

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie



Syntéza lupanových derivátů s protivirovou aktivitou

Synthesis of lupane derivatives with antiviral activity

Marek Remeš

Bakalářská práce

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233147061

Praha 2008

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

pr.c.: 134b/08 stud
(org)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod odborným vedením školitele RNDr. Jana Šarka, Ph.D. a veškeré použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 8.9.2008

Marek Remes

Remes

.....
podpis

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	4
ÚVOD.....	5
CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	5
TEORETICKÁ ČÁST	6
1. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	7
1.1. Cytotoxická aktivita lupanových derivátů.....	7
1.2. Antivirální aktivita lupanových derivátů.....	9
1.3. Anti-HIV aktivita lupanových derivátů	11
1.4. Biologicky aktivní triterpenoidy z našeho pracoviště	13
2. PŘÍPRAVA VÝCHOZÍCH SLOUČENIN.....	14
2.1. Acylchlorid 7.....	15
3. PŘÍPRAVA DERIVÁTŮ LUPANOVÝCH TRITERPENOIDŮ	16
3.1. Isopropyl-ester 8	16
3.2. Hydroxy-isopropyl-ester 9.....	16
3.3. Dimethylhemisukcinát 10.....	17
3.4. 4-chlorbenzyl-ester 11.....	18
3.5. Dimethylhemisukcinát 12.....	18
3.6. Cyklobutylmethyl-ester 13.....	19
3.7. Dimethylhemisukcinát 14.....	20
3.8. Cyklopropylmethyl-ester 15.....	20
3.9. Dimethylhemisukcinát 16.....	21
4. BIOLOGICKÁ AKTIVITA PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN	22
4.1. Cytotoxická aktivita	22
4.2. Anti-HIV aktivita	22
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
TABULKY ¹³ C NMR SPEKTER	31
LITERATURA.....	36
PODĚKOVÁNÍ.....	38
PŘÍLOHA: VZORCE PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN	

Seznam použitých zkratek

A549	lidský plicní karcinom	Koll.	kollidin
Ac	acetyl	MeCN	acetonitril
Ac ₂ O	acetanhydrid	Me	methyl
AcOH	octová kyselina	MEL-2	lidský melanom
BT549	karcinom prsu	OVCAR-3	ovariální karcinom
CEM	T-lymfoblastická leukemie	P-388	lymfocytická leukémie
DMAP	4-(dimethylamino)-pyridin	PC-3	lidský karcinom prostaty
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid	Py	pyridin
DU145	karcinom prostaty	r.t.	laboratorní teplota
Et ₂ O	diethylether	refl.	reflux
EtOAc	ethyl-acetát	RVO	rotační vakuová odparka
EtOH	ethanol	Saos2	rhabdomyosarkom
HCT15	karcinom tlustého střeva	SARS	Structure activity relationship
HT29	lidská rakovina tlustého střeva	THF	tetrahydrofuran
HeLa	karcinom močového měchýře	TLC	tenkovrstvá chromatografie
<i>i</i> -Pr	isopropyl	XF498	karcinom centrálního nervového systému
K526	promyelocytická leukemie		
K562-tax	taxol rezistentní podkmén K562		

Poznámka k číslování:

V této práci budou použity dva druhy číslování sloučenin. Látky v této práci nepřipravené budou značeny římskými číslicemi. Sloučeniny nově připravené nebo již v literatuře popsání, které byly v rámci této práce připravené, budou značeny číslicemi arabskými. Uhlíkové atomy připravených derivátů budou číslovány takto: Postranní řetězec navázaný na uhlík C-28 bude počínat C-31, postranní řetězec navázaný na C-3 bude označen čísly s čárkou a bude počínat C-1'.

Úvod

Přírodní látky se pro možnost použití ve farmacii zkoumají už relativně dlouhé období. Mezi tyto látky patří i triterpenoidy, sloučeniny, jejichž základ tvoří molekuly isoprenu (2-methylbuta-1,3-dien). Avšak jejich využití je zatím stále mizivé. Vyskytují se ve vyšších rostlinách, případně v houbách a plísních. Pro své další uplatnění jsou velmi zajímavé díky své různé biologické aktivitě. Počet izolovaných triterpenoidních sloučenin se dnes pohybuje okolo 30 000.¹ Biologicky aktivní jsou především deriváty lupanu, oleananu a ursanu, jež se řadí mezi přírodní pentacyklické triterpenoidy.

Betulin, lup-20(29)-en-3 β ,28-diol, vyskytující se v kůře břízy a kyselina betulinová, 3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina, kterou lze izolovat z kůry platanu,² se staly centrem zájmu zejména díky své dostupnosti, snadné izolovatelnosti a především díky tomu, že jsou výchozími látkami pro přípravu derivátů, které mají širokospektrální protinádorovou aktivitu, tzv. betulininů. Betulininy disponují *in vitro* významnou aktivitou vůči nádorovým liniím, jako jsou lidský melanom Mel-2, karcinom centrálního nervového systému XF498, lidský karcinom tlustého střeva HCT-15 a další.³ Jelikož se výskyt nádorových onemocnění rychle zvyšuje, je třeba se o tyto potenciální léčiva zajímat.

Modifikace betulininů (triterpenoidů odvozených od lupanového, 18 α -oleanového a des-E-lupanového skeletu) vyznačujících se antimikrobiálními, virostatickými, cytostatickými a dalšími biologickými účinky, se stává cílem výzkumu našeho pracoviště. Připravené látky jsou testovány proti nádorovým liniím nejprve *in vitro* a poté *in vivo* v Laboratoři experimentální medicíny, Dětské kliniky LF UP v Olomouci. Proti HIV jsou prováděny testy ve firmě Virochem Pharma Inc. ve městě Laval, Quebec v Kanadě.

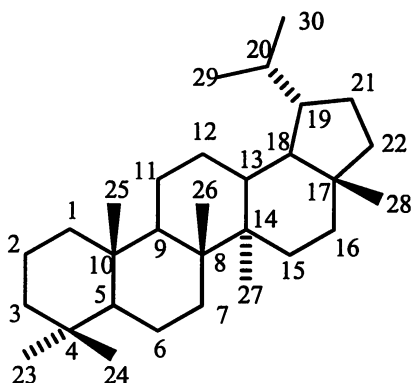
Cíle bakalářské práce:

- 1) Provést literární rešerši přípravy a cytotoxické aktivity derivátů kyseliny betulinové.
- 2) Příprava esterů 3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-ové kyseliny.
- 3) Příprava hemiesterů 3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-ové kyseliny.

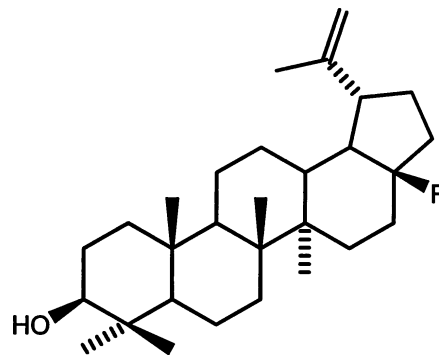
Teoretická část

1. Současný stav problematiky

Březová kůra se v lidovém léčitelství využívala velmi dlouho. Je například známo, že výluh získaný za studena z březové kůry naložené v oleji se používal při revmatických potížích a odvar na chronické podráždění kůže⁴. Éterický olej (těkavá tekutina obsažena v buňkách rostlin, extrahovaná macerací) má antiseptické účinky, ulevuje při ekzémech a lupénce.⁴ V roce 1788 byl poprvé z březové kůry izolován betulin (I), patřící do skupiny lupanových triterpenoidů. Avšak jeho struktura zůstala zahalena do tajemna ještě několik desítek let poté. Sumární vzorec byl nejprve navržen Dischendorferem a Grillmayerem v roce 1926 a o 6 let později byl potvrzen Ruzickou, Brunngerem a Gustusem. Struktura byla objasňována v průběhu dalších několika let různými reakcemi a nakonec byla definitivně potvrzena Jonesem a kol.⁵



Lupanový skelet



I, R = CH₂OH

II, R = COOH

1.1. Cytotoxická aktivita lupanových derivátů

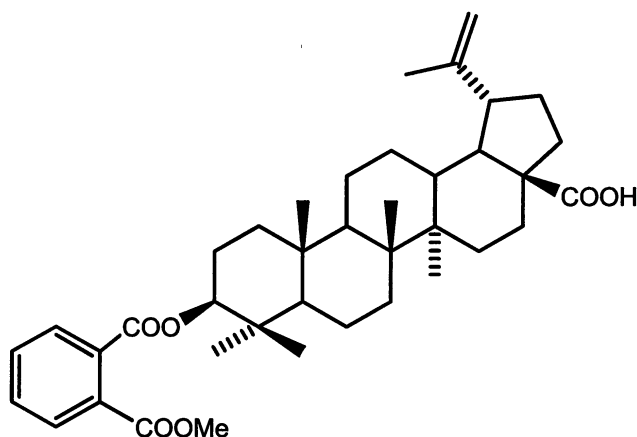
Cytotoxická aktivita je vyjadřována pomocí indexu IC₅₀, který udává minimální koncentraci látky potřebnou k usmrcení 50 % nádorových buněk. Hovoříme-li o látkách významně cytotoxicky aktivních, jedná se většinou o sloučeniny s hodnotou IC₅₀ < 10 μmol/l. Cytotoxicita triterpenoidů byla popsána již v roce 1976 u extraktu z *Vauquelinia corymbosa* vůči lymfocytární leukemické linii P-388 v práci.⁶ Jednou z účinných látek byla právě kyselina betulinová (II).⁷ Její cytotoxický účinek na buněčné linie lidského melanomu byl však popsán až v roce 1995⁸. V roce 2002 byl prokázán efekt betulinové kyseliny (II) proti širšímu spektru nádorových linií. K již známé cytotoxické aktivitě proti linii neuroblastomu byla dokázána také aktivita vůči liniím ovariálního karcinomu A2780, OVCAR-5, GROV-1, nemalobuněčného plicního karcinomu H460, karcinomu děložního krčku A431, melanomu Me665/2/21,

Me665/2/60, linií malobuněčného karcinomu POGB, POGB/DX. Hodnota IC_{50} se pohybuje jak pro linie s mutovaným genem p53, tak i s nemutovanou formou mezi 3.3 – 9.9 $\mu\text{mol/l}$.⁹ Kromě cytotoxicity projevuje kyselina betulinová (**II**) také antivirový, antibakteriální a protizánětlivý účinek.⁷

Další výzkum betulinové kyseliny (**II**) se zaměřil na modifikaci jejího skeletu pro zvýšení a rozšíření její biologické aktivity proti nádorovým buňkám různého histogenetického původu.

Při derivatizaci kyseliny **II** skupinami zvyšující lipofilitu sloučeniny se cytotoxická aktivita v porovnání s výchozí kyselinou **II** snížila,¹⁰ avšak při funkcionalizaci zvyšující polaritu sloučeniny dojde ke zvýšení cytotoxické aktivity.⁹ Po derivatizaci hydroxyskupiny ftalanhydridem došlo k rozšíření spektra účinku proti nádorům, jako jsou mezenchymální, epitelální nebo neuroektodermální nádory.²

Nejmarkantnější zvýšení cytotoxické aktivity bylo zaznamenáno v případě derivátu **III**, který měl IC_{50} 2-5krát nižší než původní kyselina **II** proti několika nádorovým liniím.² Hodnoty pro kyselinu betulinovou (**II**) a pro derivát **III** jsou uvedeny v tabulce 1.



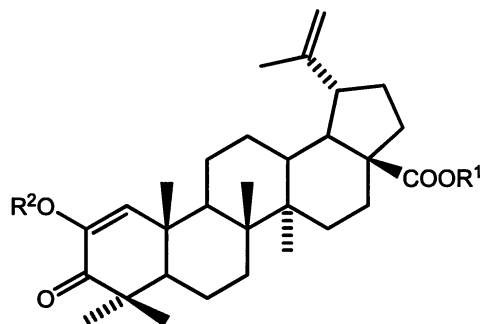
III

	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)					
	CEM	K562	K562-Tax	HT29	PC-3	SK MEL-2
II	27.5	54.8	108.2	84.5	94.1	23.2
III	5.7	8.8	47.8	7.5	18.9	13.4

Tabulka 1: Sumární cytotoxické aktivity látek **II** a **III**.

Další SARS studie prokázaly závislost aktivity jak na skupinách v poloze 3 nebo 28, tak na nasycení dvojnás vazby.¹¹ U alkyl-esterů v poloze 28 bylo pozorováno snížení aktivity, avšak hydrogenace dvojnás vazby 20(29), či oxidace 3 β -hydroxyskupiny způsobila naopak její

zvýšení.¹¹ Velmi dobrou aktivitu prokázaly proti pěti nádorovým liniím (A 549, DU 145, MCF-7, K 562, K 562-Tax) deriváty ze skupiny diosfenolů, především látky **IV** – **VI**.¹¹

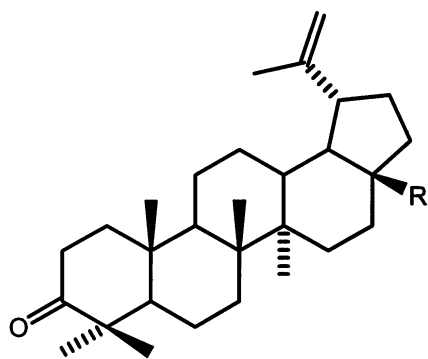


IV	R ¹ = H	R ² = H
V	R ¹ = Me	R ² = H
VI	R ¹ = Me	R ² = Me

1.2. Antivirální aktivita lupanových derivátů

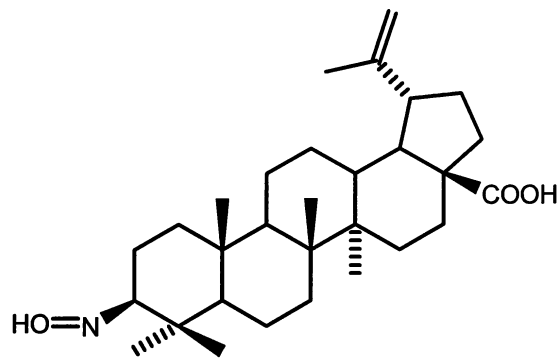
Protivirová aktivita sloučenin je obecně charakterizována hodnotou indexu EC₅₀, který vyjadřuje tzv. efektivní koncentraci látky. Terapeutický index MTC/EC₅₀ pak udává maximální možnou koncentraci látky, která je pro organismus netoxická ku efektivní koncentraci látky. Lupanové triterpenoidy – betulín (**I**), kyselina betulinová (**II**) a betulonová (**VII**) projevíly inhibiční aktivitu vůči reprodukci viru ECHO6, který se může vyskytovat u lidí a způsobovat horečky a průjemová onemocnění.¹² Jako nejúčinnější se jevila kyselina betulinová (**II**) s hodnotami EC₅₀ = 7.0 nmol/l a MTC/EC₅₀ > 4 000.¹² Účinné jsou taky další deriváty kyseliny betulinové (**II**) jako amidy, aminokyselinové deriváty a hydrazidy.

Proti viru chřipky A (H7N1) byly nejúčinnější dusíkaté deriváty připravené derivatizací kyseliny betulonové (**VII**): Oxim **VIII** vykazoval hodnotou EC₅₀ = 2200 nmol/l a poměr MTC/EC₅₀ = 392.2. Funkcionalizací karboxylové skupiny v poloze 28 na CONH₂ u kyseliny betulonové (**VII**) došlo ke zvýšení aktivity.¹³ Amid **IX** prokázal aktivitu s hodnotou EC₅₀ = 700 nmol/l a velmi široký rozsah netoxické koncentrace stanovený poměrem MTC/EC₅₀ = 1333.3.¹³ Kyselina betulinová (**II**) nebyla v těchto experimentech aktivní vůbec.¹³



VII, R = COOH

IX, R = CONH₂

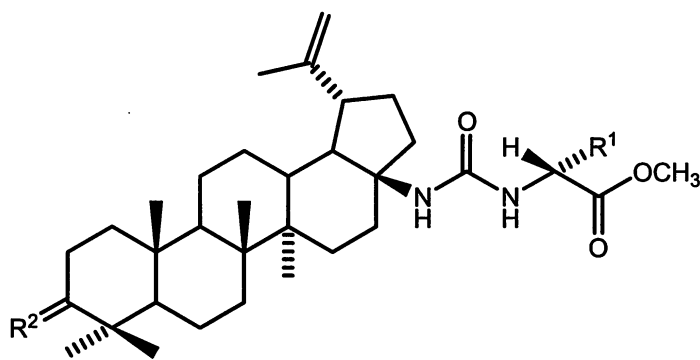


VIII

Vůči herpes simplex virům HSV-1 a HSV-2 byl aktivní betulin (I) s $EC_{50} = 905$ nmol/l proti HSV-1 a s $EC_{50} = 9\ 390$ nmol/l proti HSV-2. Nejdéle známá je aktivita kyseliny betulinové (II) vůči HSV-1 s hodnotou $EC_{50} = 5100$ nmol/l, avšak aktivita proti HSV-2 nebyla zjištěna.¹² Betulonová kyselina (IX) má proti HSV-1 hodnotu $EC_{50} = 900$ nmol/l. Byly však nalezeny dusíkaté deriváty, jejichž aktivita proti HSV-1 viru je vyšší než aktivita betulinové kyseliny (II). Jako velmi efektivní se ukázaly deriváty X – XIII, jejichž EC_{50} byla menší než 2500 nmol/l. Deriváty s oxoskupinou v poloze 3 (X, XI) projevovaly také velký terapeutický index (viz tabulka 2).¹²

Sloučenina	X	XI	XII	XIII
EC_{50} (nmol/l)	200	2200	600	1400
MTC/ IC_{50}	454.0	298.5	-	-

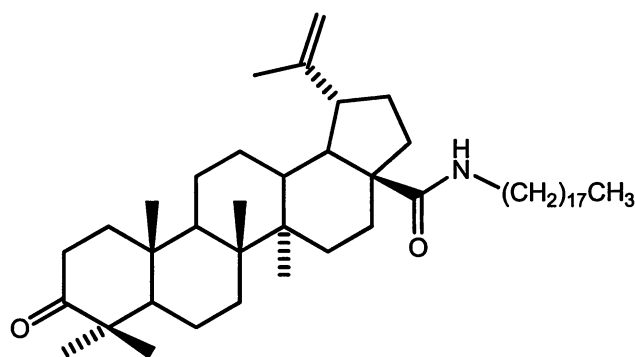
Tabulka 2: Antivirální aktivita látek X – XIII.



X, R¹ = *i*-Pr, R² = O

XI, R¹ = CH₂CH₂-S-CH₃, R² = O

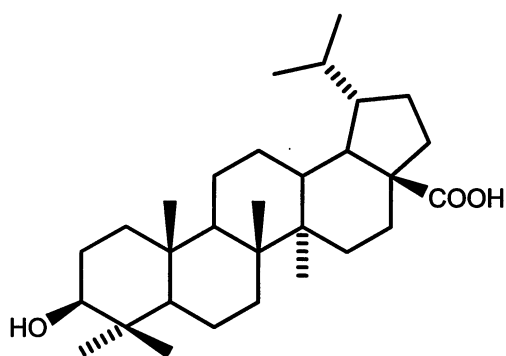
XII, R¹ = CH₂CH₂-S-CH₃, R² = NOH



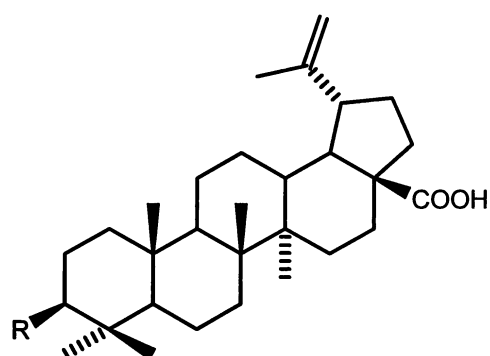
XIII

1.3. Anti-HIV aktivita lupanových derivátů

K zastavení replikace viru HIV se v dnešní době užívá několik látek. V klinickém užívání jsou látky, které inhibují HIV-1 reverzní transkriptázu, ale vedlejší efekty a vývoj odolnosti viru nutí laboratoře k výzkumu dalších potenciálních léčiv. Několik triterpenů prokázalo anti-HIV aktivitu. Kyselina betulinová (II) účinkovala proti replikaci HIV-1 na H9 lymfocytárních buňkách s hodnotou $EC_{50} = 1\,400$ nmol/l s terapeutickým indexem $MTC/EC_{50} = 9.3$.¹³ Kyselina dihydrobetulinová (XIV) měla aktivitu vyšší, resp. $EC_{50} = 900$ nmol/l a $MTC/EC_{50} = 14$.¹⁴ Jako velmi účinné se jeví některé deriváty těchto kyselin. Byl připraven a testován 3β -O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-derivát od obou kyselin a jejich aktivity ukázaly hodnoty pro derivát XV $EC_{50} < 0.35$ nmol/l s terapeutickým indexem $MTC/EC_{50} > 20\,000$ a pro derivát XVII $EC_{50} < 0.35$ nmol/l s terapeutickým indexem $MTC/EC_{50} > 14\,000$.¹⁴

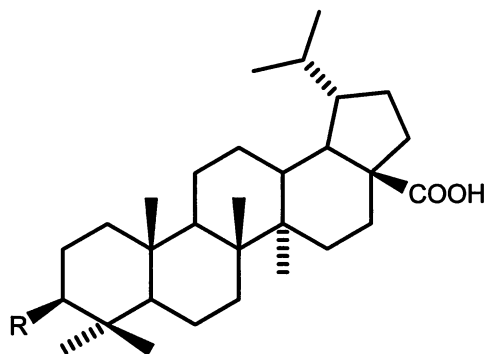


XIV



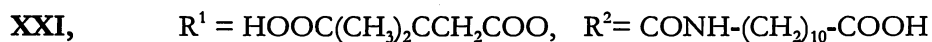
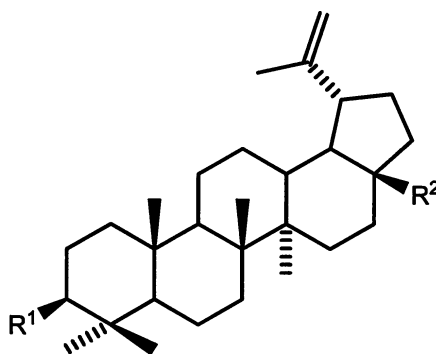
XV, R = $HOOC(CH_3)_2CCH_2COO$

XVI, R = $HOOCCH_2C(CH_3)_2CH_2COO$



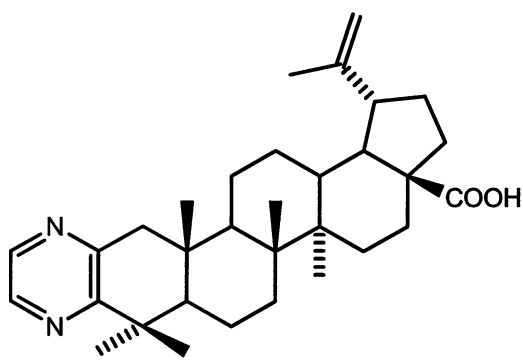
Zvýšení aktivity bylo pozorováno také pro 3 β -O-(3',3'-dimethylglutaryl) deriváty **XVI** a **XVIII** a 3'-oxaglutaryl derivát **XIX**,¹⁴ u kterých se hodnoty EC₅₀ pohybovaly v rozmezí 2 - 6 nmol/l.¹⁵ Derivát **XV** je znám jako Bevirimat, DSB, YK-FH312 a nejčastěji jako PA-457. Tato látka je již ve druhé fázi klinického testování v USA a její mechanismus účinku je objasněn, jedná se o specifickou inhibici štěpení prekursoru kapsidového proteinu GAG.¹⁶

Bylo zjištěno, že derivatizací betulinu (**I**) v pozici 28 vznikají látky účinkující mechanismem blokování vstupu viru do buněk a derivatizací pozice 3 látky, které inhibují maturaci viru. Jako jedny z nejefektivnějších anti-HIV látek se jeví také sloučeniny **XX** a **XXI**, které mají derivatizovanou pozici 3 i 28. Jejich aktivita byla IC₅₀ = 0.66 nmol/l pro derivát **XX**¹⁵ a IC₅₀ = 2.6 nmol/l pro derivát **XXI**.¹⁴

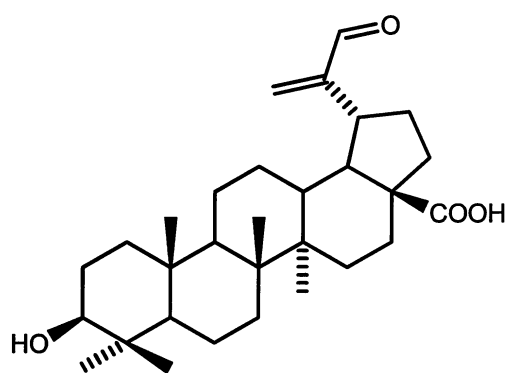


1.4. Biologicky aktivní triterpenoidy z našeho pracoviště

Na našem pracovišti bylo připraveno několik derivátů odvozených od lupanového, des-E-lupanového a 18 α -oleanového skeletu s významnou protinádorovou aktivitou.¹⁹ Tyto sloučeniny jsou nazvány betuliny.¹⁹ Jejich cytotoxická aktivita není omezena jen na buněčné linie Mel-2, ale jsou vysoce aktivní (tzn. IC₅₀ < 10 μ mol/l) i proti dalším nádorovým liniím, a to zejména proti A549, Saos2, BT549, DU145, OVCAR-3, K562 a CEM. Neaktivnější lupanové deriváty z našeho pracoviště jsou např. pyrazin **XXII**¹⁷ a aldehyd **XXIII**.¹⁸

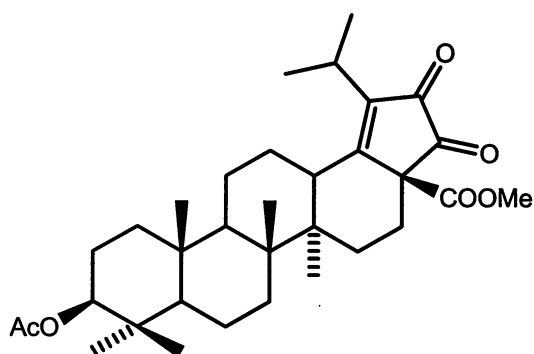


XXII

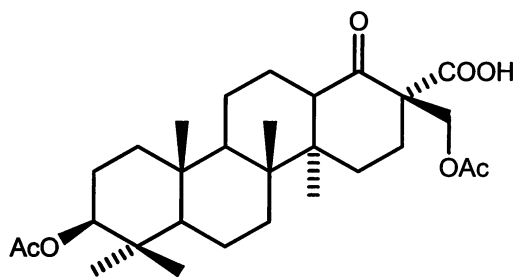


XXIII

Dalšími vysoce účinnými deriváty jsou diketon **XXIV** a des-E-lupanový derivát, β -ketokyselina **XXV**,¹⁹ která má IC₅₀ < 1 μ mol/l.

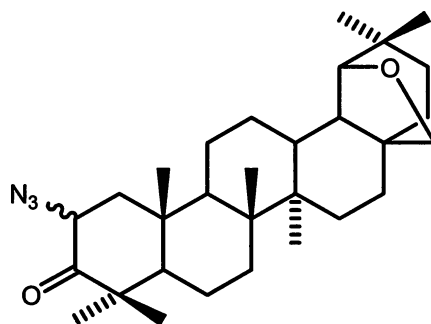


XXIV



XXV

Největší protinádorovou aktivitu z derivátů odvozených z 18 α -oleananového skeletu vykazoval azidoketon **XXVI**.¹² Cytotoxická aktivita těchto derivátů je shrnuta v tabulce 3.



XXVI

Sloučenina	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI
IC ₅₀ (μmol/l)	14.0	7.2	6.1	0.2	8.1

Tabulka 3.: Cytotoxická aktivita derivátů XXII – XXVI.

2. Příprava výchozích sloučenin

Výchozími látkami pro tuto práci byly kyseliny **5** a **6**. Příprava kyseliny **5** byla provedena dle lit.²⁰ Výchozí surovinou je přírodní triterpen betulin (**I**), který se acetylací převedl na betulin-diacetát (**1**) (Schéma 1). Následovala kyselá katalyzovaná izomerizace dvojně vazby z polohy 20(29) do polohy 18 na olefin **2**. Pak došlo k allylové oxidaci za vzniku ketonu **3**. Parciální hydrolyzou byl odstraněn acetát v poloze 28 (**4**) a po oxidaci oxidem rutheničelým tak byla získána 3β-acetoxy-21-oxolup-18-en-28-ová kyselina (**5**). Nakonec byla provedena hydrolyza acetátové skupiny v poloze C-3, za vzniku kyseliny **6** (Schéma 2).³

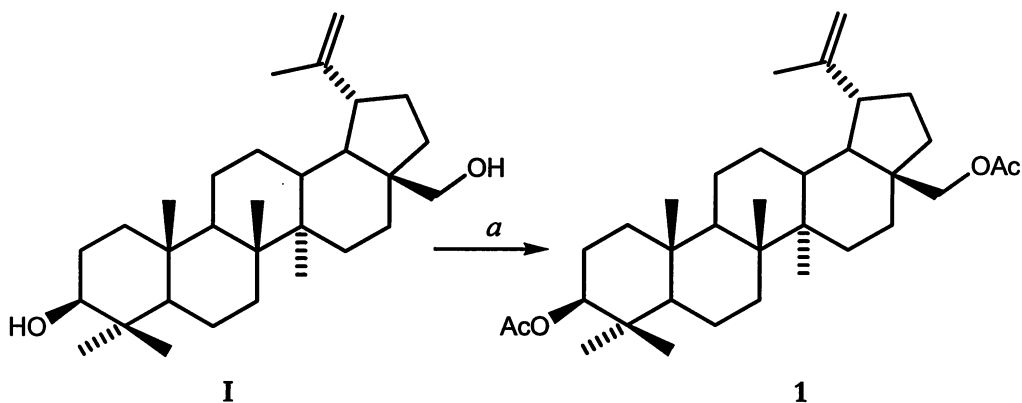


Schéma 1: α: Ac₂O / Py, 90 °C

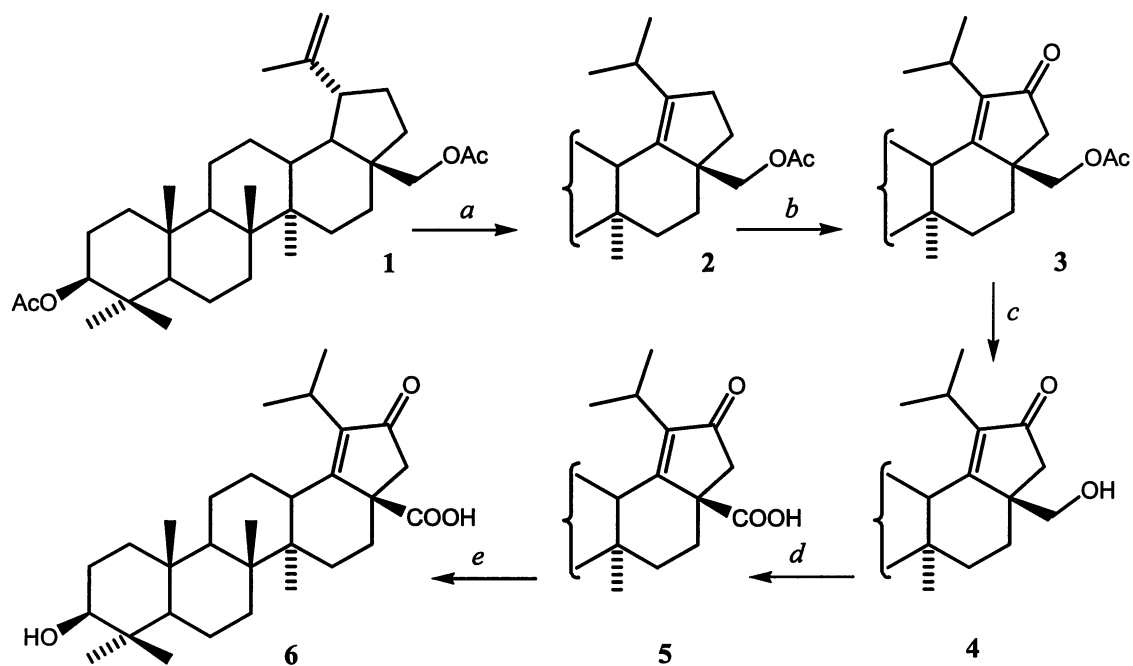


Schéma 2: *a:* HBr/C₆H₆, AcOH, Ac₂O, refl., *b:* Na₂Cr₂O₇, AcONa/C₆H₆, AcOH r.t., *c:* KOH / PhMe, EtOH, r.t. *d:* RuO₂, NaIO₄/EtOAc, H₂O, r.t., *e:* KOH / EtOH, Toluén, refl.

2.1. Acylchlorid 7

Acylchlorid 7 byl připraven reakcí kyseliny 5 s thionylchloridem za přítomnosti pyridinu v chloroformu (Schéma 3), bez separace a identifikace byl použit dále.

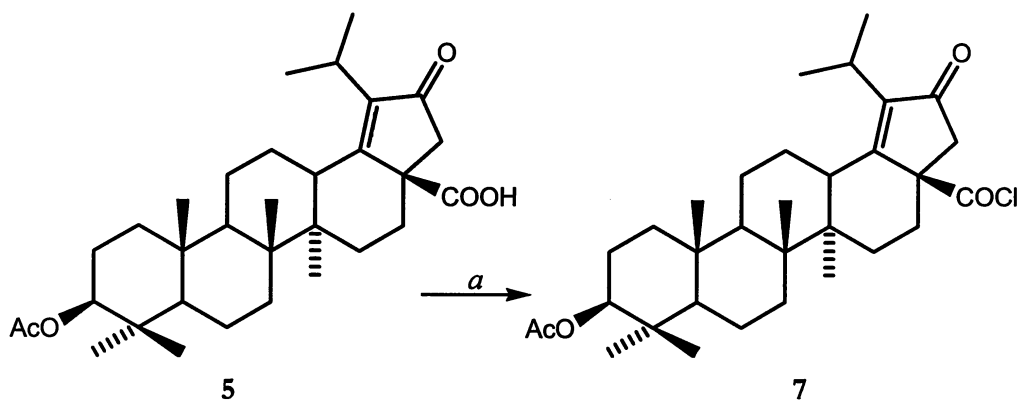


Schéma 3: *a:* SOCl₂/CHCl₃, Py, refl.

3. Příprava derivátů lupanových triterpenoidů

3.1. Isopropyl-ester 8

Chlorid kyseliny 7 reagoval s isopropylalkoholem ve směsi chloroformu a pyridinu. Byl připraven isopropyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (8), po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 84 % (Schéma 4). Isopropyl-ester 8 byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ^1H NMR spektrech byl kromě signálů obvyklých pro derivát 5 nalezen dublet šesti vodíků H-32 a H-33 při δ 1.20 ppm, s interakční konstantou $J=6.0$ Hz a septet H-31 při δ 5.01 ppm, s interakční konstantou $J=6.0$ Hz. V ^{13}C NMR spektrech byl proti látce 5 nalezen signál C-31 při δ 68.25 ppm a C-32 a C-33 při δ 21.50 ppm, resp. 21.59 ppm. V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

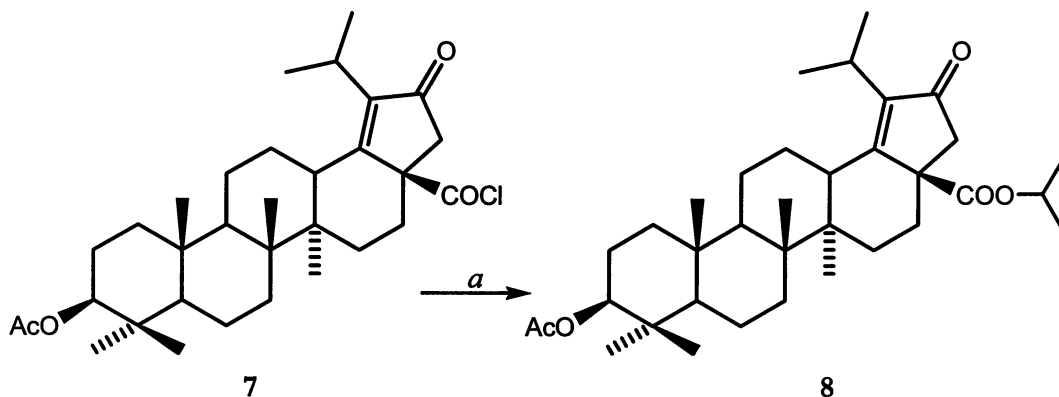


Schéma 4: a: *i*-PrOH/ CHCl_3 , Py, refl.

3.2. Hydroxy-isopropyl-ester 9

Isopropyl-ester 8 byl hydrolyzován ve směsi dioxanu, isopropylalkoholu za přítomnosti kyseliny chlorovodíkové, bromovodíkové a vody. Byl připraven hydroxyderivát 9, po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 99 % (Schéma 5). Derivát 9 byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V souladu se strukturou nebyl v ^1H NMR v porovnání s derivátem 8 nalezen signál pro acetát. V ^{13}C NMR spektrech byl signál C-3 zaznamenán při δ 78.85 ppm. V IČ spektru byl zaznamenán výrazný pás OH skupiny při 3328 cm^{-1} . V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

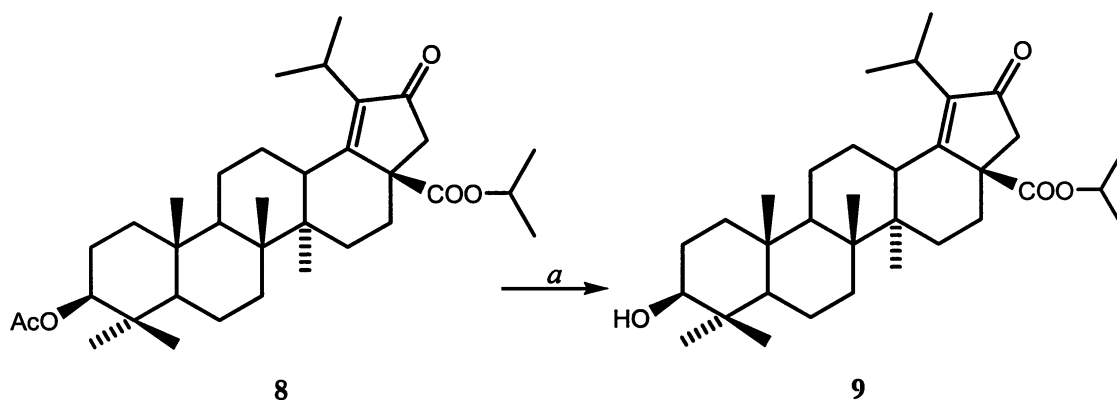


Schéma 5: *a*: HCl, HBr / dioxan, *i*-PrOH

3.3. Dimethylhemisukcinát 10

Acylace látky **9** byla prováděna 2,2-dimethylsukcinanhydridem za refluxu v kollidinu pod ochrannou argonovou atmosférou. Byl připraven dimethylhemisukcinát **10**, po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 24 % (Schéma 6). Tento derivát byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ^1H NMR spektrech byl kromě signálů obvyklých pro derivát **9** nalezen dublet šesti vodíků H-6' a H-5' při δ 1.30 ppm, s interakční konstantou $J=6.4$ Hz a signál pro H-3 α byl nalezen při δ 4.49 ppm. V ^{13}C NMR spektrech byl proti derivátu **9** nalezen signál C-1' při δ 170.94 ppm, C-2' při δ 44.67 ppm, C-3' při δ 40.44 ppm, C-4' při δ 182.11 ppm, C-5' při δ 25.58 ppm a C-6' při δ 25.02 ppm. Signál C-3 byl zaznamenán při δ 81.32 ppm. V IČ spektru byl zaznamenán výrazný pás OH skupiny při 3301 cm^{-1} a široký pás karboxylu v oblasti $2550 - 3500\text{ cm}^{-1}$. V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

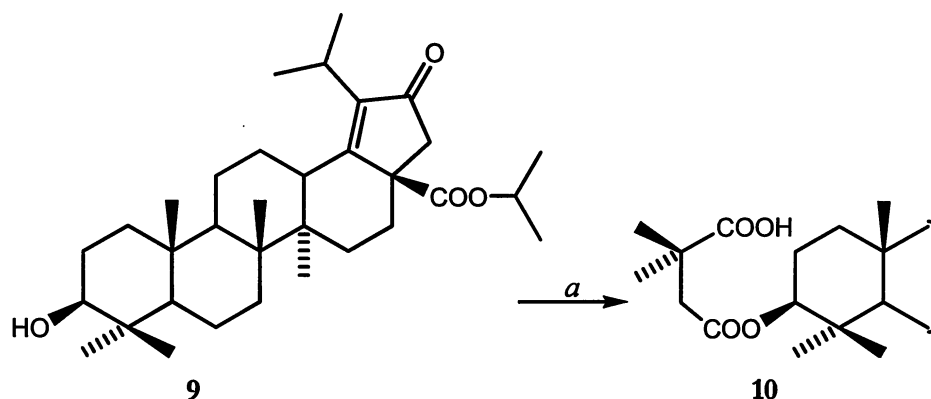


Schéma 6: *a*: 2,2-dimethylsukcinanhydrid, DMAP/Koll., refl.

3.4. 4-chlorbenzyl-ester 11

Esterifikace kyseliny **6** byla prováděna v DMF pomocí 4-chlorbenzylbromidu. Byl připraven 4-chlorbenzyl-ester **11**, po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 81 % (Schéma 7). Tento derivát byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ^1H NMR byl kromě signálů obvyklých pro kyselinu **6** nalezen dublet jednoho vodíku H-31 a při δ 4.91 ppm, s interakční konstantou $J=12.0$ Hz, dublet jednoho vodíku H-31 b při δ 5.27 ppm, s interakční konstantou $J=12.0$ Hz, multiplet dvou vodíků H-33 a H-34 při δ 7.27 ppm a multiplet dvou vodíků H-35 a H-36 při δ 7.33 ppm. Signál pro H-3 α byl zaznamenán při δ 3.17 ppm. V ^{13}C NMR spektrech byl proti látce **6** nalezen signál C-31 při δ 65.69 ppm, C-32 při δ 128.80 ppm, C-33 při δ 130.02 ppm, C-34 při δ 130.02 ppm, C-35 při δ 133.48 ppm, C-36 při δ 134.27 ppm a C-37 při δ 128.80 ppm. Signál C-3 byl zaznamenán při δ 78.84 ppm. V IČ spektru byl zaznamenán výrazný pás OH skupiny při 3345 cm^{-1} . V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

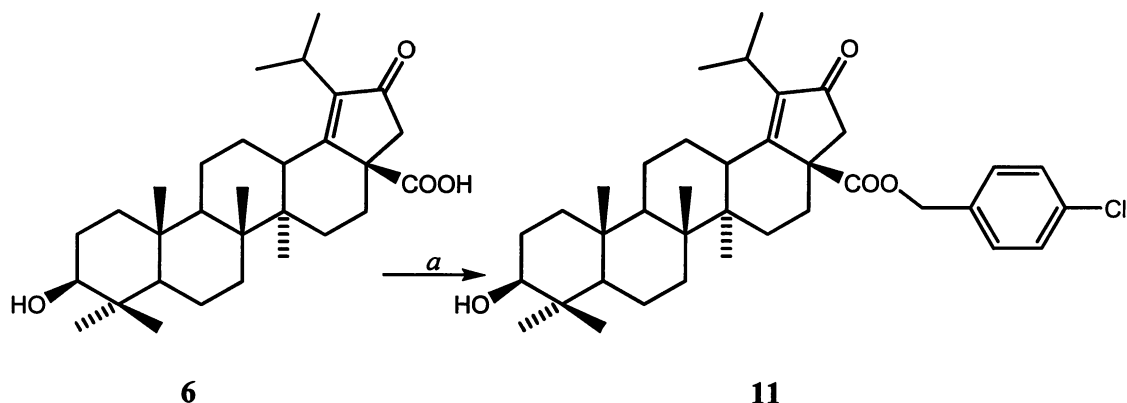


Schéma 7: α : 4-chlorbenzylbromid, K_2CO_3 , NaI/MeCN, DMF, r.t.

3.5. Dimethylhemisukcinát 12

Acylace derivátu **11** byla prováděna 2,2-dimethylsukcinanhydridem za refluxu v kolidinu pod ochrannou argonovou atmosférou. Byl připraven dimethylhemisukcinát **12**, po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 40 % (Schéma 8). Derivát **12** byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ^1H NMR byl kromě signálů obvyklých pro derivát **11** nalezen singlet tří vodíků H-6' při δ 1.29 ppm, singlet tří vodíků H-5' při δ 1.31 ppm, dublet jednoho vodíku H-2' a při δ 2.57 ppm, s interakční konstantou $J=15.6$ Hz, dublet jednoho vodíku H-2' b při δ 2.68 ppm, s interakční konstantou $J=15.6$ Hz. Signál H-3 α byl zaznamenán při δ 4.49 ppm. V ^{13}C NMR spektrech byl proti látce **11** nalezen signál C-1' při δ 170.93 ppm, C-2' při δ 44.68 ppm, C-3' při δ 40.46 ppm, C-4' při δ 182.25 ppm,

C-5' při δ 25.59 ppm a C-6' při δ 25.02 ppm. Signál C-3 byl zaznamenán při δ 81.32 ppm. V IČ spektru byl zaznamenán široký pás karboxylu v oblasti 2600 – 3500 cm^{-1} . V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

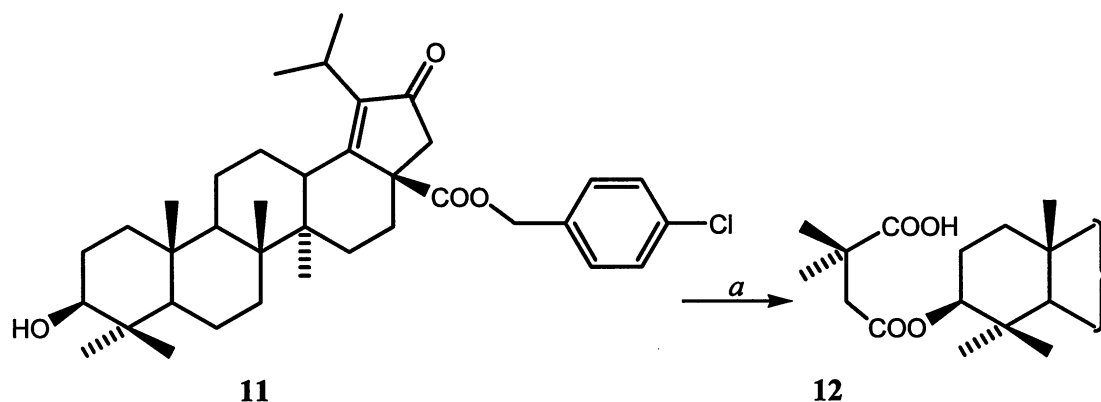


Schéma 8: *a*: 2,2-dimethylsukcinanhydrid, DMAP/Koll., refl.

3.6. Cyklobutylmethyl-ester 13

Esterifikace kyseliny **6** byla prováděna v DMF pomocí cyklobutylmethylbromidu. Byl připraven cyklobutylmethyl-ester **13**, po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 53 % (Schéma 9). Tento derivát byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ^1H NMR byl kromě signálů obvyklých pro kyselinu **6** nalezen dublet dubletu jednoho vodíku H-31*b* při δ 3.97 ppm s interakčními konstantami $J=11.0$ Hz a $J'=6.6$ Hz a dublet dubletu jednoho vodíku H-31*a* při δ 4.15 ppm s interakčními konstantami $J=11.0$ Hz a $J'=6.3$ Hz. Signál pro H-3 α byl pozorován při δ 3.20 ppm. V ^{13}C NMR spektrech byl proti látce **6** nalezen signál C-31 při δ 68.44 ppm, C-33 při δ 24.46 ppm, C-34 při δ 24.41 ppm a C-35 při δ 18.34 ppm. Signál C-3 byl zaznamenán při δ 78.83 ppm. V IČ spektru byl zaznamenán výrazný pás OH skupiny při 3357 cm^{-1} . V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

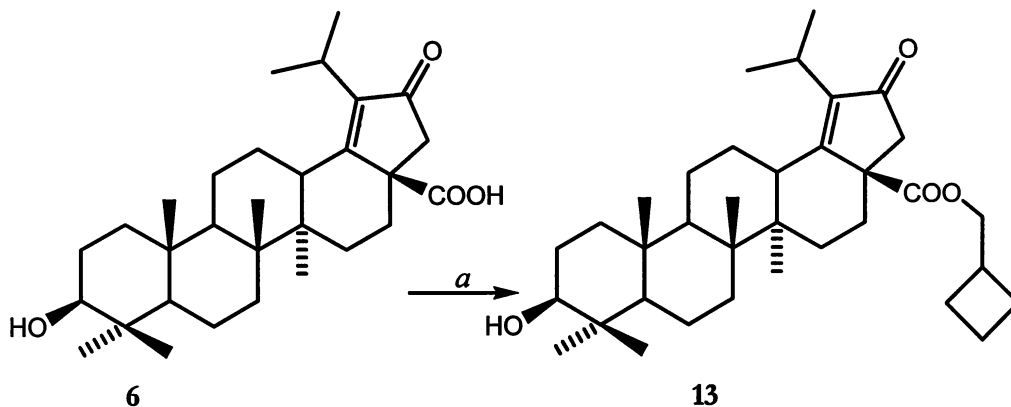


Schéma 9: *a*: cyklobutylmethylbromid, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeCN}$, DMF, r.t.

3.7. Dimethylhemisukcinát 14

Acylace derivátu **13** byla prováděna 2,2-dimethylsukcinanhydridem za refluxu v kolidinu pod ochrannou argonovou atmosférou. Byl připraven dimethylhemisukcinát **14**, po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 54 % (Schéma 10). Derivát **14** byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ^1H NMR byl kromě signálů obvyklých pro derivát **13** nalezen singlet tří vodíků H-6' při δ 1.30 ppm, singlet tří vodíků H-5' při δ 1.32 ppm, multiplet dvou vodíků H-2' při δ 2.56 – 2.68 ppm. Signál pro H-3 α byl zaznamenán při δ 4.51 ppm. V ^{13}C NMR spektrech byl proti látce **13** nalezen signál C-1' při δ 170.94 ppm, C-2' při δ 44.69 ppm, C-4' při δ 182.40 ppm, C-5' při δ 25.01 ppm a C-6' při δ 25.60 ppm. Signál C-3 byl zaznamenán při δ 81.31 ppm. V IČ spektru byl zaznamenán široký pás karboxylu v oblasti 2500 – 3200 cm^{-1} . V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

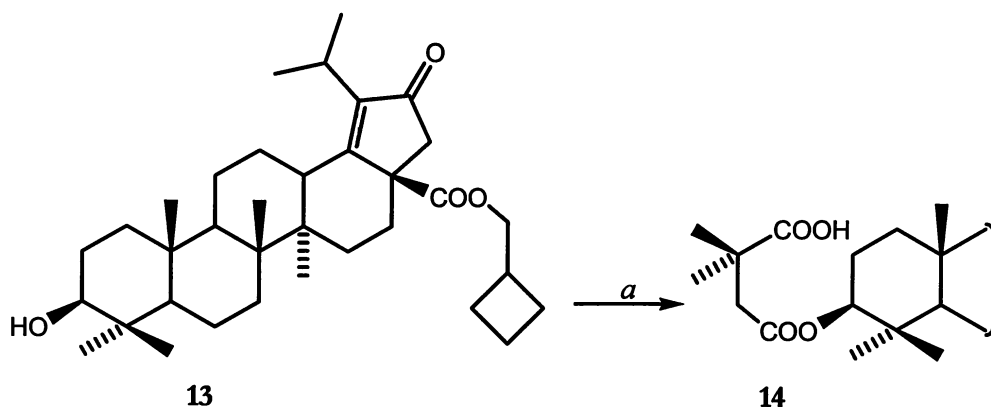


Schéma 10: *a*: 2,2-dimethylsukcinanhydrid, DMAP/Koll., refl.

3.8. Cyklopropylmethyl-ester 15

Esterifikace kyseliny **6** byla prováděna v DMF pomocí cyklopropylmethylbromidu. Byl připraven cyklopropylmethyl-ester **15**, po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 81 % (Schéma 11). Derivát **15** byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ^1H NMR byl kromě signálů obvyklých pro kyselinu **6** nalezen kvartet dvou vodíků H-34 při δ 0.28 ppm, kvartet dvou vodíků H-33 při δ 0.54 ppm, dublet dubletu jednoho vodíku H-31 b při δ 3.86 ppm s interakčními konstantami $J=11.6$ Hz a $J'=7.2$ Hz a dublet dubletu jednoho vodíku H-31 a při δ 4.04 ppm s interakčními konstantami $J=11.6$ Hz a $J'=7.2$ Hz. Signál pro H-3 α byl nalezen při δ 3.21 ppm. V ^{13}C NMR spektrech byl proti látce **6** nalezen signál C-31 při δ 69.41 ppm, C-32 při δ 9.85 ppm, C-33 při δ 3.17 ppm a C-34 při δ 3.01 ppm. Signál C-3

byl zaznamenán při δ 78.83 ppm. V IČ spektru byl zaznamenán výrazný signál pás OH skupiny při 3527 cm^{-1} . V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

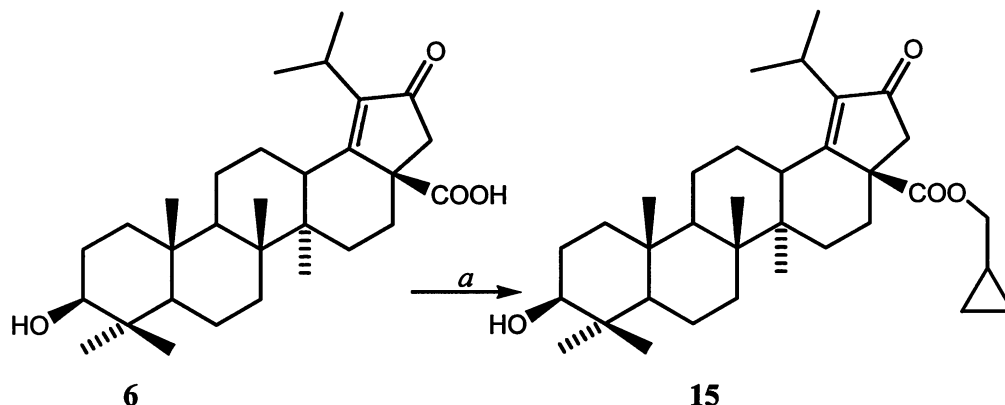


Schéma 11: *a*: cyklopropylmethylbromid, K_2CO_3 / MeCN, DMF, r.t.

3.9. Dimethylhemisukcinát 16

Acylace derivátu **15** byla prováděna 2,2-dimethylsukcinanhydridem za refluxu v kollidinu pod ochrannou argonovou atmosférou. Byl připraven dimethylhemisukcinát **16**, po chromatografické separaci a krystalizaci ve výtěžku 47 % (Schéma 12). Derivát **16** byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ^1H NMR byl kromě signálů obvyklých pro derivát **15** nalezen singlet tří vodíků H-6' při δ 1.30 ppm, singlet tří vodíků H-5' při δ 1.31 ppm, dublet jednoho vodíku H-2'a při δ 2.57 ppm s interakční konstantou $J=16.0\text{ Hz}$ a dublet jednoho vodíku H-2'b při δ 2.68 ppm s interakční konstantou $J=16.0\text{ Hz}$. Signál pro H-3 α byl zaznamenán při δ 4.51 ppm. V ^{13}C NMR spektrech byl proti látce **15** nalezen signál C-1' při δ 170.93 ppm, C-2' při δ 44.67 ppm, C-3' při δ 40.45 ppm, C-4' při δ 82.27 ppm, C-5' při δ 25.01 ppm a C-6' při δ 25.58 ppm. Signál C-3 byl zaznamenán při δ 81.31 ppm. V IČ spektru byl zaznamenán široký pás karboxylu v oblasti $2600 - 3250\text{ cm}^{-1}$. V MS-ESI spektru byl nalezen molekulový iont.

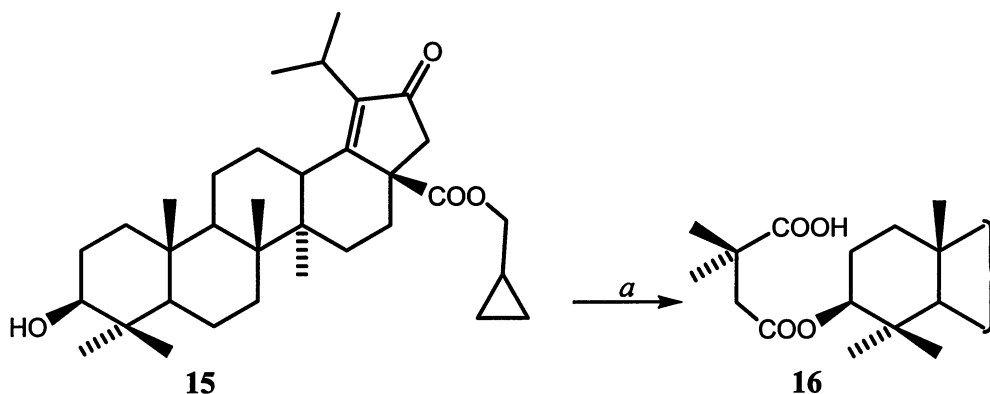


Schéma 12: *a*: 2,2-dimethylsukcinanhydrid, DMAP/Koll., refl.

4. Biologická aktivita připravených sloučenin

4.1. Cytotoxická aktivita

Celkem bylo na *in vitro* cytotoxickou aktivitu metodou MTT-testu na nádorové linii CEM (T-lymfoblastická leukémie) testováno 9 nově připravených sloučenin. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4. Za aktivní jsou považovány sloučeniny s aktivitou $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$. Ze změřených hodnot vyplývá, že acetátové analogy projevují cytotoxicitu nejmenší, hydroxyderiváty vykazují cytotoxicitu vyšší a dimethylsukcináty jsou v každé ze sérií nejaktivnější.

Sloučenina	IC ₅₀ (μmol/l)
	CEM
8	39
9	32
10	28
11	23
12	10
13	–
14	–
15	–
16	–

Tabulka 4: Cytotoxická aktivita připravených sloučenin 8 – 16.

4.2. Anti-HIV aktivita

Anti-HIV aktivita je testována ve spolupráci s kanadskou firmou Virochem Pharma Inc. K testování byly odeslány dimethylhemisukcináty **10**, **12**, **14** a **16**, zatím však nebyly dodány konečné výsledky aktivit sloučenin. Předpokládá se, že by dimethylhemisukcináty 21-oxokyseliny **6** měly vykazovat aktivitu podobnou sloučenině **XV**.

Experimentální část

Obecné poznámky k experimentální části

Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 a jsou korigovány.

Specifické optické otáčivosti byly měřeny v chloroformu na polarimetru AUTOMATIC POLARIMETER, Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) a jsou uvedeny v jednotkách [10^{-1} Deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$], koncentrace, c [g/100 ml] jsou udávány u každé hodnoty specifické optické otáčivosti.

IR spektra byla měřena v KBr na spektrometru Nicolet Avatar 370 FTIR. Vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1} .

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA – 400 (^1H při 399.95 MHz, ^{13}C při 100.58 MHz). Pro ^1H NMR spektra byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3)=77.00$ ppm. Multiplicita signálu v ^{13}C NMR spektrech byla určena z DEPT spekter. Hodnoty chemických posunů (δ stupnice) a interakčních konstant (Hz) v ^1H NMR byly určeny pomocí analýzy prvního řádu. Chemické posuny byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, interakční konstanty na jedno desetinné místo.

Hmotnostní spektra ESI byla měřena na přístroji BRUKER esquire 3000, zavedení vzorku bylo provedeno v roztoku methanolu.

Průběh reakcí a čistota vzorku byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F254 (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (model UVS - 54; 254 nm) a poté postříkáním 10% kyselinou sírovou a zahřátím na 110 - 200°C.

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Kieselgel 60 (63 - 200 μm ; Merck 7734). Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii jsou uvedeny vždy u experimentu.

K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotovapor R - 200).

Veškerá rozpouštědla používaná pro reakce, krystalizace a chromatografie byla předem destilována.

Cytotoxická aktivita byla testována na pracovišti Doc. MUDr. M. Hajdúcha Ph.D., v Laboratoři experimentální medicíny Dětské kliniky FN v Olomouci následujícím způsobem: Testovaná sloučenina byla v šesti různých zředěních přidána ke tkáňové kultuře buněk T-lymfoblastické leukemie CEM v jamkách kultivačního panelu. Každá koncentrace sloučeniny byla testována v dubletu. Inkubace buněčné suspenze v prostředí s analyzovanou sloučeninou trvala 72 hod při 37°C, v 5% atmosféře CO₂ a 100% vlhkosti. Poté byl do každé jamky panelu přidán MTT - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid] a inkubace pokračovala další 4 hodiny. Inkubace byla ukončena přidáním dodekansulfonátu sodného a procento přežívajících buněk bylo stanoveno spektrofotometricky při 540 nm. Z křivek dávkové závislosti je vypočítána koncentrace usmrcující 50 % nádorových buněk TCS₅₀.

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií a sloupcové chromatografie (jsou vždy uvedeny u experimentu)

- A hexan : ethyl-acetát 1:1 (obj.)
- B hexan : diethylether 5:1 (obj.)
- C toluen : diethylether 2:1 (obj.)
- D hexan : ethyl-acetát 5:1 (obj.)

DMAP, kollidin, isooktan, pyridin, 4-chlorbenzylbromid, cyklobutylmethylbromid, cyklopropylmethylbromid a 2,2-dimethylsukcinanhydrid byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, s. r. o.

Acetanhydrid, toluen, ethanol, methanol, ethyl-acetát, chloroform, THF, isopropylalkohol a hexan byly zakoupeny u firmy Brenntag, s. r. o.

Diethylether byl zakoupen u firmy Verkon, s. r. o.

DMF, kyselina sírová, uhličitan draselný, jodid sodný byly zakoupeny u firmy Lach-Ner, s. r. o.

Kyseliny 5 a 6 byly získány z dřívějších přísunů v naší laboratoři podle literatury.^{20,3}

Obecný postup acylace 3 β -hydroxyderivátů

Hydroxyderivát (1.0 mmol) byl rozpuštěn v kollidinu (10.0 ml), byl přidán 2,2-dimethylsukcinanhydrid (2.0-5.0 mmol) a DMAP (0.4 mmol). Směs byla refluxována pod argonovou atmosférou za stálého míchání v digestoři. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Po zreagování byla směs zředěna vodou a vytřepána dvakrát diethyletherem. Organické podíly byly vytřepány zředěnou chlorovodíkovou kyselinou (1:4) a poté vodou do neutrální reakce. Organická fáze byla oddělena a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Odparek byl čištěn gradientovou chromatografií na silikagelu (počáteční mob. fáze D) a poté krystalizován (mobilní fáze chromatografie i krystalizační rozpouštědlo uvedeno u experimentu).

1. Isopropyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (8)

Do roztoku 21-oxokyseliny **5** (5.00 g; 9.77 mmol) v chloroformu (50 ml) byla přidána kapka pyridinu a thionylchlorid (700 μ l; 9.63 mmol). Směs byla refluxována a průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Poněvadž nebyla konverze úplná, byl přidán thionylchlorid (1.0 ml; 13.8 mmol). Po úplné konverzi bylo přidáno do směsi několik kapek mravenčí kyseliny. Následně byl do směsi přidán isopropylalkohol (750 μ l; 9.80 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po úplné konverzi byla reakční směs zředěna vodou a vytřepána do chloroformu. Produkt byl čištěn gradientovou chromatografií na sloupci silikagelu (počáteční mob. fáze D), odpařen na RVO a nakonec krystalován z isopropylalkoholu. Byl získán isopropyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (**8**) (4.56 g; 84 %) o t.t. 225.2 °C, $[\alpha]_D$ -26.0 (c 0.25). IČ spektrum: 1612 (C=C), 1729 (C=O), 1735 (C=O). ¹H NMR spektrum: δ 0.84 s, 3H; 0.86 s, 3H; 0.91 s, 3H; 0.93 s, 3H; 1.03 s, 3H (5 \times CH₃); 1.20 d, 3H (J=6.0Hz, H-32, H-33); 1.21 s, 3H (H-30); 1.22 s, 3H (H-29); 2.05 s, 3H (OCOCH₃); 2.10 d, 1H (J=18.4Hz, H-22a); 2.43 d, 1H (J=18.4Hz, H-22b); 2.46 m, 1H; 2.68 dd, 1H (J=12.8Hz, J'=3.2Hz, H-13 β); 3.19 septet, 1H (J=6.8Hz, H-20); 4.49 dd, 1H (J=10.8Hz, J'=5.6Hz, H-3 α); 5.01 septet, 1H (J=6.0Hz, H-31). ¹³C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5a. MS-ESI, m/z: [Pro C₃₅H₅₄O₅, M⁺ 554], 555 [M+H]⁺.

2. Isopropyl-3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (9)

Ester **8** (2.2 g; 3.97 mmol) byl hydrolyzován ve směsi dioxanu (12.7 ml; 150.0 mmol), isopropylalkoholu (10.0 ml; 131.28 mmol), konc. kyseliny chlorovodíkové (1.0 ml), kyseliny bromovodíkové (1.0 ml) a vody (1.0 ml). Směs byla míchána za teploty 37 °C po dobu 4 dní. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po ukončení reakce byla směs nalita do roztoku vody s jarem a došlo k vysrážení produktu. Sraženina byla odsáta a vysušena na fritě. Byl připraven isopropyl-3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (**9**) (2.0 g; 98.5 %) s t. t. 102 – 103 °C, $[\alpha]_D$ -26.3 (c 0.25). IČ spektrum: 1610 (C=C), 1707 (C=O), 1718 (C=O), 3328 (OH). ¹H NMR spektrum: δ 0.77 s, 3H; 0.88 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.98 s, 3H; 1.03 s 3H (5 \times CH₃); 1.21 d, 3H (J=6.4Hz, H-32, H-33); 1.20 bs, 3H (H-30); 1.21 bs, 3H (H-29); 2.11 d, 1H (J=18.8Hz, H-22a); 2.43 d, 1H (J=18.8Hz, H-22b); 2.48 m, 1H; 2.69 dd, 1H (J=12.8Hz, J'=3.2Hz, H-13 β); 3.20 septet, 1H (J=5.2Hz, H-20); 5.01 septet, 1H (J=6.0Hz, H-31). ¹³C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5a. MS-ESI, m/z: [Pro C₃₃H₅₂O₄M⁺ 512], 513 [M+H]⁺.

3. Isopropyl-3 β -O-(3',3'-dimethylhemisukcinyloxy)-21-oxolup-18-en-28-oát (10)

Podle obecného postupu byl reakcí isopropylesteru **9** (2.0 g; 3.9 mmol) s 2,2-dimethylsukcinanhydridem (1.0 g; 7.8 mmol) připraven hemiester **10**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po krystalizaci z isooktanu byl získán hemiester **10** (600 mg; 24 %), jako bílé krystalky o t. t. 211.6 °C, $[\alpha]_D$ -26.9 (c 0.25). IČ spektrum: 1599 (C=C), 1724 (C=O), 3301 (OH), 2550 – 3500 (COOH). ¹H NMR spektrum: δ 0.81 s, 3H; 0.84 s, 3H; 0.89 s, 3H; 0.93 s, 3H; 1.03 s, 3H (5 \times CH₃); 1.20 d, 3H (J=6.0Hz, H-32, H-33); 1.21 s, 3H (H-30), 1.22 s, 3H (H-29); 1.30 d, 3H (J=6.4Hz, H-6', H-5'); 2.11 d, 1H (J=24.8Hz, H-22a); 2.43 d, 1H (J=18.4Hz, H-22b); 2.46 m, 1H; 2.63 dd, 1H (J=46.4Hz, J'=5.2Hz, H-13 β); 3.19 septet, 1H (J=6.8Hz, H-20); 4.49 dd, 1H (J=11.2Hz, J'=5.2Hz, H-3 α); 5.01 septet, 1H (J=6.0Hz, H-31). ¹³C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5a. MS-ESI, m/z: [Pro C₃₉H₆₀O₇M⁺ 640], 641 [M+H]⁺.

4. 4-chlorbenzyl-3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (11)

Do roztoku 21-oxokyseliny **6** (2.0 g; 4.25 mmol) v acetonitrilu (5.0 ml) a DMF (20.0 ml) byl přidán uhličitan draselný (650 mg; 4.7 mmol), 4-chlorbenzylbromid (800 mg; 4.7 mmol) a jodid sodný (700 mg; 4.7 mmol). Směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po úplné konverzi byla reakční směs zředěna

vodou a vytřepána diethyletherem. Organické podíly byly spojeny a odpařeny na RVO. Po gradientové chromatografii (poč. mob. fáze B) na silikagelu a krystalizaci z isooktanu byl získán ester **11** (2.05 g; 81 %), jako bílé krystalky o t. t. 96.6 °C, $[\alpha]_D$ 0, (c 0.25). IČ spektrum: 1610 (C=C), 1700 (C=O), 1735 (C=O), 3345 (OH). ^1H NMR spektrum: δ 0.71 s, 3H; 0.76 s, 3H; 0.86 s, 3H; 0.89 s, 3H; 0.96 s, 3H ($5\times\text{CH}_3$); 1.20 d, 1H ($J=7.2$ Hz, H-35, H-36); 1.22 d, 1H ($J=7.2$ Hz, H-32, H-33); 2.11 d, 1H ($J=18.4$ Hz, H-22a); 2.26 dd, 1H ($J=9.2$ Hz, $J'=6.8$ Hz, H-13 β); 2.43 m, 1H (H-16 β); 2.48 d, 1H ($J=18.4$ Hz, H-22b); 3.17 m, 2H (H-20, H-3 α); 4.91 d, 1H ($J=12.0$ Hz, H-31a); 5.27 d, 1H ($J=12.0$ Hz, H-31b); 7.27 m, 2H (H-32, H-36); 7.33 m, 2H (H-33, H-35). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5a. MS-ESI, m/z: [Pro $\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{ClO}_4$, M^+ 594], 617 [M+Na] $^+$.

5. 4-chlorbenzyl-3 β -O-(3',3'-dimethylhemisukcinyloxy)-21-oxolup-18-en-28-oát (12)

Podle obecného postupu byl reakcí 4-chlorbenzylesteru **11** (1.7 g, 2.78 mmol) s 2,2-dimethylsukcinanhydridem (710.0 mg, 5.55 mmol) připraven hemiester **12**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po gradientové chromatografii (počáteční mob. fáze C) na silikagelu a krystalizaci z isooktanu byl získán hemiester **12** (800 mg; 40 %), jako bílé krystalky o t. t. 131.7 °C, $[\alpha]_D$ 0 (c 0.25). IČ spektrum: 1612 (C=C), 1703 (C=O), 1733 (C=O), 2600 – 3500 (COOH). ^1H NMR spektrum: δ 0.69 s, 3H; 0.80 s, 3H; 0.83 s, 3H; 0.87 s, 3H; 0.88 s, 3H ($5\times\text{CH}_3$); 1.20 s, 3H (H-30); 1.22 s, 3H (H-29); 1.29 s, 3H (H-6 γ); 1.31 s, 3H (H-5 γ); 2.12 d, 1H ($J=18.4$ Hz, H-22 α); 2.48 d, 1H ($J=18.4$ Hz, H-22 β); 2.57 d, 1H ($J=15.6$ Hz, H-2'a); 2.68 d, 1H ($J=15.6$ Hz, H-2'b); 3.17 septet, 1H ($J=7.2$ Hz, H-20); 4.49 dd, 1H ($J=11.2$ Hz, $J'=5.2$ Hz, H-3 α); 4.90 d, 1H ($J=12.4$ Hz, H-31a); 5.27 d, 1H ($J=12.4$ Hz, H-31b); 7.27 m, 2H (H-32, H-36); 7.33 m, 2H (H-33, H-35). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5a. MS-ESI, m/z (negativní mód): [Pro $\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{ClO}_7$, M^+ 722], 721 [M-H] $^-$.

6. Cyklobutylmethyl-3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (13)

Do roztoku 21-oxokyseliny **6** (4.0 g; 8.4 mmol) v acetonitrilu (6.0 ml) a DMF (40.0 ml) byl přidán uhličitan draselný (2.0 g; 14.5 mmol) a cyklobutylmethylbromid (1.5 g; 10.1 mmol). Směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po úplné konverzi byla reakční směs zředěna vodou a 3 \times vytřepána diethyletherem. Organické podíly byly spojeny a odpařeny na RVO. Po odstranění výchozí kyseliny **6** na oxidu hlinitém (mob. fáze diethylether) a krystalizaci z isooktanu byl získán ester **13** (2.4 g; 53%), jako bílé krystalky o t. t. 95.0 °C, $[\alpha]_D$ -33.8, (c 0.34). IČ spektrum: 1611 (C=C), 1702 (C=O),

1728 (C=O), 3357 (OH). NMR spektra měřena na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA – 300 (¹H při 299.94 MHz, ¹³C při 75.43 MHz) v roztoku CDCl₃. ¹H NMR spektrum: δ 0.77 s, 3H; 0.89 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.98 s, 3H; 1.04 s, 3H (5×CH₃); 1.21 bs, 3H (H-29); 1.21 bs, 3H (H-29); 2.13 d, 1H (J=18.6 Hz, H-22b) ; 2.46 d, 1H (J=18.6 Hz, H-22a); 2.66 dd, 1H (J=12.5 Hz, J'=3.9 Hz, H-13β); 3.15 – 3.25 m, 2H (H-3α, H-20); 3.97 dd, 1H (J=11.0 Hz, J'=6.6 Hz, H-31b); 4.15 dd, 1H (J=11.0 Hz, J'=6.3 Hz, H-31a); ¹³C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5b. MS-ESI, m/z: [Pro C₃₅H₅₄O₄, M⁺ 538], 539 [M+H]⁺

7. Cyklobutylmethyl-3β-O-(3',3'-dimethylhemisukcinyloxy)-21-oxolup-18-en-28-oát (14)

Podle obecného postupu byl reakcí cyklobutylmethyl-esteru **13** (2.4 g, 4.46 mmol) s 2,2-dimethylsukcinanhydridem (1.2 g, 9.4 mmol) připraven hemiester **14**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po gradientové chromatografii (počáteční mob. fáze B) na silikagelu a krystalizaci z isooktanu byl získán hemiester **14** (1.6 g; 54 %), jako bílé krystalky o t. t. 151.9 °C, [α]_D –18.6 (c 0.3). IČ spektrum: 1611 (C=C), 1703 (C=O), 1731 (C=O) 2500 – 3200 (COOH). ¹H NMR spektrum: δ 0.82 s, 3H; 0.85 s, 3H; 0.90 s, 3H; 0.93 s, 3H; 1.03 s, 3H (5×CH₃); 1.22 bs, 3H (H-29); 1.20 bs, 3H (H-30); 1.30 s, 3H (H-6'); 1.32 s, 3H (H-5'); 2.46 d, 1H (J=18.4 Hz, H-22b); 2.44 – 2.53 m, 2H (H-16); 2.56 – 2.68 m, 2H (H-2'a, H-2'b); 2.63 dd, 1H (J=42.6 Hz, J'=16.0 Hz, H-13β); 3.20 septet, 1H (J=6.8 Hz, H-20); 3.96 dd, 1H (J=10.8 Hz, J'=6.4 Hz, H-31b); 4.14 dd, 1H (J=11.0 Hz, J'=6.4 Hz, H-31a); 4.51 dd, 1H (J=11.2 Hz, J'=5.2 Hz, H-3α). ¹³C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5b. MS-ESI, m/z: [Pro C₄₁H₆₂O₇, M⁺ 666], 689 [M+Na]⁺.

8. Cyklopropylmethyl-3β-hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (15)

Do roztoku 21-oxokyseliny **6** (4.0 g; 8.50 mmol) v acetonitrilu (6.0 ml) a DMF (12.0 ml) byl přidán uhličitan draselný (1.2 g; 9.0 mmol) a cyklopropylmethylbromid (0.87 ml; 1.22 g; 9.0 mmol). Směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po úplné konverzi byl produkt vysrážen do vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové o pH 4-5 a následně odsát na fritě. Produkt byl sušen při teplotě 50 °C a čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mob. fáze toluen). Po vysušení na olejové vývěvě z chloroformu byl získán ester **15** (1.75 g; 40 %), jako bílé krystalky o t. t. 181.4 °C, [α]_D –40.7, (c 0.25). IČ spektrum: 1611 (C=C), 1702 (C=O), 1730 (C=O), 3527 (OH). ¹H NMR spektrum: δ 0.28 q, 2H (H-34); 0.54 q, 2H (H-33); 0.77 s, 3H; 0.88 s, 3H; 0.95 s, 3H; 0.98 s, 3H; 1.04 s 3H (5×CH₃); 1.21 bs, 3H (H-30); 1.22 bs, 3H (H-29); 1.70 – 1.80 m, 1H;

1.83 – 1.96 m, 2H; 1.97 – 2.05 m, 1H; 2.73 dd, 1H ($J=12.8$ Hz, $J'=3.2$ Hz, H-13 β); 3.16 – 3.26 m, 2H (H-20, H-3 α); 2.13 d, 1H ($J=18.4$ Hz, H-22b); 2.48 d, 1H ($J=18.8$ Hz, H-22a); 3.86 dd, 1H ($J=11.6$ Hz, $J'=7.2$ Hz, H-31b); 4.04 dd, 1H ($J=11.6$ Hz, $J'=7.2$ Hz, H-31a); ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5b. MS-ESI, m/z: [Pro C₃₄H₅₂O₄, M⁺ 524], 525 [M+H]⁺.

9. Cyklopropylmethyl-3 β -O-(3',3'-dimethylhemisukcinyloxy)-21-oxolup-18-en-28-oát (16)

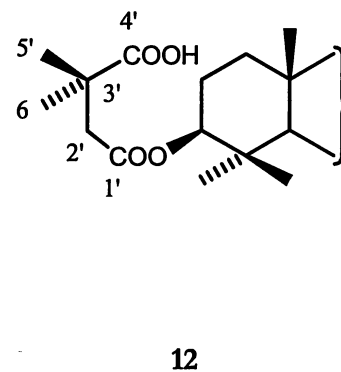
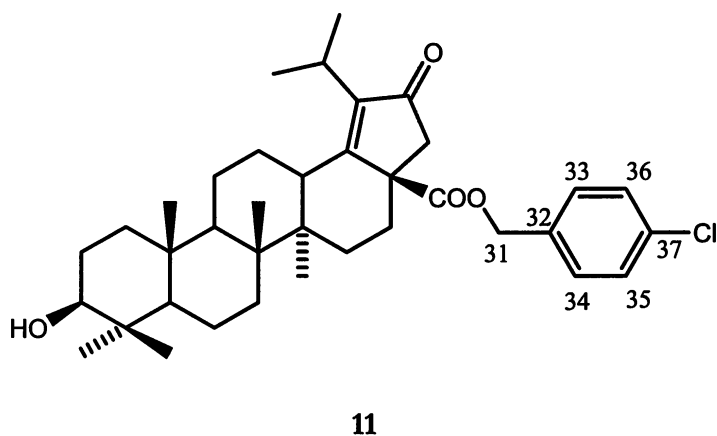
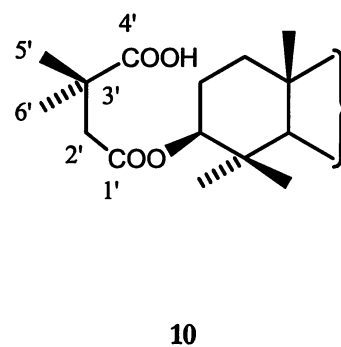
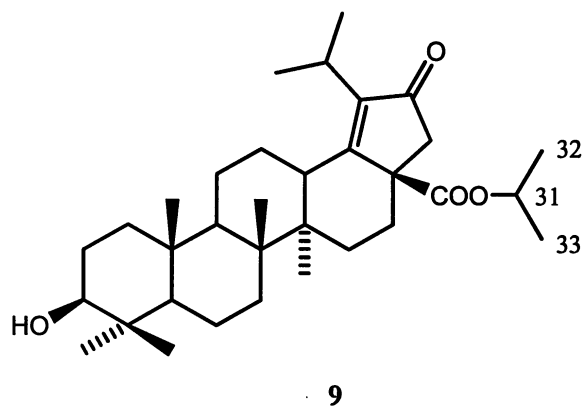
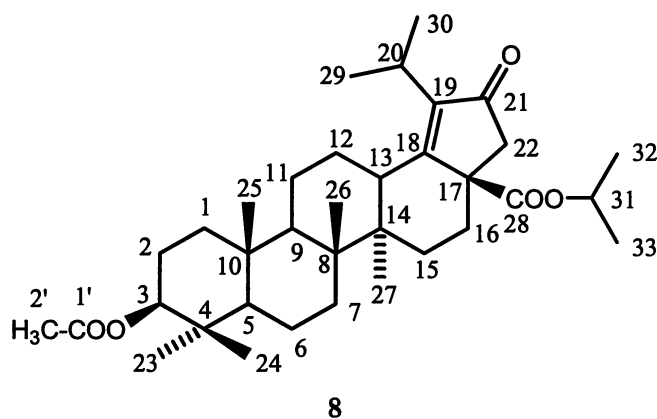
Podle obecného postupu byl reakcí cyklopropylmethylesteru **15** (1.5 g; 2.86 mmol) s 2,2-dimethylsukcinanhydridem (500.0 mg; 3.91 mmol) připraven hemiester **16**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (fáze A). Po gradientové chromatografii (počáteční mob. fáze B) a krystalizací z isooktanu byl získán hemiester **16** (870 mg; 47 %), jako bílé krystalky o t. t. 113.1 °C, $[\alpha]_{\text{D}} -22.9$ (c 0.25). IČ spektrum: 1611 (C=C), 1703 (C=O), 1731 (C=O), 2600 – 3250 (COOH). ^1H NMR spektrum: δ 0.81 s, 3H; 0.84 s, 3H; 0.89 s, 3H; 0.94 s, 3H; 1.03 s, 3H (5 \times CH₃); 1.21 d, 3H ($J=2.8$ Hz, H-33, H-34); 1.21 bs, 3H (H-30); 1.22 bs, 3H (H-29); 1.30 s, 3H (H-6 γ); 1.31 s, 3H (H-5 γ); 2.14 d, 1H ($J=18.4$ Hz, H-22a); 2.48 d, 1H ($J=18.4$ Hz, H-22b); 2.57 d, 1H ($J=16.0$ Hz, H-2'a); 2.68 d, 1H ($J=16.0$ Hz, H-2'b); 3.20 septet, 1H ($J=6.8$ Hz, H-20); 3.86 dd, 1H ($J=11.4$ Hz, $J'=7.6$ Hz, H-31b); 4.03 dd, 1H ($J=8.0$ Hz, $J'=7.6$ Hz, H-31a); 4.51 dd, 1H ($J=12.0$ Hz, $J'=4.8$ Hz, H-3 α). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 5b. MS-ESI, m/z (negativní mód): [Pro C₄₀H₆₀O₇, M⁺ 652], 651 [M-H]⁻.

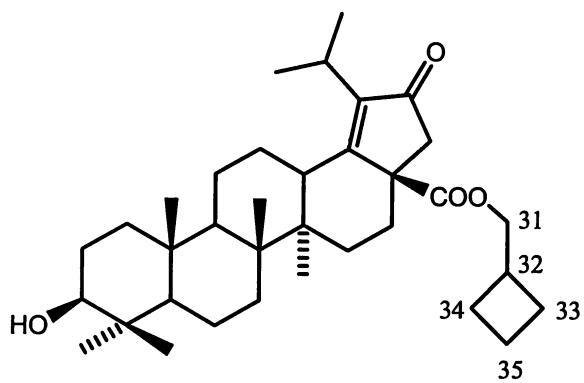
Tabulky ^{13}C NMR spekter

Přiřazení signálů ^{13}C NMR spekter bylo provedeno na základě DEPT spekter a podle analogií.

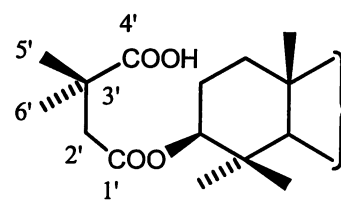
Číslování skeletu

Uhlíkové atomy byly v NMR spektrech číslovány takto: Postranní řetězec navázaný na uhlík C-28 bude počítat C-31, postranní řetězec navázaný na C-3 bude označen čísly s čárkou a bude počítat C-1'.

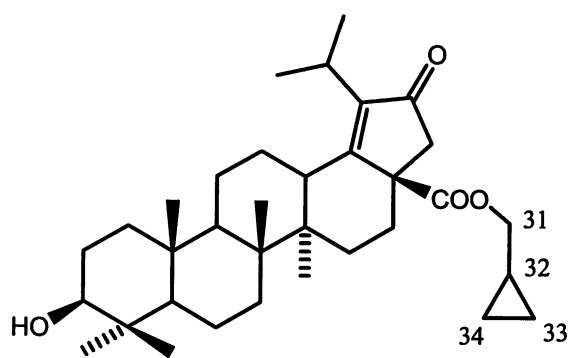




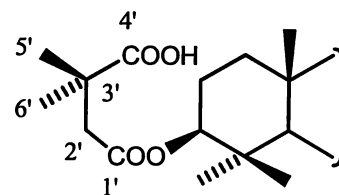
13



14



15



16

Atom C	Sloučenina				
	8	9	10	11	12
1	38.58	38.91	38.56	38.88	38.54
2	23.61	27.32	23.53	nenalezen	23.52
3	80.71	78.85	81.32	78.84	81.32
4	37.77	38.85	37.71	38.83	37.70
5	55.42	55.35	55.43	55.35	55.43
6	18.10	18.22	18.08	18.18	18.05
7	34.80	34.90	34.78	34.89	34.79
8	41.30	41.30	41.30	41.20	41.20
9	51.03	51.15	51.00	51.10	50.96
10	37.12	37.22	37.11	37.18	37.07
11	21.28	21.27	21.30	21.00	21.02
12	27.66	27.72	27.65	27.62	27.55
13	45.16	45.22	45.16	45.25	45.19
14	45.04	45.08	45.04	45.10	45.07
15	29.06	29.08	29.06	28.81	28.79
16	33.33	33.36	33.33	33.43	33.40
17	52.93	52.95	52.94	52.84	52.83
18	171.92	172.08	171.94	171.74	171.64
19	145.60	145.57	145.62	145.59	145.64
20	25.09	25.11	25.10	25.11	25.11
21	207.37	207.42	207.44	207.13	207.18
22	47.61	47.63	47.60	47.36	47.35
23	27.91	27.95	27.89	27.94	27.89
24	16.50	15.38	16.53	15.85	16.36
25	16.61	16.63	16.62	16.39	16.53
26	16.79	16.73	16.76	16.66	16.68
27	15.88	15.93	15.90	15.37	15.83
28	173.78	173.78	173.78	173.76	173.76
29	19.86	19.87	19.87	19.86	19.87
30	20.20	20.19	20.20	20.28	20.30
31	68.25	68.27	68.26	65.69	65.68
32	21.50	21.51	21.50	134.48	134.46
33	21.59	21.60	21.59	130.02	130.04
34	-	-	-	128.80	128.80
35	-	-	-	134.27	134.29
36	-	-	-	130.02	130.04
37	-	-	-	128.80	128.80
1'	170.97	-	170.94	-	170.93
2'	nenalezen	-	44.67	-	44.68
3'	-	-	40.44	-	40.45
4'	-	-	182.11	-	182.25
5'	-	-	25.58	-	25.59
6'	-	-	25.02	-	25.02

Tabulka 5a: ^{13}C NMR spektra sloučenin 8 – 12

Atom C	Sloučenina			
	13*	14	15	16
1	38.89	38.57	38.89	38.56
2	27.30	23.53	27.31	23.53
3	78.83	81.31	78.83	81.31
4	38.83	37.71	38.84	37.71
5	55.33	55.43	55.36	55.44
6	18.21	18.09	18.22	18.09
7	34.90	34.81	34.92	34.82
8	41.26	41.28	41.28	41.28
9	51.14	51.01	51.15	51.02
10	37.20	37.11	37.21	37.11
11	21.25	21.28	21.27	21.29
12	27.75	27.70	27.72	27.66
13	45.41	45.36	45.27	45.22
14	45.09	45.07	45.13	45.11
15	29.07	29.06	29.09	29.07
16	33.36	33.34	33.51	33.48
17	53.13	53.14	53.08	53.08
18	171.89	171.76	172.07	171.95
19	145.60	145.66	145.54	145.60
20	25.11	25.12	25.11	25.11
21	207.29	207.33	207.36	207.41
22	47.74	47.72	47.64	47.62
23	27.94	27.89	27.95	27.89
24	15.92	16.52	15.94	16.53
25	16.70	16.79	16.69	16.77
26	16.76	16.69	16.75	16.67
27	15.37	15.91	15.38	15.92
28	174.36	174.37	174.41	174.41
29	19.87	19.88	19.92	19.92
30	20.14	20.16	20.16	20.17
31	68.44	68.45	69.41	69.41
32	nenalezen	nenalezen	9.86	9.85
33	24.46	24.47	3.17	3.17
34	24.41	24.42	3.00	3.01
35	18.34	18.35	-	-
1'	-	170.94	-	170.93
2'	-	44.69	-	44.67
3'	-	nenalezen	-	40.45
4'	-	182.40	-	182.27
5'	-	25.01	-	25.01
6'	-	25.60	-	25.58

Tabulka 5b: ^{13}C NMR spektra sloučenin **13** – **16**

* NMR spektrum měřeno na přístroji Varian UNITYINOVA – 300 (při 75.43 MHz) v roztoku CDCl_3 .

Závěr

1. Byla provedena literární rešerše přípravy a cytotoxické aktivity derivátů kyseliny betulinové (**II**).
2. Celkově bylo připraveno a plně charakterizováno 9 dosud nepopsaných sloučenin **8 – 16**.
3. Sloučeniny **8 – 16** byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii CEM metodou MTT testu, přičemž byla nalezena u derivátu **12** cytotoxická aktivita $IC_{50} = 10 \mu\text{mol/l}$ a u derivátů **8 – 11** $IC_{50} > 10 \mu\text{mol/l}$.

Literatura

1. Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **23**, 394 (2006).
2. Kvasnica M., Sarek J., Klinotova E., Dzubak P., Hajduch M.: *Bioorg. Med. Chem* **13**, 3447 (2005).
3. Sarek J., Kvasnica M., Urban M., Klinot J., Hajduch M.: *Bioorg. Med. Chem. Letters* **15**, 4196 (2005).
4. <http://listnate-kere.atlasrostlin.cz/briza-belokora>.
5. Simonsen J., Ross W. C. J.: *The Terpenes*, vol. IV., Cambridge, 287 (1957).
6. Trumbull E. R., Bianchi E., Eckert D. J., Wiedhopf R. M., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.* **65**, 1407 (1976).
7. Hajduch M., Dzubak P., Sarek J.: *Klin Farmakol Farm* **18**, 14 (2004).
8. Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Gupta T. K. D., Pezzuto J. M.: *Nat. Med.* **1**, 1046 (1995).
9. Zuco V., Supino R., Righetti S. C.: *Cancer Lett.* **175**, 17 (2002).
10. Urban M., Klinot J., Tislerova I., Biedermann D., Hajduch M., Cisarova I., Sarek J.: *J. Synth. Org. Chem* **23**, 3979 (2006).
11. Urban M., Sarek J., Tislerova E., Dzubak P., Hajduch M.: *Bioorg. Med. Chem* **13**, 5527 (2005).
12. Kubelka T., *Bakalářská práce*, UK, Praha 2007.
13. Baltina L. A., Flekhter O. B., Nigmatullina L. R., Boreko E. I., Pavlova N. I., Nikolaeva S. N., Savinova O. V., Tolstikov G. A.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3549 (2003).
14. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen Ch-H., Garrett P. E., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* **39**, 1016 (1996).
15. Sun I-Ch., Shen J-K., Wang H-K., Cosentino L. M., Lee K-H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1267 (1998).
16. http://www.panacos.com/product_pipeline.htm a <http://clinicaltrials.gov>
17. Urban M., Sarek J., Kvasnica M., Tislerova I., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* **70**, 526 (2007).

18. Hajduch M., Sarek J.: Patent Appl. WO0190046, 23 May 2001.
19. Sarek J., Klinot J., Dzubak P., Klinotova E., Noskova V., Krecek V., Korinkova G., Thomson J. O., Janostakova A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N.Z., Hajduch M.: J. Med. Chem.: **46**, 5402 (2003).
20. Hajduch M., Sarek J.: Patent Appl. WO0190136, 23 May 2001.

Poděkování

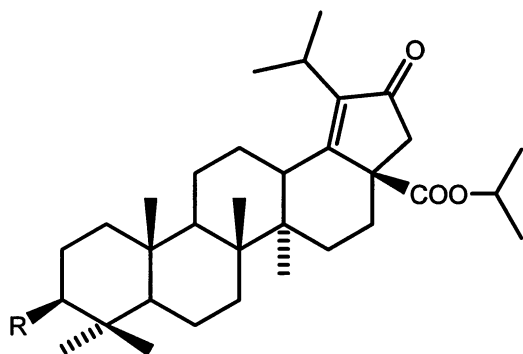
Na závěr bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Janu Šarkovi, Ph.D., za mnoho hodin, které mi věnoval, za nespočetné množství rad a konzultací a za pomoc při interpretaci spekter.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. S. Hybelbauerové za měření NMR spekter, RNDr. S. Hilgardovi, CSc. za měření IR spekter, RNDr. M. Štíchovi za měření MS spekter a Mgr. B. Šperlichové za měření specifických optických rotací. Děkuji také Doc. MUDr. M. Hajdúchovi, Ph.D. a MUDr. P. Džubákovi, Ph.D. z Laboratoře experimentální medicíny FN Olomouc za měření cytotoxických aktivit nově připravených sloučenin.

Mnohé díky patří i všem kolegům z laboratoře, kteří mi pomohli v začátcích mé práce a také za užitečné rady. Za psychickou podporu a opakované zapůjčení lodičky děkuji Bc. M. Tichému, za změření posledních NMR spekter patří díky Bc. O. Štěpánkovi, za množství rad děkuji zejména Mgr. D. Biedermannovi, M. Vlkovi a Mgr. P. Spáčilové. Nelze samozřejmě opomenout mé vděčné poděkování Bc. T. Kubelkovi, za poskytnutí ohromného pracovního prostoru a objemného množství rozpouštědel. Přeučtivě též děkuji Bc. L. Ducháčkové za množství času, který se mnou sdílela v údobí přednáškovém.

Největší dík patří mé rodině za finanční a gastronomickou podporu toliko potřebnou ke studiu a vypracování této práce a také mým přátelům za zajištění ideálních odpočinkových programů.

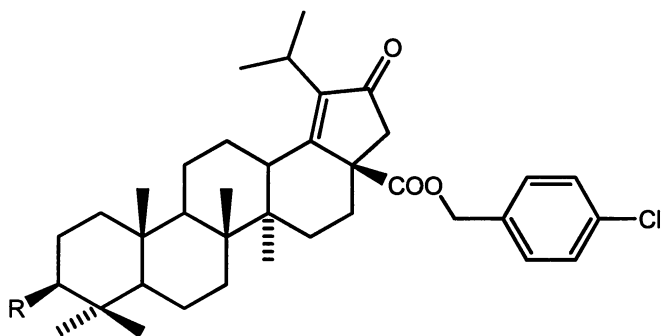
Vzorce připravených sloučenin



8, R = OAc

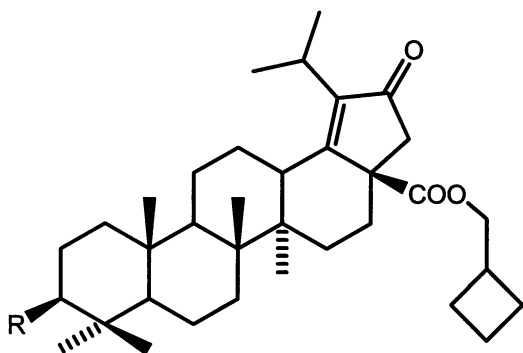
9, R = OH

10, R = HOCC(CH₃)₂CH₂COO



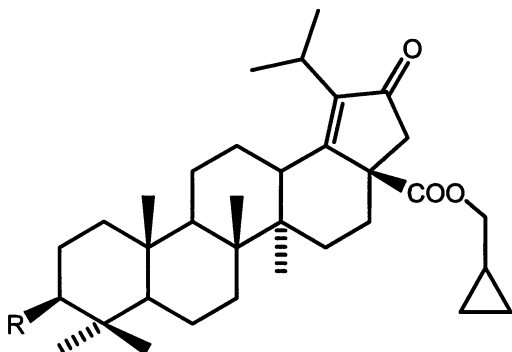
11, R = OH

12, R = HOCC(CH₃)₂CH₂COO



13, R = OH

14, R = HOCC(CH₃)₂CH₂COO



15, R = OH

16, R = HOCC(CH₃)₂CH₂COO