

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie



***Příprava heterocyklických esterů triterpenoidních
kyselin s cytotoxickou aktivitou***

Michal Tichý

Bakalářská práce

Klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

*Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře organické a jaderné chemie
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2006 – 2007 pod
vedením RNDr. JANA ŠARKA, Ph.D.*

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
Ac _m	acetoxymethyl
Ac ₄ Gal-Br	2,3,4,6-tetraacetyl- α -D-galaktopyranosylbromid
Ac ₄ Glc-Br	2,3,4,6-tetraacetyl- α -D-glukopyranosylbromid
Bn	benzyl
Boc	<i>tert.</i> butoxykarbonyl
BOP-Cl	bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)chlorofosfonát
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
EEDQ	2-ethoxy-1-ethoxykarbonyl-1,2-dihydrochinolin
Et	ethyl
IČ	infračervená spektroskopie
Me	methyl
MeCN	acetonitril
MS	hmotnostní spektrometrie, hmotnostní spektrum
NMR	nukleární magnetická rezonance
Ph	fenyl
Pip	piperidin-1-yl
Pyr	pyrrolidin-1-yl
r.t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
<i>t</i> -BuOH	2-methylpropan-2-ol
TEMPO	2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl
THF	tetrahydrofuran
t.t.	teplota tání
zahř.	zahřívání

SEZNAM NÁDOROVÝCH LINÍÍ

A549	lidský plicní karcinom
CEM	lidská T-lymfoblastická leukémie
DU145	lidský karcinom prostaty
HCT 15	lidský karcinom tlustého střeva
HT 29	karcinom střeva
Jurkat	lidský lymfom
K-562	lidská myeloidní leukémie
L 1210	lymfocytická leukemie
MEL-1	lidský melanom
MEL-2	lidský melanom
OVCAR-3	lidský ovariální karcinom
PC-3	lidský karcinom prostaty
P-388	lymfocytická leukemie
SK-MEL-2	lidský melanom
SK-OV-3	lidský ovariální karcinom
SW 620	lidský karcinom střeva

Poznámka k číslování sloučenin:

V této práci jsou použity dva způsoby číslování sloučenin. Sloučeniny nepřipravené v rámci této práce jsou číslovány arabskými číslicemi podle pořadí, v jakém se vyskytují v textu. Sloučeniny připravené v této práci jsou pro odlišení číslovány římskými číslicemi. Od kapitoly 2 (Příprava výchozích látek) jsou pro výchozí triterpenoidní kyseliny použity též římské číslice.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	3
SEZNAM NÁDOROVÝCH LINIÍ... ..	4
OBSAH.....	5
ÚVOD.....	6
TEORETICKÁ ČÁST.....	7
1 Současný stav studované problematiky.....	8
1.1 Triterpenoidy s biologickou aktivitou	8
1.1.1 Lupanové triterpenoidy s biologickou aktivitou.....	10
1.1.2 Lupanové triterpenoidy s biologickou aktivitou z našeho pracoviště ..	12
1.2 Biologicky odbouratelné estery jako prodrug	14
1.2.1 Sacharidové deriváty	14
1.2.2 Heterocyklické deriváty.....	18
2 Příprava výchozích látek	21
2.1 Příprava triterpenoidů.....	21
2.2 Příprava sacharidových činidel.....	23
3 Příprava biologicky odbouratelných esterů kyselin Ia, Ib	24
3.1 Heterocyklické estery IIIa, IIIc	25
3.2 Oxidace esterů IIIa, IIIb	27
3.3 Sacharidové estery IVa, IVb	28
4 Cytotoxická aktivita připravených derivátů	30
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
TABULKY ¹³ C NMR SPEKTER.....	39
ZÁVĚR.....	41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	42

ÚVOD

Po celou dobu své existence dokázal člověk využívat nejrozmanitějších rostlin k léčení různých nemocí a chorob. S rozvojem moderní vědy a také se stoupajícím výskytem nádorů dochází, zejména v posledních 40 letech, ke zvýšenému zájmu o izolaci a derivatizaci přírodních látek a jejich využití jako cytostatik. Tato snaha je ovšem komplikována skutečností, že účinné sloučeniny se v přírodním materiálu často vyskytují jako minoritní složky komplikovaných směsí.

Triterpenoidy tvoří nemalou část velké skupiny přírodních látek zvaných isoprenoidy. V současné době do skupiny cyklických triterpenoidů patří více jak 4000 různých látek, kromě volných terpenoidů také např. saponiny (triterpenoidní glykosidy)¹. Kromě protinádorových účinků¹ byly u triterpenů popsány další účinky - protizánětlivé², protivředové², antimikrobiální², antivirové² (včetně anti-HIV), hepatoprotektivní², analgetické² a další².

Na našem pracovišti již několik let probíhá systematický výzkum triterpenů odvozených od lupanového, 18 α -oleananového a des-E-lupanového skeletu. V rámci tohoto výzkumu byla připravena série derivátů – betulininů, které prokázaly vyšší aktivity a širší spektrum účinků^{např.}³ a jsou chráněny mezinárodními patenty^{4,5,6}.

Mezi des-E-lupanové deriváty patří i jedna z nejúčinnějších sloučenin, β -ketokyselina (3 β ,28-diacetoxy-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-ová kyselina). Právě přípravou derivátů β -ketokyseliny se zabývá tato práce.

Cíle této bakalářské práce byly:

- Provést literární rešerši přípravy a využití sacharidových a heterocyklických esterů lupanových triterpenoidů.
- Připravit vybrané sacharidové a heterocyklické estery 3 β ,28-diacetoxy-18 α -hydroxy-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-ové kyseliny.

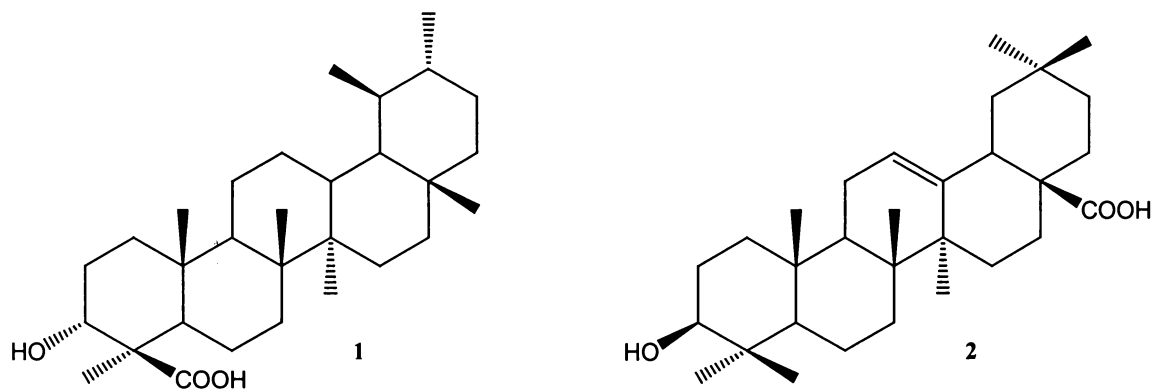
TEORETICKÁ ČÁST

1 Současný stav studované problematiky

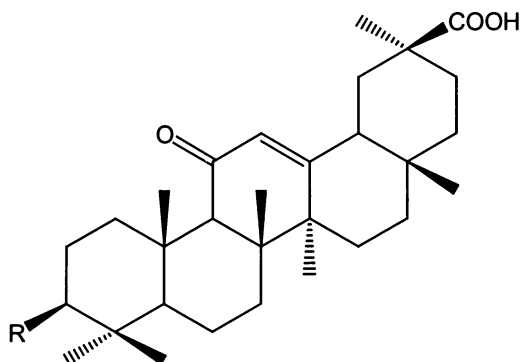
1.1 Triterpenoidy s biologickou aktivitou

Terpeny se běžně vyskytují v rostlinách, houbách, vzácně mohou být akumulovány a metabolizovány bakteriemi nebo některými zvířaty¹. Triterpenoidy lze nalézt v běžných rostlinách a ovoci jako je např. smetánka lékařská, jablko, hruška nebo brusinka¹.

V pryskyřici stromu *Boswellia serrata* je ve vysokých koncentracích přítomna kyselina boswellová (1), která je odpovědná za protizánětlivé účinky této pryskyřice, hojně využívané v indické medicíně⁷. Kyselina oleanolová (2) se ve vysokých koncentracích vyskytuje v kořenu ženšenu⁸. Má, podobně jako kyselina boswellová (1), protizánětlivé účinky⁹. Oleanolová kyselina (2) disponuje také hepatoprotektivními účinky¹⁰.

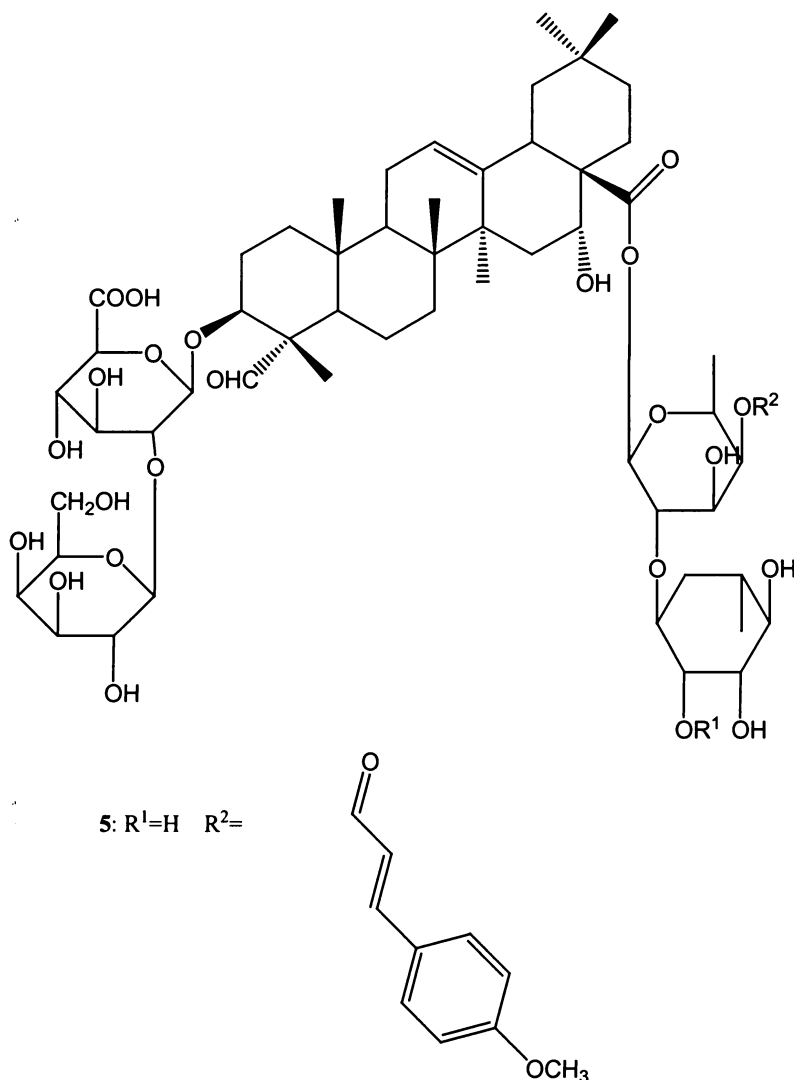


Lékořice (*Glycyrrhiza sp.*) obsahuje kromě glycyrrhetové kyseliny (3) také její 3 β -O-glykosid - glycyrrhizin (4). Podávání glycyrrhizinu (4) inhibuje vývoj nádorů jater a plic u myši¹¹.

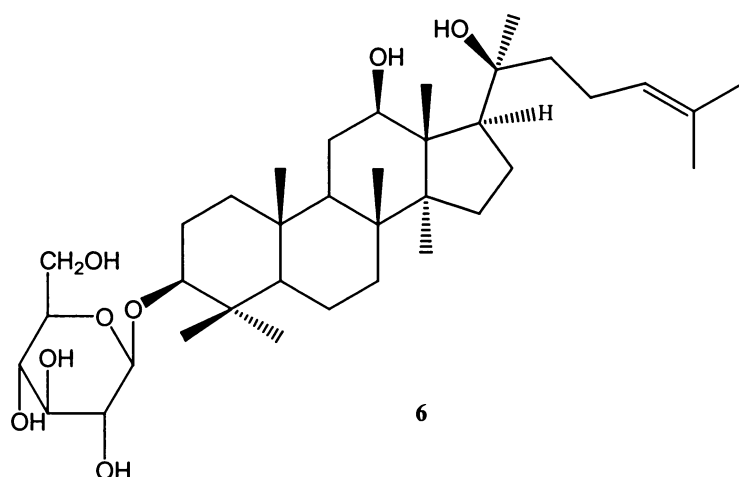


3: R=OH
4: R=O-glc UA-O-glc UA

Jenisseensosidy, např jenisseensosid D (15) jsou triterpenoidní saponiny izolované z rostliny *Silene jenisseensis*. Ve vyšších koncentracích způsobují apoptozu buněk linie Jurkat¹².

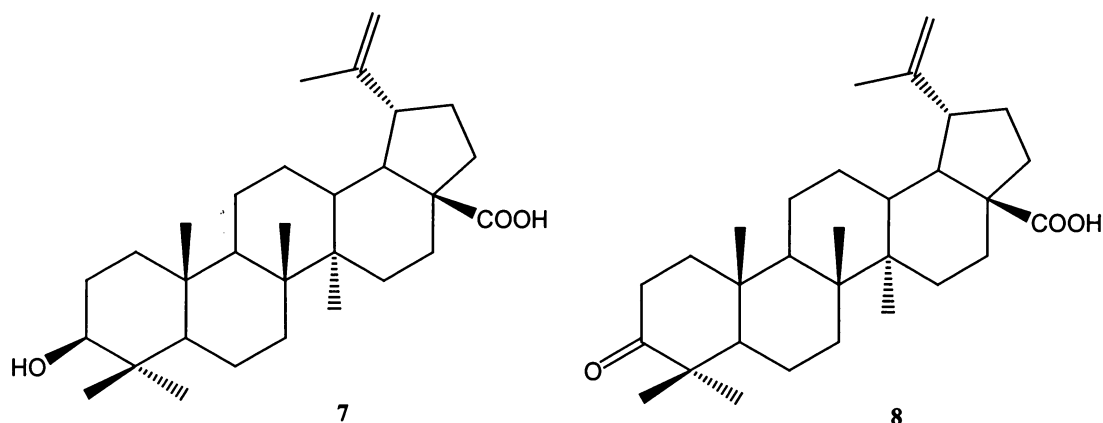


Nejznámějšími triterpenoidními glykosidy jsou ginsenosidy R(x), nalezené ve všehoji lékařském (*Panax ginseng*). Extrakt ze všehoje inhibuje syntézu DNA a zvyšuje reparační aktivitu po mutagenním působení¹¹. Ginsenosid Rh-2 (6) má inhibiční aktivitu proti růstu myších i lidských nádorových linií¹³.



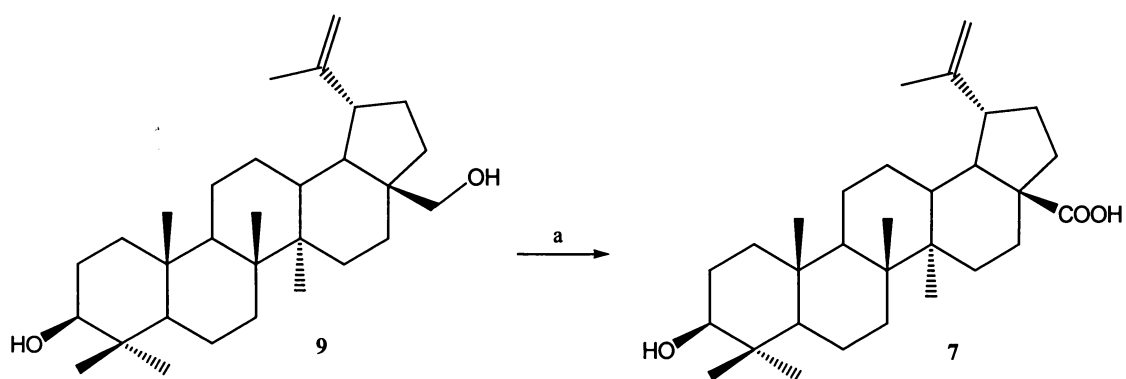
1.1.1 Lupanové triterpenoidy s biologickou aktivitou

Biologická aktivita lupanových triterpenoidů je předmětem mnoha studií. Jedna z nich¹⁴ se zabývala hledáním účinných inhibitorů nádorových linií z léčivých rostlin. Bylo zjištěno, že kyselina glycyrrhetová (3), betulinová (7) a betulonová (8) vykazují vysokou cytotoxickou aktivitu proti nádorovým liniím A549, SK-OV-3, SK-MEL 2 a HCT 15¹⁴. Aktivita těchto tří kyselin 3, 7 a 8 se pohybovala v rozmezí 0.8-11.2 µg/ml, přičemž nejaktivnější byla kyselina betulonová¹⁴ (8).



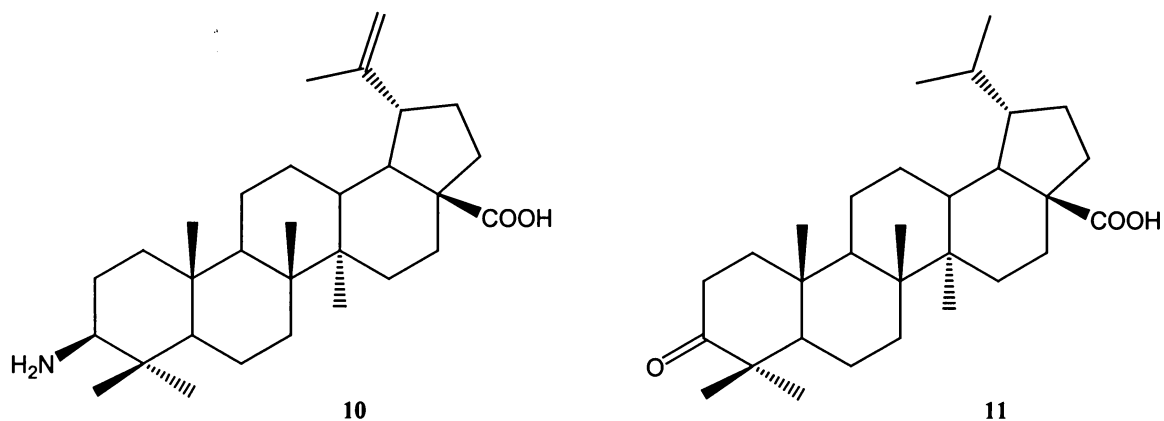
Velký zájem o kyselinu betulonovou (7) vzbudila práce¹⁵, která se zabývala nejen izolací kyseliny betulonové (7) z kůry *Ziziphus mauritania*, ale také studiem její cytotoxicity. Kyselina betulonová (7) disponuje selektivní cytotoxickou aktivitou proti lidskému melanomu, přičemž není toxická proti normálním buňkám v testovaných dávkách 200 a 400 mg/kg¹⁵.

Další zajímavou sloučeninou je betulin (9), který se vyskytuje ve svrchních vrstvách březové kůry, kde tvoří až 25 % suché hmoty.¹⁶ Betulin (9) sám o sobě žádnou významnou biologickou aktivitu nevykazuje, lze ho však snadno převést na kyselinu 7 ve výtěžku 75 % (schema 1)¹⁷.



Schema 1: a: TEMPO, NaCl₂O, NaClO

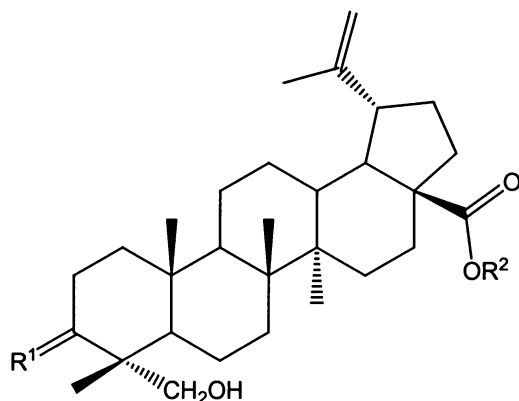
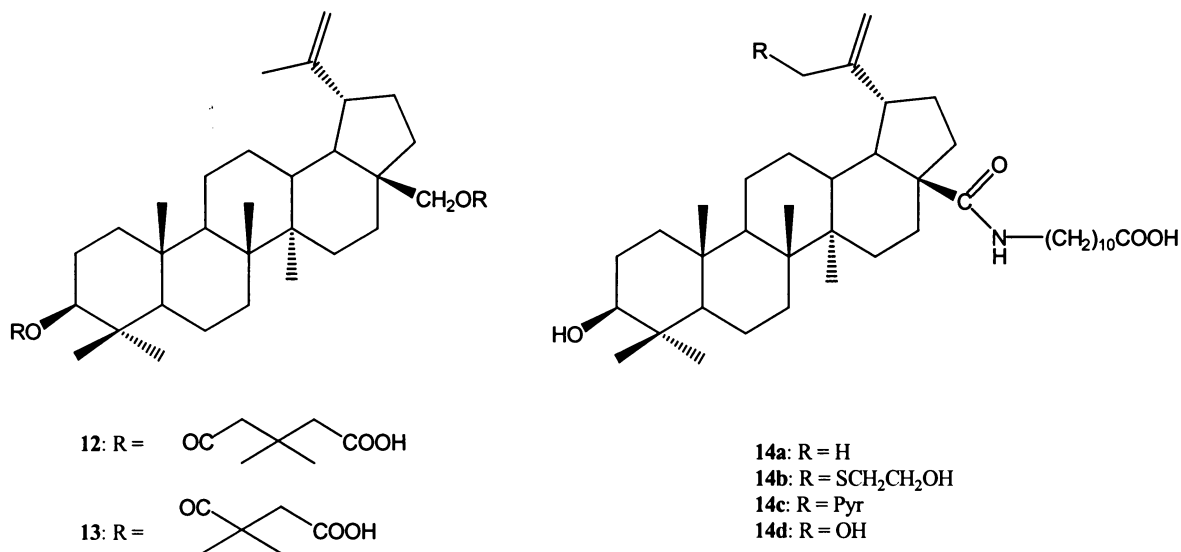
V práci¹⁸ zabývající se studiem zvýšení cytotoxicity bylo z kyseliny betulinové (7) (ED₅₀ 1.2 µg/ml) připraveno několik derivátů, které vykazují stejnou nebo zvýšenou aktivitu proti lidskému melanomu - 3β-aminoderivát **10** (1.3 µg/ml) a dihydrobetulonová kyselina (**11**) (0.7 µg/ml)¹⁸.



Kromě již zmíněných cytotoxických účinků byly u derivátů kyseliny betulinové (7) nalezeny také anti-HIV účinky¹⁶. Samotná kyselina **7** je sice aktivnější než betulin (**9**), ale přesto jsou obě sloučeniny považovány za neaktivní vůči HIV. Jako velmi účinné se však ukázaly diestery **12** a **13** s aktivitou proti HIV 1¹⁶ - 0.66 a 0.87 nM a terapeutickým indexem 21 515 a 42 400. Významnou aktivitu mají také deriváty¹⁹ **14a-14d** s navázanou 11-aminoundekanovou kyselinou v poloze C-28. Jejich anti-HIV aktivita¹⁹ je nižší než 1 µM.

Jako další příklad lupanových triterpenoidů s biologickou aktivitou mohou být uvedeny sloučeniny izolované z kořenů *Pulsatilla chinensis* (koniklec čínský)²⁰. Tato rostlina je hojně využívána v tradiční čínské medicíně k léčbě úplavice a malárie. Kořen *P. chinensis* obsahuje kyselinu pulsatillovou (**15**) a lupanové glykosidy - pulsatillosidy A (**16a**) a B (**16b**). Kyselina pulsatillová (**15**) má cytotoxickou aktivitu proti nádorovým liniím

P-388 (4.8 $\mu\text{g/ml}$), Lewisovu plicnímu karcinomu (5.9 $\mu\text{g/ml}$) a lidskému plicnímu karcinomu (1.9 $\mu\text{g/ml}$)²⁰.

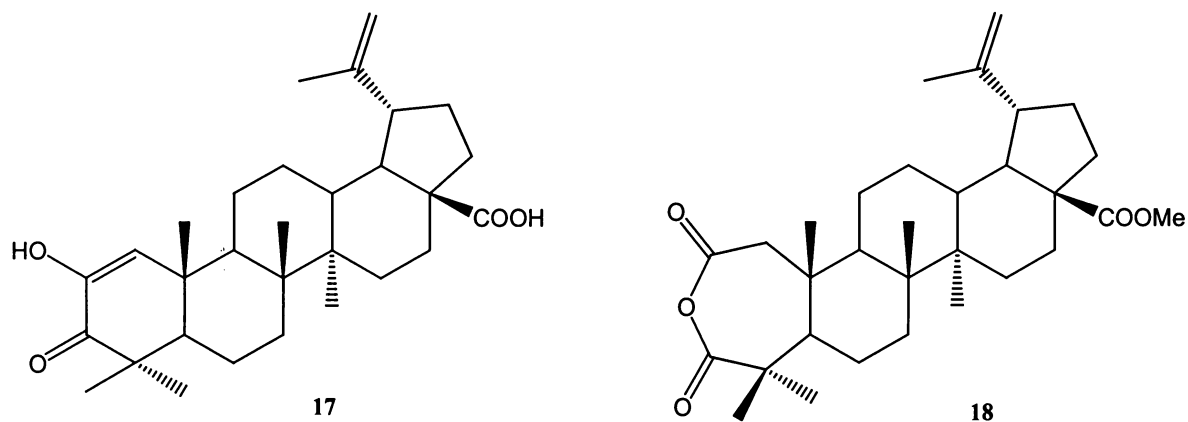


16a: R¹: $\alpha = \text{H}$, $\beta = O\text{-}\alpha\text{-L-arabinopyranosyl}$, R² = H
 16b: R¹: $\alpha = \text{H}$, $\beta = \text{OH}$, R² = $O\text{-}\beta\text{-D-glc-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glc}$
 15: R¹ = O, R² = H

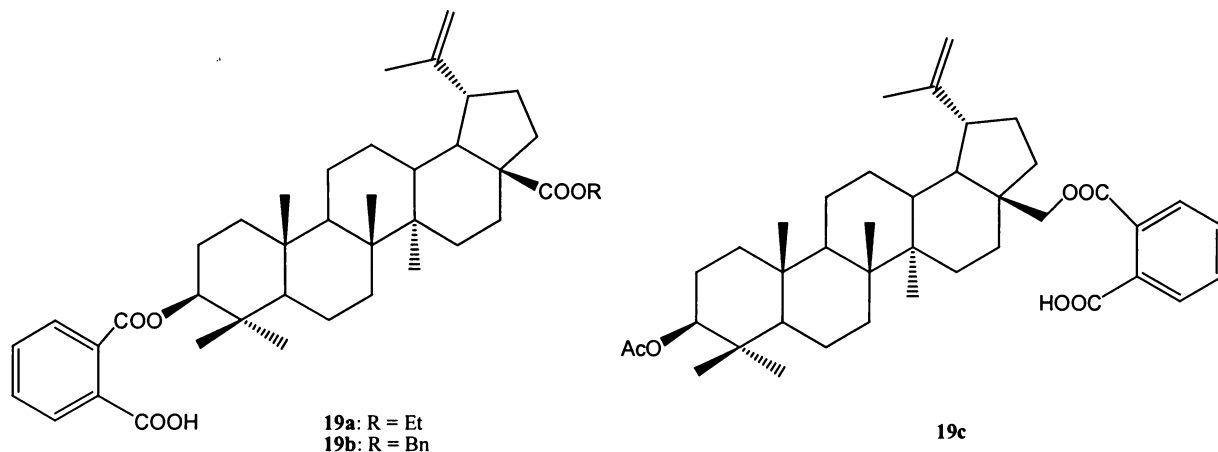
1.1.2 Lupanové triterpenoidy s biologickou aktivitou z našeho pracoviště

Na našem pracovišti probíhá intenzivní výzkum sloučenin odvozených od lupanového, des-E-lupanového a 18α -oleananového skeletu označovaných jako betuliny³. Betuliny disponují cytotoxickým účinkem proti širokému spektru nádorových linií³. Během dosavadního výzkumu bylo připraveno několik sloučenin vykazujících vysokou cytotoxickou aktivitu proti různým nádorovým liniím^{např. 21}.

Největší skupinu tvoří deriváty kyseliny betulinové (**7**) jako např. diosfenol **17** a anhydrid **18** s aktivitou IC_{50} 4-12 μM ²¹ proti nádorovým liniím CEM, HT-29, K-562 a PC-3.



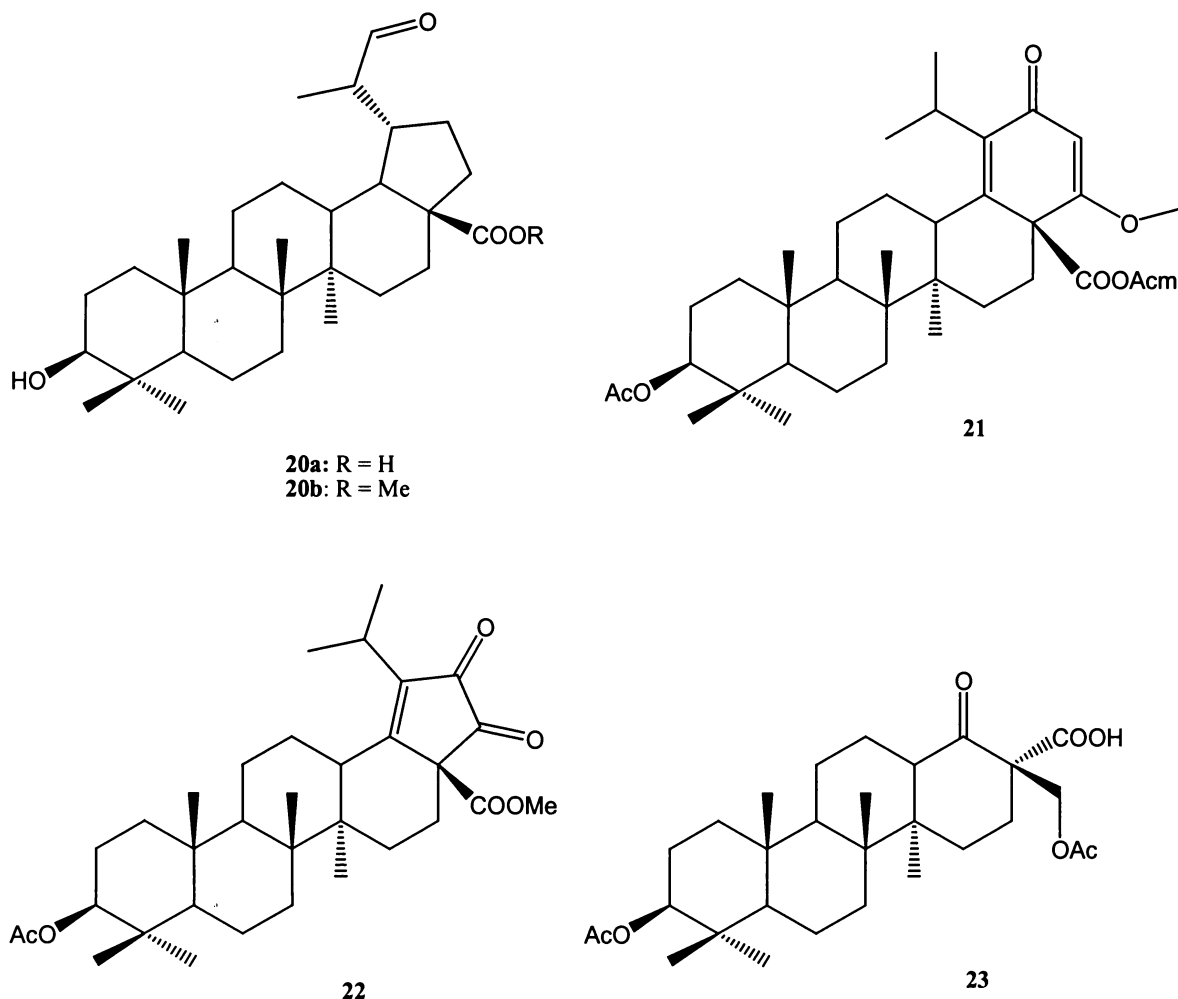
Dále bylo připraveno také několik hemifitalátů (**19a-19c**)²² s cytotoxickou aktivitou proti linii CEM v rozmezí 5-13 μM . Zavedením hemifitalátu do molekuly triterpenu se zvýšila rozpustnost v polárních rozpouštědlech, což je nezbytné pro účely testování cytotoxicity *in vivo*. Další výhodou těchto derivátů je přítomnost volné karboxylové skupiny, která umožňuje další derivatizaci²².



Velice zajímavou skupinu tvoří oxidované deriváty lupanu. Sem patří vysoce aktivní sloučeniny **20a**, **20b**, **21** s hodnotou IC_{50} vůči linii CEM menší než 10 μM .²³

Přítomnost β -dikarboxylového systému v molekule triterpenu je farmakoforem protinádorové aktivity další skupiny sloučenin. Nejaktivnějším derivátem s tímto strukturálním motivem je diketon **22**³.

Skupinu des-E-derivátů lupanu reprezentuje vůbec nejúčinnější sloučenina, β -ketokyselina **23**³. β -ketokyselina **23** má široké spektrum účinků, její aktivita proti mnoha nádorovým liniím³ (např. SW620, DU145, OVCAR-3 nebo CEM) je nižší než 1 μ M.



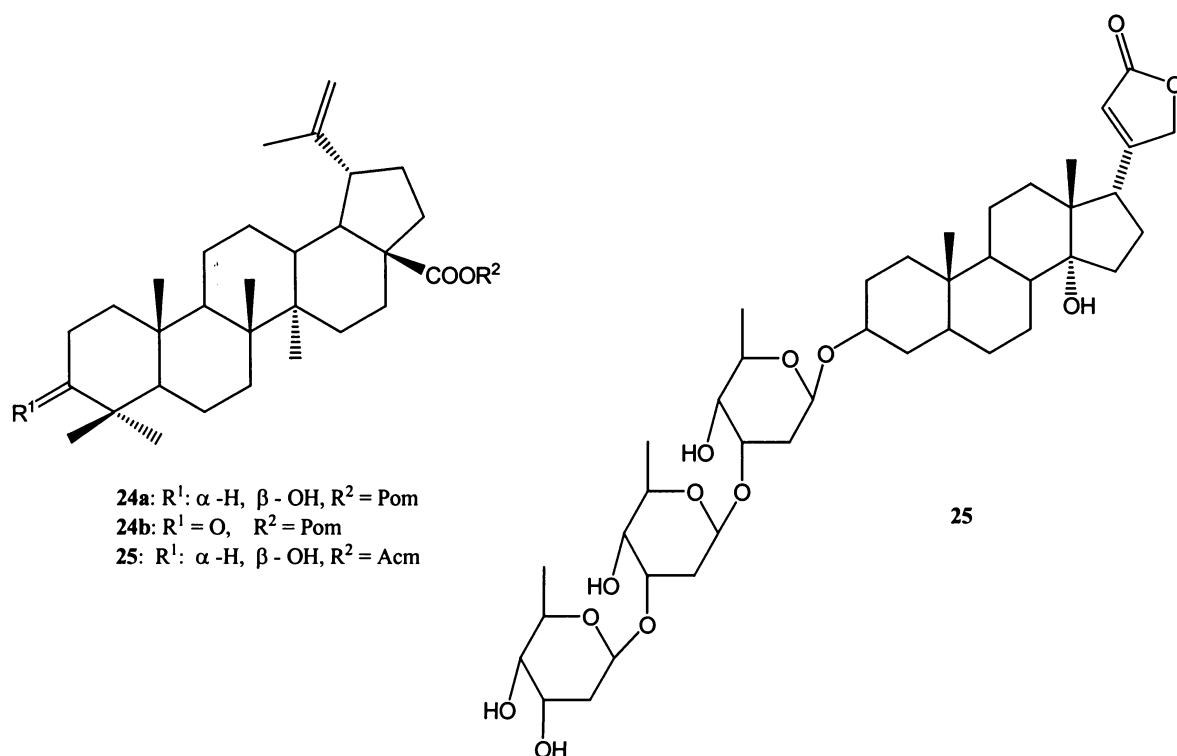
1.2 Biologicky odbouratelné estery jako prodrug

1.2.1 Sacharidové deriváty

Jedním z hlavních zájmů chemiků je připravit taková cytostatika, která by byla vysoce účinná, dobře rozpustná v rozpouštědlech založených na vodné bázi, dostupná ve větších množstvích a snadno purifikovatelná. Těmto nárokům neodpovídají volné triterpenoidní kyseliny, které sice disponují vysokou cytotoxickou aktivitou, nicméně jsou špatně rozpustné ve fyziologických podmínkách a je obtížné je získat ve vysoké čistotě. Tyto problémy nemají jejich estery, které jsou mnohem lépe purifikovatelné. Z literatury^{18,24} je

však známo, že biologická aktivita alkyl-esterů je několikrát menší než u volných kyselin. Proto byly hledány jiné skupiny látek, které by bylo možné využít jako prodrug, tedy derivátů, které se budou enzymaticky štěpit až v místě účinku. Byla připravena série (pivaloyloxy)methyl (Pom) a acetoxymethyl (Acm) esterů, které snadno podléhají intracelulárnímu enzymatickému štěpení²⁵.

Pom-estery (např. **24a** a **24b**) však byly zcela neaktivní²⁶. Acm-estery se ukázaly jako vhodnější deriváty, jejich aktivita byla srovnatelná s výchozími kyselinami²⁶, v případě Acm-esteru **25** byla dokonce biologická aktivita vyšší než u volné výchozí kyseliny **7**.

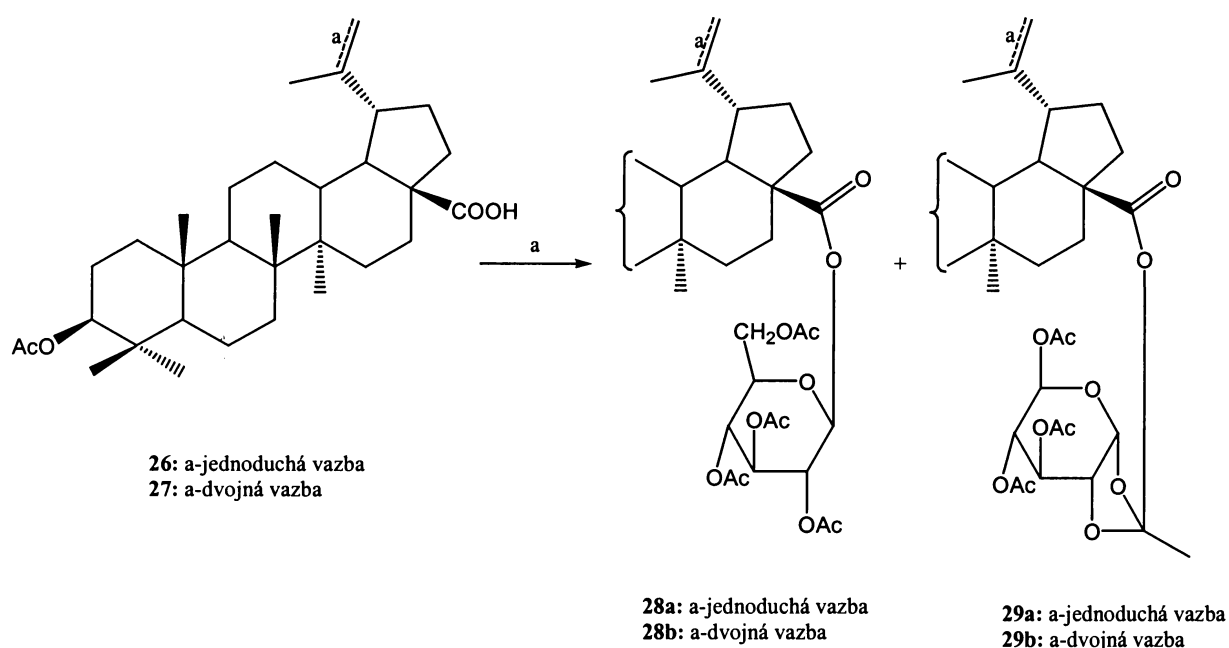


Kromě již zmiňovaných přírodních glykosidů glycyrrhizinu (**4**) a ginsenosidu **6** je velmi známý také digitoxin (**25**) obsažený v náprstníku červeném (*Digitalis purpurea*)²⁷, využívaný jako kardiotonikum²⁷.

Hydrofilní sacharidové složky přírodních saponinů většinou plní pouze úlohu pasivního transportéra nerozpustných aglykonů tím, že umožní jeho částečnou rozpustnost ve vodných médiích. Zavedení polární sacharidové složky do nepolárního triterpenického aglykonu lze uskutečnit např. tradiční Koenigs-Knorrovou metodou²⁸. Ta využívá tetraacetylovaných sacharidových bromidů v acetonitrilu za přítomnosti solí těžkých kovů, např. octanu rtuťnatého, kyanidu rtuťnatého, uhličitanu kademnatého, uhličitanu stříbrného, oxidu stříbrného nebo křemičitanu stříbrného. Tyto soli slouží k odstraňování vznikajícího HBr. Nevýhodou reakce je skutečnost, že často vzniká směs produktů, kromě

α - a β -anomerů také orthoestery.²⁸ Je známo²⁸, že použití $\text{Hg}(\text{CN})_2$ na triterpenických aglykonech poskytuje převážně β -anomer (40-90%).

Při použití $\text{Ac}_4\text{Glc-Br}$ a $\text{Hg}(\text{CN})_2$ v acetonitrilu k derivatizaci kyseliny 3β -acetylbetulínové (**26**) a 3β -acetyldihydrobetulínové (**27**) dochází kromě vzniku očekávaných esterů **28a** a **28b** také ke vzniku orthoacetátů **29a** a **29b**²⁹ (schema 2). Následná deacetylace probíhala za laboratorní teploty v přítomnosti MeONa v MeOH . Práce²⁹ konstatuje, že tato metoda je nevhodná pro přípravu bisglukosyl derivátů kyseliny betulínové, protože kyselina **7** je velmi málo rozpustná v acetonitrilu i směsi acetonitrilu s diethyletherem nebo chloroformem.



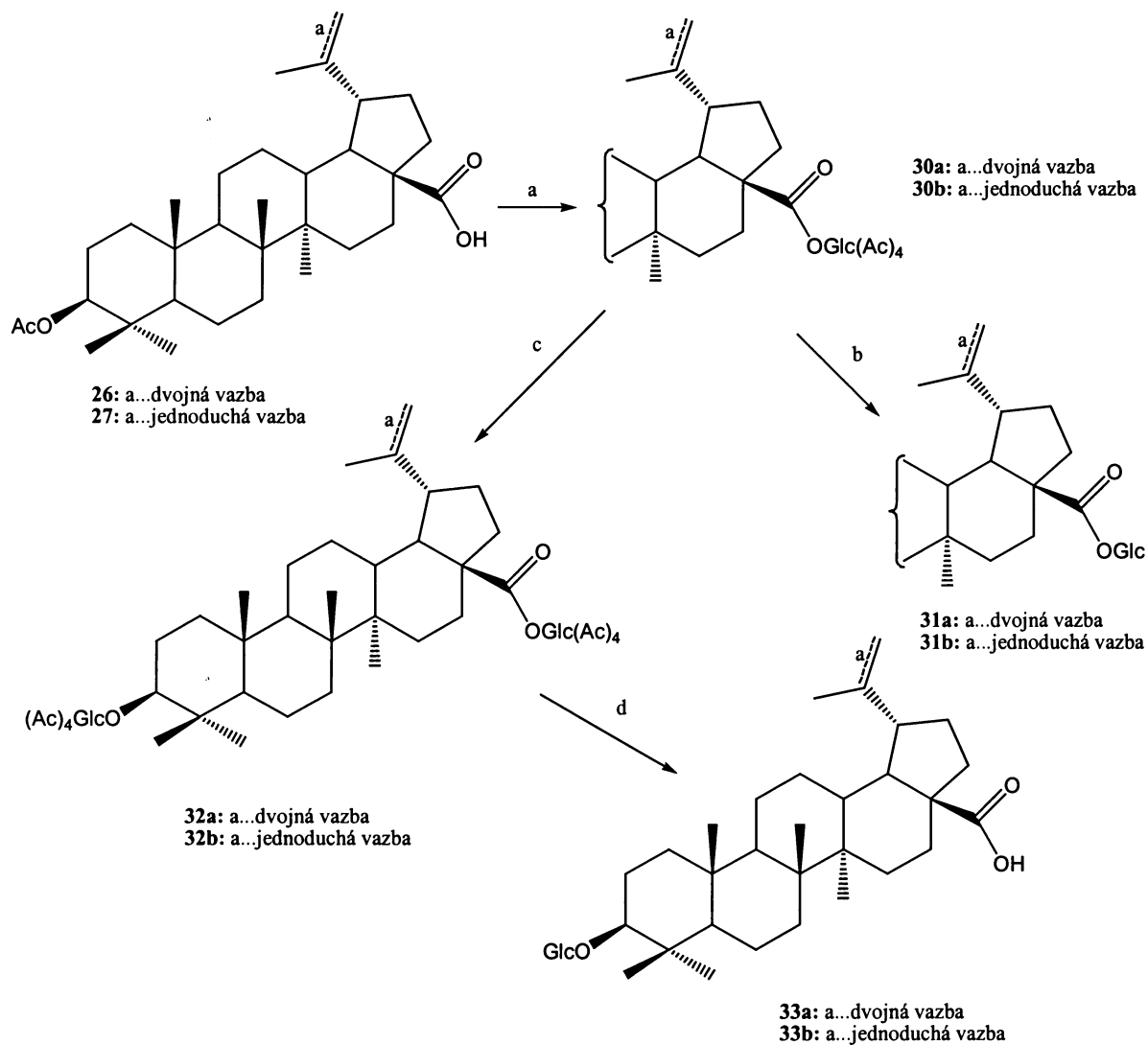
Schema 2: a: $\text{Ac}_4\text{GLC-Br}$, $\text{Hg}(\text{CN})_2/\text{MeCN}$

Cílem práce³⁰ bylo optimalizovat metodu pro přípravu sacharidových derivátů triterpenoidních kyselin. Acetylované glukopyranosové estery na C-28 **30a**, **30b** byly připraveny reakcí kyselin **26**, **27** s $\text{Ac}_4\text{GLC-Br}$ v pyridinu za přítomnosti Ag_2O . Následnou deacetylací MeONa v MeOH byly získány volné estery **31a**, **31b**. Opakovanou glykosylací esterů **30a**, **30b** byly získány deriváty **32a**, **32b**. Alkalická hydrolyza KOH v CH_2Cl_2 poskytla 3β -*O*-glukosidy **33a**, **33b** (schema 3)³⁰

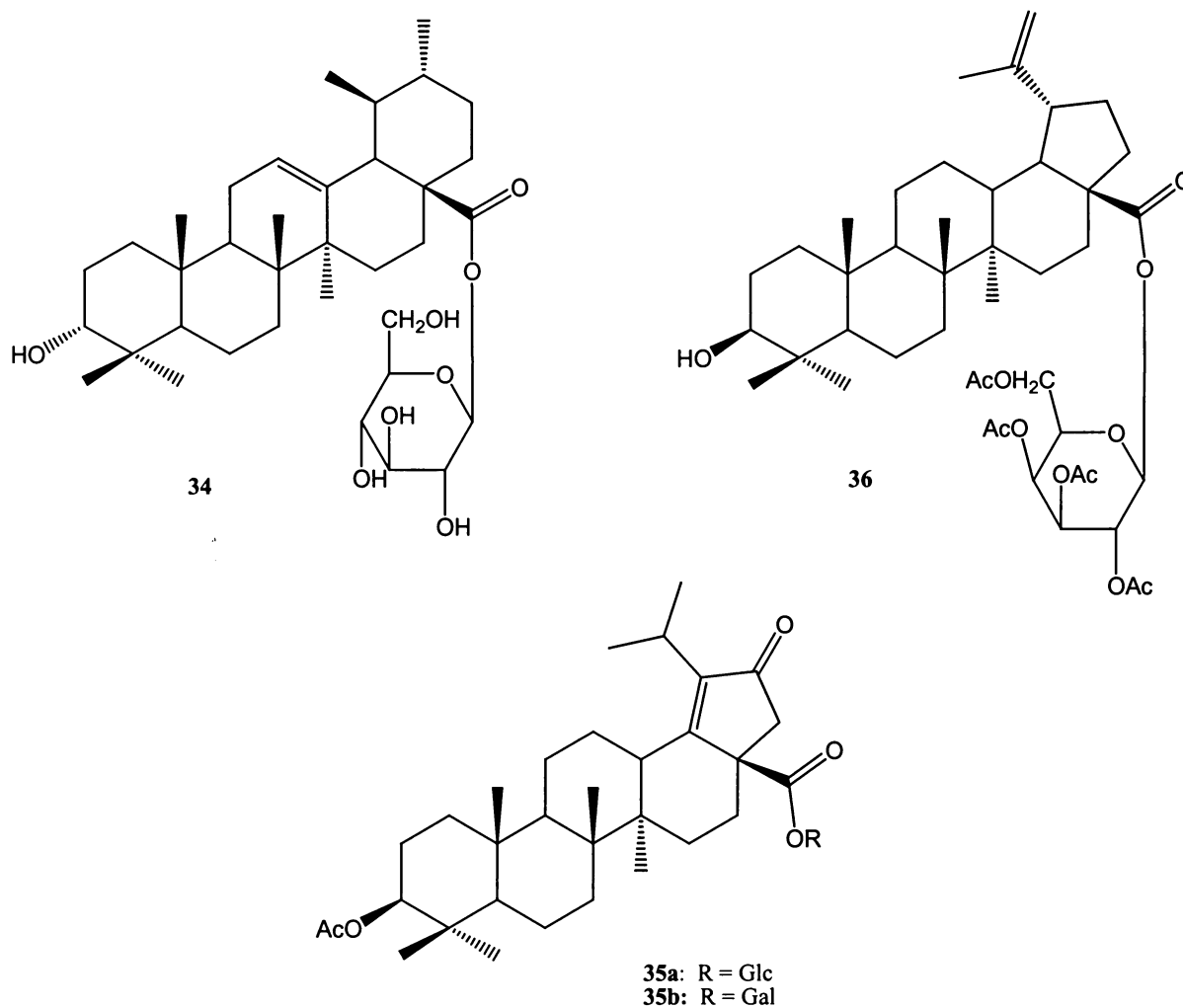
Problémem Koenigs-Knorrovy reakce je přítomnost těžkých kovů, které byly nalezeny³¹ v konečných produktech i po několika čistících krocích metodou AAS.

Práce³² popisuje přípravu a biologickou aktivitu sacharidových esterů triterpenoidních kyselin. Příprava esterů byla prováděna s použitím $\text{Ac}_4\text{Glc-Br}$ nebo $\text{Ac}_4\text{Gal-Br}$ ve směsi acetonu a acetonitrilu s uhlíčanem draselným nebo ve směsi dichlormethanu a acetonitrilu

za přítomnosti DBU. Deacetylace byly prováděny opět v methanolu s katalytickým množstvím methanolátu sodného. K výraznějšímu zvýšení cytotoxické aktivity oproti výchozím kyselinám došlo pouze u β -D-glukopyranosyl a β -D-galaktopyranosyl esterů **35a**, **35b** ($IC_{50} = 21 \mu M$, resp. $IC_{50} = 18 \mu M$). Neaktivnější byl překvapivě tetraacetylovaný derivát **36** ($IC_{50} = 9 \mu M$)³².

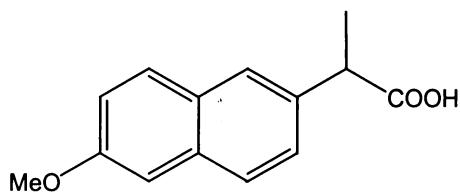


Schema 3: **a:** $Ac_4Glc-Br$, Ag_2O/Py ; **b:** $MeONa/MeOH$; **c:** $Ac_4Glc-Br$, Ag_2O/Py ; **d:** KOH/CH_2Cl_2

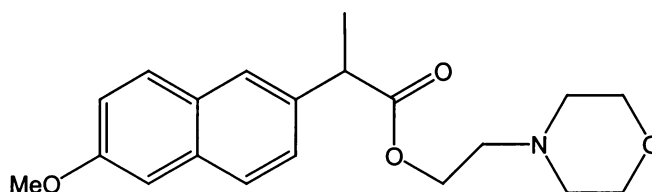


1.2.2 Heterocyklické deriváty

Dalším vhodným typem esterových skupin mohou být heterocyklické deriváty obsahující atom dusíku, např. morfolinoethyl-, pyrrolidinoethyl- nebo piperidinoethyl-estery. Přítomnost ethylového ramínka je nezbytnou podmínkou pro biologickou degradabilitu. Jako příklad pozitivního efektu zavedení morfolinoethylové skupiny může sloužit Naproxen³³ (37), derivát kyseliny propionové s protizánětlivými účinky. Při léčbě Naproxenem (37) je častý výskyt nežádoucích účinků, jako je zvýšená krvácivost a vznik vředů v trávicím traktu. Tyto problémy byly odstraněny přípravou farmakologicky neaktivního morfolinoethyl-esteru 38. Pro svoji větší rozpustnost ve vodných médiích je vhodný pro perorální a intravenózní aplikaci³³.

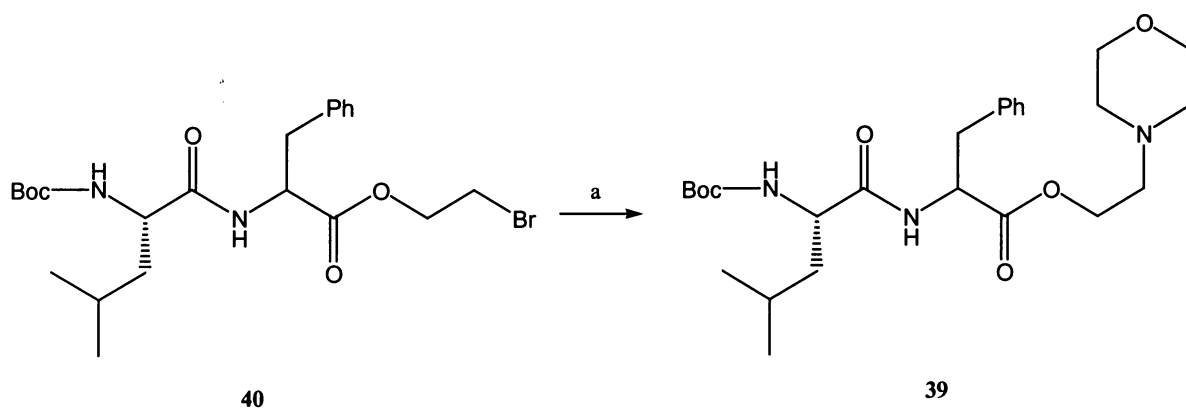


37



38

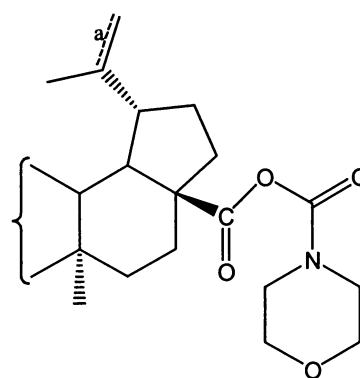
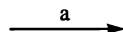
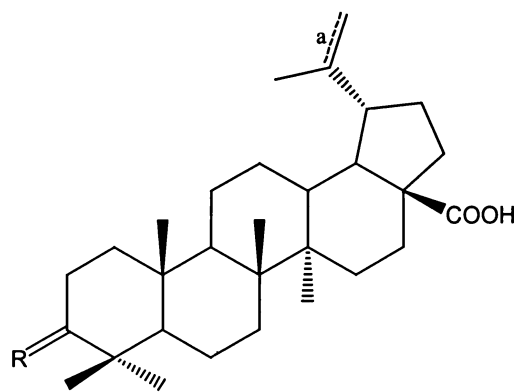
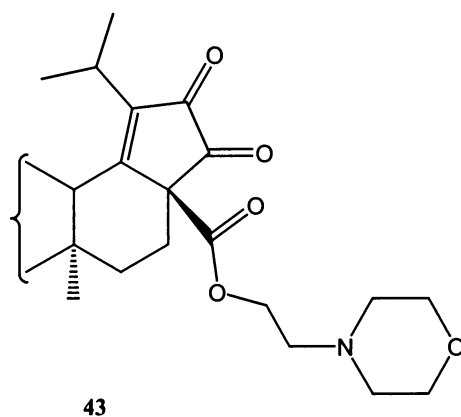
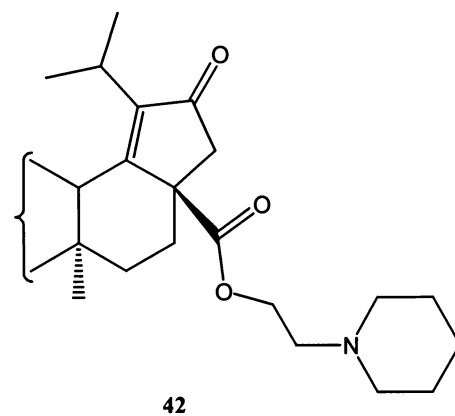
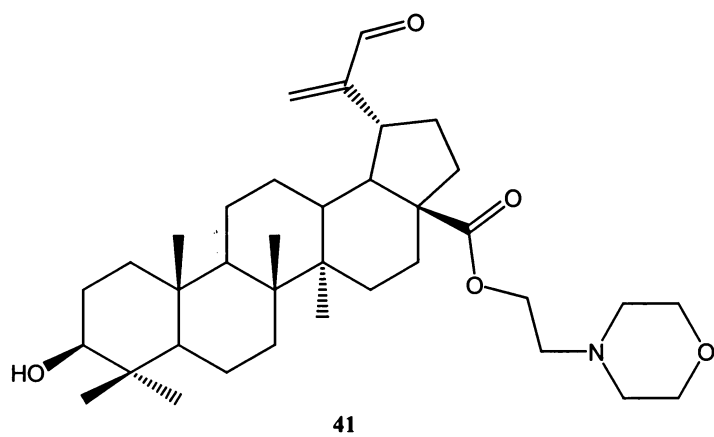
Práce³⁴ se zabývala studiem hydrolyzy chránících skupin peptidů různými typy lipáz. Bylo zkoumáno působení 34 druhů lipáz, jako nejúčinnější se ukázala lipáza N izolovaná z *Rhizopus niveus*, lipáza M z *Mucor javanicus* a lipáza A6 z *Aspergillus niger*. Dále je v této práci³⁴ konstatováno, že 2'-morfolinoethyl-Boc-leucyl-fenylalanin (39) podléhá působením lipáz úplné hydrolyze. Při přípravě esteru 39 byl jako výchozí sloučenina použit 2'-bromethyl-ester 40, (schema 4)



Schema 4: a: morfolin (0 °C)

2'-bromomethyl-estery jsou obecně vhodnými výchozími sloučeninami pro další syntézy³². Jejich cytotoxická aktivita je však zanedbatelná³². V práci³² byly 2'-bromomethyl-estery použity pro syntézu morfolinoethyl-, piperidinoethyl- a pyrrolidinoethyl- esterů triterpenoidních kyselin s cytotoxickou aktivitou³². Nejvyšší cytotoxickou aktivitu vůči linii CEM vykazaly sloučeniny 41, 42, 43.

Morfolinové deriváty lze připravit³⁵ využitím 4-morfolinokarbonyl chloridu v pyridinu za r.t. Touto metodou byly připraveny morfolinokarbonylderiváty 44, 45 a 46 z výchozích kyselin 7, 8 a 47 (schema 5)³⁵. Ani jedna ze sloučenin 44, 45, 46 se však neukázala vhodná jako potenciální virostatikum. Deriváty 44 a 45 mají vysokou anti-HIV aktivitu (EC_{50} 3.2 resp. 26 μ M), avšak velmi nízký terapeutický index (3.6 resp. 1.3), derivát 46 navíc není rozpustný v DMSO, proto nebyl vůbec testován³⁵.

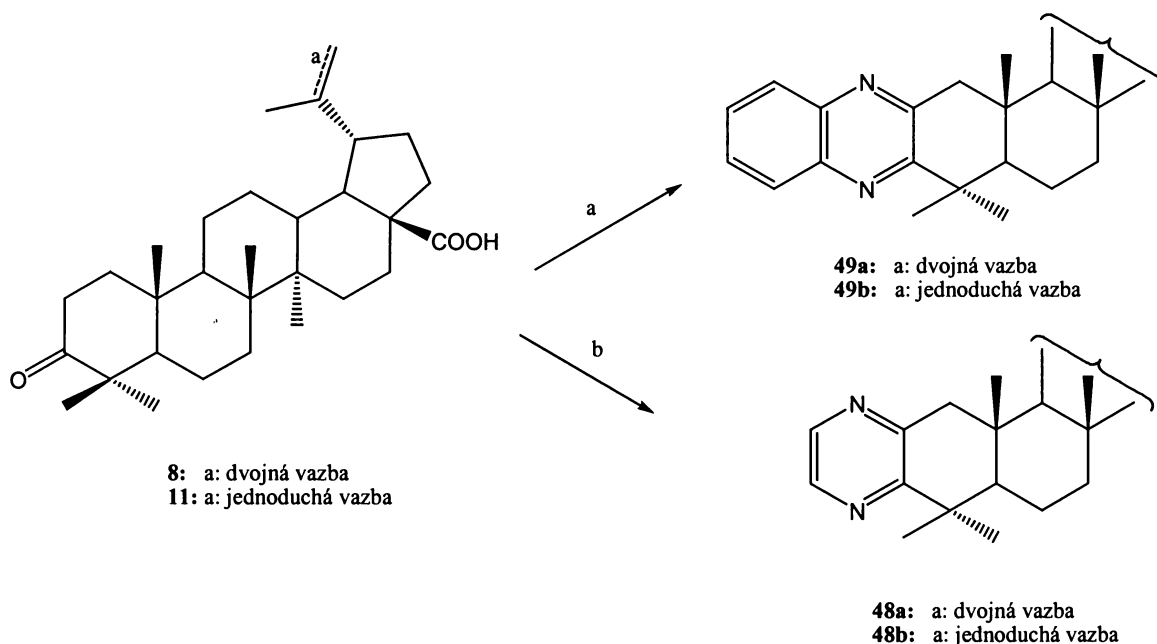


7: R = α -H, β -OH, a: dvojná vazba
 47: R = α -H, β -OH, a: jednoduchá vazba
 8: R = O a: jednoduchá vazba

44: R = α -H, β -OH, a: dvojná vazba
 45: R = α -H, β -OH, a: jednoduchá vazba
 46: R = O a: jednoduchá vazba

Schema 5: a: MfCOCl/Py (r.t.)

Dalšími připravenými heterocyklickými deriváty triterpenoidů byly deriváty s přikondenzovaným pyrazinem nebo benzopyrazinem³⁶ ke kruhu A. Byla připravena³⁶ série pyrazinových a chinoxalinových derivátů a zkoumána jejich cytotoxická aktivita. Pyrazin **48a** prokázal při *in vitro* testech aktivitu proti linii CEM vyšší (IC_{50} 14 μ M), než výchozí kyselina **8** (IC_{50} 20 μ M). Nejaktivnějším derivátem byl pyrazin **48b** (IC_{50} 8 μ M). Pyrazin **48a** byl dále testován i proti dalším nádorovým liniím, disponuje významnou aktivitou zejména proti liniím A549 a K-562 (IC_{50} <1 μ M)³⁶. Aktivita chinoxalinových derivátů (např. **49a**, **49b**) byla nižší než u výchozích kyselin, chinoxalinový derivát **49b** byl zcela neaktivní. Deriváty **48a**, **48b**, **49a**, **49b** byly připraveny reakcí kyseliny betulonové (**8**) resp. dihydrobetulonové (**11**) s ethylendiaminem resp. 1,2-fenylendiaminem a sírou ve vroucím morfolinu (schema 6)³⁶.



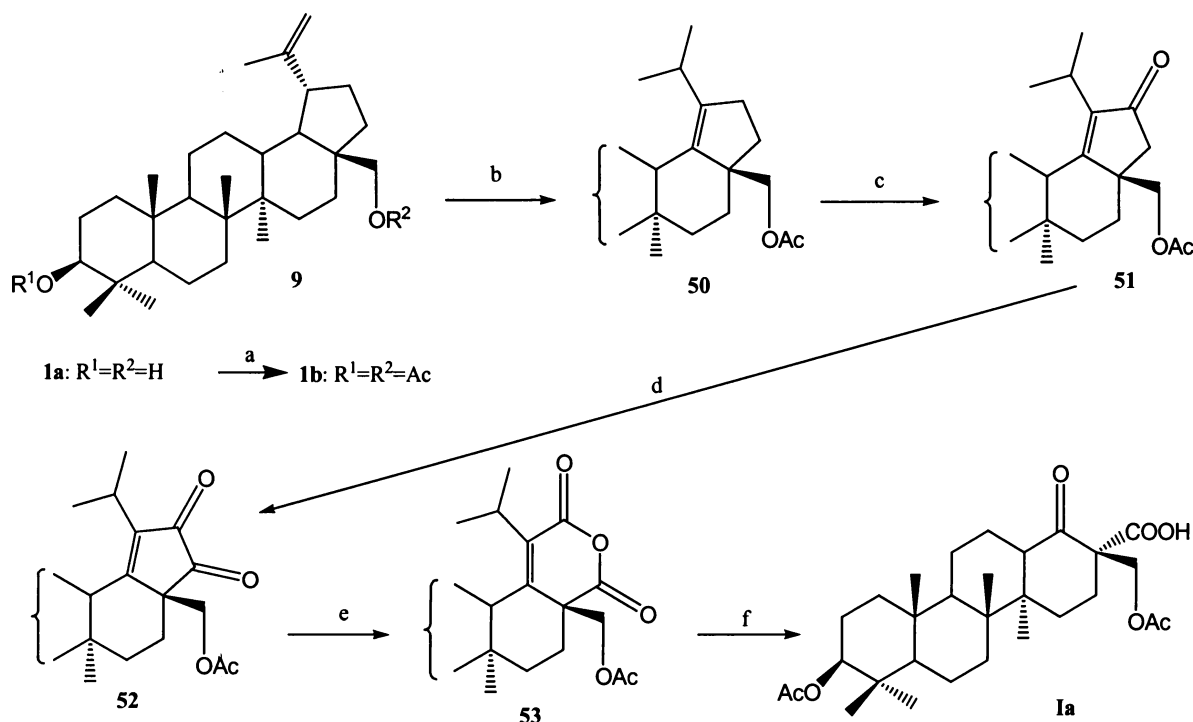
Schema 6: a: ethylendiamin, S/morfolin (reflux) b: 1,2-fenylendiamin, S/ morfolin (reflux)

2 Příprava výchozích látek

2.1 Příprava triterpenoidů

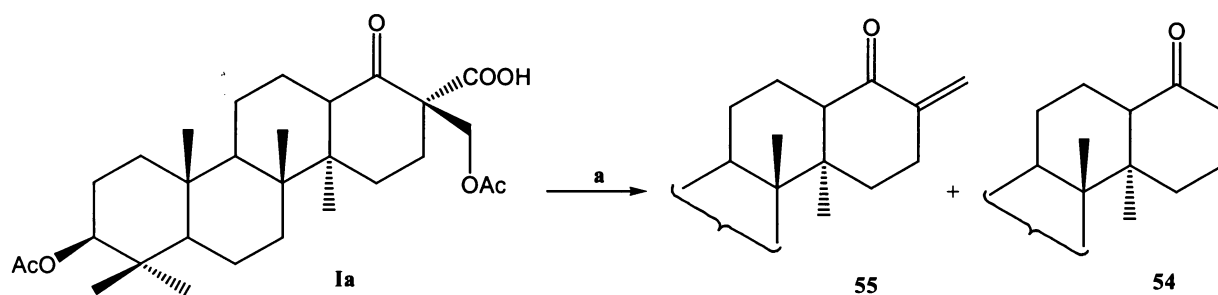
Příprava β -ketokyseliny **Ia** v laboratorním i poloprovozním měřítku je dobře popsána v literatuře^{3,36,37} (schema 7). Výchozí látkou je betulin (**9**), získávaný extrakcí svrchních vrstev březové kůry ethanolem ve výtěžku až 25 %. Získaný surový betulin (**9**) je nejprve za varu acetylován acetanhydridem v pyridinu na betulin-diacetát (**9b**). Následuje izomerizace

dvojn  vazby z polohy 20(29) do polohy 18(19) působením bromovodíku ve směsi toluenu, kyseliny octov  a acedanhydridu na olefin **50**, následnou oxidací dichromanem sodn m vzniká nenasycen  keton **51**, kter  je dále oxidován oxidem seleničitým na nenasycen  diketon **52**. Dal m krokem je reakce diketonu **52** s kyselinou peroxyoctovou za tvorby nenasyceného anhydridu **53**. Posledn  reakcí je oxida n  štěpení anhydridu **53** oxidem rutheni el m na β -ketokyselinu **Ia**. Oxid rutheni el  je generován *in situ* z oxidu rutheni it ho jodistanem sodn m ve dvouf zov m systému vody a ethyl-acetátu (schema 7). V t ezek β -ketokyseliny **Ia** ze surového betulinu (**9**) je 8.3 %³⁷.



Schema 7: **a**: Ac₂O, Py (zahř.); **b**: HBr/PhMe, AcOH, Ac₂O, zahř.; **c**: Na₂Cr₂O₇, AcONa/PhMe, AcOH, zahř.; **d**: SeO₂, dioxan, AcOH (zahř.); **e**: AcO₂H/CHCl₃, (r.t.); **f**: RuO₂, NaIO₄/EtOAc, H₂O (r.t.)

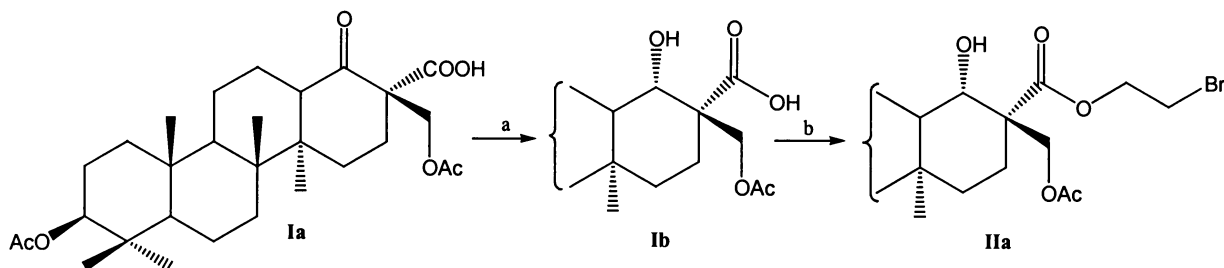
Vzhledem k tomu, že β -ketokyselina **Ia** je vysoce citliv  na p tinnost b z ³⁸, je obvykle pro dal m derivatizace redukována na 18 α -hydroxykyselinu **Ib**. V p tinnosti bází (např. KOH, DBU) dochází ke složit  eliminaci oxidu uhličitého a kyseliny octov  za vzniku směsi heptanorketonu **54** a methylenketonu **55** (schema 8).



Schema 8: **a**: diglym (reflux)

K redukci kyseliny **Ia** se používá tetrahydridoboritan sodný v prostředí chloridu ceritého, který ovlivňuje stereoselektivitu reakce³⁸ a vzniká tak pouze 18 α -hydroxykyselina **Ib**.

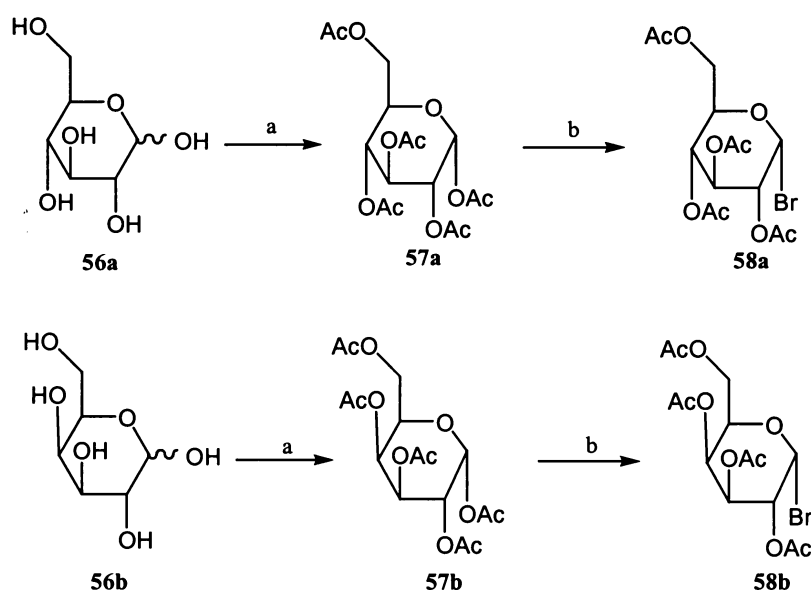
Z kyseliny **Ib** byl dále reakcí s 1,2-dibromethanem za přítomnosti DBU a uhličitanu cesného připraven 2'-bromethyl-ester **IIa** v nízkém výtěžku (schema 9).



Schema 9: **a**: NaBH₄, CeCl₃/THF, MeOH (r.t.); **b**: 1,2-dibromethan, Cs₂CO₃, DBU/DMF (r.t.)

2.2 Příprava sacharidových činidel

Pro syntézu sacharidových esterů β -ketokyseliny **Ia** byly využity dva bromidové deriváty hexos. Jejich příprava³⁹ vychází z hexos **56a** a **56b**, které byly nejprve acetylovány acetanhydridem na 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- α -D-glukopyranosu (**57a**) a 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosu (**57b**). Následnou reakcí³⁹ těchto pentaacetátů **57a**, **57b** s bromovodíkem byly získány korespondující bromidy **58a**, **58b** (schema 10).

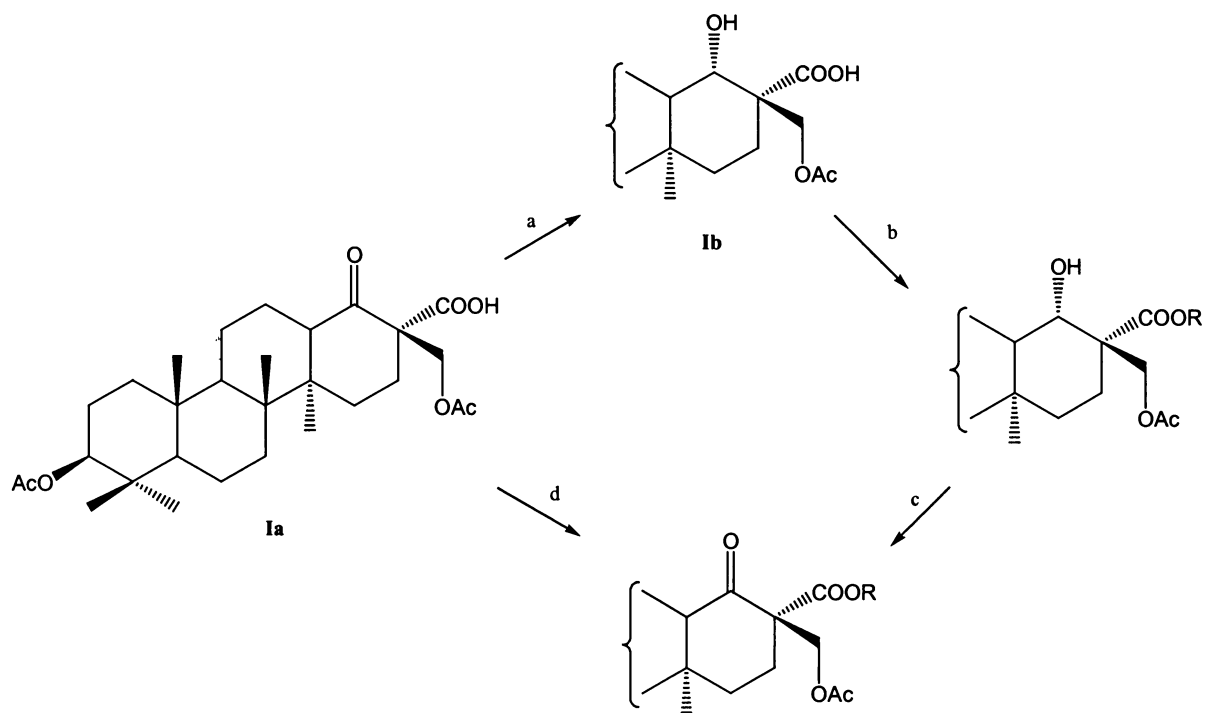


Schema 10: **a**: $\text{HClO}_4/\text{Ac}_2\text{O}$ (r.t.) **b**: HBr/AcOH (chlazení)

3 Příprava biologicky odbouratelných esterů kyselin **Ia**, **Ib**

Možnosti přípravy esterů triterpenických kyselin jsou v praxi omezené, neboť klasické postupy, jako např. přímá esterifikace, reakce s alkoholy v přítomnosti DCC nebo BOP-Cl, příp. EEDQ zde selhávají^{32,40}. Z pestré palety přípravy esterů tak chemikovi přírodních látek zbývá (kromě reakce s diazoalkany) pouze nukleofilní substituce stericky bráněných, málo reaktivních a obtížně rozpustných triterpenických kyselin odpovídajícími bromderiváty v přítomnosti silných bází jako je např. DBU, uhličitan draselný nebo cesný³².

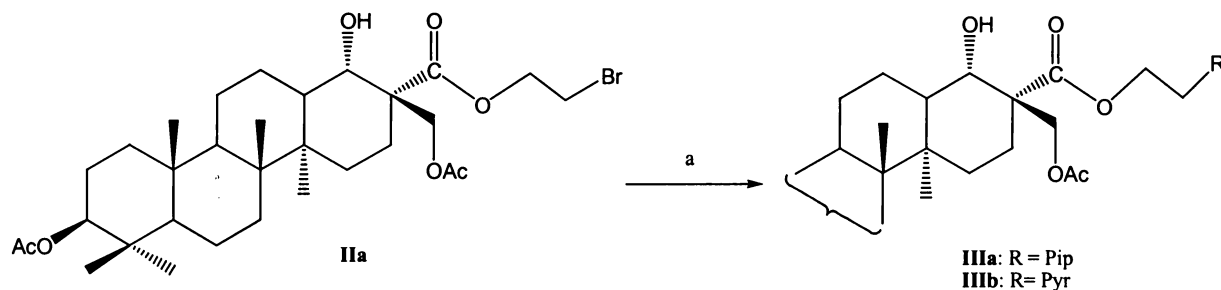
Avšak příprava esterů kyseliny **Ia** zmiňovanou metodou zde naráží navíc na nízkou stabilitu této kyseliny v bazickém prostředí (viz kap. 2.1). Estery kyseliny **Ia** je tak možné připravit pouze dvěma postupy, buď z odpovídající hydroxykyseliny **Ib**, která je vůči bázím stabilní, takto vzniklé 18α -hydroxy-estery reoxidovat na požadované 18 -oxoderiváty, nebo přímo z kyseliny **Ia**, bez použití bází, tedy např. s použitím uhličitanu stříbrného (viz schema 11).



Schema 11: a: NaBH₄, CeCl₃/THF, MeOH (r.t.); b: R-Br, K₂CO₃/DMF; c: Na₂Cr₂O₇, AcONa/dioxan, AcOH; d: R-Br, Ag₂CO₃/DMF

3.1 Heterocyklické estery **IIIa**, **IIIc**

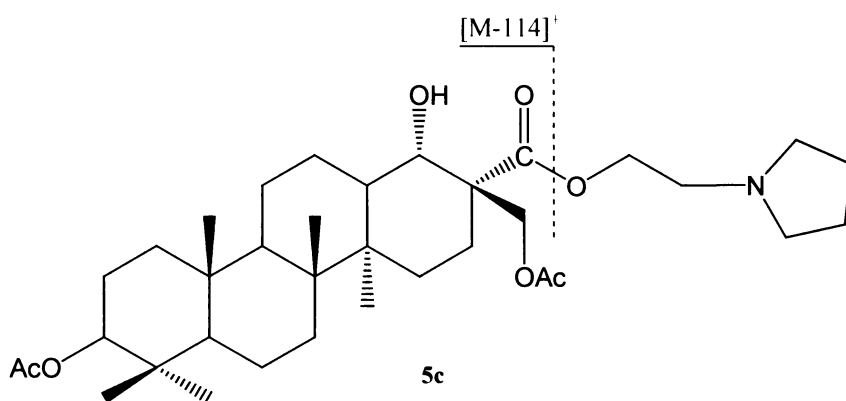
Příprava dusíkatých heterocyklických esterů (piperidinoethyl- a pyrrolidinoethyl-) vycházela z připraveného 2'-bromethyl-esteru **IIa** postupem dle literatury³². Reakcí 2'-bromethyl-esteru **IIa** s piperidinem v dichlormethanu byl získán 2'-(piperidino)-ethyl-ester **IIIa**. Reakce probíhala 12-18 hodin za r.t., přičemž bylo zjištěno, že zahřátí na 35-40 °C reakční dobu zkrátí až na 4 hodiny. Analogicky byl připraven též 2'-(pyrrolidino)-ethyl-ester **IIIb** (schema 12). Výtěžky obou reakcí jsou 40-50 %.



Schema 12: a: PipH resp. PyrH/CH₂Cl₂ (r.t.)

Oba připravené estery **IIIa**, **IIIb** byly jednoznačně charakterizovány na základě spektrálních dat. V ¹H NMR spektru **IIIa** byly kromě signálů obvyklých pro triterpen

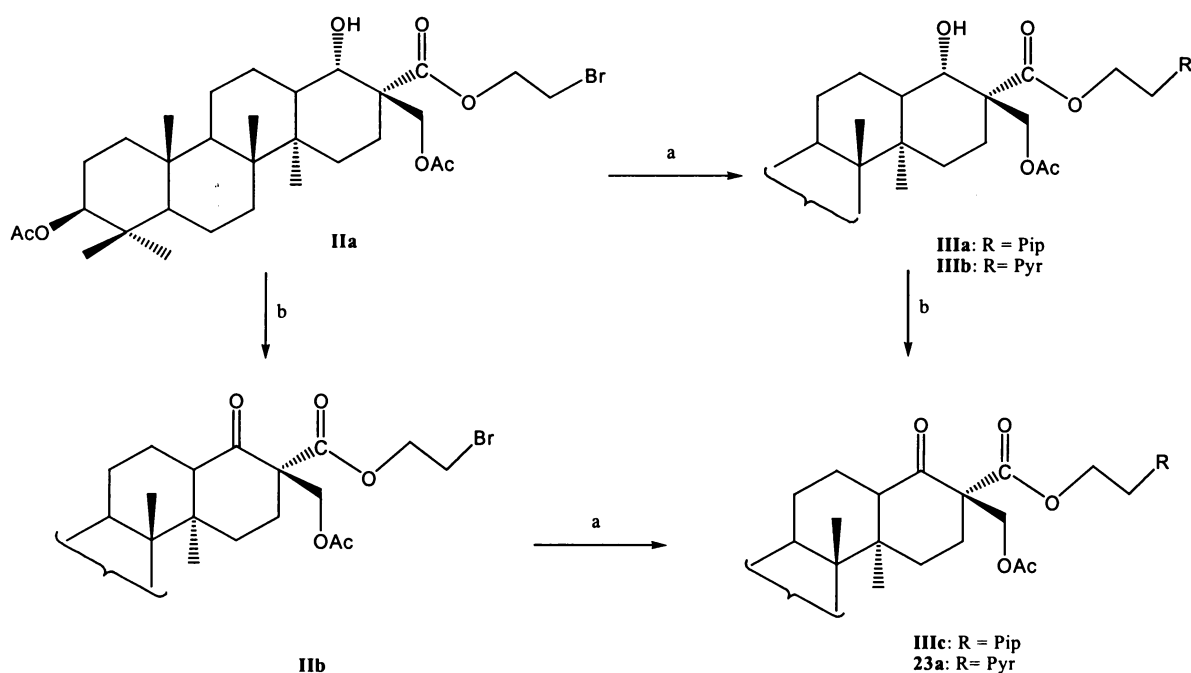
nalezeny signály dvou vodíků H-32, dvou vodíků H-1' a dvou vodíků H-5' jako multiplety při $\delta \sim 2.1-2.3$ ppm, $2.3-2.6$ ppm a $2.7-2.9$ ppm, dále multiplety vodíků H-31 při $\delta \sim 3.8 - 3.9$ ppm a při $\delta \sim 4.8$ ppm. Ve spektru esteru **IIIb** byly podobně nalezeny signály dvou vodíků H-32, dvou vodíků H-1' a dvou vodíků H-4' jako široké multiplety při $\delta \sim 2.1-2.3$ ppm, $2.5-2.7$ ppm a $2.9-3.0$ ppm a dále dva široké multiplety vodíků H-31 při $\delta \sim 3.8$ ppm a $\delta \sim 4.8$ ppm. V ^{13}C NMR spektru byl u esteru **IIIa** kromě signálů běžných pro výchozí triterpen nalezen signál uhlíku C-31 s při $\delta \sim 59$ ppm, dále signál C-32 při $\delta \sim 57$ ppm, C-1' při $\delta \sim 54$ ppm, C-2' při $\delta \sim 25$ ppm, C-3' při $\delta \sim 24$ ppm, C-4' při $\delta \sim 25$ ppm a C-5' při $\delta \sim 54$ ppm. Ve spektru esteru **IIIb** byly kromě signálů triterpenu dále nalezeny signály uhlíku C-31 při $\delta \sim 61$ ppm, dále signál C-32 při $\delta \sim 54$ ppm, C-1' při $\delta \sim 54$ ppm, C-2' při $\delta \sim 23$ ppm, C-3' při $\delta \sim 23$ ppm a C-4' při $\delta \sim 54$ ppm. V IČ spektrech obou esterů **IIIa** a **IIIb** byly nalezeny pásy valenční vibrace karbonylové skupiny v oblasti 1740 cm^{-1} a pás při 3400 cm^{-1} , který odpovídá valenční vibraci OH skupiny. V MS spektrech esterů **IIIa**, **IIIb** byly nalezeny molekulové ionty, dále ionty odpovídající ztrátám molekuly kyseliny octové, 28 hmotnostních jednotek ($\text{CH}_2\text{CH}_2^\bullet$ nebo N-CH_2^\bullet), molekuly vody, hydroxylového radikálu, 15 resp. 14 hm. jednotek (CH_3^\bullet resp. CH_2^\bullet) a ionty odpovídající kombinacím těchto ztrát. Ve spektru esteru **IIIa** byl nalezen navíc iont odpovídající ztrátě 128 hmotnostních jednotek ($\text{Pip}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}^\bullet$), ve spektru esteru **IIIb** iont odpovídající ztrátě 114 hmotnostních jednotek ($\text{Pyr}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}^\bullet$) (viz obr. 1).



Obr. 1: Návrh fragmentace esteru **IIIb** v MS

3.2 Oxidace esterů IIIa, IIIb

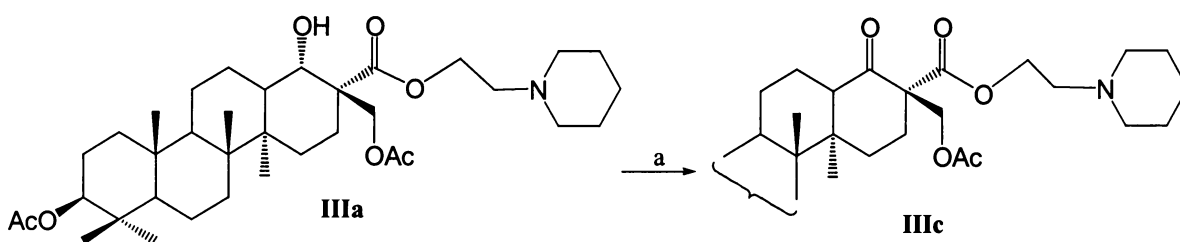
Přípravu esterů 18-okokyseliny **Ia** lze v zásadě uskutečnit dvěma způsoby. Prvním je cesta vycházející z 2'-bromethyl-esteru **IIa**, jeho oxidace na 2'-bromethyl-ester **IIb** a následná reakce s dusíkatým heterocyklem (schema 12). Druhou možností je nejprve připravit ester **IIIa** podle schematu 12, a ten podrobit zpětné oxidaci. Postupem dle literatury³³ byla provedena zpětná oxidace 2'-bromethyl-esteru **IIa** na 2'-bromethyl-ester **IIb** známý již z literatury³³ (schema 13).



Schema 13: **a:** PipH (PyrH)/CH₂Cl₂; **b:** Na₂Cr₂O₇, AcONa/dioxan, AcOH

V této práci byla zvolena druhá varianta z důvodu ověření možnosti zpětné oxidace připravených esterů, kterou by bylo možné využít též u sacharidových derivátů.

2'-(piperidino)ethyl-ester **IIIa** byl oxidován dichromanem sodným ve směsi dioxanu a kyseliny octové za přítomnosti octanu sodného (schema 14), přičemž byl získán ester **IIIc**.



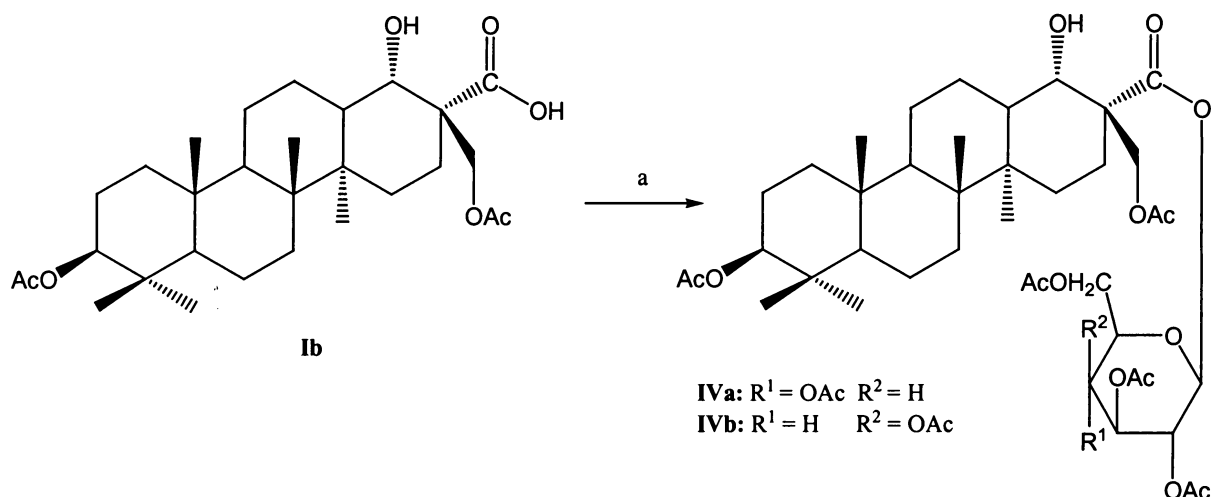
Schema 14: **a:** Na₂Cr₂O₇, AcONa/dioxan, AcOH

Ester **IIIc** byl jednoznačně identifikován na základě spektrálních dat. V ¹H NMR spektru esteru **IIIc** byl kromě signálů výchozího triterpenu nalezen ještě multiplot dvou

vodíků H-31 při $\delta \sim 4.70-4.84$. V ^{13}C NMR spektru byla potvrzena přítomnost ketonu na C-18 signálem při $\delta \sim 211$ ppm. Dále byl nalezen signál uhlíku C-31 při $\delta \sim 60$ ppm, signál C-32 při $\delta \sim 56$ ppm, C-1' při $\delta \sim 54$ ppm, C-2' při $\delta \sim 23$ ppm, C-3' při $\delta \sim 21$ ppm, C-4' při $\delta \sim 23$ ppm a C-5' při $\delta \sim 54$ ppm. V IČ spektru esteru **IIIc** byl nalezen výrazný pás v oblasti 1730 cm^{-1} , který odpovídá valenční vibraci karbonylové skupiny. V MS spektru byl nalezen molekulový iont, dále iont odpovídající ztrátě 128 hmotnostních jednotek ($\text{Pip}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}^\bullet$), ionty odpovídající ztrátám molekuly kyseliny octové, 28 hmotnostních jednotek ($\text{CH}_2\text{CH}_2^\bullet$ nebo $\text{N}-\text{CH}_2^\bullet$), molekuly oxidu uhelnatého, hydroxylového radikálu, 15 resp. 14 hm. jednotek (CH_3^\bullet resp. CH_2^\bullet) a ionty odpovídající kombinacím těchto ztrát.

3.3 Sacharidové estery **IVa**, **IVb**

Syntéza sacharidových esterů vycházela z 18α -hydroxykyseliny **Ib** a tetraacetylovaných sacharidových bromidů **58a**, **58b**. Reakcí 1,2,3,4,-tetraacetyl- O - α -D-glukopyranosylbromidu (**58a**) s kyselinou **Ib** za přítomnosti uhličitanu draselného byl připraven glukopyranosyl-ester **IVa**. Reakční doba byla 5 dní za r.t. Analogickým postupem byl připraven z galaktopyranosylbromidu **58b** a kyseliny **Ib** galaktopyranosyl-ester **IVb** (schema 15). Po purifikaci surových esterů HPLC a krystalizací z methanolu byly získány oba estery **IVa** a **IVb** ve výtěžcích 20-40 %.

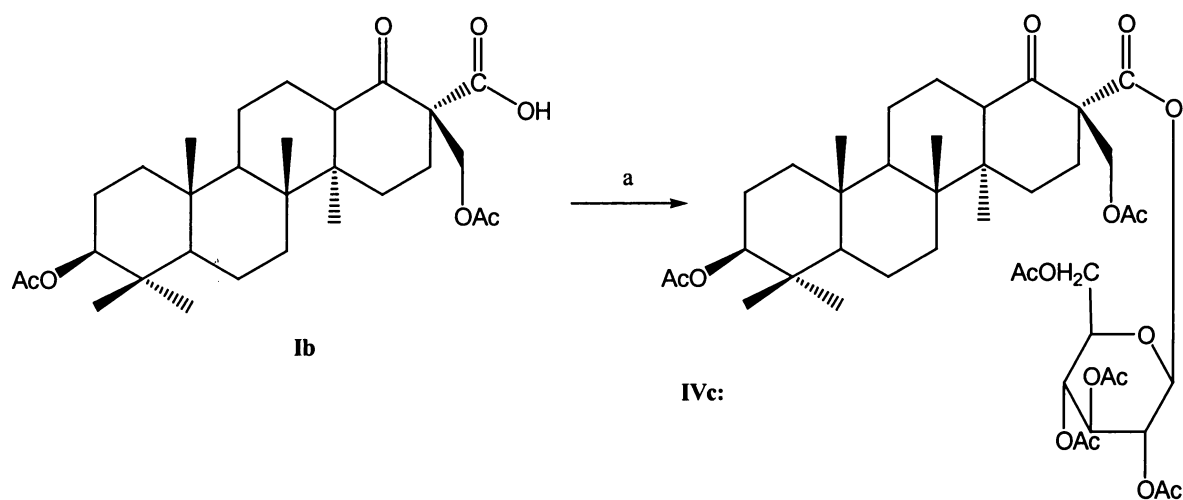


Schema 15: a: $\text{Ac}_4\text{Glc}-\text{Br}$ resp. $\text{Ac}_4\text{Gal}-\text{Br}$, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{DMF}$, MeCN

Získané tetra- O -acetylované sacharidové estery **IVa**, **IVb** byly jednoznačně identifikovány na základě spektrálních dat. V ^1H NMR spektrech obou derivátů **IVa**, **IVb** byly kromě signálů charakteristických pro triterpenický aglykon nalezeno šest singletů při

$\delta \sim 2.0\text{-}2.18$ ppm odpovídajících acetátům, dále dublet vodíku H-1' při $\delta \sim 5.7$ ppm s interakční konstantou $J \sim 8.1$ Hz. Ve spektru **IVa** byl dále nalezen dublet dubletu dubletu vodíku H-5' při $\delta \sim 3.9$ ppm s interakčními konstantami $J_1 \sim 10.2$ Hz, $J_2 \sim 4.5$ Hz a $J_3 \sim 2.4$ Hz, dublet dubletu vodíku H-6'a při $\delta \sim 4.1$ ppm s interakčními konstantami $J_1 \sim 12.6$ Hz, $J_2 \sim 2.4$ Hz, dublet dubletu vodíku H-6'b při $\delta \sim 4.3$ ppm s interakčními konstantami $J_1 \sim 12.3$ Hz, $J_2 \sim 4.5$ Hz, triplet vodíku H-4' při $\delta \sim 5.1$ ppm s interakční konstantou $J \sim 9.6$ Hz, dublet dubletu vodíku H-2' při $\delta \sim 5.1$ ppm s interakčními konstantami $J_1 \sim 9.3$ Hz, $J_2 \sim 8.1$ Hz, triplet vodíku H-3' při $\delta \sim 5.3$ ppm s interakční konstantou $J \sim 9.3$ Hz. Ve spektru **IVb** byl dále nalezen dublet dubletu vodíku H-3' při $\delta \sim 5.1$ ppm s interakčními konstantami $J_1 \sim 10.5$ Hz, $J_2 \sim 3.4$ Hz, dublet dubletu vodíku H-2' při $\delta \sim 5.3$ ppm s interakčními konstantami $J_1 \sim 10.5$ Hz, $J_2 \sim 8.1$ Hz a dublet dubletu vodíku H-4' při $\delta \sim 5.4$ ppm s interakčními konstantami $J_1 \sim 3.2$ Hz, $J_2 \sim 0.7$ Hz. V ^{13}C NMR spektrech **IVa**, **IVb** byl kromě běžných signálů triterpenicku nalezen signál terciárního uhlíku C-1' při $\delta \sim 92$ ppm, dále signál C-2' při $\delta \sim 73$ ppm, C-3' při $\delta \sim 72$ ppm, C-4' při $\delta \sim 70$ ppm, C-5' při $\delta \sim 68$ ppm a C-6' při $\delta \sim 62$ ppm. V IČ spektrech obou esterů **IVa**, **IVb** byly nalezeny pásy valenční vibrace hydroxylové skupiny při 3630 resp. 3640 cm^{-1} a pás při 1750 cm^{-1} , který odpovídá valenční vibraci karbonylové skupiny. V MS-ESI spektrech **IVa**, **IVb** byly nalezeny dceřinné ionty $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Při pokusu o přípravu tetraacetylovaného glukopyranosyl-esteru kyseliny **Ia** přímou reakcí se sacharidovým bromidem **58a** za přítomnosti uhličitanu stříbrného vznikla komplikovaná směs sloučenin, kterou se nepodařilo rozdělit (schema 15).



Schema 16: a: $\text{Ac}_4\text{Glc-Br}$, $\text{Ag}_2\text{CO}_3/\text{aceton}$ (r.t.)

4 Cytotoxická aktivita připravených derivátů

Celkem bylo na *in vitro* cytotoxickou aktivitu metodou MTT-testu⁴¹ na nádorové linii CEM (T-lymfoblastická leukémie) testováno všech 5 připravených a dosud nepopsaných sloučenin. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. Cytotoxická aktivita je vyjádřena hodnotou IC_{50} , která představuje koncentraci testované sloučeniny (v μM) usmrcující právě 50 % nádorových buněk. Za aktivní se považuje sloučenina, jejíž $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$. Derivát s hodnotou $IC_{50} \geq 250 \mu\text{M}$ se považuje za zcela neúčinný.

Z připravených sloučenin disponuje významnou cytotoxickou aktivitou piperidinoethyl-derivát **IIIa** s IC_{50} 8 μM , přičemž jeho oxidace na keto-ester **IIIc** vedla překvapivě ke snížení cytotoxické aktivity na 36 μM .

Připravený acetylovaný glukopyranosyl derivát **IVa** je zcela neaktivní.

Tab. 1: *In vitro* cytotoxické aktivity sloučenin připravených v rámci této práce na buněčné linii CEM

<i>sloučenina</i>	<i>IC₅₀ [$\mu\text{mol/l}$]</i>
	<i>CEM</i>
IIIa	8
IIIb	17
IIIc	36
IVa	250
IVb^a	-

a...výsledek testování nebyl v době uzavření této práce znám

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 (není-li u experimentu uvedeno jinak) na polarimetru AUTOMATIC POLARIMETER, Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) a jsou uváděny v jednotkách [10^{-1} Deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$], za každou hodnotou specifické optické otáčivosti je uvedena koncentrace c [g/100 ml].

IČ spektra byla měřena v chloroformu na spektrometru Nicolet Avatar 370 FT-IR. 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) v roztoku v CDCl_3 . Pro ^1H NMR spektra byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00$ ppm. Multiplicita signálů 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 v jednotkách Hz na jedno desetinné místo.

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 $m/z \geq 189$.

Hmotnostní spektra ESI sacharidových esterů byla měřena na přístroji BRUKKER esquire 3000, vzorek byl zaveden v roztoku methanolu. U vzorků měřených tímto způsobem je uveden pouze ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na foliích Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekce TLC folií byla prováděna postřikem 10% kyselinou sírovou a zahřátím na 120-180 °C.

Pro sloupcovou chromatografii byl jako stacionární fáze používán Kieselgel 60 (63 - 200 μm ; Merck 7734), mobilní fáze je vždy uvedena u experimentu. 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 μm), Refractive index detector 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 TLC byly použity tyto eluční soustavy (jsou vždy uvedeny u experimentu):

A - chloroform / ethyl-acetát / kyselina octová 100:20:1

B - toluen / diethylether 4:1

C - chloroform / ethyl-acetát 3:1

D - toluen / ethyl-acetát 2:1

E - chloroform

F - hexan / ethyl-acetát 1:2

Mobilní fáze pro HPLC jsou uvedeny čísla uvádějícími objemové procento ethyl-acetátu v hexanu.

Všechna rozpouštědla použitá pro reakce, chromatografie a krystalizace byla předem destilována.

Piperidin, pyrrolidin, DBU, 1,2-dibromethan, NaBH₄, uhličitán cesný, uhličitán draselný, dichroman sodný, octan sodný byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o.

Kyselina **1a** a bromidové deriváty hexos **58a**, **58b** byly získány z dřívějších přísunů v naší laboratoři podle literatury^{38,39}.

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 koncentracích přidána ke tkáňové kultuře buněk T-lymfoblastické leukémie CEM v jamkách kultivačního panelu. Každá koncentrace sloučeniny byla testována v dubletu. Následovala inkubace buněčné suspenze v prostředí s analyzovanou sloučeninou po dobu 72 h 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 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 - IC₅₀.

Obvyklé zpracování reakčních směsí:

Postup 1: Reakční směs byla nalita do čtyřnásobného množství zředěné kyseliny chlorovodíkové (1:10) a extrahována ethyl-acetátem. Spojené organické podíly byly promyty vodou do neutrální reakce, rozpouštědla byla odpařena na RVO a surový produkt byl dále zpracován (viz jednotlivé experimenty).

Postup 2: Reakční směs byla nalita do trojnásobného objemu vody a extrahována dichlormethanem. Spojené organické podíly byly promyty vodou, rozpouštědla byla odpařena na RVO a surový produkt byl dále zpracován (viz jednotlivé experimenty).

1. Redukce 3 β ,28-diacetoxy-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-ové kyseliny (Ia) NaBH₄

Bylo použito modifikovaného postupu dle literatury³⁸.

β -ketokyselina **Ia** (2.00 g; 3.95 mmol) byla rozpuštěna ve směsi THF (60 ml) a methanolu (47 ml), poté byl přidán roztok chloridu ceritého v methanolu (13 ml; 0.3 M). Po ochlazení na 5 °C byl pomalu přidán tetrahydridoboritan sodný (580 mg; 15.00 mmol). Reakční směs byla míchána 16 hodin za r.t.. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava A). Zpracováním reakční směsi postupem 1 byla získána hydroxykyselina **Ib** (1.45 g; 73 %) ve formě bílých krystalů o t.t. 280-285 °C, $[\alpha]_D +27$ (c 0.21). ¹H NMR spektrum je shodné se spektrem autentického preparátu³⁸. Literatura³⁸ udává t.t. 282-286 °C, , $[\alpha]_D +29$ (c 0.23).

2. Příprava 2'-bromethyl-3 β ,28-diacetoxy-18 α -hydroxy-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oátu (IIa)

18 α -hydroxykyselina **Ib** (1.00 g; 2.00 mmol) byla rozpuštěna v DMF (50 ml), do roztoku byl přidán DBU (100 μ l), dále uhličitán cesný (1.40 g; 4.30 mmol) a 1,2-dibromethan (5 ml; 69.16 mmol). Průběh reakce byl sledován TLC (soustava B). Reakční směs byla míchána 4 dny za r.t., poté byla zpracována postupem 1. Surový 2'-bromethyl-ester **IIa** byl čištěn chromatografií na silikagelu, mobilní fází byla směs toluenu a ethyl-acetátu 9:1. Byl získán 2'-bromethyl-ester **IIa** (560 mg; 46 %) ve formě bílého prášku o t.t. 250-252 °C (methanol), $[\alpha]_D +18.5^\circ$ (c 0.36). ¹H NMR spektrum je shodné se spektrem autentického preparátu³². Literatura³² udává t.t. 251-254 °C (methanol), $[\alpha]_D +19.6$ (c 0.41).

3. Příprava 2'-bromethyl-3 β ,28-diacetoxy-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oátu (IIb)

Brom-ethyl ester **IIa** (500 mg; 820 μ mol) byl rozpuštěn ve směsi dioxanu (10 ml) a kyseliny octové (10 ml), do roztoku byl přidán octan sodný (100 mg; 1.22 mmol) a dichroman sodný (200 mg; 760 μ mmol). Reakční směs byla míchána 12 hodin za r.t., poté

byla zahřívána 2 hodiny na 35 ° C. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava B). Reakční směs byla zpracována postupem 1. Po separaci HPLC (15) byl získán bromethyl-ester **IIb** (300 mg; 60 %) ve formě jemných bílých krystalků o t.t. 200-203 °C (methanol), $[\alpha]_D + 58.2$ (c 0.36). ^1H a ^{13}C NMR spektra jsou shodná se spektry autentického preparátu³². Literatura³² udává t.t. 199-201 °C (methanol), $[\alpha]_D + 56.3$ (c 0.31).

4. Příprava 2'-piperidinoethyl-3 β ,28-diacetoxy-18 α -hydroxy-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oátu (IIIa)

Bromethyl-ester **IIa** (550 mg; 910 μmol) byl rozpuštěn v dichlormethanu (27 ml), do roztoku byl přidán piperidin (450 μl ; 4.52 mmol) a reakční směs byla míchána 18 hodin za r.t., pak byla 2 hodiny zahřívána na 40 °C. Průběh reakce byl sledován TLC (soustava C). Po zpracování postupem 2 a přečistění chromatografií na silikagelu ve směsi dichlormethanu a ethylacetátu 9:1 byl získán 2'-piperidinoethyl-ester **IIIa** (200 mg; 36 %) ve formě bílých krystalů o t.t. 91-92 °C, $[\alpha]_D + 31.4$ (c 0.22). IČ spektrum: 1725 (C=O), 1734 (C=O), 3402 (O-H). ^1H NMR spektrum: 0.84s, 0.85s, 0.87s, 0.97s, 1.18s, 5 \times 3H (5 \times CH₃); 2.03s, 2.04s, 2 \times 3H (2 \times OAc); 2.06-2.26m, 4H ; 2.26-2.60m, 4H; 2.70-2.86m, 1H (2 \times H-32, 2 \times H-1', 2 \times H-5'); 3.66bs, 1H (H-18 β); 3.78-3.94m, 1H (H-31a); 4.15d, 1H (J = 11.1, H-28a); 4.36d, 1H (J = 10.8, H-28b); 4.48m, 1H (Σ J = 16.2, H-3 α); 4.79m, 1H (Σ J = 21.9, H-31b). ^{13}C NMR spektrum: viz tabulka str. 40. MS-EI, m/z (%): [pro C₃₆H₅₉NO₇, M⁺ 617], 617 (M⁺, 16), 602 (42), 589 (100), 574 (32), 558 (74), 532 (7), 530 (98), 488 (2), 460 (4), 428 (4), 385 (2), 325 (9), 256 (53), 189 (18). Elem. anal.: pro C₃₆H₅₉NO₇ (617.86) vypočteno: 69.98 % C, 9.62 % H, 2.27 % N, nalezeno 69.94 % C, 9.57 % H, 2.31 % N.

5. Příprava 2'-piperidinoethyl-3 β ,28-diacetoxy-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oátu (IIIc)

2'-piperidinoethyl-ester **IIIa** (400 mg; 648 μmol) byl rozpuštěn ve směsi dioxanu (20 ml) a kyseliny octové (10 ml). Do roztoku byl přidán octan sodný (200 mg; 2.43 mmol) a dichroman sodný (200 mg; 760 μmol). Reakční směs byla míchána 18 hodin za r.t. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava C). Reakční směs byla zpracována postupem 1. Získaný surový ester **IIIc** byl čištěn chromatografií na silikagelu ve směsi chloroformu a diethyletheru 1:1. Po krystalizaci spojených frakcí z methanolu byl získán

2'-piperidinoethyl-ester **IIIc** (185 mg; 46 %) ve formě nažloutlých krystalů o t.t. 151 °C, $[\alpha]_D +44.6$ (c 0.35). IČ spektrum: 1707 (C=O), 1726 (C=O), 1736 (C=O). ^1H NMR spektrum: 0.85s, 6H, 0.90s, 6H, 1.13s, 3×H (5×CH₃); 2.05s, 2.07s, 2×3H (2×OAc); 2.34-2.52m, 1H; 2.60-2.70bd, 1H (J = 9.6 Hz); 2.90-3.10 bm, 2H; 3.62-3.90bm, 4H; 4.40-4.60m, 3H (H-28a, H-28b, H-3α); 4.70-4.84m, 2H (H-31a, H-31b). ^{13}C NMR spektrum: viz tabulka str. 40. MS-EI, m/z (%): [pro C₃₆H₅₇NO₇, M⁺ 615], 615 (M⁺, 25), 601 (10), 573 (3), 557 (6), 540 (3), 529 (1), 471 (1), 400 (14), 385 (2), 340 (13), 325 (6), 311 (1), 297 (8), 264 (14), 249 (5), 204 (30), 189 (100). Elem. anal.: pro C₃₆H₅₇NO₇ (615.80) vypočteno: 70.21 % C, 9.33 % H, 2.27 % N, nalezeno 70.26 % C, 9.35 % H, 2.30 % N.

6. Příprava 2'-pyrrolidinoethyl-3β,28-diacetoxy-18α-hydroxy-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oátu (**IIIb**)

Bromethyl-ester **IIa** (200 mg; 330 μmol) byl rozpuštěn v dichlormethanu (5 ml), po přidání pyrrolidinu (150 μl; 1.82 mmol) byla reakční směs míchána 12 hodin za r.t. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava E). Reakční směs byla zpracována postupem 2. Po přečištění chromatografií na silikagelu ve směsi dichlormethanu a ethylacetátu 9:1 a krystalizací spojených frakcí z methanolu byl získán 2'-pyrrolidinoethyl-ester **IIIb** (110 mg; 55 %) ve formě nažloutlých krystalů o t.t. 179 °C, $[\alpha]_D +21.0^\circ$ (c 0.31). IČ spektrum: 1722 (C=O), 1740 (C=O), 3399 (O-H). ^1H NMR spektrum: 0.84s, 0.85s, 0.87s, 0.97s, 1.17s, 5×3H (5×CH₃); 2.03s, 2.04s, 2×3H (2×OAc); 2.06-2.26m, 1H; 2.50-2.68m, 4H; 2.86-3.00m, 1H (2×H-1', 2×H-4', 2×H-32); 3.63bs, 1H (H-18β); 3.84bm, 1H (H-31a); 4.15d, 1H (J = 11.1, H-28a); 4.36d, 1H (J = 10.8, H-28b); 4.48m, 1H (ΣJ = 15.9, H-3α); 4.79bm, 1H (H-31b). ^{13}C NMR spektrum: viz tabulka str. 40. MS-EI, m/z (%): [pro C₃₅H₅₇NO₇, M⁺ 603], 603 (M⁺, 24), 588 (45), 575 (100), 560 (30), 544 (62), 516 (60), 484 (3), 369 (3), 256 (4), 242 (48), 189 (28). Elem. anal.: pro C₃₅H₅₇NO₇ (603.80) vypočteno: 69.62 % C, 9.51 % H, 2.32 % N, nalezeno 69.55 % C, 9.44 % H, 2.25 % N.

7. Příprava (2',3',4',6'-tetra-O-acetyl)- β -D-glukopyranosyl-3 β ,28-diacetoxy-18-hydroxy-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oátu (IVa)

18 α -hydroxykyselina **Ia** (1.00 g; 2.00 mmol) byla rozpuštěna ve směsi DMF (10 ml) a acetonitrilu (650 μ l). Do roztoku byl přidán uhličitan draselný (300 mg; 2.17 mmol) a poté tetra-O-glukopyranosyl bromid **58a** (1.20 g; 3.00 mmol). Směs byla míchána 5 dní za r.t.. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava D). Reakční směs byla zpracována postupem 1. Surový ester **IVa** byl purifikován HPLC (50), byl získán glukopyranosyl-ester **IVa** (700 mg; 42 %), ve formě bílých krystalků o t.t. 169 °C, $[\alpha]_D +15$ (c 0.40). IČ spektrum: 1752 (C=O), 1719 (C=O), 3625 (O-H). ^1H NMR spektrum: 0.84s, 0.85s, 0.87s, 0.98s, 1.15s, 5 \times 3H (5 \times CH₃); 2.01s, 6H, 2.02s, 3H, 2.03, 3H, 2.04, 3H, 2.07, 3H (6 \times OAc); 3.74bs, 1H (H-18 β); 3.84ddd, 1H ($J_1 = 10.2$, $J_2 = 4.5$, $J_3 = 2.4$, H-5'); 4.11dd, 1H ($J_1 = 12.6$, $J_2 = 2.4$, H-6'a); 4.21d, 1H ($J = 10.8$, H-28a); 4.27dd, 1H ($J_1 = 12.3$, $J_2 = 4.5$, H-6'b); 4.28d, 1H ($J = 11.0$, H-28b); 4.47m, 1H ($\Sigma J = 15.9$, H-3 α); 5.12t, 1H ($J = 9.6$, H-4'); 5.13dd, 1H ($J_1 = 9.3$, $J_2 = 8.1$, H-2'); 5.28t, 1H ($J = 9.3$, H-3'); 5.74d, 1H ($J = 8.1$, H-1'). ^{13}C NMR spektrum: viz tabulka str. 40. MS-ESI, m/z (%): [pro C₄₃H₆₄O₁₆, M⁺ 836] 859 [M+Na]⁺, 100). Elem. anal.: pro C₄₃H₆₄O₁₆ (836.96) vypočteno: 61.71 % C, 7.71 % H, nalezeno 61.59 % C, 7.79 % H.

8. Příprava (2',3',4',6'-tetra-O-acetyl)- β -D-galaktopyranosyl-3 β ,28-diacetoxy-18-hydroxy-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oátu (IVb)

18 α -hydroxykyselina **Ia** (1.00 g; 2.00 mmol) byla rozpuštěna ve směsi DMF (10 ml) a acetonitrilu (650 μ l). Do roztoku byl přidán uhličitan draselný (300 mg; 2.17 mmol) a poté tetra-O-acetyl-galaktopyranosyl bromid **58b** (1.20 g; 3.00 mmol). Směs byla míchána 5 dní za r.t.. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava D). Reakční směs byla zpracována postupem 1. Surový ester **IVc** byl purifikován HPLC (50), po krystalizaci spojených frakcí z methanolu byl získán galaktopyranosyl-ester **IVc** (340mg, 20 %), ve formě bílých krystalků o t.t. 122-124 °C, $[\alpha]_D +19.6$ (c 0.28). IČ spektrum: 1751 (C=O), 3640 (O-H). ^1H NMR spektrum: 0.84s, 0.85s, 0.87s, 0.98s, 1.15s, 5 \times 3H (5 \times CH₃); 2.00s, 3H, 2.02s, 6H, 2.03s, 3H, 2.04s, 3H, 2.18s, 3H (6 \times OAc); 3.76bs, 1H (H-18 β); 4.04-4.17m, 3H (H-5', H-6'a, H-6'b); 4.21d, 1H ($J = 11.0$, H-28a); 4.31d, 1H ($J = 11.0$, H-28b); 4.47dd, 1H ($J_1 = 11.0$, $J_2 = 5.4$, H-3 α); 5.10dd, 1H ($J_1 = 10.5$, $J_2 = 3.4$, H-3'); 5.29dd, 1H ($J_1 = 10.5$, $J_2 = 8.1$, H-2'); 5.43dd, 1H ($J_1 = 3.2$, $J_2 = 0.7$, H-4'); 5.72d, 1H ($J = 8.1$, H-1').

^{13}C NMR spektrum: viz tabulka str. 40. MS-ESI, m/z (%): [pro $\text{C}_{43}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$, M^+ 836] 859 [$\text{M}+\text{Na}^+$, 100]. Elem. anal.: pro $\text{C}_{43}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$ (836.96) vypočteno: 61.71 % C, 7.71 % H, nalezeno 61.65 % C, 7.68 % H.

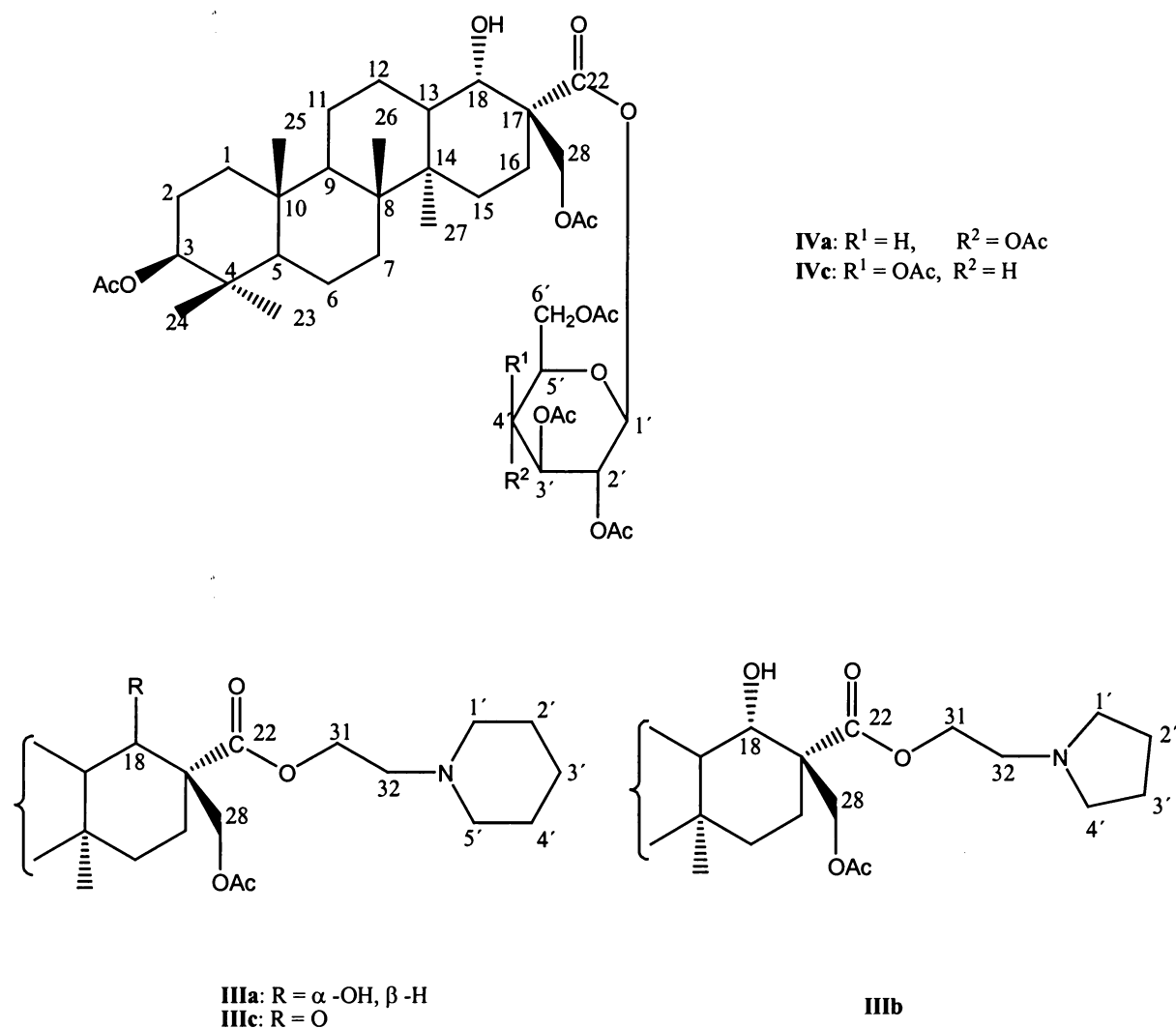
9. Pokus o přípravu (2',3',4',6'-tetra-O-acetyl)- β -D-glukopyranosyl-3 β ,28-diacetoxy-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oátu (IVc)

β -ketokyselina **Ia** (500 mg; 1.00 mmol) byla rozpuštěna v acetonu (20 ml), do roztoku byl přidán uhličitan stříbrný (400 mg; 1.45 mmol) a α -D-glukopyranosylbromid (600 mg; 1.50 mmol). Reakční směs byla míchána 6 dní za r.t. Průběh reakce byl sledován TLC (soustava F). Byla získána komplikovaná směs produktů, kterou se nepodařilo rozdělit.

Tabulka ^{13}C NMR spekter:

Přiřazení signálů ^{13}C NMR spekter bylo provedeno na základě DEPT spekter a podle analogií. Signály označené stejnými písmeny mohou být zaměněny.

Pro účely vypisování NMR spekter jsou atomy uhlíku v navázaném heterocyklu číslovány způsobem obvyklým pro sacharidové estery, tedy C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', viz schema 15



schema 15: číslování připravených sloučenin

Atom C	Sloučenina				
	IIIa	IIIb	IIIc	IVa	IVc
1	38.48	38.45	38.52	38.43	38.44
2	23.69	23.67	23.53	23.61	23.61
3	80.92	80.91	80.59	80.77	80.79
4	37.80	37.78	37.75	37.76	37.77
5	55.46	55.44	55.44	55.39	55.40
6	18.10	18.08	18.06	18.04	18.04
7	32.79	32.77	33.96	32.60	32.61
8	40.53	40.53	41.05	40.23	40.25
9	50.74	50.73	50.53	50.54	50.55
10	37.14	37.12	37.13	37.08	37.10
11	19.16	19.16	19.60	19.81	19.78
12	21.08	21.05	21.85	20.82	20.85
13	37.99	38.00	50.41	37.20	37.23
14	40.94	40.93	46.95	41.03	41.04
15	26.09 ^b	26.07 ^b	26.71 ^b	25.67	25.69
16	26.33 ^b	26.22 ^b	26.28 ^b	25.67	25.69
17	52.91	52.87	61.45	52.05	52.08
18	73.58	74.00	210.74	73.50	73.42
22	173.56 ^a	173.63 ^a	170.95 ^a	171.98 ^a	172.02 ^a
23	27.92	27.91	27.86	27.90	27.90
24	16.50	16.48	16.67	16.45	16.47
25	16.33	16.33	16.10	16.03	16.04
26	16.39	16.37	16.46	16.26	16.28
27	15.94	15.93	16.03	15.97	15.98
28	64.08	64.11	62.75	64.01	64.03
31	58.83	60.82	59.73	-	-
32	56.38	53.60	56.33	-	-
1'	53.95	53.51	54.38	91.95	92.39
2'	24.93	23.17	23.14	72.58	71.58
3'	24.04	23.17	21.47	72.44	70.59
4'	24.93	53.51	23.14	70.24	67.91
5'	53.95	-	54.38	67.93	66.64
6'	-	-	-	61.52	64.03
<u>CO</u> CH ₃	170.98 ^a	170.98 ^a	170.32 ^a	169.39 ^a	170.98 ^a
<u>CO</u> CH ₃	170.98 ^a	170.94 ^a	170.62 ^a	169.78 ^a	170.56 ^a
<u>CO</u> CH ₃	-	-	-	169.99 ^a	170.24 ^a
<u>CO</u> CH ₃	-	-	-	170.50 ^a	170.21 ^a
<u>CO</u> CH ₃	-	-	-	170.50 ^a	170.15 ^a
<u>CO</u> CH ₃	-	-	-	170.98 ^a	169.91 ^a
CO <u>CH</u> ₃	21.30	21.30	20.81	21.27	21.28
CO <u>CH</u> ₃	20.86	20.84	21.26	20.64	20.74
CO <u>CH</u> ₃	-	-	-	20.58	20.62
CO <u>CH</u> ₃	-	-	-	20.58	20.62
CO <u>CH</u> ₃	-	-	-	20.53	20.51
CO <u>CH</u> ₃	-	-	-	20.53	20.51

Závěr

1. Byla provedena literární rešerše přípravy a využití sacharidových a heterocyklických esterů triterpenoidních kyselin.
2. Byly připraveny dva heterocyklické 18 α -hydroxy-estery **IIIa**, **IIIb**.
3. Byl připraven 18-oxo-piperidinoethyl-ester **IIIc**.
4. Byly připraveny dva sacharidové 18 α -hydroxy-estery **IVa**, **IVb**.
5. Celkově bylo připraveno a plně charakterizováno 5 dosud nepopsaných sloučenin **IIIa - IIIc**, **IVa**, **IVb**.
6. Všechny připravené sloučeniny byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii CEM metodou MTT testu, přičemž jedna sloučenina **IIIa** vykazala cytotoxickou aktivitu $IC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$.

Seznam použité literatury

1. Hajdúch M., Džubák P., Šarek J.: *Klin. Farmakol Farm.* **18**, 14 (2004).
2. Džubák P., Šarek J., Cwierka K., Hajdúch M., Vydra D.: *Klin. Farmakol Farm.* **18**, 96 (2004).
3. Šarek J., Klinot J., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M.: *J. Med. Chem.* **46**, 5402 (2003).
4. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO0190136, 23 May 2001.
5. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO0190046, 23 May 2001.
6. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO019096, 23 May 2001.
7. Giner-Larza E. M., Manez S., Recio M. C., Giner R. M., Prieto J. M., Cerda-Nikolas M., Rios J. L.: *Eur. J. Pharmacol.* **428**, 137 (2001).
8. Shibata S.: Saponins with biological and pharmacological activity. New natural products and plant drugs with pharmacological and therapeutical activity. Edited by Wagner H., Wolf P. (Springer-Verlag, Berlin) str. 177 (1977).
9. Ammon H. P., Mack T., Singh G. B., Safayhi H.: *Planta Med.* **57**, 203 (1991).
10. Human Med. Inst. Pharmacological studied of hepatoprotective compounds from *Swertia mileensis*. *Traditional Medicine* **6**, 47 (1995).
11. Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **23**, 394 (2006).
12. Gaidi G., Correia M., Chauffert B., Beltramo J. L., Wagner H., Lacaille-Dubois M. A.: *Planta Med.* **68**, 70 (2002).
13. Cheng C. C., Yang S. M., Huang C. Y., Chen J.C., Chang W. M., Hsu S. L.: *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2005, **55**, 531.
14. Ryu S. Y., Choi S. U., Lee S. H., Lee Ch. O., No Z., Ahn J. W.: *Arch. Pharm. Res.* **17**, 375 (1994).
15. 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).

16. Sami A., Taru M., Salme K., Jari Y.-K.: *J. Pharm. Sci.* **29**, 1447 (2006).
17. Csuk R., Schmuck K., Schäfer R.: *Tetrahedron Lett.* **47**, 8769 (2006).
18. Kim D. S. L., Pezzuto J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1707 (1998).
19. Evers M., Poujade C., Soler F., Ribeill Y., James C., Lelievre Y., Gueguen J.-C., Reisdorf D., Morize I., Pauwels R., de Clerq E., Hénin Y., Bousseau A., Mayaux J.-F. le Pecq J.-B., Dereu N.: *J. Med. Chem.* **39**, 1056 (1996).
20. Ye W.-C., Ji N.-N., Zhao S.-X., Liu J.-H., Ye T., McKervey M. A., Stevenson P.: *Phytochemistry* **42**, 799 (1996).
21. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* **67**, 1100 (2004).
22. Kvasnica M., Sarek J., Klinotova E., Dzubak P., Hajduch M.: *Bioorg. Med Chem.* **13**, 3447 (2005).
23. Urban M., Klinot J., Tislerova I., Biedermann D., Hajduch M., Cisarova I., Sarek J.: *J. Org. Chem.* **23**, 3979 (2006).
24. Kim J. Y., Koo H. M., Kim D. S. H. L.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2405 (2001).
25. Mata E. G., Mascaretti O. A.: *Tetrahedron Lett.* **29**, 6893 (1988).
26. Urban M., Sarek J., Tislerova I., Dzubak P., Hajduch M.: *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5527 (2005).
27. Grossmann V.: *Nauka o léčivých látkách*, str. 100, Avicenum, Praha 1970.
28. Uvarova N. I., Atopkina L. N., Elyakov G. B.: *Carbohydr. Res.* **83**, 33 (1980).
29. Klinotová E., Křeček V., Klinot J., Endová M., Eisenreichová J., Buděšínský M., Štícha M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **62**, 1776 (1997).
30. Samoshina N. F., Denisenko M.V., Denisenko V.A., Uvarova N.I.: *Chem. Nat. Comp.* **39**, 575 (2003).
31. Křen V., Kubisch J., Sedmera P., Halada P., Přikrylová V., Jegorov A., Cvak L., Gebhardt R., Ulrichová J., Šimánek V.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2467 (1997).
32. Martinová B.: *Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.*
33. Kupin W., Venkat K. K., Goggins M., Douzdjian V., Escobarl F., Mozes M., Abouljoud M.: *Transplantation Proceedings* **31**, 1131 (1999).
34. Gewehr M., Kunz H.: *Synthesis* **12**, 1499 (1997).
35. Hashimoto F., Kashiwada Y., Cosentino L. M., Chen Ch.-H., Garret P. E., Lee K.-H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 2133 (1997).
36. Urban M., Sarek J., Kvasnica M., Tislerova I., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* **70**, 526 (2007).

37. Fischer P. M., Sarek J., Blaney P. M., Collier P., Fergusson J. R.: Medicament. PCT Int. Patent Appl. WO03/045971, 5 June 2003.
38. Šarek J.: Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2002.
39. Spáčilová P.: Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.
40. Šarek J.: Nepublikované výsledky
41. Nosková V.: Dizertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2002.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem těm, kteří mi pomohli při vypracování této práce. Nejprve bych rád poděkoval svému školiteli, RNDr. Janu Šarkovi, Ph.D., za velice zajímavé téma, za mnoho cenných rad a konzultací a za pomoc při interpretaci spekter.

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

Můj dík patří i kolegům z týmu betulininů, kteří mi pomohli zejména při orientaci v laboratoři v začátcích mé práce a také za mnohé užitečné rady.

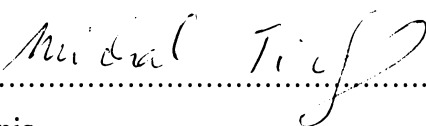
Největší dík patří mé rodině a přítelkyni za vytvoření vynikajícího zázemí a ideálních podmínek ke studiu a vypracování této práce.

Prohlášení:

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

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

V Praze dne 31. 5. 2007.


.....
podpis