

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE



**SYNTÉZA CYTOTOXICKY AKTIVNÍCH DERIVÁTŮ
TERPENŮ S VYUŽITÍM CLICK REAKCÍ**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Veronika Šidová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Já, Bc. Veronika Šidová, prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem RNDr. Milana Urbana, Ph.D. a že jsem veškerou použitou literaturu citovala na konci práce.

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

V Olomouci dne 17. 11. 2014

.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. za cenné odborné rady a připomínky, trpělivé vedení a veškerý věnovaný čas při zpracovávání řešené tematiky.

Dále pak Mgr. Igoru Popovi, CSc. za měření NMR spekter a za pomoc při jejich interpretaci.

Mé velké díky také patří kolegům z Katedry organické chemie a ÚMTM, především pak spolupracovníkům z týmu RNDr. Milana Urbana, PhD., jejichž rady a podněty mi byly inspirací.

V neposlední řadě bych také ráda poděkovala mé rodině, bez jejíž laskavé podpory a pochopení by tato práce nevznikla

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Bc. Veronika Šidová

Název práce: Syntéza cytotoxicky aktivních derivátů terpenů s využitím click reakcí

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita
Palackého v Olomouci

Školitel: RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt:

Předložená diplomová práce se zabývá syntézou nových derivátů triterpenů modifikovaných v poloze 30 pomocí Huisgenovy cykloadice. Z ochráněné kyseliny betulínové a betulínu byly připraveny azidy a jejich cykloadice s komerčními alkyny poskytla sérii nových derivátů, které byly dány na měření cytotoxické aktivity na pracoviště LEM. Práce obsahuje úvod do tématiky a přehled analogických postupů a sloučenin známých z literatury, následuje teoretická část, experimentální část a závěr. Celkem bylo připraveno 30 nových sloučenin.

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Bc. Veronika Šidová

Title: Synthesis of cytotoxic active derivatives of terpenes using Click reaction

Type of thesis: Master's

Department: Department of organic chemistry, Faculty of Science, Universitas Palacky in Olomouc

Supervisor: RNDr. Milan Urban, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract:

This diploma thesis describes the synthesis of new derivatives of triterpenes modified in the position 30 by Huisgen cycloaddition. Library of new derivatives was prepared from protected betulin and betulinic acid by cycloaddition of azides and alkynes and all compounds were provided for testing of their cytotoxic activity to Laboratory of Experimental Medicine. The work contains an introduction to the topic and outline procedures and literature research, the theoretical part, experimental part and conclusion. Thirty new compounds were prepared.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
AIBN	azobisisobutyronitril
AZT	azidothymidin
BA	betulinová kyselina
BE	betulin
BCL-2	rodina genů a proteinů podílejících se na kontrole apoptózy v buňkách
CC	kolonová chromatografie
DCC	N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIPEA	N,N'-diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EGFR	epidermální růstový faktor
equiv.	ekvivalent
EtOAc	ethylacetát
GLYM	dimethoxyethan
Me	methyl
MeCN	acetonitril
NBS	N-bromsukcinimid
Ph	fenyl
ROS	reaktivní formy kyslíku
RVO	rotační vakuová odparka
r.t.	laboratorní teplota
SREBP	sterolový regulační element-vazebný protein
THF	tetrahydrofuran
t.t.	teplota tání

VEGFR vaskulární endoteliální růstový faktor

SEZNAM POUŽITÝCH NÁDOROVÝCH LINIÍ

A 2780 nádorová linie lidských ovariálních buněk
A 431 nádorová linie epidermálních buněk s abnormálně exprimovanou úrovní EGFR
Bel-7402 nádorová linie lidských hepatálních buněk
HepG2 nádorová linie lidských hepatálních buněk
KB nádorová linie lidských buněk obsahující sekvence papilomaviru 18
MEL-1,2,4 nádorová linie hlodavčích erythroleukemických buněk
P388 nádorové linie myších leukemických buněk rezistentních vůči Menogarilu

OBSAH

SOUČASNÝ STAV STUDOVANÉ PROBLEMATIKY	10
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	12
TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1. Úvod do studované problematiky	13
1.1. Triterpeny	13
1.1.1. Kyselina betulínová (III)	14
1.1.1.1. <i>Mechanismus cytotoxického účinku</i>	15
1.1.2. Betulin (IV).....	16
1.2. Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice.....	17
1.2.1. Cu(I)-katalyzovaná azido-alkynová cykloadice	18
1.3. Lupanové triterpeny obsahující 1,2,3-triazolové substituenty	18
1.3.1. Lupanové triterpeny obsahující 1,2,3-triazol v poloze C-30.....	21
2. Příprava výchozích sloučenin	23
2.1. Protekce hydroxylových skupin v polohách 3 a 28.....	24
2.2. Allylová bromace	25
2.3. Příprava azidů nukleofilní substitucí.....	27
2.4. Aldehyd 3a a hydroxyderivát 3b	29
3. Výsledky a diskuze	30
3.1. Cykloadice azidu a terminálního alkynu	31
4. Cytotoxická aktivita připravovaných sloučenin.....	36
5. Závěr	37
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
1. Obecné podmínky experimentální části.....	38
2. Obecné postupy zpracování reakčních směsí	39
3. Příprava výchozích látek.....	40

3.1. Protekce pomocí Ph_3SiCl	40
3.2. Allylová bromace	41
3.3. Příprava azidů nukleofilní substitucí	44
3.4. Příprava 3,28-di- <i>O</i> -acetylbetul-30-alu (3a), 3,28-di- <i>O</i> -acetylbetul-30-olu (3b).....	48
4. Cykloadice azidů a terminálních alkynů	49
4.1. Obecný postup reakce	49
4.2. Triazoly 3- <i>O</i> -28- <i>O</i> -diacetylbetulinu.....	49
4.3. Triazoly 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulinu.....	53
4.4. Triazoly 3- <i>O</i> -acetylbetulinové kyseliny	59
4.5. Triazoly 3-trifenylsilylbetulinové kyseliny	63
ZDROJE	71

SOUČASNÝ STAV STUDOVANÉ PROBLEMATIKY

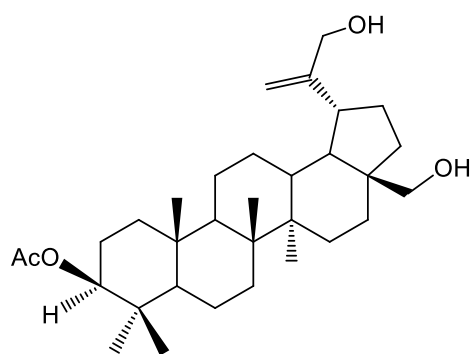
Extrakty přírodních materiálů byly odpradáвна využívány v tradiční medicíně díky jejich léčebným účinkům. V samotném počátku se jednalo o náhodné objevy a tyto extrakty byly používány bez hlubší znalosti jejich složení. Později, zejména v návaznosti na prudký rozvoj analytických metod během 19. a 20. století, byly nalezeny konkrétní sloučeniny zodpovědné za tyto léčebné účinky.¹

Jednou z významných skupin biologicky aktivních přírodních látek jsou terpeny, jejichž léčivé účinky jsou známy například z přípravků používaných v tradiční čínské medicíně.²

Jednou z podskupin terpenů jsou triterpeny, o nichž tato práce především pojednává. Triterpeny jsou tvořeny šesti izoprenovými podjednotkami a ty jsou uspořádány do polycyklických struktury. Existuje několik desítek různých skeletálních typů polycyklických triterpenů. Vyskytují se hojně v rostlinách, mořských živočiších, houbách, bakteriích, plísních atd., ze kterých je možné je izolovat.³ Každý rok jsou popsány stovky nových struktur triterpenů, které byly izolovány z rozmanité škály přírodních zdrojů.^{2, 4, 5}

Triterpeny mají řadu různých biologických aktivit. Jako příklad lze uvést aktivitu cytotoxickou, antivirální, antimikrobiální, protizánětlivou, antimykotickou a řada dalších. Nespornou výhodou těchto látek je obvykle také jejich nízká toxicita, což znamená, že mají vysoký terapeutický index, který je důležitý pro použití látek jako léčiv.^{2, 3, 6}

Přestože bylo popsáno mnoho přírodních triterpenů s poměrně významnými hodnotami IC₅₀, například skupina lupanových derivátů izolovaných ze stonků *Euonymus carnosus* dosahovala koncentrací IC₅₀ až 2,77 μM ± 0,45 μM na lidské buněčné nádorové linii Bel-7402 (I)⁷, je obecně problém s použitím triterpenů, jako léčiv. Hlavním problémem během klinických zkoušek představují nepříznivé farmakologické vlastnosti.³



Obrázek 1: Lupanový derivát (I) vyizolovaný z *Euonymus carnosus* týmem Zhou a kol.⁷

V současné době je věnováno velké úsilí na vylepšení nevhodných farmakologických vlastností a nově připravené sloučeniny se tak mohou stát velmi účinným i na úrovni *in vivo*.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

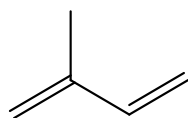
1. Vypracování rešerše na téma „Syntéza cytotoxicky aktivních derivátů terpenů s využitím click reakcí“.
2. Příprava výchozích látek a optimalizace jednotlivých reakcí.
3. Syntéza jednotlivých 1,2,3-triazolových derivátů triterpenů a následné testování cytotoxické aktivity těchto látek.

TEORETICKÁ ČÁST

Pro odlišení sloučenin připravených v literatuře od sloučenin připravených v rámci této práce je použito v prvním případě číslování římskými číslicemi a v druhém případě arabskými.

1. Úvod do studované problematiky

Jak již bylo zmíněno v úvodní části, tato práce pojednává o terpenech, tedy o rozsáhlé skupině přírodních látek. Téměř každoročně jsou publikovány zcela nové struktury izolovaných terpenů z rozličných přírodních zdrojů týmem Hill a kol. Jednotlivé struktury terpenů jsou vždy tvořeny izoprenovými jednotkami (**I**) a vzájemně se liší jejich počtem a uspořádáním.^{4,5}



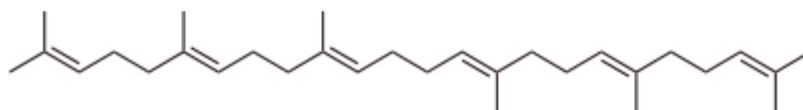
Obrázek 2: Izopren (**I**)

Terpeny lze rozdělit na acyklické a cyklické. Podle počtu izoprenových jednotek (**I**) terpeny dále dělíme na:

- monoterpeny: dvě molekuly izoprenu (**I**),
- seskviterpeny: tři molekuly izoprenu (**I**),
- diterpeny: čtyři molekuly izoprenu (**I**),
- triterpeny: šest molekul izoprenu (**I**),
- tetrapleny: osm molekul izoprenu (**I**),
- polyterpeny: vyšší počet molekul izoprenu (**I**).^{1,2}

1.1. Triterpeny

Prekursorem všech triterpenů je nenasycený uhlovodík skvalen (**II**), jehož enzymatickou cyklizací vznikají jednotlivé skeletální typy triterpenů. Strukturální různorodost produktů biosyntézy je umožněna konformační rozmanitostí jednotlivých přechodových stavů.⁸



Obrázek 3: Skvalen (II)⁸

I když existuje hodně terpenoidů, z medicínálního hlediska jsou nejvýznamnější polycyklické triterpeny. Dodnes bylo nalezeno a popsáno přibližně 4000 triterpenoidních struktur. Polycyklické triterpeny se vyskytují jak volně, tak v glykosylované formě. Tato specifická skupina bývá označována jako saponiny. Dále mezi tuto skupinu látek patří tzv. fytosteroly včetně jejich prekurzorů. Fytosteroly jsou specifickou skupinou steroidních hormonů, strukturálně odvozených od cholesterolu, avšak bez hormonálních biologických účinků.⁹

Pokud by bylo zachováno hledisko významných biologických aktivit, patří mezi neaktivnější a zároveň nejstudovanější tyto triterpenoidní skupiny:

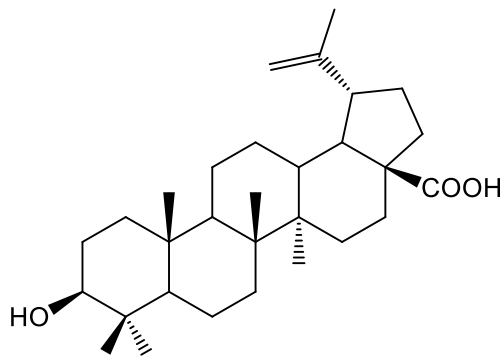
- oleanová skupina,
- ursanová skupina,
- lupanová skupina,
- damaranová skupina.^{9,10}

Nejčastěji bývají tyto triterpeny spojovány s biologickými aktivitami jako jsou antimikrobiální, antimykotické, hepatoprotektivní, virostatické (především anti-HIV aktivita),^{9, 10, 11} cytotoxické, antitumorové, protizánětlivé.^{9, 11} Nicméně existuje celá řada studií, které zkoumají další biologické účinky těchto molekul.

1.1.1. Kyselina betulinová (III)

Kyselina betulinová, systematickým názvem 3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina (III), je bílá krystalická látka, ve vodě nerozpustná, která se vyskytuje především v kůře stromů, je například minoritní složkou kůry břízy bělokoré (*Betula pendula*), po níž je látka pojmenována.¹² Kyselina betulinová (III) se vyskytuje dále v kůře stromů rodu platan (*Platanus*), dále pak v kůře cicimku mauricijského (*Ziziphus mauritiana*), černohlávku obecném (*Prunella vulgaris*) a celé řady dalších rostlin.¹³

Kyselina betulinová (**III**) má významné cytotoxické, antivirální (především anti-HIV), antibakteriální, antimalarické, protizánětlivé účinky.¹⁴ Již v roce 1976 byly popsány v práci Trumbull a kol. cytotoxické vlastnosti extraktu z palisandru (*Vauquelinia corymbosa*) na buněčnou linii lymfoidní leukemie P-388. V extraktu byly obsaženy mimo jiné i kyselina betulinová (**III**), kyselina ursolová a uvaol.¹⁰



Obrázek 4: Kyselina betulinová (**III**)²⁴

V roce 1995 byla vydána klíčová publikace Pisha a kol., v níž byl popsán cytotoxický efekt na lidské melanomové buněčné linii.¹⁵ Následovala řada studií, které se zabývaly účinky kyseliny betulinové (**III**) a jejich derivátů. Bylo zjištěno, že IC_{50} kyseliny betulinové (**III**) dosahuje hodnot 0,5-1,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na buněčné lidské myelomové linii MEL-1, 2 a 4, a zároveň byly prokázány apoptotické vlastnosti kyseliny **III**, nejen na myelomových liniích, ale i na neuroblastomových buněčných liniích a liniích non-ektodermálního původu, například na ovariálních buňkách A2780, buňkách epidermálního karcinomu A431 a celé řady dalších.¹⁰ Kyselina betulinová (**III**) vykazovala vysokou protinádorovou aktivitu na buňkách glioblastomu, kde hodnoty IC_{50} byly nižší než hodnoty IC_{50} cis platiny, vincristinu. Nespornou výhodou kyseliny **III** je její nízká toxicita vůči nenádorovým buněčným liniím; Například pro lidské nenádorové fibroblasty HDFC bylo $IC_{50} = 10.2 \pm 1.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, v porovnání s doxorubicinem ($IC_{50} = 0.38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).¹⁰

1.1.1.1. Mechanismus cytotoxického účinku

Protinádorová aktivita kyseliny betulinové (**III**) je způsobena její schopností spouštět apoptózu v rakovinových buňkách na mitochondriální úrovni.¹⁶ Vzhledem k unikátnímu mechanismu účinku (popsán níže) lze kyselinu betulinovou (**III**) označit jako perspektivní při

překonávání vybraných forem lékové rezistence. V lit.¹⁶ bylo popsáno, že v buňky neuroblastomové linie, rezistentní vůči doxorubicinu, stále vykazovaly odezvu po expozici kyselinou **III**.

Přítomnost látky **III** způsobí, že dojde k porušení mitochondriálních funkcí, aktivaci kaspáz a fragmentaci DNA. Mitochondrie buněk vystavených kyselině betulinové (**III**) vykazují zvýšení permeability membrán a následně uvolnění apoptotických faktorů, jako je cytochrom c, Smac nebo AIF z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytosolu. Regulace permeability membrán a uvolňování proteinů-apoptotických faktorů je předpokladem žádoucí cytotoxicity látek. Na iniciaci permeabilizace mitochondriální membrány se podílí tvorba ROS po expozici kyselinou betulinovou (**III**).¹⁶

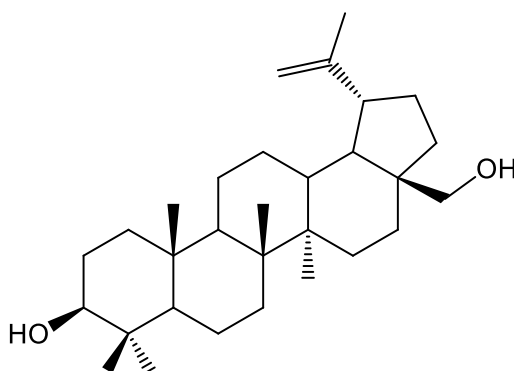
Kromě výše uvedených aktivit kyselina betulinová (**III**) vykazuje schopnosti modulovat expresi proteinů rodiny Bcl-2, které se podílejí na regulaci vnější mitochondriální membrány. Proteiny rodiny Bcl-2 vykazují jak pro- tak anti-apoptotické molekuly. Expozice buněk glioblastomů, neuroblastomů a melanomů kyselinou betulinovou (**III**) mělo za následek zvýšení regulace Bax a Bcl-Xs proteinů, tedy pro-apoptotických Bcl-2 proteinů. Navíc bylo prokázáno, že spouštění apoptózy kyselinou **III** je nezávislé na regulaci genem p53 a CD95. Kyselina **III** je také modulátorem jaderných transkripčních faktorů κ -B, který je klíčovým aktivátorem transkripce, jako odpověď na stres.¹⁶

Kyselina betulinová (**III**) má zřejmě i jiné mechanismy protinádorových účinků, například inhibuje aminopeptidázu N, tedy enzym podílejících se na regulaci angiogeneze,¹⁷ dále je schopna aktivovat selektivní proteazom degradující transkripční faktory Sp1, Sp3, Sp4, které regulují expresi VEGFR.¹⁸ Další schopností kyseliny betulinové je inhibice topoizomerázy I¹⁹ a ovlivňování buněčného cyklu.²⁰

1.1.2. Betulin (IV)

Systematickým názvem lup-20(29)-en-3 β ,28-diol (**IV**) je bílá krystalická látka nerozpustná ve vodě. Tento pentacyklický triterpen se hojně vyskytuje ve vybraných druzích dřevin, a jako zdroj pro izolaci látky **IV** slouží dnes především bříza bělokorá (*Betula pendula*). V suchém stavu tvoří betulin (**IV**) až 30 % hmotnosti kůry břízy, nicméně nachází se i v míze.²¹

Přestože betulin (**IV**) nevykazuje na rozdíl od kyseliny betulinové (**III**) významnou cytotoxickou aktivitu, existují studie, které prokázaly inhibici zrání Sterolového regulačního element-vazebného proteinu (SREBPs). Inhibicí této dráhy dochází k snížení *in vivo* syntézy cholesterolu a dalších mastných kyselin. Betulin (**IV**) také významně snižuje koncentrace lipidů v séru a tkáních a zvyšuje citlivost na inzulín. Bylo rovněž prokázáno, že terpen **IV** snižuje velikost aterosklerotických plátů a zvyšuje jejich stabilitu.²² Mimoto byly ve studiích prokázány účinky protizánětlivé, anti-HIV,²³ antimalarické,²⁴ čehož se v minulosti používalo v lidovém léčitelství. Extrakty z kůry stromů s obsahem betulinu (**IV**) byly aplikovány jako prevence, ale i při podráždění kůže.²⁴



Obrázek 5: Betulin (**IV**)²⁵

Dále existují studie zabývající se antiparazitárními vlastnostmi betulinu (**IV**) se schopností inhibice topoizomerázy,²⁶ což je žádoucí především u parazitů rezistentních na chemoterapii. Pro výzkum naší skupiny jsou zásadní primárně jeho vlastnosti protinádorové,^{10, 27} kdy je nutno poznamenat, že ze dvojice betulin (**IV**) a kyselina betulinová (**III**) je účinnější již zmiňovaná kyselina betulinová (**III**).

I přes výše zmiňované studie biologických účinků betulinu (**IV**), v současnosti se jako lék nepoužívá, v malém měřítku se jím jako pomocnou látkou impregnuje obvazový materiál. Modifikací struktury betulinu (**IV**), lze získat aktivnější deriváty.²¹

1.2. Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice

Jedná se o reakci, publikovanou v roce 1963 prof. R. Huisgenem, mezi azidem a alkynelem za vzniku heterocyklických 1,2,3-triazolů. Ačkoliv není azido- skupina nejreaktivnějším 1,3-dipólem, bývá často preferována díky relativnímu minimu nežádoucích vedlejších reakcí a

zároveň díky relativně dobré stabilitě azidu, s ohledem na zbytek molekuly, v typických reakčních podmínkách. Vzhledem k nedostatku reaktivity elektronově chudých alkyň a vedlejšími eliminačními reakcím je nezbytná katalýza.^{28,29}

1.2.1. Cu(I)-katalyzovaná azido-alkynová cykloadice

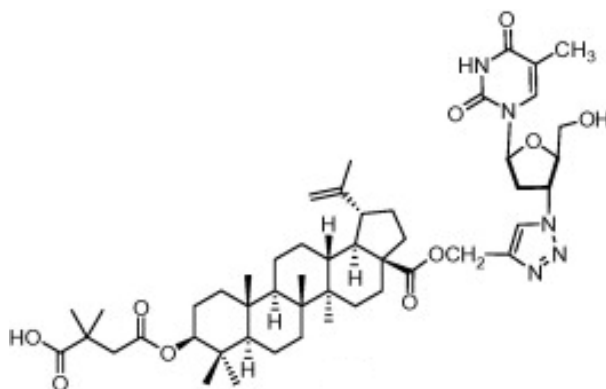
Jednou z možností je katalýza Cu(I). Cykloadice za podmínek této analýzy probíhá výhradně s terminálními alkyňy. Ke katalýze lze použít Cu(I) z komerčně dostupných zdrojů jako je CuI, CuBr, anebo lze připravit Cu(I) *in situ* redukcí z Cu(II). Tato varianta je vhodnější a byla použita i pro katalýzu cykloadic v rámci této diplomové práce. Katalýza Cu(I) umožňuje vznik komplexu měď-azid-acetylid, jehož cyklizací vznikají 1,3-substituované triazoly.³⁰

Právě druh katalýzy ovlivní i polohu substituce vznikajícího triazolu, například při použití Ag(I) katalýzy poskytuje 1,4-substituované triazoly³¹ a katalýza rutheniem umožňuje vzniknout 1,5-triazolům.³²

1.3. Lupanové triterpeny obsahující 1,2,3-triazolové substituenty

V rámci této diplomové práce byla zkoumána problematika modifikací betulínové kyseliny (**III**) a betulínu (**IV**) pomocí azido-alkynové Huisgenovy cykloadice.

První publikace, zabývající se problematikou aplikace click reakcí na terpenový skelet, pochází z roku 2012, kdy I. D. Bori a kol. připravili zcela nové látky. Ty se skládaly z fragmentů lupanového triterpenu (bevirimatu) a AZT spojených právě pomocí triazolu. Modifikace byla provedena v poloze C-3 nebo C-28 terpenu. Touto cestou připravené deriváty vykazovaly anti-HIV účinky na úrovni výchozích molekul (AZT a bevirimatu). Biologické experimenty byly měřeny na buněčné linii MT-4, jenž byla infikována HIV-1_{NL4-3} virem a biologické testy potvrdily vysoké hodnoty EC₅₀ a CC₅₀. Nejvyšších hodnot EC₅₀, CC₅₀ a jejich vzájemného poměru dosahovala níže uvedená látka **V**.³³



Obrázek 6: Molekula vzniklá spojením AZT a bevirimatu (V)³³

V publikaci³³ byla naznačena zcela nová a vysoce potencionální cesta modifikací triterpenových skeletů. Pomocí metody spojování dvou molekul skrze triazol s využitím click reakcí je možno velmi jednoduše a s vysokými výtěžky připravit rozsáhlou škálu nových látek. Nespornou výhodou metody je zejména její nezávislost na velikosti spojovaných molekul, na jejich povaze a nízké nároky na reakční podmínky cykloadice. Tedy tato metoda nabízí možnost takřka jakýchkoliv modifikací terpenového skeletu cykloadicí substituovaného 1,2,3-triazolu.

Přístup tzv. hybridizace farmakoforů, v němž jsou dvě biologicky aktivní složky kovalentně spojeny a jsou dostupné jako jedna hybridní jednotka, se ukázal jako velmi perspektivní při vývoji nových biologicky aktivních látek. Výhodou tohoto přístupu je cílená eliminace nežádoucích vlastností jednotlivých molekul, zároveň však výsledná látka může vykazovat významné biologické účinky.³⁴

Týmem Bori a kol. byly popsány významné anti-HIV aktivity výsledných molekul (např. V),³³ jelikož se v lit. vyskytovaly studie o i protinádorové aktivitě AZT ve vhodné kombinaci s další látkou s protinádorovou aktivitou, jako byl 5-fluorouracil, cis-platina, paclitaxel,³³ řada týmů se zabývala otázkou, zda by bylo možné připravit za použití Huisgenovy cykloadice látku, který by vykazovala také protinádorovou aktivitu.

V roce 2014 byla publikována studie týmu Dang Thi a kol., v níž byly syntetizovány nové molekuly vzniklé spojením triterpenu a AZT skrze triazol s cytotoxickými vlastnostmi.^{34,35} Modifikace byla prováděna v poloze 28 triterpenového skeletu. Karboxylová skupina triterpenu reagovala propargylbromidem nebo propargylaminem, vzniklé látky VI, IX byly podrobeny cykloadicí s AZT (Schéma 1, Schéma 2).

V lit.³⁴ byly popsány ester-triazoly kyseliny betulinové, ursolové, oleanolové, dikarboxylové kyseliny izolované z *Schefflera octophylla* a karboxylové kyseliny izolované z *Acanthopanax trifoliatum*. Látky byly testovány na nádorových liniích Hep-G2 a KB, jako kontroly byly použity AZT a Ellipticin. Nejnižší hodnoty IC₅₀ vykazovala sloučenina **VII** a to 5,9 μM (linie KB) a 7,0 μM (linie Hep-G2) (**Schéma 1**).³⁴

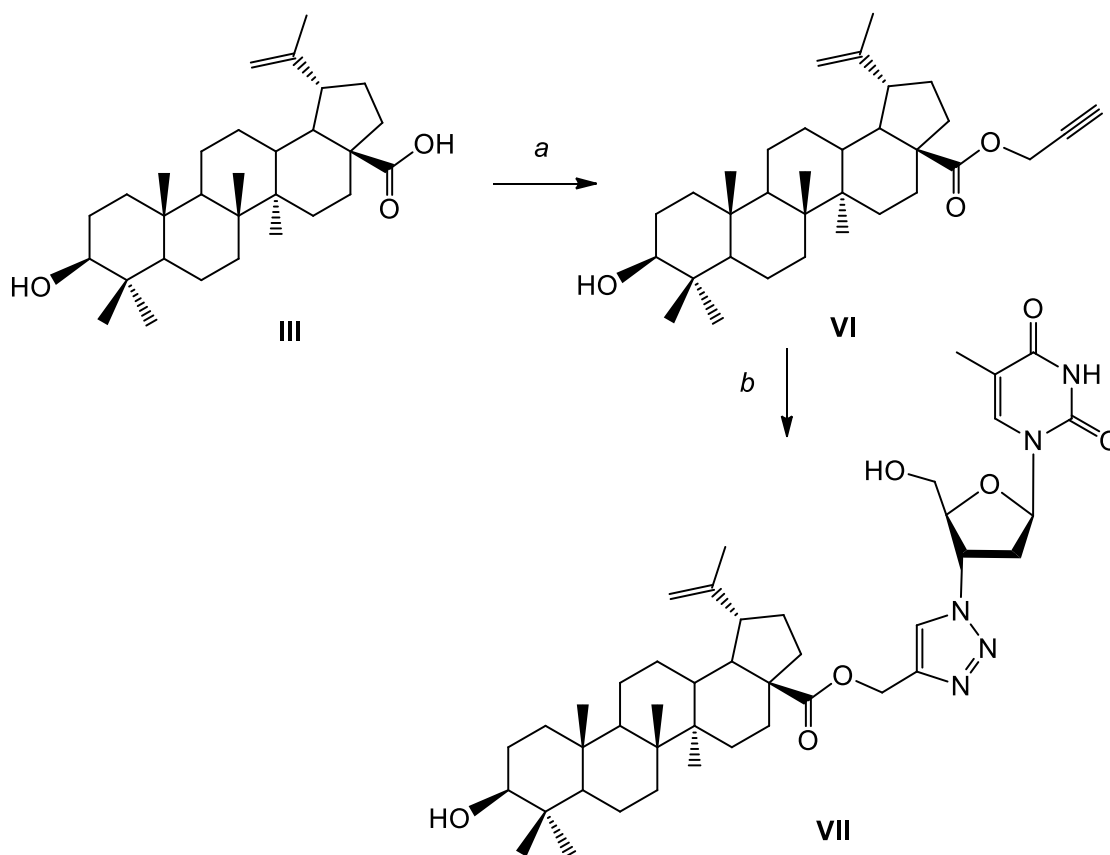


Schéma 1: Příklad syntézy ester-triazolu kyseliny betulinové (VII):³⁴

a: 2,0 equiv. propargylbromid, 2,0 equiv. Cs₂CO₃, DMF:THF 1:1, 4-6 hod.;

b: 0,8 equiv. AZT, 0,2 equiv. CuI, t-BuOH, 70°C, 12 hod.

Publikace³⁵ téhož týmu byla zaměřena na amido-triazoly kyseliny betulinové, ursolové, kyseliny izolované z *Acanthopanax trifoliatum* a bevirimatu. Stejně jako v předešlé studii byly látky testovány na nádorových liniích Hep-G2 a KB. Ve studii byly připraveny látky jak s volnou hydroxylovou skupinou v poloze 3 triterpenového skeletu, tak i látky acylované (např. **VIII**), hodnoty IC₅₀ acylovaných molekul amido-triazolů byly podstatně nižší. Látka s nejnižšími naměřenými hodnotami IC₅₀ (**X**) dosahovala pouze koncentrací 4,6 μM na linii KB a 5,9 μM na linii Hep-G2 (**Schéma 2**).³⁵

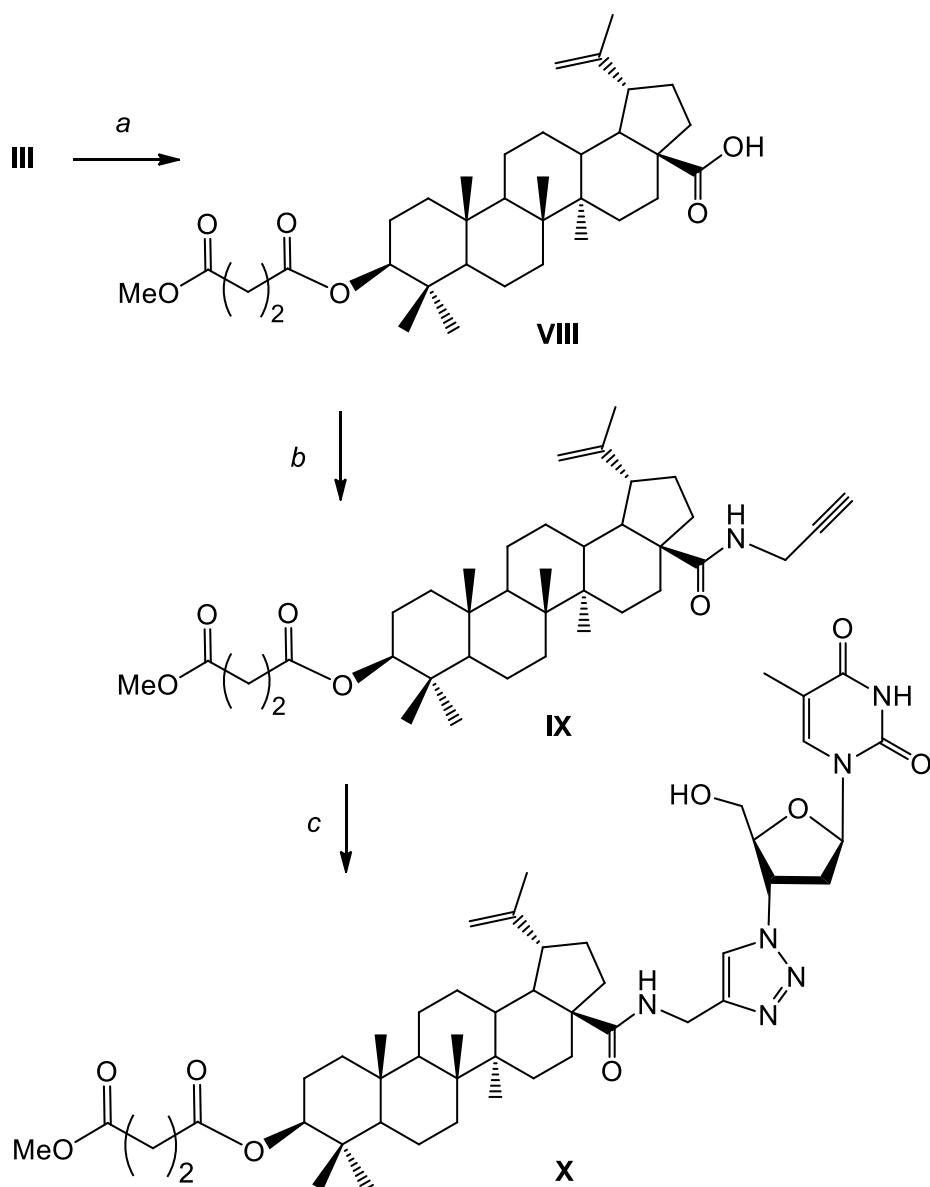


Schéma 2: Příklad syntézy amido-triazolu acylované kyseliny betulinové (X):³⁵

a: 2,0 equiv. mehyl 4-chloro-3-oxo-butanoate, 1,1 equiv. Et₃N, 0,2 equiv. DMAP, CH₂Cl₂, rt, 24 hod.;

b: 1,5 equiv. propargylamine, 1,5 equiv. DCC, 1,5 equiv. HOBt, 2,0 equiv. DIPEA, rt, 12 hod.;

c: 0,8 equiv. AZT, 0,2 equiv. CuI, t-BuOH, 70 °C, 12 hod.

1.3.1. Lupanové triterpeny obsahující 1,2,3-triazol v poloze C-30

V literatuře jsou popsány i případy, kdy byla cykloadice provedena na C-30 triterpenu. Tolstikov a kol. publikovali v roce 2013 studii ve které byly modifikace provedeny na struktuře betulinové kyseliny (III) a betulinu (IV).^{36,37}

V článku^{36,37} byl publikován postup, v němž nebyl používán volná betulinová kyselina (**III**) a volný betulin (**IV**), nýbrž výchozí látky měly ochráněny hydroxylové skupiny pomocí acetylů v případě betulinu, molekula **XI**, a pomocí acetylu na C-3 a methylesteru karboxylové kyseliny v poloze 28 pro betulinovou kyselinu, molekula **XII**. Takto ochráněné výchozí látky (**XI** a **XII**) byly podrobeny bromaci za použití N-bromsukcinimidu (NBS) za vzniku bromderivátů **XIII** a **XIV**, následně byla bromová skupina substituována azoskupinou za vzniku **XV** a **XVI**. Azidy **XVI** a **XV** reagovaly se vhodně substituovanými alkyny za podmínek Huisgenovy 1,3-dipolární adice. Následně byly odštěpeny protekční acetylové skupiny alkalickou hydrolyzou.^{36,37}

Touto cestou bylo připraveno celkem šest 1,2,3-triazolových derivátů **XVII–XXII**.³⁶

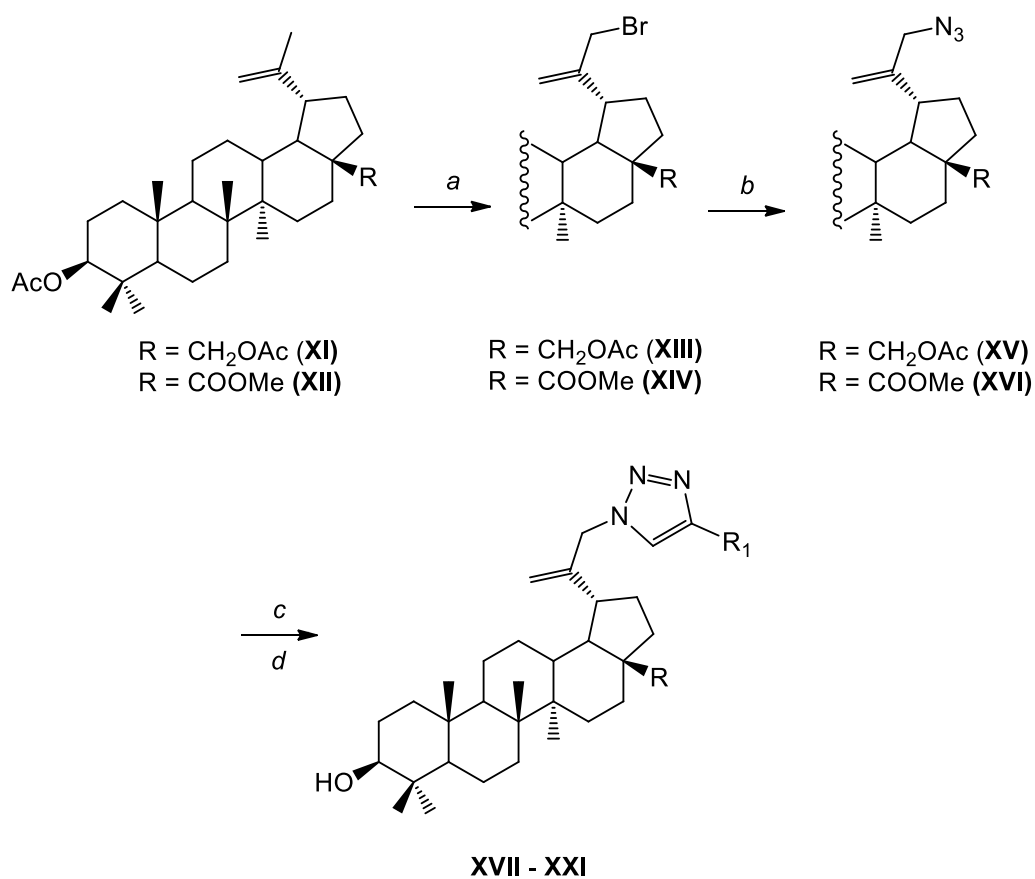


Schéma 3: *a:* NBS, CCl_4 , 20 °C; *b:* NaN_3 , MeCN, var; *c:* $\equiv\text{R}_1$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, AscNa, DMF, 50 °C; *d:* 4 M NaOH, MeOH, THF, 20 °C, 24 h

<i>Číslo látky</i>	<i>R</i>	<i>R₁</i>
XVII	COOMe	CH ₂ OH
XVIII	COOMe	Ph
XIX	COOMe	pyridin-2-yl
XX	CH ₂ OH	CH ₂ OH
XXI	CH ₂ OH	Ph
XXII	CH ₂ OH	pyridin-2-yl

Tabulka 1: Lupanové triterpenoidy obsahující 1,2,3-triazol připravené týmem Tolstikov a kol.³⁶

Nicméně cykloadice byly provedeny prozatím pouze s několika substituenty a především nebyly studovány biologické účinky těchto látek.³⁶

2. Příprava výchozích sloučenin

Tato práce pojednává o přípravě derivátů betulinu **1** a kyseliny betulinové **2** modifikovaných v poloze 30 substituovaným triazolem, syntéza byla prováděna podle obecného reakčního schématu (**Schéma 4**).

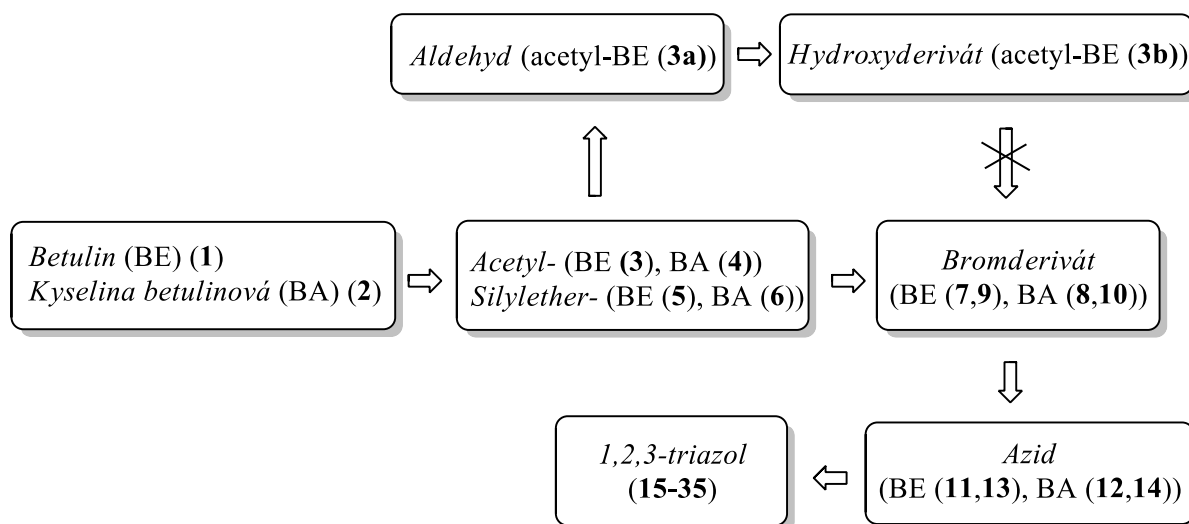


Schéma 4: Obecná příprava 1,2,3-triazolů triterpenů pomocí Huisgenovy cykloadice

2.1. Protekce hydroxylových skupin v polohách 3 a 28

Z betulinu (**1**) a kyseliny betulinové (**2**) byly nejdřív připraveny příslušné acetáty **3** a **4**. Jako první protekční skupina byl vybrán acetyl, vzhledem k jeho dostupnosti a použití při purifikaci surového betulinu (**1**) a kyseliny (**2**). Acetáty byly připraveny reakcí výchozích alkoholů s acetanhydridem v pyridinu dle ověřeného postupu z naší laboratoře.

Dále byly připravené silylované prekurzory **5** a **6**. S ohledem na to, že některé cílové molekuly by mohly vyžadovat mírnější podmínky deprotektce než acetáty, byla zvolena alternativní chránící skupina - trifenylysilylová. Trifenylysilyl chlorid (Ph_3SiCl) byl použit v nadbytku, reakce probíhala v přítomnosti imidazolu a DMF, jako rozpouštědla. Zatímco pro protekci betulinu (**2**) bylo potřeba použít 3,5 equiv. Ph_3SiCl a reakční teploty $50\text{ }^\circ\text{C}$, protekce kyseliny betulinové (**3**) probíhala za laboratorní teploty se 1,5 equiv. Ph_3SiCl , zvýšení teploty bylo nežádoucí a vedlo ke vzniku silylesterů v poloze 28.

Připravené acetáty **3** a **4**, 3,28-bis(trifenylysilyl)-betulin (**5**) a 3-trifenylysilylbetulínová kyselina (**6**) byly dále použity v přípravě bromderivátů **7 - 10** (Schéma 5, 6 a 7). Chráněné terpeny byly acetylovány v allylové poloze pomocí N-bromsukcinimidu (NBS). Tuto reakci je možné provést i s nechráněnými terpeny, ale v tom případě byly izolovány obvykle nízké výtěžky produktu. Také proto bylo nezbytné ochránit volné hydroxylové skupiny v polohách 3 a 28 betulinu (**1**) a v poloze 3 u kyseliny betulinové (**2**).

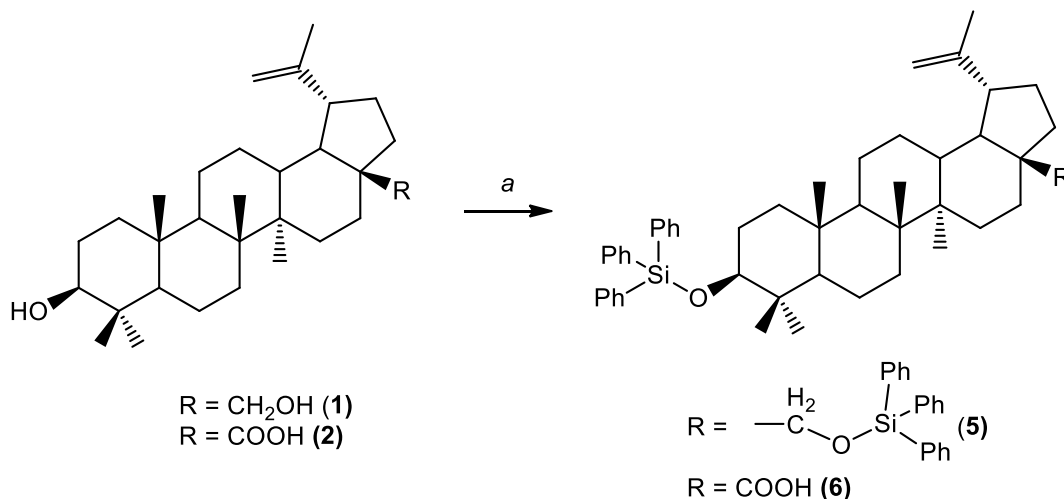


Schéma 5: a: Ph_3SiCl , imidazol, DMF

2.2. Allylová bromace

2.2.1. Bromderiváty 7 a 8

30-bromderiváty **7**, **8** byly připraveny radikálovou substitucí za použití NBS, jako bromáčnického činidla, v CCl_4 (**Schéma 6**). Literatura³⁶ uvádí, že bromace analogických terpenických derivátů probíhala za laboratorní teploty, nicméně při použití těchto podmínek byla reakční doba neúměrně dlouhá a majoritní část výchozí látky (**3,4**) zůstala nespoteřována. Proto byly podmínky optimalizovány a jako vhodné se ukázalo pozvolné zvyšování reakční teploty z laboratorní teploty na $50\text{ }^\circ\text{C}$ po 1 hod. míchání reakční směsi a následně po 3 hod. byla teplota opět zvýšena až na $77\text{ }^\circ\text{C}$. Při této teplotě již byla reakční rychlost dostatečná a celkový čas bromace se pohyboval v rozmezí 4,5 – 5,0 hod. Problémem se však stal vznik vedlejšího produktu reakce, který byl špatně oddělitelný pomocí kolonové chromatografie a to především ve větších množstvích. Podle ^1H NMR spektra bylo možné určit, že tato nečistota obsahuje brom v poloze 29. Výtěžky reakcí se proto pohybovaly okolo 50 %.

Vzhledem k radikálovému mechanismu reakce bylo možné ovlivnit její průběh radikálovým iniciačním činidlem azobisisobutyronitrilem (AIBN), 5% molární přídavek této látky snížil množství vzniku vedlejšího produktu a zároveň došlo i ke zkrácení reakční doby. Nicméně ani při použití AIBN nebylo možno zcela eliminovat vznik nežádoucího vedlejšího produktu. Výtěžky allylové bromace za těchto podmínek proto byly až 75 %.

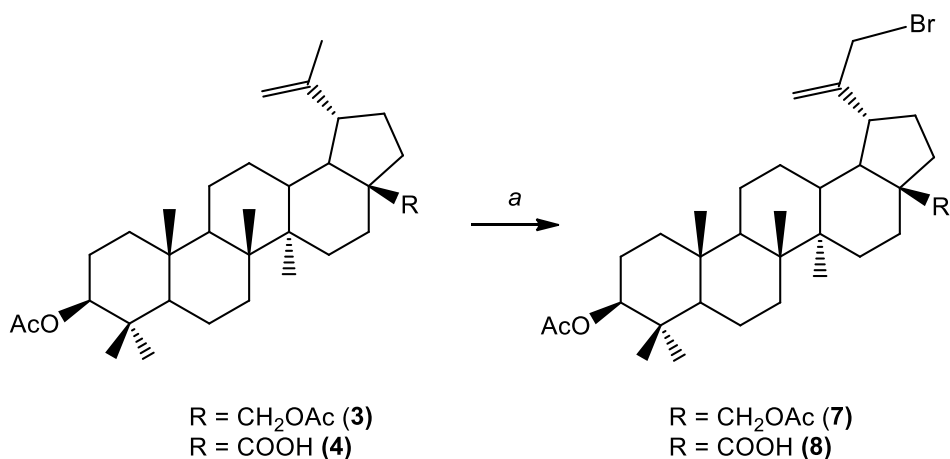


Schéma 6: *a*: NBS, AIBN, CCl₄, 20 °C, 50 °C, 77 °C, 3,5-4 hod.

2.2.2. Bromderiváty 9 a 10

Vzhledem k zvýšení výtěžku bromace při použití radikálového iniciačního činidla a menšímu obsahu vedlejších produktů byla allylová bromace silylovaných výchozích látek **5** a **6** prováděna pouze s přidavkem AIBN. (**Schéma 7**) Obdobně jako u přípravy látek **7** a **8** doprovázel allylovou bromaci silylovaného betulinu **5** a kyseliny **6** vznik výše popisovaného nežádoucího produktu. Jelikož ale vznikal pouze v omezeném množství, bylo jej možné oddělit pomocí běžných chromatografických metod. Výtěžky dosahovaly až 93 %.

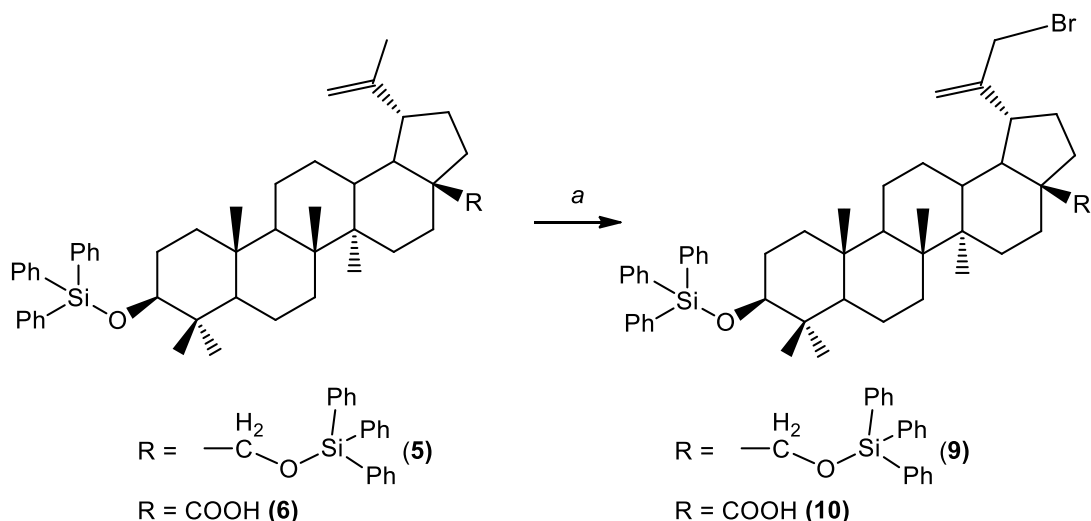


Schéma 7: a: NBS, AIBN, CCl₄, 20 °C, 50 °C, 77 °C, 5,2-5,5 hod.

2.3. Příprava azidů nukleofilní substitucí

V dalším kroku byly připraveny výchozí látky pro Huisgenovu 1,3-dipolární cykloadici, a to azidy betulinu **11** a **13** a betulinové kyseliny **13** a **14**.

2.3.1. Azidy **11** a **12**

Literatura³⁶ uvádí, že substituce bromu azidovým aniontem probíhá pomocí s nadbytkem NaN₃ v prostředí acetonitrilu (MeCN) za varu. Látky **11** a **12** byly připraveny dle publikovaného postupu.³⁶ Oproti literatuře³⁶ bylo však k přípravě látek **11** a **12** použito menšího nadbytku NaN₃ (1,5 equiv.) a byla zkrácena i doba reakce ze 24 hod. na 16 hod pro látku **11** a 20 hod. pro látku **12**. Nukleofilní substituce brom- skupiny probíhala téměř kvantitativně. (**Schéma 8**)

Azidy **11** a **12** vykazovaly poměrně vysokou stálost. Oproti jinému terpenickému azidu, 2-azidoallobetulon, který se téměř okamžitě rozkládá v přítomnosti protického rozpouštědla za laboratorní teploty,³⁸ docházelo k částečnému rozkladu **11** a **12** v protických rozpouštědlech až v řádu dnů.

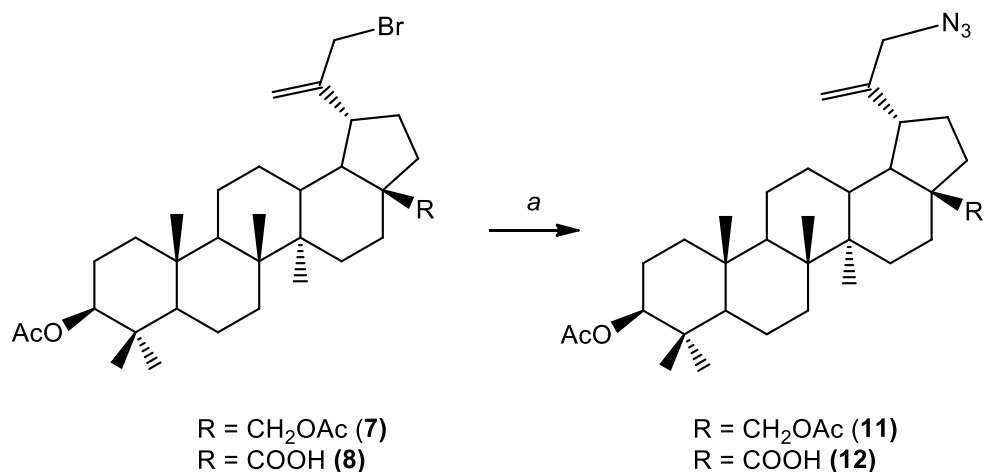


Schéma 8: *a*: NaN_3 , MeCN, var, 16 hod. (**11**), 20 hod. (**12**).

2.3.2. Azidy **13** a **14**

Sloučeniny **13**, **14** byla připravena dle postupu Antimonova a kol.³⁹, tedy pomocí NaN_3 v prostředí acetonitrilu za varu. Pro přípravu azidu **14**, na rozdíl od přípravy látky **11**, bylo potřeba použít většího nadbytku NaN_3 (1,8 equiv.) a prodloužit reakční čas na 24 hod. (**Schéma 9**) Reakce probíhala s výtěžky až 77 %.

Problémem byla špatná rozpustnost výchozí látky **10** v acetonitrilu za horka, zvláště pak při větších navážkách docházelo k částečnému nezreagování výchozích látek. Nicméně sonifikací reakční směsi byl tento problém eliminován.

Vzhledem k nepolárnímu charakteru látky **13** nastal problém s nedostatečnou rozpustností v MeCN. Reakce probíhala za vzniku malého množství azidu **13** a většina výchozí látky **9** zůstala nezreagována. Proto byly reakční podmínky dále optimalizovány.

Jako další aprotické rozpouštědlo byl vybrán THF, nicméně reakce probíhala pomalu a i přes zvýšení reakční teploty na 45 °C, poskytla pouze nízký výtěžek. Dále byla substituce prováděna v dioxanu, ke vzniku azidu **13** docházelo již za laboratorní teploty, ale vznik azidu **13** byl doprovázen i tvorbou několika dalších nežádoucích produktů.

Po sérii experimentů byl jako nejvhodnější rozpouštědlo používán DMSO. Reakce probíhala již za laboratorní teploty za použití stejného nadbytku NaN_3 , jako u látky **14**. Nicméně bylo nutné prodloužit reakční čas na 36 hod., při pokusech o zvýšení reakční teploty,

jelikož při záhřevu reakční směsi již na teplotu 50 °C docházelo k rozkladu výchozí látky **9**. Výtěžky reakce dosahovaly průměrně 75 %.

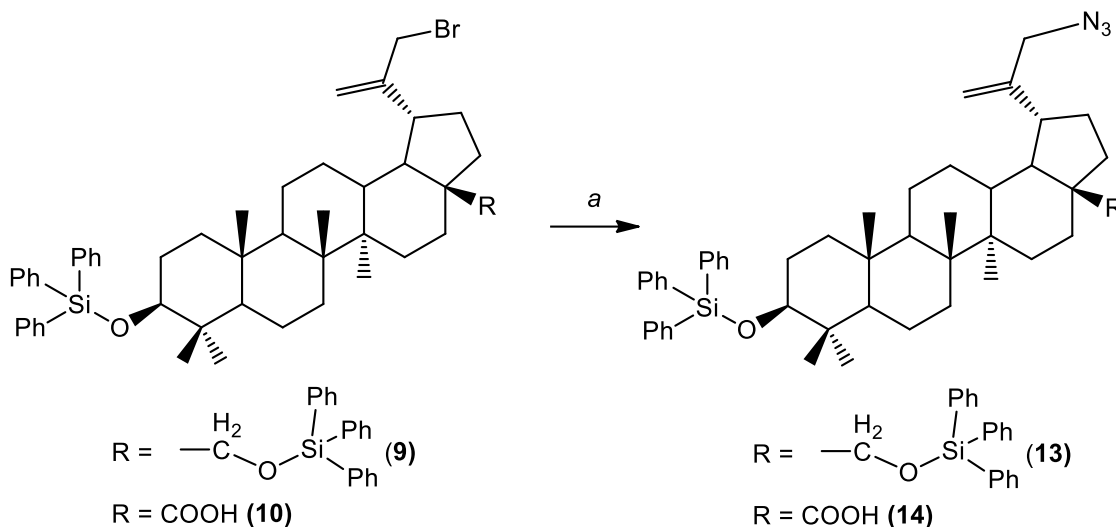


Schéma 9: a: NaN₃, MeCN, var, 24 hod (**14**); NaN₃, DMSO, rt, 36 hod (**13**).

2.4. Aldehyd **3a** a hydroxyderivát **3b**

Jak již bylo uvedeno ve **Schéma 4**, zavádění bromu do polohy 30 triterpenu bylo stěžejní reakcí pro přípravu výchozího materiálu pro tuto diplomovou práci. Mimo radikálové allylové bromace byla prováděna také alternativa nepřímé bromace a chlorace substitucí nukleofilní. (**Schéma 10**)

V prvním kroku byla oxidována methylová skupina v poloze 30 látky **3** za použití nadbytku SeO₂ v GLYM za varu za vzniku aldehydu **3a**. Výtěžky reakce se pohybovaly okolo 65%. (**Schéma 10**)

Následně byla aldehydová skupina redukována pomocí NaBH₄ v DCM za laboratorní teploty. Redukce probíhala s vysokými výtěžky a to až 72 %. Reakci připravený alkohol **3b** byl následně podroben substitucím s vybranými halogenačními činidly. (**Schéma 10**)

K substituci byl použit nejprve PBr₃, nýbrž očekávaná látka **7** vznikala pouze v minoritním množství a zlepšení výtěžků reakce nepřinesla ani optimalizace podmínek. Jako další možná se jevila varianta zavedení chloru do polohy 30 substitucí hydroxy- skupiny látky **3b** pomocí SOCl₂ za vzniku látky **3c**. Nicméně při použití tohoto chloračního činidla

docházelo k vzniku celé řady nežádoucích produktů a výtěžky reakce byly tudíž zanedbatelné. (Schéma 10)

Vzhledem k tomu, že mezitím se podařilo optimalizovat allylovou bromaci pomocí NBS, nebyla tato nepřímá halogenace nukleofilní substitucí již dále rozvíjena.

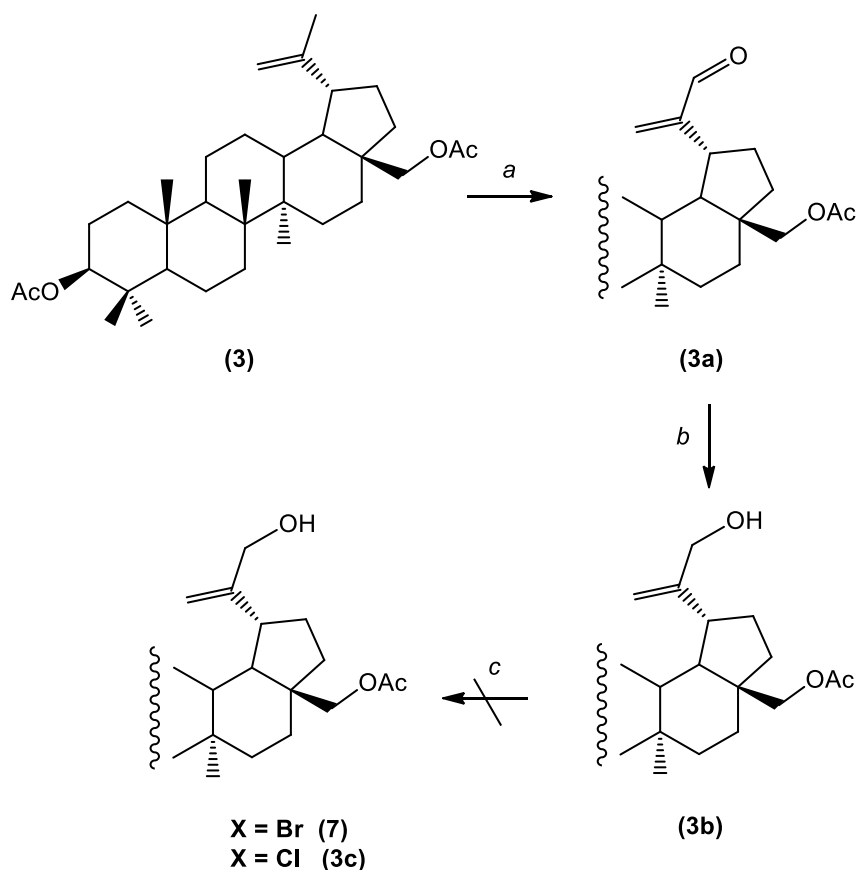


Schéma 10: *a*: SeO₂, GLYM, var, 24 hod.

b: NaBH₄, DCM, rt, 2 hod.

c: PBr₃, DCM, rt – var, 24 hod. (7); SOCl₂, DCM, rt – var, 24 hod. (3c)

3. Výsledky a diskuze

Cílem této diplomové práce byla příprava betulínu a betulínové kyseliny obsahující v poloze 30 substituovaný 1,2,3- triazol pomocí Huisgenovy cykloadice, patřící mezi skupinu tzv. click reakcí.

3.1. Cykloadice azidu a terminálního alkynu

Literatura³⁹ popisuje cykloadice prováděné na molekulách látky **XV** a **XVI**. Jako terminální alkyln do reakce vstupoval propargylalkohol, fenylacetylen a 2-ethynylpyridin.

Vzhledem k vyšším výtěžkům reakce, a zároveň i dostupnosti výchozích látek pro katalýzu, byl Cu(I) i v této diplomové práci připravován *in situ* ze $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a L-askorbanu sodného, jako redukčního činidla. Používáno bylo vždy 0,5 ekvivalentu $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a L-askorbanu sodného. Reakce obvykle proběhla s jedním ekvivalentem azidu a alkynu v DMF. (**Schéma 11**) Reakce vykazovala téměř kvantitativní průběh již za laboratorní teploty s výjimkou cyklopentenylacetyleny. Výtěžky cykloadic dosahovaly výtěžků až 88 %. Přehled připravených látek je uveden v **Tabulce 2**.

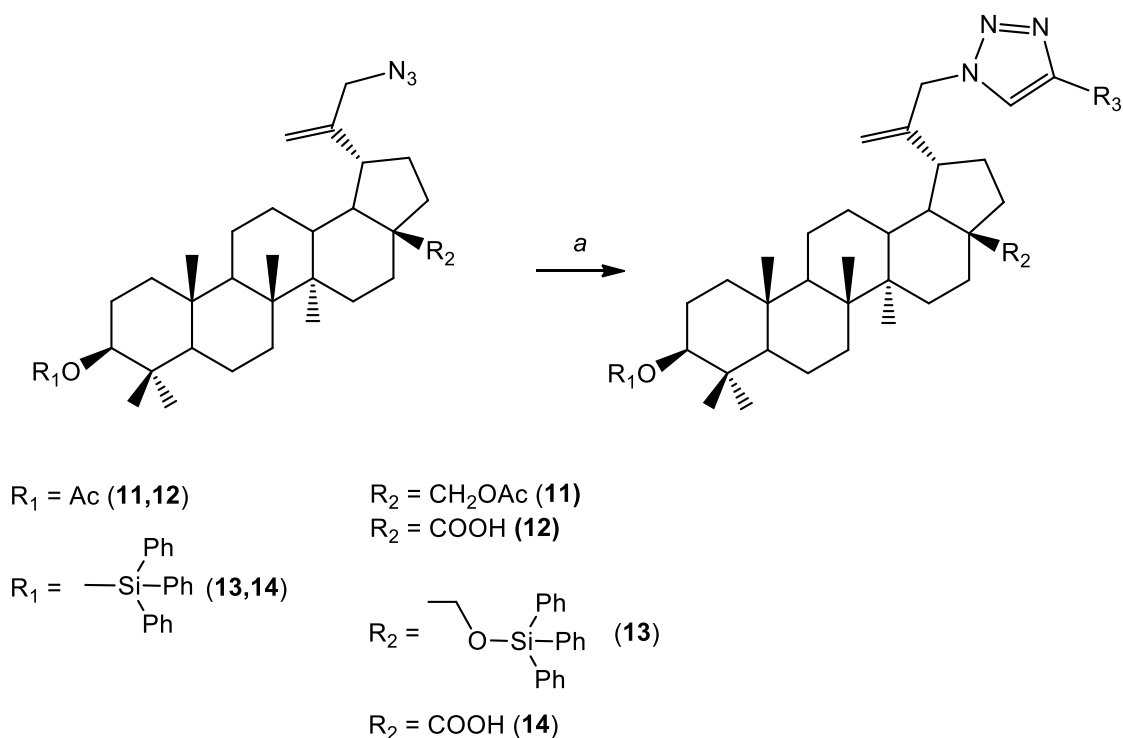
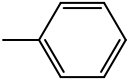
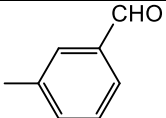
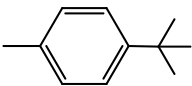
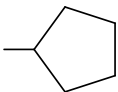
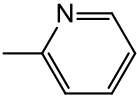
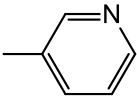
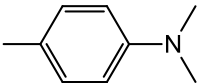
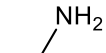


Schéma 11: $\text{c: } \text{C}\equiv\text{C—R}_3, \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}, \text{L-askorban sodný, DMF}$

R₃	BETULIN		KYSELINA BETULINOVÁ	
	R₁ = Ac	R₁ = Ph₃Si	R₁ = Ac	R₁ = Ph₃Si
	15	NS	25	29
	16	19	26	NS
	NS	20	27	30
	NS	NS	28	31
	17	21	NS	32
	18	22	NS	33
	NS	23	NS	34
	NS	24	NS	35

Tabulka 2: Přehled syntetizovaných triazolových derivátů, v tabulce jsou jejich čísla, NS znamená, že ten konkrétní derivát dosud nebyl syntetizován nebo k němu zatím nejsou doměřená spektrální data.

Bylo zaznamenáno, že vznik nežádoucích produktů eliminovalo pořadí, v němž se přidávaly jednotlivé reaktanty. Podstatné bylo přidat terminální alkyn až do roztoku, který obsahoval zredukovaný Cu(I). K roztoku azidu v DMF byla teda přidána navážka 0,5 equiv. CuSO₄·5H₂O, poté 0,5 equiv. množství L-askorbanu sodného. Roztok byl míchán tak dlouho, dokud zredukovaný Cu(I) nezbarvil reakční směs zeleně. Doba této redukce byla přibližně 5 min. Až potom bylo možné přidat alkyn.

Pro větší přehlednost byly shrnuty konkrétní experimentální podmínky do tabulky (**Tabulka 3**). Nicméně lze obecně poznamenat, že jak betulín, tak betulínová kyselina, obsahující Ph_3Si protekční skupiny vyžadovala delší reakční čas a 2 equiv. nadbytek alkynu. Zvyšování reakční teploty vedlo ke vzniku nečistot, byť v malém množství, proto byla zvolena možnost delšího reakčního času.

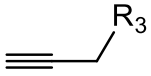
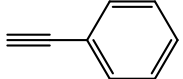
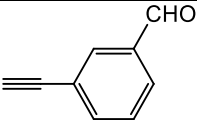
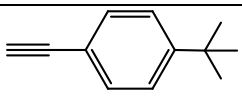
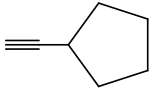
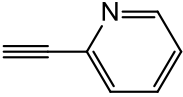
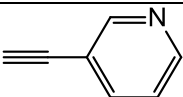
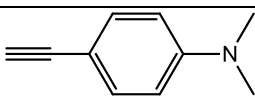
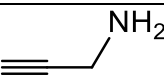
Zejména při přípravě triazolů substituovaných fenyلكarbaldehydem bylo nutné dodržet pořadí, pokud by byl totiž 2-ethylbenzaldehyd přidán do nehomogenní reakční směsi, mohlo dojít k částečné redukci aldehydické skupiny. Delší stání na vzduchu pak způsobovalo oxidaci této aldehydické skupiny.

Jako vhodné zpracování reakce bylo zvoleno vysrážení produktu v ledové drti. Vedlo nejen k odstranění DMF, nýbrž i k získání tuhé sypké látky. I když byly provedeny i experimenty, při nichž byla reakční směs vlita do vody, použití ledové drti bylo vhodnější, jelikož vedlo ke vzniku o poznání hrubší sraženiny. Ledová drť byla také v některých případech okyselena pomocí HCl na $\text{pH} \pm 3$. Tuto variantu bylo možné použít zejména pro triazoly betulínu a betulínové kyseliny obsahující acetátové protekční skupiny, ale pouze v případě, pokud použití okyselené drti nemohlo vést ke vzniku rozpustných solí. Výhodou této metody bylo především získání produktu s nižším obsahem nečistot.

Vždy byla nutná purifikace CC. Vzhledem k rozdílům polarit výchozí látky a produktu byla poměrně často používána gradientová eluce, která zajišťovala rychlejší průběh separace a vyšší čistotu produktu.

Struktura výsledných produktů byla určena na základě spektrálních dat. V ^1H NMR spektru je u všech sloučenin patrné zachování základních signálů terpenického skeletu, zejména pěti singletů methylových skupin při δ 0.60 až 1.00 ppm (3H), dále signál pro skeletální vodík H-19 β při δ okolo 3 ppm, který se někdy objevuje jako triplet dubletů, jindy jako triplet a někdy jen jako rozšířený singlet, což svědčí o dynamickém procesu v okolí kruhu E, patrně rotace nového substituentu. Dále se u všech sloučenin objevuje charakteristický signál, dublet dubletů pro H-3 α , který se u acetylovaných terpenů pohybuje okolo δ 4.5 ppm a u silylovaných derivátů při δ 3.30 ppm a signály vodíků dvojně vazby H-29 *proE* a H-29 *proZ*, jejichž posun δ je mezi 4.5-5.0 ppm a závisí výrazně na struktuře nového substituentu v poloze 30. Acetylované deriváty mají příslušné singlety acetátových methylů

při δ 2.0 – 2.1 ppm, trifenylsilylované deriváty mají signály fenylových skupin v aromatické oblasti. Fakt, že došlo k substituci v poloze C-30 terpenického skeletu je prokázán tím, že zmizel typický singlet (3H) methylové skupiny C-30 v sousedství dvojné vazby při δ 1.65 ppm a místo tohoto signálu se objevil dublet (2H) při δ 4.0 – 5.0 ppm. Přítomnost triazolu v nových strukturách dokazuje přítomnost nového singletu v aromatické oblasti (1H při δ mezi 7.5 ppm a 8.5 ppm v závislosti na substituentu). Konkrétní substituent na triazolovém kruhu je pak potvrzen u každé nové sloučeniny přítomností charakteristických signálů pro tento substituent ve výpisech v experimentální části. Všechny sloučeniny byly dány na změření HRMS a specifické optické otáčivosti, ale vzhledem k velkému množství vzorků výsledky doposud nebyly dodány.

	<i>BETULIN</i>				<i>KYSELINA BETULINOVÁ</i>			
	Číslo	R ₁ = Ac	Číslo	R ₁ = Ph ₃ Si	Číslo	R ₁ = Ac	Číslo	R ₁ = Ph ₃ Si
	15	1 : 1 equiv, DMF rt, 22 hod.; 50°C, 5 hod.,	-	-	25	1 : 1 equiv, DMF rt, 22 hod.;	29	1 : 1 equiv, DMF rt, 26 hod.,
	16	1 : 1 eq., DMF rt, 20 hod. 50°C, 4,5 hod	19	1 : 2 eq., DMF rt, 28 hod.	26	1 : 1 eq., DMF rt, 20 hod.	-	-
	-	-	20	1 : 2 eq., DMF rt, 28 hod.	27	1 : 1 equiv., DMF rt, 20 hod	30	1 : 1 equiv., DMF rt, 24 hod
	-	-	-	-	28	1 : 1 equiv.; DMF rt, 26 hod	31	1 : 1 equiv.; DMF 50°C, 48 hod
	17	1 : 1 equiv., DMF rt, 16 hod.	21	1 : 2 eq., DMF rt, 30 hod.	-	-	32	1 : 1 equiv., DMF rt, 22 hod.
	18	1 : 1 eq., DMF rt, 16 hod.	22	1 : 2 eq., DMF 50 °C, 30 hod.	-	-	33	1 : 1 eq., DMF rt, 22 hod.
	-	-	23	1 : 1 equiv, DMF rt, 36 hod.;	-	-	34	1 : 1 equiv, DMF rt, 28 hod.;
	-	-	24	1 : 1 equiv, DMF rt, 38 hod.;	-	-	35	1 : 1 equiv, DMF rt, 32 hod.;

Tabulka 3: Podmínky cykloadice azidu triterpenu a alkynu

4. Cytotoxická aktivita připravovaných sloučenin

Veškeré připravené látky, tedy jak výchozí látky, tak 1,3-disubstituované 1,2,3-triazoly budou testovány na cytotoxické vlastnosti na pracovišti doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Látky budou nejprve podrobeny odštěpení acetylových nebo trifenylyloxylových protekčních skupin v polohách 3 a 28 za použití standardních postupů. Posléze budou látky testovány. Experimenty budou prováděny zejména na CEM liniích akutní lymfoblastické leukémie, jako pozitivní kontrola bude použita kyselina betulínová. Dle dosažených výsledků budou dále zváženy další doplňující experimenty na odlišných nádorových liniích.

5. Závěr

V rámci této diplomové práce byly připravovány v poloze 4 substituované 1,2,3-triazol-1-yl-terpeny. K eliminaci nežádoucích reakcí, a to během bromace především, byly nejprve ochráněny volné hydroxylové skupiny. Jako protekční skupiny byly zvoleny Ac a Ph_3Si skupiny.

Při přípravu výchozích azidů bylo nutné nejprve připravit reaktivní 30-brom- betulin a betulinovou kyselinu, jako nejvhodnější možnost byla zvolena přímá radikálová substituce, k níž bylo použito činidlo NBS. Dále byla brom- skupina substituována za použití NaN_3 . Během přípravy výchozích látek bylo celkem připraveno 12 látek, z nichž bylo 10 doposud nepopsaných a 2 látky byly již popsány v literatuře.³⁶

Následně byly prováděny cykloadice azidů terpenů a terminálních alkynů za katalýzy Cu(I) . Celkem bylo připraveno a specifikováno 22 látek 1,2,3-triazolů, z nichž bylo 20 zcela nových a 2 byly již popsány v literatuře.³⁶

Veškeré připravené látky budou po odštěpení protekčních skupin testovány na cytotoxické vlastnosti.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Obecné podmínky experimentální části

Monitorování průběhu reakcí a čistoty produktů byl prováděn pomocí TLC na hliníkových fóliích TLC Silica gel 60 F254 (Merck). Jako mobilní fáze sloužily:

A. Hexan / EtOAc

- a. 1:1
- b. 2:1
- c. 3:1
- d. 4:1
- e. 5:1
- f. 10:1

B. Cyklohexan / EtOAc

- a. 1:2
- b. 1:1
- c. 2:1

C. Hexan / toluen

- a. 1:1
- b. 4:1

D. Hexan

Po vyvolání v příslušné soustavě mobilní fáze byly skvrny látek detekovány pomocí UV záření při vlnové délce 254 nm, a posléze byly vizualizovány postříkem 10 % roztokem H_2SO_4 a záhřevem na 200 – 220 °C.

Purifikace látek byla zpravidla prováděna kolonovou chromatografií. Jako pevná fáze byl používán Silikagel 60, high-purity grade, 40 – 63 μm (Fluka), složení mobilní fáze je popsáno u jednotlivých experimentů.

Odpařování rozpouštědel bylo prováděno na RVO Rotovapor R-210 (Büchi).

Připravené látky byly analyzovány pomocí metod NMR, IR a stanovení teploty tání.

Měření spekter ^1H bylo prováděno na přístroji JEOL s frekvencí 500 Hz v roztoku CDCl_3 za laboratorní teploty. Jako vnitřní standard byl pro ^1H spektra použit TMS. Posuny píků ve ^1H spektrech byly referencovány vůči posunu přítomného zbytkového rozpouštědla CHCl_3 , a to 7,27 ppm. Hodnoty naměřených interakčních konstant a posunů byly stanoveny dle analýzy

prvního řádu a veškeré hodnoty byly rovněž zaokrouhleny. Hodnoty interakčních konstant byly zaokrouhleny na jedno desetinné číslo a hodnoty posunů na dvě desetinná čísla. Zpracování dat spekter bylo provedeno v programu JEOL Delta v5.0.2.

IR spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet iZ10 (Thermo Scientific) a zpracování dat ze střední oblasti ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), bylo provedeno v programu OMNIC 8.3.

Měření teplot tání bylo provedeno v bodotávku PHMK 78/1586 (VEB Analytik Dresden) bez provedení korekce.

Poznámka k číslování vzorců v experimentální části: Pro terpenickou část molekul je použito standardní číslování dle pravidel steroidního a terpenického názvosloví. Pro substituenty je použito číslování čárkovanými čísly, triazol má čísla 1'-5' a dále substituent na něm má nejnižší číslo u atomu, kterým je k triazolu připojen. Přestože to není správné číslování dle IUPAC, bylo zvoleno z důvodu srozumitelnosti interpretovaných signálů v NMR spektrech. Pro názornost je u experimentů, kde by mohly být nejasnosti, vždy očíslovaná struktura.

2. Obecné postupy zpracování reakčních směsí

- A. Reakční směs byla nalita do 8 – 10 násobku vody, a posléze byla extrahována do EtOAc, spojené organické podíly byly promyty vodou a vysušeny bezvodým MgSO_4 . Po odfiltrování $\text{MgSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO.
- B. Reakční směs byla nalita do 8 – 10 násobku vody. Poté byl přidán CHCl_3 , kterým byla organická fáze opakovaně extrahována. Spojené podíly organické fáze byly promyty vodou a sušeny bezvodým MgSO_4 . Po odfiltrování pevného hydrátu MgSO_4 bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO.
- C. Reakční směs byla nalita do 5 násobku ledové drti, po vysrážení produktu a roztátí ledu byl produkt zfiltrován a vysušen v exsikátoru.

3. Příprava výchozích látek

3.1. Protekce pomocí Ph₃SiCl

3.1.1. Příprava 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulinu (5)

Do roztoku betulinu (**1**) (5,00 g, 11,3 mmol) v DMF (80 ml) bylo za laboratorní teploty přidáno 3,5 equiv. imidazolu (2,69 g, 39,6 mmol). Po rozpuštění navážky imidazolu bylo dále přidáno 3,5 equiv. Ph₃SiCl (11,66 g, 39,6 mmol). Roztok reakční směsi byl míchán za teploty 50 °C po dobu 36 hod. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze A.e., A.f.). Surová reakční směs byla zpracována postupem A. Surový produkt (**5**) byl purifikován pomocí CC na silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita gradientová eluce směsi rozpouštědel o složení D až A.d. Byla izolována bílá krystalická látka **5** (8,73 g, 77,6 %) o t.t = 222-226 °C (hexan, CHCl₃), jejíž struktura byla následně potvrzena pomocí ¹H NMR. Krystalizace byla prováděna ze směsi hexan / CHCl₃.

Reakce byla zopakována ve 4 dalších šaržích s výtěžky v rozmezí (63,4 – 76,4) %.

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.65 (s, 3H); 0.79 (s, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.87 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, 5 × Me); 1.63 (s, 3H, H-30); 3.31 (m, 1H, H-3α); 3.48 (d, 1H, J = 10.3 Hz, H-28a); 3.82 (d, 1H, J = 9.8 Hz, H-28b); 4.52 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.60 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.48-7.50 (m, 20H); 7.73-7.76 (m, 10H, 30 × H-Ph).

3.1.2. Příprava 3-trifenylsilylbetulinové kyseliny (6)

Do roztoku kyseliny betulinové (**2**) (5,00 g, 10,9 mmol) v DMF (80 ml) bylo postupně za laboratorní teploty přidáno 1,5 equiv. imidazolu (1,12 g, 16,4 mmol) a následně po rozpuštění navážky bylo přidáno 1,5 equiv. Ph₃SiCl (4,27 g, 16,4 mmol). Roztok reakční směsi byl míchán za laboratorní teploty po dobu 48 hod. Monitoring průběhu reakce byl prováděn pomocí TLC (mobilní fáze A.d.). Surová reakční směs byla zpracována postupem A.

Surový směs obsahující látku **6** byla čištěna za použití CC na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit gradient směsi rozpouštědel hexan / toulén a hexan / EtOAc (C.b., A.c.). Krystalizace byla provedena ze směsi hexan / CHCl₃. Byla izolována bílá krystalická látka **6** (6,52 g, 83,3 %) o t.t = 145-149 °C (hexan, CHCl₃). Struktura látky byla prokázána pomocí ¹H NMR.

Reakce byla zopakována v dalších 3 šaržích a výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí (59,7 – 76,7) %.

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.85 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.92 (s, 3H), 0.96 (s, 3H, 5 × Me); 3.0 (td, 1H, J₁ = 10.9 Hz, J₂ = 10.9 Hz, J₃ = 4.6 Hz, H-19β); 3.34 (dd, 1H, J₁ = 11.5 Hz, J₂ = 4.6 Hz, H-3α); 4.60 (bs, 1H, H-29 *proE*); 4.73 (bs, 1H, H-29 *proZ*); 7.37-7.45 (m, 10H); 7.65 (d, 5H, 15 × H-Ph).

3.2. Allylová bromace

3.2.1. Příprava 30-brom-3,28-di-O-acetylbetulinu (7)

Příprava bez použití AIBN

Roztok betulin diacetátu **3** (1,00 g, 1,9 mmol) v CCl₄ (18 ml) byl za laboratorní teploty smíchán s 1,7 equiv. rekrystalizovaného NBS (574 mg, 3,2 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 1 hod. za laboratorní teploty, poté byla zahřívána na teplotu 50 °C po dobu 3 hod., následně byla teplota zvýšena až na 77 °C. Celková doba reakce byla 4,5 hod. Surová reakční směs byla zpracována postupem B. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC za použití mobilní fáze A.e.

Surový produkt byl posléze přečištěn za použití CC. Jako stacionární fáze byl použit silikagel, jako mobilní fáze byl použit gradient směsi rozpouštědel hexan / EtOAc v poměrech A.e – A.b. Byla izolována bílá krystalická látka **7** (586 mg, 51,0 %). Krystalizace byla provedena ze směsi hexan / CHCl₃.

Byly naměřeny t.t. = 188-190 °C (hexan) látky **7** a struktura byla potvrzena pomocí a ¹H NMR:

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.84 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.96 (s, 3H); 1.05 (s, 3H, 5 × Me); 2.05 (s, 3H); 2.08 (s, 3H, 2 × Ac); 2.46 (dt, J₁ = 10.9 Hz, J₂ = 10.9 Hz, J₃ = 5.2 Hz, H-19β); 3.85 (d, 1H, J = 11.5 Hz, H-28b); 3.98 (s, 2H, H-30); 4.27 (d, J = 10.3 Hz, H-28a); 4.48 (dd, 1H, J₁ = 10.9 Hz, J₂ = 6.3 Hz, H-3α); 5.04 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.14 (s, 1H, H-29 *proZ*).

Použití AIBN, jako iniciačního činidla reakce

Roztok betulin diacetátu **3** (1,00 g, 1,9 mmol) v CCl₄ (18 ml) byl za laboratorní teploty smíchán s 1,5 equiv. rekrystalizovaného NBS (509 mg, 2,8 mmol) a s 5 mol. % AIBN (15,6 mg, 0,1 mmol). Homogenní reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Posléze byla reakční teplota zvýšena na 50 °C. Po 2 hod. byla teplota reakce opět zvýšena na 77 °C. Po 30 min byla reakce ukončena a reakční směs byla zpracována postupem B. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC za použití mobilní fáze A.e.

Purifikace surového produktu byla provedena za stejných podmínek, jako v předchozí kapitole. Látka **7** byla za použití AIBN připravena ve výtěžcích 861 mg, 74,9 %.

Reakce byla provedena v dalších 3 šaržích a relativní výtěžky allylové bromace se pohybovaly v rozsahu (54,8 – 70,6) %.

3.2.2. Příprava 30-brom-3-O-acetylbetulinové kyseliny (8)

Příprava bez použití AIBN

Roztok 3-O-acetylbetulinové kyseliny (**4**) (1,00 g, 2,0 mmol) v CCl₄ (15 ml) byl za laboratorní teploty smíchán s 1,7 equiv. rekrystalizovaného NBS (607 mg, 3,4 mmol). Reakční směs byla po dobu 1 hod. míchána při laboratorní teplotě, poté byla zvýšena teplota na 50 °C, při níž se směs reagovala 3,5 hod. K záhřevu na teplotu 77 °C došlo na pouhých 30 min, po nichž byla výchozí látka **4** zcela spotřebována. Celková doba reakce byla 5 hod. Po ukončení reakce byla surová směs produktů zpracována postupem B. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC za použití mobilní fáze A.d. s přídavkem 0,6 % (obj.) AcOH.

Surový produkt látky **8** byl purifikován pomocí CC na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit gradient směsi rozpouštědel A.d.- A.b. s přídavkem 0,6 % (obj.) AcOH. Allylovou bromací pomocí NBS bez použití AIBN byla připravena bílá tuhá látka **8** (648 mg, 55,9 %)

Pro identifikaci látky **8** byly naměřeny t.t. = 167-172 °C (CHCl₃) a struktura byla potvrzena pomocí a ¹H:

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.83 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.93 (s, 3H); 0.99 (s, 3H, 5 × Me); 2.05 (s, 3H, Ac); 3.04 (td, 1H, J₁ = 11.2 Hz, J₂ = 11.2 Hz, J₃ = 4.4 Hz, H-19); 4.01

(s, 2H, H-30); 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 10.3$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, H-3 α); 5.05 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.16 (s, 1H, H-29 *proZ*).

Použití AIBN, jako iniciačního činidla reakce

3-*O*-acetylbetulínová kyselina (**4**) (1,00 g, 2,0 mmol) byla rozpuštěna v CCl₄ (15 ml) a za laboratorní teploty byl roztok smíchán s 1,5 equiv. rekrystalizovaného NBS (535 mg, 3,0 mmol) a 5 mol. % AIBN (16,5 mg, 0,01 mmol). Roztok reakční směsi byl míchán za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Následně byla reakční teplota zvýšena na 50 °C. Po 2,5 hod. byla teplota reakce opět zvýšena na 77 °C. Po 30 min byla reakční směs zpracována pomocí postupu B. Průběh reakce a čistota výsledného produktu byly monitorovány pomocí TLC za použití mobilní fáze A.d. s přídatkem 0,6% (obj.) AcOH.

Nežádoucí nečistoty byly odstraněny za stejných podmínek, jako v předchozí kapitole. Látka **8** byla za použití AIBN připravena ve výtěžcích 823 mg, 71,1 %.

3.2.3. Příprava 30-brom-3,28-bis(trifenylsilyl)-betulínu (9)

Navážka 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulínu (**5**) (2,00 g, 2,0 mmol) byla rozpuštěna ve CCl₄ (15 ml), a poté byly přidány 1,6 equiv. NBS (571,9 mg, 3,2 mmol) a 5 mol. % AIBN (16,5 mg, 0,1 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 1 hod., poté byla zvýšena reakční teplota na 50 °C. Po 4 hod. záhřevu reakční směsi již výchozí látka **9** téměř zreagovala, teplota byla znovu zvýšena na 77 °C po dobu 10 min. Poté byla reakční směs rychle ochlazená a zpracována postupem B. Průběh reakce a složení výsledné surové směsi produktů byl pozorován pomocí TLC za použití mobilní fáze A.e., C.b.

Surový produkt **9** byl purifikován za použití CC, jako stacionární fáze byl použit silikagel, jako mobilní fáze byl použit gradient směsi rozpouštědel C.b – A.c. Přečištěním byla izolována bílá tuhá látka **9** (2,01 g, 93,1 %) o t.t. = 191-196 °C (hexan) . Reakce byla zopakována v 5 dalších šaržích, výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí (76,2 – 83,9) %.

Struktura látky byla potvrzena pomocí ¹H NMR.

¹H NMR spektrum (δ , ppm): 0.84 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.91 (s, 3H); 0.92 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, 5 \times Me); 2.30 (td, 1H, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, $J_3 = 5.15$ Hz, H-19 β); 3.31 (dd, 1H, $J_1 = 11.5$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H-3 α) 3.48 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-28b); 3.83 Hz (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-

28a); 3.93 (s, 2H, H-30); 4.97 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.03 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.36-7.47 (m, 20H); 7.64-7.67 (m, 10H, 30 × Ph).

3.2.4. Příprava 30-brom-3-trifenylsilylbetulinové kyseliny (10)

Navážené množství 3-trifenylsilylbetulinové kyseliny (**6**) (2,00 g, 2,8 mmol) bylo za laboratorní teploty rozpuštěno v CCl₄ (13 ml). Poté bylo přidáno 1,6 equiv. NBS (795,9 mg, 4,5 mmol) a 5 mol. % AIBN (23,0 mg, 0,1 mmol). Homogenní reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Posléze byla reakční směs zahřívána na teplotu 50 °C po dobu 4 hod, následně byla reakční teplota zvýšena na 77 °C a reakce probíhala 30 min, během nichž došlo k úplnému zreagování výchozí látky **6**. Složení reakční směsi bylo monitorováno pomocí TLC za použití mobilní fáze A.c., A.d. s přidavkem 0,6 % (obj.) AcOH, po ukončení reakce byla surová směs zpracována postupem B.

Surový produkt **10** byl purifikován pomocí CC na silikagelu. Mobilní fázi tvořil gradient směsi rozpouštědel C.b. a A.d.-A.b. s přidavkem 0,6% (obj.) AcOH. Reakce byla zopakována celkem 6× a výtěžky se pohybovaly v rozmezí (63,1 – 80,7) %.

Purifikací byl izolován bílý tuhý produkt **10** (1,80 g, 81,1%). o t.t. = 202-210 °C, struktura byla potvrzena pomocí ¹H.

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.84 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.91 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, 5 × Me); 3.03 (td, 1H, J₁ = 11.5 Hz, J₂ = 11.5 Hz, J₃ = 4.6 Hz, H-19β); 3.33 (dd, 1H, J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 4.6 Hz, H-3α); 3.99 (bs, 2H, H-30); 5.03 (s, 1H, H-29 *proE*), 5.14 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.37-7.45 (m, 10H); 7.64-7.65 (m 5H, 15 × Ph).

3.3. Příprava azidů nukleofilní substitucí

3.3.1. Příprava 30-azido-3,28-di-O-acetylbetulinu (11)

Navážka látky (**7**) (2,00 g, 3,3 mmol) byla rozpuštěna v MeCN (100 ml) a následně byla za laboratorní teploty přidána navážka 1,5 equiv. NaN₃ (322,0 mg, 5,0 mmol). Heterogenní reakční směs byla míchána při teplotě 82 °C po dobu 16 hod. Poté byla surová reakční směs zpracována postupem C, přičemž byla ledová drť okyselena přidavkem HCl na pH ± 3. Sledování složení reakční směsi a čistoty produktu bylo prováděno pomocí mobilní

fáze A.e. Surový produkt (**11**) byl purifikován pomocí CC na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel A.e..

Byla připravena bílá krystalická látka (**11**) (1,67 g, 89,1 %), u níž byly naměřeny t.t. = 172-180 °C. Krystalizace byla prováděna ze směsi hexan / CHCl₃. Tato reakce byla reprodukována v dalších 5 šaržích, přičemž výtěžky se pohybovaly v rozmezí (74,6 – 88,9) %. Struktura látky byla potvrzena pomocí ¹H NMR.

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.84 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.98 (s, 3H); 1.04 (s, 3H, 5 × Me); 2.05 (s, 3H); 2.08 (s, 3H, 2 × Ac); 2.37 (m, 1H, H-19β); 3.76 (dd, 2H, J₁ = 14.9 Hz, J₂ = 14.3 Hz, H-30); 3.83 (d, 1H, J = 10.9 Hz, H-28b); 4.25 (s, 1H, J = 10.9 Hz, H-28a); 4.47 (dd, 1H, J₁ = 10.3 Hz, J₂ = 6.3 Hz, H-3α); 4.97 (s, 1H, H-29 *proE*), 5.01 (s, 1H, H-29 *proZ*).

3.3.2. Příprava 30-azido-3-O-acetylbetulínové kyseliny (**12**)

Do roztoku látky **8** (2,00 g, 3,5 mmol) v MeCN (80 ml) bylo za laboratorní teploty přidáno 1,5 equiv. NaN₃ (337,6 mg, 5,2 mmol). Heterogenní reakční směs byla míchána při teplotě 82 °C po dobu 20 hod. Složení reakční směsi a čistota produktu byla monitorována za použití TLC, jako mobilní fáze sloužila směs rozpouštědel o složení A.b., A.c. Reakce byla ukončena a zpracována pomocí postupu C. Surový produkt **12** byl čištěn za použití CC, jako stacionární fáze byl použit silikagel, jako mobilní fáze sloužil gradient směsi rozpouštědel o složení A.c. až A.a.

Byla připravena bílá tuhá látka **12** (1,54 g, 82,5 %), u níž byla naměřena t.t. = 141-150 °C (hexan). Postup byl reprodukován v dalších 2 šaržích, přičemž výtěžky se pohybovaly v rozmezí (71,1 – 83,0) %.

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.83 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.93 (s, 3H); 0.99 (s, 3H, 5 × Me); 2.05 (s, 3H, Ac); 2.95 (td, 1H, J₁ = 10.9 Hz, J₂ = 11.5 Hz, J₃ = 5.2 Hz, H-19β); 3.77 (s, 2H, H-30); 4.48 (dd, 2H, J₁ = 10.9 Hz, J₂ = 5.2 Hz, H-3α); 4.98 (s, 1H, H-29 *proE*), 5.01 (s, 1H, H-29 *proZ*).

3.3.3. Příprava 30-azido-3,28-bis(trifenylsilyl)-betulinu (13)

Použití DMSO a laboratorní teploty

Navážka výchozí látky (**9**) (2,00 g, 1,9 mmol) byla za laboratorní teploty rozpuštěna v DMSO (40 ml), do roztoku byla poté přidána navážka 1,8 equiv. NaN₃ (217,7 mg, 3,3 mmol). Heterogenní reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 36 hod. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel A.f., C.b. Posléze byla reakce ukončena a zpracována pomocí postupu C, přičemž ledová tříšť byla okyselena pomocí HCl na pH ± 3.

Surový produkt byl purifikován pomocí CC na silikagelu, jako mobilní fáze byl použit gradient směsi rozpouštědel C.b. a A.f. – A.e. Byl izolován bílá tuhá látka **13** (1,33 g, 68,9 %), o t.t. = 155-161 °C. Struktura byla potvrzena pomocí ¹H, ¹³C NMR spektrometrie. Reakce byla reprodukována v dalších 5 šaržích, přičemž výtěžky se pohybovaly v rozmezí (53,9 – 74,9) %.

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.64 (s, 3H); 0.78 (s, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.87 (s, 3H); 0.95 (s, 3H, 5 × Me); 2.23 (td, 1H, J₁ = 10.3 Hz, J₂ = 11.5 Hz, J₃ = 6.3 Hz, H-19β); 3.33 (dd, 1H, J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 4.0 Hz, H-3α); 3.45 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H-28a); 3.70 (d, 2H, J₁ = 4.6 Hz, H-30); 3.82 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H-28b); 4.89 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.93 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.36 – 7.50 (m, 10H); 7.63 – 7.66 (m, 5H, 15 × Ph).

Použití DMSO a teploty 50 °C

Navážka výchozí látky (**9**) (100 mg, 0,1 mmol) byla za laboratorní teploty rozpuštěna v DMSO (5 ml), do roztoku byla poté přidána navážka 3,0 equiv. NaN₃ (18,1 mg, 0,3 mmol). Heterogenní reakční směs byla míchána při 50 °C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel A.f., C.b. Jelikož nedošlo k vzniku požadované látky **13**, nebyla surová směs dále zpracována.

Použití THF a teploty 45 °C

Navážené množství látky **9** (100 mg, 0,1 mmol) bylo rozpuštěno za laboratorní teploty v THF (7 ml), poté byla přidána navážka 1,5 equiv. NaN₃ (9,1 mg, 0,2 mmol), po 24 hod. míchání za laboratorní teploty bylo přidáno dalších 1,5 equiv. NaN₃ (9,1 mg, 0,2 mmol). Reakční směs byla ponechána za laboratorní teploty a míchání dalších 24 hod. Po této době

byla zvýšena reakční teplota na 45 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, za použití mobilních fází A.f., C.b. Reakční směs byla zpracována podle postupu C, nicméně purifikace surové směsi produktů nebyla provedena z důvodu velmi malého výtěžku látky **13**.

Použití dioxanu a laboratorní teploty

Látka **9** (100 mg, 0,1 mmol) byla rozpuštěna za laboratorní teploty v dioxanu (5 ml), následně 1,5 equiv. NaN₃ (9,1 mg, 0,2 mmol) bylo přidáno k roztoku. Roztok byl míchán po dobu 24 hod. za laboratorní teploty. Monitorig složení reakční směsi byl proveden za použití TLC, jako mobilní fáze byly použity směsi rozpouštědel A.f., C.b. Reakční směs byla zpracována podle postupu C, purifikace surové směsi produktů byla provedena za použití sloupcové chromatografie na silikagelu. Mobilní fázi tvořila soustava rozpouštědel C.b. Byla izolována tuhá bílá látka **13** (47 mg, 48,7%).

3.3.4. Příprava 30-azido-3-trifenylsilylbetulinové kyseliny (14)

Látka **10** (2,00 g, 2,5 mmol) byla rozpuštěna v MeCN (100 ml) sonifikací, poté byla za laboratorní teploty přidána navážka 1,8 equiv. NaN₃ (294,5 mg, 4,5 mmol). Reakční směs byla posléze míchána při teplotě 82 °C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl monitorován za použití TLC. Jako mobilní fáze byla použita soustava rozpouštědel A.d. Po ukončení reakce byla surová směs zpracována postupem C.

Surový produkt **14** byl čištěn CC na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit gradient směsi rozpouštědel A.e. – A.c. Byla izolována bílá krystalická látka **14** (1,46 g, 76,9 %) o t.t. = 166-168 °C (hexan). Reakce byla reprodukována v dalších šaržích, přičemž výtěžky se pohybovaly v rozmezí (63,7 – 75,2) %. Struktura byla potvrzena pomocí ¹H a ¹³C NMR spektrometrie.

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.84 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.91 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, 5 × Me); 2.92 (td, 1H, J₁ = 11.5 Hz, J₂ = 10.9 Hz, J₃ = 4,6 Hz, H-19β); 3.33 (dd, 1H, J₁ = 11.5 Hz, J₂ = 4.6 Hz, H-3α); 3.73 (d, 1H, J₁ = 5.7 Hz, H-30); 4.96 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.02 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.27 – 7.44 (m, 10H); 7.64 – 7.65 (m, 5H, 15 × Ph).

3.4. Příprava 3,28-di-*O*-acetylbetul-30-olu (3a), 3,28-di-*O*-acetylbetul-30-olu (3b)

3.4.1. Příprava 30-oxo-3,28-di-*O*-acetylbetulinu (3a)

Navážka látky **3** (5,00 g, 9,4 mmol) byla za laboratorní teploty rozpuštěna v GLYM (70 ml), poté byla přidána navážka 2,0 equiv. nadbytku SeO₂ (2,14 g, 19,2 mmol). Roztok byl míchán při teplotě 125 °C po dobu 24 hod. Poté byla surová směs zpracována postupem A, přičemž do vodné fáze byl přidán nasycený roztok NaCl. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC za použití mobilní fáze A.e. Následná CC byla prováděna v mobilní fázi o gradientovém složení A.e. až A.a. Byla připravena bílá krystalická látka **3a** (3,28 g, 63,5 %) o t.t. = 164-170 °C (hexan).

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.83 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 10.2 (s, 3H, 5 × Me); 2.04 (s, 3H); 2.08 (s, 3H, 2 × Ac); 2.81 (m, 1H, H-19β); 3.87 (d, 1H, J = 11.5 Hz, H-28a); 4.28 (d, 1H, J = 10.9 Hz, H-28b); 4.45 (dd, 1H, J₁ = 10.3 Hz, J₂ = 5.7 Hz, H-3α); 5.93 (s, 1H, H-29 *proE*); 6.28 (s, 1H, H-29 *proZ*); 9.51 (s, 1H, CHO).

IR spektrum: 1687 (C=C); 1737 (CHO).

3.4.2. Příprava 30-hydroxy-3,28-di-*O*-acetylbetulinu (3b)

K roztoku látky **3a** (737,4 mg, 1,4 mmol) v DCM (20 ml) a MeOH (3 ml) byla za laboratorní teploty přisypána navážka ekvivalentního množství redukčního činidla NaBH₄ (51,6 mg, 1,4 mmol). Roztok byl míchán při laboratorní teplotě po dobu 2 hod. Poté byla surová směs zpracována postupem B. Byla provedena purifikace CC na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs A.c., Tatáž fáze byla použita i pro TLC. Byla připravena bílá krystalická látka **3b** (635,8 mg, 74,0 %) o t.t. = 142-148 °C (hexan).

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.84 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.98 (s, 3H); 1.04 (s, 3H, 5 × Me); 2.05 (s, 3H); 2.07 (s, 3H, 2 × Ac); 2.34 (td, 1H, J₁ = 10.9 Hz, J₂ = 11.5 Hz, J₃ = 5.7 Hz, H-19); 3.85 (d, 1H, J = 11.4 Hz, H-28a); 4.12 (s, 2H, H-30); 4.24 (d, 1H, J = 11.4 Hz, H-28b); 4.47 (dd, 1H, J₁ = 10.3 Hz, J₂ = 5.7 Hz, H-3α); 4.91 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.97 (s, 1H, H-29 *proZ*).

4. Cykloadice azidů a terminálních alkynů

4.1. Obecný postup reakce

Navážka azidu (**11**, **12**, **13**, **14**) byla rozpuštěna v DMF. Poté bylo do roztoku přidáno za laboratorní teploty 0,5 equiv. L-askorbanu sodného a 0,5 equiv. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Po vzniku Cu(I) redukcí Cu(II), jenž se projevil vznikem zelené barvy roztoku, byly přidány 1 – 2 ekvivalenty terminálního alkynu. Reakce byla obvykle prováděna za laboratorní teploty, až na vybrané cykloadice, při nichž byla reakční směs zahřívána na 50 °C. Reakční doba se pohybovala v rozmezí od 4,5 – 34 hod. Průběh reakcí a čistota produktů (**15** – **38**) byla monitorována pomocí TLC, jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel hexan a EtOAc nebo cyklohexan a EtOAc v různých poměrech (mobilní fáze A.a.-A.d., B.a.-B.c.).

Reakce byla ukončena vlitím reakční směsi do ledové drti a vysrážením produktu, který byl poté odfiltrován skrze fritu a za laboratorní teploty sušen v exsikátoru (zpracování pomocí postupu C). Vzniklé 1,4 disubstituované triazoly byly purifikovány pomocí CC za použití silikagelu, jako stacionární fáze. Jako mobilní fáze byla použita opět směs rozpouštědel hexan / EtOAc nebo cyklohexan / EtOAc v různých poměrech (A.a.-A.e., B.a.-B.c.)

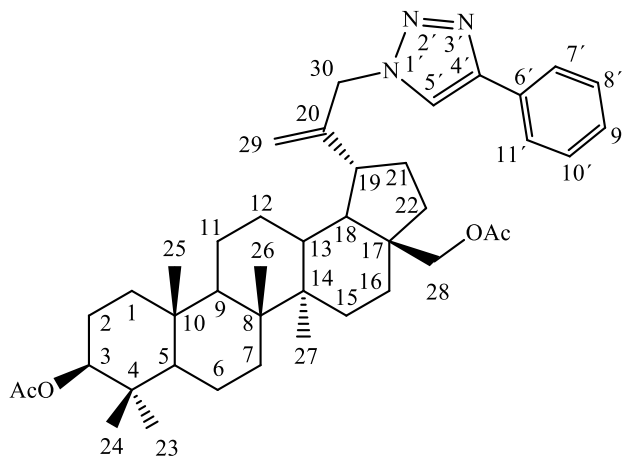
Struktury připravených triazolů byly potvrzeny pomocí ^1H a ^{13}C NMR a zároveň byla u látek změřena i teplota tání.

4.2. Triazoly 3-*O*-28-*O*-diacetylbetulinu

4.2.1. 30-(4'-fenyl-1*H*-1,2,3-triazo-1'-yl)-3,28-di-*O*-diacetylbetulin (**15**)

Látka **15** byla připravena dle obecného postupu uvedeného v kapitole 4.1. Reakce byla provedena ve dvou šaržích. V první šarži byl roztok výchozí látky **11** (50 mg, $9 \cdot 10^{-2}$ mmol) v DMF (5 ml) smíchán se všemi reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (11,0 mg, $4 \cdot 10^{-2}$ mmol), L-askorban sodný (8,7 mg, $4 \cdot 10^{-2}$ mmol) a fenylacetylenem (9,6 μl , $9 \cdot 10^{-2}$ mmol) dle obecného postupu a poté byla reakční směs míchána při teplotě 50 °C po dobu 5 hod. V druhé šarži probíhala reakce azidu **11** (200 mg, 0,4 mmol) v DMF (15 ml) a reaktantů $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (44,0 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (35,0 mg, 0,2 mmol) a fenylacetylen (38,7 μl , 0,4 mmol) za laboratorní teploty po dobu 22 hod.

Zpracování bylo provedeno dle obecného postupu, přičemž ledová drť byla okyselena pomocí HCl na $\text{pH} \pm 3$. Jako mobilní fáze pro TLC sloužila směs rozpouštědel A.a. Mobilní fáze o stejném složení byla použita i při purifikaci surové látky **15** CC. Byla připravena bílá látka **15** o t.t. = 124-128 °C (hexan), výtěžky reakcí dosahovaly hodnot 43,6 mg (74,0 %) a 208,4 mg (88,3 %).



Obrázek 7: 30-(4'-fenyl-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)-3,28-di-O-diacetylbetulín (**15**)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.80 (s, 6H); 0.81 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 0.99 (s, 3H, 5 \times Me); 2.01 (s, 3H); 2.01 (s, 3H, 2 \times Ac); 2.34 (m, 1H, H-19 β); 3.74 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, H-28b); 4.20 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, H-28a); 4.43 (dd, 1H, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, H-3 α); 4.70 (s, 1H, H-29 proE); 4.93 (d, 2H, $J_{\text{GEM}} = 15.1$ Hz, H-30); 5.03 (s, 1H, H-29 proZ); 7.29 (t, 1H, $J = 7.53$ Hz, H-9'); 7.38 (t, 2H, $J = 8.3$ Hz, H-8', 10'); 7.72 (s, 1H, H-5'); 7.81 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H-7', 11').

4.2.2. 30-(4'-(7'-formylfenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)-3,28-di-O-diacetylbetulín (**16**)

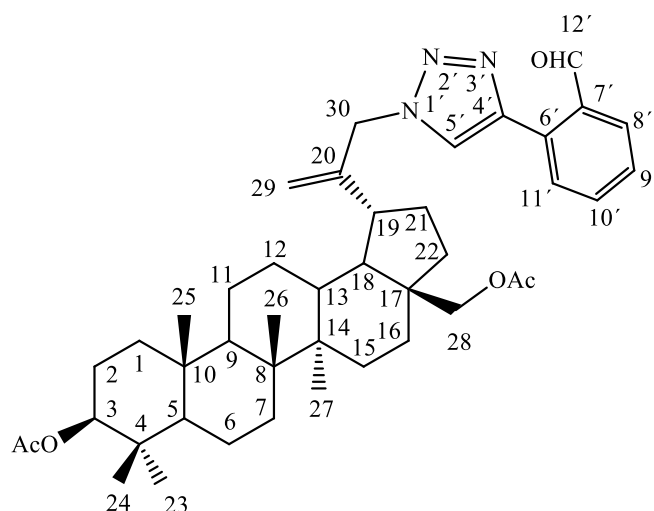
Příprava látky **16** byla prováděna podle obecného postupu popsaného v kapitole 4.1. Reakce byla provedena ve dvou šaržích. Za laboratorní teploty byla rozpuštěna navážka výchozí látky **11**. (50 mg, $9 \cdot 10^{-2}$ mmol) v DMF (5 ml) a roztok byl smíchán se všemi reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (11,0 mg, $4 \cdot 10^{-2}$ mmol), L-askorban sodný (8,7 mg, $4 \cdot 10^{-2}$ mmol) a 2-ethynylbenzaldehyd (11,5 mg, $9 \cdot 10^{-2}$ mmol). Poté byla reakční směs míchána při teplotě 50 °C po dobu 4,5 hod.

Reakce byla zopakována s navážkou výchozího azidu **11** (150 mg, 0,3 mmol), který byl rozpuštěn v DMF (15 ml). Po přidavku všech reagensů: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (33,0 mg,

0,1 mmol), L-askorban sodný (26,2 mg, 0,1 mmol) a 2-ethynylbenzaldehyd (34,4 mg, 0,3 mmol) probíhala reakce za laboratorní teploty po dobu 20 hod.

Po uplynutí doby reakce byla reakční směs zpracována dle obecného postupu, přičemž ledová drť byla okyselena HCl na $\text{pH} \pm 3$. Průběh reakcí byl monitorován TLC za použití mobilní fáze A.b. Purifikace CC byla prováděna gradientovou elucí, mobilní fáze byla tvořena rozpouštědly v poměrech A.c. až A.b.

Byla izolována bílá krystalická látka **16** o t.t. = 129 - 134 °C (hexan) (42,6 mg, 69,4 % v první šarži a 133,4 mg, 72,3 % ve druhé šarži). Krystalizace byla provedena ze směsi hexan / CHCl_3 . Struktura byla potvrzena pomocí ^1H NMR spektrometrie.



Obrázek 8: 30-(4'-(7'-formylfenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)-3,28-di-O-acetylbetulín (16)

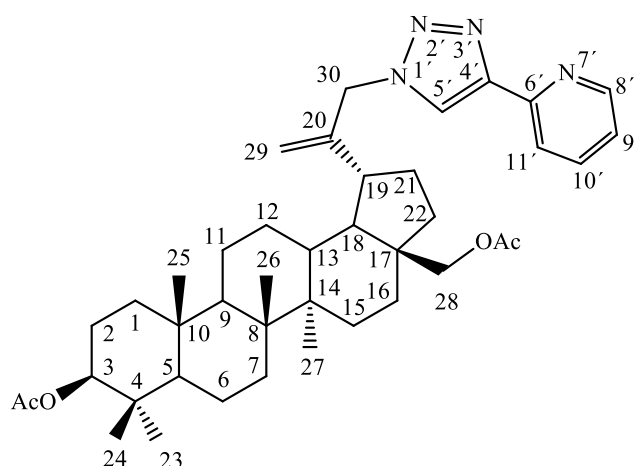
^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.98 (s, 3H); 1.03 (s, 3H, 5 \times Me); 2.04 (s, 3H); 2.05 (s, 3H, 2 \times Ac); 3.78 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, H-28a); 4.25 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, H-28b); 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 10.0$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, H-3 α); 4.75 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.00 (d, 2H, $J = 15.0$ Hz, H-30); 5.08 (s, 1H, $J = 15.0$ Hz, H-29 *proZ*); 7.53 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz); 7.65 (td, 1H, $J_1 = 7.3$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz, $J_3 = 0.9$ Hz); 7.70 – 7.75 (m, 2H); 7.84 (s, 1H); 8.03 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, 6 \times H-aromát); 10.38 (s, 1H, CHO).

4.2.3. 30-(4'-(7'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)-3,28-di-O-acetylbetulín (17)

Roztok azidu **11** (150 mg, 0,3 mmol) v DMF (15 ml) byl za laboratorní teploty smíchán s navážkami reaktantů dle obecného postupu: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (33,0 mg, 0,1 mmol), L-

askorban sodný (26,2 mg, 0,1 mmol) a 2-ethynylpyridin (26,7 μ l, 0,3 mmol). Reakce byla prováděna za laboratorní teploty a probíhala po dobu 16 hod. Následně byla surová směs zpracována uvedeným obecným postupem. Směs rozpouštědel A.b. byla použita pro TLC k monitorování průběhu reakce a čistoty produktu. Purifikace surového produktu **17** byla provedena CC na silikagelu s gradientovou elucí směsí rozpouštědel v poměrech A.c až A.b.

1,2,3-triazol **17** byl nažloutlé barvy (98,0 mg, 55,3 %) o t.t. = 198-203 °C (hexan) Struktura látky byla potvrzena uvedenými spektrálními daty.



Obrázek 9: 30-(4'-(7'-formylfenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)-3,28-di-O-acetylbetulín (16)

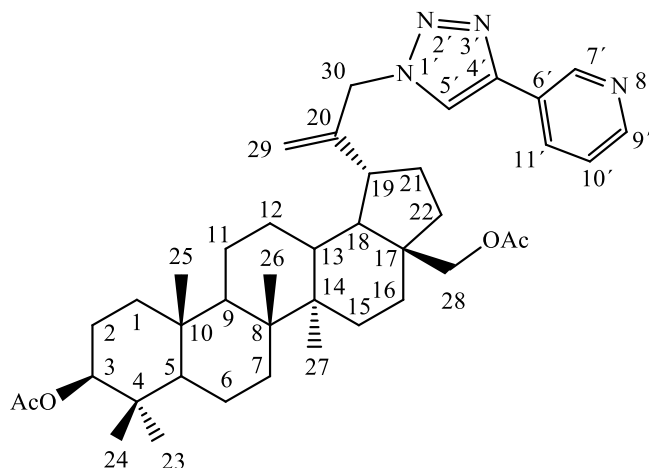
^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 6H); 0.84 (s, 3H); 0.96 (s, 3H); 1.02 (s, 3H, 5 \times Me); 2.04 (s, 3H); 2.05 (s, 3H, 2 \times Ac); 2.19 (m, 1H, H-19); 3.76 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, H-28b); 4.24 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, H-28a); 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, H-3 α); 4.71 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.00 (AB-system, 2H, $J_{\text{GEM}} = 15.6$ Hz, H-30); 5.06 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.24 (t, 1H, $J = 4.7$ Hz); 7.65 (td, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz); 8.15 (s, 1H, H-5'); 8.19 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz); 8.57 (m, 1H, H-8',9',10',11').

4.2.4. 30-(4'-(8'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)-3,28-di-O-acetylbetulín (18)

K navážce azidu **11** (150 mg, 0,3 mmol) v DMF (15 ml) byly postupně za laboratorní teploty přidány ostatní reaktanty dle uváděného obecného postupu v kap. 4.1.: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (33,0 mg, 0,1 mmol), L-askorban sodný (26,2 mg, 0,1 mmol) a 3-ethynylpyridin (27,2 mg, 0,3 mmol). Reakce probíhala za neustálého míchání za laboratorní teploty po dobu 16 hod. Poté byla reakce ukončena a surová směs zpracována uvedeným obecným postupem. Pro

monitorig průběhu reakce bylo použito TLC s mobilní fází A.b. Produkt 20 byl čištěn na silikagelu CC, jako mobilní fáze byl použit gradient směsi rozpouštědel A.c až A.b.

Byla připravena lehce nažloutlá pevná látka **18** (103,1 mg, 58,2 %) o t.t. = 192-196 °C (hexan) se spektrálními daty:



Obrázek 10: 30-(4'-(8'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)-3,28-di-O-acetylbetulín (18)

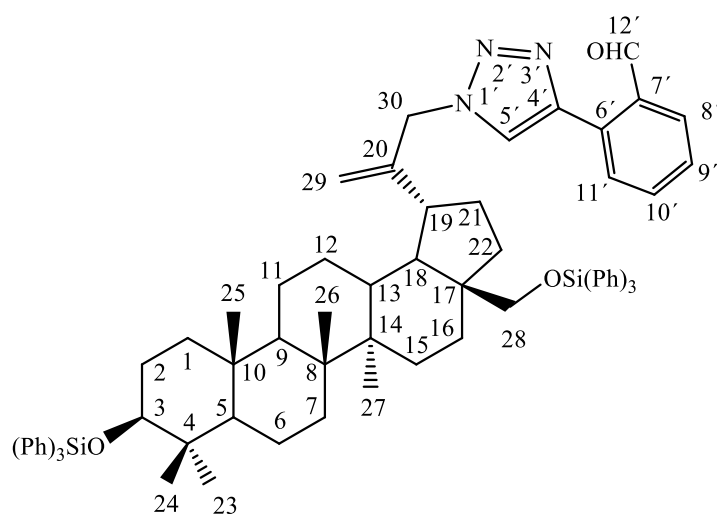
^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 6H); 0.84 (s, 3H); 0.98 (s, 3H); 1.02 (s, 3H, 5 \times Me); 2.04 (s, 3H); 2.05 (s, 3H, 2 \times Ac); 2.39 (m, 1H, H-19 β); 3.76 (m, 1H, H-28b); 4.25 (d, 1H, J = 11.2 Hz, H-28a); 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, H-3 α); 4.75 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.00 (m, 2H, H-30); 5.09 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.27 (m, 1H); 7.39 (m, 1H); 7.85 (m, 1H, H-5'); 8.24 (m, 1H); 8.59 (s, 1H); 9.00 (s, 1H, H-7',9',10',11').

4.3. Triazoly 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulínu

4.3.1. 30-(4'-(7'-formylfenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulín (19)

Roztok azidu **13** (350 mg, 0,3 mmol) v DMF (20 ml) byl smíchán dle obecného postupu s ostatními reaktanty, a to s: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (42,1 mg, 0,2 mmol), L-askorbanem sodným (33,4 mg, 0,2 mmol) a terminálním alkynem 2-ethynylbenzaldehydem (78,1 mg, 0,6 mmol). Reakce byla prováděna za laboratorní teploty, poté byla po 28 hod. ukončena a zpracována dle obecného postupu. Pro kontrolu průběhu reakce a čistoty produktu bylo použito TLC s mobilní fází A.c. Surový produkt byl čištěn CC za použití totožné mobilní

fáze, jako pro TLC. Byl izolována pevná nažloutlá látka **19** (325,8 mg, 82,7 %) o t.t. = 137-143 °C (hexan).

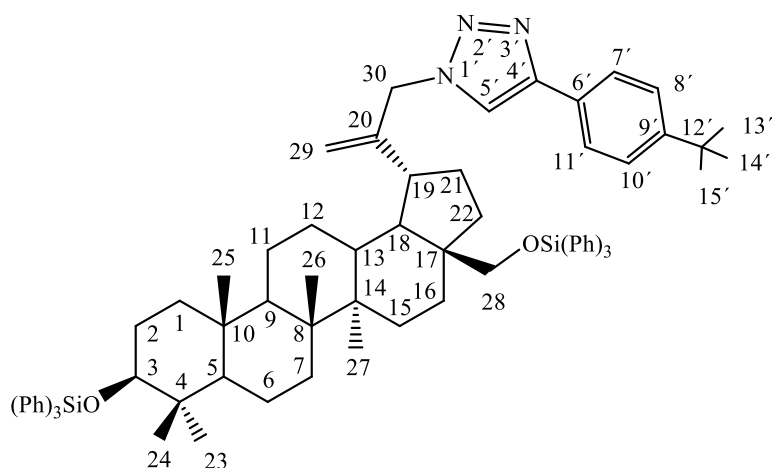


Obrázek 11: 30-(4'-(7'-formylfenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (19)

¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.64 (s, 3H); 0.79 (s, 3H); 0.87 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, 5 × Me); 2.27 (m, 1H, H-19β); 3.32 (dd, 1H, J₁ = 11.7 Hz, J₂ = 4.2 Hz, H-3α); 3.43 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H-28b); 3.81 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H-28a); 4.65 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.95 (t, 1H, J = 14.8 Hz, H-30); 5.02 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.36-7.46 (m, 20H); 7.52 (t, 1H, J = 7.8 Hz); 7.63-7.66 (m, 16H); 7.70 (m, 1H); 7.76 (s, 1H, H-5'); 8.04 (dd, 1H, J₁ = 7.8 Hz, J₂ = 1.0 Hz, 9 × H-Ph, H-8',9',10',11'); 10.38 (s, 1H, CHO).

4.3.2. 30-(4'-(9'-*t*-butylfenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (20)

Navážka azidu **13** (350 mg, 0,3 mmol) byla rozpuštěna v DMF (20 ml), a poté byla smíchána podle obecného postupu s reaktanty, a to s: CuSO₄·5H₂O (42,1 mg, 0,2 mmol), L-askorbanem sodným (33,4 mg, 0,2 mmol) a 4-*tert*-butylfenylacetylenem (108,2 μl, 0,6 mmol). K reakci docházelo za laboratorní teploty a po 28 hod. byl surový produkt **20** zpracován dle obecného postupu. Mobilní fáze pro TLC a CC tvořila směs A.d. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií, byla izolována pevná bílá látka **20** (318,1 mg, 78,9 %) o t.t. = 169-174 °C (hexan).

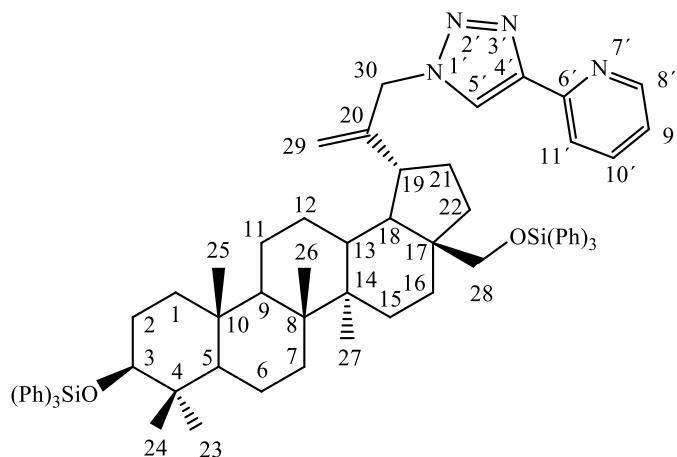


Obrázek 12: 30-(4'-(9'-*t*-butylfenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (20)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.64 (s, 3H); 0.78 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, $5 \times \text{Me}$); 1.36 (s, 9H, *t*-Bu); 2.21 (m, 1H, H-19 β); 3.32 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, H-3 α); 3.40 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-28b); 3.70 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-28a); 4.61 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.92 (AB-system, 2H, $J_{\text{GEM}} = 12.2$ Hz, H-30); 4.97 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.36-7.47 (m, 20H); 7.62-7.66 (m 13H); 7.76-7.78 (m, 2H, $30 \times \text{Ph}$, H-5',7',8',10',11').

4.3.3. 30-(4'-(7'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (21)

Reakce byla provedena podle obecného postupu v kapitole 4.1. Byl smíchán roztok látky **13** (350 mg, 0,3 mmol) v DMF (20 ml) s reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (42,1 mg, 0,2 mmol), L-askorbanem sodným (33,4 mg, 0,2 mmol) a 2-ethynylpyridiém (67,2 μl , 0,6 mmol). Reakce byla provedena za laboratorní teploty, probíhala po dobu 30 hod. Byl získán surový produkt **23** zpracováním dle obecného postupu, který byl purifikován kolonovou chromatografií. Jako mobilní fáze pro TLC byla použita směs rozpouštědel A.c. Pro CC na silikagelu byl použit gradient směsi A.c. až A.a. Byla připravena bílá pevná látka **21** (246,5 mg, 64,1 %) o t.t. = 158-164 $^\circ\text{C}$ (hexan).

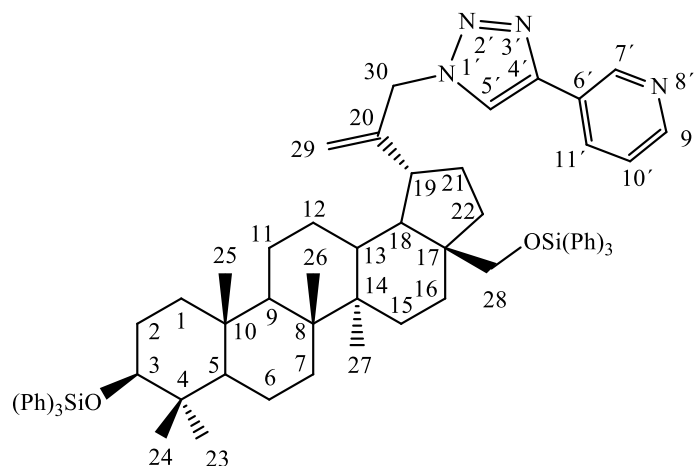


Obrázek 13: 30-(4'-(7'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (21)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.64 (s, 3H); 0.78 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.88 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, $5 \times \text{Me}$); 2.28 (m, 1H, H-19 β); 3.34 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, H-3 α); 3.81 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-28b); 4.60 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.95 (AB-system, 2H, $J_{\text{GEM}} = 15.6$ Hz, H-30); 5.00 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.38-7.47 (m, 20H); 7.65-7.69 (m, 13H); 7.80 (td, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz, $J_3 = 1.8$ Hz); 8.13 (s, 1H, H-5'); 8.23 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 8.60 (d, 1H, $J = 4.7$ Hz, $30 \times \text{Ph}$, H-8',9',10',11').

4.3.4. 30-(4'-(8'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (22)

Dle obecného postupu v kapitole 4.1. byla připravena i látka **24**. K roztoku látky **13** (350 mg, 0,3 mmol) v DMF (20 ml) byly přidány ostatní reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (42,1 mg, 0,2 mmol), L-askorbanem sodným (33,4 mg, 0,2 mmol) a 3-ethynylpyridiem (69,6 mg, 0,6 mmol). Reakce byla zahřívána na teplotu 50 °C, probíhala po dobu 30 hod. Reakční směs obsahující produkt **22** byla zpracována dle obecného postupu, byla provedena purifikace CC na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit gradient směsi A.c. až A.a. Pro monitoring průběhu reakce pomocí TLC byla zvolena fáze A.c. Byla připravena bílá pevná látka **22** (246,5 mg, 64,1 %) o t.t. = 164-1167 °C (hexan).

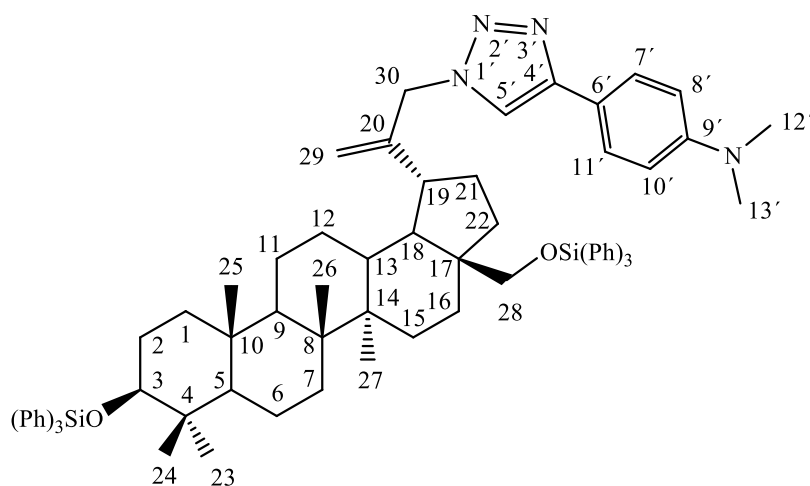


Obrázek 14: 30-(4'-(8'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (22)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.66 (s, 3H); 0.80 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 0.89 (s, 3H, 5 \times Me); 2.25 (m, 1H, H-19 β); 3.33 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, H-3 α); 3.82 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-28b); 4.62 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.93 (AB-system, 2H, $J_{\text{GEM}} = 15.6$ Hz, H-30); 5.01 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.37-7.46 (m, 20H); 7.64-7.67 (m, 11H); 7.77 (s, 1H, H-5'); 8.23 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 8.62 (m, 1H); 9.03 (m, 1H, 30 \times Ph, H-7',9',10',11').

4.3.5. 30-(4'-(9'-*N,N*-dimethylaminofenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (23)

Azid **13** (350 mg, 0,3 mmol) byl rozpuštěn za laboratorní teploty v DMF (20 ml) a smíchán s ostatními reaktanty dle obecného postupu přípravy triazolů: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (42,1 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (33,4 mg, 0,2 mmol) a 4-ethynyl-*N,N*-dimethylanilin (49,0 mg, 0,3 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty a probíhala po dobu 36 hod. Poté byl surový produkt **23** vysrážen dle obecného postupu a purifikován CC za použití gradientové eluce s mobilní fází o složení A.d. až A.a. Byla izolována pevná látka **23** cihlově červené barvy (264,1 mg, 66,1 %) o t.t. = 229-235 °C (hexan).

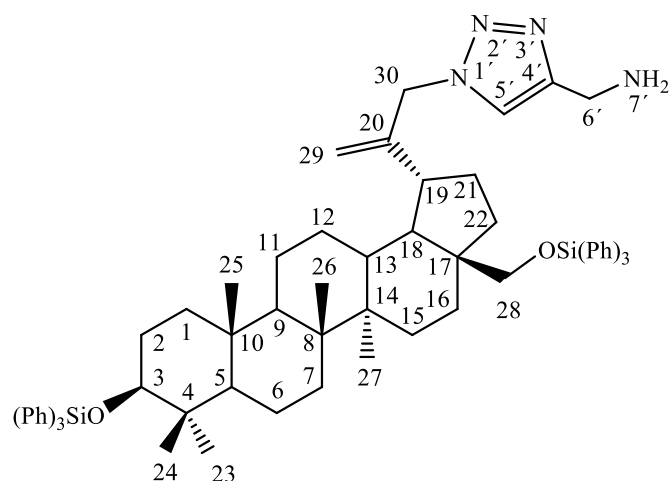


Obrázek 15: 30-(4'-(9'-*N,N*-dimethylaminofenyl)-1*H*-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (23)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.65 (s, 3H); 0.79 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 0.97 (s, 3H, 5 \times Me); 2.29 (m, 1H, H-19 β); 3.00 (s, 6H, 2 \times Me); 3.33 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, H-3 α); 3.41 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-28b); 3.81 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-28a); 4.61 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.90 (AB-system, 2H, $J_{\text{GEM}} = 15.3$ Hz, H-30); 4.97 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.37-7.46 (m, 20H); 7.55 (s, 1H, H-5'); 7.63-7.67 (m, 11H); 7.71 (d, 3H, $J = 8.8$ Hz, 30 \times H-Ph, H-7',8',10',11').

4.3.6. 30-(4'-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (24)

Roztok výchozí látky **13** (350 mg, 0,3 mmol) v DMF (20 ml) byl dle obecných reakčních podmínek přípravy triazolů smíchán s ostatními reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (42,1 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (33,4 mg, 0,2 mmol) a propargylamin (21,9 μl , 0,3 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 38 hod, posléze byla reakční směs zpracována popsáním obecným postupem. Nečistoty byly odstraněny kolonovou chromatografií a byla izolována bílá pevná látka **24** (184,7 mg, 48,3 %) o t.t. = 138-142 $^\circ\text{C}$ (hexan). Pro monitorig metodou TLC a pro purifikaci pomocí CC byla použita mobilní fáze o složení A.b.



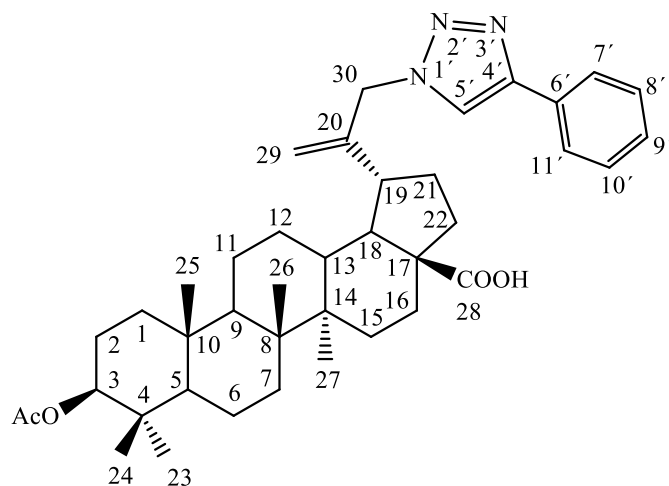
Obrázek 16: 30-(4'-aminomethyl-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3,28-bis(trifenylsilyl)-betulin (**24**)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.64 (s, 3H); 0.78 (s, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.87 (s, 3H); 0.95 (s, 3H, 5 \times Me); 2.06-2.10 (m, 2H, H-6'); 2.20 (m, 1H, H-19 β); 3.31 (dd, 1H, $J_1 = 11.7$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz, H-3 α); 3.38 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-28b); 3.80 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-28a); 4.52 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.93 (AB-system, 2H, $J_{\text{GEM}} = 15.6$ Hz, H-30); 5.00 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.36-7.47 (m, 20H); 7.62-7.66 (m, 10H, 6 \times Ph); 8.03 (s, 1H, H-5'); 10.02 (s, 2H, NH₂).

4.4. Triazoly 3-*O*-acetylbetulinové kyseliny

4.4.1. 30-(4'-fenyl-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)-3-*O*-acetylbetulinová kyselina (**25**)

Azid **12** (150 mg, 0,3 mmol) byl rozpuštěn za laboratorní teploty v DMF (15 ml), poté byly přidány i ostatní reaktanty dle obecného pracovního postupu přípravy: CuSO₄·5H₂O (37,6 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (29,7 mg, 0,2 mmol) a terminální alkyň fenylacetylen (28,4 mg, 0,3 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hod. Surový produkt **25** byl získán srážením dle obecného postupu, ledová drť byla okyselena za použití HCl na pH \pm 3. Purifikace látky **25** byla provedena CC na silikagelu za použití mobilní fáze o složení A.b., stejná fáze byla použita také pro TLC. Byla připravena bílá tuhá látka **25** (126,3 mg, 70,1 %) o t.t. = 176-179 °C (hexan).

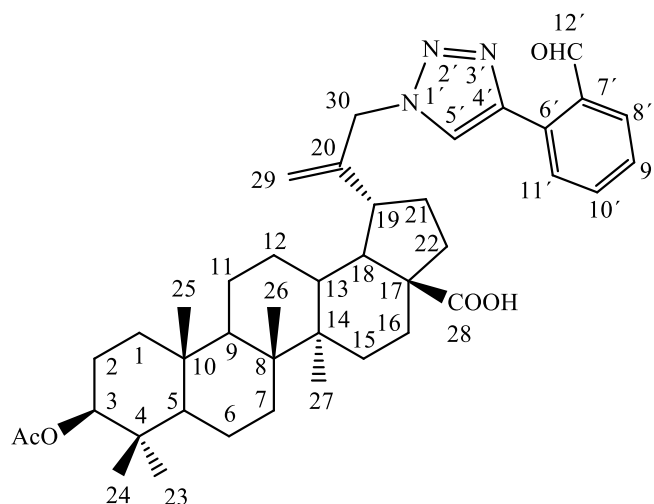


Obrázek 17: 30-(4'-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1'-yl)-3-O-acetylbetulinová kyselina (25)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.92 (s, 3H); 0.97 (s, 3H, $5 \times \text{Me}$); 2.05 (m, 3H, Ac); 2.99 (td, 1H, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 11.0$ Hz, $J_3 = 4.4$ Hz, H-19 β); 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, H-3 α); 4.75 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.00 (AB-system, 2H, $J_{\text{GEM}} = 15.7$ Hz, H-30); 5.10 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.34 (t, 1H, $J = 8.7$ Hz, H-9'); 7.43 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-8',10'); 7.77 (s, 1H, H-5'); 7.84 (d, 2H, H-7',11').

4.4.2. 30-(3'-(7'-formylfenyl)-1H-1,2,3-triazol-1'-yl)-3-O-acetylbetulinová kyselina (26)

Roztok azidu **12** (150 mg, 0,3 mmol) v DMF (15 ml), byl smíchán dle obecného pracovního postupu přípravy triazolů s ostatními reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (37,6 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (29,7 mg, 0,2 mmol) a 2-etylnylbenzaldehyd (36,2 mg, 0,3 mmol). Reakce byla míchána za laboratorní teploty a probíhala 20 hod, následně byla zpracována obecným postupem, přičemž ledová drť byla okyselena $\text{HCl} \pm 3$. Surový produkt **26** byl purifikován CC na silikagelu za použití gradientové mobilní fáze o složení hexan A.a. a B.b až B.a. Poměr rozpouštědel A.a. byl použit i pro TLC. Byla připravena bílá tuhá látka **26** (114,9 mg, 61,7 %) o t.t. = 161-167 °C (hexan).

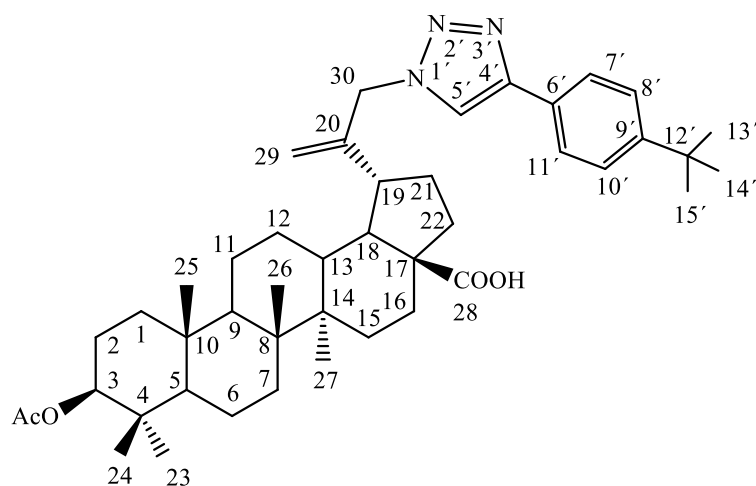


Obrázek 18: 30-(3'-(7'-formylfenyl)-1H-1,2,3-triazol-1'-yl)-3-O-acetylbetulínová kyselina (26)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.91 (s, 3H); 0.97 (s, 3H, $5 \times \text{Me}$); 2.05 (m, 3H, Ac); 2.99 (td, 1H, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 11.0$ Hz, $J_3 = 4.8$ Hz, H-19 β); 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 10.3$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, H-3 α); 4.75 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.00 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz, H-30); 5.12 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.52 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz); 7.43 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz); 7.72 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz); 7.86 (s, 1H, H-5'); 8.03 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-8',9',10',11'); 10.38 (s, 1H, CHO).

4.4.3. 30-(3'-(9'-t-butylylfenyl)-1H-1,2,3-triazol-1'-yl)-3-O-acetylbetulínová kyselina (27)

Navážka výchozího azidu **12** (150 mg, 0,3 mmol) byla za laboratorní teploty rozpuštěna v DMF (15 ml) a roztok byl smíchán podle obecného pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.1. reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (37,6 mg, 0,2 mmol), L-askorbanem sodným (29,7 mg, 0,2 mmol) a t-butylylfenylacetylenem (50,1 μl , 0,3 mmol). Roztok reakční směsi byl míchán za laboratorní teploty po dobu 20 hod, poté byl zpracován obecným postupem, přičemž ledová drť byla pět okyselena HCl na $\text{pH} \pm 3$. Nečistoty obsažené v surovém produktu **27** byly odstraněny během CC na silikagelu za použití gradientové mobilní fáze o složení A.b a A.a, Mobilní fáze o složení A.b. byla použita i pro monitorig TLC. Byla izolována bílá tuhá látka **27** (151,8 mg, 78,2 %) o t.t. = 187-192 $^\circ\text{C}$ (hexan).

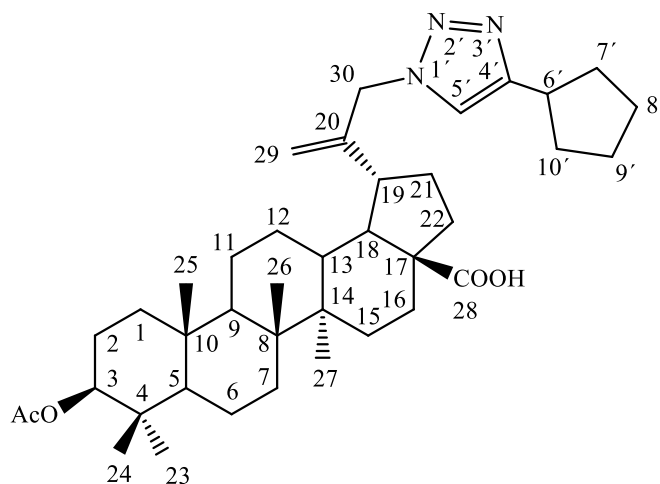


Obrázek 19: 30-(3'-(9'-t-butylfenyl)-1H-1,2,3-triazolo-1'-yl)-3-O-acetylbetulinová kyselina (27)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.92 (s, 3H); 0.98 (s, 3H, 5 \times Me); 1.35 (s, 9H, t-Bu); 2.05 (m, 3H, Ac); 2.99 (td, 1H, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 10.9$ Hz, $J_3 = 4.2$ Hz, H-19); 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, H-3 α); 4.47 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.00 (s, 2H, H-30); 5.09 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.45 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz); 7.74 (s, 1H, H-5'); 7.77 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-8',9',10',11').

4.4.4. 30-(3'-cyklopentyl-1H-1,2,3-triazolo-1'-yl)-3-O-acetyl betulinová kyselina (28)

Dle obecných podmínek přípravy triazolů byla připravena i látka **30**. Azid **12** (150 mg, 0,3 mmol) byl rozpuštěn v DMF (15 ml) za laboratorní teploty, poté byly přidány navážky všech reaktantů: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (37,6 mg, 0,2 mmol), L-askorbanem sodným (29,7 mg, 0,2 mmol) a cyklopentylacetylen (26,2 mg, 0,3 mmol). Reakce probíhala za podmínek laboratorní teploty a míchání po dobu 26 hod. Poté byla zpracována a produkt byl vysrážen do ledové drti okyselené HCl na $\text{pH} \pm 3$ dle obecného postupu. Byla použita purifikace CC za použití mobilní fáze A.b. Tatáž fáze byla použita i pro TLC. Byla připravena bílá tuhá látka **28** (150,1 mg, 85,2 %) o t.t. = 146-155 °C (hexan).



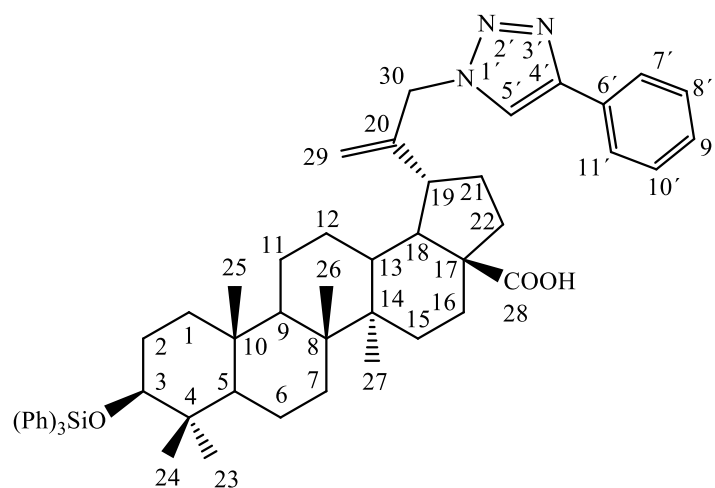
Obrázek 20: 30-(3'-cyklopentyl-1H-1,2,3-triazol-1'-yl)-3-O-acetyl betulinová kyselina (28)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.91 (s, 3H); 0.94 (s, 3H, 5 \times Me); 1.67 (m, 6H, H-7',8',9',10') 2.05 (m, 3H, Ac); 2.95 (td, 1H, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, $J_3 = 4.4$ Hz, H-19 β); 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, H-3 α); 4.68 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.90 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-30); 5.05 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.26 (s, 1H, H-5').

4.5. Triazoly 3-trifenylsilylbetulinové kyseliny

4.5.1. 30-(4'-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulinová kyselina (29)

Výchozí látka **14** (300 mg, 0,4 mmol) byla za laboratorní teploty rozpuštěna v DMF (18 ml), poté dle obecného pracovního postupu byly přidány další reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (49,5 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (39,3 mg, 0,2 mmol) a terminální alkyn fenylacetylen (40,5 mg, 0,4 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 26 hod. Následně byla reakční směs zpracována dle obecného postupu. Nečistoty byly odstraněny během CC na silikagelu za použití směsi rozpouštědel B (cyklohexan / EtOAc) v poměru c. TLC bylo prováděno s totožnou mobilní fází. Byla izolována bílá tuhá látka **29** (250,0 mg, 74,9 %) o t.t. = 185-190 °C (cyklohexan).

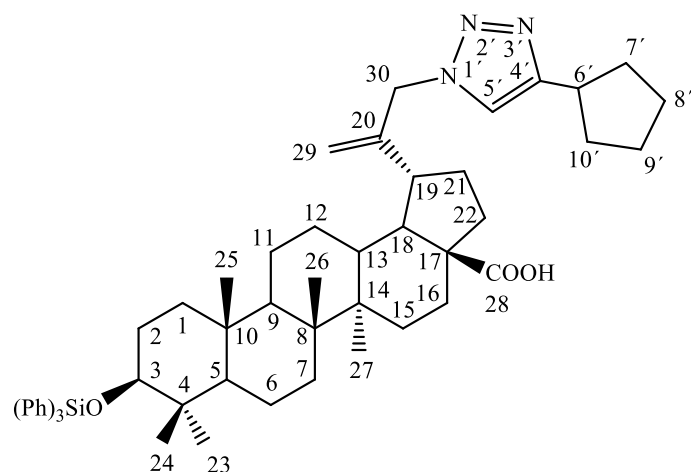


Obrázek 21: 30-(4'-fenyl-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulinová kyselina (29)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 1H); 0.88 (s, 3H); 0.90 (s, 3H); 0.92 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, 5 \times Me); 2.98 (td, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, $J_3 = 5.2$ Hz, 1H, H-19 β); 3.34 (dd, 1H, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-3 α); 4.70 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.88 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, H-30); 5.07 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.31-7.45 (m, 11H); 7.65 (m, 7H); 7.75 (s, 1H, H-5'); 7.83 (m, 2H, 4 \times Ph).

4.5.2. 30-(4'-(9'-t-butylfenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulinová kyselina (30)

K azidu **14** (300 mg, 0,4 mmol) rozpuštěném v DMF (18 ml) byly dle obecného pracovního postupu přidány reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (49,5 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (39,3 mg, 0,2 mmol) a 4-tert-butylfenylacetylen (71,5 μl , 0,4 mmol). Roztok byl míchán za laboratorní teploty po dobu 24 hod. Surová látka **30** byla srážena podle obecného pracovního. Nečistoty byly odstraněny použitím CC, jako mobilní fáze sloužila směs rozpouštědel B.c., tatáž fáze byla použita i pro TLC. Byla připravena bílá tuhá látka **30** (262,7 mg, 72,4 %) o t.t. = 210-216 $^\circ\text{C}$ (cyklohexan).

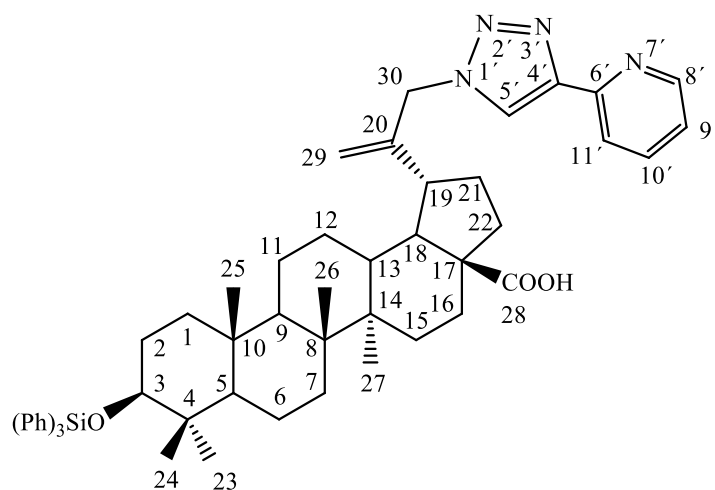


Obrázek 23: 30-(4'-cyklopentyl-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulínová kyselina (31)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.84 (s, 1H); 0.88 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 0.92 (s, 3H, $5 \times \text{Me}$); 1.69 (m, 8H, $8 \times \text{H-7',8',9',10'}$); 2.94 (td, $J_1 = 11.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 11.0 \text{ Hz}$, $J_3 = 4.1 \text{ Hz}$, 1H, H-19 β); 3.33 (dd, 1H, $J_1 = 11.5 \text{ Hz}$, $J_2 = 4.5 \text{ Hz}$, H-3 α); 4.66 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.88 (d, 2H, $J = 11.4 \text{ Hz}$, H-30); 5.03 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.24 (s, 1H, H-5'); 7.38-7.45 (m, 10H); 7.64-7.66 (m, 5H, $3 \times \text{Ph}$).

4.5.4. 30-(4'-(7'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulínová kyselina (32)

Do roztoku azidu **14** (300 mg, 0,4 mmol) v DMF (18 ml) byly dle obecného pracovního postupu přidány reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (49,5 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (39,3 mg, 0,2 mmol) a 2-etylnylpyridin (40,0 μl , 0,4 mmol). Roztok byl míchán za laboratorní teploty po dobu 22 hod a následně byl produkt **32** vysrážen dle obecného postupu. Mobilní fázi pro TLC tvořila směs B.b. Rovněž byla provedena purifikace CC za použití gradientové mobilní fáze o složení B (cyklohexan / EtOAc) v poměrech c.-b. Byla izolována bílá tuhá látka **32** (265,0 mg, 64,8 %) o t.t. = 198-203 $^\circ\text{C}$ (cyklohexan).

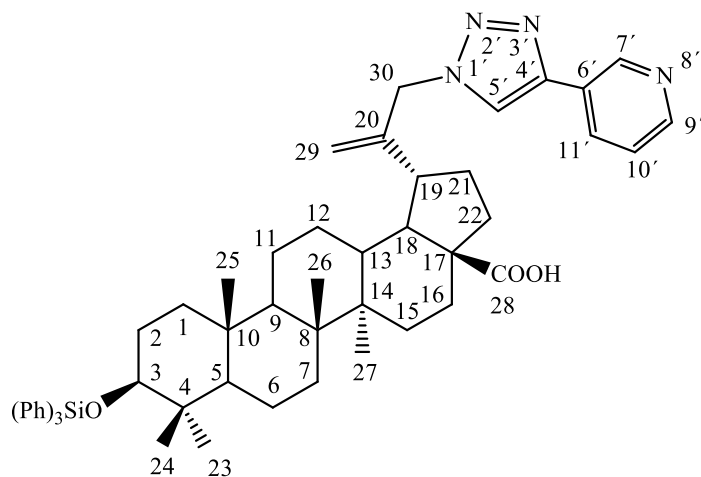


Obrázek 24: 30-(4'-(7'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulínová kyselina (32)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.82 (s, 1H); 0.88 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 0.92 (s, 3H); 0.95 (s, 3H, 5 \times Me); 3.02 (m, 1H, H-19 β); 3.33 (dd, 1H, $J_1 = 11.7$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-3 α); 4.66 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.01 (d, 2H, $J = 11.4$ Hz, H-30); 5.06 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.36-7.45 (m, 10H); 7.64-7.66 (m, 5H, 3 \times Ph); 7.80 (td, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz, $J_3 = 1.6$ Hz); 8.19 (s, 1H); 8.22 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz); 8.59 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-8',9',10',11').

4.5.5. 30-(4'-(8'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulínová kyselina (33)

Navážka azidu **14** (300 mg, 0,4 mmol) byla za laboratorní teploty rozpuštěna v DMF (18 ml) a podle obecného pracovního postupu byly přidány reaktanty: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (49,5 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (39,3 mg, 0,2 mmol) a 3-etylnylpyridin (41,0 mg, 0,4 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hod, poté byla ukončena a surový produkt **33** zpracován dle obecného postupu přípravy triazolů. Mobilní fázi pro TLC tvořila směs cyklohexan / EtOAc (fáze B) v poměru c. Rovněž byla provedena purifikace CC za použití gradientové mobilní fáze o složení B.c až B.a. Byla izolována bílá tuhá látka **33** (249,4 mg, 61,0 %) o t.t. = 200-208 °C (cyklohexan).

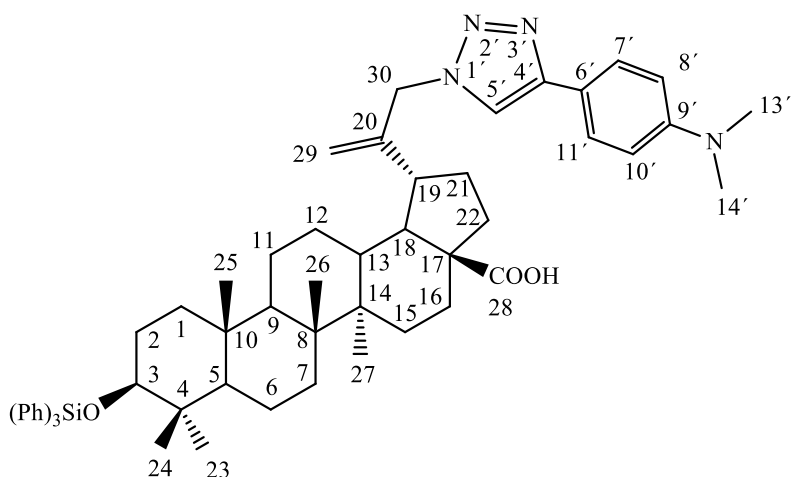


Obrázek 25: 30-(4'-(8'-pyridyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulínová kyselina (33)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.83 (s, 1H); 0.88 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 0.91 (s, 3H); 0.95 (s, 3H, $5 \times \text{Me}$); 2.98 (m, 1H, H-19 β); 3.34 (dd, 1H, $J_1 = 11.5$ Hz, $J_2 = 4.3$ Hz, H-3 α); 4.79 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.01 (s, 2H, H-30); 5.10 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.37-7.45 (m, 10H); 7.64-7.66 (m, 5H, $3 \times \text{Ph}$); 7.90 (s, 1H, H-5'); 8.30 (s, 1H); 8.59 (s, 1H); 9.00 (s, 1H, H-9',10',11').

4.5.6. 30-(4'-(9'-*N,N*-dimethylaminofenyl)-1H-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulínová kyselina (34)

Do připraveného roztoku azidu **14** (300 mg, 0,4 mmol) v DMF (18 ml) byly za laboratorní teploty postupně přidány reaktanty podle obecného postupu: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (49,5 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (39,3 mg, 0,2 mmol) a 4-ethynyl-*N,N*-dimethylanilin (57,6 mg, 0,4 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 28 hod. Následně byla zpracována podle popsaného postupu a produkt **34** byl purifikován CC, jako mobilní fáze byl použit gradient směsi B.c. až B.a. Poměr rozpouštědel c byl užít i pro TLC. Byla připravena cihlově červená tuhá látka **34** (235,3 mg, 65,8 %) o t.t. = 191-196 °C (cyklohexan).

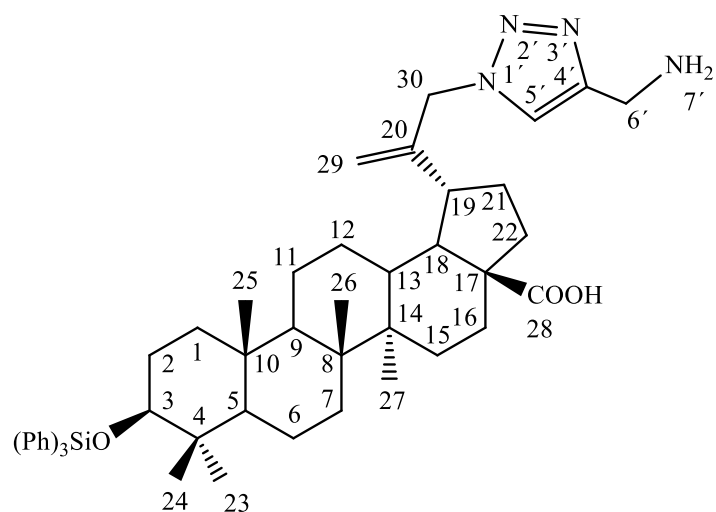


Obrázek 26: 30-(4'-(9'-*N,N*-dimethylaminofenyl)-1*H*-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulinová kyselina (34)

^1H NMR spektrum (δ , ppm): 0.84 (s, 1H); 0.88 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 0.90 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, 5 \times Me); 3.00 (m, 1H, H-19 β); 3.34 (dd, 1H, $J_1 = 11.7$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-3 α); 4.68 (s, 1H, H-29 *proE*); 4.96 (s, 2H, H-30); 5.05 (s, 1H, H-29 *proZ*); 6.77 (d, 2H, $J = 9.1$ Hz, H-8',10'); 7.37-7.46 (m, 10H); 7.61-7.72 (m, 9H, 3 \times Ph, H-5',7',11').

4.5.7. 30-(4'-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazo-1'-yl)- 3-trifenylsilylbetulinová kyselina (35)

Navážka azidu **14** (300 mg, 0,4 mmol) byla za laboratorní teploty rozpuštěna v DMF (18 ml), poté byly přidány další reaktanty v pořadí podle obecného postupu: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (49,5 mg, 0,2 mmol), L-askorban sodný (39,3 mg, 0,2 mmol) a propargylamin (25,7 μl , 0,4 mmol). K reakci docházelo za laboratorní teploty po dobu 32 hod. Následně byla surová reakční směs zpracována a produkt **35** byl srážen, jak uvádí obecný postup. Nečistoty byly odstraněny CC. Pro TLC i CC byla použita mobilní fáze B.b. Byla připravena bílá tuhá látka **35** (188,1 mg, 58,4 %) o t.t. = 172-179 $^\circ\text{C}$ (cyklohexan).



¹H NMR spektrum (δ, ppm): 0.84 (s, 1H); 0.89 (s, 3H); 0.89 (s, 3H); 0.90 (s, 3H); 0.96 (s, 3H, 5 × Me); 2.93 (td, 1H, J₁ = 10.8 Hz, J₂ = 10.8 Hz, J₃ = 4.6 Hz, H-19β); 3.34 (m, 1H, H-3α); 4.64 (s, 1H, H-29 *proE*); 5.01 (m, 2H, H-30); 5.09 (s, 1H, H-29 *proZ*); 7.36-7.45 (m, 10H); 7.64-7.66 (m, 5H, 3 × Ph); 8.12 (s, 1H, H-5'); 10.16 (s, 2H, NH₂).

ZDROJE

1. Butler M.S., Robertson A. A., Cooper M. A.: *Nat Prod Rep.* **2014**, 61, 1612.
2. Connolly J. D., Hill R. A.: *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 463.
3. Sarek J., Kvasnica M., Vlk M., Biedermann D.: *In Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer.* **2010**. Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge NY. Chapter 6, pp 159-189 .
4. Connolly J. D., Hill R. A.: *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 131.
5. Connolly J. D., Hill R. A.: *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 273.
6. Dang Z., Ho P., Zhu L., Qian K., Lee K.-H., Huang L., Chem C.-H.: *J. Med. Chem.* **2013**. 56, 2029.
7. Zhou J., Li C.-J., Yang J.-Z., Ma J., Li Y., Bao X.-Q., Chen X.-G., Zhang D., Zhang D. M.: *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 77, 276-284.
8. Van Tamelen M. M.: *Bioorg. Chem.* **1968**, 1, 111.
9. Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 394.
10. Laszczyk M. N.: *Planta Med.* **2009**. 75, 1549.
11. Grishko V. V., Tolmacheva I. A., Pereslavitseva A. V.: *Chem. of Nat. Comp.* **2015**. 51, 1.
12. Tan Y., Yu R., Pezzuto J. M.: *Clin. Cancer Res.* **2003**. 9, 2866
13. Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F.: *Cancer Lett.* **2002**. 175, 1.
14. Patocka J.: *J. Appl. Biomed.* **2003**. 1, 9.
15. 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.: *Nat. Med. (N. Y.)*. **1995**. 1, 1046.
16. Fulda S.: *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, 9, 1096.
17. Sjostrom H., Noren O., Olsen J.: *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**. 477, 25.
18. Chintharlapalli S., Papineni S., Ramaiah S. K., Safe S.: *Cancer Res.* **2007**. 67, 2816.
19. Chowdhury A. R., Mandal S., Mitra B., Sharma S., Mukhopadhyay S., Majumder H. K.: *Med. Sci. Monit.* **2002**. 8, 254.
20. Rieber M., Strasberg Rieber M.: *DNA Cell Biol.* **1998**. 17, 399.

21. Alakurtti S., Mäkelä T., Koskimies S., Yli-Kauhaluoma J.: *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006.** 29, 1.
22. Tang J.-J., Li J.-G., Qi W., Qiu W. W., Li P.-S., Li B.-L., Song B.-L.: *Cell Met.* **2011.** 13, 4.
23. Reutrakul V., Anantachoke N., Pohmakotr M., Jaipetch T., Yoosook C., Kasisit J., Napaswa C., Panthong A., Santisuk T., Prabpai S., Kongsaree P., Tuchinda P.: *Planta Med.* **2010.** 76, 368.
24. Gao Y; Xu H; Lu Z; Xu Z.: *Se. Pu.* **2009.** 27, 745.
25. Saudagar P., Dubey V. K.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014.** 90, 354.
26. Steele J. C., Warhurst D. C., Kirby G. C., Simmonds M. S.: *Phytother Res.* **1999.** 13, 115.
27. Li Y., He K., Huang Y., Zheng D., Gao C., Cui L., Jin Y. H.: *Mol Carcinog.* **2010.** 49, 630.
28. Huisgen R.: *Proc. Chem. Soc.* **1961.** 357-396.
29. Huisgen R.: *Angew. Chem. Int. Edit.* **1963.** 2, 565.
30. Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002.** 41, 2596.
31. Zhang L., Chen X., Xue P., Sun H. Y., Williams I.D., K. Sharpless B., Fokin V. V., Jia G.: *J. Am. Chem. Soc.* **2005.** 127, 15998.
32. McNulty J., Keskar K., Vemula R.: *Chemistry - A European Journal.* **2011.** 17, 14727.
33. Bori, I. D., Hung H.-Y., Qian K., Chen Ch.-H., Morris-Natschake S. L., Lee K.-H.: *Tetrahydron Lett.* **2012.** 53,1987.
34. Dang-Thi T. A., Tuyet N. T. K., The C. P., Ha H. T., Thi C. B., Duy T. D., D'hooghe M., Van Nguyen T. : *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014.** 24, 5194.
35. Dang-Thi T. A., Tuyet N. T. K., The C. P., Nguyen H. T., Thi C. B., Phuong H. T., Van Boi L., Van Nguyen T., D'hooghe M.: *Tetrahydr. Lett.* **2015.** 56, 218.
36. Antimonova A. N., Petrenko N. I., Shakirov M. M., Rybalova T. V., Frolova T. S., Shul'ts E. E., Kukina T. P., Sinitsyna O. I., Tolstikov G. A.: *Chem. Nat. Comp.* **2013.** 49, 657.
37. Shi W., Tang N., Yan W.-D.: *J. of Asian Nat. Prod. Res.* **2015.** 17, 159.
38. Urban M.: *Dizertační práce*, Univerzita Karlova v Praze, **2005.**