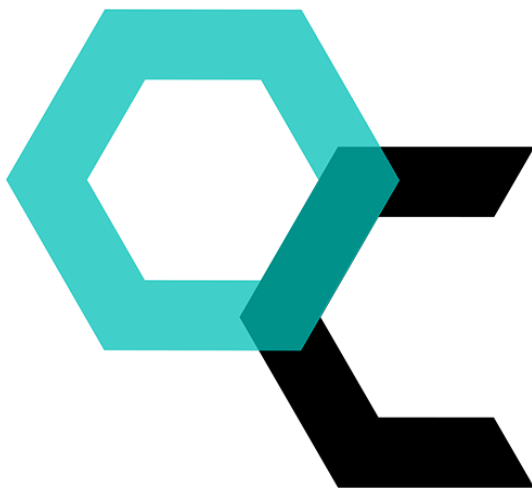


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Syntéza nových heterocyklických derivátů triterpenů pomocí Suzuki-
Miyaura cross-couplingové reakce

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Barbora Vránová

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Borková, Ph.D.

Olomouc 2020

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, 9. 6. 2020

.....

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Nejvíce bych chtěla poděkovat vedoucí mé práce, Mgr. Lucii Borkové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu při řešení problémů, trpělivost a přátelský přístup. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. za podporu a cenné rady, Mgr. Soně Krajčovičové, Ph.D. za změření NMR spekter a Katedře organické chemie za možnost vykonat tuto závěrečnou práci. Velký dík patří i mé rodině a přátelům za neustálou podporu.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory projektů studentské grantové soutěže na UP s registračním číslem IGA_PrF_2020_012 a s podporou grantu Ministerstva Zdravotnictví ČR s číslem NV19-03-00107.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autorky: Barbora Vránová

Název práce: Syntéza nových heterocyklických derivátů triterpenů pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra organické chemie

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Borková, Ph.D.

Odborný konzultant: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt:

Předložená diplomová práce se zabývá syntézou nových heterocyklických derivátů triterpenů pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu. V teoretické části jsou shrnuty základní informace o pentacyklických triterpenech a jejich biologických vlastnostech. Pozornost je věnována dosud publikovaným aromatickým a heterocyklickým derivátům připravených modifikací A-kruhu triterpenů. Experimentální část se věnuje problematice přípravy výchozích látek, triterpenoidních triflátů, z komerčně dostupného allobetulonů a kyseliny betulinové. S využitím Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce je následně syntetizována série heterocyklických derivátů allobetulonů s modifikací v poloze C-2. Bylo zjištěno, že některé deriváty jsou termicky a na vzduchu nestabilní, proto je nutné uchovávat je pod atmosférou dusíku při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Připravené deriváty podléhají pozvolnému rozkladu také v kyselých rozpouštědlech jako jsou DCM a CHCl_3 . Celkem bylo připraveno a plně charakterizováno 13 nových heterocyklických derivátů allobetulonů za účelem testování jejich cytotoxické aktivity.

Klíčová slova: triterpeny, allobetulon, kyselina betulinová, cytotoxická aktivita, Suzuki-Miyaura cross-coupling

Počet stran: 80

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Barbora Vránová

Title: Synthesis of novel heterocyclic derivatives of triterpenes by the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction

Type of thesis: Master's

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: Mgr. Lucie Borková, Ph.D.

Advisor consultant: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract:

This master thesis is aimed at the synthesis of new heterocyclic derivatives of triterpenes using Suzuki-Miyaura cross-coupling. The theoretical part summarizes general information about pentacyclic triterpenes and their biological activities. Attention is also given to the previously published aromatic and heterocyclic derivatives prepared by modification of the A-ring of triterpenes. The experimental part deals with the preparation of starting materials, triterpenoid triflates, from commercially available allobetulon and betulinic acid. Using the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction, a series of heterocyclic derivatives of allobetulon with modification at the C-2 position is subsequently synthesized. It has been found that some derivatives are thermally unstable and unstable in air, so it is necessary to store them under a nitrogen atmosphere at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. The prepared derivatives also undergo gradual decomposition in acidic solvents such as DCM and CHCl_3 . A total of 13 new heterocyclic allobetulon derivatives were prepared and fully characterized in order to test their cytotoxic activity.

Keywords: triterpenes, allobetulone, betulinic acid, cytotoxic activity, Suzuki-Miyaura cross-coupling

Number of pages: 80

Number of appendices: 1

Language: Czech

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcOH	kyselina octová
Bn	benzyl
DCM	dichlormethan
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
eq.	ekvivalent
EtOAc	ethyl acetát
EtOH	ethanol
IC ₅₀	koncentrace sloučeniny inhibující růst u 50 % nádorových buněk
i-PrOH	isopropylalkohol
KHMDS	bis(trimethylsilyl)amid draselný
MF	mobilní fáze
MeOH	methanol
P	produkt
PCC	pyridinium chlorochromát
R _f	retenční faktor
r.t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
<i>t</i> -BuOH	<i>terc</i> -butanol
TEA	trimethylamin
THF	tetrahydrofuran

VL výchozí látka

VP vedlejší produkt

OBSAH

ÚVOD	8
1. Terpeny	10
1.1 Allobetulin a allobetulon.....	12
1.2 Kyselina betulinová a kyselina betulonová	14
2. Aromatické deriváty triterpenů	16
2.1 Deriváty allobetulonu	16
2.2 Deriváty betulinu	17
2.3 Deriváty kyseliny betulinové.....	20
2.4 Deriváty kyseliny betulonové.....	24
3. Heterocyklické deriváty triterpenů	26
3.1 Deriváty allobetulonu	26
3.2 Deriváty betulinu	27
3.3 Deriváty kyseliny betulinové.....	27
3.4 Deriváty kyseliny betulonové.....	28
4. Výsledky a diskuze	30
4.1 Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů allobetulonu	30
4.1.1. 2-Hydroxyallobetulon-1-en (II).....	30
4.1.2. 2-(Trifluoromethylsulfonyl)allobetulon-1-en (III).....	30
4.2 Příprava aromatických a heterocyklických derivátů allobetulonu.....	31
4.2.1 2- <i>p</i> -Tolylallobetulon-1-en (IV).....	31
4.2.2 2-(Pyridin-4-yl)-allobetulon-1-en (V).....	32
4.2.3 2-(Furan-3-yl)-allobetulon-1-en (VI).....	32
4.2.4 2-(Thiofen-2-yl)-allobetulon-1-en (VII).....	33
4.2.5 2-(Thiofen-3-yl)-allobetulon-1-en (VIII).....	33
4.2.6 2-(Benzo[b]thien-2-yl)-allobetulon-1-en (IX)	34
4.2.7 2-(1,4-Benzodioxan-6-yl)-allobetulon-1-en (X)	35
4.2.8 2-(Indazol-6-yl)-allobetulon-1-en (XI).....	35
4.2.9 2-(1H-Pyrazol-4-yl)-allobetulon-1-en (XII).....	36
4.2.10 2-(Isochinolin-4-yl)-allobetulon-1-en (XIII).....	37
4.2.11 2-(5-Chlorothiofen-2-yl)-allobetulon-1-en (XIV)	37
4.2.12 2-(Furan-2-yl)-allobetulon-1-en (XV).....	38
4.2.13 2-(Pyridin-2-yl)-allobetulon-1-en (XVI).....	38
4.2.14 2-(Indol-5-yl)-allobetulon-1-en (XVII).....	39

4.2.15	2-(Pyrimidin-5-yl)-allobetulon-1-en (XVIII).....	39
4.2.16	2-(Pyridin-3-yl)-allobetulon-1-en (XIX).....	40
4.3.	Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů benzylbetulonátu a kyseliny betulonové	41
4.3.1.	Benzylbetulinát (XXI)	41
4.3.2.	Benzylbetulonát (XXII).....	42
4.3.3.	2-Hydroxy-benzylbetulonát-1-en (XXIII)	42
4.3.4.	2-(Trifluoromethylsulfonyl)benzylbetulonát-1-en (XXIV)	43
4.4.	Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů kyseliny betulonové.....	44
4.4.1	2-Hydroxybetulon-1-enová kyselina (XXVI)	44
4.4.2.	2-(Trifluoromethylsulfonyl)-betulon-1-enová kyselina (XXVII)	44
5.	ZÁVĚR	46
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	49
6.1	Obecné poznámky k experimentální části	49
6.2	Obecné postupy zpracování reakčních směsí:	50
6.3	Charakteristické signály skeletu allobetulonu v ¹ H NMR spektrech	51
6.4	Příprava výchozích látek pro syntézu derivátů allobetulonu	51
6.5	Obecný postup pro přípravu aromatických a heterocyklických derivátů allobetulonu pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu	52
6.6	Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů benzylbetulonátu.....	59
6.7	Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů kyseliny betulonové.....	60
	PŘEHLED LITERATURY	62
	Příloha ¹H a ¹³C NMR spekter všech nově připravených sloučenin.....	67

ÚVOD

Pentacyklické triterpeny jsou přírodní sloučeniny, které se vyskytují zejména u rostlin jako sekundární metabolity. Významné jsou zejména díky svým biologickým vlastnostem: cytotoxickým, anti-HIV, neuroprotektivním, protizánětlivým, virostatickým a dalším. Díky těmto účinkům stojí již řadu let v popředí zájmu výzkumných skupin i farmaceutických firem po celém světě.

Mezi pentacyklické triterpeny se řadí i molekuly allobetulinu a allobetulonů, kyseliny betulinové a kyseliny betulonové, které vykazují širokou škálu biologických vlastností, z nichž významná je zejména cytotoxická aktivita. Právě jejich skelety jsou nejčastěji modifikovány a studovány za účelem zvýšení biologické dostupnosti a selektivity (zejména cytotoxické). Zmíněným sloučeninám a derivátům modifikovaných v polohách C-2 a C-3 aromatickými a heterocyklickými substituenty se věnuje teoretická část této diplomové práce. Důraz je kladen na jejich syntézu a biologické vlastnosti.

Široké možnosti využití v organické syntéze nabízí metoda Suzuki-Miyaura cross-couplingu, která umožňuje zavedení zejména aromatických a heterocyklických substituentů do nejrůznějších molekul za využití boronových kyselin nebo jejich esterů.

Při této reakci dochází ke vzniku nové C-C vazby mezi halogenidy nebo trifláty na jedné straně a boronovými kyselinami nebo jejich estery na straně druhé. Suzuki-Miyaura cross coupling je obvykle prováděn za přítomnosti báze a katalyzátoru obsahujícího palladium.

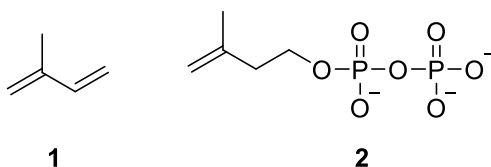
Experimentální část této diplomové práce se věnuje využití Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce pro přípravu nových heterocyklických derivátů allobetulonů a kyseliny betulonové s potenciálními cytotoxickými vlastnostmi.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše pojednávající o aromatických a heterocyklických derivátech allobetulonu, betulinu, kyseliny betulinové a kyseliny betulonové modifikovaných v polohách C-2 a C-3 se zaměřením na jejich biologické účinky.
2. Příprava výchozích látek pro syntézu malé knihovny nových heterocyklických derivátů triterpenů.
3. Syntéza série heterocyklických derivátů allobetulonu v poloze C-2 pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce za účelem testování jejich cytotoxické aktivity.
4. Syntéza série heterocyklických derivátů kyseliny betulonové v poloze C-2 Suzuki-Miyaura cross-couplingem za účelem testování jejich cytotoxické aktivity.

1. Terpeny

Terpeny jsou v přírodě široce rozšířenou skupinou organických sloučenin. Obecně se řadí mezi lipidy a jejich struktura je složena z podjednotek izoprenu (**1**). Základní jednotkou biosyntézy terpenů je izopentenyl pyrofosfát (**2**) (*Obr. 1*).

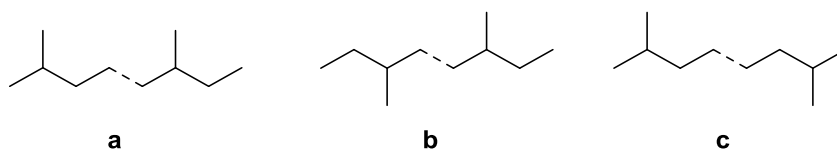


Obrázek 1: Struktura izoprenu (**1**) a izopentenyl pyrofosfátu (**2**)

Biosynteticky vznikají terpeny v rámci mevalonátové dráhy, která hraje důležitou roli při mnoha buněčných procesech, jako je růst a diferenciace buňky. V současné době je diskutována i v souvislosti s mnoha patologickými procesy, na příklad s rozvojem aterosklerózy. Mezi produkty mevalonátové dráhy patří pro tělo důležité steroidní prekurzory. Nejdůležitějším z nich je cholesterol, prekurzor žlučových kyselin a steroidních hormonů.¹

Základní dělení terpenů vychází z počtu podjednotek izoprenu (**1**) v molekule. Podle počtu podjednotek rozlišujeme hemiterpeny, monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, sesterterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny.²

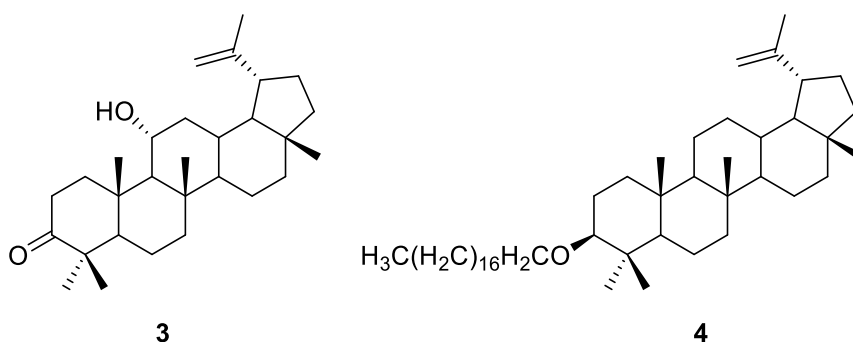
Terpeny vznikají spojováním dvou podjednotek izoprenu. Celkem mohou vznikat tři typy spojení. Nejčastějším z nich je „ocas-hlava“ (*Obr. 2a*), méně časté jsou spojení „hlava-hlava“ (*Obr. 2b*) nebo „ocas-ocas“ (*Obr. 2c*).



Obrázek 2: (a) spojení hlava-ocas, (b) spojení hlava-hlava, (c) spojení ocas-ocas

Významnou skupinu terpenů tvoří pentacyklické triterpeny. Jedná se zejména o sekundární metabolity rostlin, které se v závislosti na typu rostliny ukládají hlavně v mitochondriích, mikrozomech nebo chloroplastech rostlinných buněk.^{3,4} V rostlině se mohou vyskytovat i ve formě glykosidů.⁵

Vysoký počet pentacyklických triterpenů se zajímavými biologickými vlastnostmi byl izolován z afrických léčebných rostlin. Příkladem mohou být deriváty lupanového typu **3** a **4** (Obr. 3), které byly izolovány z nigerijské rostliny *Paullinia pinnata*, a u kterých byla naměřená antimikrobiální aktivita vůči některým nebezpečným typům bakterií, z nichž za zmínku stojí *Clostridium tetani* nebo *Shigella dysenteriae*, s minimální inhibiční koncentrací pohybující se mezi 15,4 až 37,2 µg/ml.⁴ Pentacyklické triterpeny byly izolovány i z řady živočichů, mořských živočichů nebo hub.



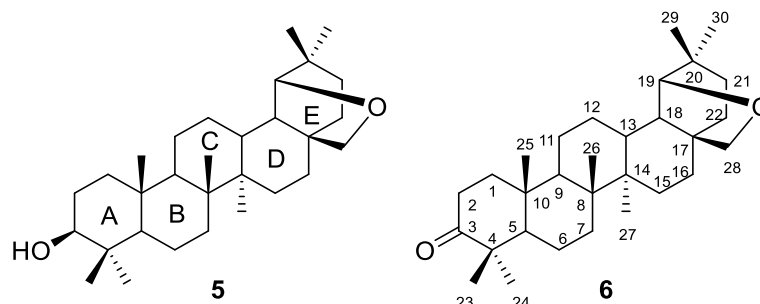
Obrázek 3: Pentacyklické triterpeny izolované z rostliny *Paullinia pinnata*

Hlavní potenciál pentacyklických triterpenů a jejich derivátů spočívá zejména v široké škále zajímavých biologických vlastností. Za zmínku stojí například protizánětlivá^{6,7}, protinádorová⁵, antimykotická⁸, antimikrobiální⁹, antiproliferační¹⁰, nebo imunomodulační aktivita některých sloučenin.⁵

Mezi pentacyklické triterpeny se řadí i allobetulin (**5**) a allobetulon (**6**) (Obr. 4), a kyselina betulinová (**7**) a kyselina betulonová (**8**) (Obr. 5), kterým bude věnovaná samostatná kapitola.

1.1 Allobetulin a allobetulon

Allobetulin (**5**) a allobetulon (**6**) (*Obr. 4*) se řadí mezi pentacyklické triterpeny 18 α -oleananového typu. Obě molekuly lze získat modifikací betulinu (**9**).



Obrázek 4: Struktury molekul allobetulinu (**5**) a allobetulonů (**6**)

Allobetulin (**5**) (*Obr. 4*) byl poprvé připraven v roce 1922. Již dříve bylo známo, že molekula betulinu (**9**) podléhá za kyselých podmínek přesmyku, ale až Schulze a Pieroh připravili allobetulin (**5**) zahříváním betulinu (**9**) s kyselinou mravenčí. Při dvoukrokové reakci nejprve dochází ke tvorbě esteru kyseliny mravenčí, který po saponifikaci podléhá isomeraci na allobetulin (**5**) (*Schéma 1*).^{11,12,13}

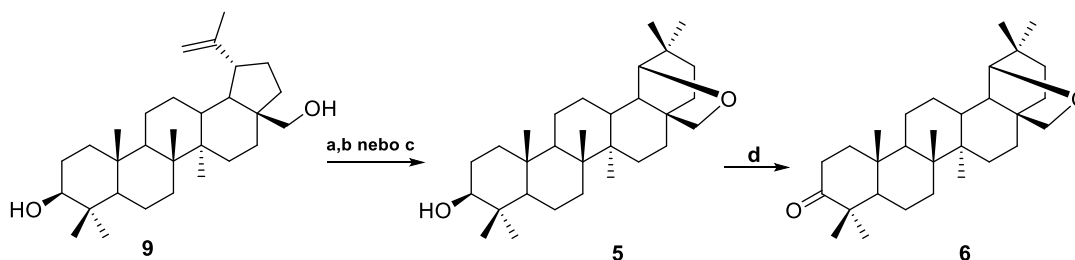


Schéma 1: Příprava allobetulonů (**6**) z betulinu (**9**). (a) kyselina mravenčí, var, 50 min; (b) KOH v EtOH, toluen, var, 30 min; (c) Montmorillonit K10, DMF, 25 °C, 3 h, var, 5 dní; (d) CrO₃, H₂SO₄, aceton, 0 °C, 2 h.

V literatuře je pro tuto reakci popsáno mnoho podmínek, například reakce betulinu (**9**) s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou v ethanolu.¹⁴ Li a kolektiv srovnali ve své práci použití různých oxidačních činidel jako jsou kyselina sírová na silikagelu, kyselina *p*-toluensulfonová na silikagelu, Montmorillonit K10 nebo Montmorillonit KSF.¹⁵ V současnosti víme, že allobetulin (**5**) vzniká reakčním mechanismem Wagner-Meerweinova přesmyku (*Schéma 2*).¹³

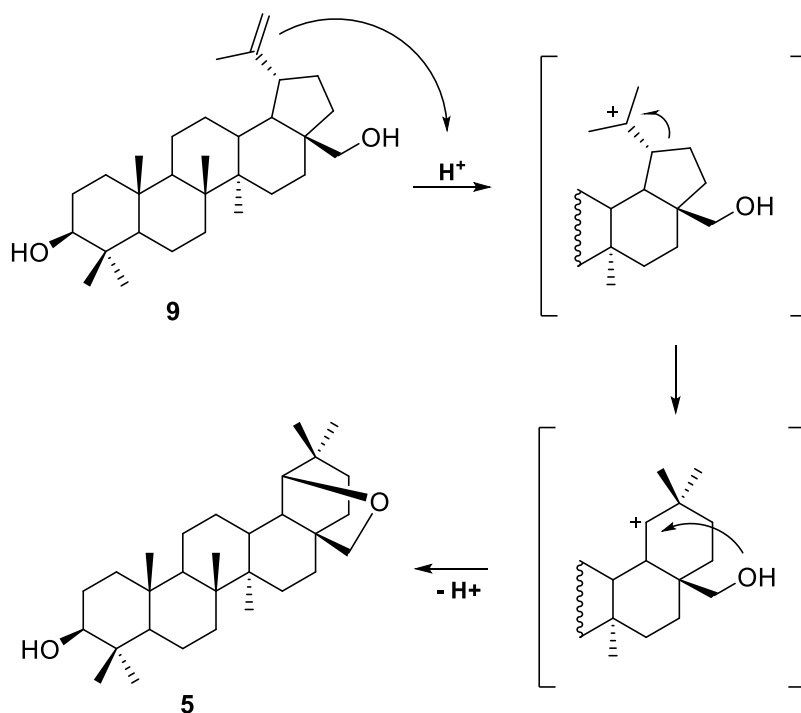


Schéma 2: Mechanismus kyselého katalyzovaného Wagner-Meerweinova přesmyku molekuly betulinu (9) na allobetulin (5).

Allobetulon (6) lze z allobetulinu (5) (Schéma 1) získat Jonesovou oxidací, která využívá oxidačních vlastností chromanů.¹³ Další možností je využití Swernovy oxidace, při které dochází k reakci alkoholu s oxalylchloridem, DMSO a organickou zásadou, kterou může být například triethylamin. Při reakci nejprve dochází ke tvorbě meziprojektu, tzv. aktivovaného DMSO, kterým je alkohol oxidován na keton.¹⁶

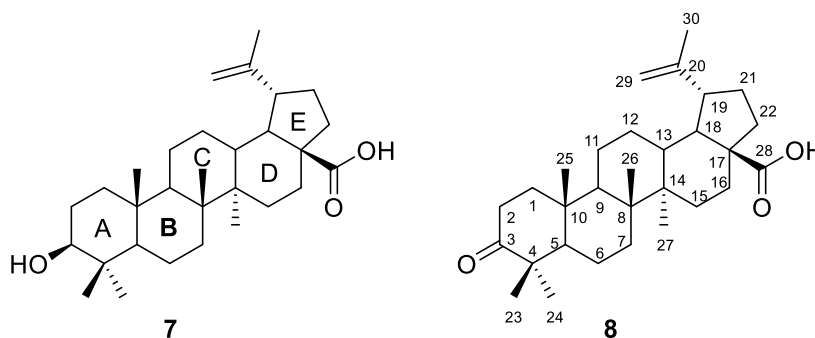
Heller a kolektiv se zabývali cytotoxickou aktivitou allobetulinu (5), allobetulon (6) a jejich derivátů. Cytotoxická aktivita EC_{50} byla stanovena na šesti lidských nádorových liniích. Hodnoty EC_{50} allobetulinu (5) byly ve všech případech vyšší než 30 μM , což značí jeho velmi nízkou aktivitu. Allobetulon (6) vykazoval vyšší, i když stále jen mírnou, aktivitu na dvou nádorových liniích. Na nádorové linii A2780 (adenokarcinom vaječníků) byla naměřena hodnota $EC_{50} = 18,5 \mu M$, na nádorové linii A549 (alveolární bazální epiteliální adenokarcinom) bylo $EC_{50} = 20,8 \mu M$.¹³

Protože sloučeniny 5 a 6 vykazovaly nízkou cytotoxicitu, byla připravena série derivátů, na kterých bylo studováno, jaké modifikace vedou ke zlepšení cytotoxických vlastností. Bylo zjištěno, že otevření A kruhu vede ke snížení cytotoxicity, a naopak, zavedení NH_2 skupiny do polohy C-3 vede ke zvýšení aktivity těchto derivátů.¹³

1.2 Kyselina betulinová a kyselina betulonová

Kyselina betulinová (**7**) a kyselina betulonová (**8**) (Obr. 5) se řadí mezi pentacyklické triterpeny lupanového typu. Obě sloučeniny vynikají širokou škálou biologických vlastností.

Kyselina betulinová (**7**) je sekundární metabolit, který lze izolovat z přírodních zdrojů, jako je kůra břízy nebo platanu, extrakcí vhodným organickým rozpouštědlem (např. methanolem, chloroformem nebo dichlormethanem) v gramovém až kilogramovém množství.¹⁷ V menším množství může být kyselina betulinová (**7**) izolována i z jiných druhů rostlin, například ze *Ziziphus jujuba*¹⁸, *Syzygium formosanum*¹⁹ nebo *Doliocarpus schottianus*.^{20,21}



Obrázek 5: Struktura kyseliny betulinové (**7**) a kyseliny betulonové (**8**)

Nejvýznamnější biologickou vlastností kyseliny betulinové (**7**) je její cytotoxická aktivita.^{22,23,24} Kyselina betulinová (**7**) vykazuje selektivní cytotoxickou aktivitu zejména vůči melanomu, neuroektodermálním a maligním buňkám nádorů mozku.^{22,25}

Za zmínku dále stojí i anti-HIV²⁶, antibakteriální²⁷, protizánětlivá²⁸, hepatoprotektivní aktivita²⁹ a další.^{30,31} Bylo prokázáno, že molekula kyseliny betulinové (**7**) funguje i jako antioxidant a pomáhá tak redukovat oxidační stres, který může být příčinou mnoha patologických změn, například může vyvolat Parkinsonovu nebo Alzheimerovu chorobu.^{31,32}

Jednoduchou modifikací, oxidací hydroxyskupiny na C-3, lze z kyseliny betulinové (**7**) získat kyselinu betulonovou (**8**). Jinou metodou přípravy kyseliny betulonové (**8**) je Jonesova oxidace betulinu (**9**), která využívá oxidačních vlastností oxidu chromového v kyselém prostředí (Schéma 3).³³ V literatuře je dále popsána dvoukroková syntéza opět vycházející z betulinu (**9**), kdy v prvním kroku vzniká reakcí

se vzdušným kyslíkem za katalýzy Pd(OAc)₂ betulon aldehyd (**10**), který je v dalším kroku oxidován chloritanem sodným na kyselinu betulonovou (**8**) (Schéma 3).³⁴

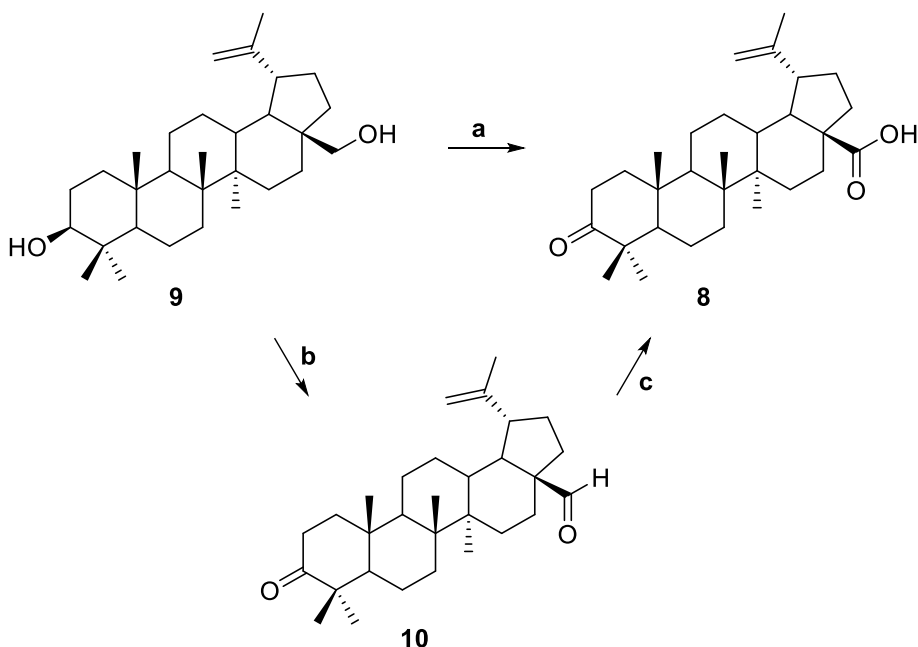


Schéma 3: Příprava kyseliny betulonové (**8**) z betulinu (**9**). (a) CrO₃, aceton, 0 °C, 2 h; (b) Pd(OAc)₂, pyridin, toluen, vzduch, 80 °C, 7 h; (c) NaClO₂, NaH₂PO₄·H₂O, 2-methyl-2-buten, *t*-BuOH, rt, 12 h.

Kyselina betulonová (**8**) byla izolována i z přírodních zdrojů, například z listů rostliny *Pentalinon andrieuxii*³⁵, z kořenů rostliny *Ainsliaea acerifolia*³⁶, z *Viscum coloratum*³⁷ nebo z kůry břízy (*Betula pubescens*).³⁸

Biologické vlastnosti kyseliny betulonové (**8**) jsou velmi podobné biologickým vlastnostem kyseliny betulinové (**7**). Kyselina betulonová (**8**) byla studována pro své antioxidační účinky a schopnost snižovat organotoxický efekt některých protinádorových léčiv.^{35,39} Za zmínku dále stojí i antivirotické vlastnosti⁴⁰, antimalarické¹⁶, protizánětlivé, hepatoprotektivní a další.²¹

Yang a kolektiv se zabývali cytotoxickou aktivitou kyseliny betulonové (**8**) a jejích derivátů. Cytotoxická aktivita kyseliny **8** byla stanovena na pěti nádorových liniích. Na linii MGC-803 (mucinózní adenokarcinom žaludku) byla naměřena hodnota IC₅₀ = 17,7 μM, na linii PC3 (karcinom prostaty) bylo IC₅₀ = 13,9 μM a na linii MCF7 (karcinom prsu) bylo IC₅₀ = 18,2 μM.⁴¹

2. Aromatické deriváty triterpenů

2.1 Deriváty allobetulonu

Babak a kolektiv popsali ve své práci z roku 2014 přípravu aromatického derivátu allobetulonu **11** substituovaného v poloze C-2. Příprava (2S,2'R)-2-hydroxy[3-(trifluoromethoxy)fenyl]-methylallobetulonu (**11**) vychází z allobetulonu (**6**), který za přítomnosti katalytického množství KOH reaguje s 3-(trifluoromethoxy)benzaldehydem. Jedná se o reakci typu aldolizace (Schéma 4).⁴²

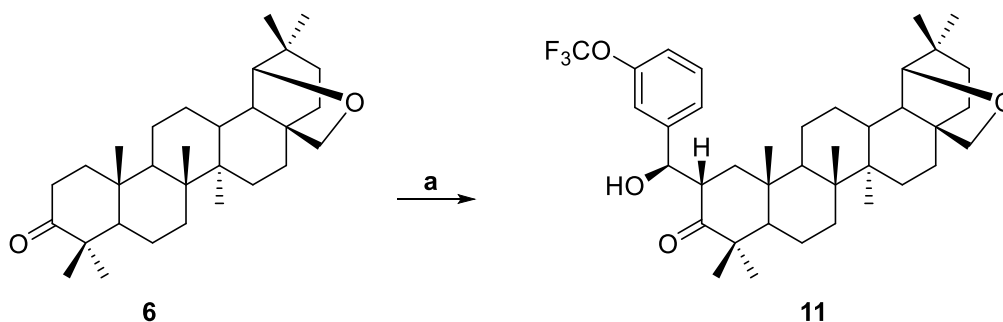


Schéma 4: Syntéza derivátu **11**. (a) 3-(trifluoromethoxy)benzaldehyd, *i*-PrOH, KOH, var, 8 h.

Babak a kolektiv dále publikovali přípravu jedenácti aromatických derivátů, α,β -nenasycených ketonů, **12a-12k** (Obr. 6). Tyto deriváty lze připravit dvěma způsoby, které se liší podmínkami, ale oba vychází z molekuly allobetulonu (**6**). První možností je var allobetulonu (**6**) v isopropanolu a prostředí KOH. Druhá možnost využívá varu allobetulonu (**6**) v xylenu v prostředí kyseliny *para*-toluensulfonové (Schéma 5).⁴²

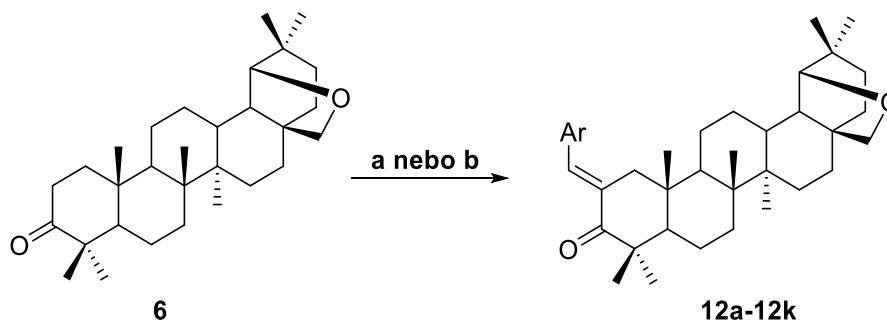
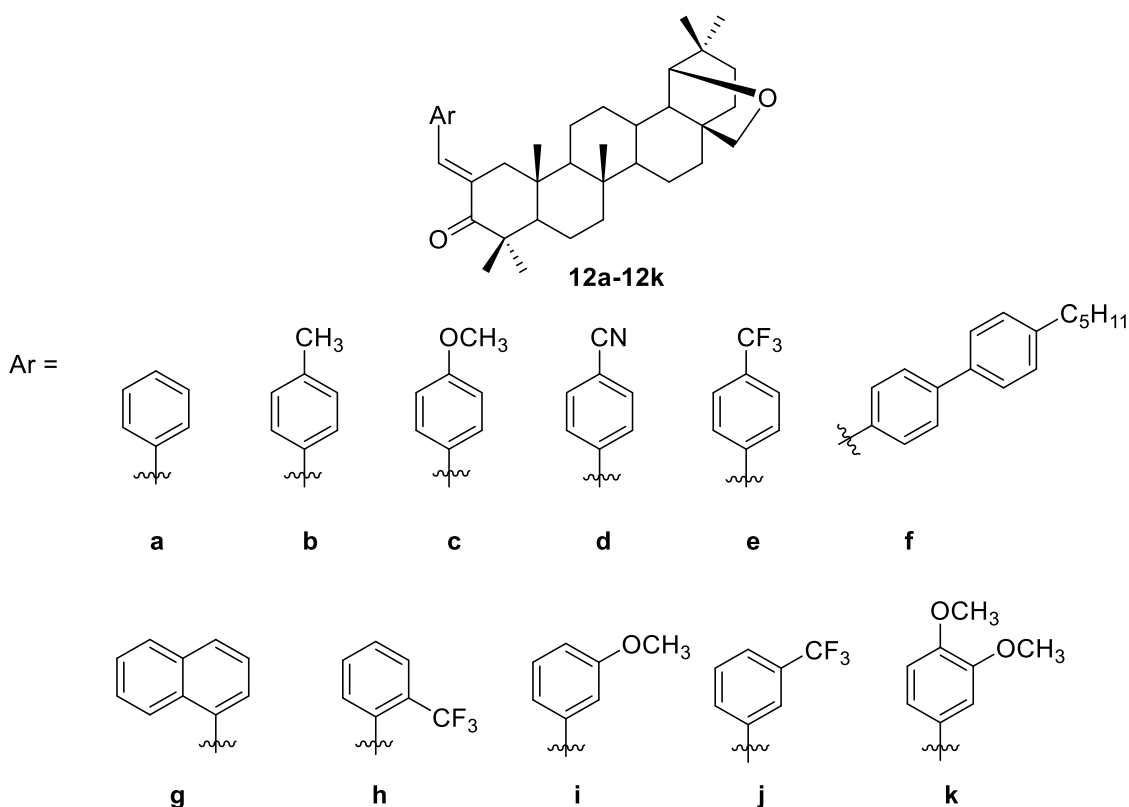


Schéma 5: Příprava derivátů **12a-12k**. (a) ArCHO, *i*-PrOH, KOH, var; (b) ArCHO, xylen, TsOH, var.



Obrázek 6: Aromatické deriváty allobetulonů 12a-12k

2.2 Deriváty betulinu

V roce 2016 Liu a kolektiv publikovali článek zaměřený na přípravu aromatických a heterocyklických derivátů kyseliny betulinové (**7**) a betulinu (**9**) za využití Suzuki-Miyaura nebo Stille couplingu. Byla připravena série 12 aromatických derivátů **16a–16l** (Obr. 7).

Syntéza derivátů **16a-16l** vychází z betulinu (**9**), který byl ochráněn pomocí anhydridu kyseliny benzoové v bazickém prostředí pyridinu. Produktem reakce byl ester **13**, který byl pomocí PCC oxidován na ester kyseliny betulonové **14**. V následujícím kroku byl připraven enol-triflát **15** reakcí esteru **14** s Tf_2NPh v bazickém prostředí KHMDS. Pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu, nebo Stille couplingu, byl do molekuly zaveden požadovaný aromatický substituent (Ar). Závěrečným krokem reakčního sledu byla bazická hydrolýza chránící skupiny pomocí LiOH nebo NaOH (Schéma 6).

Deriváty **16a-16l** (Obr. 7) byly *in vitro* testovány na anti-HIV a cytotoxickou aktivitu. Jako nejnadějnější se jeví derivát **16a**, který vykazuje hodnotu inhibice viru HIV $\text{EC}_{50} = 11 \text{ nM}$.⁴³

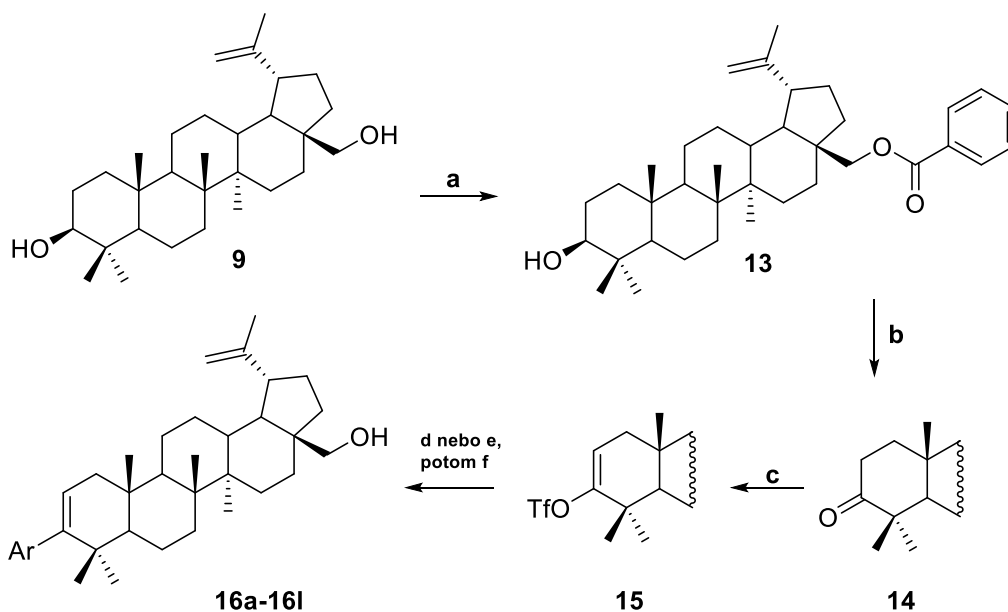
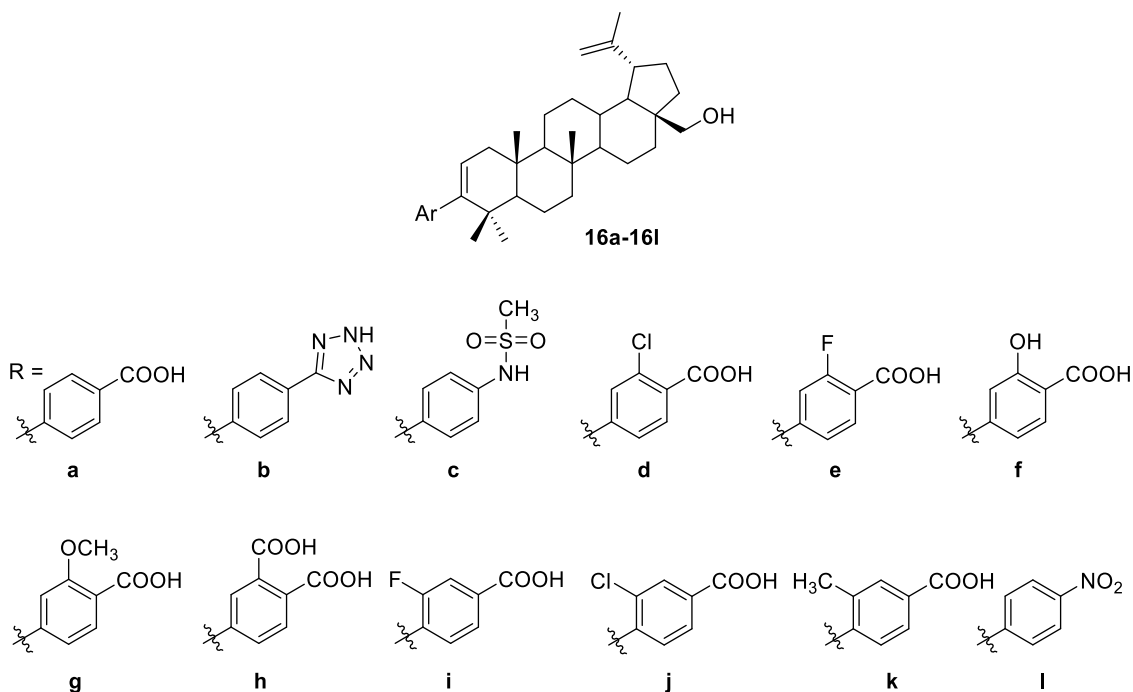


Schéma 6: Příprava derivátů 16a-16l. (a) $(PhCO)_2O$, DMAP, pyridin, 60 °C, 3 h; (b) PCC, CH_2Cl_2 , r.t., 2 h; (c) KHMDS, Tf_2NPh , THF, -78 °C, 2 h; (d) $Ar-B(OH)_2$, Na_2CO_3 , K_2CO_3 nebo K_3PO_4 , $Pd(PPh_3)_4$, 1,4-dioxan nebo DME, H_2O , 85-100 °C, 3-14 h; (e) $Ar-SnBu_3$, LiCl, $Pd(PPh_3)_4$, 1,4-dioxan, 85 °C, 15,5 h; (f) LiOH nebo NaOH, 1,4-dioxan, H_2O , 75 °C, 3-18 h.



Obrázek 7: Aromatické deriváty betulinu 16a-16l

V roce 2017 Gupta a kolektiv připravili sérii 12 benzyldenových derivátů betulinu **17a-17l** (Obr. 8), jejichž syntéza vychází z kyseliny betulinové (**7**). Kyselina betulinová (**7**) je pomocí PCC v dichlormethanu oxidována na kyselinu betulonovou (**8**), která je podrobena aldolové kondenzaci s různými aldehydy. Posledním krokem je redukce keto skupiny v poloze C-3 na OH skupinu pomocí NaBH₄ v methanolu (Schéma 7).

Deriváty **17a-17l** byly testovány na cytotoxickou aktivitu na šesti lidských nádorových liniích: A549 (adenokarcinom plic), PC-3 (karcinom prostaty), HCT116 (kolorektální karcinom), MCF-7 (karcinom prsu), MIA PaCa-2 (karcinom pankreatu) a fR2 (karcinom prsu). Sloučeniny **17a** a **17b** vykazují cytotoxickou aktivitu na nádorové linii A549 s hodnotami IC₅₀ = 1,22 μM a 1,8 μM. Sloučenina **17c** vykazuje cytotoxickou aktivitu IC₅₀ v rozmezí 1,4-1,6 μM na nádorových liniích A549, PC-3 a HCT-116. Sloučenina **17i** vykazuje cytotoxickou aktivitu IC₅₀ = 1,5 μM na nádorové linii MCT-116, IC₅₀ = 1,18 μM na nádorové linii MCF-7 a IC₅₀ = 1.21 μM na nádorové linii MIA PaCa-2.

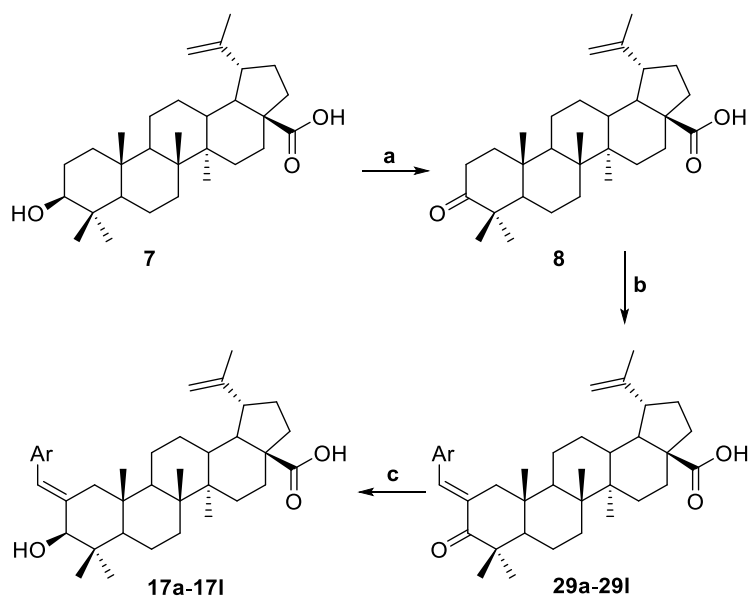
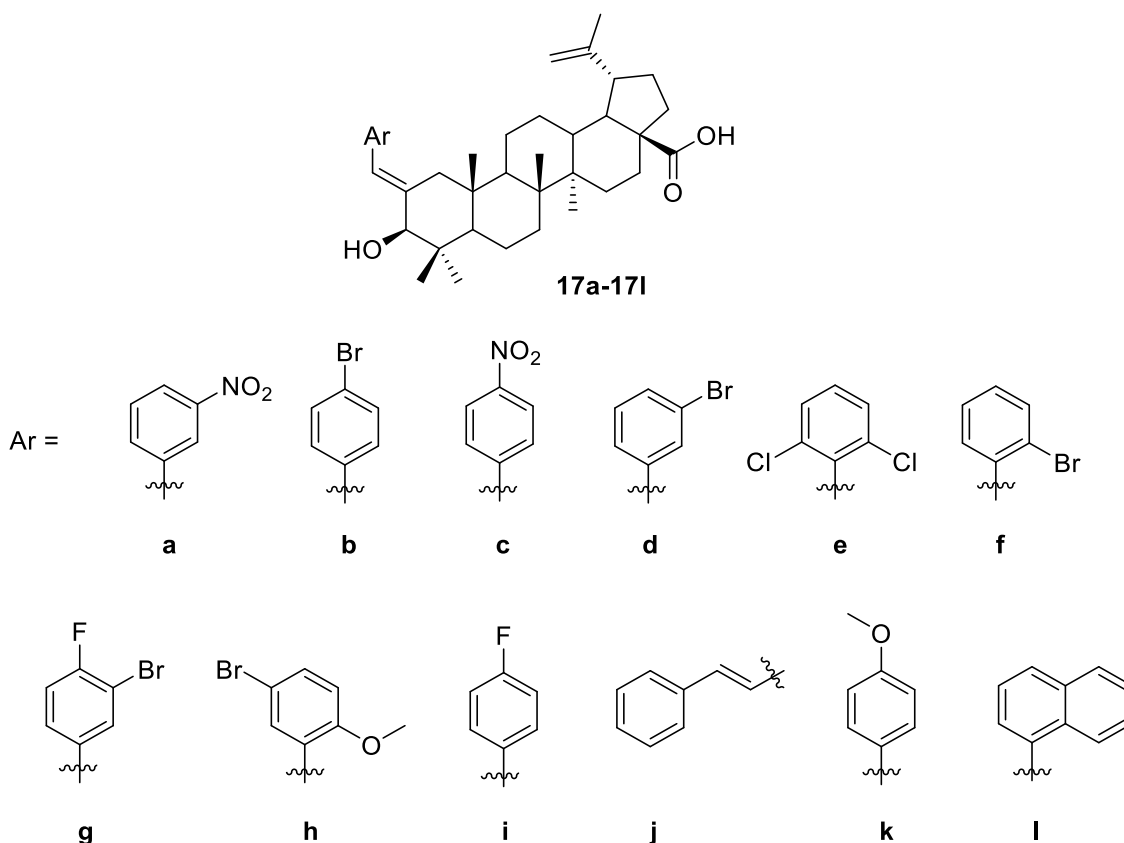


Schéma 7: Příprava derivátů **17a-17l**. (a) PCC, DCM, rt, 2h; (b) RCHO, NaH, THF, 0 °C-r.t., 1,5–2 h; (c) NaBH₄, MeOH, 0 °C-rt, 1-1,5 h.



Obrázek 8: Struktury derivátů 17a-17l

2.3 Deriváty kyseliny betulinové

V roce 2016 publikovali Liu a kolektiv článek zaměřený na přípravu série aromatických derivátů kyseliny betulinové s potenciálními anti-HIV účinky. Celkem bylo připraveno 16 derivátů (**18a-18p**), které jsou zobrazeny na *Obrázku 9*.⁴³

Pro přípravu derivátů **18a-18p** byla využita metoda Suzuki-Miyaura cross couplingu. Příprava derivátů vycházela z komerčně dostupné kyseliny betulinové (**7**), která byla ochráněna pomocí benzylbromidu v bazickém prostředí. Produktem reakce byl benzylester kyseliny betulinové (**19**), který byl pomocí PCC oxidován na benzylester kyseliny betulinové (**20**). V následujícím kroku byl připraven enol-triflát **21** reakcí benzylesteru **19** s Tf_2NPh v bazickém prostředí KHMDS. Pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu byl do molekuly zaveden požadovaný aromatický substituent (Ar). Posledním krokem tohoto reakčního sledu bylo ochránění benzylesteru reakcí s vodíkem při tlaku 1 atm za katalýzy Pd/C ve směsi rozpouštědel ethyl acetát/methanol (*Schéma 8*).⁴³

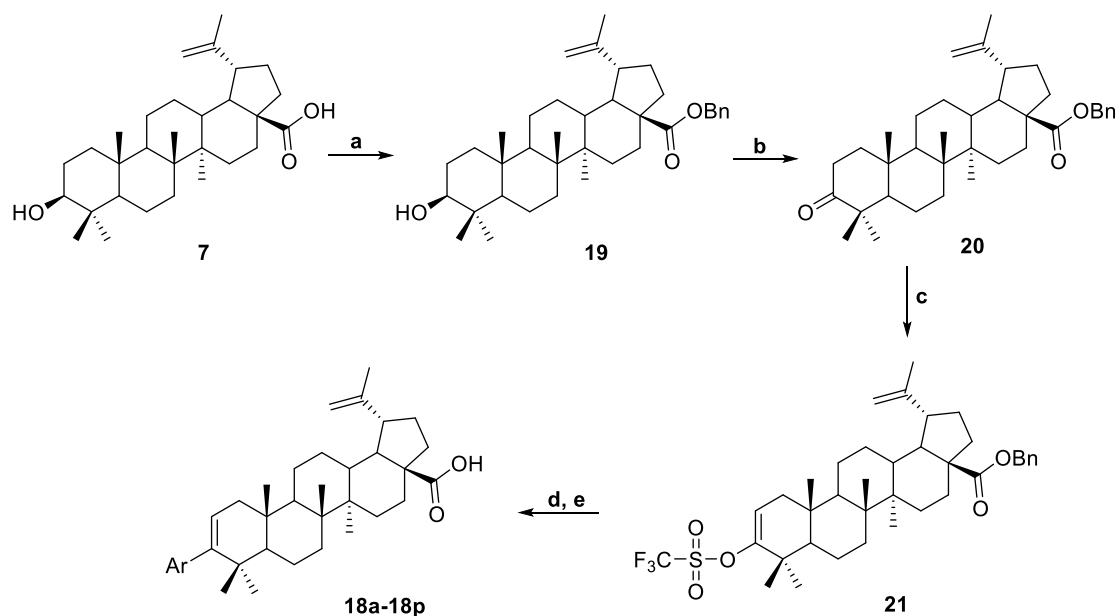
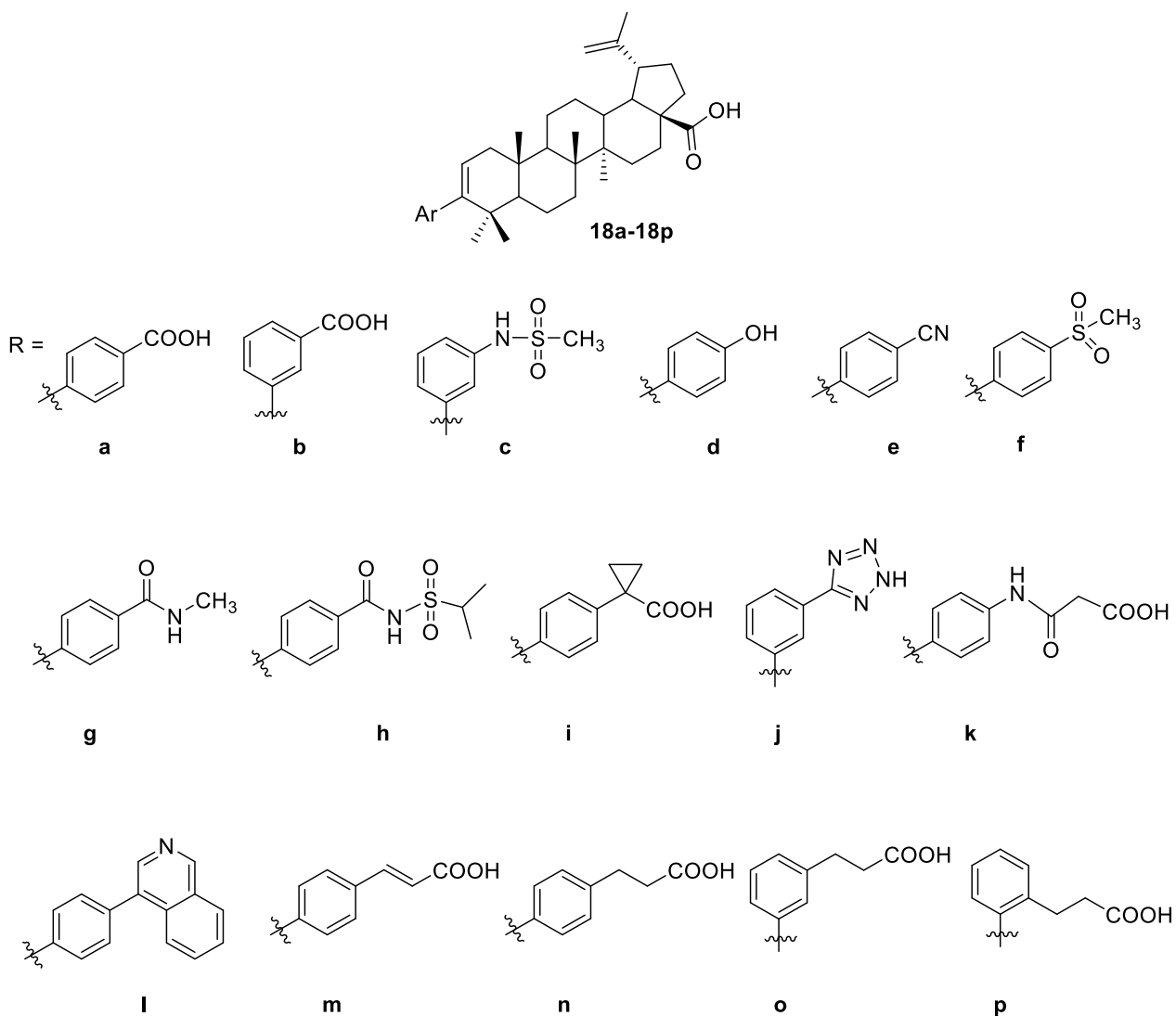


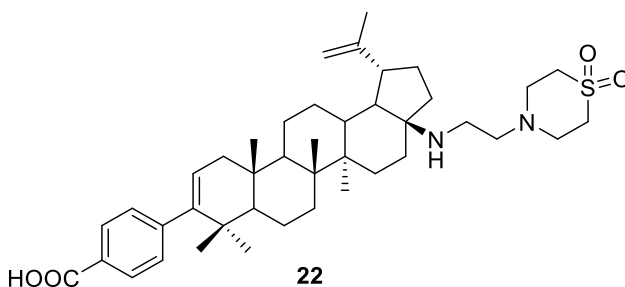
Schéma 8: (a) K₂CO₃, BnBr, 60 °C, 3 h; (b) PCC, CH₂Cl₂, rt, 15 h; (c) KHMDS, PhNTf₂, THF, -78 °C, 1 h; (d) Ar-B(OH)₂, Na₂CO₃, Pd(Ph₃P)₄, DME, H₂O, 100 °C, 1,5-3 h; (e) Pd/C, H₂, 1 atm, EtOAc, MeOH, rt, 3-24 h.

Deriváty **18a-18p** (Obr. 9) byly testovány na antivirovou (inhibice *wild type* HIV-1 infekce) a cytotoxickou aktivitu. Nejnadějněji se jeví derivát kyseliny 4-benzoové **18a**, který vykazuje hodnotu inhibice WT HIV-1 infekce EC₅₀ = 16 nM.⁴³



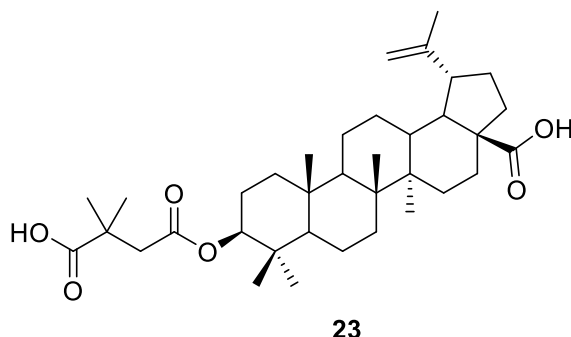
Obrázek 9: Aromatické deriváty kyseliny betulinové **18a-18p** substituované v poloze C-3

V roce 2018 publikovali Regueiro-Ren a kolektiv vývoj derivátu BMS-955176 (**22**) (*Obr. 10*) s anti-HIV aktivitou. Tento derivát se řadí do tzv. druhé generace inhibitorů HIV1 a již úspěšně prošel fází IIb klinického testování.⁴⁴



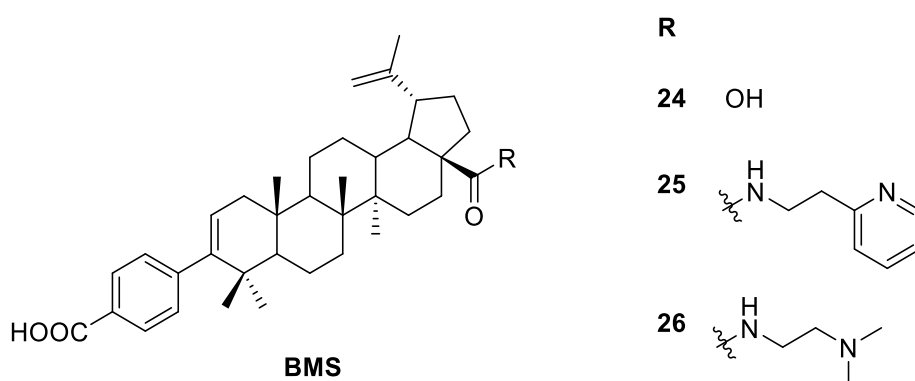
Obrázek 10: Struktura BMS-955176 (**22**)

Práce navazuje na derivát bevirimat (**23**) (*Obr. 11*), který skončil ve fázi IIa klinického testování, a z jehož struktury byla odvozena celá generace aromatických derivátů kyseliny betulinové (**7**).⁴⁵



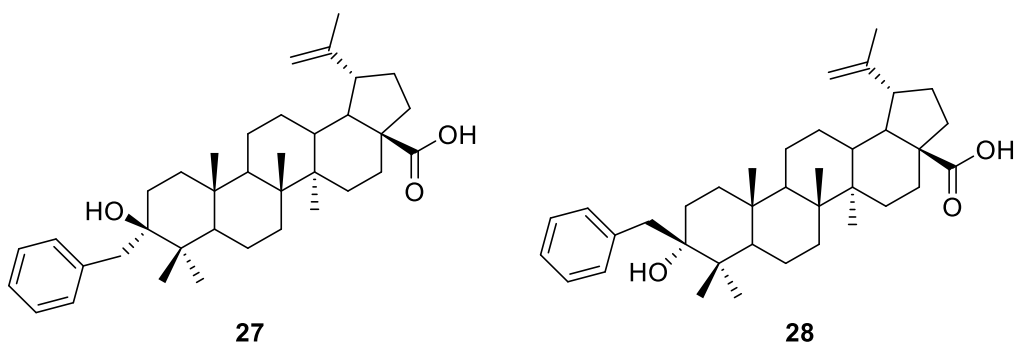
Obrázek 11: Struktura bevirimatu (**23**)

Společně s derivátem BMS-955176 (*Obr. 10*) byly připraveny i aromatické deriváty BMS-1 až BMS-3 (**24-26**) (*Obr. 12*), které se liší substitucí na C-28. Syntéza vychází z kyseliny betulinové (**7**), ze které je ve třech krocích připraven enoltriflát, který je podroben Suzuki-Miyura cross-couplingu a reduktivní debenzylaci. Cílové molekuly **24-26** jsou pak připraveny sledem několika dalších reakčních kroků.^{45,44}



Obrázek 12: Struktury derivátů BMS-1 až BMS-3 (**24-26**)

Genet a kolektiv publikovali v roce 2010 přípravu aromatických derivátů kyseliny betulinové (**7**) substituovaných v poloze C-3. Grignardovou reakcí s kyselinou betulonovou (**8**) byly připraveny diastereoizomery **27** a **28** (*Obr. 13*), které by se potenciálně měly vázat na GPCR receptory (receptory spřažené s G-proteinem) a působit jako selektivní agonisté TGR5, tedy jako potenciální léčiva proti diabetu 2. typu.⁴⁶

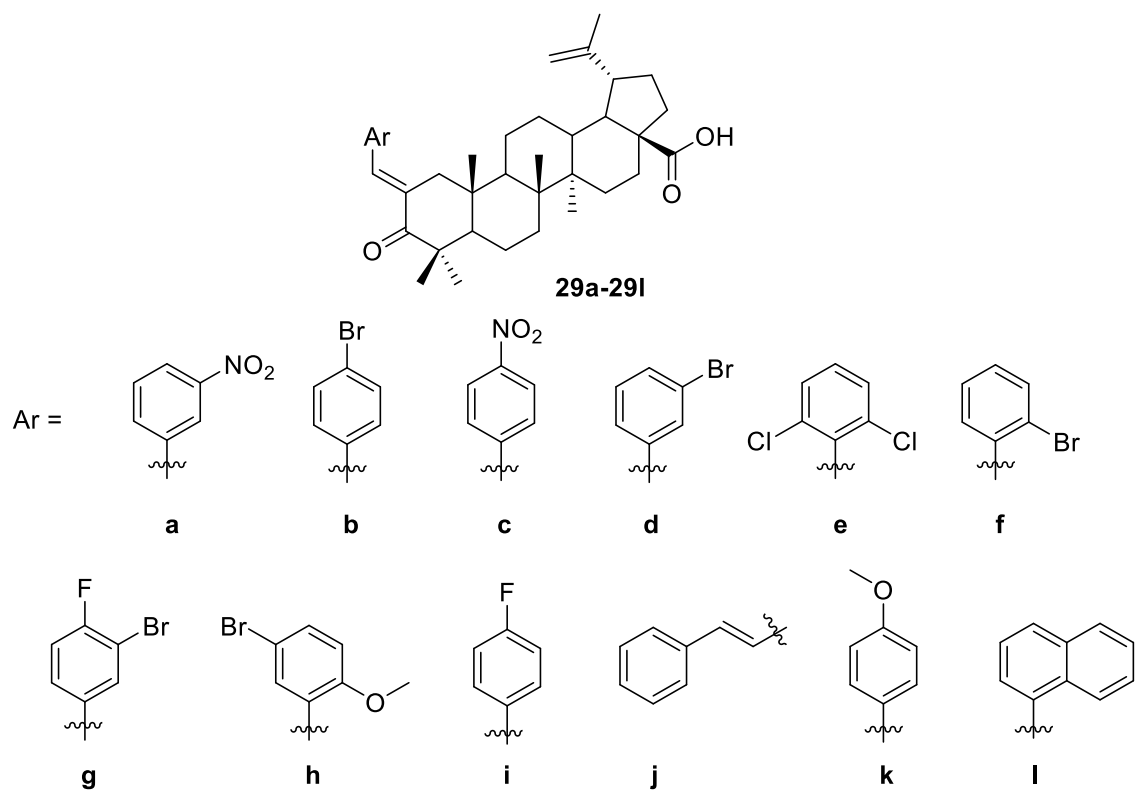


Obrázek 13: *Struktury derivátů 27 a 28*

2.4 Deriváty kyseliny betulonové

Gupta a kolektiv dále publikovali přípravu 12 benzyldenových derivátů kyseliny betulonové **29a-29l** (*Obr. 14*). Jejich syntéza vychází z kyseliny betulinové (**7**), reakční sled je stejný jako v případě derivátů kyseliny betulinové **17a-17l** (*Obr. 8*) a je uvedený ve *Schématu 7*.⁴⁷

Sloučeniny **29a-29l** byly, stejně jako deriváty **17a-17l**, testovány na cytotoxickou aktivitu na šesti nádorových liniích (uvedených dříve). Sloučeniny **29b**, **29c**, **29d** a **29h** vykazují cytotoxicitu na nádorové linii A549 s hodnotami $IC_{50} = 1,7 \mu M$ (**29b**), $1,5 \mu M$ (**29c**), $3,0 \mu M$ (**29d**) a $1,7 \mu M$ (**29h**). Sloučenina **29c** je aktivní i na nádorové linii HCT-116, hodnota $IC_{50} = 1,4 \mu M$.



Obrázek 14: *Struktury derivátů 29a-29l*

3. Heterocyklické deriváty triterpenů

3.1 Deriváty allobetulonu

Příprava morfolinového derivátu allobetulonu **30** byla v literatuře popsána třemi způsoby. První z nich publikovali v roce 2007 Tolmacheva a kolektiv, kteří vycházeli z isopropenyletherketonu **31**, jež vařili v morfolinu 8 hodin (*Schéma 9*). Další možností přípravy derivátu **30** je var diastereoizomerní směsi epoxy acetátů **32a** a **32b** s morfolinem 16 až 20 hodin (*Schéma 9*).⁴⁸ Třetí způsob publikovali v roce 2012 Urban a kolektiv, jejichž příprava vychází z bromketonu **33**, který za varu s močovinou, guanidinem nebo acetamidem v morfolinu poskytl ve všech případech morfolinový derivát **30** (*Schéma 9*). Cytotoxická aktivita sloučeniny **30** byla měřena na nádorové linii CEM (akutní lymfoblastická leukémie), hodnota cytotoxicity byla $IC_{50} = 0,226 \text{ mmol/l}$.⁴⁹

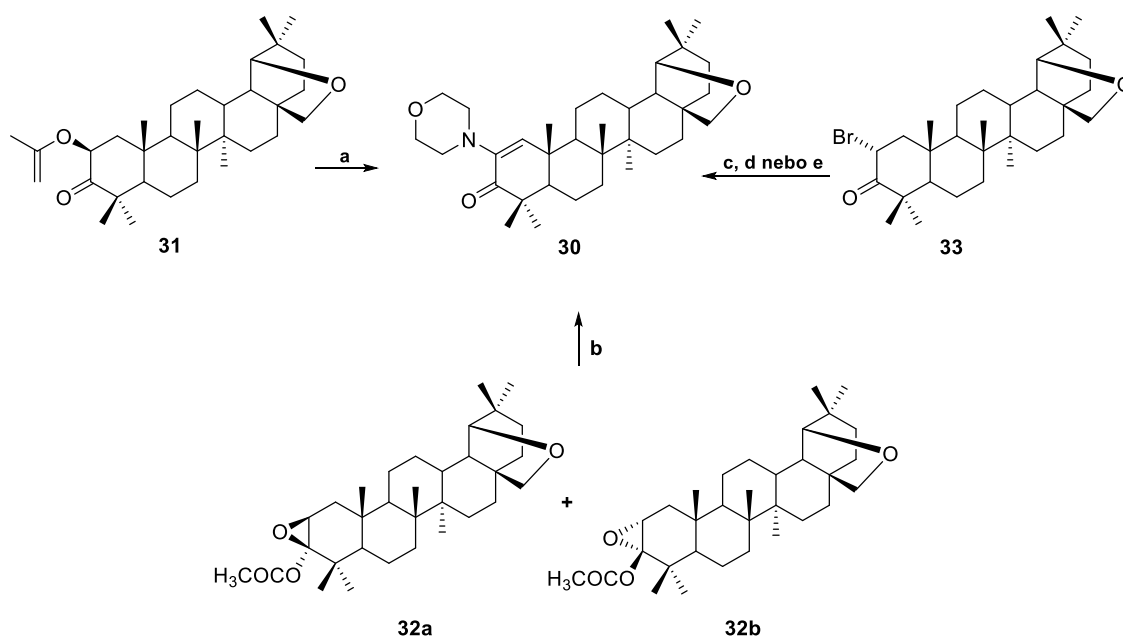
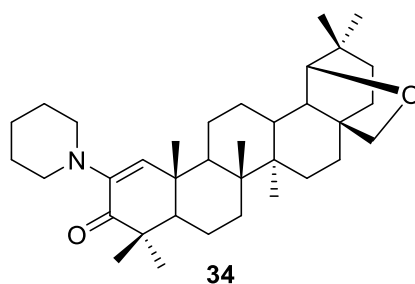


Schéma 9: Příprava morfolino derivátu **30**. (a) morfolin, var, 8 h ; (b) morfolin, var, 16-20 h; (c) močovina nebo (d) guanidin nebo (e) acetamid v morfolinu, var, 3 h.

Tolmacheva a kolektiv popsali také přípravu piperidinového derivátu **34** (*Obr. 15*), jehož příprava vychází, stejně jako v případě morfolinového derivátu **30**, z racemické směsi derivátů **32a** a **32b**, které jsou vařeny s piperidinem.⁴⁸

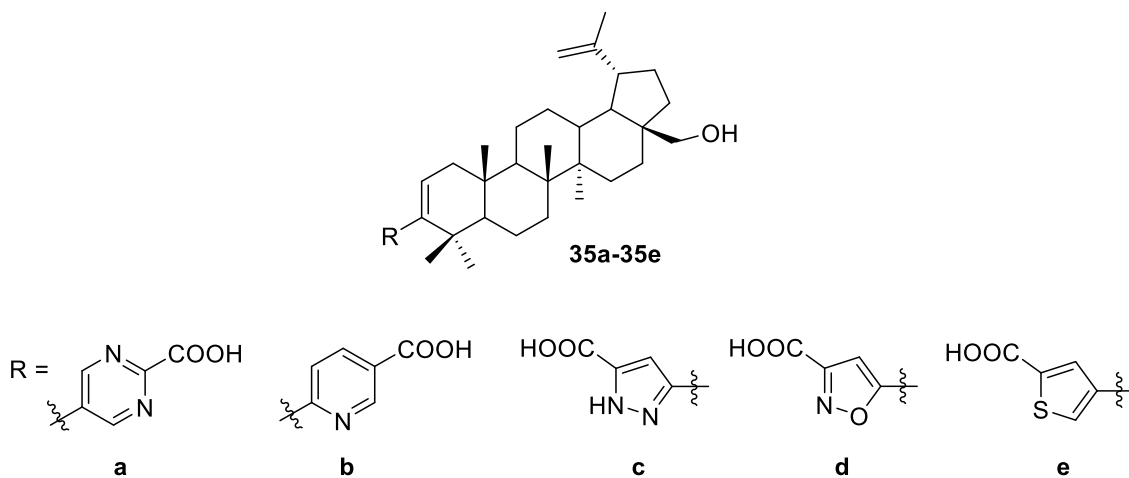


Obrázek 15: Struktura piperidinového derivátu allobetulonu (**34**)

3.2 Deriváty betulinu

Liu a kolektiv připravili pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu celkem 5 heterocyklických derivátů betulinu, **35a-35e** (Obr. 16), které byly připraveny stejným reakčním sledem jako deriváty **16a-16l** (Schéma 6).

Deriváty **35a-35e** byly testovány na antivirovou aktivitu vůči WT HIV-1 infekci. Všechny testované deriváty vykazují vysokou aktivitu vůči této infekci v rozmezí hodnot EC_{50} 1,08 μ M (derivát **35a**) až 0,039 μ M (derivát **35d**).⁴³

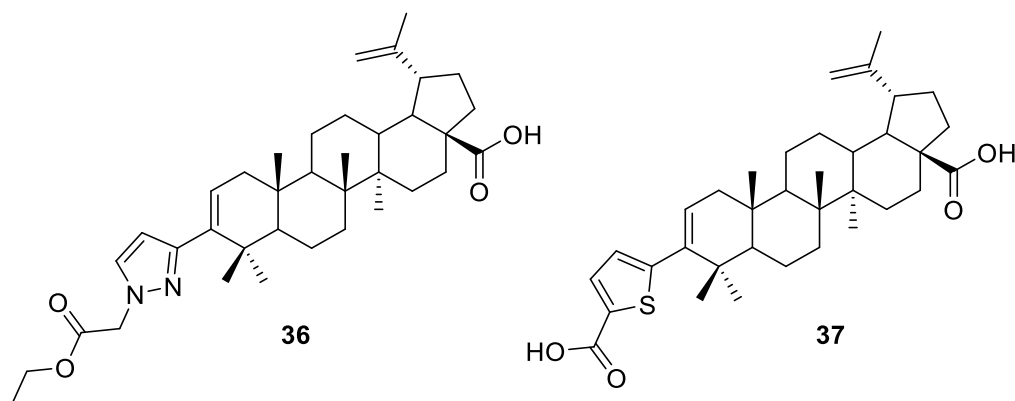


Obrázek 16: Struktury heterocyklických derivátů betulinu (**35a-35e**)

3.3 Deriváty kyseliny betulinové

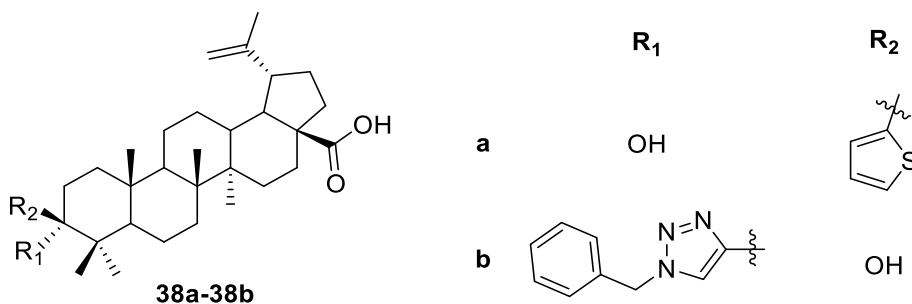
V literatuře je popsána příprava dvou heterocyklických derivátů kyseliny betulinové substituovaných v poloze C-3, konkrétně jde o deriváty **36** a **37** (Obr. 17), jež byly připraveny pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu. Reakční sled je obdobný jako v případě syntézy série aromatických derivátů kyseliny betulinové (**18a-18p**), která je uvedena na Schématu 8. Sloučeniny **36** a **37** byly testovány na antivirovou aktivitu vůči

WT HIV-1 infekci. Derivát **36** vykazoval hodnotu $EC_{50} = 0,167 \mu\text{M}$ a derivát **37** $EC_{50} = 0,059 \mu\text{M}$.⁴³



Obrázek 17: Struktura heterocyklických derivátů **36** a **37**

Genet a kolektiv popsali přípravu nejen aromatických derivátů **27** a **28**, ale i heterocyklických derivátů kyseliny betulonové **38a** a **38b** (Obr. 18) pomocí Grignardovy reakce. Sloučeniny **38a** a **38b** byly připraveny jako potenciální selektivní agonisté TGR5 (receptor spřažený s G-proteinem), kteří mají potenciál při léčbě diabetu 2. typu.⁴⁶

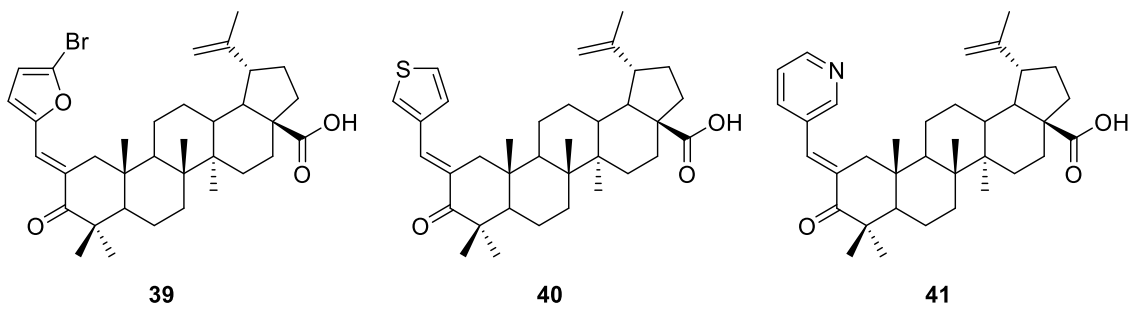


Obrázek 18: Struktury derivátů **38a** a **38b**

3.4 Deriváty kyseliny betulonové

Gupta a kolektiv připravili tři heterocyklické deriváty kyseliny betulonové **39-41**. Sloučeniny **39-41** byly připraveny obdobným reakčním sledem, jaký je popsán na Schématu 7.⁴⁷

Sloučeniny byly testovány na cytotoxickou aktivitu na šesti lidských buněčných nádorových liniích. Nejnadějněji se jeví derivát **40**, který vykazuje hodnotu cytotoxicity $IC_{50} = 1,97 \mu\text{M}$ na nádorové linii HCT-116.⁴⁷



Obrázek 19: Struktury derivátů 39, 40, a 41

4. Výsledky a diskuze

4.1 Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů allobetulonu

V rámci naší výzkumné skupiny již byla připravena série aromatických derivátů allobetulonu (**I**) pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu.⁵⁰ Rozhodli jsme se doplnit tuto knihovnu o sérii heterocyklických derivátů, u nichž se předpokládá, že by mohly vykazovat vyšší cytotoxickou aktivitu než deriváty aromatické.

Série derivátů allobetulonu (**I**) byla připravována jako první z důvodu předpokladu snadnější purifikace a lepší rozpustnosti finálních produktů. Při reakcích obvykle nedochází ke vzniku vedlejších produktů, narozdíl od syntézy derivátů kyseliny betulonové (**XXV**), a současně není potřeba použití žádných chránících skupin.

4.1.1. 2-Hydroxyallobetulon-1-en (**II**)

Výchozí sloučeninou pro reakci byl allobetulon (**I**), který reagoval s *tert*-butoxidem draselným v *tert*-butanolu za energického míchání a přístupu vzduchu. Jedná se o reakci, která je v chemii triterpenů již zavedená a popsána v literatuře.^{13,51}

Reakce poskytla diosfenol **II** ve výtěžku 93 % (*Schéma 10*). ¹H NMR spektrum tohoto derivátu se shodovalo s literaturou.^{13,51}

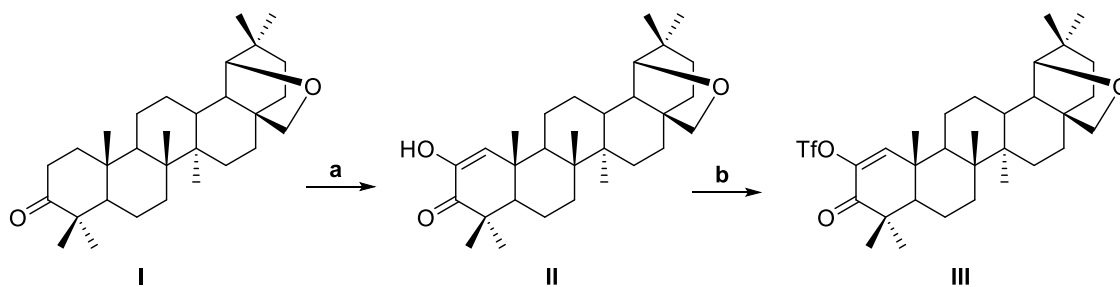


Schéma 10: (a) *tert*-butoxid draselný, *tert*-butanol, 40 °C, 4 h; (b) Tf₂NPh, TEA, DMAP, DCM, rt, 1,5 h.

4.1.2 2-(Trifluoromethylsulfonyl)allobetulon-1-en (**III**)

Přísun triflátu **III** byl proveden celkem čtyřikrát. Sloučenina **II** byla přenesena do vyžíhané a pod proudem dusíku ochlazené Schlenkovy baňky opatřené septem a míchadlem. Do baňky bylo dále přidáno 1,5 eq. Tf₂NPh, 3 eq. TEA, 10 molárních procent katalyzátoru DMAP a bezvodý DCM (*Schéma 10*). Postupně došlo k barevné změně reakční směsi ze světle žluté na tmavě červenou.⁵⁰

Reakční směs byla zpracována extrakcí do EtOAc, který byl odpařen na RVO a surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Enotriflát **III** byl získán ve výtěžku 90 %. ¹H NMR spektrum tohoto derivátu se shodovalo s literaturou.

4.2 Příprava aromatických a heterocyklických derivátů allobetulonů

V rámci přípravy série heterocyklických derivátů allobetulonů (**I**) byl nejprve syntetizován aromatický *p*-tolyl derivát **IV**, který byl již interně připraven i plně charakterizován.⁵⁰ Cílem přípravy tohoto derivátu bylo vyzkoušet si metodiku Suzuki-Miyaura cross-couplingu, zpracování reakční směsi a její purifikaci.

V dalších reakcích již byly použity nově zakoupené heterocyklické boronové kyseliny, u kterých se předpokládalo, že by mohly být za daných reakčních podmínek nestabilní, což se ve dvou případech ukázalo jako reálný problém. Při těchto dvou reakcích pravděpodobně docházelo k rozkladu boronových kyselin, či vzniklých produktů, přímo v reakční směsi, což bude diskutováno níže.

4.2.1 2-*p*-Tolylallobetulon-1-en (**IV**)

Modelový postup přípravy aromatického derivátu triterpenu pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce, který byl následně aplikován pro přípravu heterocyklických derivátů triterpenů:

Výchozí sloučeninou pro přípravu tolyl derivátu **IV** byl enoltriflát **III**, který byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu a pomocí stříkačky přenesen do vyžíhané a pod proudem dusíku ochlazené slzové baňky opatřené septem a míchadlem. Do slzové baňky byly dále přidány 2 eq. 4-methylfenylboronové kyseliny rozpuštěné v 2-propanolu a 2 eq. uhličitánu draselného rozpuštěného ve vodě. Pro zahájení reakce bylo přisypáno katalytické množství (2 mol %) PdCl₂(PPh₃)₂. Reakce byla ponechána reagovat přes noc při teplotě 90 °C (*Schéma 11*).⁵⁰

Reakční směs byla zpracována extrakcí do EtOAc, který byl odpařen na RVO. Surový produkt **IV** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Celkem bylo po zpracování a purifikaci získáno 71 mg (79 %) tolylderivátu **IV**. Produkt reakce byl již v naší výzkumné skupině připraven a charakterizován, proto byl srovnán se standardem pomocí TLC, R_f obou látek se shodovaly. Také ¹H NMR spektrum tolylu **IV** se shodovalo se spektrem interního standardu.⁵⁰

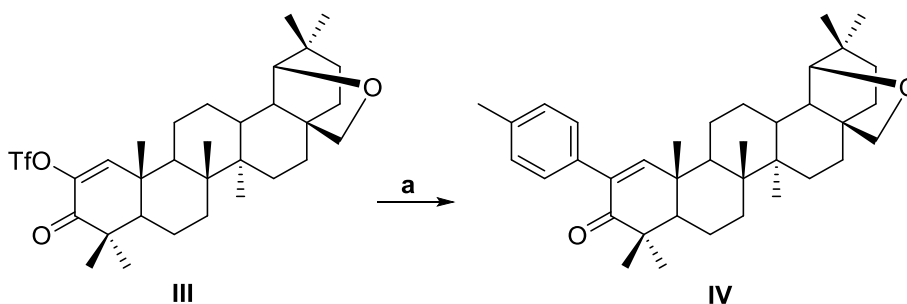


Schéma 11: (a) 4-methylfénylboronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.2 2-(Pyridin-4-yl)-allobetulon-1-en (V)

Pyridin-4-yl derivát **V** byl připraven analogicky podle výše zmíněného modelového postupu reakcí enoltriflátu **III** s pyridin-4-boronovou kyselinou (*Schéma 12*). Reakční směs byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu za poskytnutí derivátu **V** v množství 65 mg (74 %). Struktura derivátu **V** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V 1H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezeny dva dublety dubletu při 8.56 a 7.24 ppm, každý s integrálem dva, odpovídající signálům pyridin-4-ylu. Dále byl nalezen singlet s integrálem jedna při 7.30 ppm odpovídající signálu H-1.

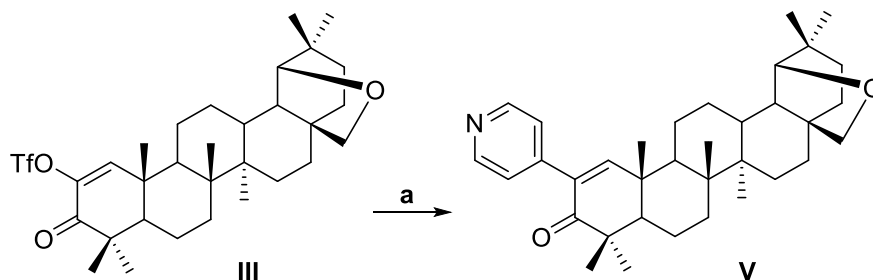


Schéma 12: (a) pyridin-4-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.3 2-(Furan-3-yl)-allobetulon-1-en (VI)

Furan-3-yl derivát **VI** byl připraven analogicky podle výše zmíněného postupu reakcí enoltriflátu **III** s furan-3-boronovou kyselinou (*Schéma 13*). Reakce byla provedena dvakrát. Surový produkt **VI** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s výtěžkem 76 - 85 %. Struktura derivátu **VI** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V 1H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezeny dublet

dubletu při 7.96 ppm, multiplet při 7.39 - 7.36 ppm a dublet dubletu při 6.51 ppm vše s integrálem jedna, odpovídající signálům furan-3-ylu. Dále byl nalezen singlet při 7.20 ppm s integrálem jedna odpovídající H-1.

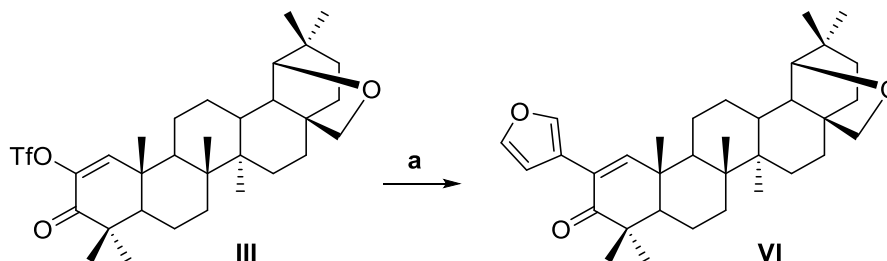


Schéma 13: (a) furan-3-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.4 2-(Thiofen-2-yl)-allobetulon-1-en (VII)

Thiofen-2-yl derivát **VII** byl připraven obdobně jako předešlé deriváty reakcí enoltriflátu **III** s thiofen-2-boronovou kyselinou (*Schéma 14*). Produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s výtěžkem 66 %. Struktura derivátu **VII** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V 1H NMR spektru byl kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezen dublet při 7.28 ppm, multiplet při 7.26 - 7.23 ppm a dublet dubletu při 7.00 ppm vše s integrálem jedna, odpovídající thiofen-2-ylu. Dále byl nalezen singlet při 7.35 ppm s integrálem jedna odpovídající H-1.

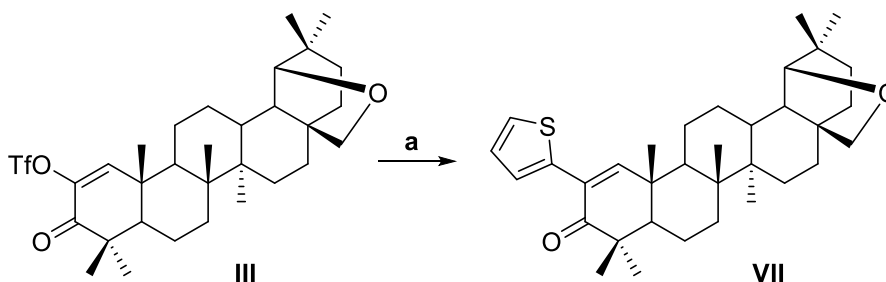


Schéma 14: (a) thiofen-2-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.5 2-(Thiofen-3-yl)-allobetulon-1-en (VIII)

Thiofen-3-yl derivát **VIII** byl připraven analogicky jako předešlé deriváty Suzuki-Miyaura cross-couplingem triflátu **III** s thiofen-3-boronovou kyselinou (*Schéma 15*). Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Výtěžek reakce

byl 74 %. Struktura byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet allobetulonů nalezeny dublet dubletu při 7.56 ppm s integrálem jedna, multiplet při 7.20 ppm s integrálem dva a dublet dubletu při 7.20 ppm s integrálem jedna odpovídající signálům thiofen-3-ylu a vodíku H-1.

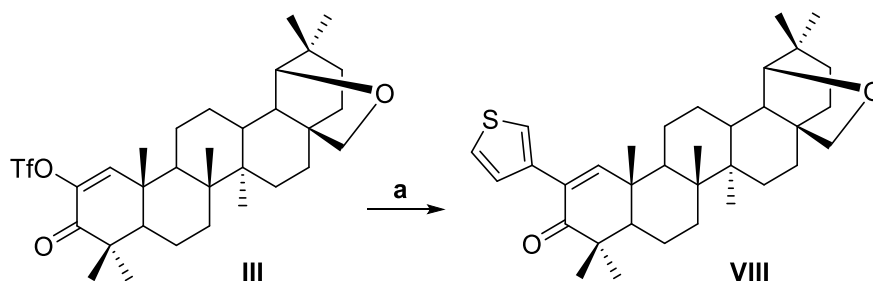


Schéma 15: (a) thiofen-3-boronová kyselina, K_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.6 2-(Benzo[b]thien-2-yl)-allobetulon-1-en (IX)

Benzo[b]thien-2-yl derivát **IX** byl připraven obdobným postupem jako předešlé deriváty reakcí triflátu **III** s benzo[b]thien-2-ylboronovou kyselinou (Schéma 16). Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Reakce byla provedena dvakrát, nejprve s výtěžkem 38 %, a podruhé s výtěžkem 81 %. Rozdíl ve výtěžcích byl způsoben částečným rozkladem první šarže derivátu stáním na vzduchu. S druhou várkou již bylo nakládáno obezřetněji, produkt byl uchováván pod atmosférou dusíku a uložen při -18 °C. Struktura derivátu **IX** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet allobetulonů nalezeny dva multiplety při 7.79 – 7.75 ppm a 7.73 – 7.69 ppm, singlet při 7.60 ppm, vše s integrálem jedna, a multiplet při 7.33 – 7.26 ppm s integrálem dva odpovídající signálům benzo[b]thien-2-ylu. Dále byl nalezen singlet při 7.42 ppm s integrálem jedna odpovídající H-1.

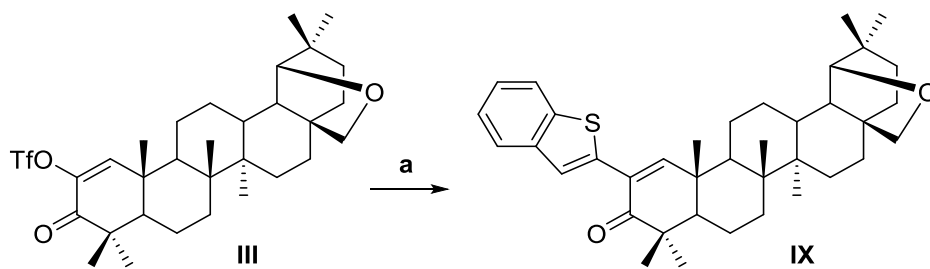


Schéma 16: (a) benzo[b]thien-2-ylboronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.7 2-(1,4-Benzodioxan-6-yl)-allobetulon-1-en (X)

1,4-Benzodioxan-6-yl **X** byl připraven analogicky jako předešlé deriváty Suzuki-Miyaura cross-couplingem triflátu **III** s 1,4-benzodioxan-6-boronovou kyselinou (Schéma 17). Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s výtěžkem 60 %. Struktura derivátu **X** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V 1H NMR spektru byl kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezen multiplet při 6.81 ppm s integrálem tři a multiplet při 4.28 - 4.23 ppm s integrálem čtyři odpovídající 1,4-benzodioxan-6-ylu. Dále byl nalezen singlet s integrálem jedna při 7.10 ppm odpovídající H-1.

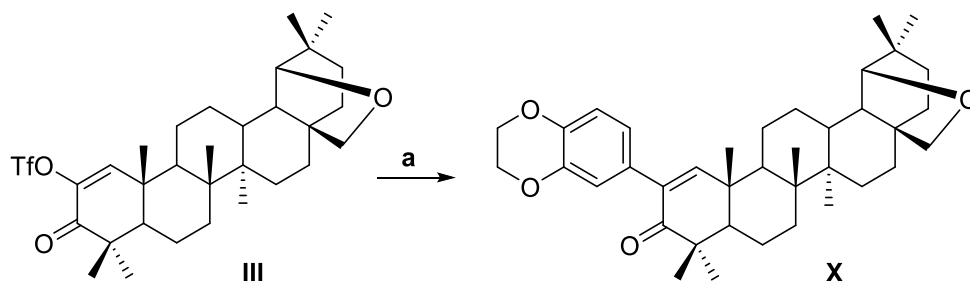


Schéma 17: (a) 1,4-benzodioxan-6-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.8 2-(Indazol-6-yl)-allobetulon-1-en (XI)

Indazol-6-yl **XI** byl připraven analogicky jako v předešlých případech reakcí triflátu **III** s indazol-6-boronovou kyselinou (Schéma 18). Při reakci byly optimalizovány reakční podmínky a bylo použito 1,2 eq. boronové kyseliny namísto původních 2 eq. Po zpracování reakční směsi byl surový derivát **XI** čištěn dvakrát pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Výtěžek činil 62 %. Struktura derivátu **XI** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V 1H NMR spektru byl kromě signálů typických pro skelet

allobetulonů nalezen singlet při 8.04 ppm, dublet při 7.70 ppm a dublet dubletu při 7.10 ppm vše s integrálem jedna a multiplet při 7.28 – 7.26 ppm s integrálem dva odpovídající indazol-6-ylu. Dále byl nalezen singlet při 7.50 ppm s integrálem jedna odpovídající vodíku H-1.

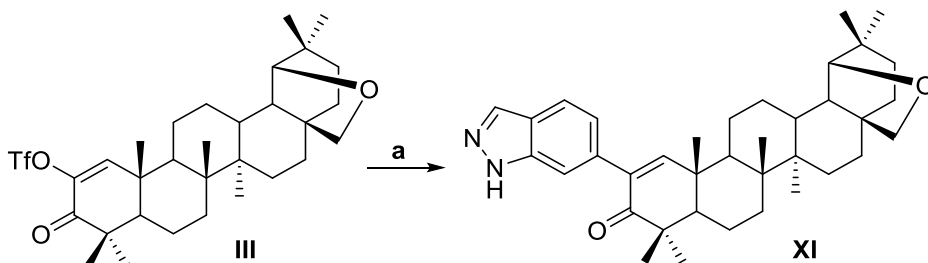


Schéma 18: (a) indazol-6-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.9 2-(1H-Pyrazol-4-yl)-allobetulon-1-en (XII)

Derivát **XII** se nepodařilo připravit, molekula pravděpodobně podléhá rozkladu přímo v reakční směsi. Reakce byla opakována a její průběh byl monitorován pomocí TLC (monitoring byl prováděn každou hodinu, později byla reakce ponechána reagovat přes noc), avšak se stejným výsledkem jako v prvním případě (*Schéma 19*). Při reakci byl od začátku pozorován vznik složité reakční směsi, kterou se ani při opakované purifikaci sloupcovou chromatografií na silikagelu nepodařilo rozdělit. Směs byla analyzována pomocí LC-MS. V hmotnostním spektru byl mimo řady vedlejších produktů, z nichž byl identifikován pouze dimer boronové kyseliny, pozorován i hmotnostní pík pyrazolu **XII**, produkt se však nepodařilo samostatně izolovat.

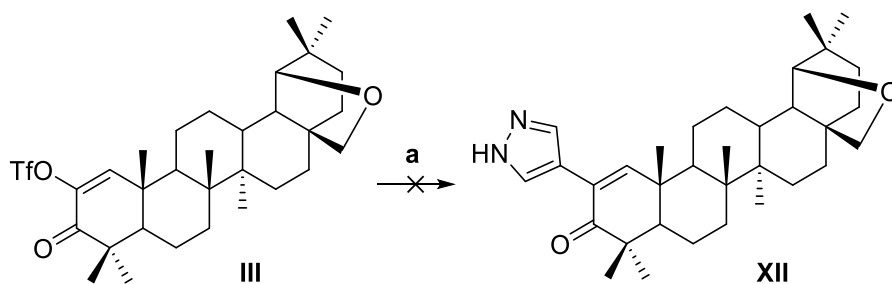


Schéma 19: (a) 1H-pyrazol-4-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.10 2-(Isochinolin-4-yl)-allobetulon-1-en (XIII)

Isochinolin-4-yl **XIII** byl připraven obdobně jako předešlé deriváty Suzuki-Miyaura cross-couplingovou reakcí enoltriflátu **III** a isochinolin-4-boronové kyseliny (Schéma 20). Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, ale i po purifikaci obsahoval zbytek výchozí boronové kyseliny. Reakce byla znovu opakována s modifikovanými reakčními podmínkami – bylo použito 1,2 eq. isochinolin-4-boronové kyseliny. Produkt byl následně čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu a výtěžek reakce byl 72 %. Struktura derivátu **XIII** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byl kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezen singlet při 9.20 ppm, singlet při 8.27 ppm, dublet při 7.98 ppm a multiplet při 7.68–7.63 ppm vše s integrálem jedna a triplet při 7.58 ppm s integrálem dva odpovídající isochinolin-4-ylu. Dále byl ve spektru nalezen singlet při 7.29 ppm s integrálem jedna odpovídající vodíku H-1.

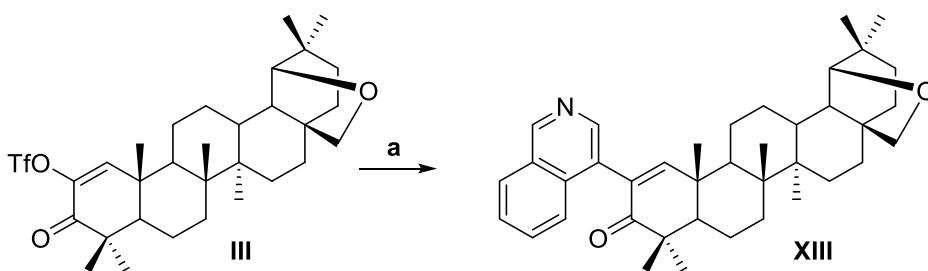


Schéma 20: (a) isochinolin-4-boronová kyselina, K_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.11 2-(5-Chlorothiolen-2-yl)-allobetulon-1-en (XIV)

5-Chlorothiolen-2-yl derivát **XIV** byl připraven analogicky jako předešlé deriváty reakcí triflátu **III** s 5-chlorothiolen-2-boronovou kyselinou (Schéma 21). Dále byl surový derivát dvakrát přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Výtěžek reakce byl 73 %. Struktura derivátu **XIV** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezeny dva dublety při 7.03 a 6.80 ppm s integrálem jedna odpovídající 5-chlorothiolen-2-ylu. Dále byl nalezen singlet při 7.30 ppm s integrálem jedna odpovídající H-1.

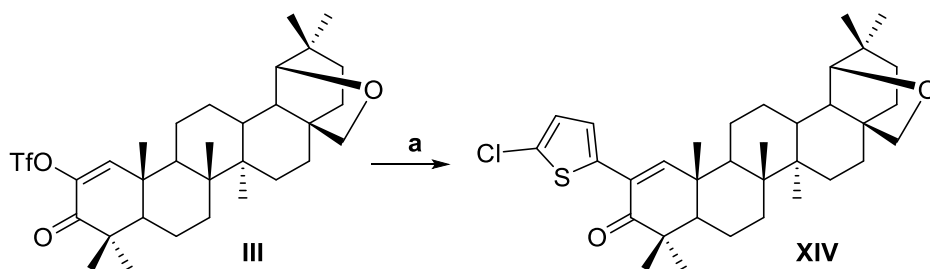


Schéma 21: (a) 5-chlorothiolen-2-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , $90\text{ }^\circ C$, přes noc.

4.2.12 2-(Furan-2-yl)-allobetulon-1-en (XV)

Furan-2-yl derivát **XV** byl připraven obdobným způsobem jako předešlé deriváty reakcí triflátu **III** s furan-2-boronovou kyselinou (Schéma 22). Surový derivát **XV** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Furan-2-yl derivát **XV** byl získán v množství 72 mg, což odpovídá výtěžku 84 %. Struktura derivátu **XV** byla ověřena pomocí spektrálních dat. V 1H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezeny dva dublety při 7.34 a 6.82 ppm a dublet dubletu při 6.41 ppm, vše s integrálem jedna, odpovídající třem vodíkům furan-2-ylu. Dále byl nalezen singlet při 7.52 ppm s integrálem jedna odpovídající H-1.

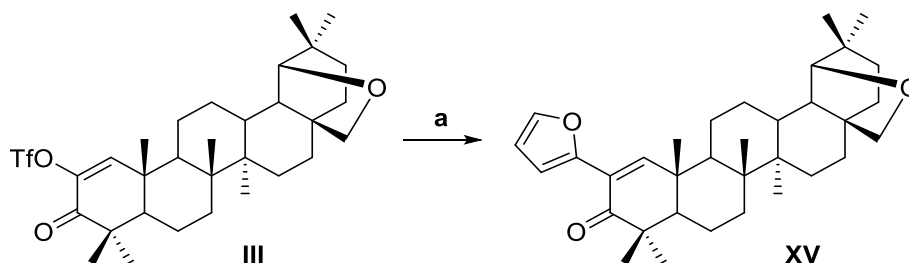


Schéma 22: (a) furan-2-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , $90\text{ }^\circ C$, přes noc.

4.2.13 2-(Pyridin-2-yl)-allobetulon-1-en (XVI)

Pyridin-2-yl derivát **XVI** se nepodařilo připravit (Schéma 23). Po ukončení reakce byla izolována směs dvou látek v poměru 1:1, které měly na TLC blízké R_f . Směs byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu. Jednotlivé látky se nedařilo oddělit. Jak je patrné z 1H NMR spektra, ani jedna z molekul není kýžený produkt reakce, ale jedná se o blíže neidentifikované terpenické vedlejší produkty. Reakce byla opakována za poskytnutí stejného výsledku.

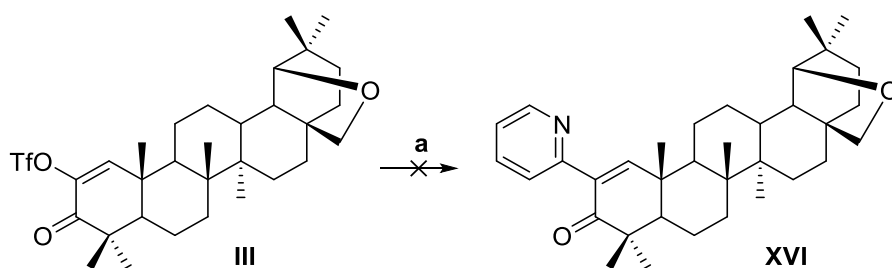


Schéma 23: (a) pyridin-2-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , $90\text{ }^\circ C$, přes noc.

4.2.14 2-(Indol-5-yl)-allobetulon-1-en (XVII)

Indol-5-yl derivát **XVII** byl připraven obdobným postupem jako předešlé deriváty pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu mezi triflátem **III** a indol-5-boronovou kyselinou (*Schéma 24*). Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Výtěžek reakce byl 62 %.

Struktura derivátu **XVII** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V 1H NMR spektru byl kromě signálů odpovídajících skeletu allobetulonu nalezen singlet při 8.1 ppm, dublet při 7.58 ppm, dublet při 7.34 ppm, dublet dubletu při 7.13 ppm a multiplet při 6.56 – 6.50 ppm vše s integrálem jedna a multiplet při 7.20 – 7.17 ppm s integrálem dva odpovídající indol-5-ylu a vodíku H-1.

Reakce byla provedena dvakrát, protože derivát **XVII** je nestabilní a podléhá pozvolnému rozkladu v roztoku, na vzduchu, dokonce i pod atmosférou dusíku při $4\text{ }^\circ C$, proto musí být skladován pod atmosférou dusíku při teplotě $-18\text{ }^\circ C$.

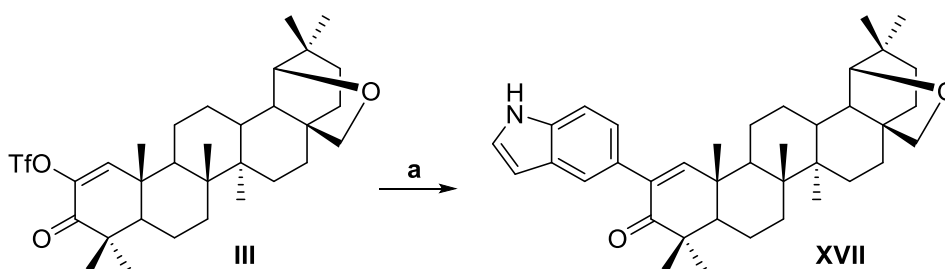


Schéma 24: (a) indol-5-boronová kyselina, K_2CO_3 , $PdCl_2(PPh_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , $90\text{ }^\circ C$, přes noc.

4.2.15 2-(Pyrimidin-5-yl)-allobetulon-1-en (XVIII)

Pyrimidin-5-yl derivát **XVIII** byl připraven analogickým postupem jako předešlé deriváty reakcí triflátem **III** s pyrimidin-5-boronovou kyselinou (*Schéma 25*). Produkt byl

čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Výtěžek činil 72 %. Struktura derivátu **XVIII** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byl kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezen singlet při 9.11 ppm s integrálem jedna a singlet při 8.69 ppm s integrálem dva, odpovídající pyrimidin-5-ylu. Dále byl nalezen singlet při 7.29 ppm s integrálem jedna odpovídající H-1.

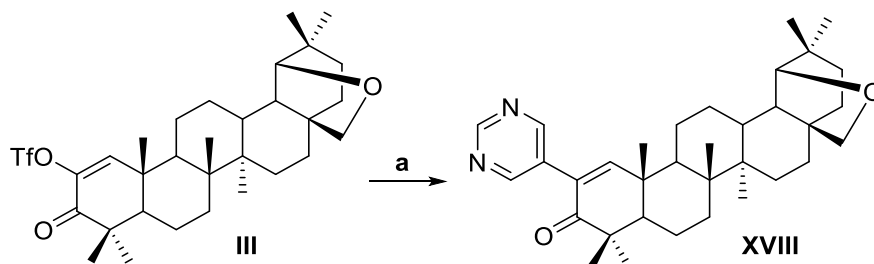


Schéma 25: (a) pyrimidin-5-boronová kyselina, K_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 90 °C, přes noc.

4.2.16 2-(Pyridin-3-yl)-allobetulon-1-en (**XIX**)

Pyridin-3-yl derivát **XIX** byl připraven analogicky jako předešlé deriváty Suzuki-Miyaura cross-couplingem triflátu **III** s pyridin-3-boronovou kyselinou (*Schéma 26*). Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Výtěžek reakce byl 76 %. Struktura byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byl kromě signálů typických pro skelet allobetulonu nalezen singlet při 8.51 ppm s integrálem dva, multiplet při 7.69 – 7.64 ppm s integrálem jedna a multiplet při 7.25 – 7.22 ppm s integrálem dva odpovídající signálům pyridin-3-ylu a vodíku H-1.

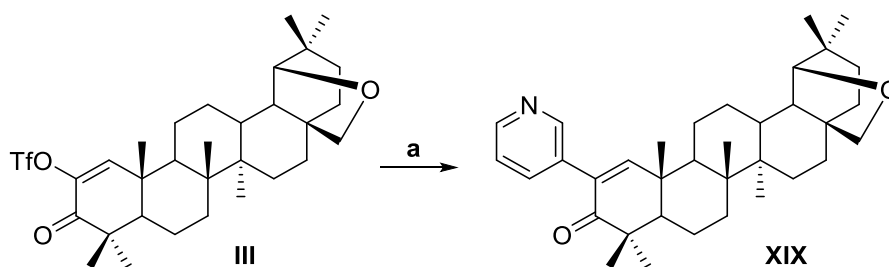


Schéma 26: (a) pyridin-3-boronová kyselina, K_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , 85 °C, přes noc.

4.3. Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů benzylbetulonátu a kyseliny betulonové

Již dříve byla v rámci naší výzkumné skupiny připravena série aromatických derivátů kyseliny betulonové (**XXV**) pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu.^{50,52} Některé z derivátů vykazují selektivitu vůči nádorovým buněčným liniím s hodnotami IC₅₀ v řádu jednotek μM až stovek nM. Z tohoto důvodu měla být připravena série heterocyklických derivátů kyseliny **XXV**, u kterých předpokládáme srovnatelnou či vyšší cytotoxickou aktivitu ve srovnání s deriváty aromatickými, což koreluje s poznatky publikovanými v literatuře.^{53,54}

Na začátku syntézy je potřeba esterifikovat volnou karboxylovou skupinu na C-17 benzylbromidem z důvodu lepší rozpustnosti esterů a jejich snadnější manipulace např. při purifikaci, ve srovnání s deriváty s volnou karboxylovou funkcí. Předpokládalo se také, že chránění je nezbytné pro hladký průběh syntézy enoltriflátu **XXIV**. Rozhodujícím krokem této reakční cesty se jeví finální deprotektace benzylesterů, která bude muset být pečlivě optimalizována.

Deriváty s volnou COOH skupinou vykazují obecně vyšší cytotoxickou aktivitu než benzylestery.

4.3.1. Benzylbetulinát (**XXI**)

Výchozí sloučeninou pro reakci byla komerčně dostupná kyselina betulinová (**XX**), která reagovala s benzylbromidem za přítomnosti uhličitanu draselného, dimethylformamidu a acetonitrulu (*Schéma 27*). Reakce byla provedena z 15 g kyseliny betulinové (**XX**) jako výchozí látky a produktem reakce byl benzylester **XXI** získaný ve výtěžku 97 %. ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁵⁵

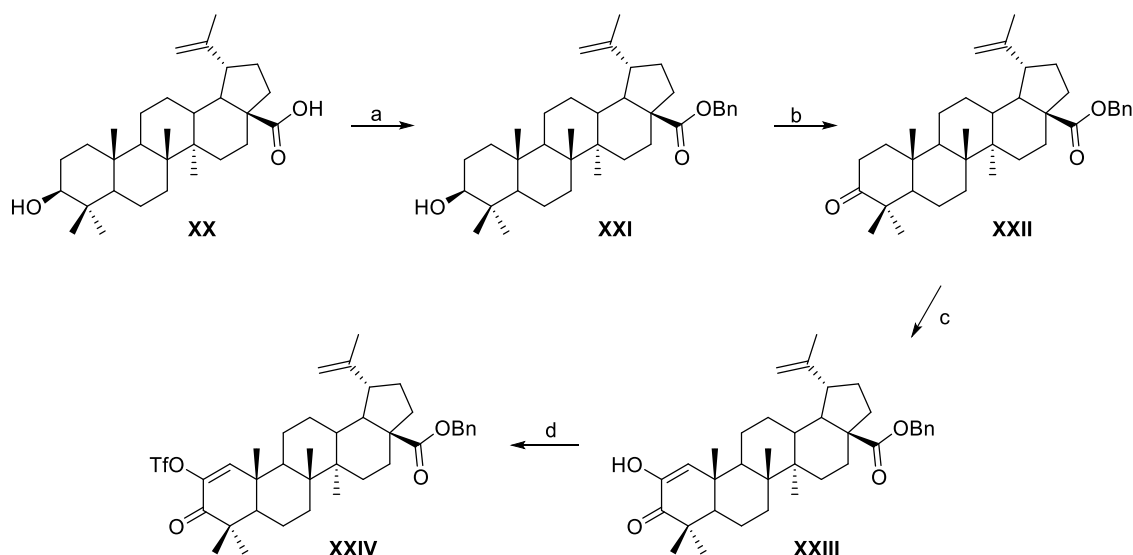


Schéma 27: (a) BnBr, K₂CO₃, acetonitril, DMF, 60 °C, 16 h; (b) trihydrát octanu sodného, dihydrát dichromanu sodného, 1,4-dioxan, AcOH, (CH₃CO)₂O, r.t., 16 h; (c) vzduch/O₂, t-BuOK, t-BuOH, 40 °C, 2-4 h; (d) Tf₂NPh, TEA, DMAP, DCM, r.t., 4 h.

4.3.2. Benzylbetulonát (XXII)

K oxidaci benzylolesteru **XXI** bylo využito 1,8 eq. dihydrátu dichromanu sodného a 1,5 eq. trihydrátu octanu sodného v systému 1,4-dioxanu, kyseliny octové a acetanhydridu (Schéma 27). Reakční směs byla vytřepána s nasyceným roztokem KHCO₃ do neutrálního pH, extrahována do EtOAc a čištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Reakce byla provedena celkem třikrát. Byl získán benzylbetulonát **XXII**. Výtěžky jednotlivých reakcí se pohybovaly v rozmezí 69-83 %. ¹H NMR spektrum bylo shodné s literaturou.⁵⁵

4.3.3. 2-Hydroxy-benzylbetulonát-1-en (XXIII)

Výchozí sloučeninou pro reakci byl benzylbetulonát **XXII**, který reagoval s *tert*-butoxidem draselným v *tert*-butanolu za energického míchání a přístupu vzduchu při 40 °C (Schéma 27). Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (více viz níže).

Po ukončení reakce byla reakční směs neutralizována roztokem vody okyselené kyselinou chlorovodíkovou, extrahována do EtOAc a čištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Reakce poskytla diosfenol **XXIII** ve výtěžku 82 % avšak jako směs s benzylbetulonátem **XXII** v poměru 1:1, čistota produktu tak byla pouhých 50 %. Bylo zjištěno, že diosfenol **XXIII** podléhá na vzduchu při r.t. pozvolnému rozkladu

na blíže nestudovanou směs látek, a proto musí být uchováván pod atmosférou dusíku při 4 °C.^{56,57}

Reakce byla několikrát opakována, protože výchozí látka **XXII** a produkt reakce, diosfenol **XXIII**, mají na TLC velmi podobný retenční faktor a jsou špatně rozlišitelné. I přes prodloužení reakčního času ze 4 h na 7 h nedocházelo ke 100% konverzi a reakce stále poskytovala směs výchozí látky a produktu, kterou nešlo zcela oddělit ani pomocí několikanásobné sloupcové chromatografie na silikagelu, proto byl optimalizován postup pro monitoring reakce.

TLC fólie byla před nanesením vzorků namočena do roztoku AgNO₃ v systému MeOH/H₂O 5:1 a vysušena ve vodorovné poloze volně na vzduchu. Po nanesení vzorků byla mobilní fáze ponechána dvakrát vzlínat, poté byla TLC fólie vysušena a následně namočena do roztoku zředěné kyseliny sírové a vypálena při 150-200 °C. Po vypálení byly skvrny výchozí látky a produktu rozlišitelné na základě rozdílné barvy.

Z časových důvodů nebyla reakce s nově vyvinutým monitoringem opakována ve větším měřítku, problematikou se v budoucnu budu dále zabývat.

4.3.4. 2-(Trifluoromethylsulfonyl)benzylbetulonát-1-en (**XXIV**)

Sloučenina **XXIII** byla přenesena do vyžíhané a pod proudem dusíku ochlazené Schlenkovy baňky opatřené septem a míchadlem. Do baňky bylo dále přidáno 1,5 eq. Tf₂NPh, 3 eq. TEA, 10 molárních procent DMAP a bezvodý DCM (*Schéma 27*).⁵⁰ Po ukončení reakce byla reakční směs zpracována extrakcí do EtOAc, který byl odpařen na RVO a surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Enotriflát **XXIV** byl získán pouze ve výtěžku 12 %, protože výchozí diosfenol **XXIII** byl použit jako směs s benzylbetulonátem **XXII** (1:1). Reakce je zřejmě citlivá na přítomnost nečistot a bude opakována po přísunu čistého diosfenolu **XXIII**. Produkt byl charakterizován pomocí ¹H NMR. ¹H NMR spektrum bylo shodné s literaturou.⁵⁰

4.4. Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů kyseliny betulonové

Tento alternativní postup přípravy výchozích látek pro syntézu derivátů kyseliny betulonové (**XXV**) byl zařazen z důvodu problematické přípravy diosfenolu **XXIII** v předešlé kapitole. Tato cesta by poskytovala výhody v podobě zkrácení syntézy o dva reakční kroky, zavedení chránicí skupiny a finální deprotekcí všech derivátů.

Tento syntetický postup vychází z kyseliny betulonové (**XXV**), která je již v prvním kroku oxidována na diosfenol **XXVI**, a následně převedena na enoltriflát **XXVII** s volnou karboxylovou funkcí. Jako problematický krok se ukázala reakce poskytující triflát **XXVII**, při které vzniká směs dvou látek, která je jen obtížně separovatelná pomocí sloupcové chromatografie. Směs produktů je nestabilní a podléhá rozkladu i při uchování za inertních podmínek při 4 °C.

Jako perspektivnější se jeví původní syntéza, která využívá chránicí skupiny, a pro jejíž nejproblematictější část byla vyvinuta nová metoda monitoringu pomocí TLC, která byla diskutována v předešlé kapitole.

4.4.1 2-Hydroxybetulon-1-enová kyselina (**XXVI**)

Výchozí sloučeninou pro reakci byla kyselina betulonová (**XXV**), která reagovala analogicky jako 3-oxotriterpeny **I** a **XXII** s *tert*-butoxidem draselným v *tert*-butanolu za energického míchání a přístupu vzduchu při 40 °C (Schéma 28). Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Reakce poskytla diosfenol **XXVI** ve výtěžku 82 %, jehož ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁵⁸

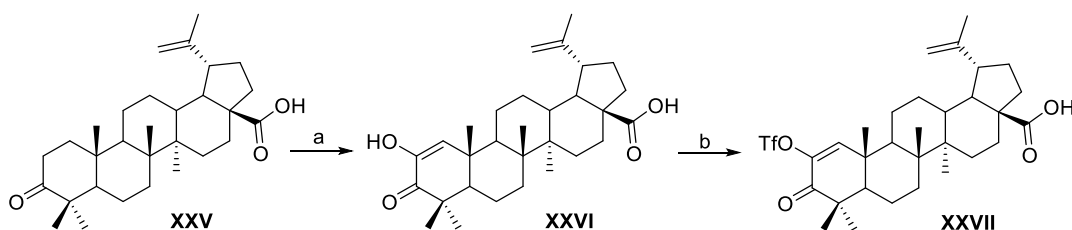


Schéma 28: (a) vzduch/O₂, *t*-BuOK, *t*-BuOH, 40 °C, 4 h; (b) Tf₂NPh, TEA, DMAP, DCM, *r.t.*, 20 min.

4.4.2. 2-(Trifluoromethylsulfonyl)-betulon-1-enová kyselina (**XXVII**)

Pro přípravu enoltriflátu **XXVII** byly nejprve vyzkoušeny stejné reakční podmínky jako při přípravě enoltriflátů **III** a **XXIV**. Byly použity 3 eq. TEA, 10 mol %

katalyzátoru DMAP a 1,5 eq. Tf₂NPh (*Schéma 28*). Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byl v reakční směsi nadále patrný zbytek výchozí látky, proto byl proveden pokus o optimalizaci reakčních podmínek.

Bylo nasazeno několik testovacích reakcí v analytickém měřítku, jejichž podmínky jsou shrnuty v *Tabulce 1*. Byl optimalizován počet eq. TEA (**b**), DMAP (**c**) i Tf₂NPh (**d-g**). Všechny reakce byly monitorovány pomocí TLC (zpočátku po 20 minutách, později po hodinách). Tyto reakce nebyly dále zpracovávány.

V případech reakcí **b-d** nedošlo ke stoprocentní konverzi výchozího diosfenolu **XXVI** a v reakční směsi se kromě produktu **XXVII** tvořil i neznámý vedlejší produkt.

Při použití dvou a více eq. činidla Tf₂NPh (reakční podmínky **e-g**) došlo po 20 minutách ke vzniku dvou produktů v poměru zhruba 1:1, které měly na TLC podobné retenční faktory. Reakce **e**, **f** a **g** poskytovaly dle TLC konverzi 100 %, avšak ve větším měřítku byla nasazena pouze reakce **e**, protože u ní byl pozorován vznik nejméně minoritních vedlejších produktů. Po úplném zreagování diosfenolu **XXVI** byla reakční směs zpracována obdobně jako v případě enoltriflátů **III** a **XXIV**, a poté byla čištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Podařilo se získat několik čistých frakcí kýženého produktu **XXVII**, které odpovídaly výtěžku 20 %. Zbytek frakcí tvořila směs produktu **XXVII** a neznámého vedlejšího produktu, který nebyl dále studován, protože se jej nepodařilo samostatně izolovat.

	TEA	DMAP	Tf ₂ NPh	TLC monitoring
a*	3 eq.	10 mol %	1,5 eq.	VL + P + VP
b	1,5 eq.	10 mol %	1,5 eq.	VL + P + VP
c	3 eq.	5 mol %	1,5 eq.	VL + P + VP
d	3 eq.	10 mol %	1,1 eq.	VL + P + VP
e	3 eq.	10 mol %	2 eq.	P + VP
f	3 eq.	10 mol %	2,5 eq.	P + VP
g	3 eq.	10 mol %	3 eq.	P + VP

*Tabulka 1: Optimalizace reakčních podmínek pro přípravu enoltriflátu **XVII**. *Výchozí reakční podmínky použité v reakcích s diosfenoly **II** a **XXXII**.*

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit triterpenoidní trifláty z komerčně dostupného allobetulonu (**I**) a kyseliny betulinové (**XX**) pro následnou syntézu malé knihovny nových heterocyklických derivátů triterpenů modifikovaných v poloze C-2 pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce za účelem testování jejich cytotoxické aktivity.

V teoretické části práce byla vypracována literární rešerše pojednávající o aromatických a heterocyklických derivátech allobetulonu (**I**), betulinu, kyseliny betulinové (**XX**) a kyseliny betulonové (**XXV**) modifikovaných v polohách C-2 a C-3 se zaměřením na jejich biologické účinky.

V diskuzní části práce je nejprve popsána příprava výchozích látek pro syntetickou cestu vedoucí k heterocyklickým derivátům allobetulonu (**I**). Dále je věnována pozornost problematice samotné přípravy nových heterocyklických derivátů. V průběhu práce byly postupně optimalizovány reakční podmínky pro průběh Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce. Byl snížen počet eq. boronové kyseliny z původních 2 eq. až na 1,1 eq., což vedlo k jednoduššímu zpracování reakčních směsí, ke snadnější purifikaci, a tím pádem ke zvýšení výtěžků. Dále byla také snížena reakční teplota z původních 90 °C na 85 °C za zachování 100% konverze a rychlosti reakce.

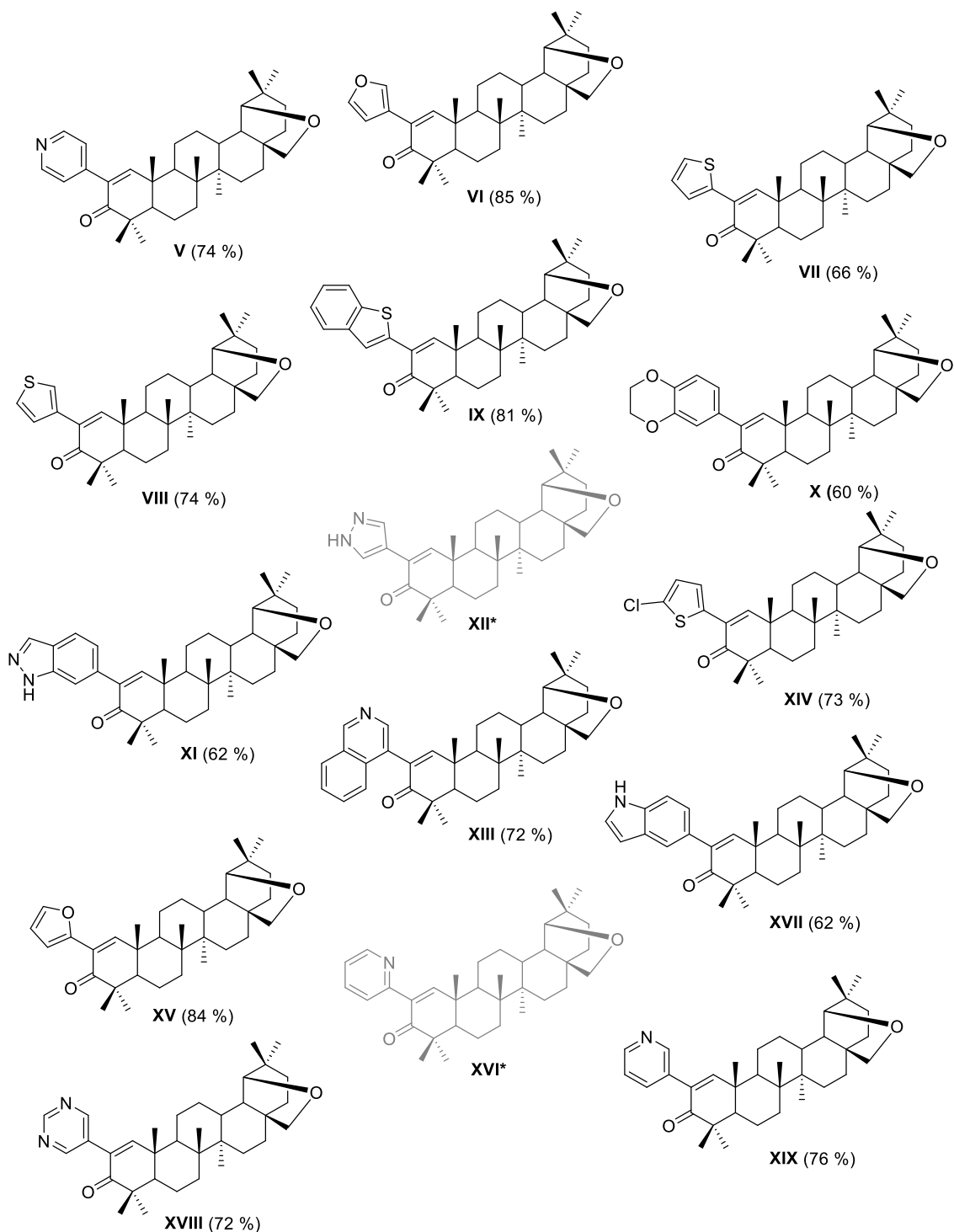
Pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu bylo připraveno a plně charakterizováno (NMR, HRMS, IR, teplota tání) 13 nových heterocyklických derivátů allobetulonu **V-XI**, **XIII-XV** a **XVII-XIX** modifikovaných v poloze C-2, které budou v blízké době testovány na cytotoxickou aktivitu, nicméně se kvůli své nestabilitě nejeví jako nadějní kandidáti. Testování bylo pozdrženo z důvodu přednostního využívání infrastruktury ÚMTM pro testování na COVID-19.

Většina připravených derivátů je na vzduchu nestabilní, a proto je nutné uchovávat je pod atmosférou dusíku při -18 °C. Připravené deriváty podléhají pozvolnému rozkladu také v kyselých rozpouštědlech jako jsou DCM a CHCl₃.

Před syntézou druhé série heterocyklických derivátů triterpenů bylo potřeba se vypořádat s problematickým krokem přípravy výchozího diosfenolu benzylbetulonátu **XXIII**. Díky tomu byla vyvinuta nová metoda TLC monitoringu, která však nebyla aplikována na reakci ve větším měřítku z časových důvodů.

Dále byla testována cesta přípravy výchozích látek pro syntézu derivátů kyseliny betulonové **XXV** bez použití chránicí skupiny a byl proveden pokus o optimalizaci

reakčních podmínkách vedoucích ke vzniku triflátu **XXVII**, avšak produkt se podařilo připravit pouze ve výtěžku 20 %, a proto bylo od této metody upuštěno.



Obrázek 20: Přehled derivátů allobetulonů. *Nepřipraveno.

Celkem bylo v této práci připraveno 13 nových heterocyklických derivátů allobetulonů (**Obr. 20**), které budou v blízké době testovány na cytotoxickou aktivitu. Většina z připravených derivátů je nestabilní na vzduchu. Deriváty jsou uchovávány pod

atmosférou dusíku při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při kontaktu s kyselými rozpouštědly (např. CHCl_3 nebo DCM) dochází k jejich rozkladu.

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Obecné poznámky k experimentální části

- ¹H a ¹³C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL (500 MHz) za laboratorní teploty. Jako rozpouštědlo pro všechny vzorky byl použit CDCl₃. Chemické posuny spekter byly referencovány vůči signálu reziduálního CHCl₃ v CDCl₃ v ¹H NMR při δ 7.26 ppm, v ¹³C NMR při δ 77.00 ppm. Hodnoty chemických posunů (v ppm) a interakčních konstant (v Hz) byly určeny analýzou prvního řádu. Hodnoty pro chemický posun byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa a hodnoty interakčních konstant na jedno desetinné místo. Všechna spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova.
- Infračervená spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet iT10 se střední oblastí v rozmezí 400-4000 cm⁻¹. Spektra byla dále zpracována v programu OMNIC 8.3.
- Hmotnostní spektra byla měřena za využití LC-MS Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) s elektrosprejem jako ionizačním zdrojem (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Chromatografická separace probíhala na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3 μm). Vzorky byly rozpuštěny v MF MeOH/H₂O/HCOOH 95:5:0,1.
- Teploty tání byly měřeny na bodotávku STUART SMP30.
- Průběh a čistota reakcí byly kontrolovány pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F₂₅₄. Detekce byla provedena nejprve pomocí UV záření (při 254 nm), a následně namočením do 10% H₂SO₄ a zahřátím na 150-200 °C.
- Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií:
 - Hex/EtOAc 8:1+ 0,1 % CHCl₃ (obj.)
 - Hex/EtOAc 6:1 (obj.)
 - Hex/EtOAc 5:1 (obj.)
 - Hex/EtOAc 10:1 (obj.)
 - Tol/Et₂O 5:1 (obj.)

7. V případě, že byla sloučenina čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu, použitá mobilní fáze je uvedena u experimentu. Pro sloupcovou chromatografií na silikagelu byl využíván Kieselgel 60.
8. Rozpouštědla byla odpařována na RVO Büchi Rotovapor R-200.
9. Připravené sloučeniny budou testovány na cytotoxickou aktivitu na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha, PhD. pomocí MTS testu.
10. Některé reakce byly provedeny opakovaně. V experimentální části jsou popsány optimalizované reakční postupy, při kterých bylo dosaženo nejvyšších výtěžků.

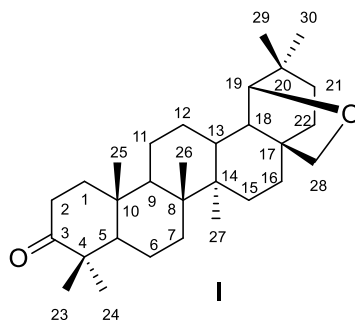
Benzylbromid, boronové kyseliny, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, DMAP, Tf_2NPh , *tert*-butoxid draselný a dichroman sodný dihydrát byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, s.r.o.

DCM, DMF, TEA, acetonitril, acetonhydrid, 2-propanol, ethylacetát, hexan, uhličitán draselný, 1,4-dioxan, *tert*-butanol, kyselina chlorovodíková, kyselina octová a síran hořečnatý byly zakoupeny u firmy Lach-Ner, s.r.o.

6.2 Obecné postupy zpracování reakčních směsí:

- A** Reakční směs byla nalita do čtyřnásobného objemu vody okyselené kyselinou chlorovodíkovou (1:10) a extrahována 3x do EtOAc. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny MgSO_4 , zfiltrvány a rozpouštědla byla odpařena na RVO.
- B** Reakční směs byla vytřepána s roztokem NH_4Cl do neutrálního pH a extrahována 3x do EtOAc. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny MgSO_4 , zfiltrvány a rozpouštědla byla odpařena na RVO.

6.3 Charakteristické signály skeletu allobetulonů v ^1H NMR spektrech



Obrázek 21: Číslování molekuly allobetulonů (**I**)

Pro molekulu allobetulonů (**I**) jsou charakteristické:

- dublet okolo 3.80 ppm s integrálem 1 náležící H-28a
- singlet okolo 3.55 ppm s integrálem 1 náležící H-19
- dublet okolo 3.46 ppm s integrálem 1 náležící H-28b
- a sedm singletů v rozmezí 1.25 - 0.80 ppm, každý s integrálem tři, které náležejí sedmi skeletálním CH_3 skupinám
- další signály charakteristické pro skeletální vodíky allobetulonů se nacházejí v oblasti 1.90 – 0,80 ppm, tyto signály nejsou obvykle v odborné literatuře procesovány

6.4 Příprava výchozích látek pro syntézu derivátů allobetulonů

6.4.1 Příprava 2-hydroxyallobetulon-1-enu (**II**)

Do suspenze allobetulonů (**I**) (3,0 g; 6,8 mmol) v *tert*-butanolu (150 ml) byl přidán *tert*-butoxid draselný (3,0 g; 26,7 mmol). Reakční směs byla za stálého míchání profoukávána vzduchem při 40 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (eluční soustava A).

Po 4 hodinách byla reakce ukončena. Reakční směs byla zpracována podle obecného postupu zpracování reakcí A.

Reakcí byl získán 2-hydroxyallobetulon-1-en (**II**), který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 8:1 + 1 % CHCl_3 . Bylo získáno 3,08 g (93 %) diosfenolu **II**. Výsledný produkt byl srovnán s interním standardem pomocí TLC, jejich R_f se shodovaly. ^1H NMR spektrum tohoto derivátu se shodovalo s literaturou.⁴⁹

6.4.2 Příprava 2-(trifluoromethylsulfonyl)-allobetulon-1-enu (III)

Reakce byla provedena ve vyžíhané a pod proudem dusíku ochlazené Schlenkově baňce opatřené míchadlem a septem v inertním prostředí dusíku. Do roztoku diosfenolu **II** (800 mg; 1,76 mmol) v suchém DCM (8 ml) byl postupně přidán: TEA (387 μ l; 5,28 mmol), Tf₂NPh (943 mg; 2,64 mmol) a DMAP (22 mg; 0,176 mmol). Reakční směs byla míchána za pokojové teploty. Postupně došlo k barevné změně reakční směsi ze světle žluté na tmavě červenou. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (eluční soustava B).

Po 1,5 hodině byla reakce ukončena. Reakční směs byla zpracována podle obecného postupu zpracování reakcí B.

Reakcí byl získán enoltriflát allobetulonů **III**, který byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 6:1 + 0,1 % CH₃COOH. Bylo získáno 931 mg (90 %) enoltriflátu **III**. ¹H NMR spektrum tohoto derivátu se shodovalo s literaturou.⁵⁰

6.5 Obecný postup pro přípravu aromatických a heterocyklických derivátů allobetulonů pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu

Všechny couplingové reakce byly prováděny ve vyžíhaných a pod proudem dusíku ochlazených slzových baňkách opatřných míchadlem a septem v inertním prostředí dusíku. Všechny komponenty byly postupně přidávány do slzové baňky pomocí injekční stříkačky: enol triflát **III** (100 mg; 0,17 mmol) rozpuštěný v 1,4 dioxanu (0,6 ml), 2 eq. (případně 1.2 eq. nebo 1.1 eq, viz konkrétní reakce) příslušné boronové kyseliny rozpuštěné nebo suspendované v 2-propanolu (0,6 ml) a 2 eq. uhličitanu draselného (36 mg; 0,34 mmol) rozpuštěného ve vodě (0,3 ml). Na závěr byl do reakční směsi přisypán katalyzátor PdCl₂(PPh₃)₂ (2 mol%; 2,5 mg) a septum bylo nahrazeno zpětným chladičem se septem. Reakční směs reagovala přes noc za stálého míchání při teplotě 85-90 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC.

Reakční směs byla zpracována podle obecného postupu zpracování B. Jednotlivé deriváty byly čištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze je vždy uvedena u experimentu).

Některé deriváty jsou na vzduchu nestabilní, a proto je nutné uchovávat je pod atmosférou dusíku při -18 °C. Připravené deriváty podléhají pozvolnému rozkladu také v kyselých rozpouštědlech jako jsou DCM a CHCl₃.

6.5.1 Příprava 2-*p*-tolylallobetulon-1-enu (IV)

Podle obecného postupu byl reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s 4-methylfenylboronovou kyselinou (46 mg; 0,34 mmol) připraven tolyl derivát **IV**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 7:1 + 0,1 % CH₃COOH. Bylo získáno 90 mg (79 %) tolyl derivátu **IV**. Produkt byl srovnán s interním standardem derivátu **IV** pomocí TLC, sloučeniny vykazovaly stejnou hodnotu R_f. ¹H NMR spektrum tohoto derivátu se shodovalo s literaturou.⁵⁰

6.5.2 Příprava 2-(pyridin-4-yl)-allobetulon-1-enu (V)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s pyridin-4-boronovou kyselinou (41,9 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **V**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 2:1 + 0,1 % CH₃COOH. Bylo získáno 65 mg (74 %) derivátu **V**. ¹H NMR spektrum (500 MHz, CDCl₃): δ 8.56 (dd, *J* = 4.5, 1.6 Hz, 2H, pyridin-4-yl), 7.30 (s, 1H, H-1), 7.24 (dd, *J* = 4.5, 1.6 Hz, 2H, pyridin-4-yl), 3.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-28a), 3.55 (s, 1H, H-19), 3.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-28b), 1.21 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.80 (s, 3H, 7 x CH₃). ¹³C NMR spektrum (126 MHz, CDCl₃): δ 203.7, 158.0, 149.7, 144.8, 134.2, 122.8, 87.8, 71.2, 52.9, 46.7, 45.4, 45.2, 41.5, 41.5, 41.0, 39.4, 36.7, 36.3, 34.4, 33.1, 32.7, 28.8, 28.6, 26.4, 26.3, 26.2, 24.5, 21.7, 21.3, 19.5, 19.4, 16.2, 13.3. IR (DRIFT): 1683.93 (C=O), 1313.19 (arom. C-N), 1036.41 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro C₃₅H₅₀O₂N [M+H]⁺ 516,3839, nalezeno 516,3836.

6.5.3 Příprava 2-(furan-3-yl)-allobetulon-1-enu (VI)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s furan-3-boronovou kyselinou (38,1 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **VI**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 10:1. Bylo získáno 86 mg (85 %) derivátu **VI**. ¹H NMR spektrum (500 MHz, CDCl₃): δ 7.96 (s, 1H), 7.40 – 7.35 (m, 1H, furan-3-yl), 7.20 (s, 1H, H-1), 6.52 (dd, *J* = 1.9, 0.7 Hz, 1H, furan-3-yl), 3.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-28a), 3.57 (s, 1H, H-19), 3.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-28b), 1.18 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.82 (s, 3H, 7 x CH₃). ¹³C NMR spektrum (126 MHz, CDCl₃): δ 204.0, 153.4, 142.4, 141.6, 127.4, 120.6, 108.0, 87.9, 71.3, 52.7, 46.7, 45.3, 45.2, 41.5, 41.0, 39.0, 36.7, 36.3, 34.4, 33.2, 32.7, 28.8, 28.8, 26.4, 26.4, 26.2, 24.5, 21.6, 21.5, 19.8, 19.3, 16.2, 13.3. IR (DRIFT): 1678.02 (C=O),

1225.14 (C-O-C furan), 1035.05 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro $C_{34}H_{49}O_3$ $[M+H]^+$ 505,3678, nalezeno 505,3676.

6.5.4 Příprava 2-(thiofen-2-yl)-allobetulon-1-enu (VII)

Podle obecného postupu byl reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s thiofen-2-boronovou kyselinou (43,6 mg; 0,34 mmol) připraven derivát **VII**, který byl dvakrát čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 7:1 a hexan/EtOAc 8:1. Bylo získáno 59 mg (66 %) derivátu **VII**. Derivát **VII** byl získán v podobě bílých krystalů, pro které byla změřena teplota tání 242,2 °C (hexan/EtOAc). 1H NMR spektrum (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.35 (s, 1H, H-1), 7.28 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 7.26 – 7.23 (m, 1H), 7.00 (dd, $J = 5.1, 3.7$ Hz, 1H, thiofen-2-yl), 3.79 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-28a), 3.57 (s, 1H, H-19), 3.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-28b), 1.21 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.82 (s, 3H, 7x CH_3). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz, $CDCl_3$): δ 153.7, 129.5, 126.7, 125.7, 124.8, 87.9, 71.3, 52.6, 46.7, 45.3, 45.3, 41.5, 41.5, 41.0, 39.3, 36.7, 36.3, 34.5, 33.1, 32.7, 28.8, 26.4, 26.2, 24.6, 21.7, 21.5, 19.7, 19.3, 16.2, 13.4. IR (DRIFT): 1684.62 (C=O), 1035.07 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro $C_{34}H_{49}O_2S$ $[M+H]^+$ 521,3451, nalezeno 521,3448.

6.5.5 Příprava 2-(thiofen-3-yl)-allobetulon-1-enu (VIII)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s thiofen-3-boronovou kyselinou (43,6 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **VIII**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 8:1. Bylo získáno 66 mg (74 %) derivátu **VIII**. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (dd, $J = 3.0, 1.3$ Hz, 1H, thiofen-3-yl), 7.28 – 7.26 (m, 2H, thiofen-3-yl, H-1), 7.20 (dd, $J = 5.1, 1.3$ Hz, 1H, thiofen-3-yl), 3.79 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-28a), 3.56 (s, 1H, H-9), 3.47 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-28b), 1.20 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.95 (s, 6H), 0.82 (s, 3H, 7 x CH_3). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz, $CDCl_3$): δ 203.4, 153.7, 138.3, 129.5, 126.7, 125.7, 124.8, 87.9, 71.3, 52.6, 46.7, 45.3, 45.3, 41.5, 41.5, 41.0, 39.3, 36.7, 36.3, 34.5, 33.1, 32.7, 28.8, 26.4, 26.4, 26.2, 24.6, 21.7, 21.5, 19.7, 19.3, 16.2, 13.4. IR (DRIFT): 1670.84 (C=O), 1034.33 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro $C_{34}H_{49}O_2S$ $[M+H]^+$ 521,3450, nalezeno 521,3448.

6.5.6 Příprava 2-(benzo[b]thien-2-yl)-allobetulon-1-enu (IX)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s benzo[b]thien-2-ylboronovou kyselinou (60,7 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **IX** čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 9:1. Bylo získáno 79 mg (81 %) derivátu **IX**. ^1H NMR spektrum (500 MHz, CDCl_3): δ 7.79 – 7.75 (m, 1H), 7.73 – 7.69 (m, 2H), 7.60 (s, 1H, benzo[b]thien-2-yl), 7.42 (s, 1H, H-1), 7.33 – 7.26 (m, 1H, benzo[b]thien-2-yl), 3.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-28a), 3.58 (s, 1H, H-19), 3.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-28b), 1.24 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.83 (s, 3H, 7 x CH_3). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz, CDCl_3): δ 203.3, 155.6, 140.1, 139.3, 138.8, 129.8, 124.4, 124.2, 123.6, 122.5, 121.9, 87.9, 71.3, 52.5, 46.7, 45.6, 45.2, 41.5, 41.5, 41.1, 39.5, 36.7, 36.3, 34.5, 33.1, 32.7, 28.9, 28.8, 26.4, 26.4, 26.2, 24.6, 21.8, 21.4, 19.6, 19.1, 16.1, 13.34. IR (DRIFT): 1672.91 (C=O), 1034.27 (C-O-C), 657.31 (C-S). HRMS: vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 571,3604, nalezeno 571,3604.

6.5.7 Příprava 2-(1,4-benzodioxan-6-yl)-allobetulon-1-enu (X)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s 1,4-benzodioxan-6-boronovou kyselinou (61,4 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **X**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 5:1 + 0,1 % CH_3COOH . Bylo získáno 59 mg (60 %) derivátu **X**. ^1H NMR spektrum (500 MHz, CDCl_3): δ 7.10 (s, 1H, H-1), 6.86 – 6.77 (m, 3H), 4.28 – 4.23 (m, 4H, 1,4-benzodioxan-6-yl), 3.79 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-28a), 3.56 (s, 1H, H-19), 3.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-28b), 1.19 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.81 (s, 3H, 7 x CH_3). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz, CDCl_3): δ 204.6, 155.0, 143.2, 143.1, 135.6, 130.7, 129.6, 121.4, 117.1, 117.0, 87.9, 71.3, 64.5, 64.4, 52.9, 46.7, 45.4, 45.3, 41.5, 41.4, 41.0, 39.0, 36.7, 36.3, 34.5, 33.2, 32.7, 28, 28.7, 26.4, 26.2, 24.5, 21.7, 21.3, 19.6, 19.4, 16.1, 13.3. IR (DRIFT): 1670.25 (C=O), 1034.70 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 573,3935, nalezeno 573,3938.

6.5.8 Příprava 2-(indazol-6-yl)-allobetolon-1-enu (XI)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s indazol-6-boronovou kyselinou (55 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **XI**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 5:1. Derivát **XI** byl získán ve výtěžku 59 %.

¹H NMR spektrum (500 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, indazol-6-yl), 7.50 (s, 1H, H-1), 7.28 – 7.26 (m, 2H), 7.10 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H, indazol-6-yl), 3.80 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-28a), 3.56 (s, 1H, H-19), 3.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-28b), 1.23 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.80 (s, 3H, 7 x CH₃). ¹³C NMR spektrum (126 MHz, CDCl₃): δ 204.8, 156.8, 140.2, 136.4, 136.0, 134.8, 122.6, 121.8, 120.4, 109.3, 87.9, 71.3, 52.9, 46.7, 45.5, 45.4, 41.5, 41.0, 39.3, 36.7, 36.3, 34.5, 33.2, 32.7, 29.7, 28.8, 28.73, 26.4, 26.2, 24.5, 21.7, 21.4, 19.6, 19.5, 16.2, 13.3. IR (DRIFT): 3221.51 (N-H), 1670.04 (C=O), 1034.91 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro C₃₇H₅₁O₂N₂ [M+H]⁺ 555,3947, nalezeno 555,3945.

6.5.9 Příprava 2-(isochinolin-4-yl)-allobetulon-1-enu (XIII)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s isochinolin-4-boronovou kyselinou (58,9 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **XIII**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 1:1. Bylo získáno 59 mg (68 %) derivátu **XIII**. ¹H NMR spektrum (500 MHz, CDCl₃): δ 9.20 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.68 – 7.63 (m, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, isochinolin-4-yl), 7.29 (s, 1H, H-1), 3.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-28a), 3.53 (s, 1H, H-19), 3.47 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-28b), 1.32 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.78 (s, 3H, 7 x CH₃). ¹³C NMR spektrum (126 MHz, CDCl₃): δ 203.7, 160.4, 152.5, 143.1, 134.9, 133.1, 130.3, 129.5, 128.2, 127.9, 127.0, 124.5, 87.8, 71.2, 53.6, 53.4, 46.7, 45.3, 45.3, 41.6, 41.5, 41.0, 39.8, 36.7, 36.2, 34.4, 33.3, 32.7, 29.00, 28.7, 26.4, 26.2, 24.5, 21.7, 21.5, 20.1, 19.3, 16.3, 13.4. IR (DRIFT): 1668.44 (C=O), 1034.13 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro C₃₉H₅₂O₂N [M+H]⁺ 566,3994, nalezeno 566,3993.

6.5.10 Příprava 2-(5-chlorthiofen-2-yl)-allobetulon-1-enu (XIV)

Podle obecného postupu byl reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s 5-chlorthiofen-2-boronovou kyselinou (55,3 mg; 0,34 mmol) připraven derivát **XIV**, který byl dvakrát čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl v obou případech hexan/EtOAc 5:1. Bylo získáno 69 mg (73 %) derivátu **XIV**. ¹H NMR spektrum (500 MHz, CDCl₃): δ 7.30 (s, 1H, H-1), 7.03 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, 5-chlorthiofen-2-yl), 3.79 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-28a), 3.56 (s, 1H, H-19), 3.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-8b), 1.19 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.82 (s, 3H, 7 x CH₃). ¹³C NMR spektrum (126 Hz, CDCl₃): δ 203.2,

153.4, 136.3, 130.7, 128.9, 125.3, 123.2, 87.8, 71.2, 52.5, 46.7, 45.2, 45.1, 41.6, 41.5, 41.1, 39.4, 36.7, 36.3, 34.4, 33.1, 32.7, 28.8, 28.7, 26.4, 26.2, 24.5, 21.6, 21.4, 19.7, 19.2, 16.2, 13.4. IR (DRIFT): 1667.27 (C=O), 1034.09 (C-O-C), 811.98 (C-Cl). HRMS: vypočteno pro C₃₄H₄₈ClO₂S [M+H]⁺ 555,3058, nalezeno 555,3059.

6.5.11 Příprava 2-(furan-2-yl)-allobetulon-1-enu (XV)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s furan-2-boronovou kyselinou (38,2 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **XV**, který byl čištěn dvakrát sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 12:1 a hexan/EtOAc 6:1. Bylo získáno 72 mg (84 %) derivátu **XV**. Derivát **XV** byl získán v podobě bílých krystalů, pro které byla naměřena teplota tání 201,3 °C (hexan/EtOAc). ¹H NMR spektrum (500 MHz, CDCl₃): δ 7.52 (s, 1H, H-1), 7.34 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.41 (dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, 1H, furan-2-yl), 3.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-28a), 3.56 (s, 1H, H-19), 3.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-28b), 1.18 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.81 (s, 3H, 7 x CH₃). ¹³C NMR spektrum (126 MHz, CDCl₃): δ 152.2, 149.4, 141.2, 125.9, 111.6, 109.4, 87.9, 71.3, 52.6, 46.7, 45.3, 45.3, 41.5, 41.0, 38.9, 36.7, 36.3, 34.5, 33.2, 32.7, 29.7, 28.8, 28.7, 26.4, 26.2, 24.5, 21.7, 21.5, 19.7, 19.3, 16.2, 13.3. IR (DRIFT): 1677.90 (C=O), 1218.14 (C-O-C furan), 1035.68 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro C₃₄H₄₉O₃ [M+H]⁺ 505,3678, nalezeno 505,3676.

6.5.12 Příprava 2-(indol-5-yl)-allobetulon-1-enu (XVII)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s indol-5-boronovou kyselinou (55,3 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **XVII**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 5:1. Bylo získáno 68 mg (62 %) derivátu **XVII**. Derivát **XVII** byl získán v podobě bílých krystalů, pro které byla naměřena teplota tání 147,6 °C (hexan/EtOAc). ¹H NMR spektrum (500 MHz, CDCl₃): δ 8.17 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, indol-5-yl), 7.20 – 7.17 (m, 2H, H-1, indol-5-yl), 7.13 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 6.56 – 6.50 (m, 1H), 3.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-28a), 3.56 (s, 1H, H-19), 3.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-28b), 1.22 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.95 (s, 6H), 0.81 (s, 3H, 7 x CH₃). ¹³C NMR spektrum (126 MHz, CDCl₃): δ 205.2, 154.9, 137.2, 129.2, 127.9, 124.5, 122.7, 120.4, 110.5, 102.9, 87.9, 71.3, 53.0, 46.7, 45.5, 45.4, 41.5, 41.4, 40.9, 39.1, 36.7, 36.3, 34.5, 33.2, 32.7, 29.7, 28.8, 28.8, 26.4, 26.3, 24.6, 21.7, 21.4, 19.7, 19.5, 16.1, 13.3. IR

(DRIFT): 3353.07 (N-H), 1652.35 (C=O), 1033.38 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro $C_{38}H_{52}O_2N$ $[M+H]^+$ 554,3994, nalezeno 554,3993.

6.5.13 Příprava 2-(pyrimidin-5-yl)-allobetulon-1-enu (XVIII)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s pyrimidin-5-boronovou kyselinou (42 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **XVIII**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 5:1. Bylo získáno 63 mg (72 %) derivátu **XVIII**. 1H NMR spektrum (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.11 (s, 1H), 8.69 (s, 2H, pyrimidin-5-yl), 7.29 (s, 1H, H-1), 3.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-28a), 3.54 (s, 1H, H-19), 3.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-28b), 1.20 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.80 (s, 3H, 7 x CH_3). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz, $CDCl_3$): δ 158.8, 157.5, 155.9, 130.9, 130.5, 87.8, 71.2, 53.1, 46.7, 45.2, 41.6, 41.5, 41.0, 39.7, 36.7, 36.2, 34.4, 33.1, 32.6, 28.7, 28.5, 26.3, 26.3, 26.2, 24.5, 21.6, 21.4, 19.6, 19.2, 16.2, 13.3. IR (DRIFT): 1670.37 (C=O), 1335.54 (arom. C-N), 1293.20 (arom. C-N), 1034.28 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro $C_{34}H_{49}O_2N_2$ $[M+H]^+$ 517,3790, nalezeno 517,3789.

6.5.14 Příprava 2-(pyridin-3-yl)-allobetulon-1-enu (XIX)

Reakcí enol triflátu **III** (100 mg; 0,17 mmol) s pyridin-3-boronovou kyselinou (41,9 mg; 0,34 mmol) byl připraven derivát **XIX**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 2:3. Bylo získáno 67 mg (76 %) derivátu **XIX**. 1H NMR spektrum (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.51 (s, 2H), 7.69 – 7.64 (m, 1H, pyridin-3-yl), 7.25 – 7.22 (m, 2H, H-1, pyridin-3-yl), 3.78 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-28a), 3.55 (s, 1H, H-19), 3.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-28b), 1.20 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.80 (s, 3H, 7 x CH_3). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz, $CDCl_3$): δ 157.5, 148.9, 148.6, 135.9, 133.3, 132.9, 122.7, 87.8, 71.2, 53.0, 46.7, 45.3, 41.5, 41.5, 41.0, 39.4, 36.7, 36.3, 34.4, 33.1, 32.7, 28.8, 28.6, 26.4, 26.3, 26.2, 24.5, 21.7, 21.4, 19.7, 19.3, 16.2, 13.3. IR (DRIFT): 1671.00 (C=O), 1327.03 (arom. C-N), 1035.11 (C-O-C). HRMS: vypočteno pro $C_{35}H_{50}O_2N$ $[M+H]^+$ 516,3839, nalezeno 516,3836.

6.6 Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů benzylbetulonátu

6.6.1 Příprava benzylbetulinátu (XXI)

Do suspenze kyseliny betulinové (**XX**) (15 g; 0,033 mol) v DMF (180 ml) a acetonitrilu (30 ml) byl přidán benzylbromid (7,8 ml) a uhličitán draselný (9,12 g). Reakce probíhala za stálého míchání při 60 °C přes noc.

Vysrážené bílé krystaly benzylesteru **XXI** byly odsáty přes Büchenerovu nálevku a promyty vodou a hexanem. Bylo získáno 17,1 g benzylesteru **XXI** (97 %). Produkt byl srovnán s interním standardem pomocí TLC (eluční soustava C), sloučeniny měly stejnou hodnotu R_f.⁵⁵

6.6.2 Příprava benzylbetulonátu (XXII)

Do baňky s kulatým dnem opatřené míchadlem bylo naváženo 10 g (0,018 mol) benzylesteru kyseliny betulinové (**XXI**). Byl přidán dihydrát dichromanu sodného (7,7 g; 0,026 mol), octan sodný (2,3 g; 0,028 mol), 1,4-dioxan (160 ml), anhydrid kyseliny octové (25 ml) a kyselina octová (60 ml). Po 4 hodinách bylo přidáno 0,5 eq. (0,55 g; 0,0019 mol) dihydrátu dichromanu sodného. Reakce byla za stálého míchání při r.t. ponechána reagovat přes noc. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (eluční soustava D).

Po ukončení reakce byla reakční směs nalita do pětinasobného objemu vody, extrahována 3x do EtOAc a zneutralizována pomocí nasyceného roztoku KHCO₃. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny pomocí MgSO₄, zfiltrány a odpařeny na RVO. Surový produkt **XXII** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 10:1. Reakcí bylo získáno 6,89 g benzylbetulonátu (**XXII**), což odpovídá výtěžku 69 %. Produkt byl srovnán s interním standardem pomocí TLC, sloučeniny měly stejnou hodnotu R_f.⁵⁵

6.6.3 Příprava 2-hydroxy-benzylbetulonát-1-enu (XXIII)

Do suspenze benzylbetulonátu (**XXII**) (400 mg; 0,75 mol) v *tert*-butanolu (30 ml) byl přidán *tert*-butoxid draselný (334 mg; 2,99 mol). Reakční směs byla intenzivně míchána za přítupu vzduchu při 40 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC

(eluční soustava A). Po 2 hodinách byla reakce ukončena. Reakční směs byla zpracována podle obecného postupu zpracování reakcí A.

Reakcí byl získán 2-hydroxy-benzylbetulonát-1-en (**XXIII**), který byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 12:1. Bylo získáno 405 mg diosfenolu **XXIII** (82 %) ve směsi s **XXXII** v poměru 1:1. Signály diosfenolu **XXIII** v ^1H NMR spektru se shodovaly s literaturou.⁵⁷

6.6.4 Příprava 2-(trifluoromethylsulfonyl)-benzylbetulonát-1-enu (**XXIV**)

Reakce byla provedena ve vyžíhané a pod proudem dusíku ochlazené Schlenkově baňce opatřené míchadlem a septem v inertním prostředí dusíku. Do roztoku diosfenolu **XXIII** (1 g; 1,82 mmol) v suchém DCM (10 ml) byl postupně přidán: TEA (0,76 ml; 5,45 mmol), Tf_2NPh (0,974 g; 2,73 mmol) a DMAP (22 mg; 0,182 mmol). Po třech hodinách bylo přidáno 0,5 eq. Tf_2NPh . Reakce byla za stálého míchání při r.t. ponechána reagovat po dobu 4 hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (eluční soustava C).

Po 4 hodinách byla reakce ukončena. Reakční směs byla zpracována podle obecného postupu zpracování reakcí B. Reakcí byl získán enoltriflát **XXIV**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 5:1. Bylo získáno 150 mg (12 %) enoltriflátu **XXIV**. ^1H NMR spektrum enoltriflátu **XXIV** se shodovalo s literaturou.⁵⁰

6.7 Příprava výchozích sloučenin pro syntézu derivátů kyseliny betulonové

6.7.1. Příprava 2-hydroxy-betulon-1-enové kyseliny (**XXVI**)

Do suspenze kyseliny betulonové (**XXV**) (1,3 g; 2,8 mmol) v *tert*-butanolu (96 ml) byl přidán *tert*-butoxid draselný (1,27 g; 11,2 mmol). Reakční směs byla intenzivně míchána za přítomnosti vzduchu při 40 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (eluční soustava E). Po 4 hodinách byla reakce ukončena. Reakční směs byla zpracována podle obecného postupu zpracování reakcí A.

Reakcí byl získán diosfenol **XXVI**, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl toluen/ Et_2O 5:1 + 0,1 % AcOH. Bylo získáno 1,08 g diosfenolu **XXVI**, což odpovídá výtěžku 82 %. ^1H NMR spektrum diosfenolu **XXVI** se shodovalo s literaturou.⁵⁸

7.7.1. Příprava 2-(triflouromethylsulfonyl)-betulon-1-enové kyseliny (XXVII)

Reakce byla provedena za stejných podmínek, jako v případě příprav enoltriflátů **III** a **XXIV**. Do Schlenkovy baňky byl přidán diosfenol **XXVI** (100 mg; 0,31 mmol), bezvodý DCM (1 ml), Tf₂NPh (190 mg; 0,775 mmol), TEA (5 µl) a DMAP (2,6 mg; 0,031 mmol). Reakce byla monitorována pomocí TLC (eluční soustava D).

Reakce byla ukončena po 20 minutách a zpracována podle obecného postupu zpracování reakcí B. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl hexan/EtOAc 10:1. Bylo získáno 16 mg enoltriflátu **XXVII**, což odpovídá výtěžku 20 %. Produkt byl potvrzen pomocí LC-MS.

PŘEHLED LITERATURY

- (1) Buhaescu, I.; Izzedine, H. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 575–584.
- (2) Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23* (3), 394.
- (3) Nes, W. D.; Heftmann, E. *J. Nat. Prod.* **1981**, *44* (4), 377–400.
- (4) Sandjo, L. P.; Kuete, V. *Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa*; Elsevier Inc., 2013.
- (5) Patočka, J. *J. Appl. Biomed.* **2012**, *10* (3), 7–12.
- (6) Geetha, T.; Varalakshmi, P. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76* (1), 77–80.
- (7) De Almeida, P. D. O.; Boleti, A. P. D. A.; Rüdiger, A. L.; Lourenço, G. A.; Da Veiga Junior, V. F.; Lima, E. S. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*.
- (8) Shai, L. J.; McGaw, L. J.; Aderogba, M. A.; Mdee, L. K.; Eloff, J. N. J. *Ethnopharmacol.* **2008**, *119* (2), 238–244.
- (9) Katerere, D. R.; Gray, A. I.; Nash, R. J.; Waigh, R. D. *Phytochemistry* **2003**, *63* (1), 81–88.
- (10) Juan, E. M.; Planas, J. M.; Ruiz-Gutierrez, V.; Daniel, H.; Wenzel, U. *Br. J. Nutr.* **2008**, *100* (1), 36–43.
- (11) Schulze, H.; Pieroh, K. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1922**, *55* (8).
- (12) Lagemwa, F. N.; Huang, F. Y.; Bentley, M. D.; Mendel, M. J.; Alford, A. R. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38* (2), 493–496.
- (13) Heller, L.; Obernauer, A.; Csuk, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 3002–3012.
- (14) William, B.; Mclean, J.; Taylor, G. R. *J. Chem. Soc.* **1932**, No. 119601, 4303–4308.
- (15) Li, T.; Wang, J.; Zheng, X. *J. Chem. Soc.* **1998**, 3957–3965.
- (16) Tolstikov, G.; Flekhter, O.; Shultz, E.; Baltina, L.; Tolstikov, A. *Chem. Sustain.*

- Dev.* **2005**, *13* (1), 1–29.
- (17) Carr, P. E. Birch bark processing and the isolation of natural products from birch bark, 1999.
- (18) Su, B. N.; Cuendet, M.; Farnsworth, N. R.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *Planta Med.* **2002**, *68* (12), 1125–1128.
- (19) Chang, C. W.; Wu, T. S.; Hsieh, Y. S.; Kuo, S. C.; Lee Chao, P. D. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62* (2), 327–328.
- (20) De Oliveira, B. H.; Santos, C. A. M.; Espíndola, A. P. D. M. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13* (2), 95–98.
- (21) Bastos, D. Z. L.; Pimentel, I. C.; de Jesus, D. A.; de Oliveira, B. H. *Phytochemistry* **2007**, *68* (6), 834–839.
- (22) Saeed, M. E. M.; Mahmoud, N.; Sugimoto, Y.; Efferth, T.; Abdel-Aziz, H. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9* (MAY).
- (23) Tiwari, R.; Puthli, A.; Balakrishnan, S.; Sapra, B. K.; Mishra, K. P. *Cancer Invest.* **2014**, *32* (8), 402–408.
- (24) Raghuvar Gopal, D. V.; Narkar, A. A.; Badrinath, Y.; Mishra, K. P.; Joshi, D. S. *Toxicol. Lett.* **2005**.
- (25) Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. *Cancer Lett.* **2002**, *175* (1), 17–25.
- (26) Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Bailas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I. S.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57* (2), 243–247.
- (27) Fontanay, S.; Grare, M.; Mayer, J.; Finance, C.; Duval, R. E. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120* (2), 272–276.
- (28) Huguet, A. I.; Del Carmen Recio, M.; Máez, S.; Giner, R. M.; Ríos, J. L. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *410* (1), 69–81.
- (29) Yi, J.; Xia, W.; Wu, J.; Yuan, L.; Wu, J.; Tu, D.; Fang, J.; Tan, Z. *J. Vet. Sci.* **2014**, *15* (1), 141–148.

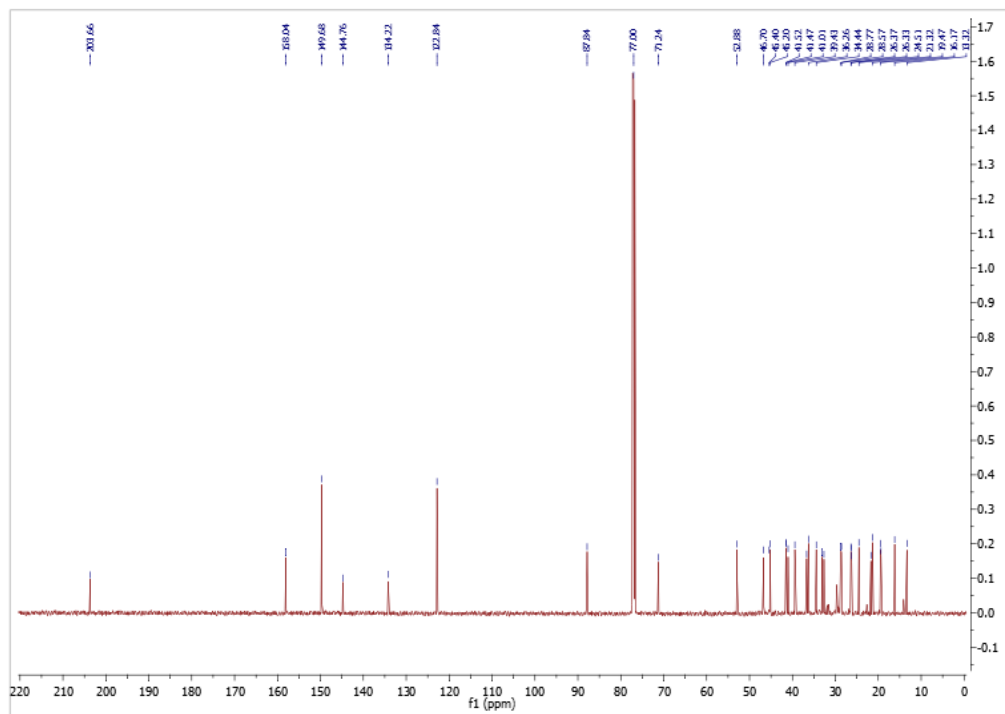
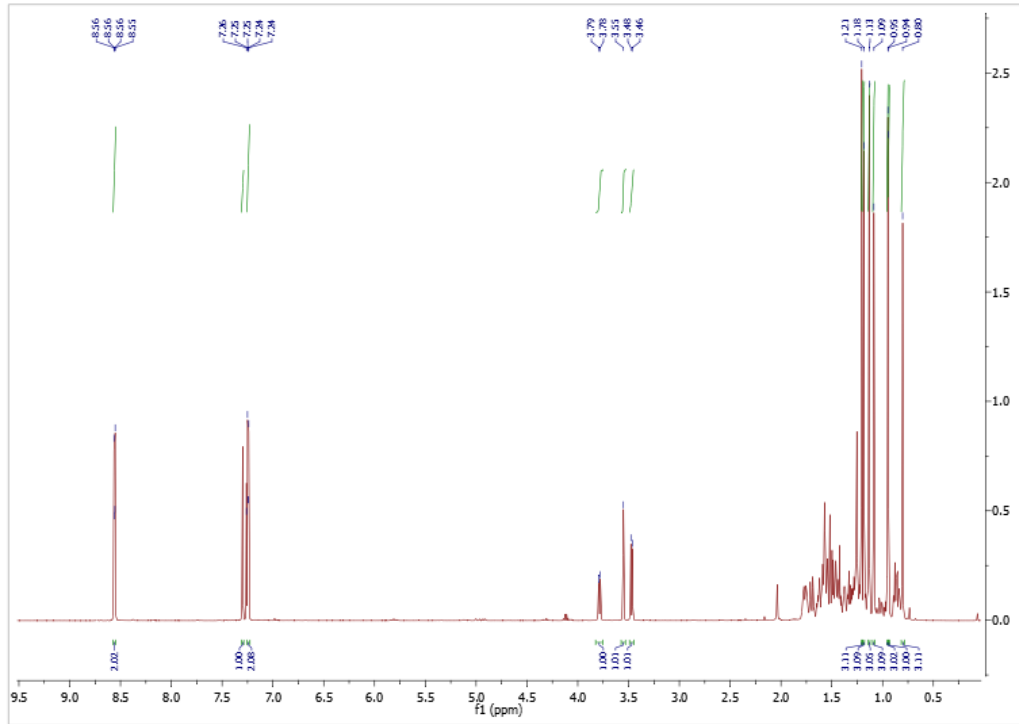
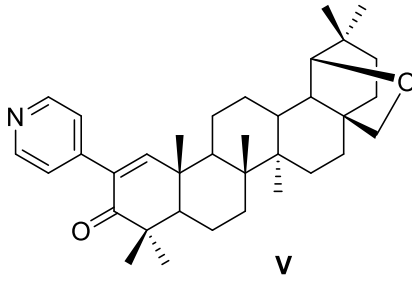
- (30) Jonnalagadda, S. C.; Suman, P.; Morgan, D. C.; Seay, J. N. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2017**, *53*, 45–84.
- (31) Grymel, M.; Zawojak, M.; Adamek, J. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82* (6), 1719–1730.
- (32) Yi, J.; Zhu, R.; Wu, J.; Wu, J.; Xia, W.; Zhu, L.; Jiang, W.; Xiang, S.; Tan, Z. *Pharmacol. Reports* **2016**.
- (33) Melnikova, N.; Burlova, I.; Kiseleva, T.; Klabukova, I.; Gulenova, M.; Kislitsin, A.; Vasin, V.; Tanaseichuk, B. *Molecules* **2012**, *17* (10), 11849–11863.
- (34) Mäki-Opas, I.; Hämäläinen, M.; Moilanen, L. J.; Haavikko, R.; Ahonen, T. J.; Alakurtti, S.; Moreira, V. M.; Muraki, K.; Yli-Kauhaluoma, J.; Moilanen, E. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (6), 2848–2857.
- (35) Domínguez-Carmona, D. B.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Ruiz-Pinell, G.; Gutierrez-Yapu, D.; Chan-Bacab, M. J.; Giménez-Turba, A.; Peña-Rodríguez, L. M. *Phytomedicine* **2010**, *17* (5), 379–382.
- (36) Sang, Z. C.; Min, C. Y.; Sang, U. C.; Kang, R. L. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29* (3), 203–208.
- (37) Chen, B.-N.; Yang, G.-E.; Li, J.-K.; Du, H.-J.; Li, Q.-S.; Zhang, Z.-M. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, *45* (2), 110–111.
- (38) Abyshev, A. Z.; Agaev, É. M.; Guseinov, A. B. *Pharm. Chem. J.* **2007**, *41* (8), 419–423.
- (39) Sorokina, I. V.; Tolstikova, T. G.; Zhukova, N. A.; Petrenko, N. I.; Schults, E. E.; Uzenkova, N. V.; Grek, O. R.; Pozdnyakova, S. V.; Tolstikov, G. A. *Dokl. Biol. Sci.* **2004**, *399* (1–6), 434–437.
- (40) Boryczka, S.; Jastrzebska, M.; Bebenek, E.; Kusz, J.; Zubko, M.; Kadela, M.; Michalik, E. *J. Pharm. Sci.* **2012**.
- (41) Yang, S. J.; Liu, M. C.; Zhao, Q.; Hu, D. Y.; Xue, W.; Yang, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 58–65.
- (42) Babak, N. L.; Gella, I. M.; Semenenko, A. N.; Shishkina, S. V.; Shishkin, O. V.; Musatov, V. I.; Lipson, V. V. *Russ. J. Org. Chem.* **2014**, *50* (7), 1048–1055.
- (43) Liu, Z.; Swidorski, J. J.; Nowicka-sans, B.; Terry, B.; Protack, T.; Lin, Z.;

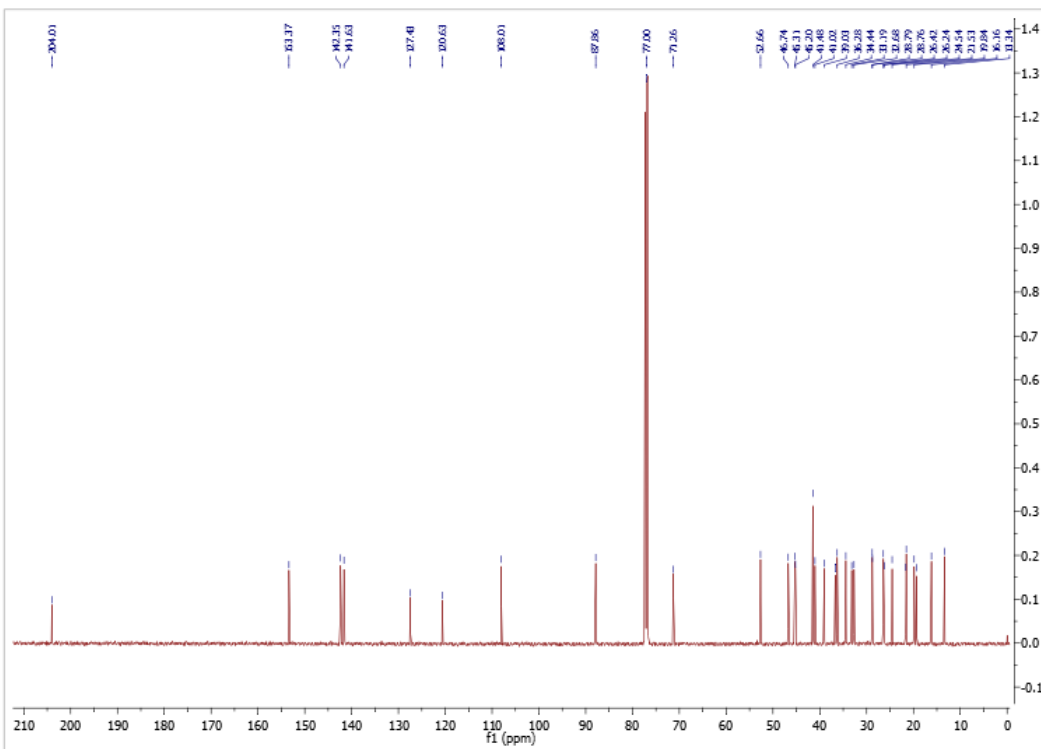
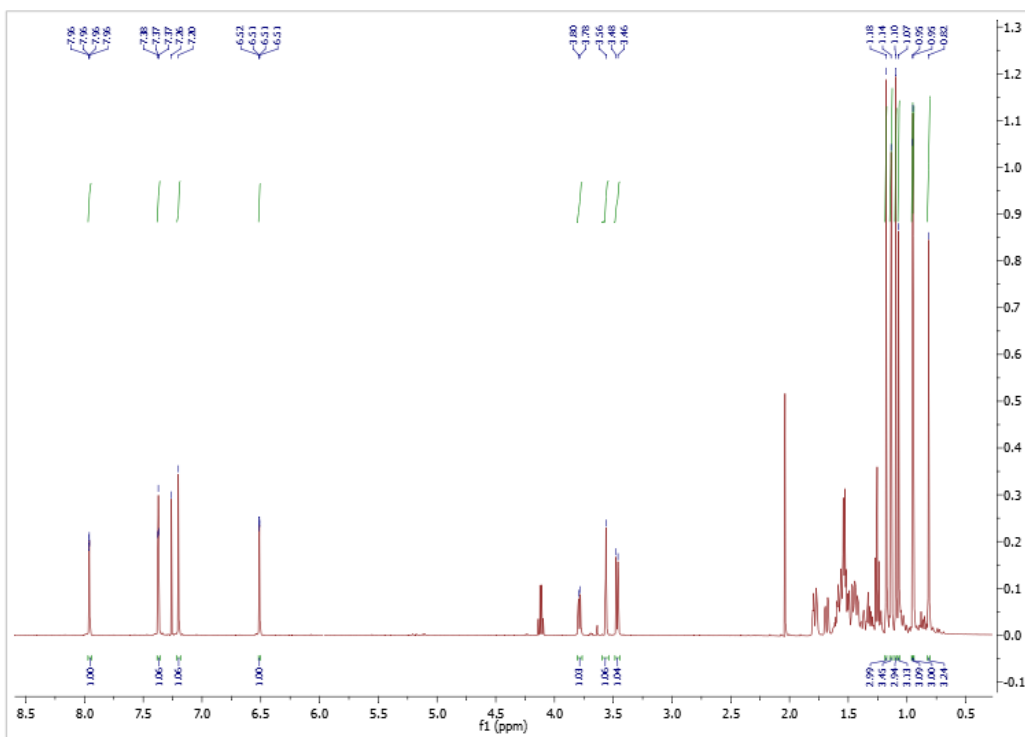
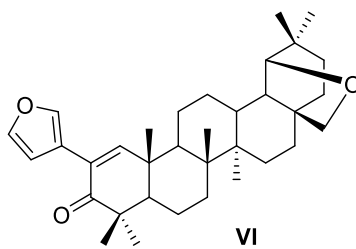
- Samanta, H.; Zhang, S.; Li, Z.; Parker, D. D.; Rahematpura, S.; Jenkins, S.; Beno, B. R.; Krystal, M.; Meanwell, N. A.; Dicker, I. B.; Regueiro-ren, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (8), 1757–1770.
- (44) Regueiro-ren, A.; Swidorski, J. J.; Liu, Z.; Chen, Y.; Sin, N.; Sit, S.; Chen, J.; Venables, B. L.; Zhu, J.; Nowicka-sans, B.; Protack, T.; Lin, Z.; Terry, B.; Samanta, H.; Zhang, S.; Li, Z.; Easter, J.; Beno, B. R.; Arora, V.; Huang, X. S.; Rahematpura, S.; Parker, D. D.; Haskell, R.; Santone, K. S.; Cockett, M. I.; Krystal, M.; Meanwell, N. A.; Jenkins, S.; Hanumegowda, U.; Dicker, I. B. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7289–7313.
- (45) Regueiro-Ren, A.; Liu, Z.; Chen, Y. et al. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (6), 568–572.
- (46) Genet, C.; Schmidt, C.; Strehle, A.; Schoonjans, K.; Auwerx, J.; Saladin, R.; Wagner, A. *ChemMedChem* **2010**, *5* (12), 1983–1988.
- (47) Gupta, N.; Rath, S. K.; Singh, J.; Qayum, A.; Singh, S.; Sangwan, P. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 517–530.
- (48) Tolmacheva, I. A.; Shelepen, L. N.; Shashkov, A. S.; Grishko, V. V.; Glushkov, V. A.; Tolstikov, A. G. *Chem. Nat. Compd.* **2007**, *43* (2), 127–131.
- (49) Urban, M.; Vlk, M.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Sarek, J. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, *20* (11), 3666–3674.
- (50) Borkova, L. Disertační práce, Univerzita Palackého, Olomouc, **2018**.
- (51) Edition, I.; Korovin, a V; Tkachev, a V. *Synthesis (Stuttg.)* **2001**, *50* (2), 304–310.
- (52) Vranova, B. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc, **2018**.
- (53) Kvasnica, M.; Urban, M.; Dickinson, N. J.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32* (9), 1303–1330.
- (54) Dehaen, W.; Mashentseva, A. A.; Seitembetov, T. S. *Molecules* **2011**, *16* (3), 2443–2466.
- (55) 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.*

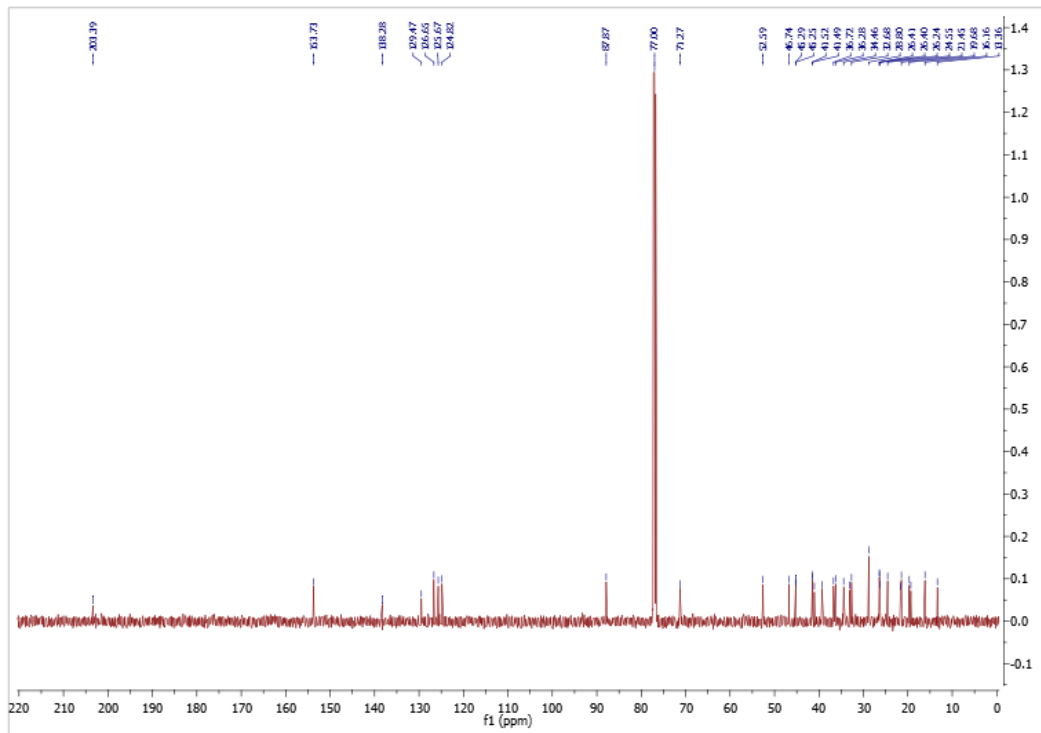
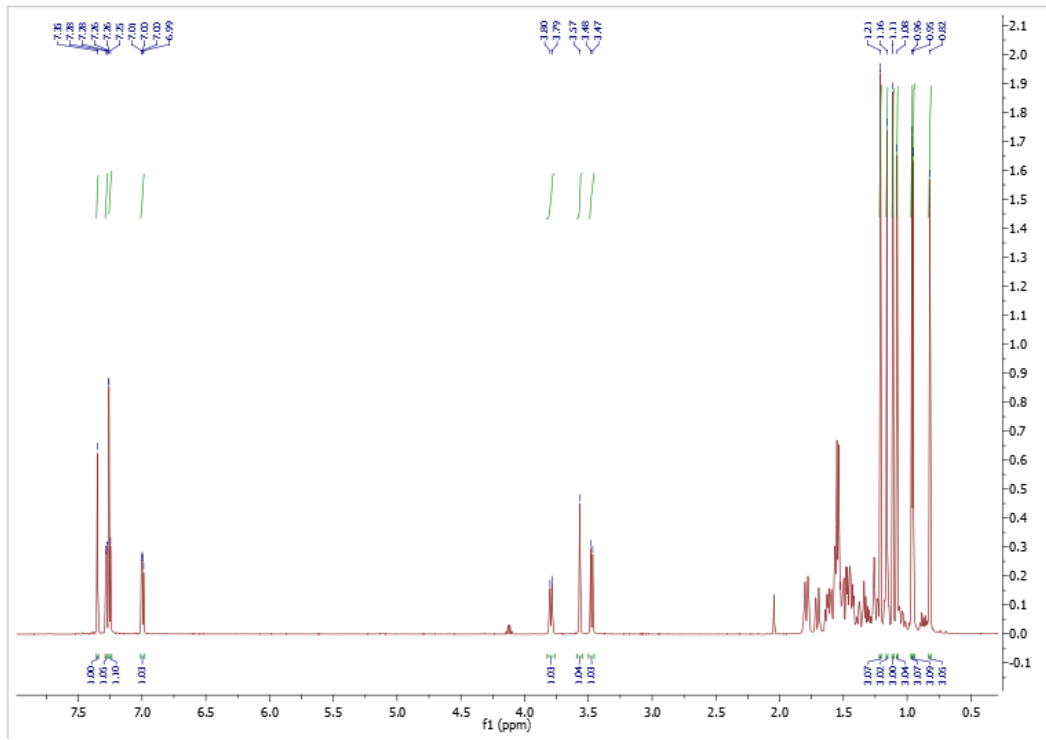
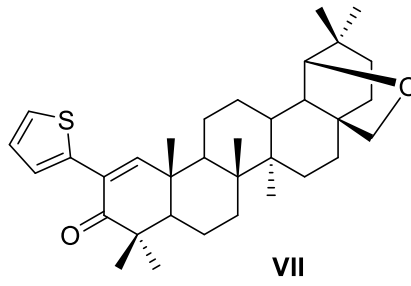
Med. Chem. **2015**, *96*, 482–490.

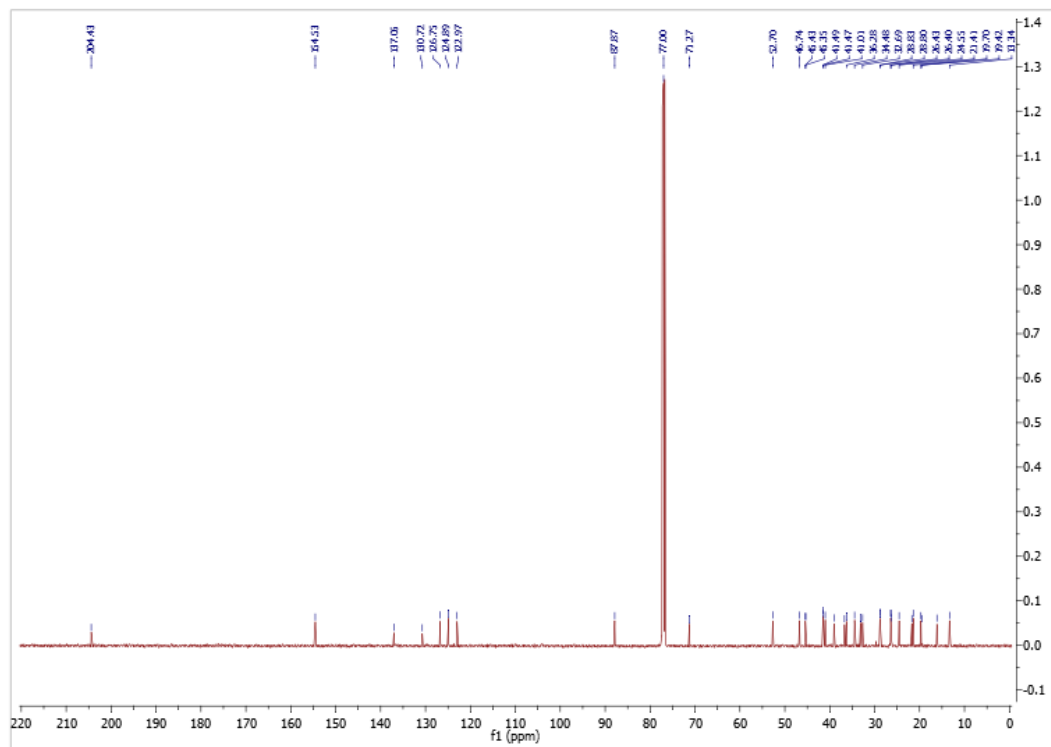
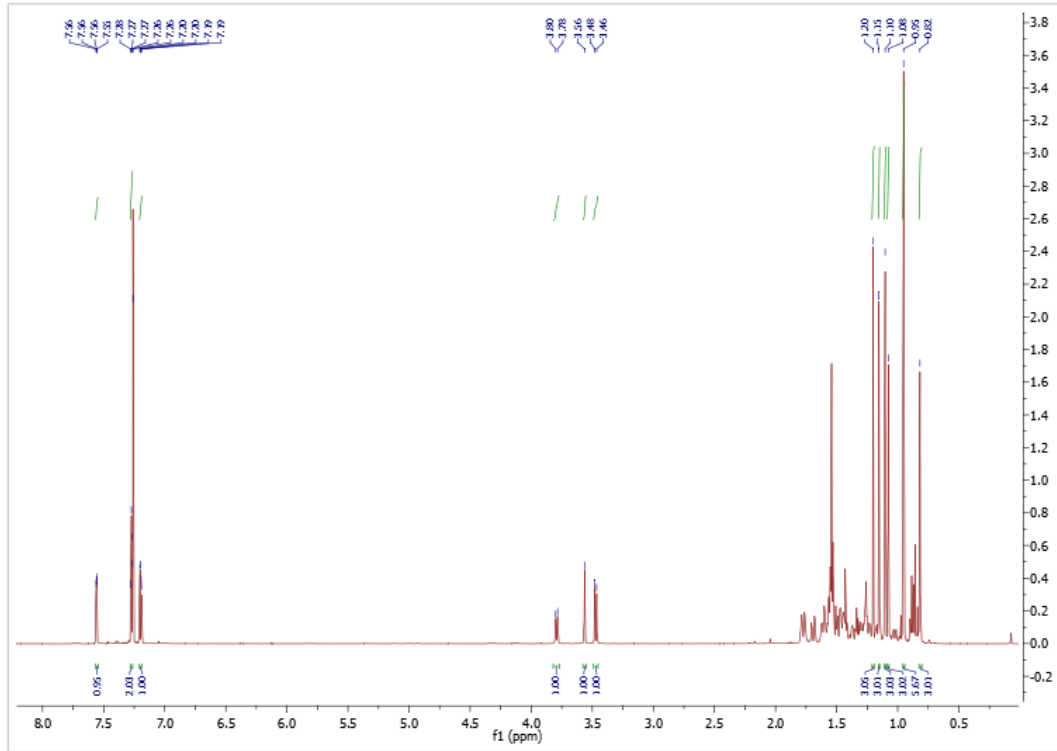
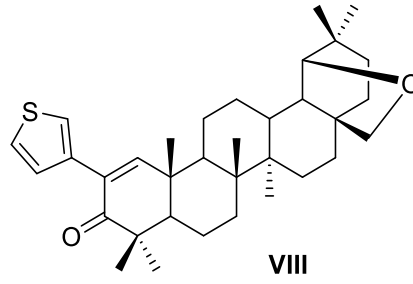
- (56) Urban, M.; Sarek, J.; Tislerova, I.; Dzubak, P.; Hajduch, M. *Bioorganic Med. Chem.* **2005**, *13* (19), 5527–5535.
- (57) Vlk, M.; Urban, M.; Elbert, T.; Sarek, J. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, *298* (2), 1149–1157.
- (58) Dinh Ngoc, T.; Moons, N.; Kim, Y.; De Borggraeve, W.; Mashentseva, A.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; Dehaen, W. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22* (13), 3292–3300.

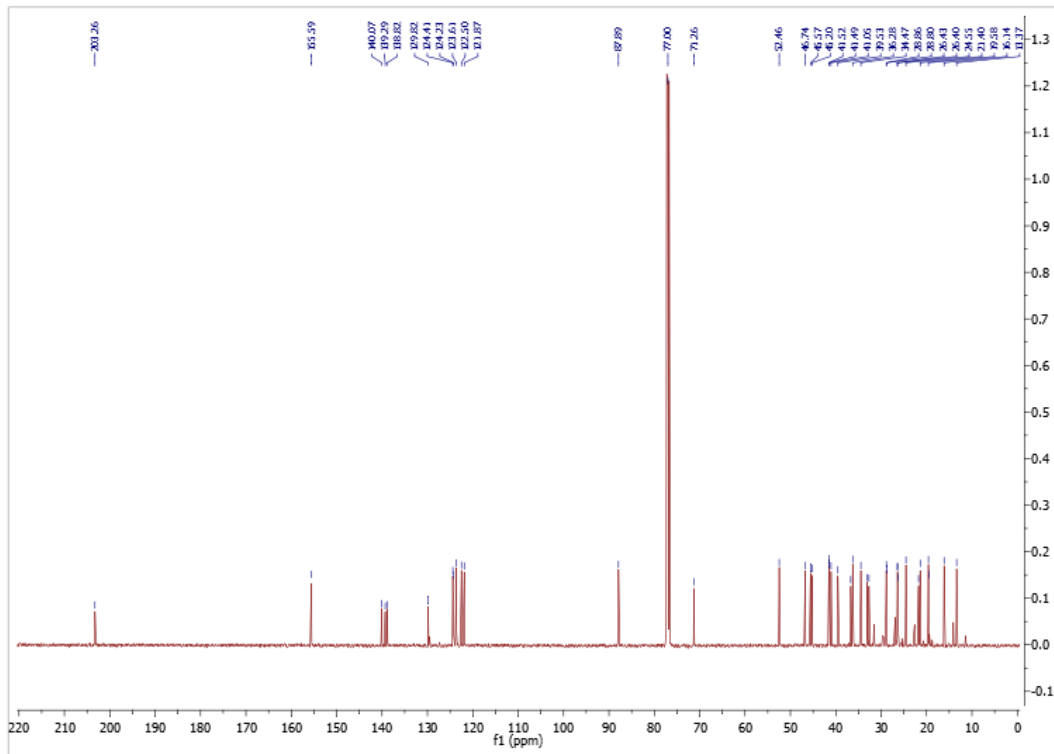
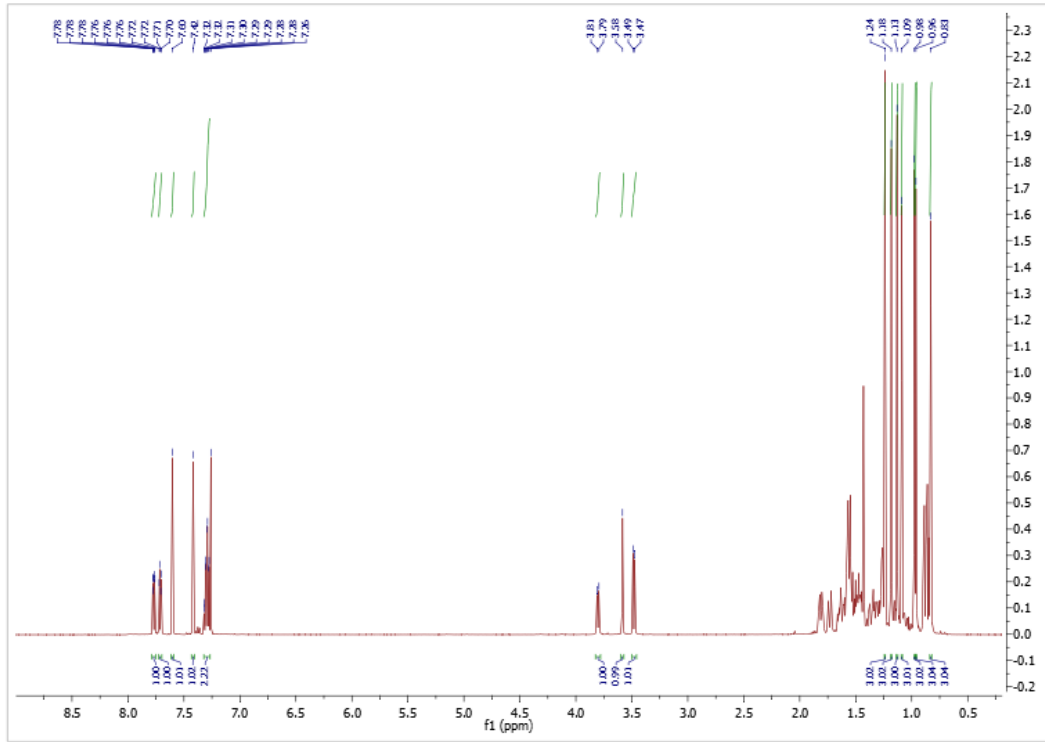
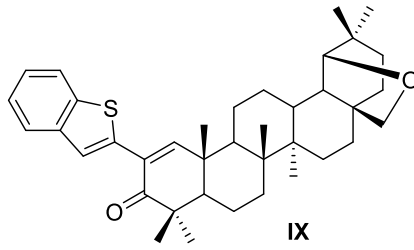
Příloha ^1H a ^{13}C NMR spekter všech nově připravených sloučenin

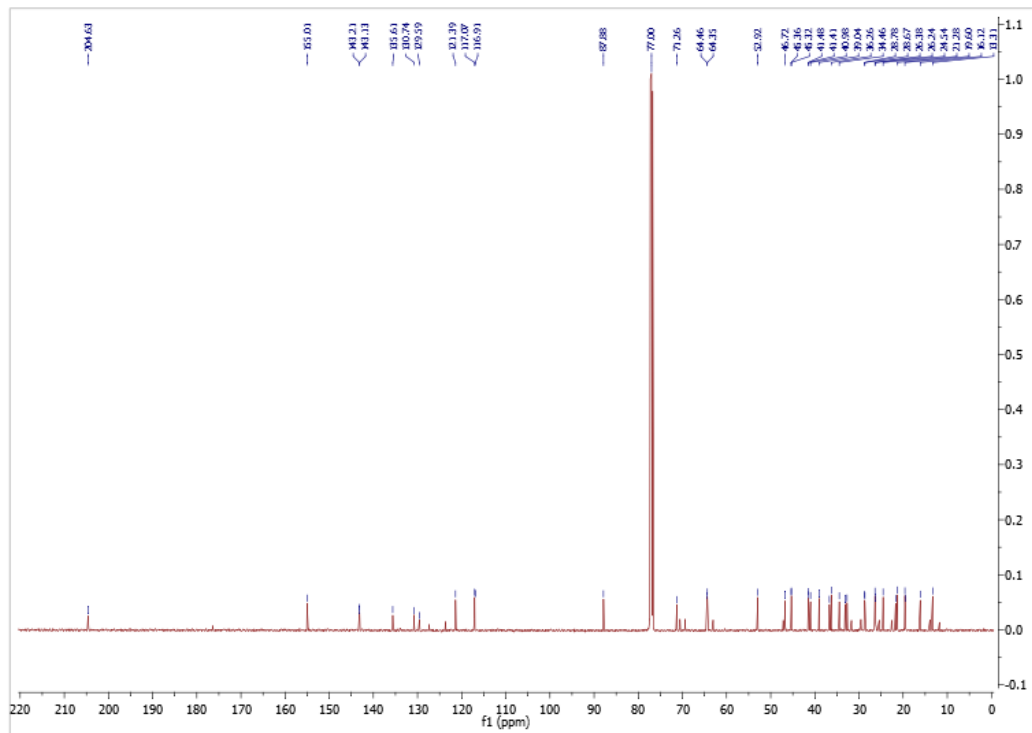
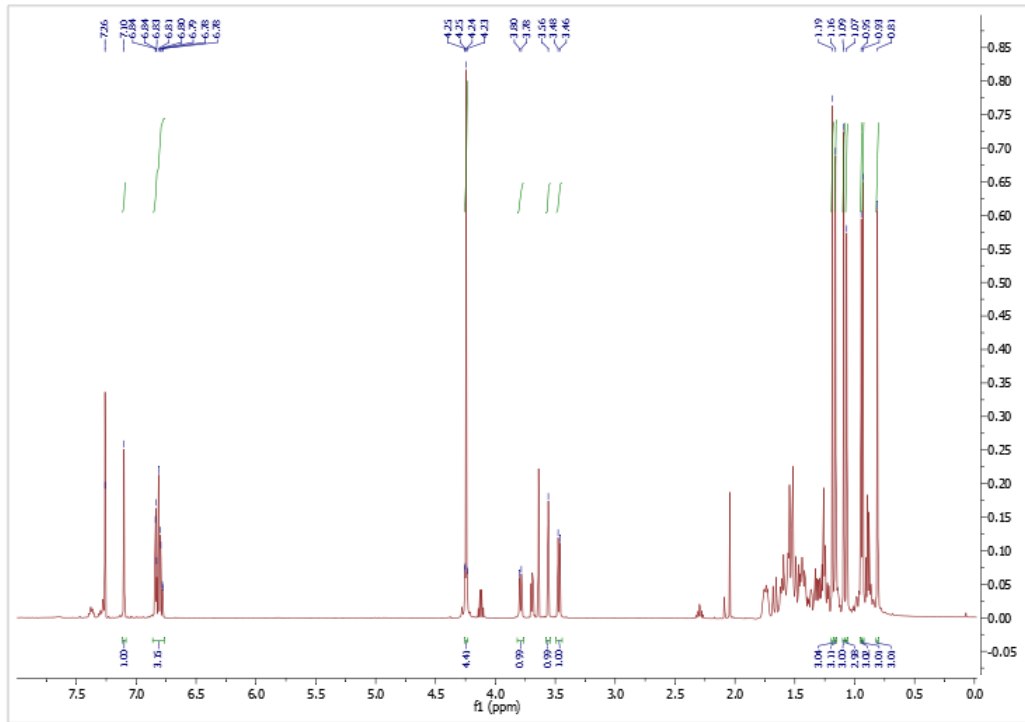
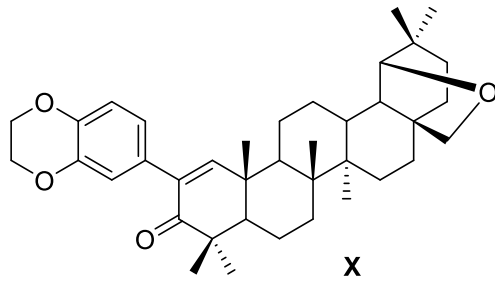


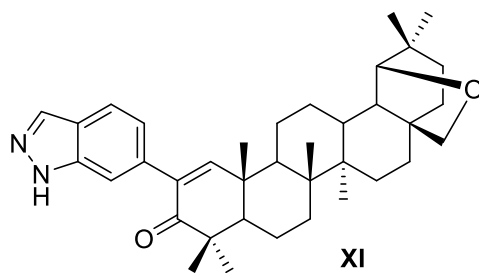












XI

