neposlední řadě jsou základem aromaterapie.⁸

Skupina monoterpenů je velmi početná, její zástupce lze rozdělit podle struktury na acyklické, monocyklické nebo bicyklické. Acyklickým zástupce monoterpenů je geraniol (**2**) a myrcen (**3**, obrázek 2). Mezi monocyklické monoterpeny patří menthol (**4**) a limonen (**5**). Zajímavostí je, že vůně limonenu je ovlivněna přítomností chirálního centra. Vyskytuje se v konfiguraci (R)-(+)-limonen (**5**) jako součást citrusového aroma, nebo jako (S)-(-)-limonen, který je základem vůně borového jehličí.¹¹



Obrázek č. 2: Struktura geraniolu (**2**), myrcenu (**3**), mentholu (**4**), (R)-(+)-limonenu (**5**).

Nejrozšířenějšími zástupci bicyklických monoterpenů jsou α -pinen (**6**, obrázek 3) a β -pinen (**7**), kteří jsou součástí pryskyřice jehličnanů. Dalším zástupcem je kafr (**8**), který je součástí silice kastrovníku.¹⁴ Příkladem monoterpeny, který je syntetizován nikoliv rostlinou, ale broukem puchýřníkem lékařským, je kantaridin (**9**).¹¹



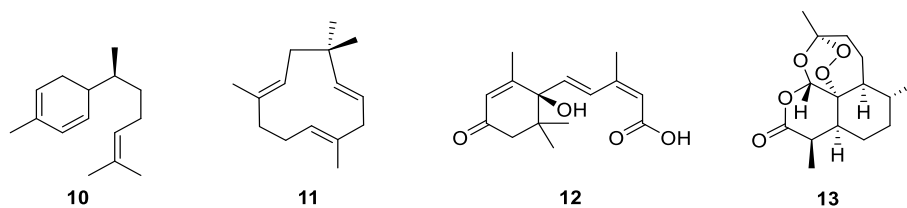
Obrázek č. 3: Struktura α -pinenu (**6**), β -pinenu (**7**), kafro (**8**) a kantaridinu (**9**).

1.2 Seskviterpeny

Seskviterpeny se skládají ze tří izoprenových jednotek (C-15-izoprenoidy). Struktura může být acyklická nebo cyklická. Vyskytují se především v nižších rostlinách, mořských organismech a v některých druzích hub.¹⁵

Mezi významné cyklické zástupce se řadí zingiberen (**10**, obrázek 4), který se nachází v zázvorovém oleji, humulen (**11**), který najdeme v chmelu otáčivém,¹⁶ nebo také kyselina abscisová (**12**), fytohormon navozující období vegetačního klidu.¹⁵ V přírodě se můžeme setkat také se seskviterpenovými laktony.¹⁶ Jedním z nejvýznamnějších je artemisinin (**13**), který ve své struktuře obsahuje peroxidový můstek, jenž je zásadní pro jeho aktivitu. Izoluje se z čínské léčivé byliny pelyňku ročního (*Artemisia annua L.*)

a využívá se na léčbu malárie.⁹ Za objev tohoto účinku byla v roce 2015 udělena Nobelova cena v oboru fyziologie a medicíny.

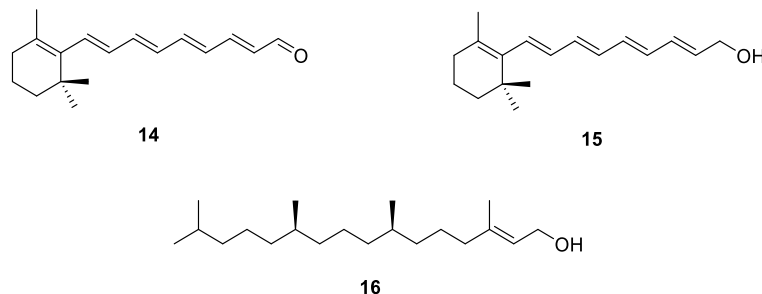


Obrázek č. 4: Struktura zingiberenu (**10**), humulenu (**11**), kyseliny abscisové (**12**) a artemisininu (**13**).

1.3 Diterpeny

Další skupinou terpenů jsou diterpeny, které obsahují čtyři izoprenové jednotky (C-20-izoprenoidy). Hlavním producentem diterpenů jsou vyšší rostliny čeledi pryšcovitých, hluchavkovitých a tisoovitých,² dále některé mořské i suchozemské druhy živočichů, houby a řasy.¹⁷

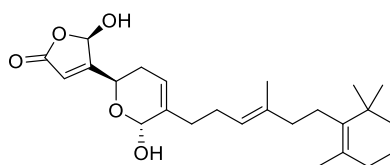
Důležitým zástupcem je retinal (**14**, obrázek 5), který vzniká oxidací retinolu (**15**) a je aktivní formou vitamínu A, nebo fytol (**16**), který je součástí chlorofylu.



Obrázek č. 5: Struktura retinalu (**14**), retinolu (**15**) a fytolu (**16**).

1.4 Sesterterpeny

Sesterterpeny jsou skupinou terpenů obsahující pět izoprenových jednotek (C-25-izoprenoidy). Jejich výskyt v přírodě je poněkud výjimečný, nachází se například v některých druzích mořských hub (řád *Dictyoceratida*).¹⁸ Jedním z významných derivátů, vykazujících antibiotické, analgetické a protizánětlivé účinky, je manoalid (**17**, obrázek 6), který byl izolován z mořské houby *Luffariella varlabilis*.⁷

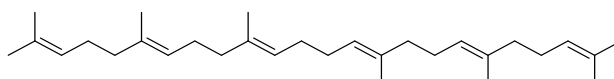


17

Obrázek č. 6: Struktura manoalidu (**17**).

1.5 Triterpeny

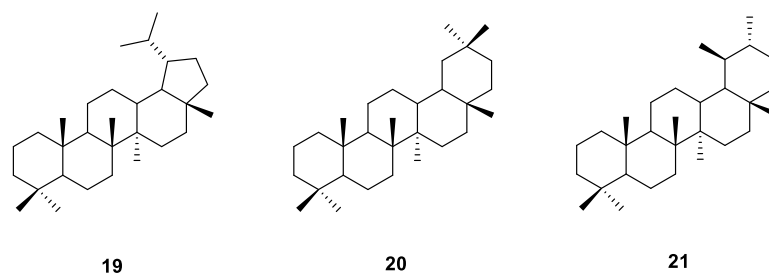
Triterpeny jsou látky složené ze šesti izoprenových jednotek, obsahují ve své molekule obvykle 30 atomů uhlíku (C-30-izoprenoidy). Prekurzorem všech triterpenů je skvalen (**18**, obrázek 7). Jeho název je odvozen od rodu žraloků *Squalus*, z jejichž jater byl původně získáván. V dnešní době je izolován z dostupnějších zdrojů, například z amarantového nebo olivového oleje. Používá se na léčbu kožních onemocnění¹⁹ nebo jako pomocná látka v očkovacích vakcínách proti chřipce.²⁰ Triterpeny jsou obecně produkovány rostlinami, mořskými živočichy, houbami i plísněmi.²¹



18

Obrázek č. 7: Struktura skvalenu (**18**).

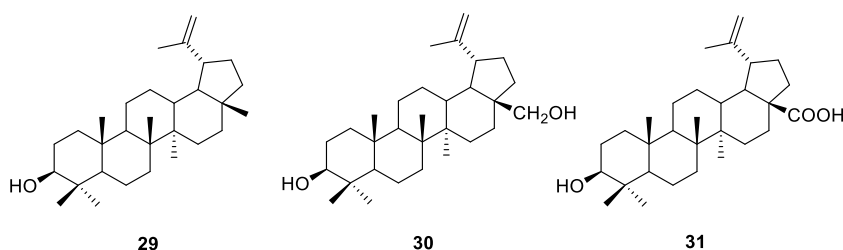
Triterpeny představují nejpočetnější podskupinu terpenů s velkou rozmanitostí biologických účinků – jsou studovány pro své protizánětlivé,²² hepatoprotektivní,²³ analgetické,²⁴ antimikrobiální,²³ antimykotické,²³ antivirové (včetně anti-HIV aktivity)²³ a především cytostatické účinky.^{25,26} Mohou se používat při prevenci a léčbě hepatitidy, parazitických a protozoálních infekcí. Nevýhodou triterpenů je však špatná rozpustnost ve vodných médiích a toxicita spojená s hemolytickými a cytostatickými vlastnostmi.²⁶ Velkou část derivátů triterpenů lze odvodit od několika základních skeletálních struktur, přičemž mezi nejvýznamnější patří lupan (**19**), oleanan (**20**) a ursan (**21**, obrázek 8).



Obrázek č. 8: Struktura lupanu (**19**), oleananu (**20**) a ursanu (**21**).

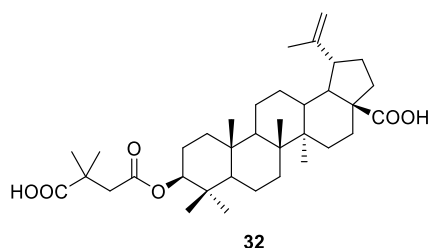
1.5.1 Lupanová skupina

Mezi hlavní deriváty lupanu patří lupeol (**29**), betulin (**30**) a kyselina betulinová (**31**, obrázek 9). Kyselina betulinová a betulin se nachází v kůře břízy bělokoré (*Betula pendula*) a v menším množství i v platanu javorolistém (*Platanus hispanica*). Skupina látek odvozená od lupanu vykazuje velké množství biologických účinků. Významná je jejich cytotoxická a protinádorová aktivita,¹⁰ antimikrobiální,²⁷ protizánětlivý²⁴ nebo antivirový efekt²⁸ a také hepatoprotektivní²⁶ či kardioprotektivní vlastnosti.²⁶



Obrázek č. 9: Struktura lupeolu (**29**), betulinu (**30**) a kyseliny betulinové (**31**).

Kyselina betulinová vykazuje dobré antivirové a anti-HIV účinky.²⁹ Jejím nejvýznamnějším derivátem je bevirimat (**32**, obrázek 10), který byl vyvíjen jako možné terapeutikum pro léčbu infekce virem HIV-1. Tato látka inhibuje replikaci virové částice odlišným mechanismem než jiná antiretrovirová léčiva. Blokuje štěpení virového polyproteinu HIV proteasou, a tak zabraňuje maturaci a uvolňování virových částic z napadených buněk.³⁰ *In vitro* aktivita bevirimatu vůči izolovanému viru na H9 lymfocytech vykazovala hodnotu $IC_{50} = 10,3$ nM. Vzhledem ke snadným vznikům rezistencí však tato molekula neprošla 3. fází klinických testů.²⁸



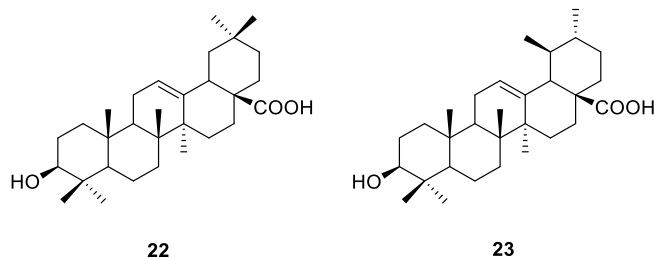
Obrázek č. 10: Struktura bevirimatu (**32**).

Významné jsou také cytotoxické účinky kyseliny betulinové. První zmínka o její cytotoxické aktivitě byla publikována již v roce 1976,²⁶ o 19 let později byl popsán cytotoxický účinek na buněčné linie lidského melanomu MEL-1, 2 a 4. V této práci Pisha a kol. uvádí hodnotu IC_{50} v rozmezí 0,5–1,6 $\mu\text{g/ml}$.^{26,10} Další studie také prokázaly významnou aktivitu proti buněčným liniím glyomu, karcinomu vaječníku, plic a také děložního čípku.^{31–33}

1.5.2 Skupina oleananu a ursanu

Z hlediska biologických aktivit a farmaceutického významu jsou také velmi studováni hlavní zástupci skupiny oleananu a ursanu. Vyskytují se v mnoha druzích rostlin, které se už od dávných dob považují za léčivé.³⁴

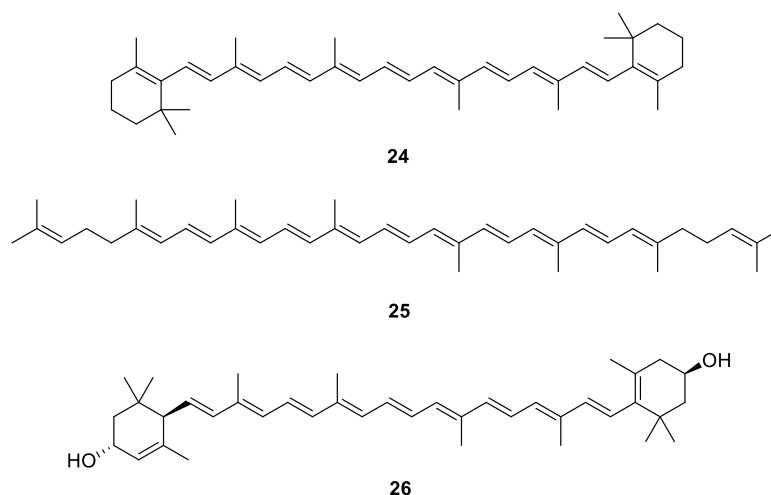
Od skeletu oleananu je například odvozená kyselina oleanolová (**22**, obrázek 11). Nachází se v listech a plodech olivovníku evropského nebo jmelí bílého. Používá se v tradiční čínské medicíně pro léčbu onemocnění jater, nebo v prevenci zubního kazu.¹⁰ Kyselina ursolová (**23**), která je odvozena od skeletálního typu ursanu, je přítomná ve slupkách plodů rostlin (konkrétně v jablcích, švestkách, borůvkách a brusinkách) a dále v květech rostlin (např. v mátě pepřné nebo v levanduli). Mezi její stěžejní farmakologické vlastnosti patří protizánětlivý, antiulcerogenní, hepatoprotektivní, antimikrobiální a cytotoxický účinek.^{10,26}



Obrázek č. 11: Struktura kyseliny oleanolové (**22**) a kyseliny ursolové (**23**).

1.6 Tetraterpeny

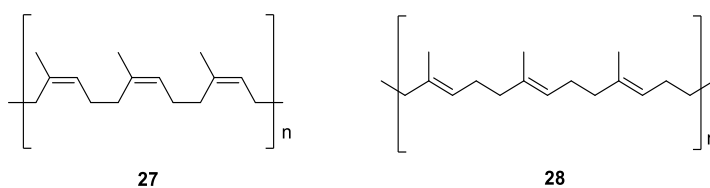
Terpeny obsahující 8 izoprenových jednotek nazýváme tetraterpeny (C-40-izoprenoidy). K biosyntéze tetraterpenů dochází především kondenzací dvou diterpenů. Obecně se vyskytují ve vyšších rostlinách a živočiších, kde ovlivňují jejich zbarvení, biologický význam mají nejčastěji jako antioxidanty.² Nejběžnější tetraterpeny jsou karotenoidy, které se dále dělí na karoteny a xantofyly.⁹ Mezi významné zástupce karotenů patří oranžový pigment β -karoten (**24**, obrázek 12), nacházející se převážně v mrkvi, nebo červené barvivo lykopen (**25**), které najdeme například v rajčatech. Žluté barvivo obsažené v květech pampelišek či slunečnic se nazývá lutein (**26**), patří do skupiny xantofylů.²



Obrázek č. 12: Struktura β -karotenu (**24**), lykopenu (**25**) a luteinu (**26**).

1.7 Polyterpeny

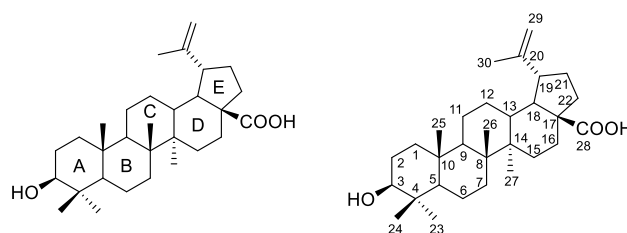
Polyterpeny jsou polymerní izoprenoidní uhlovodíky, které se skládají z více než osmi jednotek izoprenu. Do této skupiny patří přírodní kaučuky (**27**) a gutaperča (**28**, obrázek 13). Rozdíl v jejich struktuře (cis-trans konfigurace) je patrný z obrázku 13.³⁵



Obrázek č. 13: Struktura kaučuku (**27**) a gutaperči (**28**).

2. Současný stav studované problematiky

Triterpenoidy lupanového typu představují skupinu přírodních látek, která je schopná indukovat programovanou buněčnou smrt. Jejich cytotoxicita je ale z farmakologického hlediska mnohdy nízká, stejně jako jejich rozpustnost ve vodných médiích. Proto se již mnoho let řada výzkumných skupin snaží o derivatizaci původních molekul s cílem zlepšení cytotoxické aktivity a rozpustnosti při zachování schopnosti indukovat apoptózu v nádorových buňkách. V této části práce budou podrobněji diskutovány stěžejní deriváty kyseliny betulinové modifikované na E kruhu v poloze 30 (obrázek 14).



Obrázek č. 14: Označení kruhů a číslování uhlíků kyseliny betulinové.

2.1 Kyslíkaté deriváty

Derivát kyseliny betulinové obsahující aldehydovou skupinu v poloze C-30 (**35**, schéma 1) vykazuje vysokou *in vitro* cytotoxickou aktivitu na několika nádorových liniích.^{36,37,38} Lze jej připravit oxidací polohy 30 pomocí SeO₂ v ethanolu.³⁹ 30-oxobetulinová kyselina **35** byla v několika studiích testována na inhibici buněčné proliferace. Vysoká aktivita byla zjištěna proti buněčné linii lymfoblastické leukémie CCRF-CEM (IC₅₀ = 1,71 μM),⁴⁰ rovněž proti buňkám rakoviny tlustého střeva HCT-116 (IC₅₀ = 4,38 μM) a u nádorové linie MDA-MB-231 (IC₅₀ = 1,37 μM).³⁷ Ve struktuře tohoto derivátu se nachází tzv. Michaelův akceptor (souhrnný název pro α,β-nenasycené ketony, aldehydy, nitrily a karboxylové kyseliny, obsahující elektron-deficientní dvojnou vazbu, která může podléhat Michaelově adici), což sice vede k lepší cytotoxické aktivitě, avšak k nízké selektivitě vůči nádorovým buňkám. Derivát **35** proto není vhodným kandidátem pro klinickou praxi, jelikož v testech vykázal vysokou toxicitu na dvou nenádorových fibroblastových buněčných liniích BJ (IC₅₀ = 6,1 μM) a MRC-5 (IC₅₀ = 4,1 μM). Terapeutický index (poměr hodnoty IC₅₀ CCRF-CEM proti průměru hodnot BJ a MRC-5) udává hodnotu 1,6.⁴¹

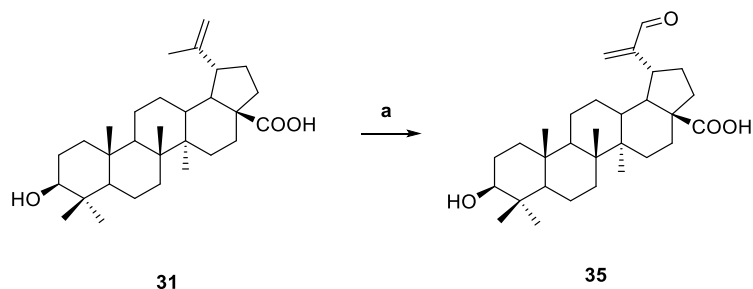
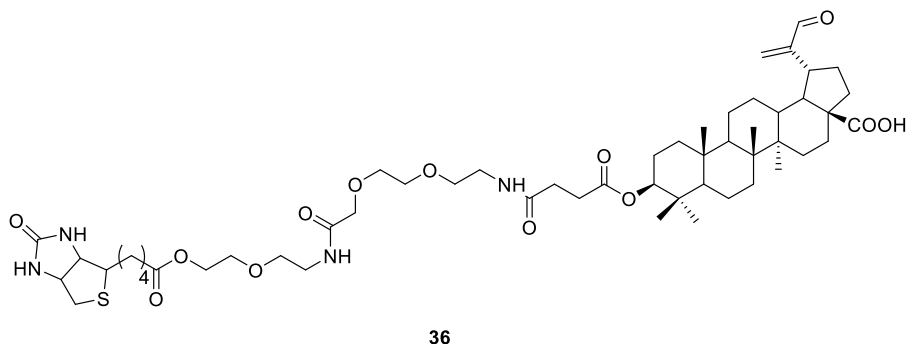


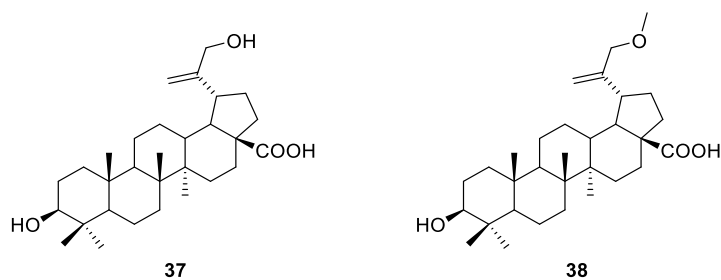
Schéma č. 1: Příprava derivátu **35** (a: SeO_2/EtOH , reflux, 9 h).

Mechanismus cytotoxického účinku derivátu **35** není zcela objasněn. Pomocí syntézy na pevné fázi bylo připraveno několik konjugátů (např. **36**, obrázek 15) cytotoxicky aktivních triterpenů s biotinem, navázaným prostřednictvím linkeru. Nově připravené látky umožňují díky navázanému biotinu zakotvení aktivních molekul na pevnou fázi a izolaci a charakterizaci potenciálních molekulárních cílů. Pomocí testů na buněčných liniích CCRF-CEM a HCT-116 bylo zjištěno, že biotinylované deriváty mají podobné cytotoxické účinky jako jejich prekurzory. Konkrétně aldehyd **35** byl biotinylován v pozici C-3 (derivát **36**) a vykazoval hodnotu IC_{50} 3,39 μM (pro buněčnou linii CCRF-CEM).⁴⁰ Obdobný derivát s navázanou molekulou BODIPY umožnil vizualizovat aldehyd **35** v buňkách osteosarkomu a bylo potvrzeno, že se neselektivně váže na proteiny v celém objemu buňky (zřejmě prostřednictvím Michaelovského akceptoru na cysteiny).⁴²



Obrázek č. 15: Biotinylovaný derivát **36**.

Jednoduché kyslíkaté deriváty obsahující hydroxyskupinu (**37**) a methoxyskupinu v poloze 30 (**38**, obrázek 16) byly popsány v literatuře⁴³ a testovány na nádorových liniích HCT-116, PC-3 a SK-MEL-2. Syntéza zahrnovala reakci bromovaného derivátu **45** (obrázek 20) s LiOH v $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ za vzniku alkoholu **37** a s methoxidem sodným v MeOH za vzniku příslušného etheru **38**. Hodnoty GI_{50} byly pro obě sloučeniny větší než 50 μM .



Obrázek č. 16: Kyslíkaté deriváty **37** a **38**.

Reakcí 30-oxobetulinové kyseliny **35** s nadbytkem diazomethanu po dobu 3 dnů vzniká směs derivátů **35a-35e** (schéma 2). Očekávaný produkt methylester **35a** vzniká nukleofilním atakem karboxylové skupiny v poloze C-28. Konkurenčními reakcemi jsou 1,3-dipolární adice na dvojnou vazbu za vzniku dihydropyrazolu **35e** a adice karbenu na aldehyd C-30, při níž vzniká oxiran **35d** nebo keton **35b**. Poslední cyklopropanový derivát **35c** vznikl elektrofilní adicí karbenu na dvojnou vazbu. Všechny získané deriváty byly otestovány na buněčné linii CCRF-CEM. Nejlepšího výsledku dosáhl methylester **35a**, který vykazuje podobné hodnoty cytotoxické aktivity jako jeho prekurzor, 30-oxobetulinová kyselina (**35**), s hodnotou $IC_{50} \approx 5 \mu M$.³⁹

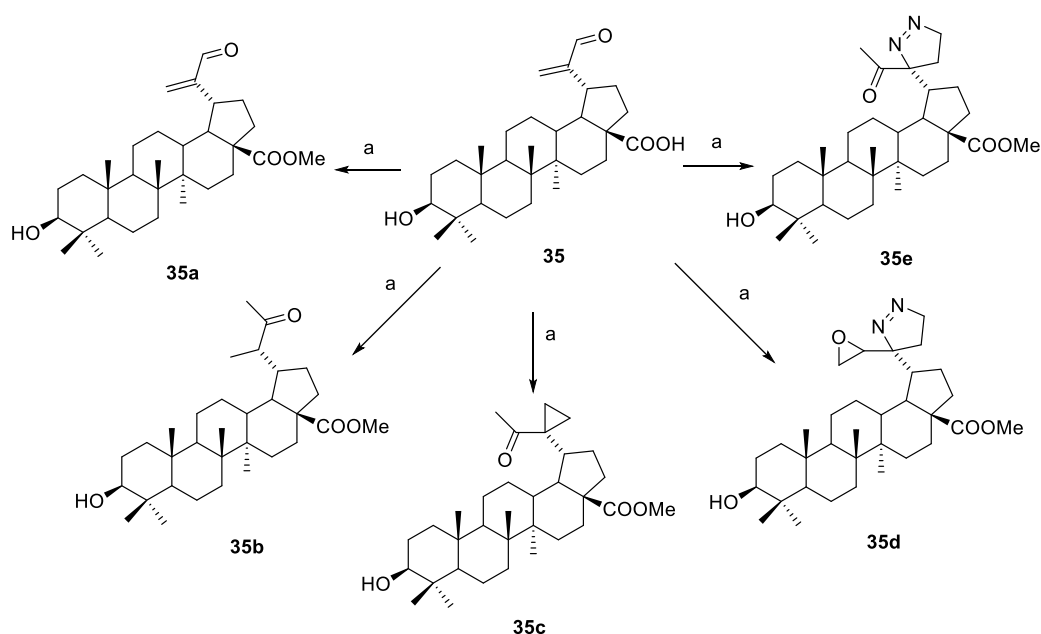
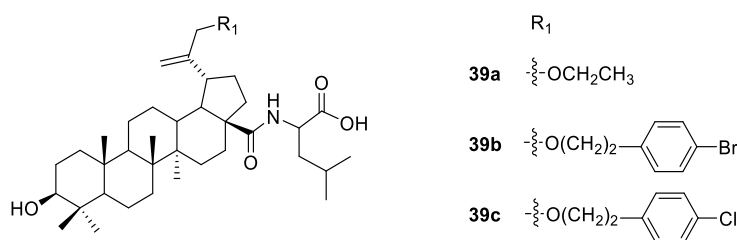


Schéma č. 2: Směs derivátů **35a-35e** (a: CH_2N_2 , Et_2O , rt, 72 hod.).

V týmu Q. Kedu⁴⁴ se zabývali efektem modifikace polohy C-30 kyseliny betulinové na proteosomální aktivitu. Z výsledků vyplývá, že čím je postranní řetězec v poloze C-30 objemnější, tím více molekula inhibuje proteasom. Deriváty **39b** a **39c** (obrázek 17) vykazují nejvyšší aktivitu s hodnotami IC_{50} 1,56 μ M a 1,80 μ M, zatímco derivát **39a**, obsahující málo objemnou ethoxy skupinou, vykazuje hodnotu $IC_{50} = 13,21 \mu$ M.

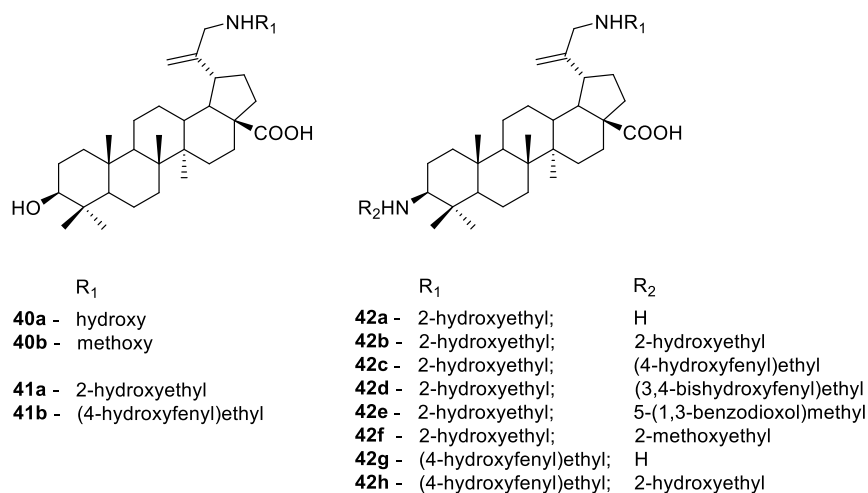


Obrázek č. 17: Deriváty s proteosomální aktivitou.

2.2 Dusíkaté deriváty

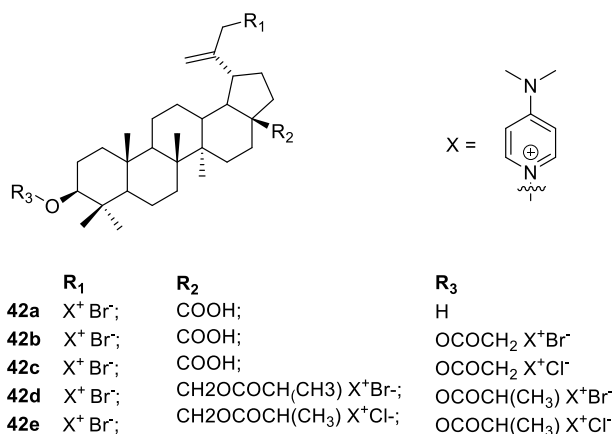
V literatuře⁴³ byly také popsány jednoduché aminové deriváty **40a–40b** (obrázek 18), které byly testovány na nádorových liniích HCT-116, PC-3 a SK-MEL-2. Cytotoxický účinek u obou derivátů byl horší než detekční limit ($GI_{50} > 50 \mu$ M).

V další studii⁴⁵ byly aminové substituenty zavedeny do poloh C-3 a C-30. Všechny deriváty **41a–41b** a **42a–42h** (obrázek 18) byly testovány na buněčných liniích SK-MEL-2, lidského maligního melanomu A-375, lidského medulloblastomu Daoy, lidského glioblastomu LN-229 a lidského adenokarcinomu vaječníku OVCAR-3. Lépe ze studie vyšly sloučeniny substituované v obou polohách současně (konjugáty **42a–42h**), jejichž cytotoxické aktivity byly ve srovnání s kyselinou betulinovou (pohybují se okolo $IC_{50} \approx 5 \mu$ M) vyšší a ovlivňují buněčnou smrt převážně prostřednictvím apoptózy. Mezi jednu z neaktivnějších sloučenin patřil derivát **42g**, který na třech buněčných liniích (A-375, Daoy, LN-229) vykazoval hodnoty IC_{50} nižší než 2 μ M. Monosubstituované deriváty **41c–41d** používají ke spuštění buněčné smrti jiné neapoptické cesty.



Obrázek č. 18: Aminové deriváty odvozené od kyseliny betulínové.

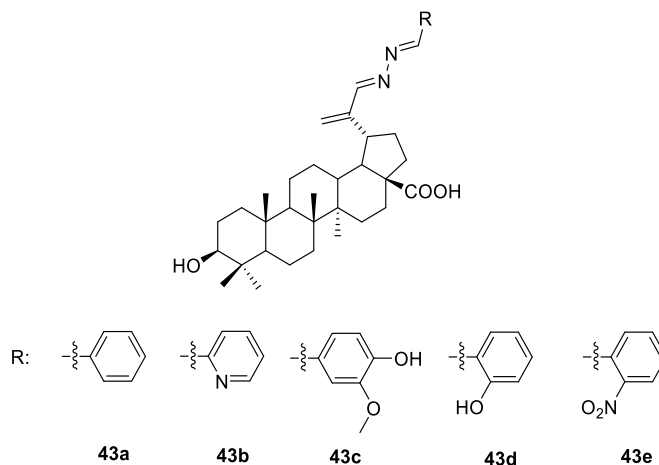
Ve skupině J. Holého⁴⁶ se věnovali přípravě konjugátů kyseliny betulínové s dimethylaminopyridinem v polohách C-3, C-28 a C-30. Připravená sada derivátů **42a–42e** (obrázek 19) byla navržena jako potenciální mitochondriálně cílené léčivo proti nádorovým buňkám. Testování proběhlo na buněčných liniích lidského maligního melanomu WM321 a WM793. Bylo prokázáno, že schopnost derivátů inhibovat proliferaci buněk je přímo spojena s narušením mitochondriální struktury. Všechny deriváty obsahující skupinu DMAP v poloze C-30 byly neaktivní ($ED_{50} > 3,5 \mu\text{M}$).^{46,47}



Obrázek č. 19: DMAP deriváty odvozené od kyseliny betulínové.

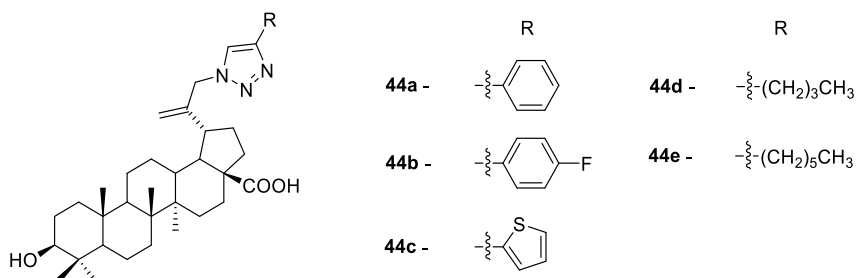
Soubor azinů **43a–43e** (obrázek 20) byl připraven v týmu doc. Urbana⁴¹ reakcí 30-oxobetulínové kyseliny **35** s různě substituovanými aromatickými hydrazony. Připravené aziny byly testovány na nádorových liniích CCRF-CEM, K562, HCT116, HCT116_{p53}, A549, U2OS a na rezistentních leukemických buňkách CEM-DNR, K562-TAX. Z výsledků měření vyplývá, že připravené deriváty jsou vysoce cytotoxické vůči linii CCRF-CEM a vykazují nižší toxicitu na nenádorových buňkách než výchozí

aldehyd **35**. Nejlepší cytotoxické aktivity dosahuje derivát **43c** s hodnotou $IC_{50} = 3,4 \mu M$ (CCRF-CEM).



Obrázek č. 20: Soubor azinů **43a–43e**.

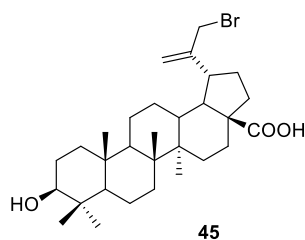
Pomocí Huisgenovy click-reakce byla v týmu W. Shi⁴⁸ připravena sada substituovaných triazolových derivátů **44a–44e** (obrázek 21) s cytotoxickou aktivitou testovanou na lidské promyeloidní leukémické buněčné linii HL-60. Všechny uvedené deriváty vykazovaly lepší hodnotu cytotoxické aktivity než výchozí kyselina betulinová. Derivát **44b**, který obsahuje největší aromatický postranní řetězec, poskytoval nejlepší hodnotu $IC_{50} = 1,3 \mu M$.



Obrázek č. 21: Soubor triazolových derivátů **44a–44e**.

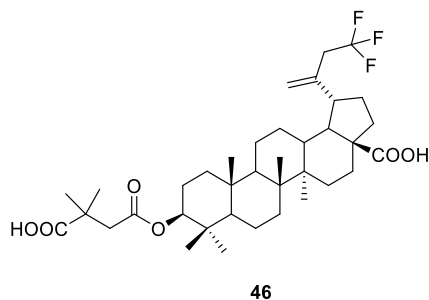
2.3 Další deriváty

Kyselina 30-brombetulinovaná **45** (obrázek 22) je základem několika syntéz vedoucích k novým derivátům. Bromace v poloze C-30 se provádí pomocí NBS v CCl_4 .⁴³ V dostupné literatuře nebyla cytotoxická aktivita ani jiné účinky tohoto derivátu měřeny.



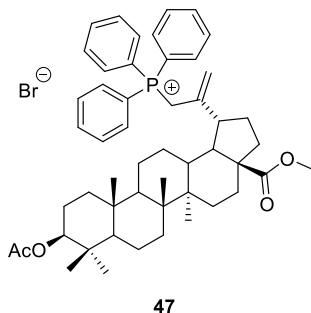
Obrázek č. 22: Kyselina 30-brombetulinová **45**.

Derivát **46** obsahující trifluormethylovou skupinu v poloze C-30 (obrázek 23) byl připraven v týmu Li J.⁴⁹ a testován na anti-HIV replikační aktivitu. V porovnání s bevirimatem ($EC_{50} = 0,075 \mu\text{M}$) derivát **46** vykazuje podobnou aktivitu proti HIV-1, konkrétně $EC_{50} = 0,097 \mu\text{M}$. Trifluormethylová skupina se zavádí do polohy C-30 pomocí S-(trifluormethyl)diarylsulfoniové soli v přítomnosti CuTc, 2,4,6-dimethylpyridinu a DMA.



Obrázek č. 23: Trifluormethylovaný derivát.

Série trifenylofosfoniových solí odvozených od kyseliny betulinové byla navržena jako potencionální léčivo proti schistosomóze, což je parazitní onemocnění způsobené rodem motolic *Schistosoma* (česky také krevnička). Derivát **47** vykazoval vysokou antischistosomální aktivitu proti dospělým *S. mansoni* ($IC_{50} = 0,76 \mu\text{M}$).⁵⁰



Obrázek č. 24: Trifenylofosfoniová sůl **47** odvozená od kyseliny betulinové.

3. Wittigova reakce

Wittigova reakce je reakce tzv. fosfonium-ylidu s aldehydem, popřípadě ketonem, pomocí které lze v molekule vytvořit novou dvojnou vazbu. Poprvé byla tato reakce popsána v roce 1953 Georgem Wittigem a Georgem Geisslerem.⁵¹ Německý vědec George F. K. Wittig za tuto práci obdržel v roce 1979 spolu s americkým organickým chemikem Herbertem C. Brownem Nobelovu cenu za chemii.⁵²

3.1 Klasická Wittigova reakce

Klasická Wittigova reakce, popsaná v původní práci Wittiga a Geisslera,⁵¹ je znázorněna ve schématu 4. Jedná se o nukleofilní adici fosfonium-ylidu na aldehyd nebo keton za vzniku odpovídajícího alkenu a trifenylofosfinoxidu. Tato reakce obecně poskytuje celou řadu alkenů s vysokými výtěžky.⁵³

Základním reakčním činidlem Wittigovy reakce je tzv. fosfonium-ylid, který lze obecně definovat jako neutrální dipolární sloučeninu s náboji na sousedních atomech. Jeho příprava je snadná, reakce probíhá mechanismem S_N2 ve vysokých výtěžcích. Na začátku do reakce vstupuje silný nukleofil trifenylofosfin (**A**, schéma 3) a primární nebo sekundární alkylhalogenid (**B**) za vzniku odpovídající fosfoniové soli (**C**). Fosfoniová sůl obsahuje slabě kyselé protony, které se nacházejí v těsné blízkosti kladně nabitého fosforu. Použitím báze lze proton odtrhnout za vzniku neutrálního fosfonium-ylidu (**D**).⁵²

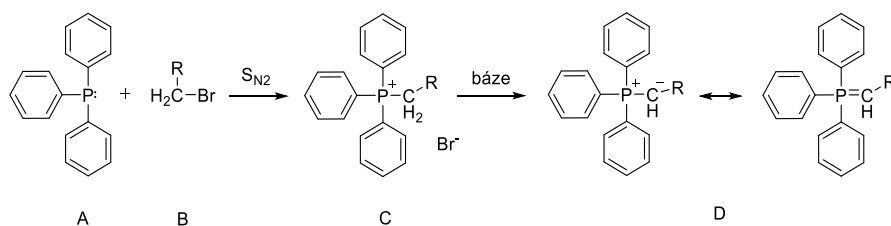
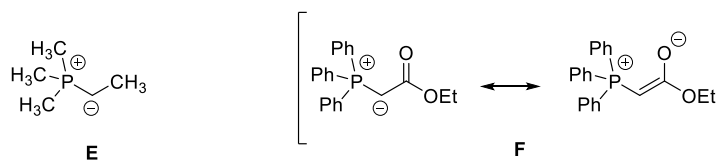


Schéma č. 3: Příprava fosfonium-ylidu

Ylidy lze podle jejich stability rozdělit na dva typy. Tzv. nestabilizované ylidy (**E**, obrázek 25) nejsou schopny konjugace, obsahují zpravidla pouze jednoduché alkylové substituenty na kladně nabitém atomu fosforu, přičemž sousední nukleofilní atom uhlíku není nijak stabilizován. Jejich vznik vyžaduje použití silné báze, například BuLi za inertních podmínek, připravují se proto vždy *in situ* v konkrétní reakci. Druhým typem jsou stabilizované ylidy (například **F**), jejichž strukturu lze často vyjádřit několika

mezomerními vzorci. Stabilizované fosfonium-ylidy obsahují funkční skupiny, které jsou schopny stabilizovat nukleofilní atom uhlíku, a lze je vytvořit již slabší bázi, jako je hydroxid alkalického kovu ve vodném roztoku.⁵⁴ Stabilizované ylidy jsou poměrně stabilní, lze je proto uchovávat delší dobu a jsou tudíž komerčně dostupné.



Obrázek č. 25: Příklad nestabilizovaného (**E**) a stabilizovaného (**F**) ylidu.

Mechanismus Wittigovy reakce je podrobněji nastíněn ve schématu 4. Nukleofilní atom uhlíku fosfonium-ylidu (**D**, schéma 4) se aduje na elektronově deficitní uhlík karbonylové skupiny aldehydu nebo ketonu (**G**) za vzniku betainového meziprojektu (**H**). Betain je definován jako neutrální dipolární sloučenina s náboji na nesousedních atomech. Vznikem intramolekulární vazby O–P se betain přemění na čtyřčlenný cyklický meziprodukt, nazývaný oxafosfetan (**I**), který se spontánně rozkládá na alken (**J**) a trifenylofosfinoxid (**K**). Meziprojekt z reakce nelze izolovat.^{52,55}

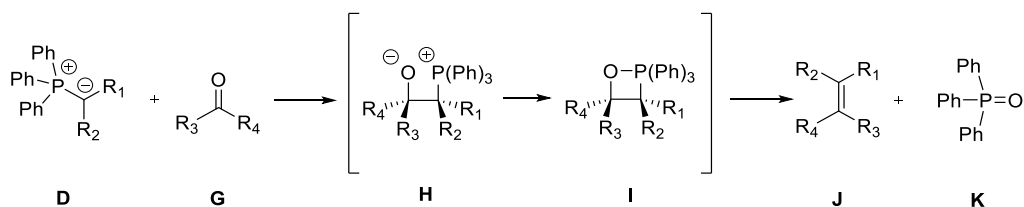


Schéma č. 4: Wittigova reakce.

Stereoselektivita Wittigovy reakce je přímo spojena s jejím mechanismem. Konkrétně závisí na kroku tvorby cyklického meziprojektu **I**, kdy může vzniknout *cis*- (**L**) i *trans*- (**N**) oxafosfetan (schéma 5). Takto vytvořené meziprojekt jsou podrobeny stereospecifické syneliminaci za vzniku odpovídajících *E*- (**O**) nebo *Z*- (**M**) alkenů.⁵⁵ Stereoselektivita úzce souvisí rovněž s typem použitého ylidu. Nestabilizované fosfonium-ylidy dávají vzniknout zpravidla *Z*-alkenům (**M**), stabilizované ylidy naopak poskytují převážně *E*-alkeny (**O**). Další významnou roli hrají reakční podmínky. Konečný podíl vznikajících *Z*- a *E*-izomerů lze do určité míry termodynamicky kontrolovat. Za nízkých teplot je preferována tvorba *cis*-oxafosfetanu (**L**, schéma 5), a tedy výsledný

produkt je *Z*-alken (**M**). Pokud se reakční směs zahřívána, vzniká převážně *E*-alken (**O**) syneliminací trans-oxafosfetanu (**N**).⁵⁴

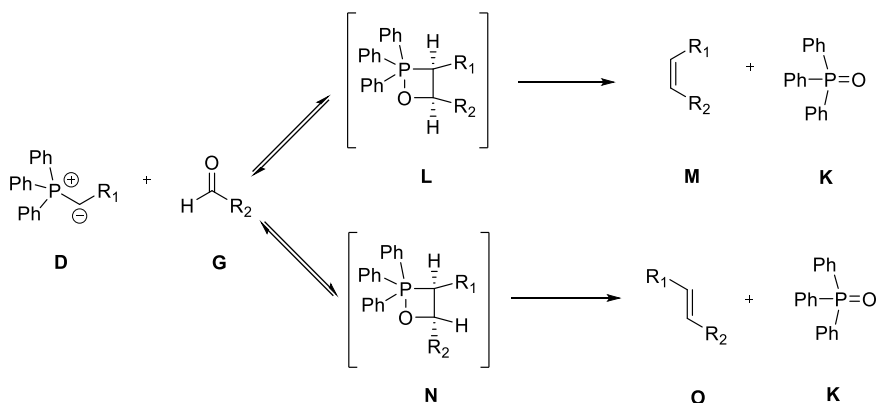


Schéma č. 5: Stereochemie Wittigovy reakce – vznik *E*- a *Z*-alkenů.

3.2 Modifikace Wittigovy reakce

Možnosti použití klasické Wittigovy reakce mají určitá omezení. Reakce není vhodná pro většinu stericky bráněných ketonů, pro které poskytuje nízké výtěžky. Dalším problémem může být nedostatečná stereoselektivita, kdy klasickým mechanismem nelze v některých případech připravit čisté *E*-izomery. Tato omezení vedla k vývoji nových modifikací klasické metody, přičemž mezi nejpoužívanější patří Schlosserova a tzv. Horner-Wadsworth-Emmonsowa (HWE) modifikace.

Podstatným rozdílem Schlosserovy modifikace je přidání lithiové soli do Wittigovy reakce. V přítomnosti Li⁺ vznikají poměrně stabilní betainy, které je možné deprotonovat. Řízená opětovná protonace probíhá použitím stericky bráněného donoru protonů za vzniku transbetainu (**N**, schéma 6). Použitím dalšího ekvivalentu báze dochází ke vzniku *E*-alkenu.⁵⁶

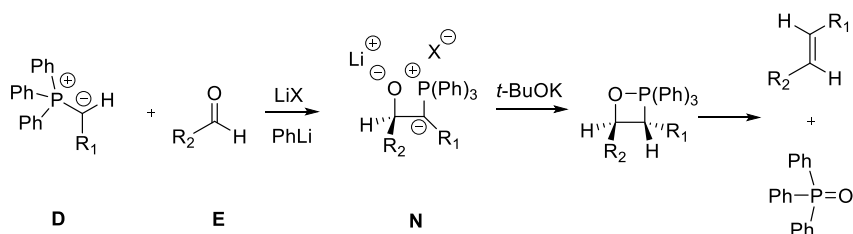


Schéma č. 6: Schlosserova reakce

Při Horner-Wadsworth-Emmonsově (HWE) reakci je hlavním reakčním činidlem stabilizovaný fosfonátový karbanion (**O**, schéma 7), který lze připravit reakcí Michaelis-Arbuzova,⁵⁷ tedy alkyací trialkylfosfitu příslušným alkylhalogenidem. Metoda je velmi výhodná pro ketony, které za běžných podmínek reagují neochotně. Za správných reakčních podmínek vzniká čistý *E*-alken (**P**) a jako vedlejší produkt fosfátový ion **Q**, který lze snadno z reakce odstranit extrakcí.^{58,59}

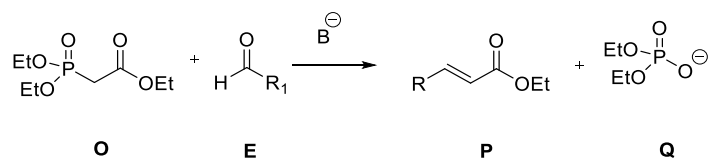


Schéma č. 7: Horner-Wadsworth-Emmonsova reakce.

Výsledky a diskuze

4. Příprava výchozích sloučenin

4.1 Benzylester kyseliny betulinové

Výchozí látkou celé práce byla kyselina betulinová (**I**, schéma 8), která byla na počátku ochráněna v poloze 28 benzylesterem. Ochránění karboxylové funkce bylo provedeno z důvodu snazší práce s benzylovanými produkty v počátcích syntézy (rozpuštnost, jednodušší separace produktů na sloupcové chromatografii, krystalizace) a pro prvotní optimalizaci Wittigových reakcí.

Benzylester kyseliny betulinové (**II**, schéma 9) byl připraven alkylací kyseliny betulinové **I** benzyl bromidem v THF modifikovaným postupem z literatury⁶⁰. Výtěžek reakce po purifikaci a následné krystalizaci ze směsi hexan – EtOAc byl 94 %. Tato látka byla následně oxidována v poloze 30 na aldehyd **III**.

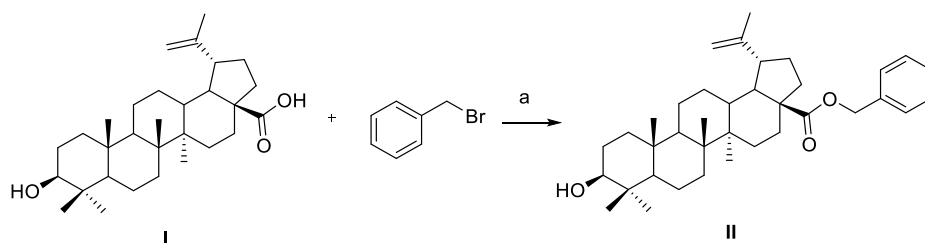


Schéma č. 8: Příprava benzylesteru kyseliny betulinové **II** (a: K₂CO₃, THF, reflux, 24 hod).

4.2 Benzylester kyseliny 30-oxobetulinové

Oxidace benzylesteru **II** (schéma 9) v poloze 30 na aldehyd byla učiněna pomocí oxidu seleničitého v prostředí 2-methoxyethanolu (GLYM) podle postupu v literatuře³⁹. Produkt **III** byl po zpracování reakce purifikován s výtěžkem 27 %. Nízký výtěžek je způsoben ztrátami produktu při sloupcové chromatografii. Takto připravený aldehyd **III** byl použit jako výchozí látka pro první pokusy Wittigovy reakce na triterpenu v poloze C-30.

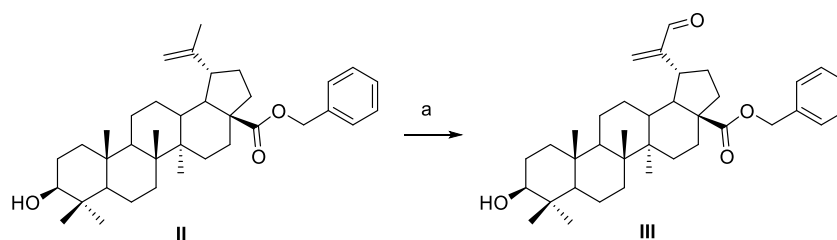


Schéma č. 9: Příprava benzylesteru kyseliny 30-oxobetulinové **III** (a: SeO_2 , GLYM, reflux, 24 hod).

4.3 Kyselina 30-oxobetulinová

Kyselina 30-oxobetulinová (**IV**, schéma 10) byla připravena oxidací kyseliny betulinové rovněž pomocí oxidu seleničitého v prostředí 2-methoxyethanolu (GLYM) podle postupu v literatuře³⁹. Purifikace kyseliny **IV** je z důvodu její velmi špatné rozpustnosti v běžně používaných organických rozpouštědlech značně obtížná. Vzhledem k tomu, že během zpracování reakce byl finální produkt vysrážen v dostatečné čistotě, nebyla purifikace na sloupcové chromatografii provedena. Tato surová kyselina **IV** byla následně použita jako prekurzor pro syntézu finálních derivátů s volnou karboxylovou skupinou v poloze 28, která je klíčová pro cytotoxickou aktivitu.

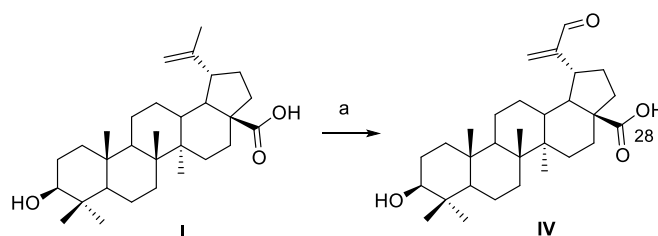


Schéma č. 10: Příprava kyseliny 30-oxobetulinové **IV** (a: SeO_2 ; GLYM, reflux, 24 hod).

5. Příprava fosfoniových solí

Fosfoniové soli **Va–Vk** (schéma 11) byly základním reakčním činidlem pro syntézu požadovaných derivátů. Pro tuto práci bylo vybráno deset různě substituovaných bromidů, které posloužily jako výchozí látka k jejich syntéze. Zvolené bromidy obsahují jak aktivující a deaktivující skupiny na benzenovém jádře v různé poloze, tak také jeden heterocyklus a jeden alkylový řetězec. Příprava solí zahrnovala reakci trifenylofosfinu s příslušným bromidem v toluenu nebo acetonitrilu. Jednotlivé podmínky reakcí jsou

podrobně rozvedeny v experimentální části. Požadovaná sůl se zpravidla již po několika minutách reakce srážela ve formě bílých, popř. lehce zbarvených krystalů z reakční směsi. Po ukončení reakce byla směs zfiltrována na fritě, odsátá sůl byla promyta diethyletherem, vysušena a uchovávána v lahvičkách pod inertní atmosférou. Tímto způsobem bylo připraveno devět fosfoniových solí **Vb–Vj**. Reakce proběhly s kvantitativními výtěžky v rozmezí 87–97 %, purifikace připravených solí nebyla prováděna. Nejjednodušší trifenylofosfoniová sůl **Va** byla komerčně dostupná, syntéza z příslušného bromidu proto nebyla provedena.

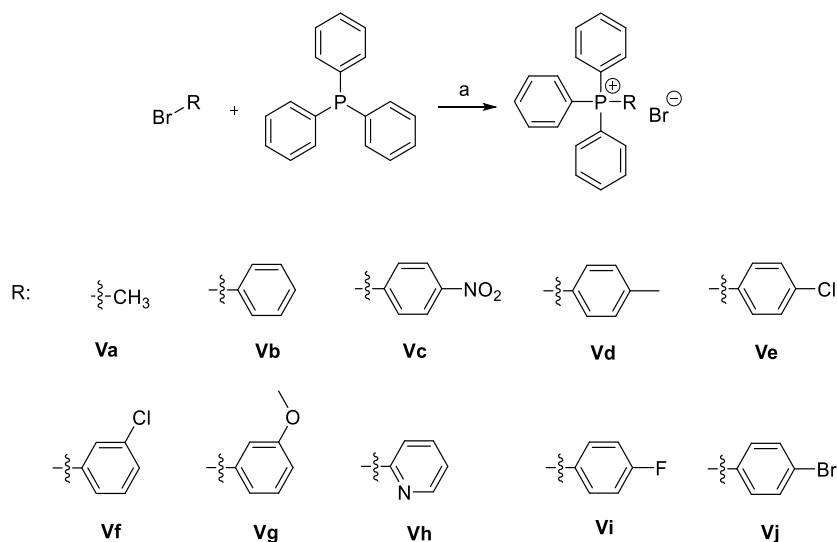


Schéma č. 11: Fosfoniové soli používané k syntéze finálních triterpenických derivátů.

6. Optimalizace reakčních podmínek

Vzhledem ke skutečnosti, že možnosti využití Wittigovy reakce v poloze 30 triterpenoidního skeletu nebyly dosud v chemii terpenů podrobněji prozkoumány, byla značná část práce věnována optimalizaci reakčních podmínek. Výchozí látkou prvních pokusů Wittigovy reakce byl aldehyd **III**.

Příprava samotných derivátů probíhala zpočátku v baňce opatřené septem s inertní dusíkovou atmosférou. Do baňky byla nejprve vsypána fosfoniová sůl (**Va–Vd**) a *t*-BuOK, poté byl pomocí stříkačky přes septum přidán toluen. Bezbarvá heterogenní směs byla umístěna na míchačku a vznik příslušného fosfonium-ylidu byl charakterizován změnou v homogenní roztok výrazné barvy cca po 30–45 minutách reakce. Následně bylo zjištěno, že použití ultrazvuku značně urychlí vznik příslušného ylidu, přičemž zhruba po 5 minutách sonifikace bylo zbarvení reakční směsi velmi

intenzivní. K roztoku připraveného ylidu byl poté vsypán aldehyd **III**, baňka byla umístěna do olejové lázně vyhřáté na teplotu 60 °C a reakce byla ponechána do druhého dne. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC.

Výběr vhodného rozpouštědla, reakční teploty, reakčního času a množství použité fosfoniové soli spolu s bází následně probíhal s použitím nejjednodušší soli **Va** (schéma 12). Nejprve bylo nasazeno pět paralelních reakcí s použitím 2 ekvivalentů soli a 2,1 ekvivalentů báze (mírný nadbytek) v DCM, CHCl₃, toluenu, THF a dioxanu, které běžely 7 dní za pokojové teploty (použitá rozpouštědla nebyla suchá). Stejný set reakcí běžel současně při zahřívání na 50 °C. Průběh reakcí byl průběžně kontrolován a porovnáván pomocí TLC. Reakce částečně probíhaly ve všech rozpouštědlech za obou teplotních podmínek, avšak ani po sedmi dnech nedošlo ke stoprocentní konverzi výchozí látky. Lze však konstatovat, že zahřívání značně podpořilo reakci, přičemž reakční doba nehraje zásadní roli. Nejlepší konverze výchozí látky v produkt byla pozorována v toluenu při zahřívání na 50 °C již po prvním dni reakce. Následující dny se do složení reakční směsi nijak nepromítly.

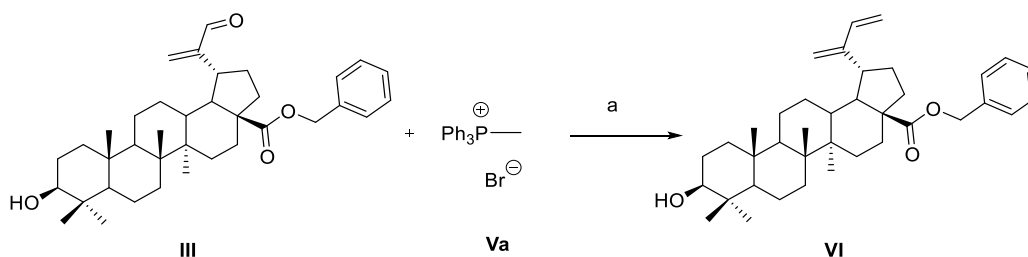


Schéma č. 12: Příprava derivátu **VI** (a: *t*-BuOK, toluen, 50 °C, 24 h).

6.1 Konjugát **VI**

Při přípravě derivátu **VI** (schéma 12) nejprve reagovaly 3 ekvivalenty fosfoniové soli **Va** s 3,5 ekvivalentu *t*-BuOK v toluenu. Po vytvoření žlutě zbarveného gelovitého ylidu byl přidán výchozí aldehyd **III**. Reakce byla zahřívána na 60 °C za inertních podmínek po dobu 24 hodin, po kterých se směs odbarvila. Pomocí TLC bylo zjištěno, že výchozí aldehyd nebyl zcela spotřebován. Reakční směs byla následně odpařena a poté přečištěna sloupcovou chromatografií s výtěžkem 75 %. Struktura produktu byla potvrzena spektrálními daty.

6.2 Konjugát VII

Při přípravě derivátu **VII** (schéma 13) nejprve reagovaly 3 ekvivalenty fosfoniové soli **Vb** se 3 ekvivalenty *t*-BuOK a po vytvoření sytě červeného gelovitého fosfonium-ylidu byl přidán výchozí aldehyd **III**. Reakční teplota byla oproti předchozímu experimentu zvýšena na 80 °C, reakce probíhala za inertních podmínek po dobu 24 h. Pomocí TLC bylo zjištěno, že směs stále obsahovala stopy výchozí látky. Po purifikaci byl výtěžek reakce 89 %. Z naměřeného ¹H NMR bylo zjištěno, že se nejedná o čistý produkt, ale o směs dvou látek. Podrobnější analýzou spektra a ze zjištěných interakčních konstant dubletů dvojných vazeb byly identifikovány dva izomery požadovaného produktu odvozené od rozdílné konfigurace na dvojně vazbě mezi atomy C30–C31. Ve směsi převažoval *E*-izomer ($J = 16,2$ Hz) nad *Z*-izomerem ($J = 12,6$ Hz), což je patrné z obr. 26.

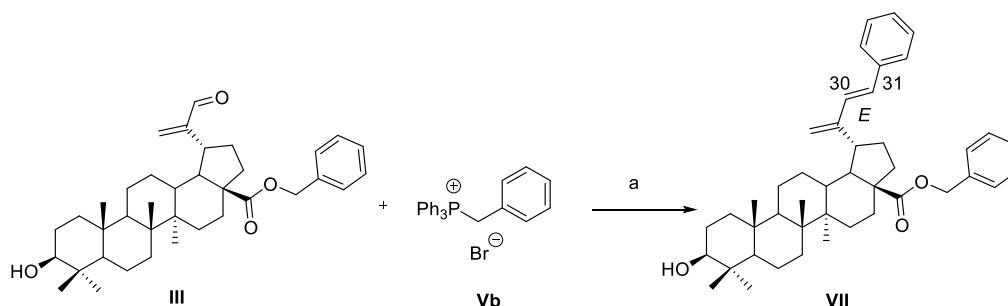
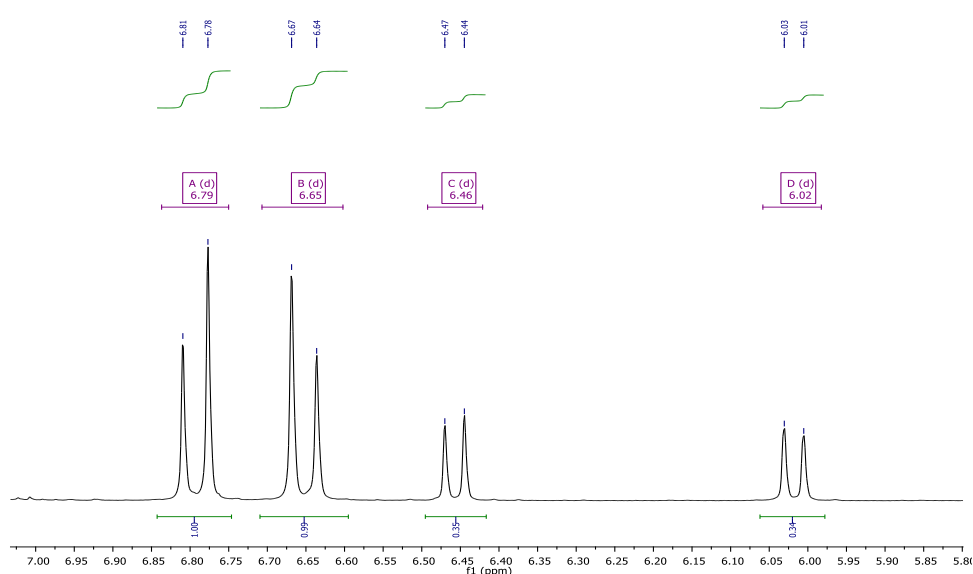


Schéma č. 13: Schéma přípravy derivátu **VIIb** (a: *t*-BuOK, toluen, 60 °C, reflux, 24 hod).



Obrázek č. 26: Výřez ¹H NMR spektra protonů dvojně vazby C30–C31 připraveného derivátu **VII** (vlevo *E*-izomer, vpravo *Z*-izomer).

6.3 Konjugát VIII

Při přípravě derivátu **VIII** (schéma 14) nejprve reagovaly 2 ekvivalenty fosfoniové soli **Vc** s 2 ekvivalenty *t*-BuOK a po vytvoření sytě červeného gelovitého fosfonium-ylidu byl přidán výchozí aldehyd **III**. Reakční teplota byla zvýšena na 100 °C z důvodu nedostatečné konverze výchozí látky u předchozích experimentů, reakce probíhala v THF za inertních podmínek po dobu 24. Konečná směs měla žlutou barvu. Po zpracování a purifikaci činil výtěžek 34 %, což bylo pravděpodobně způsobeno použitím nižšího množství fosfonium-ylidu vůči aldehydu **III**. Naměřené ¹H NMR spektrum opět potvrdilo přítomnost obou izomerů *E* a *Z*, v tomto případě ovšem převažovalo množství *Z*-izomeru.

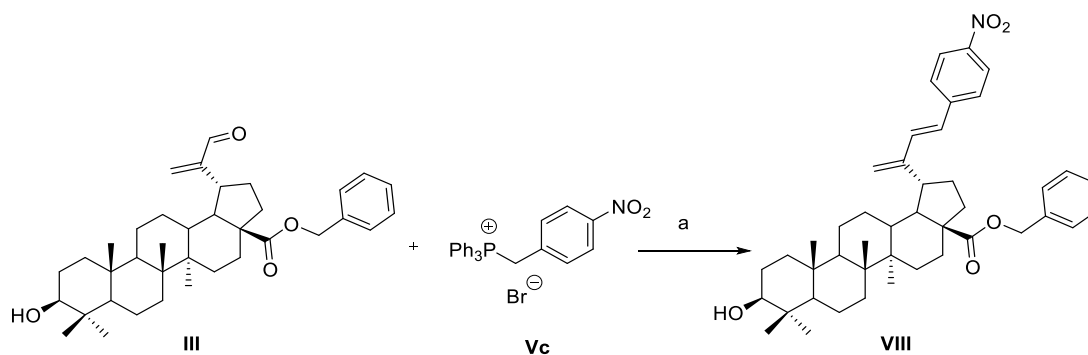


Schéma č. 14: Schéma přípravy derivátu **VIII** (a: *t*-BuOK, toluen, 60 °C, reflux, 24 hod).

6.4 Konjugát IX

Při přípravě derivátu **IX** (schéma 15) nejprve reagovaly 3 ekvivalenty fosfoniové soli **Vd** se 4 ekvivalenty *t*-BuOK a po vytvoření červeného gelovitého fosfonium-ylidu byl přidán výchozí aldehyd **III**. Z důvodu eliminace vznikajícího druhého izomeru byla snížena reakční teplota. Reakce probíhala v toluenu při pokojové teplotě za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Pomocí TLC bylo zjištěno, že opět nedošlo ke stoprocentní konverzi výchozího materiálu. Po purifikaci sloupcovou chromatografií byl výtěžek reakce 65 %. Naměřené ¹H NMR spektrum sice potvrdilo přítomnost obou izomerů, ale *E*-izomer byl ve značném nadbytku. Tímto experimentem bylo odhaleno, že přítomnost obou izomerů v reakční směsi zapříčiňuje vysoká reakční teplota. Za laboratorní teploty vzniká přednostně *E*-izomer.

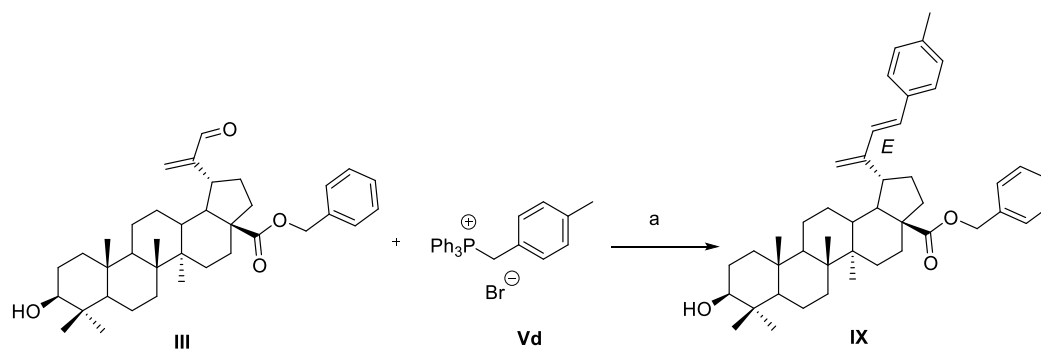


Schéma č. 15: Schéma přípravy derivátu **IX** (a: *t*-BuOK, toluen, rt, 24 hod).

7. Příprava finálních derivátů kys. betulinové

Po prvotní optimalizaci bylo přistoupeno k syntéze požadovaných derivátů s volnou karboxylovou skupinou v poloze 28. Zpočátku reakce probíhaly v baňce pod dusíkovou inertní atmosférou za laboratorní teploty. Vzhledem k velmi nízkým výtěžkům a opětovně nedostatečné konverzi výchozí látky bylo třeba reakční podmínky dále upravit. Pro zajištění inertního prostředí bylo přistoupeno k použití vakuové linky. Reakce probíhaly ve vyžíhané šlenkovce na vakuové lince pod argonem. Rovněž bylo potřeba změnit rozpouštědlo, jelikož výchozí aldehyd **IV** byl v toluenu špatně rozpustný a vytvářel gel. Použití suchého THF vyřešilo potíže s rozpustností, což značně přispělo ke zdárnému průběhu reakce. Následně bylo třeba optimalizovat množství soli a báze, aby konverze výchozího materiálu byla stoprocentní. Po řadě neúspěšných pokusů bylo zjištěno, že v případě použití 4 ekvivalentů fosfonium-ylidu vůči výchozímu aldehydu a 4,5 ekvivalentů báze dojde ke spotřebování veškeré výchozí látky do druhého dne při laboratorní teplotě za vylučného vzniku požadovaného produktu. Reakční směs byla následně extrahována a po odpaření chromatografována na sloupci silikagelu. Výsledný produkt byl charakterizován pomocí fyzikálních i spektrálních dat; všechny deriváty byly připraveny jako čisté *E*-izomery. Jednotlivé reakční podmínky jsou podrobněji rozepsány v experimentální části. Hotové deriváty byly poslány na testování cytotoxické aktivity, výsledky jsou uvedeny v samostatné kapitole níže.

V ^1H NMR spektru finálních derivátů byly nalezeny charakteristické signály triterpenoidního skeletu kyseliny betulinové – pět singletů CH_3 skupiny při $\delta \approx 0,74\text{--}1,01$ ppm, dále dublet dubletu odpovídající vodíku H-3 α při $\delta \approx 3,2$ ppm s interakčními konstantami 11,4 Hz a 4,7 Hz, triplet dubletu odpovídající vodíku H-19 β při $\delta \approx 3,3$ ppm s interakčními konstantami 11,1 Hz a 4,7 Hz. U jednotlivých derivátů byly poté nalezeny

signály odpovídající vodíkům dvojných vazeb v polohách 29, 30 a 31 v rozmezí $\delta \approx 5,1\text{--}7,2$ ppm a rovněž signály vodíků na aromatickém kruhu příslušných substituentů. V ^{13}C NMR spektru jsou patrné signály uhlíků nově vzniklé dvojně vazby v oblasti $\delta \approx 110\text{--}160$ ppm. V IR spektru byl nalezen pás hydroxylové skupiny v oblasti vlnočtů kolem 3400 cm^{-1} a C=O karboxylu při 1690 cm^{-1} , dále dva pásy okolo 2940 a 2870 cm^{-1} charakterizující vibrace vazeb C–H triterpenoidního skeletu a pás C=C vazeb okolo 1590 cm^{-1} . Pomocí HRMS byla potvrzena struktura nových derivátů podle hmoty odpovídající molekulovým iontům $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.1 Konjugát X

Při přípravě derivátu **X** (schéma 16) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Vf** s *t*-BuOK a po vytvoření sytě oranžového fosfonium-ylidu (cca po 30 min) byl přidán výchozí aldehyd **IV**. Reakce probíhala v suchém THF na vakuové lince pod inertní atmosférou po dobu 24 hodin. Derivát byl připravován třikrát (optimalizace reakčních podmínek), s nejlepším výtěžkem 60 %. Struktura derivátu **X** byla potvrzena spektrálními daty.

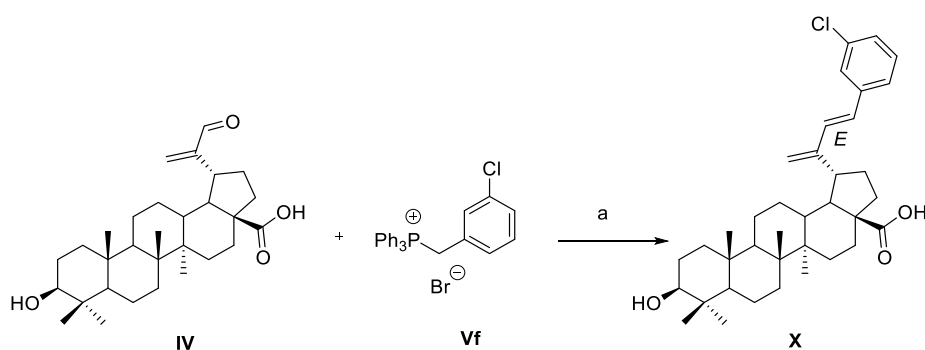


Schéma č. 16: Příprava derivátu **X** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.2 Konjugát XI

Při přípravě derivátu **XI** (schéma 17) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Ve** s *t*-BuOK a po vytvoření fosfonium-ylidu oranžového zbarvení byl přidán výchozí aldehyd **IV** a barva roztoku se změnila až na tmavě červenou. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Po purifikaci byl výtěžek reakce 44 %. Struktura derivátu **XI** byla potvrzena pomocí spektrálních dat.

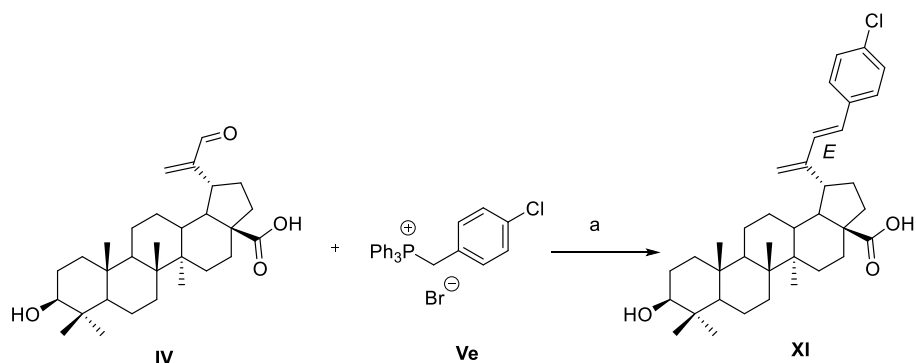


Schéma č. 17: Schéma přípravy derivátu **XI** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.3 Konjugát XII

Při přípravě derivátu **XII** (schéma 18) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Vi** s *t*-BuOK a po vytvoření červeného fosfonium-ylidu byl přidán výchozí aldehyd **IV** a reakční směs se zbarvila do oranžova. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Výsledný roztok měl hnědou barvu. Reakce byla opakována třikrát s nejlepším výtěžkem 38 %. Struktura derivátu **XII** byla potvrzena spektrálními daty.

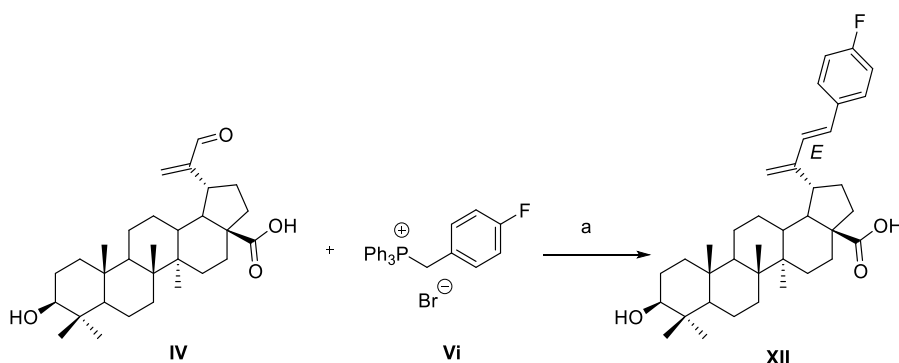


Schéma č. 18: Schéma přípravy derivátu **XII** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.4 Konjugát XIII

Při přípravě derivátu **XIII** (schéma 19) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Vj** s *t*-BuOK a po vytvoření sytě oranžového fosfonium-ylidu byl přidán výchozí aldehyd **IV**. Po ukončení reakce měl roztok oranžovou barvu. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Výtěžek reakce po purifikaci dosáhl 64 %. Struktura derivátu **XIII** byla potvrzena spektrálními daty.

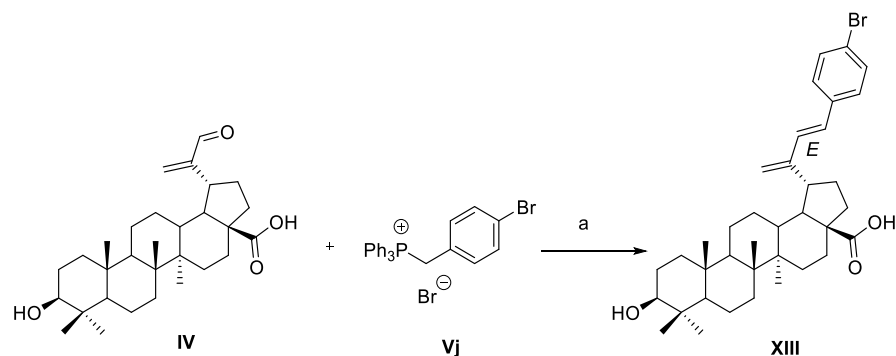


Schéma č. 19: Schéma přípravy derivátu **XIII** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.5 Konjugát XIV

Při přípravě derivátu **XIV** (schéma 20) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Vb** s *t*-BuOK a po vytvoření sytě oranžového fosfonium-ylidu byl přidán výchozí aldehyd **IV**. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Výtěžek reakce po purifikaci byl 35 %. Struktura derivátu **XIV** byla potvrzena spektrálními daty.

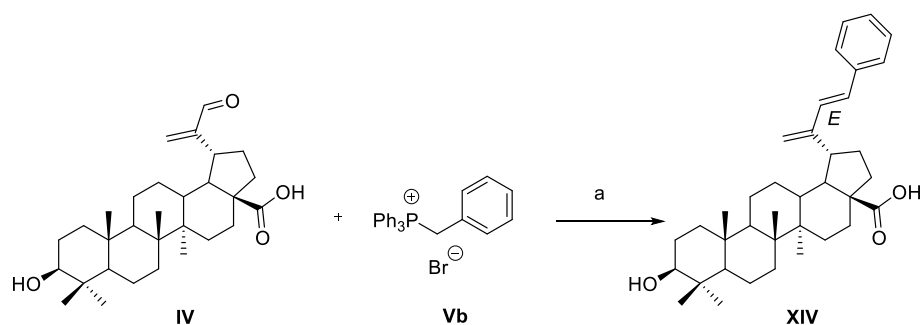


Schéma č. 20: Schéma přípravy derivátu **XIV** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.6 Konjugát XV

Při přípravě derivátu **XV** (schéma 21) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Vd** s *t*-BuOK a po vytvoření fosfonium-ylidu červeného zbarvení byl přidán výchozí aldehyd **IV** a reakční směs zhnědla. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Výtěžek reakce po purifikaci činil 38 %. Struktura derivátu **XV** byla potvrzena spektrálními daty.

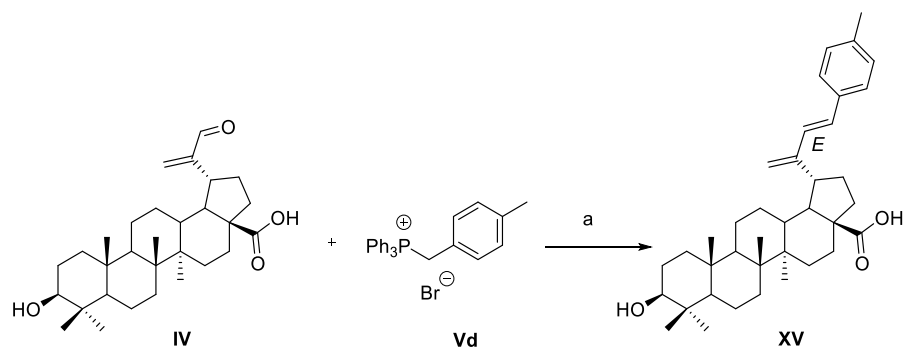


Schéma č. 21: Příprava derivátu **XV** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.7 Konjugát **XVI**

Při přípravě derivátu **XVI** (schéma 22) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Vg** s *t*-BuOK a po vytvoření oranžového fosfonium-ylidu byl přidán výchozí aldehyd **IV**. Po ukončení reakce měl roztok hnědou barvu. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Reakci jsem opakovala dvakrát s nejlepším výtěžkem 38 %. Struktura derivátu **XVI** byla potvrzena spektrálními daty.

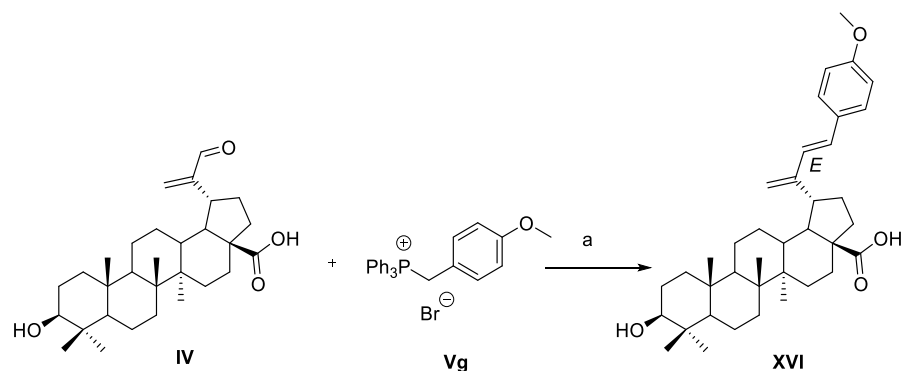


Schéma č. 22: Příprava derivátu **XVI** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.8 Konjugát **XVII**

Při přípravě derivátu **XVII** (schéma 23) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Vk** s *t*-BuOK a po vytvoření sytě žlutého ylidu byl přidán výchozí aldehyd **IV** a reakce změnila svou barvu do oranžova. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Výtěžek po purifikaci byl 60 %. Struktura derivátu **XVII** byla potvrzena spektrálními daty. Tento derivát je velmi špatně rozpustný v CHCl_3 a v MeOH, vzorky pro měření HRMS a NMR proto byly rozpuštěny v DMSO.

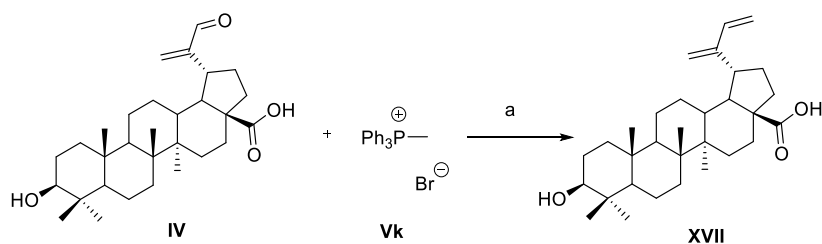


Schéma č. 23: Příprava derivátu **XVII** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.9 Konjugát XVIII

Při přípravě derivátu **XVIII** (schéma 24) bylo nejprve zapotřebí připravit fosfoniovou sůl z komerčně dostupného hydrobromidu. Ten byl nejprve neutralizován pomocí K_2CO_3 na $pH = 7$ (sytě červené zbarvení), extrahován, odpařen a poté použit pro přípravu fosfoniové soli obvyklým způsobem. Příprava bude podrobněji popsána v experimentální části.

Připravená fosfoniová sůl béžové barvy **Vh** reagovala s *t*-BuOK a po vytvoření ylidu (červenohnědé zbarvení) byl přidán výchozí aldehyd **IV**. V průběhu reakce měla reakční směs hnědou barvu. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 5 dní. Po purifikaci produktu byl výtěžek 39 %. Struktura derivátu **XVIII** byla potvrzena spektrálními daty.

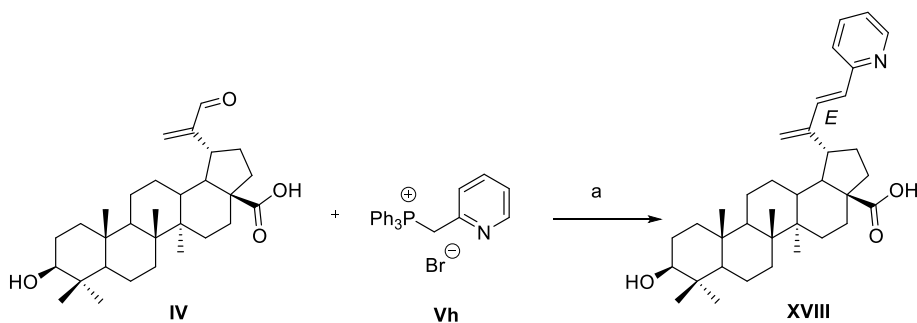


Schéma č. 24: Příprava derivátu **XVIII** (a: *t*-BuOK, THF, rt, 24 hod).

7.10 Konjugát XIX

Při přípravě derivátu **XIX** (schéma 25) nejprve reagovala fosfoniová sůl **Vc** s *t*-BuOK. Po vytvoření ylidu (sytě červená barva) byl přidán výchozí aldehyd **IV**, intenzita červeného zbarvení během reakce slábla. Reakce probíhala v suchém THF za inertních podmínek po dobu 24 hodin. Tuto reakci jsem opakovala dvakrát, pokaždé byla výsledkem směs *Z*- i *E*-izomeru. Reakce byla proto zopakována při teplotě $-30\text{ }^\circ\text{C}$ kvůli

eliminaci nežádoucího izomeru, přičemž reakční čas byl prodloužen na 48 hodin. V tomto případě nedošlo ke konverzi výchozí látky v produkt. Při dalším pokusu byla reakce zahřívána na 70 °C, reakční čas byl 24 hodin. Po následném zpracování, sloupcové chromatografii ve směsi rozpouštědel toluen – diethylether a změření ^1H NMR spektra tentýž den bylo zjištěno, že se jedná o čistý *E*-izomer. Po odstranění zbytkového toluenu a opětovném měření ^1H -NMR spektra o týden později již byly ve spektru objeveny oba izomery. Z výsledků vyplývá, že v případě tohoto derivátu dochází postupem času k ustavení rovnováhy mezi oběma izomery. Tato skutečnost je podpořena přítomností nitroskupiny v para poloze na benzenovém jádře, kdy lze nalézt několik rezonančních variant prokonjugované části molekuly (schéma 26), u kterých dochází k posunu dvojně vazby, což může zapříčinit přechod jednoho izomeru ve druhý. Struktura derivátu **XIX** byla potvrzena spektrálními daty, z důvodu přechodu čistého *E*-izomeru v opačný však nebylo změřeno ^{13}C NMR spektrum.

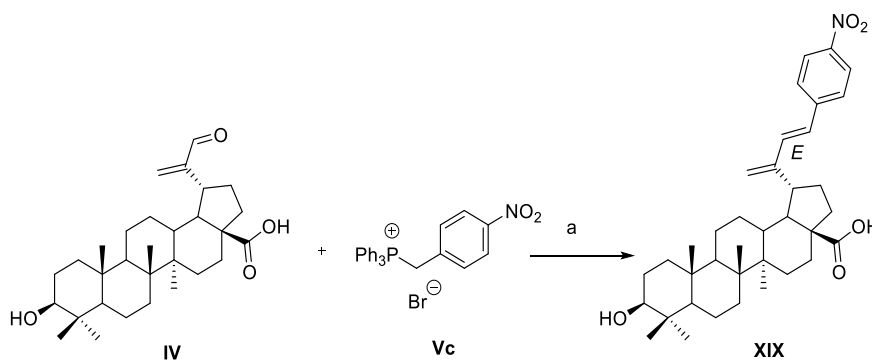


Schéma č. 25: Příprava derivátu **XIX** (a: *t*-BuOK, THF, 70 °C, 24 hod).

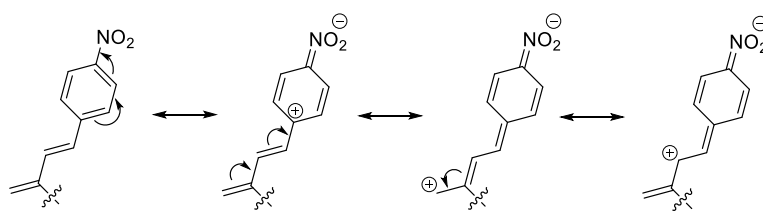


Schéma č. 26: Rezonanční struktury derivátu **XIX**.

8. Testování cytotoxické aktivity

Měření cytotoxické aktivity proběhlo metodou MTT testu⁶¹, kterému bylo podrobena všech deset finálních sloučenin. K datu odevzdání této práce byly dostupné výsledky pro sloučeniny **X**, **XI**, **XII**, **XIII**, **XIV**, **XV**, **XVI** a **XIX**. Testování proběhlo na 8 nádorových a 2 kontrolních nenádorových buněčných liniích (BJ a MRC-5) a bylo provedeno na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha Ph.D. v Laboratoři experimentální medicíny.

Výsledky jsou zpracovány v tabulce č. 1 a okomentovány v závěru práce. Pokud jsou u nádorových buněčných linií hodnoty $IC_{50} > 50 \mu\text{M/L}$, pak derivát považujeme za neúčinný.

Tabulka 1: Výsledky měření cytotoxické aktivity připravených sloučenin

Sloučenina	IC_{50} ($\mu\text{M/L}$)									
	CCRF-CEM	CEM-DNR	HCT116	HCT116 p53 ^{-/-}	K562	K562-TAX	A549	U2OS	BJ	MRC-5
X	5,49	33,39	35,60	43,47	40,00	29,18	42,33	25,63	>50,00	>50,00
XI	5,42	33,14	39,49	38,50	45,31	29,22	45,43	25,80	>50,00	>50,00
XII	4,85	31,40	35,39	40,98	36,17	29,81	40,56	23,90	44,64	38,27
XIV	6,45	30,20	35,53	39,51	40,04	25,31	41,81	24,21	>50,00	>50,00
XV	6,53	39,49	>50,00	>50,00	>50,00	>50,00	49,77	40,31	>50,00	>50,00
XVI	4,58	30,55	34,63	39,63	41,37	25,55	40,09	25,24	>50,00	44,08
XVIII	>50,00	>50,00	>50,00	>50,00	>50,00	>50,00	>50,00	>50,00	>50,00	>50,00
XIX	3,57	22,91	18,57	15,72	11,49	23,41	14,25	19,48	24,28	19,15

Směrodatná odchylka cytotoxické aktivity se obvykle pohybuje do 15 % průměrné naměřené hodnoty.

Závěr

1. Byla vypracována literární rešerše, která se zabývá deriváty kyseliny betulinové modifikovanými v poloze C-30 a jejich biologickými aktivitami.
2. V dostatečném množství byly připraveny výchozí látky **III** a **IV**.
3. Jako základní reakční činidlo pro Wittigovu reakci bylo navrženo deset fosfoniových solí, z toho devět bylo připraveno v dostatečném množství potřebném pro syntézu. Fosfoniová sůl **Va** byla komerčně dostupná.
4. Byly optimalizovány podmínky Wittigovy reakce na benzylesteru kyseliny betulinové.
5. Bylo připraveno celkem deset doposud nepopsaných derivátů kyseliny betulinové modifikovaných v poloze C-30 – **X**, **XI**, **XII**, **XIII**, **XIV**, **XV**, **XVI**, **XVII**, **XVIII**, **XIX** a čtyři deriváty benzylesteru kyseliny betulinové **VI**, **VII**, **VIII** a **IX** na kterých byla prováděna optimalizace Wittigovy reakce.
6. Získané deriváty kyseliny betulinové byly plně charakterizovány spektrálními daty (s výjimkou derivátu **XIX**, pro který nebylo změřeno ^{13}C NMR spektrum z důvodu konverze na druhý izomer).
7. Všechny připravené sloučeniny byly připraveny na *in vitro* testování cytotoxické aktivity na osmi nádorových a dvou nenádorových buněčných liniích. Osm z nich (**X**, **XI**, **XII**, **XIV**, **XV**, **XVI**, **XVIII** a **XIX**) již bylo otestováno. Derivát **XVIII** je neaktivní na všech buněčných liniích (hodnoty $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$). Ostatní deriváty naopak vykazují dobré hodnoty biologických aktivit (v rozmezí $\text{IC}_{50} = 3,57\text{--}6,53 \mu\text{M}$) na vysoce chemosenzitivní buněčné linii T-lymfoblastické leukémie CCRF/CEM. Nejaktivnější deriváty **XII**, **XVI**, **XIX**, které na nádorové buněčné linii CCRF-CEM mají hodnotu IC_{50} nižší než $5 \mu\text{M}$, vykazují poměrně nízkou toxicitu vůči nenádorovým buněčným liniím BJ a MRC-5 s terapeutickým indexem okolo 10. Deriváty **X**, **XI**, **XIV**, **XV** jsou jen o málo méně aktivní než předchozí skupina, avšak jejich toxicita je nižší než detekční limit a jsou tak považovány za selektivně cytotoxické vůči nádorové linii CCRF-CEM.

Experimentální část

1. Obecný úvod k experimentální části

Průběh reakcí a čistota produktů byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieslelgel 60 F₂₅₄. Detekce probíhala dvojí kontrolou – nejprve pod UV zářením při vlnové délce 254 nm a následně byla fólie vizualizována postřikem 10 % kyselinou sírovou a zahřátím horkovzdušnou pistolí na teplotu přibližně 200 °C.

Pro vyvíjení TLC fólií byly použity tyto eluční soustavy:

A. Hexan / EtOAc 3 : 1

B. CHCl₃ / EtOAc 10 : 1

C. Toluen / Et₂O 2 : 1

Odpařování rozpouštědel bylo prováděno na rotační vakuové odparce (RVO) Büchi Rotavapor R-215. Připravené látky byly charakterizovány pomocí spektrálních metod – NMR, IR HRMS a stanovení teploty tání. Měření NMR spekter bylo prováděno na přístroji JEOL ECX-500SS s frekvencí 500 Hz (¹H NMR) a 126 MHz (¹³C NMR) za laboratorní teploty a za použití CDCl₃ nebo DMSO-d₆ jako rozpouštědla. Chemické posuny spekter byly referencovány vůči signálu reziduálního CHCl₃ v CDCl₃ při $\delta = 7,27$ ppm (¹H NMR) a vůči signálu CDCl₃ při $\delta = 77,00$ ppm (¹³C NMR). Chemické posuny (v ppm) a interakční konstanty (v Hz) byly určovány analýzou prvního řádu. Hodnoty pro chemický posun byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, zatímco hodnoty interakčních konstant na jedno desetinné místo. Vyhodnocení spekter proběhlo v programu JEOL Delta v5.0.2. a MestReNova 6.0.2-5475. IR spektra byla měřena na spektrometru Thermo Nicolet AVATAR 370 FTIR se střední oblastí v 400–4000 cm⁻¹ a zpracována v programu OMNIC 8.3. Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Dionex Ultimate 3000, Thermo Exactive plus, vzorky byly rozpuštěny v MeOH (kromě konjugátu **XVII**, který byl rozpuštěn v DMSO). Teploty tání byly změřeny na bodotávku PHMK 78/1586, hodnoty nebyly korigovány. Připravené deriváty byly podrobeny testování na cytotoxickou aktivitu na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha, Ph.D. Testování probíhalo následovně: Příslušná sloučenina byla přidána ke tkáňové kultuře buněk T-lymfoblastické leukémie CEM v šesti různých koncentracích. Doba inkubace trvala 72 hodin při 37 °C v přítomnosti

5 % oxidu uhličitého a 100 % vlhkosti. Do každé jamky byl přidán MTT-[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid] a následovala inkubace po další 4 hodiny. Přidáním dodekansulfonátu sodného nastalo ukončení inkubace a přežívající buňky byly stanoveny spektrofotometricky při 540 nm. Koncentrace usmrcující 50 % nádorových buněk – IC₅₀ – byla vyhodnocena z křivek dávkové závislosti.

Řada reakcí byla provedena opakovaně, s drobnými odchylkami. V experimentální části jsou popsány optimalizované reakční postupy, při kterých bylo dosaženo nejvyšších výtěžků.

Obecné postupy zpracování reakční směsi:

A: Reakční směs byla nalita do šestinásobku objemu destilované vody a posléze byla extrahována do EtOAc. Spojené organické podíly byly promyty destilovanou vodou. Zbytková voda byla z organické fáze odstraněna pomocí bezvodého MgSO₄, který byl ze směsi odfiltrován. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno na RVO.

B: Reakční směs byla nalita do šestinásobku objemu 5 % roztoku HCl a posléze byla extrahována do CHCl₃. Spojené organické podíly byly promyty destilovanou vodou. Zbytková voda byla z organické fáze odstraněna pomocí bezvodého MgSO₄, který byl ze směsi odfiltrován; rozpouštědlo bylo následně odpařeno na RVO.

2. Příprava výchozích látek

2.1 Příprava benzylesteru kyseliny betulinové (II)

Kyselina betulinová (5,10 g; 10,61 mmol, 95%) byla rozpuštěna v 50 ml THF, poté byly přidány 3 ekvivalenty K₂CO₃ (4,53 g; 32,83 mmol) a 3 ekvivalenty benzylbromidu (3,89 ml; 32,71 mmol). Reakce byla zahřívána do druhého dne při 70 °C. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s eluční soustavou A. Zpracování reakce bylo provedeno obecným postupem A, po odpaření byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze hexan / EtOAc 3 : 1. Bylo připraveno 5,5 g produktu (95 %), naměřená spektrální data jsou v souladu s literaturou⁶⁰. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.39–7.29 (m, 5H), 5.14 (d, 1H, *J* = 12.3 Hz), 5.09 (d, 1H, *J* = 12.3 Hz), 4.72 (s, 1H), 4.59 (s, 1H), 3.17 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz), 3.02 (td, 1H, *J*₁ = 10.9 Hz,

$J_2 = 4.7$ Hz), 2.31–2.24 (m, 1H), 2.18 (td, 1H, $J_1 = 12.7$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz), 1.67 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.68–0.63 (m, 1H, $J = 9.1$ Hz) ppm.

2.2 Příprava benzylesteru kyseliny 30-oxobetulinové (III)

5,5 g benzylesteru kyseliny betulínové (10,06 mmol) bylo rozpuštěno ve 100 ml 2-methoxyethanolu a poté bylo přidáno 2,5 ekvivalentu SeO_2 (2,81 g; 25,32 mmol). Za stálého míchání reakční směsi při 140 °C reakce probíhala 24 hodin. Průběh byl kontrolován pomocí TLC s eluční soustavou A. Po ukončení reakce byla černě zbarvená směs za horka zfiltrována (oddělení vysráženého selenu) do 800 ml ledové destilované vody. Vysrážený produkt byl odsát na Büchnerově nálevce a poté byl volně vysušen na vzduchu. Purifikace pomocí sloupcové chromatografie byla provedena dvakrát za použití mobilní fáze hexan / EtOAc 3 : 1. Výtěžek reakce byl 1,43 g produktu (27 %), naměřená spektrální data jsou v souladu s literaturou³⁹. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.51 (s, 1H), 7.44–7.28 (m, 5H), 6.25 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 5.15 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz), 5.10 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz), 3.40–3.29 (m, 1H), 3.16 (dd, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 2.35–2.26 (m, 1H), 2.15 (td, 1H, $J_1 = 12.4$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz), 0.94 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.74 (s, 3H), 0.72 (s, 3H), 0.66–0.61 (m, 1H) ppm.

2.3 Příprava kyseliny 30-oxobetulinové (IV)

5,02 g kyseliny betulínové (10,40 mmol; 0,95 %) bylo rozpuštěno ve 100 ml 2-methoxyethanolu a poté bylo přidáno 2,5 ekvivalentu SeO_2 (2,91 g; 26,23 mmol). Za stálého míchání reakční směsi při 140 °C reakce probíhala 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s eluční soustavou A a byl doprovázen změnou zbarvení ze žluté na černou. Reakční směs byla za horka zfiltrována do 800 ml ledové destilované vody, vysrážený produkt byl odsát na Büchnerově nálevce a volně vysušen na vzduchu. Výtěžek reakce byl 97 % (4,78 g), surový produkt nebyl dále čištěn. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.48 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 3.34–3.25 (m, 1H), 3.17–3.10 (m, 1H), 2.27–2.22 (m, 1H), 2.22–2.16 (m, 1H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.77 (s, 3H), 0.71 (s, 3H), 0.66–0.61 (m, 1H) ppm.

3. Příprava fosfoniových solí

Obecný postup přípravy fosfoniových solí:

Navážené množství trifenylofosfinu bylo rozpuštěno v rozpouštědle a poté byl do reakční směsi přidán příslušný bromid. Reakce byla umístěna na vyhřátou olejovou lázeň pod zpětný chladič po dobu 24 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs zfiltrována přes fritu, produkt byl promyt malým množstvím Et₂O a vysušen. Připravená fosfoniová sůl byla uchována v lahvičkách pod inertní dusíkovou atmosférou.

3.1 Fosfoniová sůl Vb

Reakce byla provedena obecným postupem popsaným výše. Trifenylofosfin (2,01 g; 7,57 mmol; 98 %) byl rozpuštěn v 35 ml CH₃CN, poté byl do směsi napipetován benzylbromid (0,916 ml; 7,55 mmol; 99 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 95 °C. Reakce poskytla 3,20 g bílé krystalické látky (98 %).

3.2 Fosfoniová sůl Vc

Reakce byla provedena obecným postupem popsaným výše. Trifenylofosfin (3,14 g; 11,85 mmol; 99 %) byl rozpuštěn ve 40 ml toluenu, poté byl do směsi přidán 4-nitrobenzylbromid (2,16 g; 9,90 mmol; 99 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 70 °C. Reakce poskytla 4,50 g bílé krystalické látky (95 %).

3.3 Fosfoniová sůl Vd

Reakce byla provedena obecným postupem popsaným výše. Trifenylofosfin (2,07 g; 7,81 mmol; 99 %) byl rozpuštěn v 35 ml toluenu, poté byl do směsi přidán 4-methylbenzylbromid (1,44 g; 7,55 mmol; 97 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 110 °C. Reakce poskytla 3,06 g bílé krystalické látky (90 %).

3.4 Fosfoniová sůl Ve

Reakce byla provedena obecným postupem popsaným výše. Trifenylofosfin (0,97 g; 3,66 mmol; 99 %) byl rozpuštěn v 6 ml toluenu, poté byl do směsi přidán 4-

chlorbenzylbromid (0,5 g; 2,36 mmol; 97 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 110 °C. Reakce poskytla 0,98 g světle hnědé krystalické látky (95 %).

3.5 Fosfoniová sůl Vf

Reakce byla provedena obecným postupem popsaným výše. Trifenylfosfin (2,97 g; 11,21 mmol; 99 %) byl rozpuštěn v 40 ml toluenu, poté byl do směsi napipetován 3-chlorbenzylbromid (1,5 ml; 11,08 mmol; 97 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 70 °C. Reakce poskytla 4,91 g bílé krystalické látky (95 %).

3.6 Fosfoniová sůl Vg

Reakce byla provedena obecným postupem popsaným výše. Trifenylfosfin (1,86 g; 7,02 mmol; 99 %) byl rozpuštěn v 35 ml toluenu, poté byl do směsi napipetován 3-methoxybenzylbromid (1 ml; 7,01 mmol; 98 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 70 °C. Reakce poskytla 2,83 g bílé krystalické látky (87 %).

3.7 Fosfoniová sůl Vh

1 g 2-(bromomethyl)pyridin hydrobromidu (5,70 mmol; 98 %) byl rozsuspendován v 10 ml DCM. Následně byl do této směsi pomalu přikapáván roztok 0,56 g K_2CO_3 (4,05 mmol) v 10 ml H_2O . Neutralizační reakce probíhala za míchání v ledové lázni po dobu 1,5 hodiny za vzniku sytě červené směsi (pH = 7). Po ukončení reakce byla reakční směs extrahována do DCM, spojené organické fáze byly vysušeny pomocí $MgSO_4$, zfiltrány, a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO při 20 °C.

Fosfoniová sůl Vh byla dále připravena obecným postupem popsaným výše. Zneutralizovaný bromid byl rozpuštěn ve 20 ml toluenu. Poté byl do reakční směsi přidán trifenylfosfin (0,93 g; mmol; 3,51 mmol; 99 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 110 °C. Reakce poskytla 1,49 g světle hnědé krystalické látky (92 %).

3.8 Fosfoniová sůl Vi

Reakce byla provedena obecným postupem popsaným výše. Trifenylfosfin (1,04 g; 3,93 mmol; 99 %) byl rozpuštěn ve 40 ml toluenu, poté byl do směsi napipetován 4-

fluorobenzylbromid (0,5 ml; 3,95 mmol; 97 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 100 °C. Reakce poskytla 1,67 g bílé krystalické látky (94 %).

3.9 Fosfoniová sůl Vj

Reakce byla provedena obecným postupem popsaným výše. Trifenylfosfin (1,50 g; 5,66 mmol; 99 %) byl rozpuštěn ve 20 ml toluenu, poté byl do směsi přidán 4-bromobenzylbromid (1,44 ml; 5,65 mmol; 98 %) a reakce probíhala v olejové lázni vyhřáté na 80 °C. Reakce poskytla 2,80 g bílé krystalické látky (97 %).

4. Příprava derivátů odvozených od benzylesteru kyseliny betulinové

4.1 Konjugát VI

K roztoku 3 ekvivalentů fosfoniové soli **Va** (213,4 mg; 0,59 mmol; 0,98 %) v 5 ml toluenu bylo přidáno 3,5 ekvivalentu *t*-BuOK (71,4 mg; 0,62 mmol, 0,98 %). Po uzavření baňky septem byl z reakce odsát vzduch a zaveden dusík. Pomocí sonifikace v ultrazvukové lázni došlo po 15 minutách ke vzniku fosfonium-ylidu (žluté zbarvení směsi, gelovitá konzistence). Poté byl do reakční směsi přidán aldehyd **III** (100,7 mg; 0,18 mmol) a po 24 hodinách za míchání v olejové lázni zahřáté na 60 °C byla směs zpracována postupem A. Složení reakční směsi bylo monitorováno pomocí TLC za použití eluční soustavy B. Produkt byl po odpaření na RVO purifikován sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze CHCl₃/EtOAc 10 : 1. Po purifikaci bylo získáno 90 mg (76 %) bílých krystalů konjugátu **VI**: t.t. 180–184 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.41–7.29 (m, 5H), 6.33 (dd, 1H, *J*₁ = 17.5 Hz, *J*₂ = 10.9 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 17.5 Hz), 5.17 (d, 1H, *J* = 12.3 Hz), 5.09 (d, 1H, *J* = 12.3 Hz), 5.03 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz), 4.95 (s, 2H), 3.22–3.11 (m, 2H), 2.37–2.28 (m, 1H), 2.18–2.10 (m, 1H), 1.90 (dd, 1H, *J* = 12.6, *J*₂ = 7.8 Hz), 1.80 (t, 1H, *J* = 11.4 Hz), 0.96 (s, 6H), 0.79 (s, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.68–0.63 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 175.96, 153.05, 139.32, 136.54, 128.65, 128.40, 128.23, 113.56, 112.21, 79.09, 65.93, 56.70, 55.46, 50.77, 50.67, 42.46, 40.78, 39.78, 38.98, 38.83, 38.41, 37.29, 36.94, 34.46, 32.95, 32.24, 29.78, 28.11, 27.52, 26.97, 21.15, 18.41, 16.26, 15.99, 15.49, 14.85 ppm; IR (DRIFT) ν_{max}: 3120–3595, 2938, 2868, 1691, 1596, 1464 cm⁻¹.

4.2 Konjugát VII

K roztoku 3 ekvivalentů fosfoniové soli **Vb** (235 mg; 0,54 mmol) v 2 ml toluenu byly přidány 3 ekvivalenty *t*-BuOK (63 mg; 0,55 mmol, 98 %). Po uzavření baňky septem byl z reakce odsát vzduch a zaveden dusík. Po 15 minutách sonifikace reakční směsi došlo ke vzniku fosfonium-ylidu (červené zbarvení směsi, gelovitá konzistence). Poté byl do reakce přidán aldehyd **III** (100,9 mg; 0,18 mmol) a reakce probíhala 24 hodin v olejové lázni zahřáté na 60 °C. Složení reakční směsi bylo monitorováno pomocí TLC za použití eluční soustavy A. Po odpaření vznikla žlutá krystalická látka, která byla purifikována sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze Hexan / EtOAc 5 : 1. Po purifikaci bylo získáno 100 mg (89 %) bílých krystalů konjugátu **VII**, jednalo se o směs izomerů *E* i *Z*. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.44–7.30 (m, 10H), 6.80 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-31 *E*-isomer), 6.66 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-30 *E*-isomer), 6.46 (d, *J* = 12.6 Hz, H-31 *Z*-isomer), 6.02 (d, *J* = 12.6 Hz, H-30 *Z*-isomer), 5.24 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz), 5.13 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz), 5.09 (d, 2H, *J* = 20.3 Hz), 3.32 (td, 1H, *J*₁ = 11.1 Hz, *J*₂ = 4.6 Hz), 3.20–3.15 (m, 1H), 2.41–2.35 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.80 (s, 6H), 0.76 (s, 3H), 0.70–0.64 (m, 1H) ppm.

4.3 Konjugát VIII

K roztoku 2 ekvivalentů fosfoniové soli **Vc** (170,6 mg; 0,36 mmol) v 2 ml THF byly přidány 2 ekvivalenty *t*-BuOK (41 mg; 0,36 mmol, 98 %). Po uzavření baňky septem byl z reakce odsát vzduch a zaveden dusík. Po 15 minutách sonifikace reakční směsi došlo ke vzniku fosfonium-ylidu. Reakce byla doprovázena změnou zbarvení homogenní směsi z oranžové na sytě červenou. Poté byl přidán aldehyd **III** (101 mg; 0,18 mmol) a reakce probíhala 24 hodin v olejové lázni zahřáté na 60 °C. Složení reakční směsi bylo monitorováno pomocí TLC za použití eluční soustavy A. Po odpaření vznikla žlutá krystalická látka, která byla purifikována sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze hexan / EtOAc 3 : 1. Po purifikaci bylo získáno 41 mg (34 %) bílých krystalů konjugátu **VII**, jednalo se o směs izomerů *E* i *Z*. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.14–8.08 (m, 2H), 7.64–7.59 (m, 2H), 7.40–7.31 (m, 5H), 6.92 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-31 *E*-isomer), 6.65 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-30 *E*-isomer), 6.47 (d, *J* = 12.6 Hz, H-31 *Z*-isomer), 6.21 (d, *J* = 12.6 Hz, H-30 *Z*-isomer), 5.22 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz), 5.10 (d, 1H, *J* = 12.0

Hz), 5.05 (s, 1H), 4.96 (s, 1H), 3.29 (td, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz), 3.20–3.14 (m, 1H), 0.95 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.75 (s, 6H), 0.67–0.63 (m, 1H) ppm.

4.4 Konjugát IX

K roztoku 3 ekvivalentů fosfoniové soli **Vd** (239,5 mg; 0,54 mmol) v 2 ml toluenu byly přidány 4 ekvivalenty *t*-BuOK (83,8 mg; 0,73 mmol; 98 %). Po uzavření baňky septem byl z reakce odsát vzduch a zaveden dusík. Po 15 minutách sonifikace reakční směsi došlo ke vzniku fosfonium-ylidu. Reakce byla doprovázena změnou zabarvení homogenní směsi z oranžové na červenou. Poté byl přidán aldehyd **III** (99,9 mg; 0,18 mmol) a reakce probíhala 24 hodin při pokojové teplotě. Složení reakční směsi bylo monitorováno pomocí TLC za použití eluční soustavy A. Po odpaření na RVO vznikla krystalická látka, která byla purifikována sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze hexan / EtOAc 3 : 1. Po purifikaci bylo získáno 77 mg (65 %) bílých krystalů konjugátu **VII**, jednalo se o směs izomerů *E* i *Z*. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.43–7.29 (m, 7H), 7.16–7.11 (m, 2H), 6.74 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-31 *E*-isomer), 6.61 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-30 *E*-isomer), 6.40 (d, $J = 12.6$ Hz, H-31 *Z*-isomer), 5.95 (d, $J = 12.6$ Hz, H-30 *Z*-isomer), 5.22 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz), 5.12 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz), 5.06 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 3.28 (td, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz), 3.19–3.14 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.94 (dd, 1H, $J_1 = 12.6$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz), 1.91–1.83 (m, 1H), 0.97 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.68–0.63 (m, 1H) ppm.

5. Příprava finálních produktů odvozených od kyseliny betulinové

Obecný postup přípravy:

Vyžíhaná šlenkovka byla připojena na vakuovou linku a po zchlazení a dostatečném vysušení byla do vytvořené argonové atmosféry vsypána navážená fosfoniová sůl spolu s *t*-BuOK. Následně byl přes septum pomocí stříkačky přidán suchý THF. Po patnáctiminutové sonifikaci došlo ke konverzi fosfoniové soli na fosfonium-ylid, která byla doprovázena změnou barvy. Ke vzniklému fosfonium-ylidu byl přidán aldehyd **IV** a reakce probíhala za míchání po dobu 24 hodin. Složení reakční směsi bylo sledováno

pomocí TLC za použití mobilní fáze C, po ukončení byla reakce zpracována obecným postupem B. Produkt byl následně purifikována sloupcovou chromatografií na silikagelu.

5.1 Konjugát X

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Vf** (598 mg; 1,28 mmol) s 5 ekvivalenty *t*-BuOK (184 mg; 1,61 mmol, 98 %) ve 3 ml suchého THF připraven sytě oranžový fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (150 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze toluen / Et₂O 2 : 1. Bylo získáno 111 mg (60 %) bílých krystalů konjugátu **X**: t.t. 181–184 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.44–7.42 (m, 1H, H – arom. ring), 7.32–7.28 (m, 1H, H – arom. ring), 7.26–7.21 (m, 1H, H – arom. ring), 7.20–7.17 (m, 1H, H – arom. ring), 6.79 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-31), 6.62 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-30), 5.12 (d, 2H, *J* = 14.9 Hz, 2 × H-29), 3.25 (td, 1H, *J*₁ = 11.1 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, H-19β), 3.19 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, H-3α), 2.29–2.22 (m, 1H), 2.22–2.15 (m, 1H), 2.02 (dd, 1H, *J*₁ = 12.8 Hz, *J*₂ = 7.7 Hz), 1.90 (t, 1H, *J* = 11.3 Hz), 1.01, 0.96, 0.95, 0.80, 0.74 (15H, all s, 5 × CH₃), 0.70–0.66 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, CDDl₃) δ: 181.80, 152.42, 139.64, 134.70, 133.19, 129.90, 127.37, 126.75, 126.50, 124.85, 113.80, 79.20, 56.57, 55.49, 50.94, 50.64, 42.54, 40.87, 40.06, 39.01, 38.85, 38.67, 37.36, 37.04, 34.51, 33.25, 32.33, 29.97, 29.84, 28.14, 27.48, 27.20, 21.17, 18.42, 16.26, 15.49, 14.92 ppm; HRMS: ESI-TOF *m/z* vypočteno pro C₃₇H₅₂O₃Cl [M+H]⁺ 579,3599, nalezeno 579,3605; IR (DRIFT) *v*_{max}: 2380–3610, 2939, 2869, 1689, 1594, 1451 cm⁻¹.

5.2 Konjugát XI

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Ve** (539 mg; 1,27 mmol) s 4,5 ekvivalenty *t*-BuOK (166 mg; 1,45 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven oranžový fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (150 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze toluen / Et₂O 5 : 2. Bylo získáno 80,6 mg (44 %) bílých krystalů konjugátu **XI**: t.t. 173–176 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.39–7.34 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 7.30–7.26 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 6.76 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-31), 6.63 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-30), 5.10 (d, 2H, *J* = 15.4

Hz, 2 × H-29), 3.25 (td, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-19 β), 3.19 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-3 α), 2.29–2.22 (m, 1H), 2.18 (td, 1H, $J_1 = 12.5$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz), 2.02 (dd, 1H, $J_1 = 12.8$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz), 1.90 (t, 1H, $J = 11.3$ Hz), 1.01, 0.96, 0.94, 0.80, 0.74 (15H, all s, 5 × CH₃), 0.70–0.66 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 181.85, 152.42, 136.15, 132.98, 132.34, 128.80, 127.73, 126.79, 113.24, 79.10, 56.50, 55.41, 50.81, 50.56, 42.47, 40.80, 39.98, 38.93, 38.77, 38.62, 37.28, 36.96, 34.44, 33.22, 32.28, 29.90, 29.77, 28.07, 27.42, 27.14, 21.11, 18.34, 16.19, 15.40, 14.84 ppm; HRMS: ESI-TOF m/z vypočteno pro C₃₇H₅₂O₃Cl [M+H]⁺ 579,3599, nalezeno 579,3602; IR (DRIFT) ν_{\max} : 2380–3610, 2939, 2868, 1691, 1593, 1490 cm⁻¹.

5.3 Konjugát XII

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Vi** (580 mg; 1,29 mmol) s 5 ekvivalenty *t*-BuOK (183 mg; 1,60 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven oranžový fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (150 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze toluen / Et₂O 2 : 1. Bylo získáno 68,7 mg (38 %) průhledných krystalů konjugátu **XII**: t.t. 149–153 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.43–7.37 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 7.03–6.97 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 6.71 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-31), 6.64 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-30), 5.08 (d, 2H, $J = 18.4$ Hz, 2 × H-29), 3.26 (td, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-19 β), 3.19 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-3 α), 2.39–2.32 (m, 1H), 2.29–2.23 (m, 1H), 2.19 (td, 1H, $J_1 = 12.4$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz), 2.02 (dd, 1H, $J_1 = 12.8$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz), 1.90 (t, 1H, $J = 11.4$ Hz), 1.01, 0.96, 0.95, 0.81, 0.74 (15 H, all s, 5 × CH₃), 0.70–0.66 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 181.78, 152.56, 133.89, 133.87, 131.57, 128.12, 128.06, 126.95, 115.73, 115.55, 112.78, 79.19, 56.58, 55.50, 50.85, 50.65, 42.55, 40.88, 40.13, 39.01, 38.85, 38.69, 37.37, 37.05, 34.52, 33.27, 32.36, 29.99, 29.80, 28.15, 27.50, 27.19, 21.19, 18.42, 16.27, 15.49, 14.93 ppm; HRMS: ESI-TOF m/z vypočteno pro C₃₇H₅₂O₃F [M+H]⁺ 563,3895, nalezeno 563,3899; IR (DRIFT) ν_{\max} : 2450–3620, 2939, 2869, 1693, 1600, 1508 cm⁻¹.

5.4 Konjugát XIII

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Vj** (653 mg; 1,27 mmol) s 4,5 ekvivalenty *t*-BuOK (163 mg; 1,42 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven sytě oranžový fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (150 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií nejprve za použití mobilní fáze toluen / Et₂O 2 : 1 a poté s mobilní fází toluen / Et₂O 4 : 1. Bylo získáno 68,7 mg (38 %) bílých krystalů konjugátu **XIII**: t.t. 188–191 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.45–7.41 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 7.32–7.28 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 6.77 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-31), 6.61 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-30), 5.11 (d, 2H, *J* = 14.7 Hz, 2 × H-29), 3.25 (td, 1H, *J*₁ = 11.1 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, H-19β), 3.19 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, H-3α), 2.29–2.22 (m, 1H), 2.18 (td, 1H, *J*₁ = 12.5 Hz, *J*₂ = 3.6 Hz), 2.01 (dd, 1H, *J*₁ = 12.7 Hz, *J*₂ = 7.8 Hz), 1.90 (t, 1H, *J* = 11.3 Hz), 1.01, 0.96, 0.94, 0.80, 0.74 (15H, all s, 5 × CH₃), 0.70–0.65 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 181.82, 152.49, 136.67, 132.53, 131.82, 128.13, 126.91, 121.19, 113.42, 79.17, 56.57, 55.49, 50.90, 50.64, 42.55, 40.88, 40.03, 39.01, 38.85, 38.70, 37.36, 37.03, 34.51, 33.30, 32.35, 29.97, 29.85, 28.15, 27.50, 27.23, 21.18, 18.42, 16.27, 15.48, 14.92 ppm; HRMS: ESI-TOF *m/z* vypočteno pro C₃₇H₅₂O₃Br [M+H]⁺ 623,3094, nalezeno 623,3098; IR (DRIFT) *v*_{max}: 2380–3615, 2938, 2868, 1686, 1589, 1486 cm⁻¹.

5.5 Konjugát XIV

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Vi** (552 mg, 1,27 mmol) s 4,5 ekvivalenty *t*-BuOK (161 mg; 1,41 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven oranžový fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (150 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze CHCl₃ / EtOAc 8 : 1. Bylo získáno 60,5 mg (35 %) bílých krystalů konjugátu **XIV**: t.t. 168–174 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.47–7.42 (m, 2H, H – arom. ring), 7.34–7.29 (m, 2H, H – arom. ring), 7.24–7.19 (m, 1H, H – arom. ring), 6.80 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-31), 6.69 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-30), 5.09 (d, 2H, *J* = 23.6 Hz, 2 × H-29), 3.28 (td, 1H, *J*₁ = 11.1 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, H-19β), 3.19 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, H-3α), 2.39–2.32 (m, 1H), 2.31–2.24 (m, 1H), 2.24–2.17 (m, 1H), 1.91 (t, 1H, *J* = 11.4 Hz), 1.01, 0.96, 0.95, 0.81, 0.74 (15H, all

s, 5 × CH₃), 0.70–0.66 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 181.83, 152.70, 137.71, 131.68, 128.73, 128.19, 127.50, 126.65, 112.75, 79.20, 56.59, 55.49, 50.85, 50.66, 42.55, 40.88, 40.27, 39.00, 38.84, 38.67, 37.36, 37.08, 34.52, 33.23, 32.36, 29.98, 29.84, 28.14, 27.49, 27.14, 21.18, 18.43, 16.26, 15.50, 14.93 ppm; HRMS: ESI-TOF *m/z* vypočteno pro C₃₇H₅₃O₃ [M+H]⁺ 545,3989, nalezeno 545,3988; IR (DRIFT) *v*_{max}: 2450–3610, 2939, 2869, 1692, 1601, 1450 cm⁻¹.

5.6 Konjugát XV

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Vd** (571 mg; 1,28 mmol) s 5 ekvivalenty *t*-BuOK (182 mg; 1,59 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven červený fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (152 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze toluen / Et₂O 2 : 1. Bylo získáno 67,1 mg (38 %) bílých krystalů konjugátu **XV**: t.t. 169–174 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.36–7.32 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 7.14–7.10 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 6.75 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-31), 6.66 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-30), 5.06 (d, 2H, *J* = 25.5 Hz, 2 × H-29), 3.27 (td, 1H, *J*₁ = 11.2 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, H-19β), 3.19 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, H-3α), 2.34 (s, 3H, -CH₃ on arom. ring), 2.29–2.23 (m, 1H), 2.22–2.16 (m, 1H), 2.01 (dd, 1H, *J*₁ = 12.7 Hz, *J*₂ = 7.8 Hz), 1.90 (t, 1H, *J* = 11.4 Hz), 1.01, 0.96, 0.95, 0.80, 0.74 (15H, all s, 5 × CH₃), 0.70–0.66 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 182.02, 152.82, 137.33, 134.92, 130.72, 129.45, 128.11, 126.56, 112.20, 79.20, 56.60, 55.50, 50.85, 50.66, 42.55, 40.88, 40.27, 39.01, 38.85, 38.70, 37.36, 37.09, 34.52, 33.27, 32.38, 29.99, 29.85, 28.15, 27.50, 27.11, 21.35, 21.19, 18.43, 16.27, 15.49, 14.93 ppm; HRMS: ESI-TOF *m/z* vypočteno pro C₃₈H₅₅O₃ [M+H]⁺ 559,4146, nalezeno 559,4146; IR (DRIFT) *v*_{max}: 2490–3620, 2939, 2868, 1691, 1605, 1450 cm⁻¹.

5.7 Konjugát XVI

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Vg** (592 mg; 1,28 mmol) s 5 ekvivalenty *t*-BuOK (183 mg; 1,60 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven oranžový fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (150 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze toluen / Et₂O 2 : 1. Bylo

získáno 70,5 mg (38 %) bílých krystalů konjugátu **XVI**: t.t. 147–150 °C; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.23 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, H – arom. ring), 7.06–7.02 (m, 1H, H – arom. ring), 7.00–6.97 (m, 1H, H – arom. ring), 6.80–6.77 (m, 1H, H – arom. ring), 6.78 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-31), 6.66 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-30), 5.09 (d, 2H, $J = 22.7$ Hz, 2 × H-29), 3.83 (s, 3H, methoxy -CH₃), 3.27 (td, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-19β), 3.19 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-3α), 2.38–2.32 (m, 1H), 2.30–2.23 (m, 1H), 2.23–2.16 (m, 1H), 2.02 (dd, 1H, $J_1 = 12.8$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz), 1.91 (t, 1H, $J = 11.4$ Hz), 1.01, 0.96, 0.95, 0.80, 0.74 (15 H, all s, 5 × CH₃), 0.70–0.65 (m, 1H) ppm; **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ: 182.01, 159.99, 152.66, 139.19, 132.02, 129.66, 128.09, 119.41, 113.32, 112.91, 111.82, 79.20, 56.59, 55.49, 55.39, 50.87, 50.65, 42.55, 40.87, 40.21, 39.00, 38.84, 38.69, 37.35, 37.07, 34.51, 33.25, 32.37, 29.99, 29.84, 28.14, 27.48, 27.14, 21.18, 18.41, 16.26, 15.48, 14.92 ppm; **HRMS**: ESI-TOF m/z vypočteno pro C₃₈H₅₅O₄ [M+H]⁺ 575,4095, nalezeno 575,4090; **IR** (DRIFT) ν_{\max} : 2450–3650, 2939, 2868, 1686, 1599, 1452 cm⁻¹.

5.8 Konjugát XVII

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Va** (620 mg; 1,70 mmol; 0,98 %) s 4,5 ekvivalenty *t*-BuOK (220 mg; 1,92 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven sytě žlutý fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (200 mg; 0,42 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace pomocí sloupcové chromatografie byla provedena dvakrát za použití stejné mobilní fáze toluen / Et₂O 4 : 1. Bylo získáno 119 mg (60 %) bílých krystalů konjugátu **XVII**: t.t. 228–230 °C; **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.06 (s, 1H, -COOH), 6.35 (dd, 1H, $J_1 = 17.5$ Hz, $J_2 = 11.0$ Hz, H-30), 5.25 (d, 1H, $J = 17.5$ Hz, H-31), 5.06 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, H-31), 4.99 (d, 2H, $J = 11.1$ Hz, 2 × H-29), 4.24 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, -OH), 3.07 (td, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-19β), 3.01–2.92 (m, 1H, H-3α), 2.02–1.95 (m, 1H), 1.80 (dd, 1H, $J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz), 1.74 (t, 1H, $J = 11.3$ Hz), 0.94, 0.87, 0.86, 0.75, 0.65 (15H, all s, 5 × CH₃) ppm; **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.16, 152.43, 139.20, 113.27, 112.45, 76.74, 55.40, 54.85, 49.90, 49.75, 41.92, 40.23, 40.11, 38.46, 38.23, 37.62, 36.69, 36.09, 33.93, 32.41, 31.58, 29.28, 28.06, 27.12, 26.52, 20.56, 17.92, 15.91, 15.76, 15.74, 14.40 ppm; **HRMS**: ESI-TOF m/z vypočteno pro C₃₉H₄₉O₃ [M+H]⁺ 469,3676, nalezeno 469,3680; **IR** (DRIFT) ν_{\max} : 2400–3530, 2925, 2867, 1685, 1594, 1453 cm⁻¹.

5.9 Konjugát XVIII

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Vi** (586 mg; 1,28 mmol) s 5 ekvivalenty *t*-BuOK (183 mg; 1,60 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven červenohnědý fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (150 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze toluen / Et₂O 2 : 1. Bylo získáno 70 mg (39 %) béžových krystalů konjugátu **XVIII**: t.t. 166-170 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.60–8.55 (m, 1H, H-pyridine), 7.68–7.61 (m, 1H, H-pyridine), 7.38 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-pyridine), 7.28 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz, H-31), 7.17–7.10 (m, 1H, H-pyridine), 6.79 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz, H-30), 5.22 (d, 2H, *J* = 28.5 Hz, 2 × H-29), 3.31 (td, 1H, *J*₁ = 11.1 Hz, *J*₂ = 4.6 Hz, H-19β), 3.18 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 4.6 Hz, H-3α), 2.21 (td, 1H, *J*₁ = 12.3 Hz, *J*₂ = 3.1 Hz), 2.01 (dd, 1H *J*₁ = 12.6 Hz, *J*₂ = 7.9 Hz), 1.91 (t, 1H, *J* = 11.3 Hz), 1.00, 0.96, 0.94, 0.79, 0.74 (15H, all s, 5 × CH₃), 0.69–0.65 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 181.15, 155.95, 152.50, 149.18, 137.00, 136.61, 127.13, 122.06, 115.47, 79.16, 56.53, 55.49, 50.94, 50.66, 42.55, 40.87, 39.96, 39.00, 38.85, 38.64, 37.35, 37.08, 34.52, 33.33, 32.41, 29.99, 29.83, 28.14, 27.50, 27.31, 21.19, 18.43, 16.26, 15.49, 14.92 ppm; HRMS: ESI-TOF *m/z* vypočteno pro C₃₆H₅₂O₃N [M+H]⁺ 546,3942, nalezeno 546,3947; IR (DRIFT) *v*_{max}: 2380–3595, 2929, 2867, 1689, 1587, 1465 cm⁻¹.

5.10 Konjugát XIX

Podle obecného postupu byl reakcí 4 ekvivalentů fosfoniové soli **Vc** (610 mg; 1,28 mmol) s 4,5 ekvivalenty *t*-BuOK (165 mg; 1,44 mmol; 98 %) v 3 ml suchého THF připraven oranžový fosfonium-ylid. Poté byl do reakce přidán výchozí aldehyd **IV** (150 mg; 0,32 mmol) a reakce byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Purifikace probíhala sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze toluen/Et₂O 4 : 1. Bylo získáno 75 mg (40 %) bílých krystalů konjugátu **XIX**: t.t. 168–171 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.21–8.16 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 7.59–7.53 (m, 2H, 2 × H – arom. ring), 6.94 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-31), 6.72 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-30), 5.23 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, 2 × H-29), 3.27 (td, 1H, *J*₁ = 11.1 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, H-19β), 3.18 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, H-3α), 2.03 (dd, 1H, *J*₁ = 12.7 Hz, *J*₂ = 7.8 Hz), 1.91 (t, 1H, *J* = 11.4 Hz), 1.02, 0.96, 0.95, 0.81, 0.74 (15H, all s, 5 × CH₃), 0.70–0.66 (m, 1H) ppm; HRMS: ESI-TOF *m/z*

vypočteno pro $C_{37}H_{52}O_5N$ $[M+H]^+$ 590,3840, nalezeno 590,3848; **IR** (DRIFT) ν_{\max} :
2400–3425, 2929, 2863, 1690, 1593, 1514, 1449, 1339 cm^{-1} .

Literatura

- (1) Ruzicka, L. *Proc. Chem. Soc. London* **1959**, 341–360.
- (2) Aldred, E.; Buck, C.; Vall, K.; Aldred, E. M.; Buck, C.; Vall, K. In *Pharmacology*; Elsevier, 2009; pp 167–174.
- (3) Habermehl, G. G.; Fliegner, W. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1997**, *20*, 3–24.
- (4) Regueiro-Ren, A.; Liu, Z.; Chen, Y.; Sin, N.; Sit, S.-Y.; Swidorski, J. J.; Chen, J.; Venables, B. L.; Zhu, J.; Nowicka-Sans, B.; Protack, T.; Lin, Z.; Terry, B.; Samanta, H.; Zhang, S.; Li, Z.; Beno, B. R.; Huang, X. S.; Rahematpura, S.; Parker, D. D.; Haskell, R.; Jenkins, S.; Santone, K. S.; Cockett, M. I.; Krystal, M.; Meanwell, N. A.; Hanumegowda, U.; Dicker, I. B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (6), 568–572.
- (5) Zengin, H.; Baysal, A. H. *Molecules* **2014**, *19* (11), 17773–17798.
- (6) Knobloch, K.; Pauli, A.; Iberl, B.; Weigand, H.; Weis, N. *J. Essent. Oil Res.* **1989**, *1* (3), 119–128.
- (7) de Silva, E. D.; Scheuer, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21* (17), 1611–1614.
- (8) Wiart, C. In *Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Neurodegenerative Diseases*; Elsevier, 2014; pp 189–284.
- (9) Huang, M.; Lu, J.-J.; Huang, M.-Q.; Bao, J.-L.; Chen, X.-P.; Wang, Y.-T. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21* (12), 1801–1818.
- (10) Hajduch, M.; Dzubak, P.; Sarek, J. *Klin. Farmakol. a Farm.* **2004**, *18* (1), 14–21.
- (11) Dvořáková, M.; Valterová, I.; Vaněk, T. *Chem. List.* **2011**, *105*, 839–845.
- (12) Taha, A. M.; Eldahshan, O. A. *Chem. Biodivers.* **2017**, *14* (5).
- (13) Chan, K. K. *Journal of Chromatography A*. Elsevier November 30, 2001, pp 47–57.
- (14) Rabl, W.; Katzgraber, F.; Steinlechner, M. *Forensic Sci. Int.* **1997**, *89* (1–2), 137–140.
- (15) Buckle, J.; Buckle, J. In *Clinical Aromatherapy*; Elsevier, 2015; pp 37–72.
- (16) Ludwiczuk, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M. I. In *Pharmacognosy*; Elsevier, 2017; pp 233–266.
- (17) Ovenden, S. P. B.; Nielson, J. L.; Liptrot, C. H.; Willis, R. H.; Tapiolas, D. M.; Wright, A. D.; Motti, C. A. *Molecules* **2012**, *17* (3), 2929–2938.

- (18) Kazlauskas, R.; Murphy, P. T.; Quinn, R. J.; Wells, R. J. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17* (30), 2631–2634.
- (19) Wolosik, K.; Knas, M.; Zalewska, A.; Niczyporuk, M.; Przystupa, A. W. *J. Cosmet. Sci.* **2013**, *64* (1), 59–66.
- (20) Matyas, G. R.; Rao, M.; Pittman, P. R.; Burge, R.; Robbins, I. E.; Wassef, N. M.; Thivierge, B.; Alving, C. R. *J. Immunol. Methods* **2004**, *286* (1–2), 47–67.
- (21) Hill, R. A.; Connolly, J. D. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34* (1), 90–122.
- (22) Giner-Larza, E. M.; Manez, S.; Recio, M. C.; Giner, R. M.; Prieto, J. M.; Cerda-Nicolas, M.; Rios, J. L. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *428* (1), 137–143.
- (23) Tang, X.-H.; Gao, J.; Fang, F.; Chen, J.; Xu, L.-Z.; Zhao, X.-N.; Xu, Q. *Am. J. Chin. Med.* **2005**, *33* (4), 627–637.
- (24) Oyebanji, B. O.; Saba, A. B.; Oridupa, O. A. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2014**, *11* (1), 30–33.
- (25) Petronelli, A.; Pannitteri, G.; Testa, U. *Anticancer. Drugs* **2009**, *20* (10), 880–892.
- (26) Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23* (3), 394–411.
- (27) Haque, S.; Nawrot, D. A.; Alakurtti, S.; Ghemtio, L.; Yli-Kauhaluoma, J.; Tammela, P. *PLoS One* **2014**, *9* (7), e102696.
- (28) Li, F.; Goila-Gaur, R.; Salzwedel, K.; Kilgore, N. R.; Reddick, M.; Matallana, C.; Castillo, A.; Zoumplis, D.; Martin, D. E.; Orenstein, J. M.; Allaway, G. P.; Freed, E. O.; Wild, C. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (23), 13555–13560.
- (29) Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Sarek, J.; Cwierka, K. *Klin. Farmakol. a Farm.* **2004**, *18* (2), 96–101.
- (30) Martin, D. E.; Salzwedel, K.; Allaway, G. P. *Antivir. Chem. Chemother.* **2008**, *19* (3), 107–113.
- (31) Wick, W.; Grimmel, C.; Wagenknecht, B.; Dichgans, J.; Weller, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289* (3), 1306 LP-1312.
- (32) Fulda, S.; Jeremias, I.; Steiner, H. H.; Pietsch, T.; Debatin, K. M. *Int. J. cancer* **1999**, *82* (3), 435–441.
- (33) Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. *Cancer Lett.* **2002**, *175* (1), 17–25.
- (34) Liu, J. *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *49* (2), 57–68.
- (35) Moldoveanu, S. C. *Tech. Instrum. Anal. Chem.* **1998**, *20* (C), 203–216.
- (36) Hajduch, M.; Sarek, J. Triterpenoids derivatives. WO0190046, 2001.

- (37) Bar, F. M. A.; Khanfar, M. A.; Elnagar, A. Y.; Liu, H.; Zaghloul, A. M.; Badria, F. A.; Sylvester, P. W.; Ahmad, K. F.; Raisch, K. P.; El Sayed, K. A. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72* (9), 1643–1650.
- (38) Sarek, J.; Klinot, J.; Dzubak, P.; Klinotova, E.; Noskova, V.; Krecek, V.; Korinkova, G.; Thomson, J. O.; Janost'akova, A.; Wang, S.; Parsons, S.; Fischer, P. M.; Zhelev, N. Z.; Hajduch, M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (25), 5402–5415.
- (39) Urban, M.; Klinot, J.; Tislerova, I.; Biedermann, D.; Hajduch, M.; Cisarova, I.; Sarek, J. *Synthesis (Stuttg.)* **2006**, *2006* (23), 3979–3986.
- (40) Soral, M.; Hodon, J.; Dickinson, N. J.; Sidova, V.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Sarek, J.; Urban, M. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (12), 2563–2570.
- (41) Pokorny, J.; Krajcovicova, S.; Hajduch, M.; Holoubek, M.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Volna, T.; Popa, I.; Urban, M. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (5), 483–491.
- (42) Krajcovicova, S.; Stankova, J.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Soral, M.; Urban, M. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (19), 4957–4966.
- (43) Kim, J. Y.; Koo, H.-M.; Kim, D. S. H. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (17), 2405–2408.
- (44) Qian, K.; Kim, S.-Y.; Hung, H.-Y.; Huang, L.; Chen, C.-H.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (19), 5944–5947.
- (45) Mar, A. A.; Szotek, E. L.; Koohang, A.; Flavin, W. P.; Eiznhamer, D. A.; Flavin, M. T.; Xu, Z. Q. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (18), 5389–5393.
- (46) Holy, J.; Kolomitsyna, O.; Krasutsky, D.; Oliveira, P. J.; Perkins, E.; Krasutsky, P. A. *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18* (16), 6080–6088.
- (47) Bernardo, T. C.; Cunha-Oliveira, T.; Serafim, T. L.; Holy, J.; Krasutsky, D.; Kolomitsyna, O.; Krasutsky, P.; Moreno, A. M.; Oliveira, P. J. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21* (23), 7239–7249.
- (48) Shi, W.; Tang, N.; Yan, W.-D. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2015**, *17* (2), 159–169.
- (49) Li, J.; Goto, M.; Yang, X.; Morris-Natschke, S. L.; Huang, L.; Chen, C. H.; Lee, K. H. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (1), 68–71.
- (50) Spivak, A. Y.; Keiser, J.; Vargas, M.; Gubaidullin, R. R.; Nedopekina, D. A.; Shakurova, E. R.; Khalitova, R. R.; Odinokov, V. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (21), 6297–6304.
- (51) Wittig, G.; Geissler, G. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *580* (1), 44–57.
- (52) McMurry, J. In *Organická chemie*; 2007; pp 706–709.
- (53) Li, J. J.; Springer International Publishing: Cham, 2014; pp 632–635.

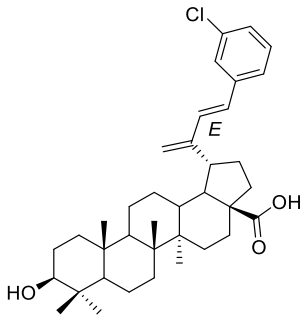
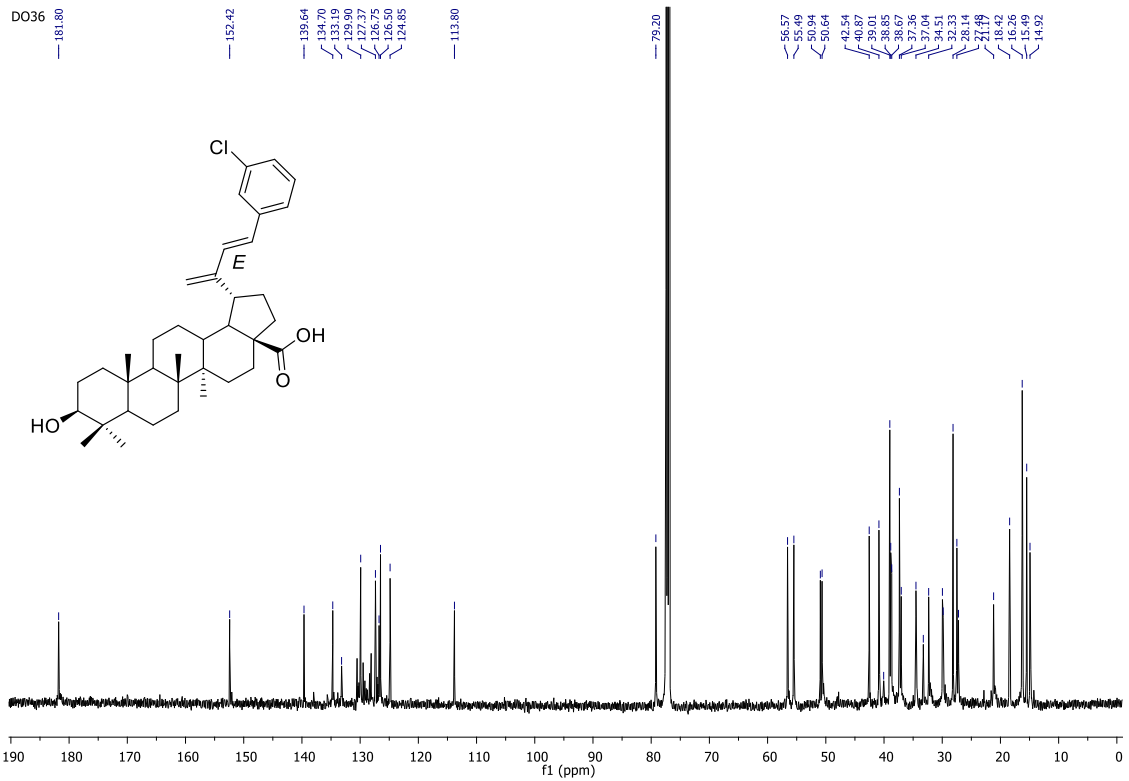
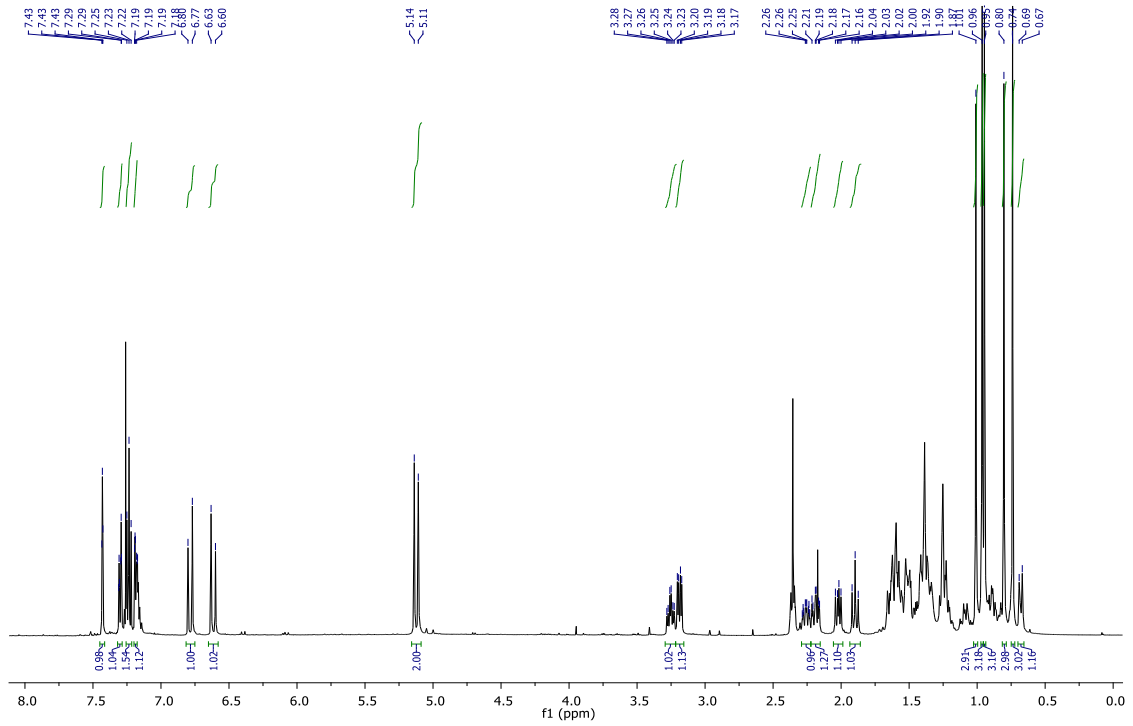
- (54) Tanaka, K.; Furuta, T.; Fuji, K. In *Modern Carbonyl Olefination*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG; pp 286–342.
- (55) Edmonds, M.; Abell, A. In *Modern Carbonyl Olefination*; Takeda, T., Ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004; pp 1–17.
- (56) Li, J. J.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2002; p 322.
- (57) Timperley, M. C. In *Best Synthetic Methods*; Elsevier, 2015; pp 91–325.
- (58) Maercker, A. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp 270–490.
- (59) Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83* (7), 1733–1738.
- (60) Ali, M. T. M.; Zahari, H.; Aliasak, A.; Meng Lim, S.; Ramasamy, K.; Patrick G. Macabeo, A. *Orient. J. Chem.* **2017**, *33* (1), 242–248.
- (61) Hajduch, M.; Kolar, Z.; Novotny, R.; Hanus, J.; Mihal, V.; Hlobilkova, A.; Noskova, V.; Strnad, M. *Anticancer. Drugs* **1997**, *8* (10), 1007–1013.

Přílohy

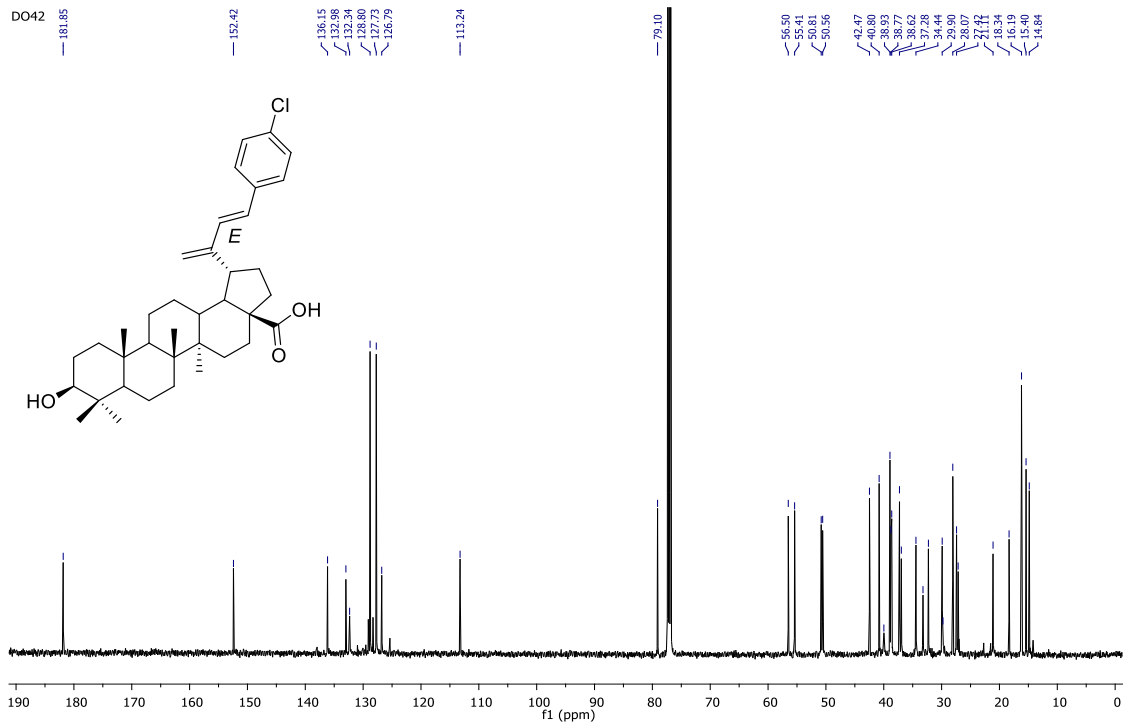
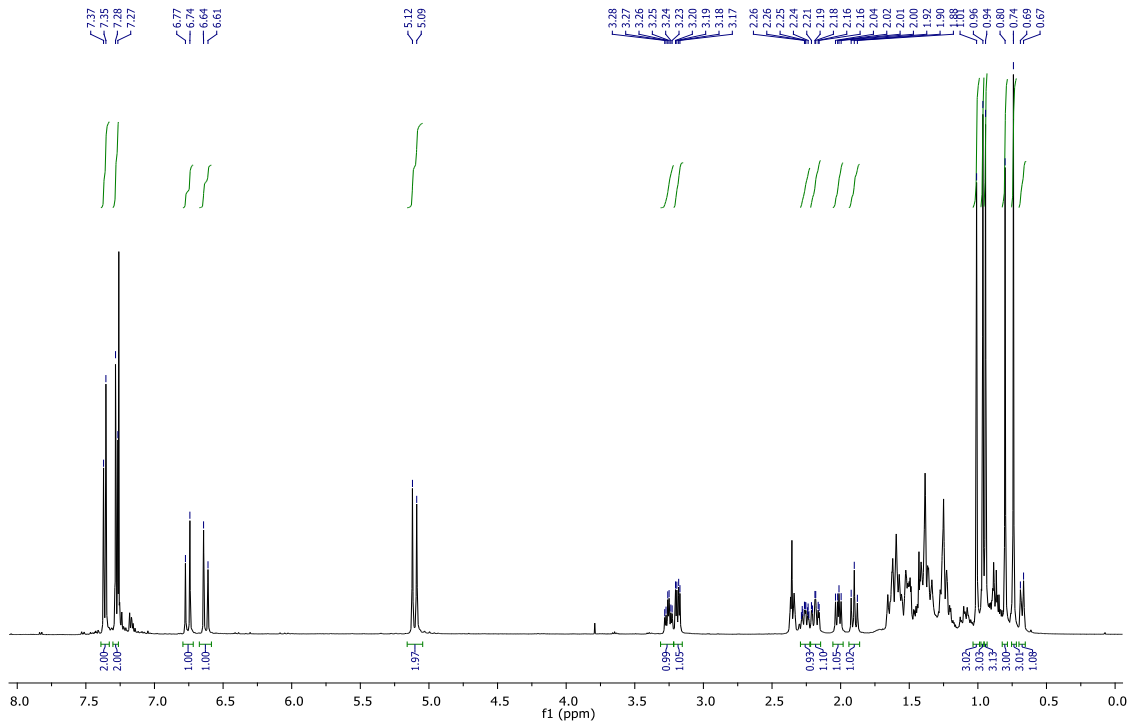
^1H a ^{13}C NMR spektra derivátů kyseliny betulinové

	str.
Konjugát X.....	65
Konjugát XI	66
Konjugát XII.....	67
Konjugát XIII.....	68
Konjugát XIV	69
Konjugát XV.....	70
Konjugát XVI	71
Konjugát XVII.....	72
Konjugát XVIII.....	73
Konjugát XIX	74

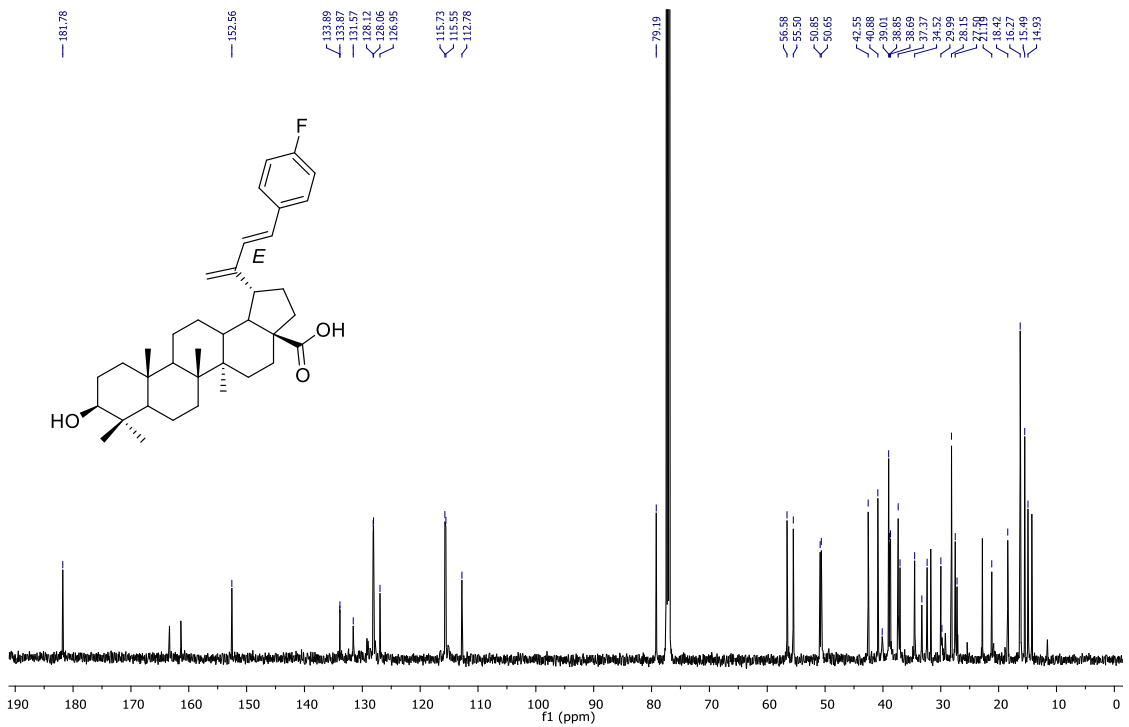
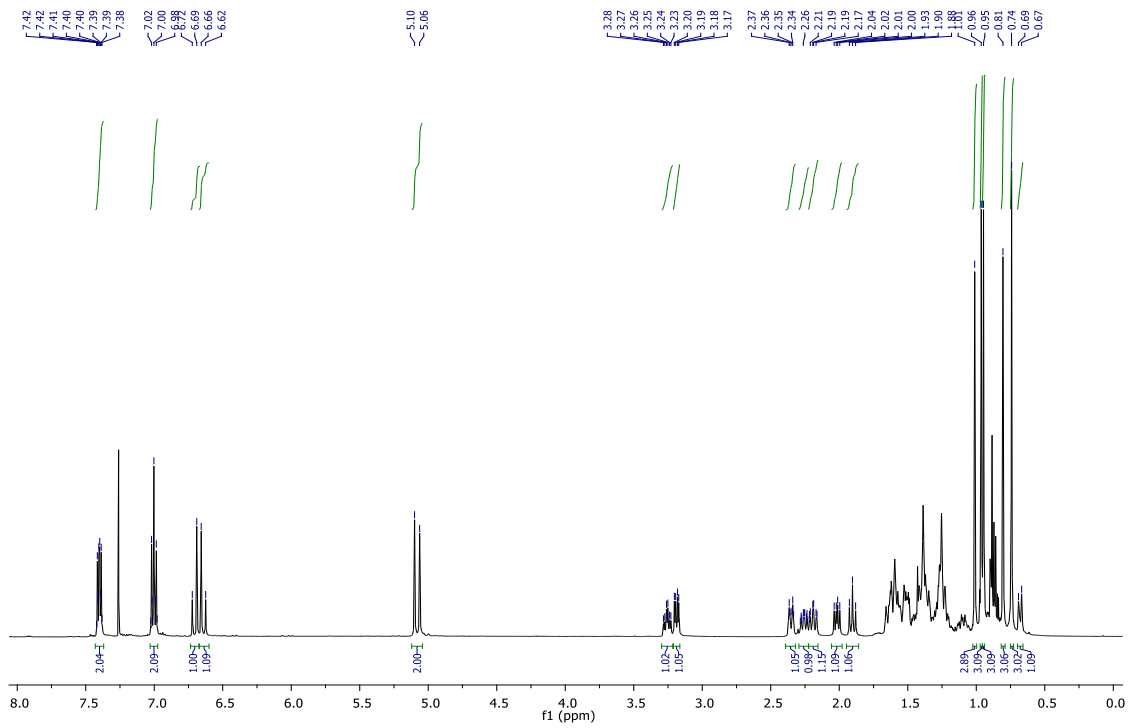
Konjugát X



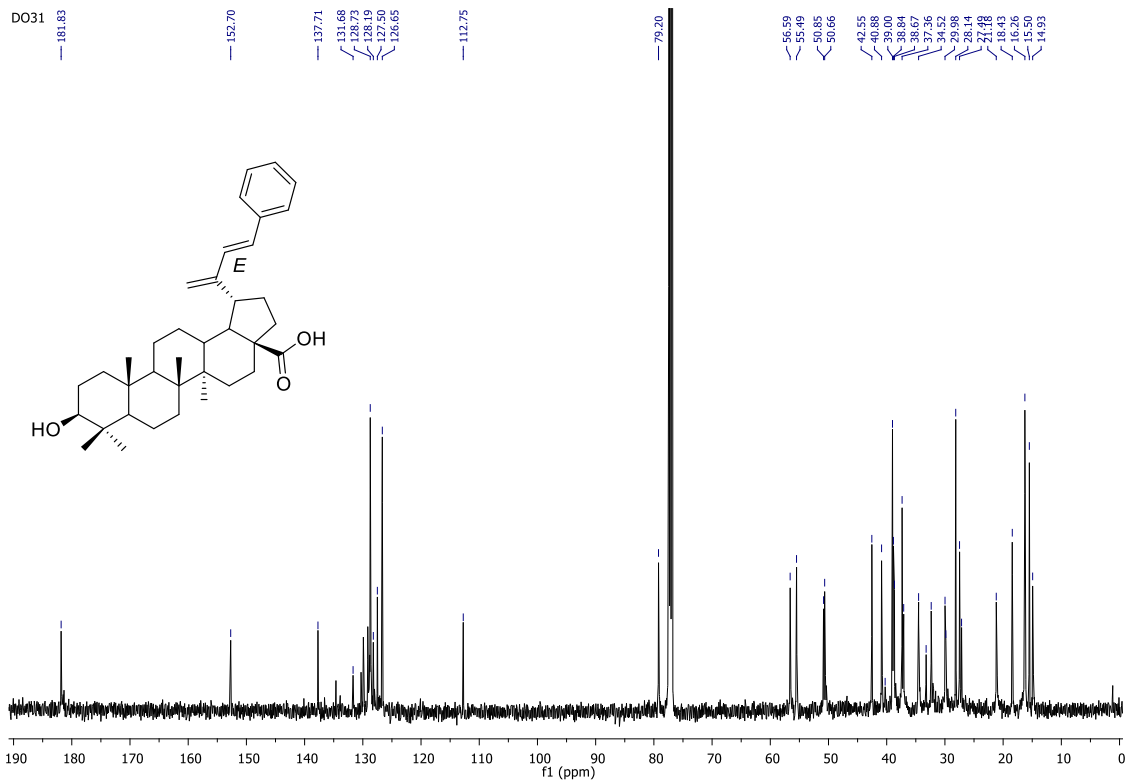
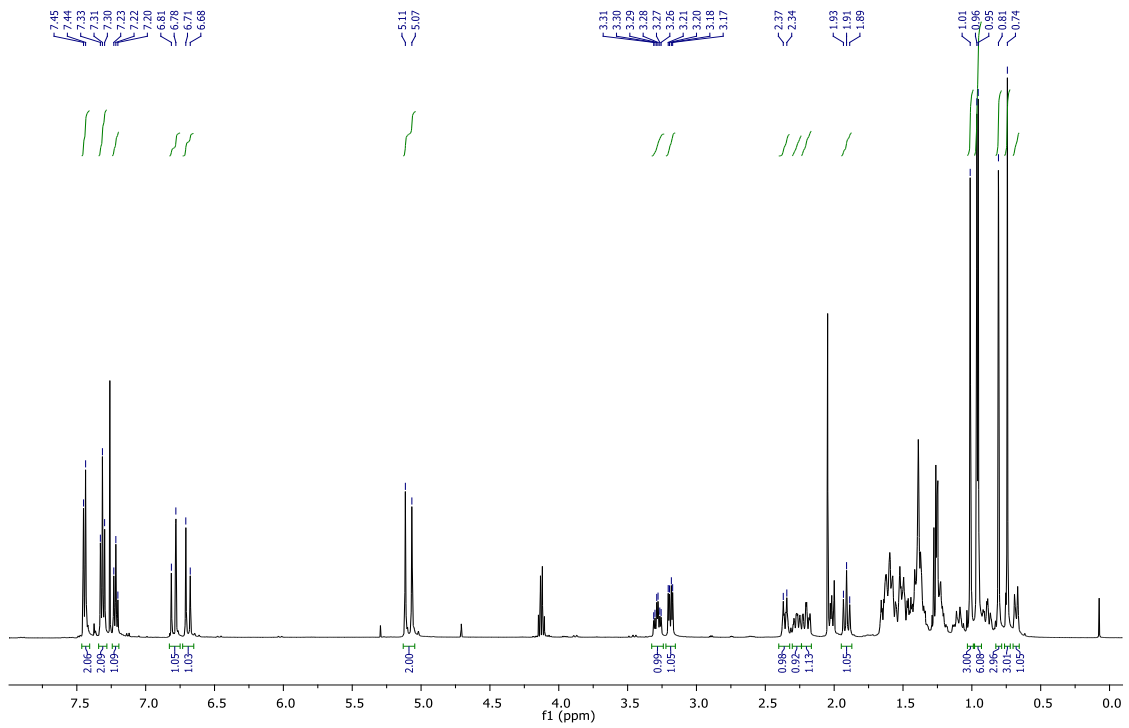
Konjugát XI



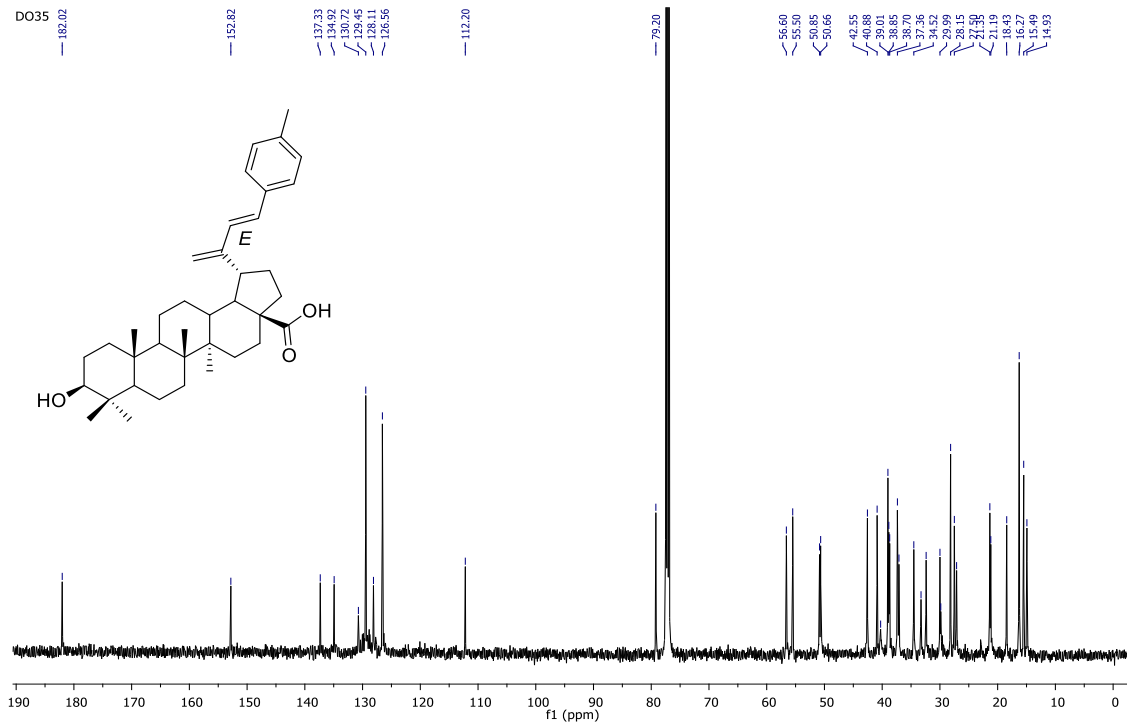
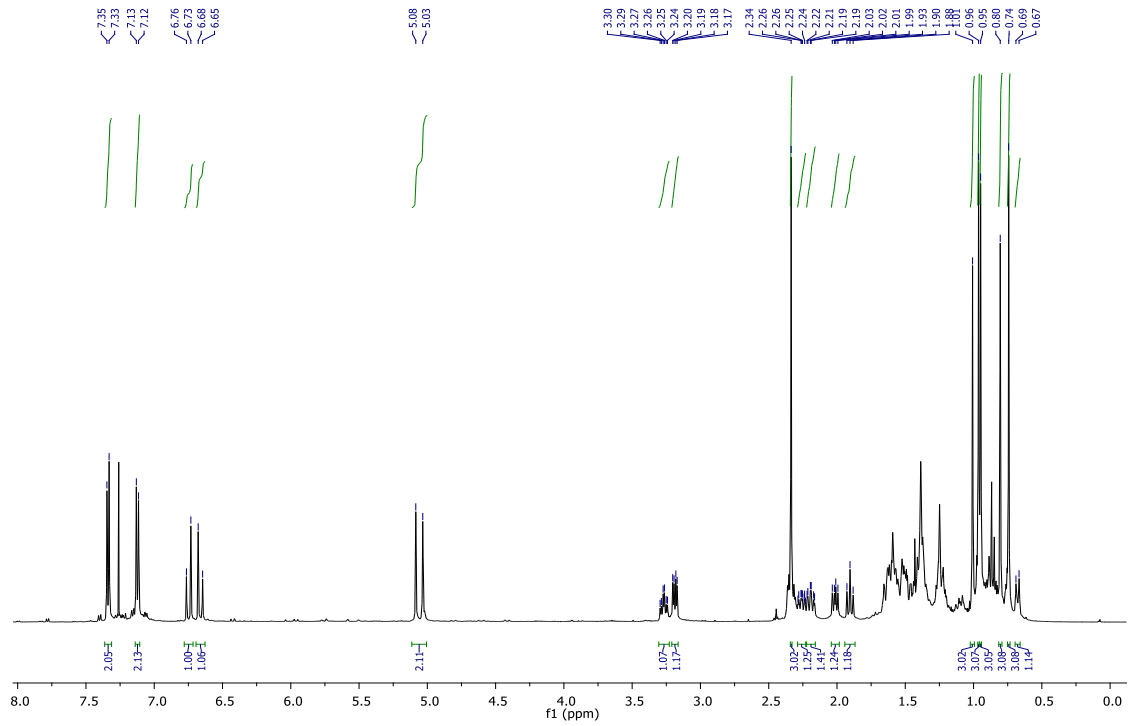
Konjugát XII



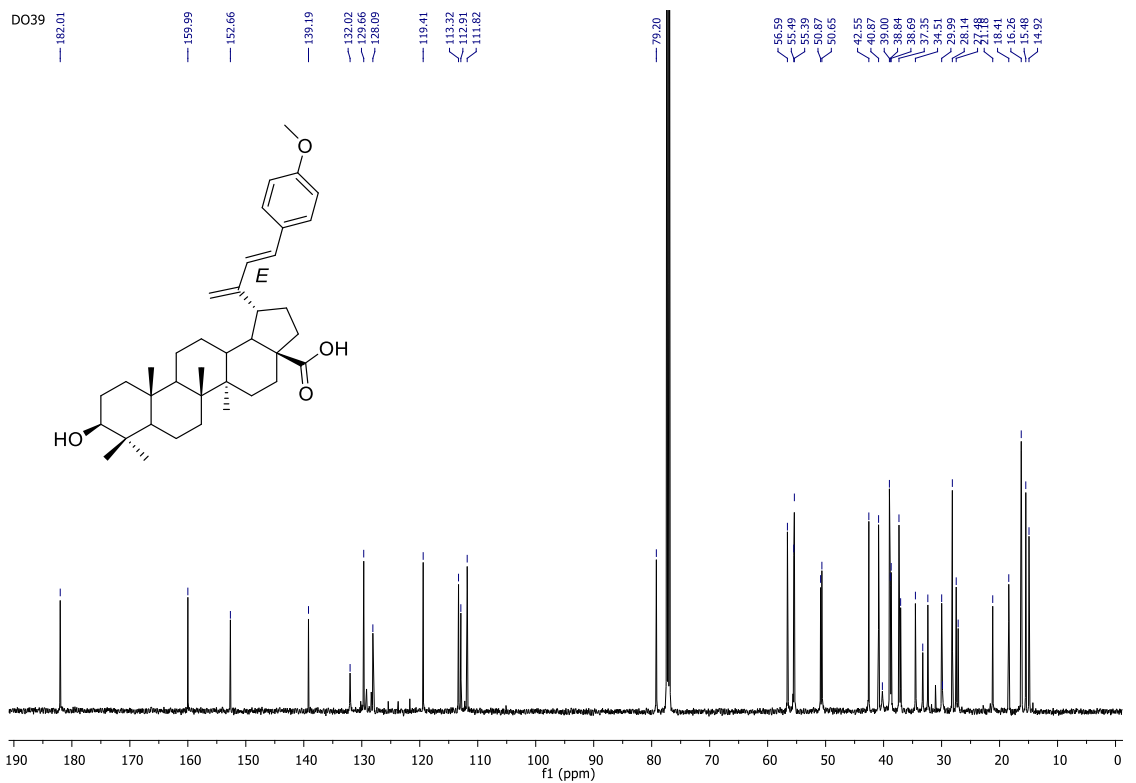
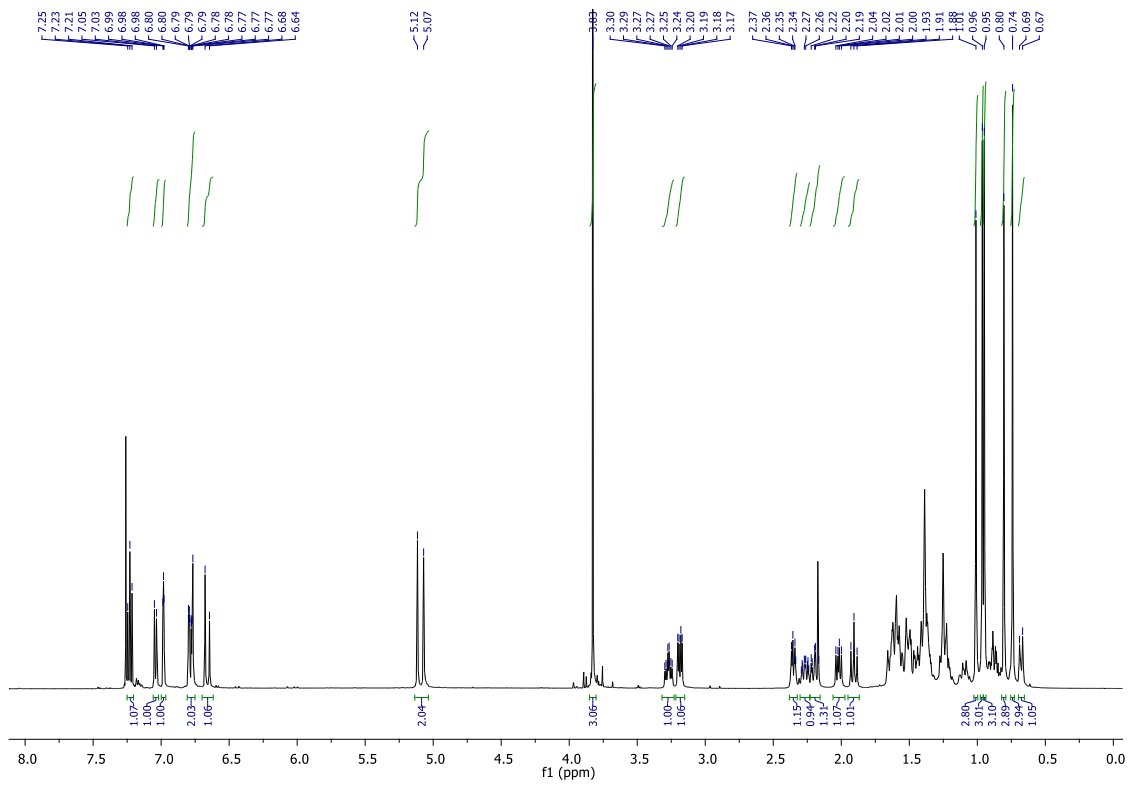
Konjugát XIV



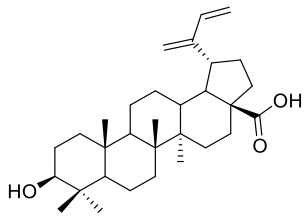
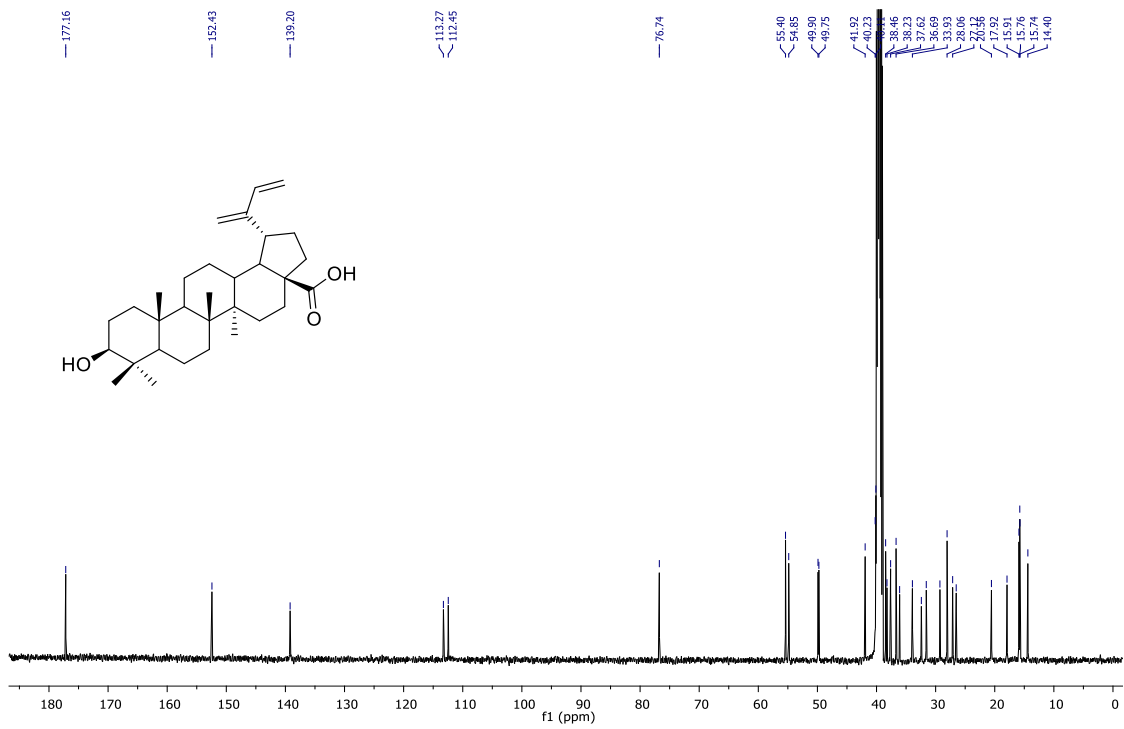
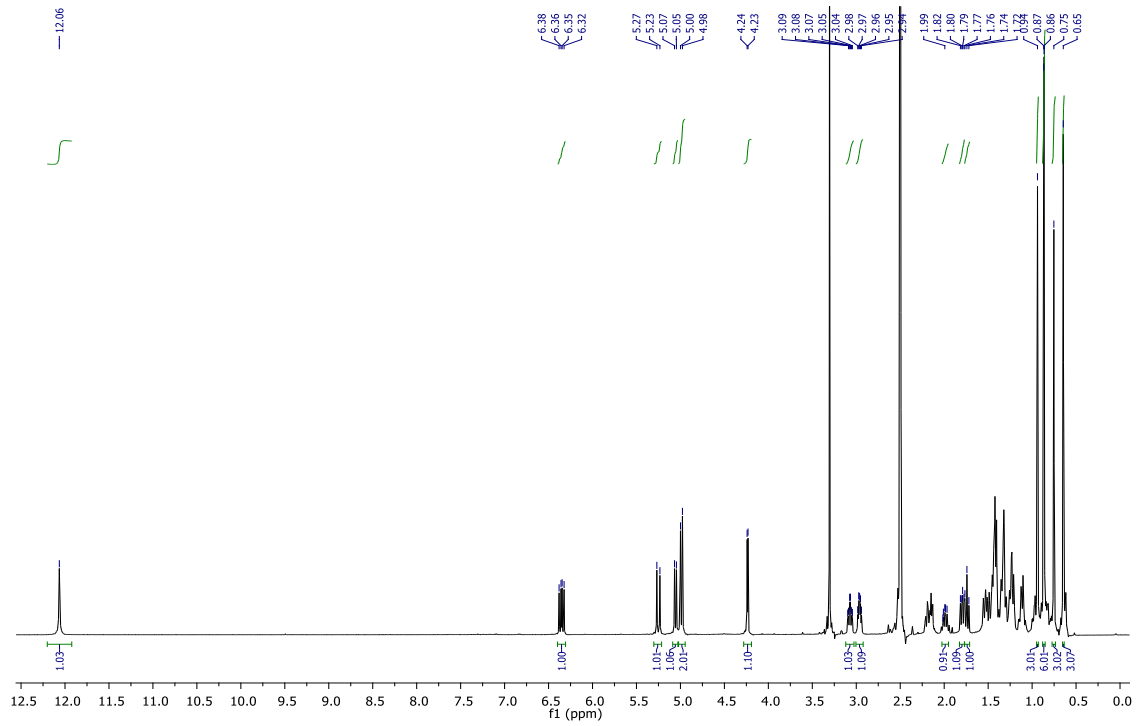
Konjugát XV



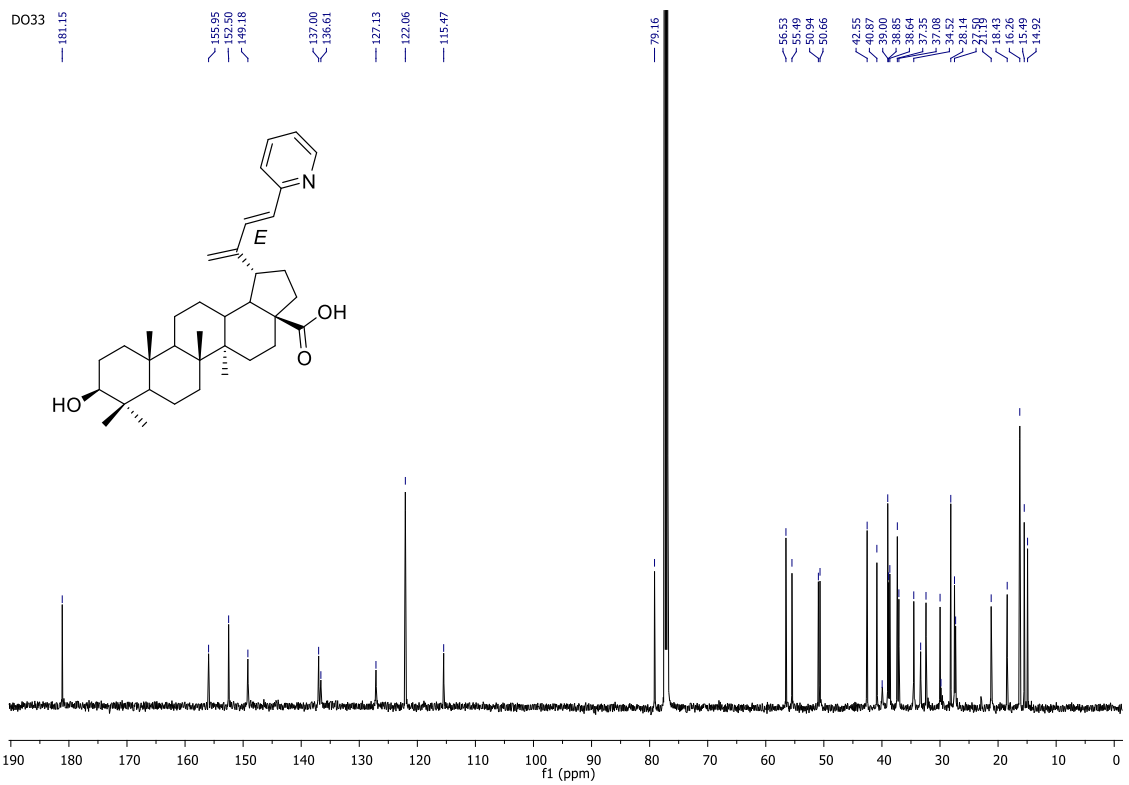
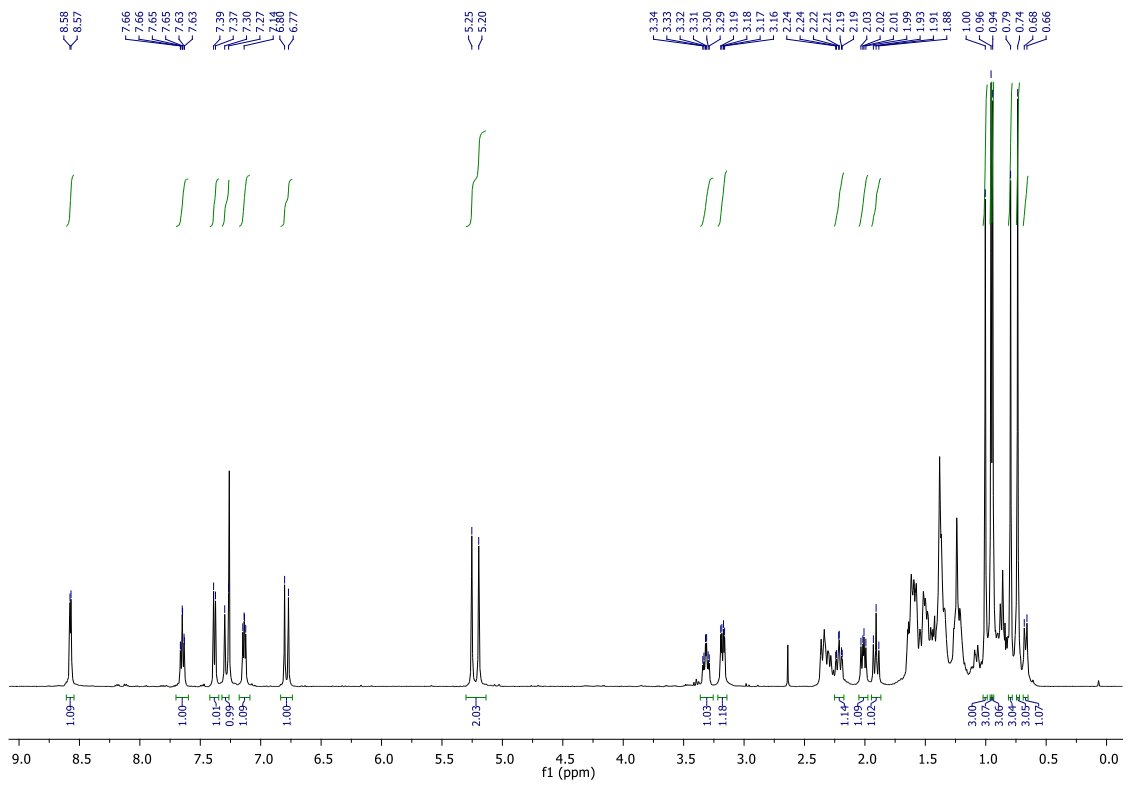
Konjugát XVI



Konjugát XVII



Konjugát XVIII



Konjugát XIX

