

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Zavádění polárních substituentů do kruhu A derivátů
betulinu a kyseliny betulinové**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Lucie Borková
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Milan Urban, Ph.D.
Konzultant práce:	RNDr. Jan Šarek, Ph.D.

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, pod vedením RNDr. Milana Urbana, Ph.D. 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, 8. 8. 2014

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, za všechnen čas, který mi věnoval, za trpělivost a za četné rady, zejména při interpretaci spektrálních dat.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Šarkovi, Ph.D. za hlavní námět pro mou diplomovou práci, Mgr. Igoru Popovi, CSc. za měření NMR spekter a interpretaci dvojdimenzionálních spekter a Mgr. Jiřímu Kaletovi, Ph.D. za měření HRMS.

V neposlední řadě děkuji všem bývalým i současným kolegům z Katedry organické chemie a ÚMTM, zejména pak kolegům z týmu triterpenů, za příjemné pracovní prostředí a mnohé rady a podněty. Děkuji také své rodině za podporu během celého studia.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Bc. Lucie Borková

Název práce: Zavádění polárních substituentů do kruhu A derivátů betulinu a kyseliny betulinové

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, UPOL

Školitel: RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Školitel-konzultant: RNDr. Jan Šarek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt:

Předložená diplomová práce se věnuje problematice syntéz derivátů betulinu a kyseliny betulinové modifikovaných na kruhu A, jejich cytotoxické aktivitě a zejména prozkoumání nukleofilních substitucí v poloze 2. V úvodní části jsou shrnuty poznatky o současném stavu studované problematiky formou literární rešerše, teoretická část pak rozebírá jednotlivé skupiny derivátů kyseliny betulinové a allobetulinu modifikované na kruhu A a uvádí do kontextu výsledky této práce s výsledky jiných autorů. V rámci této diplomové práce bylo syntetizováno a charakterizováno 18 triterpenoidních sloučenin, z toho 8 nových, a byla změřena jejich cytotoxická aktivita na více nádorových liniích. Potvrdila se původní hypotéza, že substituce v poloze 2 povede ke zvýšení aktivity oproti výchozímu materiálu, nejaktivnější derivát (thiokyanatan) měl IC_{50} s submikromolárními hodnotami. Oproti původnímu předpokladu došlo však ke ztrátě selektivity a využitelnost těchto sloučenin jako terapeutik je pravděpodobně nízká. Přínosem jsou zejména data použitelná pro SAR studie, které by mohly vést k návrhu nových struktur s vyšší selektivitou.

Klíčová slova: triterpenoidy, cytotoxická aktivita, betulinová kyselina, allobetulon, oleanan A kruh, PTC katalyzátor

Počet stran: 56

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Bc. Lucie Borkova

Title: Introduction of polar substituents into A-ring of betulin derivatives and betulinic acid derivatives

Type of thesis: Master's

Department: Department of organic chemistry, Faculty of Science, UPOL

Advisor: RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Advisor-consultant: RNDr. Jan Sarek, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract:

The submitted diploma thesis dedicates the synthesis of betulin and betulinic acid derivatives modified on the A-ring, their cytotoxic activity and mainly the utilization of nucleophilic substitution on C-2 position. The prefatory part summarizes knowledge of the present state of the studied issue in a literary review. The theoretical part analyzes individual groups of betulinic acid and allobetulin derivatives modified on the A-ring and brings into context the results of this study with the results of other authors. In this thesis, 18 triterpenoid compounds, 8 of them new, were synthesized and characterized and their cytotoxic activity was measured on more cancer cell lines. The original hypothesis was confirmed: substitution on C-2 position leads to an increase in activity compare to the starting material; the most active derivative (thiocyantan) had IC_{50} in submicromolar values. Compared to the original assumption, however, a loss of selectivity occurred and therefore, the utility of these compounds as therapeutics is likely to be low. The benefits are especially applicable data for SAR studies that could lead to the design of new structures with higher selectivity.

Keywords: triterpenoids, cytotoxic activity, betulinic acid, allobetulon, oleanane, A-ring, PTC

Number of pages: 56

Number of appendixes: 0

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD	8
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	9
1. SOUČASNÝ STAV STUDOVANÉ PROBLEMATIKY	11
1.1 Deriváty kyseliny betulinové a allobetulinu modifikované na A-kruhu	11
1.1.1 Reakce allobetulinu (II).....	12
1.1.2 Reakce allobetulonů (VI) a dihydrobetulonové kyseliny (VII)	13
1.1.3 Reakce 2-bromallobetulonů (XXIVa) a 2-bromdihydrobetulonové kyseliny (XXVa)	16
TEORETICKÁ ČÁST	18
2. PŘÍPRAVA VÝCHOZÍCH SLOUČENIN	19
2.1 Betulin (1a) a kyselina betulinová (1b).....	19
2.2 Allobetulin (2a) a kyselina betulonová (3a).....	20
2.3 Allobetulon (2b)	20
2.4 Dihydrobetulonová kyselina (3b).....	21
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	22
3.1 2-bromallobetulon (2c) a 2-bromdihydrobetulonová kyselina (3c)	22
3.2 Allobetulon-2 β -karbonitril (4).....	23
3.3 Allobetulon-2-thiokyanatan (5)	23
3.4 2-aminomethylenallobetulin (6) a 2-acetamidomethylenallobetulin-3-acetát (7)	24
3.5 2-azidoallobetulon (8a) a 2-aminoallobetulon-1(2)-en (8b)	25
3.6 2-sulfanylallobetulon (9a) a allobetulon-1(2)-en (9b).....	26
3.7 2-hydroxyethylsulfanylallobetulon (10), 2',3'-dihydro-1',4'-oxathiin 11a a diosfenol 11b	28
3.8 2-nitroallobetulon (12a), 2,2-dinitroallobetulon (12b), allobetulon-1(2)-en-3-acetát (12c)	29
3.9 2-aminoallobetulon (13), allobetulon-2- <i>N</i> -acetamid (14)	30
3.10 2-karbonitrildihydrobetulonová kyselina (15).....	31
3.11 2-thiokyanatano-dihydrobetulonová kyselina (16).....	31
3.12 2-azidodihydrobetulonová kyselina (17)	31
3.13 2-sulfanyldihydrobetulonová kyselina (18).....	32

4. CYTOTOXICKÁ AKTIVITA PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN	33
ZÁVĚR	35
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
TABULKY ¹³C NMR SPEKTER.....	48
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
SEZNAM NÁDOROVÝCH BUNĚČNÝCH LINÍ.....	52
LITERATURA.....	53

ÚVOD

Triterpeny představují rozsáhlou skupinu přírodních polycyklických terpenů, vyskytujících se nejenom v rostlinách, ale i v dalších suchozemských a vodních organismech. V Asii jsou běžně využívány jako součást přírodní medicíny. Triterpeny jsou tvořeny šesti izoprenoidními jednotkami a jsou odvozeny od více než 40 skeletálních typů. Často vykazují různé biologické účinky, kterých jsou do dnešní doby známy desítky, jsou to např. účinky protizánětlivé, protivředové, antimikrobiální a proti-HIV. Hlavní důraz je v současné době kladen na testování cytotoxických aktivit triterpenů.

Řada triterpenů, zejména lupanových a oleananových derivátů, vykazuje cytotoxickou aktivitu proti široké škále nádorových buněčných linií různého histologického původu, včetně kmenů rezistentních vůči dostupným chemoterapeutikům (např. taxolu a daunorubicinu). Jejich protinádorová aktivita byla dokonce pozorována i v preklinických studiích na zvířecích modelech.

Zájem o nová cytostatika z řady modifikovaných triterpenoidů roste nejenom díky jejich vysoké aktivitě, ale i nízké toxicitě a často neznámému mechanismu účinku. Triterpeny lze také snadno získat z dobře dostupných přírodních zdrojů, i proto se staly slibnými kandidáty ve vývoji nových léčivých přípravků nejenom proti rakovině.

Tato diplomová práce je zaměřena na zavádění polárních substituentů do A-kruhu derivátů betulinu a kyseliny betulinové s použitím různých chemických reakcí, například nitrace nebo nukleofilní substituce halogenderivátů. U nukleofilní substituce byla navíc zkoumána možnost využití katalyzátoru fázového přenosu.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Příprava série známých oleananových a lupanových derivátů s polární skupinou na A kruhu pro testování cytotoxické aktivity, která doposud nebyla na těchto sloučeninách studována.
2. Příprava série nových oleananových derivátů s polární skupinou na A kruhu a jejich testování na cytotoxickou aktivitu.
3. Optimalizace reakcí a syntéza nových lupanových derivátů s polární skupinou na A kruhu a jejich testování na cytotoxickou aktivitu.
4. Prozkoumání využití PTC u nukleofilních substitucí na A kruhu triterpenů.
5. Porovnání cytotoxicit známých i nových sloučenin a pokus o poodhalení vztahu mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou.

Poznámka k textu

Číslování sloučenin v této práci je dvojího charakteru. V kapitole *1. Současný stav studované problematiky* je použito římské číslování sloučenin podle pořadí, v jakém se objevují v textu. V dalších kapitolách včetně experimentální části je použito arabské číslování sloučenin.

Klasické desetinné čárky jsou v textu nahrazeny desetinnými tečkami, jak je obvyklé v anglosaské literatuře. Tato náhrada má zpřehlednit zejména výpisy spektrálních dat.

1. Současný stav studované problematiky

Triterpeny jsou přírodní sloučeniny vyskytující se obvykle v rostlinách, mořských organismech, houbách, plísních a bakteriích. Každým rokem jsou z přírodních zdrojů izolovány stovky nových triterpenů, o čemž svědčí recenze Conolyho & Hilla publikované každým rokem, poslední z roku 2013.¹

Triterpeny se mohou chlubit celou řadou biologických účinků.² Často jsou to účinky cytotoxické³, protivirové⁴, antimikrobiální⁵, antifungální⁶, antimalarické⁷, protizánětlivé⁸, protivředové⁹, hepatoprotektivní¹⁰ a kardioprotektivní¹¹, ale i mnohé další. Toxicita triterpenů je obvykle velmi nízká (terapeutický index vysoký), což je důležité pro jejich potenciální využití v léčebné terapii.

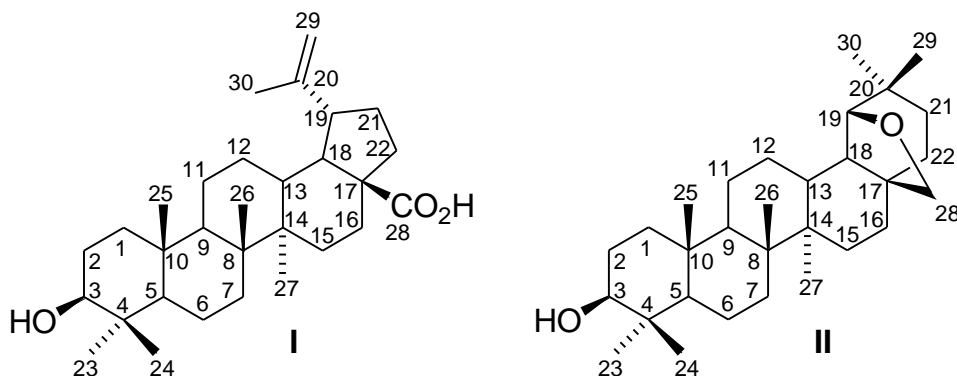
Přestože triterpeny disponují celou řadou biologických aktivit, výchozí sloučeniny mají obvykle dva nedostatky. Prvním z nich je fakt, že triterpeny nejsou aktivní v dostatečně malých koncentracích. Hodnota IC_{50} se pohybuje v jednotkách mikromolů na litr u nejaktivnějších derivátů, ale často není dostatečná ve srovnání s již dostupnými terapeutiky. Zvýšení aktivity triterpenoidních derivátů je jedním z hlavních cílů mnoha výzkumných skupin z celého světa zabývajících se problematikou triterpenů. Druhým nedostatkem jsou jejich nevhodné farmakologické vlastnosti, zejména jejich malá rozpustnost ve vodných médiích. Problematika rozpustnosti je jedním z hlavních důvodů, proč sloučeniny, které vykazují vysoké *in vitro* aktivity, často selžou v průběhu *in vivo* testování, a proč jejich administrace způsobuje mnoho obtíží.

V naší skupině studujeme vliv modifikace lupanových triterpenoidů na jejich cytotoxickou aktivitu. Naším hlavním cílem je modifikovat tyto sloučeniny tak, abychom zlepšili jejich farmakologické vlastnosti (biodostupnost, rozpustnost) a zvýšili jejich terapeutický index. Již dříve jsme našli u řady derivátů významné protirakovinné účinky.^{2,3}

1.1 Deriváty kyseliny betulinové a allobetulinu modifikované na A-kruhu

Předložená práce si klade za cíl zavedení polárních substituentů do poloh 2 a 3 lupanového a 18α -oleananového skeletu (Obr. 1). Jak je z předchozího výzkumu známo, polární substituenty v poloze 2 lupanového skeletu výrazně zvyšují cytotoxicitu těchto sloučenin.^{12,13,14,15}

Obr. 1: Lupanový skelet zastoupený kyselinou betulinovou (**I**) a 18 α -oleananový skelet zastoupený allobetulinem (**II**).



1.1.1 *Reakce allobetulinu (II)*

Literatura¹⁶ popisuje zajímavou metodu zavedení nitroskupiny do polohy 2. Jedná se o nitraci nitrační směsí v kyselině octové (Schéma 1), jejímž výsledkem je α -nitroketon **III** vyskytující se převážně v enolformě.¹⁷ Ve spektrech byla pozorována struktura 2-nitroenu **III (a)** a diastereomery 2-nitroketonu **III (b)**. Redukcí nitrovaného derivátu **IV** tetrahydridohlinitanem lithným byl připraven jednotný aminoalkohol **IV** (Schéma 1). Nitraci allobetulinu (**II**) za zvýšené teploty vzniká dle lit.¹⁸ vedlejší produkt 2,2-dinitroketon **V**.

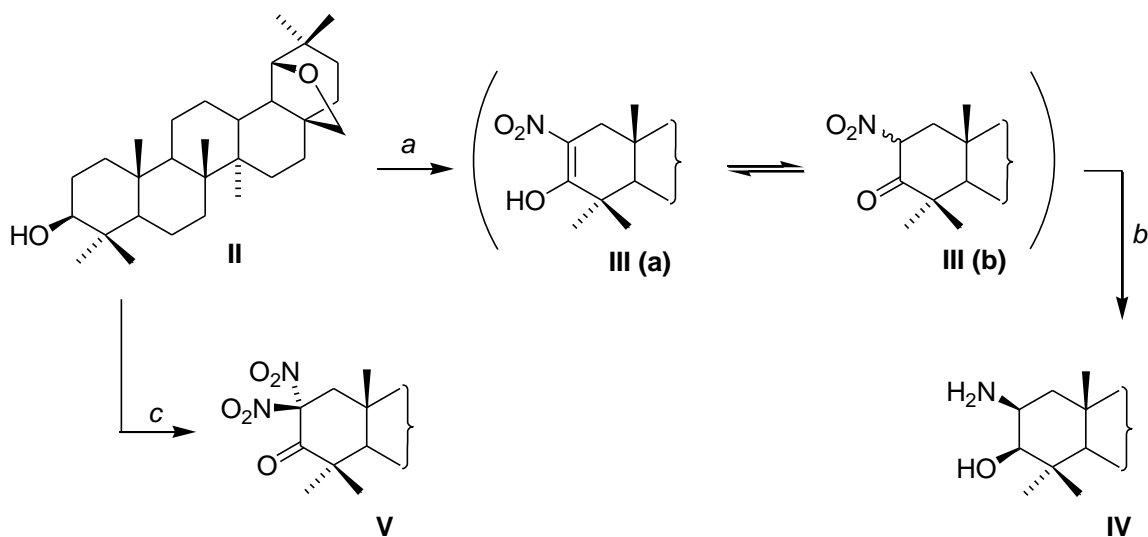


Schéma 1: *a:* HNO₃ (d = 1.35)/AcOH; *b:* LiAlH₄/CH₂Cl₂, Et₂O; *c:* HNO₃ (d = 1.35)/AcOH:dioxan (1:1) (70 °C)

1.1.2 Reakce allobetulonů (VI) a dihydrobetulonové kyseliny (VII)

Reakce aldehydu VIII (vyskytuje se v enolformě¹⁹), připraveného z allobetulonů (VI) známým postupem²⁰, s alkylaminy za přítomnosti DCC byly využity k přípravě série sloučenin IXa – IXf ve výtěžcích 49 – 63 % (Schéma 2).²¹

V lit.^{22,23} byly popsány reakce vedoucí z allobetulonů (VI) k 2-hydroxyiminoketonu X za použití čerstvě připraveného isoamylnitritu. Keton X byl následně redukován NaBH₄ za vzniku hydroxyderivátu XI (Schéma 2).

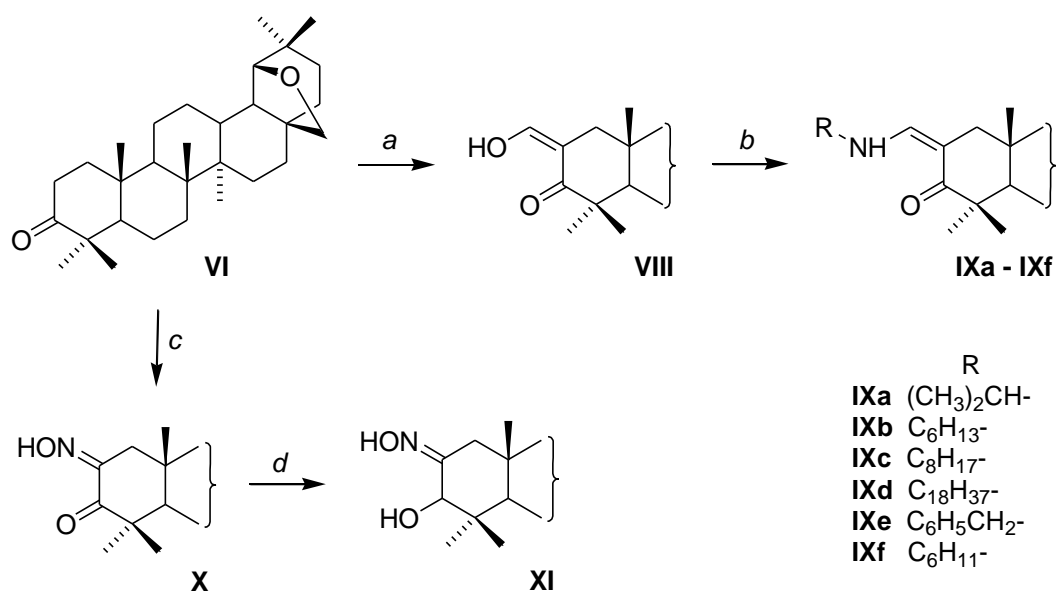
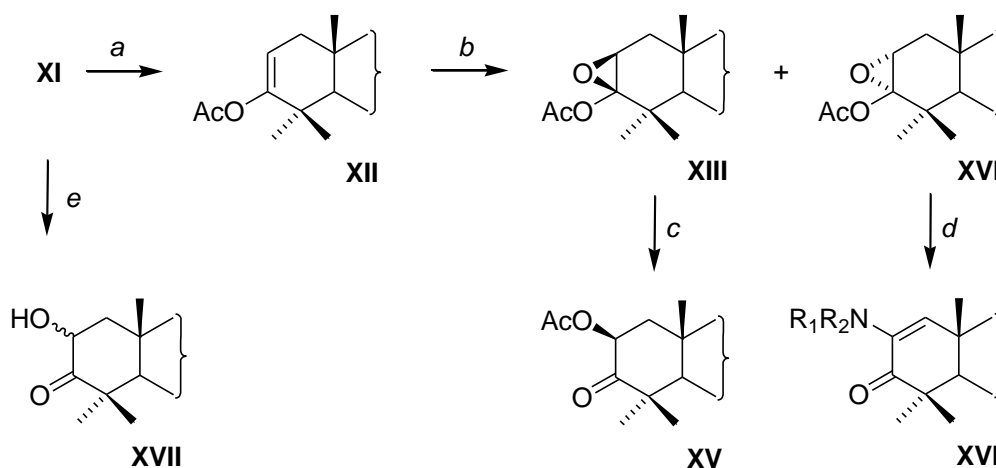


Schéma 2: a: HCO₂Et, MeONa/MeOH, CHCl₃; b: RNH₂, DCC/PhMe (reflux); c: *i*-C₆H₁₁NO₂, *t*-BuOK/*t*-BuOH; d: NaBH₄/MeOH

3β-acetoxyleanan-2-en XII byl připraven dvěma způsoby lišícími se v použití acetylačního činidla (acetanhydridu nebo isopropenyl acetátu) a obě reakce poskytovaly podobný výtěžek (70 % a 73 %, respektive).²⁴ Oxidace XII MCPBA za standardních podmínek²⁵ poskytla diastereomerní směs epoxyderivátů XIII a XIV (Schéma 3). Přesmyk epoxyderivátů XIII a XIV na 2-acetoxyleanon XV proběhl dle očekávání s vysokou stereoselektivitou. Kvůli sterickému bránění geminálních C-4 methylových skupin byl výsledným produktem výhradně 2β-acetoxyleanon XV (Schéma 3). V případě použití cyklického nebo lineárního aminu jako rozpouštědla reagovaly epoxidy XIII a XIV za vzniku enaminů XVIa – XVIe (Schéma 3).²⁴

Z lit.^{26,27} je známo, že triterpenoidy a 4,4-dimethyl-3-oxosteroidy při reakci s peroxykyselinami podléhají štěpení C3-C4 vazby, vedoucí k tvorbě sedmičlenných laktonů. Překvapivým byl proto vznik 2-hydroxyketonu **XVII** z hydroxyderivátu **XI** za přítomnosti MCPBA a katalytického množství kyseliny sírové (Schéma 3).²⁸ 2-hydroxyketon **XVII** se tvoří nejenom v methanolu, ale i ve směsi rozpouštědel ethanol/chloroform a methanol/dichlormethan. Lit.²⁸ popisuje, že podle ¹H-NMR spektra nebyla pozorována tvorba žádného methylesteru MCPBA ani 2-methoxyketonu. Pokud je methanol nahrazen kyselinou octovou nebo acetonitrilem hydroxylace neprobíhá. Klíčová je také přítomnost kyseliny sírové. Reakce však není nijak ovlivněna přítomností inhibitorů radikálových reakcí a její mechanismus ještě nebyl objasněn.



XVIa: $R_1, R_2 = -(CH_2)_5-$; **XVIb:** $R_1, R_2 = -(CH_2)_2O(CH_2)_2-$; **XVIc:** $R_1 = C_6H_5CH_2-$, $R_2 = H$; **XVI d:** $R_1 = C_6H_{13}-$, $R_2 = H$; **XVI e:** $R_1 = C_6H_{11}-$, $R_2 = H$

Schéma 3: *a:* Ac_2O/CCl_4 , H_2SO_4 nebo isopropenyl acetát/ CCl_4 , H_2SO_4 ; *b:* MCPBA/ CH_2Cl_2 , Et_2O ; *c:* morfolin/ $PhMe$ (reflux); *d:* R_1R_2NH (reflux); *e:* MCPBA/ $MeOH$, H_2SO_4

Ve steroidní literatuře je publikováno, že 3-oxosteroidy jsou za přítomnosti silné báze oxidovány atmosférickým kyslíkem na 2,3-dioxosteroidy ve formě diosfenolů.²⁹ Později byl stejný postup aplikován na 3-oxoderiváty triterpenů a bylo zjištěno, že 2,3-dioxotriterpeny v enolformě (diosfenoly) je také možno připravit zaváděním proudu čistého kyslíku do roztoku 3-oxoderivátu a t-BuOK v t-BuOH (40 °C) po dobu 20 – 30 min.³⁰ V reakční směsi vzniká směs diosfenolu a značného množství vedlejšího produktu – laktolu, který vzniká následnou oxidací diosfenolu. V pracích^{31,32} byla tato reakce podrobně zkoumána a bylo zjištěno, že čistý diosfenol **XVIII** ve výtěžku 90 –

97 % lze připravit nahrazením čistého kyslíku vzduchem, kdy je nutno reakční dobu prodloužit na 2 – 3 h při r.t. (Schéma 4). Po této době začíná ve směsi vznikat laktol jako produkt následné oxidace a po 24 hodinách je laktol jediným produktem reakce. Diosfenol **XIX** je možno připravit analogickým způsobem oxidací dihydrobetulonové kyseliny (**VII**) (Schéma 4),³³

Aldehydketony **XX** a **XXI** byly připraveny modifikovaným způsobem^{12,19} za použití ethyl formiátu v přítomnosti velkého nadbytku hydridu sodného (10 eq.) za varu v bezvodém dioxanu; β -ketoestery **XXII** a **XXIII** byly připraveny obdobným způsobem s využitím diethylkarbonátu jako činidla (Schéma 4).¹⁴

Bromderiváty **XXIVa** a **XXVa** byly připraveny reakcí allobetulonu (**VI**) a kyseliny dihydrobetulonové (**VII**) s jedním ekvivalentem Br_2 , dva ekvivalenty Br_2 byly použity k získání dibromoderivátů **XXIVb** a **XXVb** (Schéma 4), jak bylo již dříve popsáno.^{13,20,34,35,36}

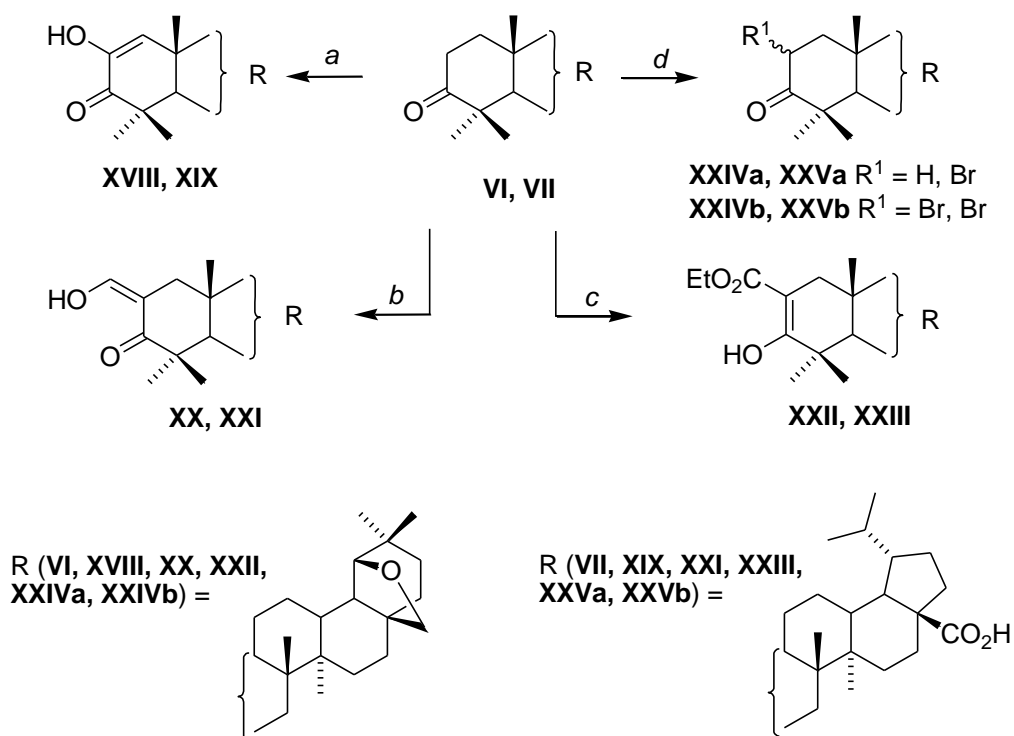


Schéma 4: *a:* O_2 (vzduch), *t*-BuOK/*t*-BuOH; *b:* $\text{HCO}_2\text{Et}/\text{NaH}$, dioxan (reflux); *c:* $\text{Et}_2\text{CO}_3/\text{NaH}$, dioxan (reflux); *d:* Br_2/AcOH , AcONa

1.1.3 Reakce 2-bromallobetulonů (**XXIVa**) a 2-bromdihydrobetulonové kyseliny (**XXVa**)

Jednou z významných možností přípravy triterpenoidních derivátů substituovaných v poloze 2 je využití nukleofilní substituce. Touto cestou bylo doposud připraveno pouze omezené množství sloučenin. V roce 1966³⁴ byl z 2-bromallobetulonů (**XXIVa**) připraven 2-azidoketon **XXVI**, zatímco v lit.¹⁴ byly popsány reakce vedoucí k syntéze morfolinového derivátu **XXVII** (Schéma 5) a kondenzovaných heterocyklických derivátů **XXVIII** a **XXIX** (Schéma 6). Nejčastějším vedlejším produktem nukleofilních substitucí na oleananovém skeletu je dle lit.¹⁴ diosfenol **XXX**.

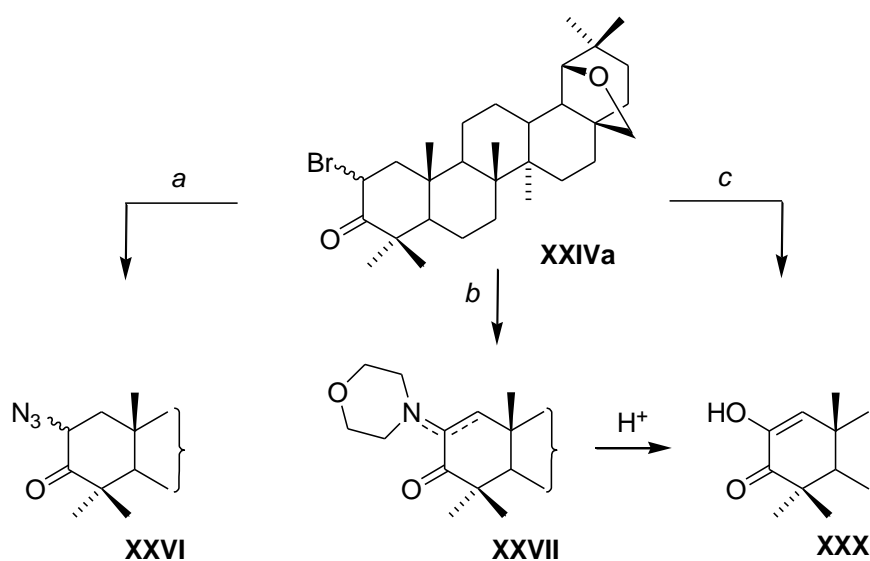


Schéma 5: *a:* NaN_3/NMP , $AcOH$; *b:* např. močovina/morfolin (reflux); *c:* např. močovina/pyridin (reflux)

Na lupanovém skeletu byla s ohledem na nukleofilní substituci popsána pouze reakce 2-bromdihydrobetulonové kyseliny (**XXVa**) s thiomčovinou, kterou byl připraven aminothiazol **XXXI**, jehož následnou modifikací vznikl bromderivát **XXXII** (Schéma 6).¹⁴

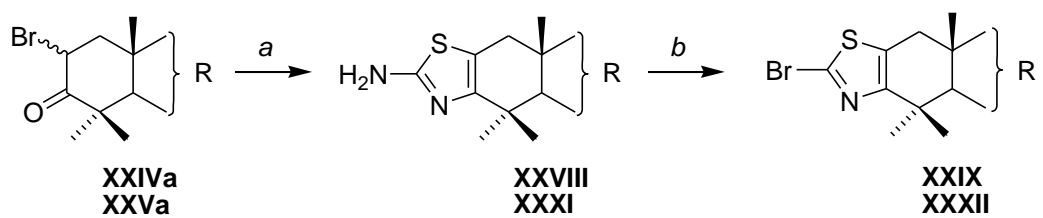


Schéma 6: *a*: thiomčovina/morfolin (reflux); *b*: isoamylnitrit, TBAB/CHCl₃ (reflux)

TEORETICKÁ ČÁST

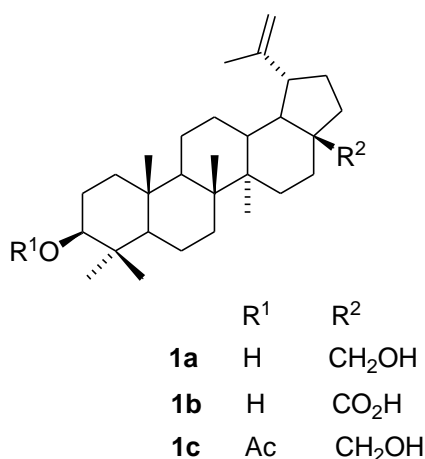
2. Příprava výchozích sloučenin

2.1 Betulin (1a) a kyselina betulinová (1b)

Betulin (**1a**) je přírodní pentacyklický triterpen, jenž hraje důležitou roli jako výchozí sloučenina pro syntézu řady nových biologicky aktivních sloučenin.^{3,37} V přírodě se nachází ve svrchních vrstvách březové kůry v množství až 20 % v závislosti na podmínkách, ve kterých strom roste.³⁸ V roce 1934³⁹ byla popsána extrakce betulinu (**1a**) ze svrchních vrstev kůry břízy bělokoré (*Betula pendula*) nízkovroucí ropnou frakcí. V dnešní době se používá, zejména z environmentálních důvodů extrakce ethanolem,⁴⁰ popsána byla i superkritická extrakce oxidem uhličitým za teploty 55 °C a tlaku 20 MPa.⁴¹

V březové a platanové kůře je v minoritním množství (do 2 %) zastoupena i kyselina betulinová (**1b**). Byla popsána řada prací^{42,43,44,45} zabývajících se její extrakcí z těchto zdrojů, ale pro získání průmyslově významných kvantit kyseliny **1b** je její zastoupení v kůře bříz či platanů nedostatečné a tudíž se její získání extrakčně ekonomicky nevyplácí. Schůdnější možností pro přísun kyseliny betulinové (**1b**) v kilogramových množstvích je její syntéza oxidací betulinmonoacetátu (**1c**), která je v USA patentově chráněna.⁴⁶

Obr. 2: Struktura betulinu (**1a**), kyseliny betulinové (**1b**) a betulinmonoacetátu (**1c**).



2.2 Allobetulin (2a) a kyselina betulonová (3a)

Betulin (1a) je základní výchozí sloučenina pro přísun jak allobetulinu (2a), tak i kyseliny betulonové (3a). Přesmyk betulinu (1a) poskytující allobetulin (2a) je znám již z lit.⁴⁷ a byl dostatečně popsán v práci⁴⁸ (Schéma 7). Postupů vedoucích ke kyselině betulonové (3a) bylo popsáno mnoho. Liší se především v počtu kroků a použitých činidlech. Pod patentovou ochranou⁴⁹ se nachází jednokrokový postup (Schéma 7) využívající Jonesova činidla k současné oxidaci obou hydroxyskupin betulinu. V naší laboratoři však bylo shledáno, že v malém měřítku tato reakce poskytuje nedostatečné výtěžky, je náročná na spotřebu drahého oxidu chromového a zpracování reakční směsi je obtížné.¹⁹ Jinou alternativou¹⁹ je mnoha kroková syntéza vedoucí od výchozího betulinu (1a) přes kyselinu betulinovou (1b) až ke kyselině betulonové (3a), která je však kvůli velkému množství kroků ekonomicky nepříznivá. Další možností⁵⁰ je přímá oxidace betulinové kyseliny (1b) coby základní suroviny pro přípravu kyseliny 3a v jednom reakčním kroku (Schéma 7).

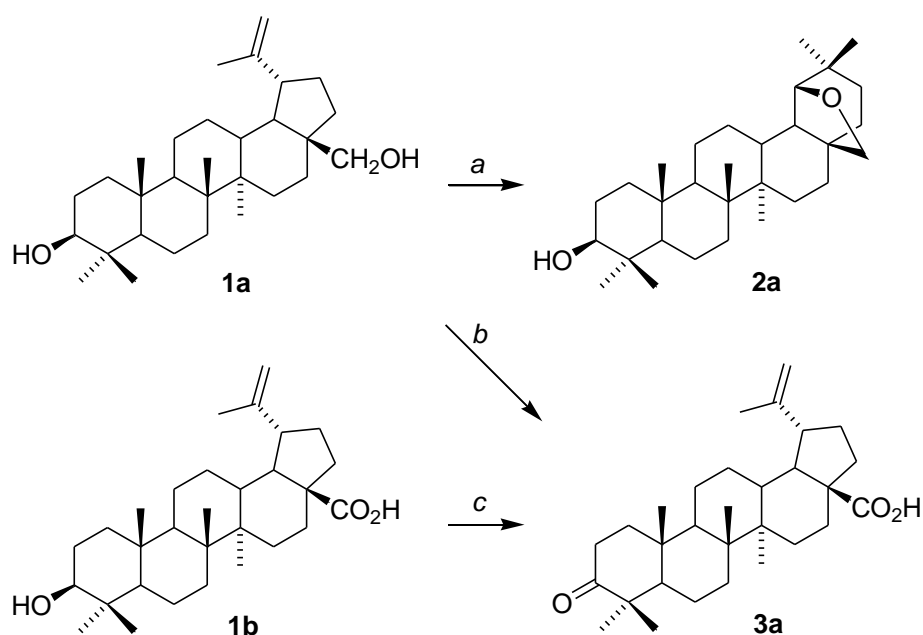


Schéma 7: *a*: Montmorillonit-K10/CHCl₃ (reflux); *b*: Jonesovo činidlo I/aceton (0 °C); *c*: CrO₃/DMF, H₂SO₄

2.3 Allobetulon (2b)

Výchozí sloučeninou pro přípravu allobetulonu (2b) byl allobetulin (2a), který byl oxidován postupem popsáním v literatuře¹⁹ za použití triethylamonium

chlorochromátu jako oxidačního činidla (Schéma 8); použitím tohoto činidla nevzniká obvyklý vedlejší produkt – 28-oxoallobetulon, který není možné od allobetulonu (**2b**) oddělit běžnými chromatografickými ani krystalizačními metodami. Oxidace poskytla allobetulon (**2b**) ve výtěžku 94 %.

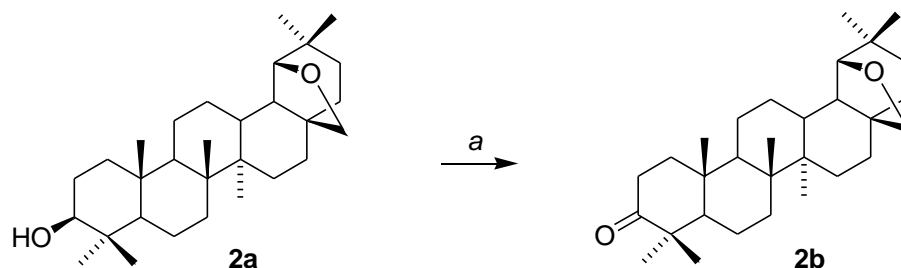


Schéma 8: *a*: TEACC/CHCl₃ (0 °C)

2.4 Dihydrobetulonová kyselina (**3b**)

Výchozí sloučeninou pro přípravu dihydrobetulonové kyseliny (**3b**) byla kyselina betulonová (**3a**), která byla katalyticky hydrogenována vodíkem za použití Raneyova niklu jako katalyzátoru. Tento katalyzátor byl použit, protože přírodní výchozí materiál obsahuje v závislosti na přírodním zdroji stopy různých nečistot a katalytických jedů a použití typických hydrogenačních katalyzátorů jako např. Adamsova katalyzátoru, platinové černi, palladia apod. selhává.⁵¹ (Schéma 9).

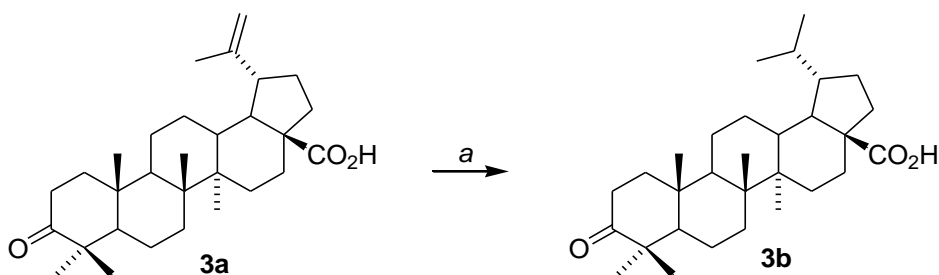


Schéma 9: *a*: H₂, RaNi/THF

3. Výsledky a diskuze

Cílem této práce bylo připravit sérii polárních derivátů odvozených od betulinu (**1a**) a kyseliny betulinové (**1b**) modifikovaných v poloze C-2 zejména pomocí nukleofilní substituce. Deriváty oleananu sice zpravidla cytotoxicky aktivní nejsou, ale vzhledem k jejich stabilitě obvykle nepodléhají žádným vedlejším reakcím a přesmykům, a jsou proto vhodné k testování nových reakčních postupů a optimalizaci podmínek. Deriváty kyseliny betulinové (**1b**) bývají více či méně cytotoxicky aktivní v závislosti na modifikaci molekuly. Výchozími sloučeninami pro přípravu série C-2 modifikovaných derivátů byly 2-bromallobetulon (**2c**) a kyselina 2-bromdihydrobetulonová (**3c**).

3.1 2-bromallobetulon (**2c**) a 2-bromdihydrobetulonová kyselina (**3c**)

2-bromderiváty **2c** a **3c** byly připraveny přímou bromací 3-oxoderivátů **2b** a **3b** elementárním bromem. Literatura³⁴ uvádí snadnou přípravu diastereomerní směsi α a β epimerů přikapáním roztoku bromu v kyselině octové s octanem sodným k roztoku výchozích sloučenin **2b** a **3b** v chloroformu a kyselině octové. Při aplikaci tohoto postupu na allobetulon (**2b**) byl získán 2-bromderivát **2c** ve výtěžku 74 % za 24 h (reakce běžela přes noc). Provedením reakce v čistém chloroformu bez příměsí kyseliny octové a octanu sodného bylo zjištěno, že allobetulon (**2b**) zreagoval na bromketon **2c** dle TLC do 35 min (Schéma 10). Přikapáváním roztoku bromu v chloroformu se reakční směs ihned odbarvovala; 2-bromderivát **2c** vznikl ve výtěžku 65 %. 2-bromkyselina **3c** byla připravena pouze modifikovaným způsobem ve výtěžku 98 %. Použití octanu sodného a kyseliny octové v bromační směsi ve starší literatuře bylo zřejmě vedeno snahou o ovlivnění poměru jednotlivých epimerů.

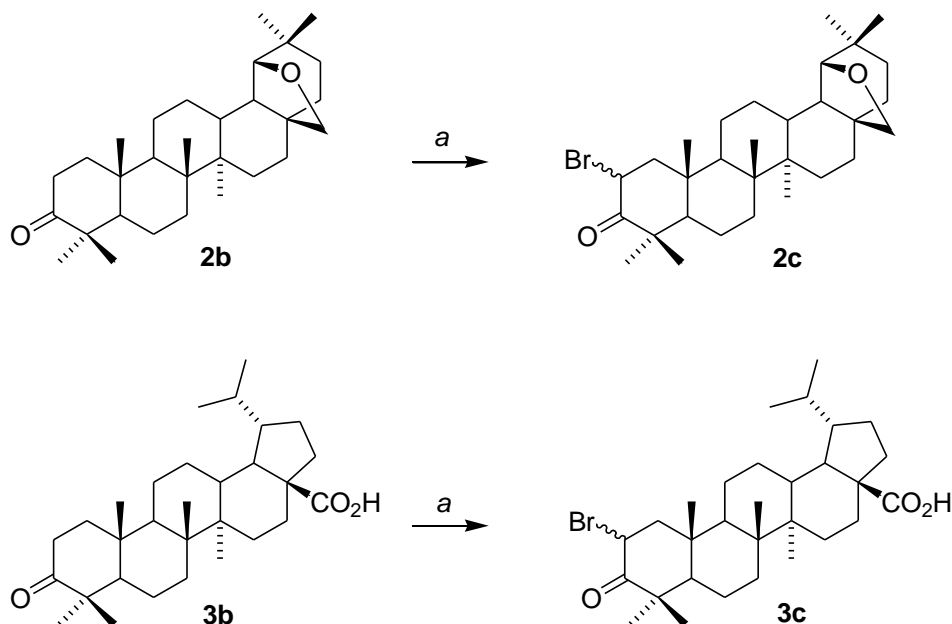


Schéma 10: *a*: Br₂/CHCl₃

3.2 Allobetulon-2 β -karbonitril (4)

Allobetulon-2-karbonitril, směs epimerů, byl získán reakcí 2-bromallobetulonu (2c) s NaCN v DMSO (Schéma 11). Reakce byla kvůli nízkému výtěžku (45 %) opakována za použití jiných rozpouštědel - dichlormethan, toluen, chloroform, ethylacetát, avšak tyto reakce poskytovaly buď menší, anebo žádnou konverzi. V IR spektru karbonitrilu **4** byl pozorován pás charakteristický pro C \equiv N skupinu při 2245 cm⁻¹. O 2 β -konfiguraci svědčí dublet dubletu H-1a při 1.66 ppm, dublet dubletu H-1b při 2.30 ppm a triplet H-2 při 3.67 ppm. Na základě shodných interakčních konstant, $J_{(H-1/H-1a)} \sim J_{(H-1/H-1b)} \sim 2.1$ Hz, vyplývá, že torzní úhly jsou takřka stejné a nitril směřuje v molekule karbonitrilu **4** do polohy β .

Reakce byla také prováděna za PTC katalýzy v DMSO při r.t. nebo s dvojfázovým systémem chloroform/voda či ethylacetát/voda za varu. Ani v případě katalyzovaných reakcí se konverzi nepodařilo zvýšit.

3.3 Allobetulon-2-thiokyanatan (5)

Reakce 2-bromallobetulonu (2c) s KSCN v DMSO dala vzniknout α a β epimerům allobetulon-2-thiokyanatanu (**5**) ve výtěžku 89 % (Schéma 11). Epimery se nepodařilo od sebe oddělit a produkt byl tedy charakterizován jako směs. V IR spektru

byl nalezen pás při 2153 cm^{-1} náležící vazbě $\text{C}\equiv\text{N}$. V ^1H NMR spektru byl kromě signálů obvyklých pro oleananový skelet nalezen multiplot H-1a při $1.98 - 2.19\text{ ppm}$, multiplot H-1b při $2.48 - 2.75\text{ ppm}$ a multiplot H-2 α,β při $4.70 - 4.74\text{ ppm}$.

Reakce byla prováděna i za PTC katalýzy ve směsi rozpouštědel aceton/voda a ve dvojfázovém systému ethylacetát/voda, avšak ani u jedné z reakcí nedošlo ke konverzi ani po 20 a 24 h varu.

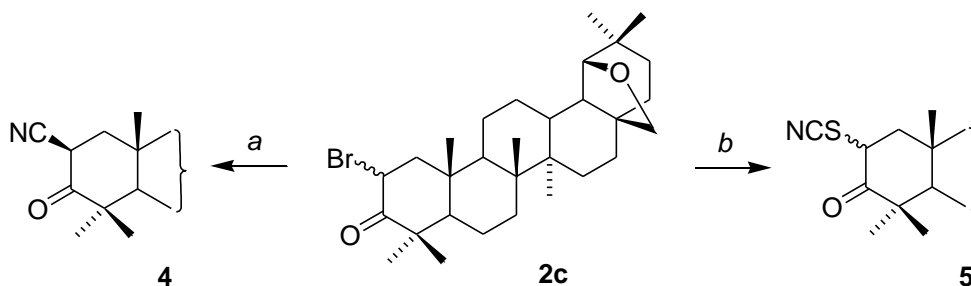


Schéma 11: *a*: NaCN/DMSO; *b*: KSCN/DMSO (reflux)

3.4 2-aminomethylenallobetulin (6) a 2-acetamidomethylenallobetulin-3-acetát (7)

Redukcí nitrilu **4** s využitím LiAlH_4 v THF (Schéma 12) byla získána směs α a β diastereomerů 2-aminomethylenallobetulinu (**6**) ve výtěžku 82 %. V IR spektru byl pozorován široký pás NH a OH skupiny při $3000 - 3600\text{ cm}^{-1}$. V ^1H NMR spektru byl přítomen multiplot H-2 při $1.72 - 1.78\text{ ppm}$, dublet H-1a při $2,18\text{ ppm}$, dublet H-1b při 2.57 , široký singlet NH_2 při 2.80 ppm , a také dublety H-31a a H-31b při 2.80 a 2.98 ppm . Sloučenina **6** je špatně rozpustná a navíc přítomnost volné NH_2 skupiny u triterpenů často způsobí, že NMR signály jsou rozšířené a spektrum není prvního řádu, což ztěžuje interpretaci. Proto byla struktura stanovena ještě pomocí přípravy derivátů.

Aminoalkohol **6** byl acetylován acetanhydridem, čímž došlo k ochraně obou funkčních skupin (Schéma 12) za vzniku 2-acetamidomethylenallobetulin-3-acetátu (**7**) ve výtěžku 56 %. Sloučenina je dobře rozpustná v chloroformu a spektra snáze interpretovatelná. V IR spektru byly nalezeny pásy dvou karbonylů při 1658 a 1723 cm^{-1} a pás NH skupiny při 3311 cm^{-1} . V ^1H NMR spektru byl kromě signálů obvyklých pro oleananový skelet pozorován singlet dvou H-1 při 1.84 ppm , dále singlet dvou

acetátů při 2.43 ppm, singlet dvou H-31 při 2.43 ppm, multiplet H-2 při 3.13 – 3.36 ppm a multiplet NH při 5.68 – 5.88 ppm.

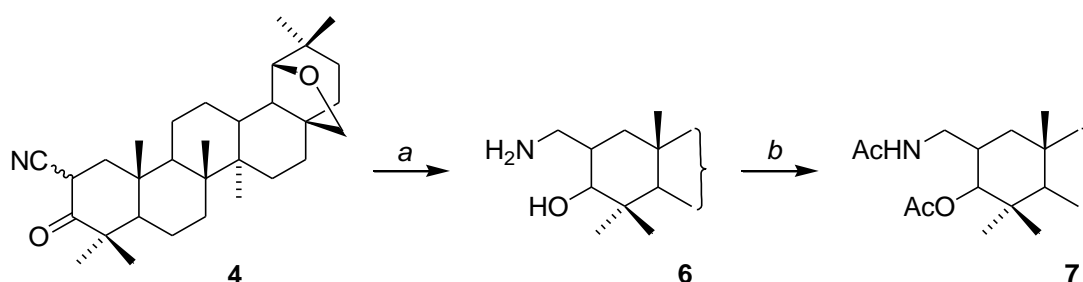


Schéma 12: *a*: LiAlH₄/THF (reflux); *b*: Ac₂O/AcOH (reflux)

3.5 2-azidoallobetulon (**8a**) a 2-aminoallobetulon-1(2)-en (**8b**)

2-azidoallobetulon (**8a**) byl získán modifikovaným způsobem¹⁹. Diastereomerní směs α a β epimerů 2-bromallobetulonu (**2c**) byla společně s azidem sodným rozpuštěna v NMP s přidavkem malého množství koncentrované kyseliny octové (Schéma 13). Po zpracování reakce byly izolovány bílé krystalky azidu (**8a**), které za laboratorní teploty spontánně eliminují molekulu dusíku za vzniku světle žlutých až oranžových krystalků stabilnějšího enaminoketonu **8b** (v IR spektru byl nalezen pás při 3340 cm⁻¹ náležící aminoskupině, TLC - R_f shodné s R_f preparátu **8b**⁵²). Značná odlišnost naměřené t.t. v porovnání s t.t. uvedenou v literatuře⁵² je pravděpodobně způsobena lyofilizací sloučeniny **8a** v citované práci.

Reakce prováděná za PTC katalýzy v dvojfázovém systému ethylacetát/voda při r.t. neproběhla.

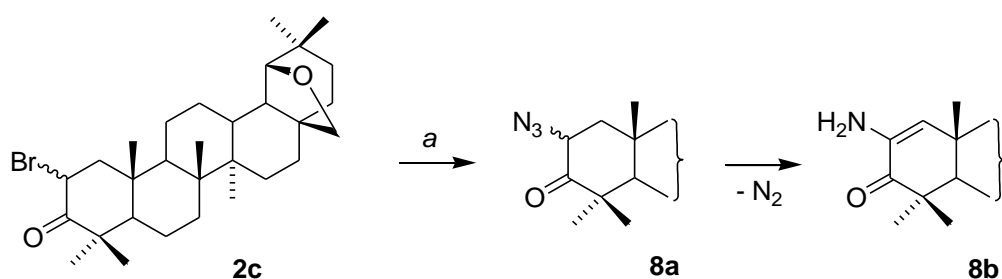


Schéma 13: *a*: NaN₃/NMP, AcOH

3.6 2-sulfanylallobetulon (9a) a allobetulon-1(2)-en (9b)

Jedním z úkolů, vytyčených na začátku této práce, byla syntéza 2-sulfanylallobetulonu (**9a**), který doposud nebyl popsán. Při experimentech vedených k jeho získání často docházelo ke vzniku komplikovaných reakčních směsí se čtyřmi až šesti produkty, které se od sebe nepodařilo rozdělit, anebo se při chromatografiích rozkládaly.

Výchozími sloučeninami byly vždy 2-bromallobetulon (**2c**) a sulfid sodný. Experimenty se lišily použitými rozpouštědly či směsmi rozpouštědel, množstvím ekvivalentů sulfidu sodného, použitím PTC, reakční teplotou a reakčním časem. Pouze v případě reakcí B a C, prováděných v DMSO s kapkou destilované vody při 75 °C a bez použití PTC, se z reakční směsi podařilo izolovat allobetulon-1(2)-en (**9b**), který je produktem vedlejší eliminační reakce (Schéma 14). V IR spektru byl nalezen pás valenční vibrace C=C při 1667 cm⁻¹ a pás karbonylu při 1728 cm⁻¹. V ¹H-NMR spektru byl kromě signálů obvyklých pro oleananový skelet nalezen dublet H-1 při 5.80 ppm a dublet H-2 při 7.14 ppm. Značná odlišnost naměřené t.t. ve srovnání s t.t. uvedenou v literatuře³⁴ je zřejmě způsobena stopami rozpouštědel nebo krystalově vázaným rozpouštědlem.

Výsledky jednotlivých experimentů jsou shrnuty v Tab. 1.

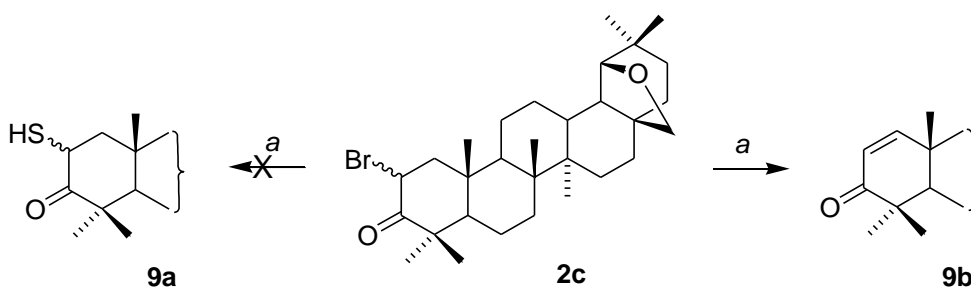


Schéma 14: a: např. Na₂S/DMSO, kapka vody (75 °C)

Tab. 1: Přehled reakcí 2-bromallobetulonů (**2c**) se sulfidem sodným

Experiment	Rozpouštědlo	Na ₂ S	PTC	Teplota	Čas	Pozn.
A	DMSO + kapka vody	66.5 ekv.	-	80 °C	24 h	Rozklad při chromatografii
B	DMSO + kapka vody	33.3 ekv.	-	75 °C	5.5 h	Eliminace
C	DMSO + kapka vody	5 ekv.	-	75 °C	24 h	Eliminace
D	DMSO + kapka vody	5 ekv.	Ano	75 °C	24 h	Rozklad při chromatografii
E	DMF + kapka vody	5 ekv.	-	80 °C	10 h	Směs 5 sloučenin
F	DMF + kapka vody	5 ekv.	Ano	80 °C	10 h	Směs 4 sloučenin
G	Et ₂ O	5 ekv.	-	r.t.	47 h	Směs 4 sloučenin
H	Et ₂ O	5 ekv.	Ano	r.t.	47 h	Směs 3 sloučenin
I	NMP	5 ekv.	-	r.t.	48 h	Směs 6 sloučenin
J	MeOH	5 ekv.	-	r.t.	48 h	Směs 6 sloučenin

Z provedených experimentů vyplývá, že použité rozpouštědlo či směs rozpouštědel hraje důležitou roli při tvorbě reakčních produktů co do jejich počtu a použití PTC v reakci umožňuje vznik jednodušší reakční směsi v porovnání s reakcí bez PTC. I přes snížení reakční teploty a zvýšení reakčního času se nepodařilo snížit počet reakčních produktů na přijatelnou mez. Průběh všech reakcí byl monitorován pomocí TLC (hexan:EtOAc, 5:1). I přes všechnu vynaloženou snahu se 2-sulfanylallobetulon (**9a**) nepodařilo připravit a izolovat z reakční směsi.

3.7 2-hydroxyethylsulfanylallobetulon (10), 2',3'-dihydro-1',4'-oxathiin 11a a diosfenol 11b

Po neúspěšných pokusech o přípravu 2-sulfanylallobetulonu (9a) bylo naší snahou připravit jiný lupanový derivát obsahující sirnou skupinu v poloze 2. Modifikovaným způsobem⁵³ byl z allobetulonu (2c) připraven 2-hydroxyethylsulfanylallobetulon (10), který je nestabilní a při čištění na sloupcové chromatografii eliminoval vodu, čímž došlo k jeho zacyklení a vzniku 2',3'-dihydro-1',4'-oxathiinu 11a (Schéma 15). Přeměna sloučeniny 10 na 11a byla prokázána analýzou spektrálních dat. V IR spektru surové sloučeniny 10 byl nalezen pás valenční vibrace C=C při 1654 cm⁻¹, dále slabý pás karbonylové skupiny při 1713 cm⁻¹ a široký pás valenční vibrace hydroxyskupiny při 3341 cm⁻¹, což svědčí o tom, že sloučenina 10 se vyskytuje převážně v enol formě. V MS surové sloučeniny byl navíc nalezen její molekulový ion. NMR spektra se nepodařilo interpretovat, protože surová sloučenina 10 obsahovala řadu nečistot a při pokusech o separaci přecházela na derivát 11a. V IR spektru preparátu 11a byl nalezen pás charakteristický pro C=C při 1655 cm⁻¹. Také v MS ES⁺ byl nalezen molekulový ion [M+H]⁺ o *m/z* 499 a [M+Na]⁺ o *m/z* 521 svědčící o uzavření cyklu. Pro úplné potvrzení struktury byly změřeny a plně interpretovány NMR spektra, včetně dvojdimenzionálních a bylo provedeno plné přiřazení všech signálů atomů H a C.

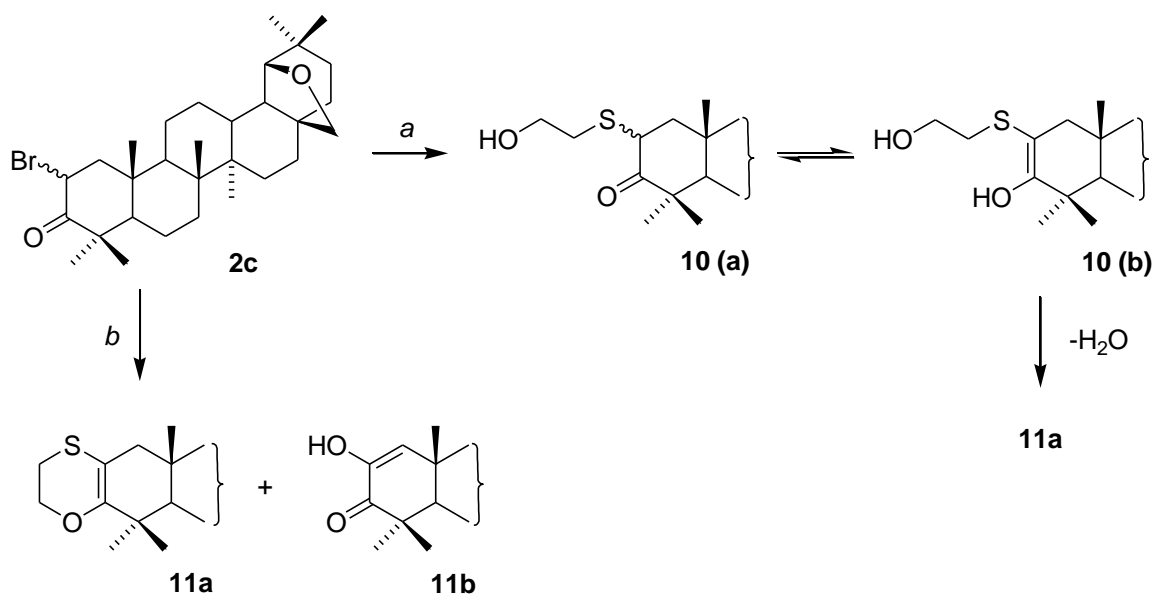


Schéma 15: *a*: merkaptoethanol (1000 ekv.), NaOH/bezvodý EtOH (0 °C → r.t.);
b: merkaptoethanol (1 ekv.), NaOH/anh. EtOH (0 °C → r.t.)

Ve druhém experimentu o nukleofilní substituci 2-bromallobetulon (2c) merkptoethanolem bylo použito ekvivalentní množství reaktantů. Po chromatografickém čištění surové reakční směsi byly získány dva hlavní produkty: diosfenol 11b (41 %), charakterizovaný již dříve³¹ a heterocyklus 11a (11 %). Rozdílná t.t. diosfenolu 11b naměřená v této práci a v literatuře³¹ je zřejmě způsobena použitím jiného krystalizačního rozpouštědla a tedy jinou krystalovou modifikací.

3.8 2-nitroallobetulon (12a), 2,2-dinitroallobetulon (12b), allobetulon-1(2)-en-3-acetát (12c)

Byly provedeny dva pokusy o přípravu 2-nitroallobetulon (12a) pomocí nukleofilní substituce, avšak ani jeden nevedl ke kýženému produktu (Schéma 16). V prvním experimentu byl po 48 h stále přítomen výchozí bromketon 2c, který jen částečně zreagoval na směs dvou produktů, které nebyly izolovány. Při druhém experimentu byla v reakční směsi po 48 h pozorována směs tří produktů, z toho jeden byl charakterizován jako produkt eliminace podle shodného R_f se sloučeninou 9b.

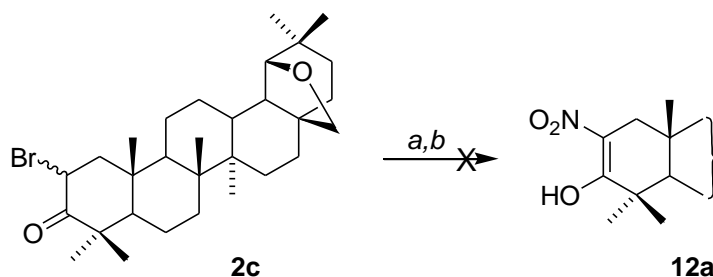


Schéma 16: a: NaNO₂, floroglucinol/DMSO; b: NaNO₂, PTC/DMSO

2-nitroallobetulon (12a) byl připraven až podle lit.¹⁶ nitrací allobetulinu (2a) suspendovaném v kyselině octové s kyselinou dusičnou (v poměru 2:1). Po zahřátí reakční směsi se allobetulin (2a) rozpustil, pozvolným ochlazením na r.t. se opět vysrážely drobné krystalky. Reakce byla míchána za r.t. ještě 5 h, a poté byla zpracována postupem uvedeným v lit.¹⁶ Byly získány a chromatograficky odděleny tři hlavní produkty: 2-nitroallobetulon (12a) 2,2-dinitroderivát 12b a allobetulon-1(2)-en-3-acetát (12c) (Schéma 17). NMR spektrum 2-nitroallobetulon (12a) je shodné se spektrem¹⁶ a ve shodě s literaturou se sloučenina vyskytuje v enolformě. Bylo zjištěno, že prodloužením reakční doby na 17 h je hlavním produktem nitrace acetát 12c. Rozdílná t.t. sloučeniny 12c naměřená v této práci a v literatuře²⁴ je pravděpodobně

způsobena použitím jiného krystalizačního rozpouštědla a tedy jinou krystalovou modifikací.

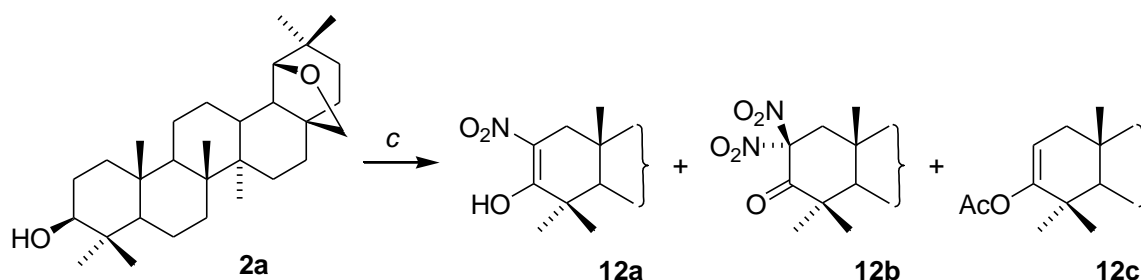


Schéma 17: a: HNO₃ (d = 1.35)/AcOH

3.9 2-aminoallobetulon (**13**), allobetulon-2-*N*-acetamid (**14**)

Redukcí 2-nitroallobetulonu (**12a**) zinkem za varu v kyselině octové byl připraven 2-aminoallobetulon (**13**), který se však v průběhu zpracování rozkládal a nebylo možné jej izolovat. Aby bylo zabráněno rozkladu vzniklého aminu **13**, byly provedeny experimenty vedoucí k ochraně jeho aminoskupiny *in situ* v reakční směsi. Ihned po redukcí 2-nitroderivátu **12a** zinkem byl zinek z reakční směsi odfiltrován a bylo přidáno acylační činidlo (acetanhydrid či sukcinanhydrid) a průběh reakce byl monitorován TLC (Schéma 18). Surový acetamid **14** byl z reakční směsi izolován po 1 h. V IR spektru sloučeniny **14** byl přítomen pás dvou karbonylů při 1677 a 1704 cm⁻¹ a pás NH skupiny při 3426 cm⁻¹. Také ¹H NMR spektrum potvrdilo přítomnost acetylů singletem při 2.00 ppm a vodíku z NH skupiny dubletem dubletu při 6.49 ppm.

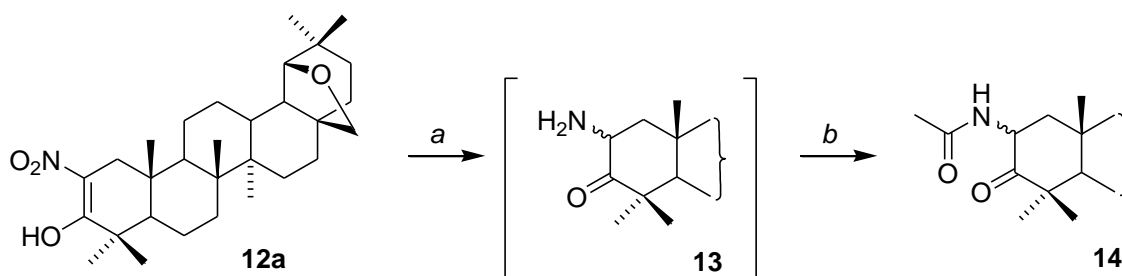


Schéma 18: a: Zn/AcOH (reflux); b: Ac₂O/AcOH

3.10 2-karbonitrildihydrobetulonová kyselina (15)

Pro přípravu 2-karbonitrildihydrobetulonové kyseliny (**15**) byl použit postup vyvinutý pro přípravu karbonitrilu **4** z bromderivátu **2c**. Po zpracování reakce (Schéma 19) byly získány bílé krystalky 2-karbonitrilu **15** (69 %). IR spektrum obsahovalo pás při 2234 cm^{-1} charakteristický pro nitrilovou skupinu. Struktura **15** byla potvrzena přiřazením všech signálů v 2D NMR spektrech.

V lit.⁵⁴ je uveden zcela odlišný postup přípravy karbonitrilu **15**, sloučenina však nebyla autory charakterizována zřejmě proto, že se jednalo pouze o meziprodukt ve vícekrokové reakci.

3.11 2-thiokyanatano-dihydrobetulonová kyselina (16)

2-thiokyanatandihydrobetulonová kyselina (**16**) byla připravena reakcí 2-bromdihydrobetulonové kyseliny (**3c**) a thiokyanatanu draselného v DMSO za varu (Schéma 19). Byl získán chromatograficky přečištěný 2-thiokyanoderivát **16** ve výtěžku 71 %. V IR spektru nalezen pás skupiny $\text{C}\equiv\text{N}$ při 2154 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ spektrum obsahovalo kromě signálů obvyklých pro lupanový skelet dublet dubletu H-1a při 1.89 ppm, dublet dubletu H-1b při 1.97 ppm a dublet dubletu H-2 při 4.71 ppm.

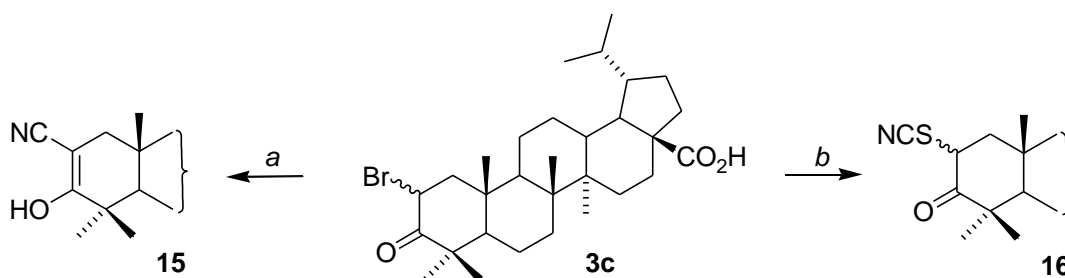


Schéma 19: *a*: NaCN/DMSO; *b*: KSCN/DMSO (reflux)

3.12 2-azidodihydrobetulonová kyselina (17)

Diastereomerní směs α a β epimerů 2-brombetulonové kyseliny (**3c**) byla spolu s azidem sodným ponechána reagovat v NMP při r.t (Schéma 20). Po 24 h byl dle TLC jediným produktem reakce azid **17**. I přes okamžité zpracování reakční směsi následované chromatografií se nepodařilo produkt reakce izolovat. Na základě TLC

jednotlivých frakcí bylo zjištěno, že se azid **17** při chromatografii na koloně rozkládá na řadu dalších sloučenin, které se od sebe nepodařilo oddělit.

3.13 2-sulfanyldihydrobetulonová kyselina (**18**)

Přestože se nepodařilo připravit thiol **9b** pokusili jsme se obdobnou reakci povést na lupanovém skeletu. Je totiž známo, že ve vzácných případech reakce nefungující u allobetulinu probíhají bez problémů na lupanových derivátech. Bromkyselina **3c** byla společně se sulfidem sodným rozpuštěna v NMP nebo methanolu (Schéma 20). Reakce sledovaná pomocí TLC proběhla za 90, respektive 120 min. Reakce byla standardně zpracována nalitím do 10x množství vody a produkt reakce byl extrahován do ethylacetátu. Odparek byl vždy čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Byly vystřídány tři směsi rozpouštědel (chloroform/methanol (100:1) s 0.1 % AcOH; toluen/ether (15:1) a chloroform/ ethylacetát (33:1)), avšak ani jednou z nich se nepodařilo thiol **18** vyčistit. Selhal také pokus o přečištění derivátu **18** na semipreparativním HPLC kvůli jeho nedostatečné rozpustnosti v reverzním systému rozpouštědel. V blízké budoucnosti je našim plánem vyzkoušet preparativní TLC nebo semipreparativní HPLC s normálními fázemi. Sloučenina **18** je špatně rozpustná v polárních i nepolárních rozpouštědlech a proto je její separace nesnadná, při chromatografiích bývá přítomna v mnoha frakcích spolu s nečistotami.

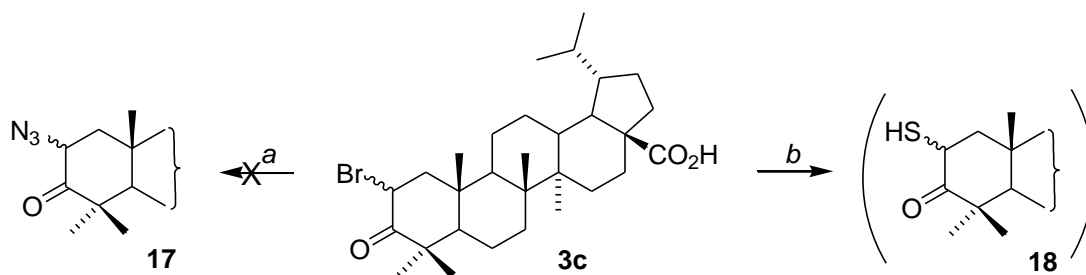


Schéma 20: *a*: NaN_3/NMP ; *b*: $Na_2S/MeOH$

4. Cytotoxická aktivita připravených sloučenin

Cytotoxická aktivita připravených sloučenin byla testována na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha Ph.D., v Laboratoři experimentální medicíny, Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, metodou MTT testu⁵⁵. Všechny připravené sloučeniny (s výjimkou derivátu **9**) byly nebo jsou *in vitro* testovány na vysoce chemosenzitivní buněčné linii T-lymfoblastické leukémie CCRF/CEM a dále na panelu sedmi nádorových buněčných linií odvozených od různých solidních i hematologických tumorů zahrnujících plicní (A549), střevní (HCT116) a myeloidní leukémické (K562) rakovinné buněčné linie, včetně MDR linií. Abychom zjistili terapeutický index, byla změřena cytotoxická aktivita připravených derivátů i na dvou kontrolních nenádorových buněčných liniích fibroblastů (BJ a MRC-5).

Terapeutický index je poměrem cytotoxické aktivity na normální/nádorové buněčné linii a měl by být vyšší než 10.

Deriváty s hodnotou $IC_{50} \geq 100 \mu\text{mol/l}$ u nádorových buněčných linií jsou považovány za zcela neúčinné.

Výsledky jsou shrnuty v Tab. 2 a okomentovány v Závěru diplomové práce.

Tab. 2: Výsledky měření cytotoxické aktivity připravených sloučenin na panelu osmi nádorových a dvou nenádorových buněčných liniích.

Sloučenina	CCRF/CEM	CEM-DNR	A549	HCT116	HCT116p53--	K562	K562-TAX	U2OS	BJ	MRC-5
2c	5.2 ± 0.8	53.7 ± 3.3	69.9 ± 4.2	21.5 ± 2.7	22.8 ± 1.3	11.7 ± 2.2	7.5 ± 1.5	47.5 ± 3.2	86.0 ± 6.4	75.8 ± 16.8
3c	3.1 ± 0.5	15.6 ± 2.3	15.2 ± 1.6	1.0 ± 0.2	5.2 ± 0.7	0.7 ± 0.2	5.1 ± 1.3	10.0 ± 2.2	21.8 ± 1.5	8.0 ± 1.1
4	100	67.2 ± 10.6	98.6 ± 2.2	81.7 ± 11.8	100	100	43.3 ± 1.9	98.2 ± 2.9	128.5 ± 29.1	150
8	5.5 ± 0.3	47.5 ± 10.6	53.0 ± 6.6	20.5 ± 2.8	16.6 ± 0.9	11.7 ± 3.9	18.2 ± 0.8	21.0 ± 11.9	23.3 ± 4.5	19.7 ± 2.8
9b	48.4 ± 4.9	82.6 ± 11.8	98.0 ± 3.1	49.9 ± 4.9	72.0 ± 2.4	59.0 ± 14.3	54.8 ± 1.9	100	99.3 ± 27.6	83.3 ± 21.8
11a	68.2 ± 2.4	85.7 ± 7.0	95.1 ± 5.5	74.4 ± 13.0	100	100	60.5 ± 5.6	100	146.6 ± 3.5	128.4 ± 38.5
11b	13.1 ± 1.1	59.5 ± 1.9	62.3 ± 3.8	41.6 ± 3.6	33.4 ± 5.9	16.9 ± 1.4	45.3 ± 1.0	45.8 ± 6.2	69.7 ± 8.5	25.4 ± 7.1
12a	47.9 ± 4.8	81.2 ± 0.8	100	69.3 ± 15.7	95.2 ± 2.1	69.2 ± 9.1	52.7 ± 5.9	96.1 ± 6.0	140.8 ± 22.5	150
12b	100	90.1 ± 3.7	100	95.4 ± 7.3	100	100	61.7 ± 2.1	100	150	150
12c	87.5 ± 8.4	68.1 ± 9.9	77.3 ± 7.3	65.2 ± 16.2	100	100	55.7 ± 2.6	94.5 ± 5.7	150	150
14	32.2 ± 5.7	62.6 ± 4.2	53.9 ± 4.0	42.9 ± 4.2	38.7 ± 7.0	32.4 ± 5.3	50.9 ± 6.6	67.5 ± 21.9	57.8 ± 10.2	21.6 ± 4.1
15	10.1 ± 1.9	33.7 ± 6.7	14.4 ± 4.0	10.0 ± 1.0	10.6 ± 0.5	5.8 ± 1.9	15.1 ± 1.9	31.2 ± 4.1	15.5 ± 3.5	2.6 ± 1.4
16	0.9 ± 0.1	14.5 ± 0.5	12.5 ± 1.6	3.5 ± 1.0	3.4 ± 0.4	3.4 ± 0.3	5.4 ± 1.3	15.1 ± 2.8	5.8 ± 0.5	4.6 ± 0.7

ZÁVĚR

1. Byly připraveny známé oleananové a lupanové deriváty s polární skupinou na A kruhu.
2. Byla připravena série nových oleananových derivátů s polární skupinou na A kruhu.
3. Byly optimalizovány reakce vedoucí k syntéze nových lupanových derivátů s polární skupinou na A kruhu.
4. Byla prozkoumána možnost přípravy 2-substituovaných triterpenů s pomocí PTC katalyzátoru. Bylo zjištěno, že ve většině případů nemá PTC katalyzátor na průběh reakce vliv či reakce za podmínek vhodných pro PTC neprobíhá. Výjimkou byly reakce 2-bromallobetulonů (**2c**) se sulfidem sodným, kde docházelo ke vzniku jednodušších reakčních směsí v porovnání s reakcemi bez PTC.
5. V rámci této práce bylo připraveno a spektrálními daty potvrzeno 18 sloučenin, včetně výchozích derivátů, z toho 8 doposud nepopsaných: **4**, **5**, **6**, **7**, **10**, **11a**, **14** a **16**. Řada sloučenin byla připravena jako směs dvou epimerů, které od sebe nebyly separovány.
6. Všechny nově připravené i již dříve známé sloučeniny, včetně výchozích bromderivátů **2c** a **3c**, byly nebo právě jsou testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu na lidské T-lymfoblastické leukémii CEM a panelu dalších nádorových i nenádorových buněčných liniích. Výjimku tvoří sirný derivát **10**, který se sice podařilo charakterizovat, ale ne dostatečně přečistit pro biologické testování.
7. Bylo zjištěno, že substituce v poloze 2 má velký vliv na cytotoxickou aktivitu připravených sloučenin. Deriváty allobetulinu **2a** bývají obecně považovány za zcela neaktivní. Překvapivým zjištěním proto byla nízká až střední aktivita většiny těchto derivátů. Zcela neaktivními byly pouze karbonitril **4** a dinitroderivát **11b**. Zajímavou cytotoxickou aktivitu, srovnatelnou s výchozím bromderivátem **2c**, měl na CCRF/CEM linii již známý azidoderivát **8** ($IC_{50} = 5.5 \mu\text{mol/l}$). Vysoké aktivity ($< 10 \mu\text{mol/l}$ na CCRF/CEM linii) pak byly pozorovány u obou nově testovaných derivátů dihydrobetulonové kyseliny (**3c**): nitrilu **15** i thiokyanatanu **16**. Thiokyanatan **16** byl shledán jako nejvíce aktivní sloučenina celého setu změřených

derivátů ($IC_{50} = 0.9 \mu\text{mol/l}$), který však dosahuje vysokých cytotoxických hodnot i na nenádorových buněčných liniích, proto disponuje jen nízkým terapeutickým indexem.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

OBECNÉ POZNÁMKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Teploty tání byly vymezeny na bodotávku PHMK 78/1586 (VEB Analytik Dresden) a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet iZ10 (Thermo Scientific), střední oblast v rozsahu 400 – 4000 cm^{-1} , a byla zpracována v programu OMNIC 8.3.

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL (500 MHz) za laboratorní teploty (21 °C) v roztoku CDCl_3 . Pro ^1H NMR spektra byl použit jako vnitřní standard tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00$ ppm. Hodnoty chemických posunů (v ppm) a interakčních konstant (v Hz) byly určeny pomocí analýzy prvního řádu. Hodnoty chemických posunů byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, interakční konstanty byly zaokrouhleny na jedno desetinné místo. Data byla zpracována v programu JEOL Delta v5.0.2.

Hmotnostní spektra byla měřena na Aquity UPLC-MS (Waters) s PDA detektorem v roztoku MeOH.

Průběh reakcí a čistota vzorků byly sledovány pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (254 nm), a poté postříkem 10% kyselinou sírovou a zahřáním na 110 - 200 °C.

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií (vždy uvedeny u experimentu):

- A PhMe / Et₂O 20:1 (obj.)
- B CHCl_3 / EtOAc 20:1 (obj.)
- C hexan / EtOAc 5:1 (obj.)
- D hexan / EtOAc 1:1 (obj.)
- E PhMe / Et₂O 20:1 (obj.) + kapka AcOH
- F PhMe / Et₂O 5:1 (obj.) + kapka AcOH

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Silikagel 60, high-purity grade, 40 – 63 μm (Fluka). Mobilní fáze jsou uvedeny vždy u experimentu.

K odpařování rozpouštědel byla použita RVO Rotovapor R-210 (Büchi).

Cytotoxická aktivita byla testována na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha, Ph.D. v Laboratoři experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci formou MTT testu.

Obecné postupy zpracování reakcí

A Reakční směs byla nalita do desetinásobného objemu vody, a poté byla extrahována do organického rozpouštědla. Spojené organické podíly byly promyty vodou, rozpouštědla byla odpařena na RVO.

B Reakční směs byla nalita do dvojnásobného objemu vody, a poté byla extrahována do toluenu. Spojené toluenové fáze byly promyty vodou, rozpouštědla byla odpařena na RVO.

C Reakční směs byla nalita do dvojnásobného objemu 5% kyseliny octové, a poté byla extrahována ethylacetátem. Spojené organické podíly byly promyty vodou, rozpouštědla byla odpařena na RVO.

1. Příprava allobetulonů (2b)

Do roztoku allobetulinu (**2a**) (30 g; 67.7 mol) v chloroformu (240 ml) byl za chlazení ledovou lázní přidán TEACC (130 ml). Po 6 h míchání při r.t. byla reakce ukončena přidáním ethyletheru (360 ml) do reakční směsi. Vzniklá hnědá sraženina byla oddělena. Reakční směs byla dále zfiltrována na koloně plněné fluorisilem a dosucha odpařena. Bylo získáno 28.2 g (94 %) bílých krystalků allobetulonů (**2b**). ¹H NMR spektrum bylo shodné se spektrem autentického preparátu.

2. Příprava 2-bromallobetulonů (2c)

Do roztoku allobetulonů (**2b**) (6.4 g; 14.5 mmol) v chloroformu (100 ml) byl za stálého míchání přikapán roztok bromu (0.66 ml; 12.8 mmol) v chloroformu (22.34 ml). Reakce sledovaná pomocí TLC (mobilní fáze A) proběhla při r.t. za 35 min.

Reakční směs byla zpracována postupem A. Surový bromderivát **2c** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl toluen/ether 20:1. Byly získány světle žluté krystalky 2-bromallobetulonů (**2c**) (4.9 g; 65 %). ¹H NMR spektrum bylo shodné se spektrem autentického preparátu.¹⁴

3. Příprava 2-bromdihydrobetulonové kyseliny (3c)

Do roztoku dihydrobetulonové kyseliny (**3b**) (2.0 g; 4.4 mmol) v chloroformu (32 ml) byl za stálého míchání přikapán roztok bromu (0.23 ml; 4.5 mmol) v chloroformu (7.67 ml). Reakce proběhla dle TLC (mobilní fáze B) za 30 min při r.t. Reakční směs byla zpracována postupem A.

Surová bromkyselina **3c** byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl toluen/ether 10:1. Byl získán bílý prášek 2-bromdihydrobetulonové kyseliny (**3c**) (2.3 g; 98 %). ¹H NMR spektrum bylo shodné se spektrem autentického preparátu.¹⁴

4. Příprava allobetulon-2β-karbonitrilu (4)

2-bromallobetulon (**2c**) (2.0 g; 3.3 mmol) byl rozpuštěn v DMSO (100 ml) a do směsi byl přidán kyanid sodný (328 mg; 6.7 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C). Reakce byla po 24 h míchání při r.t. zpracována postupem B.

Surový nitril **4** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, gradientově toluen toluen/ether 10:1. Spojením frakcí a odpařením rozpouštědel byl získán chromatograficky jednotný karbonitril **4** (700 mg; 45 %), bílé krystalky o t.t. 268 – 270 °C (cyklohexan). IR: 1030 (C-O), 1738 (C=O), 2245 (C≡N). ¹H NMR spektrum: 0.79 s, 3H; 0.88 s, 3H; 0.92 s, 3H; 0.92 s, 3H, 0.94 s, 3H; 0.96 s, 3H; 1.06 s, 3H (7×CH₃); 1.66 dd, 1H, (J₁ = 14.3 Hz, J₂ = 3.4 Hz, H-1a); 2.30 dd, 1H, (J₁ = 15.5 Hz, J₂ = 2.3 Hz, H-1b); 3.43 d, 1H, (J = 8.0 Hz, H-28a); 3.51 s, 1H (H-19); 3.67 t, 1H (H-2); 3.75 d, 1H, (J = 8.0 Hz, H-28b).

5. Příprava allobetulon-2-thiokyanatanu (5)

Do roztoku 2-bromallobetulon (**2c**) (500 mg; 1.0 mmol) v DMSO (25 ml) byl přidán thiokyanatan draselný (390 mg; 4.8 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Reakce byla po 2 h míchání za varu zpracována postupem A.

Surový thiokyanatan **5** byl rekrystalizován ze směsi rozpouštědel chloroform/hexan, čímž bylo získáno 426 mg (89 %) krystalů o t.t. 214 – 216 °C (CHCl₃/hexan). IR spektrum: 1036 (C-O), 1707 (C=O), 1723 (C=O), 2153 (C≡N). ¹H NMR spektrum: 0.79 s, 3H; 0.80 s, 3H; 0.90 s, 3H; 0.93 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.96 s, 3H; 1.03 s, 3H (7×CH₃); 1.98 – 2.19 m, 1H (H-1a); 2.48 – 2.75 m, 1H (H-1b); 3.44 d, 1H (J = 8.0 Hz, H-28a); 3.52 s, 1H (H-19); 3.76 d, 1H (J = 8.0 Hz, H-28b); 4.70 – 4.74 m, 1H (H-2α,β). ¹³C NMR spektrum: viz Tab. 3. MS ESI⁺ *m/z* (%) [pro C₃₁H₄₇NO₂S: M⁺ = 497]: 472 [M-CN+H]⁺ (100); 515 [M+H₂O]⁺ (30).

6. Příprava 2-aminomethylenallobetulin (6)

Směs allobetulon-2-nitrilu **4** (100 mg; 0.22 mmol) a LiAlH_4 (107 mg; 3.21 mmol) byla rozpuštěna v THF (10 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C). Reakce byla po 2 h míchání za varu ochlazena na r.t. Do reakční směsi bylo přidáno 0.5 ml EtOAc, 0.5 ml MeOH a 1 ml 10% HCl. Reakční směs byla zfiltrována a zpracována postupem A.

Surový amin **6** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byla směs rozpouštědel hexan/EtOAc 5:1 s gradientem EtOAc na 50 %, poté došlo ke změně složení mobilní fáze na $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:1 s gradientem MeOH na 33 %. Byl získán bílý aminoallobetulin **6** (83 mg; 82 %) o t.t. 108 – 109 °C ($\text{CHCl}_3/\text{hexan}$). IR spektrum: 1035 (C-O), výrazný pás 3000 – 3600 (NH, OH). ^1H NMR spektrum: 0.79 s, 3H; 0.83 s, 3H; 0.89 s, 3H; 0.90 s, 3H; 0.90 s, 3H; 0.92 s, 3H; 0.97 s, 3H ($7 \times \text{CH}_3$); 1.72 – 1.78 m, 1H (H-2); 2.18 d, 1H ($J = 13.5$ Hz, H-1a); 2.57 d, 1H ($J = 13.0$ Hz, H-1b); 2.80 bs, 2H (NH_2); 2.80 d, 1H ($J = 13.5$ Hz, H-31a); 2.98 d, 1H ($J = 13.5$ Hz, H-31b); 3.10 – 3.31 m, 1H (H-3); 3.43 d, 1H ($J = 8$ Hz, H-28a); 3.51 s, 1H (H-19); 3.76 d, 1H ($J = 7$ Hz, H-28b). MS ESI^+ m/z (%) [pro $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{NO}_2$: $\text{M}^+ = 471$]: 472 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (100).

7. Příprava 2-acetamidomethylenallobetulin-3-acetátu (7)

Směs allobetulon-2-nitrilu **4** (200 mg; 0.43 mmol) a LiAlH_4 (214 mg; 6.43 mmol) byla rozpuštěna v THF (15 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C). Reakce byla po 30 min míchání za varu ochlazena na r.t. Do reakční směsi byl přidán 1 ml EtOAc, 1 ml MeOH a 2 ml 10% HCl. Reakční směs byla zfiltrována a zpracována postupem A. Po odpaření bylo získáno 267 mg surového aminoderivátu **6**.

Do roztoku 76% aminoderivátu **6** (100 mg; 0.16 mmol) v kyselině octové byl přidán acetanhydrid (3 ml; 31.74 mol). Reakční směs byla míchána za varu 30 min, a poté byla zpracována postupem A. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze D).

Surový acetamid **7** (77 mg) byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byla směs rozpouštědel hexan/EtOAc 1:1 s gradientem EtOAc až na 100 %, poté došlo ke změně složení mobilní fáze na $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:1. Byly získány krystalky acetamidu **7** (50 mg; 56 %) o t.t. 144 – 145 °C ($\text{CHCl}_3/\text{hexan}$). IR spektrum:

1035 (C-O), 1658 (C=O), 1723 (C=O), 3311 (NH). ^1H NMR spektrum: 0.79 s, 3H; 0.86 s, 3H; 0.87 s, 3H; 0.88 s, 3H; 0.90 s, 3H; 0.91 s, 3H; 0.95 s, 3H ($7 \times \text{CH}_3$); 1.84 s, 2H (H-1); 2.02 s, 6H ($2 \times \text{Ac}$); 2.43 s, 2H (H-31); 3.13 – 3.36 m, 1H (H-2); 3.42 d, 1H ($J = 8.0$ Hz, H-28a); 3.50 s, 1H (H-19); 3.75 d, 1H ($J = 7.0$ Hz, H-28b); 3.79 – 3.85 m, 1H (H-3); 5.68 – 5.88 m, 1H (NH). ^{13}C NMR spektrum: viz Tab. 3. MS ESI⁺ m/z (%) [pro $\text{C}_{35}\text{H}_{57}\text{NO}_4$: $\text{M}^+ = 555$]: 496 [M-AcO]⁺ (100), 1028 [$2\text{M}+\text{H}_2\text{O}$]⁺ (45). MS ESI⁻ m/z (%): 572 [$\text{M}+\text{H}_2\text{O}-\text{H}$]⁻ (100).

8. Příprava 2-azidoallobetulonů (8a)

Bromderivát **2c** (100 mg; 0.193 mmol) byl rozpuštěn v NMP (3 ml) s kapkou kyseliny octové, do reakční směsi byl přidán azid sodný (75 mg; 1.154 mmol). Reakce proběhla při r.t. za 30 min, její průběh byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C).

Po zpracování reakční směsi postupem A byl získán světle žlutý medovitý produkt, který byl krystalizován přidávkem cyklohexanu a vysušen pod proudem dusíku. Byly získány bílé krystalky azidu **8a** (24 mg; 26 %) o t.t. 152 – 154 °C. Lit.⁵² uvádí t.t. 94 – 97 °C (lyofilizát z benzenu). ^1H NMR spektrum bylo shodné se spektrem preparátu z lit.⁵²

9. Reakce bromderivátu 2c se sulfidem sodným

Bromderivát **2c** (200 mg; 0.385 mmol) byl rozpuštěn v DMSO (10 ml) s kapkou vody a do reakční baňky byl přidán sulfid sodný (1 g; 12.820 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C). Po 5.5 h byl výchozí bromderivát **2c** již úplně spotřebován a v reakční směsi byly dle TLC přítomny 3 sloučeniny. Reakční směs byla po 5.5 h míchání při 75 °C zpracována postupem A a bylo získáno 165 mg surové směsi po odpaření.

Hlavním produktem, který se podařilo izolovat, byl allobetulon-1(2)-en (**9b**) s příměsí dalších dvou neidentifikovaných látek, ten byl krystalizován ze směsi dichlormethanu a methanolu, směsné krystaly byly sušeny pod proudem dusíku (78 mg). Allobetulon-1(2)-en (**9b**) byl dále čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl hexan/EtOAc 10:1. Odpařením ze směsi rozpouštědel hexan/EtOAc byl získán allobetulon-1(2)-en (**9b**) (13 mg; 7.7 %) o t.t. 196 – 198 °C. Lit.³⁴ uvádí t.t. 249 – 251 °C. ^1H NMR spektrum bylo shodné se spektrem preparátu

z lit.³⁴ Ostatní produkty se izolovat nepodařilo, jedná se o polární látky a dle TLC nejspíš došlo k jejich dalšímu rozkladu při zpracování nebo chromatografii.

10. Reakce s merkaptoethanolem (I)

Dehydratace 2-ethanolsulfanylallobetulonů (10)

Směs hydroxidu sodného (3.9 g; 0.095 mmol), merkaptoethanolu (6.84 ml; 0.097 mol) a bezvodého ethanolu (1 ml) byla míchána při r.t. dokud nevznikl roztok. Roztok byl ochlazen ledovou lázní na 0 – 5 °C, poté byl do roztoku pozvolna přidáván bromderivát **2c** (50 mg; 0.096 mmol). Vodní lázeň byla odstraněna a reakční směs se nechala míchat při r.t. 5 dní. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C). Reakční směs byla zpracována postupem A.

Po odpaření větší části rozpouštědel vznikly 2 denním stáním odparku v digestoři krystaly 2-ethanolsulfanylallobetulonů (**10**) (81 mg) IR spektrum: 1033 (C-O), 1654 (C=C), 3341 (OH). HRMS (FAB) [pro C₃₂H₅₀O₃NaS: M⁺ 537]: vypočteno 537.3373, nalezeno 537.3371. Byl učiněn pokus o přečištění 40 mg krystalků sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl hexan/EtOAc 30:1, ale došlo k dehydrataci a uzavření šestičlenného cyklu, byla získána čistá sloučenina **11a** (17 mg; 36 %). Spektrální data jsou uvedena u experimentu níže.

11. Reakce s merkaptoethanolem (II)

Příprava heterocyklu 11a a diosfenolu 11b

Směs hydroxidu sodného (79 mg; 1.927 mmol), merkaptoethanolu (135 µl; 1.927 mmol) a bezvodého ethanolu (10 ml) byla míchána při r.t. dokud nevznikl roztok. Roztok byl ochlazen ledovou lázní na 0 – 5 °C, poté byl do roztoku pozvolna přidáván bromderivát **2c** (850 mg; 1.638 mmol). Vodní lázeň byla odstraněna a reakční směs se nechala míchat při r.t. 3 dny. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C). Reakční směs byla zpracována postupem A.

Směs produktů byla rozdělena chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl hexan/EtOAc 10:1 s gradientem EtOAc až po 100% EtOAc. Byly získány bílé krystalky heterocyklu **11a** (89 mg; 11 %) o t.t. 269 – 271 °C (cyklohexan). IR spektrum: 1034 (C-O), 1655 (C=C). ¹H NMR spektrum: 0.79 s, 3H (H-29), 0.90 s, 3H (H-27), 0.92 s, 3H (H-30), 0.92 m, 1H (H-12a), 0.93 s, 6H (H-24,26), 0.98 s, 3H (H-25), 1.04 s, 3H (H-23),

1.13 m, 1H (H-15a), 1.17 m, 1H (H-5), 1.20 dd, 1H ($J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-16a), 1.27 m, 1H (H-7a), 1.28 m, 1H (H-11a), 1.30 m, 1H (H-a), 1.30 tt, 1H ($J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 3.7$ Hz, H-21a), 1.38 m, 1H (H-9), 1.40 m, 1H (H-6b), 1.42 m, 1H (H-7b), 1.43 m, 1H (H-16b), 1.44 m, 1H (H-12b), 1.45 m, 1H (H-11b), 1.46 m, 1H (H-22b), 1.46 mm, 2H (H-13,18), 1.52 dd, 1H ($J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-21b), 1.63 m, 1H (H-15b), 1.79 d, 1H ($J = 15.2$ Hz, H-1a), 1.87 d, 1H ($J = 15.2$ Hz, H-1b), 2.92 dq, 1H ($J_1 = 12.8$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, H-31a), 3.04 m, 1H (H-31b), 3.36 m, 1H (H-6a), 3.43 d, 1H ($J = 7.8$ Hz, H-28a), 3.52 m, 1H (H-19), 3.77 d, 1H ($J = 7.8$ Hz, H-28b), 4.06 m, 1H (H-32a), 4.27 m, 1H (H-32b). ^{13}C NMR spektrum: viz Tab. 3. MS ESI⁺ m/z (%) [pro $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_2\text{S}$: $\text{M}^+ = 498$]: 499 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (65); 521 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (100); 1019 [$2\text{M}+\text{Na}$]⁺ (45).

Byl získán bílý diosfenol **11b** (304 mg; 41 %) 204 – 206 °C (cyklohexan). Lit.³¹ uvádí t.t. 231.5 – 233 °C ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$). ^1H NMR spektrum bylo shodné se spektrem preparátu z lit.³¹

12. Příprava 2-nitroallobetulonů (12a), 2,2-dinitroallobetulonů (12b) a allobetulon-1(2)-en-3-acetátu (12c)

Allobetulin (**2a**) (500 mg; 1.129 mmol) byl rozpuštěn v kyselině octové (10 ml) při 80 °C. Pozvolným ochlazením na r.t. se opět vysrážely drobné krystalky výchozí sloučeniny. Do reakční směsi byla za stálého míchání přikapána 58% kyselina dusičná (5 ml). Reakční směs byla míchána za r.t. ještě 5 h, a poté byla zpracována postupem A. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C).

Směs nitroderivátu **12a**, dinitroderivátu **12b** a acetátu **12c** byla dělena sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl dichlormethan. Frakce obsahující čistý nitroderivát **12a** nebo dinitroderivát **12b** byly spojeny a dosucha odpařeny. Byly získány třpytivě bílé krystalky 2-nitroallobetulonů (**12a**) (111 mg; 20 %) o t.t. 236 – 238 °C (odpařeno z dichlormethanu). Lit.¹⁶ uvádí t.t. 235.8 °C. ^1H NMR spektrum bylo shodné se spektrem preparátu z lit.¹⁶

Byly získány bílé krystalky 2,2-dinitroderivát (**12b**) (109 mg; 18 %) o t.t. 212 – 213 °C (odpařeno z dichlormethanu). Lit.¹⁶ uvádí t.t. 202.4 °C. ^1H NMR spektrum bylo shodné se spektrem preparátu z lit.¹⁶

Prodloužením reakční doby na 17 h byl hlavním produktem identické reakce allobetulon-1(2)-en-3-acetát (**12c**) (74 mg; 14 %) o t.t. 287 °C (odpařeno z dichlor-

methanu). Lit.²⁴ uvádí t.t. 262 – 264 °C (EtOH/CHCl₃). ¹H NMR spektrum bylo shodné se spektrem preparátu z lit.²⁴

13. Příprava allobetulon-2-*N*-acetamidu (**14**)

K roztoku 2-nitroallobetulonou (**9a**) (100 mg; 0.206 mmol) v kyselině octové (6 ml) byl přidán zinkový prach (133 mg; 2.046 mmol). Reakční směs byla zahřívána k varu po dobu 10 - 45 min (uvedeno u jednotlivých reakcí), a poté ještě 15 min míchána. Redukce byla po 10 min varu ukončena odfiltrováním zinku z reakční směsi. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze C). Do reakční baňky byl přidán acetanhydrid (3 ml; 31.737 mmol). Acylace sledovaná pomocí TLC (mobilní fáze D) proběhla při r.t. do 1 h. Reakční směs byla zpracována postupem A.

Spojené surové produkty dvou reakcí byly čištěny chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl hexan/EtOAc 1:1. Acetamidové frakce byly spojeny a odpařeny. Byl získán bílý prášek allobetulon-2-*N*-acetamidu (**14**) (87 mg; 47 %) o t.t. 230 – 232 °C (cyklohexan). IR spektrum: 1033 (C-O), 1677 (C=O), 1704 (C=O), 3426 (NH). ¹H NMR spektrum: 0.77 s, 3H; 0.79 s, 3H; 0.86 s, 3H; 0.91 s, H; 0.91 s, 3H; 0.93 s, 3H; 1.01 s, 3H (7× CH₃); 1.80 – 1.83 m, 1H (H-1a); 2.00 s, 3H (Ac); 2.57 – 2.62 m, 1H (H-1b); 3.42 d, 1H (J = 8 Hz, H-28a); 3.50 s, 1H (H-19); 3.74 d, 1H (J = 8 Hz, H-28b); 4.08 – 4.96 m, 1H (H-2α,2β); 6.49 dd, 1H (J₁ = 75 Hz, J₂ = 5.5 Hz, NH). ¹³C NMR spektrum: viz Tab. 3. MS ESI⁺ *m/z* (%) [pro C₃₂H₅₁NO₃: M⁺ = 497]: 498 [M+H]⁺ (100); 996 [2M+H]⁺ (18). MS ESI⁻ *m/z* (%): 496 [M-H]⁻ (100).

14. Příprava 2-karbonitrildihydrobetulonové kyseliny (**15**)

Do roztoku 2-bromdihydrobetulonové kyseliny (**3c**) (150 mg; 0.280 mmol) v DMSO (10 ml) byl přidán kyanid sodný (69 mg; 1.408 mmol). Reakční směs byla míchána za r.t. 4 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze E). Reakční směs byla zpracována postupem C.

Surový produkt **15** (136 mg) byl rekrystalizován z cyklohexanu a čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byla směs rozpouštědel PhMe/Et₂O/AcOH v poměru 100:10:1. Frakce obsahující produkty byly spojeny a dosucha odpařeny. Byly získány bílé jehlicovité krystalky 2-karbonitrildihydrobetulonové kyseliny (**15**) (93 mg; 69 %) o t.t. 222 – 224 °C (CHCl₃/hexan). IR

spektrum: 1684 (C=O), 1737 (C=O), 2235 (C≡N), 2500-3100 (OH). ¹H NMR spektrum: 0.75 m, 1H (H-5); 0.75 d, 3H (J = 6.9 Hz, H-30); 0.85 d, 3H (J = 6.9 Hz, H-29); 0.89 s, 3H (H-26); 0.92 s, 3H (H-27); 0.94 s, 3H (H-25); 1.05 s, 3H (H-24), 1.15 tt, 1H (J₁ = 11.6 Hz, J₂ = 3.2 Hz, H-15a); 1.17 m, 1H (H-12a); 1.20 m, 1H (H-9); 1.25 tt, 1H (J₁ = 13.5 Hz, J₂ = 3.3 Hz, H-22a); 1.29 m, 1H (H-1a); 1.33 m, 1H (H-18); 1.33 mm, 2H (H-11a,16a); 1.33 s, 3H (H-23); 1.35 mm, 4H (H-6,7); 1.44 m, 1H (H-11b); 1.45 m, 1H (H-15b); 1.47 m, 1H (H-21a); 1.58 m, 1H (H-21b); 1.67 m, 1H (H-12b); 1.78 qd, 1H (J₁ = 6.9 Hz, J₂ = 2.6 Hz, H-20); 1.87 m, 1H (H-22b); 2.17 m, 1H (H-13); 2.21 dd, 1H (J₁ = 11.6 Hz, J₂ = 3.2 Hz, H-16b); 2.22 m, 1H (H-19); 2.25 td, 1H (J₁ = 15.6 Hz, J₂ = 2.5 Hz, H-1b); 3.66 m, 1H (H-2). ¹³C NMR spektrum: viz Tab. 4.

15. Příprava 2-thiokyanatanodihydrobetulonové kyseliny (16)

Do roztoku 2-bromdihydrobetulonové kyseliny (**3c**) (150 mg; 0.280 mmol) v DMSO (10 ml) byl přidán thiokyanatan draselný (181 mg; 2.243 mmol). Reakční směs byla míchána při 80 °C 23 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze E). Reakční směs byla zpracována postupem A.

Surový thiokyanoderivát **16** (135 mg) byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byla směs rozpouštědel PhMe/Et₂O/AcOH v poměru 100:10:1. Frakce obsahující **16** byly spojeny a dosucha odpařeny. Byly získány bílé krystalky 2-thiokyanodihydrobetulonové kyseliny (**16**) (102 mg; 71 %) o t.t. 190 – 192 °C (CHCl₃/hexan). IR spektrum: 1685 (C=O), 1712 (C=O), 2154 (C≡N), 2471 – 3196 (OH). ¹H NMR spektrum: 0.76 d, 3H (J = 6.5 Hz); 0.79 s, 3H; 0.85 d, 3H (J = 7.0 Hz); 0.91 s, 3H; 0.99 s, 3H; 1.09 s, 3H; 1.15 s, 3H (7× CH₃); 1.89 dd, 1H (J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 7.5 Hz, H-1a); 1.97 dd, 1H (J₁ = 13.5 Hz, J₂ = 8.5 Hz, H-1b); 4.71 dd, 1H (J₁ = 11.5 Hz, J₂ = 8.5 Hz, H-2). ¹³C NMR spektrum: viz Tab. 4. ESI⁺ *m/z* (%) [pro C₃₁H₄₇NO₃S: M⁺ = 513]: 514 [M+H]⁺ (28). MS ESI⁻ *m/z* (%): 512 [M-H]⁻ (100); 1026 [2M-H]⁻ (25).

16. Příprava 2-azidodihydrobetulonové kyseliny (17)

Směs 2-bromderivátu **3c** (300 mg; 0.6 mmol) a azidu sodného (182 mg; 2.8 mmol) byla rozpuštěna v NMP (15 ml) a ponechána míchat při r.t. Po 24 h byl v reakční směsi dle TLC (mobilní fáze F) přítomen pouze produkt reakce.

Po zpracování reakce postupem A byl odparek obsahující sloučeninu **17** chromatografován na silikagelu (mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:3 s 0.07 % AcOH). Po nástřiku vytvořil produkt reakce na silikagelu žlutočervený pás. Všechny frakce obsahující organickou hmotu byly zbarveny do žluta až oranžova, což značí rozklad azidu **17**. Tento rozklad byl popsán u analogických azidů v lit.⁵⁶

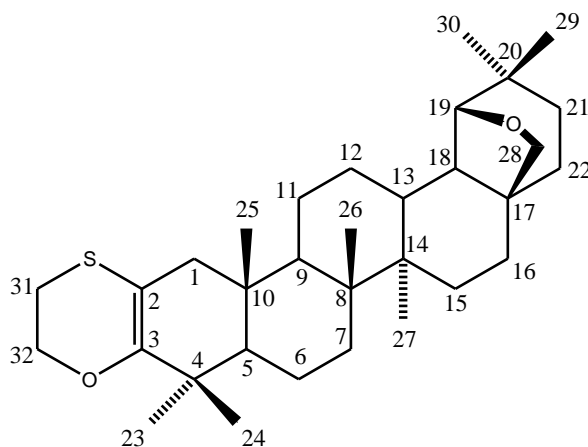
17. Příprava 2-sulfanyldihydrobetulonové kyseliny (18)

Příklad reakce: Bromderivát **3c** (1 g; 1.9 mmol) byl společně se sulfidem sodným (800 mg; 10.3 mmol) rozpuštěn v NMP (100 ml). Reakční směs byla míchána při r.t. 90 min, poté byla dle TLC (mobilní fáze F) ukončena a zpracována postupem A. Odparek (854 mg) byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl 7% PhMe/Et₂O s gradientem Et₂O na 20 %. Derivát **18** se nepodařilo chromatograficky vyčistit.

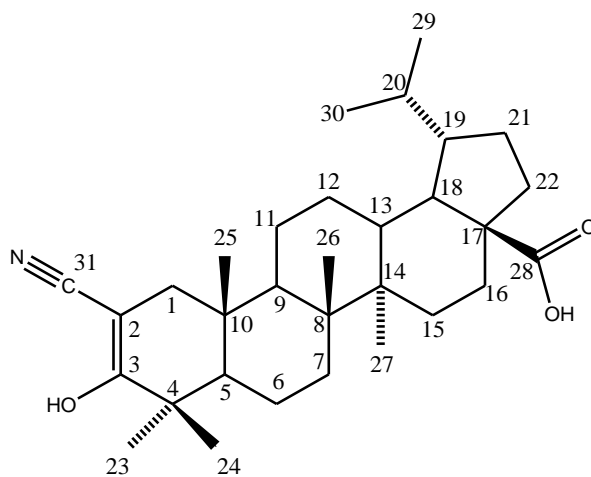
TABULKY ^{13}C NMR SPEKTER

Přiřazení signálů ^{13}C NMR spekter bylo provedeno na základě 2D NMR (COSY, ROESY, HMQC, HMBC) nebo DEPT spekter a podle analogií.

Číslování oleananového skeletu v ^{13}C NMR spektrech



Číslování lupanového skeletu v ^{13}C NMR spektrech



Tab. 3: ^{13}C chemické posuny sloučenin **5**, **7**, **11a** a **14**.

Atom	5	7	11a	14
1	46.77	42.26	45.79	46.86
2	57.51	29.77	96.28	58.60
3	209.47	118.67	149.23	213.09
4	40.56	40.73	38.77	40.48
5	50.48	53.38	53.28	51.81
6	16.54	17.00	19.48	19.41
7	38.64	36.81	36.85	37.07
8	41.01	41.11	40.78	40.90
9	49.62	51.32	49.58	50.89
10	39.26	37.56	37.12	38.09
11	19.67	19.55	19.79	21.09
12	24.86	24.37	26.33	26.30
13	36.36	34.20	34.37	34.14
14	40.92	40.80	40.57	40.83
15	26.47	26.51	26.52	26.47
16	32.76	32.80	32.82	32.77
17	41.54	41.57	41.57	41.51
18	47.45	46.88	46.87	50.11
19	87.97	88.04	88.00	88.02
20	36.78	36.34	36.36	36.35
21	34.46	34.00	33.09	33.79
22	26.27	26.37	26.51	26.35
23	27.00	27.69	28.19	28.84
24	21.32	21.05	21.55	21.46
25	15.13	15.79	15.53	15.94
26	15.95	16.78	16.28	16.78
27	13.50	13.74	13.56	13.51
28	71.33	71.34	71.36	71.30
29	24.61	24.63	24.65	24.69
30	28.84	28.89	28.89	28.87
31	112.58	18.95	27.09	169.82
32	-	171.17	65.27	24.60
33	-	23.41	-	-
34	-	172.12	-	-
35	-	24.03	-	-

Tab. 4: ^{13}C chemické posuny sloučenin **15** a **16**.

Atom	15	16
1	37.45	38.53
2	61.61	56.89
3	182.37	211.67
4	56.10	50.94
5	52.10	49.62
6	19.72	19.96
7	33.61	32.84
8	40.74	42.78
9	50.37	48.66
10	37.06	37.46
11	21.25	22.11
12	26.84	26.88
13	38.20	40.69
14	42.77	44.19
15	29.60	29.71
16	32.04	32.00
17	56.88	52.25
18	48.74	48.66
19	44.22	47.47
20	29.82	29.80
21	22.80	22.80
22	37.57	38.53
23	29.55	29.21
24	19.70	19.61
25	16.96	18.63
26	15.97	15.43
27	14.57	14.60
28	182.49	182.33
29	23.04	23.02
30	14.74	14.73
31	118.55	112.22

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimidu
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Et	ethyl
IC ₅₀	nejnižší koncentrace, která usmrtí 50 % buněk
MCPBA	<i>m</i> -chlorperoxybenzoová kyselina
MDR	mnohočetná léková rezistence
MeOH	methanol
MeONa	methanolát sodný
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
PhMe	toluen
PTC	katalyzátor fázového přenosu
RVO	rotační vakuová odparka
SAR	vztah mezi strukturou a aktivitou
TBAB	tetrabutylamonium bromid
TEACC	triethylamonium chlorochromát
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie

SEZNAM NÁDOROVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ

A549	lidský adenokarcinom plic
BJ	lidský fibroblast (nenádorový)
CCRF/CEM	lidská T-lymfoblastická leukémie
CEM-DNR	lidská T-lymfoblastická leukémie, daunorubicin rezistentní
HCT116	lidská rakovina střev
HCT166p53--	lidská rakovina střev se změnou exprese p53
K562	lidská chronická myeloidní leukémie
K562-TAX	lidská chronická myeloidní leukémie, taxol rezistentní
MRC-5	lidský fibroblast (nenádorový)
U2OS	lidský osteosarkom

LITERATURA

1. Hill R.A., Connolly J. D.: *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1028.
2. Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394.
3. Sarek J., Kvasnica M., Vlk M., Biedermann D.: *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer*. Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge NY **2010**. Chapter 6, pp 159-189.
4. Dang Z., Ho P., Zhu L., Qian K., Lee K.-H., Huang L., Chem C.-H.: *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2029.
5. Zuo W.-J., Dai H.-F., Chen J., Chen H.-Q., Zhao Y.-X., Mei W.-L., Wang J.-H.: *Planta Med.* **2011**, *77*, 1835.
6. Innocente B., Casanova B. B., Klein F., Lana A. D., Pereira D., Muniz M. N., Sonnet G. G., Fuentefria A. M., Gnoatto S. C. B.: *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83*, 344.
7. Chianese G., Yerbanga S. R., Lucantoni L., Habluetzel A., Basilico N., Taramelli D., Fattorusso E., Tagalialatela-Scafati O.: *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1448.
8. Fu Y., Zhou E., Wei Z., Liang D., Wang W., Wang T., Guo M., Zhang N., Yang Z.: *FEBS J.* **2014**, *281*, 2543.
9. Yano S., Harada M., Watanabe K., Nakamaru K., Hatakeyama Y., Shibata S., Takahashi K., Mori T., Hirabayashi K., Takeda M., Nagata N.: *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2500.
10. Morikawa T., Ninomiya K., Yamaguchi T., Yoshikawa M., Hayakawa T., Muraoka O.: *Phytochemistry* **2014**, *102*, 169.
11. Sanchez-Quesada C., Lopez-Biedma A., Warleta F., Campos M., Beltran G., Gaforio J. J.: *J. Agr. Food Chem.* **2013**, *61*, 12182.
12. You Y. J., Kim Y., Nam N. H., Ahn B. Z.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3137.
13. Koohang A., Majewski N. D., Szotek E. L., Mar A. A., Eiznhamer D. A., Flavin M. T., Xu Z.-Q.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2168.

14. Urban M., Vlk M., Dzubak P., Hajduch M., Sarek J.: *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3666.
15. Borková L.: Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, **2012**.
16. Shernyukov A. V., Mainagashev I. Ya., Korchagina D. V., Gatikov Yu. V., Salakhutdinov N. F., Tolstikov G. A.: *Chem. Nat. Compd.* **2012**, *48*, 821.
17. Angelini G., Chiappe C., Maria P., Fontana A., Gasparrini F., Pieraccini D., Pierini M., Siani G.: *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8193.
18. Turner J. C.: *Chem. Commun. (London)* **1967**, *8*, 396.
19. Urban M.: Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, **2005**.
20. Klinot J., Světlý J., Kudláčková D., Buděšínský M., Vystrčil A.: *Collection Czech. Chem. Commun.* **1979**, *44*, 211.
21. Tolmacheva I. A., Anikina L. V., Vikharev Yu. B., Shelepenkina L. N., Grishko V. V., Tolstikov A. G.: *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2008**, *34*, 125.
22. Tolmacheva I. A., Nazarov A. V., Maiorova O. A., Grishko V. V.: *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 606.
23. Anikina L. V., Tolmacheva I. A., Vikharev Yu. B., Grishko V. V.: *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2010**, *36*, 240.
24. Tolmacheva I. A., Shelepenkina L. N., Shashkov A. S., Grishko V. V., Glushkov V. A., Tolstikov A. G.: *Chem. Nat. Compd.* **2007**, *43*, 153.
25. Buckett W. R., Hewett C. L., Savage D. S.: *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1116.
26. Sejbal J., Klinot J., Hrnčířová D., Vystrčil A.: *Collect. Czech. Chem. C.* **1985**, *50*, 2753.
27. Holker J. S. E., Jones W. R., Ramm P. J.: *J. Chem. Soc.* **1969**, *C*, 357.
28. Sejbal J., Klinot J., Vystrčil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1987**, *52*, 1052.
29. Mori H., Gandhi V. S., Schwenk E.: *Chem. Pharm. Bull.* **1962**, *10*, 842.
30. Hanna R., Ourisson G.: *Bull. Soc. Chim. France* **1961**, 1945.
31. Korovin A. V., Tkachev A. V.: *Russ. Chem. Bull.* **2001**, *50*, 304.

32. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* **2004**, *64*, 1100.
33. Lehn J. M., Ourisson G.: *B. Soc. Chim. Fr.* **1962**, 1133.
34. Klinot J., Vystreil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1966**, *31*, 1079.
35. Novotný J., Podlaha J., Klinot J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1993**, *58*, 2737.
36. Mukherjee R., Jaggi M., Siddiqui M. J. A., Srivastava S. K., Rajendran P., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4087.
37. Sarek J., Kvasnica M., Vlk M., Urban M., Dzubak P., Hajduch M.: *Research on Melanoma - A Glimpse into Current Direction and Future Trends*. Murph M.: Tech, Rijeka Croatia **2011**. Chapter 6, pp 125-157.
38. Zhao G., Yan W., Cao D.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 959.
39. Ruzicka L., Frame G. F., Leicester H. M., Liguori M., Brungger H.: *Chem. Ber.* **1934**, *17*, 426.
40. Yu-Hong Z., Tao Y., Yang W.: *J. Forestry Res.* **2003**, *14*, 202.
41. Bruckner V., Kovács J., Koczka I.: *J. Chem. Soc.* **1948**, 948.
42. Laszczyk M., Jäger S., Simon-Haarhaus B., Scheffler A., Schempp Ch. M.: *Planta Med.* **2006**, *72*, 1389.
43. Hao R., Shigetoshi O.: *J. Wood Sci.* **2012**, *58*, 169.
44. Şoica C. M., Dehelean C. A., Peev C., Aluas M., Zupkó I., Kása P., Alexa E., *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 968.
45. Guidoin M.-F., Yang J., Pichete A., Roy Ch.: *Thermochim. Acta* **2003**, *398*, 153.
46. Krasutsky P. A., Carlson R. M., Nesterenko V. V.: Methods for Manufacturing Betulinic Acid. U.S. Patent, US 0016482, 7. February **2002**.
47. Linkowska E.: *Pol. J. Chem.* **1994**, *68*, 875.
48. Biedermann D.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, **2003**.
49. Pezzuto J. M., Kim D. S. H. L.: Improved Methods of Manufacturing Betulinic Acid. U.S. Patent, US 5804575, 27. March **1998**.

50. Akihisha T., Takamine Z., Yoshizumi K., Tokuda H., Kimura Y., Ukyja M., Nakahara T., Yokochi T., Ichiishi E., Nishino H.: *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 278.
51. Lehn J. M., Ourisson G.: *Bull. Soc. Chim. France* **1962**, 1133.
52. Urban M.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, **2000**.
53. Hwa J. C. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 3604.
54. You Y.-J., Kim Y., Nam N.-H., Ahn B.-Z.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3137.
55. Hajduch M., Kolar Z., Novotny R., Hanus J., Mihal V., Hoblikova A., Noskova V., Strnad M.: *Anticancer Drugs* **1997**, 8, 1007.
56. Pettit G. R., Melody N., Hempensall F., Chapuis J.-Ch., Groy T. L., Williams L.: *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 863.