

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Studium využitelnosti Suzukiho cross-couplingu pro přípravu derivátů kyseliny
betulinové

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Barbora Vránová

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Borková

Olomouc 2018

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, 21. 5. 2018

.....

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Lucii Borkové, za odborné vedení, trpělivost a asistenci při řešení problémů.

Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. jako mému odbornému konzultantovi za cenné rady.

Velký dík patří celému týmu za ochotu při řešení problémů a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Největší poděkování patří mé rodině a přátelům za neustálou podporu po celou dobu studia.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autorky: Barbora Vránová

Název práce: Studium využitelnosti Suzukiho cross-couplingu pro přípravu derivátů kyseliny betulínové

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra organické chemie

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Borková

Odborný konzultant: doc. RNDr. Milan Urban, PhD.

Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt:

Předložená bakalářská práce se zabývá syntézou nových derivátů kyseliny betulínové za využití metody Suzuki-Miyaura cross-couplingu a testováním jejich cytotoxické aktivity. V teoretické části je shrnuto základní rozdělení terpenů a poznatky o kyselině betulínové a jejích cytotoxicky aktivních derivátech. Pozornost je dále zaměřena na Suzuki-Miyaura cross-coupling a jeho potenciální využití při syntéze nových derivátů betulínové kyseliny. Praktická část je věnována přípravě výchozích látek, série derivátů benzylbetulonátu metodou Suzuki-Miyaura cross-couplingu a série derivátů kyseliny betulonové s volnou -COOH skupinou. Závěrem jsou shrnuty předběžné výsledky z testování cytotoxické aktivity připravených derivátů.

Klíčová slova: triterpeny, kyselina betulínová, cytotoxická aktivita, Suzuki-Miyaura cross-coupling.

Počet stran: 54

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Barbora Vránová

Title: Study of the scope of Suzuki cross-coupling in preparation of betulinic acid derivatives

Type of thesis: Bachelor's

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: Mgr. Lucie Borková

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

The year of presentation: 2018

Abstract:

This bachelor thesis is aimed at the synthesis of new derivatives of betulinic acid using Suzuki-Miyaura cross-coupling method and their cytotoxic activity. The theoretical part summarizes general division of terpenes and scientific findings about betulinic acid and its derivatives with cytotoxic activity. Attention is also given to the general description of Suzuki-Miyaura cross-coupling and its potential uses in the synthesis of derivatives of betulinic acid. The practical part is dedicated to preparation of starting compounds, synthesis of a series of derivatives of benzylbetulonate by Suzuki-Miyaura cross-coupling and synthesis of a series of derivatives of betulinic acid with a free -COOH group. In conclusion, the preliminary results from the cytotoxic activity screening of the prepared derivatives are summarized.

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

Number of pages: 54

Number of appendix: 0

Language: Czech

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcOH	kyselina octová
Bn	benzyl
DCM	dichlormethan
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
eq.	ekvivalent
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
Hex	hexan
IC ₅₀	koncentrace sloučeniny inhibující růst u 50 % nádorových buněk
KHMDS	bis(trimethylsilyl)amid draselný
MeOH	methanol
PCC	pyridinium chlorochromát
r.t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
Tol	toluen

SEZNAM NÁDOROVÝCH LINÍÍ

A-253	lidský epidermoidní karcinom
A-431	lidský epidermoidní karcinom
A549	lidský adenokarcinom plic
BV173	lidská chronická myeloidní leukémie
DLD-1	lidský karcinom tračníku
ECV309	karcinom močového měchýře
G-361	lidský melanom
HCT-8	lidský adenokarcinom
HCT-116	lidská rakovina střev
HEp-2	lidský karcinom děložního čípku
HT-29	lidský adenokarcinom
IMR-5	lidský neuroblastom
K562	chronická myeloidní leukémie
LAN-5	lidský neuroblastom
MCF7	lidský karcinom plic
MEL-2	lidský melanom
MIA PaCa-2	karcinom pankreatu
NBL-S	lidský neuroblastom
NBL-W	lidský neuroblastom
P-388	myší lymfocytární leukémie
PC-3	lidský karcinom prostaty
SHSY5Y	lidský neuroblastom
SK-MEL-2	lidský melanom
SK-N-SH	lidský neuroblastom
SW-480	lidský adenokarcinom
SW1736	anaplastický karcinom štítné žlázy

OBSAH

ÚVOD	10
CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. TERPENY	13
1.1 Rozdělení terpenů.....	13
1.1.1 Hemiterpeny	13
1.1.2 Monoterpeny	14
1.1.3 Seskviterpeny	15
1.1.4 Diterpeny.....	16
1.1.5 Sesterterpeny	17
1.1.6 Triterpeny.....	18
1.1.7 Tetraterpeny	19
2. SUZUKI-MIYAURA CROSS-COUPLING.....	20
2.1 Úvod.....	20
2.2 Suzuki-Miyaura cross-coupling	21
2.3 Katalytický cyklus.....	21
2.4 Reakční podmínky	22
2.5 Výhody a nevýhody Suzuki cross-couplingu.....	23
3. KYSELINA BETULINOVÁ	25
3.1 Anti-HIV účinky kyseliny betulinové a jejích derivátů	26
3.2 Cytotoxické účinky kyseliny betulinové a jejích derivátů	27
3.2.1 Cytotoxicky aktivní deriváty kyseliny betulinové s modifikací na A kruhu.....	28
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	31
4.1 Příprava výchozích sloučenin	31
4.1.1 Benzylester kyseliny betulinové (II)	31
4.1.2 Benzylbetulonát (III).....	31

4.1.3	Enoltriflát benzylbetulonátu IV.....	31
4.2	Příprava derivátů benzylbetulonátu.....	32
4.2.1	Tolyl derivát benzylbetulonátu V.....	32
4.2.2	Hydroxyfenyl derivát benzylbetulonátu VI.....	33
4.2.3	Aminofenyl derivát benzylbetulonátu VII.....	33
4.2.4	Methoxyfenyl derivát benzylbetulonátu VIII.....	34
4.2.5	Fenyl derivát benzylbetulonátu IX.....	35
4.3	Deprotekce benzylesterů.....	36
4.3.1	Tolyl derivát kyseliny betulonové X.....	36
4.3.2	Hydroxyfenyl derivát kyseliny betulonové XI.....	36
4.3.3	Methoxyfenyl derivát kyseliny betulonové XII.....	37
4.3.4	Aminofenyl derivát kyseliny betulonové XIII.....	38
5.	CYTOTOXICKÁ AKTIVITA PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN.....	40
	ZÁVĚR.....	41
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
	OBECNÉ POZNÁMKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI.....	43
	POUŽITÁ LITERATURA.....	51

ÚVOD

Triterpeny jsou v přírodě velmi rozšířené sloučeniny. Nalézt a izolovat je můžeme zejména z rostlin. Mohou být součástí živočichů, vzácněji i mořských hub nebo řas. Jedná se o sloučeniny vykazující řadu biologických účinků, zejména se jedná o účinky protinádorové, antimikrobiální, virostatické, hepatoprotektivní a další.

Jedním z významných zástupců triterpenů je kyselina betulinová, přírodní pentacyklická sloučenina s mnoha významnými biologickými vlastnostmi. Nalezneme ji zejména u rostlin, kde plní funkci sekundárního metabolitu. Ve větší míře se kyselina betulinová vyskytuje v kůře platanu nebo břízy.

U kyseliny betulinové byla prokázána cytotoxická aktivita vůči řadě buněčných nádorových linií. Z tohoto důvodu jsou připravovány stále nové semisyntetické deriváty kyseliny betulinové s potenciální cytotoxickou aktivitou. Kyselina betulinová však vykazuje i další biologické aktivity jako anti-HIV, antimikrobiální a další.

Skelet kyseliny betulinové nabízí několik možností pro modifikaci, konkrétně se jedná o uhlíky C2, C3, C28, C29 a C30. Tato práce je zaměřena na přípravu nových derivátů kyseliny betulinové v poloze C3 pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingu.

Suzuki-Miyaura cross-coupling je moderní a často využívaná reakce v organické syntéze, která dává vzniku nové C-C vazbě. Nicméně do dnešní doby vyšlo pouze pár publikací s tematikou Suzuki-Miyaura cross-couplingu na triterpenech. Cílem této práce je studium využitelnosti této reakce na triterpenech a příprava menší knihovny sloučenin s potenciální biologickou aktivitou.

CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na základní dělení terpenů, kyselinu betulinovou a její cytotoxicky aktivní deriváty s modifikací na A kruhu a metodu Suzuki-Miyaura cross-couplingu.
2. Příprava výchozích sloučenin v dostatečném množství.
3. Příprava a charakterizace sady nových derivátů benzylbetulonátu.
4. Příprava a charakterizace sady nových derivátů kyseliny betulonové.
5. Testování cytotoxické aktivity připravených derivátů

TEORETICKÁ ČÁST

1. TERPENY

Terpeny jsou početnou skupinou biomolekul, kterou řadíme mezi lipidy.¹ Nalezneme je zejména u vyšších rostlin, které si je sami vytváří jako sekundární metabolity, což jsou sloučeniny, které se neúčastní hlavních metabolických drah, a nejsou využívány jako energetické nebo zásobní zdroje. Rostlině mohou sloužit jako lákadla pro opylující hmyz, jako regulátory nebo jako ochrana před škůdci.²

Je nutné podotknout, že do této podskupiny patří spousta biologicky a průmyslově důležitých sloučenin jako kafr, skvalen, karotenoidy, přírodní kaučuk, aj.³

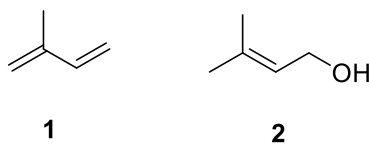
1.1 Rozdělení terpenů

Terpeny se formálně skládají z daného počtu isoprenových podjednotek. Dělíme je na hemiterpeny s 1 isoprenovou podjednotkou, monoterpeny se 2 podjednotkami, seskviterpeny se 3 podjednotkami, diterpeny se 4 podjednotkami, sesterterpeny s 5 podjednotkami, triterpeny s 6 podjednotkami, tetraterpeny s 8 podjednotkami, a polyterpeny, které obsahují více než 8 isoprenových podjednotek.¹

1.1.1 Hemiterpeny

Hemiterpeny jsou první a nejméně početnou podskupinou terpenů. Jedná se o deriváty, které obsahují pouze jednu podjednotku 2-methyl-buta-1,3-dienu – isoprenu (**1**) (*Obr. 1*).⁴

Hemiterpeny můžeme nejčastěji nalézt v přírodních olejích. Pravděpodobně nejznámějším zástupcem hemiterpenů je 3-methyl-2-buten-1-ol – prenil (**2**) (*Obr. 1*). Na rozdíl od isoprenu, prenil je přírodní sloučenina. Jeho nejvýznamnějším zdrojem je olej ylang-ylang.⁴

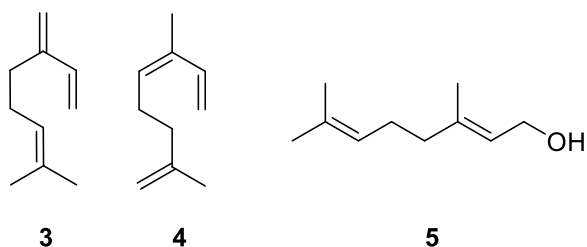


Obr. 1: Strukturní vzorec isoprenu (1) a prenilu (2)

1.1.2 Monoterpeny

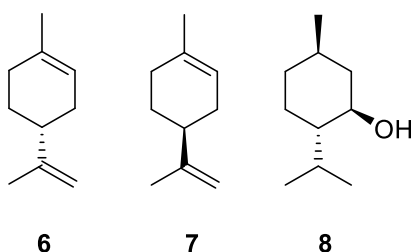
Monoterpeny jsou přírodní, biologicky aktivní látky, které jsou produkovány vyššími rostlinami. Formálně jsou odvozeny ze dvou isoprenových podjednotek a obsahují deset atomů uhlíku. Z hlediska struktury je dělíme na acyklické, monocyklické a bicyklické. V dnešní době je známo více než 1000 různých monoterpenů. Často se jedná o silice s nezaměnitelnou vůní, které můžeme získat pomocí destilace s vodní parou.²

Mezi hlavní zástupce acyklických monoterpenů řadíme myrcen (**3**), ocimen (**4**) a geraniol (**5**) (Obr. 2). Myrcen (**3**) je vonná silice z vavřínu a vyskytuje se ve formě dvou konfiguračních izomerů jako α -myrcen nebo β -myrcen.² Ocimen (**4**) je acyklický monoterpen, který je součástí řady esenciálních olejů, např. oleje z listů bazalky (*Ocimum basilicum*) nebo z šištic chmele (*Humulus lupulus*). V přírodě ho můžeme nalézt ve formě 4 konfiguračních izomerů.⁴ Geraniol (**5**) je isoprenoid, který je součástí růžového oleje.²



Obr. 2: Strukturní vzorec myrcenu (**3**), *cis*- α -ocimenu (**4**) a geraniolu (**5**)

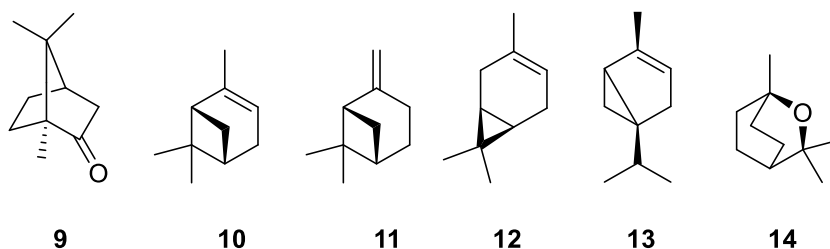
Monocyklické monoterpeny mají mnoho významných zástupců. Jedním z nich je limonen vyskytující se v citrusových plodech. Limonen může mít R (**6**) nebo S (**7**) konfiguraci. Rozdíl mezi těmito dvěma izomery je velmi patrný: zatímco R-izomer má charakteristickou pomerančovou vůni, pro S-izomer je typická vůně citronu. Dalším, neméně významným, zástupcem je mentol (**8**) (Obr. 3), který lze získat z máty peprné (*Mentha piperita*).²



Obr. 3: Strukturní vzorce (*R*)-limonenu (**6**), (*S*)-limonenu (**7**) a mentolu (**8**)

Třetí podskupinou jsou bicyklické monoterpeny, mezi které řadíme mnoho významných sloučenin. Nejdůležitější z nich je kafr (**9**). Jedná se o přírodní látku, která je obsažena v kastrovníku, ale i v mnoha dalších rostlinách. Využívá se v medicíně pro přípravu mastí, nebo v aromaterapii. Kafr se připravuje i syntetickou cestou.²

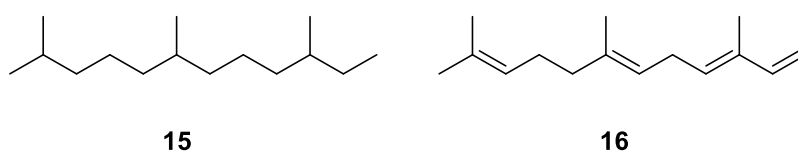
Mezi nejrozšířenější bicyklické monoterpeny patří α -pinen (**10**) a β -pinen (**11**), které jsou obsaženy v silicích jehličnatých stromů. Dalšími významnými zástupci jsou 3-karen (**12**), α -thujon (**13**) nebo eukalyptol (**14**) (Obr. 4).²



Obr. 4: Strukturní vzorce kafru (**9**), α -pinenu (**10**), β -pinenu (**11**), 3-karenu (**12**), α -thujonu (**13**) a eukalyptolu (**14**)

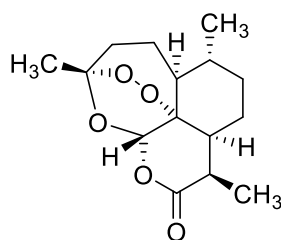
1.1.3 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou sloučeniny formálně tvořené třemi podjednotkami isoprenu. Základní strukturou, od které jsou odvozeny, je farnesan (**15**) (Obr.5), což je nepolární molekula tvořená 15 atomy uhlíku.⁴ Nalézt jej můžeme zejména v surových olejích, které mají potenciál jako biopaliva.⁵ Součástí slupky jablek a hrušek je α -farnesen, zejména jeho (E,E)-isomer (**16**) (Obr. 5), který slouží (obecně rostlinám) na ochranu před predátory a škůdci.⁶



Obr. 5: Struktura farnesanu (**15**) a (E,E)- α -farnesen (**16**)

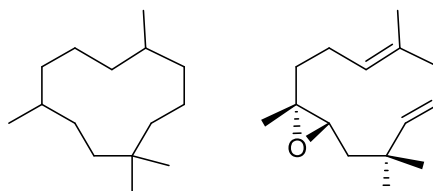
Významným zástupcem seskviterpenů je přírodní lakton artemisinin (**17**) (Obr 6). Tato sloučenina se používá zejména jako antimalarikum, které je v dnešní době z důvodu rezistence bakterií podáváno často v kombinaci s jinými léčivy.⁷ U artemisininu byla prokázána i protizánětlivá a cytotoxická aktivita.⁸



17

Obr. 6: Vzorec artemisininu (17)

Příkladem cyklických seskviterpenů jsou humulany, které vznikají cyklizací farnesanu (15) mezi uhlíky C1 a C11. Toto uzavření kruhu se uplatňuje zejména při biogenezi. Základní strukturou je humulan (18) (Obr. 7), často vznikají i epoxidy jako je (-)-2,3-epoxy-6,9-humuladien (19) (Obr. 7), které jsou součástí esenciálních olejů z chmele nebo hřebíčku.⁴



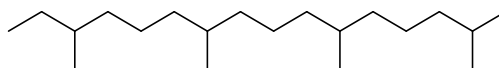
18

19

Obr. 7: Struktura humulanu (18) a (-)-2,3-epoxy-6,9-humuladienu (19)

1.1.4 Diterpeny

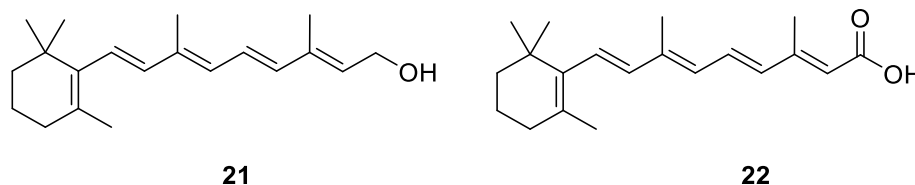
Molekuly, skládající se ze čtyř isoprenových podjednotek (20 atomů uhlíku), se nazývají diterpeny.¹ Jedná se o početnou skupinu přírodních molekul, které můžeme izolovat zejména z rostlin, nalézt je ale můžeme i ve včelím tmelu (*propolis*), nebo v houbě rodu *Hyattella* (*Hyattella* aff. *intestinalis*), jejíž extrakty vykazují virostatický účinek vůči adenoviru.^{9,10} Obecně jsou molekuly diterpenů odvozeny od základního skeletu alifatické molekuly fytanu (20) (Obr. 8).⁴



20

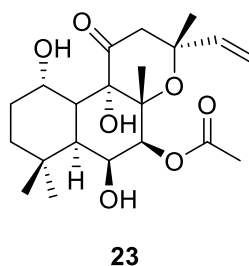
Obr. 8: Molekula fytanu (20)

Významnými zástupci skupiny diterpenů jsou molekuly retinolu (**21**) a retinalu (**22**) (Obr. 9). Obě molekuly jsou součástí skupiny látek označovaných jako retinoidy. Retinol (**21**) je po chemické stránce alkohol a retinal (**22**) je aldehyd, přičemž se jedná o dvě formy vitamínu A, který je důležitý pro správnou funkci zraku.⁴



Obr. 9: Molekuly retinolu (**21**) a retinalu (**22**)

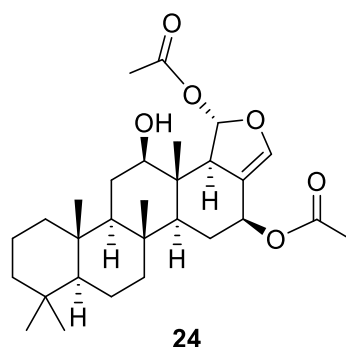
Za zmínku stojí i derivát forskolin (**23**) (Obr.10) fungující jako aktivátor adenylátcyklasy, enzymu, který se podílí na regulaci mnoha biochemických dějů v buňce. Příkladem jednoho z takových mechanismů je regulace metabolismu sacharidů, kdy dochází k inhibici syntézy glykogenu.¹¹



Obr. 10: Molekula forskolinu (**23**)

1.1.5 Sesterterpeny

Málo početnou podskupinou terpenů jsou sesterterpeny, které formálně obsahují pět podjednotek isoprenu a tedy 25 atomů uhlíku. Sesterterpeny můžeme nalézt zejména ve vyšších rostlinách, ale i v mořských houbách. Příkladem je molekula heteroneminu (**24**) (Obr. 11), která byla izolována z mořské houby *Heteronema erecta*.^{4,12} Heteronemin (**24**) vykazuje hodnotu $IC_{50} = 3 \mu M$ vůči protein farnesyl transferase, enzymu, jehož substrátem je Ras protein, jeden z hlavních onkogenů, uplatňujících se při nádorových mutacích.¹³



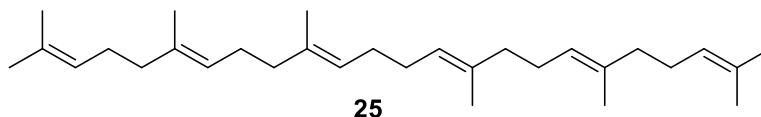
Obr. 11: Molekula heteroneminu (24)

1.1.6 Triterpeny

Triterpeny jsou sloučeniny formálně složeny ze šesti isoprenových podjednotek (obsahují 30 atomů uhlíku). Vyskytují se zejména ve vyšších rostlinách, ale i v mořských organismech, plísních, mikroorganismech a velmi vzácně i v houbách.¹⁴

Triterpeny mají mnoho významných biologických účinků, jsou to například účinky antimikrobiální, antivirotické, protizánětlivé, hepatoprotektivní, analgetické a antimykotické. Velmi důležité jsou také jejich účinky cytotoxické. Především díky těmto vlastnostem se v posledních dekádách zvýšil zájem o přípravu nových semisyntetických derivátů triterpenů s potenciální biologickou aktivitou. Zároveň řada těchto přírodních látek nalézá své využití v průmyslu, v kosmetice a ve farmacii.^{14,15}

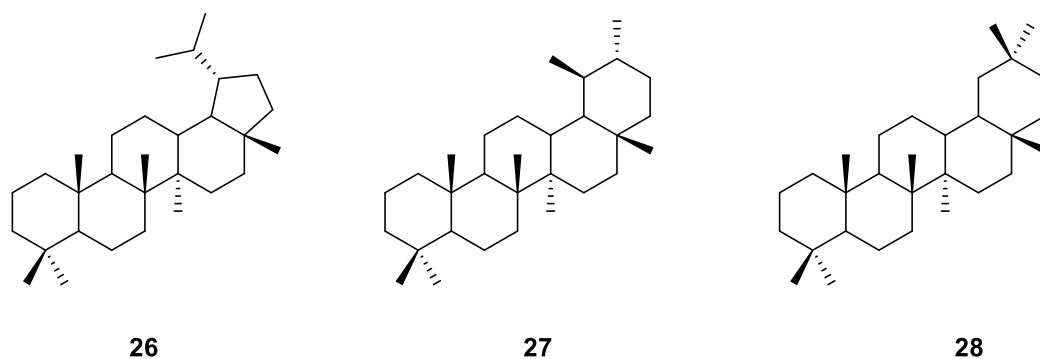
Důležitým zástupcem této skupiny je skvalen (**25**) (*Obr. 12*), od něhož je strukturně odvozena většina triterpenů.⁴ V lidském organismu slouží skvalen jako prekurzor pro syntézu většiny steroidních hormonů, zároveň se jedná o důležitý intermediát při biosyntéze cholesterolu a žlučových barviv. Skvalen je výchozí sloučeninou pro biosyntézu celé řady strukturně složitějších triterpenů, včetně triterpenů pentacyklických, o kterých budu hovořit dále.^{14,16}



Obr. 12: Molekula skvalenu (25)

Nejrozšířenější podskupinou triterpenů jsou triterpeny pentacyklické, které lze dále dělit podle skeletálních typů. V přírodě jsou nejčastěji zastoupeny skelety lupanu (**26**), ursanu (**27**) a oleananu (**28**) (*Obr. 13*).

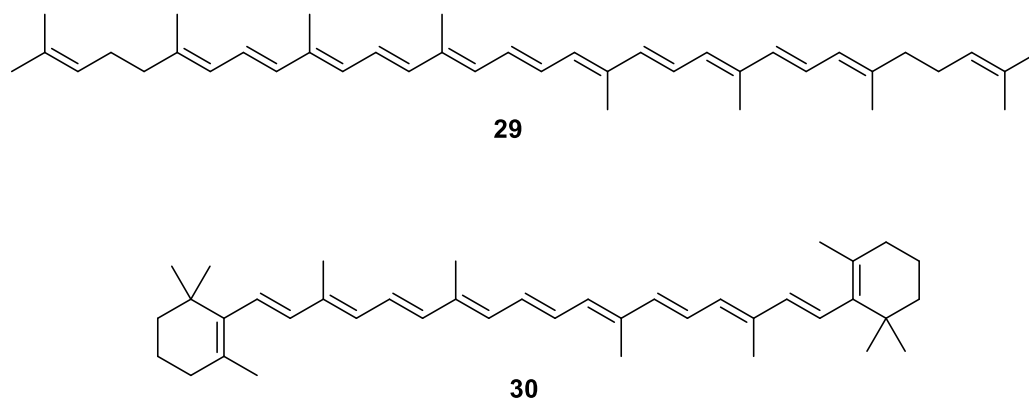
Pentacyklické triterpeny jsou sloučeniny, které disponují nejrůznějšími biologickými vlastnostmi: cytotoxickými, antimikrobiálními, antivirotickými, protizánětlivými, hepatoprotektivními nebo kardioprotektivními, přičemž největší pozornost je věnována cytotoxické aktivitě.^{4,17} Deriváty těchto sloučenin mají vysokou cytotoxicitu, ale některé vlastnosti, jako je malá rozpustnost ve vodě, nebo nízká selektivita, je znevýhodňují vůči ostatním cytofarmakům.¹⁷



Obr. 13: Struktury lupanu (26), ursanu (27) a oleananu (28)

1.1.7 Tetraterpeny

Tetraterpeny se skládají z osmi isoprenových podjednotek a mají tedy 40 atomů uhlíku. Strukturně nejjednodušším tetraterpenem je lykopen (29) (Obr. 14), který nalezneme zejména v rajčatech, kde se výrazně podílí na jejich červeném zbarvení, ale i v jiných rostlinách. Dalším typickým zástupcem této skupiny je β -karoten (30) (Obr. 14), který se nachází v mrkvi a způsobuje její oranžové zbarvení.⁴



Obr. 14: Molekuly lykopenu (29) a β -karotenu (30)

2. SUZUKI-MIYAURA CROSS-COUPLING

2.1 Úvod

Objev nového typu reakcí, které vedou k tvorbě vazby mezi dvěma uhlíky, znamenal v organické chemii velký průlom. Tyto moderní reakce, probíhající mezi organokovovými sloučeninami a elektrofilu, katalyzované pomocí katalyzátorů obsahujících přechodné kovy (zejména palladium), byly souhrnně pojmenovány jako cross-couplingové reakce.¹⁸

Velmi důležitými se v tomto směru staly publikace pánů Hecka, Suzukiho a Negishiho, kteří se v minulém století zasloužili o největší rozvoj cross-couplingů, a následně byli odměněni Nobelovou cenou.¹⁹ V současnosti jsou tyto reakce bohatě využívány zejména na poli organické syntézy a neustále podléhají dalšímu vývoji.¹⁸

Existuje řada typů cross-couplingů, lišících se zejména typem organokovových ligandů, které vstupují do reakce, ale také požívanými katalyzátory a reakčními podmínkami. Průběh cross-couplingových reakcí je charakterizován katalytickým cyklem, který zahrnuje tři fáze: oxidativní adici, transmetalaci a redukční eliminaci.²⁰

Mezi nejznámější cross-couplingy patří Stille, Negishi, Sonogashira, Kumada-Tamao-Corriu a Suzuki-Miyaura cross-coupling. Stille cross-coupling využívá k reakci toxických stannanů, které reagují s alkyl nebo arylhalogenidy.^{21,20} Negishi cross-coupling využívá organozinečnaté sloučeniny, které reagují nejčastěji s alkenyljodidy nebo bromidy za katalýzy Pd-fosfiny.^{22,23}

U Sonogashira cross-couplingu dochází ke spojení terminálního alkynu s aryl- nebo alkenylhalogenidy či trifláty za katalýzy Pd-katalyzátorů a měďnatých solí.^{20,24} Sonogashira cross-couplingem se nejčastěji připravují disubstituované acetyleny.²⁵

Reakci mezi Grignardovými činidly, organokovovými sloučeninami obsahujícími hořčík, a vinyl- nebo aryl-halidy za katalýzy Ni-komplexem publikovali v roce 1972 Kumada a Tamao.²⁶ V témže roce byla publikována i práce Corria, která pojednávala o reakci aromatických halidů s aromatickými Grignardovými sloučeninami.²⁷ Cross-coupling Grignardových činidel tak nese ve svém názvu jména všech jeho objevitelů.

2.2 Suzuki-Miyaura cross-coupling

Suzuki-Miyaurova reakce je jednou z nejvýznamnějších cross-couplingových reakcí. Jejimi objeviteli jsou japonští vědci Akira Suzuki a Norio Miyaura, kteří ji publikovali v roce 1979.²⁸ Při této reakci dochází k interakci alkenyl- či arylboronových kyselin nebo jejich esterů s alkenyl- nebo arylhalogenidy či trifláty za vzniku nové C-C vazby. Při tomto procesu je nezbytná přítomnost katalyzátoru, nejčastěji komplexu na bázi palladia, a báze (*Schéma 1*).^{20,29}

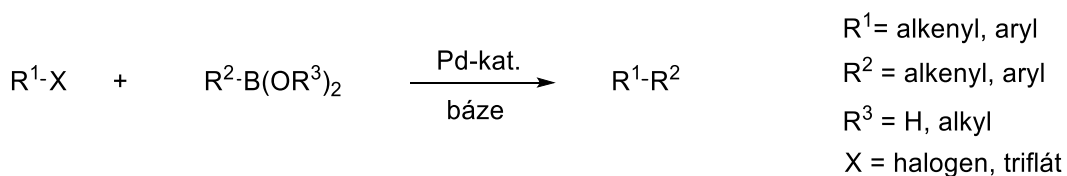


Schéma 1: Obecný průběh Suzuki-Miyaura cross-couplingu.

2.3 Katalytický cyklus

Průběh Suzuki-Miyaura cross-couplingu je, stejně jako průběh ostatních cross-couplingových reakcí, charakterizován katalytickým cyklem, který zahrnuje tři základní kroky: oxidativní adici, transmetalaci a reduktivní eliminaci.²⁹ Celý průběh cyklu je zobrazen na *Obrázku 15*.

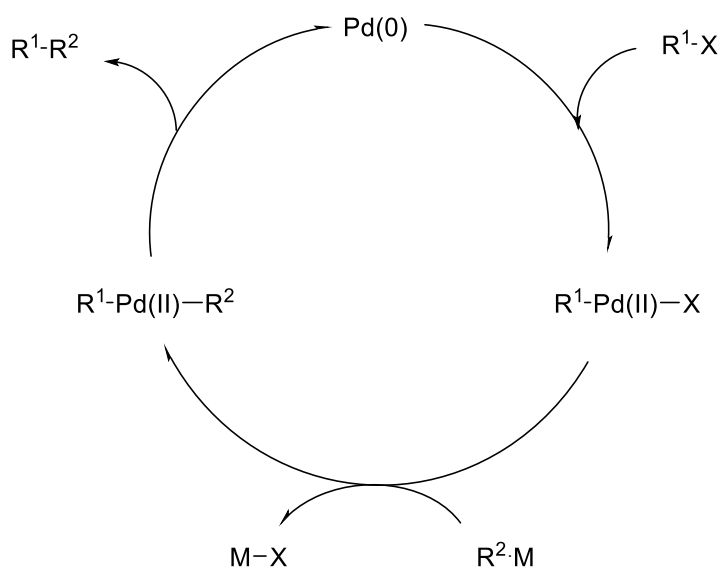
V prvním kroku cyklu, oxidativní adici, dochází ke tvorbě stabilního *trans*- σ -komplexu, kdy se na katalyzátor v oxidačním stavu 0 (Pd⁰) naváže molekula halogenidu, nebo triflátu, nesoucí požadovaný postranní řetězec R². Navázáním molekuly R²-X na katalyzátor dojde ke zvýšení oxidačního stavu katalyzátoru z 0 na +II (Pd^{II}) a výsledný komplex má podobu R²-Pd(II)-X.²⁹

Oxidativní adice je rychlost určující krok celého cyklu. Rychlost je závislá na povaze molekuly, která tvoří komplex s katalyzátorem. Komplex se nejrychleji tvoří v případě jodidů a triflátů, málo ochotně bude vznikat v případě chloridů. Nejvhodnějšími substráty jsou aktivované arylové halogenidy, u kterých dochází k odtahu elektronů z aromatického jádra a jsou tudíž mnohem reaktivnější než substráty, u kterých dochází k dodávání elektronů do systému.

Pro průběh druhého kroku cyklu, transmetalace, je v případě Suzuki couplingu nutná přítomnost báze. Boronové kyseliny jsou velmi slabými nukleofily, proto musí být aktivovány pomocí vhodných bází, jako jsou např. NaOH nebo slabší K₂CO₃.

V průběhu transmetalace je postranní zbytek R^1 , pocházející z boronové kyseliny (R^1-M), připojen ke stávajícímu komplexu za vzniku komplexu nového - $R^2-Pd(II)-R^1$. Současně s jeho vznikem odstupuje molekula $M-X$ (zbytek organokovové sloučeniny a halogenidu nebo triflátu).^{29,30}

Závěrečný krok katalytického cyklu, reduktivní eliminace, probíhá přes *cis*- σ -komplex (musí dojít k izomeraci původního *trans*- σ -komplexu). Z *cis*- σ -komplexu je uvolněna nová molekula R^1-R^2 , a zároveň dochází i k regeneraci katalyzátoru, který je z oxidačního stavu +II (Pd^{II}) zredukován na počáteční oxidační stav 0 (Pd^0).²⁹

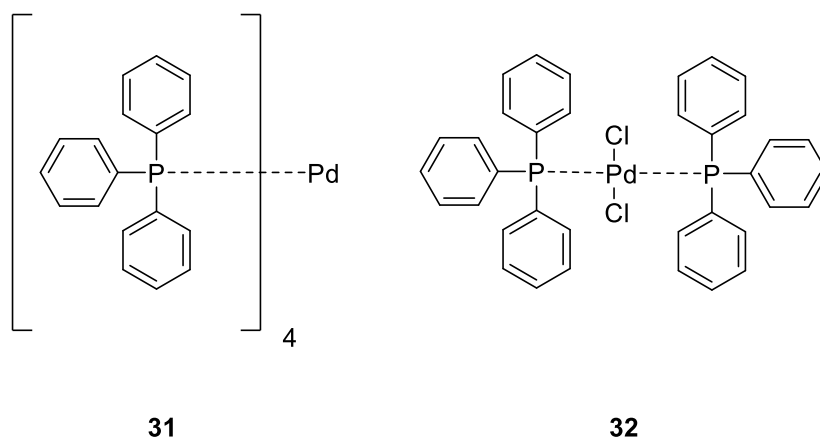


Obr. 15: Katalytický cyklus cross-couplingu

2.4 Reakční podmínky

Při vhodných podmínkách běží Suzuki cross-coupling i na složitých, stericky bráněných nebo málo reaktivních substrátech.³¹ Pro správný průběh reakce je nutná přítomnost katalyzátoru, báze a vhodné směsi rozpouštědel. Jednotlivé komponenty mohou být různě kombinovány a mají velký vliv na výsledný výtěžek reakce.

Jako katalyzátory se nejčastěji používají komplexní sloučeniny palladia, méně časté je použití katalyzátorů na bázi niklu nebo platiny.³⁰ Mezi nepoužívanější katalyzátory obsahující palladium se řadí triarylfosfíny, zejména $Pd(PPh_3)_4$ (**31**) a $PdCl_2(PPh_3)_2$ (**32**) (Obr. 16), často se také uplatňují sloučeniny $Pd(OAc)_2$ nebo $PdCl_2$.³⁰ V současné době jsou vyvíjeny stále nové generace katalyzátorů, od kterých je očekávána vysoká účinnost a selektivita. Jedním z nejmodernějších typů jsou např. katalyzátory nanočásticové.³²



Obr. 16: Příklady katalyzátorů využívaných při Suzuki-Miyaura cross-couplingu

Jak již bylo zmíněno, pro správný průběh Suzuki couplingu je nutná přítomnost báze. Báze aktivuje boronovou kyselinu a umožňuje vznik komplexu $R^2\text{-Pd(II)-R}^1$. Nejširší uplatnění mají slabší báze jako např. Na_2CO_3 a K_2CO_3 . Využívají se při cross-couplingu aromatických boronových kyselin, nicméně nemají takový vliv na rychlost reakce jako např. Cs_2CO_3 nebo CsOH , které reakci urychlují.³⁰

Pro některé reakce, zejména pro reakce 1-alkenylboronových kyselin, je zapotřebí silnějších bází. Využívají se zejména K_3PO_4 , KOH , Ag_2O nebo toxický TlOH .³³ V případě, kdy je jedna z výchozích sloučenin citlivá na bazické prostředí lze využít CsF nebo Bu_4NHF_2 .³⁴

V Suzuki cross-couplingu se často využívá dvoufázového (heterogenního) systému rozpouštědel. Jedním z rozpouštědel je voda, která umožňuje rozpuštění báze. Podle typu výchozích sloučenin se volí další rozpouštědlo/a, důraz je kladen na rozpustnost, a také na předejití vzniku nežádoucích vedlejších produktů. Nejčastěji se používají toluen, DMF a 1,4-dioxan.³⁰

2.5 Výhody a nevýhody Suzuki cross-couplingu

Výhody:

- Boronové kyseliny a jejich estery jako výchozí sloučeniny: Základní výhodou Suzuki-Miyaura cross-couplingu je použití boronových kyselin a jejich esterů jako výchozích sloučenin. Boronové kyseliny a jejich estery jsou komerčně dostupné a v porovnání s jinými organokovovými sloučeninami, zejména sloučeninami cínu nebo zinku, jsou méně toxické a mnohem šetrnější vůči životnímu prostředí.

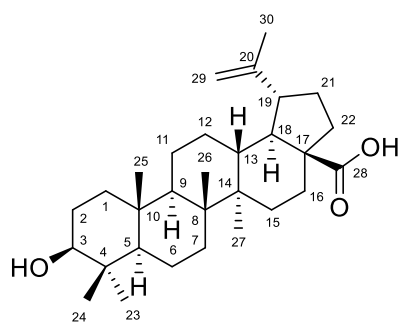
- Volba substrátu: V závislosti na podmínkách reakce, volbě katalyzátoru, báze a rozpouštědla probíhá Suzuki coupling jak s halogenidy (nejreaktivnější jsou jodidy, dále bromidy a nejméně reaktivní jsou chloridy, fluoridy se nepoužívají), tak i trifláty.²⁹
- Reakční podmínky: Reakce probíhá zpravidla za mírných podmínek, není potřeba vysokých teplot ani tlaků.
- Zpracování reakční směsi: V neposlední řadě je výhodou snadné odstranění anorganických vedlejších produktů z reakční směsi pomocí extrakce.
- Výtěžek reakce: Reakce probíhá zpravidla s vysokými výtěžky, ale výsledky se liší v závislosti na reakčních podmínkách, reaktivitě boronové kyseliny či jejího esteru, atd.³⁰

Nevýhody:

- Finanční nákladnost: Boronové kyseliny a jejich estery jsou sice komerčně dostupné, ale drahé. Cena boronových kyselin se pohybuje v rozmezí 1000 – 5000 Kč za gram kyseliny, estery boronových kyselin jsou dražší.
- Stabilita katalyzátorů: Katalyzátory používané při Suzuki couplingu jsou ve většině případů náchylné na vzdušnou vlhkost a musí se s nimi pracovat za inertních podmínek.
- Homocoupling: Při reakci může docházet k tvorbě homocouplingových (selfcouplingových) vedlejších produktů, např. z důvodu přístupu vzduchu, který způsobuje rychlou dimerizaci boronové kyseliny.³⁰
- Nevýhodou je také nízká reaktivita některých výchozích sloučenin, např. některých arylhalogenidů.²⁹

3. KYSELINA BETULINOVÁ

Kyselina betulinová (**33**) (Obr.17) je přírodní pentacyklická kyselina, která patří do skupiny triterpenů. Jedná se o jeden z biologicky aktivních derivátů lupanu (**26**). Poprvé byla získána z *Vauquelinia corymbosa* společně s uvaolem a kyselinou ursolovou. U této směsi látek byla prokázána cytotoxická aktivita.³⁵



33

Obr. 17: Kyselina betulinová (**33**)

Kyselina betulinová (**33**) se vyskytuje zejména v kůře některých stromů, např. v kůře platanu (*Platanus acerifolius*).³⁶ Získána byla také z keře *Ziziphus mauritiana* a dalších rostlin.³⁷

Průmyslový význam má izolace kyseliny betulinové (**33**) a jejího prekurzoru, alkoholu betulinu (**34**), z kůry břízy (*Betula pendula*). V kůře břízy je majoritně obsažen betulin (**34**), který lze po izolaci zoxidovat na kyselinu betulinovou (**33**). Obsah betulinu (**34**) v kůře stromů se liší druh od druhu a může dosahovat až 30%.³⁸ Jedna z možných cest převedení betulinu (**34**) na kyselinu betulinovou (**33**) je pomocí Jonesovy oxidace, vedoucí přes kyselinu betulonovou (**35**), a následné redukce derivátu **35** tetrahydridoboritanem sodným (Schéma 2).³⁹

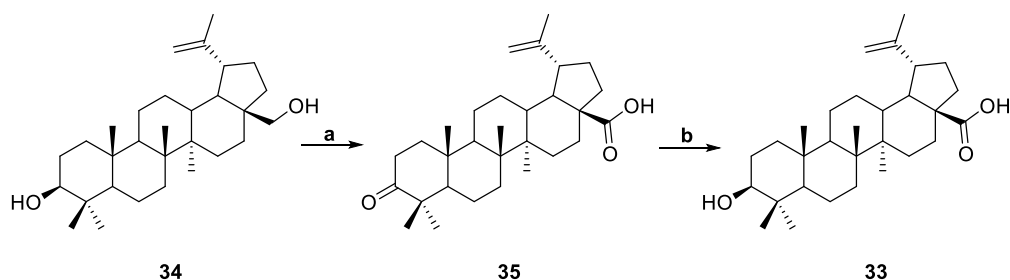


Schéma 2: Příprava kyseliny betulinové (**33**) z betulinu (**34**). a: CrO_3 , H_2SO_4 , aceton, $0\text{ }^\circ\text{C}$; b: NaBH_4 , THF.

Kyselina betulinová (**33**) je bílá krystalická látka, která se z kůry břízy a platanu získává extrakcí pomocí nejrůznějších rozpouštědel, například pomocí MeOH.⁴⁰ Kyselina betulinová (**33**) je rozpustná v pyridinu, omezeně rozpustná v alkoholech (MeOH nebo EtOH) a téměř nerozpustná ve vodě. Sumární vzorec je C₃₀H₄₈O₃ a přesná molekulová hmotnost 456,3603 g/mol. Systematický název podle IUPAC je (3β)-3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-ová kyselina.

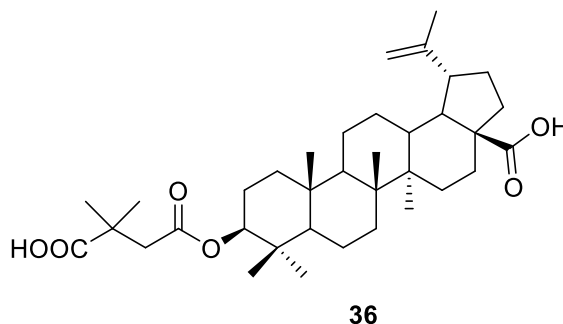
Biologické vlastnosti kyseliny betulinové (**33**) jsou velmi rozmanité. Zejména významná je cytotoxická aktivita, které je v této práci věnována samostatná kapitola. Neméně důležitá je její antivirová aktivita, zejména anti-HIV aktivita, které je taktéž věnována samostatná kapitola.^{39,16}

Kyselina betulinová (**33**), stejně tak jako betulin (**34**), vykazuje protizánětlivé účinky, které byly testovány na *in vitro* a *in vivo* modelech. Mezi další biologické vlastnosti této kyseliny patří účinky antibakteriální, antimalarické, antihelmintické, antinociceptivní, spasmogenní a další.³⁹

3.1 Anti-HIV účinky kyseliny betulinové a jejích derivátů

V roce 1996 byla publikována studie, kde byla kyselině betulinové (**33**) naměřena hodnota EC₅₀ = 1,6 μM na infikovaných H9 lymfocytech. Z tohoto důvodu začal být o kyselinu **33** a její deriváty zájem jako o potenciální antivirotika.⁴¹

Jedním z testovaných derivátů kyseliny betulinové s anti-HIV účinky byl derivát Bevirimat (**36**) (*Obr. 18*), který se dostal do fáze IIa klinických zkoušek. V této fázi byl jeho anti-HIV účinek zaznamenán u 45 % pacientů. V klinických zkouškách derivát **36** dále nepokračoval. Důvodem byla rezistence vůči Bevirimatu.



Obr. 18: Struktura Bevirimatu (36)

Metoda Suzuki-Miyaura cross-couplingu byla využita pro přípravu dalších derivátů kyseliny betulinové (**33**), které byly označeny jako tzv. druhá generace

ve výzkumu anti-HIV terapeutik. Příprava nejnadějnějšího z derivátů, BMS-955176 (**40**), za využití Suzuki reakce je zobrazena na *Schématu 3*.¹⁶

Syntéza vychází z kyseliny betulinové (**33**), která je nejdříve ochráněna pomocí benzylbromidu v přítomnosti K_2CO_3 a následně pomocí PCC zoxidována na keto kyselinu **37**. Reakce keto kyseliny **37** s $PhNTf_2$ v přítomnosti KHMDS a THF při $-78\text{ }^\circ\text{C}$ poskytla triflát **38**, který byl využit pro Suzuki-Miyaura cross-coupling s (4-(methoxykarbonyl)phenyl)boronovou kyselinou v přítomnosti Na_2CO_3 a katalyzátoru $Pd(Ph_3P)_4$ ve směsi 1,4-dioxanu, 2-propanolu a vody. Reakcí vznikl derivát **39**. Sledem šesti dalších kroků byla získána molekula BMS-955176 (**40**).¹⁶

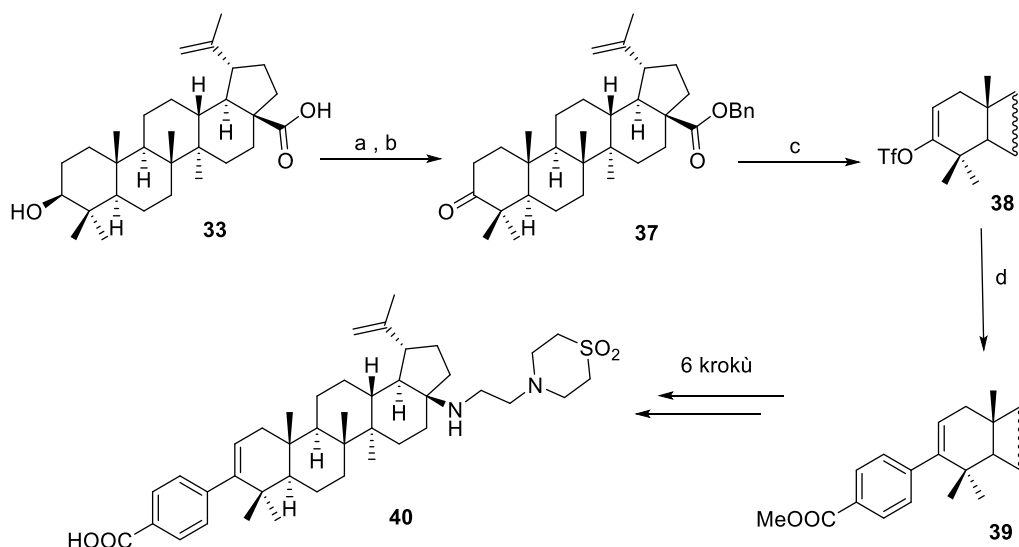


Schéma 3: Příprava derivátu BMS-955176. (Reakční podmínky: a: K_2CO_3 , $BnBr$, DMF , $60\text{ }^\circ\text{C}$, 3,5 h, 99 %; b: PCC , CH_2Cl_2 , 6 h, 96 %; c: $KHMDS$, $PhNTf_2$, THF , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 4 hod, 90 %; d: (4-(methoxykarbonyl)phenyl)boronová kyselina, Na_2CO_3 , $Pd(PPh_3)_4$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O , reflux, 14,5 h, 68,1 %).

3.2 Cytotoxické účinky kyseliny betulinové a jejích derivátů

Cytotoxické vlastnosti kyseliny betulinové (**33**) byly poprvé zaznamenány v roce 1976, kdy Trumbull a kolektiv publikovali článek o extraktu z *Vauquelinia corymbosa*. Tento extrakt vykazoval cytotoxický účinek vůči leukemické linii P-388 (myší lymfocytární leukémie).³⁵ Podobné vlastnosti vykazovala i směs obsahující pouze betulin (**34**) a kyselinu betulinovou (**33**).¹

Opravdový zájem o kyselinu betulinovou (**33**) a její deriváty začal být až v roce 1995, kdy byla prokázána cytotoxická aktivita kyseliny betulinové (**33**) vůči buněčné linii

lidského melanomu. Následně byly provedeny pokročilé experimenty na myších, kterým byly do těla aplikovány nádorové buňky s lidským melanomem. U rakovinných buněk v tělech myši došlo po ošetření kyselinou betulinovou (**33**) ke spuštění plánované buněčné smrti bez toxických následků pro organismus.⁴²

Cytotoxické vlastnosti kyseliny betulinové (**33**) byly prokázány i u jiných nádorových linií, např. na liniích lidského neuroblastomu. Po třídenní inkubaci s kyselinou betulinovou (**33**) v nejvyšší koncentraci 4,4 μM se ukázalo, že všech 9 testovaných nádorových linií lidského neuroblastomu (SKNSH, SHSY5Y, IMR-5, LAN-5, NBL-S, NBAS5, NBAS6, NBL-W, NBL-WR a MEL-2) je na kyselinu **33** velmi citlivých. Největší účinek se projevil u nádorové linie LAN-5, která reagovala na kyselinu **33** již při koncentraci 0,66 μM .⁴³

Kyselina betulinová (**33**) způsobuje indukci apoptózy nádorových buněk nebo působí antiproliferačně. V současné době je popsáno více mechanismů, kterými kyselina **33** způsobuje zahájení apoptózy: přímým působením na mitochondrie, sníženou regulací exprese P13K/Akt signálních molekul pomocí ROS, ovlivněním propustnosti mitochondriální membrány, pomocí p53 nebo umožňuje snadnější uvolňování cytochromu c (apoptózu indukujícího faktoru).⁴⁴

Jeden z mechanismů účinku kyseliny betulinové (**33**) na rakovinné buňky je následující: kyselina **33** selektivně působí na semiautonomní orgány mitochondrie, zajišťující buněčné dýchání a produkci ATP, který je nezbytný pro správnou funkci buněk. Přítomnost kyseliny betulinové způsobuje zvýšení permeability mitochondriální membrány a dojde k narušení membránového potenciálu. Poté je vypuštěn cytochrom c. Následuje aktivace kaspázové kaskády. Konkrétně se jedná o kaspázy 3 a 8, přičemž efektorová kaspáza 3 je zodpovědná za aktivaci apoptózy, a kaspáza 8 umožňuje vazbu na protein. Následně dojde ke spojení těchto enzymů v kaspázový komplex. Konečným důsledkem celého procesu je rozpad buněčného jádra.^{45,46}

Výrazné cytotoxické vlastnosti kyseliny **33** vzbudily mezi vědeckou veřejností pozornost, což vedlo a nadále vede k syntéze nových semisyntetických derivátů kyseliny **33** jako potenciálních cytofarmak.

3.2.1 Cytotoxicky aktivní deriváty kyseliny betulinové s modifikací na A kruhu

Derivát *m*-pikolyamid kyseliny betulinové **41** (Obr. 19) vykazuje vysokou cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii MCF7 (rakovina prsu) s hodnotou $\text{IC}_{50} = 1,4 \mu\text{M}$ a vůči nádorové linii G-361 (lidský melanom) s hodnotou $\text{IC}_{50} = 0,5 \mu\text{M}$.⁴⁷

Csuk a kolektiv publikovali v roce 2012 derivát **42** (*Obr. 19*), který vykazuje submikromolární cytotoxickou aktivitu vůči řadě buněčných linií. U nádorových linií A431 (epidermoidní karcinom), HCT-8 a HCT-116 (karcinom tlustého střeva) byla zjištěna hodnota $IC_{50} = 0,2 \mu M$, na linii MCF-7 (karcinom prsu) byla naměřena hodnota $IC_{50} = 0,3 \mu M$, a na liniích A253 (epidermoidní karcinom), DLD-1, HT-29, SW480 (střevní adenokarcinom) a SW1736 (anaplastický karcinom štítné žlázy) bylo $IC_{50} = 0,4 \mu M$.⁴⁸

Submikromolární cytotoxickou aktivitu vykazuje i derivát **43** (*Obr. 19*), u kterého byly naměřeny hodnoty pro buněčnou linii MCF-7/ADR (karcinom vaječnicků) $IC_{50} = 0,33 \mu M$, pro linii MCF-7 (karcinom prsu) $IC_{50} = 0,54 \mu M$ a pro HT-29 (lidský adenokarcinom) $IC_{50} = 0,97 \mu M$.⁴⁹

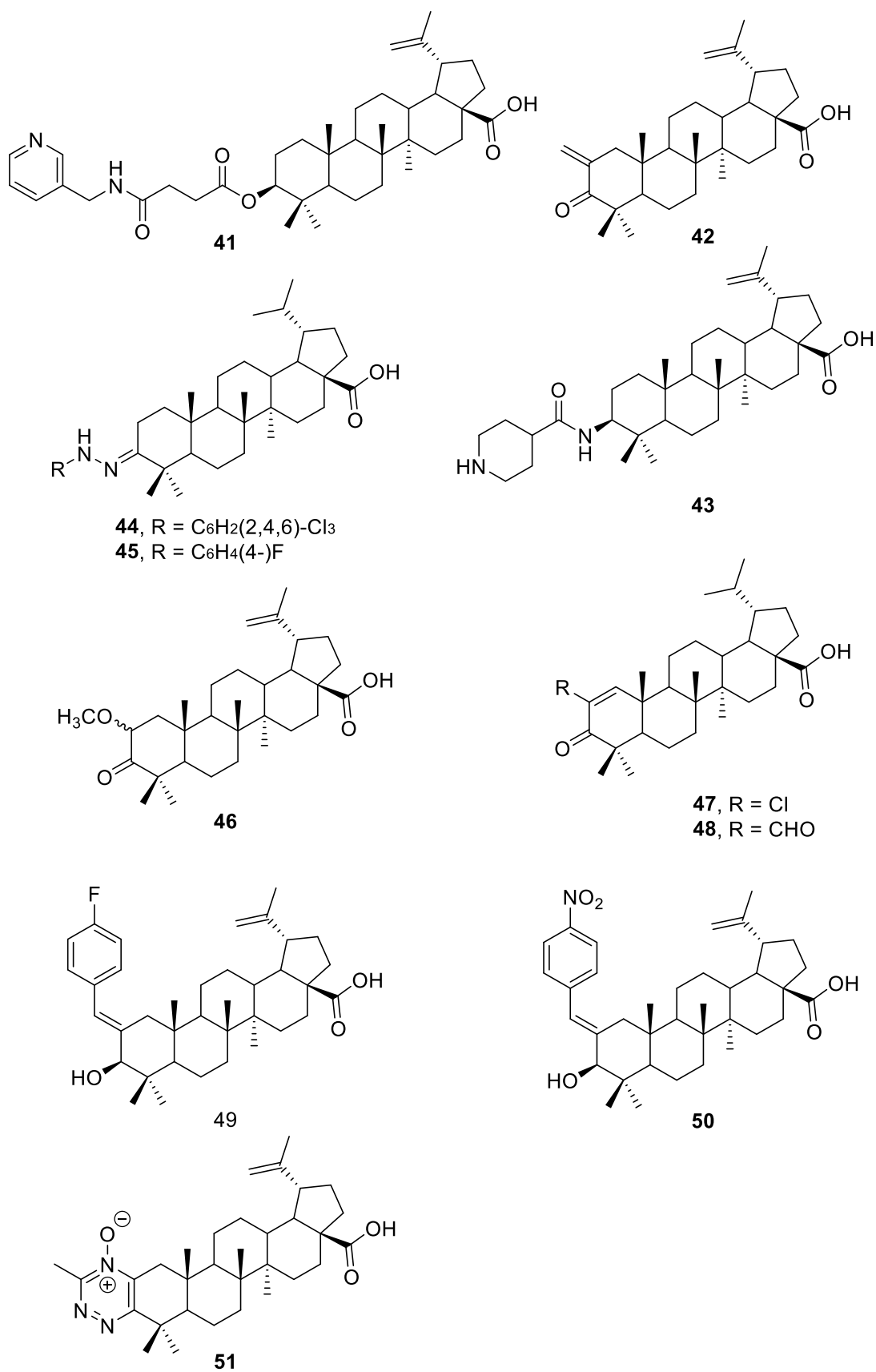
U derivátů **44** a **45** (*Obr. 19*) byla naměřena vysoká cytotoxická aktivita vůči buněčné linii ECV304 (karcinom močového měchýře) $IC_{50} = 0,21 \mu M$, resp. $IC_{50} = 0,35 \mu M$.⁵⁰

Dalším derivátem s vysokou cytotoxickou aktivitou je sloučenina **46** (*Obr. 19*), která má hodnotu $IC_{50} = 0,91 \mu M$ vůči buněčné linii BV-173 (chronická myeloidní leukémie) a hodnotu $IC_{50} = 0,52 \mu M$ vůči buněčné linii K562 (chronická myeloidní leukémie).⁵¹

Vysokou cytotoxickou aktivitu mají i deriváty **47** a **48** (*Obr. 19*). Submikromolární aktivitu vůči nádorové linii SK-MEL-2 (lidský melanom) prokázala sloučenina **47**, $IC_{50} = 0,27 \mu M$. Sloučenina **48** má cytotoxicitu $IC_{50} = 0,35 \mu M$ vůči nádorové linii A-549 (karcinom plic).⁵²

Derivát **49** (*Obr. 19*) vykázal aktivitu u nádorových linií MCF-7 (karcinom prsu) s cytotoxickou aktivitou $IC_{50} = 1,18 \mu M$, MIA PaCa-2 (karcinom slinivky břišní) s $IC_{50} = 1,21 \mu M$ a HCT-116 (karcinom tlustého střeva) s $IC_{50} = 1,5 \mu M$. Sloučenina **50** (*Obr. 19*) má mikromolární aktivitu vůči liniím HCT-116 (karcinom tlustého střeva) s $IC_{50} = 1,36 \mu M$, A549 (karcinom plic) s $IC_{50} = 1,5 \mu M$ a vůči PC-3 (karcinom prostaty) s $IC_{50} = 1,6 \mu M$.⁴⁷

Molekula **51** (*Obr. 19*) má hodnotu $IC_{50} = 1,4 \mu M$ u linie HCT-116 a $IC_{50} = 1,5 \mu M$ pro buněčnou linii HEP-2 (karcinom děložního čípku).⁵³



Obr. 19: Přehled derivátů s modifikací na A kruhu vykazující cytotoxickou aktivitu

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Příprava výchozích sloučenin

4.1.1 Benzylester kyseliny betulinové (II)

Výchozí sloučeninou pro reakci byla kyselina betulinová (**I**), která reagovala s benzylbromidem a uhlíčanem draselným v přítomnosti acetonitrilu a DMF. Reakce poskytla benzylester kyseliny betulinové (**II**) ve výtěžku 97,3% (Schéma 4).⁵⁴

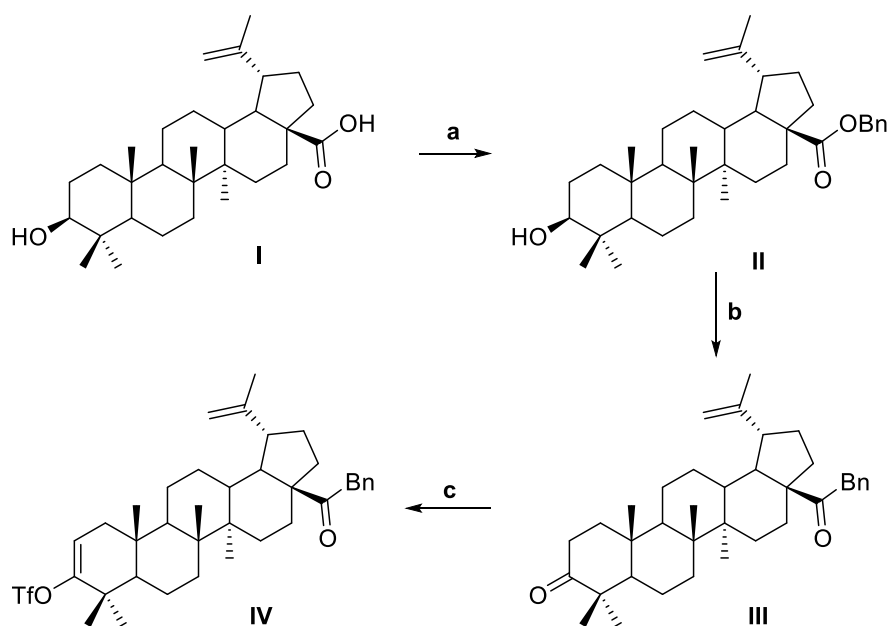


Schéma 4: a: BnBr, K₂CO₃, acetonitril, DMF; b: trihydrát octanu sodného, dihydrát dichromanu sodného 1,4-dioxan, AcOH, (CH₃CO)₂O; c: KHMDS, Tf₂NPh, THF/toluen.

4.1.2 Benzylbetulonát (III)

Keto kyselina **III** byla získána optimalizací postupu popsaného v literatuře. Pro oxidaci benzylesteru kyseliny betulinové (**II**) byl využit dihydrát dichromanu sodného (1,8 eq.) a trihydrát octanu sodného (1,5 eq.) v systému 1,4-dioxan, AcOH a (CH₃CO)₂O (Schéma 4).⁵⁴ Po extrakci do EtOAc byla získána sloučenina **III** ve výtěžku 69 % přečištěná sloupcovou chromatografií na silikagelu.

4.1.3 Enoltriflát benzylbetulonátu IV

Přísun triflátu **IV** byl proveden celkem čtyřikrát. Sloučenina **III** reagovala s 1,1 eq. Tf₂NPh a dvěma eq. KHMDS v systému THF/toluen v inertním prostředí při

-78 °C (roztok acetonu a kapalného dusíku) podle postupu popsaného v literatuře¹⁶ (*Schéma 4*).

Reakční směs byla zpracována extrakcí do EtOAc, který byl následně odpařen na RVO. Po přečištění derivátu **IV** pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu bylo získáno 1,879 g (74 %) triflátu **IV**, jehož struktura byla potvrzena pomocí spektrálních dat.

Byl proveden pokus o optimalizaci reakce snížením množství KHMDS ze dvou ekvivalentů na 1,5 eq. a použitím THF jako jediného rozpouštědla namísto směsi rozpouštědel THF/toluen. Reakce pod upravenými podmínkami probíhala, ale konverze výchozí keto kyseliny **III** na triflát **IV** proběhla pouze ze 70 % (na TLC pozorována nezreagovaná výchozí látka a nečistoty).

4.2 Příprava derivátů benzylbetulonátu

4.2.1 Tolylní derivát benzylbetulonátu **V**

Výchozí sloučeninou pro přípravu tolylního derivátu **V** byl triflát **IV**, 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 roztoku byly dále přidány dva eq. 4-methylfenylboronové kyseliny rozpuštěné ve 2-propanolu a dva eq. uhličitanu sodného rozpuštěného ve vodě. Pro zahájení reakce bylo do baňky přisypáno katalytické množství (2 molární procenta) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ a reakční směs byla ponechána reagovat přes noc při teplotě 90 °C (při dosažení této teploty došlo vždy ke ztmavnutí reakční směsi až na tmavě hnědou) (*Schéma 5*).⁵⁵

Reakční směs byla zpracována extrakcí do EtOAc, který byl odpařen na RVO. Surový produkt **V** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Bylo získáno 68 mg (37 %) čistého tolylního derivátu **V**. Z důvodu nízkého výtěžku byla reakce opakována. Po zpracování reakční směsi a purifikaci bylo získáno 84 mg (46 %) derivátu **V**, jehož struktura byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ¹H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet benzylbetulonátu nalezeny dva multiplety při 7.08 – 7.07 ppm a 7.03 – 7.01 ppm, odpovídající čtyřem vodíkům aromatického jádra navázaného na C-3. Dále byl nalezen signál pro CH₃ skupinu tolylu při 2.35 ppm a multiplet odpovídající vodíku na C-2 v oblasti 5.28 – 5.26 ppm.

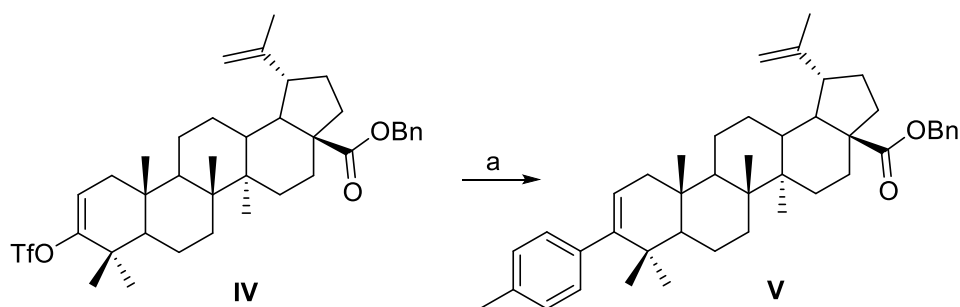


Schéma 5: a: 4-methylfenylboronová kyselina, Na_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O .

4.2.2 Hydroxyfenyl derivát benzylbetulonátu VI

Hydroxyfenyl derivát benzylbetulonátu **VI** byl připraven analogicky podle výše zmíněného postupu reakcí triflátu **IV** s 4-hydroxyfenylboronovou kyselinou (*Schéma 6*). Reakční směs byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu za poskytnutí derivátu **VI** s výtěžkem 59 %. Struktura byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byl při 5.26 ppm nalezen multiplet odpovídající vodíku na C-2. Signály multipletů při 6.98 a 6.72 ppm odpovídají čtyřem vodíkům na aromatickém jádře hydroxyfenylu.

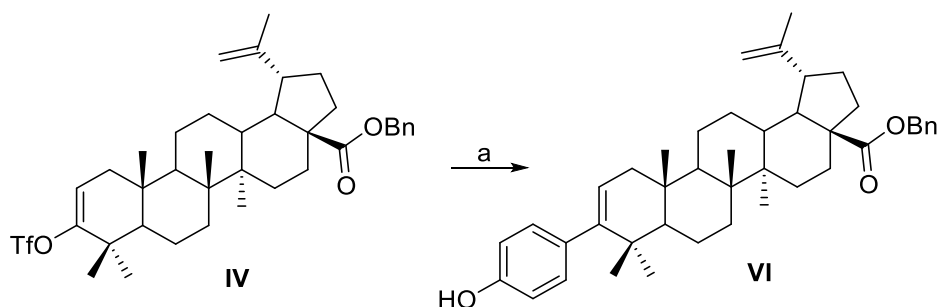


Schéma 6: a: 4-hydroxyfenylboronová kyselina, Na_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O .

4.2.3 Aminofenyl derivát benzylbetulonátu VII

Aminofenyl derivát **VII** byl připraven analogicky podle předešlého postupu reakcí triflátu **IV** s monohdrátem kyseliny 3-aminofenylboronové (*Schéma 7*). Produkt **VII** byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s výtěžkem 39 %. Struktura byla ověřena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byla kromě signálů typických pro skelet benzylbetulonátu nalezena skupina signálů při 7.33 – 6.49 ppm, odpovídající čtyřem vodíkům aromatického jádra navázaného na C-3. Dále byl při 5.26 ppm nalezen multiplet odpovídající vodíku na C-2.

Nízký výtěžek reakce byl způsoben použitím jednoho eq. 3-aminofenylboronové kyseliny namísto 2 ekvivalentů. Na TLC destičce byl vidět zbytek nezreagované výchozí látky **IV**. Reakce byla opakována za použití dvou eq. příslušné boronové kyseliny, výtěžek reakce bez čištění sloupcovou chromatografií na silikagelu byl 91 %. Produkt byl použit do další reakce.

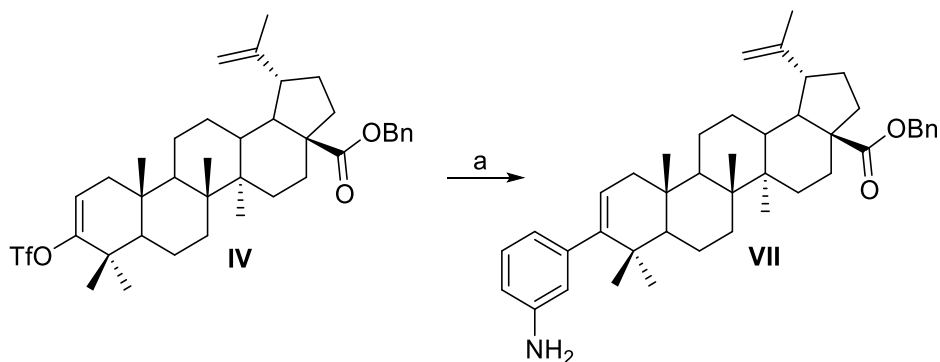


Schéma 7: a: 3-aminofenylboronová kyselina, Na_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O .

4.2.4 Methoxyfenyl derivát benzylbetulonátu **VIII**

Methoxyfenyl derivát **VIII** byl připraven obdobně jako předešlé deriváty Suzuki-Miyaura cross-couplingem triflátu **IV** s kyselinou 4-methoxyfenylboronovou (*Schéma 8*). Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Výtěžek reakce byl 41 %. Struktura byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet benzylbetulonátu nalezeny multiplety při 7.03 a 6.79 ppm, odpovídající čtyřem vodíkům aromatického jádra navázaného na C-3. Singlet při 3.80 ppm odpovídá methoxy skupině na aromátu a multiplet při 5.26 ppm odpovídá vodíku na C-2.

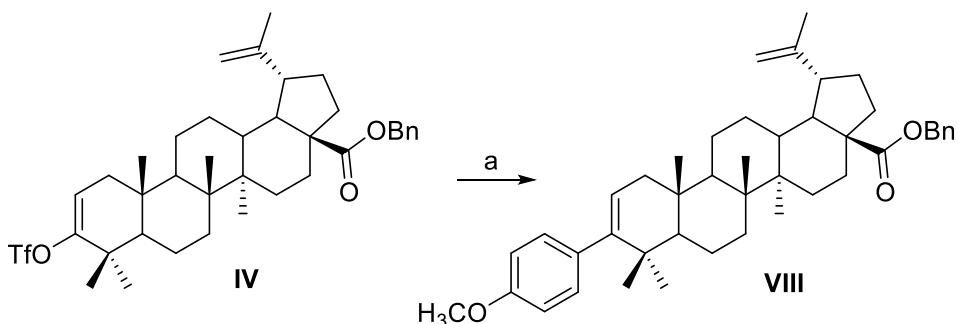


Schéma 8: a: 4-methoxyfenylboronová kyselina, Na_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O .

4.2.5 Fenyl derivát benzylbetulonátu IX

Fenyl derivát benzylbetulonátu **IX** byl připraven analogicky jako předešlé deriváty reakcí triflátu **IV** s benzenboronovou kyselinou (*Schéma 9*). Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. První reakce poskytla velmi nízký výtěžek (17 %) z důvodu znečištěné výchozí sloučeniny **IV** neznámou látkou. Reakce byla opakována s přečištěným triflátem **IV**. Výtěžek činil 64 %. Struktura derivátu **IX** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet benzylbetulonátu nalezeny multiplety při 7.35 až 7.12 ppm, odpovídající pěti vodíkům fenylu navázaného v poloze C-3. Multiplet při 5.27 ppm odpovídá vodíku na C-2.

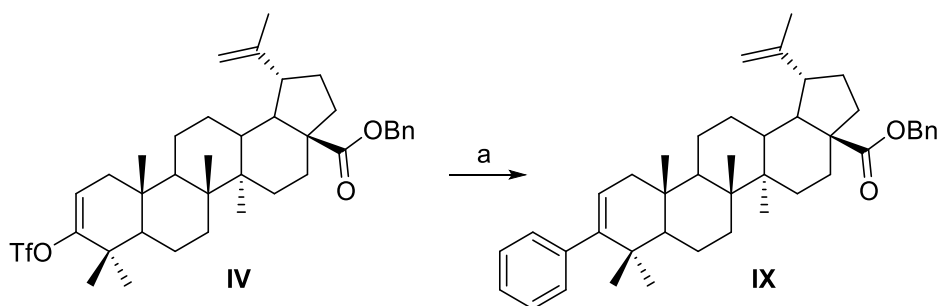


Schéma 9: a: benzenboronová kyselina, Na_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 1,4-dioxan, 2-propanol, H_2O .

4.3 Deprotekce benzylesterů

4.3.1 Tolylyl derivát kyseliny betulonové **X**

Výchozí sloučeninou pro deprotekcí byl tolylyl derivát benzylbetulonátu **V**, který byl po Suzuki-Miyaura cross-couplingu extrahován do EtOAc, zbaven rozpouštědel a bez dalšího čištění převeden do slzové baňky s inertním prostředím dusíku opatřené míchadlem. Následně byl do baňky přidán suchý EtOH, cyklohexa-1,4-dien (7 eq.) a Pd/C (*Schéma 10*). Reakční směs byla míchána a zahřívána na 50 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, mobilní fáze Hex/EtOAc 7:1. Po 20 hodinách již nedocházelo k další konverzi a i přes patrné zbytky nezreagované výchozí sloučeniny **V** byla reakční směs odsáta přes fritu (S3) s křemelinou, zbavena rozpouštědel a přečištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Výtěžek reakce byl 42 %.

Struktura sloučeniny **X** byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ¹H NMR spektru byly kromě signálů typických pro skelet kyseliny betulonové nalezeny dva multiplety při 7.02 a 6.97 ppm, odpovídající vodíkům aromatického jádra navázaného na C-3. Singlet při 2.28 ppm náleží CH₃ skupině tolylu, multiplet při 5.24 ppm náleží vodíku na C-2. Ve spektru již nebyly pozorovány píky charakteristické pro benzyl ester.

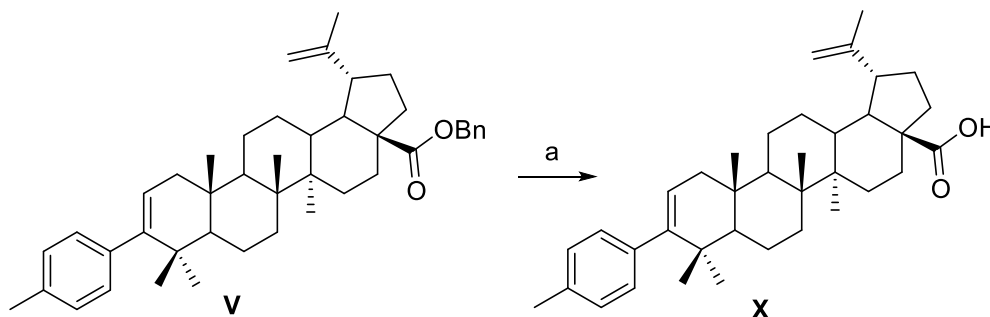


Schéma 10: a: cyklohexa-1,4-dien, Pd/C, EtOH.

4.3.2 Hydroxyfenyl derivát kyseliny betulonové **XI**

Deprotekce hydroxyfenyl derivátu kyseliny betulonové **VI** proběhla analogicky jako v případě předchozího derivátu za využití cyklohexa-1,3-dienu v bezvodém EtOH v přítomnosti Pd/C (*Schéma 11*); v případě použití alternativního cyklohexa-1,4-dienu reakce neprobíhá ani při použití 10 eq. zdroje vodíku. Výtěžek reakce byl po čištění sloupcovou chromatografií na silikagelu 42 %. Z ¹H NMR spektra je však patrné, že se kýžený produkt reakce nepodařilo dostatečně vyčistit. Ve spektru je vidět směs dvou derivátů v poměru 2:1, přičemž majoritně je zastoupena hydroxyfenylkyselina **XI**. V ¹H NMR spektru byly nalezeny dva multiplety vodíků aromatického jádra hydroxyfenylu při

6.54 a 6.30 ppm. Dále byl nalezen multiplet v oblasti 5.25 – 5.18 ppm odpovídající vodíku na C-2. Ve spektru již nebyly pozorovány píky charakteristické pro benzyl ester. ^{13}C NMR spektrum nebylo měřeno z důvodu přítomnosti druhého derivátu ve vzorku. Kvůli nedostatku času nebyla reakce opakována.

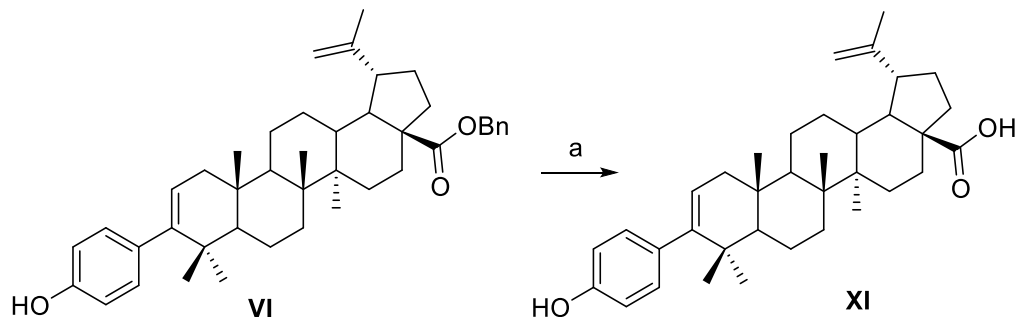


Schéma 11: a: cyklohexa-1,3-dien, Pd/C, EtOH.

4.3.3 Methoxyfenyl derivát kyseliny betulonové XII

Methoxyfenyl derivát kyseliny betulonové **XII** byl připraven analogicky podle výše zmíněného postupu reakcí derivátu **VIII** s cyklohexa-1,3-dienem v prostředí bezvodého EtOH a Pd/C (*Schéma 12*). Výtěžek po čištění sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze Hex/EtOAc + 0,1 % CH_3COOH) byl 55 %. Struktura derivátu **XII** nebyla potvrzena pomocí NMR díky špatné rozpustnosti, sloučenina byla nerozpustná nebo omezeně rozpustná v těchto rozpouštědlech: chloroform, methanol, acetonitril a DCM. Methoxyfenyl derivát **XII** byl rozpustný pouze v THF, avšak z důvodu nízké koncentrace látky ve vzorku nebylo spektrum sloučeniny **XII** v THF- d_8 ostré a píky byly jen velmi špatně viditelné. Struktura derivátu **XII** tak byla potvrzena pouze pomocí HRMS – viz experimentální část.

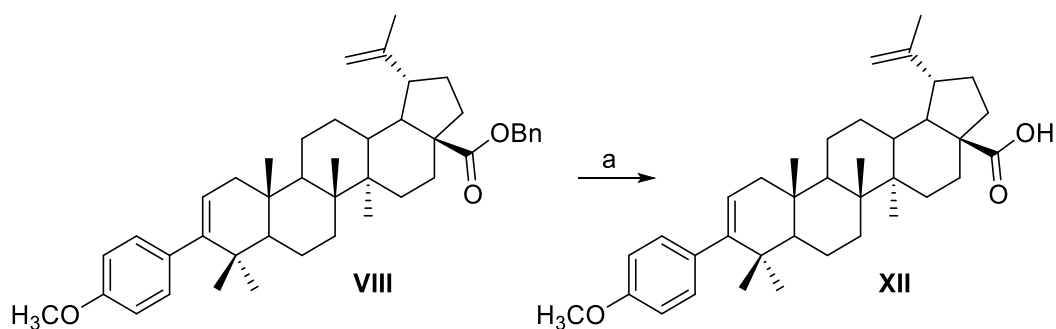


Schéma 12: a: cyklohexa-1,3-dien, Pd/C, EtOH.

4.3.4 Aminofenyl derivát kyseliny betulonové XIII

Deprotekce derivátu **VII** poskytovala dle výše zmíněného postupu – reakcí s cykloxa-1,3-dienem nulovou konverzí (monitorováno pomocí TLC, mobilní fáze Tol/Et₂O 30:1). Proto bylo potřeba najít alternativní metodu deprotekce, při které by byly zachovány ostatní funkční skupiny a násobné vazby v molekule.

Alternativní metodou deprotekce benzylesteru byla shledána dvoukroková reakce popsaná v literatuře¹⁶. V prvním kroku dochází k výměně benzyl esteru za silyl ester reakcí s TBDMSH. Ve druhém kroku je vzniklý silyl ester odštěpen pomocí TBAF za vzniku karboxylové kyseliny v celkovém výtěžku 96 % dle literatury¹⁶. Tato metoda byla aplikována na derivát **VII**.

V prvním kroku reagoval derivát **VII** se dvěma eq. TBDMSH, 0,2 eq. TEA a 0,25 eq. Pd(OAc)₂ v prostředí DCM při 60 °C. Reakce byla kontrolována pomocí TLC (mobilní fáze Tol/Et₂O 30:1). Po dvou hodinách bylo patrné, že k reakci nedochází. Z tohoto důvodu byly k reakční směsi přidány další dva eq. TBDMSH a 0,2 eq. TEA, reakční směs byla míchána při 60 °C další hodinu a následně zpracována (*Schéma 13*).

Reakční směs byla zfiltrována přes fritu (S3) se silikagelem a vrstvou křemeliny, promyta roztokem 25% EtOAc v hexanu a rozpouštědla byla odpařena na RVO. K odparku byla přidána koncentrovaná CH₃COOH, THF a voda. Reakční směs byla za r.t. ponechána míchat po dobu 1 hodiny, během které došlo k barevné změně z průhledné na žlutou, ale nevyloučila se sraženina popsaná v literatuře¹⁶. Po přidání dalšího množství destilované vody došlo k vyloučení malého množství bílé sraženiny, která byla odsáta přes fritu (S4), zbytek reakční směsi byl extrahován do EtOAc a rozpouštědla byla odpařena. Struktura silyl esteru **XIII** však nebyla potvrzena spektrálními daty (1H-NMR) ani v jednom ze zpracovaných vzorků, a proto bylo od této metody deprotekce upuštěno.

Další metodou přípravy derivátu **XIV** byla kontrolovaná redukce benzylesteru **VII** vodíkem za přítomnosti Pd/C v bezvodém systému DCM/MeOH (*Schéma 13*). Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze Hex/EtOAc + 0,1 % CH₃COOH). Reakce byla po 3 hodinách ukončena, aby nedocházelo k hydrogenaci násobných vazeb na molekule, přestože byla dle TLC v reakční směsi stále přítomna výchozí sloučenina **VII**. Rozpouštědla byla odpařena a surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s vrstvou křemeliny. Reakce poskytla derivát **XIV** ve výtěžku 18 %. Nízký výtěžek byl způsoben obtížnou purifikací anilinového derivátu a neúplnou konverzí výchozí látky. Struktura sloučeniny **XIV** byla potvrzena

pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR byl nalezen signál odpovídající NH_2 skupině na aromatickém jádru při 4.90 ppm a skupina multiplétů při 6.88 až 6.23 ppm náležící čtyřem vodíkům na aromatickém jádře anilinového substituentu. Multiplét při 5.20 – 5.10 ppm náleží vodíku na C-2. Ve spektru již nebyly pozorovány píky charakteristické pro benzyl ester.

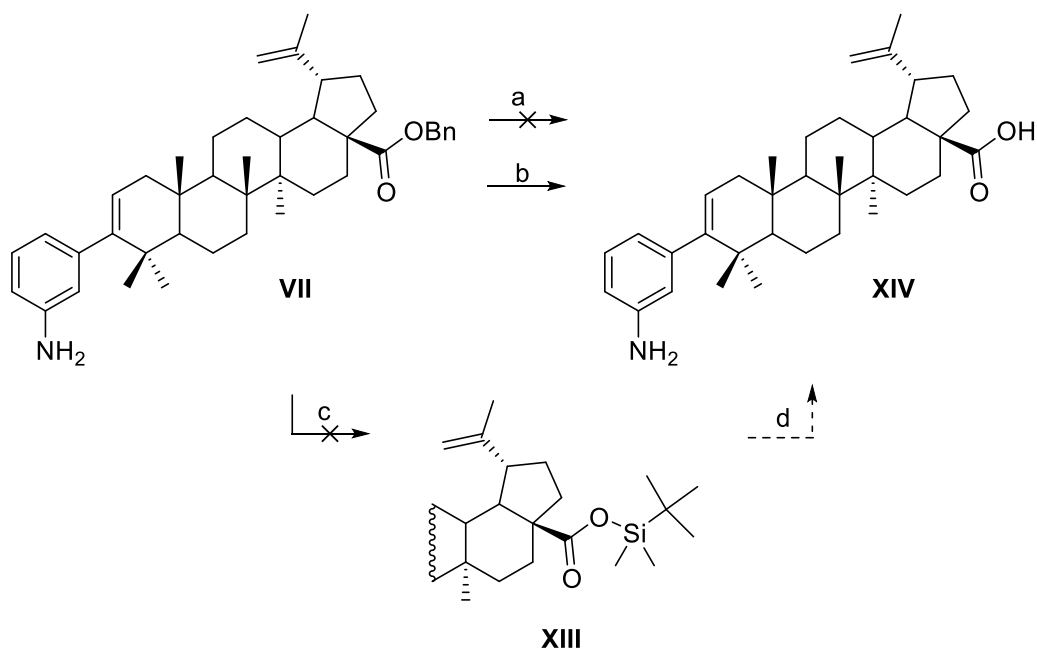


Schéma 13: a: cykloxa-1,3-dien, Pd/C, EtOH; b: H_2 , Pd/C, DCM/MeOH; c: TBDMSH, DCM, TEA, Pd(OAc) $_2$; d: TBAF, H_2O /1,4-dioxan.

5. CYTOTOXICKÁ AKTIVITA PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

Všechny připravené deriváty benzylbetulonátu (**V** – **IX**) byly testovány *in vitro* pomocí MTT testu na vysoce senzitivní buněčné linii CCRF/CEM (T-lymfoblastická leukémie). Připravené deriváty byly dále testovány na sedmi nádorových liniích různého histogenetického původu: A549 (lidský adenokarcinom plic), HCT116 a HCT116p5 (lidská rakovina střev), K562 a K562-TAX (chronická myeloidní leukémie), U2OS (osteosarkom) a CEM-DNR (T-lymfoblastická leukémie, daunorubicin rezistentní) a na dvou nenádorových liniích lidských fibroblastů (BJ a MRC-5). Deriváty benzylbetulonátu **V** – **IX** měly dle očekávání hodnotu IC_{50} vyšší než $50 \mu M$ a jsou shledány jako cytotoxicky neaktivní.

Sloučeniny **X** a **XIV** s volnou karboxylovou skupinou, která je esenciální pro cytotoxicitu derivátů kyseliny betulinové (**I**), jsou v současné době teprve testovány. U těchto derivátů se předpokládá, že by měly být cytotoxicky aktivní (hodnota IC_{50} menší než $50 \mu M$).

ZÁVĚR

1. Byla vypracována literární rešerše.
2. Byly připraveny výchozí sloučeniny **II**, **III** a **IV** v dostatečném množství.
3. Byla připravena sada derivátů benzylbetulonátu **V**, **VI**, **VII**, **VIII** a **IX**.
4. Byly připraveny deriváty s volnou -COOH skupinou **X**, **XI**, **XII** a **XIV**.
5. Připravené deriváty benzylbetulonátu (**V-IX**) byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu a byly dle předpokladu shledány neaktivní (hodnota $IC_{50} > 50 \mu M$). Deriváty **X** a **XIV** jsou v současné době testovány a výsledky testů ještě nejsou známy.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

OBECNÉ POZNÁMKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL (500 MHz) za laboratorní teploty. Jako rozpouštědlo pro většinu vzorků byl použit CDCl_3 . Pro měření spekter derivátu **X** byl použit deuterovaný THF, pro derivát **XIV** byl použit deuterovaný DMSO. Chemické posuny spekter byly referencovány vůči signálu reziduálního CHCl_3 v CDCl_3 v ^1H NMR při δ 7.27, v ^{13}C 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 vyhodnocována pomocí programu MestReNova x64.

Hmotnostní spektra s PDA detektorem byla měřena na přístroji Aquity UPLC-MS v přítomnosti MeOH.

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 postřikem 10% kyselinou sírovou a zahřátím na 150-200 °C.

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

- A: Hex / EtOAc 21:1 (obj.)
- B: Tol / Et₂O 30:1 (obj.)
- C: Hex / EtOAc + CH₃COOH 5:1 (obj.)
- D: Hex / EtOAc 5:1 (obj.)
- E: Hex / Tol 1:1 (obj.)
- F: Hex / EtOAc 30:1 (obj.)

V případě, že byla sloučenina čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu, použitá mobilní fáze je uvedena u každého experimentu. Pro sloupcovou chromatografií byl využíván Kieselgel 60.

Rozpouštědla byla odpařována na RVO Büchi Rotovapor R-200.

Připravené deriváty byly testovány na cytotoxickou aktivitu na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha, Ph.D. následujícím postupem:

Testovaná sloučenina byla přidána ke tkáňové kultuře buněk T-lymfoblastické leukémie CEM v šesti různých koncentracích. Vzorky byly inkubovány po dobu 72 hodin při 37 °C za přítomnosti 5% atmosféry CO₂ a 100% vlhkosti. Do každé jamky testovacího

panelu byl přidán MTT-[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid] a vzorek byl inkubován další 4 hodiny. Ukončení inkubace nastalo přidáním dodekansulfonátu sodného. Procento přeživajících buněk bylo stanoveno spektrofotometricky při 540 nm. Poté byla z křivek dávkové závislosti stanovena hodnota IC₅₀ (koncentrace usmrcující 50 % nádorových buněk).

Boronové kyseliny, benzylbromid, Pd(OAc)₂, PdCl₂(PPh₃)₂, Pd/C, TBDMSH, KHMDs, Tf₂NPh, cyklohexa-1,4-dien, cyklohexa-1,3-dien, dichroman sodný dihydrát, EtOH, byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, s.r.o.

DMF, TEA, THF, DCM, acetonitril, acetanhydrid, 2-propanol, diethylether, ethylacetát, hexan, uhličitan sodný, 1,4-dioxan, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, MgSO₄, byly zakoupeny u firmy Lach-ner, s.r.o.

Obecný postup zpracování reakcí:

- A Reakční směs byla extrahována do EtOAc. Organické podíly byly spojeny a vytřepány s NH₄Cl a solankou, vysušeny pomocí MgSO₄, zfiltrány a rozpouštědla byla odpařena na RVO.
- B Reakční směs byla odsáta přes fritu (S3), která byla pokryta vrstvou křemeliny. Rozpouštědla byla odpařena na RVO.

1. Příprava benzylbetulinátu (II)

Do suspenze kyseliny betulinové (**I**) (5,0 g; 0,011 mol) v DMF (60 ml) a acetonitrilu (10 ml) byl přidán uhličitan draselný (3,04 g) a benzylbromid (2,25 ml). Reakce probíhala za stálého míchání při teplotě 60 °C a byla ukončena po 3,5 hodinách. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze D).

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 MgSO₄, zfiltrány a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Reakcí byl získán benzylester kyseliny betulinové (**II**) (5,74 g; 97 %) v podobě bílých krystalků. ¹H NMR spektrum bylo shodné se spektrem autentického preparátu.⁵⁴

2. Příprava benzylbetulonátu (III)

Do baňky s kulatým dnem byla přenesena suspenze benzylesteru **II** (5,74 g; 0,012 mol) v 1,4-dioxanu (139 ml), ke které byla přidána kyselina octová (44 ml), acetanhydrid (19 ml) a přisypán octan sodný (2,18 g; 0,016 mol) a dihydrát dichromanu

sodného (5,73 g; 0,019 molů). Reakce byla za stálého míchání a při r.t. ponechána reagovat přes noc. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze D).

Reakční směs byla nalita do pětinasobného objemu vody a extrahována 3x do EtOAc. Spojené organické fáze byly promyty roztokem hydrogenuhličitanu a solankou, byly vysušeny $MgSO_4$ a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Surový benzylbetulonát **III** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl Hex/EtOAc 5:1. Byly získány bílé krystalky sloučeniny **III** (3,97 g; 69 %). 1H NMR spektrum bylo shodné se spektrem autentického preparátu.⁵⁴

3. Příprava enoltriflátu benzylbetulonátu **IV**

Benzylbetulonát (**III**) (2 g; 0,0057 mol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (20 ml), a přenesen stříkačkou do vyžíhané a pod proudem dusíku ochlazené baňky opatřené míchadlem a septem. Baňka s výchozí látkou byla ponořena do lázně obsahující směs kapalného dusíku a acetonu (- 78 °C) a chlazená po dobu 30 minut. Poté byly k výchozí látce po kapkách přidány 2 eq. KHMDS (14,3 ml; 0,0114 molů) a reakční směs byla míchána 60 min. Následně bylo do reakční směsi přidáno 1,1 eq. Tf_2NPh (1,44 g; 0,00627 molů) rozpuštěného v bezvodém THF (9,4 ml). V průběhu 30 min došlo k barevné změně reakční směsi z průhledné na sytě červenou. Výchozí látka byla po třech hodinách spotřebována (monitorováno pomocí TLC, mobilní fáze E) a reakční směs byla zpracována postupem A. Surový enol-triflát **IV** byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl Hex/EtOAc 50:1. Bylo získáno 1,879 g (74 %) derivátu **IV**. 1H NMR spektrum bylo shodné se spektrem autentického preparátu.¹⁶

Obecný postup přípravy derivátů benzylbetulonátu pomocí Suzuki-Miyura cross-couplingu

Všechny reakce byly prováděny ve vyžíhaných a pod proudem dusíku ochlazených slzových baňkách opatřených míchadlem a septem v inertním prostředí dusíku nebo argonu. Pomocí injekční stříkačky byly do baňky postupně přidávány všechny komponenty: triflát **IV** (200 mg; 0,295 mmol) rozpuštěný v 1,4-dioxanu (1,2 ml), 2 eq. příslušné boronové kyseliny rozpuštěné nebo suspendované v 2-propanolu (1,2 ml) a uhličitan sodný (109 mg; 1,17 mmol) rozpuštěný ve vodě (0,6 ml). Na závěr byl do reakční směsi přisypán katalyzátor $PdCl_2(PPh_3)_2$ (2 molární procenta; 4-5 mg) a septum bylo nahrazeno zpětným chladičem.

Reakční směs byla ponechána reagovat přes noc za stálého míchání a při teplotě 90 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (pro deriváty **V** a **VIII** mobilní fáze A, pro deriváty **VI** a **VII** mobilní fáze B, pro derivát **IX** mobilní fáze F).

Reakční směs byla zpracována podle obecného postupu zpracování metodou A. Všechny produkty byly čištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fáze je vždy uvedena u experimentu.

4. Příprava tolyl derivátu benzylbetulonátu **V**

Podle obecného postupu byl reakcí triflátu **IV** (200 mg; 0,295 mmol) s 4-methylfenylboronovou kyselinou (80,5 mg; 0,59 mmol) a uhličitanem sodným (109,9 mg; 1,17 mmol) připraven tolyl derivát **V** čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl Hex/EtOAc 21:1. Bylo získáno 84 mg (46 %) derivátu **V**. ^1H NMR spektrum (500 MHz): δ 7.40 – 7.32 (m, 5H), 7.08 – 7.07 (m, 2H), 7.03 – 7.01 (m, 2H), 5.28 – 5.26 (m, 1H), 5.19 – 5.17 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 5.13 – 5.10 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.76 – 4.74 (m, 1H), 4.63 – 4.61 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.33 – 2.28 (m, 1H), 2.26 – 2.33 (m, 1H), 2.11 – 2.06 (m, 1H), 1.71 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.84 (s, 3H). ^{13}C NMR spektrum (101 MHz): δ 176.01, 150.76, 146.80, 140.83, 136.65, 135.48, 130.05, 128.64, 128.39, 128.21, 127.94, 123.69, 109.73, 65.88, 56.77, 53.05, 49.68, 49.56, 47.07, 42.51, 41.99, 40.64, 38.53, 37.63, 37.10, 36.39, 33.76, 32.22, 30.73, 29.74, 29.56, 25.83, 21.44, 21.23, 21.13, 20.01, 19.54, 16.56, 15.68, 14.80. HRMS: vypočteno pro $\text{C}_{44}\text{H}_{59}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 619,4510, nalezeno 619,4510.

5. Příprava hydroxyfenylderivátu benzylbetulonátu **VI**

Reakcí triflátu **IV** (200 mg; 0,295 mmol) se 2 eq. 4-hydroxyfenylboronové kyseliny (80,3 mg; 0,58 mmol) a uhličitanem sodným (109,9 mg; 1,17 mmol) byl podle obecného postupu připraven derivát **VI** čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl Tol/Et₂O 30:1. Bylo získáno 111 mg (59 %) derivátu **VI**. ^1H NMR spektrum (500 MHz): δ 7.40 – 7.29 (m, 5H), 7.00 – 6.96 (m, 2H), 6.74 – 6.70 (m, 2H), 5.26 (m, 1H), 5.17 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 5.11 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 4.75 – 4.71 (m, 1H), 4.62 – 4.58 (m, 1H), 3.04 (td, $J = 10.9, 4.7$ Hz, 1H), 2.32 – 2.21 (m, 2H), 2.06 (dd, $J = 17.0, 6.4$ Hz, 1H), 1.95 – 1.86 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). ^{13}C NMR spektrum (101 MHz): δ 176.09, 153.89, 150.76, 146.37, 136.61, 136.33, 131.29, 129.81, 128.64, 128.39, 128.22, 124.03, 123.83, 114.07, 109.73, 65.92, 56.77, 53.03, 49.67, 49.55, 47.07, 42.50, 42.00, 40.63, 38.54, 37.70, 37.10,

36.37, 33.75, 32.21, 30.72, 29.73, 29.52, 25.82, 21.43, 21.08, 20.02, 19.53, 16.55, 15.67, 14.79. HRMS: vypočteno pro $C_{43}H_{57}O_3$ $[M+H]^+$ 621,4302, nalezeno 621,4302.

6. Příprava aminofenylderivátu benzybetulonátu VII

Podle obecného postupu byl reakcí enol-triflátu **IV** (200 mg; 0,295 mmol) s monohdrátem 3-aminofenylboronové kyseliny (52 mg; 0,33 mmol) a uhličitanem sodným (109,9 mg; 1,17 mmol) připraven derivát **VII** čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází Hex/EtOAc 21:1. Bylo získáno 71 mg (39%) derivátu **VII**. 1H NMR spektrum (500 MHz): δ 7.40 – 7.27 (m, 5H), 7.06 – 7.02 (m, 1H), 6.61 – 6.57 (m, 1H), 6.57 – 6.54 (m, 1H), 6.50 – 6.48 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.16 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 4.75 – 4.71 (m, 1H), 4.62 – 4.58 (m, 1H), 3.04 (td, $J = 10.9, 4.7$ Hz, 1H), 2.32 – 2.20 (m, 2H), 2.06 (dd, $J = 17.0, 6.3$ Hz, 1H), 1.69 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.93 (s, 6H), 0.92 (s, 3H), 0.82 (s, 3H). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz): δ 176.04, 150.75, 146.93, 144.98, 144.61, 136.62, 129.78, 128.64, 128.38, 128.21, 128.07, 127.61, 123.75, 123.42, 121.37, 117.68, 113.35, 109.73, 100.04, 65.89, 56.76, 53.06, 49.66, 49.54, 47.06, 42.48, 41.92, 40.62, 38.52, 37.56, 37.09, 36.36, 33.73, 32.20, 30.71, 29.70, 25.80, 21.43, 21.26, 19.96, 19.52, 16.56, 15.66, 14.79. HRMS: vypočteno pro $C_{43}H_{58}O_2N_1$ $[M+H]^+$ 620,4462, nalezeno 620,4466.

7. Příprava metoxyfenyl derivátu benzybetulonátu VIII

Reakcí triflátu **IV** (200 mg; 0,295 mol) s kyselinou 4-methoxyfenylboronovou (89,7 mg; 0,59 mmol) a uhličitanem sodným (109 mg; 1,17 mmol) byl podle obecného postupu získán derivát **VIII** čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl Hex/EtOAc 21:1. Bylo získáno 76,6 mg (41 %) derivátu **VIII**. 1H NMR spektrum (500 MHz): δ 7.40 – 7.30 (m, 5H), 7.06 – 7.01 (m, 2H), 6.82 – 6.77 (m, 2H), 5.26 (m, 1H), 5.17 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 4.62 – 4.59 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.05 (td, $J = 10.8, 4.7$ Hz, 1H), 2.33 – 2.20 (m, 2H), 2.06 (dd, $J = 17.0, 6.4$ Hz, 1H), 1.95 – 1.83 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.82 (s, 3H). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz): δ 175.99, 157.95, 150.76, 146.43, 136.64, 136.20, 131.10, 128.64, 128.39, 128.20, 123.97, 112.59, 109.73, 65.87, 56.75, 55.30, 53.03, 49.67, 49.54, 47.06, 42.49, 42.00, 40.62, 38.51, 37.72, 37.09, 36.37, 33.74, 32.20, 30.71, 29.85, 29.73, 29.53, 25.81, 21.43, 21.09, 20.02, 19.53, 16.57, 15.67, 14.79. HRMS: vypočteno pro $C_{44}H_{59}O_3$ $[M+H]^+$ 635,4459, nalezeno 635,4454.

8. Příprava fenyl derivátu benzylbetulonátu IX

Podle obecného postupu byl reakcí triflátu **IV** (400 mg; 0,59 mmol) s fenylboronovou kyselinou (144 mg; 1,18 mmol) a uhličitanem sodným (250 mg; 2,36 mmol) připraven derivát **IX** čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází Hex/EtOAc 30:1. Bylo získáno 231 mg (64 %) derivátu **IX**. ^1H NMR spektrum (500 MHz): δ 7.40 – 7.30 (m, 5H), 7.26 – 7.19 (m, 3H), 7.14 – 7.10 (m, 2H), 5.27 (m, 1H), 5.17 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 5.11 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 4.80 – 4.69 (m, 1H), 4.65 – 4.56 (m, 1H), 3.04 (td, $J = 10.9, 4.8$ Hz, 1H), 2.32 – 2.21 (m, 2H), 2.08 (dd, $J = 17.0, 6.4$ Hz, 1H), 1.69 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz): δ 176.01, 150.77, 146.99, 143.79, 136.69, 130.19, 128.66, 128.41, 128.22, 127.24, 126.06, 123.80, 109.73, 77.41, 77.16, 76.91, 65.89, 56.80, 53.10, 49.73, 49.61, 47.10, 42.54, 41.99, 40.68, 38.57, 37.65, 37.11, 36.42, 33.78, 32.24, 30.77, 29.76, 29.58, 25.86, 21.48, 21.14, 20.01, 19.56, 16.57, 15.70, 14.81. HRMS: vypočteno pro $\text{C}_{43}\text{H}_{57}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 605,4353, nalezeno 605,4353.

Obecný postup přípravy derivátů X-XII s volnou COOH skupinou

Suzuki-Miyaura cross-couplingem připravený derivát benzylbetulonátu (**V** – **VIII**) byl zbaven rozpouštědel na RVO a bez dalšího čištění byl převeden do slzové baňky s inertním prostředím dusíku opatřené míchadlem. Do baňky byl pomocí injekční stříkačky přidán suchý EtOH (5-6 ml) a reakční směs byla probublána dusíkem po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 7 eq. cyklohexa-1,3-dienu a Pd/C a septum bylo nahrazeno zpětným chladičem. Reakční směs byla míchána a zahřívána při 50 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC.

Reakční směs byla zpracována podle obecného postupu zpracování metodou B. Všechny produkty byly čištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fáze je vždy uvedena u experimentu.

9. Příprava tolyl derivátu kyseliny betulonové X

Podle obecného postupu byl reakcí derivátu **V** (180 mg; 0,29 mmol) s cyklohexa-1,4-dienem (180 μl ; 1,25 mmol) a Pd/C (180 mg) v suchém EtOH (6 ml) připraven derivát **X** čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází Hex/EtAOc 7:1. Bylo získáno 66 mg (42 %) derivátu **X**. ^1H NMR spektrum (500 MHz): δ 7.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 5.24 (m, 1H), 4.76 – 4.69 (m, 1H), 4.61 – 4.55 (m, 1H), 3.08 (td, $J = 10.7, 4.4$ Hz, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.04 – 1.03 (m, 6H), 1.01 (s,

3H), 0.93 – 0.92 (m, 6H). HRMS: vypočteno pro C₃₇H₅₁O₂ [M-H]⁻ 527,3884, nalezeno 527,3862.

10. Příprava hydroxyfenyl derivátu kyseliny betulonové XI

Reakcí derivátu VI (105 mg; 0,169 mmol) s cyklohexa-1,3-dienem (112 μl; 1,184 mmol) a Pd/C (105 mg) v suchém EtOH (5 ml) byl připraven derivát XI čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází Tol/Et₂O + 0,1 % CH₃COOH 5:1. Bylo získáno 38 mg (42 %) derivátu XI. ¹H NMR spektrum (500 MHz): δ 6.94 – 6.86 (m, 2H), 6.70 – 6.64 (m, 2H), 5.25 – 5.18 (m, 1H), 4.71 – 4.67 (m, 1H), 4.58 – 4.54 (m, 1H), 2.99 (dd, *J* = 10.8, 4.7 Hz, 1H), 2.30 – 2.16 (m, 3H), 2.02 (dd, *J* = 17.0, 6.4 Hz, 1H), 1.66 (s, 3H), 0.97 – 0.94 (m, 6H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.85 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz): δ 146.14, 130.66, 123.31, 113.52, 109.13, 52.61, 46.62, 41.54, 40.18, 38.17, 37.24, 36.77, 35.91, 33.29, 31.87, 30.26, 29.36, 29.01, 25.34, 20.55, 19.55, 18.98, 16.02, 15.26, 14.28. HRMS: vypočteno pro C₃₆H₅₁O₃ [M+H]⁺ 531,3833, nalezeno 531,3833.

11. Příprava methoxyfenylderivátu kyseliny betulonové XII

Podle obecného postupu byl reakcí derivátu VIII (154 mg; 0,243 mmol) s cyklohexa-1,3-dienem (162 μl; 1,701 mmol) a Pd/C (154 mg) v suchém EtOH (5 ml) připraven derivát XII čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází Hex/EtOAc + CH₃COOH 5:1. Bylo získáno 134 mg derivátu XII. HRMS: vypočteno pro C₃₇H₅₃O₃ [M+H]⁺ 545,3989, nalezeno 545,3990.

12. Příprava aminofenylderivátu kyseliny betulonové XIV

Baňka s derivátem IX (104 mg; 0,168 mmol) opatřená míchadlem byla evakuována na vakuové lince a naplněna argonem. Poté bylo přes septum přidáno 1,5 ml bezvodého DCM a 0,5 ml bezvodého MeOH a reakční směs byla 5 minut probublávána dusíkem. Následně bylo přisypáno 3,5 mol% katalyzátoru Pd/C (6,2 mg) a reakční směs byla 3 h probublávána vodíkem. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze C).

Rozpouštědla byla odpařena a surový produkt XIV byl pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu oddělen od nezreagované výchozí látky IX. Mobilní fází byl Hex/EtOAc + CH₃COOH 5:1. Bylo získáno 17 mg (18 %) derivátu XIV. ¹H NMR spektrum (500 MHz): δ 6.91 – 6.86 (m, 1H), 6.43 – 6.39 (m, 1H), 6.34 – 6.31 (m, 1H), 6.26 – 6.21 (m, 1H), 5.20 – 5.10 (m, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.76 – 4.63 (m, 1H), 4.62 – 4.52 (m, 1H), 3.05 – 2.88 (m, 1H), 2.28 (ddd, *J* = 15.4, 10.1, 3.4 Hz, 1H), 2.17 – 2.09 (m, 1H),

2.02 (dd, $J = 17.1, 6.5$ Hz, 1H), 1.66 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.87 (s, 3H). ^{13}C NMR spektrum (126 MHz): δ 177.25, 150.34, 147.51, 146.98, 143.59, 127.53, 122.12, 117.55, 115.65, 111.79, 109.59, 55.49, 52.45, 48.82, 48.49, 46.58, 41.99, 41.17, 40.42, 37.76, 36.95, 36.31, 35.77, 33.14, 31.64, 30.11, 29.46, 29.22, 28.97, 25.18, 22.07, 21.04, 20.92, 19.37, 18.99, 16.18, 15.41, 14.33. HRMS: vypočteno pro $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{O}_2\text{N}_1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 530,3993, nalezeno 2530,3990.

POUŽITÁ LITERATURA

- (1) 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.
- (2) Dvořáková, M.; Valterová, I.; Vaněk, T. *Chem. List.* **2011**, *105* (11), 839–845.
- (3) Kodíček, M.; Valentová, O.; Hynek, R. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*; PRAHA: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 2015.
- (4) Breitmaier, E. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2006.
- (5) Richter, S.; Kathrotia, T.; Naumann, C.; Kick, T.; Slavinskaya, N.; Braun-Unkhoff, M.; Riedel, U. *Fuel* **2018**, *215*, 22–29.
- (6) Green, S.; Friel, E. N.; Matich, A.; Beuning, L. L.; Cooney, J. M.; Rowan, D. D.; MacRae, E. *Phytochemistry* **2007**, *68* (2), 176–188.
- (7) Cui, L.; Mharakurwa, S.; Ndiaye, D.; Rathod, P. K.; Rosenthal, P. J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *93* (Suppl 3), 57–68.
- (8) Ho, W. E.; Peh, H. Y.; Chan, T. K.; Wong, W. S. F. *Pharmacol. Ther.* **2014**, *142* (1), 126–139.
- (9) Aminimoghadamfarouj, N.; Nematollahi, A. *Molecules* **2017**, 1–13.
- (10) Ahmadi, P.; Haruyama, T.; Kobayashi, N.; Voogd, J. De; Tanaka, J. **2017**, *65* (9), 874–877.
- (11) Seamon, K. B.; Padgett, W.; Daly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78* (6), 3363–3367.
- (12) Mudit, M.; El Sayed, K. A. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (11), 1745–1760.
- (13) Ledroit, V.; Debitus, C.; Ausseil, F.; Raux, R.; Menou, J. L.; Hill, B. T. *Pharm. Biol.* **2004**, *42* (6), 454–456.
- (14) Connolly, J. D.; Hill, R. a. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22* (June), 230–248.
- (15) Misra, R. C.; Sharma, S.; Sandeep, S.; Garg, A.; Chanotiya, C. S.; Ghosh, S. *New*

- Phytol.* **2017**, 214 (2), 706–720.
- (16) Regueiro-Ren, A.; Liu, Z.; Chen, Y. et al. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7 (6), 568–572.
- (17) Borkova, L.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Burianova, R.; Hajduch, M.; Sarek, J.; Popa, I.; Urban, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 121, 120–131.
- (18) Bolm, C. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (12), 5221–5223.
- (19) Bäckvall, J.-E. *Sci. Backgr. Nobel Prize Chem.* **2010**, 50005 (October), 1–12.
- (20) Hocek, M. *Chem. List.* **2003**, 97 (12), 1145–1150.
- (21) Stille, J. K. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1986**, 25, 508–524.
- (22) Negishi, E. ichi; King, A. O.; Okukado, N. *Journal of Organic Chemistry.* 1977.
- (23) King, A. O.; Okukado, N.; Negishi, E. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, No. 19, 683.
- (24) Sonogashira, K. *J. Organomet. Chem.* **2002**, 653 (1–2), 46–49.
- (25) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16 (50), 4467–4470.
- (26) Tamao, K.; Sumitani, K.; Kumada, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94 (12), 4374–4376.
- (27) Corriu, R. J. P.; Masse, J. P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, No. 144, 144.
- (28) Miyaura, N.; Yamada, K. *Tet. Lett.* **1979**, No. 36, 3437–3440.
- (29) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, 95 (7), 2457–2483.
- (30) Meijere de, A.; Diederich, F. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*, Second, Co.; de Meijere, A., Diederich, F., Eds.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2004.
- (31) Barder, T. E.; Walker, S. D.; Martinelli, J. R.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (13), 4685–4696.
- (32) Mandali, P. K.; Chand, D. K. *Catal. Commun.* **2013**, 31, 16–20.

- (33) Uenishi, J. ichi; Beau, J. M.; Armstrong, R. W.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (15), 4756–4758.
- (34) Wright, S. W.; Hageman, D. L.; McClure, L. D. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (20), 6095–6097.
- (35) Trumbull, E. R.; Bianchi, E.; Eckert, D. J.; Wiedhopf, R. M.; Cole, J. R. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65* (9), 1407–1408.
- (36) Urban, M.; Sarek, J.; Klinot, J.; Korinkova, G.; Hajduch, M. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67* (7), 1100–1105.
- (37) Ali-seyed, M.; Jantan, I. **2016**, 517–536.
- (38) Dehelean, C. A.; Şoica, C.; Ledeti, I.; Aluaş, M.; Zupko, I.; Găluşcan, A.; Cinta-Pinzaru, S.; Munteanu, M. *Chem. Cent. J.* **2012**, *6* (1), 1–9.
- (39) Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24* (1), 90–114.
- (40) Tapondjou, L. a; Lontsi, D.; Sondengam, B. L.; Choi, J.; Lee, K.-T.; Jung, H.-J.; Park, H.-J. *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26* (2), 143–146.
- (41) Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C. H.; Garrett, P. E.; Lee -, K. H. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (5), 1016–1017.
- (42) Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I. S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W.; Fong, H. H.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; et al. *Nat Med* **1995**, *1* (10), 1046–1051.
- (43) Schmidt, M. L.; Pezzuto, J. M. **2010**, *33* (12), 0–3.
- (44) Goswami, P.; Paul, S.; Banerjee, R.; Kundu, R.; Mukherjee, A. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2018**, *828*, 1–9.
- (45) Fulda, S.; Scaffidi, G.; Susin, S. A.; Krammer, P. H.; Kroemer, G.; Peter, M. E.; Debatin, K. M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (51), 33942–33948.
- (46) Fulda, S. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9* (6), 1096–1107.
- (47) Bildziukevich, U.; Rárová, L.; Šaman, D.; Wimmer, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 41–50.

- (48) Csuk, R.; Stark, S.; Nitsche, C.; Barthel, A.; Siewert, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 337–345.
- (49) Cui, H.-W.; He, Y.; Wang, J.; Gao, W.; Liu, T.; Qin, M.; Wang, X.; Gao, C.; Wang, Y.; Liu, M.-Y.; Yi, Z.; Qiu, W.-W. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 240–248.
- (50) Mukherjee, R.; Jaggi, M.; Rajendran, P.; Siddiqui, M. J. .; Srivastava, S. K.; Vardhan, A.; Burman, A. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (9), 2181–2184.
- (51) Vlk, M.; Urban, M.; Elbert, T.; Sarek, J. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, *298* (2), 1149–1157.
- (52) You, Y. J.; Kim, Y.; Nam, N. H.; Ahn, B. Z. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (19), 3137–3140.
- (53) Grishko, V. V.; Tolmacheva, I. A.; Nebogatikov, V. O.; Galaiko, N. V.; Nazarov, A. V.; Dmitriev, M. V.; Ivshina, I. B. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 629–639.
- (54) 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.
- (55) Borková, L.; *Nepublikované výsledky.*