

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie



**Příprava hemiesterů fluorovaných triterpenoidů  
s biologickou aktivitou**

**Kateřina Frišonsová**

Bakalářská práce  
Klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře organické a jaderné chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v letech 2006-2007 pod vedením RNDr. Jana Šarka, Ph.D.

## Seznam použitých zkratk

DAST	<i>N,N</i> -diethyl- <i>N</i> -(1,1,1-trifluoro- $\lambda$ -sulfanyl)amin
DMAP	4-( <i>N,N</i> -dimethylamino)-pyridin
EtOH	ethanol
IR	infračervené spektrum
MCPBA	3-chlorperoxybenzoová kyselina
MS	hmotnostní spektrum
PCC	pyridinium chlorochromát
pyr	pyridin
refl.	reflux
r.t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
<i>t</i> -BuOH	2-methylpropan-2-ol
<i>t</i> -BuOK	2-methylprop-2-oxid draselný
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie

## Seznam nádorových linií

A-549	lidský plicní karcinom
A-2780	lidský ovariální karcinom
CEM	lidská T-lymfoblastická leukémie
GROV-1	lidský ovariální karcinom
MEL-1	lidský melanom
MEL-2	lidský melanom
OVCAR-3	lidský ovariální karcinom
P-388	lymfocytální leukemie

## Poznámka k číslování

V této práci budou použity dva druhy číslování sloučenin. Sloučeniny nepřipravované v této práci budou označeny *římskými* číslicemi. Výchozí triterpenické sloučeniny a rovněž sloučeniny nové, které byly v této práci připraveny, budou označeny číslicemi *arabskými* a malými písmeny.

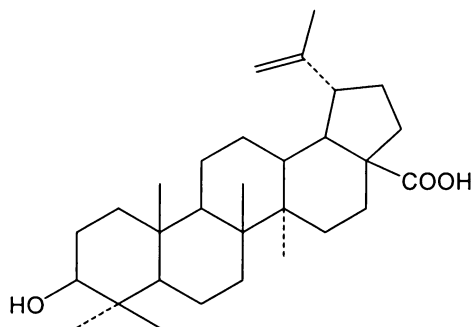
# Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	3
SEZNAM NÁDOROVÝCH LINÍ.....	3
OBSAH.....	4
ÚVOD.....	5
CÍLE.....	5
TEORETICKÁ ČÁST.....	6
<b>1. Současný stav studované problematiky.....</b>	<b>7</b>
1.1. Triterpenoidy s protinádorovou aktivitou.....	7
1.2. Anti-HIV aktivita lupanových triterpenoidů .....	9
1.3. Fluorderiváty triterpenoidů.....	10
1.4. Hemiesterly lupanových triterpenoidů a jejich biologická aktivita.....	12
<b>2. Příprava výchozích sloučenin .....</b>	<b>15</b>
2.1 Příprava výchozích sloučenin <b>1a</b> a <b>1g</b> .....	15
2.1.1 Příprava difluoralkoholu <b>1c</b> .....	16
<b>3. Příprava hemiesterů fluorovaných 18<math>\alpha</math>-oleananových derivátů.....</b>	<b>17</b>
3.1. Hemisukcináty <b>1h</b> , <b>1d</b> .....	18
3.2. Hemiglutaráty <b>1e</b> , <b>1f</b> .....	19
<b>4. Cytotoxická aktivita připravených sloučenin.....</b>	<b>21</b>
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	22
TABULKY <sup>13</sup> C NMR SPEKTER.....	28
ZÁVĚR.....	29
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	30
PODĚKOVÁNÍ.....	32
PŘÍLOHA.....	33

# ÚVOD

V současné době dochází k citelnému nárůstu počtu nádorových onemocnění, která se tak stávají nejběžnějšími nemocemi vůbec. Podle statistik postihne některá forma rakoviny jednu třetinu populace a způsobí přes 20% všech úmrtí<sup>1</sup>. Vzhledem k této skutečnosti roste poptávka po nových cytostaticích. Jednou z možných cest řešení je snaha o syntézu nových látek s protinádorovou aktivitou, u nichž je nejdůležitější charakteristikou vysoký terapeutický index, široké spektrum účinnosti a také snadná dostupnost.

Od 70. let 20. století dochází k významným objevům vysoké biologické aktivity u přírodních látek na bázi triterpenoidů<sup>2</sup>. Patří mezi ně zejména deriváty lupanových, oleananových, ursanových a dammaran-eufanových triterpenů, vyznačující se protinádorovými, antibakteriálními, anti-HIV a dalšími účinky<sup>3</sup>. Jedním z prvních triterpenoidů, u kterých byly pozorovány protinádorové účinky, byla kyselina betulinová (3 $\beta$ -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina), vyskytující se v platanové kůře a betulin (lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol), obsažený v březové kůře<sup>2</sup>. Aktivita těchto látek byla zkoumána nejprve ve směsích z extraktů rostlin, později byly prokázány biologické aktivity těchto látek jako čistých sloučenin.



Na našem pracovišti byla v minulých letech připravena série derivátů pentacyklických triterpenoidů, označovaných jako betulininy<sup>2</sup>, které vycházejí ze strukturních rysů lupanového, 18 $\alpha$ -oleananového a des-E-lupanového skeletu. Betulininy se vyznačují širokým spektrem aktivit, nízkou toxicitou a dobrou dostupností z přírodních zdrojů<sup>2</sup>.

## CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

1. Provést literární rešerši přípravy a potenciálního farmakologického využití fluorovaných lupanových triterpenoidů a hemiesterů lupanových triterpenoidů.
2. Připravit výchozí fluorované triterpenoidy a syntetizovat hemiestery fluorovaných triterpenoidů.

# TEORETICKÁ ČÁST

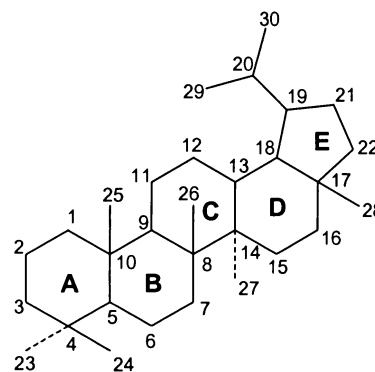
# 1. SOUČASNÝ STAV STUDOVANÉ PROBLEMATIKY

## 1.1 Triterpenoidy s protinádorovou aktivitou

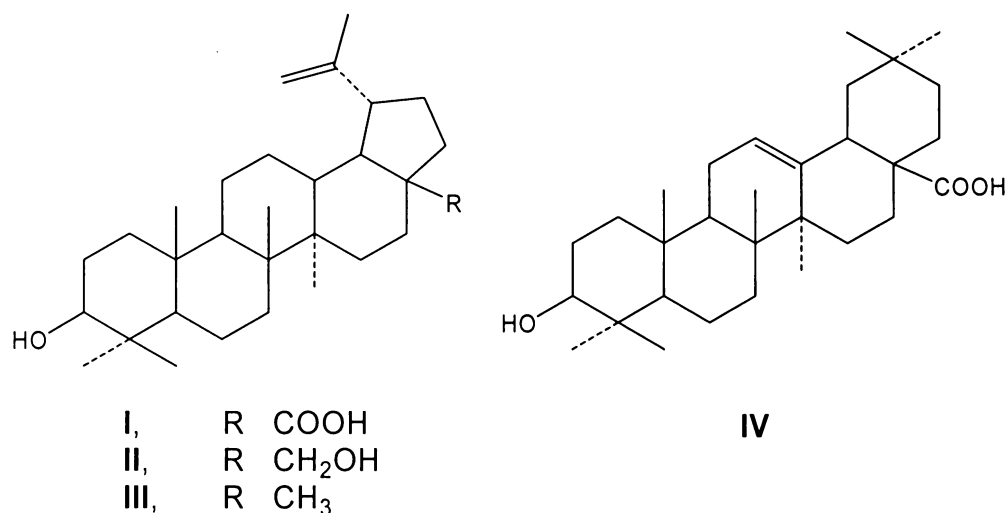
Terpenoidy patří spolu se steroly do rozsáhlé skupiny isoprenoidů a tvoří významnou skupinu přírodních látek vyskytujících se zejména ve vyšších rostlinách a v ovoci, v malé míře i v houbách a mikroorganismech<sup>2</sup>. V současnosti je identifikováno přibližně 30 000 přírodních terpenoidů<sup>2</sup>. Skupinu terpenoidů lze rozdělit podle počtu isoprenových jednotek na mono-, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra- a polyterpeny. V současnosti je známo více než 4 000 přírodních cyklických triterpenoidů<sup>2</sup>, přičemž u mnoha z nich byla v minulosti prokázána zajímavá biologická aktivita.

Triterpeny mají řadu potenciálně využitelných biologických účinků. Nejvýznamější jsou z tohoto pohledu deriváty oleananových, ursanových, lupanových a dammaran-eufanových triterpenoidů<sup>2</sup>. Studované jsou především v souvislosti s protizánětlivými, hepatoprotektivními, analgetickými, hypoglykemickými, anti-HIV, antimikrobiálními, antimykotickými, virostatickými a tonizujícími účinky<sup>3</sup>. V centru zájmu jsou i jejich cytostatické účinky<sup>2</sup>. Stále se vyvíjí syntéza derivátů s nižší toxicitou a přitom vyššími terapeutickými účinky.

Nejdéle známé jsou cytotoxické účinky derivátu lupanu – betulinové kyseliny (**I**). Roku 1976 byla publikována práce zabývající se cytotoxickou aktivitou extraktu z *Vauquelinia corymbosa* na lymfocytální leukemické linii P-388. Následně byla publikována řada prací, jež se zabývala cytotoxickým účinkem podobných směsí. Všechny obsahovaly kyselinu betulinovou (**I**) nebo betulin (**II**). Cytotoxický účinek kyseliny **I** byl popsán v článku<sup>4</sup> z roku 1991. Práce<sup>5</sup> publikovaná v roce 1995 popisuje cytotoxický účinek kyseliny **I** a vzbudila zájem jak o kyselinu **I**, tak i o její deriváty. Významné protinádorové účinky tak byly potvrzeny u některých derivátů, odvozených od betulinu (**II**) (březová kůra), lupeolu (**III**) a kyseliny oleananové (**IV**) (ženšenový kořen)<sup>2</sup>.



**lupanový skelet**



Dle práce<sup>5</sup> se  $IC_{50}$  pro betulinovou kyselinu (**I**) na linii lidského melanomu pohybuje mezi 0.5-1.6  $\mu\text{g/ml}$ , přičemž byla pozorována dávkově závislá fragmentace DNA s indukcí apoptózy do 24 hodin po podání.

Během dalšího výzkumu byla prokázána protinádorová aktivita kyseliny betulinové (**I**) na buněčných liniích neuroblastomu, ovariálního karcinomu A2780, OVCAR-5, GROV-1, malobuněčného (POGB), nemalobuněčného a plicního karcinomu, karcinomu děložního krčku A431 a různým melanomů, přičemž se  $IC_{50}$  pohybuje v rozmezí 1.5-4.5  $\mu\text{g/ml}$ , a to jak na liniích s mutovaným genem p53, tak i s nezmutovanou formou.

Podrobněji účinky kyseliny betulinové (**I**) mapuje nová práce<sup>6</sup>. Shrnuje farmakologické aktivity základních triterpenoidů na různých nádorových liniích, objasňuje mechanismy jejich působení a shrnuje výsledky biologických testů. Podle této literatury mají nejúčinnější sloučeniny z našeho pracoviště – betulininy hodnoty  $IC_{50} \sim 0.2 \mu\text{M}$ . Betulininy jsou účinné na většině testovaných nádorových linií, jak na buňkách p53 negativních, tak i na pRb negativních, přičemž vykazují nižší toxicitu vůči nenádorovým buňkám.

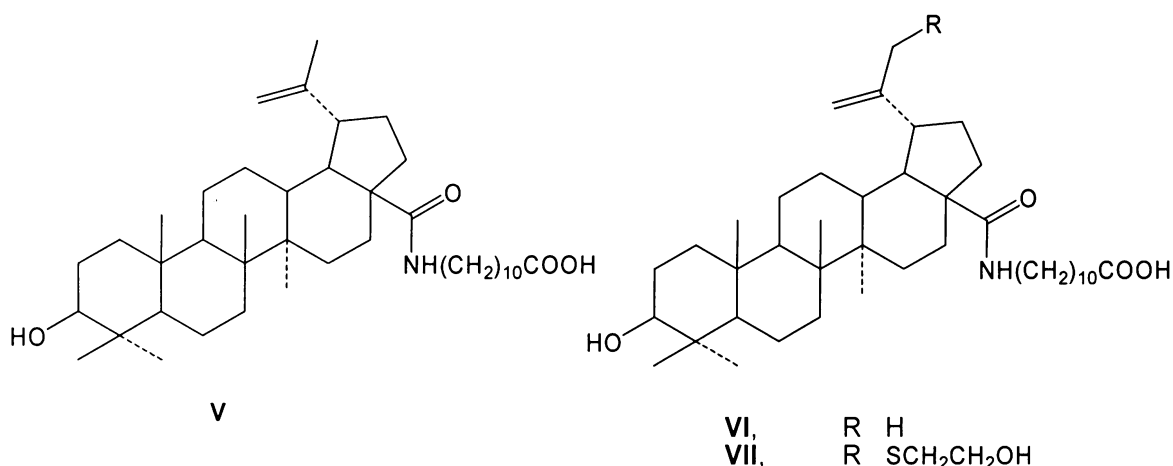
Některé biologicky aktivní deriváty kyseliny betulinové byly připraveny biotransformacemi za pomoci bakterií<sup>2</sup> a prokázaly  $ED_{50}$  vůči MEL-2 v mnohem nižší koncentraci, než je  $ED_{50}$  pro kyselinu (**I**), a to až 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (pozn.:  $ED_{50}$  je koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici buněčné proliferace *in vitro*).



## 1.2 Anti-HIV aktivita lupanových triterpenoidů

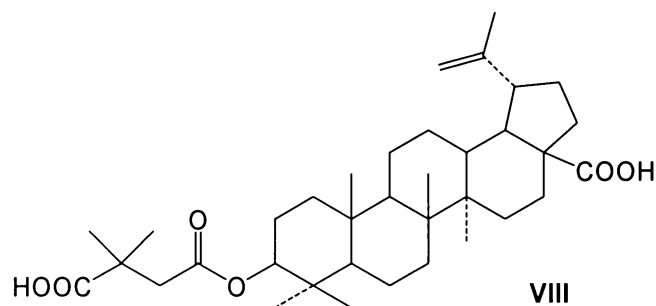
AIDS je celosvětově jednou z nejnebezpečnějších nemocí, proto neustále vzrůstá snaha o nalezení nových terapeutik účinných proti původci této nemoci, retroviru HIV-1<sup>7</sup>, který při svém šíření lidskou populací velmi rychle mutuje. Tato vlastnost spolu se schopností unikat obranným mechanismům imunitního systému znemožňuje přípravu účinné vakcíny k aktivní imunizaci. S pomocí chemoterapie lze rozvoj infekce výrazně zpomalit, ne však zcela zastavit. Důležitým terapeutikem pro léčbu AIDS je 3'-azido-2',3'-dideoxythymidin (AZT), který zabraňuje působení inhibicí reverzní transkriptázy uvnitř viru. Známými léčivy s podobným účinkem jako AZT jsou i nukleosidové analogy 2',3'-dideoxyinosin (ddI) a 2',3'-dideoxycytidin (ddC) a allosterické inhibitory jako jsou TIBO, HEPT a Nevirapine. Další možností zastavení působení viru je použití specifických inhibitorů proteázy viru HIV, mezi zástupce této skupiny léčiv patří Ro 31-8959 a A 80987. Kvůli neustále se objevující rezistenci a špatné orální dostupnosti současných terapeutik je však nutný přísun stále nových léků.

V souvislosti s hledáním potenciálních léčebných prostředků byla objevena<sup>7</sup> anti-HIV aktivita betulinové kyseliny (**I**). Nižší anti-HIV aktivita byla nalezena<sup>8</sup> též u amidového derivátu **V**, proto byla provedena syntéza série derivátů tohoto amidu za účelem zvýšení anti-HIV aktivity, což se u sloučenin **VI** a **VII** splnilo. Derivát **VI** projevil  $IC_{50} = 0.28 \mu\text{mol/l}$  a u derivátu **VII** byla zjištěna  $IC_{50} = 0.20 \mu\text{mol/l}$ , přičemž byly tyto aktivity měřeny na buňkách linie CEM a MT-4.



V literatuře<sup>8</sup> je popsána snaha o syntézu specifických inhibitorů HIV s novým mechanismem účinku související s anti-HIV aktivitou kyseliny betulinové (**I**). Těmi jsou zejména syntézy hemiesterů lupanových triterpenoidů, popsané v kapitole 1.4.

Velmi důležitým zbrusu novým terapeutikem je přípravek Bevirimat<sup>9</sup> od firmy Panacos, známý též jako PA-457, který je derivátem kyseliny betulinové a je prvním anti-HIV léčivem ze třídy inhibitorů maturace viru HIV. Bevirimat je chemicky 3β-O-(3',3'-dimethylsukcinyl)betulinová kyselina (**VIII**), která se podává orálně ve formě tablet a je účinná proti divokému typu HIV-1.



### 1.3 Fluorderiváty triterpenoidů

Pro zavedení fluoru do molekul organických sloučenin lze použít několik způsobů. Tyto metody popisuje práce<sup>10</sup>. Jedná se o substituci kyslíkaté funkční skupiny za jeden nebo dva atomy fluoru za velmi mírných podmínek. Jako nejvýhodnější fluorační činidlo se proti SF<sub>4</sub>, BF<sub>3</sub>, HF nebo fluorovaným aminům jeví DAST, který je použitelný pro konverzi funkčních skupin, jako je hydroxylová, karbonylová či karboxylová skupina, činidlo však reaguje i s epoxidy, halogenderiváty, sulfonáty, některými ethery a dalšími sloučeninami<sup>11</sup>. DAST je jedno z mála fluoračních činidel, které neatakuje sklo<sup>12</sup>.

DAST se připravuje reakcí<sup>10,11</sup> diethylaminotrimethylsilanu (**IX**) s SF<sub>4</sub>, kdy vzniká kromě DASTu (**X**) i fluortrimethylsilan (**XI**) (schéma 1). DAST je relativně stabilní produkt, který může být skladován v plastových nádobách za snížené teploty. Reakcí DASTu s hydroxyderiváty vznikají monofluorderiváty, reakcí s ketony či aldehydy geminální difluorderiváty<sup>10,11</sup>.

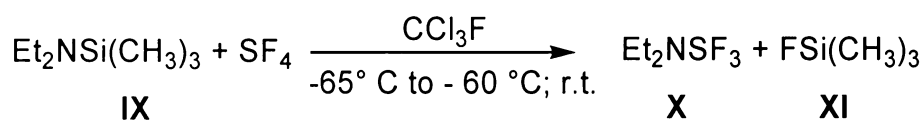
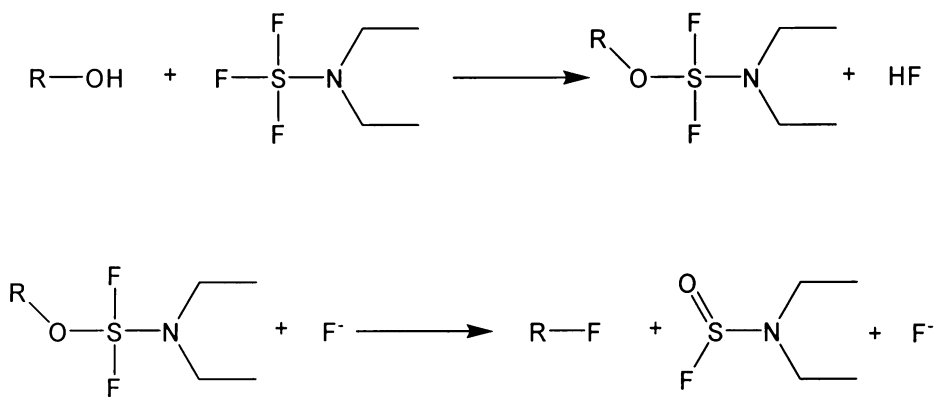


Schéma 1: Příprava DASTu

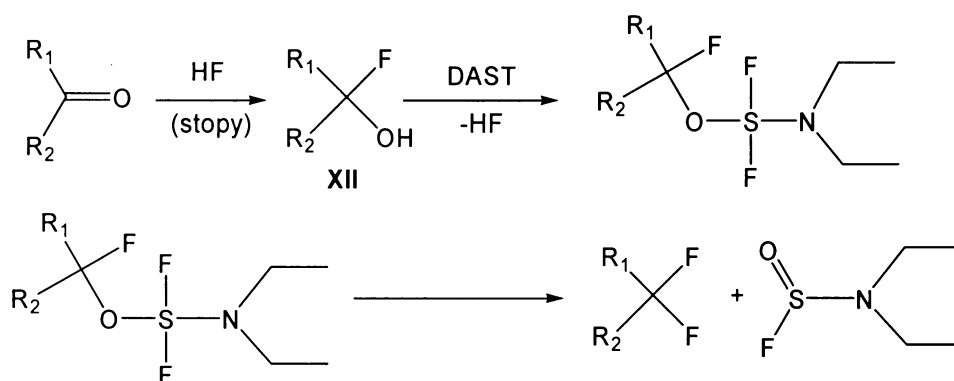
Obvyklý způsob přípravy fluorderivátů triterpenoidů odpovídajících hydroxyderivátů je detailně popsán v literatuře<sup>10-13</sup>. Substrát reaguje s DASTem za snížené teploty (-78 °C) a poté se teplota nechá vystoupat na r.t. Reakce se obvykle ukončuje pozvolným přidáním vody.

Mechanismus reakce kyslíkatých sloučenin s DASTem je rozdílný podle druhu výchozí kyslíkaté funkční skupiny, se kterou DAST reaguje<sup>11</sup>. V případě hydroxyderivátů se jedná o nukleofilní substituci fluoru vázaného na síře kyslíkem hydroxysloučeniny, přičemž odstupuje molekula fluorovodíku (schéma 2). Další přeměna intermediátu je závislá na struktuře alkylového zbytku. Většinou dochází k přeměně na fluorid, byly pozorovány i produkty eliminace nebo přesmyky karbokationtového typu<sup>12</sup>.



**Schéma 2:** Mechanismus reakce DASTu s alkoholy

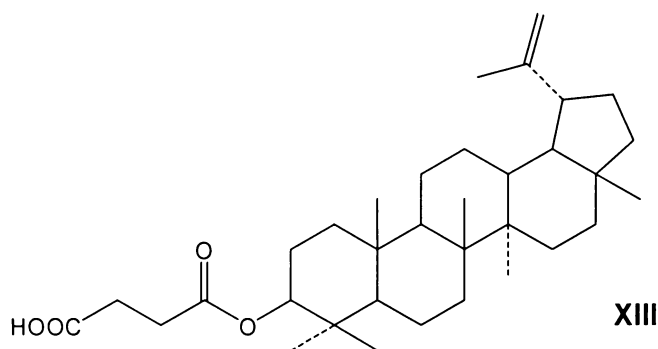
Reakce s DASTem se také velmi dobře uplatňuje při přípravě geminálních difluorderivátů z karbonylových sloučenin<sup>11</sup>. Reakce se provádí většinou za refluxu. Mechanismus začíná napadením karbonylové skupiny fluorovodíkem, vzniklým reakcí činidla se stopami vody v reakční směsi. Hydroxyskupina vzniklého fluorhydrinu (**XII**) dále reaguje s DASTem analogicky jako u hydroxyderivátů (schéma 3).



**Schéma 3:** Mechanismus reakce DASTu s aldehydy a ketony

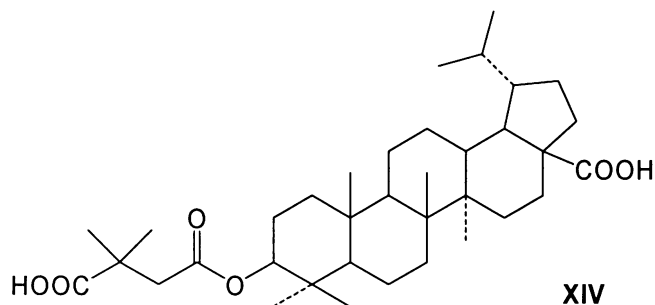
## 1.4 Hemiestery lupanových triterpenoidů a jejich biologická aktivita

Bylo prokázáno<sup>14</sup>, že klasické alkyl-estery většinou ztrácejí cytotoxickou aktivitu vůči příslušné kyselině. Proto jsou hledány vhodnější estery, které by se svými biologickými vlastnostmi výchozím kyselinám vyrovnaly, nebo lépe vykázaly účinky ještě vyšší. Bylo zjištěno, že biologickou aktivitou vynikají zejména hemiestery a jejich soli. Příkladem může být lupeol-hemisukcinát **XIII**, který má významné protizánětlivé účinky<sup>15</sup>.

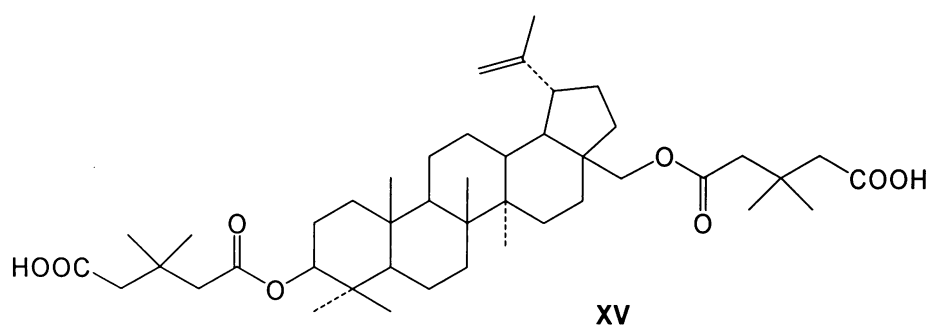


Významným objevem je však v oblasti hemiesterů lupanových triterpenoidů vysoká anti-HIV aktivita. Betulinová kyselina (**I**) prokázala<sup>3</sup> inhibiční aktivitu vůči HIV replikaci v H9 lymfocytech s  $EC_{50} = 1.4 \mu\text{mol/l}$  a terapeutickým indexem (TI) = 9.3. Účinek kyseliny (**I**) tkví v inibici vstupu HIV-1 do buněk<sup>3</sup>. Betulin (**II**) je ve srovnání s kyselinou betulinovou (**I**) méně účinný, avšak jeho hemiestery jsou účinné mimořádně.

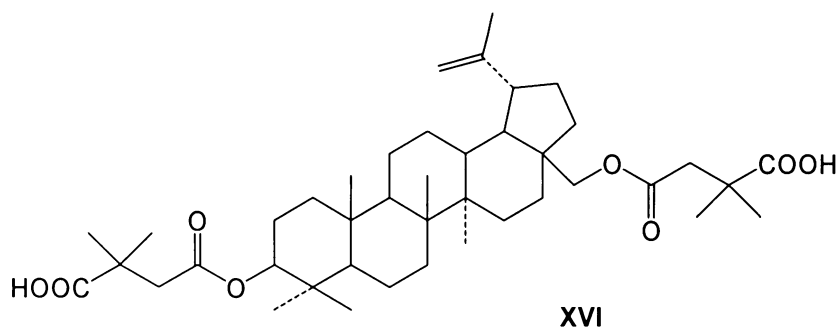
Mezi účinné hemiestery betulinové a dihydrobetulinové kyseliny patří<sup>16</sup> 3 $\beta$ -*O*-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinová kyselina (**VIII**), známá jako léčivo Bevirimat<sup>8</sup> (viz kapitola 1.2) a dihydroanalog **XIV**, které vykázaly EC<sub>50</sub> nižší než 0.35 nmol/l s terapeutickým indexem pro dehydroderivát (**V**) TI=20 a pro dihydroderivát (**XIV**) TI=14 s tím, že lze výsledky porovnat s léčivem AZT (EC<sub>50</sub> = 0.02  $\mu$ mol/l, TI = 25). Stejně výsledky zaznamenává i publikace<sup>17</sup>.



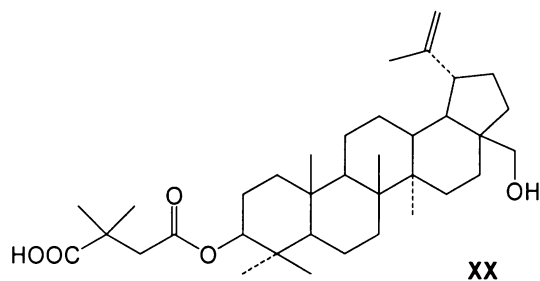
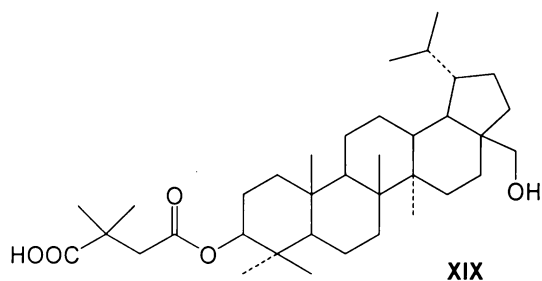
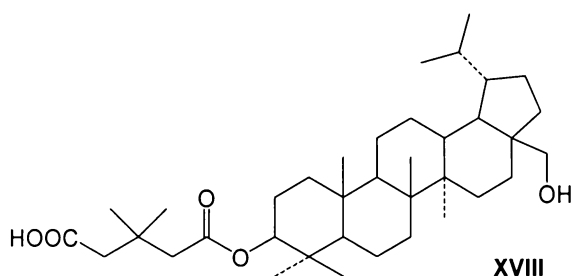
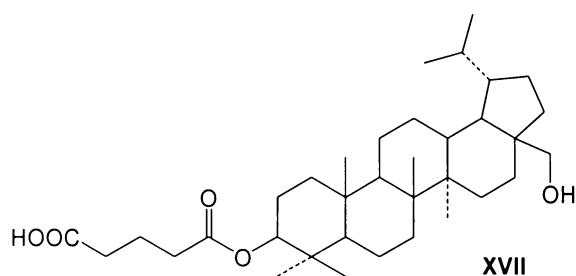
Další práce se zabývají již deriváty betulinu (**II**). Publikace<sup>7,18</sup> se také inspirovaly syntézou hemiesterů a proto byly připraveny dimethylhemiglutaráty odvozené od betulinu (**II**) s příslibem zajímavých anti-HIV aktivit. Výsledkem byl 3 $\beta$ ,28-*O*-bis(3',3'-dimethylglutaryl)betulin (**XV**) s výraznou anti-HIV aktivitou mající EC<sub>50</sub> = 0.66 nmol/l a vysoký TI =22.

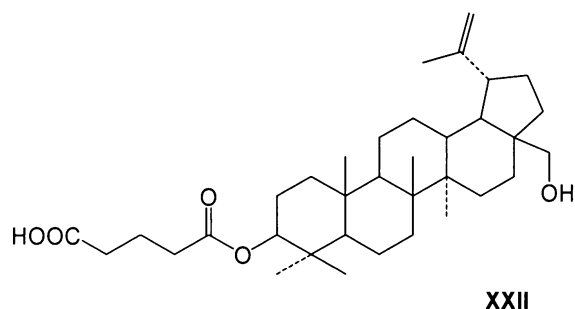
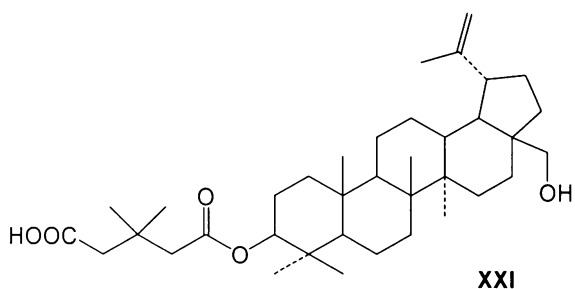


Práce<sup>17</sup> popisuje sérii syntéz dimethylsuccinátů lupanových triterpenoidů a hodnotí jejich anti-HIV aktivitu. Vysokou aktivitu projevil dimethylsuccinát **XVI**, a to EC<sub>50</sub> rovnou 0.87 nmol/l s terapeutickým indexem 42. TI byl opět porovnán s léčivem AZT.



Rozsáhlou sérii syntéz s četnými úspěchy v měření anti-HIV aktivit popisuje publikace<sup>19</sup>. Byly zjištěny další zajímavé výsledky především u dihydrobetulin-3 $\beta$ -O-glutarátu (**XVII**) s  $EC_{50} = 0.02$  nmol/l a extrémně vysokým terapeutickým indexem  $1.12 \cdot 10^6$ . Dalšími sloučeninami s vysokou anti-HIV aktivitou byly dihydrobetulin-3 $\beta$ -O-3',3'-dimethylsukcinát (**XVIII**) a dihydrobetulin-3 $\beta$ -O-3',3'-dimethylglutarát (**XIX**) s hodnotami  $EC_{50}$  1.7, respektive 1.3 nmol/l a jejich terapeutické indexy činily 16, respektive 20. Potenciální anti-HIV aktivity  $EC_{50}$  mezi 4.4 nmol/l a 66.2 nmol/l s terapeutickými indexy od 670 do 6568 ukázaly i deriváty **XX – XXII**, ale přesto jsou tyto sloučeniny méně aktivní, než jejich odpovídající dihydroderiváty.

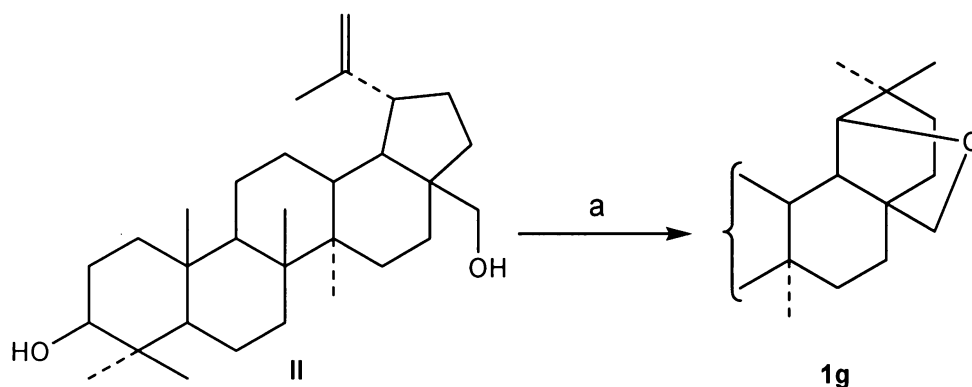




## 2. PŘÍPRAVA VÝCHOZÍCH SLOUČENIN

### 2.1 Příprava výchozích sloučenin 1a a 1g

Základní sloučeninou pro přípravu výchozích látek pro tuto práci byl betulin (**II**) (lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol), který je možno získat extrakcí svrchních vrstev březové kůry ethanolem.



**Schéma 4:** a: Montmorillonit K10/CHCl<sub>3</sub>, refl.

Allobetulin (**1g**) lze připravit kyselé katalyzovaným přesmykem betulinu<sup>20</sup> (**II**) (schéma 4). Příprava allobetulonů (**XXIII**) vychází z allobetulinu (**1g**) a je možné jej získat několika způsoby<sup>12,21-23</sup>, například oxidací allobetulinu (**1g**) pyridinium chlorochromátem (schéma 5).

Výchozí sloučeninou pro přípravu hydroxyketonu **1a** je allobetulon (**XXIII**), který se oxiduje pomocí MCPBA v kyselém prostředí<sup>24</sup> na hydroxyketon **1a**. Jednotlivé reakční

kroky přípravy série oleananových derivátů jsou uvedeny ve schématu 5. Přípravou hydroxyketonů se podrobně zabývá literatura<sup>25</sup>.

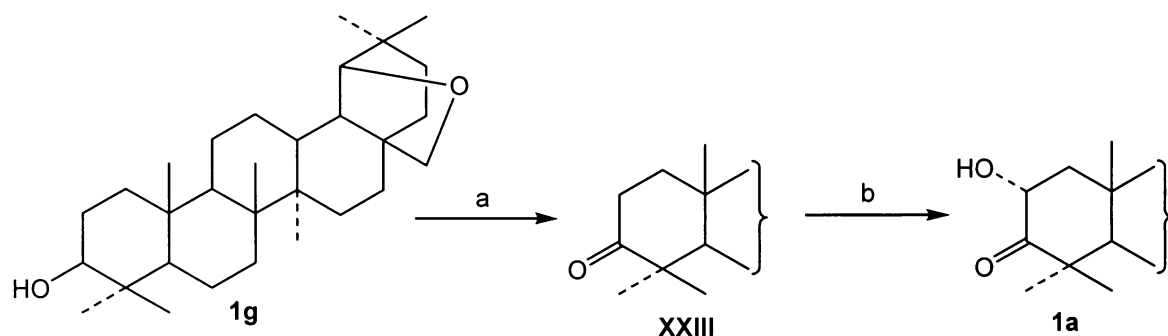


Schéma 5: a: PCC/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>; b: MCPBA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 2.1.1 Příprava difluoralkoholu 1c

Pro přípravu difluoralkoholu 1c byl použit hydroxyketon 1a, který poskytl podle modifikovaného postupu dle literatury<sup>12</sup> v reakci s DASTem difluorketon 1b. Je známo<sup>12</sup>, že stejný produkt 1b poskytuje i reakce DASTu s hydroxyketonem XXIV (schéma 6).

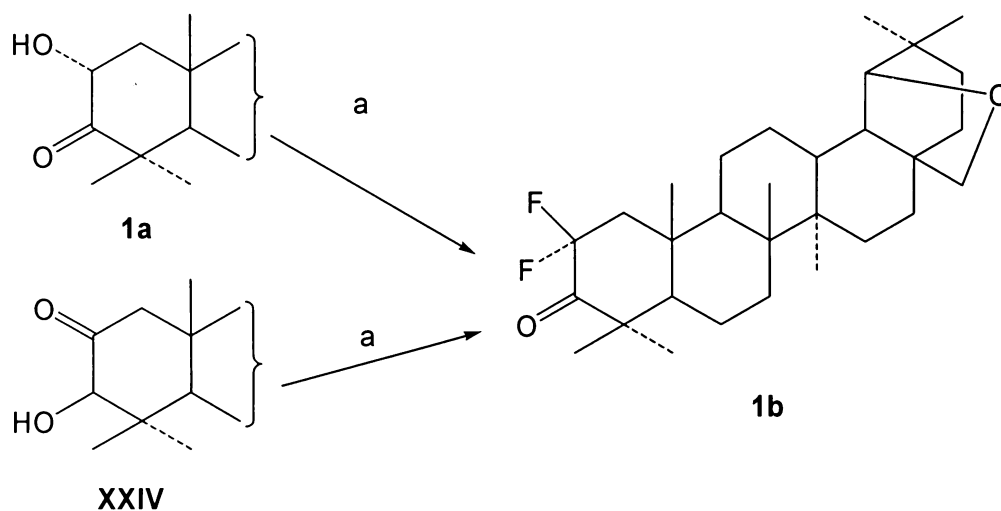
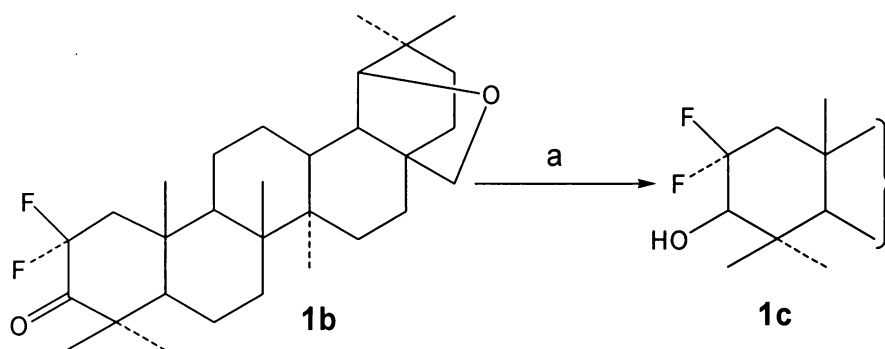


Schéma 6: a: DAST/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78° C až r.t., 24 h



Dalším krokem byla redukce difluorketonu **1b** pomocí  $\text{NaBH}_4$  na difluoralkohol **1c**<sup>12</sup> (schéma 7). Tato reakce probíhala výlučně<sup>12</sup> za vzniku  $3\beta$ -hydroxyderivátu **1c**.



**Schema 7:** a:  $\text{NaBH}_4/\text{THF}$ ,  $\text{MeOH}$

Totožnost difluoralkoholu **1c** byla potvrzena porovnáním  $^1\text{H}$  NMR spekter s autentickým materiálem<sup>12</sup>. Bylo zaznamenáno charakteristické seskupení signálů  $\delta$  3.4 – 3.8 tří vodíků H-19 $\alpha$ , H-28a a H-28b, prokazující  $19\beta,28$ -epoxy- $18\alpha$ -oleananový skelet na cyklu E. Dále byl nalezen signál vodíku H-3 $\alpha$  jako dublet dubletu při  $\delta$  3.35, konfigurace tohoto vodíku byla potvrzena porovnáním interakčních konstant  $^1\text{H}$  spektra autentického preparátu<sup>12</sup>.

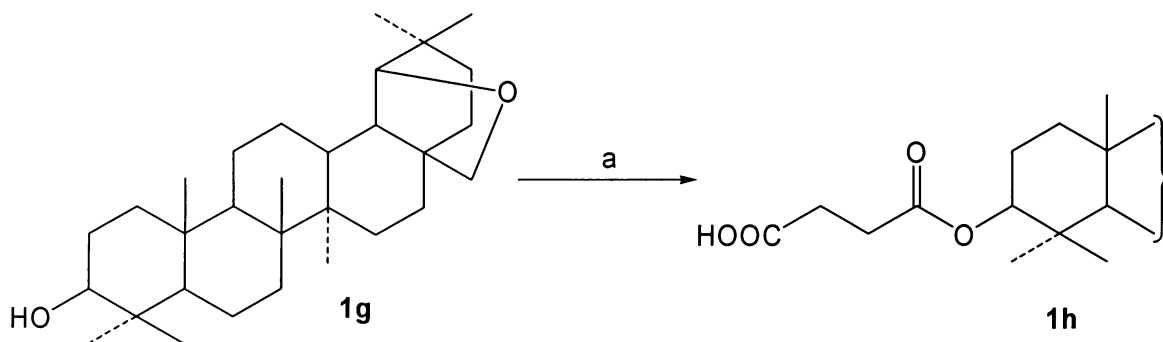
### 3. PŘÍPRAVA HEMIESTERŮ FLUOROVANÝCH OLEANANOVÝCH DERIVÁTŮ

Vzhledem k tomu, že derivatizace  $3\beta$ -hydroxyskupiny betulinové kyseliny (**I**) lipofilními skupinami jako třeba acetáty, vede ke snížení cytotoxické aktivity, je výběru derivatizační funkce při syntéze nových derivátů potřeba věnovat zvýšenou pozornost<sup>24</sup>. Pro syntézu hydrofilních derivátů triterpenoidů se jeví jako vhodné nižší dikyseliny, např. jantarová nebo glutarová. Příprava hemisukcinátů a hemiglutarátů a jejich dimethylderivátů vychází z jednoduché reakce<sup>18,24</sup> hydroxyderivátu s anhydridem příslušné kyseliny v pyridinu v přítomnosti DMAPu.

Takto připravené sloučeniny hemisukcinát **1d**, glutarát **1e** a dimethylhemiglutarát **1f** byly charakterizovány pomocí spektrálních dat.

### 3.1 Hemisukcináty **1h**, **1d**

Hemisukcinát **1h** byl připraven z allobetulinu (**1g**) ve výtěžku 49 % (schéma 8). Jedná se o již známou<sup>21</sup> sloučeninu. Stejně jako v literatuře<sup>21</sup> byly v <sup>1</sup>H NMR spektru hemisukcinátu **1h** nalezeny signály charakteristické pro allobetulin - seskupení signálů  $\delta$  3.4 – 3.8 tří vodíků H-19 $\alpha$ , H-28a a H-28b. Kromě toho byl nalezen dublet dubletu vodíku H-3 $\alpha$  při  $\delta$  4.88. Byl nalezen také multiplot 4 vodíků hemisukcinátové skupiny při  $\delta$  ~ 2.6 - 2.8. V <sup>13</sup>C NMR spektru hemisukcinátu **1h** byly nalezeny navíc dva signály karboxylových uhlíků hemisukcinátové skupiny při  $\delta$  ~ 171 a 177 a dva signály sekundárních uhlíků při  $\delta$  ~ 28 - 29. V IR spektru sloučeniny **1h** byl nalezen široký pás karbonylu při 1720 cm<sup>-1</sup> a velmi slabý pás OH vibrace v oblasti 3520 cm<sup>-1</sup>. V MS spektru hemisukcinátu **1h** byl kromě iontů odpovídajících běžným ztrátám nalezen ion odpovídající ztrátě molekuly kyseliny jantarové.



**Schema 8:** a: sukcinanhydrid/DMAP/pyr, reflux, 2h

Hemisukcinát **1d** byl připraven z difluoralkoholu **1c** podle schematu 9. Výtěžek reakce byl 41 %. Kromě signálů charakteristických pro základní skelet sloučeniny, byl v <sup>1</sup>H NMR spektru hemisukcinátu **1d** nalezen také multiplot čtyř vodíků hemisukcinátové skupiny při  $\delta$  ~ 2.6 - 2.8. V <sup>13</sup>C NMR spektru hemisukcinátu **1d** byly nalezeny navíc dva signály karboxylových uhlíků hemisukcinátové skupiny při  $\delta$  ~ 171 a 177 a dva signály

sekundárních uhlíků při  $\delta \sim 29$ . V IR spektru sloučeniny **1d** byl nalezen široký pás karbonylu při  $1740\text{ cm}^{-1}$ , karboxylu při  $2800\text{ cm}^{-1}$  a velmi slabý pás OH vibrace v oblasti  $3410\text{ cm}^{-1}$ . V MS spektru sloučeniny **1d** byl kromě iontů odpovídajících běžným ztrátám nalezen ion odpovídající ztrátě ( $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CO}^\cdot$ ).

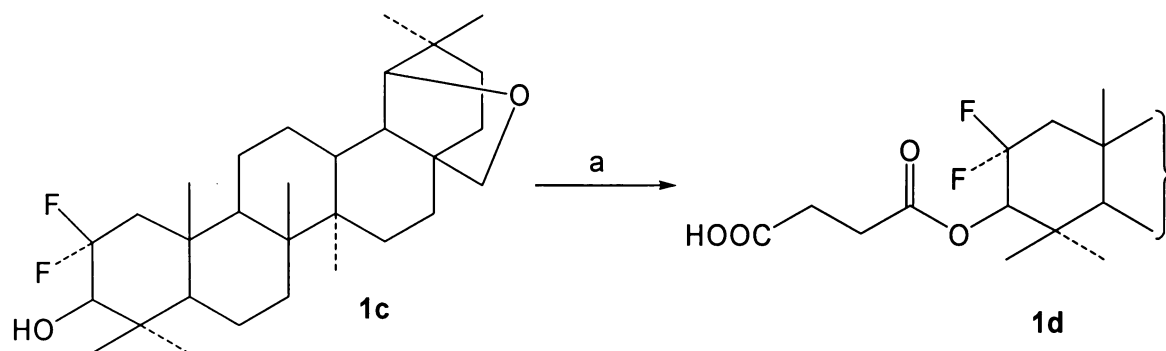


Schéma 9: a: sukcinanhydrid/DMAP/pyr, refl., 2 h

### 3.2 Hemiglutaráty **1e**, **1f**

Hemiglutarát **1e** byl připraven z difluoralkoholu **1c** ve výtěžku 44 % (schéma 10). Kromě signálů charakteristických pro základní skelet sloučeniny, byl v  $^1\text{H}$  NMR spektru sloučeniny **1e** nalezen multiplet čtyř vodíků na uhlících 2' a 4' hemiglutarátové skupiny při  $\delta \sim 2.6 - 2.8$ . Dále byl nalezen multiplet dvou vodíků při  $\delta \sim 2.0 - 2.1$ , zde se jednalo o vodíky na uhlíku C-3' hemiglutarátové skupiny. V  $^{13}\text{C}$  NMR spektru hemiglutarátu **1e** byl nalezen signál karboxylového uhlíku hemiglutarátové skupiny při  $\delta \sim 172$  a dále i singlety tří sekundárních uhlíků při  $\delta \sim 20, 32.5$  a  $33.5$ . V IR spektrech derivátu **1e** byl nalezen široký pás karbonylu při  $1730\text{ cm}^{-1}$  a karboxylu při  $2900\text{ cm}^{-1}$ . V MS spektru sloučeniny **1e** byl kromě iontů odpovídajících běžným ztrátám nalezen ion odpovídající ztrátě ( $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_3\text{CO}^\cdot$ ).

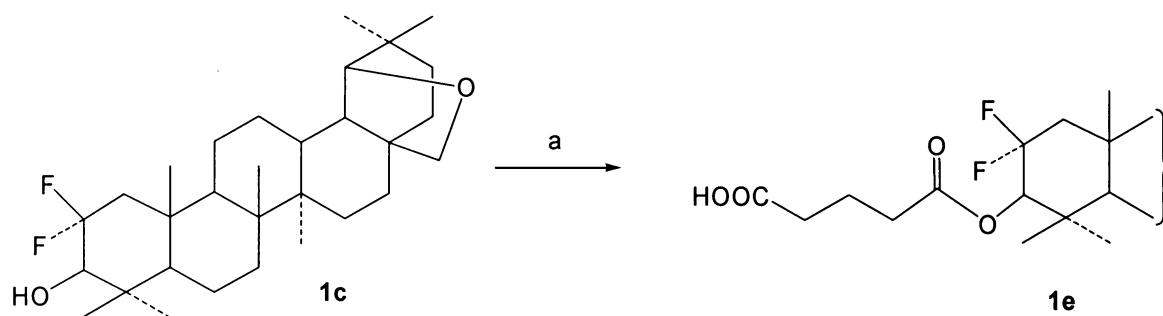


Schéma 10: a: glutaranhydrid/DMAP/pyr, refl., 2 h

Dimethylhemiglutarát **1f** byl připraven z difluoralkoholu **1c** ve výtěžku 73 % (schéma 11). V  $^1\text{H}$  NMR spektru sloučeniny **1f** byly nalezeny také signály 4 vodíků na uhlících 2' a 4' hemiglutarátové skupiny jako singletu při  $\delta \sim 2.5$  a dvou dubletů při  $\delta \sim 2.5$  a  $\delta \sim 2.7$ . Také bylo zaznamenáno 6 vodíků dvou methylových skupin, které jsou navázány na uhlíku C-3' hemiglutarátové skupiny, které byly nalezeny jako dva singlety při  $\delta \sim 1.2$ . V  $^{13}\text{C}$  NMR spektru derivátu **1f** byly nalezeny navíc dva signály karboxylových uhlíků hemiglutarátové skupiny při  $\delta \sim 172$  a  $178$ , dvou sekundárních uhlíků při  $\delta \sim 45$  a jednoho kvartérního uhlíku při  $\delta \sim 33$ . Byl nalezen i signál při  $\delta \sim 28$ , znamenající přítomnost obou methylových skupin navázaných na esterovém substituentu. V IR spektru sloučeniny **1f** byl nalezen široký pás karbonylu při  $1690\text{ cm}^{-1}$  a pás karboxylu při  $2800\text{ cm}^{-1}$ . V MS spektru sloučeniny **1f** byl kromě iontů odpovídající běžným ztrátám nalezen ion odpovídající ztrátě  $(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_3)_2\text{CO})$ .

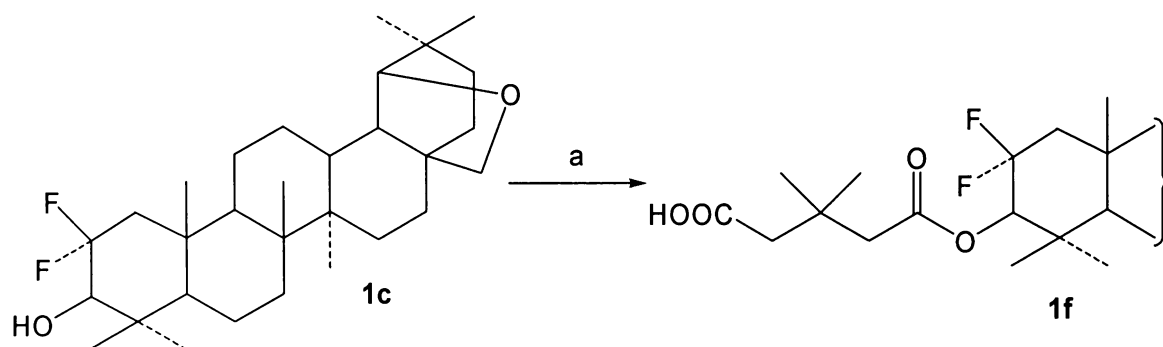


Schéma 11: a: 3,3-dimethylglutaranhydrid/DMAP/pyr, refl., 2h

#### 4. CYTOTOXICKÁ AKTIVITA PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

Celkem byly testovány *in vitro* metodou MTT-testu<sup>26,27</sup> na nádorové linii CEM 3 sloučeniny. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. Cytotoxická aktivita je vyjádřena hodnotou IC<sub>50</sub>, která představuje minimální koncentraci testované sloučeniny (v μmol/l) usmrcující právě 50 % nádorových buněk. Za aktivní se považuje sloučenina, jejíž IC<sub>50</sub> je menší než 10 μmol/l. Derivát s aktivitou IC<sub>50</sub> = 250 μmol/l se považuje za zcela neúčinný.

Testy látek **1d**, **1e** a **1f** nepřinesly žádné překvapivé výsledky, pouze bylo zaznamenáno zvýšení cytotoxické aktivity u hemiglutarátu **1e** oproti hemisukcinátu **1d**, avšak dimethylovaný hemiglutarát **1f** projevil v porovnání s hemiglutarátem **1e** výrazné snížení cytotoxické aktivity. Cytotoxická aktivita sloučeniny **1h** byla měřena již v minulosti a je známo, že tento derivát je neaktivní<sup>21</sup> stejně jako difluoralkohol **1c**<sup>12</sup> a allobetulin **1g**<sup>21</sup>.

Hlavní oblast využitelnosti těchto derivátů však leží na poli anti-HIV aktivity, která zatím nebyla měřena.

Sloučenina	IC <sub>50</sub> [μmol/l]
	CEM
<b>1c</b>	250
<b>1d</b>	102.0
<b>1e</b>	23.5
<b>1f</b>	127.1
<b>1g</b>	250
<b>1h</b>	250

**Tabulka 1:** *In vitro* cytotoxické aktivity sloučenin připravených v této bakalářské práci na buněčné linii CEM (T-lymfoblastická leukémie)

# **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 uváděny v jednotkách [ $10^{-1}$  Deg  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ], koncentrace,  $c$  [g/100 ml], jsou udávány u každé hodnoty specifické optické otáčivosti.

IČ spektra byla měřena v chloroformu na spektrometru Nicolet Avatar 370 FTIR. Vlnočty jsou uvedeny v  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian VNMRS300 ( $^1\text{H}$  při 299.94 MHz,  $^{13}\text{C}$  při 75.427 MHz) v roztoku v  $\text{CDCl}_3$ . Pro  $^1\text{H}$  NMR spektra byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan. Chemické posuny  $^{13}\text{C}$  NMR spekter byly referencovány vůči  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00$  ppm. Multiplicita signálů v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech byla určena z DEPT spekter. Hodnoty chemických posunů ( $\delta$  stupnice) a interakčních konstant (Hz) v  $^1\text{H}$  NMR byly určeny pomocí analýzy prvního řádu. Chemické posuny byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, interakční konstanty v jednotkách Hz v  $^1\text{H}$  NMR na jedno desetinné místo a v  $^{13}\text{C}$  NMR na celá čísla.

Hmotnostní spektra EI byla měřena na přístroji Shimadzu QP 2010, teplota iontového zdroje byla 150 °C, zavedení vzorku bylo provedeno přímým vstupem na rheniovém drátku vyhřívaném elektrickým proudem (proud narůstal od 0 mA do 380 mA rychlostí 10 mA/s), energie ionizujících elektronů byla 75 eV. Relativní intenzity jsou vztaženy na nejintenzivnější ion v oblasti  $m/z \geq 50$ .

Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60  $F_{254}$  (Merck) nebo na TLC fóliích s reverzní stacionární fází RP-18  $F_{254s}$  (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (model UVS - 54; 254 nm) a poté postříkem 10% kyselinou sírovou a zahřátím na 110 – 200 °C.

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Kieselgel 60 (63 - 200  $\mu\text{m}$ ; Merck 7734). Používaný HPLC systém měl toto uspořádání: vysokotlaké čerpadlo Gilson (model 321-322), preparativní HPLC kolona (Labio 25×250 mm nebo 50×250 mm, sorbent Biospher Si120, 7 $\mu\text{m}$ ), Refractive index detektor IOTA 2 (Precision Instruments), propojený přes RS-232 s PC s programem Chromulan 1.20 a automatický sběrač frakcí Gilson (model 206). K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotovapor R-200). Pro lyofilizace byl používán cryocooler Huber TC 100E.

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií a mobilní fáze pro sloupcové chromatografie na silikagelu (jsou vždy uvedeny v experimentu):

- A toluen : diethylether 15 : 1
- B toluen : diethylether 6 : 1
- C hexan : ethyl-acetát 9 : 1
- D chloroform : ethyl-acetát : kyselina octová 20 : 4 : 5

Veškerá rozpouštědla používaná pro reakce, krystalizace a chromatografie byla předem predestilována. Acetonitril použitý pro krystalizace byl absolutizován dvojnásobnou destilací s  $P_4O_{10}$ . Methanol použitý pro krystalizace byl absolutizován obvyklým způsobem s hořčíkem. Činidla DAST, DMAP a  $NaBH_4$  byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o. Výchozí látky hydroxyketon **1a** a allobetulin (**1g**), použité pro syntézy, jsou majetkem laboratoře RNDr. Jana Šarka, Ph.D.

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 leukémie CEM v jamkách kultivačního panelu. Každá koncentrace sloučeniny byla testována v dubletu. Inkubace buněčné suspenze v prostředí s analyzovanou sloučeninou trvala 72 h při 37 °C, v 5% atmosféře  $CO_2$  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 h. 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 -  $TCS_{50}$ .



## Obecný postup zpracování reakčních směsí

Reakční směs byla nalita do dvojnásobného množství zředěné kyseliny chlorovodíkové (1:10), dále byla extrahována ethyl-acetátem, spojené organické podíly byla promyty do neutrální reakce a následně byla rozpouštědla odpařena na RVO.

## Obecný postup přípravy hemiesterů:

Do roztoku hydroxysloučeniny (1 mmol) v pyridinu (10-15 ml podle rozpustnosti) byl přidán anhydrid (4 mmol) a DMAP (8 mmol). Po 10 h refluxu (TLC fáze D) byla reakční směs zpracována obecným postupem zpracování reakčních směsí. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií. Chromatograficky jednotný produkt byl krystalizován nebo lyofilizován.

### 1. Příprava difluorketonu **1b**

Difluorketon **1b** byl připraven modifikovaným postupem dle literatury<sup>12</sup>. Do roztoku hydroxyketonu **1a** (3.50 g; 8.0 mmol) v chloroformu (20 ml) byl přidán DAST (3.5 ml; 26.50 mmol). Reakční směs byla míchána 4 dny za r.t.. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava A). V dalším postupu byla do reakční směsi přidána po malých dávkách voda (1 ml) a přisypáván práškový NaHCO<sub>3</sub>, dokud směs nepřestala pěnit. Pak byla organická fáze oddělena a protřepána s vodou, organická rozpouštědla byla odpařena na RVO. Světle hnědý odparek (3.5 g) byl dále čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu v toluenu. Krystalizací z MeOH byl získán difluorketon **1b** (1.5 g; 41 %) o t.t. 243 - 245 °C,  $[\alpha]_D +123$  (c 0.52). Literatura<sup>12</sup> uvádí t.t. 243 - 245 °C,  $[\alpha]_D +123$ . <sup>1</sup>H NMR spektrum bylo identické s autentickým materiálem<sup>12</sup>.

### 2. Příprava difluoralkoholu **1c**

Difluoralkohol **1c** byl připraven modifikovaným postupem dle literatury<sup>12</sup>. Do roztoku difluorketonu **1b** (1.5 g; 3.1 mmol) ve směsi THF (145 ml) a MeOH (135 ml) byl za chlazení ledem přidáván NaBH<sub>4</sub> (200 mg, 5.3 mmol) a reakční směs byla míchána po dobu 3 hodin a poté zpracována obecným postupem. Chromatograficky jednotný (dle TLC v soustavě B) odparek byl rozpuštěn v toluenu, přefiltrován přes sloupec

silikagelu a rozpouštědlo bylo odstraněno na RVO. Filtrací odparku přes sloupek silikagelu v toluenu byla získána chromatograficky jednotná frakce (700 mg) a směsná frakce, která byla dále čištěna na HPLC (mobilní fáze C). Byl získán difluorallobetulin **1c** (850 mg; 57 %) o t.t. 299 - 301 °C,  $[\alpha]_D +48$  (c 0.39). Literatura<sup>12</sup> uvádí t.t. 299 - 301 °C,  $[\alpha]_D +48$ . <sup>1</sup>H NMR spektrum bylo identické s autentickým materiálem<sup>12</sup>.

### 3. Příprava hemisukcinátu **1h**

Z allobetulinu (**1g**) (500 mg; 1.13 mmol) byl obecným postupem připraven hemisukcinát **1h**. Krystalizací ze směsi butanon – acetonitril – voda byl získán chromatograficky jednotný hemisukcinát **1h** (300 mg; 49 %) o t.t. 268 - 271 °C,  $[\alpha]_D +46$  (c 0.39). Literatura<sup>21</sup> uvádí t.t. 268 - 270 °C,  $[\alpha]_D +46$ . <sup>1</sup>H NMR spektrum je shodné se spektrem autentického preparátu<sup>21,28</sup>.

### 4. Příprava hemisukcinátu **1d**

Obecným postupem byl z difluoralkoholu **1c** (200 mg; 0.40 mmol) připraven hemisukcinát **1d**. Odparek byl ve formě roztoku v toluenu nanesen na sloupec silikagelu a byla provedena chromatografie s gradientem mobilní fáze od 40% ethyl-acetátu v hexanu až po 100% ethyl-acetát. Krystalizací z acetonitrilu byl získán hemisukcinát **1d** (100 mg; 41 %) o t.t. 109.3 °C a  $[\alpha]_D +48,1$  (c 0.26). IČ spektrum: 1731 (C=O), 1751 (C=O), 2736 (COOH), 2851 (COOH), 2957 (COOH), 3407 (O-H). <sup>1</sup>H NMR spektrum: 0.80 s, 0.89 s, 0.92 s, 0.93 s, 0.94 d (J=0.9), 1.00 s, 1.04 s, 21H (7xCH<sub>3</sub>); 2.32 td, 1H (J=13.8, J'=4.8, H-1 $\alpha$ ); 2.67 – 2.81 m, 4H (HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO); 3.46 d, 1H (J=7.8, H-28a); 3.54 s, 1H (H-19 $\alpha$ ); 3.78 d, 1H (J=7.5, H-28b); 4.88 dd, 1H (J=23.1, J'=5.7, H-3 $\alpha$ ); <sup>19</sup>F NMR spektrum: -90.60 dd (J=4.8, J'=248.1, F<sub>A</sub>); -106.32 dddd (J=249.2, J'=34.7, J''=22.9, J'''=14.1, F<sub>B</sub>). MS m/z (%): [Pro C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>F<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, M<sup>+</sup> 578]: 577 (M<sup>+</sup>-H, 90), 478 (56), 458 (61), 407 (93), 387 (10), 369 (7), 342 (22), 323 (19), 309 (8), 297 (7), 283 (8), 269 (10), 256 (15), 236 (25), 220 (37), 205 (73), 191 (100). Elementární analýza: pro C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>F<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (578) vypočteno: C 70.56 %, H 9.06 %, F 6.57%, nalezeno: C 70.61 %, H 9.07 %, F 6.55 %.

### 5. Příprava hemiglutarátu **1e**

Obecným postupem byl z difluoralkoholu **1c** (200 mg; 0.4 mmol) připraven hemiglutarát **1e**. Odparek byl nanesen na sloupec silikagelu a byla provedena

chromatografie s gradientem mobilní fáze od 40% ethyl-acetátu v hexanu až po 100% ethyl-acetát. Následnou lyofilizací z *t*-BuOH byl získán hemiglutarát **1e** (110 mg; 44 %) o t.t. 230.0 °C a  $[\alpha]_D +41.5$  (c 0.24). IČ spektrum: 1710 (C=O), 1744 (C=O), 2866 (COOH), 2946 (COOH), <sup>1</sup>H NMR spektrum: 0.80 s, 0.90 s, 0.92 s, 0.93 d (J=0.9), 0.93 s, 1.00 s, 1.04 s, 21 H (7xCH<sub>3</sub>); 1.97 – 2.10 m, 2H (HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO); 2.31 td, 1H (J=13.7, J'=4.9, H-1α); 2.40 – 2.60 m, 4H (HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO); 3.46 d, 1H (J=7.8, H-28a); 3.54 s, 1H (H-19α); 3.78 d, 1H (J=7.6, H-28b); 4.87 dd, 1H (J=23.3, J'=5.8, H-3α). MS m/z (%): [Pro C<sub>35</sub>H<sub>54</sub>F<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, M<sup>+</sup> 592]: 591 (M<sup>+</sup>-H, 100), 544 (5), 425 (13), 361 (13), 32 (13), 265 (8). Elementární analýza: pro C<sub>35</sub>H<sub>54</sub>F<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (592) vypočteno: C 70.91 %, H 9.18 %, F 6.41 %, nalezeno: C 70.89 %, H 9.17 %, F 6.44 %.

## 5. Příprava dimethylhemiglutarátu **1f**

Do roztoku difluoralkoholu **1c** (200 mg; 0.40 mmol) v pyridinu (2 ml) byl přidán 3,3-dimethylglutaranhydrid (620 mg; 4.4 mmol) a DMAP (400 mg; 8 mmol). Po 10 hodinách refluxu při 120 °C (TLC fáze F) bylo přidáno několik kapek vody a dále byla reakční směs 1 h refluxována. Poté byla reakční směs zpracována postupem A. Filtrací v chloroformu přes sloupec silikagelu a následnou lyofilizací z *t*-BuOH byl získán dimethylhemiglutarát **1f** (190 mg; 73 %) o t.t. 111.4 °C a  $[\alpha]_D +20.8$  (c 0.39). IČ spektrum: 1689 (C=O), 2700 (COOH), 2964 (COOH), <sup>1</sup>H NMR spektrum: 0.81 s, 0.91 s, 0.92 s, 0.93 s, 0.93 s, 1.00 s, 1.03 s, 21 H (7xCH<sub>3</sub>); 1.17 s, 1.18 s, 6H (2xCH<sub>3</sub>); 2.31 td, 1H (J=13.7, J'=4.8, H-1α); 2.52 s, 2H; 2.53 d, 1H (J=14.8); 2.67 d, 1H (J=14.8) (HOOCCH<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>COO); 3.47 d, 1H (J=7.7, H-28a); 3.59 s, 1H (H-19α); 3.81 d, 1H (J=7.8, H-28b); 4.88 dd, 1H (J=23.4, J'= 5.9, H-3α). MS m/z (%): [Pro C<sub>37</sub>H<sub>58</sub>F<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, M<sup>+</sup> 620]: 619 (M<sup>+</sup>-H, 100), 508 (3), 465 (3), 385 (4), 325 (5), 265 (4), 181 (3). Elementární analýza: pro C<sub>37</sub>H<sub>58</sub>F<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (620) vypočteno: C 71.58 %, H 9.42 %, F 6.12 %, nalezeno: C 71.55 %, H 9.41 %, F 12.95 %.

## Tabulky $^{13}\text{C}$ NMR spekter

Přiřazení signálů  $^{13}\text{C}$  NMR spekter bylo provedeno na základě DEPT spekter a podle analogií. Číslování atomů uhlíku jednotlivých sloučenin je uvedeno v příloze na str. 34.

atom C	Sloučenina		
	1d	1e	1f
1	46.68 t (J=19)	46.66 t (J=19)	46.65 t (J=19)
2	121.47 (J=242, J'=250)	121.54 (J=240, J'=248)	121.52 (J=240, J'=249)
3	77.65 t (J=19)	77.20	77.12
4	39.44 d (J=6)	39.37 d (J=6)	39.32 (J=6)
5	55.09	55.04	55.06
6	17.93	17.95	17.95
7	33.56	33.56	33.57
8	40.88	40.88	40.87
9	51.41	51.42	51.40
10	38.42 d (J=9)	38.43 d (J=9)	38.41 (J=9)
11	21.30	21.28	21.28
12	26.29	26.29	26.29
13	34.00	33.99	33.94
14	40.77	40.77	40.77
15	26.22	26.22	26.20
16	36.68	36.68	36.63
17	41.44	41.44	41.44
18	46.75	46.74	46.71
19	87.93	87.92	87.99
20	36.23	36.23	36.18
21	32.66	32.66	32.64
22	26.18	26.17	26.13
23	28.57	28.75	28.72
24	16.41 (J=3)	16.48 d (J=3)	16.48 d (J=3)
25	15.93 (J=6)	15.94 d (J=6)	15.89 d (J=6)
26	15.67	15.67	15.66
27	13.42	13.42	13.42
28	71.17	71.16	71.05
29	24.51	24.51	24.50
30	28.76	28.75	28.72
1'	171.64	172.41	171.56
2'	28.80	33.16	44.67
3'	28.90	19.96	32.52
4'	177.00	32.60	45.07
5'	-	177.69	178.03
6'	-	-	27.77
7'	-	-	27.77

## ZÁVĚR

1. Byla provedena rešerše přípravy a potenciálního farmakologického využití fluorovaných lupanových triterpenoidů a hemiesterů lupanových triterpenoidů.
2. Byl připraven difluorketon **1b** a difluoralkohol **1c** a dále hemisukcináty **1h** a **1e**, hemiglutarát **1f** a dimethylhemiglutarát **1g**.
3. Celkově byly připraveny 3 dosud nepopsané sloučeniny **1e**, **1f** a **1g**. U všech tří byla provedena úplná charakterizace.
4. Všechny tyto látky byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii CEM metodou MTT testu.

# LITERATURA

1. Nussbaum R. L., Melnnis R. R., Willard H. F.: *Klinická genetika*, Triton, Praha 2004.
2. Hajdúch M., Džubák P., Šarek J.: *Klin. Farmakol. Farm.* **18**, 14 (2004).
3. Džubák P, Šarek J., Cwiertka K., Hajdúch M., Vydra D.: *Klin. Farmakol. Farm.* **18**, 96 (2004).
4. Yasukawa K., Takido M., Matsumoto T., Takeuchi M., Nakagawa S.: *Oncology* **48**, 72 (1991).
5. 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., Dasgupta T. K., Pezzuto J. M.: *Nat Med.* **1**, 1046 (1995).
6. Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **23**, 394 (2006).
7. Sun I-Ch., Shen J.-K., Wang H.-K., Cosentino L. M., Lee K.-H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1267 (1998).
8. [http://www.aidsinfo.nih.gov/DrugsNew/DrugDetailT.aspx?MenuItem=Drugs&int\\_id=414&Search=Off&ClassID=&TypeID=](http://www.aidsinfo.nih.gov/DrugsNew/DrugDetailT.aspx?MenuItem=Drugs&int_id=414&Search=Off&ClassID=&TypeID=)
9. Evers M., Poujade Ch., Soler F., Ribeill Y., James C., Lelièvre Y., Gueguen J.-Ch., Reisdorf D., Morize I., Pauwels R., De Clerdq E., Hénin Y., Bousseau A., Mayaux J.-F., Le Pecq J.-B. D., Dereu N.: *J. Med. Chem.* **39**, 1056 (1996).
10. Middleton W. J.: *J. Org. Chem.* **40**, 574 (1975).
11. Hudlický M.: *Org. React.* **35**, 513 (1988).
12. Biedermann D.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2003.
13. Biedermann D. Sarek J., Klinot J., Hajduch M., Dzubak P.: *Synthesis* **7**, 1157 (2005)
14. Kim D S. L., Pezzuto J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1707 (1998).
15. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* **67**, 1100 (2004).
16. Hashimoto F., Kashiwada Y., Cosentino L. M., Chen Ch.-H., Garrett P. E., Lee K.-H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 2133 (1997).

17. Kashiwada Y., Chiyo J., Ikeshiro Y., Nagao T., Okabe H., Cosentino L. M., Fowke K., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 183 (2001).
18. Sun I-Ch., Wang H.-K., Kashiwada Y., Shen J.-K., Cosentino L. M., Chen Ch.-H., Yang L.-M., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.* **41**, 4648 (1998).
19. Kashiwada Y., Sekiya M., Ikeshiro Y., Fujioka T., Kilgore N. R., Wild C. T., Allaway G. P., Lee K.-H.: *Bioorg. Med Chem. Lett.* **14**, 5851 (2004).
20. Li T.-S., Wang J.-X., Zheng X.-J.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 3957 (1998).
21. Kvasnica M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2003.
22. Klinot J., Vystrčil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **31**, 1079 (1966).
23. Korovin A. V., Thachev A. V.: *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **50**, 304 (2001).
24. Kubelka T.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.
25. Cvak J.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 1999.
26. Nosková V.: *Dizertační práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2002.
27. Hajdúch M., Mihál V., Minařík J., Faber E., Šafářová M., Weigl E., Antálek P.: *Cytotechnology* **19**, 243 (1996).
28. Flekhter O. B., Medvedeva N. I., Karachurina L. T., Baltina L. A., Galin F. Z., Zarudii F. S., Tolstikov G. A.: *Pharm. Chem. J.* **39**, 401 (2005).

## PODĚKOVÁNÍ

Závěrem bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Šarkovi, Ph.D za zajímavý námět pro mou bakalářskou práci, za veškerý čas, který mi věnoval, a za nesčetné rady, připomínky a konzultace.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Ivě Rudovské, Ph.D za měření NMR spekter a ochotnou pomoc s jejich interpretací, RNDr. Stanislavu Hilgardovi, CSc. za měření IR spekter, RNDr. Martinu Štíchovi za měření MS spekter, Mgr. Bohuně Šperlichové za měření teplot tání a optických rotací a RNDr. Miroslavu Kvasnicovi za pomoc s interpretací veškerých spekter.

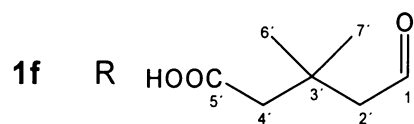
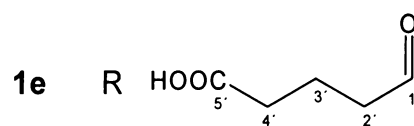
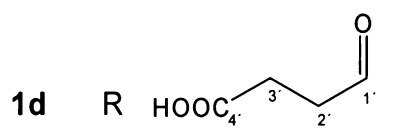
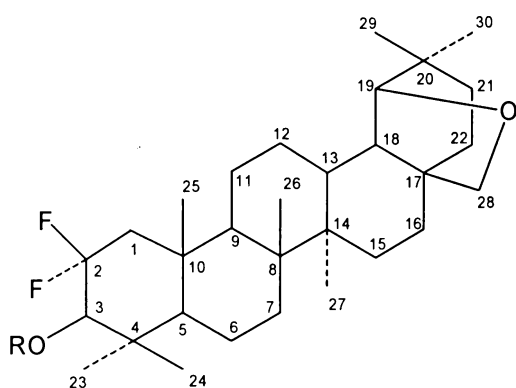
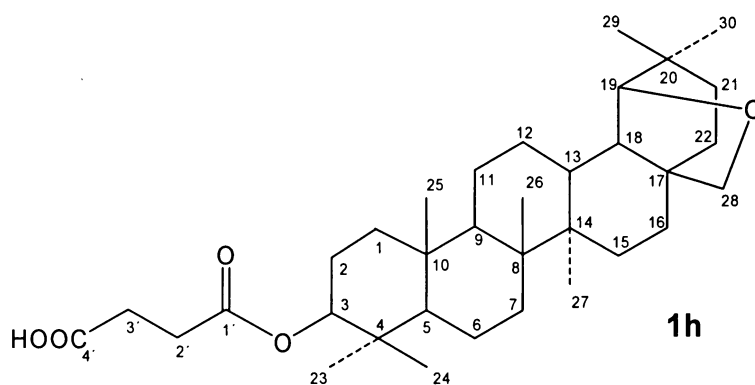
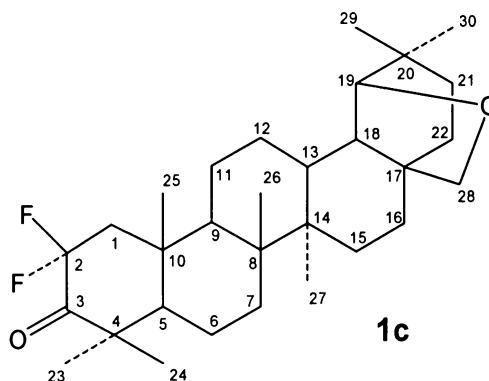
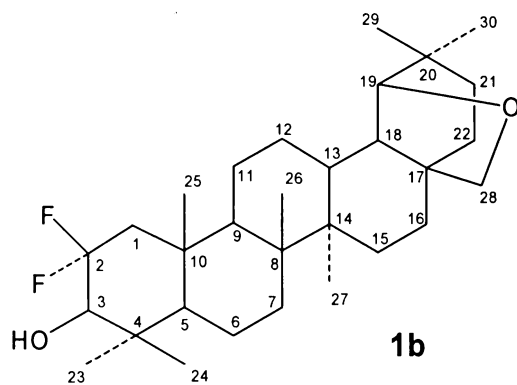
Děkuji také Doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D a dalším pracovníkům Laboratoře experimentální analýzy FN Olomouc za veškerá měření cytotoxických aktivit připravených sloučenin.

Mé díky patří všem kolegům z laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Za trpělivost a mnohé zajímavé rady a podněty děkuji především Mgr. Lence Markové.

Hlavně bych ale chtěla poděkovat mé rodině za psychickou podporu, finanční zázemí a umožnění studia.



# PŘÍLOHA: VZORCE PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN A JEJICH ČÍSLOVÁNÍ



## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v mimo tuto práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

A handwritten signature in cursive script, written in black ink, positioned above a horizontal dotted line.

podpis