

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Miroslav Kašpar

SYNTÉZA LIGANDŮ PRO FARNESOIDNÍ X RECEPTOR

Synthesis of ligands for farnesoid X receptor

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Chodounská, CSc.

Praha 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením školitelky RNDr. Hany Chodounské, CSc. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze a mimo Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i. je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne 10. května 2018

.....

Miroslav Kašpar

## **Poděkování**

Děkuji své školitelce RNDr. Haně Chodounské, CSc. za cenné rady a odborné vedení, Ing. Barboře Slavíkové za vstřícnost, velký dík také patří RNDr. Evě Kudové, PhD. za velkou pomoc jak v rámci syntetické práce, tak při řešení administrativních úkonů. Dále bych chtěl poděkovat celému týmu Steroidních inhibitorů v čele s Prof. RNDr. Martinem Kotorou, CSc. za umožnění vypracování své studentské práce na jejich pracovišti. Za biologické testy a pomoc s návrhem struktur děkuji celému týmu prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D. Za cenné konzultace děkuji Prof. Pavlu Kočovskému, DSc, FRSE. Děkuji také celému servisnímu týmu z ÚOCHB za pomoc při měření a pomoc při interpretaci hmotnostních, infračervených a NMR spekter. Za pečlivou gramatickou korekturu děkuji své kamarádce Mgr. Martě Bendové. Z rodiny bych rád poděkoval především mamince, Áje Haškové a prarodičům za vytvoření příjemného studentského prostředí, díky kterým jsem zažil v době svého studia ty nejlepší roky.

## **Abstrakt**

Farnesoidní X receptor se vyskytuje především v jaterních buňkách a je známo, že pomocí jeho aktivace se dají léčit onemocnění způsobující cirhózu jater, zejména nealkoholickou steatózu a primární biliární cirhózu. Obě tato onemocnění jsou rozšířená především ve vyspělých zemích a v dnešní době není dostupná účinná léčba. Tato práce byla zaměřena na syntézu nových analogů žlučových kyselin, které mohou vykazovat lepší agonistické vlastnosti než endogenní ligandy - žlučové kyseliny, a proto by mohly mít terapeutické využití. Struktura připravených látek byla navržena na základě podobnosti se známými ligandy a počítačového modelování. Jejich čistota a struktura byla prokázána použitím běžných analytických metod a jejich biologická aktivita byla stanovena na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové.

Klíčová slova: farnesoidní X receptor, FXR, žlučové kyseliny

## **Abstract**

Farnesoid X receptor is mostly expressed in liver cells and its activation may be used for the treatment of cirrhosis causing diseases, especially biliary cirrhosis and nonalcoholic steatosis. These two latter diseases are most common in developed countries and, as of date, no effective treatments are available. Therefore, the aim of this project is the design and synthesis of novel bile acid analogues with subsequent biological evaluation towards farnesoid X receptor. Thus, a series of new compounds were designed using computational modeling studies and chemical synthesis was done to develop structure-activity relationships. Chemical structure analysis and purity was confirmed by conventional analytical methods. Finally, synthetic compounds were profiled against farnesoid X receptor in collaboration with the Pharmaceutical faculty of Charles University in Hradec Králové.

Keywords: farnesoid X receptor, FXR, bile acids

## Seznam použitých zkratk

Ac	acetát
AcOH	kyselina octová
CA	kyselina cholová
CDCA	kyselina chenodeoxycholová
COSY	correlation spectroscopy
Cyp27A1	sterol-27-hydroxyláza
Cyp7A1	cholesterol-7-alfa-hydroxyláza
Cyp7B1	steroid-7-alfa-hydroxyláza
Cyp8B1	sterol-12-alfa-hydroxyláza
DBD	DNA binding domain, DNA vazebná doména
DCA	kyselina deoxycholová
DEAD	diethyl azodikarboxylát
DHP	3,4-dihydro-2H-pyran
DIPA	diisopropylamin
DIPEA	diisopropylethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EA	elementární analýza
EI	elektronová ionizace
ekv.	ekvivalent
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
FXR	farnesoidní X receptor
HCA	kyselina hyocholová
HDL	high density lipoprotein, lipoprotein vysoké hustoty
hm.	hmotnostní

HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMPA	hexamethylfosforamid
HSQC	heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
IČ	infračervené spektrum
iPr	isopropyl
kvant.	kvantitativně
LBD	ligand binding domain, ligand vazebná doména
LCA	kyselina litocholová
LDA	lithium diisopropylamid
LDL	low density lipoprotein, lipoprotein nízké hustoty
LRH-1	liver receptor homolog - 1, jaterní receptorový homolog - 1
M	molekulový ion
Me <sub>2</sub> CO	aceton
MeCHO	acetaldehyd
MeOH	methanol
MOM	methoxymethyl
MOMBr	methoxymethyl bromid
mRNA	informační ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrum
NASH	nealkoholová steatohepatitida
NBS	N-bromsukcinimid
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butyllithium
NMR	jaderná magnetická resonance
NOE	jaderný Overhauserův efekt
OCA	kyselina obeticholová
PBC	primární biliární cirhóza
PCC	pyridinium chlorochromát

Ph <sub>2</sub> CO	benzofenon
PPh <sub>3</sub>	trifenylfosfin
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluensulfonát
PTSA	kyselina <i>p</i> -toluensulfonová
RLU	relativní luminiscenční jednotka
ROESY	rotating frame Overhauser effect spectroscopy
RP	reverzní fáze
SHP	small heterodimer partner, malý heterodimerní partner
TAG	triacylglycerol
t-BuOH	2-methylpropan-2-ol
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyranyl
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan
TMSCl	trimethylsilyl chlorid
t.t.	teplota tání
UV	ultrafialový
ŽK	žlučová kyselina

# Obsah

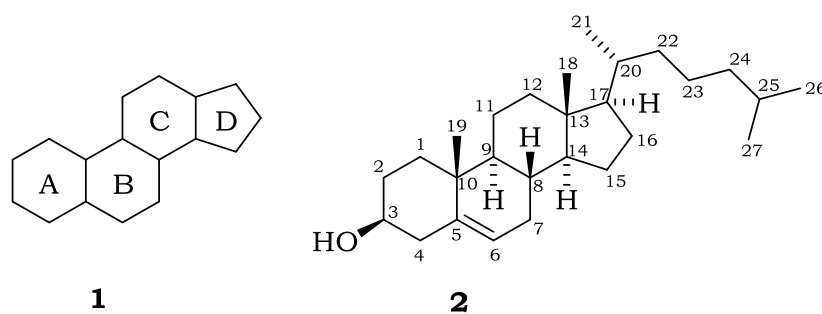
<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>10</b>
1.1	Obecný úvod	10
1.2	Farnesoidní X receptor	12
1.2.1	Struktura a mechanismus působení FXR	12
1.3	Ligandy FXR	15
1.4	Vliv substituce ligandu na aktivitu a afinitu k FXR	15
<b>2</b>	<b>CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>ÚVOD DO PROBLEMATIKY SYNTÉZY</b>	<b>21</b>
3.1	ČÁST 1. Příprava C6 alkylovaného výchozího derivátu	21
3.1.1	Přímá alkylace enolátu alkylhalogenem, příprava dle Yu et al.	22
3.1.2	Mukaiyamova aldolová kondenzace, příprava dle D'Amore et al	24
3.1.3	Další možnosti alkylace v $\alpha$ -poloze karbonylu	25
3.2	ČÁST 2. Modifikace funkčních skupin na C3 a C7	26
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>27</b>
4.1	Příprava C6-alkylovaného výchozího derivátu	27
4.1.1	Přímá alkylace enolátu alkylhalogenem	29
4.1.2	Mukaiyamova aldolová kondenzace	30
4.2	Modifikace funkčních skupin na C3 a C7	33
4.2.1	Optimalizace stereoselektivní redukce C7 karbonylu	35
4.2.2	Optimalizace redukce dvojně vazby	36
4.3	Dokování ligandů do LBD FXR	37
4.4	Testování připravených látek	38
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>42</b>
6.1	Použité přístroje a metody	42
6.2	Obecné postupy	44
6.2.1	Hydrolyza esterů: obecný postup	44
6.3	Syntéza derivátů žlučových kyselin	44
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>59</b>

# 1 ÚVOD

## 1.1 Obecný úvod

Steroidy jsou fyziologicky a farmakologicky významné látky odvozené od steranu (**1**, **Obr. 1**). Spolu s terpeny jsou někdy řazeny mezi isoprenoidy. Zpravidla jde o bezbarvé krystalické látky rozpustné v tucích. Steroidy plní řadu různých funkcí, ať už jde o hormonální signalizaci sexuálních hormonů, protizánětlivý účinek kortikosteroidů nebo jsou součástí membrán.<sup>1</sup>

Nejnámější a zároveň první steroid se správně určenou strukturou je cholesterol (**2**, **Obr. 2**). Nesprávné uspořádání základního uhlíkového skeletu publikovali<sup>2, 3</sup> ve dvacátých letech A. Windaus a H. Wieland na základě výsledků odbourávání žlučových kyselin (ŽK) a cholesterolu. Odbouráváním ŽK bylo možné nashromáždit více podkladů k řešení konstituce, než tomu bylo u cholesterolu, díky přítomnosti hydroxylových skupin v pozicích 3, 7 a 12, které mají různou reaktivitu. Správnou strukturu cholesterolu publikoval začátkem třicátých let R. Robinson.<sup>4</sup>

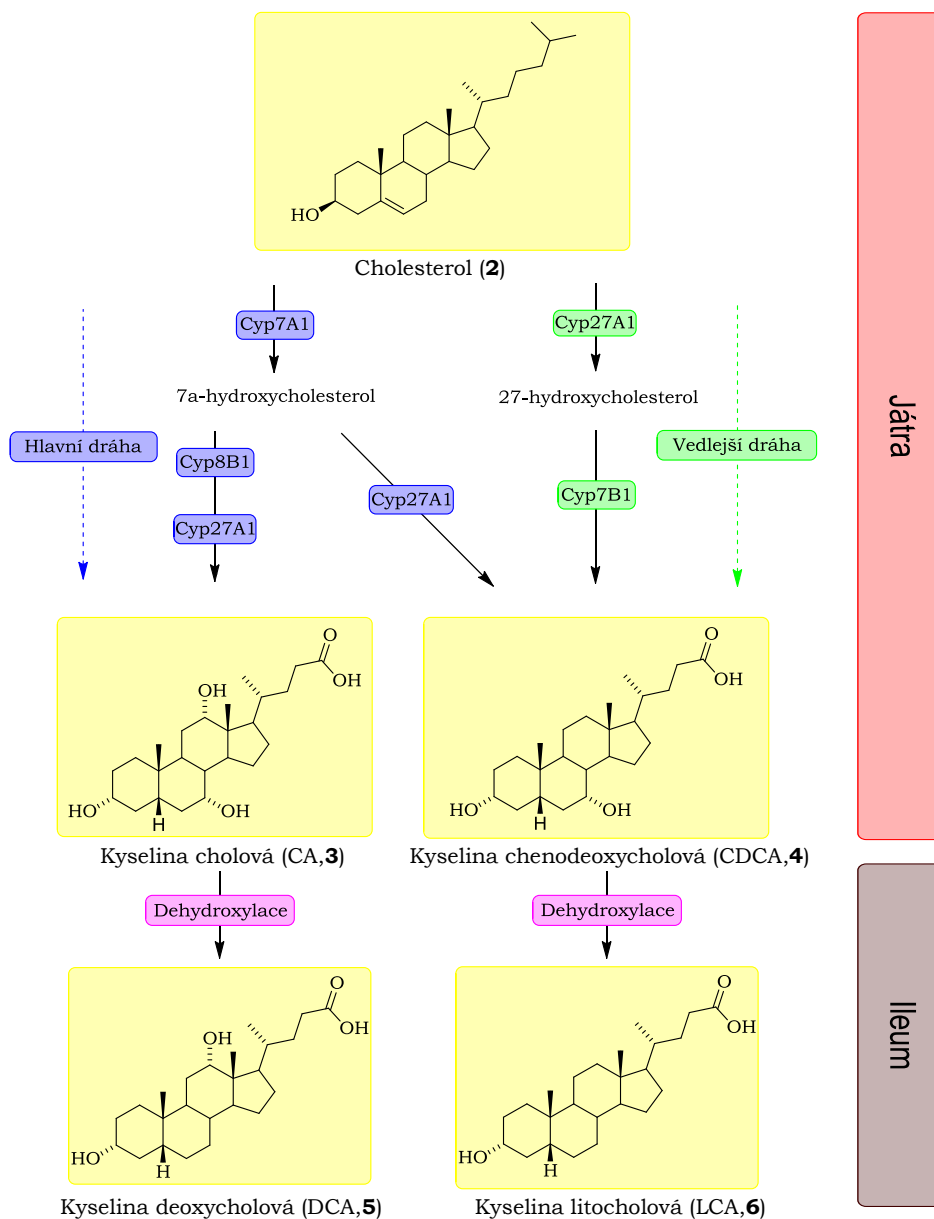


Obrázek 1. Označení kruhů v základním skeletu steranu (**1**) a cholesterol (**2**)

Cholesterol má osm center chirality, všechny substituenty směřující pod rovinu steroidního skeletu se označují jako alfa, substituenty mířící nad tuto rovinu jako beta. Konfigurace se vyznačuje pouze tehdy, je-li jiná než tzv. přirozená (**Obr. 1**). Látky s  $5\alpha$  i  $5\beta$ -konfigurací mají v přírodě téměř stejné zastoupení, a proto se tato konfigurace v nákresu struktury vyznačuje. V případě postranního cholestanového řetězce se vyznačuje ještě

## Úvod

konfigurace na uhlíku C20. Kruhy se ve steroidním skeletu značí zleva písmeny A - D.



Obrázek 2. Biosyntéza ŽK. Cholesterol-7- $\alpha$ -hydroxyláza (CYP7A1), sterol-12- $\alpha$ -hydroxyláza (CYP8B1), sterol-27-hydroxyláza (CYP27A1), steroid-7- $\alpha$ -hydroxyláza (CYP7B1). Převzato a upraveno.<sup>5, 6</sup>

Cholesterol slouží jako prekurzor pro biosyntézu steroidních hormonů, feromonů a ŽK. Hlavní cesta transformace cholesterolu je jeho oxidace v játrech (**Obr. 2**), kde je přeměněn na primární ŽK - kyselinu cholovou (CA, **3**) a kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA, **4**). Přeměna je katalyzována enzymy typu cytochrom P<sub>450</sub>, enzym určující rychlost transformace je

cholesterol-7-alfa-hydroxyláza (Cyp7A1).<sup>7</sup> Primární ŽK dále podléhají konjugaci s aminokyselinami glycinem a taurinem za vzniku tauro a glyko konjugátů. Jedná se o amfifilní látky, které jsou sekretovány žlučí do střev, kde zajišťují vstřebávání tuků. Ve střevech dochází k mikrobiální dehydroxylaci, čímž vznikají sekundární ŽK - kyselina deoxycholová (DCA, **5**) a kyselina lithocholová (LCA, **6**).<sup>8-10</sup>

Denně se v lidském těle takto syntetizuje 200 - 600 mg žlučových kyselin a stejné množství odchází z těla výkaly. Čistý denní obrat činí přibližně 5% z celkového množství ŽK. Zbylých 95 % je recyklováno čtyři až dvanáctkrát denně.<sup>11</sup> Většina ŽK je reabsorbována v ileu aktivním transportem, zatímco malé množství je reabsorbováno pasivní difuzí a portální žilou odvedeno do jater.

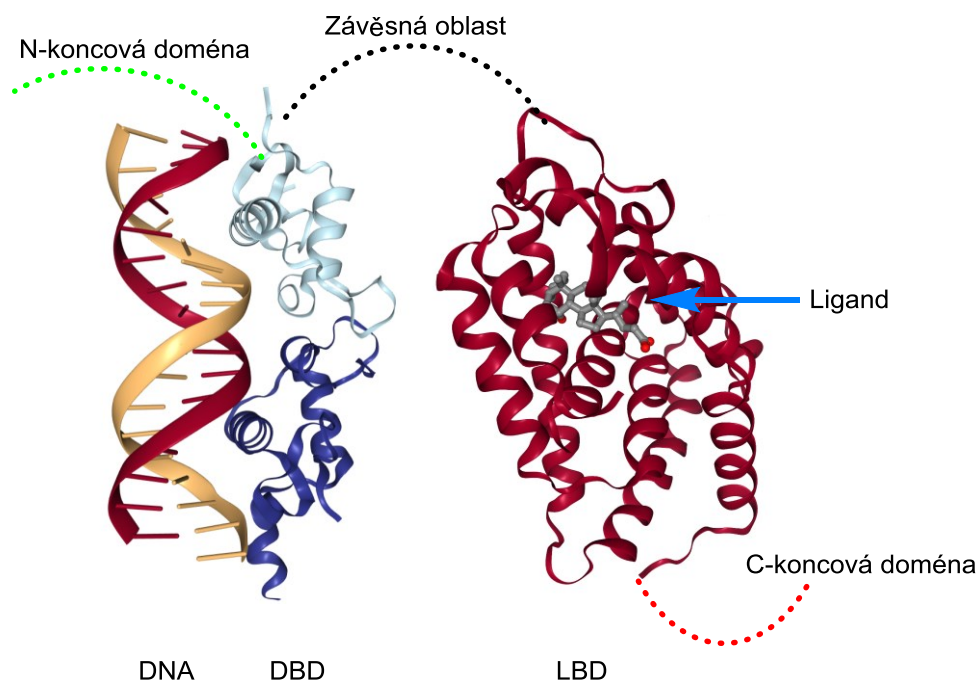
ŽK působí při vysokých koncentracích zánětlivě, což způsobuje poškození jater, střev a dalších tkání.<sup>12</sup> Syntéza ŽK je tedy pod přísnou kontrolou, aby se zabránilo jejich nadměrné vnitrobuněčné akumulaci. Tento regulační mechanismus zprostředkovává farnesoidní X receptor (FXR).<sup>13</sup>

## 1.2 Farnesoidní X receptor

FXR patří do rodiny jaderných receptorů, jedná se o ligandy-aktivované transkripční faktory.<sup>14</sup> Název „farnesoidní“ dostal v roce 1995, kdy byl identifikován<sup>15</sup> jako receptor aktivovaný farnesolem. K aktivaci docházelo však v supra-fyziologických koncentracích. V roce 1999 tři vědecké skupiny nezávisle na sobě publikovaly<sup>16-18</sup> ŽK jako přirozené agonisty FXR, které jsou od té doby vnímány jako endogenní látky s hormonální aktivitou.

### 1.2.1 Struktura a mechanismus působení FXR

FXR se jako většina nukleárních receptorů skládá z pěti domén (**Obr. 3**). N-Koncové domény, DNA vazebné domény (z angl. DNA binding domain, DBD), závěsné oblasti, ligand vazebné domény (z angl. ligand binding domain, LBD) a C-koncové domény.<sup>19</sup>



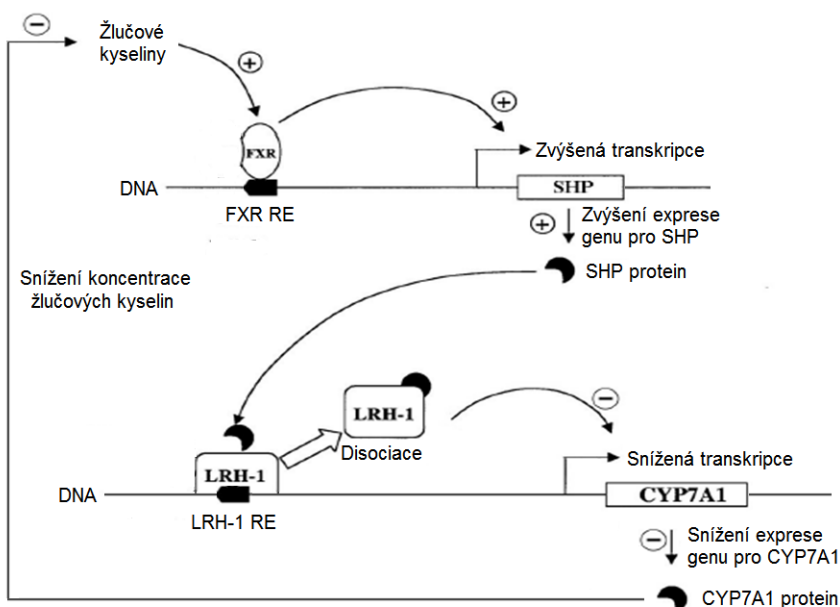
Obrázek 3. Obecná struktura nukleárního receptoru. DNA vazebná doména (DBD, z angl. DNA binding domain), ligand vazebná doména (LBD, z angl. Ligand binding domain). Převzato a upraveno z Protein data bank.<sup>20, 21</sup>

DBD slouží k rozpoznání specifické sekvence DNA, která se nazývá responzivní element (RE), a slouží k vazbě receptoru do tohoto místa. DBD obsahuje dva tzv. „zinkové prsty“, které zajišťují jak orientaci proteinu do velkého žlábků DNA, tak tvorbu dimerních komplexů, které jsou typické pro nukleární receptory. Závěsná oblast spojuje DBD a LBD, čímž zajišťuje receptoru jistou flexibilitu.<sup>22</sup>

Pro design léčiv je nejdůležitější LBD, kde dochází k interakci ligandu s receptorem. Při navázání agonisty, LBD zaujme aktivní konformaci, která může reagovat s koaktivátorem a spustit transkripci požadované DNA sekvence, zatímco navázáním antagonisty dochází k blokaci vazebného místa a zabránění aktivaci receptoru. Tato práce se dále zabývá pouze agonisty FXR.

Aktivací nukleárního receptoru dochází k aktivaci specifické DNA sekvence, čímž dochází k syntéze kódovaného proteinu. FXR dokáže aktivovat celou řadu genů, například gen kódující protein „malý heterodimerní partner“ (z angl. small heterodimer partner, SHP), tento

protein následně inhibuje funkci dalšího nukleárního receptoru tzv. „jaterního receptorového homologu-1“ (z angl. liver receptor homolog, LRH-1), a to disociací jeho komplexu s DNA. Tím dochází k potlačení exprese genu pro CYP7A1.<sup>23</sup> Jde o mechanismus negativní zpětné vazby, aby nedocházelo k nadměrné akumulaci ŽK v játrech (**Obr. 4**).



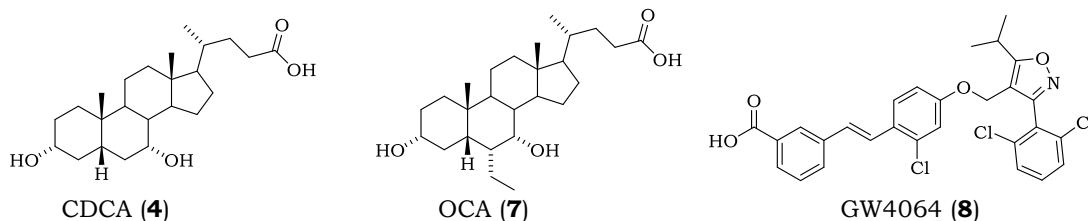
Obrázek 4. Negativní zpětná vazba vyvolaná aktivací farnesoidního X receptoru, slouží k zabránění nadměrné akumulace ŽK v játrech, které mohou být ve vysokých koncentracích toxické. Farnesoidní X receptor (FXR), DNA vazebné místo farnesoidního X receptoru (FXR RE, z angl. farnesoid X receptor responsive element), malý heterodimerní partner (SHP, z angl. small heterodimer partner), jaterní receptorový homolog-1 (LRH-1, z angl. liver receptor homolog, LRH-1), cholesterol-7-alfa-hydroxyláza (CYP7A1). Převzato a upraveno.<sup>23</sup>

Prostřednictvím aktivace různých genů se FXR podílí nejen na regulaci biosyntézy a eliminaci ŽK ve střevech a játrech, ale také na metabolismu lipidů HDL, LDL, triacylglyceridů (TAG) a homeostáze glukózy.<sup>13</sup>

Farnesoidní X receptor je proto v dnešní době považován za slibný cíl při léčbě cholestázy - poruchy mechanismu tvorby a vylučování žluče, která má hlavní podíl na rozvoji primární biliární cirhózy (PBC) - autoimunitního onemocnění jater a nealkoholické steatohepatitidy (NASH) - postupného ukládání TAG v játrech. Tato onemocnění postupně vedou až k cirhóze a

v konečném stádiu je dnes jedinou možnou terapií transplantace jater.<sup>13, 24, 25</sup>

### 1.3 Ligandy FXR



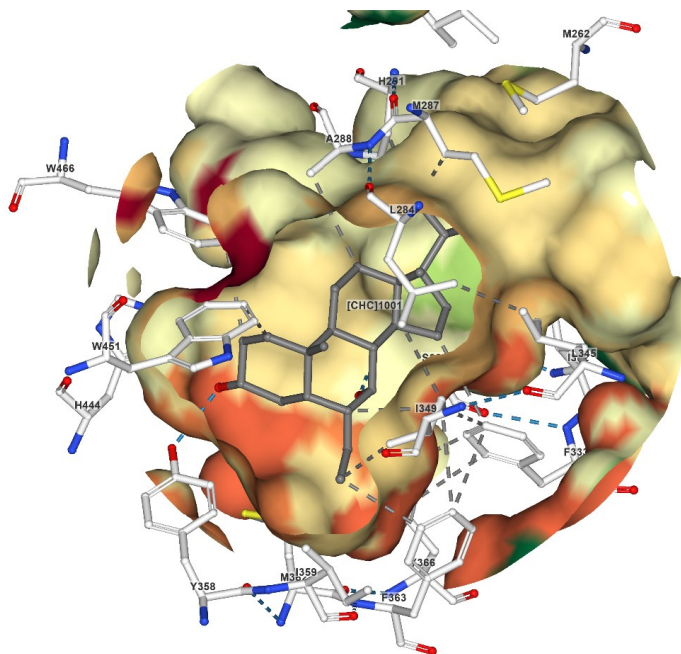
Obrázek 5. Nejdůležitější ligandy lidského FXR.

Hlavní endogenní ligand FXR je CDCA (**4**). Dále byly proto syntetizovány a systematicky testovány ligandy podobné struktury jako CDCA (**4**).<sup>26</sup> Nejvyšší afinitu ze všech otestovaných látek vykazovala kyselina obeticholová (OCA, **7**, **Obr. 5**), která aktivuje receptor v nanomolárních koncentracích<sup>27</sup> a v roce 2016 byla registrována pod obchodním názvem OCALIVA™.<sup>28</sup> Využitím kombinatorní chemie bylo připraveno velké množství nesteroidních analogů, z nichž za zmínku stojí GW4064 (**8**, **Obr. 5**), který vykazuje podobnou afinitu k receptoru jako OCA, ale má nevyhovující farmakologické vlastnosti, zejména špatnou biologickou dostupnost při orálním podání.<sup>29</sup>

### 1.4 Vliv substituce ligandu na aktivitu a afinitu k FXR

K dnešnímu dni (17. leden 2018, poznámka autora) byly publikovány desítky agonistů FXR.<sup>26, 27, 30-35</sup> Vybrané výsledky jsou shrnuty v **Tab. 1**, je zde zřejmý trend: lipofilní substituce v poloze C6 (**R<sup>2</sup>**) zvyšuje afinitu ligandu, zatímco hydrofilní substituce ji snižuje, například kyselina hyocholová (HCA, **12**, EC<sub>50</sub> > 30 μM) má výrazně horší afinitu než kyselina 6α-methylchenodeoxycholová (6α-MeCDCA, **9**, EC<sub>50</sub> = 0,75 μM). Toto zjištění vedlo k domněnce, že v receptoru existuje „kapsa“, kde může docházet k hydrofobním interakcím. Lipofilní substitucí v poloze C6 lze tedy výrazně zvýšit afinitu ligandu. Substituce methylem zvyšuje tuto afinitu zhruba řádově, ethylem již o řády dva, substituce většími substituenty

(propyl, benzyl) naopak vede ke snížení afinity. Ethyl tedy nejlépe vyhovuje „kapse“ v receptoru jak polaritou, tak stericíky. Tato domněnka byla dále potvrzena jak naměřením krystalických struktur komplexu FXR (**Obr. 6**),<sup>36</sup> tak pomocí počítačového modelování.<sup>30, 36</sup>



Obrázek 6. Výřez krystalické struktury FXR s obeticholovou kyselinou. Barva odpovídá hydrofobicitě. Zelená barva představuje hydrofobní část kapsy a červená hydrofilní. Šedivě jsou vyznačeny hydrofobní interakce, modře vodíkové můstky. Z obrázku je patrná „kapsa“ pro ethyl, kde dochází k hydrofobním interakcím z Phe<sub>363</sub> a Ile<sub>349</sub>. Převzato a upraveno z Protein data bank.<sup>36</sup>

Hydroxyl v poloze C3 (**R<sup>1</sup>**) není nezbytný pro aktivaci FXR, neboť 3-deoxy-CDCA (**19**, EC<sub>50</sub> = 1,30 μM) vykazuje vyšší afinitu k FXR než CDCA (**4**, EC<sub>50</sub> = 8,66 μM). Naopak v případě 6α-ethyl derivátů vykazuje 3-deoxy-OCA (**51**, EC = 0,4 μM) nižší afinitu k FXR než OCA (**7**, EC<sub>50</sub> = 0,098 μM).

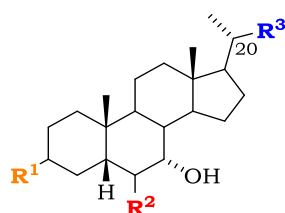
Hydroxyl v poloze C7 má na afinitu výraznější vliv, neboť 7β-hydroxy epimer CDCA je vůči FXR neaktivní. Krystalické struktury komplexu LBD FXR s OCA (**7**) a LBD FXR s 3-deoxy-CDCA (**19**) odhalily vodíkovou vazbu mezi 7α-OH, Tyr<sub>366</sub> a Ser<sub>329</sub>. Proto se předpokládá, že hydroxyl v poloze C7 hraje významnou roli při aktivaci FXR.<sup>36-38</sup>

Postranní řetězec (**R**<sup>3</sup>) toleruje mnoho různých variací například: alkoholy, aminy, amidy, sulfonáty, karbamáty, sulfonamidy a thiokarbamáty. V porovnání s karboxylem vykazují tyto deriváty srovnatelné nebo dokonce lepší FXR agonistické vlastnosti. Například látka **36** ( $EC_{50} = 0,41 \mu\text{M}$ ) vykazuje dvacetkrát vyšší afinitu k FXR než CDCA (**4**,  $EC_{50} = 8,66 \mu\text{M}$ ). Sloučenina **38** ( $EC_{50} = 0,15 \mu\text{M}$ ) měla dokonce šestkrát vyšší afinitu k FXR než látka **37** ( $EC_{50} = 0,90 \mu\text{M}$ ). Tyto výsledky dále potvrzují, že 6 $\alpha$ -ethyl substituent významně přispěl k afinitě a aktivitě. Dále skupina Dr. Pellicciariho<sup>26</sup> zjistila, že deriváty ŽK s kratším postranním řetězcem mají nižší aktivitu a afinitu vůči FXR než přirozené ŽK.

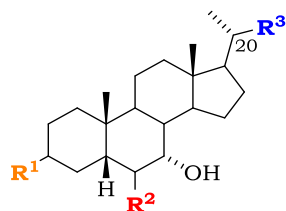
Konjugace glycinu a taurinu s ŽK má na aktivitu malý vliv, přirozené konjugáty glyko-CDCA (**52**,  $EC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) a tauro-CDCA (**53**,  $EC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) vykazují lehce nižší afinitu než jejich prekurzor CDCA (**4**,  $EC_{50} = 8,66 \mu\text{M}$ ).<sup>17</sup> Polosyntetické konjugáty glyko-OCA (**47**,  $EC_{50} = 0,29 \mu\text{M}$ ) a tauro-OCA (**48**,  $EC_{50} = 0,23 \mu\text{M}$ ) též vykazují nižší afinitu v porovnání se svým prekurzorem OCA (**7**,  $EC_{50} = 0,098 \mu\text{M}$ ).<sup>34</sup> Na základě krystalických struktur bylo zjištěno, že karboxyl (amid v případě konjugátů) vytváří vodíkovou vazbu s Arg<sub>328</sub> v LBD FXR.<sup>33</sup>

Je patrné, že výzkum se zatím věnoval zejména vlivu substituce na C6 (**R**<sup>2</sup>) a modifikacím uhlíkového řetězce C20 - C24 (**R**<sup>3</sup>).

Tabulka 1. Přehled afinit a aktivit vybraných ligandů FXR

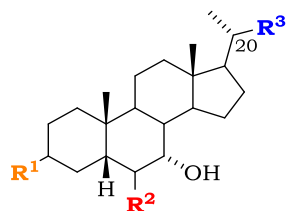


Číslo	Triviální název	<b>R</b> <sup>1</sup>	<b>R</b> <sup>2</sup>	<b>R</b> <sup>3</sup>	Afinita $EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Aktivita $E_{\text{max}}$ (%)*	Ref.
<b>4</b>	CDCA	$\alpha$ -OH	-H	20	8,66	100	30
<b>7</b>	OCA	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -ethyl		0,098	144	27
<b>8</b>	GW4064	-	-	-	0,037	117	31
<b>9</b>	6 $\alpha$ -MeCDCA	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -methyl		0,75	148	27
<b>10</b>	6 $\alpha$ -PrCDCA	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -propyl		1,11	156	27
<b>11</b>	6 $\alpha$ -BnCDCA	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -benzyl		>30	5	27
<b>12</b>	HCA	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -OH		>30	9	26



Číslo	Triviální název	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Afinita EC <sub>50</sub> (μM)	Aktivita E <sub>max</sub> (%)*	Ref.
13	-	α-OH	α-OMe		14,73	113	26
14	-	α-OH			0,48	170	26
15	-	α-OH			>30	68	26
16	-	α-OH			0,54	105	26
17	6α-FCDCA	α-OH	α-F		15,11	99	26
18	6β-FCDCA	α-OH	β-F		1,21	76	26
19	3-deoxy-CDCA	α-H	-H		1,30	87	26
20	-	α-OH	-H		>30	66	26
21	-	α-OH	-H		13,20	58	26
22	-	α-OH	-H		10,23	35	26
23	-	α-OH	-H		15,62	60	26
24	-	α-OH	-H		6,0	18	35
25	-	α-OH	-H		2,43	82	26
26	bisnor-CDCA	α-OH	-H		>30	65	26
27	-	α-OH	-H		9,68	101	26
28	-	α-OH	-H		2,72	47	26
29	-	α-OH	-H		1,22	111	26
30	-	α-OH	-H		5,99	27	26
31	-	α-OH	-H		4,59	68	26
32	-	α-OH	-H		2,50	61	33
33	-	α-OH	-H		2,72	47	33
34	-	α-OH	-H		1,14	77	33
35	-	α-OH	-H		0,79	62	33
36	-	α-OH	-H		0,41	63	33

# Úvod



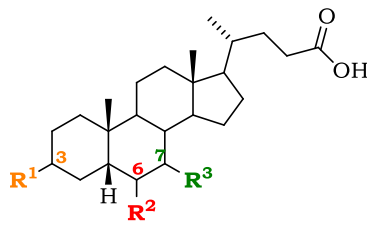










Číslo	Triviální název	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Afinita EC <sub>50</sub> (μM)	Aktivita E <sub>max</sub> (%)*	Ref.
37	-	α-OH	-H		0,90	55	32
38	-	α-OH	α-ethyl		0,15	290	32
39	-	α-OH	α-ethyl		0,11	168	34
40	-	α-OH	α-ethyl		0,09	109	34
41	-	α-OH	α-ethyl		0,02	109	34
42	-	α-OH	α-ethyl		0,60	142	34
43	-	α-OH	α-ethyl		0,24	226	34
44	-	α-OH	α-ethyl		1,0	263	34
45	-	α-OH	α-ethyl		0,05	191	34
46	-	α-OH	α-ethyl		0,03	121	34
47	glyko-OCA	α-OH	α-ethyl		0,29	135	34
48	tauro-OCA	α-OH	α-ethyl		0,23	131	34
49	-	α-OMe	α-ethyl		1,8	108	34
50	-	α-Me	α-ethyl		1,5	49	34
51	3-deoxy-OCA	-H	α-ethyl		0,4	126	34
52	glyko-CDCA	α-OH	-H		10	78	17
53	tauro-CDCA	α-OH	-H		10	85	17

\*Vztaženo na relativní kontrolu, CDCA (100 %), kyselina chenodeoxycholová (CDCA), kyselina hyocholová (HCA), kyselina obeticholová (OCA).

## 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla syntéza nových derivátů OCA (**54** - **63**, **Tab. 2**). Dosud publikované ligandy FXR se lišily zejména substitucí postranního řetězce C20 - C24 a substitucí na C6. Zde se zabývám zejména modifikacemi v polohách C3 (**R<sup>1</sup>**) a C7 (**R<sup>3</sup>**) při zachování lipofilní substituce na C6 (**R<sup>2</sup>**). Cílem bylo dále potvrdit vliv hydroxylů v polohách C3 a C7.

Tabulka 2. Přehled ligandů syntetizovaných v rámci této práce.

Struktura	Označení	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Volná vazebná energie (kcal · mol <sup>-1</sup> )*
	<b>54</b>	α-OH		=O	-10,39
	<b>55</b>	α-OH		=O	-10,59
	<b>56</b>	=O		=O	-10,47
	<b>57</b>	=O		=O	-10,51
	<b>58</b>	β-OH		=O	-10,18
	<b>59</b>	β-OH		=O	-10,52
	<b>60</b>	β-OH		α-OH	-10,53
	<b>61</b>	α-OAc		=O	-9,77
	<b>62</b>	α-OH		β-OH	-10,32
	<b>63</b>	α-OH	(E) 	β-OH	-10,17

\*Vypočtená hodnota prostřednictvím programu MOE, jedná se o dG vazebnou energii ligand vazebné domény s příslušným ligandem.

### 3 ÚVOD DO PROBLEMATIKY SYNTÉZY

Výchozí látka pro syntézu ligandů byla vybrána CDCA (**4**, **Schéma 1**), a to vzhledem k dostatečné zásobě z depozit laboratoře, publikovaným postupům její alkylace a vysoké ceně komerčně dostupné OCA. Návrh celkové syntézy lze rozdělit do dvou částí:

- ČÁST 1. - Příprava C6-alkylovaného výchozího derivátu
- ČÁST 2. - Modifikace funkčních skupin na C3 a C7

#### 3.1 ČÁST 1. Příprava C6 alkylovaného výchozího derivátu

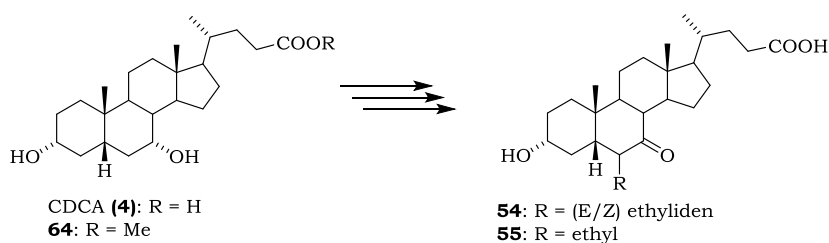


Schéma 1. Příprava C6-alkylovaného derivátu.

V první části syntézy bylo potřeba připravit dostatečné množství výchozího alkylovaného derivátu, který by poté posloužil jako výchozí látka pro další reakce. Vzhledem ke značné strukturní podobnosti s již známou OCA, byly využity publikace popisující její syntézu. V literatuře<sup>30, 39</sup> jsou popsány dva způsoby syntézy OCA (**Schéma 2** a **Schéma 3**). Oba využívají chránicí skupiny pro C3-OH, tvorbu enolátu a následnou alkylaci uhlíku C6. Hlavní rozdíl spočívá v alkylačním kroku. Skupina Yu et al.<sup>39</sup> využila přímou alkylaci enolu alkylhalogenem (**Schéma 2**, reakce **c**), zatímco skupina D'Amore et al.<sup>30</sup> využila trimethylsilyl enoletheru a jeho následnou aldolovou kondenzaci s aldehydem (**Schéma 3**, reakce **b**).

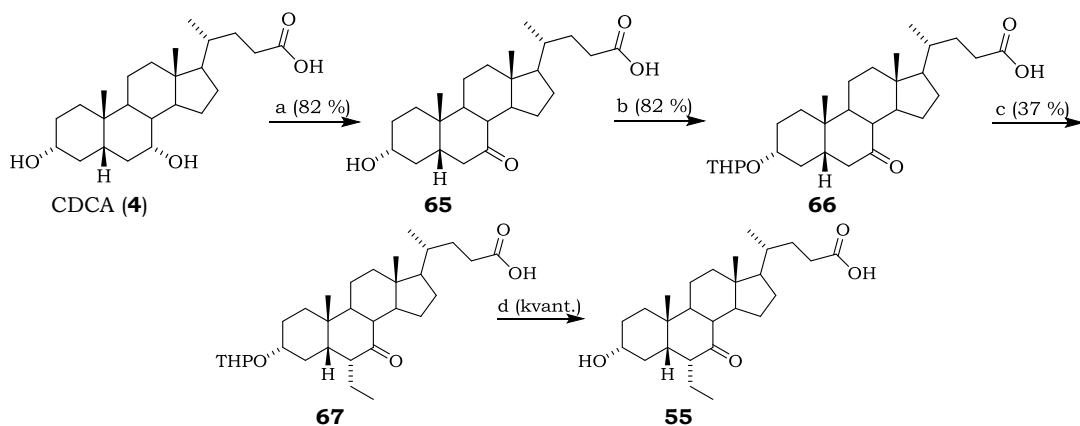


Schéma 2. Příprava dle Yu et al.<sup>39</sup> (a) PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25 °C; (b) DHP, PTSA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; (c) DIPA/*n*-BuLi, EtI, THF, -78 °C; (d) PPTS, EtOH, 25 °C.

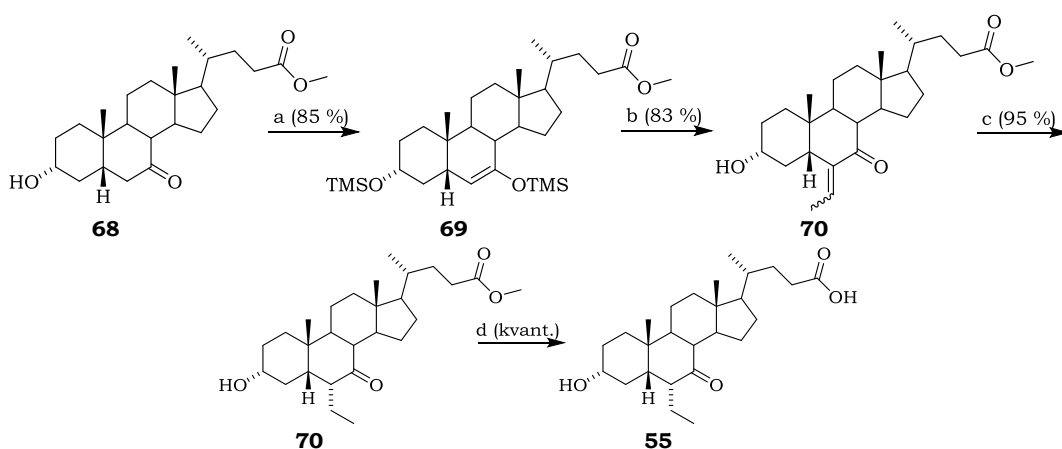
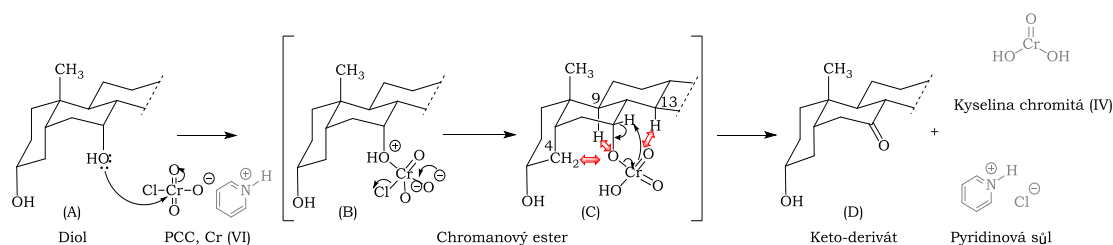


Schéma 3. Příprava dle D'Amore et al.<sup>30</sup>: (a) DIPA/*n*-BuLi, TMSCl, Et<sub>3</sub>N, THF, -78 °C; (b) MeCHO, BF<sub>3</sub> · Et<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -60 °C; (c) H<sub>2</sub>, Pd/C, THF/MeOH (1:1); (d) 5 % roztok NaOH v H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1).

### 3.1.1 Přímá alkylace enolátu alkyhalogenem, příprava dle Yu et al.

V prvním případě se vychází z komerčně dostupné a levnější CDCA (4). Nejprve je CDCA (4) regioselektivně oxidována, poté je zavedena tetrahydropyranylová chránicí skupina (THP), která má dobrou stabilitu v bazickém prostředí. Následuje tvorba enolátu lithium diisopropylaminem a alkylace ethyl bromidem. Původní práce<sup>27</sup> skupiny Pellicciari et al. uvádí celkový výtěžek 7 - 8 %. Tento postup byl dále optimalizován skupinou Yu et al.<sup>39</sup> (Schéma 2), a to především využitím pyridinium chlorochromátu (PCC) jako oxidačního činidla a ethyl jodidu jako alkylačního činidla, čímž bylo dosaženo celkového výtěžku 25 %. Pozoruhodná regioselektivita oxidace (Schéma 2, reakce a) je dána rozdílnou reaktivitou hydroxylů, kdy

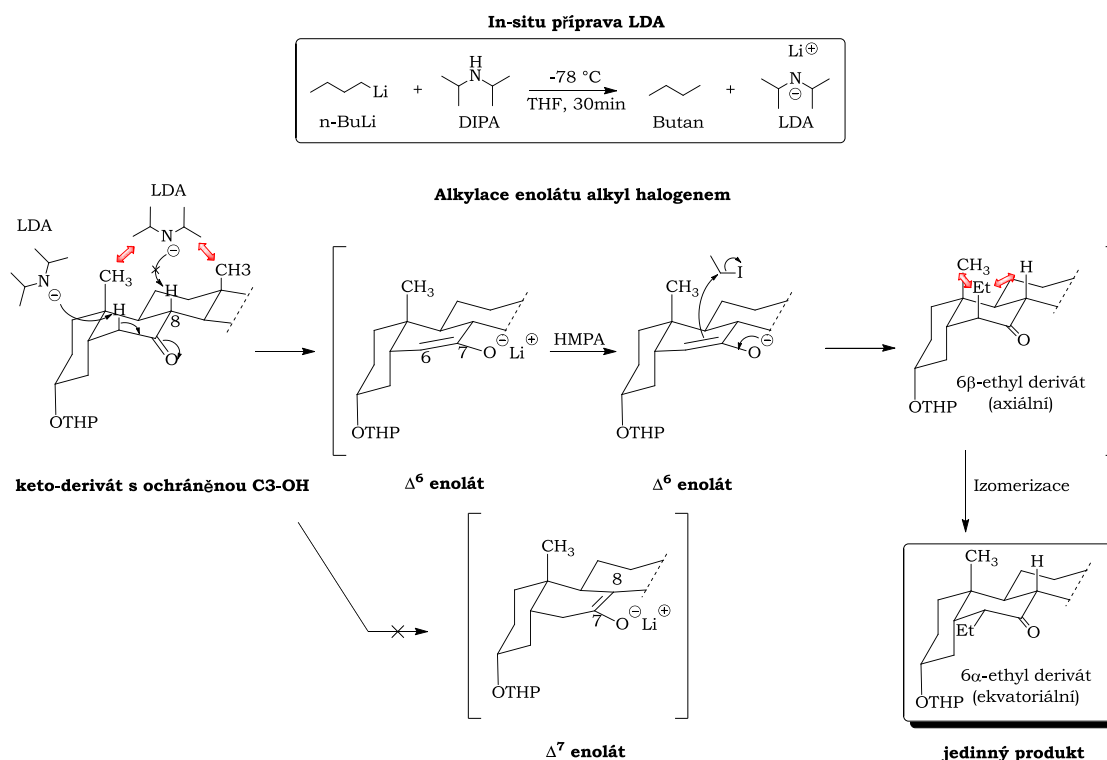
hydroxyl C3-OH je ekvatoriální a C7-OH je axiální. Tato rozdílná reaktivita byla již popsána v původních pracích se žlučovými kyselinami.<sup>40-42</sup> Vysvětlit lze z mechanismu reakce (**Obr. 7**). Nejprve dochází ke koordinaci volného elektronového páru z C7-OH k atomu chromu (**A**), čímž se vytvoří chromanový ester (**B**). K přesunu H<sup>+</sup> iontu může posloužit volný elektronový pár kyslíku v chromanovém esteru, nebo pyridin. Odtržením protonu na C7 dochází k posunu elektronů z C-H vazby do C-O vazby (**C**), čímž vzniká vazba C=O (**D**). Chroman odstupuje jako kyselina chromitá. Axiální alkoholy se oxidují rychleji než ekvatoriální, neboť rychlost určující krok - oddělení kyseliny chromité (krok **C** → **D**), vede ke snížení diaxiální stérické interakce.



Obrázek 7. Mechanismus oxidace CDCA, kde klíčové stérické interakce v molekule **C** jsou vyznačeny červeně dvojitými šipkami.

Stereoselektivita alkylačního kroku (**Schéma 2**, reakce **c**) je vysvětlená v mechanismu reakce (**Obr. 8**). Reakce začíná in situ přípravou lithium diisopropylaminu (LDA). Pro generaci LDA se běžně užívá alkyl lithium (např. *n*-BuLi) a diisopropylamin (DIPA). Pro naše účely báze má LDA vhodnější vlastnosti než *n*-BuLi, neboť LDA nemá tak silný nukleofilní charakter a obsahuje stéricky objemné skupiny *i*Pr, čímž zajišťuje lepší kinetickou kontrolu nad tvorbou enolátu. Reakce probíhá při teplotě -78 °C, jednak kvůli kinetické kontrole a protože LDA je tak silná báze (pK<sub>a</sub> = 36), že může při vyšších teplotách deprotonovat i THF. Poté se k reakční směsi přidá roztok ketonu **66**, který ihned reaguje s LDA za vzniku lithného enolátu. Lithný kation je částečně komplexován hexamethylphosphoramidem (HMPA), čímž se zvýší nukleofilicita enolátu a urychlí se tak následná nukleofilní substituce S<sub>N</sub>2. Kinetickou kontrolou reakce získáme Δ<sup>6</sup> enolát, neboť axiální proton na C8 je stéricky bráněn

methyly C18 a C19, navíc k tomu by v případném  $\Delta^7$  enolátu docházelo k značnému torznímu pnutí mezi kruhy B a C. Alkylací  $\Delta^6$  enolátu pravděpodobně nejprve vzniká axiální  $6\beta$ -ethyl derivát, který poté izomerizuje na ekvatoriální  $6\alpha$ -ethyl derivát. Axiální  $6\beta$ -ethyl derivát je nestabilní kvůli stérické interakci mezi  $6\beta$ -ethylem, C19 methylem a C8 axiálním vodíkem.<sup>27</sup>

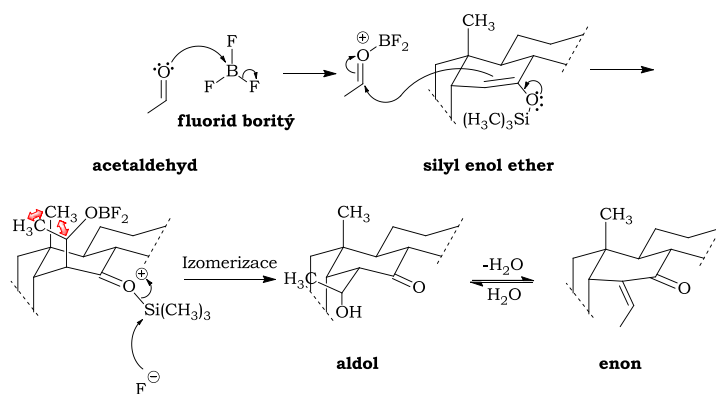


Obrázek 8. Mechanismus přímé alkylace. Nejprve dochází k in-situ tvorbě LDA, která deprotonuje alfa-pozici ke karbonylu. Tvorba  $\Delta^6$  enolátu je preferovaná, neboť v případě  $\Delta^7$  enolátu by docházelo k značnému torznímu pnutí mezi B a C kruhy. Vzniká výhradně  $6\alpha$ -ethyl derivát, neboť tak nedochází k axiální stérické interakci. Stérické interakce jsou vyznačeny červeně dvojími šipkami. Tetrahydropyranyl (THP), *n*-butyllithium (*n*-BuLi), diisopropylamin (DIPA), lithium diisopropylamid (LDA), hexamethylphosphoramid (HMPA).

### 3.1.2 Mukaiyamova aldolová kondenzace, příprava dle D'Amore et al

Příprava dle D'Amore et al.<sup>30</sup> (**Schéma 3**) vychází z methylesteru kyseliny 7-oxo-litocholové (**68**), který je převeden na silylenolether. V reakci je možné využít například trimethylsilyl chlorid (TMSCl), je ovšem možné použít i jiné stéricky objemné substituované silyl chloridy (triethyl, *tert*-butyldimethyl nebo triisopropyl). Jako báze se používají zpravidla

stéricky objemné aminy, například LDA. Triethylamin se do reakce přidává až na konec, a to pro neutralizaci vznikající kyseliny chlorovodíkové, která by mohla zpětně odchránit trimethylsilyl (TMS) chránicí skupinu. Izolovaný silylenolether může v přítomnosti Lewisovy kyseliny ( $\text{BF}_3$  nebo  $\text{TiCl}_4$ ) reagovat jako nukleofil s acetaldehydem. Jde o klíčovou reakci této syntetické strategie a je známá jako Mukaiyamova aldolová kondenzace (**Obr. 9**). Nejprve volný elektronový pár acetaldehydu atakuje prázdný orbital v  $\text{BF}_3$ , čímž dojde k aktivaci acetaldehydu. Silylenolether poté nukleofilně atakuje aktivovaný acetaldehyd. Následnou disociací chránicí skupiny TMS dojde k vytvoření aldolu. Po spontánní eliminaci molekuly vody dojde k vytvoření enonu.



Obrázek 9. Mechanismus Mukaiyamovy aldolové kondenzace za přítomnosti  $\text{BF}_3$ . Stérické interakce jsou vyznačeny červeně dvojitými šipkami.

### 3.1.3 Další možnosti alkylace v $\alpha$ -poloze karbonylu

Existují i jiné, používané metody alkylace  $\alpha$ -uhlíku karbonylu. Žádná z nich však nebyla publikována v souvislosti se syntézou OCA. Další možností, jak generovat enolát, než jak bylo uvedeno v kapitolách **3.1.1** a **3.1.2**, je generovat enolát jiných kovů než lithia či křemíku. Použít se dají například kovy sodíku, draslíku, bóru, cínu, či některých přechodných kovů. V určitých případech nabízejí tyto kovy lepší kontrolu nad stereo- a regioselektivitou generovaného enolátu.<sup>43</sup> Lze také využít klasická Storkova reakce, kdy se enolát „zafixuje“ jako enamín, který poté může reagovat s elektrofilem.<sup>44</sup> Dále existují méně standardní metody, například alkylace

trifláty,<sup>45</sup> nebo alkylace ethylenem, která je však využitelná spíše v rámci průmyslových aplikací.

### 3.2 ČÁST 2. Modifikace funkčních skupin na C3 a C7

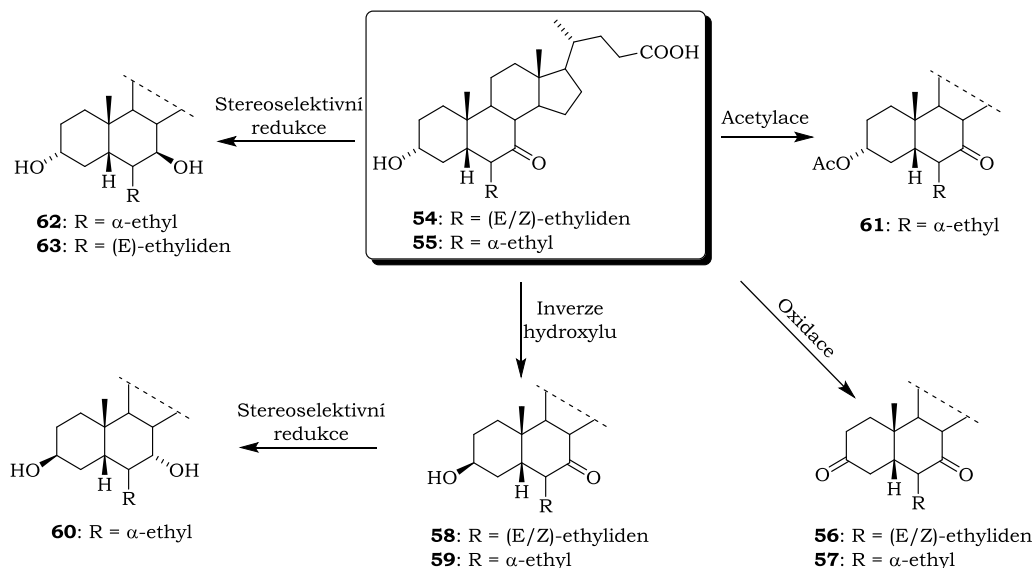


Schéma 4. Schématický návrh syntézy látek **56** - **63**, vycházející z látek **54** a **55**

Látky **56** - **63** lze syntetizovat z výchozích derivátů **54** a **55**. Schematický návrh druhé části syntézy je zobrazen na **Schématu 4**. Steroid **61** lze získat acylací látky **55**, k tomu lze využít například acetanhydrid,<sup>46, 47</sup> acetylchlorid,<sup>48</sup> či dokonce ethylacetát.<sup>49</sup> Reakce jsou katalyzované kyselé nebo bazicky. Látky **62** a **63** je možné získat stereoselektivní redukcí látek **54** a **55**. K tomu je možné využít komplexních hydridů, popsané jsou i metody redukce alkalickými kovy,<sup>50</sup> katalytická hydrogenace na Raneyově niklu<sup>51</sup> nebo elektrochemická redukce.<sup>52</sup> Látky **58** a **59** lze získat inverzí hydroxyly výchozích 3α-hydroxy-derivátů **54** a **55**. K tomu se dnes nejčastěji využívá Mitsunobova reakce,<sup>53</sup> další možností inverze je například převedení hydroxyly na tosylát a jeho následná reakce s KNO<sub>2</sub><sup>54</sup> nebo reakce s chloromethansulfonátem a octanem cesným.<sup>55</sup> Látky **56** a **57** lze připravit oxidací výchozích látek **54** a **55**. Běžný způsob oxidace sekundárních alkoholů je použití oxidantů chromového typu,<sup>56-59</sup> další možností je využití oxidantů na bázi DMSO,<sup>60-62</sup> Al(OiPr)<sub>3</sub><sup>63</sup> nebo NaOCl.<sup>64</sup> Látka **60** lze získat stereoselektivní redukcí **59** pomocí NaBH<sub>4</sub>.<sup>30</sup>

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Příprava C6-alkylovaného výchozího derivátu

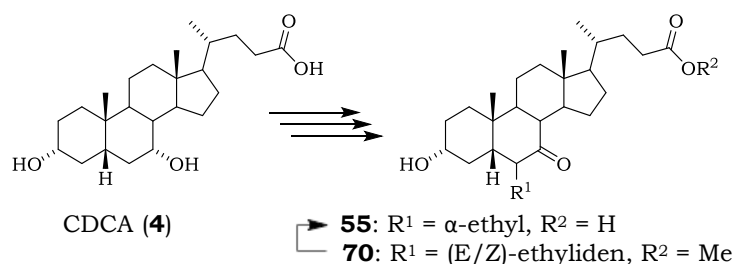
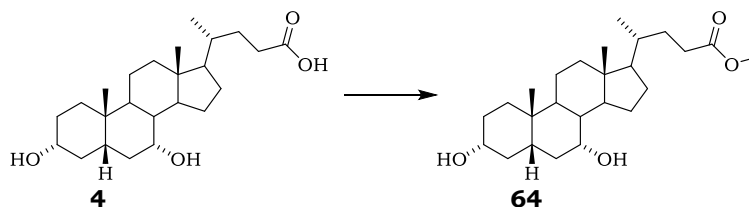


Schéma 5. Příprava C6-alkylovaného výchozího materiálu.

Stěžejní krok v syntéze je zavedení alkyly na steroidní skelet. Byly vyzkoušeny obě publikované metody (viz. kapitoly **3.1.1** a **3.1.2**). Vzhledem k tomu, že obě publikované metody vycházejí z 7-oxo derivátu, bylo nejprve potřeba optimalizovat regioselektivní oxidaci. Byla vyzkoušena běžná oxidační činidla a jako substrát byla použita jak CDCA (**4**), tak její methylester (**64**).

Tabulka 3. Esterifikace CDCA



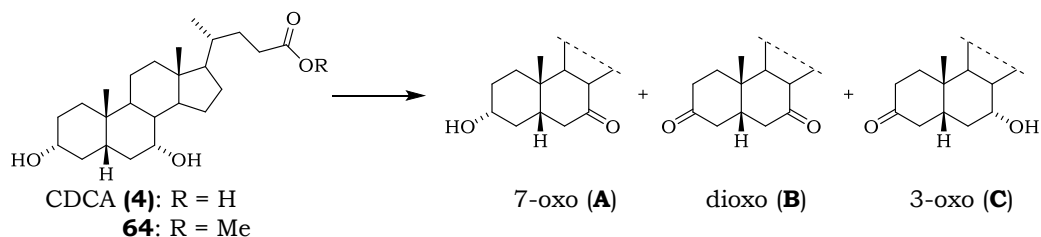
Označení reakce	Maximální množství substrátu		Reakční podmínky	Výtěžek*
	(g)	(mmol)		
<b>1</b>	0,5	1,27	CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (nadbytek), Et <sub>2</sub> O, benzen, 0 °C	kvant.
<b>2</b>	40	102	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 mol. %), MeOH, reflux	kvant.

\*Izolované výtěžky po chromatografii.

Pro esterifikaci byl využit jak diazomethan (**Tab. 3**, reakce **1**), tak Fisherova esterifikace (**Tab. 3**, reakce **2**). Obě reakce poskytovaly kvantitativní výtěžky. Výhoda diazomethanu je především jednoduchost, jedná se o tzv. “čistou reakci”, kde hlavní vedlejší produkt je plynný dusík. Vzhledem ke své výbušnosti je diazomethan nevhodný pro přísuny většího množství materiálu a proto tato reakce byla využívána pouze pro malá

reakční množství, řádově desítky až stovky miligramů. Pro větší přísuny byla využita Fisherova esterifikace.

Tabulka 4. Optimalizace podmínek regioselektivní oxidace



Označení reakce	Substrát	Reakční podmínky	Výtěžek (%) <sup>*</sup>	
			A	B + C
1	4	PCC (1,1 ekv.), CHCl <sub>3</sub> , silikagel, 25 °C	20	16
2	4	PCC/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (20/80, 1,7 ekv.), CHCl <sub>3</sub> , 25 °C	13	33
3	4	NBS (1,5 ekv.), 3 % vodný roztok NaHCO <sub>3</sub> , 25 °C	47	25
4	4	CrO <sub>3</sub> (1,1 ekv.), H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, Me <sub>2</sub> CO, 0 °C	50	35
5	4	CrO <sub>3</sub> (0,65 ekv.), H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, Me <sub>2</sub> CO, 0 °C	54	17
6	64	CrO <sub>3</sub> (0,65 ekv.), H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, Me <sub>2</sub> CO, 0 °C	60	20

<sup>\*</sup>Izolované výtěžky po chromatografii. Pyridinium chlorochromát (PCC), N-bromsukcinimid (NBS). Reakce byly provedeny s 500 mg; 1,27 mmol (4), 1,23 mmol (64) substrátu.

Nejlepší výsledek poskytla klasická Jonesova oxidace methylesteru CDCA (64). Při každém pokusu byla získána zpět část výchozího materiálu, který byl regenerován a použit k dalším oxidacím. Vysoký výtěžek při použití pouze 0,65 ekv. CrO<sub>3</sub> vypadá překvapivě (Tab. 4, reakce 5 a 6). Oxid chromový ovšem může oxidovat 1,5 ekvivalentu substrátu, neboť stechiometrie oxidace je 2:3, CrO<sub>3</sub>:ROH. Důvodem vyššího výtěžku při použití methylesteru než při použití volné kyseliny je lepší rozpustnost v organických rozpouštědlech, což zjednodušuje extrakci a umnožňuje lepší dělení při sloupcové chromatografii na silikagelu.

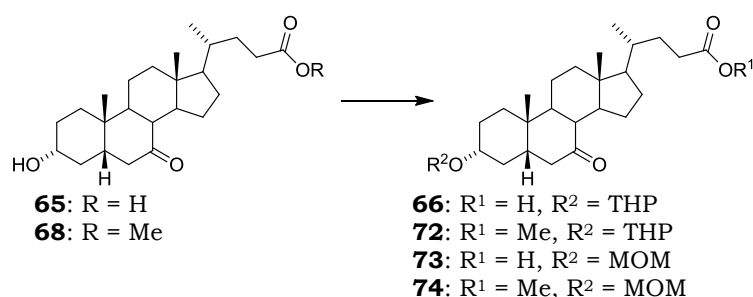
Výtěžek 60 % byl dostačující a tyto reakční podmínky byly aplikovány až na dvacetigramové dávky, kde bylo izolováno 50 % produktu. U takto velkých reakčních množství je třeba dbát na dostatečné chlazení, neboť reakce je silně exotermní. K tomu je třeba využít velkou reakční nádobu, aby chlazení probíhalo na co největším povrchu. Toto je pravděpodobně

hlavní příčina nižších výtěžků při velkých dávkách, snáze dochází k nárůstu teploty reakční směsi a k “přeoxydování” na diketon (**B**).

#### 4.1.1 Přímá alkylace enolátu alkylhalogenem

Pro přímou alkylation bylo potřeba vybrat chránicí skupinu stabilní v silně bazickém prostředí. Byla vyzkoušena jak chránicí skupina methoxymethylesteru (MOM), tak THP. Obě skupiny jsou stabilní při  $\text{pH} > 12$ , MOM je stabilní i v slabě kyselém prostředí, což může být výhoda při zpracování, oproti tomu THP zavádí do molekuly nové stereogenní centrum, čímž může znesnadňovat interpretaci NMR spekter.

Tabulka 5. Zavádění chránicí skupiny



Označení reakce	Substrát	Reakční podmínky	Výtěžek (%) <sup>*</sup>	Produkt
1	65	PTSA (0,2 ekv.), DHP (3,7 ekv.), CHCl <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1), 25 °C	37	66
2	68	PTSA (0,13 ekv.), DHP (3 ekv.), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 25 °C	84	72
3	65	MOMBr (1 ekv.), DIPEA (2,1 ekv.), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 25 °C	15	73
4	68	MOMBr (1 ekv.), DIPEA (1,1 ekv.), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 25 °C	32	74

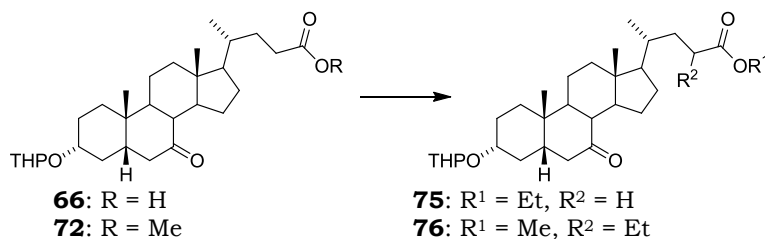
<sup>\*</sup>Izolované výtěžky po chromatografii. Kyselina *p*-toluensulfonová (PTSA), 3,4-dihydro-2H-pyran (DHP), methoxymethyl bromid (MOMBr), diisopropylethylamin (DIPEA). Reakce byly provedeny s 50 mg; 0,12 mmol substrátu.

Jelikož nejvyšší výtěžky poskytovala chránicí skupina THP, byla vybrána pro další syntézu. Bohužel se ukázalo, že látky **66** a **72** jsou pro alkylation nevhodné. Při použití popsaných<sup>27, 39</sup> reakčních podmínek docházelo buď k esterifikaci nebo k alkylation na uhlíku C23 (**Tab. 6**). Žádanou alkylation na pozici C6 se popsanými podmínkami nepodařilo provést. Navíc ethyl na C23 a C6 nelze jednoznačně rozlišit hmotností ani

## Výsledky a diskuze

1D NMR spektroskopii. Alkyl na C23 byl prokázán HMBC NMR spektroskopii, ve spektru lze pozorovat interakci karboxylového uhlíku s alifatickými CH<sub>2</sub> a CH<sub>3</sub> protony z ethylu.

Tabulka 6. Přímá alkylace enolátu alkyhalogenem



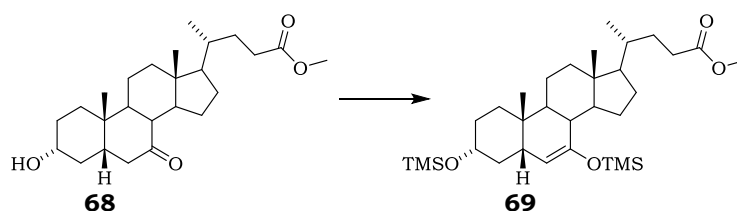
Označení reakce	Substrát	Reakční podmínky	Výtěžek (%)*	Produkt
1	66	DIPA (4 ekv.), <i>n</i> -BuLi (4 ekv.), HMPA (4 ekv.), EtI (10 ekv.), -78 °C	71	75
2	72	DIPA (3 ekv.), <i>n</i> -BuLi (3 ekv.), HMPA (4 ekv.), EtI (10 ekv.), -78 °C	60	76
3	72	DIPA (3,2 ekv.), <i>n</i> -BuLi (3,2 ekv.), HMPA (3,2 ekv.), EtBr (10 ekv.), -78 °C	52	76

\*Izolované výtěžky po chromatografii. Diisopropylamin (DIPA), *n*-butyllithium (*n*-BuLi), hexamethylfosforamid (HMPA), ethyl jodid (EtI), ethyl bromid (EtBr). Reakce byly provedeny s 100 mg; 0,21 mmol (**66**), 0,20 mmol (**72**) substrátu.

### 4.1.2 Mukaiyamova aldolová kondenzace

Druhou popsanou<sup>30</sup> možností je využití silylenoletheru - jako chránící skupiny pro OH a jako prekurzoru pro Mukaiyamovu aldolovou kondenzaci. Silylenolether se podařilo připravit v kvantitativním výtěžku, a to reakcí látky **68** s trimethylsilylchloridem (TMSCl) v přítomnosti LDA. (**Tab. 7**). Reakci je potřeba dobře chladit a zředěný roztok steroidu v THF přidávat do reakční směsi velmi pomalu, TMSCl a LDA musí být po celou dobu v nadbytku. Reakci nebylo třeba optimalizovat, publikované<sup>30</sup> reakční podmínky bylo možné aplikovat na gramová množství bez ztráty výtěžku. Vzniklý silylenolether lze izolovat jako žlutý olej, který je stabilní po dobu měsíců.

Tabulka 7. Příprava silylenoletheru

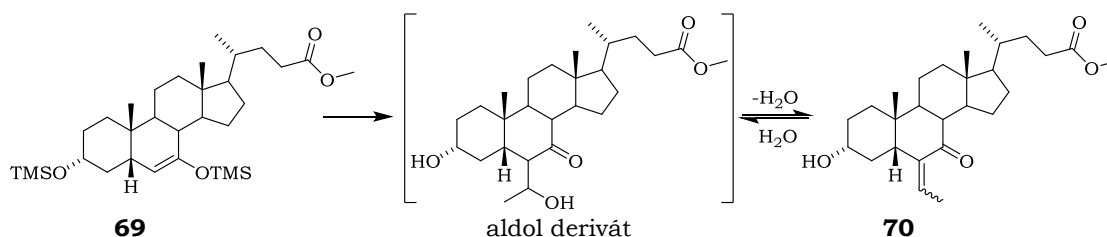


Označení reakce	Substrát	Reakční podmínky	Výtěžek (%)*
1	68	DIPA (6 ekv.), <i>n</i> -BuLi (6 ekv.), TMSCl (8 ekv.), Et <sub>3</sub> N (15 ekv.), THF, -78 °C	97

\*Izolované výtěžky po chromatografii. Diisopropylamin (DIPA), *n*-butyllithium (*n*-BuLi), trimethylsilylchlorid (TMSCl), triethylamin (Et<sub>3</sub>N). Reakce byla provedena v rozsahu 0,05 - 5 g; 0,12 - 12,36 mmol substrátu.

Následná Mukaiyamova aldolová kondenzace probíhá při -60 °C v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Jako optimální se ukázalo použití tří ekvivalentů acetaldehydu místo publikovaných<sup>30</sup> dvou (**Tab. 8**). Bylo zjištěno, že rychlost přidávání fluoridu boritého je stěžejní. Pokud přikapávání není dostatečně pomalé, dochází k předčasnému ochránění hydroxyly a ketonu. V takovém případě je majoritní produkt výchozí látka **68**. S velmi pomalým přikapáváním fluoridu boritého v průběhu několika hodin bylo dosaženo až 95 % výtěžku. K tomuto účelu byla využita automatická přikapávačka.

Tabulka 8. Mukaiyamova aldolová kondenzace



Označení reakce	Substrát	Reakční podmínky	Výtěžek (%)*
1	69	MeCHO (2 ekv.), BF <sub>3</sub> · Et <sub>2</sub> O (4 ekv.), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -60 °C	75
2	69	MeCHO (3 ekv.), BF <sub>3</sub> · Et <sub>2</sub> O (4 ekv.), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -60 °C	95

\*Izolované výtěžky po chromatografii. Reakce byly provedeny v rozsahu 0,05 - 6,6 g, 0,09 - 12,02 mmol substrátu.

Dále bylo zjištěno, že po přidání všech reagentů je potřeba nechat reakční směs ohřát na laboratorní teplotu a několik hodin ji ponechat “odpočívat”. Tím je zajištěno, že dojde ke kvantitativní eliminaci hydroxyly. Pokud se reakce zpracuje předčasně, lze nedoreagovanou zpracovanou směs rozpustit v toluenu a částečně zahustit spolu s kapkou koncentrované kyseliny sírové. Dojde k eliminaci hydroxyly a následným odpařením vody azeotropickou směsí s toluenem dojde k posunu reakční rovnováhy směrem k látce **70**. Kondenzační produkt **70**, na rozdíl od výchozí látky **69**, výrazně absorbuje UV světlo, což usnadňuje jeho identifikaci a izolaci.

Dle uvedeného reakčního **Schématu 6** bylo připraveno celkem deset gramů látky **70** s celkovým výtěžkem 46 %, což byla dostatečná zásoba pro modifikace funkčních skupin na C3 a C7.

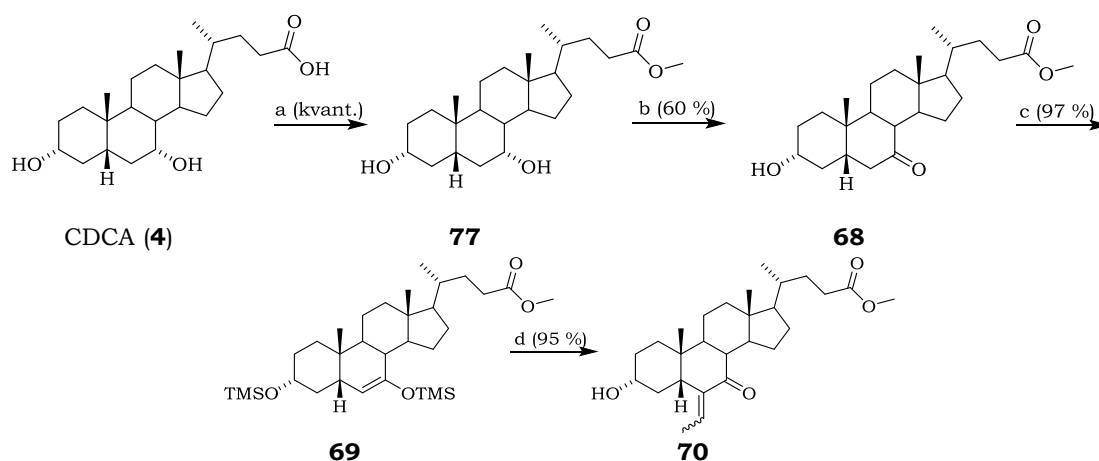


Schéma 6. Optimalizované schéma přípravy výchozího materiálu **70**: (a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , MeOH, reflux; (b)  $\text{CrO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Me}_2\text{CO}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ; (c) DIPA/ $n$ -BuLi, TMSCl,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ ; (d) MeCHO,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-60\text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.2 Modifikace funkčních skupin na C3 a C7

Deriváty **54** - **63** byly připraveny dle uvedeného **Schématu 7**. Většinu reakcí nebylo potřeba optimalizovat a byly provedeny obvykle ve dvou šaržích, nejprve v minimálním množství tzv. "screeningové" a poté v takovém množství, které bylo třeba k vyčištění, úplnou charakterizaci a biologické testy.

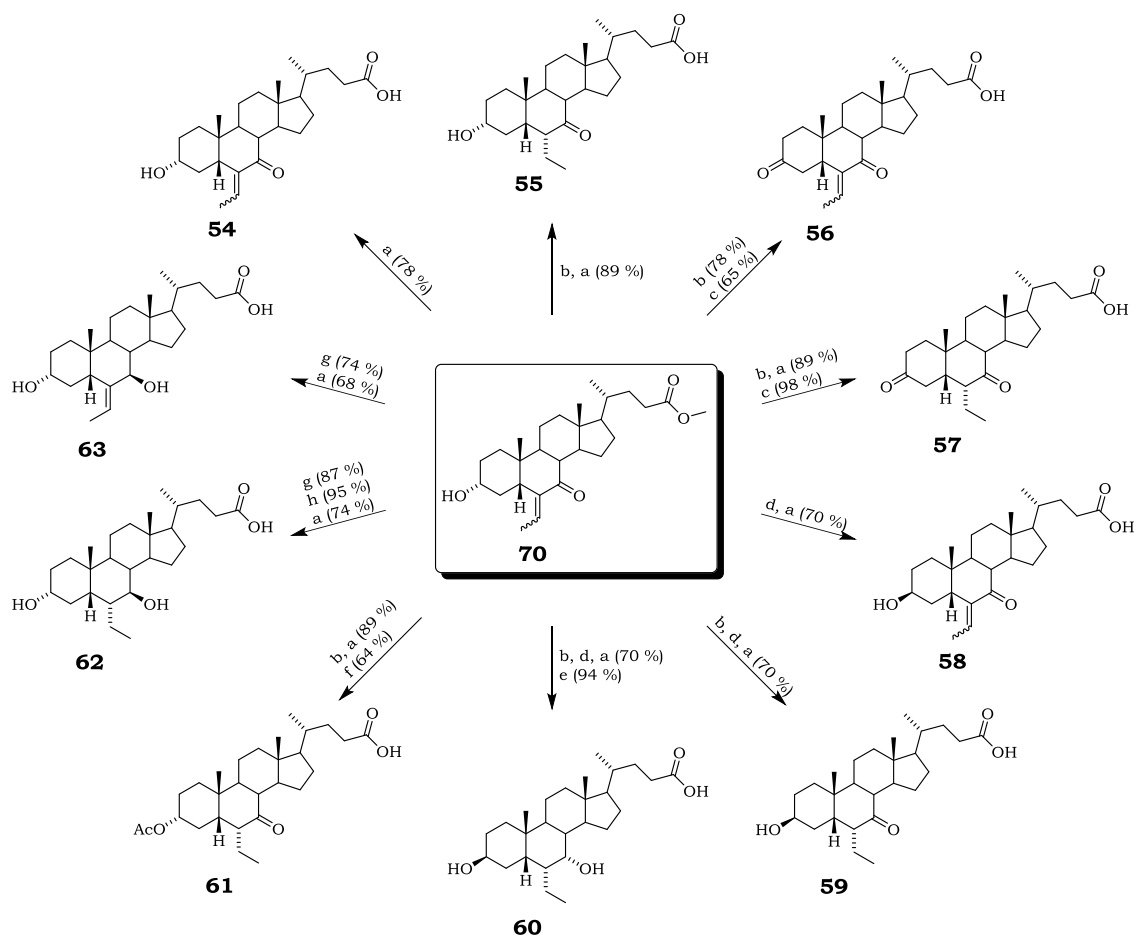
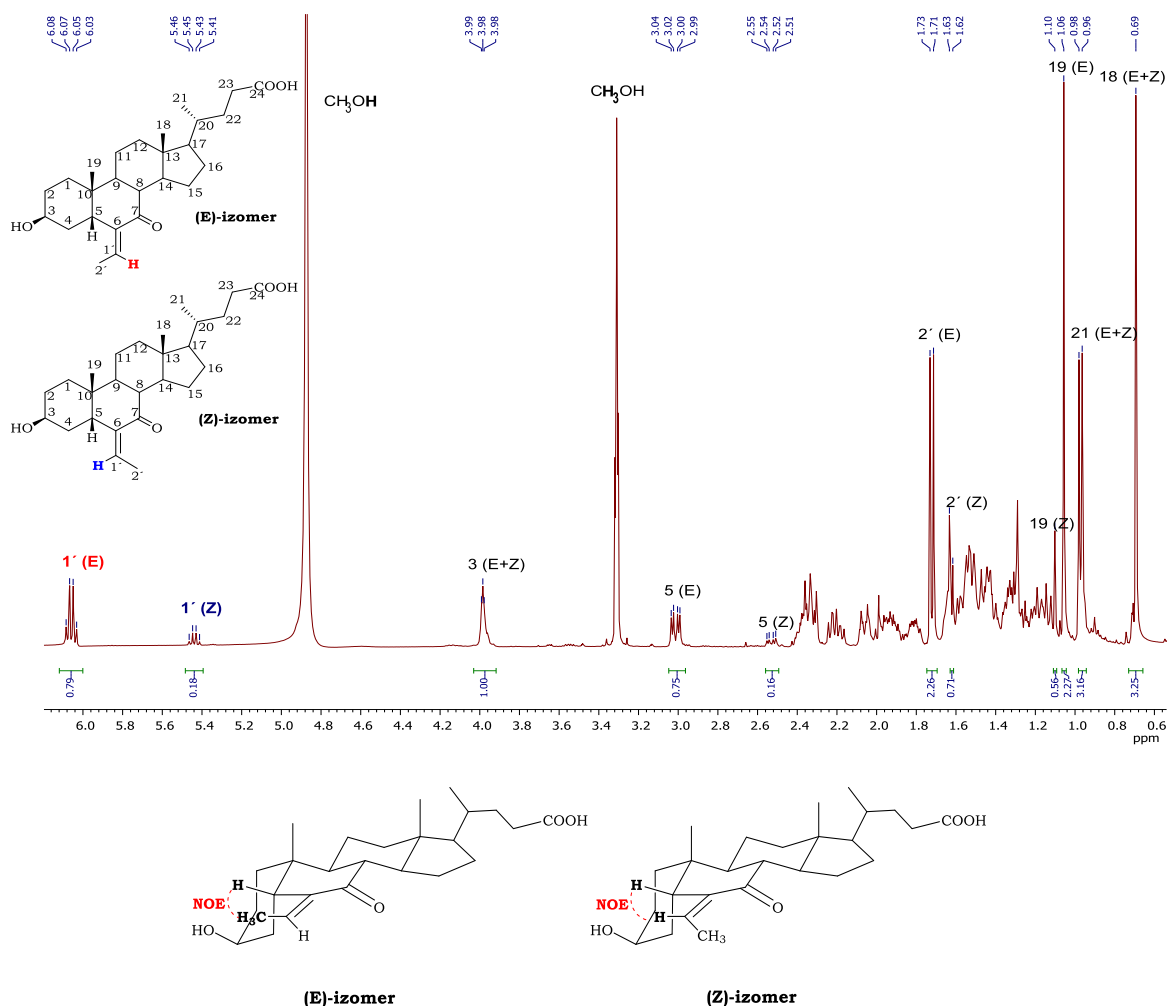


Schéma 7. Modifikace funkčních skupin na C3 a C7 pozicích steroidního skeletu: **(a)** NaOH, H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1), 45 °C; **(b)** H<sub>2</sub> (1 atm.), Pd/C, EtOH, 25 °C; **(c)** CrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, Me<sub>2</sub>CO, 0 °C; **(d)** PPh<sub>3</sub>, HCOOH, DEAD, THF, 0 °C; **(e)** NaBH<sub>4</sub>, THF/H<sub>2</sub>O (4:1), 0 °C; **(f)** Ac<sub>2</sub>O, pyridin, 0 °C; **(g)** NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C; **(h)** H<sub>2</sub> (1 atm.), PtO<sub>2</sub>, AcOH, 25 °C.

Látky **54**, **56**, **58** a **70** byly získány jako směsi (E/Z)-izomerů, které se nepodařilo jednotlivě izolovat. Látka **63** byla získána jako čistý E-izomer. Poměr jednotlivých izomerů byl vždy určen intergrací H1' olefinického protonu, který byl v <sup>1</sup>H spektru dobře rozlišen (horní část **Obr. 10**). Přiřazení jednotlivých izomerů příslušným signálům pak bylo provedeno

## Výsledky a diskuze

pomocí ROESY, ve spektru bylo možné pozorovat přímé interakce NOE (spodní část **Obr. 10**).



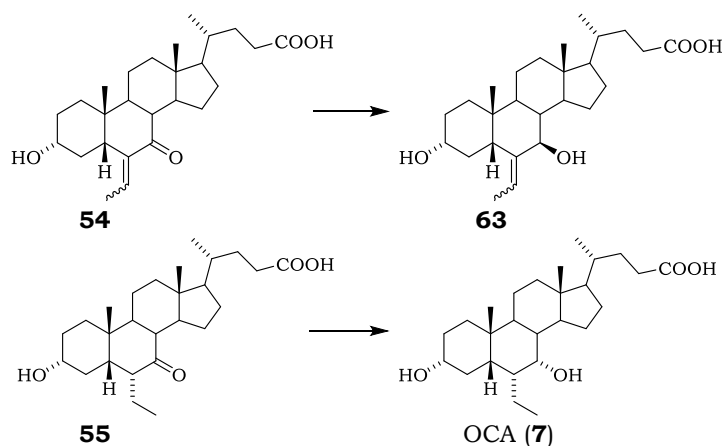
Obrázek 10.  $^1\text{H}$  NMR spektra látky **58**, kde jsou vyznačeny klíčové signály olefinických protonů  $\text{H}1'$ , které posloužily pro určení poměru (E/Z)-izomerů ve směsi. K přiřazení jednotlivých signálů příslušné molekule posloužil experiment ROESY, klíčové NOE interakce u obou izomerů jsou zobrazeny v dolní části obrázku. Izomerie, popřípadě zastoupení jednotlivých izomerů u ostatních látek, byla prokázána obdobně.

Jediné reakce, které bylo třeba optimalizovat, byly stereoselektivní redukce C7 karbonylu při syntéze látek **62 a 63** a redukce dvojně vazby při syntéze látky **62** (**Schéma 7**).

## 4.2.1 Optimalizace stereoselektivní redukce C7 karbonylu

Bylo potřeba optimalizovat stereoselektivní redukci karbonylu (**Schéma 7**, reakce **g**). Při reakci látky **55** s kovovým sodíkem nebo N-Selektridem byl izolován pouze výchozí keton. Překvapivě, pokud je na C6 přítomný ethylden, redukcí borohydridem vzniká 7 $\beta$ -OH (**Tab. 9**, reakce **1**), zatímco v přítomnosti ethylu na C6 vzniká 7 $\alpha$ -OH derivát (**Tab. 9**, reakce **2**). Naprosto odlišná stereochemie při použití stejného reduktantu by se dala vysvětlit “bráněním” axiálnímu či ekvatoriálnímu nukleofilnímu ataku. Při substituci C6 ethylem dochází k bránění ekvatoriálního ataku, naopak při substituci C6 ethyldenem dochází k bránění ataku axiálního.

Tabulka 9. Optimalizace stereoselektivní redukce



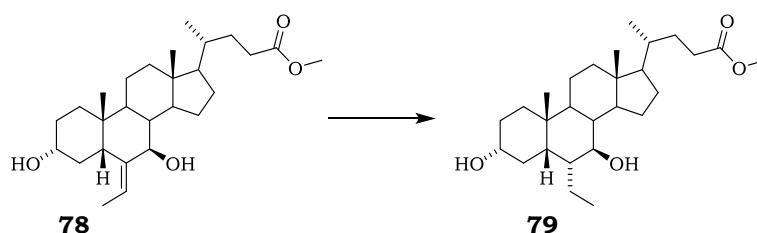
Označení reakce	Substrát	Reakční podmínky	Výtěžek (%) <sup>a</sup>	Produkt
<b>1</b>	<b>55</b>	Na (10 ekv.), t-BuOH, reflux	nereagovalo <sup>b</sup>	-
<b>2</b>	<b>55</b>	N-Selektrid (5 ekv.), t-BuOH, 40 °C	nereagovalo <sup>b</sup>	-
<b>3</b>	<b>55</b>	NaBH <sub>4</sub> (5 ekv.), MeOH, 0 °C	74	OCA ( <b>7</b> )
<b>4</b>	<b>54</b>	NaBH <sub>4</sub> (5 ekv.), THF/H <sub>2</sub> O (4:1), 0 °C	94	<b>63</b>

<sup>a</sup>Izolované výtěžky po chromatografii, <sup>b</sup>izolován výchozí substrát. Všechny reakce byly provedeny s 50 mg; 0,12 mmol substrátu.

## 4.2.2 Optimalizace redukce dvojně vazby

Bylo potřeba optimalizovat redukcí dvojně vazby, (**Schéma 7**, reakce **h**). Přestože látku **55** se podařilo získat z látky **70** klasickou hydrogenací s katalyzátorem Pd/C (**Schéma 7**, reakce **b**), při syntéze látky **62** stejné reakční podmínky (**Tab. 10**, reakce **1**) neposkytly ani částečnou redukcí dvojně vazby, a to i při hydrogenaci v autoklávu za zvýšeného tlaku (**Tab. 10**, reakce **2**). Takto rozdílná reaktivita by se dala vysvětlit přítomností hydroxyly na C7, který při  $\beta$ -konfiguraci může bránit interakci dvojně vazby s povrchem katalyzátoru. Byly vyzkoušeny běžné metody redukce dvojně vazby. Jako vhodná se nakonec ukázala hydrogenace na oxidu platičitém v ledové kyselině octové. Tato reakce poskytovala téměř kvantitativní výtěžky.

Tabulka 10. Optimalizace redukce dvojně vazby

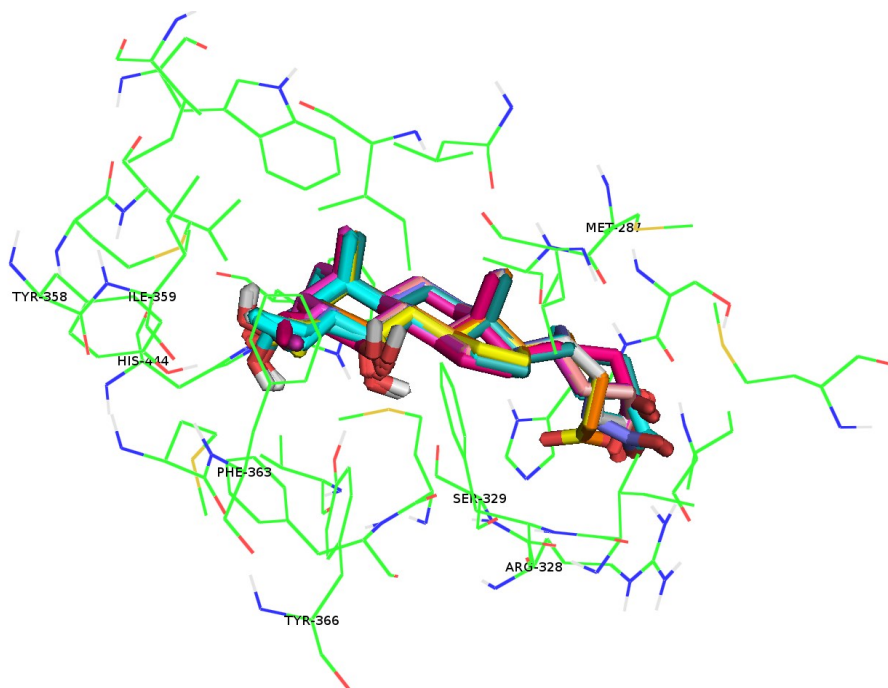


Označení reakce	Reduktant (ekv.)	Tlak (atm.)	Katalyzátor (hm. %)	Rozpouštědlo	Čas (h)	Teplota (°C)	Výtěžek (%) <sup>a</sup>
<b>1</b>	H <sub>2</sub> (nadbytek)	1	Pd/C (10)	EtOH	24	25	nereagovalo <sup>b</sup>
<b>2</b>	H <sub>2</sub> (nadbytek)	5	Pd/C (10)	EtOH	2	25	nereagovalo <sup>b</sup>
<b>3</b>	H <sub>2</sub> (nadbytek)	1	RhCl(PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (100)	Benzen	48	25	nereagovalo <sup>b</sup>
<b>4</b>	H <sub>2</sub> (nadbytek)	1	RaNi (20)	MeOH	2	25	nereagovalo <sup>b</sup>
<b>5</b>	H <sub>2</sub> (nadbytek)	1	RaNi (20)	EtOH	10	80	nereagovalo <sup>b</sup>
<b>6</b>	NHNH (6)	-	-	AcOH/MeOH (1:9)	1	25	nereagovalo <sup>b</sup>
<b>7</b>	H <sub>2</sub> (nadbytek)	1	PtO <sub>2</sub> (10)	AcOH	24	25	95

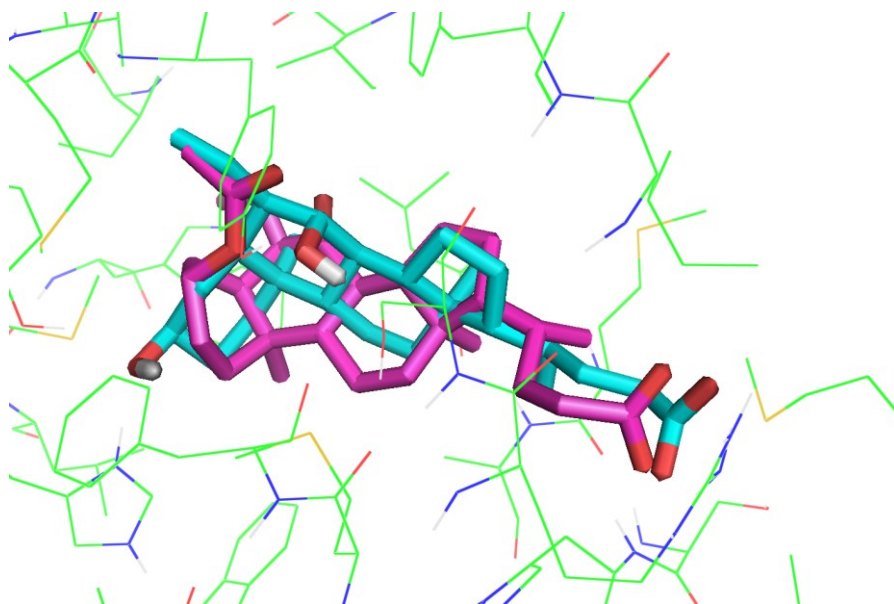
<sup>a</sup>Izolované výtěžky po chromatografii, <sup>b</sup>izolován výchozí substrát. Všechny reakce byly provedeny s 50 mg; 0,12 mmol substrátu.

### 4.3 Dokování ligandů do LBD FXR

Počítačové modelování provedl PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D. v programu MOE™: Molecular Operating Environment (verze: 2016.0802) na krystalické struktuře lidského FXR (1OSV). Ta byla převzata z databáze Protein data bank.<sup>65</sup> Struktura proteinu byla překontrolována a nesrovnalosti byly opraveny (jmenovitě: nesprávné typy reziduí a proteinových řetězců, C- a N-konce, které mají být nabity). Vodíky byly následně přidány za použití protokolu Protonation 3D. Částečné náboje byly přiřazeny k celé struktuře proteinu za použití silového pole AMBER 94. Vnitřní energie molekuly proteinu byla minimalizována (gradient: 0,001 kcal · mol<sup>-1</sup>). Struktury ligandů byly vytvořeny pomocí rozhraní programu MOE. Strukturám ligandů byly přidány částečné náboje a byly energeticky minimalizovány. Samotné dokování ligandů bylo provedeno metodou Alpha PMI (vzorky na konformaci: 20, počet pozic: 250). Výsledná pozice byla vybrána pomocí protokolu Induced fit, který umožní LBD přizpůsobit svoji konformaci dokovanému ligandu. Finální výstup je volná vazebná energie dG [kcal · mol<sup>-1</sup>], která byla vypočítána pomocí skórovací funkce GBVI/WSA dG.



Obrázek 11. Vypočtené pozice pro ligandy **54 - 60**, **62**, **63** a kyselinu obeticholovou v LBD FXR.



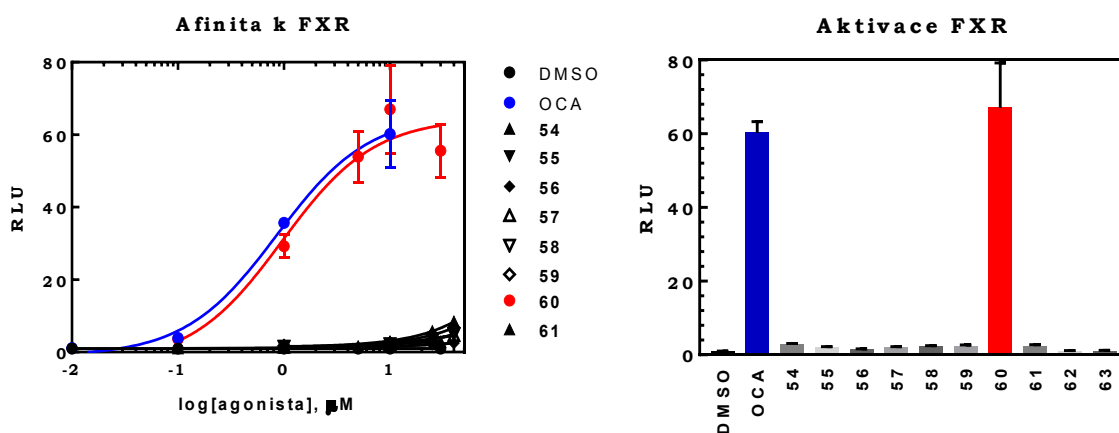
Obrázek 12. Vypočtené pozice pro ligand **61** (fialově) a kyselinou obeticholovou (modře) v LBD FXR.

Všechny ligandy s výjimkou **61** zaujímají v LBD téměř stejnou pozici, nehledě na C3 a C7 substituci (**Obr. 11** a **12**). Tomu odpovídá jejich velmi podobná volná vazebná energie  $dG$  (**Tab. 2**, strana 20). Pouze ligand **61** zaujímá odlišnou pozici, způsobenou objemnější substitucí v poloze C3. Tato odlišná pozice se odráží ve zvýšené vazebné energii oproti kyselině obeticholové.

#### 4.4 Testování připravených látek

Vybrané látky **54** - **63** byly otestovány v laboratoři prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D. na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Všechny testy probíhaly na jaterních buňkách linie HepG2, které jsou komerčně dostupné. Byla testována buněčná toxicita, aktivita ( $E_{max}$ ) a afinita ( $EC_{50}$ ) vůči lidskému FXR (**Obr. 13**). K tomu byly využity zavedené eseje a kity, jmenovitě cell proliferation assay, který slouží k určení buněčné toxicity látek a gene reporter assay, který slouží k určení aktivity a afinity látek k lidskému FXR. Experimentální procedury nebyly součástí této práce a jsou publikovány jinde.<sup>66</sup>

Látky nejevily známky toxicity při fyziologických koncentracích (> 30  $\mu\text{M}$ ). Proto byly u všech látek testovány jejich agonistické vlastnosti.

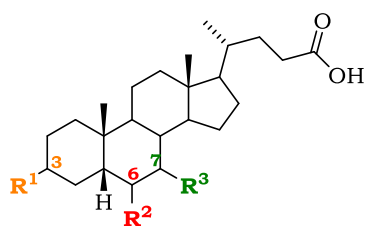


Obrázek 13. Afinita a aktivita testovaných ligandů vůči FXR. Byl použit reportérový plazmid se sekvencí FXR-RE vázající ligandem aktivovaný FXR, který spouští syntézu luciferázy. Ta je luminiscenčně měřena v linii HepG2. Graf nalevo je vyjádřen jako logaritmičká koncentrace testovaného ligandu v  $\mu\text{M}$  vůči relativní luminiscenci vzhledem k negativní kontrole (RLU, z angl. relative luminiscence unit). Graf napravo je vyjádřen jako aktivita testovaného ligandu vůči RLU.

Naměřené výsledky jsou shrnuty v **Tab. 11**. Látky **54**, **56**, **58** a **59** vykazují tak nízkou afinitu vůči FXR, že u nich nelze experimentálně stanovit  $\text{EC}_{50}$ , jejich aktivita  $E_{\text{max}}$  je pak v řádu procent vůči OCA (**7**). Látky **55**, **57**, **62** a **63** vykazují mírnou afinitu vůči FXR, která je ovšem na hranici fyziologických koncentrací, dále látky **62** a **63** nevykazují statisticky významnou aktivaci, nejedná se tedy o agonisty FXR. Trochu lepší agonistické vlastnosti vykazovala **61** ( $\text{EC}_{50} = 12,2 \mu\text{M}$ ;  $E_{\text{max}} = 2,3 \%$ ). Tato data bohužel nesouhlasí s dokováním, při kterém všechny ligandy (s výjimkou ligandu **61**) vykazovaly téměř stejnou vazebnou pozici a i téměř stejné vazebné energie  $\text{dG}$ . Nejlépe ze všech otestovaných látek dopadla látka **60**, která vykazuje srovnatelné agonistické vlastnosti jako OCA (**7**).

## Výsledky a diskuze

Tabulka 11. Afinita a aktivita testovaných látek.



Označení	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Afinita EC <sub>50</sub> (μM)	Aktivita E <sub>max</sub> (%) <sup>a</sup>	Volná vazebná energie <sup>b</sup> (kcal · mol <sup>-1</sup> )
OCA (7)	α-OH		α-OH	0,86 ± 1,3	100,0 ± 0,05	-10,64
54	α-OH		=O	Neurčeno	3,3 ± 0,06	-10,39
55	α-OH		=O	>30	1,8 ± 0,07	-10,59
56	=O		=O	Neurčeno	0,9 ± 0,05	-10,47
57	=O		=O	>30	1,9 ± 0,06	-10,51
58	β-OH		=O	Neurčeno	2,1 ± 0,12	-10,18
59	β-OH		=O	Neurčeno	2,4 ± 0,10	-10,52
60	β-OH		α-OH	0,96 ± 1,6	111,5 ± 0,18	-10,53
61	α-OAc		=O	12,2 ± 1,5	2,3 ± 0,16	-9,77
62	α-OH		β-OH	>30	0,1 ± 0,07	-10,32
63	α-OH	(E)	β-OH	>30	0,1 ± 0,10	-10,17

<sup>a</sup>vztaženo na relativní kontrolu, kde OCA je 100 %. <sup>b</sup>Vypočtená hodnota prostřednictvím programu MOE, jedná se o dG vazebnou energii ligand vazebné domény s příslušným ligandem.

## 5 ZÁVĚR

V první části bylo potřeba optimalizovat pouze regioselektivní oxidaci C7 $\alpha$ -OH. K tomu byla vybrána Jonesova oxidace. Navržený intermediát **70** se podařilo syntetizovat metodou dle D'Amore et al. Metoda dle Yu et al. žádaný intermediát **70** neposkytla. Bylo připraveno celkem deset gramů intermediátu **70** s celkovým výtěžkem 46 %.

V druhé části se podařilo připravit navržené látky **54** - **63**. Všechny látky byly izolovány jako opticky čisté izomery s výjimkou látek **54**, **56** a **58**, které byly získány jako směsi E/Z izomerů a nepodařilo se je vykrytalizovat. Látky **55**, **57**, **59** - **63** byly získány v krystalické formě. U všech testovaných látek byla prokázána struktura a ověřena jejich čistota použitím běžných analytických a separačních metod.

Výsledky biologických testů potvrzují dosavadní známé požadavky receptoru na ligand. Pouze látka **60** má hydroxyl v pozici C7 $\alpha$ -OH. Pro aktivaci receptoru tedy nadále zůstává stěžejní C7 $\alpha$ -OH, kde jde zatím o jedinou receptorem tolerovanou substituci. Steroid **60** je značně podobný s OCA (**7**), jediný rozdíl je v orientaci hydroxyly na C3. Hydroxyl v poloze C3 tedy nehraje pravděpodobně téměř žádnou roli při aktivaci FXR, neboť i 3-deoxy OCA (**51**) aktivuje receptor v mikromolárních koncentracích.

## 6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Použité přístroje a metody

Reakce neobsahující vodné prostředí byly prováděny v předem vyžehané aparatuře pod argonovou atmosférou. Chemikálie náchylné na vlhkost byly přenášeny jednorázovými stříkačkami nebo pomocí kanyly. Vzorky pro analýzu byly sušeny několik hodin nad oxidem fosforečným při 50 °C a tlaku 0,10 Pa. Rozpouštědla byla odpařována na vakuové odparce při tlaku 0,25 kPa a teplotě 50 °C.

Preparativní sloupcové chromatografie byly prováděny v normálním módu na silikagelu (Fluka, 60 µm). Pro obtížnější separace byl využit preparativní HPLC systém (Gilson, USA). Kolona: Supelcosil LC-Si, 250 × 21,2 mm, 5 µm. Mobilní fáze: gradient, (EtOAc/hexan, 0/100 do 70/30 během 30 min), průtok mobilní fáze 15 ml/min. Vzorek: 5 - 50 mg steroidu rozpuštěno v benzenu, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nebo THF. Detekce: ELSD (Gilson, USA).

Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly použity desky potažené vrstvou polárního silikagelu (Merck, 60 µm). Detekce látek probíhala nejprve osvětlením TLC destičky UV zářením vlnové délky 254 nm a poté obarvením chemickým reagentem. Pro chemickou vizualizaci byl použit roztok kyseliny sírové v methanolu či kyselý roztok dihydrátu síranu ceřičito-amonného s tetrahydrátem heptamolybdenanu amonného. První roztok byl připraven smísením kyseliny sírové (98 %; 20 ml) a methanolu (250 ml). Druhý pak rozpuštěním (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0,2 g; 0,32 mmol), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O (4,8 g; 3,88 mmol) a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %; 20 ml) ve 250 ml vody. Destičky byly poté zahřáty na 300 - 400 °C do objevení barevných skvrn. Mobilní fáze byly vždy připraveny smísením daných rozpouštědel v uvedeném objemovém poměru a jsou vyjádřeny jako (v/v).

Teploty tání byly měřeny na bodotávku Hund Wetzlar H 600 (Helmut Hund, Německo) a nejsou korigovány. Optická rotace byla měřena polarimetrem Autopol IV (Rudolf Research Analytical, Flanders, USA) při

589,3 nm a teplotě 22 °C. Hodnoty  $[\alpha]_D$  jsou uvedeny v  $[10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}]$ , koncentrace  $c$  jako  $[\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$ . Infračervená spektra byla měřena na spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA), vzorek byl rozpuštěn buď v chloroformu, nebo rozetřen spolu s KBr. NMR spektra byla měřena při 24 °C na spektrometrech Bruker AVANCE III™ 400, 500 nebo 600 MHz. K přiřazení signálů byly využity 2D NMR techniky COSY, HSQC, HMBC a ROESY. Číslování NMR signálů je dle doporučené IUPAC nomenklatury steroidů.<sup>67</sup> NMR spektra jsou korigována na tetramethylsilan jako vnitřní standard a jsou vypsána v stupnici ppm, interakční konstanty  $J$  jsou udány v Hz. Multiplicity signálů jsou označeny následovně: s - singlet, d - dublet, t - triplet, q - kvartet, dt - dublet tripletu, qd - kvartet dubletu, m - multiplet. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific) s ESI nebo GCT Premiere (Waters) s EI ionizací (70 eV), a to v pozitivním nebo negativním módu.

Finální látky byly analyzovány na HPLC-MS, kde nebyla v rozsahu  $m/z$  200 - 2000 detekována žádná jiná molekula než žádaná. Kolona: Phenomenex C4 RP, 250 × 2 mm, 5 μm. Mobilní fáze: gradient, (MeCN/H<sub>2</sub>O, 50/50 do 100/0 během 30 min), průtok mobilní fáze 150 μl/min. Vzorek: 20 μl roztoku steroidu (1 mg · ml<sup>-1</sup> v mobilní fázi). Detekce: (ESI-) LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific).

Veškerá rozpouštědla a chemikálie byly čištěny běžným způsobem: THF a Et<sub>2</sub>O byly čerstvě destilovány nad sodíkem s přísadkou Ph<sub>2</sub>CO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> byl destilován čerstvý z P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, t-BuOH byl destilován nad sodíkem a uchován nad 4Å molekulárními sítí.

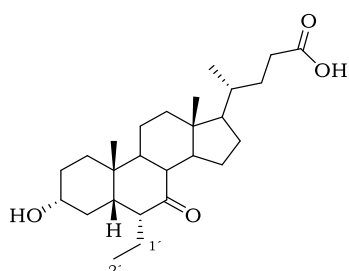
Azodikarboxylát draselný byl připraven čerstvý z příslušného amidu dle Thieleho předpisu.<sup>68</sup> Diazomethan byl připraven z N-nitroso-N-methylmočoviny, jak je popsáno.<sup>69</sup> Jonesovo činidlo bylo připraveno dle literatury.<sup>70</sup> N-bromsukcinimid byl překrytalizován z vroucí vody dle předpisu.<sup>71</sup> Veškerá ostatní rozpouštědla a chemikálie byly zakoupeny od komerčních dodavatelů a použity bez dalšího čištění.



## Experimentální část

6,5 Hz; 3H - C21); 0,69 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 207,6 (C7); 178,1 (C24); 145,4 (C6); 130,4 (C1'); 71,0 (C3); 56,0; 52,0; 50,2; 46,9 (C5); 44,7; 40,7; 40,3; 38,4; 36,6; 35,8; 35,4; 32,3; 32,0; 30,5; 29,4; 27,0; 23,2 (C19); 22,4; 18,9 (C21); 12,7 (C2'); 12,4 (C18). **IR** (CHCl<sub>3</sub>): 3419 (O-H), 1707 (C=O, COOH), 1690 (C=O), 1624 (C=C), 1290 (C-O, COOH), 1064 (C-OH). **MS** (ESI-): vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>4</sub> (M-H<sup>+</sup>): 415,2854; nalezeno: 415,2849. **EA:** vypočteno pro (C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub> + 1/2 H<sub>2</sub>O): 73,37 % C; 9,71 % H; nalezeno: 73,34 % C; 9,64 % H.

### Kyselina 6α-ethyl-3α-hydroxy-7-oxo-5β-cholanová (**55**)

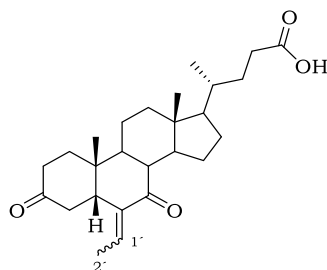


Steroid **70** (500 mg; 1,16 mmol) byl rozpuštěn v EtOH (96 %; 20 ml) a bylo přidáno Pd/C (10 %; 1 hm. %; 50 mg). Směs byla hydrogenována při 1 atm. za prudkého míchání přes noc. Katalyzátor byl odfiltrován přes křemelinu a rozpouštědlo bylo odpařeno. Hydrolyzou odparku dle *obecného postupu*, byl získán bezbarvý olej (480 mg). Chromatografií na silikagelu (25 g) v soustavě EtOAc/hexan/AcOH (30/70/1) byla, po odpaření s toluenem a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **55** (400 mg; celkem po dvou reakčních krocích 82 %) jako bílý prášek. Látka byla krystalizována ze směsi Me<sub>2</sub>CO (3 ml) a MeOH (kapka) takto: roztok byl uzavřen v baňce s nasycenou vodní parou po dobu dvou týdnů. Získané krystaly (100 mg) byly promyty pentanem a použity na analýzu. Matečné louhy byly odpařeny dosucha a odparek byl použit bez dalšího čištění.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0,40 (EtOAc/hexan/AcOH, 50/50/1). **T.t.:** 182 - 184 °C. **[α]<sub>D</sub>:** -54,5; c 0,08; CHCl<sub>3</sub>. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3,55 - 3,37 (m; 1H - C3); 2,85 (dt; J = 7,7; 5,5 Hz; 1H - C6); 2,52 (t; J = 11,2 Hz; 1H - C8); 1,28 (s; 3H - C19); 0,98 (d; J = 6,5 Hz; 3H - C21); 0,84 (t; J = 7,4 Hz; 3H - C2'); 0,73 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz; CD<sub>3</sub>OD) δ 215,4 (C7); 178,0 (C24); 71,6 (C3); 56,3; 53,2; 52,1; 51,1; 50,4; 45,3; 43,8; 40,3; 36,8; 36,5; 35,2; 32,5; 32,3; 31,9; 30,5; 29,2; 25,6; 23,9 (C19); 22,9; 20,0; 18,8 (C21); 12,5 (C18); 12,2 (C2'). **IR** (KBr): 3439 (O-H), 1729 (C=O, COOMe),

1687 (C=O), 1294 (C-O, COOMe), 1061 (C-OH). **MS** (ESI+): vypočteno pro  $C_{26}H_{42}O_4Na$  ( $M+Na^+$ ): 441,2975, nalezeno: 441,2976. **EA**: vypočteno pro  $C_{26}H_{42}O_4$ : 74,60 % C; 10,11 % H; nalezeno: 74,37 % C; 10,09 % H.

*Kyselina (E/Z)-6-ethyliden-3,7-dioxo-5 $\beta$ -cholanová (56)*

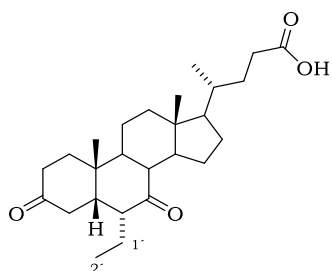


Steroid **54** (100 mg; 0,24 mmol) byl rozpuštěn v  $Me_2CO$  (10 ml) a směs byla vychlazena na 0 °C. Poté byl po kapkách přidáván roztok Jonesova činidla, dokud nebyl výchozí hydroxyl zcela naoxidován. Reakce byla sledována pomocí TLC.

Reakce byla ukončena přidáním isopropanolu (5 ml) a směs byla extrahována EtOAc (3 × 20 ml). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (30 ml), nasyceným roztokem NaCl (2 × 30 ml), sušeny bezvodým  $Na_2SO_4$ . Po odpaření rozpouštědel byl získán bezbarvý olej (85 mg). Chromatografií na silikagelu (5 g) v soustavě EtOAc/hexan (1/1) byla, po odpaření a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **56** (65 mg; 65 %) jako bílý prášek.

**Poměr E/Z:** 18/1. **TLC:**  $R_f = 0,53$  (EtOAc/hexan/AcOH, 70/30/1), absorbuje  $UV_{254}$ .  **$^1H$  NMR:** (400 MHz;  $CDCl_3$ )  $\delta$  6,26 (q;  $J = 7,1$  Hz; 1H - C1 $\prime$ ); 2,96 (dd;  $J = 12,9; 5,4$  Hz; 1H - C5); 1,68 (d;  $J = 7,2$  Hz; 3H - C2 $\prime$ ); 1,11 (s; 3H - C19), 0,95 (d;  $J = 6,4$  Hz; 3H - C21); 0,69 (s; 3H - C18).  **$^{13}C$  NMR:** (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  210,1 (C3); 203,9 (C7); 179,4 (C24); 141,6 (C6); 131,7 (C1 $\prime$ ); 54,7; 50,8; 48,7; 47,2; 43,8; 43,2; 39,4; 39,1; 36,9; 35,9; 35,3; 35,0; 31,0; 30,9; 28,5; 26,1; 22,3 (C19); 22,1; 18,6 (C21); 12,9 (C2 $\prime$ ); 12,3 (C18). **IR** ( $CHCl_3$ ): 1733 (C=O, COOH), 1710 (C3=O), 1688 (C7=O), 1632 (C=C), 1299 (C-O, COOH). **MS** (ESI+): vypočteno pro  $C_{26}H_{38}O_4Na$  ( $M+Na^+$ ): 437,2662; nalezeno: 437,2663. **EA**: vypočteno pro ( $C_{26}H_{38}O_4 + 1/6 H_2O$ ): 74,68 % C; 9,26 % H; nalezeno: 74,54 % C; 9,12 % H.

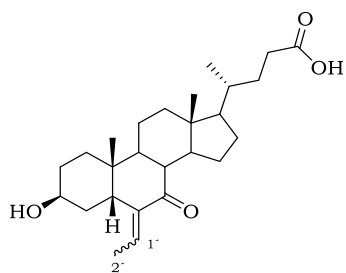
*Kyselina 6 $\alpha$ -ethyl-3,7-dioxo-5 $\beta$ -cholanová (57)*



Steroid **55** (100 mg; 0,24 mmol) byl rozpuštěn v Me<sub>2</sub>CO (10 ml) a vychlazen na ledové lázni na 0 °C. Poté byl postupně, velmi pomalu po kapkách, přidáván roztok Jonesova činidla, dokud nebyl výchozí alkohol zcela naoxidován. Reakce byla sledována pomocí TLC. Reakce byla ukončena přidáním isopropanolu (5 ml) a směs byla extrahována EtOAc (3 × 20 ml). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (30 ml), nasyceným roztokem NaCl (2 × 30 ml), sušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Odpařením rozpouštědel byl získán bezbarvý olej (95 mg). Chromatografií na silikagelu (5 g) v soustavě EtOAc/hexan (1/1) byla, po odpaření rozpouštědel a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **57** (80 mg; 80 %) jako bílý prášek. Látka byla rozpuštěna v CHCl<sub>3</sub> (2 ml) a ochlazená na -70 °C. Vzniklé krystalky (40 mg) byly promyty pentanem a použity na analýzu.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0,53 (EtOAc/hexan/AcOH, 50/50/1). **T.t.:** 145 - 147 °C. **[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** -54,2; c 0,14; CHCl<sub>3</sub>. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2,73 (dt;  $J$  = 7,3; 5,3 Hz; 1H - C6); 1,32 (s; 3H - C19); 0,93 (d;  $J$  = 6,4 Hz; 3H - C21); 0,79 (t;  $J$  = 7,4 Hz; 30H - C2'); 0,69 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  212,3 (C7); 210,9 (C3); 180,0 (C24); 55,0; 52,5; 52,4; 50,1; 45,0; 43,9; 42,8; 39,0; 38,4; 36,8; 36,1; 35,6; 35,3; 31,1; 30,9; 28,4; 24,7; 23,1 (C19); 22,4; 18,7 (C1'); 18,5 (C21); 12,2 (C2'); 12,0 (C18). **IR** (CHCl<sub>3</sub>): 1738 (C=O, COOH), 1709 (C3=O), 1692 (C7=O), 1295 (C-O, COOH). **MS** (ESI): vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>4</sub> (M-H<sup>+</sup>): 415,2854, nalezeno: 415,2855. **EA:** vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>: 74,96 % C; 10,11 % H; nalezeno: 74,90 % C; 9,88 % H.

*Kyselina (E/Z)-6-ethyliden-3β-hydroxy-7-oxo-5β-cholanová (58)*



110 mg steroidu **70** (0,26 mmol) bylo rozpuštěno v destilovaném THF (5 ml) a byl přidán PPh<sub>3</sub> (1,7 ekv.; 120 mg; 0,43 mmol). Po úplném rozpuštění byla po kapkách přidána HCOOH (98%; 2 ekv.; 20 μl; 0,51 mmol), následně byl přidán roztok DEAD (2 ekv.; 80 μl; 0,51 mmol) zředěný v 1 ml suchého THF. Reakce byla zpracována za 48 hodin na základě TLC. Reakční směs byla zahuštěna za sníženého tlaku a byl přidán CHCl<sub>3</sub> (10 ml) a silikagel (5 g), poté byla směs odpařena dosucha a směs byla z baňky nasypána na kolonu a chromatografována při použití EtOAc/hexan (5/95). Po odpaření s toluenem a vysušením za sníženého tlaku byl získán *methylester kyseliny (E/Z)-6-ethyliden-3β-formyloxy-7-oxo-5β-cholanové* (75 mg) jako nažloutlá olejovitá látka.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0,86 (EtOAc/hexan, 1/1), absorbuje UV<sub>254</sub>. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 8,06 (s; 1H - OCOH); 6,17 (q; J = 7,0 Hz; 1H - C1'); 5,18 - 5,11 (m; 1H - C3); 3,63 (s; 3H - C25); 2,84 (t; J = 8,8 Hz; 1H - C8); 1,65 (d; J = 7,1 Hz; 3H - C2'); 1,02 (s; 3H - C19); 0,89 (d; J = 6,3 Hz; 3H - C21); 0,62 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 204,8 (C7); 174,7 (C24); 160,5 (OCO<sub>2</sub>H); 143,1 (C6); 130,6 (C1'); 69,3 (C3); 54,6; 51,5 (C25); 50,8; 48,7; 43,7; 41,1; 39,1; 38,7; 35,3; 34,8; 32,3; 31,1; 31,1; 29,8; 28,5; 26,0; 24,6; 23,4 (C19); 21,8; 18,5 (C21); 12,7 (C2'); 12,1 (C18).

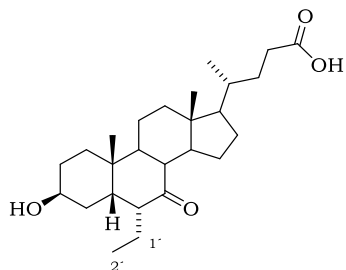
Hydrolyzou *methylesteru kyseliny (E/Z)-6-ethyliden-3β-formyloxy-7-oxo-5β-cholanové* (75 mg, 0,17 mmol) dle *obecného postupu* byl, po odpaření rozpouštědel, získán bezbarvý olej (50 mg). Chromatografií na silikagelu (5 g) v soustavě EtOAc/hexan/AcOH (30/70/1) byla, po odpaření s toluenem a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **58** (40 mg; celkem po třech reakčních krocích 57 %) jako bílý prášek.

**Poměr E/Z:** 5/1. **TLC:** R<sub>f</sub> = 0,32 (EtOAc/hexan/AcOH, 50/50/1). **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD) δ 6,06 (q; J = 7,1 Hz; 1H - C1'); 3,95 - 3,92 (m; 1H - C3); 3,01 (dd; J = 12,8; 4,8 Hz; 1H - C5); 1,72 (d; J = 7,1 Hz; 3H - C2');

## Experimentální část

1,06 (s; 3H - C19); 0,97 (d;  $J = 6,5$  Hz; 3H - C21); 0,69 (s; 3H - C18).  **$^{13}\text{C}$  NMR:** (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  208,28 (C7); 178,2 (C24); 145,9 (C6); 130,2 (C1'); 66,4 (C3); 56,0; 51,9; 50,2; 44,7; 42,0; 40,3; 40,1; 36,6; 36,2; 36,0; 32,4; 32,0; 30,1; 29,4; 27,9; 27,0; 23,8 (C19); 22,9; 18,9 (C21); 12,7 (C2'); 12,5 (C18). **IR** (KBr): 3432 (O-H), 1740 (C=O, COOH), 1689 (C=O), 1633 (C=C), 1418 (C-O, COOH), 1064 (C-OH). **MS** (ESI+): vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ): 439,2819; nalezeno: 439,2819. **EA:** vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_4$ : 74,96 % C; 9,68 % H; nalezeno: 75,17 % C; 9,76 % H.

### Kyselina 6 $\alpha$ -ethyl-3 $\beta$ -hydroxy-7-oxo-5 $\beta$ -cholanová (**59**)



Steroid **70** (1,0 g; 2,32 mmol) byl rozpuštěn v EtOH (96 %; 40 ml) a bylo přidáno Pd/C (10 %; 10 hm. %; 100 mg). Směs byla hydrogenována při 1 atm. za prudkého míchání přes noc. Reakční směs byla zfiltrována přes křemelinu a po odpaření rozpouštědel byl získán bílý prášek (1,0 g). Vzorek byl použit bez dalšího čištění.

**TLC:**  $R_f = 0,51$  (EtOAc/hexan, 1/1).  **$^1\text{H}$  NMR:** (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,66 (s; 3H - OMe); 3,55 - 3,50 (m; 1H - C3); 2,68 (td;  $J = 7,5; 6,5$  Hz; 1H - C6); 1,21 (s; 3H - C19); 0,91 (d;  $J = 6,4$  Hz; 3H - C21); 0,80 (t;  $J = 7,4$  Hz; 3H - C2'); 0,64 (s; 3H - C21); 0,62 (s; 3H - C18).

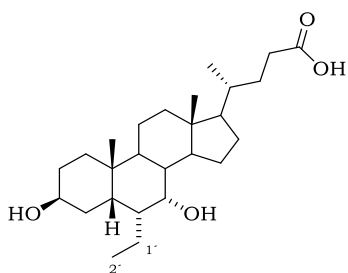
Odparek (700 mg; 1,62 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (25 ml) a byl přidán  $\text{PPh}_3$  (1,7 ekv.; 730 mg; 2,75 mmol). Po úplném rozpuštění byla po kapkách přidána HCOOH (98%; 2 ekv.; 120  $\mu\text{l}$ ; 3,24 mmol), následně byl přidán roztok DEAD (2 ekv.; 500  $\mu\text{l}$ ; 3,24 mmol) zředěný v 10 ml suchého THF. Reakce byla zpracována za 48 hodin na základě TLC. Reakční směs byla zahuštěna za sníženého tlaku a byl přidán  $\text{CHCl}_3$  (10 ml) a silikagel (5 g), poté byla směs odpařena dosucha a přesypána z baňky na kolonu. Chromatografií v soustavě EtOAc/hexan (5/95) byl, po odpaření rozpouštědel a vysušením za sníženého tlaku, získán *methylester kyseliny 6 $\alpha$ -ethyl-3 $\beta$ -formyloxy-7-oxo-5 $\beta$ -cholanové* (600 mg) jako žlutý olej.

**TLC:**  $R_f = 0,83$  (EtOAc/hexan, 1/1).  **$^1\text{H NMR}$ :** (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,05 (s; 1H -  $\text{OCO}\underline{\text{H}}$ ); 5,11 - 5,10 (m; 1H - C3); 3,66 (s; 3H - C25); 2,56 (dd;  $J = 11,9; 10,7$  Hz; 1H - C8); 1,25 (s; 3H - C19); 0,92 (d;  $J = 6,4$  Hz; 3H - C21); 0,83 (t;  $J = 7,0$  Hz; 3H - C2') 0,67 (s; 3H - C18).  **$^{13}\text{C NMR}$ :** (101 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  215,8 (C7); 174,8 (C24); 160,7 ( $\text{OCO}\underline{\text{H}}$ ); 70,0 (C3); 61,1; 55,0; 51,7 (C25); 48,9; 45,8; 45,5; 43,1; 42,7; 38,9; 35,9; 35,4; 33,7; 31,2; 31,1; 31,0; 28,3; 26,6; 26,4 (C19); 25,1; 24,5; 21,9; 18,5 (C21); 13,1 (C2'); 12,3 (C18).

Hydrolyzou *methylesteru kyseliny 6 $\alpha$ -ethyl-3 $\beta$ -formyloxy-7-oxo-5 $\beta$ -cholanové* (350 mg; 0,76 mmol) dle *obecného postupu* byl získán bezbarvý olej (330 mg). Chromatografií na silikagelu (12 g) v soustavě EtOAc/hexan/AcOH (30/70/1) byla, po odpaření s toluenem a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **59** (250 mg; celkem po třech reakčních krocích 63 %) jako bílý prášek. Látka byla volně krystalizována z EtOAc. Vzniklé krystalky (50 mg) byly promyty pentanem a použity pro analýzu.

**TLC:**  $R_f = 0,30$  (EtOAc/hexan/AcOH, 50/50/1). **T.t:** 140 - 142 °C.  **$[\alpha]_D$ :** -44,7;  $c$  0,22;  $\text{CHCl}_3$ .  **$^1\text{H NMR}$ :** (400 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3,98 - 3,93 (m; 1H - C3); 2,86 (dt;  $J = 7,9; 5,5$  Hz; 1H - C6); 2,51 (t;  $J = 11,2$ ; Hz; 1H - C8); 1,28 (s; 3H - C19); 0,96 (d;  $J = 6,5$  Hz; 3H - C21); 0,81 (t;  $J = 7,4$  Hz 3H - C2'); 0,71 (s; 3H - C18).  **$^{13}\text{C NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  216,3 (C7); 178,1 (C24); 66,6 (C3); 56,3; 53,1; 51,3 (C8); 50,4; 47,4; 44,9; 43,8; 40,4; 37,3; 36,6; 32,3; 32,0; 30,3; 29,8; 29,3; 27,9; 25,6; 24,5 (C19); 23,2; 19,9; 18,8 (C21); 12,5 (C2'); 12,3 (C18). **IR** ( $\text{CHCl}_3$ ): 3431 (O-H), 1741 (C=O, COOH), 1692 (C=O), 1291 (C-O, COOH), 1051 (C-OH). **MS** (ESI+): vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ): 441,2975; nalezeno: 441,2976. **EA:** vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_4$ : 74,60 % C; 10,11 % H; nalezeno: 74,57 % C; 10,07 % H.

*Kyselina 6 $\alpha$ -ethyl-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanová (60)*

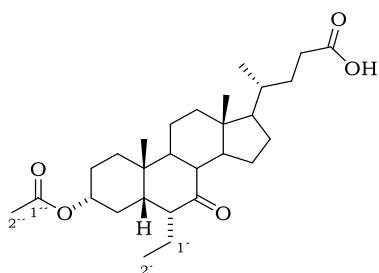


Steroid **59** (200 mg; 0,48 mmol) byl rozpuštěn ve směsi THF/H<sub>2</sub>O (4/1; 15 ml) a směs byla vychlazena na 0 °C. Poté byl postupně přidán NaBH<sub>4</sub> (5 ekv.; 90 mg; 2,40 mmol). Po jedné hodině byla přidána směs MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1; 20 ml).

Reakční směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce na poloviční objem a okyselena 5% HCl na pH 2. Tento roztok byl extrahován EtOAc (3 × 20 ml), spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (2 × 20 ml) a sušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Směs byla odpařena dosucha, čímž byl získán nažloutlý olej (280 mg). Chromatografií na silikagelu (5 g) v soustavě EtOAc/hexan/AcOH (30/70/1) byla, po odpaření s toluenem a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **60** (190 mg; 94 %) jako bílý prášek. Látka byla krystalizována ze směsi Me<sub>2</sub>CO (2 ml) a MeOH (kapka) takto: směs byla uzavřena v baňce s nasycenou vodní parou po dobu jednoho týdne. Vzniklá sraženina byla opláchnuta ledovým Me<sub>2</sub>CO a zfiltrována. Sraženina byla dále promyta ledovým Me<sub>2</sub>CO (3 × 100 μl), pentanem (3 × 2 ml) a přesypána do baňky, kde byla rozpuštěna v suchém t-BuOH (10 ml) a lyofilizována na vysokém vakuu při -190 °C přes noc. Byla získána látka **60** (50 mg) jako jemný, bílý prášek.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0,38 (EtOAc/hexan/AcOH, 70/30/1). **T.t.:** 121 - 123 °C. **[α]<sub>D</sub>:** +4,4; c 0,27; MeOH. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 4,12 - 4,01 (m; 1H - C7); 0,96 - 0,86 (m; 8H - C2' + C19 + C21); 0,66 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179,6 (C24); 71,3 (C3); 66,9 (C7); 55,9; 50,7; 43,0; 40,9; 40,1; 39,8; 39,8; 36,2; 35,5; 32,7; 31,1; 31,0; 30,8; 30,3; 28,3; 27,6; 23,9; 23,8 (C19); 22,2; 21,2; 18,4 (C21); 12,0 (C18); 11,8 (C2'). **IR** (KBr): 3439 (O-H), 1711 (C=O, COOH), 1229 (C-O, COOH), 1063 (C7-OH), 1036 (C3-OH). **MS** (ESI<sup>-</sup>): vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>O<sub>4</sub> (M-H<sup>+</sup>): 419,3167; nalezeno: 419,3162. **EA:** vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>: 74,24 % C; 10,51 % H; nalezeno: 74,11 % C; 10,25 % H.

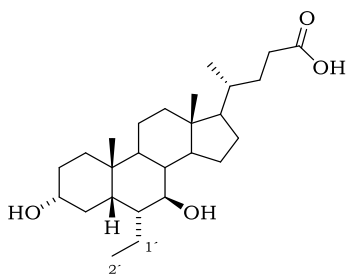
*Kyselina 3β-acetoxi-6α-ethyl-7-oxo-5β-cholanová (61)*



Steroid **55** (500 mg; 1,19 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (3 ml) a směs byla vychlazena na 0 °C. Za stálého míchání byl pomalu přikapán Ac<sub>2</sub>O (5,3 ekv.; 600 μl; 6,33 mmol) a reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě do druhého dne. Reakce byla zpracována nalitím do kádinky s ledem a kyselinou citronovou, ze které byl produkt extrahován pomocí EtOAc (3 × 30 ml). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (30 ml), nasyceným roztokem NaCl (2 × 30 ml) a sušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědel byl získán bezbarvý olej (450 mg). Chromatografií na silikagelu (18 g) v soustavě EtOAc/hexan/AcOH (15/85/1) byla, po odpaření s toluenem a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **61** (350 mg; 64 %) jako bílý prášek. Vzorek byl rozpuštěn v takovém množství EtOAc, aby se vytvořila jemná suspenze (3 ml). Ta byla rozpuštěna přidáním MeOH (kapka). Roztok byl přefiltrován přes smotek vatičky a nechán krystalizovat. Vzniklé krystalky (20 mg) byly promyty pentanem a použity pro analýzu.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0,59 (EtOAc/hexan/AcOH, 50/50/1). **T.t.:** 135 - 138 °C. **[α]<sub>D</sub>:** -12,8; c 0,27; MeOH. **<sup>1</sup>H NMR:** δ 4,68 - 4,56 (m; 1H - C3); 2,85 (q; J = 5,6 Hz; 1H - C6); 2,52 (t; J = 11,2 Hz; 1H - C8); 1,98 (s; 3H - C2'); 1,28 (s; 3H - C19); 0,97 (d; J = 6,5 Hz; 3H - C21); 0,81 (t; J = 7,4 Hz; 3H - C2'); 0,71 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 215,2 (C7); 178,1 (C24); 172,4 (C1'); 74,9 (C3); 56,3 (C17); 53,2 (C6); 51,9 (C5); 51,2 (C8); 50,4 (C14); 45,3 (C9); 43,8 (C13); 40,3 (C12); 36,8 (C10); 36,6 (C20); 34,8 (C1); 32,3 (C22); 32,0 (C23); 29,3 (C11); 28,9 (C4); 27,0 (C2); 25,6 (C16); 23,8 (C19); 23,0 (C15); 21,2 (C2'); 20,0 (C1'); 18,8 (C21); 12,5 (C18); 12,3 (C2'). **IR** (KBr): 1735 (C=O, AcO), 1712 (C=O), 1708 (C=O, COOH), 1241 (C-O, AcO). **MS** (ESI<sup>-</sup>): vypočteno pro C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>O<sub>5</sub> (M-H<sup>+</sup>): 459,3118; nalezeno: 459,3116. **EA:** vypočteno pro C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>: 73,01 % C; 9,63 % H nalezeno: 72,71 % C; 9,49 %.

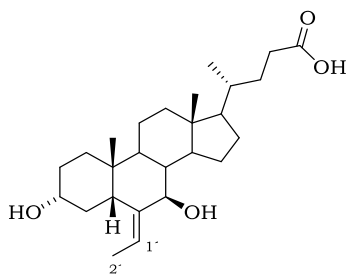
*Kyselina 6 $\alpha$ -ethyl-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanová (62)*



Steroid **78** (100 mg; 0,23 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml ledové AcOH a byl přidán PtO<sub>2</sub> (10 hm. %; 10 mg). Směs byla hydrogenována při 1 atm. za prudkého míchání přes noc. Reakční směs byla zfiltrována přes křemelinu. Odpařením rozpouštědla byl získán bezbarvý olej (80 mg). Hydrolyzou směsi dle *obecného postupu* byla získána bezbarvá olejovitá látka (50 mg). Chromatografií na silikagelu (3 g) v soustavě EtOAc/hexan/AcOH (20/80/1) byla, po odpaření s toluenem a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **62** (35 mg; celkem po dvou reakčních krocích 36 %) jako bílý prášek. Látka byla rozpuštěna v takovém množství EtOAc, aby se vytvořila jemná suspenze (1 ml). Ta byla poté rozpuštěna přidáním MeOH (kapka). Roztok byl přefiltrován přes smotek vatičky a ochlazen na -70 °C. Vzniklé krystalky (20 mg) byly opláchnuty ledovým EtOAc, promyty pentanem a použity pro analýzu.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0,40 (EtOAc/hexan/AcOH, 50/50/1). **T.t.:** 208 - 212 °C. **[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** +11,4; c 0,18; MeOH. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  3,51 - 3,39 (m; 1H - C3); 3,08 (t; *J* = 10,6; Hz; 1H - C7); 0,99 - 0,93 (m; 6H - C19 + C21); 0,86 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H - C2'); 0,72 (s; 3H - C18), **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz; CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  178,2 (C24); 76,2 (C7); 72,4 (C3); 57,8; 56,6; 45,1; 45,0; 44,6; 44,6; 41,7; 41,1; 36,7; 36,5; 35,6; 32,4; 32,1; 31,1; 30,8; 29,6; 27,9; 24,0 (C19); 22,6; 22,0 (C1'); 18,9 (C21); 12,7 (C18); 11,5 (C2'). **IR** (KBr): 3420 (O-H), 1705 (C=O, COOH), 1071 (C7-OH), 1028 (C3-OH). **MS** (ESI-): vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>O<sub>4</sub> (M-H<sup>+</sup>): 419,3167; nalezeno: 419,3161. **EA:** vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>: 74,24 % C; 10,54 % H; nalezeno: 73,98 % C; 10,33 % H.

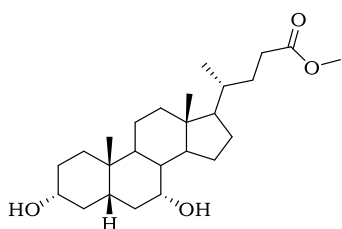
*Kyselina (E)-6-ethyliden-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanová (63)*



Hydrolýzou esteru **78** (100 mg; 0,23 mmol) dle *obecného postupu* byl získán bezbarvý olej (95 mg). Chromatografií na silikagelu (5 g) v soustavě EtOAc/hexan/AcOH (20/80/1) byla, po odpaření s toluenem a vysušením za sníženého tlaku, získána látka **63** (65 mg; 67 %) jako bílý prášek. Látka byla dále rozpuštěna v minimu EtOAc (2 ml) s MeOH (kapka). Roztok byl ochlazen na -70 °C, čímž se vytvořily malé krystalky. Matečné louhy byly odsáty a krystalky (20 mg) byly promyty pentanem a použity pro analýzu.

**TLC:**  $R_f$  = 0,41 (EtOAc/hexan/AcOH, 50/50/1). **T.t.:** 171 - 174 °C. **[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** +20,6; c 0,27; MeOH. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  5,66 (qd;  $J$  = 6,8; 2,1 Hz; 1H - C1<sup>1</sup>); 3,96 - 3,88 (m; 1H - C7); 3,62 - 3,52 (m; 1H - C3); 2,53 (dd;  $J$  = 13,1; 4,1 Hz; 1H - C5); 1,62 (dd;  $J$  = 6,8; 2,0 Hz; 3H - C2<sup>1</sup>); 0,97 (d;  $J$  = 6,5 Hz; 3H - C21); 0,80 (s; 3H - C19); 0,70 (s; 3H - C18), **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz; CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  178,2 (C24); 143,7 (C6); 115,4 (C1<sup>1</sup>); 74,1 (C7); 71,9 (C3); 57,9; 56,6; 46,1; 45,9; 45,1; 41,5; 41,1; 37,0; 36,7; 36,4; 35,9; 32,4; 32,1; 30,9; 29,6; 28,1; 23,4 (C19); 22,5; 18,9 (C21); 12,7; 12,6. **IR** (KBr): 3412 (O-H), 1710, (C=O, COOH), 1084 (C7-OH), 1051 (C3-OH). **MS** (ESI-): vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>O<sub>4</sub> (M-H<sup>+</sup>): 417,3010; nalezeno: 417,3003. **EA:** vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>: 74,60 % C; 10,11 % H; nalezeno: 74,33 % C; 9,95 % H.

*Methylester kyseliny chenodeoxycholové (64)*

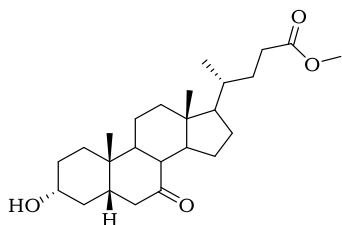


*Kyselina chenodeoxycholová* (10,0 g; 25,47 mmol) byla rozpuštěna v MeOH (150 ml) a byla přidána H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %; 1 ml). Reakční směs byla refluxována po dobu 8 hodin. Pro ukončení reakce byl přidán nasycený roztok NaHCO<sub>3</sub> do pH 7. Reakční směs byla částečně zahuštěna na vakuové odparce a extrahována CHCl<sub>3</sub> (3 × 150 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (1 × 150 ml), nasyceným roztokem NaCl (1 × 150 ml) a

sušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědel bylo získáno 10,5 g žlutého oleje. Chromatografií na silikagelu (300 g) v soustavě Me<sub>2</sub>CO/petroléter (1/9) byl po odpaření rozpouštědel získán žlutý olej **64** (10,3 g; 99 %).

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0,28 (EtOAc/hexan, 1/1). [α]<sub>D</sub>: +11,0; c 0,23; CHCl<sub>3</sub>; (lit.<sup>74</sup> +12,9). **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,87 - 3,82 (m; 1H - C7); 3,66 (s; 3H - C25); 3,51 - 3,39 (m; 1H - C3); 2,39 - 2,29 (m; 1H - C8); 2,27 - 2,16 (m; 2H - C23); 0,92 (d; J = 6,5 Hz; 1H - C21); 0,85 (s; 3H - C19); 0,65 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174,9 (C24); 72,2 (C3); 68,7 (C7); 55,9; 51,6 (C25); 50,6; 42,8; 41,6; 40,0; 39,8; 39,6; 35,5; 35,5; 35,2; 35,7; 33,0; 31,2; 31,1; 30,8; 28,3; 23,9; 22,9; 20,7 (C19); 18,4 (C21); 11,9 (C18). **IR** (CHCl<sub>3</sub>): 3613 (O-H), 1731 (C=O), 1234 (C-O), 1076 (C-OH). **MS** (ESI+): vypočteno pro C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>): 429,2975; nalezeno: 429,2976. **EA:** vypočteno pro C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>: 73,85 % C; 10,41 % H; nalezeno: 73,83 % C; 10,43 % H.

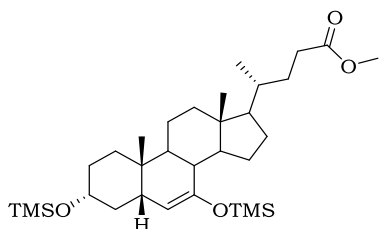
*Methylester kyseliny 7-oxo-litocholové (68)*



Steroid **64** (6,80 g; 16,72 mmol) byl rozpuštěn v Me<sub>2</sub>CO (200 ml) a vychlazen na 0 °C. Dále bylo po kapkách přidáno Jonesovo činidlo (10% vodný roztok, 0,64 ekv.; 40 ml; 10,72 mmol). Reakční směs byla ponechána reagovat dalších 30 minut a následně byla reakce ukončena přidáním isopropanolu (5 ml). Reakční směs byla zahuštěna na poloviční objem a extrahována do CHCl<sub>3</sub> (3 × 100 ml). Spojené organické extrakty byly promyty NaHCO<sub>3</sub> (2 × 100 ml), vodou (1 × 50 ml), nasyceným roztokem NaCl (1 × 50 ml) a sušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědel byl získán žlutý olej (6,95 g). Chromatografií na silikagelu (250 g) v soustavě Me<sub>2</sub>CO/petroléter (17/83) byla získána polotuhá bezbarvá látka **68** (3,75 g), která byla krystalizována z horkého EtOAc (40 ml). Získané krystaly (3,26 g; 48 %) byly použity pro další reakce.

**TLC:**  $R_f = 0,40$  (EtOAc/hexan, 1/1). **T.t.:** 108 - 110 °C (lit.<sup>74</sup> 107 - 109 °C). **[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** -33,8;  $c$  0,20; CHCl<sub>3</sub>; (lit.<sup>74</sup> -38,0). **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3,65 (s; 3H - C25); 3,63 - 3,53 (m; 1H - C3); 2,88 - 2,80 (m; 1H<sub>a</sub> - C6); 2,41 - 2,13 (m; 1H<sub>b</sub> - C6 + 1H<sub>a</sub> - C23 + 1H - C8); 1,18 (s; 3H - C19); 0,91 (d;  $J = 6,5$  Hz; 1H - C21); 0,64 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  212,1 (C7); 174,8 (C24); 71,1 (C3); 54,9; 51,7 (C25); 49,7; 49,0; 46,2; 45,5; 42,9; 42,8; 39,1; 37,6; 35,4; 35,3; 34,3; 31,2; 31,1; 30,0; 28,42; 25,0; 23,2 (C19); 21,8; 18,5 (C21); 12,2 (C18). **IR** (CHCl<sub>3</sub>): 3608 (O-H), 1730 (C=O, COOMe), 1250 (C-O, COOMe), 1059 (C-OH). **MS** (ESI<sup>+</sup>): vypočteno pro C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>): 427,2819; nalezeno: 427,2808. **EA:** vypočteno pro C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>: 74,22 % C; 9,97 % H; nalezeno: 74,20 % C; 9,98 % H.

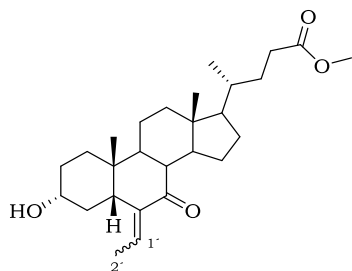
*Methylester kyseliny 3,7-bis[(trimethylsilyl)oxy]-5 $\beta$ -chol-6-enové (69)*



K roztoku diisoprylaminu (6 ekv.; 10,4 ml; 79 mmol) v suchém THF (25 ml) byl po kapkách přidán roztok *n*-butyllithia v hexanu (2,5 M; 6 ekv.; 31,6 ml; 79 mmol), a to při -78 °C. Po třiceti minutách byl po kapkách přidán trimethylsilylchlorid (8 ekv.; 18,0 ml; 97 mmol) a reakční směs byla ponechána reagovat po dalších 10 minut. Poté byl přikapán roztok steroidu **68** (5,01 g; 12 mmol; rozpuštěn v 18 ml suchého THF). Reakční směs byla ponechána dalších 30 minut při teplotě -78 °C. Dále byl přidán triethylamin (15 ekv.; 24,1 ml; 180 mmol). Reakce byla přivedena na teplotu -20 °C a ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> (30 ml). Po ohřátí na laboratorní teplotu byla vodná fáze extrahována EtOAc (3 × 50 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 × 50 ml), vodou (50 ml), nasyceným roztokem NaCl (50 ml) a sušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědel byl získán žlutý olej (6,85 g). Chromatografií na silikagelu (240 g) v soustavě EtOAc/hexan (3/97) byla, po vysušení za sníženého tlaku, získána látka **69** (6,62 g; 97 %) jako nažloutlý polotuhý olej.

**TLC:**  $R_f = 0,81$  (EtOAc/hexan, 1/9).  **$[\alpha]_D$ :** +145,7;  $c$  0,12;  $\text{CHCl}_3$ .  **$^1\text{H NMR}$ :** (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,72 (d;  $J = 5,9$  Hz; 1H - C6); 3,65 (s; 3H - C25); 3,55 - 3,45 (m; 1H - C3); 2,39 - 2,16 (m; 2H - C23); 0,91 (d;  $J = 6,4$  Hz; 3H - C21); 0,81 (s; 3H - C19); 0,67 (s; 3H - C18); 0,15 (s; 9H -OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,10 (s; 9H -OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).  **$^{13}\text{C NMR}$ :** (101 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174,7 (C24); 151,7 (C7); 108,9 (C6); 71,5 (C3); 54,8; 54,1; 51,5 (C25); 44,4; 42,7; 41,0; 40,9; 40,3; 40,1; 35,3; 34,7; 33,0; 31,1; 31,0; 30,7; 28,7; 27,1; 22,6 (C19); 21,0; 18,5 (C21); 12,3 (C18); 0,4 (-OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,3 (-OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **IR** ( $\text{CHCl}_3$ ): 1731 (C=O, COOMe), 1655 (C=C), 1178 (C-O, COOMe), 1079 (C-OSi), 686 (Si-Me). **MS** (ESI+): vypočteno pro  $\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_4\text{Si}_2\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ): 571,3609; nalezeno: 571,3609. **EA:** vypočteno pro  $\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_4\text{Si}_2$ : 67,83 % C; 10,23 % H; nalezeno: 67,79 % C; 10,18 % H.

*Methylester kyseliny (E/Z)-6-ethyliden-3 $\alpha$ -hydroxy-7-oxo-5 $\beta$ -cholanové (70)*



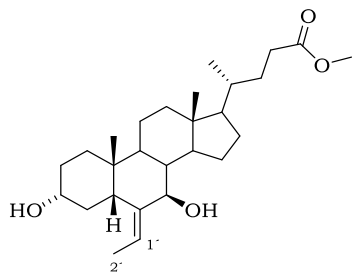
Steroid **69** (6,60 g; 12,02 mmol) byl rozpuštěn v suchém  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml) a směs byla vychlazena na  $-78$  °C. Za stálého míchání byl přikapán roztok acetaldehydu v suchém  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/9; 3 ekv.; 20,3 ml; 36,07 mmol) a směs byla míchána po dobu 10 minut. Poté byl po kapkách přidán roztok  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (4 ekv.; 13,4 ml; 48,09 mmol), reakční směs byla udržována při teplotě  $-78$  °C po 2 hodiny a potom byla ponechána ohřát na laboratorní teplotu. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku  $\text{NaHCO}_3$  (50 ml) a vodná fáze byla extrahována  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  50 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (50 ml), vodou (50 ml), nasyceným roztokem  $\text{NaCl}$  (50 ml) a sušeny bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Po odpaření rozpouštědel byl získán žlutý olej (4,90 g). Chromatografií na silikagelu (245 g) v soustavě EtOAc/hexan (1/4) byla, po vysušení za sníženého tlaku, získána látka **70** (4,3 g; 83 %) jako lehce nažloutlý prášek.

**Poměr E/Z:** 2/1. **TLC:**  $R_f = 0,52$  (EtOAc/hex, 1/1), absorbuje  $\text{UV}_{254}$ .  **$^1\text{H NMR}$ :** (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,18 (q;  $J = 7,1$  Hz; 1H - C1'); 3,69 - 3,62 (m; 1H - C3 + 3H - C25); 2,58 (dd;  $J = 13,0$ ; 4,2 Hz; 1H - C8); 1,69 (d;  $J = 7,1$  Hz;

## Experimentální část

3H - C2<sup>1</sup>); 1,00 (s; 3H - C19); 0,93 (d;  $J = 6,4$  Hz; 3H - C21); 0,64 (s; 3H - C18). **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  207,4 (C7); 176,3 (C24); 145,3 (C6); 130,4 (C1<sup>1</sup>); 70,9 (C3); 55,9; 52,0 (C25); 52,0; 50,1; 46,8; 44,7; 40,7; 40,2; 38,4; 36,5; 35,8; 35,4; 32,2; 31,8; 30,5; 29,4; 27,0; 23,3 (C19); 22,4; 18,9 (C21); 12,7 (C2<sup>1</sup>); 12,5 (C18). **IR** (CHCl<sub>3</sub>): 3608 (O-H), 1731 (C=O, COOMe), 1685 (C=O), 1632 (C=C), 1220 (C-O, COOMe), 1060 (C-OH). **MS** (EI<sup>+</sup>): vypočteno pro C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>+</sup>): 430,3083; nalezeno: 430,3080. **EA:** vypočteno pro C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>: 75,31 % C; 9,83 % H; nalezeno: 75,18 % C; 9,99 % H.

### *Methylester kyseliny (E)-6-ethyliden-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanové (78)*



Steroid **70** (500 mg; 1,16 mmol) byl rozpuštěn v MeOH (30 ml) a směs byla vychlazena na 0 °C. Za stálého míchání byl pomalu přidán NaBH<sub>4</sub> (10 ekv.; 440 mg; 11,6 mmol) a reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě jednu hodinu.

Do reakční směsi byla přidána voda (100 ml) a reakční směs byla extrahována EtOAc (3 × 150 ml). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (100 ml), nasyceným roztokem NaCl (2 × 100 ml), sušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědel byl získán bezbarvý olej (450 mg). Chromatografií na silikagelu (20 g) v soustavě EtOAc/hexan (1/9) byla, po vysušení za sníženého tlaku, získána látka **78** (375 mg; 74 %) jako bílý prášek. Látka byla použita bez dalšího čištění.

**TLC:** R<sub>f</sub> = 0,27 (EtOAc/hexan, 1/1). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: +10,4; c 0,31; MeOH. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  5,66 (qd;  $J = 6,8$ ; 2,2 Hz; 1H - C1<sup>1</sup>); 3,95 - 3,86 (m; 1H - C7); 3,62 - 3,52 (m; 1H - C3); 2,52 (dd;  $J = 13,1$ ; 4,1 Hz; 1H - C5); 1,62 (dd;  $J = 6,8$ ; 2,1 Hz; 3H - C2<sup>1</sup>); 0,97 (d;  $J = 6,5$  Hz; 3H - C21); 0,80 (s; 3H - C19); 0,70 (s; 3H - C18), **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz; CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  178,2 (C24); 143,7 (C6); 115,3 (C1<sup>1</sup>); 74,1 (C7); 71,8 (C3); 57,9; 56,5 (C17); 52,0 (C25); 46,1 (C5); 45,9 (C8); 45,1; 41,5; 41,1; 37,0; 36,7; 36,4; 35,8; 32,3; 32,0; 30,9; 29,6; 28,1; 23,4 (C19); 22,4; 19,0 (C21); 12,7 (C18); 12,6 (C2<sup>1</sup>). **IR** (CHCl<sub>3</sub>): 3608 (O-H), 1731, (C=O, COOH), 1236 (C-O,

COOH), 1080 (C7-OH), 1047 (C3-OH). **MS** (ESI+): vypočteno pro C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>): 455,3132; nalezeno: 455,3132.

## 7 LITERATURA

1. Lednicer, D. *Steroid chemistry at a glance*. Wiley: Hoboken, **2011**.
2. Windaus, A. Constitution of sterols and their connection with other substances occurring in nature. *Nobel Lecture* **1928**.
3. Wieland, H. O. The chemistry of bile acids. *Nobel Lecture* **1928**.
4. Robinson, R. Constitution of cholesterol. *Nature* **1932**, 130, 540-541.
5. Hofmann, A. F. The function of bile salts in fat absorption. The solvent properties of dilute micellar solutions of conjugated bile salts. *Biochemical Journal* **1963**, 89, 57-68.
6. Li, T.; Chiang, J. Y. L. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Research* **2009**, 2009.
7. Myant, N. B.; Mitropoulos, K. A. Cholesterol-7- $\alpha$ -hydroxylase. *Journal of Lipid Research* **1977**, 18, 135-153.
8. Chiang, J. Y. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of Hepatology* **2004**, 40, 539-551.
9. Chiang, J. Y. Regulation of bile acid synthesis. *Frontiers in Bioscience* **1998**, 3, 176-193.
10. Russell, D. W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual Review of Biochemistry* **2003**, 72, 137-174.
11. Chiang, J. Y. L. Bile acid metabolism and signaling. *Comprehensive Physiology* **2013**, 3, 1191-1212.
12. Attili, A. F.; Angelico, M.; Cantafora, A.; Alvaro, D.; Capocaccia, L. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Medical Hypotheses* **1986**, 19, 57-69.
13. Claudel, T.; Staels, B.; Kuipers, F. The farnesoid X receptor - a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2005**, 25, 2020-2031.
14. Mangelsdorf, D. J.; Evans, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **1995**, 83, 841-850.
15. Forman, B. M.; Goode, E.; Chen, J.; Oro, A. E.; Bradley, D. J.; Perlmann, T.; Noonan, D. J.; Burka, L. T.; McMorris, T.; Lamph, W. W.; Evans, R. M.; Weinberger, C. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **1995**, 81, 687-693.

16. Makishima, M.; Okamoto, A. Y.; Repa, J. J.; Tu, H.; Learned, R. M.; Luk, A.; Hull, M. V.; Lustig, K. D.; Mangelsdorf, D. J.; Shan, B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **1999**, 284, 1362-1365.
17. Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R. K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Kliewer, S. A.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D. D.; Lehmann, J. M. Bile acids: Natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **1999**, 284, 1365-1368.
18. Wang, H. B.; Chen, J.; Hollister, K.; Sowers, L. C.; Forman, B. M. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR BAR. *Molecular Cell* **1999**, 3, 543-553.
19. Benoit, G.; Cooney, A.; Giguere, V.; Ingraham, H.; Lazar, M.; Muscat, G.; Perlmann, T.; Renaud, J. P.; Schwabe, J.; Sladek, F.; Tsai, M. J.; Laudet, V. International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacological Reviews* **2006**, 58, 798-836.
20. Kudlinzki, D., Merk, D., Linhard, V.L., Saxena, K., Sreeramulu, S., Nilsson, E., Dekker, N., Wissler, L., Bamberg, K., Schubert-Zsilavecz, M., Schwalbe, H. FXR with CDCA and NCoA-2 peptide. Manuskript v přípravě.
21. Hudson, W. H.; Youn, C.; Ortlund, E. A. Crystal structure of the mineralocorticoid receptor DNA binding domain in complex with DNA. *PLoS One* **2014**, 9, e107000.
22. Giguere, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine Reviews* **1999**, 20, 689-725.
23. Davis, R. A.; Miyake, J. H.; Hui, T. Y.; Spann, N. J. Regulation of cholesterol-7alpha-hydroxylase: BAREly missing a SHP. *Journal of Lipid Research* **2002**, 43, 533-543.
24. Fiorucci, S.; Mencarelli, A.; Distrutti, E.; Palladino, G.; Cipriani, S. Targeting farnesoid X Receptor: From medicinal chemistry to disease treatment. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, 17, 139-159.
25. Fiorucci, S.; Cipriani, S.; Baldelli, F.; Mencarelli, A. Bile acid-activated receptors in the treatment of dyslipidemia and related disorders. *Progress in Lipid Research* **2010**, 49, 171-185.
26. Pellicciari, R.; Costantino, G.; Camaioni, E.; Sadeghpour, B. M.; Entrena, A.; Willson, T. M.; Fiorucci, S.; Clerici, C.; Gioiello, A. Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure-activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, 4559-4569.
27. Pellicciari, R.; Fiorucci, S.; Camaioni, E.; Clerici, C.; Costantino, G.; Maloney, P. R.; Morelli, A.; Parks, D. J.; Willson, T. M. 6 alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, 3569-3572.

28. Hirschfield, G. M.; Mason, A.; Luketic, V.; Lindor, K.; Gordon, S. C.; Mayo, M.; Kowdley, K. V.; Vincent, C.; Bodhenheimer Jr, H. C.; Parés, A.; Trauner, M.; Marschall, H.-U.; Adorini, L.; Sciacca, C.; Beecher-Jones, T.; Castelloe, E.; Böhm, O.; Shapiro, D. Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* **2015**, 148, 751-761.
29. Chiang, P. C.; Thompson, D. C.; Ghosh, S.; Heitmeier, M. R. A formulation-enabled preclinical efficacy assessment of a farnesoid X receptor agonist, GW4064, in hamsters and cynomolgus monkeys. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, 100, 4722-4733.
30. D'Amore, C.; Di Leva, F. S.; Sepe, V.; Renga, B.; Del Gaudio, C.; D'Auria, M. V.; Zampella, A.; Fiorucci, S.; Limongelli, V. Design, synthesis, and biological evaluation of potent dual agonists of nuclear and membrane bile acid receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 937-954.
31. Maloney, P. R.; Parks, D. J.; Haffner, C. D.; Fivush, A. M.; Chandra, G.; Plunket, K. D.; Creech, K. L.; Moore, L. B.; Wilson, J. G.; Lewis, M. C.; Jones, S. A.; Willson, T. M. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 2971-2974.
32. Gioiello, A.; Macchiarulo, A.; Carotti, A.; Filipponi, P.; Costantino, G.; Rizzo, G.; Adorini, L.; Pellicciari, R. Extending SAR of bile acids as FXR ligands: Discovery of 23-N-(carbocinnamyloxy)-3 alpha,7 alpha-dihydroxy-6 alpha-ethyl-24-nor-5 beta-cholan-23-amine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, 19, 2650-2658.
33. Pellicciari, R.; Gioiello, A.; Costantino, G.; Sadeghpour, B. M.; Rizzo, G.; Meyer, U.; Parks, D. J.; Entrena-Guadix, A.; Fiorucci, S. Back door modulation of the farnesoid X receptor: design, synthesis, and biological evaluation of a series of side chain modified chenodeoxycholic acid derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 4208-4215.
34. Xiao, H.; Li, P.; Li, X.; He, H.; Wang, J.; Guo, F.; Zhang, J.; Wei, L.; Zhang, H.; Shi, Y.; Hou, L.; Shen, L.; Chen, Z.; Du, C.; Fu, S.; Zhang, P.; Hao, F.; Wang, P.; Xu, D.; Liang, W.; Tian, X.; Zhang, A.; Cheng, X.; Yang, L.; Wang, X.; Zhang, X.; Li, J.; Chen, S. Synthesis and biological evaluation of a series of bile acid derivatives as FXR agonists for treatment of NASH. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2017**, 8, 1246-1251.
35. Sato, H.; Macchiarulo, A.; Thomas, C.; Gioiello, A.; Une, M.; Hofmann, A. F.; Saladin, R.; Schoonjans, K.; Pellicciari, R.; Auwerx, J. Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51, 1831-1841.
36. Mi, L.-Z.; Devarakonda, S.; Harp, J. M.; Han, Q.; Pellicciari, R.; Willson, T. M.; Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Molecular Cell* **2003**, 11, 1093-1100.

37. Pellicciari, R.; Costantino, G.; Fiorucci, S. Farnesoid X receptor: from structure to potential clinical applications. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 5383-5403.
38. Merk, D.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M. Medicinal chemistry of farnesoid X receptor ligands: from agonists and antagonists to modulators. *Future Medicinal Chemistry* **2012**, 4, 1015-1036.
39. Yu, D.; Mattern, D. L.; Forman, B. M. An improved synthesis of 6 $\alpha$ -ethylchenodeoxycholic acid (6ECDCA), a potent and selective agonist for the farnesoid X receptor (FXR). *Steroids* **2012**, 77, 1335-1338.
40. Haslewood, G. A. D. Preparation of deoxycholic acid. *Nature* **1942**, 150, 211.
41. Fieser, L. F.; Rajagopalan, S. Oxidation of steroids. III. Selective oxidations and acylations in the bile acid series. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, 72, 5530-5536.
42. Fieser, L. F.; Rajagopalan, S. Selective oxidation with N-bromosuccinimide. I. Cholic acid. *Journal of the American Chemical Society* **1949**, 71, 3935-3938.
43. Braun, M. General methods for the preparation of enolates. In *Modern Enolate Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: **2015**.
44. Stork, G.; Brizzolara, A.; Landesman, H.; Szmuszkowicz, J.; Terrell, R. The enamine alkylation and acylation of carbonyl compounds. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 207-222.
45. Bates, R. B.; Taylor, S. R. Alkylation of enolates with triflates. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, 58, 4469-4470.
46. Fritz, J. S.; Schenk, G. H. Acid catalyzed acetylation of organic hydroxyl groups. *Analytical Chemistry* **1959**, 31, 1808-1812.
47. Kristensen, T. E. Chemoselective O-acetylation of hydroxyamino acids and amino alcohols under acidic reaction conditions: History, scope and applications. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2015**, 11, 446-468.
48. Ishihara, K.; Kurihara, H.; Yamamoto, H. An extremely simple, convenient, and selective method for acetylating primary alcohols in the presence of secondary alcohols. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, 58, 3791-3793.
49. Heravi, M. M.; Bakhtiari, K.; Javadi, N. M.; Oskooie, H. A.; Bamoharram, F. F. Selective acetylation of alcohols and amines with ethyl acetate in the presence of H<sub>6</sub>[PMo<sub>9</sub>V<sub>3</sub>O<sub>40</sub>] as the catalyst. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2007**, 138, 445-447.
50. Giordano, C.; Perdoncin, G.; Castaldi, G. Reduktion von Ketonen mit Alkalimetallen in tertiären Alkoholen: Unerwarteter Effekt von Kationen auf die Stereochemie. *Angewandte Chemie* **1985**, 97, 510-511.

51. Tian, H.; Zhao, H.; Cao, X. Catalytic transfer hydrogenation of 7-ketolithocholic acid to ursodeoxycholic acid with Raney nickel. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2013**, 19, 606-613.
52. Huang, X.; Cao, X. Preparation of ursodeoxycholic acid from 7-ketone lithocholic acid by stereoselective electroreduction. *Bioresources and Bioprocessing* **2015**, 2, 27.
53. Mitsunobu, O.; Yamada, M. Preparation of esters of carboxylic and phosphoric acid via quaternary phosphonium salts. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1967**, 40, 2380-2382.
54. Kasal, A.; Pasztorova, S. Synthesis of RIA haptens - 3-Alpha,11-Alpha-Dihydroxy-5-Alpha-Pregnan-20-One 11-Hemisuccinate. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1993**, 58, 619-628.
55. Shimizu, T.; Hiranuma, S.; Nakata, T. Efficient method for inversion of secondary alcohols by reaction of chloromethanesulfonates with cesium acetate. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 6145-6148.
56. Bowden, K.; Heilbron, I. M.; Jones, E. R. H.; Weedon, B. C. L. 13. Researches on acetylenic compounds. Part I. The preparation of acetylenic ketones by oxidation of acetylenic carbinols and glycols. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1946**, 39-45.
57. Collins, J. C.; Hess, W. W.; Frank, F. J. Dipyridine-chromium(VI) oxide oxidation of alcohols in dichloromethane. *Tetrahedron Letters* **1968**, 9, 3363-3366.
58. Corey, E. J.; Suggs, J. W. Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters* **1975**, 16, 2647-2650.
59. Corey, E. J.; Schmidt, G. Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. *Tetrahedron Letters* **1979**, 20, 399-402.
60. Omura, K.; Swern, D. Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. a preparative, steric and mechanistic study. *Tetrahedron* **1978**, 34, 1651-1660.
61. Pfitzner, K. E.; Moffatt, J. G. A new and selective oxidation of alcohols. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 3027-3028.
62. Parikh, J. R.; Doering, W. v. E. Sulfur trioxide in the oxidation of alcohols by dimethyl sulfoxide. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89, 5505-5507.
63. Oppenauer, R. V. Eine methode der dehydrierung von sekundären alkoholen zu ketonen. I. zur herstellung von sterinketonen und sexualhormonen. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1937**, 56, 137-144.

64. Stevens, R. V.; Chapman, K. T.; Weller, H. N. Convenient and inexpensive procedure for oxidation of secondary alcohols to ketones. *Journal of Organic Chemistry* **1980**, 45, 2030-2032.
65. Mi, L. Z.; Devarakonda, S.; Harp, J. M.; Han, Q.; Pellicciari, R.; Willson, T. M.; Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Molecular Cell* **2003**, 11, 1093-1100.
66. Carazo, A.; Pavek, P. The Use of the LanthaScreen TR-FRET CAR Coactivator Assay in the Characterization of Constitutive Androstane Receptor (CAR) Inverse Agonists. *Sensors (Basel)* **2015**, 15, 9265-9276.
67. IUPAC-IUB Joint commission on biochemical nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. *European Journal of Biochemistry* **1989**, 186, 429-458.
68. Thiele, J. Ueber azodicarbonsäure (diimidicarbonsäure). *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1892**, 271, 127-136.
69. Arndt, F. Diazomethane. *Organic Synthesis* **1935**, 15.
70. Eisenbraun, E. J. Cycloöctanone. *Organic Synthesis* **1965**, 45.
71. Dauben, H. J.; McCoy, L. L. N-bromosuccinimide. I. Allylic bromination, a general survey of reaction variables. *Journal of the American Chemical Society* **1959**, 81, 4863-4873.
72. Rose, A. S.; Hildebrand, P. W. NGL Viewer: a web application for molecular visualization. *Nucleic Acids Research* **2015**, 43, 576-579.
73. Pan, L.; Aller, S. G. Tools and procedures for visualization of proteins and other biomolecules. *Current Protocols in Molecular Biology* **2015**, 110, 1-47.
74. Hauser, E.; Baumgartner, E.; Meyer, K. Zur kenntnis der chenodesoxycholasäure (3alpha,7alpha-dihydroxy-5beta-cholansäure). *Helvetica Chimica Acta* **1960**, 43, 1595-1600.