

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Syntéza triterpenů vhodných pro jejich vizualizaci
v buňkách**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Barbora Šťastná

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Olomouc 2023

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, 15. 5. 2023

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především svému vedoucímu bakalářské práce, panu doc. RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při vypracovávání práce a asistenci při řešení problémů. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce, paní Mgr. Nikole Jakubcové za veškerou pomoc, ochotu, podporu a čas. V neposlední řadě mé díky patří celé výzkumné skupině za veškeré rady při řešení příslušných úkolů a možnost vypracovávat závěrečnou práci v příjemném a přátelském prostředí.

Ráda bych rovněž poděkovala panu RNDr. Karlu Kobernovi, CSc. a paní RNDr. Anně Ligasové, Ph.D. za vykonání vizualizačních testů a za možnost přihlížet v jejich provádění. Děkuji také panu RNDr. Adamu Příbylkovi, Ph.D. za změření HRMS spekter.

Můj velký dík patří celé mé rodině a příteli za podporu po celou dobu mého studia.

Tato bakalářská práce vznikla za podpory projektu „Národní ústav pro výzkum rakoviny“ (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Barbora Šťastná

Název práce: Syntéza triterpenů vhodných pro jejich vizualizaci v buňkách

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra organické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Nikola Jakubcová

Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zaměřuje na syntézu dusíkatých heterocyklických derivátů kyseliny dihydrobetulonové a betulonové a především na jejich následnou derivatizaci v poloze C-28 a C-30. V teoretické části se obecnými informacemi o jednotlivých skupinách terpenů s širším pojednáním o triterpenech zabývá první kapitola následovaná kapitolou druhou shrnující poznatky o jejich dusíkatých heterocyklických derivátech. Závěrečná kapitola teoretické části je věnována zobrazovacím metodám chemických látek v buňce, z nichž je v současnosti velmi významnou metodou bioortogonální reakce. Části o výsledcích a experimentálním provedení jsou věnovány syntéze příslušných výchozích látek a jejich derivatizaci v poloze C-28, či C-30. Konkrétně byly zaváděny substituenty vhodné pro konjugaci s komplementární fluorescenční značkou, což umožňovalo následnou vizualizaci daných modifikovaných derivátů v buňkách. Bylo připraveno celkem sedm nových triterpenických derivátů, jež byly charakterizovány a následně byly podrobeny vizualizačním testům. Vybrané deriváty rovněž byly, či v blízké době budou otestovány i na cytotoxickou aktivitu.

Klíčová slova: triterpenoidy, heterocyklické deriváty, bioortogonální reakce

Počet stran: 92

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Barbora Šťastná

Title: Synthesis of triterpenes suitable for their visualisation in cells

Type of thesis: Bachelor's

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: Assoc. Prof. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Advisor consultant: Mgr. Nikola Jakubcová

The year of presentation: 2023

Abstract:

This bachelor thesis focuses on the synthesis of nitrogen heterocyclic derivatives of dihydrobetulonic and betulonic acids and especially on their subsequent derivatization in the C-28 and C-30 position. In the theoretical part, general information on the individual groups of terpenes with a broader discussion of triterpenes is dealt with in the first chapter followed by the second chapter summarizing the knowledge on their mainly nitrogen heterocyclic derivatives. The final chapter of the theoretical part is devoted to imaging methods of chemical substances in the cell, of which bioorthogonal reaction is currently a very important method. The sections about results and experimental design are devoted to the synthesis of the relevant starting compounds and their derivatization at the C-28 or C-30 position. Specifically, substituents suitable for conjugation with a complementary fluorescent label were introduced, allowing subsequent visualization of the modified derivatives in cells. A total of seven new triterpene derivatives were prepared, characterized and subsequently subjected to visualization tests. Selected derivatives have also been or will shortly be tested for cytotoxic activity.

Keywords: triterpenoids, heterocyclic derivatives, bioorthogonal reaction

Number of pages: 92

Number of appendixes: 1

Language: Czech

Seznam zkratek

5-FAM	5-karboxyfluorescein
AcOH	kyselina octová
AcONa	octan sodný
CuAAC	Cu ^I katalyzovaná azido-alkynová cykloadice
CuOTf	trifluormethansulfonát měďný
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DFT	diskrétní Fourierova transformace
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMC	dimethylkarbonát
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDA	ethylendiamin
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ekv.	ekvivalent
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol

GFP	zelený fluorescenční protein
Hex	hexan
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
h ν	světelná energie
IC ₅₀	nejnižší koncentrace, jež usmrtí 50 % buněk
IEDDA	Diels-Alderova reakce s inverzními elektronovými požadavky
IR	infračervené záření
kat.	katalyzátor
MF	mobilní fáze
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid
MW	mikrovlnné záření
NMR	nukleární magnetická rezonance
PG	chránicí skupina (protecting group)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
RVO	rotační vakuová odparka
r. t.	laboratorní teplota
SPAAC	napětím podporovaná [3 + 2] cykloadice
<i>t</i> -BuOK	<i>tert</i> -butoxid draselný
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -butylhydroperoxid

TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
Tol	toluen
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
t. t.	teplota tání
UV	ultrafialové záření

Seznam nádorových linií

A549	linie lidského adenokarcinomu plic
BJ	linie lidského nenádorového fibroblastu
CEM	linie lidské lymfoblastické leukemie
CCRF-CEM	linie lidské T-lymfoblastické leukemie
CEM-DNR	linie lidské T-lymfoblastické leukemie, daunorubicin rezistentní
G-361	linie lidského maligního melanomu
HCT116	linie lidské rakoviny střev
HCT116p53-	linie lidské rakoviny střev se změnou exprese genu p53
HeLa	linie lidských epitelových buněk
HT-29	linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
K562	linie lidské chronické myeloidní leukemie
K562-TAX	linie lidské chronické myeloidní leukemie, taxol rezistentní
MRC-5	linie lidského nenádorového fibroblastu
MCF-7	linie lidského adenokarcinomu prsu
U2OS	linie lidského osteosarkomu

Obsah

Úvod.....	13
Cíle bakalářské práce	14
Teoretická část	15
1. Terpeny a terpenoidy	15
1.1 Triterpeny	20
1.1.1 Deriváty lupanu	21
1.1.2 Deriváty oleananu	24
1.1.3 Deriváty ursanu	25
2. Heterocyklické deriváty triterpenů	26
2.1 Triterpenické deriváty s přikondenzovaným pyrazinem	28
2.2 Triterpenické deriváty s přikondenzovaným pyridinem.....	30
3. Vizualizace chemických látek v buňkách pomocí bioortogonální reakce	33
3.1 Bioortogonální reakce	34
3.1.1 Bioortogonální reakce azidu s alkynem	36
Výsledky a diskuze	40
1. Příprava výchozích látek.....	40
1.1 Kyselina betulonová (II).....	40
1.2 Pyrazinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (IV)	40
1.3 Pyridinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (V).....	41
1.4 Pyridinový derivát kyseliny betulonové (VI).....	41
2. Derivatizace pyrazinových a pyridinových derivátů	42
2.1 Derivatizace v poloze C-28	42
2.1.1 Příprava derivátů VII, VIII, IX	43
2.1.2 Příprava derivátů X, XI, XII	45
2.2 Derivatizace v poloze C-30	47

2.2.1	Oxidace na aldehyd	48
2.2.2	Protekce polohy C-28.....	49
2.2.3	Pinnickova oxidace	51
2.2.4	Reakce s linkerem	52
2.2.5	Deprotekce	53
	Vizualizační testování.....	54
	Cytotoxická aktivita připravených derivátů.....	56
	Závěr	57
	Experimentální část.....	59
1.	Obecné poznámky k experimentální části	59
2.	Příprava výchozích látek.....	60
2.1	Příprava kyseliny betulonové (II).....	60
2.2	Příprava pyrazinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (IV).....	61
2.3	Příprava pyridinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (V).....	61
2.4	Příprava pyridinového derivátu kyseliny betulonové (VI).....	62
3.	Derivatizace v poloze C-28.....	62
3.1	Příprava derivátů s propargylesterovou skupinou (VII, VIII, IX).....	62
3.1.1	Příprava derivátu VII.....	62
3.1.2	Příprava derivátu VIII	63
3.1.3	Příprava derivátu IX.....	64
3.2	Příprava derivátů s azidovým linkerem (X, XI, XII).....	64
3.2.1	Příprava derivátu X	64
3.2.2	Příprava derivátu XI.....	65
3.2.3	Příprava derivátu XII.....	66
4.	Derivatizace v poloze C-30.....	67
4.1	Příprava aldehydu XIII	67
4.2	Protekce polohy C-28	67

4.2.1	Příprava protektivní skupiny XIVd.....	68
4.2.2	Příprava protekovaného derivátu XIV	69
4.3	Příprava derivátu XV – Pinnickova oxidace	70
4.4	Příprava derivátu XVI – reakce s linkerem	70
4.5	Příprava derivátu XVII – deprotekce	71
	Seznam literatury	73
	Příloha: ^1H a ^{13}C NMR spektra nově připravených sloučenin.....	81

Úvod

Terpeny patří mezi nejrozšířenější přírodní látky na Zemi, protože není divu, že jejich využití je a bude stále velkým tématem. Významnými zdroji však nejsou pouze byliny, keře a stromy, mohou to být i mořští živočichové, řasy, či houby, ale také suchozemští živočichové. Hojné využití terpenů pramení především ze skutečnosti, že jsou snadno dostupné a vykazují řadu pozitivních biologických účinků, mezi které se řadí především cytotoxická aktivita, dále pak i antimikrobiální, protivirové, anti-HIV, či antifungální účinky. Značná část nižších terpenů a jejich derivátů je významná jako chuťová, či vonná aditiva, nicméně mezi ty nejvýznamnější se řadí triterpeny, a to konkrétně pentacyklické.

Pro aplikaci triterpenů však existuje i několik nevýhod, kdy problém představuje především jejich lipidický charakter, a tedy i nízká rozpustnost, či úplná nerozpustnost ve vodě a obecně v polárních rozpouštědlech. Dalším problémem je rovněž jejich nízká terapeutická aktivita při nízkých koncentracích. Tyto problémy se řeší přípravou jejich semi-syntetických derivátů, z nichž jsou v poslední době nejzásadnější právě heterocyklické deriváty. Nejčastěji jsou k triterpenům a jejich derivátům připojovány heterocykly dusíkaté, kupříkladu pyrazin, či pyridin.

V současnosti taktéž narůstá zájem o pozorování procesů přímo v příslušném biologickém kompartmentu, k čemuž se s hojností využívají bioortogonální reakce, jež spadají pod tzv. click reakce. Danou metodu je možné využít i ke zjištění biologického cíle příslušné aktivní látky, přičemž právě díky této metodě bylo potvrzeno cílení triterpenů a jejich derivátů na mitochondrie. Triterpeny konjugované s fluorescenční značkou jsou zvláště výhodné pro jejich vizualizaci v buňkách, přičemž tato oblast je nyní důležitým předmětem zkoumání, a byla rovněž motivem pro tuto bakalářskou práci.

Tato bakalářská práce se tedy mimo syntézy příslušných derivátů rovněž zabývá provedením vizualizačních testů a potvrzením, či vyvrácením vhodnosti daných triterpenických derivátů pro tuto aplikaci. Dalším důležitým zjišťovaným parametrem je také cytotoxická aktivita připravených derivátů.

Cíle bakalářské práce

Studium a vypracování literární rešerše zaměřené na terpeny a terpenoidy, heterocyklické deriváty triterpenů a vizualizaci malých molekul v buňkách s využitím fluorescenčních a jiných značek zavedených do molekul pomocí bioortogonálních reakcí.

Příprava dusíkatých heterocyklických derivátů kyseliny betulonové a dihydrobetulonové.

Modifikace vytvořených heterocyklických derivátů substituenty vhodnými pro konjugaci s fluorescenční značkou.

Charakterizace nově vytvořených triterpenických derivátů (NMR, HRMS, IR spektrometrie, bod tání).

Zaslání nově syntetizovaných derivátů biologickému týmu pro zjištění biologické aktivity (cytotoxicity) daných derivátů a podílení se na testování jejich zobrazovací schopnosti v buňkách.

Teoretická část

1. Terpeny a terpenoidy

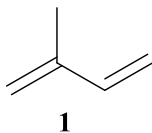
Terpeny a od nich odvozené terpenoidy jsou největší skupinou přírodních látek. Tyto sloučeniny jsou nejčastěji produkovány rostlinami, avšak také dalšími eukaryotními organismy, jako jsou hmyz,¹ houby,² améby,³ a mořské organismy.⁴ Terpeny také vytvářejí prokaryotní organismy, především bakterie.⁵ V přírodě bylo dosud nalezeno více než 55 000 terpenoidů.⁶ Terpeny jsou významnou součástí esenciálních olejů, což jsou koncentrované, těkavé kapaliny extrahované z různých částí rostlin používané jako chuťová a vonná aditiva, či z důvodu farmakologických účinků, jako jsou například antiseptické, analgetické, antimikrobiální, spasmolytické, nebo také lokálně anestetické účinky.⁷

Jako terpeny označujeme sloučeniny s jednoduchými uhlovodíkovými strukturami, zatímco terpenoidy jsou modifikovaná třída terpenů s různými funkčními skupinami a oxidovanými methylovými skupinami.⁸

V závislosti na druhu organismu jsou terpenoidy syntetizovány dvěma různými způsoby. V organismech, jež nejsou schopné fotosyntézy, tj. v některých bakteriích, kvasinkách, houbách, ale zejména u vyšších živočichů, probíhá syntéza terpenoidů cytosolovou mevalonátovou dráhou. Naopak u fotosyntetických organismů, tedy organismů obsahujících plastidy, jsou terpenoidy produkovány plastidovou 2-C-methyl-D-erythriol-4-fosfátovou dráhou. Jedná se o aerobní a fotosyntetické bakterie, sinice, řasy a především tímto způsobem vznikají terpeny i v chloroplastech rostlin. Mnoho terpenů a terpenoidů je produkováno přírodními zdroji pouze v malém množství.⁹

Přestože některé rostlinné terpenoidy fungují jako primární metabolity, většina terpenů a terpenoidů v rostlinách je zapojena do druhově specifických interakcí jako sekundární metabolity, které plní roli v komunikaci a obraně rostlin. Z toho také vyplývá skutečnost, že velké množství terpenů a terpenoidů má významné biologické účinky, mezi které se řadí především protinádorová,¹⁰ protizánětlivá,¹¹ antimikrobiální, antifungální aktivita¹² a jiné.

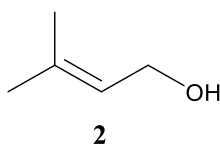
Základní stavební jednotkou všech terpenů je formálně pětiuhlíkatý izopren (2-methylbuta-1,3-dien) (**1**) (Obr. č. 1), jenž je nejhojněji produkovaná těkavá organická sloučenina na Zemi.¹³



Obr. č. 1: Struktura izoprenu (**1**)

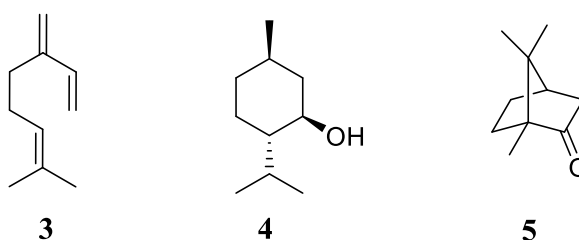
Izoprenové jednotky se formálně spojují dle tzv. izoprenového pravidla, které osvětlil profesor Leopold Ružička, jenž byl za řešení molekulární struktury vyšších terpenů oceněn v roce 1939 Nobelovou cenou za chemii.^{14,15} Izoprenové pravidlo (pravidlo C5) vychází z počtu a uspořádání atomů uhlíku v molekule. Tyto molekuly se seskupují podle počtu izoprenových jednotek, jež mohou být spojeny třemi způsoby, přičemž jako základní je označováno spojení hlava-ocas. Z izoprenového pravidla vychází i chemický vzorec terpenů $(C_5H_8)_n$, kdy n označuje počet izoprenových jednotek v molekule a právě podle počtu n rozlišujeme hemiterpeny (C_5 , $n = 1$), monoterpeny (C_{10} , $n = 2$), seskviterpeny (C_{15} , $n = 3$), diterpeny (C_{20} , $n = 4$), sesterterpeny (C_{25} , $n = 5$), triterpeny (C_{30} , $n = 6$), tetraterpeny (C_{40} , $n = 8$) a polyterpeny.¹⁶

První skupinou terpenů jsou hemiterpeny obsahující pět uhlíků, tedy jednu izoprenovou jednotku (C_5H_8). Nejvýznamnějším zástupcem je již výše zmíněný izopren (**1**) (Obr. č. 1), který je vytvářen především listy rostlin.¹⁷ Pozdější studie dokázaly, že izopren (**1**) jsou schopné syntetizovat i heterotrofní organismy jako člověk a zvířata, kupříkladu křasy.¹⁸ Dalším významným zástupcem hemiterpenů je prenol (3-methylbut-2-en-1-ol) (**2**) (Obr. č. 2), který se vyskytuje v esencích citrusových plodů, jako jsou citron, či limetka, dále v oleji chmelu otáčivého (*Humulus lupulus*) a v oleji ylang-ylang, jenž je získáván z čerstvě natrhaných květů kanangy vonné (*Cananga odorata*).^{4,19}



Obr. č. 2: Struktura prenolu (**2**)

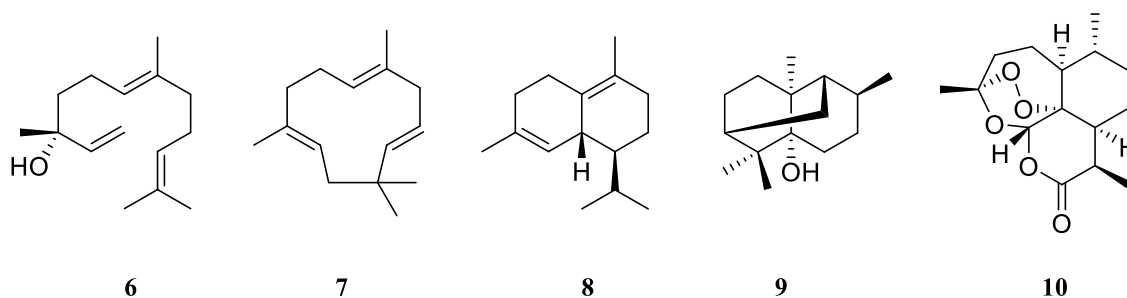
Monoterpeny jsou druhou skupinou terpenů a obsahují tedy dvě izoprenové jednotky ($C_{10}H_{16}$). Skupinu lze dělit na tři podskupiny, a to na acyklické (též alifatické), monocyklické a bicyklické monoterpeny. V rámci každé skupiny se mohou monoterpeny vyskytovat jako jednoduché nenasycené uhlovodíky, nebo mohou mít funkční skupiny a být alkoholy, aldehydy, či ketony. Monoterpeny se vyskytují především v esenciálních olejích rostlin, mnohdy vykazují antibakteriální a protinádorovou aktivitu a jsou často velmi aromatické, čehož se využívá ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.^{8,20–22} Významným zástupcem alifatických monoterpenů je kupříkladu myrcen (**3**) (Obr. č. 3) vyskytující se ve verbenovém oleji z verbeny citronové (*Lippia citriodora*),²⁰ a jenž je díky své reaktivní dienové struktuře mnohostranně použitelný jako univerzální výchozí surovina pro výrobu aromat, kosmetiky, vitamínů a léčiv.²³ Z monocyklických monoterpenů je velmi často zmiňovaným zástupcem menthol (**4**) (Obr. č. 3), jehož přírodním zdrojem je především peprmintový olej z máty peprné (*Mentha piperita*),²⁰ který se hojně využívá ve farmaceutickém, kosmetickém, ale i v potravinářském průmyslu.²⁴ Zástupcem bicyklických monoterpenů je například kafr (**5**) (Obr. č. 3) produkovaný kafrovníkem lékařským (*Cinnamomum camphora*).²⁰ Kafr (**5**) se vepsal do historie zejména z důvodu jeho užití jako změkčovadla při výrobě celuloidu, jednoho z prvních plastických materiálů.²⁵ V dnešní době je kafr (**5**) obsažen v mnoha komerčních produktech jako jsou repelenty proti molům, pyrotechnika, či konzervační látky léčiv a kosmetiky.²⁶



Obr. č. 3: Struktury myrcenu (**3**), mentholu (**4**) a kafru (**5**)

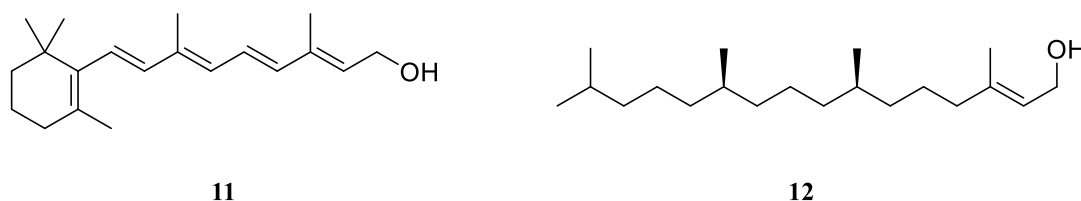
Další, tedy třetí a zároveň nejrozmanitější skupinou terpenů jsou patnáctiuhlíkaté seskviterpeny se třemi izoprenovými jednotkami ($C_{15}H_{24}$). Obdobně jako monoterpeny se i seskviterpeny strukturně rozdělují na lineární, monocyklické, bicyklické a tricyklické. Speciální skupinou seskviterpenů jsou pak od nich odvozené laktony.⁸ Seskviterpeny jsou produkovány rostlinami, jsou součástí rostlinných esenciálních olejů²⁷ a latexů,⁸ každopádně je lze nalézt též v některých houbách, či mořských organismech.⁴

Mezi biologické účinky seskviterpenů a jejich laktonů se řadí například protinádorové,²⁸ antibakteriální,²⁹ protizánětlivé,³⁰ nebo také antimalarické účinky.²⁸ Často se též jedná o látky s příjemnou vůní, čehož se využívá v kosmetice, či pro výrobu produktů určených k dentální hygieně.⁴ Lineárním seskviterpenem je například β -nerolidol (6), monocyklickým α -humulen (7), bicyklickým δ -kadinen (8), tricyklickým pačulol (též pačuli alkohol) (9) a seskviterpenickým laktonem artemisinin (10) (Obr. č. 4).²⁰



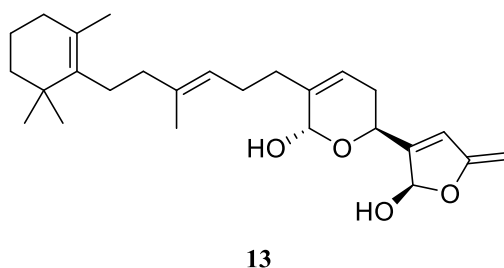
Obr. č. 4: Struktury β -nerolidolu (6), α -humulenu (7), δ -kadinenu (8), pačulolu (9), artemisininu (10)

V pořadí čtvrtou skupinu terpenů tvoří diterpeny obsahující čtyři izoprenové jednotky ($C_{20}H_{32}$). V přírodě se diterpeny nejčastěji nacházejí v polyoxygenované formě s keto-, nebo hydroxylovými skupinami, jež jsou mnohdy esterifikovány strukturně malými alifatickými, či aromatickými kyselinami.³¹ Výskyt diterpenů je poměrně pestrý, jelikož jsou součástí rostlin, dřevin, meteoritů, hub, mořských organismů včetně korálů a plžů, řas, hmyzu, kupříkladu termitů, a dalších suchozemských organismů, například i lidí.⁴ Z biologických účinků se diterpeny vyznačují cytotoxickou, antibakteriální, antifungální, insekticidní, či antileishmaniální aktivitou.³² Mezi významné zástupce diterpenů se řadí například retinol (11) (Obr. č. 5), jenž je jednou z forem vitamínu A, či fytol (12) (Obr. č. 5), který je důležitou složkou chlorofylu. Dalšími zástupci diterpenů jsou též jejich laktony, příkladně ginkgolidy, které jsou součástí extraktů stromu jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*).⁴



Obr. č. 5: Struktury retinolu (11) a fytolu (12)

Pátou skupinou terpenů jsou sesterterpeny, jež ve své struktuře obsahují pět izoprenových jednotek (C₂₅H₄₀). I přes fakt, že jsou relativně málo početnou skupinou terpenů, jsou sesterterpeny poměrně rozšířené. Byly izolovány především z různých mořských bezobratlých organismů, zejména mořských hub.³³ Dále jsou však součástí některých druhů bakterií, lišejníků, hub, hmyzu, kapradin či vyšších rostlin.^{4,33} Významnou stránkou sesterterpenů jsou jejich rozmanité biologické vlastnosti jako je cytotoxicita vůči lidským nádorovým buňkám, inhibice patogenních mikrobů, dále i protizánětlivé, antiprotozoální a antituberkulózní aktivity.³³ Zástupcem sesterterpenů je například manoalid (**13**) (Obr. č. 6), jenž je mateřskou sloučeninou řady metabolitů mořských hub.³⁴ Manoalid je také přírodním inhibítozem vápníkových kanálů a vyznačuje se svou protizánětlivou, antiproliferační³⁵ a antibiotickou aktivitou.³⁶

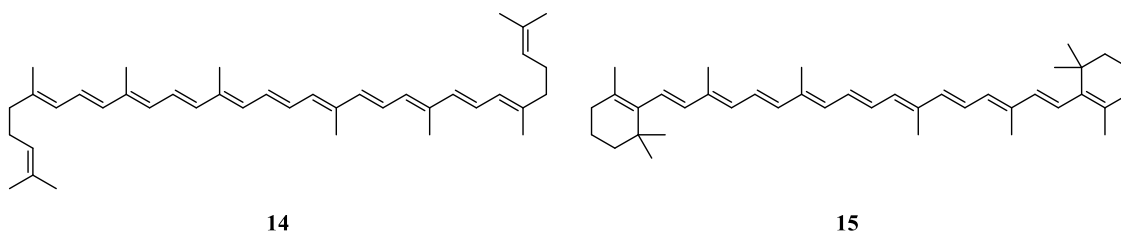


Obr. č. 6: Struktura manoalidu (**13**)

Triterpeny (C₃₀H₄₈), jakožto skupina terpenů, na niž bude v této práci brán největší zřetel, je popsána v samostatné podkapitole 1.1.

Čtyřicetihlíkaté tetraterpeny jsou skupinou terpenů obsahující osm izoprenových jednotek (C₄₀H₆₄), přičemž nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou karotenoidy. Karotenoidy jsou v tucích rozpustné sloučeniny, jež jsou zodpovědné za žlutooranžovou až červenou pigmentaci a lze je nalézt ve všech vyšších rostlinách, některých živočiších, řasách, či houbách.^{20,37} Právě v listech rostlin mají karotenoidy významnou roli, a to jako barevné filtry pro fotosyntézu, což vede ke vzniku žlutého a červeného zbarvení listů během podzimu, jelikož se karotenoidy degradují pomaleji než zelený chlorofyl. Živočichové si karotenoidy neumí sami vytvořit, proto je metabolizují z přijímané potravy a následně se tyto karotenoidové metabolity nacházejí jako chromoproteiny například v krevní plazmě, vaječném žloutku, či v peří některých ptáků jako jsou plameňáci.⁴ Mezi zástupce karotenoidů se řadí například lykopen (**14**) (Obr. č. 7) s konjugovaným systémem dvojných vazeb, jenž je zodpovědný za chromoforický,

zbarvení vytvářející, charakter molekuly. Cyklizací lykopenu (**14**) na obou koncích molekuly vzniká bicyklický karotenoid obecně známý jako β -karoten (**15**) (Obr. č. 7), který se nejhojněji vyskytuje u vyšších rostlin.³⁸ β -Karoten a další karotenoidy jsou prekurzory vitamínu A, používají se jako antioxidanty v léčích a rovněž jako barviva v potravinářství a kosmetice.³⁷



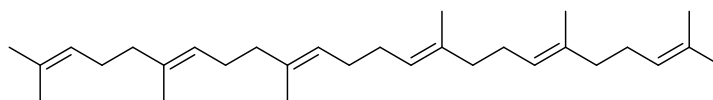
Obr. č. 7: Struktury lykopenu (**14**) a β -karotenu (**15**)

Jako polyterpeny jsou označovány terpeny, jež ve své struktuře obsahují více než osm izoprenových jednotek. Mezi nejznámějšími zástupci polyterpenů figuruje přírodní kaučuk získávaný koagulací latexu z kaučukovníku brazilského (*Hevea brasiliensis*).⁴ Strukturně se jedná o vysokomolekulární polymer skládající se z izoprenových jednotek v *cis*-konfiguraci. Jako polyizoprenové *trans*-izomery jsou pak označovány polymery gutaperča a balata.²⁰

1.1 Triterpeny

Triterpeny jsou skupinou terpenů, jež ve své struktuře obsahují třicet uhlíků a jsou tedy formálně tvořeny šesti izoprenovými jednotkami ($C_{30}H_{48}$). Triterpeny lze též označit za hlavní třídu sekundárních metabolitů,⁸ jež jsou produkovány například rostlinami, dřevinami, houbami, řasami, živočichy (hmyz, ryby, savci), lišejníky, bakteriemi,⁴ či mořskými organismy.³⁹ Triterpeny se vyznačují také důležitými biologickými účinky, mezi něž se řadí protizánětlivé,¹¹ antifungální,³⁹ cytotoxické,⁴⁰ antimikrobiální, antivirální,⁴¹ anti-HIV,⁴² neuroprotektivní,⁴³ hepatoprotektivní, či antioxidační účinky.⁴⁴

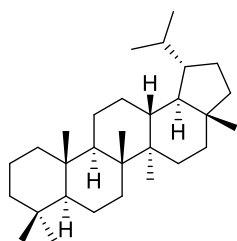
Jejich biosyntetickým prekurzorem je třicetihlíkatý skvalen (**16**) (Obr. č. 8), přičemž na základě jeho cyklizačních a přesmykových reakcí můžeme triterpeny dělit na lineární a cyklické.¹¹ Triterpeny obsahují také větší množství methylových skupin a mohou být oxidovány na alkoholy, aldehydy, či karboxylové kyseliny.⁸



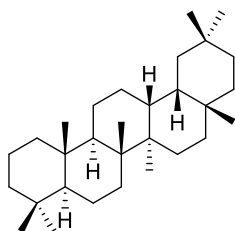
16

Obr. č. 8: Struktura skvalenu (16)

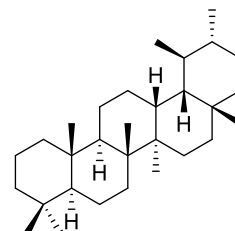
V přírodě se z triterpenických zástupců vyskytují především jejich cyklické deriváty, přičemž nejvýznačnějšími jsou triterpeny tetracyklické a pentacyklické.¹¹ Nejvýznamnější zástupci se pak řadí do skupiny pentacyklických triterpenů, která se dělí do podskupin dle určitého skeletálního vzoru, jenž je společný pro všechny zástupce dané podskupiny. Mezi nejznámější zástupce pentacyklických skeletálních typů patří deriváty lupanu (17), oleananu (18) a ursanu (19) (Obr. č. 9).⁴



17



18



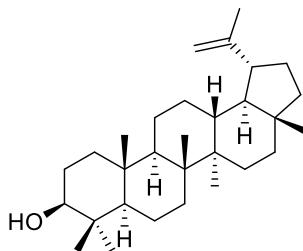
19

Obr. č. 9: Struktury lupanu (17), oleananu (18) a ursanu (19)

1.1.1 Deriváty lupanu

Triterpenoidy odvozené od lupanu jsou tvořeny čtyřmi šestičlennými a jedním pětičlenným cyklem a jsou obsaženy zejména ve vyšších rostlinách.⁴

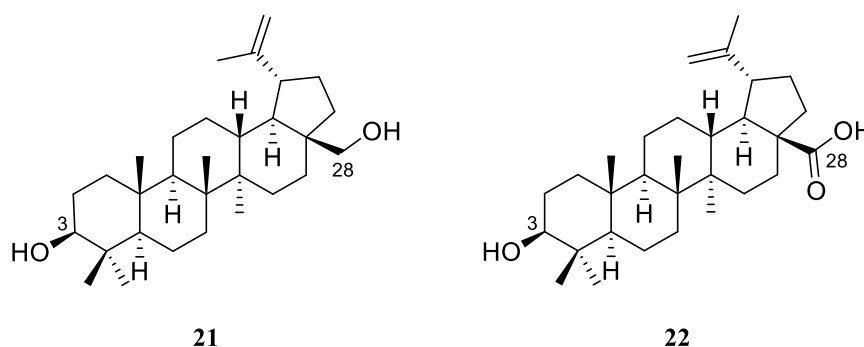
První lupanový triterpenoid byl izolován ze slupky semen luštěniny lupiny žluté (*Lupinus luteus*), pročež se označuje jako lupeol (20) (Obr. č. 10),⁴ jenž je významný především pro své protinádorové účinky.⁴⁵



20

Obr. č. 10: Struktura lupeolu (20)

Dalšími důležitými zástupci lupanových triterpenoidů jsou betulin (**21**) (Obr. č. 11) a kyselina betulinová (**22**) (Obr. č. 11), jejichž nejznámějším společným zdrojem jsou zástupci z čeledi břízovitých (*Betulaceae*), jak ostatně i latinský název této čeledi jasně naznačuje. Nejvýznamnějším zdrojem je bezpochyby kůra břízy bělokoré (*Betula pendula*),⁴ v níž se procentové zastoupení betulinu (**21**) může vyšplhat až ke 24 %.⁴⁶ Betulin (**21**) je pak obsažen i v jádrech jujuby čínské (*Ziziphus jujuba*), v kůře marhaníku granátového (*Punica granatum*), či v kůře břízy mandžuské (*Betula platyphylla*).⁴⁷ Samotná kyselina betulinová (**22**) byla původně získávána z afrického stromu cicimku čínského (*Ziziphus mauritiana*),⁴⁸ přičemž jejím dalším významným zdrojem je též kůra platanu javorolistého (*Platanus hispanica*), v níž je její procentové zastoupení okolo 3,3 %.⁴⁶



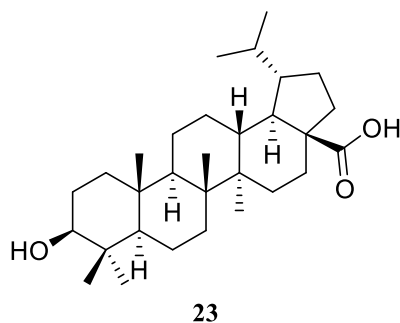
Obr. č. 11: Struktury betulinu (**21**) a kyseliny betulinové (**22**)

Předností betulinu (**21**) (Obr. č. 11) je zejména jeho hojné rozšíření a nízká toxicita,⁴⁷ naopak nevýhodou je jeho špatná rozpustnost ve vodě, a proto je často modifikován, především v poloze C-3, či C-28.⁴⁹ Z biologických aktivit se betulin (**21**) vyznačuje hepatoprotektivními a antioxidačními účinky. Nejvýznamnější je však jeho protinádorová aktivita, a to vůči karcinomům jícnu, žaludku, či děložního čípku.⁴⁷ Betulin (**21**) se dále používá k urychlování hojení ran,⁵⁰ či z důvodů jeho protizánětlivých účinků, jež by mohly do budoucna vést k jeho aplikaci při léčbě zánětlivých nádorů.⁵¹

Kyselina betulinová (**22**) (Obr. č. 11) je produktem oxidace betulinu (**21**) (Obr. č. 11), kterou lze z tohoto připravit dvoukrokovou syntézou.⁵² Jde o bílou krystalickou látku, jež vykazuje špatnou rozpustnost ve vodě, DMF a DMSO, omezenou rozpustnost v chloroformu, či v organických alkoholech jako je methanol, a naopak dobrou rozpustnost v kyselině octové a pyridinu.⁵³ Na rozdíl od betulinu (**21**) je kyselina betulinová (**22**) farmakologicky aktivnější. Vyznačuje se například protinádorovou

aktivitou, přičemž jejím cílem jsou především mitochondrie nádorových buněk. U rakoviny prostaty, či tlustého střeva mají membrány mitochondrií v buňkách daných karcinomů, oproti zdravým buňkám, jiné vlastnosti – jsou strukturálně a funkčně modifikovány. Významné rozdíly jsou například ve složení membránových lipidů (vyšší nenasycenost acylových zbytků), v tekutosti dané membrány, či aktivitě cytochrom c oxidázy, jednoho z klíčových mitochondriálních enzymů zapojeného do energetického metabolismu buněk. Tyto modifikace pak indikují specifické zacílení kyseliny betulinové (**22**) právě na mitochondriální membrány rakovinových buněk.⁵⁴ Dále kyselina betulinová (**22**) působí protinádorově vůči maligním melanomům, plicním, ovariálním a cervikálním karcinomům,⁵⁵ či dokonce maligním mozgovým nádorům.⁵⁶ Její využití má v této oblasti velký potenciál, a to vzhledem k její selektivní cytotoxicitě na nádorové buněčné linie, nikoli však na normální buňky.⁵⁵ Kyselina betulinová (**22**) vykazuje také významnou anti-HIV aktivitu spočívající v inhibici replikace viru HIV v H9 lymfocytech.⁴² Mezi její další pozitivní biologická působení patří například protizánětlivé,⁵⁷ hepatoprotektivní,⁵⁸ či antidiabetické účinky.⁵⁹

Kyselina dihydrobetulinová (**23**) (Obr. č. 12) je dalším zástupcem pentacyklických triterpenů s lupanovým skeletem. Je produktem hydrogenace kyseliny betulinové (**22**) (Obr. č. 11), a to konkrétně dvojně vazby mezi uhlíky C-20 a C-29. Z biologických účinků kyseliny dihydrobetulinové (**23**) je významná například její značná antileishmaniální aktivita, jež spočívá v jejím zacílení na topoizomerázy I a II, tedy v indukci apoptózy buněk v parazitických prvocích *Leishmania donovani*.⁶⁰ Dalším významným biologickým působením kyseliny dihydrobetulinové (**23**) je její anti-HIV aktivita, přičemž obdobně jako kyselina betulinová (**22**) vykazuje inhibiční aktivitu vůči replikaci viru HIV v akutně infikovaných buňkách H9. Významná je pak rovněž anti-HIV aktivita jejich derivátů, která je mnohdy vyšší než u nemodifikovaných výchozích kyselin.⁶¹ Kyselina dihydrobetulinová (**23**) je také známá pro své protinádorové účinky, přičemž z tohoto hlediska jsou v dnešní době předmětem zkoumání především její deriváty.⁶²

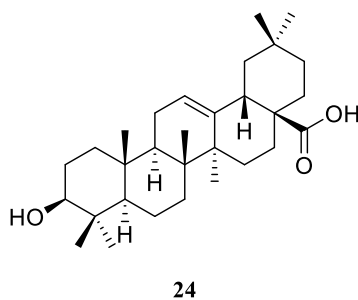


Obr. č. 12: Struktura kyseliny dihydrobetulinové (23)

1.1.2 Deriváty oleananu

Oleananové deriváty jsou skupinou pentacyklických triterpenů tvořených pěti šestičlennými cykly.⁴⁴ Mateřskou sloučeninou je třicetihlíkatý oleanan (18) (Obr. č. 9), jenž byl poprvé izolován z ropy. Řada oleananových derivátů se nachází v rostlinách jako povrchově aktivní glykosidy, tzv. saponiny, jejichž hydrolyzou jsou pak získávány bezcukerné aglykony, známé jako sapogeniny.⁴

Mezi nejvýznamnější zástupce oleananových triterpenoidů patří kyselina oleanolová (24) (Obr. č. 13) obsažená v listech olivovníku evropského (*Olea europaea*), v kořenech rostlin z rodu ženšen (*Panax*),⁴ v měsíčku lékařském (*Calendula officinalis*),²⁰ a také v tymiánu obecném (*Thymus vulgaris*).⁶³ Velmi často je kyselina oleanolová (24) součástí saponinů jako jejich aglykon.⁴ Vyznačuje se zejména protinádorovou aktivitou, například inhibicí proliferace a indukci apoptózy buněčné linie akutní promyelocytární leukémie.⁶⁴ Dále má kyselina oleanolová (24) protizánětlivé,⁶⁵ antioxidační, kardiovaskulární (antihypertenzivní),⁶⁶ nebo též hepatoprotektivní účinky, přičemž působí kupříkladu proti poškození jater zapříčiněného antituberkulotickou léčbou.⁶⁷ Rovněž, jako kyselina betulinová (22) (Obr. č. 11), se i kyselina oleanolová (24) vyznačuje antidiabetickými účinky.⁵⁹

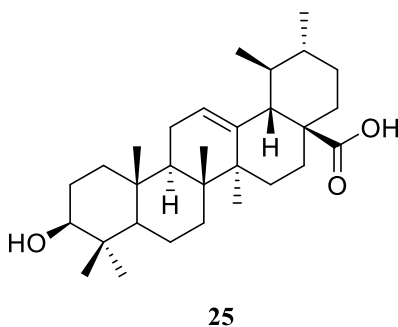


Obr. č. 13: Struktura kyseliny oleanolové (24)

1.1.3 Deriváty ursanu

Další skupinou pentacyklických triterpenů jsou ursanové deriváty, které jsou, stejně jako deriváty oleananové, tvořeny pěti šestičlennými cykly.⁴⁴

Nejvýznamnějším zástupcem ursanových triterpenoidů je derivát, jenž byl poprvé izolován z listů a bobulí keře medvědice lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi*). Jedná se o kyselinu ursolovou (**25**) (Obr. č. 14), která se nachází rovněž v bobulích klikvy velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon*), či v ochranném voskovém povlaku jablek, hrušek, švestek a dalších plodů.⁴ Mezi biologické účinky kyseliny ursolové (**25**) se řadí její protinádorové působení, kdy kupříkladu extrakt z jablečné slupky obsahující tuto kyselinu a některé její deriváty vykazoval antiproliferativní účinky v buňkách lidského karcinomu prsu MCF-7.⁶⁸ Obdobně jako kyselina oleanolová (**24**) (Obr. č. 13) vykazuje i kyselina ursolová (**25**) antioxidační, či kardiovaskulární (antihypertenzivní) účinky.⁶⁶ Kyselina ursolová (**25**) se také používá jako emulgátor ve farmaceutických přípravcích a potravinách.⁴



Obr. č. 14: Struktura kyseliny ursolové (**25**)

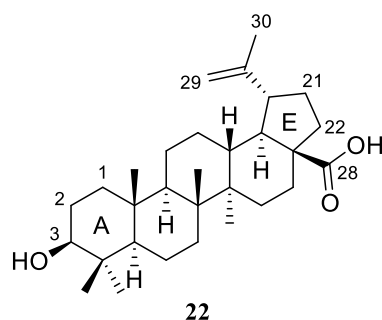
2. Heterocyklické deriváty triterpenů

Terpeny se těší velkému komerčnímu zájmu díky své široké škále funkčních vlastností, jež byly zevrubně popsány v první kapitole. Jsou využívány kupříkladu jako zesilovače permeace a antioxidanty v kosmetice, jako protiinfekční agens v zemědělských produktech, či jako antioxidační přísady do obalů potravin. Existuje však i několik problémů v užití terpenů do komerčních produktů spojených s jejich chemickou stabilitou a špatnou rozpustností ve vodě. Další důležitou aplikací terpenů představují farmaceutické produkty, v nichž terpeny vystupují jako bioaktivní sloučeniny nebo jako pomocné látky. Zde je potenciální výhodou terpenů skutečnost, že díky jejich mnohačetným mechanismům účinku je nepravděpodobné, že by si infekční agens vytvořily vůči terpenům rezistenci.⁶⁹

Triterpeny mají oproti průmyslově syntetizovaným sloučeninám řadu předností. Vyznačují se velkým rozsahem biologických účinků a nízkou toxicitou, jsou snadno dostupné z přírodních zdrojů, tudíž jsou i biologicky odbouratelné a neznamenaají žádnou hrozbu pro životní prostředí. Na druhou stranu je jejich aplikace v léčivech spíše sporadická, jelikož mají obecně vyšší terapeutické koncentrace ve srovnání s ostatními léčivy. Dále jsou triterpeny sloučeninami, které působí na více cílů, což ztěžuje především vyhledávání *in silico* modelů pro studium vztahů mezi strukturou a aktivitou, a také přípravu derivátů s vyšší rozpustností ve vodě, či vyšším účinkem. Velkou nevýhodou triterpenů je též jejich lipofilita, s níž úzce souvisí i obtížná adsorpce z gastrointestinálního traktu.⁷⁰ Příprava jejich semi-syntetických derivátů je tudíž velmi žádoucí. Příkladně jsou buď modifikovány jejich polární (hydroxy-, karboxy-) skupiny, či jiné funkční skupiny,⁷¹ nebo je prováděno připojení heterocyklu,⁷² přičemž právě heterocyklickými deriváty triterpenů se zabývá tato kapitola.

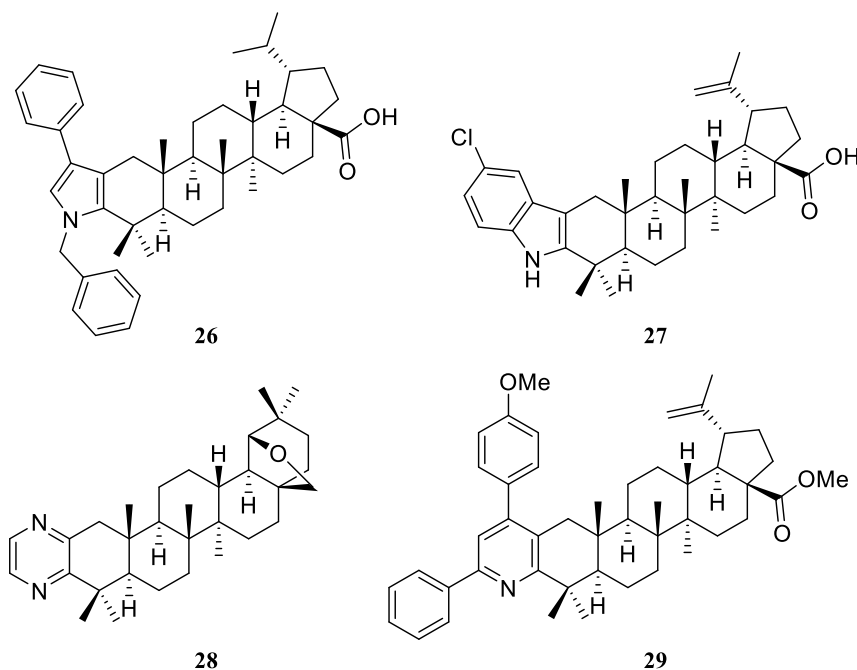
Příprava a používání heterocyklických derivátů triterpenů má své opodstatnění, jelikož jsou obecně stabilnější a nepodléhají tak snadno metabolické degradaci, přičemž aromatické heterocyklické deriváty též obvykle vykazují výraznější absorpci při ozáření UV světlem, což usnadňuje jejich detekci v mnoha studiích *in vivo* a následných klinických testech.⁷²

Derivatizaci jsou nejčastěji podrobovány pentacyklické triterpeny, příkladně kyselina betulinová (**22**). Modifikace jsou prováděny konkrétně v polohách C-3, či C-28, a méně často pak v polohách C-2, či C-29 (nebo C-30).⁷⁰ Heterocyklus je pak často přikondenzován k A-kruhu, a to přes uhlíky C-2 a C-3, ojedinelé též přes uhlíky C-1 a C-2. Další možností je připojení heterocyklu ke kruhu E přes uhlíky C-21 a C-22 (Obr. č. 15).⁷²



Obr. č. 15: Struktura kyseliny betulinové (**22**) s vyznačenými nejčastěji modifikovanými polohami

Nejčastěji připojovanými heterocykly jsou heterocykly dusíkaté,⁷² a to konkrétně pětičlenné cykly, například pyrrol⁷³ (**26**) a indol⁷³ (**27**) (Obr. č. 16), či šestičlenné kruhy, kupříkladu pyrazin⁷⁴ (**28**) a méně často pyridin⁷⁵ (**29**) (Obr. č. 16).



Obr. č. 16: Struktury vybraných derivátů triterpenů s připojeným pyrrolem (**26**), indolem (**27**), pyrazinem (**28**) a pyridinem (**29**)

2.1 Triterpenické deriváty s přikondenzovaným pyrazinem

Deriváty triterpenů s přikondenzovaným pyrazinem byly předmětem zkoumání již od 80. let minulého století, kdy byly poprvé syntetizovány Sejbalem *et al.* Ti původně připravovali izomerní ketony derivátů oleananů za podmínek Willgerodt-Kindlerovy reakce, přičemž přidáním ethylendiaminu (EDA) do reakční směsi získali dané pyrazinové deriváty. Konkrétně připravili čtyři deriváty triterpenů oleananového typu s přikondenzovaným pyrazinem, přičemž prvním získaným byl produkt **31** vycházející z allobetulonů (**30**) (Schéma č. 1).⁷⁶

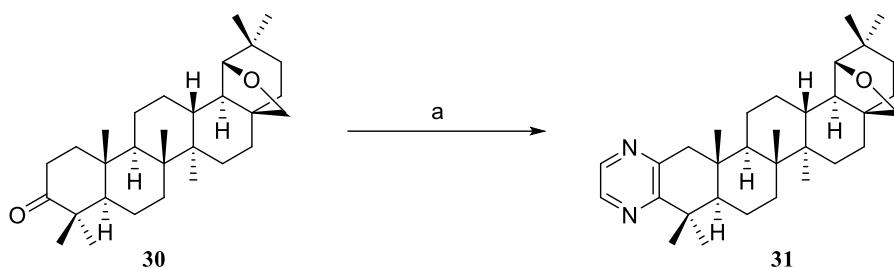
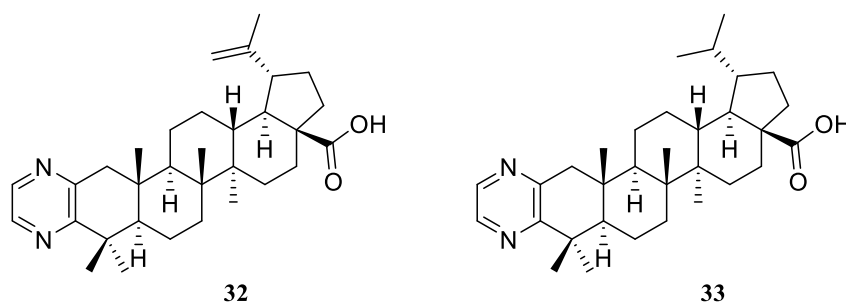


Schéma č. 1: Reakční schéma syntézy pyrazinového derivátu **31**. Podmínky: (a) síra, morfolin, ethylendiamin, reflux, 2 h, 88 %.

Syntézou pyrazinových derivátů lupanů a oleananů, se dále zabývali Urban *et al.*, jež pro jejich syntézu využívali právě podmínky Sejbala *et al.* U syntetizovaných produktů byla následně zjišťována cytotoxicita, přičemž některé deriváty vykazovaly značnou aktivitu. Příkladně pyrazinový derivát kyseliny betulinové **32** (Obr. č. 17) působil cytotoxicky vůči buňkám lidského adenokarcinomu plic A549 ($IC_{50} = 0,25 \mu\text{mol/l}$) a buňkám lidské chronické myeloidní leukemie K562 ($IC_{50} = 0,77 \mu\text{mol/l}$). Cytotoxicky účinný byl též produkt **33** (Obr. č. 17) odvozený od kyseliny dihydrobetulinové (**23**) (Obr. č. 12), jenž vykazoval hodnotu $IC_{50} = 2 \mu\text{mol/l}$ vůči buňkám lidského kolorektálního adenokarcinomu HT-29 a $IC_{50} = 8 \mu\text{mol/l}$ vůči buňkám lidské lymfoblastické leukemie CEM.⁷⁴



Obr. č. 17: Struktury lupanových pyrazinových derivátů **32** a **33**

Derivát **32** je také jediným z pyrazinových derivátů triterpenů, který vykazuje poměrně významnou aktivitu vůči osteoklastogenezi, tedy tvorbě osteoklastů zprostředkovávající kostní resorpci, a to konkrétně 58% inhibici jejich formace při koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$.⁷⁷ Derivát **32** má rovněž další potenciální aplikaci, a to vzhledem k jeho významným antileishmaniálním účinkům vůči amastigotům *Leishmania donovani*,⁷⁸ což jsou cytoplazmatické mikroorganismy oválného až kruhového tvaru rodu *Leishmania*,⁷⁹ kdy daný derivát **32** vykazoval 93% inhibici při koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$.⁷⁸

Hodoň *et al.* připravili oxidací derivátu **32** v poloze C-30 pomocí SeO_2 jeho aldehyd **34**, jenž vykazoval výrazné cytotoxické účinky, příkladně vůči buňkám lidské T-lymfoblastické leukemie CCRF-CEM ($\text{IC}_{50} = 0,67 \mu\text{mol/l}$), nicméně s nízkou selektivitou, kdy vykazoval $\text{IC}_{50} = 1,8 \mu\text{mol/l}$ vůči nenádorovým fibroblastům MRC-5. Daný derivát **34** byl proto esterifikován propargylbromidem za vzniku derivátu **35**, a ten byl poté podroben zavedení modifikované molekuly glukózy, za vzniku sloučeniny **36** (Schéma č. 2). Derivát **36** si zachoval cytotoxickou aktivitu vůči buňkám CCRF-CEM ($\text{IC}_{50} = 2,0 \mu\text{mol/l}$) a byl méně cytotoxický vůči oběma testovaným nerakovinovým fibroblastům, MRC-5 ($\text{IC}_{50} = 28 \mu\text{mol/l}$) a BJ ($\text{IC}_{50} = 26 \mu\text{mol/l}$), nicméně ztratil aktivitu i vůči některým nádorovým buněčným liniím.⁸⁰

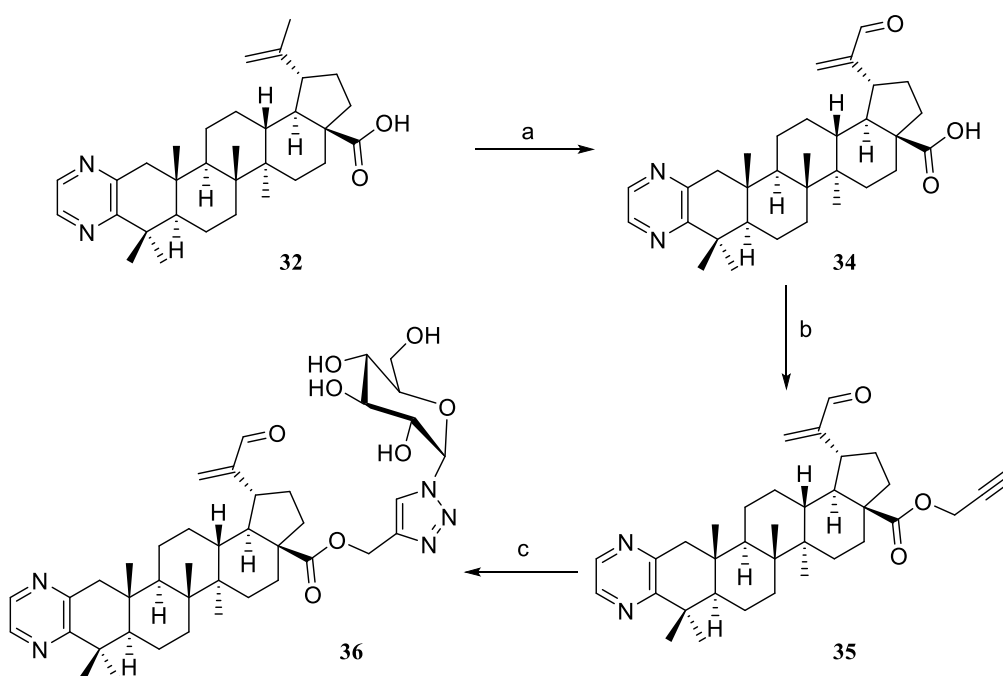


Schéma č. 2: Reakční schéma syntézy pyrazinového derivátu **36**. Podmínky: (a) SeO_2 , 2-methoxyethanol, reflux, 6 h, 55 %; (b) propargylbromid, K_2CO_3 , DMF, r. t., 4 h, 47 %; (c) β -D-glukopyranosyl azid, CuI , 40 $^\circ\text{C}$, 24 h, 29 %.

Dalším významným působením pyrazinových derivátů triterpenů je jejich antibakteriální a antifungální aktivita. Tuto aktivitu vykazovaly deriváty připravené Ghoshem *et al.*, kteří syntetizovali dané deriváty pomocí speciální one-pot mikrovlnné syntézy. Ketony daných triterpenů se nejdříve podrobily tzv. auto-oxidaci pomocí *t*-BuOK a O₂, za vzniku vicinálních diketonů. Ty se pak za působení mikrovlnného záření ponechaly reagovat s malými kousky kovového lithia a bezvodým EDA za tvorby pyrazinových produktů. Takto bylo připraveno pět pyrazinových derivátů, jež vykazovaly vyšší antibakteriální a antifungální aktivitu než jejich mateřské sloučeniny. Příkladně sloučenina **39** vykazovala vyšší antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím *Escherichia coli*, či *Shigella dysenteriae*, a také vůči plísním *Aspergillus niger*, či *Candida albicans*, než její mateřská sloučenina taraxeron (**37**). Ten byl v rámci syntézy daného pyrazinového derivátu **39** převeden auto-oxidací na jeho 2,3-dioxo derivát (**38**) (Schéma č. 3).⁸¹

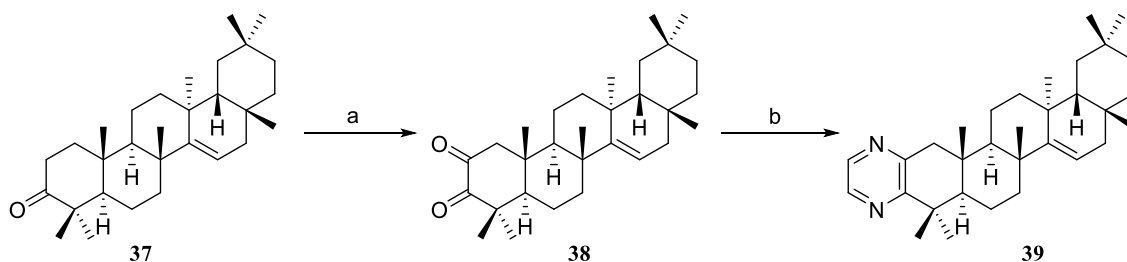


Schéma č. 3: Reakční schéma syntézy pyrazinového derivátu **39**. Podmínky:

(a) *t*-BuOK, O₂, 2 h; (b) MW, Li, EDA (bezvodý), 100 °C, 20 min.

2.2 Triterpenické deriváty s přikondenzovaným pyridinem

Ve srovnání s pyrazinovými triterpenickými deriváty nebyly triterpeny s přikondenzovaným pyridinem studovány tak často, a to především z důvodu jejich obtížnější přípravy.⁷²

Obecně se tvorbou pyridinových derivátů zabývali Abbiati *et al.*, kteří pro jejich přípravu využívali one-pot syntézu, kdy byl příslušný keton podroben reakci s propargylaminem v EtOH při 75 °C v přítomnosti katalyzátoru za vzniku daného pyridinového derivátu. Právě na volbu správného katalyzátoru a jeho efekt na výtěžek reakce byl výzkum zaměřen. Bylo zjištěno, že nejvhodnějšími katalyzátory pro tuto reakci jsou soli kovů, konkrétně pak soli zlatité (př. NaAuCl₄·2 H₂O) byly shledány jako neúčinnější a nejselektivnější, přičemž jejich použití je obecné, každopádně při použití reaktivních ketonů jsou vhodnými katalyzátory také soli mědi (př. CuCl).⁸²

Právě měďná sůl CuCl je hojně využívaným katalyzátorem při tvorbě pyridinových derivátů triterpenů za použití výše uvedených reagentů. Haavikko *et al.*, jež se věnovali syntéze heterocyklických derivátů lupanů s antileishmaniální aktivitou, tyto podmínky použili pro přípravu pyridinového derivátu **41** z kyseliny betulonové (**40**) (Schéma č. 4), každopádně pouze s 11% výtěžností. U tohoto derivátu pak byla zjištěna 88% inhibice při koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$, nicméně pouze 26% inhibice při koncentraci 15 $\mu\text{mol/l}$, což lze označit jako mírnou antileishmaniální aktivitu.⁷⁸

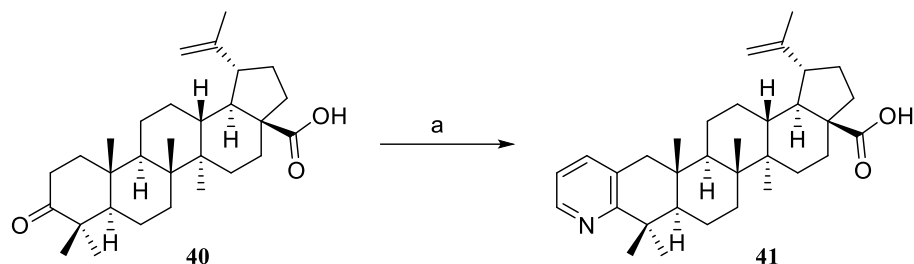
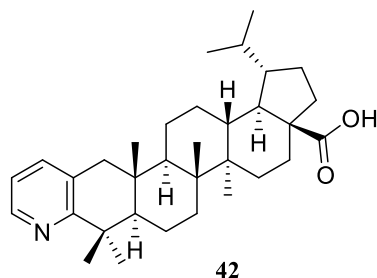


Schéma č. 4: Reakční schéma syntézy pyridinového derivátu **41**. Podmínky:

(a) propargylamin, CuCl, EtOH, reflux, 17 h, 11 %.

Derivát **41** byl rovněž za použití daných podmínek připraven Hodoněm *et al.*, kteří se zaměřili na jeho cytotoxickou aktivitu, přičemž bylo zjištěno, že daný derivát **41** je výrazně cytotoxicky aktivnější vůči daunorubicin rezistentním buňkám lidské T-lymfoblastické leukemie CEM-DNR ($\text{IC}_{50} = 2,4 \mu\text{mol/l}$) a taxol rezistentním buňkám lidské chronické myeloidní leukemie K562-TAX ($\text{IC}_{50} = 1,9 \mu\text{mol/l}$), než vůči příslušným nerezistentním nádorovým buněčným liniím CCRF-CEM a K562. Vykazoval vynikající chemickou, plazmatickou a mikrosomální stabilitu. Obdobně působil pyridinový derivát **42** (Obr. č. 18) odvozený od kyseliny dihydrobetulinové (**23**) (Obr. č. 12). Součástí daného výzkumu byly též pyridinové deriváty odvozené od kyseliny oleanolové (**24**) (Obr. č. 13) a ursolové (**25**) (Obr. č. 14), které však vykazovaly $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{mol/l}$ vůči většině nádorovým buněčným liniím, pročež nebyly podrobovány dalšímu zkoumání.⁸⁰



Obr. č. 18: Struktura pyridinového derivátu **42**

Hodoň *et al.* následně podrobili deriváty **41** (Schéma č. 4) a **42** (Obr. č. 18) derivatizaci v poloze C-28 s použitím 4-(chloromethyl)-5-methyl-1,3-dioxol-2-onu, KI, K₂CO₃ a acetonu za vzniku medoxomilových proléčiv **43** a **44** (Schéma č. 5), jež vykazovaly velmi silnou cytotoxickou aktivitu vůči buňkám lidské chronické myeloidní leukemie K562. Derivát **43** měl vůči této nádorové buněčné linii IC₅₀ = 0,037 μmol/l a derivát **44** IC₅₀ = 0,043 μmol/l. Tyto deriváty byly rovněž velmi selektivní.⁸⁰

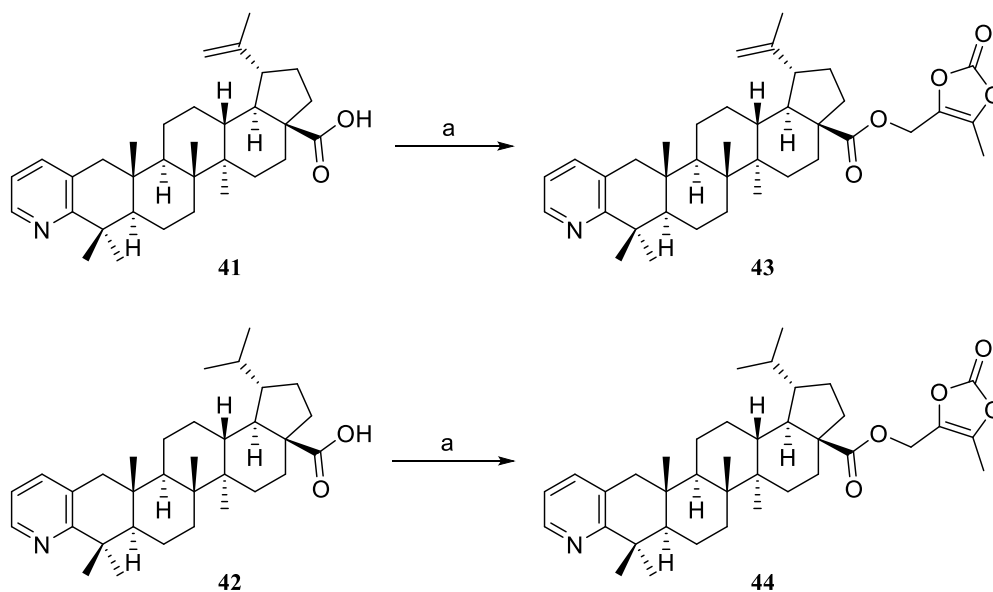


Schéma č. 5: Reakční schéma syntézy derivátů **43** a **44**. Podmínky: (a) 4-(chloromethyl)-5-methyl-1,3-dioxol-2-on, KI, K₂CO₃, aceton, r. t.

3. Vizualizace chemických látek v buňkách pomocí bioortogonální reakce

Vizualizace, nebo též zobrazení, malých molekul v buňkách představuje v současné době základní nástroj při objevování nových léčiv. Studovaná molekula je opatřena fluorescenční značkou, která umožňuje přímou vizualizaci buněčného příjmu a distribuce léčiva v buňce. Nejčastěji používanou metodou pro sledování těchto molekul je fluorescenční mikroskopie,⁸³ jež skýtá řadu výhod. Tato technika je minimálně invazivní, umožňuje dlouhodobější pozorování procesů v živých buňkách a tkáních, a je též mimořádně citlivá (až na úroveň jedné molekuly). Klíčovou výhodou této techniky představuje skutečnost, že lze zaměřit konkrétní funkční procesy specifickým připojením fluoroforů k molekulám, které nás zajímají.⁸⁴ Doposud byla popsána řada různých konjugátů malých molekul s různými fluorescenčními značkami.⁸³

Dnes je velmi často diskutovanou metodou vizualizace pomocí bioortogonálních reakcí, jejichž podstata se značně překrývá s tzv. click reakcemi.⁸⁵ Fakt, že jsou bioortogonální a click reakce aktuálním tématem je zejména Nobelova cena, kterou získali v roce 2022, právě za vývoj click a bioortogonální chemie, Carolyn R. Bertozzi, Morten Meldal a K. Barry Sharpless.

Click chemie je založena na syntéze látek pomocí spojování malých jednotek prostřednictvím heteroatomových vazeb C-X-C. Aby mohla být daná reakce označována jako click reakce, musí splňovat přísná kritéria, jimiž jsou tyto reakce striktně definovány. Reakce musí být modulární, mít široký rozsah, poskytovat velmi vysoké výtěžky, vytvářet pouze inertní vedlejší produkty, a být stereospecifická. Požadované vlastnosti procesu zahrnují jednoduché reakční podmínky, snadno dostupné reaktanty a činidla, používání žádného nebo neškodného rozpouštědla a jednoduchou, nechromatografickou izolaci produktu, který musí být stabilní za fyziologických podmínek. Cílem je vyvinout rozšiřující se soubor výkonných, selektivních a modulárních bloků, které spolehlivě fungují v malých i velkých aplikacích.⁸⁶ Click reakce jsou často, ale ne striktně, bioortogonální.⁸⁵

3.1 Bioortogonální reakce

Bioortogonální chemie zahrnuje třídu chemoselektivních a rychle probíhajících reakcí uskutečňujících se v biologickém prostředí,⁸⁵ které však s biologickým systémem neinteragují a ani do něj nezasahují. Bioortogonální reakcí se musí vytvořit stabilní kovalentní vazba mezi dvěma zúčastněnými funkčními skupinami, které jsou inertní vůči biologickým částem, a které jsou v ideálním případě netoxické. Pro optimální využitelnost by rovněž měla být alespoň jedna z těchto funkčních skupin malá. Reakce musí mít rychlou kinetiku, aby se produkt tvořil přiměřenou rychlostí i při velmi nízkých koncentracích reaktantů, a to ve fyziologickém rozmezí pH a teploty.⁸⁷

Jak bylo již zmíněno výše, podstata bioortogonálních reakcí se značně překrývá s click reakcemi, přičemž rozdílem je právě skutečnost, že click reakce zahrnují i selektivní reakce funkčních skupin, které se v molekulách biologických systémů běžně vyskytují.⁸⁵

Vývoj bioortogonálních reakcí pramenil ve snaze studia biomolekul v jejich přirozeném prostředí. Například geneticky kódované peptidové značky, a to především zelený fluorescenční protein (GFP), rozšířily repertoár proteinů, které lze v buněčných systémech zkoumat. Existuje však mnoho biomolekul, jako jsou nukleové kyseliny, lipidy a glykany, které nelze sledovat pomocí geneticky kódovaných reportérů. Zkoumání právě těchto biomolekul v živých systémech je uskutečňováno pomocí bioortogonálních chemických reakcí.⁸⁸

V současné době se při použití bioortogonální chemie ke zkoumání biomolekul v živých systémech postupuje ve dvou krocích. Nejprve se metabolický substrát, ligand malé molekuly, nebo inhibitor enzymu opatří jednou z bioortogonálních funkčních skupin, též nazývanou jako chemický reportér, a zavede se do biologického systému.⁸⁷ Substrátem může být monosacharid pro značení glykanů, nukleosid pro značení DNA, aminokyselina pro značení proteinů nebo mastná kyselina pro značení lipidů.⁸⁸ Nutno podotknout, že strukturní deformace daným metabolickým substrátem musí být minimální, a to proto, aby nedošlo k narušení přirozené bioaktivity molekuly. Jakmile je pak substrát opatřený chemickým reportérem začleněn do cílové biomolekuly, podléhá v druhém kroku reakci s molekulou sondy s komplementární bioortogonální funkční skupinou.⁸⁷

Mezi používané bioortogonální reakce se zařazuje oximová a hydrazonová ligace, Staudingerova ligace, mědi katalyzovaná azido-alkynová cykloadice a napětím podporovaná [3 + 2] cykloadice, tetrazinová ligace, kovem katalyzovaná couplingová reakce, a dále rovněž fotoindukovatelná bioortogonální reakce.⁸⁵

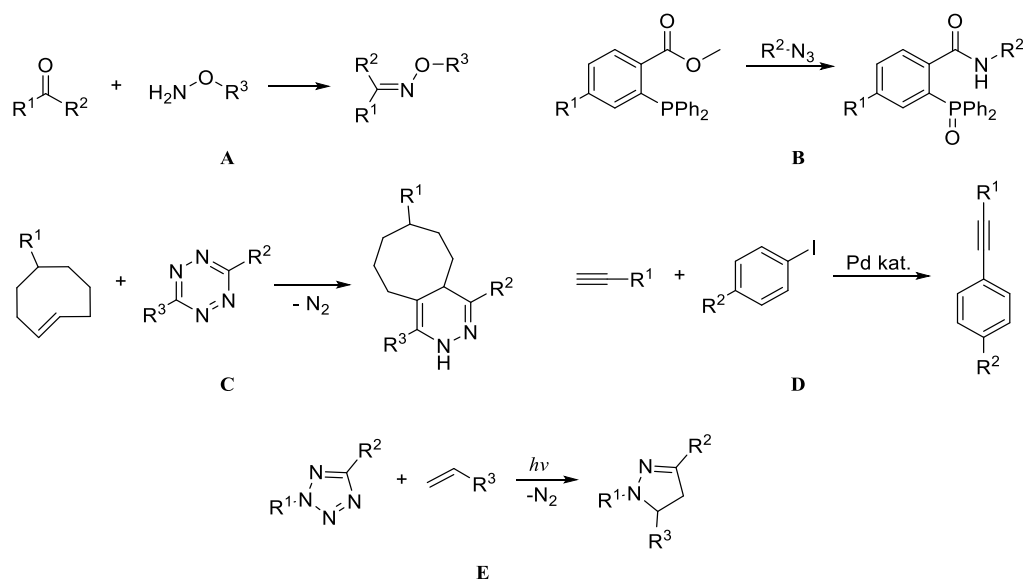
Tvorba oximů a hydrazonů kondenzací karbonylů s alkoxyaminy a hydraziny (Obr. č. 19-A),⁸⁵ tedy aminovými nukleofily zesílenými účinkem α -efektu,⁸⁸ představuje jedny z nejstarších reakcí, které se uplatňují při ligaci v biologických systémech.⁸⁵ Aldehydy a ketony se na povrchu buněk nevyskytují a v tomto prostředí mohou tedy sloužit jako jedinečné chemické reportéry.⁸⁸

Jako Staudingerova ligace se označuje reakce triarylfosfinů s organickými azidy, jíž jsou produkovány iminofosforanové meziprodukty, které hydrolyzují ve vodě za vzniku aminových, popř. amidových, a fosfinoxidových produktů (Obr. č. 19-B). Relativní snadnost Staudingerovy reakce a faktická nepřítomnost triarylfosfinů a azidů v biologickém prostředí poskytla ideální platformu pro vývoj bioortogonální reakce.⁸⁵

Diels-Alderova reakce s inverzními elektronovými požadavky (IEDDA) je dalším používaným typem bioortogonální reakce. Jedná se o reakci mezi dienofily bohatými na elektrony a dieny s elektronovým deficitem. Nejčastěji aplikovanou IEDDA reakcí je tetrazinová ligace, jíž rozumíme reakci mezi 1,2,4,5-tetrazinem a alkenovým nebo alkynovým dienofilem prostřednictvím [4 + 2] cykloadice, či retro [4 + 2] cykloadice za vzniku dihydropyridazinového, či pyridazinového konjugátu (Obr. č. 19-C).⁸⁵ Tento typ ligace našel uplatnění především při použití cyklického dienofilu, a to například trans-cyklooktenu,⁸⁵ či cyklooktynu.⁸⁹

Bioortogonální couplingové reakce katalyzované kovem jsou nejčastěji prováděny za použití palladia (Obr. č. 19-D), či ruthenia.⁸⁵ Aplikace katalyzátorů na bázi palladia našlo příkladně uplatnění při Suzuki-Miyaura cross-couplingových reakcích proteinů.⁹⁰ Ruthenia jako katalyzátoru bylo pak kupříkladu použito při křížové metatezi olefinů, jež byla rovněž využita pro bioortogonální chemii.⁹¹

Fotoindukovatelné bioortogonální reakce vykazují na rozdíl od tepelných procesů často vyšší výtěžky a selektivitu bez nutnosti katalýzy přechodnými kovy.⁸⁵ Příkladem efektivního využití světla k iniciaci selektivních reakcí v biologických systémech je tetrazol-alkenová cykloadice, též označovaná jako „fotoclick“ reakce (Obr. č. 19-E).⁹²



Obr. č. 19: Příklady bioortogonálních reakcí: (A) oximová ligace, (B) Staudingerova ligace, (C) tetrazinová ligace, (D) Pd katalyzovaná couplingová reakce, (E) fotoindukovaná tetrazol-alkenová ligace

3.1.1 Bioortogonální reakce azidu s alkyem

Azidové a terminální alkyenové funkční skupiny jsou velmi malé a nemají schopnost se spojovat s jinými molekulami stabilnějšími vazbami než slabými dipolárními interakcemi. Jsou tedy i v biologických systémech nereaktivní vůči většině přítomných molekul, a proto se mohou neporušené pohybovat buňkami a organismy. K jejich interakci dochází až tehdy, když jsou pro jejich reakci vytvořeny vhodné podmínky, nebo jsou přidány příslušné katalyzátory.⁸⁵

Azidy reagují s alkyeny za vzniku triazolů reakcí označovanou jako Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice. Původní Huisgenova cykloadice vykazovala velmi pomalou kinetiku, a proto byla prováděna za zvýšených teplot a tlaků, což nebylo v souladu s její využitelností v biologických systémech.⁸⁷ Další nevýhodou tohoto způsobu reakce byla též nepřívětivá regioselektivita, kdy byla získávána směs 1,4- a 1,5-disubstituovaných triazolů (Schéma č. 6).⁹³

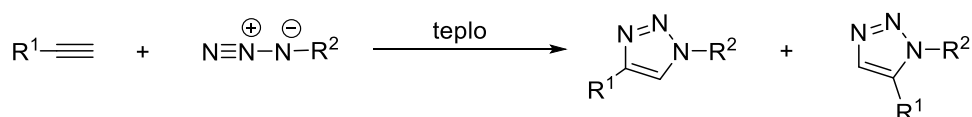


Schéma č. 6: Reakční schéma původní Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice

Dalším a velmi významným způsobem provedení Huisgenovy cykloadice azidů s alkyny je reakce za použití měďných katalyzátorů (CuAAC). Tento způsob publikovali v roce 2002 nezávisle na sobě Sharpless *et al.*⁹³ a Meldal *et al.*⁹⁴ Zavedení měďných katalyzátorů změnilo tento proces v široce použitelný tím, že došlo k urychlení tvorby triazolů až 100 milionkrát,⁸⁵ a rovněž k významnému zvýšení regiosektivity dané reakce.⁹⁵ Takto katalyzovaná azido-alkynová cykloadice umožňuje exkluzivní tvorbu 1,4-disubstituovaných triazolů, které jsou z hlediska velikosti a tvaru přívětivými napodobeninami nativních trans-amidových vazeb na bázi peptidů a jsou mnohem stabilnější vůči tepelnému a chemickému štěpení než amidy.⁸⁵

Reakce probíhá ve více stupních za tvorby snadno vznikajícího binukleárního intermediátu – acetylidu měďného, přičemž jako ligand pro měď byl použit acetonitril, nebo též voda, jež vykazovala obdobné výsledky.⁹⁶ Mechanismus dané reakce navrhl, dle předlohy z publikace Sharplesse *et al.*,⁹³ v roce 2004 Himo *et al.*, kteří dle porovnání experimentálních dat s výpočty DFT potvrdili, že navržený mechanismus vysvětluje klíčové body experimentu, ačkoli jsou jeho součástí nebyvalé, kov obsahující acyklické meziproducty (Schéma č. 7). Potvrzené klíčové body experimentu představovaly dramatický nárůst rychlosti pozorovaný při syntéze triazolů katalyzované měďnými katalyzátory shodující se s vypočtenými aktivačními bariérami, jež jsou až o 11 kcal/mol nižší než u odpovídajících cykloadic, a dále výlučná regiosektivita procesů katalyzovaných Cu^I jak předpovězena výpočtem, tak pozorována experimentálně.⁹⁶

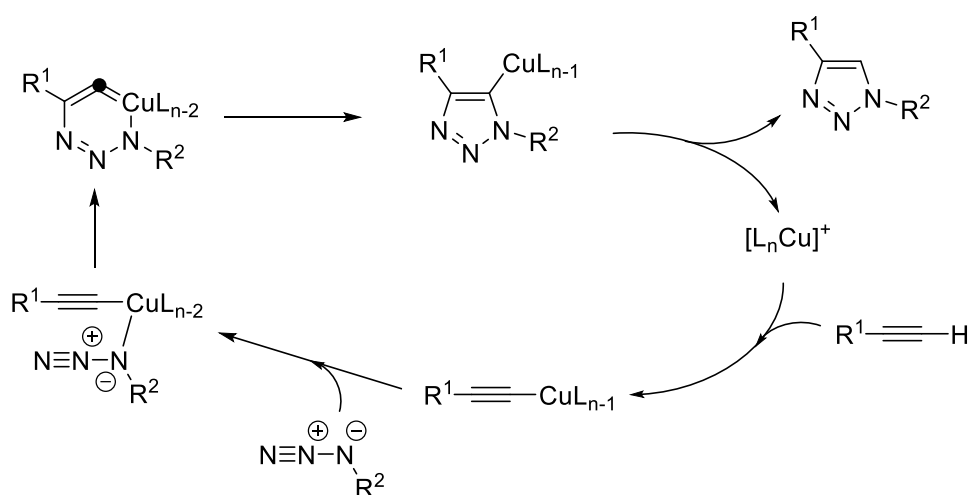


Schéma č. 7: Navržený mechanismus Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice katalyzované Cu^I

Jako katalyzátory mohou být používány přímo měďné soli, jako je například CuI, CuOTf·C₆H₆, či [Cu(NCCH₃)₄][PF₆], přičemž tyto reakce obvykle vyžadují acetonitril jako kosolvent a jeden ekvivalent dusíkaté báze, například 2,6-lutidin, triethylamin, diisopropylethylamin, nebo pyridin. Takto katalyzované reakce nicméně vytvářejí též vedlejší produkty.⁹³ Druhou možností je tedy generování měďného katalyzátoru *in situ* z levnějších a často i čistších měďnatých solí, příkladně CuSO₄·5 H₂O, jež jsou redukovány askorbanem sodným nebo kyselinou askorbovou.^{93,96} Výhodou tohoto způsobu generování měďného katalyzátoru je právě přítomnost mírného nadbytku příslušného redukčního činidla, které zabraňuje tvorbě oxidačních coupling produktů.⁹⁶

Nicméně vzhledem k toxicitě měďných katalyzátorů byl objeven třetí způsob provedení cykloadice alkyne s azidem. Konkrétně se jedná o napětím podporovanou [3 + 2] cykloadici (SPAAC), jež probíhá mezi azidem a cykloalkynem, nejčastěji substituovaným cyklooktynem (Schéma č. 8). Pnutí v cyklooktynovém kruhu totiž způsobuje, že reakce s azidem probíhá bez použití jakéhokoliv katalyzátoru, poměrně rychle, selektivně, za mírných podmínek a vzniklé reakční produkty jsou netoxické pro živý systém, v němž se tato reakce uskutečňuje.⁸⁹

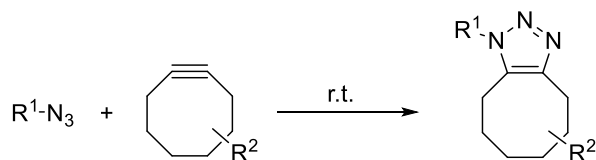
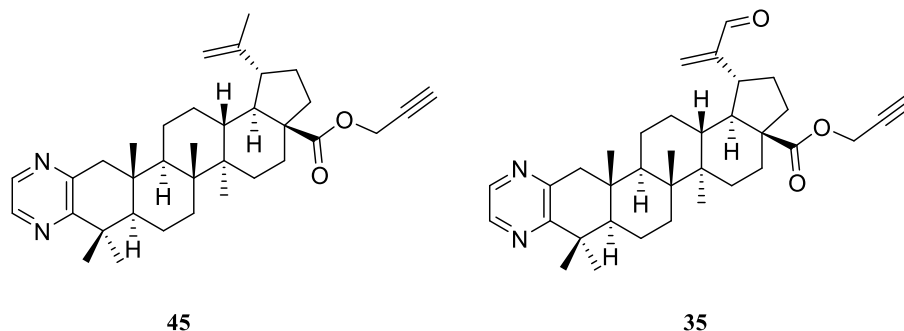


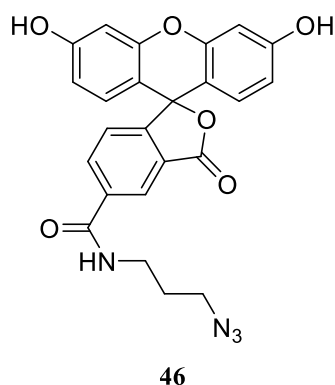
Schéma č. 8: Reakční schéma napětím podporované [3 + 2] azido-alkynové cykloadice

Jak bylo již zmíněno výše, bioortogonální reakce jsou vhodným nástrojem pro pozorování určitých molekul přímo v biologických systémech, přičemž právě azido-alkynovou cykloadici katalyzovanou měďnými katalyzátory použili pro vizualizaci triterpenoidních derivátů Hodoň *et al.* V kapitole 2.1 byly popsány z hlediska cytotoxické aktivity molekuly **32** (Obr. č. 17) a **34** (Schéma č. 2). Pro přímou vizualizaci buněčného cíle těchto molekul byly použity jejich deriváty **45** a **35** (Obr. č. 20) opatřené propargylesterovou skupinou v poloze C-28.⁸⁰



Obr. č. 20: Struktury derivátů **45** a **35**

Pro vizualizační experimenty byly využity buňky lidské T-lymfoblastické leukemie CCRF-CEM a lidská epiteliální buněčná linie HeLa, jež byly inkubovány 10 μ M roztoky sloučenin **45** nebo **35** (Obr. č. 20) po dobu 4 h, fixovány a následně byly testované sloučeniny vizualizovány pomocí click reakce s 5-FAM azidem (**46**) (Obr. č. 21) za katalýzy měďných iontů. Tyto deriváty byly poté pozorovány pomocí fluorescenční mikroskopie. V případě sloučeniny **45** nebyl po click reakci pozorován žádný signál jak v buňkách CCRF-CEM, tak HeLa. Sloučenina **35** však poskytovala signál v buněčné linii HeLa, nicméně nebyla tak jasně viditelná v buňkách CCRF-CEM. S ohledem na další experimenty popsané v příslušné publikaci bylo však potvrzeno, že cílem derivátů **45** a **35**, a tedy i derivátů **32** (Obr. č. 17) a **34** (Schéma č. 2), jsou mitochondrie zejména nádorových buněk.⁸⁰



Obr. č. 21: Struktura 5-FAM azidu (**46**)

Výsledky a diskuze

1. Příprava výchozích látek

Vybranými výchozími látkami této bakalářské práce byly kyseliny betulonová (**II**) a dihydrobetulonová (**III**). Tyto kyseliny byly podrobeny připojení pyrazinového, či pyridinového heterocyklu k A-kruhu přes uhlíky C-2 a C-3. Kyselina betulonová (**II**) byla syntetizována oxidací kyseliny betulinové (**I**). Kyselina dihydrobetulonová (**III**) byla zakoupena. Připraven byl pyrazinový (**IV**) a pyridinový (**V**) derivát kyseliny dihydrobetulonové (**III**) a pyridinový derivát (**VI**) odvozený od kyseliny betulonové (**II**). Pyrazinový derivát kyseliny betulonové (**32**) (Obr. č. 17) připravován nebyl, jelikož tento a jeho deriváty byly předmětem zkoumání Hodoně *et al.*⁸⁰

1.1 Kyselina betulonová (**II**)

Kyselina betulonová (**II**) byla připravena oxidací kyseliny betulinové (**I**) (Schéma č. 9) za použití 1,8 ekv. dihydrátu dichromanu sodného a 1,5 ekv. bezvodého octanu sodného ve směsi rozpouštědel dle modifikovaného postupu převzatého z literatury.⁹⁷ Výtěžek reakce byl 80 % a ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁹⁸

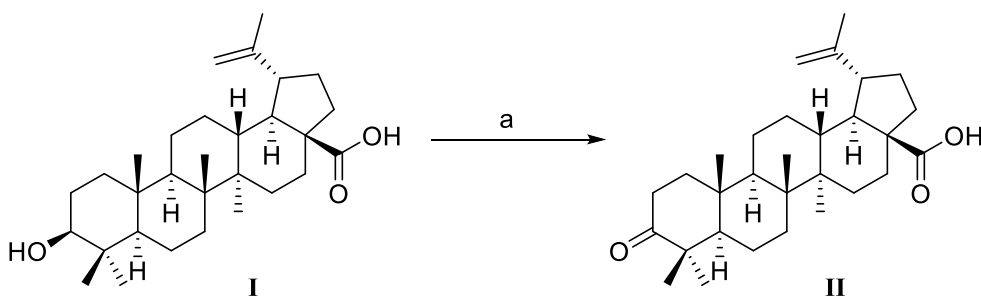


Schéma č. 9: Reakční schéma syntézy kyseliny betulonové (**II**).

Podmínky: (a) Na₂CrO₄·2 H₂O, AcONa, 1,2-dioxan, AcOH, acetanhydrid, r. t., 24 h.

1.2 Pyrazinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (**IV**)

Kyselina dihydrobetulonová (**III**) byla podrobena reakci s EDA a sírou s použitím morfolinu jako rozpouštědla za vzniku jejího pyrazinového derivátu (**IV**)

(Schéma č. 10).⁷⁶ Tento produkt byl získán v 77% výtěžku. Derivát **IV** byl již popsán a jeho ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁷⁴

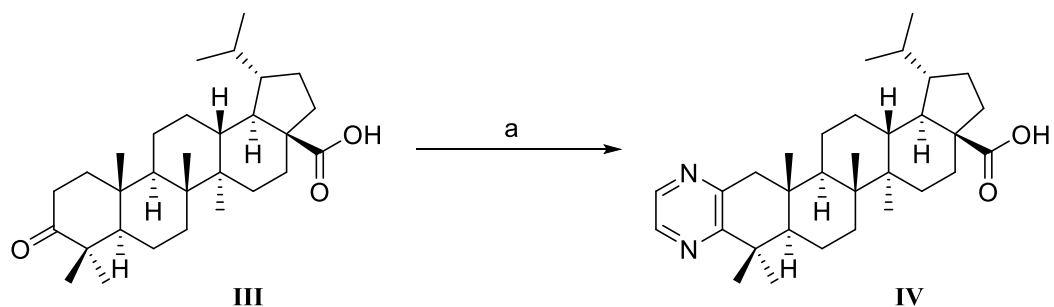


Schéma č. 10: Reakční schéma syntézy pyrazinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**IV**). Podmínky: (a) EDA, síra, morfolin, 135 °C, 4,5 h.

1.3 Pyridinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (**V**)

Pyridinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (**V**) byl produktem reakce kyseliny dihydrobetulonové (**III**) se 6,0 ekv. propargylaminu v bezvodém EtOH za katalýzy NaAuCl₄·2 H₂O (Schéma č. 11).⁸⁰ Výtěžek reakce byl 34 %. Zdůvodnění takto nízkého výtěžku je použití částečně rozloženého propargylaminu, jenž byl pro využití v reakci přečištěn pomocí aktivního uhlí a přefiltrován. Tento derivát byl již popsán, přičemž ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁸⁰

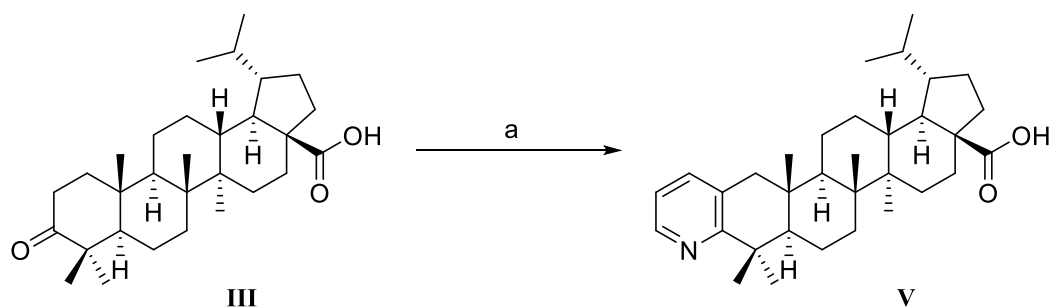


Schéma č. 11: Reakční schéma syntézy pyridinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**V**). Podmínky: (a) propargylamin, NaAuCl₄·2 H₂O, EtOH (bezvodý), 95 °C, 48 h.

1.4 Pyridinový derivát kyseliny betulonové (**VI**)

Pyridinový derivát kyseliny betulonové (**VI**) byl připraven analogickou reakcí jako pyridinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (**V**). Pro reakci byla použita kyselina

betulonová (**II**), propargylamin (6,0 ekv.), bezvodý EtOH a NaAuCl₄·2 H₂O jako katalyzátor (Schéma č. 12).⁸⁰ Reakce byla prováděna 2×, přičemž při prvním provedení byl použit částečně rozložený propargylamin přečištěný pomocí aktivního uhlí a výtěžek reakce byl 31 %. Při druhém pokusu bylo pro přečištění příslušného propargylaminu využito destilace, což mělo za následek zvýšení výtěžku reakce na 50 %. Produkt byl již také popsán a ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁷⁸

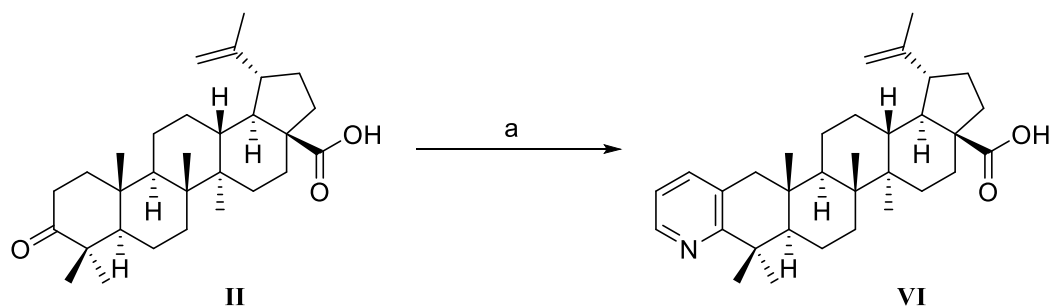


Schéma č. 12: Reakční schéma syntézy pyridinového derivátu kyseliny betulonové (**VI**). Podmínky: (a) propargylamin, NaAuCl₄·2 H₂O, EtOH (bezvodý), 95 °C, 65–72 h.

2. Derivatizace pyrazinových a pyridinových derivátů

Po přípravě pyrazinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) a pyridinových derivátů kyseliny betulonové (**VI**) a dihydrobetulonové (**V**) byla cílem jejich derivatizace v poloze C-28. Tento způsob derivatizace probíhal poměrně snadno. Následně byla rovněž vykonána derivatizace v poloze C-30, jenž byla realizována pouze u pyridinového derivátu kyseliny betulonové (**VI**) a naopak vyžadovala individuálnější přístup za použití vhodné protektivní skupiny v poloze C-28.

2.1 Derivatizace v poloze C-28

Všechny výše uvedené triterpenické heterocyklické deriváty (**IV**, **V**, **VI**) byly substitučně derivatizovány v poloze C-28 dvojným způsobem. Ve výsledku bylo vytvořeno šest nových derivátů: tři finální produkty (**VII**, **VIII**, **IX**) s propargylesterovou skupinou v poloze C-28, a rovněž tři finální amidické deriváty (**X**, **XI**, **XII**) s azidovým linkerem v téže poloze.

2.1.1 Příprava derivátů VII, VIII, IX

Pro přípravu derivátů s propargylesterovou skupinou v poloze C-28 byly zvoleny podmínky Hodoně *et al.*, jež tyto podmínky aplikovali pro syntézu obdobných derivátů pyrazinového derivátu kyseliny betulonové (**32**) (Obr. č. 17).⁸⁰ Výchozí triterpenické deriváty (**IV**, **V**, **VI**) reagovaly s 10,0 ekv. propargylbromidu a 10,0 ekv. K₂CO₃ za přítomnosti THF jako rozpouštědla.

Derivát **VII** byl připraven z pyrazinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) (Schéma č. 13) s výtěžkem 69 %. Jeho struktura byla potvrzena pomocí spektrálních dat, kdy v ¹H NMR spektru byl nalezen charakteristický dublet dubletu při 8.41 ppm a dublet při 8.27 ppm odpovídající dvěma vodíkům na pyrazinovém kruhu. Dále pak dva charakteristické dublety dubletu při 4.70 ppm a 4.63 ppm, jež odpovídají dvěma vodíkům právě na C-28 navázaném propargylesteru, přičemž signál vodíku terminálního alkyngu tohoto substituentu byl nalezen jako triplet při 2.42 ppm. Ve spektru byly rovněž nalezeny signály charakteristické pro skelet kyseliny dihydrobetulonové (**III**), jakož je příkladně sedm signálů v rozmezí 1.30–0.77 ppm s integrálem tři odpovídající vodíkům v sedmi skeletálních CH₃ skupinách, či dva dublety při 3.05 ppm a 2.47 ppm odpovídající dvěma H-1 vodíkům, jejichž chemický posun je ovlivněn přítomností pyrazinového kruhu. Přítomnost alkyonové skupiny byla potvrzena také IR spektrem signálem při 3277 cm⁻¹.

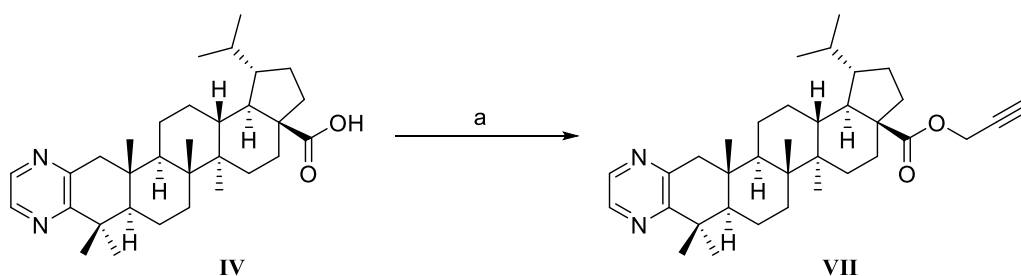


Schéma č. 13: Reakční schéma syntézy derivátu **VII**. Podmínky: (a) propargylbromid, K₂CO₃, THF, reflux, 2,5 h.

Derivát **VIII** byl syntetizován z pyridinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**V**) (Schéma č. 14) za 76% výtěžku. Jeho struktura byla potvrzena ¹H NMR spektrem, v němž byly, kromě signálů typických pro skelet kyseliny dihydrobetulonové (**III**), nalezeny tři charakteristické signály odpovídající třem vodíkům pyridinového kruhu. Konkrétně se jednalo o dublet dubletu při 8.45 ppm, dublet při 7.24 ppm a dublet dubletu při 6.97 ppm. Dále rovněž dva dublety dubletu při 4.70 ppm a 4.62 ppm odpovídající dvěma vodíkům

propargylesteru na C-28 a triplet při 2.42 odpovídající vodíku na terminálním alkyne. Při 2.74 ppm je poté dublet, jež odpovídá vodíku H-1, přičemž signál druhého vodíku H-1 splývá v multiplot s jinými signály. Přítomnost alkyonové skupiny byla prokázána v IR spektru signálem při 3282 cm^{-1} .

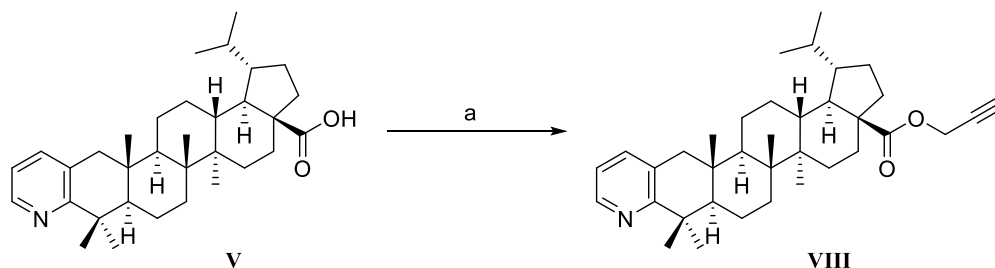


Schéma č. 14: Reakční schéma syntézy derivátu **VIII**. Podmínky: (a) propargylbromid, K_2CO_3 , THF, reflux, 2 h.

Derivát **IX** byl připraven z pyridinového derivátu kyseliny betulonové (**VI**) (Schéma č. 15) s výtěžkem 90 %. Struktura derivátu **IX** byla potvrzena pomocí ^1H NMR spektra, kde byly, kromě signálů charakteristických pro pyridinový kruh připojený přes uhlíky C-2 a C-3 k A kruhu, nalezeny dva signály odpovídající dvěma H-29 vodíkům kyseliny betulonové (**II**), kdy první signál je dubletem při 4.76 ppm a druhý splývá se signálem vodíku propargylesterové skupiny na C-28 v multiplot s integrálem dva při 4.64 ppm. Signál odpovídající druhému vodíku na propargylesterové skupině je dublet dubletu při 4.72 ppm. Charakteristický triplet odpovídající vodíku na terminálním alkyne byl nalezen při 2.44 ppm. Pro skelet kyseliny betulonové (**II**) byly ve spektru nalezeny charakteristické signály, jako triplet dubletu při 3.05 ppm s integrálem jedna odpovídající vodíku H-19, singlet při 1.70 ppm s integrálem tři odpovídající vodíkům methylu C-30, či pět singletů s integrálem tři odpovídající vodíkům pěti skeletálních CH_3 skupin. Přítomnost alkyonové skupiny byla potvrzena signálem v IR spektru při 3285 cm^{-1} .

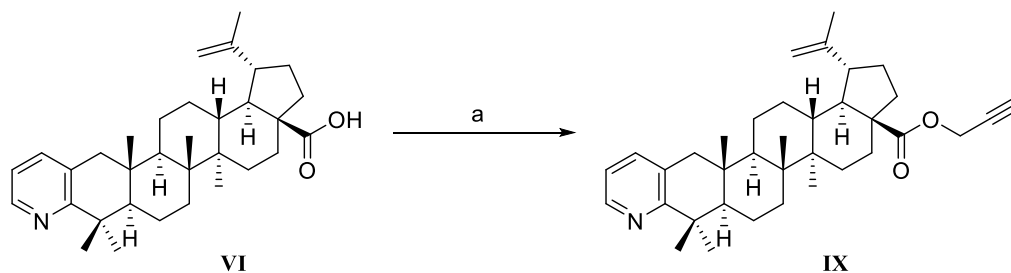


Schéma č. 15: Reakční schéma syntézy derivátu **IX**. Podmínky: (a) propargylbromid, K_2CO_3 , THF, reflux, 2,5 h.

2.1.2 Příprava derivátů X, XI, XII

Pro syntézu amidických derivátů opatřených azidovým linkerem v poloze C-28 bylo použito modifikovaných podmínek pro obecnou přípravu amidů.⁹⁹ Deriváty **X**, **XI**, **XII** byly připraveny reakcí příslušného výchozího triterpenického derivátu se 2,0 ekv. 11-azido-3,6,9-trioxaundekan-1-aminu (dále jen odpovídající amin) v prostředí EDC (1,5 ekv.), HOBt (1,5 ekv.) a DIPEA (1,5 ekv.). V případě nedostatku kapalných složek byl přidán DMF jako rozpouštědlo.

Derivát **X** byl připraven z pyrazinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) (Schéma č. 16) s výtěžkem 69 %. Struktura připraveného derivátu **X** byla potvrzena pomocí ¹H NMR spektra, v němž byly, kromě signálů typických pro pyrazinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (**IV**), nalezeny signály charakteristické pro azidový linker navázaný v poloze C-28 prostřednictvím amidu. Konkrétně byl nalezen charakteristický triplet při 6.02 ppm odpovídající amidovému vodíku, dále dva multiplety při 3.67 ppm s integrálem osm a při 3.62 ppm s integrálem dva, triplet při 3.54 ppm s integrálem dva, multiplet při 3.45 ppm s integrálem dva a triplet při 3.39 ppm s integrálem dva, jež odpovídají šestnácti vodíkům na příslušném azidovém linkeru. Přítomnost azidové skupiny byla prokázána v IR spektru signálem při 2101 cm⁻¹.

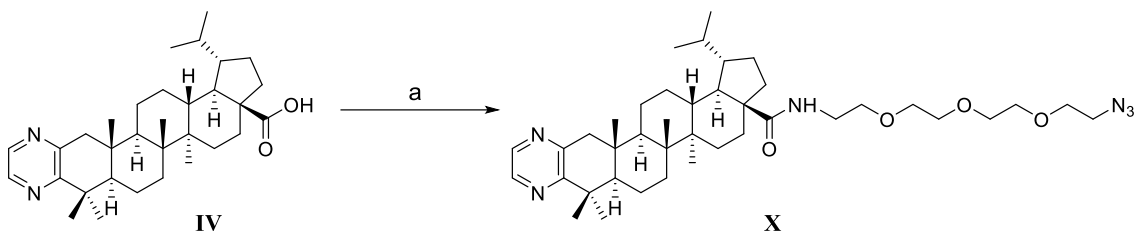


Schéma č. 16: Reakční schéma syntézy derivátu **X**. Podmínky: (a) odpovídající amin, EDC, HOBt, DIPEA, r. t., 6 h.

Derivát **XI** byl syntetizován z pyridinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**V**) (Schéma č. 17) s 84% výtěžkem. Struktura derivátu **XI** byla potvrzena ¹H NMR spektrem, v němž byly nalezeny, kromě signálů charakteristických pro pyridinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (**V**), signály typické pro azidový linker v poloze C-28. Při 6.03 ppm byl nalezen triplet amidického vodíku a v rozmezí 3.66–3.38 ppm sada multipletů a tripletů s celkovým integrálem šestnáct odpovídající vodíkům na azidovém linkeru. Přítomnost azidové skupiny byla potvrzena signálem v IR spektru při 2100 cm⁻¹.

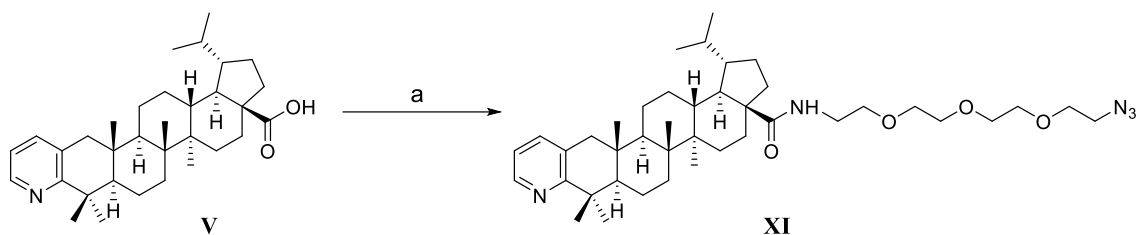


Schéma č. 17: Reakční schéma syntézy derivátu **XI**. Podmínky: (a) odpovídající amin, EDC, HOBt, DIPEA, DMF, r. t., 24 h.

Derivát **XII** byl připraven z pyridinového derivátu kyseliny betulonové (**VI**) (Schéma č. 18) za 75% výtěžku. Struktura derivátu **XII** byla potvrzena pomocí ^1H NMR spektra, ve kterém byly, kromě signálů typických pro pyridinový derivát kyseliny betulonové (**VI**), jako je triplet dubletu odpovídající vodíku H-19 při 3.15 ppm, nalezeny rovněž signály odpovídající vodíkům na C-28 navázaném azidovém linkeru, a to triplet při 6.05 ppm odpovídající vodíku amidu, či sadu čtyř multipletů a jednoho tripletu v rozmezí 3.67–3.39 ppm s celkovým integrálem šestnáct odpovídající vodíkům azidového linkeru. Přítomnost azidové skupiny byla prokázána IR spektrem, a to signálem při 2100 cm^{-1} .

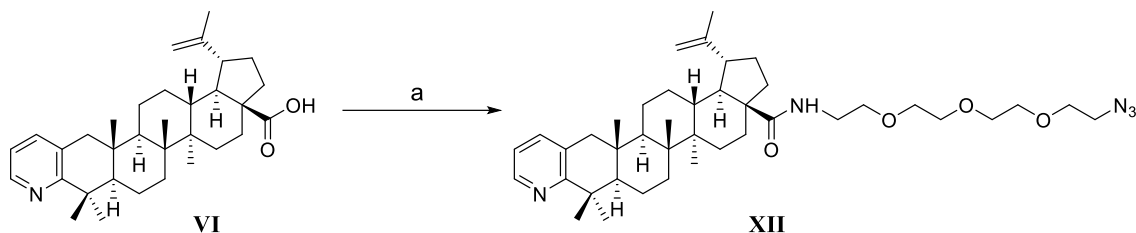


Schéma č. 18: Reakční schéma syntézy derivátu **XII**. Podmínky: (a) odpovídající amin, EDC, HOBt, DIPEA, DMF, r. t., 21 h.

2.2 Derivatizace v poloze C-30

Jak bylo již zmíněno výše, pro derivatizaci v poloze C-30 bylo nutné zvolit specifitější přístup, než u modifikace polohy C-28. Pro tento typ derivatizace byl zvolen jako reaktant pyridinový derivát kyseliny betulonové (VI), přičemž kýženým produktem byl amidický derivát s azidovým linkerem v poloze C-30 (XVII). Bylo navrženo obecné reakční schéma (Schéma č. 19) popisující jednotlivé kroky syntézy, nímž se příslušná reakční sekvence po celou dobu řídila. Velmi důležitým krokem byla především volba vhodné protektivní skupiny pro karboxylovou skupinu v poloze C-28.

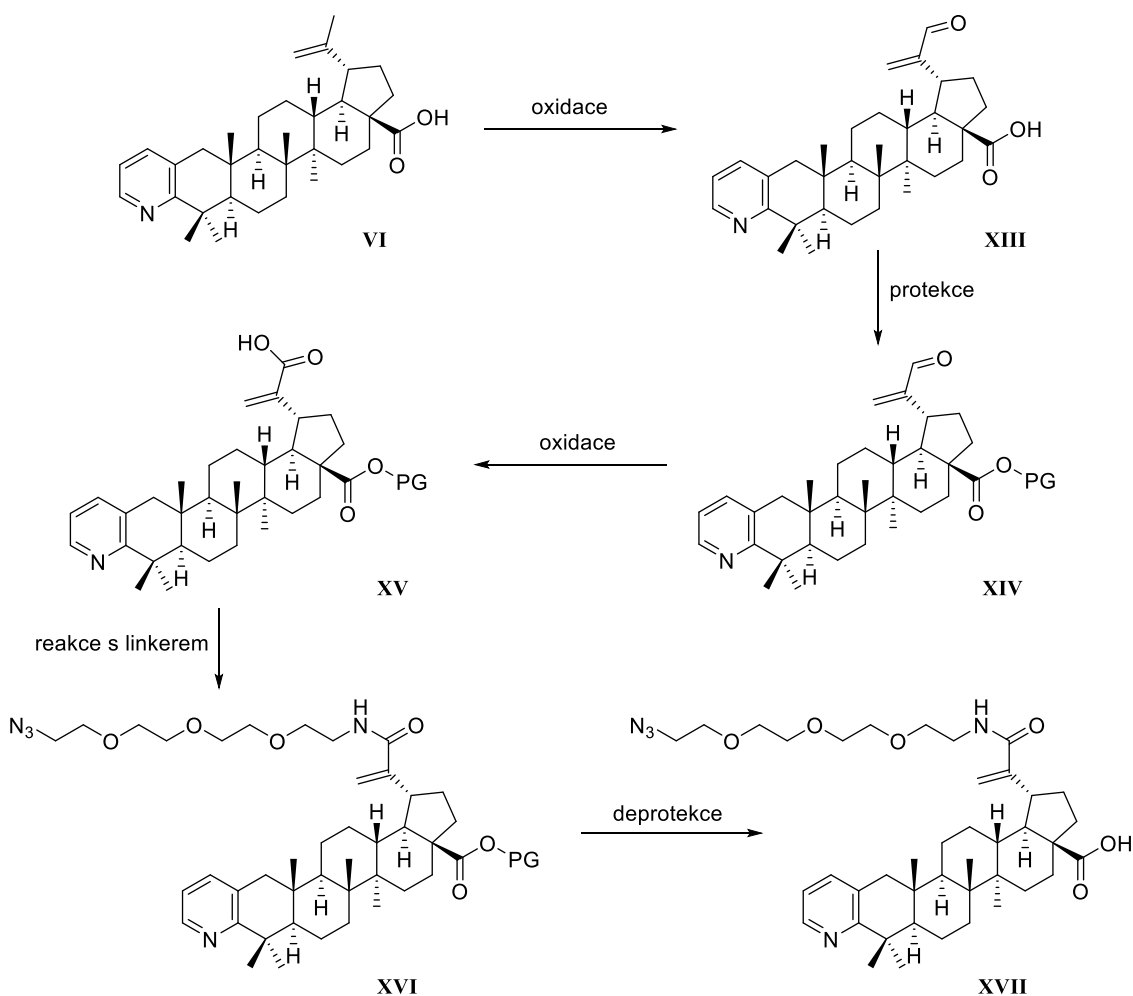


Schéma č. 19: Obecné reakční schéma syntézy amidického derivátu s azidovým linkerem v poloze C-30 (XVII)

2.2.1 Oxidace na aldehyd

Pro oxidaci pyridinového derivátu kyseliny betulonové (**VI**) na aldehyd v poloze C-30 (**XIII**) byly vybrány podmínky za použití 2,0 ekv. SeO_2 jako oxidačního činidla a methoxyethanolu dle Hodoně *et al.*, jež tyto podmínky používali pro získání derivátu s aldehydickou skupinou v poloze C-30 (**34**) (Schéma č. 2) z analogického pyrazinového derivátu kyseliny betulonové (**32**) (Schéma č. 2).⁸⁰ Tyto podmínky se však překvapivě ukázaly jako nevyhovující, jelikož nedocházelo ke zdatelné konverzi. Reakce byla dále provedena za optimalizovaných podmínek, s 2,2 ekv. SeO_2 , nicméně bez pozitivního výsledku. Tudíž bylo od těchto podmínek upuštěno.

Druhým vyzkoušeným způsobem bylo využití podmínek rovněž se 2,0 ekv. SeO_2 . Rozdílem byla aplikace *t*-BuOOH (2,2 ekv.) a SiO_2 v DCM.¹⁰⁰ Tento způsob reakce se ukázal jako částečně úspěšný. Produkt byl sice získán, nicméně vzhledem k počtu nadcházejících kroků reakční sekvence (Schéma č. 19), za poměrně nízkého, 31% výtěžku, protože byly i tyto podmínky oxidace shledány jako nevyhovující.

Třetí metodu oxidace pyridinového derivátu kyseliny betulonové (**VI**) na aldehyd (**XIII**) taktéž představovalo použití 2,0 ekv. SeO_2 . Na rozdíl od výše uvedených podmínek byly použity 3,0 ekv. *t*-BuOOH a namísto SiO_2 byla použita AcOH v poměru 2:3 vůči rozpouštědлу, kterým byl opět DCM (Schéma č. 20).¹⁰¹ Vzhledem k výtěžku 59 %, byl tento přístup shledán jako nejvhodnější pro získání kýženého produktu **XIII**, a tudíž byl pro účely přípravy tohoto derivátu několikrát využit.

Struktura připraveného derivátu **XIII** byla potvrzena ^1H NMR spektrem, kde byl, kromě signálů charakteristických pro pyridinový derivát kyseliny betulonové (**VI**), nalezen charakteristický singlet při 9.54 ppm odpovídající vodíku aldehydu v poloze C-30.

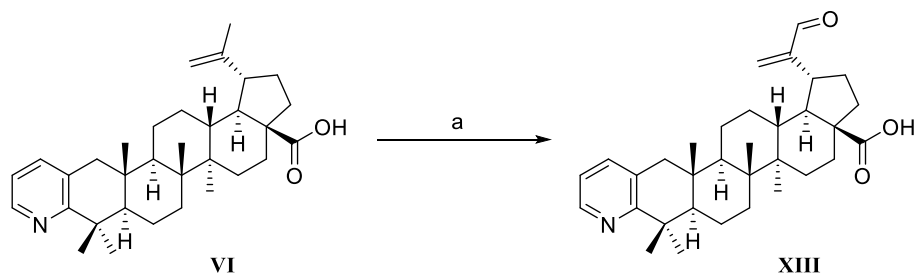


Schéma č. 20: Reakční schéma syntézy derivátu **XIII** s aldehydickou skupinou v poloze C-30. Podmínky: (a) SeO_2 , *t*-BuOOH, AcOH, DCM, r. t., 68 h.

2.2.2 Protekce polohy C-28

Tento krok představoval jeden z nejdůležitějších aspektů celé reakční sekvence, jelikož dle výše uvedeného reakčního schématu (Schéma č. 19) po protekci polohy C-28 následovala v poloze C-30 Pinnickova oxidace za vzniku karboxylové skupiny a její následná modifikace azidovým linkerem. Pokud by však nebyla poloha C-28 chráněna, docházelo by i v této poloze k interakci s azidovým linkerem, což nebylo žádoucí. Bylo proto nutné vybrat takovou protektivní skupinu, jež by úspěšně chránila polohu C-28 během reakcí probíhajících v poloze C-30, a jež by byla po dosažení kýžené modifikace v poloze C-30 rovněž vhodně a jednoduše odstraněna. Právě z tohoto důvodu představovala modifikace v poloze C-30 mnohem složitější reakční sekvenci než modifikace polohy C-28.

Pro účely protekce karboxylové skupiny triterpenoidů v poloze C-28 byla v minulosti používána benzylesterová skupina, nicméně použití této protektivní skupiny by zde nebylo z hlediska způsobu její deprotektce možné. Ta totiž probíhá za použití katalytické hydrogenace,¹⁰² což je v tomto případě nevhodné vzhledem ke skutečnosti, že součástí reakční sekvence (Schéma č. 19) je azidový derivát, jenž by byl vodíkem v přítomnosti katalyzátoru ze skupiny platinových kovů redukován. Jako další možná protektivní skupina se nabízel *p*-methoxybenzylester. U této skupiny se nadále vyvíjí optimalizace podmínek pro její užití jako protektivní skupiny u triterpenoidů. V rámci naší výzkumné skupiny stále probíhá hledání vhodné protektivní skupiny. Kromě *p*-methoxybenzylesterové se nabízí různé dimethoxybenzylesterové skupiny, přičemž jako nejvhodnější se ukázala být 2,6-dimethoxybenzylesterová skupina.¹⁰³

Pro protekci polohy C-28 aldehydu **XIII** byla nakonec, vůbec poprvé, vybrána jako chránící 2,6-dimethoxybenzylesterová skupina, u níž již byly optimalizovány podmínky deprotektce.¹⁰³ Pro vytvoření produktu s touto protektivní skupinou v poloze C-28 (**XIV**) bylo nejprve nutné syntetizovat 2,6-dimethoxybenzylbromid (**XIVd**), jenž není z důvodu jeho značné nestability volně prodejný.¹⁰⁴

Syntézou protektivní skupiny byla tříkroková reakce, jejíž výchozí látkou byla kyselina 2,6-dimethoxybenzoová (**XIVa**), jež za použití podmínek z literatury¹⁰⁵ pro esterifikační reakci s DMC a DBU poskytovala methyl-2,6-dimethoxybenzoát (**XIVb**) (Schéma č. 21). Produkt reakce byl získán v 79% výtěžku. Struktura připraveného derivátu **XIVb** byla

potvrzena ^1H NMR spektrem, v němž byl nalezen charakteristický triplet při 7.28 ppm odpovídající vodíku H-4 na aromatickém jádře, dublet při 6.56 ppm s integrálem dva odpovídající dvěma vodíkům H-3 a H-5 rovněž na aromatickém jádře, dále singlet při 3.91 ppm s integrálem tři odpovídající vodíkům CH_3 skupiny esteru a charakteristický singlet při 3.82 ppm s integrálem šest odpovídající vodíkům na dvou aromatických methoxy-skupinách.

Derivát **XIVb** podléhal v dalším kroku redukcí za použití LiAlH_4 jako redukčního činidla a bezvodého THF jako rozpouštědla dle literatury,¹⁰⁶ za vzniku 2,6-dimethoxybenzylalkoholu (**XIVc**) (Schéma č. 21). Výtěžek reakce byl 94 %. Jeho struktura byla potvrzena pomocí ^1H NMR spektra, v němž byl opět nalezen charakteristický triplet při 7.22 ppm odpovídající H-4 na aromátu a dublet při 6.57 ppm s integrálem dva odpovídající vodíkům H-3 a H-5 na aromátu. Rozdílem byl charakteristický singlet při 4.79 ppm s integrálem dva odpovídající dvěma vodíkům benzyly. Při 3.85 ppm byl rovněž nalezen singlet s integrálem šest odpovídající vodíkům na dvou methoxy-skupinách navázaných na C-2 a C-6 aromatického kruhu.

Třetím krokem byla konečně syntéza 2,6-dimethoxybenzylbromidu (**XIVd**), jenž byl získán reakcí derivátu **XIVc** s PBr_3 v bezvodém Et_2O (Schéma č. 21).¹⁰⁴ Produkt reakce byl ihned po jeho syntetizování použit pro protekci polohy C-28 derivátu **XIII**, proto zde není uveden výtěžek. ^1H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.¹⁰⁴

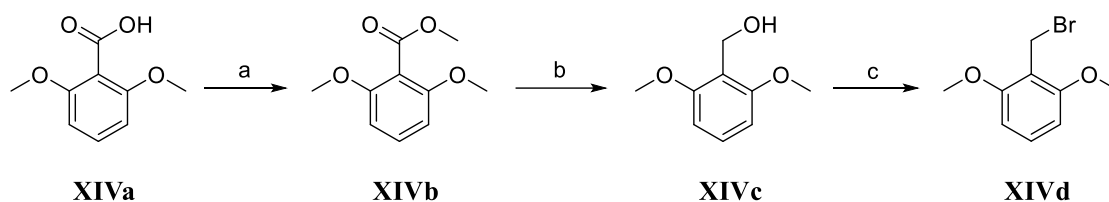


Schéma č. 21: Reakční schéma syntézy 2,6-dimethoxybenzylbromidu (**XIVd**).

Podmínky: (a) DMC, DBU, reflux, 4 h; (b) LiAlH_4 , THF (bezvodý), r. t., 2 h; (c) PBr_3 , Et_2O (bezvodý), 0 °C, 1 h.

Samotná protekce karboxylové skupiny v poloze C-28 derivátu **XIII** probíhala reakcí se 3,0 ekv. 2,6-dimethoxybenzylbromidu (**XIVd**) za použití K_2CO_3 (5,0 ekv.) a DMF (Schéma č. 22). Podmínky byly převzaty z literatury a modifikovány.¹⁰² Produkt byl získán v 52% výtěžku. Reakce byla prováděna 2×, přičemž při opakování reakce bylo zjištěno, že se surový produkt **XIV** při r. t. částečně rozkládá, a proto byl získán v ještě

menším výtěžku. Jelikož však bylo syntetizované množství dostatečné pro dokončení reakční sekvence (Schéma č. 19), nebyla tato reakce již opakována a optimalizována. Struktura připraveného derivátu **XIV** byla potvrzena ^1H NMR spektrem, v němž byly nalezeny signály typické jak pro skelet derivátu **XIII**, tak protektivní skupiny **XIVd**. Kupříkladu byl nalezen charakteristický singlet při 9.53 ppm odpovídající vodíku aldehydu v poloze C-30, dublet při 6.56 ppm s integrálem dva odpovídající dvěma vodíkům H-3 a H-5 na aromátu protektivní skupiny, dále dva dublety při 5.28 ppm a 5.21 ppm odpovídající dvěma vodíkům na benzylovém uhlíku a singlet při 3.83 ppm s integrálem šest odpovídající vodíkům na dvou methoxy-skupinách protektivní skupiny. Signál H-4 vodíku na aromátu protektivní skupiny byl nalezen jako součást multipletu se signálem jednoho vodíku pyridinového kruhu při 7.27 ppm s integrálem dva. Rovněž byl nalezen charakteristicky triplet dubletu při 3.37 ppm odpovídající vodíku H-19, či pět singletů v rozmezí 1.30–0.76 ppm s integrálem tři odpovídající vodíkům pěti CH_3 skupin triterpenoidního skeletu.

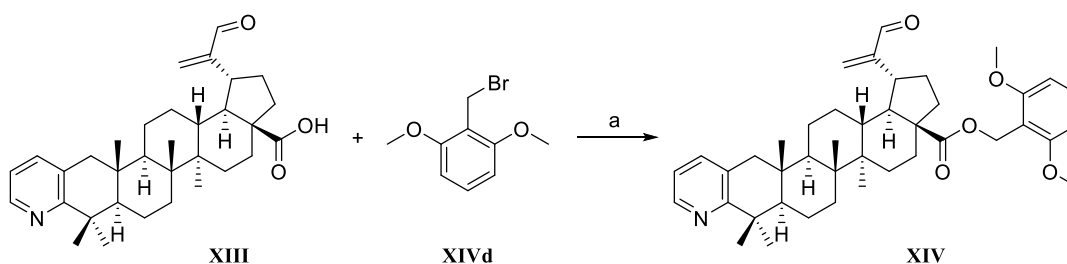


Schéma č. 22: Reakční schéma syntézy derivátu **XIV** protekcí derivátu **XIII** v poloze C-28. Podmínky: (a) K_2CO_3 , DMF, r. t., 1 h.

2.2.3 Pinnickova oxidace

Dalším krokem byla oxidace aldehydické skupiny v poloze C-30 protekovaného derivátu **XIV** na karboxylovou. Pro tuto reakci byly vybrány podmínky Pinnickovy oxidace,¹⁰⁰ kdy byl derivát **XIV** podroben působení NaClO_2 (5,0 ekv.), KH_2PO_4 (5,0 ekv.), 2-methylbut-2-enu a směsi rozpouštědel za vzniku derivátu **XV** (Schéma č. 23). Reakce byla opakována 2×, přičemž v prvním případě byla provedena purifikace sloupcovou chromatografií na silikagelu s MF Hex/EtOAc 3:1, kdy byl získán produkt **XV** ve 48% výtěžku. Vzhledem k velmi nízké rozpustnosti derivátu **XV** nebyla při druhém opakování reakce prováděna purifikace sloupcovou chromatografií a produkt **XV** byl použit v surovém stavu rovnou do další reakce. Struktura tohoto produktu byla potvrzena

pomocí spektrálních dat, jež se od spektrálních dat derivátu **XIV** lišila pouze velmi málo. V ^1H NMR spektru derivátu **XV** byl nalezen především charakteristický singlet při 12.29 ppm odpovídající vodíku karboxylové skupiny v poloze C-30.

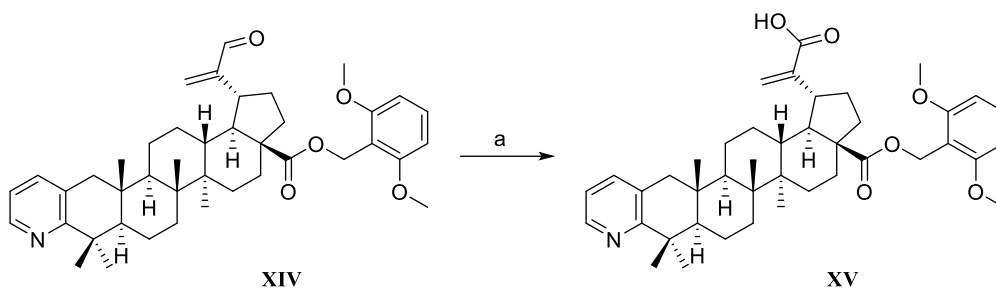


Schéma č. 23: Reakční schéma Pinnickovy oxidace za vzniku derivátu **XV**. Podmínky: (a) NaClO_2 , KH_2PO_4 , 2-methylbut-2-en, H_2O , DCM, MeOH, r. t., 24 h.

2.2.4 Reakce s linkerem

Po Pinnickově oxidaci následovala reakce s azidovým linkerem, jež je v tomto případě orientován do polohy C-30 derivátu **XV** za vzniku amidického derivátu **XVI** (Schéma č. 24). Pro syntézu tohoto derivátu (**XVI**) byly použity shodné podmínky jako při syntéze derivátu **XII** (Schéma č. 18), tedy odpovídající amin (2 ekv.) v prostředí EDC (1,5 ekv.), HOBt (1,5 ekv.) a DIPEA (1,5 ekv.).⁹⁹ Derivát **XVI** byl získán v 59% výtěžku. Struktura připraveného derivátu **XVI** byla ověřena ^1H NMR spektrem, v němž byly, kromě signálů typických pro triterpenoidní derivát s protektivní skupinou, nalezeny signály typické pro navázaný azidový linker, kupříkladu charakteristický triplet při 6.21 ppm odpovídající vodíku na amidu, či multiplet při 3.66 ppm s integrálem deset, multiplet při 3.59 ppm s integrálem dva, multiplet při 3.52 ppm s integrálem dva a triplet při 3.37 ppm s integrálem dva odpovídající šestnácti vodíkům azidového linkeru. Přítomnost azidové skupiny byla rovněž prokázána v IR spektru signálem při 2100 cm^{-1} .

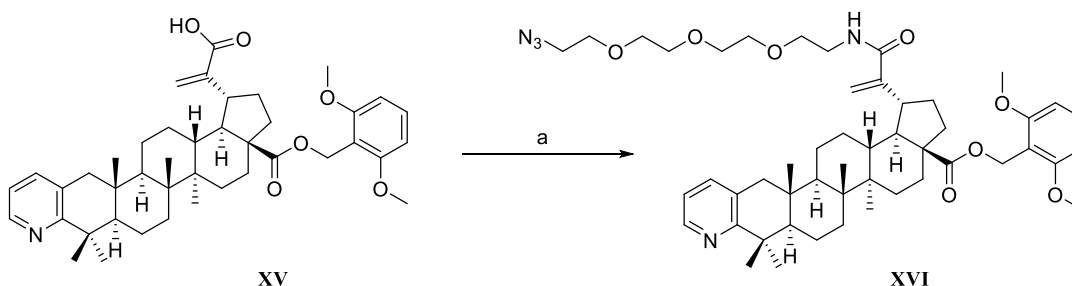


Schéma č. 24: Reakční schéma syntézy derivátu **XVI**. Podmínky: (a) odpovídající amin, EDC, HOBt, DIPEA, DMF, r. t., 48 h.

2.2.5 Deprotekce

Pro odstranění 2,6-dimethoxybenzylové skupiny v poloze C-28 derivátu **XVI** byla použita kyselina trifluoroctová (TFA), konkrétně její 5% roztok v DCM. Reakce probíhala velmi snadno za vzniku kýženého produktu **XVII** (Schéma č. 25) v 89% výtěžku. Struktura připraveného derivátu **XVII** byla potvrzena ^1H NMR spektrem, ve kterém byl nalezen charakteristický triplet při 7.91 ppm odpovídající amidovému vodíku. Dále byly nalezeny signály odpovídající šestnácti vodíkům azidového linkeru, a to multiplet s integrálem deset při 3.64 ppm, multiplet s integrálem dva při 3.57 ppm, multiplet s integrálem dva při 3.41 ppm a triplet s integrálem dva při 3.34 ppm. Rovněž byly nalezeny dva charakteristické singlety při 5.48 ppm a 5.33 ppm odpovídající dvěma H-29 vodíkům a typický triplet dubletu při 3.24 ppm s integrálem jedna odpovídající vodíku H-19.

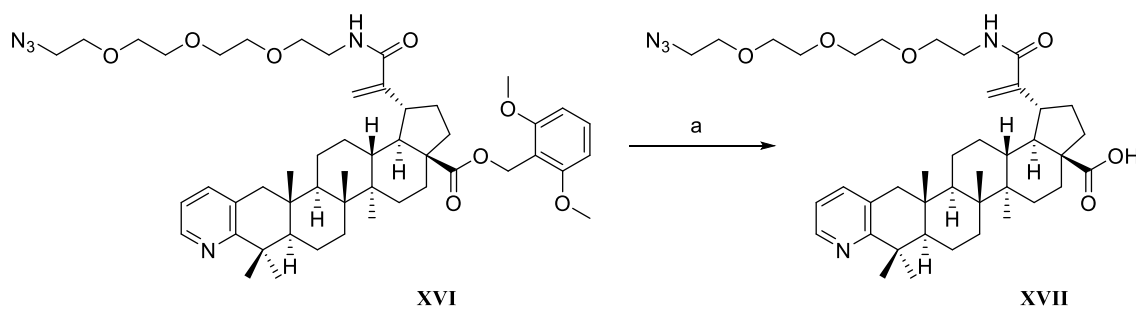


Schéma č. 25: Reakční schéma syntézy derivátu **XVII**. Podmínky: (a) 5% TFA v DCM, r. t., 105 min.

Vizualizační testování

Připravené deriváty **VII–XII** a **XVII** byly podrobeny vizualizačním testům. Testy byly vykonány na ÚMTM RNDr. Annou Ligasovou, Ph.D., při čemž jsem byla přítomna.

V experimentech byly použity lidské nádorové epitelové buňky HeLa, jež byly nasazeny do Petriho misek den před experimentem. Každá miska obsahovala 3 kruhová skla o průměru 12 mm. Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu D-MEM v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂.

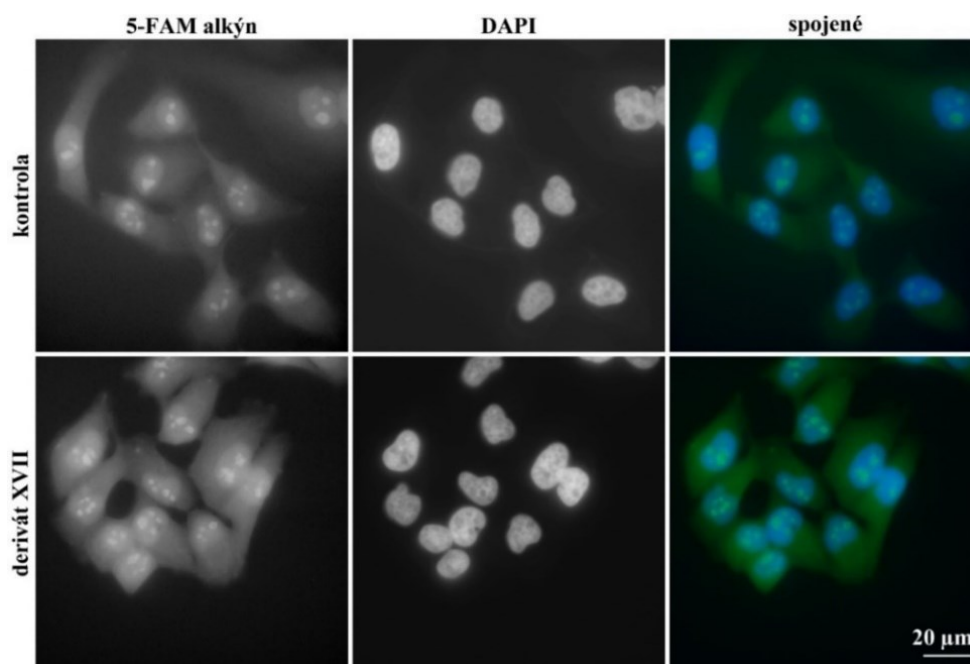
V den experimentu byly k buňkám přidány testované deriváty, přičemž konečná koncentrace derivátů **VII**, **IX–XII** byla 10 μmol/l, a derivátů **VIII** a **XVII** 50 μmol/l. Buňky v médiu s deriváty nebo bez derivátů (kontrolní vzorky) byly inkubovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂ po dobu 1 h. Po ukončení inkubace byly buňky 3× opláchnuty fosfátovým pufrem (PBS) a poté byly fixovány 2% roztokem formaldehydu v PBS po dobu 10 minut za r. t. Po fixaci byly buňky opět 3× opláchnuty PBS a byly permeabilizovány po dobu 10 minut pomocí 0,2% roztoku Tritonu X-100 v PBS za r. t. Poté byly buňky 3× opláchnuty PBS.

Následně byla provedena click reakce, kdy byl ke vzorkům buněk s alkynovými deriváty **VII–IX** přidán roztok 10 mM hydrochinonu, 2 mM CuSO₄·5 H₂O a 10 μM 5-FAM azidu (**46**) (Obr. č. 21) v deionizované vodě. Analogicky byl ke vzorkům buněk s azidovými deriváty **X–XII** a **XVII** přidán roztok 10 mM hydrochinonu, 2 mM CuSO₄·5 H₂O a 10 μM 5-FAM alkynu v deionizované vodě. Click reakce probíhala 30 minut za r. t. Následovalo promytí roztokem 25 mM Tris-HCl (pH = 7,5) a 150 mM NaCl, jež bylo provedeno 3× po 10 minutách. Po promytí byla provedena inkubace buněk v roztoku 10 μM DAPI v 25 mM Tris-HCl (pH = 7,5) a 150 mM NaCl po dobu 30 minut za r. t. Poté následovalo další promytí 25 mM Tris-HCl (pH = 7,5) a 150 mM NaCl, a to 3× po 5 minutách.

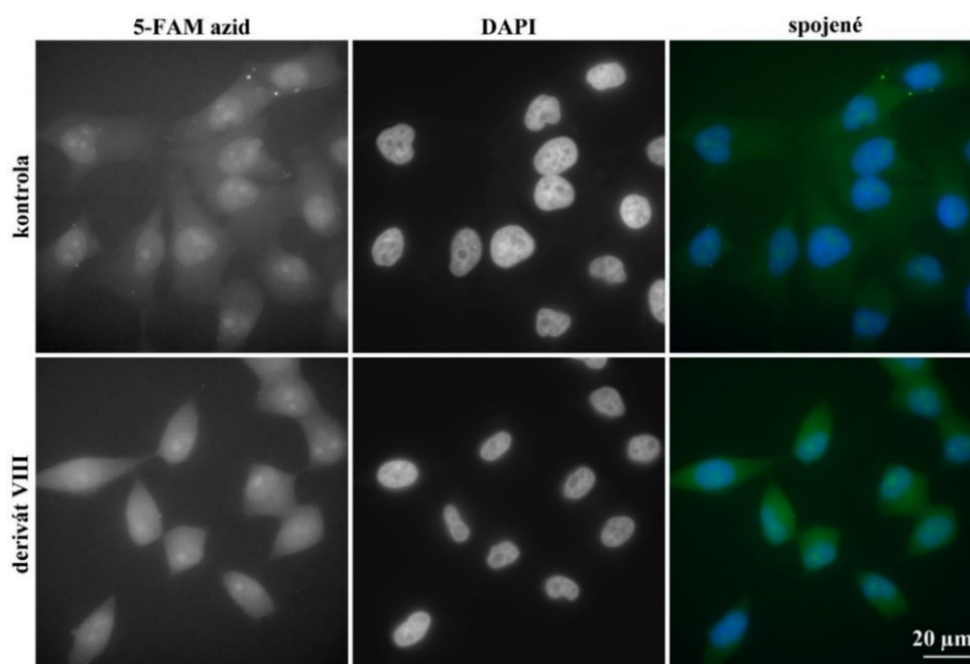
Posléze byla skla s buňkami převedena do 3 μl montovacího média a zalakována. Buňky byly poté snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Deriváty **VII**, **IX–XII** a **XVII** bohužel neposkytly signifikantní signál. Tento výsledek byl s největší pravděpodobností způsoben nízkou rozpustností daných derivátů (**VII**, **IX–**

XII a **XVII**), a rovněž výraznou modifikací v porovnání s mateřskou molekulou (**IV**, **V**, **VI**). Vizualizační test azidového derivátu **XVII** (Obr. č. 22) současně poskytl nescifické značení jader „obarvených“ 5-FAM alkynem. Alkynový derivát **VIII** bylo možné částečně vizualizovat (Obr. č. 23). Ve srovnání s kontrolními vzorky, ve kterých nebyly buňky inkubovány s připravenými deriváty, vykazovaly buňky s „kliknutým“ derivátem **VIII** o něco vyšší signál a menší cytoplazmatický objem.



Obr. č. 22: Detekce derivátu **XVII** po click reakci s 5-FAM alkynem.



Obr. č. 23: Detekce derivátu **VIII** po click reakci s 5-FAM azidem.

Cytotoxická aktivita připravených derivátů

Vybrané syntetizované deriváty (**VII–XIII** a **XVII**) byly podrobeny *in vitro* testování pomocí MTT testů, a to na pěti nádorových a dvou nenádorových liniích. Z nádorových to byly linie A549, HCT116, HCT116p53-, K652 a U2OS, z nenádorových pak dvě linie fibroblastů BJ a MRC-5.

Deriváty **VIII**, **IX** a **XII** vykazovaly hodnotu $IC_{50} > 50 \mu\text{mol/l}$, což znamená, že jsou cytotoxicky neaktivní.

U derivátů **VII**, **X**, **XI**, **XIII** a **XVII** v současné době stále probíhá testování.

Každopádně vzhledem k podobnosti derivátu **XIII** s derivátem **34** (Schéma č. 2), jenž byl silně cytotoxicky aktivní, nicméně neselektivní, se očekávají i u tohoto derivátu **XIII** analogické výsledky, tedy hodnota $IC_{50} < 50 \mu\text{mol/l}$.

Jelikož bylo prokázáno, že deriváty triterpenoidů s volnou C-28 karboxylovou skupinou jsou cytotoxicky aktivnější než jejich estery,⁸⁰ je u derivátu **XVII** rovněž očekávána vyšší cytotoxická aktivita, a to proto, že na rozdíl od derivátů **IV–XII** má volnou C-28 karboxylovou skupinu.

Závěr

Cílem bakalářské práce byla syntéza nových triterpenických derivátů vhodných pro konjugaci s fluorescenční značkou, jejich charakterizace instrumentálními metodami (NMR, HRMS, IR) a následné provedení vizualizačních testů a testů cytotoxické aktivity.

Byla vypracována literární rešerše popisující obecné informace a základní rozdělení terpenů a terpenoidů spolu s jejich významnými zástupci a účinky, dále jejich významné heterocyklické deriváty, a rovněž zobrazovací metody chemických látek v buňkách se zaměřením na bioortogonální reakce.

Nejprve byla připravena výchozí látka – kyselina betulonová (**II**). Druhá výchozí látka, kyselina dihydrobetulonová (**III**), byla zakoupena. Tyto látky byly následně modifikovány připojením pyrazinu, či pyridinu přes C-2 a C-3 uhlík A-kruhu za vzniku pyrazinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) a pyridinových derivátů kyseliny dihydrobetulonové (**V**) a betulonové (**VI**). U přípravy derivátu **VI** byla provedena optimalizace přečištění reaktantu propargylaminu, čímž bylo dosaženo bezmála dvojnásobného výtěžku.

Připravené sloučeniny **IV**, **V** a **VI** byly podrobeny derivatizaci v poloze C-28, čímž bylo vytvořeno šest nových triterpenických derivátů, a to konkrétně deriváty **VII**, **VIII** a **IX** s propargylesterovou skupinou v poloze C-28 a deriváty **X**, **XI** a **XII** s azidovým linkerem v poloze C-28.

Pyridinový derivát **VI** byl následně vybrán i pro realizaci derivatizace v poloze C-30, pročež byl syntetizován jeho C-30 aldehydický derivát **XIII**. Pro další derivatizaci polohy C-30 bylo však nutné provést protekci polohy C-28, aby bylo zabráněno nežádoucím reakcím právě v této poloze.

Následovala tudíž syntéza protektivní, 2,6-dimethoxybenzoové skupiny, jejíž příprava skýtala tři reakční kroky, a to esterifikaci kyseliny 2,6-dimethoxybenzoové **XIVa** na methyl-2,6-dimethoxybenzoát **XIVb**, jenž byl redukován pomocí LiAlH_4 na 2,6-dimethoxyalkohol **XIVc**, který reakcí s PBr_3 poskytoval 2,6-dimethoxybenzylbromid **XIVd**, s nímž aldehydický derivát **XIII** reagoval za vzniku protekovaného derivátu **XIV**.

Protekovaný derivát **XIV** byl oxidován za podmínek Pinnickovy oxidace na derivát **XV** s karboxylovou skupinou v poloze C-30, jež byla v následujícím kroku modifikována navázáním azidového linkeru, čímž vznikl derivát **XVI**. Ten byl v závěrečné reakci s 5% TFA zbaven protektivní skupiny v poloze C-28 za vzniku finálního produktu **XVII**.

Všech sedm připravených finálních produktů **VII–XII** a **XVII** bylo podrobena vizualizačním testům, a to jejich inkubací s kultivovanými buňkami, konjugací s komplementární fluorescenční značkou (5-FAM azid pro **VII–IX**, 5-FAM alkyn pro **X–XII** a **XVII**) a následným pozorováním pod fluorescenčním mikroskopem. Výsledkem byla částečná vizualizace derivátu **VIII**. Ostatní deriváty bohužel vizualizovány nebyly.

U derivátů **VII–XII**, **XIII** a **XVII** bylo, nebo v blízké době bude provedeno testování na cytotoxickou aktivitu *in vitro* pomocí MTT testů. U derivátů **VIII**, **IX** a **XII** již byla zjištěna hodnota $IC_{50} > 50 \mu\text{mol/l}$, což znamená jejich cytotoxickou neaktivitu. Deriváty **VII**, **X**, **XI**, **XIII** a **XVII** jsou v současné době stále testovány.

Experimentální část

1. Obecné poznámky k experimentální části

Průběh reakcí a čistota vzorků byly monitorovány pomocí TLC na fóliích VWR TLC Aluminium Plates, Silica F254. Následná detekce byla prováděna pomocí UV záření (254 nm), a poté ponořením TLC fólie do 10% roztoku kyseliny sírové a jejím zahřátím na 150–200 °C. Jednotlivé mobilní fáze (MF), jež byly použity pro vyvíjení TLC fólií, jsou vždy uvedeny u příslušného experimentu.

Pro odpařování rozpouštědel byla využívána rotační vakuová odparka (RVO) značky Büchi Rotavapor R-200.

Purifikace syntetizovaných sloučenin byla prováděna sloupcovou chromatografií s použitím Kieselgelu 60. Aplikované MF jsou pak uvedeny u konkrétních experimentů.

Měření ^1H a ^{13}C NMR spekter bylo prováděno na přístroji JEOL (500 MHz) za r. t. Pro účely měření bylo nejčastěji používáno deuterované rozpouštědlo CDCl_3 , popř. také CD_3OD , nebo $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Chemické posuny ^1H a ^{13}C spekter byly referencovány vůči signálu reziduálního CHCl_3 v CDCl_3 při $\delta = 7,26$ ppm a $\delta = 77,16$ ppm, či vůči signálu reziduálního CH_3OH v CD_3OD při $\delta = 3,31$ ppm a $\delta = 49,00$ ppm, nebo vůči signálu reziduálního $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ v $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ při $\delta = 2,50$ ppm a $\delta = 39,52$ ppm. Hodnoty chemických posunů δ (v ppm) a interakčních konstant J (v Hz) byly určovány analýzou prvního řádu. Hodnoty chemických posunů byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa a hodnoty interakčních konstant na jedno desetinné místo. Všechna NMR spektra byla vyhodnocována pomocí programu MestReNova.

Spektra HRMS byla měřena na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000, (Thermo Fisher Scientific) a hmotnostním spektrometru Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific) s elektrosprejem, či APCI jako ionizačním zdrojem. Separace pomocí chromatografie byla provedena izokratickou elucí, MF: 95 % MeOH + 5 % voda + 0,1 % HCOOH, na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 × 2 mm, 3 μm částice).

IR spektra byla získána proměřením na spektrometru Thermo Nicolet AVATAR 370 FTIR se střední oblastí v 400–4000 cm^{-1} a zpracována v programu OMNIC 8.3.

Teploty tání byly zjištěny měřením na bodotávku Stuart Melting Point Apparatus SMP30.

Finální produkty byly podrobeny vizualizačním testům na ÚMTM, a to na pracovišti RNDr. Karla Koberny, CSc. Dále připravené deriváty byly, či v blízké době budou podrobeny testování cytotoxické aktivity, a to na ÚMTM na pracovišti doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D.

Buňky byly snímány fluorescenčním mikroskopem Olympus IX83 s objektivem UPLSAPO O 100 \times , NA 1.4 (Olympus) vybaveného kamerou Zyla (Andor) s rozlišením 1024 \times 1024 pixelů a s použitím programu CellSense Dimension (Olympus). Fotografie byly poté zpracovány v programu Adobe Photoshop CS4.

Obecný postup zpracování reakcí:

A: Reakční směs byla převedena do přebytku solanky (popř. vody) a následně extrahována EtOAc. Standardně byla extrakce prováděna 3 \times , a poté byla provedena kontrola pH organické vrstvy. Po promytí spojených organických podílů solankou (popř. vodou) následovalo jejich vysušení pomocí bezvodého MgSO_4 , filtrace přes vatou a odpaření přebytku rozpouštědel na RVO.

B: Reakční směs byla přefiltrována přes skládaný filtr. Rozpouštědla filtrátu obsahujícího produkt byla odpařena na RVO.

2. Příprava výchozích látek

2.1 Příprava kyseliny betulonové (II)

Kyselina betulonová (**I**) (10,0 g, 21,9 mmol) byla rozpuštěna ve směsi rozpouštědel 1,4-dioxanu (250 ml), kyselině octové (80 ml) a acetanhydridu (34 ml). Následně byl přidán dihydrát dichromanu sodného (11,8 g, 39,4 mmol) a bezvodý octan sodný (2,7 g, 32,8 mmol). Vzniklá reakční směs byla míchána za r. t. po dobu 24 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC s MF Tol/ Et_2O v poměru 5:1 a byl doprovázen ztmavnutím reakční směsi. Po ukončení reakce byla reakční směs extrahována převedením do

nadbytku solanky a byla 2× vytřepána EtOAc. Následovala neutralizace dvojnásobným vytřepáním pomocí nasyceného roztoku NaHCO₃. Spojené organické podíly byly následně vysušeny bezvodým MgSO₄, přefiltrovány a přebytek rozpouštědel byl odpařen na RVO. Poté byla provedena purifikace pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s gradientem MF Hex/EtOAc 6:1–3:1. Po odpaření rozpouštědel na RVO byla produktem **II** bílá amorfnní látka (8,0 g, 80 %). ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁹⁸

2.2 Příprava pyrazinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (IV)

Do reakční nádoby byla přivedena kyselina dihydrobetulonová (**III**) (4,0 g, 8,8 mmol), síra (2,6 g, 81,1 mmol), morfolin (35 ml) a EDA (2,9 ml). Vzniklá tmavě hnědá reakční směs byla míchána pod refluxem (135 °C) po dobu 4,5 h. Během reakce vznikal H₂S, což bylo znatelné jeho charakteristickým zápachem. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s MF Tol/Et₂O 4:1. Po ukončení reakce byla reakční směs zpracována dle obecného postupu **A**. Následovala purifikace pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s MF Tol/Et₂O 2:1. Po odpaření rozpouštědel byl získán produkt **IV** jako bílá amorfnní látka (3,3 g, 77 %). ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁷⁴

2.3 Příprava pyridinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (V)

Do baňky bylo přivedeno 7 ml propargylaminu a aktivní uhlí. Tato směs byla 10 minut míchána a následně byla provedena filtrace přes diskový mikrofiltr. Do reakční nádoby s kyselinou dihydrobetulonovou (**III**) (4,0 g, 8,8 mmol) byl pod atmosférou dusíku přiveden bezvodý EtOH (200 ml). Poté byl přidán přečištěný propargylamin (3,4 ml, 53,1 mmol) a nakonec NaAuCl₄·2 H₂O (220 mg, 0,6 mmol). Reakční směs byla míchána pod refluxem (95 °C) po dobu 48 h, kdy postupně docházelo k jejímu tmavnutí ze žluté do tmavě hnědé barvy. Průběh reakce byl monitorován TLC s MF Tol/Et₂O 2:1. Po skončení reakce byla reakční směs zpracována obecným postupem **B**. Tmavě hnědý surový produkt **V** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s MF Tol/Et₂O 2:1. Po odpaření rozpouštědel na RVO byl získaný produkt **V** podroben rekrystalizaci ze směsi hexan:MeOH. Produkt **V** byl po rekrystalizaci béžovou amorfnní látkou (1,5 g, 34 %). ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁸⁰

2.4 Příprava pyridinového derivátu kyseliny betulonové (VI)

Do baňky byl přiveden propargylamin, jenž byl podroben purifikaci předestilováním (110 °C) do límcové baňky. Ke kyselině betulonové (II) (10,4 g, 22,9 mmol) umístěné v reakční nádobě byl přidán pod atmosférou dusíku bezvodý EtOH (520 ml), přičemž docházelo k jejímu částečnému rozpouštění. Poté byl přidán destilací purifikovaný propargylamin (8,7 ml, 137,6 mmol) a NaAuCl₄·2 H₂O (573 mg, 1,6 mmol). Takto připravená reakční směs byla míchána pod refluxem (95 °C) 65 h. Během reakce došlo k rozpouštění kyseliny betulonové (II) a k postupnému ztmavnutí reakční směsi ze žluté do tmavě hnědé barvy. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s MF Tol/Et₂O 2:1 a po jejím ukončení byla reakční směs zpracována obecným postupem B. Získaný tmavě hnědý surový produkt VI byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s MF Hex/EtOAc 4:1. Po odpaření rozpouštědla na RVO byla získaným produktem VI žlutá krystalická látka (5,6 g, 50 %). ¹H NMR bylo shodné se spektrem z literatury.⁷⁸

3. Derivatizace v poloze C-28

3.1 Příprava derivátů s propargylesterovou skupinou (VII, VIII, IX)

3.1.1 Příprava derivátu VII

Do reakční nádoby byly přivedeny všechny reaktanty, tedy pyrazinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (IV) (1,1 g, 2,2 mmol), K₂CO₃ (1,5 g, 11,2 mmol), propargylbromid (2,0 ml, 22,3 mmol) a THF (45 ml). Reakční směs byla míchána pod refluxem po dobu 2,5 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s MF Tol/Et₂O 1:1. Po ukončení reakce nebyla prováděna extrakce. Rozpouštědla byla odpařena na RVO a surový produkt VII byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s MF Tol/Et₂O 1:1. Po odpaření rozpouštědla byl získán derivát VII ve formě béžové krystalické látky (0,9 g, 79 %) o t. t. 191–194 °C.

IR spektrum: 3277 (C-H alkyn), 2955–2874 (C-H), 1717 (C=O), 1173–1143 (C-O) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₃₅H₅₀N₂O₂ [M + H⁺] 531,3945, nalezeno 531,3953. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (dd, *J* = 2.3, 0.6 Hz, 1H), 8.27

(d, $J = 2.4$ Hz, 1H, 2 × H-pyrazin), 4.70 (dd, $J = 15.5, 2.4$ Hz, 1H, $-CH_2$ -propargyl), 4.63 (dd, $J = 15.5, 2.5$ Hz, 1H, $-CH_2$ -propargyl), 3.05 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, H-1a), 2.47 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, H-1b), 2.42 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, terminální H-propargyl), 1.30 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.77 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 7 × CH₃). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 175.50, 159.86, 150.97, 142.45, 141.63, 78.40, 77.16, 74.37, 57.23, 53.22, 51.38, 49.08, 48.88, 48.77, 44.24, 42.79, 40.87, 39.65, 38.37, 37.30, 36.93, 33.62, 31.97, 31.66, 29.88, 29.81, 27.10, 24.17, 23.14, 22.87, 21.63, 20.26, 16.24, 15.85, 14.84, 14.76.

3.1.2 Příprava derivátu VIII

Do reakční nádoby byl přiveden pyridinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (**V**) (799 mg, 1,6 mmol), K₂CO₃ (2,2 g, 16,3 mmol) a THF (33 ml). Vzniklá reakční směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 30 minut. Následně byl přidán propargylbromid (1,5 ml, 16,3 mmol), což zapříčinilo mírné ztmavnutí béžově zbarvené reakční směsi. Reakce byla ukončena po 2 h, přičemž její průběh byl monitorován pomocí TLC s MF Hex/EtOAc 5:1. Reakční směs byla po ukončení reakce zpracována pomocí obecného postupu **A**. Surový produkt **VIII** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu za použití MF Hex/EtOAc 17:1. Po odpaření rozpouštědel na RVO byl získaný produkt **VIII** bílou amorfni látkou (650 mg, 76 %) s t. t. 163–167 °C.

IR spektrum: 3282 (C-H alkyn), 2954–2860 (C-H), 1721 (C=O), 1575 (C-C aromát), 1186 (C-O) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ m/z vypočteno pro C₃₆H₅₁NO₂ [M + H⁺] 530,3993, nalezeno 530,4000. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (dd, $J = 4.6, 1.0$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 7.6, 4.7$ Hz, 1H, 3 × H-pyridin), 4.70 (dd, $J = 15.5, 2.4$ Hz, 1H, $-CH_2$ -propargyl), 4.62 (dd, $J = 15.5, 2.4$ Hz, 1H, $-CH_2$ -propargyl), 2.74 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, H-1a), 2.42 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, terminální H-propargyl), 1.31 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.77 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 7 × CH₃). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 175.51, 164.05, 147.37, 137.59, 129.71, 120.76, 78.40, 77.16, 74.37, 57.24, 53.66, 51.38, 49.11, 48.84, 46.07, 44.24, 42.78, 40.89, 39.59, 38.42, 37.29, 36.36, 33.78, 31.98, 31.77, 29.94, 29.81, 27.20, 24.24, 23.13, 22.85, 21.69, 20.37, 15.91, 15.80, 14.85, 14.77.

3.1.3 Příprava derivátu IX

K výchozímu pyridinovému derivátu kyseliny betulonové (VI) (500 mg, 1,0 mmol) byl přiveden K_2CO_3 (1,4 g, 10,2 mmol) a THF (20,5 ml). Reakční směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 30 minut a následně byl přidán propargylamin (0,9 ml, 10,2 mmol), čímž došlo ke změně zbarvení reakční směsi z bílého do pleťového zbarvení. Reakce byla ukončena po 2,5 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC s MF Hex/EtOAc 5:1. Reakční směs byla po ukončení reakce zpracována dle obecného postupu A. Získaný produkt IX byl poté podroben purifikaci sloupcovou chromatografií na silikagelu s MF Hex/EtOAc v gradientu 10:1–6:1. Po odpaření rozpouštědel na RVO byl získán produkt IX ve formě nažloutlé krystalické látky (483 mg, 90 %) o t. t. 172–174 °C.

IR spektrum: 3285 (C-H alkyn), 2954–2860 (C-H), 1720 (C=O), 1138 (C-O) cm^{-1} .

HRMS: ESI+ m/z vypočteno pro $C_{36}H_{49}NO_2$ [M + H⁺] 528,3836, nalezeno 528,3839.

¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.44 (dd, $J = 4.6, 0.9$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 7.6, 4.7$ Hz, 1H, 3 \times H-pyridin), 4.76 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-29a), 4.72 (dd, $J = 15.5, 2.5$ Hz, 1H, $-CH_2$ -propargyl), 4.66–4.61 (m, 2H, H-29b + $-CH_2$ -propargyl), 3.05 (td, $J = 10.9, 4.8$ Hz, 1H, H-19), 2.73 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, H-1a), 2.44 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, terminální H-propargyl), 1.70 (s, 3H, 3 \times H-30), 1.31 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.78 (s, 3H, 5 \times CH₃). **¹³C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 175.33, 164.03, 150.59, 147.36, 137.59, 129.72, 120.75, 109.84, 78.29, 77.16, 74.48, 56.79, 53.68, 51.50, 49.64, 49.09, 47.00, 46.11, 42.62, 40.87, 39.59, 38.59, 36.94, 36.37, 33.70, 32.07, 31.77, 30.67, 29.81, 25.83, 24.23, 21.65, 20.36, 19.56, 15.85, 15.83, 14.86.

3.2 Příprava derivátů s azidovým linkerem (X, XI, XII)

3.2.1 Příprava derivátu X

Do reakční nádoby byl přiveden pyrazinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (IV) (500 mg, 1,0 mmol), EDC (292 mg, 1,5 mmol) a HOBt (206 mg, 1,5 mmol). Vzniklá reakční směs byla 30 minut míchána za r. t. Následně byl k této reakční směsi přiveden DIPEA (265 μ l, 1,52 mmol) a 11-azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (403 μ l, 2,0 mmol). Reakční směs byla celkově míchána 6 h za r. t. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s MF Hex/EtOAc 2:1 + 3 kapky MeOH. Reakční směs byla poté zpracována dle obecného postupu A. Surový produkt X byl naoranžovělou olejovitou látkou, jenž byl

přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s MF Hex/EtOAc v gradientu 2:1–1:1 + 1 % MeOH. Po odpaření rozpouštědel byl získán produkt **X** jako nažloutlá olejovitá látka (485 mg, 69 %).

IR spektrum: 3364 (N-H), 2948, 2865 (C-H), 2101 (C-N₃), 1654 (C=O amid), 1106 (C-O ether) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₄₀H₆₄N₆O₄ [M + H⁺] 693,5062, nalezeno 693,5068. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.40 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, 2 × H-pyrazin), 6.02 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, N-H), 3.69–3.65 (m, 8H), 3.64–3.61 (m, 2H), 3.54 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.51–3.40 (m, 2H), 3.39 (t, 2H, 16 × H-linker), 3.05 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, H-1a), 1.30 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.77 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 7 × CH₃). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 175.51, 164.05, 147.37, 137.59, 129.71, 120.76, 78.40, 77.16, 74.37, 57.24, 53.66, 51.38, 49.11, 48.84, 46.07, 44.24, 42.78, 40.89, 39.59, 38.42, 37.29, 36.36, 33.78, 31.98, 31.77, 29.94, 29.81, 27.20, 24.24, 23.13, 22.85, 21.69, 20.37, 15.91, 15.80, 14.85, 14.77.

3.2.2 Příprava derivátu XI

Do reakční nádoby byl přiveden pyridinový derivát kyseliny dihydrobetulonové (**V**) (500 mg, 1,0 mmol) a 2 ml DMF za vzniku žlutého roztoku. K tomuto roztoku byl přidán EDC (293 mg, 1,5 mmol) a HOBt (206 mg, 1,5 mmol). Reakční směs byla míchána za r. t. po dobu 30 minut, kdy byl následně přidán DIPEA (266 μl, 1,5 mmol) a 11-azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (404 μl, 2,0 mmol) za vzniku suspenze, jež po cca 1 hodině míchání za r. t. přešla opět ve žlutý roztok. Reakce byla ukončena po 24 h, přičemž její průběh byl monitorován TLC s MF Hex/EtOAc 1:1. Reakční směs byla zpracována dle obecného postupu **A**. Následně byl surový produkt **XI** ve formě žlutého oleje purifikován pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s MF Hex/EtOAc v gradientu 1:1–1:2. Po odpaření rozpouštědel na RVO byl produkt **XI** získán ve formě nažloutlé olejovité látky (590 mg, 84 %).

IR spektrum: 3364 (N-H), 2948, 2865 (C-H), 2100 (C-N₃) 1647 (C=O amid), 1096 (C-O ether) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₄₁H₆₅N₅O₄ [M + H⁺] 692,5109, nalezeno 692,5111. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (dd, *J* = 4.4, 0.9 Hz, 1H), 7.24 (d, 1H), 6.98 (dd, *J* = 7.6, 4.7 Hz, 1H, 3 × H-pyridin), 6.03 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, N-H), 3.69–3.65 (m, 8H), 3.63–3.60 (m, 2H), 3.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.52–3.40 (m, 2H), 3.38

(t, 2H, 16 × H-linker), 2.75 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, H-1a), 2.52 (td, $J = 12.8, 3.7$ Hz, 1H, H-1b), 1.31 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.76 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 7 × CH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 176.50, 164.01, 147.31, 137.64, 129.77, 120.78, 77.16, 70.91, 70.81, 70.79, 70.43, 70.32, 70.25, 56.35, 53.67, 50.85, 49.57, 48.90, 46.05, 44.43, 42.87, 40.84, 39.58, 39.03, 38.80, 37.93, 36.36, 33.86, 33.67, 31.76, 30.11, 29.60, 27.25, 24.24, 23.19, 23.17, 21.75, 20.38, 16.05, 15.79, 14.80, 14.72.

3.2.3 Příprava derivátu XII

Pyridinový derivát kyseliny betulonové (VI) (750 mg, 1,5 mmol) byl rozpuštěn ve 2 ml DMF za vzniku žlutého roztoku. Následně byl přidán EDC (441 mg, 2,3 mmol), HOBt (311 mg, 2,3 mmol) a další 2 ml DMF. Vzniklá suspenze byla míchána za r. t. po dobu 30 minut. K této byl následně přiveden DIPEA (401 μl, 2,3 mmol) a 11-azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (607 μl, 3,1 mmol). Z původní suspenze se tímto přídatkem stal opět žlutý roztok. Reakce byla ukončena po 21 h, přičemž byl její průběh sledován pomocí TLC s MF Hex/EtOAc 1:1. Reakční směs byla zpracována obecným postupem A. Vzniklý surový produkt XII, jímž byla žlutozelená olejovitá látka, byl poté přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s MF Hex/EtOAc 1:2. Po odpaření rozpouštědel na RVO byla získaným produktem XII nažloutlá olejovitá látka (790 mg, 75 %).

IR spektrum: 3363 (N-H), 2927, 2865 (C-H), 2100 (C-N₃), 1639 (C=O amid), 1097 (C-O ether) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ m/z vypočteno pro C₄₁H₆₃N₅O₄ [M + H⁺] 690,4953, nalezeno 690,4960. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.44 (dd, 1H), 7.22 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 7.5, 4.7$ Hz, 1H, 3 × H-pyridin), 6.05 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, N-H), 4.76 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-29a), 4.62–4.58 (m, 1H, H-29b), 3.69–3.65 (m, 8H), 3.64–3.61 (m, 2H), 3.55 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.53–3.40 (m, 2H), 3.40–3.37 (m, 2H, 16 × H-linker), 3.15 (td, $J = 11.1, 4.3$ Hz, 1H, H-19), 2.73 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, H-1a), 2.32 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, H-1b), 1.70 (s, 3H, 3 × H-30), 1.31 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.78 (s, 3H, 5 × CH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 176.35, 163.99, 151.17, 147.29, 137.66, 129.81, 120.78, 109.50, 77.16, 70.91, 70.81, 70.78, 70.43, 70.26, 55.87, 53.70, 50.85, 50.25, 49.15, 46.95, 46.09, 42.70, 40.81, 39.58, 39.05, 38.51, 38.06, 36.38, 33.80, 31.76, 31.06, 29.59, 25.92, 24.23, 21.71, 20.38, 19.67, 16.01, 15.81, 14.79, 14.25.

4. Derivatizace v poloze C-30

4.1 Příprava aldehydu XIII

Syntézou aldehydu XIII byla reakce derivátu VI (2,5 g, 5,2 mmol) rozpuštěného ve směsi DCM (39 ml) a AcOH (26 ml), se 70% *t*-BuOOH (2,1 ml, 15,6 mmol) a SeO₂ (577 mg, 10,4 mmol). Reakční směs byla oranžovým roztokem s pevným podílem SeO₂, jenž se v průběhu reakce postupně rozpustil a následně docházelo též ke ztmavnutí reakční směsi. Reakční směs byla míchána za r. t. po dobu 68 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s MF Hex/EtOAc 3:1. Po ukončení reakce byla reakční směs převedena do přebytku solanky a 3 × vytřepána DCM. Následně byla organická fáze 4× vytřepána nasyceným roztokem FeSO₄·7 H₂O a 2× nasyceným roztokem NaHCO₃. Spojené organické podíly byly vysušeny pomocí bezvodého MgSO₄, přefiltrovány přes vatku a přebytek rozpouštědel byl odpařen na RVO. Surový produkt XIII, jakožto žlutooranžová amorfnní látka, byl purifikován sloupcovou chromatografií na silikagelu s MF CHCl₃/MeOH 50:1 + 0,15 % AcOH. Po odpaření rozpouštědel byl získán produkt XIII ve formě nažloutlé amorfnní látky (1,6 g, 59 %).

IR spektrum: 2983 (C-H), 1692 (C=O), 1574 (C-C aromát), 1427 (O-H karboxyl) cm⁻¹.

HRMS: ESI+ *m/z* vypočteno pro C₃₃H₄₅NO₃ [M + H⁺] 504,3472, nalezeno 504,3477.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.54 (s, 1H, H-30), 8.47 (dd, *J* = 4.7, 1.2 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.04 (dd, *J* = 7.6, 4.8 Hz, 1H, 3 × H-pyridin), 6.29 (s, 1H, H-29a), 5.91 (s, 1H, H-29b), 3.43 (td, *J* = 11.1, 4.8 Hz, 1H, H-19), 2.71 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, H-1a), 1.32 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.75 (s, 3H, 5 × CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 195.13, 180.00, 163.48, 156.63, 146.73, 138.52, 134.04, 130.26, 121.19, 77.16, 56.60, 53.71, 48.77, 46.00, 42.57, 40.70, 39.54, 38.48, 37.04, 36.34, 33.65, 32.21, 31.52, 29.90, 27.42, 24.12, 21.65, 20.37, 15.93, 15.84, 14.70.

4.2 Protekce polohy C-28

Protekce polohy C-28 aldehydu XIII vyžadovala tříkrokovou přípravu protektivní skupiny 2,6-dimethoxybenzylbromidu XIVd a následně samotnou syntézu protekovaného derivátu XIV s 2,6-dimethoxybenzylesterovou skupinou v poloze C-28.

4.2.1 Příprava protektivní skupiny XIVd

Prvním krokem byla syntéza methyl-2,6-dimethoxybenzoátu (**XIVb**) z kyseliny 2,6-dimethoxybenzoové (**XIVa**). Reakční nádoba s míchadlem byla vyžehána, dusíkem ochlazená na r. t. a uzavřena septem. Do této reakční nádoby byla přivedena kyselina 2,6-dimethoxybenzoová (**XIVa**) (3,0 g, 16,5 mmol), a poté, již přes septum, DMC (29 ml) za vzniku bílé suspenze. Následně byl přidán DBU (2,5 ml, 16,5 mmol), jehož přídavek způsobil změnu zbarvení suspenze z bílé na běžovou. Reakční směs byla míchána pod refluxem (105 °C) po dobu 4 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s MF Hex/EtOAc 3:1 a byl doprovázen zružováním reakční směsi. Po ukončení reakce byla reakční směs zpracována dle obecného postupu A. Surový produkt **XIVb**, jenž byl běžovou krystalickou látkou, byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s MF Hex/EtOAc 1:1 + 1 % DCM. Po odpaření rozpouštědel byl získán produkt **XIVb** ve formě bílé krystalické látky (2,6 g, 79 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4), 6.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3, H-5), 3.91 (s, 3H, -(CO)OCH₃), 3.82 (s, 6H, 2 × -OCH₃).

Druhým krokem přípravy protektivní skupiny **XIVd** byla redukce připraveného methylesteru kyseliny 2,6-dimethoxybenzoové (**XIVb**) na 2,6-dimethoxybenzylalkohol (**XIVc**). Do vyžehané, dusíkem ochlazené a septem opatřené reakční nádoby s míchadlem bylo stříkačkou přivedeno 33 ml suchého THF a 21,3 ml 1M roztoku LiAlH₄ v suchém THF. Tato reakční směs byla vychlazená v ledové lázni. Do druhé vyžehané a dusíkem ochlazené baňky byl rychle přiveden připravený derivát **XIVb** (2,5 g, 12,7 mmol) a taktéž 33 ml suchého THF. Tento roztok byl následně stříkačkou přes septum pomalu převeden do reakční nádoby umístěné v ledové lázni, kdy za stálého míchání vznikal čirý roztok. Po přidavku byla reakční nádoba vyjmuta z ledové lázně a za r. t. byla míchána pod atmosférou dusíku po dobu 2 h. Průběh reakce byl monitorován TLC s MF Hex/EtOAc 3:1. Po ukončení reakce byla reakční směs pomalu zředěna vodou, jež rozložila přebytek LiAlH₄ za vzniku bílé sraženiny a vyvíjení H₂. Voda byla přidávána do konce vyvíjení H₂. Vzniklá sraženina byla cca 20 minut míchána, a následně byla zcela rozpuštěna přídavkem 10% H₂SO₄. Reakční směs byla poté zpracována dle obecného postupu A. Vzniklý produkt **XIVc** byl získán jako bílá krystalická látka (2,0 g, 94 %), přičemž byl poté použit v surovém stavu do další reakce.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.22 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4), 6.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3, H-5), 4.79 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-PG}$), 3.85 (s, 6H, $2 \times -\text{OCH}_3$).

Třetím, a tedy i posledním krokem přípravy 2,6-dimethoxybenzylbromidu (**XIVd**), jakožto protektivní skupiny, byla reakce 2,6-dimethoxybenzylalkoholu (**XIVc**) s PBr_3 . Do reakční nádoby s míchadlem, jež byla vyžihána a ochlazená dusíkem na r. t., byl rychle přiveden syntetizovaný derivát **XIVc** (2,0 g, 11,8 mmol) a následně stříkačkou přes septum suchý Et_2O (38,2 ml) za vzniku bezbarvého roztoku. Reakční nádoba byla ponořena do ledové lázně s NaCl a míchána. Taktéž stříkačkou byl přes septum k reakční směsi pomalu přiveden PBr_3 (427 μl) za vzniku nažloutlé sraženiny, která se po kompletním přidavku tohoto reaktantu téměř rozpustila. Reakční směs byla míchána v ledové lázni s NaCl pod atmosférou dusíku po dobu 1 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s MF Hex/ EtOAc 1:1. Reakce byla ukončena, i přes skutečnost neúplné konverze. Do reakční směsi bylo následně za účelem rozkladu přebytku PBr_3 přidáno 10 ml MeOH . Reakční směs byla naředěna studenou vodou, čímž došlo k rozpuštění nažloutlé sraženiny a rychle $3\times$ vytřepána Et_2O . Organická fáze měla neutrální pH. Spojené organické podíly byly $1\times$ vytřepány vodou, vysušeny bezvodým MgSO_4 , přefiltrovány přes vatku a přebytek rozpouštědel byl bez zahřívání baňky ve vodní lázni odpařen na RVO. Získaný produkt **XIVd** nebyl purifikován sloupcovou chromatografií na silikagelu, nýbrž byl ihned použit pro přípravu derivátu **XIV**, protože nebyl počítán výtěžek. Ten by byl totiž vzhledem k neprovedení purifikace větší než 100 %.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.24 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4), 6.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3, H-5), 4.70 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-PG}$), 3.89 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$).

4.2.2 Příprava protekovaného derivátu **XIV**

Do reakční nádoby byl přiveden aldehyd (**XIII**) (151 mg, 0,3 mmol) rozpuštěný ve 3 ml DMF a K_2CO_3 (206 mg) za vzniku nažloutlé suspenze, jež byla míchána za r. t. Po 30 minutách byl přidán syntetizovaný 2,6-dimethoxybenzylbromid (**XIVd**) (197 mg, 0,8 mmol) rozpuštěný ve 3 ml DMF , čímž došlo k mírnému zesvětlení suspenze. Reakční směs byla míchána po dobu 1 h za r. t., přičemž její průběh byl monitorován TLC s MF Tol/ Et_2O 5:1. Po ukončení reakce byla reakční směs zpracována dle obecného postupu A. Surový produkt **XIV** byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s MF

Hex/EtOAc 5:1. Po odpaření rozpouštědel byl získán produkt **XIV** ve formě bílé amorfni látky (196 mg, 52 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.53 (s, 1H, H-30), 8.44 (dd, *J* = 4.6, 1.1 Hz, 1H, H-pyridin), 7.29–7.25 (m, 1H, H-PG), 7.21 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* = 7.6, 4.6 Hz, 1H, 2 × H-pyridin), 6.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2 × H-PG), 6.25 (s, 1H, H-29a), 5.88 (s, 1H, H-29b), 5.28 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 5.21 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, -CH₂-PG), 3.83 (s, 6H, 2 × -OCH₃), 3.37 (td, *J* = 11.2, 4.7 Hz, 1H, H-19), 2.69 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, H-1a), 1.30 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.76 (s, 3H, 5 × CH₃).

4.3 Příprava derivátu **XV** – Pinnickova oxidace

Do reakční nádoby byl přiveden derivát **XIV** (325 mg, 0,5 mmol), MeOH (13 ml), DCM (9,8 ml) a 2-methylbut-2-en (4 ml) za vzniku bezbarvého roztoku. Ve druhé baňce byl připraven roztok NaClO₂ (281 mg, 2,5 mmol), KH₂PO₄ (338 mg, 2,5 mmol) ve vodě (3,25 ml), jenž byl přidán k roztoku v reakční nádobě za vzniku růžově zbarvené emulze s bílou sraženinou. Vzniklá reakční směs byla míchána za r. t. po dobu 24 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s MF Hex/EtOAc 3:1. Po ukončení reakce byla reakční směs přivedena do nadbytku solanky a 3× vytřepána DCM. Organická vrstva měla neutrální pH. Spojené organické podíly byly 2× vytřepány solankou, vysušeny MgSO₄, přefiltrovány přes vatu a přebytek rozpouštědel byl odpařen na RVO. Získaný surový produkt **XV** byl narůžovělou amorfni látkou (367 mg), jenž byl bez purifikace použit do další reakce.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ 12.29 (s, 1H, O-H), 8.39 (s, 1H, H-pyridin), 7.38–7.28 (m, 2H, H-pyridin + H-PG), 7.06 (s, 1H, H-pyridin), 6.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2 × H-PG), 5.97 (s, 1H, H-29a), 5.59 (s, 1H, H-29b), 5.11 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, -CH₂-PG), 3.78 (s, 6H, 2 × -OCH₃), 1.23 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.70 (s, 3H, 5 × CH₃).

4.4 Příprava derivátu **XVI** – reakce s linkerem

Do reakční nádoby byl přiveden derivát **XV** (367 mg, 0,5 mmol) a 25 ml DMF za vzniku roztoku s narůžovělým zákalem. Následně byly přidány reaktanty EDC (157 mg, 0,8 mmol) a HOBt (111 mg, 0,8 mmol), jež se rozpouštěly pouze částečně. Vzniklá

suspenze byla míchána po dobu 30 minut, v průběhu kterých došlo k rozpuštění pevných složek, načež byl přidán DIPEA (143 μ l, 0,8 mmol) a 11-azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (217 μ l, 1,1 mmol). Reakční směs byla míchána za r. t. 48 h, přičemž její průběh byl sledován pomocí TLC s MF Tol/Et₂O 1:1. Po ukončení reakce byla reakční směs zpracována obecným postupem A. Surový produkt **XVI** byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s MF Hex/EtOAc 1:1. Po odpaření přebytku rozpouštědel byl získán produkt **XVI** ve formě bezbarvé amorfnní látky (283 mg, 59 %).

IR spektrum: 2940 (C-H), 2100 (C-N₃), 1714 (C=O), 1597 (C-C aromát), 1120 (C-O ether) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₅₀H₇₁N₅O₈ [M + H⁺] 870,5375, nalezeno 870,5387. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (dd, *J* = 4.4, 1.1 Hz, 1H, H-pyridin), 7.27 (t, 1H, H-PG), 7.22 (dd, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* = 7.6, 4.7 Hz, 1H, 2 \times H-pyridin), 6.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2 \times H-PG), 6.21 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, N-H), 5.42 (s, 1H, H-29a), 5.25 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H-29b), 5.23–5.19 (m, 2H, -CH₂-PG), 3.83 (s, 6H, 2 \times -OCH₃), 3.69–3.64 (m, 10H), 3.61–3.57 (m, 2H), 3.53–3.49 (m, 2H), 3.37 (t, 2H, 16 \times H-linker), 3.22 (td, *J* = 11.0, 4.6 Hz, 1H, H-19), 1.31 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.77 (s, 3H, 5 \times CH₃). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 176.39, 169.73, 164.06, 159.60, 152.39, 147.39, 137.54, 130.25, 129.69, 120.76, 116.15, 112.63, 103.83, 77.16, 70.89, 70.83, 70.81, 70.47, 70.25, 70.20, 56.83, 55.96, 55.56, 53.67, 50.83, 50.59, 49.01, 46.12, 43.64, 42.60, 40.66, 39.59, 39.25, 38.21, 36.74, 36.35, 33.70, 32.32, 32.02, 31.77, 29.67, 27.10, 24.26, 21.71, 20.39, 15.78, 15.62, 14.81.

4.5 Příprava derivátu **XVII** – deprotektce

Do reakční nádoby byl přiveden derivát **XVI** (234 mg) a 2,34 ml 5% roztoku TFA v DCM. Takto připravená reakční směs byla míchána za r. t. po dobu 105 min. Průběh reakce byl monitorován TLC s čistým EtOAc jako MF. Po ukončení reakce byla reakční směs zbavena TFA pod proudem dusíku. Surový produkt **XVII** byl purifikován sloupcovou chromatografií na silikagelu s MF CHCl₃/MeOH 25:1. Po odpaření rozpouštědel byl získaný produkt **XVII** bezbarvou olejovitou látkou (172 mg, 89 %).

IR spektrum: 3100 (OH), 2100 (C-N₃), 1684 (C=O), 1179, 1128 (C-O ether) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₄₁H₆₁N₅O₆ [M + H⁺] 720,4695, nalezeno 720,4695. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.53 (dd, *J* = 5.5, 1.0 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H,

2 × H-pyridin), 7.91 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, N-H), 7.68 (dd, $J = 7.7, 5.7$ Hz, 1H, H-pyridin), 5.48 (s, 1H, H-29a), 5.33 (s, 1H, H-29b), 3.68–3.60 (m, 10H), 3.59–3.54 (m, 2H), 3.47–3.37 (m, 2H), 3.34 (t, 2H, 16 × H-linker), 3.24 (td, $J = 11.2, 3.9$ Hz, 1H, H-19), 3.05 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, H-1a), 2.51 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H-1b), 1.42 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.82 (s, 3H, 5 × CH₃). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 179.81, 172.50, 160.95, 153.42, 147.92, 142.40, 136.85, 124.98, 116.99, 71.70, 71.68, 71.55, 71.31, 71.13, 70.68, 57.62, 53.89, 52.08, 51.78, 49.85, 45.61, 43.90, 43.70, 41.75, 40.38, 39.49, 39.43, 37.78, 37.33, 34.37, 33.75, 33.05, 30.84, 30.63, 28.19, 23.81, 22.73, 20.66, 16.21, 16.13, 15.07.

Seznam literatury

- (1) Zhao, R.; Lu, L.; Shi, Q.; Chen, J.; He, Y.; Zacharis, C. K.; Tzanavaras, P. D. *Molecules* **2018**, *23*, 2838.
- (2) Schmidt-Dannert, C. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2014**, *148*, 19–61.
- (3) Chen, X.; Köllner, T. G.; Jia, Q.; Norris, A.; Santhanam, B.; Rabe, P.; Dickschat, J. S.; Shaulsky, G.; Gershenzon, J.; Chen, F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 12132–12137.
- (4) Breitmaier, E. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2006**; pp 1–214.
- (5) Yamada, Y.; Kuzuyama, T.; Komatsu, M.; Shin-ya, K.; Omura, S.; Cane, D. E.; Ikeda, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 857–862.
- (6) Ajikumar, P. K.; Tyo, K.; Carlsen, S.; Mucha, O.; Phon, T. H.; Stephanopoulos, G. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 167–190.
- (7) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475.
- (8) Perveen, S. *Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids*; IntechOpen: Rijeka, **2018**; pp 1–12.
- (9) Schrader, J.; Bohlmann, J. *Biotechnology of Isoprenoids*; Springer International Publishing: Cham, **2015**; pp 3–107.
- (10) Duan, X.-Y.; Guo, K.-Y.; Lv, D.-J.; Mei, R.-Q.; Zhang, M.-D. *Fitoterapia* **2020**, *147*, 104734.
- (11) Miranda, R. de S.; Jesus, B. da S. M.; Silva Luiz, S. R.; Viana, C. B.; Adão Malafaia, C. R.; Figueiredo, F. de S.; Carvalho, T. dos S. C.; Silva, M. L.; Londero, V. S.; Costa-Silva, T. A.; Lago, J. H. G.; Martins, R. C. C. *Phyther. Res.* **2022**, *36*, 1459.

- (12) de Matos Castro Silva, D.; de Luca Ito, R. K.; Bonfietti, L. X.; Szeszs, M. W.; Rocha, A. L.; Viola, N.; Abdala, E.; de Souza Carvalho Melhem, M. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2020**, *14*, 299–309.
- (13) McGenity, T. J.; Crombie, A. T.; Murrell, J. C. *ISME J.* **2018**, *12*, 931–941.
- (14) Ruzicka, L. *Experientia* **1953**, *9*, 357–367.
- (15) Hillier, S. G.; Lathe, R. *J. Endocrinol.* **2019**, *242*, R9–R22.
- (16) Mosquera, M. E. G.; Jiménez, G.; Tabernero, V.; Vinueza-Vaca, J.; García-Estrada, C.; Kosalková, K.; Sola-Landa, A.; Monje, B.; Acosta, C.; Alonso, R.; Valera, M. Á. *Sustain. Chem.* **2021**, *2*, 467–492.
- (17) Sharkey, T. D.; Wiberley, A. M. Y. E.; Donohue, A. R. *Ann. Bot.* **2008**, *101*, 5–18.
- (18) Gelmont, D.; Stein, R. A.; Mead, J. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *99*, 1456–1460.
- (19) Moshonas, M. G.; Shaw, P. E. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 1029–1030.
- (20) Ludwiczuk, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M. I. *Pharmacognosy* **2017**, 233–266.
- (21) Trombetta, D.; Venuti, V.; Cristani, M.; Saija, A.; Bisignano, G.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Daniele, C.; Mazzanti, G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2474–2478.
- (22) Sobral, M. V.; Xavier, A. L.; Lima, T. C.; de Sousa, D. P. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 953451.
- (23) Johnen, L.; Behr, A. *ChemSusChem* **2009**, *2*, 1072–1095.
- (24) Thorup, I.; Würtzen, G.; Carstensen, J.; Olsen, P. *Toxicol. Lett.* **1983**, *19*, 211–215.
- (25) Rasmussen, S. C. *Ambix* **2018**, *65*, 356–372.
- (26) Barceloux, D. G. *Med. Toxicol. Nat. Subst.* **2008**, 407–413.

- (27) Coats, J. R.; Zhu, J.; Bartholomay, L. C.; Paluch, G. E. *Amyris and Siam-wood Essential Oils: Insect Activity of Sesquiterpenes*; Peterson, C. J.; Stout II, D. M.; American Chemical Society: Washington DC, **2010**; pp 5–18.
- (28) Han, X.; Chai, Y.; Lv, C.; Chen, Q.; Liu, J.; Wang, Y.; Chou, G. *Molecules* **2022**, *27*, 5079.
- (29) Li, H.; Song, X.; Li, H.; Zhu, L.; Cao, S.; Liu, J. *Molecules* **2022**, *27*, 1115.
- (30) Arizmendi, N.; Alam, S. B.; Azyat, K.; Makeiff, D.; Befus, A. D.; Kulka, M. *Molecules* **2022**, *27*, 2450.
- (31) Lanzotti, V. *Diterpenes for Therapeutic Use*; Ramawat, K. G.; Mérillon, J.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2013**; pp 3173–3191.
- (32) Topcu, G.; Goren, A. C. *Rec. Nat. Prod.* **2007**, *1*, 1–16.
- (33) Li, K.; Gustafson, K. R. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, *38*, 1251–1281.
- (34) Ebada, S. S.; Lin, W.; Proksch, P. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 313–346.
- (35) Vries, G. W. De; Muallem, S.; Sachs, G. S.; Woldemussie, E.; Wheeler, L. A.; Goodrum, D. *J. Biol. Chem.* **2021**, *262*, 6531–6538.
- (36) de Silva, E. D.; Scheuer, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1611–1614.
- (37) Tanaka, T.; Shnimizu, M.; Moriwaki, H. *Molecules* **2012**, *17*, 3202–3242.
- (38) Huang, M.; Lu, J.-J.; Huang, M.-Q.; Bao, J.-L.; Chen, X.-P.; Wang, Y.-T. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21*, 1801–1818.
- (39) Yang, W.-S.; Qi, X.-R.; Xu, Q.-Z.; Yuan, C.-H.; Yi, Y.-H.; Tang, H.-F.; Shen, L.; Han, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *41*, 116188.
- (40) Wang, J.; Jin, M.; Sun, J.; Qi, Y.; Cui, L.; Wang, M.; Zhou, W.; Li, G. *Chem. Nat. Compd.* **2022**, 1–3.
- (41) Laconi, S.; Madeddu, M. A.; Pompei, R. *Phyther. Res.* **2014**, *28*, 1890–1892.

- (42) Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I.-S.; Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243–247.
- (43) Gonzalez, G.; Hodoň, J.; Kazakova, A.; D'Acunतो, C. W.; Kaňovský, P.; Urban, M.; Strnad, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *213*, 113168.
- (44) Abdullah; Khan, M. A.; Ahmad, W.; Ibrar, M.; Rehman, M. U.; Ahmad, M.; Adhikari, A.; Asif, M. *Drug Chem. Toxicol.* **2022**, *45*, 1796–1807.
- (45) Saleem, M.; Maddodi, N.; Zaid, M. A.; Khan, N.; Bin Hafeez, B.; Asim, M.; Suh, Y.; Yun, J.-M.; Setaluri, V.; Mukhtar, H. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 2119–2127.
- (46) Galgon, T.; Höke, D.; Dräger, B. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 187–190.
- (47) LI, S.; JIN, C. *Med. Plant* **2022**, *13*, 78–80.
- (48) Cîntă Pînzaru, S.; Leopold, N.; Kiefer, W. *Talanta* **2002**, *57*, 625–631.
- (49) Alakurtti, S.; Mäkelä, T.; Koskimies, S.; Yli-Kauhaluoma, J. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1–13.
- (50) Scheffler, A. *Planta Med.* **2019**, *85*, 524–527.
- (51) Tuli, H. S.; Sak, K.; Gupta, D. S.; Kaur, G.; Aggarwal, D.; Chaturvedi Parashar, N.; Choudhary, R.; Yerer, M. B.; Kaur, J.; Kumar, M.; Garg, V. K.; Sethi, G. *Plants (2223-7747)* **2021**, *10*, 2663.
- (52) Kim, D. S. H. L.; Chen, Z.; Van Nguyen, T.; Pezzuto, J. M.; Qiu, S.; Lu, Z.-Z. *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 1607–1612.
- (53) Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 90–114.
- (54) Zichri, S. Ben; Kolusheva, S.; Shames, A. I.; Schneiderman, E. A.; Poggio, J. L.; Stein, D. E.; Doubijensky, E.; Levy, D.; Orynbayeva, Z.; Jelinek, R. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2021**, *1863*, 183471.
- (55) Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17–25.

- (56) Fulda, S.; Debatin, K.-M.; Jeremias, I.; Steiner, H. H.; Pietsch, T. *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 435–441.
- (57) Takada, Y.; Aggarwal, B. B. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 3278–3286.
- (58) Yi, J.; Xia, W.; Yuan, L.; Wu, J.; Tu, D.; Tan, Z.; Fang, J.; Wu, J. *J. Vet. Sci.* **2014**, *15*, 141–148.
- (59) Silva, F. S. G.; Oliveira, P. J.; Duarte, M. F. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 2991–3008.
- (60) Roy Chowdhury, A.; Mandal, S.; Goswami, A.; Ghosh, M.; Mandal, L.; Chakraborty, D.; Ganguly, A.; Tripathi, G.; Mukhopadhyay, S.; Bandyopadhyay, S.; Majumder, H. K. *Mol. Med.* **2003**, *9*, 26–36.
- (61) Hashimoto, F.; Kashiwada, Y.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H. *Bioorganic Med. Chem.* **1997**, *5*, 2133–2143.
- (62) Eignerova, B.; Tichy, M.; Krasulova, J.; Kvasnica, M.; Rarova, L.; Christova, R.; Urban, M.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Hajduch, M.; Sarek, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *140*, 403–420.
- (63) Rowe, E. J.; Orr, J. E.; Uhl, A. H.; Parks, L. M. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim).* **1949**, *38*, 122–124.
- (64) Li, H.; He, N.; Li, X.; Zhou, L.; Zhao, M.; Jiang, H.; Zhang, X. *Oncol. Lett.* **2013**, *6*, 885–890.
- (65) Lee, W.; Song, K.-S.; Bae, J.-S.; Yang, E.-J.; Ku, S.-K. *Inflammation* **2013**, *36*, 94–102.
- (66) Somova, L. O.; Nadar, A.; Rammanan, P.; Shode, F. O. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 115–121.
- (67) Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Siordia-Reyes, A. G.; Meckes-Fischer, M.; Jiménez-Arellanes, A. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *9*, 644–651.
- (68) He, X.; Liu, R. H. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4366–4370.

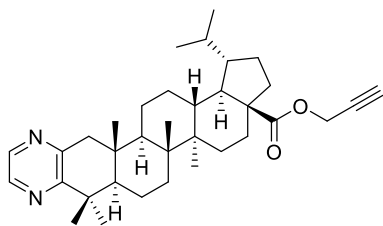
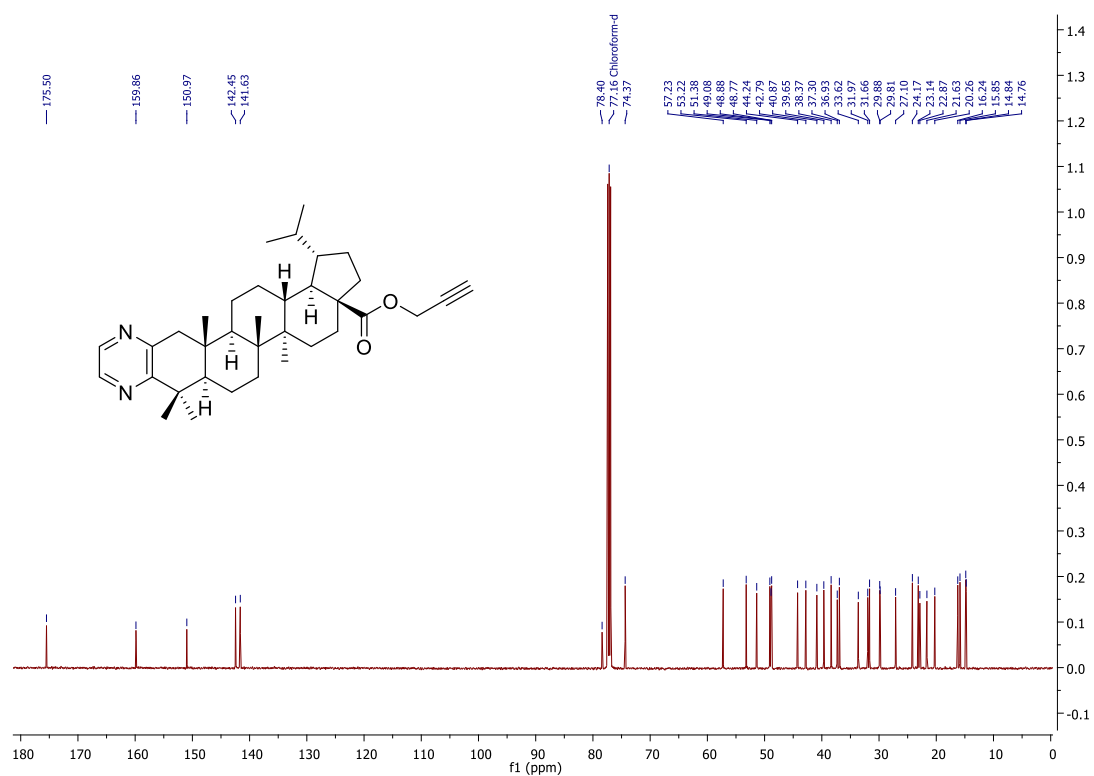
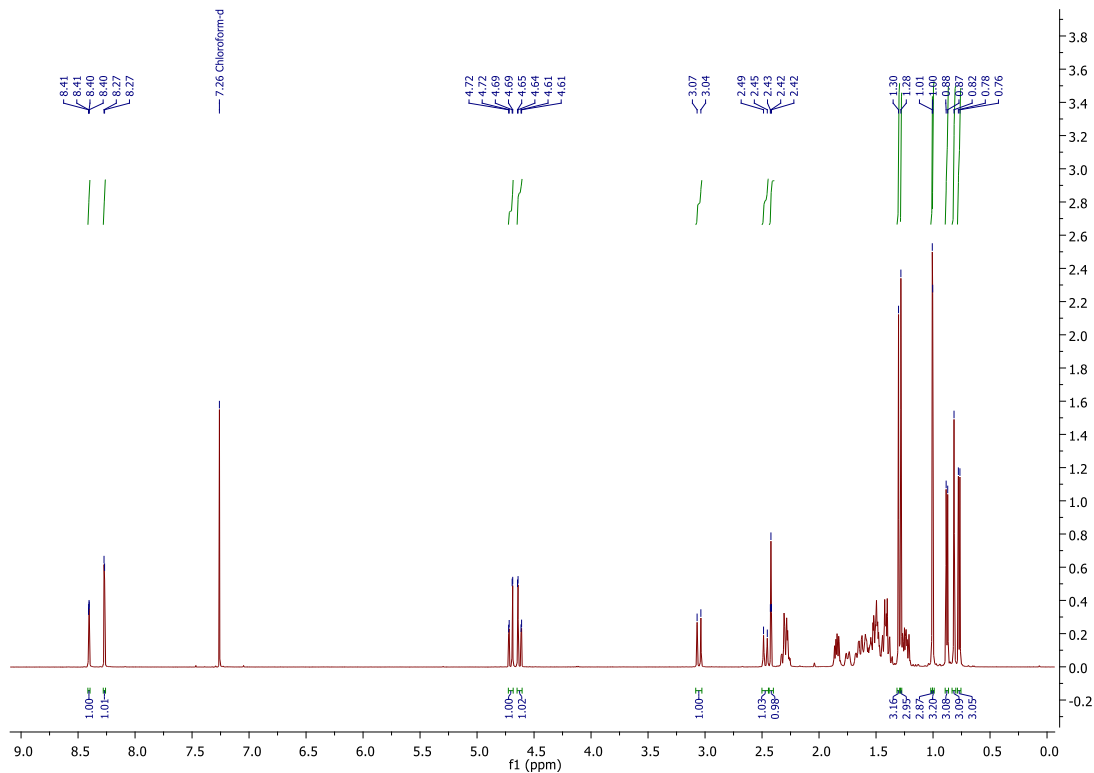
- (69) Soto, E. R.; Rus, F.; Ostroff, G. R. *Molecules* **2022**, *27*, 3580.
- (70) Pokorný, J.; Borková, L.; Urban, M. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 636–658.
- (71) Zhou, M.; Zhang, R.-H.; Wang, M.; Xu, G.-B.; Liao, S.-G. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *131*, 222–236.
- (72) Kvasnica, M.; Urban, M.; Dickinson, N. J.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 1303–1330.
- (73) Kumar, V.; Rani, N.; Aggarwal, P.; Joshi, N.; Burman, A. C.; Sanna, V. K.; Singh, A. T.; Jaggi, M.; Sharma, P. K.; Irchhaiya, R. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5058–5062.
- (74) Urban, M.; Sarek, J.; Kvasnica, M.; Tislerová, I.; Hajdúch, M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 526–532.
- (75) Sousa, J. L. C.; Albuquerque, H. M. T.; Silvestre, A. J. D.; Silva, A. M. S. *Molecules* **2022**, *27*, 4904.
- (76) Sejbál, J.; Klinot, J.; Protiva, J.; Vystrčil, A. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1986**, *51*, 118–127.
- (77) Xu, J.; Li, Z.; Luo, J.; Yang, F.; Liu, T.; Liu, M.; Qiu, W.-W.; Tang, J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3122–3134.
- (78) Haavikko, R.; Nasereddin, A.; Sacerdoti-Sierra, N.; Kopelyanskiy, D.; Alakurtti, S.; Tikka, M.; Jaffe, C. L.; Yli-Kauhaluoma, J. *Medchemcomm* **2014**, *5*, 445–451.
- (79) Yaman, B.; Karaarslan, I.; Akalın, T.; Özdemir, F. *J. Cutan. Pathol.* **2021**, *48*, 807–810.
- (80) Hodoň, J.; Frydrych, I.; Trhlíková, Z.; Pokorný, J.; Borková, L.; Benická, S.; Vlk, M.; Lišková, B.; Kubíčková, A.; Medvedíková, M.; Pisár, M.; Šarek, J.; Das, V.; Ligasová, A.; Koberna, K.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Urban, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *243*, 114777.
- (81) Ghosh, P.; Rasul, M. G.; Chakraborty, M.; Mandal, A.; Saha, A. *Indian J. Chem. - Sect. B Org. Med. Chem.* **2011**, *50*, 1519–1523.

- (82) Abbiati, G.; Arcadi, A.; Bianchi, G.; Di Giuseppe, S.; Marinelli, F.; Rossi, E. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6959–6966.
- (83) Krajcovicova, S.; Stankova, J.; Dzubak, P.; Hajdich, M.; Soural, M.; Urban, M. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 4957–4966.
- (84) Nienhaus, G. U. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 8992–8994.
- (85) Scinto, S. L.; Bilodeau, D. A.; Hincapie, R.; Lee, W.; Nguyen, S. S.; Xu, M.; am Ende, C. W.; Finn, M. G.; Lang, K.; Lin, Q.; Pezacki, J. P.; Prescher, J. A.; Robillard, M. S.; Fox, J. M. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, *1*, 30.
- (86) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (87) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- (88) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- (89) Chupakhin, E. G.; Krasavin, M. Y. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2018**, *54*, 483–501.
- (90) Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346–16347.
- (91) Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805–16811.
- (92) Lim, R. K. V.; Lin, Q. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 828–839.
- (93) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- (94) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- (95) Heravi, M. M.; Tamimi, M.; Yahyavi, H.; Hosseinnejad, T. *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20*, 1591–1647.
- (96) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210–216.

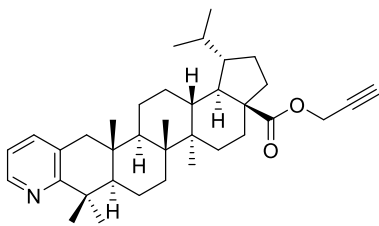
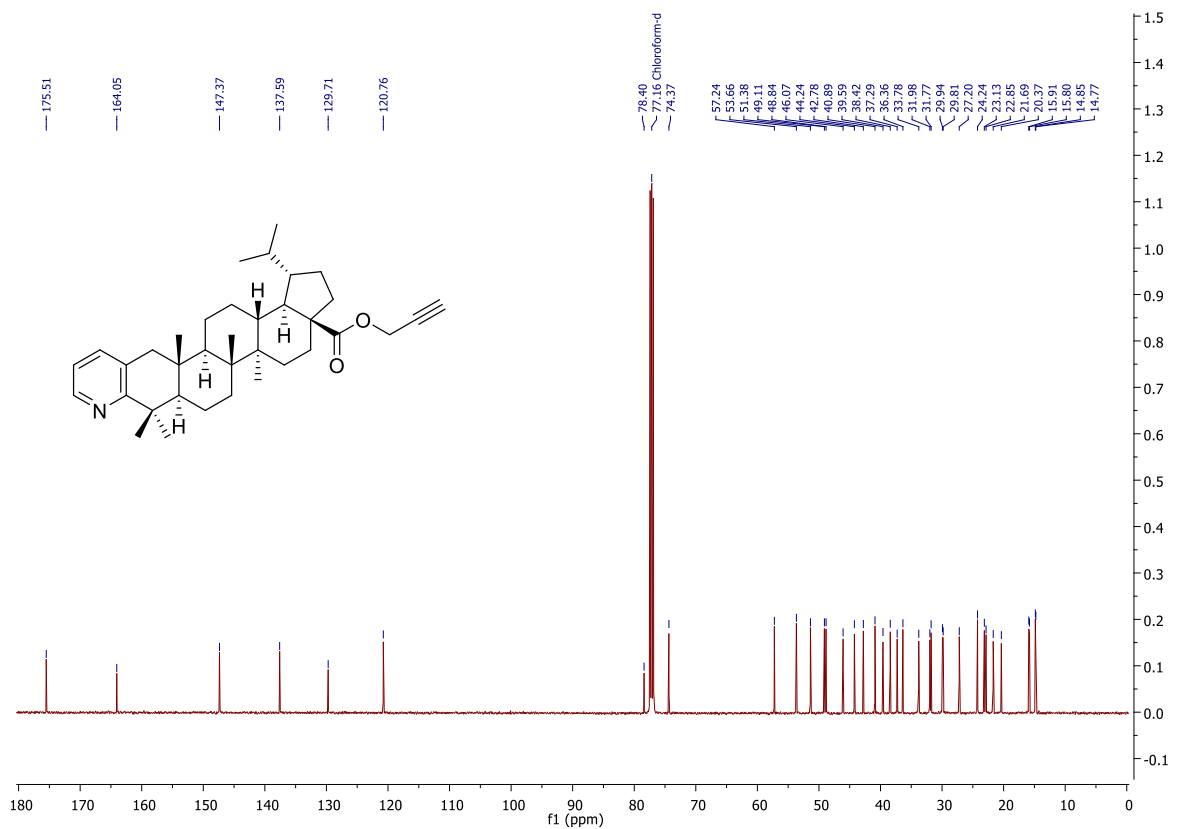
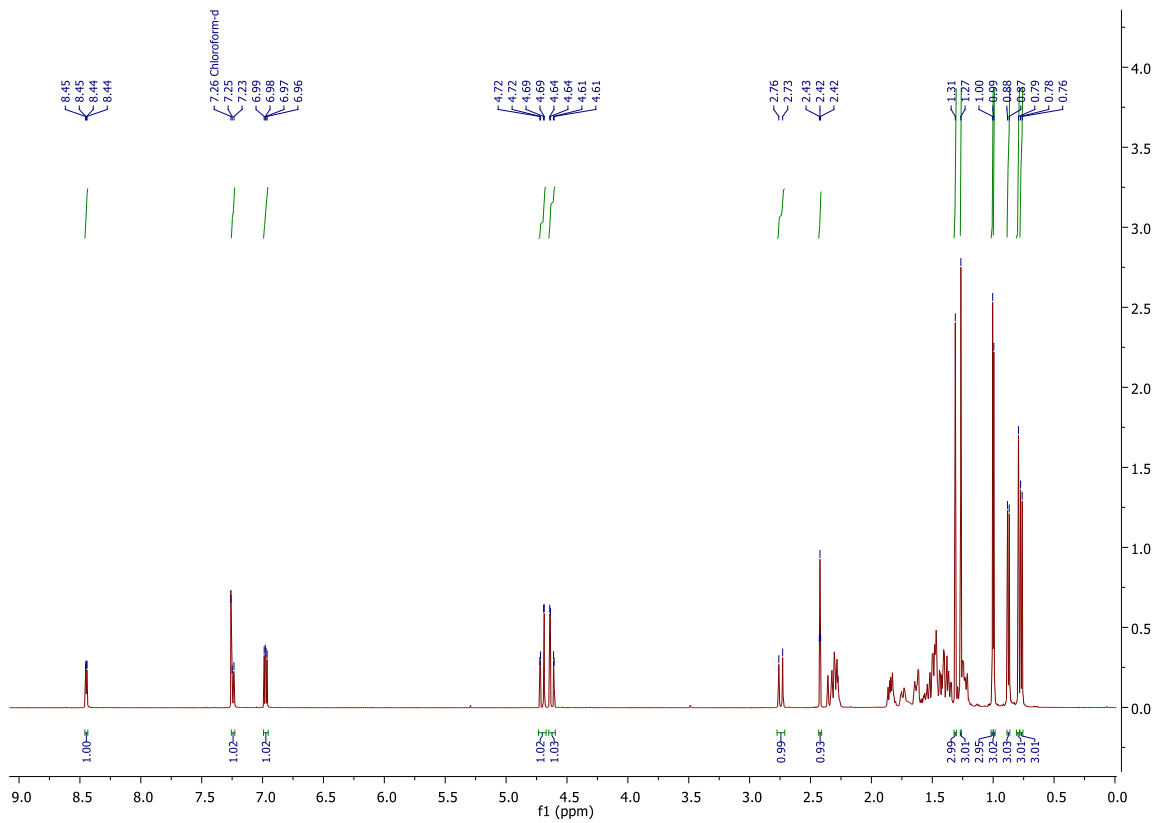
- (97) Vlk, M.; Urban, M.; Elbert, T.; Sarek, J. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, *298*, 1149–1157.
- (98) Melnikova, N.; Burlova, I.; Kiseleva, T.; Klabukova, I.; Gulenova, M.; Kislitsin, A.; Vasin, V.; Tanaseichuk, B. *Molecules* **2012**, *17*, 11849–11863.
- (99) Ghosh, A. K.; Shahabi, D. *Tetrahedron Lett.* **2021**, *63*, 152719.
- (100) Jurčeka, O., Modifikace Dihydrobetulinu v Poloze C-30 Pomocí Cykloadičních Reakcí, Diplomová Práce, Univerzita Palackého v Olomouci, **2022**.
- (101) Bachořík, J.; Nепublikované výsledky.
- (102) Borkova, L.; Jasikova, L.; Rehulka, J.; Frisonsova, K.; Urban, M.; Frydrych, I.; Popa, I.; Hajduch, M.; Dickinson, N. J.; Vlk, M.; Dzubak, P.; Sarek, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 482–490.
- (103) Jakubcová, N.; Nепublikované výsledky.
- (104) Aitken, R. A.; Saab, E. A.; Slawin, A. M. Z. *Molbank* **2021**, *2021*, M1277–M1277.
- (105) Shieh, W.-C.; Dell, S.; Repič, O. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2188–2191.
- (106) Fallek, A.; Weiss-Shtofman, M.; Kramer, M.; Dobrovetsky, R.; Portnoy, M. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 3722–3727.

Příloha: ^1H a ^{13}C NMR spektra nově připravených sloučenin

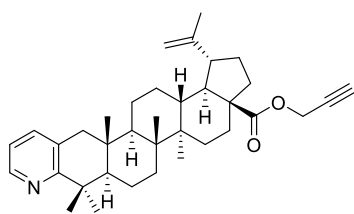
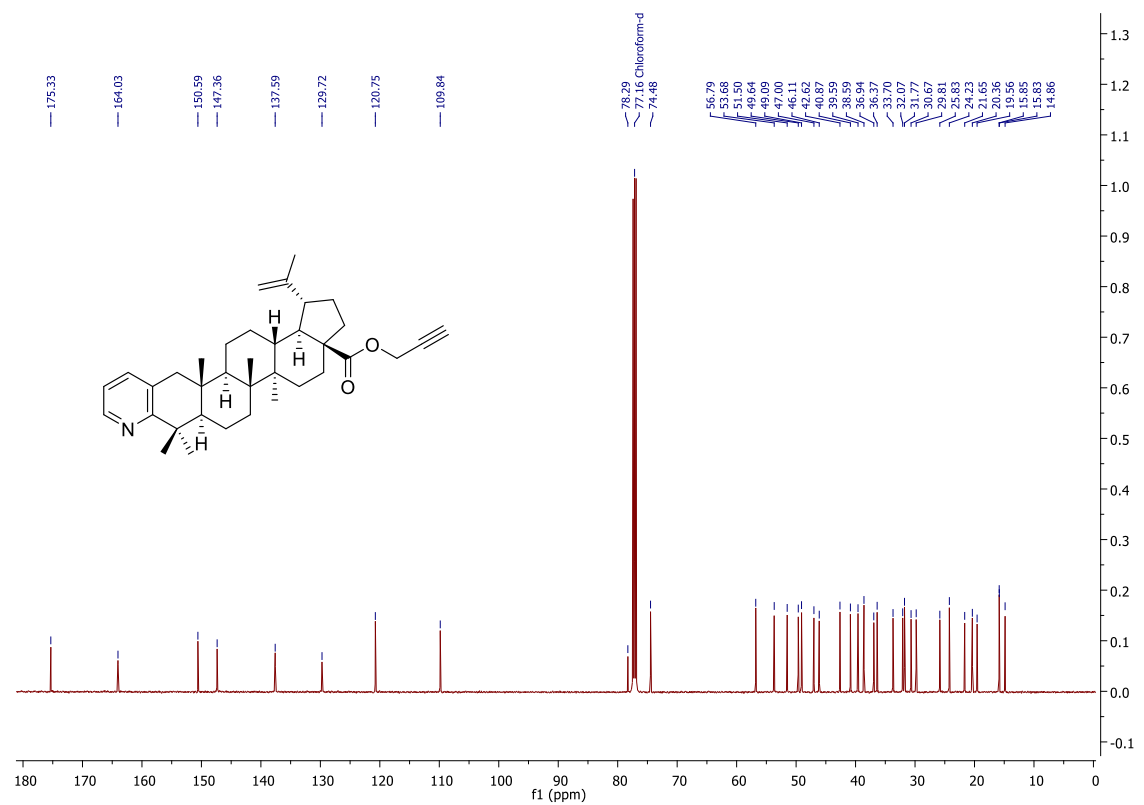
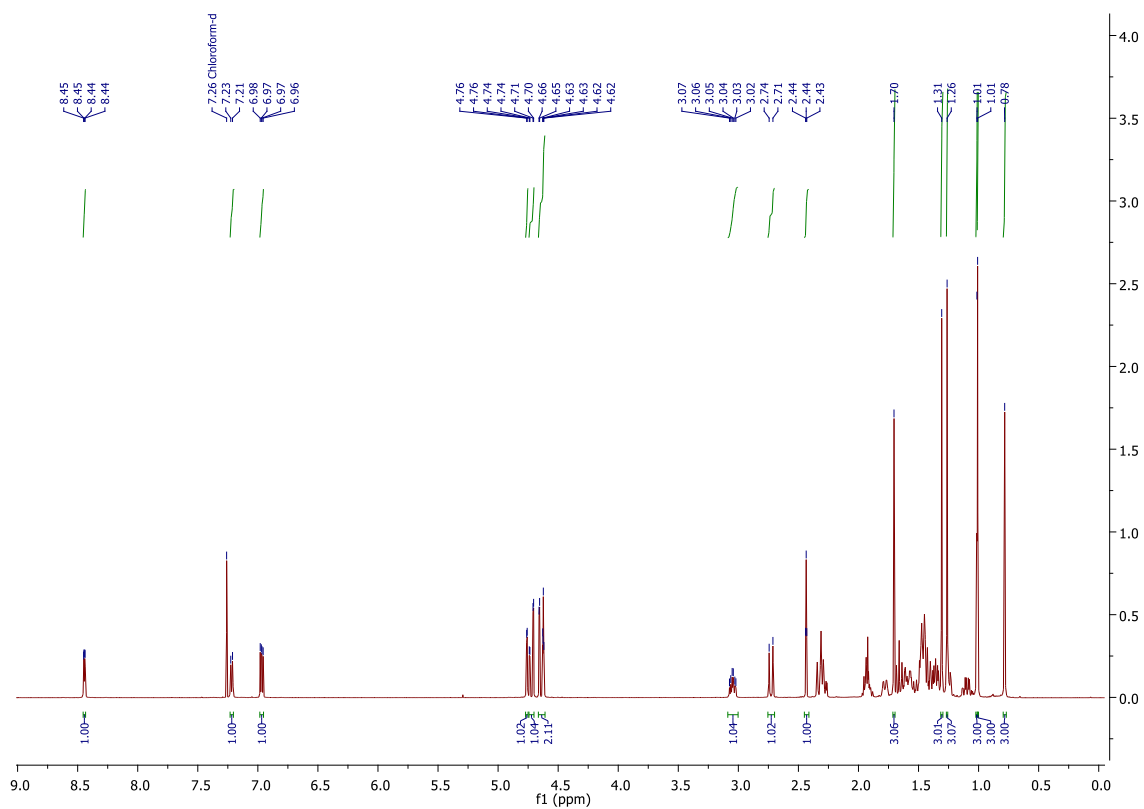
Propargylester pyrazinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (VII)



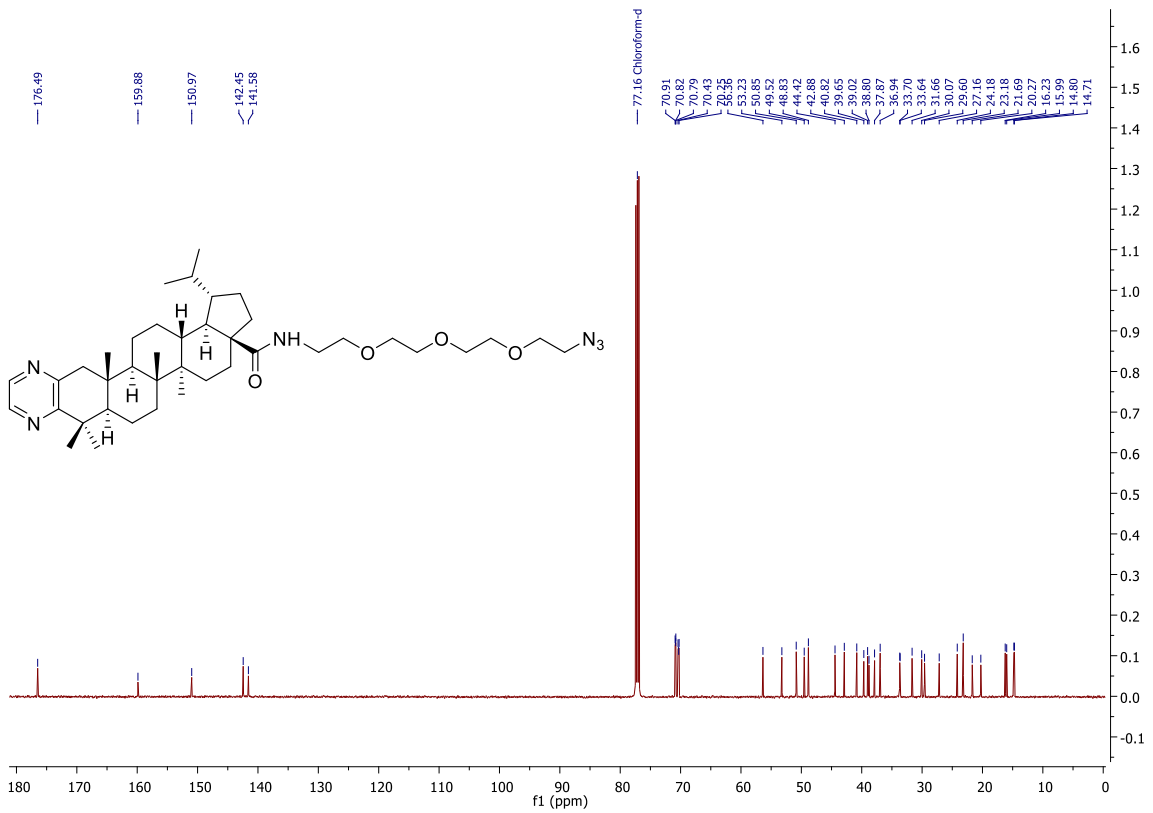
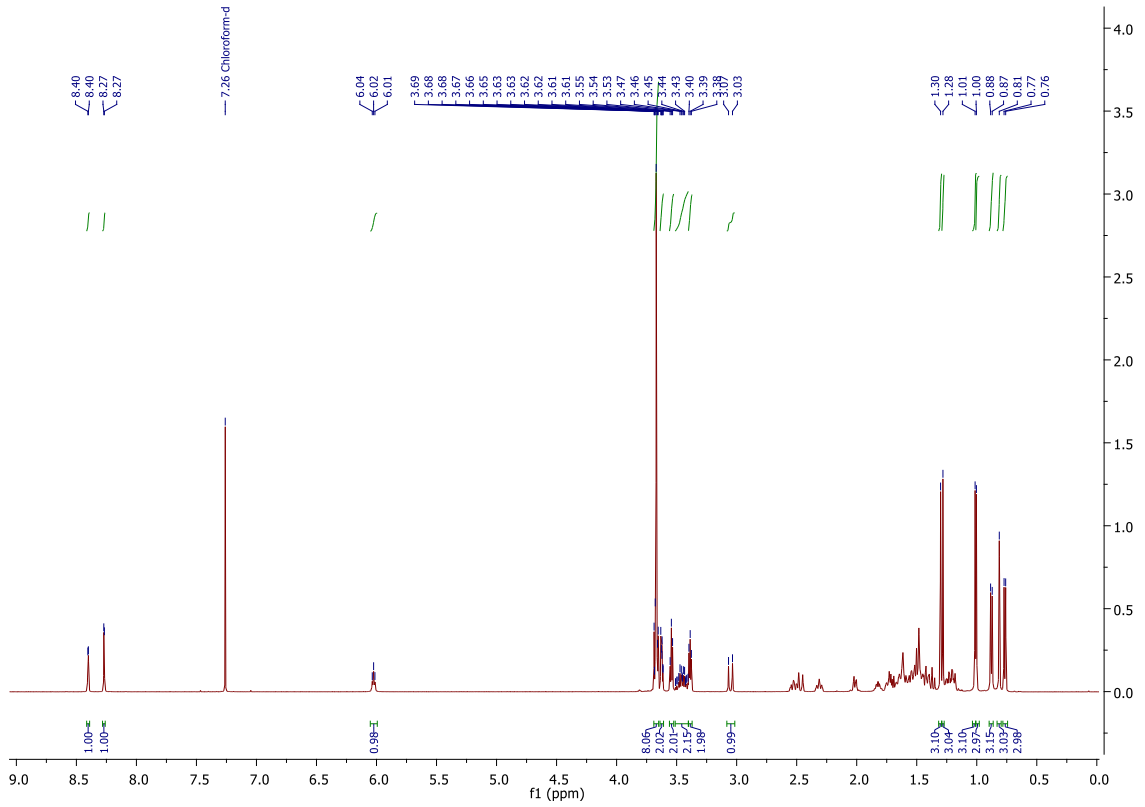
Propargylester pyridinového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (VIII)



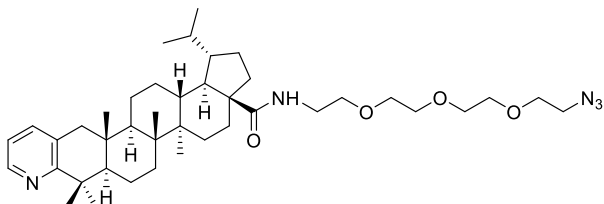
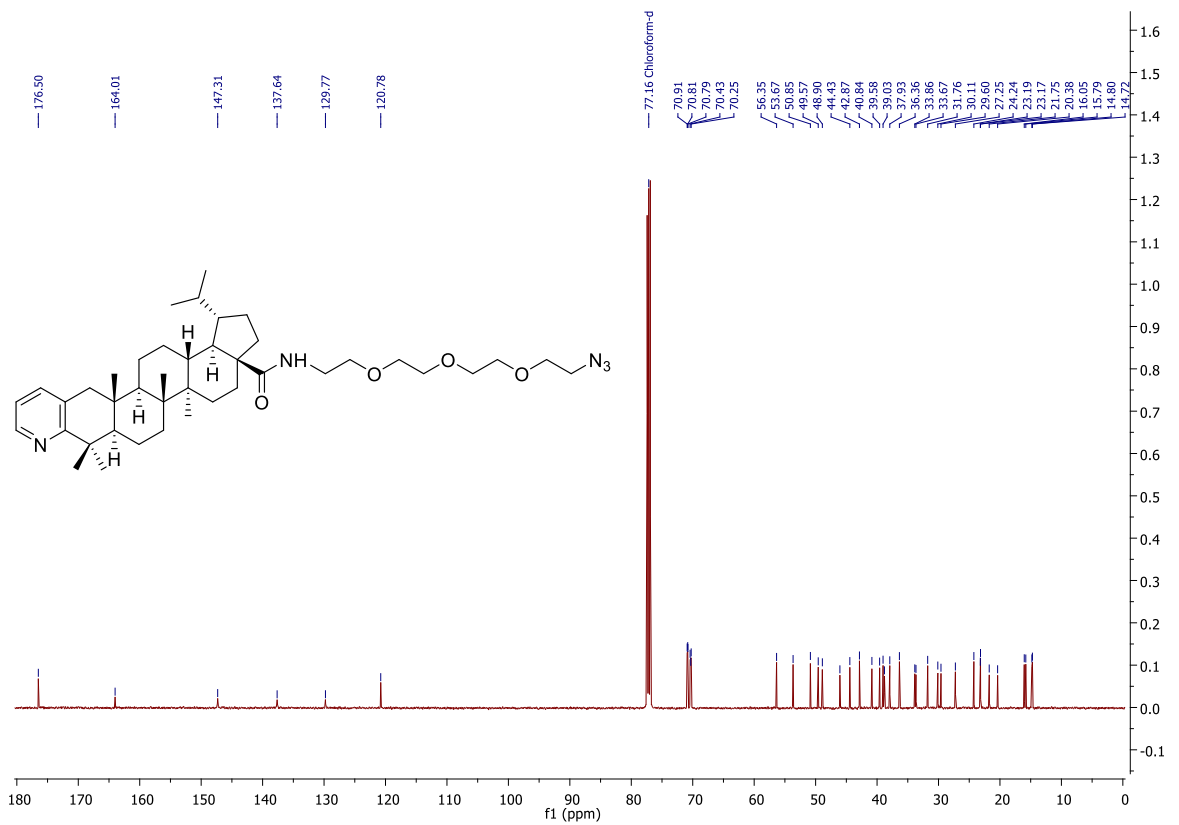
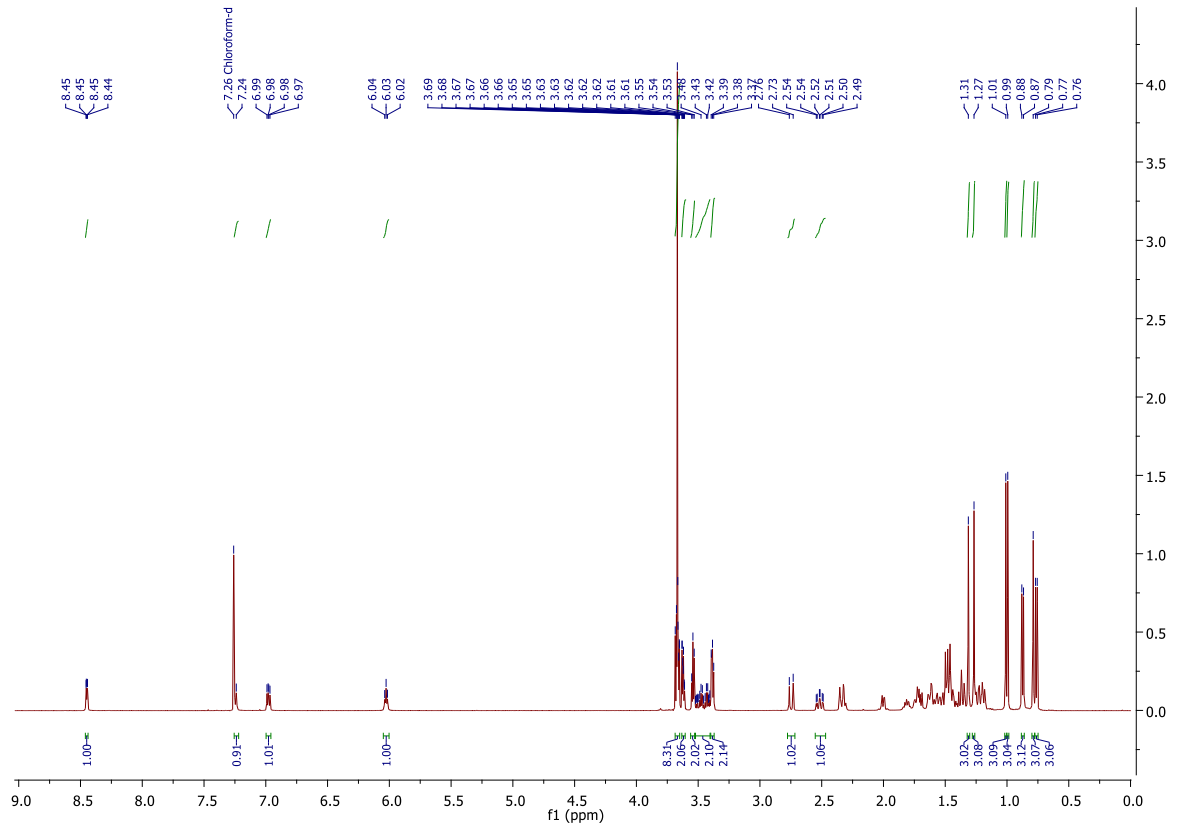
Propargylester pyridinového derivátu kyseliny betulonové (IX)



Pyrazinový derivát kyseliny dihydrobetulonové s azidovým linkerem (X)

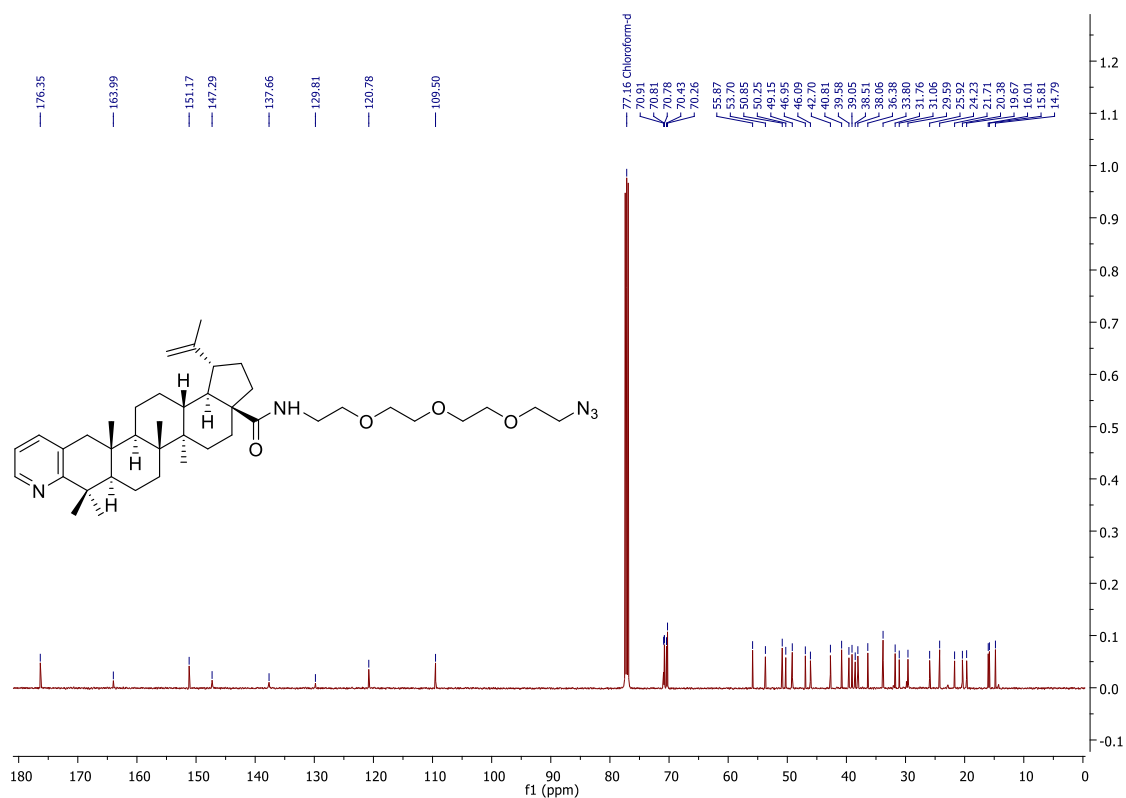
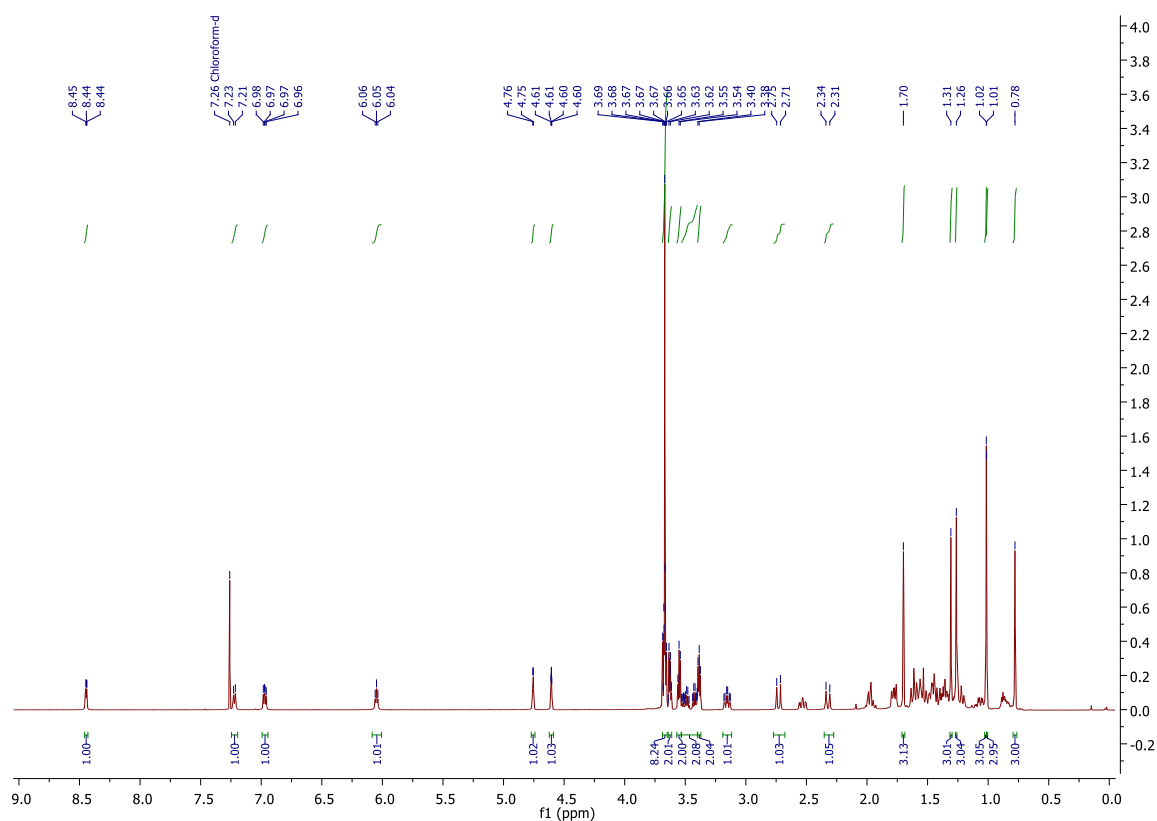


Pyridinový derivát kyseliny dihydrobetulonové s azidovým linkerem (XI)

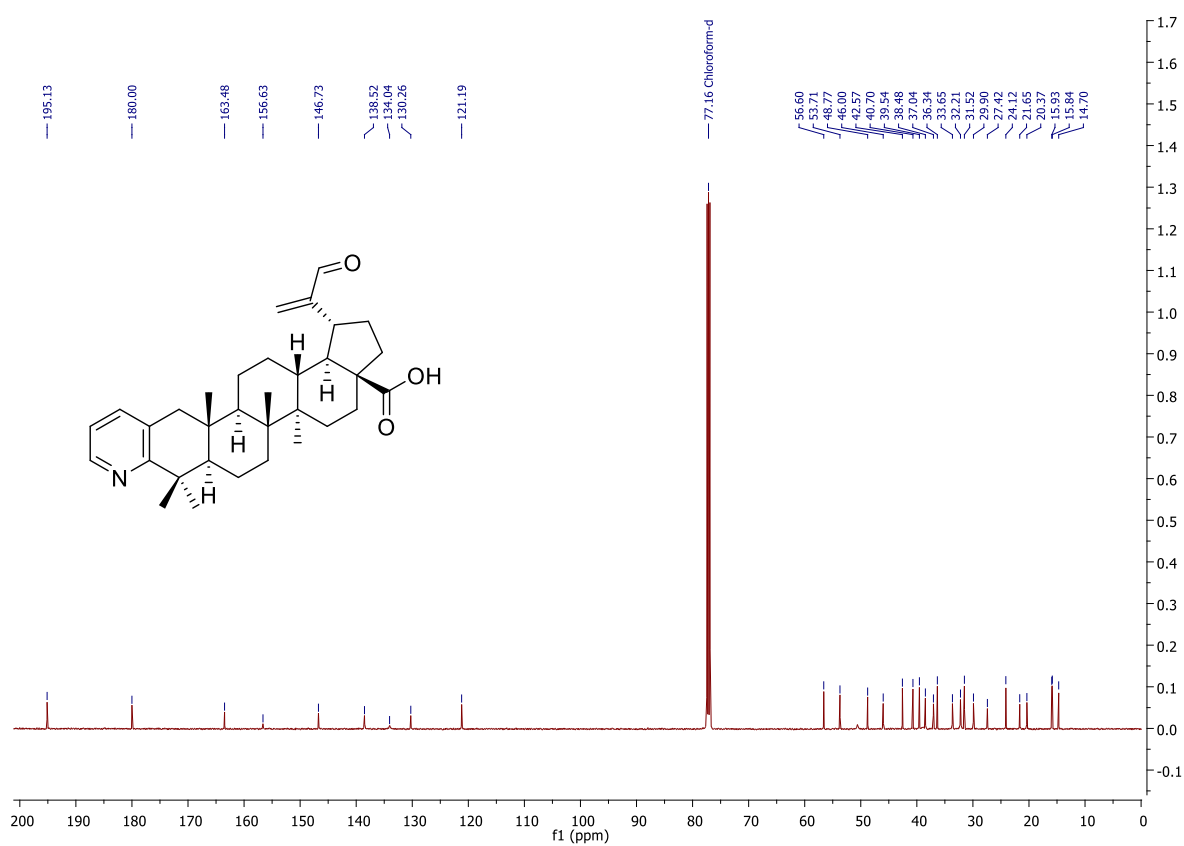
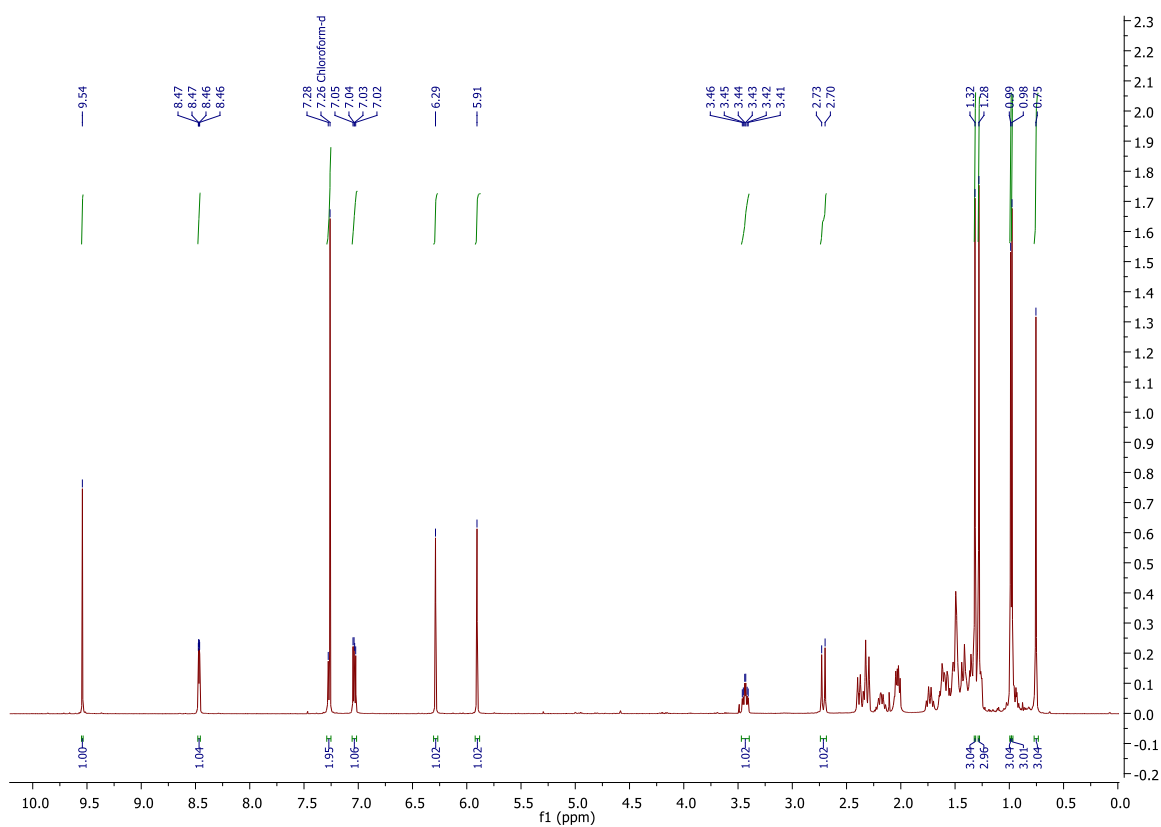


Pyridinový derivát kyseliny betulonové s azidovým linkerem v poloze C-28

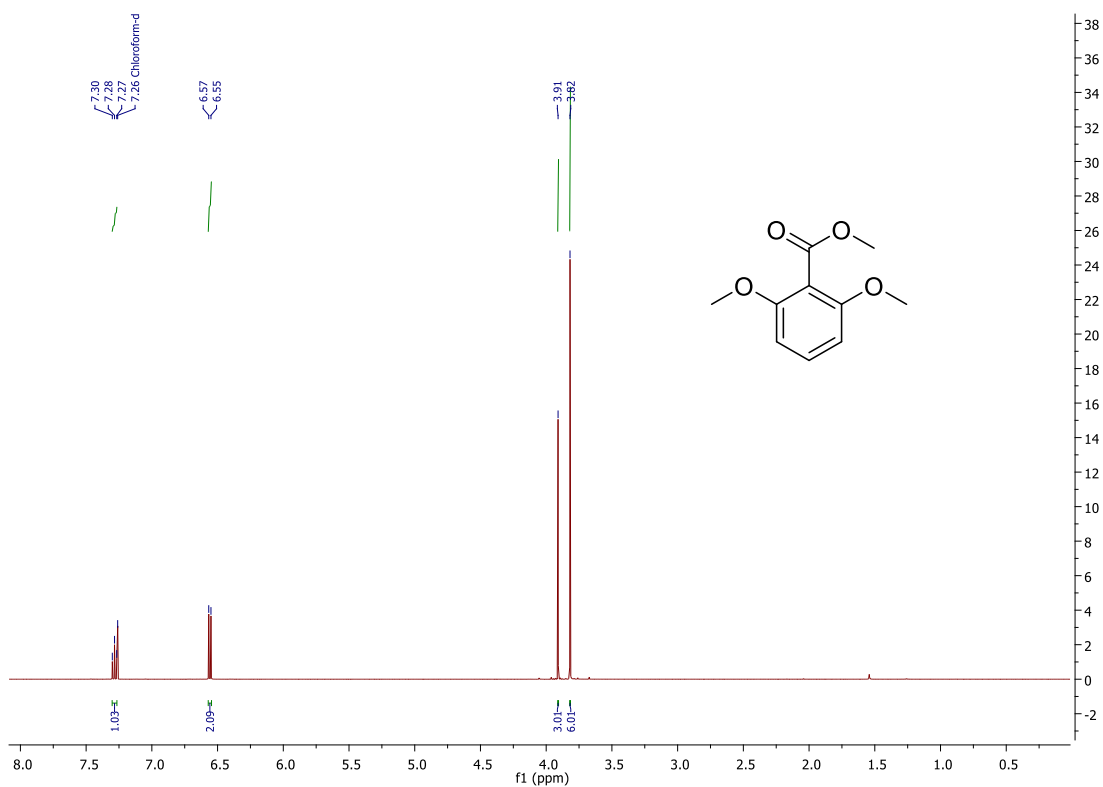
(XII)



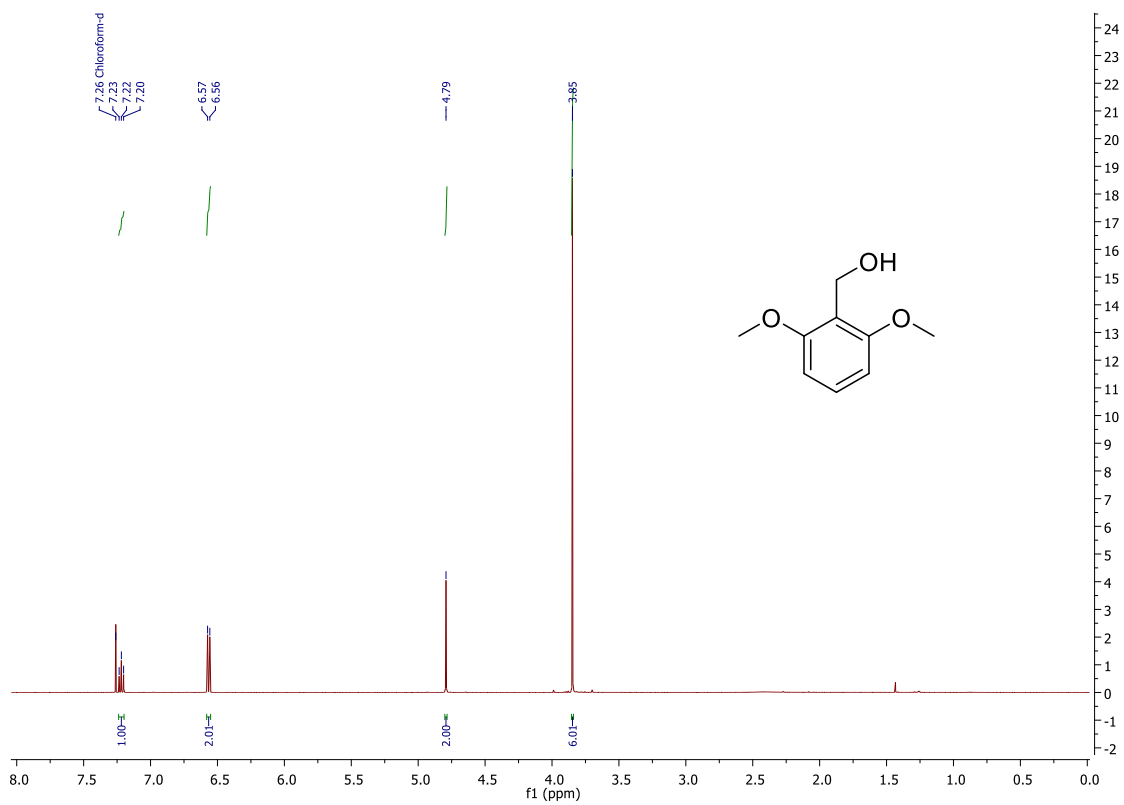
Aldehyd pyridinového derivátu kyseliny betulonové (XIII)



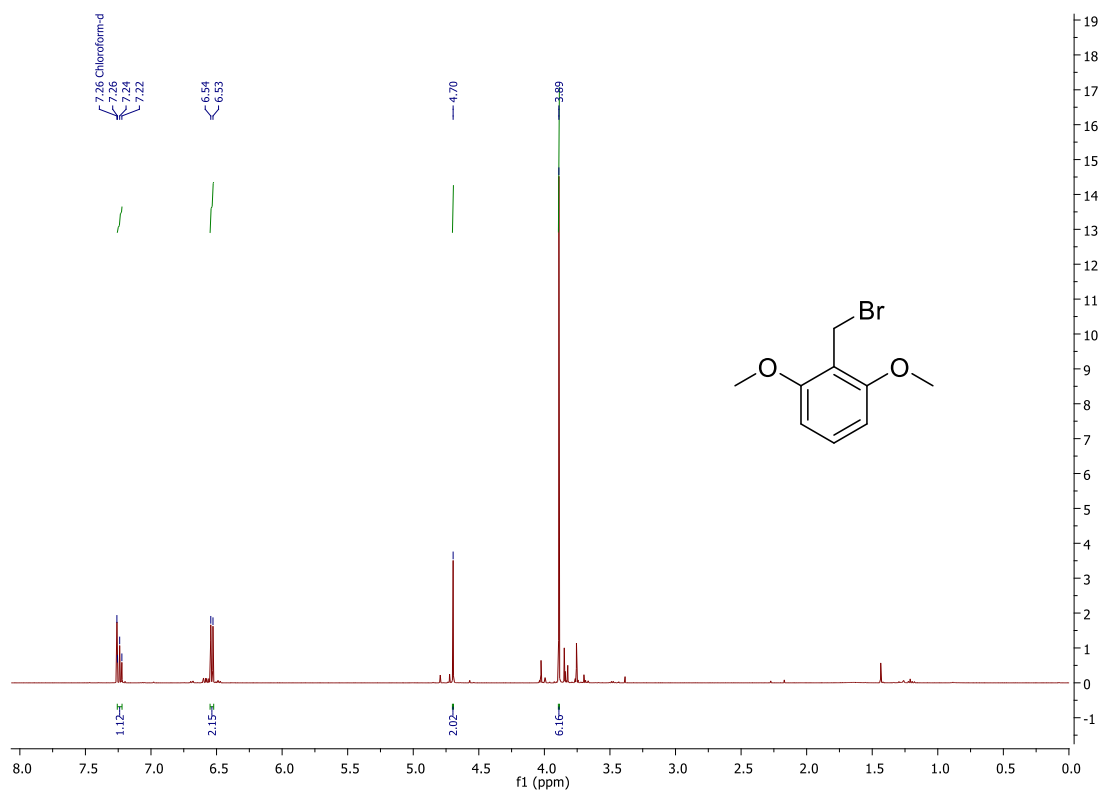
Methyl-2,6-dimethoxybenzoát (XIVb)



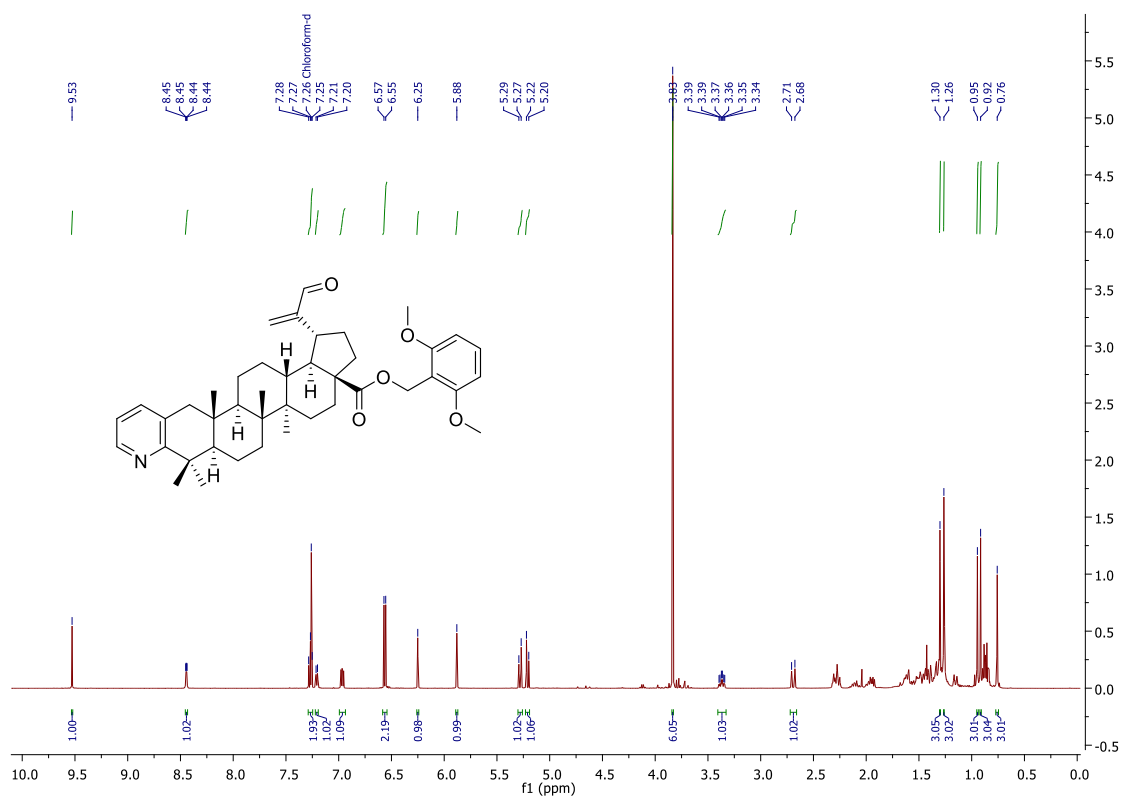
2,6-Dimethoxybenzylalkohol (XIVc)



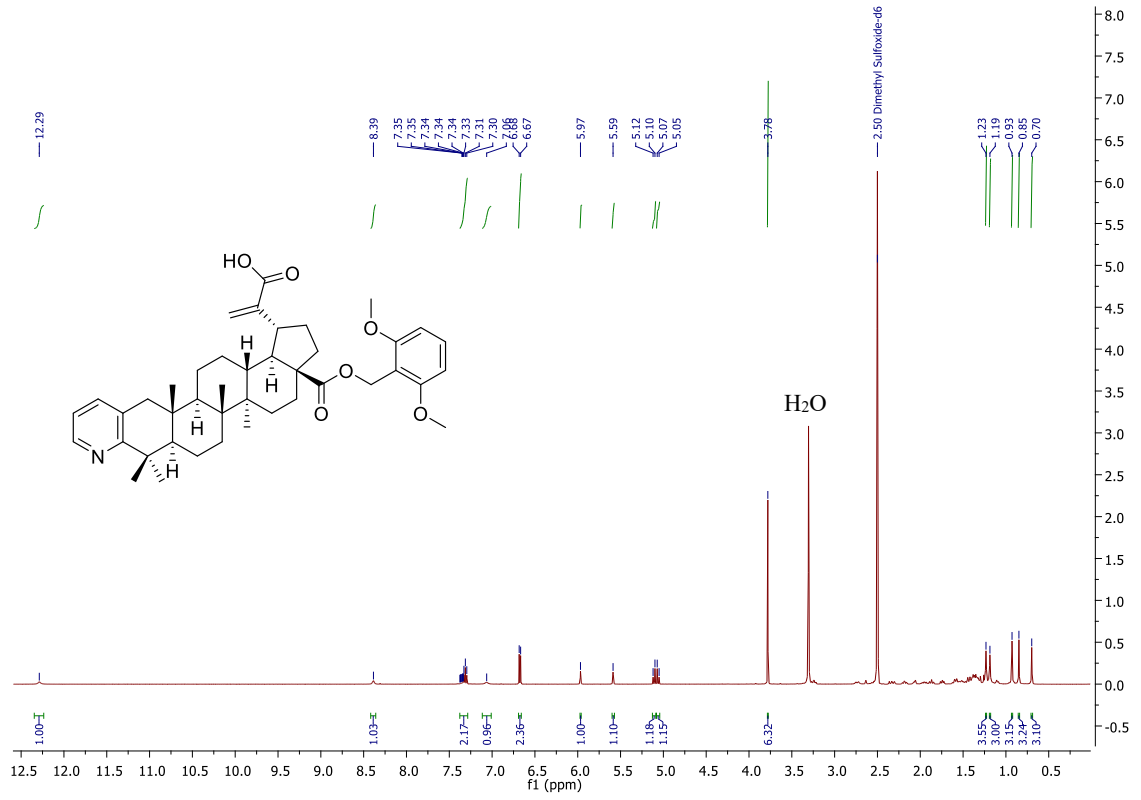
2,6-Dimethoxybenzylbromid (XIVd)



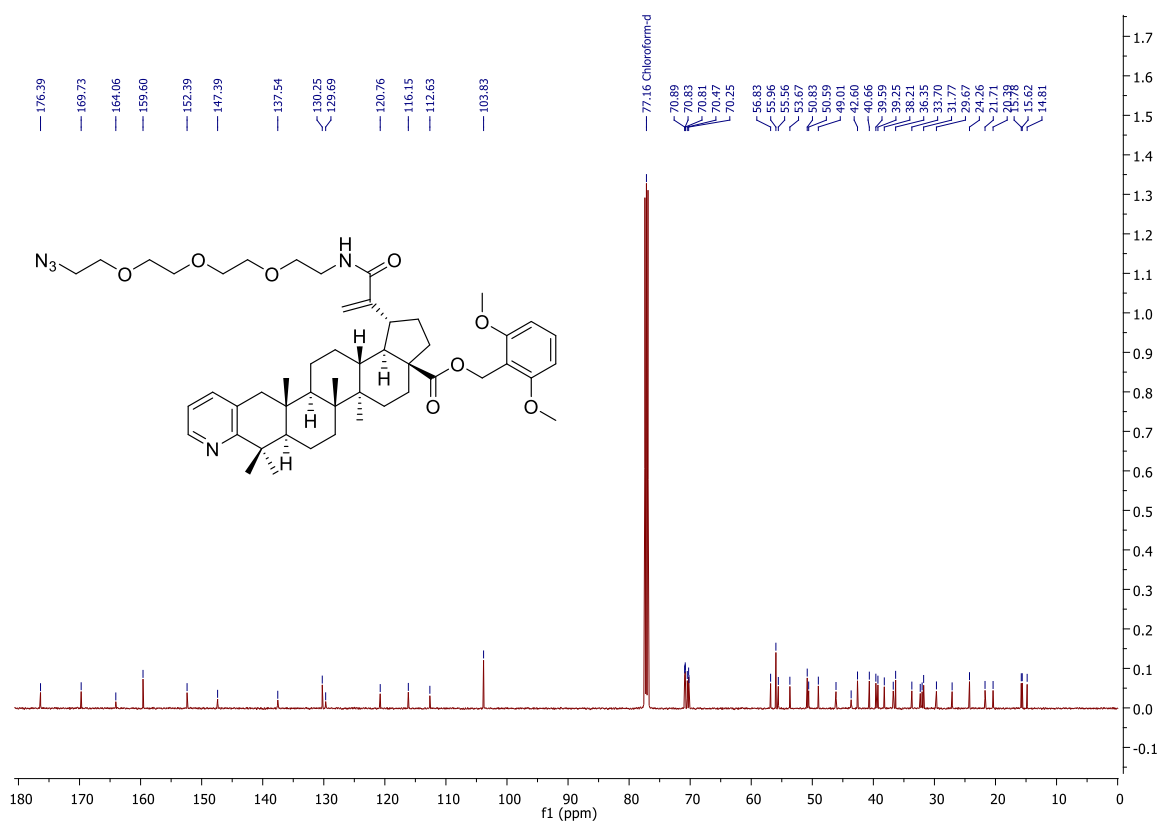
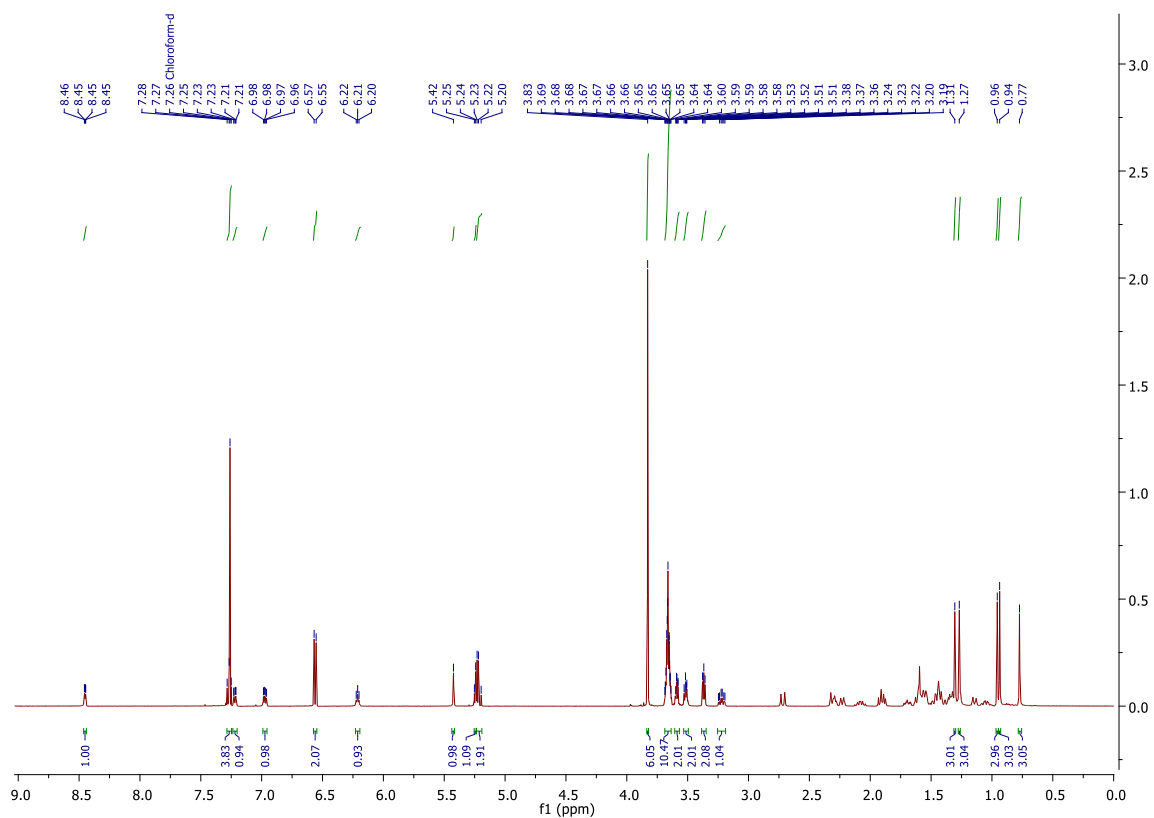
Protokovaný derivát (XIV)



Produkt Pinnickovy oxidace (XV)



Protekový derivát s linkerem (XVI)



Pyridinový derivát kyseliny betulonové s azidovým linkerem v poloze C-30
(XVII)

