



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Příprava klíčového intermediátu vhodného k identifikaci
struktury nově izolovaných giberelinů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Markéta Fuksová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Fuksová
Název práce	Syntéza klíčového intermediátu vhodného k identifikaci struktury nově izolovaných giberelinů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Předložená bakalářská práce se zabývá přípravou vhodného intermediátu, který by vedl k úspěšné totální syntéze a následné identifikaci nového giberelinu nedávno izolovaného v laboratoři prof. Heddena v Rotsham Research center. V teoretické části jsou shrnuty poznatky o struktuře a aktivitě giberelinů, a především o strukturních modifikacích giberelinu A₃ v kontextu organické semisyntézy giberelinových derivátů. Experimentální část je zaměřena na syntézu klíčového intermediátu a optimalizaci všech dílčích kroků k němu vedoucích. V rámci práce byla testována biologická aktivita vybraných látek na buněčných liniích MCF7. Všechny připravené molekuly byly charakterizovány dostupnými spektrálními metodami
Klíčová slova	Fytohormony, gibereliny, kyselina giberelová, syntéza přírodních látek, semisyntéza, biologická aktivita
Počet stran	66
Počet příloh	1
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Markéta Fuksová
Title of thesis	Synthesis of the key-intermediate on our route to the newly isolated gibberellin structure determination
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	This Bachelor thesis describes the chemical synthesis of a key synthetic intermediate that is required to successfully achieve the synthesis and thus identification of recently isolated structurally new gibberellin plant hormone. This compound was detected in the laboratory of prof. Hedden at the Rotsham Research Center and differ from any of previously known 137 gibberellins. Theoretical part summarizes the knowledge about the structure and activity of gibberellins, and is specially focused on the semisynthetic structural modifications of gibberellin A₃. Experimental part of this manuscript focus on the synthesis of the key intermediate and optimization of all partial steps leading to it. The biological activity of selected compounds towards MCF7 cell lines was also tested.
Keywords	Phytohormones, semisynthesis, gibberellines, natural product synthesis, biological activity
Number of pages	66
Number of appendices	1
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 4. 5. 2019

.....

Podpis

Poděkování

Mé upřímné poděkování patří především vedoucímu mé práce RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. za jeho bezchybné vedení, trpělivost a ochotu během zpracovávání práce, a především za čas, který mi věnoval. Ráda bych poděkovala také Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za odborné rady a vedení při biologickém testování připravených sloučenin. Dále děkuji kolektivu oddělení bioorganické chemie Laboratoře růstových regulátorů za podporu a pomoc při práci v laboratoři.

Na závěr bych chtěla poděkovat Interní grantové agentuře Univerzity Palackého v Olomouci za finanční podporu výzkumu prováděného v této bakalářské práci (IGA_PrF_2019_018 a IGA_PrF_2019_020).

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD	9
2 CÍLE PRÁCE.....	10
3 TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Gibereliny.....	11
3.1.1 Historie giberelinů.....	11
3.1.2 Struktura giberelinů.....	13
3.1.3 Vztah mezi strukturou a aktivitou	13
3.1.4 Protinádorová a protizánětlivá aktivita	15
3.1.5 Charakterizace a kvantifikace giberelinů	16
3.2 Chemie kyseliny giberelové (GA ₃)	17
3.2.1 Dostupnost GA ₃	18
3.2.2 Metody identifikace giberelinů při výrobě GA ₃	18
3.2.3 Totální syntézy GA ₃	20
3.2.3.1 První totální syntéza GA ₃ – Corey (1978).....	20
3.2.3.2 Druhá totální syntéza GA ₃ – Mander (1980).....	21
3.3 Gibereliny – základní strukturní a chemické vlastnosti	22
3.3.1 Strukturní deriváty GA ₃	23
3.3.1.1 Modifikace kruhu A	23
3.3.1.2 Modifikace kruhu B	26
3.3.1.3 Modifikace na kruzích C a D	28
3.4 Návrh syntézy neznámého giberelinu	30
3.4.1 Původ nového giberelinu a návrh jeho pravděpodobné struktury	30
3.4.2 Klíčové syntetické kroky umožňující zavedení klíčových 11 β a 12α hydroxy skupin ..	32
3.4.3 Navržené syntetické schéma vedoucí k přípravě cílové struktury nového giberelinu	33
3.4.4 Cíle bakalářské práce	34
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
4.1 Chemikálie	36
4.2 Metody a materiál	36
4.2.1 Obecné informace	36
4.2.2 Vizualizační roztoky pro TLC	37
4.3 Organická syntéza	38
4.3.1 Methylester kyseliny giberelové (III).....	38
4.3.2 Syntéza dienu IV pomocí hydrazinolýzy	39
4.3.3 Chránění karboxylové skupiny na C-19.....	40
4.3.3.1 Zavedení MOM chránicí skupiny	40

4.3.3.2	Chránění karboxylové skupiny pomocí allylu	41
4.3.3.3	Chránění karboxylové skupiny pomocí benzylu	42
4.3.4	Oxidace hydroxy skupiny na C-3.....	43
4.3.4.1	Oxidace látky V pomocí PDC.....	43
4.3.4.2	Oxidace látky VI na keton IX	44
4.3.4.2.1	Pomocí PDC.....	44
4.3.4.2.2	Pomocí Dess-Martinova činidla (DMP).....	44
4.3.5	Redukce C-3 keto skupiny ketonu VIII na alkohol.....	45
4.3.6	Příprava klíčového intermediátu I – selektivní redukce α,β -olefinu na A kruhu.....	46
4.3.7	Příprava dimethyl esterů a jejich derivátů.....	47
4.3.7.1	Syntéza dikarboxylové kyseliny XII.....	47
4.3.7.2	Syntéza dimethyl diesteru XIII	47
4.3.7.3	Oxidace dimethyl diesteru XIII na keton XIV	48
4.4	Biologické testování připravených látek.....	49
5	VÝSLEDKY	50
5.1	Syntéza klíčového intermediátu	50
5.1.1	Neselektivní chránění karboxylových skupin	53
5.2	Biologické testování připravených látek.....	55
6	DISKUZE.....	56
6.1	Organická syntéza	56
6.2	Biologické testování.....	61
7	ZÁVĚR	62
8	LITERATURA.....	63
9	PŘÍLOHA Č. 1: KOPIE SPEKTER PŘIPRAVENÝCH PRODUKTŮ	67

Seznam zkratek

B.t. – bod tání

Bn – benzyl

BnBr – benzyl bromid

CD₃C(O)CD₃ – deuterovaný aceton

CDCl₃ – deuterovaný chloroform

d – dublet

DCM – dichlormethan

DIPEA – N,N-diisopropylethylamin

DMF – dimethylformamid

DMP – Dess-Martinovo činidlo

eq – počet ekvivalentů

Et₂O - diethylether

EtOAc – ethylacetát

GA₃ – kyselina gibberelová

IC₅₀ – polovina maximální inhibiční koncentrace (1/2 inhibitory concentration)

J – štěpící konstanta

m – multiplet

Me – methyl

MOM-Cl - methoxymethyl chlorid

NCS – N-chlorosukcinimid

NMR – nukleární magnetická rezonance

PCC – pyridinium-chlorchromát

PDC – pyridinium-dichromát

PE – petrolether

ppm – parts per milion

R.t. – retenční čas

RT – laboratorní teplota

RVO – rotační vakuová odparka

s – singlet

t – triplet

TBAC - tetrabutylamonium chloridu

TEMPO - 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

δ – chemický posun

1 Úvod

Gibereliny (GA) tvoří skupinu fytohormonů zajišťující růst a vývoj rostlin. Tyto látky tak hrají nezastupitelnou roli v komunikaci mezi buňkami, pletivy a orgány v průběhu celého životního cyklu organismu. V rostlinách jsou zapojeny do několika různých biologických procesů, jako je hydrolýza škrobu během klíčení, prodlužování stonku, stimulace kvetení, regulace zrání plodů či zpomalení procesu stárnutí. Z chemického hlediska se jedná o přirozeně se vyskytující tetracycké diterpenoidní karboxylové kyseliny, jejichž syntéza probíhá v mladých semenech, vyvíjejících se plodech a dalších aktivně rostoucích orgánech jako mladých listech či pupenech. Jejich přítomnost byla zaznamenána u všech vyšších rostlin, některých druhů mikroorganismů a hub.¹

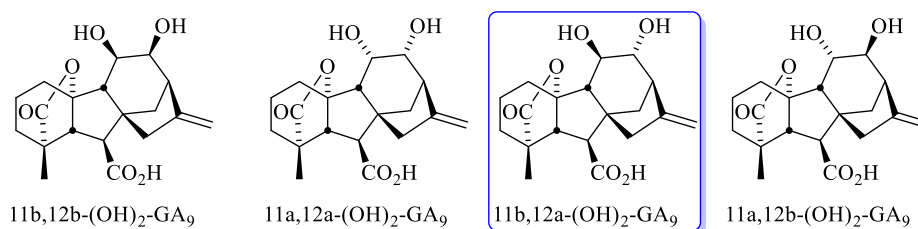
Gibereliny byly poprvé objeveny na počátku 30. let. 20. století v Japonsku u hub *Gibberella fujikuroi*. Japonští fytofyzikologové sledovali tyto houby, protože byly (a jsou) původcem onemocnění rýže (*Oryza sativa*) zvané *Bakanae*. Při této chorobě u napadané rostliny dochází k výraznému urychlení prodlužování nadzemních částí rostlin, což následně vede k nedostatečné tvorbě mechanických pletiv, poléhání porostu, snížení výnosu a u některých jedinců může dojít až k jejich uhynutí.² Následné sledování těchto hub vedlo k identifikaci kyseliny giberelové (dnes giberelin A₃ – GA₃) jako sekundárního metabolitu hub *Gibberella fujikuroi* zodpovědného za tuto nemoc. Výzkum vedl k izolaci této vysoce účinné látky (od roku 1956 nazvána jako kyselina giberelová, její struktura identifikována v roce 1958). Během let 1950 až 1970 se výzkum rozšířil i mimo Japonsko a tyto vysoce bioaktivní hormony se staly postupně dostupné ve větších množstvích, což umožnilo jejich využití při fyziologických studiích.¹

V průběhu let bylo izolováno a identifikováno 137 endogenních GA, pouze málo z nich je ale dostupných ve větších množstvích, a tudíž využitelných pro výzkum. Výjimku tvoří GA₃ a GA₄, které jsou produkovány biotechnologicky pomocí fermentace.³ Nejdostupnější je ale GA₃, proto je také ideální výchozí látkou pro chemické modifikace.⁴ GA₃ je tetracycká diterpenoidní sloučenina obsahující dvě hydroxylové skupiny v pozicích 3 a 13, laktonový kruh a jednu karboxylovou kyselinu. Bylo prokázáno, že různé deriváty giberelinů mohou vykazovat různé biologické vlastnosti, a to jak v rostlinných, tak u živočišných buněk. Některé z nich dokonce prokazují jistou protinádorovou aktivitu.⁵

2 Cíle práce

V naší laboratoři se zabýváme přípravou izotopně a fluorescenčně značených biologicky aktivních giberelinů A₁, A₃, A₄ a A₇. Dále se zabýváme syntézou a testováním giberelinů a jejich derivátů s cílem ohodnotit jejich biologickou aktivitu, kterou mají (mohou mít) vůči živočišným buňkám. V rámci mé bakalářské práce jsem se ale zaměřila na syntézu klíčového intermediátu nezbytného k přípravě struktury izolovaného, ale zatím neidentifikovaného nového giberelinu (interně nazván giberelin A₁₃₈). Tato látka byla nedávno detekována při analýze cukrové řepy ve skupině profesora Heddena v Rotsham Research centru (Velká Británie). Tato nová látka byla prozatím popsána pouze pomocí LC-MS/MS (LC chromatogram/MS-MS spektra). Na základě fragmentace a retenčního času a jejich porovnáním s knihovnou 137 známých retenčních časů a MS/MS spekter ostatních giberelinů bylo prokázáno, že tato látka neodpovídá žádné z těchto látek. Na základě těchto MS/MS spekter a porovnáním známých fragmentací profesor Hedden a dr. Pospíšil navrhli strukturu tohoto neznámého giberelinu (Obr. 1).

Protože syntéza této látky je časově náročná a je nemožné ji připravit v rámci jedné bakalářské (diplomové práce), cílem předložené bakalářské práce je tedy „pouze“ připravit první klíčový intermediát nezbytný pro tuto syntézu. Při vlastní práci vycházíme z kyseliny giberelové (GA₃), ze které jsou několika krokovou syntézou postupně připraveny jednotlivé klíčové intermediáty. Všechny připravené látky budou zároveň testovány na jejich biologickou aktivitu s hlavním důrazem na protinádorovou a protizánětlivou aktivitu. Všechny připravené látky také budou charakterizovány dostupnými fyzikálně-chemickými metodami. Rešeršní část pokrývá teoretické řešení dané problematiky a zabírá se strukturními modifikacemi giberelinu A₃ v kontextu organické semisyntézy giberelinových derivátů.



Obr. 1: Čtyři nejpravděpodobnější struktury nového giberelinu navržené dle MS/MS spekter. Modře znázorněna nejpravděpodobnější struktura dle dostupných znalostí o biotransformacích v rostlinách.

3 Teoretická část

3.1 Gibereliny

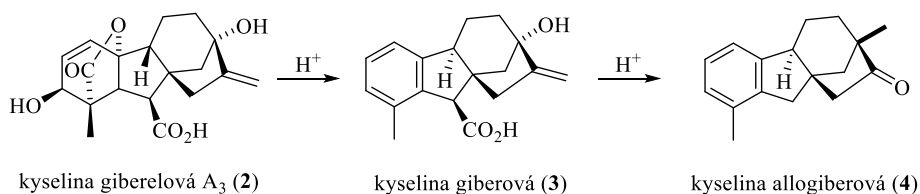
Gibereliny (GA) jsou významnou skupinou rostlinných hormonů (fytohormonů), které hrají roli téměř ve všech aspektech růstu a vývoje rostlin.⁶ Spolu s auxiny a cytokininy jsou klíčovými růst podporujícími hormony vyskytujícími se v rostlinách, jejichž přítomnost je nezbytná pro růst a vývoj rostlin. V dnešní době je známo 137 endogenních giberelinů a mnoho dalších jejich derivátů. Tak jako ostatní fytohormony i gibereliny působí ve velice nízkých koncentracích. Ty se v závislosti na typu pletiva a druhu rostliny pohybují mezi 10^{-9} – 10^{-15} mol/g čerstvé hmoty. Typickým a ojedinělým účinkem giberelinů je dlouhivý růst stonku zvýšením intenzity buněčného dělení. Dále regulují indukci klíčení semen přerušením jejich dormance a indukují proces kvetení.⁷ Z těchto důvodů zejména GA₃ patří mezi důležité biotechnologické produkty a komerčně je vyráběn houbami a využíván v zemědělském a zahradnickém průmyslu. Například většina stolních hroznů bez semen se pěstuje pomocí přídatku exogenní GA₃, kdy po její aplikaci v době kvetení dochází ke zvětšení bobulí a zároveň k zastavení tvorby semen hroznů. Účinek inhibice senescence se také využívá pro prodloužení období sklizně u citrusů. Aplikací GA₃ lze také u okrasných rostlin urychlit nebo indukovat jejich období květenství. Giberelin A₉ je pak úspěšně využíván k zastavení strupatosti některých odrůd jablek.⁸

3.1.1 Historie giberelinů

Gibereliny byly objeveny v Japonsku v první polovině 20. století. Z tohoto důvodu zde započal i jejich výzkum. Vše začalo na počátku 19. století, kdy se na japonské národní plodině – rýži (*Oryza sativa*) – objevilo nové onemocnění. V japonštině se této nemoci začalo říkat *Bakanae* – doslova pošetilá rýže – neboť se vyznačovala tvorbou abnormálně prodloužených stonků rýže. Toto onemocnění u rýže vyvolávalo nedostatečnou tvorbu oporných pletiv, s čímž byla následně spojena lámavost stonků, blednutí listů, neplodnost, a v konečném důsledku úhyn infikované rostliny.³ V roce 1898 japonský vědec Shotaro Horim publikoval studii, ve které popsal toto onemocnění a prokázal, že původcem infekce je houba *Gibberella fujikuro*.⁸ S prvotní myšlenkou, že houba produkuje látku, která stimuluje abnormální dlouhivý růst výhonků rýže, přišel v roce 1912 Sawada.⁸ Toto tvrzení v roce 1926 potvrdil Kurosawa a navíc dodal, že se daná látka svým složením nepodobá enzymům, ale spíše nějaké „chemikálii“. Po jeho publikaci mnoho fytopatologů začalo s pokusy o izolaci aktivní substance ze sekretu houby. Jedna taková látka, která byla v roce 1934 pojmenována kyselina fusarová⁹ a o rok později přejmenována na kyselinu giberelinovou (dle názvu houby, z které

byla získána), stimulovala růst rostlin při aplikaci na jejich kořeny. Roku 1938 Yabuta a Sumiki⁸ určili, že tato „látka“ jsou vlastně dvě pevné krystalické sloučeniny, které tak dostaly název giberelin A a giberelin B. Po skončení druhé světové války se výzkumný program rozšířil mimo Japonsko a aktivně se do něj zapojili zejména vědci z USA a Spojeného království (UK). Uvědomili si důležitost tohoto výzkumu a nezávisle na sobě získali vysoce aktivní látky, pojmenované kyselina giberelová (UK) a giberelin-X (USA). Současně v Japonsku došlo k přezkoumání složení giberelinu A a bylo zjištěno, že se vlastně jedná o směs tří strukturně podobných sloučenin. Tyto látky byly pojmenovány jako giberelin A₁, A₂ a A₃. Poslední jmenovaný (giberelin A₃ (GA₃)) strukturou i funkcí odpovídal ve Spojeném království popsané kyselině giberelové (UK) a ve Spojených Státech izolovanému giberelinu-X (USA). Název tohoto giberelinu se ustálil na kyselina giberelová A₃ (GA₃). Druhá substance, biologicky neaktivní giberelin B, byla později charakterizována jako kyselina allogiberová.¹⁰

Identifikace struktury GA₃ byla samozřejmě nezbytná k vyjasnění chaosu ohledně struktury giberelinů a jejich derivátů. Aby však došlo k jednoznačné charakterizaci, musely být jednotlivé deriváty giberelinů z důvodu jejich malých množství přítomných v sekretech hub připraveny *de novo*. Nejdříve byla připravena kyselina giberelová A₃ (2),¹¹ následně kyselina giberová (3)¹² a nakonec kyselina allogiberová (4)¹³. Bylo také ukázáno, že přeměna 2 na 3 a 4 probíhá pomocí Wagnerova-Meerweinova přesmyku. (Obr. 2).



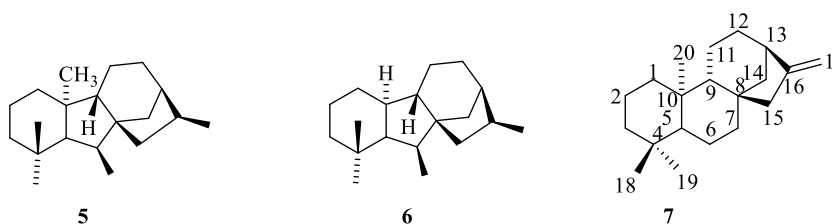
Obr. 2 - Tři „prvotní gibereliny“, jejichž strukturní identifikace byla nezbytná k nalezení struktury GA₃a vyjasnění vztahů mezi těmito látkami. Snadnost H⁺ katalyzovaného přesmyku pouze ztěžoval tento úkol.

V současné době je plně charakterizováno 137 endogenních GA pocházejících z cévnatých rostlin, hub a také z některých druhů bakterií¹⁴ a dalších několik set jejich strukturních derivátů bylo připraveno *de novo* syntetickými chemiky. Je pravděpodobné, že i nadále bude docházet, díky citlivějším analytickým metodám, k objevům dalších endogenních giberelinů. Díky jejich velmi nízké koncentraci je však jejich strukturní charakterizace poměrně složitá, a tedy strukturní charakterizace nově detekovaných GA je v dnešní době extrémně náročná. Všem známým strukturám byl přiřazen triviální název giberelin A₁-A₁₃₇, zkráceně GA₁ atd., číslováno dle pořadí jejich objevení¹⁵. Žádná z rostlin či hub však neprodukuje všechny známé GA. Některé můžeme nalézt jen u vyšších rostlin, další pouze u organismů z říše hub či mikroorganismů. Z houby *Gibberella fujikuro* (*Fusarium moniliforme*) bylo nakonec získáno 6 giberelinů a dostalo se jim označení GA₁, GA₂,

GA₃, GA₄, GA₇ a GA₉. Stejný rok MacMillan et al. izolovali 3 gibereliny ze semen fazolí a označili je jako GA₅, GA₆ a GA₈.¹⁶ Další byly pak izolovány a charakterizovány postupně od 60. let 20. století až dodnes

3.1.2 Struktura giberelinů

Ze strukturního hlediska patří gibereliny mezi diterpenoidní látky. Z chemického hlediska jsou slabými kyselinami rozpustnými ve vodě. Jejich struktura je založena na dvou základních skeletech: *ent*-giberelanovém skeletu (5), který obsahuje 20 atomů uhlíku a 20-nor-*ent*-giberelanovém (6) skeletu obsahuje pouze 19 uhlíkatých atomů (Obr. 3). Název pochází z označení mateřského skeletu giberelinů, *ent*-kaurenu (7) tetracyklického diterpenoidního uhlovodíku a biosyntetického prekursoru giberelinů.¹⁷ Předpona *ent*- zde pak určuje, že se jedná o enantiomer kaurenu.¹⁸ U giberelinů jsou kruhy A a C šestičlenné, B a D jsou složeny z pěti atomů uhlíku. U *ent*-kaurenu jsou kruhy A, B a C šestičlenné a pouze kruh D je pětičlenný.



Obr. 3 - Struktura 20-nor-*ent*-giberelanu (5, C₁₉), *ent*-giberelanu (6, C₂₀) a *ent*-kaurenu (7).

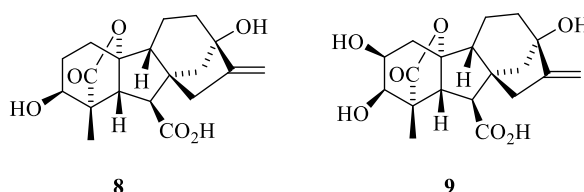
Oba tyto základní skelety podléhají různým *in vivo* modifikacím, jako např. oxidace či dehydratace, které mají značný vliv na biologickou a regulační aktivitu těchto látek. Další významnější modifikace jako přidání funkčních skupin či násobných vazeb pak naprosto mění biologickou aktivitu těchto látek. Obecně lze říci, že většina modifikací se omezuje na zavedení hydroxy, oxo či karboxylových skupin do různých pozic na kruzích A, C a D.¹⁹ Z pohledu biologické aktivity lze říci, že gibereliny C₂₀ mající 20 uhlíkových atomů obvykle nevykazují žádnou biologickou aktivitu a jsou spíše prekuzory giberelinů C₁₉ s 19 uhlíkovými atomy.

3.1.3 Vztah mezi strukturou a aktivitou

Bioaktivní GA se zapojují do téměř všech procesů v životním cyklu vyšších rostlin. Vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou je značný a změna jedné hydroxy skupiny může naprosto změnit aktivitu hormonu. Pouze několik málo ze všech známých giberelinů má endogenní biologickou aktivitu, zbývající vznikají degradací biologicky aktivních GA či reprezentují meziprodukty vzniklé

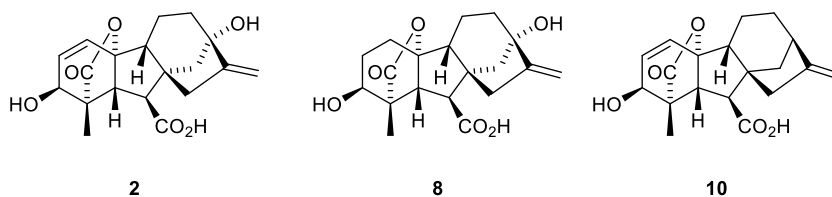
během biosyntézy.²⁰ Gibereliny tedy existují v tělech rostlin ve více než jedné formě. Hashimoto a Rappaport ve svých studiích²¹ naznačují, že C-7 glysidované formy giberelinů působí jako zásoba aktivních giberelinů. Aktivní forma odpovídající kyseliny by pak byla získána z neutrální formy přerušením glykosidické vazby v okamžiku, kdy jej rostlina potřebuje.

Klíčovými strukturními znaky bioaktivních GA je volná 7-karboxylová skupina, 10,19- γ -laktonový můstek a 3- β -hydroxylová skupina s/bez 1,2-dvojně vazby.²² Absence těchto funkčních skupin vede obecně ke ztrátě aktivity. Předpokládá se, že ztráta aktivity je způsobena snížením afinity GA vůči odpovídajícím receptorům. Substitute na C-2 patří do skupiny modifikací, které snižují vazebnou afinitu, a tedy snižují bioaktivitu hormonu.²³



Obr. 4 - Ukázka biologicky aktivního (GA₁) a neaktivního giberelinu (GA₈). Jediným rozdílem je přítomnost hydroxy skupiny na C-2.

Jak již bylo zmíněno, pouze několik málo ze 137 známých giberelinů je opravdu biologicky aktivních. Nejvíce biologicky aktivní jsou gibereliny A₁ (**8**), A₄ (**10**) (rostliny) a GA₃ (**2**) (houby a bakterie) (Obr.5). Biologická aktivita se samozřejmě liší v závislosti na organismu, resp. na cílových receptorech v rámci organismů.²⁴ Ale v porovnávacích studiích se jako nejaktivnější jeví giberelin A₃ (**2**), následovaný A₁ (**8**) a nejméně aktivní vychází giberelin A₄ (**10**). Ze strukturního hlediska tyto tři gibereliny mají následující důležité strukturní rysy:



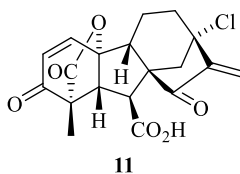
Obr. 5 - Struktury bioaktivních giberelinů.

- 1) GA₃ (**2**) obsahuje na uhlíku C-3 β -hydroxylovou skupinu, mezi atomy C-4 a C-5 násobnou vazbu, C-7 karboxylovou skupinu a C-13 hydroxy skupinu.
- 2) GA₁ (**8**) má shodnou strukturu s GA₃ (**2**) až na chybějící $\Delta^{4,5}$ násobnou vazbu.
- 3) GA₄ (**10**) má shodnou strukturu s GA₁ (**8**), ale chybí ji C-13 hydroxylová skupina. Oproti GA₃ (**2**) ji tedy chybí dvě strukturní skupiny C-13 hydroxylová skupina a $\Delta^{4,5}$ násobná vazba.

3.1.4 Protinádorová a protizánětlivá aktivita

Jak již bylo zmíněno, gibereliny patří mezi tetracyklické diterpenoidní sloučeniny. Jedná se tak o širokou skupinu látek získávaných především izolací z rostlinných organismů a v menší míře z mikroorganismů. U některých z těchto substancí, a to především u giberelinů a *ent*-kaurenů, byly zaznamenány různé biologické aktivity.³ Zmíněné skupiny látek jsou si strukturně velice blízké, jelikož *ent*-kaureny jsou biologické prekurzory giberelinů, avšak ve své biologické aktivitě se značně rozcházejí.²⁵ Gibereliny disponují bioaktivitou, která má značný význam při rozvoji rostlin a představují tak jednu z nejdůležitějších skupin fytohormonů.¹⁹ Oproti tomu bioaktivita *ent*-kaurenů je spojena s protinádorovým a protizánětlivým účinkem. Podstatou této aktivity jsou α,β -nenasycené ketony vyskytující se na kruzích A a D (**11**). Tato struktura však u žádného izolovaného endogenního giberelinu nebyla popsána. Přírodní gibereliny s tímto strukturním jevem tudíž (zatím) nejsou známy. Proto byla navržena a syntetizována řada derivátů giberelinů, které by mohly protinádorovou aktivitu vykazovat. Většina výzkumných skupin při přípravě takových derivátů vychází z GA₃ a snaží se inkorporovat α,β -nenasycený keton do A a D kruhu. Toxicita získaných derivátů byla testována na lidských nádorových buněčných liniích pomocí MTT testu. Protinádorová aktivita byla v některých případech také prokázána u derivátů, které obsahují pouze jeden α,β -nenasycený keton na A, či B kruhu.²⁵

V průběhu let byla syntetizována řada derivátů giberelinů s touto vlastností. Následující obrázek (Obr. 6) znázorňuje strukturu derivátu GA-13315 (**11**), molekuly s výraznými protinádorovými účinky.²⁶ U této látky byla prokázána inhibice topoizomerázy a schopnost snížit expresi vaskulárního endotelového růstového faktoru u nádorové buněčné linie A549.²⁶



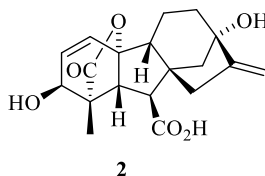
Obr. 6 – GA-13315 nejaktivnější dosud známý giberelinový derivát s protinádorovými účinky.

3.1.5 Charakterizace a kvantifikace giberelinů

Pro studium biosyntézy, struktury a funkce giberelinů v rostlinách se využívá řada analytických metod. Při analýze a identifikaci hormonálního složení rostlinného materiálu je nutná analýza potvrzující přítomnost konkrétních giberelinů ve vzorku. Toto se provádí pomocí porovnání obsažených látek vůči syntetickým standardům jednotlivých giberelinů, anebo izolací a následnou identifikací pomocí strukturních analytických metod (nově detekované gibereliny). Gibereliny se však v rostlinách vyskytují ve velmi malém množství (obecně ng g^{-1} čerstvé hmoty), a tak je jejich izolace a následná charakterizace velice obtížná. Již jednou izolované a identifikované gibereliny pak lze v extraktech identifikovat díky chromatografickému chování podpořeném hmotnostní spektrometrií (MS). Zde se získané výsledky analyzovaného rostlinného extraktu porovnají se známými hodnotami, již plně charakterizovaných standardů. Pakliže se ukáže, že (nově) detekovaný giberelin neodpovídá (referenční čas na LC, fragmentace MS) žádnému známému giberelinu (k dnešnímu dni jich je plně popsáno 137), navrhne se jeho struktura (struktury), která by mohla odpovídat nově detekované látce a tato navržená struktura(y) se připraví pomocí organické syntézy nebo semisyntézy. Obecně se pro přípravu nových derivátů (i těch, co nejsou nové) využívá semisyntézy. Tedy syntézy cílových látek z biologicky dostupného pokročilého intermediátu. Díky dostupnosti GA_3 (biotechnologická výroba) vychází téměř veškeré semisyntetické metody giberelinů z giberelinu A_3 . Z tohoto důvodu se v následující kapitole budu věnovat chemii této látky.¹⁸

3.2 Chemie kyseliny giberelové (GA₃)

Kyselina giberelová (GA₃, 2, Obr. 7) je tetracyklická dihydroxy kyselina obsahující dvojnou vazbu mezi atomy C-1 a C-2, C-10 γ -laktonový kruh, a hydroxylovou skupinu v pozici C-3 a C-13. Komerčně je vyráběna z kultury houby *Gibberetta fujikuroi* jako bílá pevná krystalická látka s teplotou tání 223 až 235 °C a molekulovou hmotností 346,38 g/mol. Je velmi dobře rozpustná v ethanolu, methanolu, ethylacetátu, butylacetátu a acetonu a rozpustná v benzenu a petroletheru. Její schopnost rozpouštět se ve vodě je značně omezena, dosahuje pouze 5 g.L⁻¹.²⁷ V suchém prostředí je stabilní, ve vodném roztoku alkoholu a při vysokých teplotách se chová jako nestabilní molekula (viz dále). Její poločas rozpadu ve vodných roztocích je přibližně 14 dnů při 20 °C a 2 dny při teplotě 50 °C. Nedostatečná stabilita je spjata s přítomností dvojně vazby mezi prvním a druhým uhlíkem $\Delta^{1,2}$ A kruhu. Biologická aktivita této molekuly je nedílně spjata právě s $\Delta^{1,2}$ násobnou vazbou a γ -laktonovým kruhem.



Obr. 7 – Struktura giberelinu A₃ (GA₃).

V okamžiku, kdy byla rozeznána důležitá role kyseliny giberelové při regulaci procesů v rostlinné říši a kdy došlo k identifikaci její struktury, započal pomyslný „hon“ na průmyslové využití této látky. V dnešní době se GA₃ komerčně připravuje fermentací (viz níže), ale cesta k jejím derivátům, ať již přírodního nebo syntetického původu, je mnohem komplikovanější a prozatím odolává biotechnologickým možnostem průmyslu. Na počátku 60. let ale byla dostupnost GA₃ velice omezená, a tak se tato látka stala cílem organické syntézy. Počáteční syntetické pokusy cílící na syntézu GA₃ se zaměřovaly na systém tetracyklického skeletu²⁸ bez toho, aby braly v potaz hustou síť funkčních skupin přítomných na skeletu GA₃. Nebylo tedy překvapením, že takto připravené analogy GA₃ měly žádné či pouze omezené biologické vlastnosti. Tyto deriváty tak neumožňovaly vědecké komunitě žádný posun v pochopení funkce giberelinů, a to jak v oblasti biosyntézy giberelinů, tak v oblasti pochopení jejich funkce, resp. vliv na růst a vývoj rostlin. Rozvoj organické syntetické chemie v 70. a 80. letech 20. století spojený s vývojem nových syntetických metod a činidel umožnil v roce 1978 skupině E. J. Coreyho²⁹ (Nobelova cena za „for his development of the theory and methodology of organic synthesis“, 1990, cena nedělena) úspěšně dokončit totální syntézu GA₃. V těsném závěsu (1980) pak tato syntéza byla dokončena prof. Lewisem Manderem.³⁰ Tyto dvě syntézy GA₃ otevřely nové cesty a možnosti k vytvoření mnoha syntetických derivátů.

Syntetické deriváty giberelinu A₃ umožnily systematické zkoumání vlivu giberelinů na biosyntetické transformace a vedli k objasnění mnoha biochemických procesů v rostlinách. I přesto ale *de novo* syntéza GA₃, která by umožnila vyvinout průmyslovou syntézu, zůstává v současné mimo možnosti jiné než laboratorní přípravy. Je tedy jednodušší a finančně výhodnější připravit cílové gibereliny z GA₃ a následně modifikovat pomocí semisyntetických organických postupů.

3.2.1 Dostupnost GA₃

Komerční produkce GA₃ je založena především na fermentaci houby *Gibberella fujikuroi*. Další teoretickou možností přípravy GA₃ je, jak jsem již zmínila, chemická syntéza^{29,30} nebo extrakce z rostlin,¹⁸ avšak ani jedna z těchto možností neobstojí z ekonomického hlediska. Do roku 1955 se využívala k přípravě GA₃ metoda povrchové fermentace (LSF), záhy se však od této metody odstoupilo. Nevýhodu tohoto postupu byla tvorba značného množství vedlejších produktů, velmi nízký výtěžek (40-60 mg/L substrátu) a velmi dlouhá doba inkubace (10-30 dní). Tato metoda byla postupně nahrazena technikou ponorného kvašení (SmF), avšak i tento proces vykazoval nízký výtěžek při vysokých vstupních nákladech. Navíc, tato metoda je velmi ovlivněna různými environmentálními a nutričními faktory (doba inkubace, teplota inkubace, pH, rychlost míchání, zdroj uhlíku a dusíku, bioelementy atd.). Z tohoto důvodu byl vyvinut alternativní proces pro produkci GA₃, který se vyznačuje cca 100x nižšími náklady na 1 kg připravené GA₃, fermentace na pevné fázi (SSF). Tato metoda tak umožnila komercializovat GA₃ zejména díky tomu, že využívá jako vstupních surovin odpadní hmotu produkovanou agroprůmyslem.³¹

3.2.2 Metody identifikace giberelinů při výrobě GA₃

Identifikace a charakterizace giberelinů obsažených v rostlinných vzorcích jsou založeny na kombinaci různých metod, zejména pak spektrofotometrických, chromatografických a fluorometrických.

- 1) Spektrofotometrická analýza probíhá při 254 nm. Metoda je výhodná pro měření vyšších koncentrací giberelinů, a zejména pak při analýze většího počtu vzorků. Je jednoduchá a velice rychlá, avšak závislá na vysoké čistotě vzorků (nezbytné k zabránění nežádoucích interferencí). Navíc není specifická na GA₃. K identifikaci je totiž nutné převést GA₃ pomocí kyseliny chlorovodíkové na kyselinu giberelenovou (3).³²
- 2) Chromatografické metody jsou oproti spektrofotometrii citlivější, jelikož umožňují oddělení a identifikaci různých GA vzniklých během fermentace. Nejpoužívanější chromatografickou technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí.³³ Při kvantifikaci

GA₃ je však využito jiné než UV detekce (GA₃ není UV aktivní – neabsorbuje) a vesměs je využito kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (HPLC-ESI-MS/MS).³⁴ Dále se využívá HPLC spojená s detekcí pomocí fluorescence (HPLC-FD) a v nedávné době byla zavedena také UPLC/MS/MS metoda.³⁵ Obecně, HPLC-MS je méně časově náročná metoda a zároveň s tím velmi citlivá a selektivní. Důležitým faktem je také jednoduchá příprava vzorku.

- 3) Fluorometrickými metodami lze kvantifikovat GA₃ přítomnou ve vzorku pomocí reakce s kyselinou sírovou (85%, V/V) při 4°C. Nevýhodou této techniky je, že nerozlišuje mezi GA₃ (2) a kyselinou giberelenovou (3). Proto tato metoda vyžaduje pečlivou přípravu vzorků.³⁶

3.2.3 Totální syntézy GA₃

Jak bylo již řečeno, skupina E. J. Coreyho a následně L. Mandera dosáhla první, respektive druhé totální syntézy GA₃. V následujících dvou podkapitolách budou tyto syntézy podrobně představeny.

3.2.3.1 První totální syntéza GA₃ – Corey (1978)²⁹

Syntéza GA₃ E. J. Coreyho (Schéma 1) je založena na extensivním využití Diels-Alderovy (DA) cykloadiční reakce. Syntéza vycházela z pokročilého intermediátu **13** obsahujícího kruh C. Tento benzochinonový skelet **13** byl následně zahříván v benzenu s dienem **12** za podmínek termické DA adice. Výsledný adukt **14** tak obsahoval nejen kruh C, ale i nově utvořený kruh B. Následné uzavření kruhu D, Achillova pata všech předcházejících pokusů, byl utvořen pomocí variace McMurryho complingu (není ukázáno). Po kontrakci šestičlenného kruhu na pětičlenný následovala intramolekulární DA, která vytvořila poslední kruh A. Následná hydrolýza laktonu v získaném produktu **17** následovaná posledními „kosmetickými“ úpravami funkčních skupin zakončila totální syntézu GA₃ (**2**).

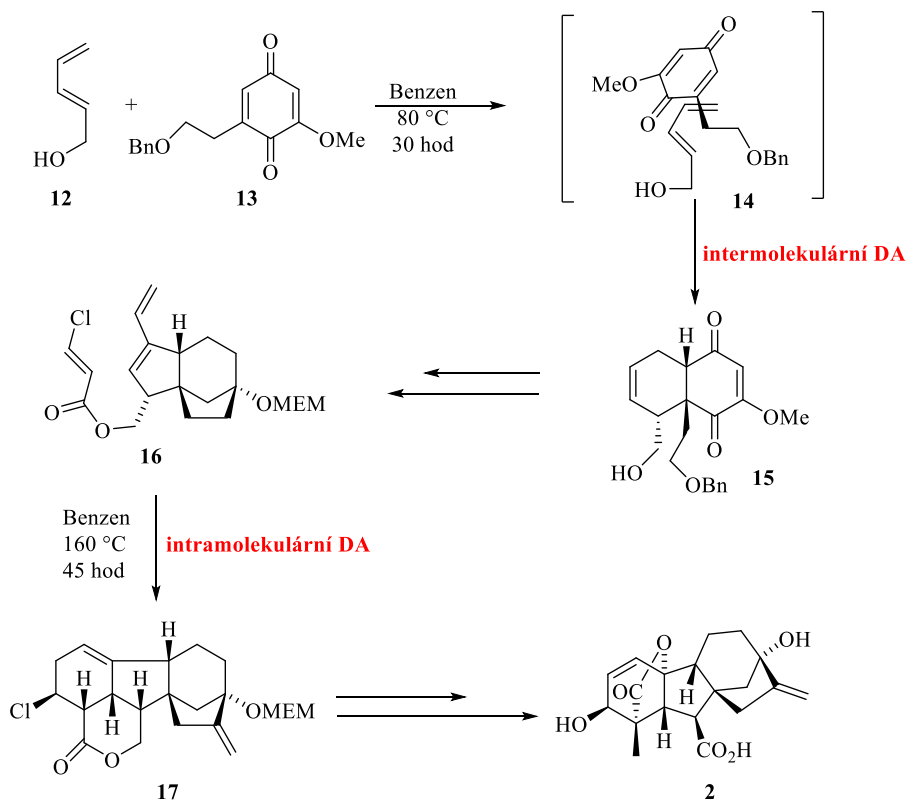


Schéma 1 - Schéma klíčových transformací první totální syntézy GA₃.²⁹

3.2.3.2 Druhá totální syntéza GA₃ – Mander (1980)³⁰

Druhá totální syntéza GA₃ vycházela z hydrofluorenového intermediátu – fluorenonu **18** – a oproti předchozímu přístupu se při ní Lewis Mander vyhnul lineárního přístupu (postupná syntéza jednotlivých kruhů) a místo toho syntézu založil na nepřímé strategii založené na využití aromatického A-kruhu skeletu (**18**). Klíčové kroky syntézy pak můžeme rozdělit do čtyř kroků (Schéma 2).

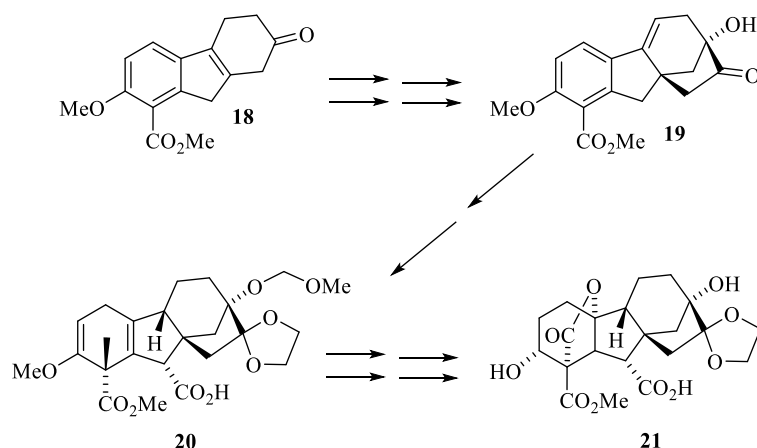


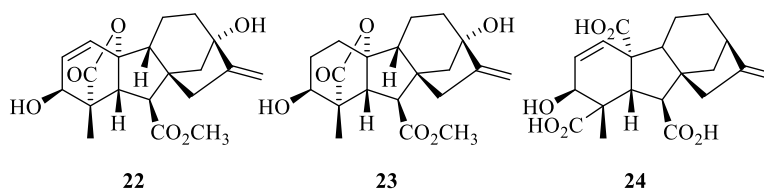
Schéma 2 – Klíčové kroky totální syntézy GA₃ dle Mandera (1980).³⁰

První klíčový intermediát, látka **18**, byla získána metodou založenou na diazo-ketonové cyklizaci vycházející z kyseliny 2,5-dimethoxybenzoové. Její přeměna na giban (**19**) zahrnovala hydrokyanaci a konverzi vzniklého kyanohydrinu na tetracyklický keton, který po intramolekulární cyklizaci s následnou transformací poskytl giban **19**. Další kroky pak zahrnovaly zavedení karboxylové funkční skupiny na kruh B, benzylovou lithiaci, hydrogenaci a redukční alkylaci a vedly k vytvoření důležitého meziproduktu **20**. Jak je patrné ze schématu, látka **20** již obsahuje stereochemické a strukturní rysy nezbytné pro úspěšné zakončení syntézy GA₃. Následné syntetické úpravy C-18 karboxylové funkční skupiny poskytly lakton **21**, jenž byl následně pomocí sekvence operací zahrnujících zavedení a odstranění chránících skupin konvertován na GA₃. Totální syntéza GA₃ tak byla ukončena ve 34 krocích z výchozí látky, kyseliny 2,5-dimethoxybenzoové.

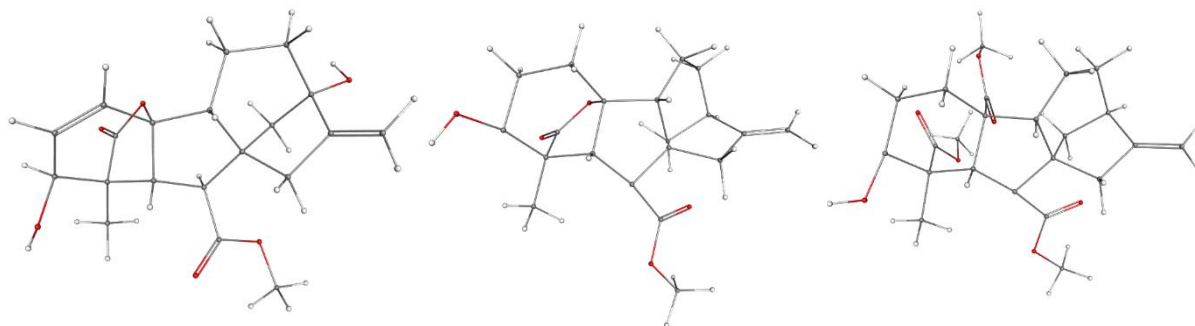
3.3 Gibereliny – základní strukturní a chemické vlastnosti

Cílený a detailní výzkum zaměřený na určení struktury giberelinů přinesl o této třídě látek velice zajímavé a cenné informace, které mohly být následně využity při popisu vlivu strukturních změn na reaktivitu a biologickou aktivitu giberelinů.

První překvapující zjištění pocházelo z pozorování krystalografických dat methyl esteru GA₁₃ (C20 giberelin) a methyl esteru GA₄ (C19 giberelin). Ukázalo se, že tyto dvě látky se naprosto liší konformací, který zaujímá kruh A (Obr. 9). Zatímco u methyl esteru giberelinu A₁₃ jsou uspořádány dva axiální estery přibližně rovnoběžně, což způsobuje zploštění kruhu A, ve struktuře methyl esteru giberelinu A₄ laktonový můstek naopak zploštění kruhu A znemožňuje. Důsledkem je změna orientace C-18 methylové skupiny (GA₁₃ vs. GA₄), která tak mění svou relativní polohu vzhledem k esteru C-7. Tato změna v konformaci má s velkou pravděpodobností za následek pozorovatelnou změnu v biologické aktivitě.³⁷



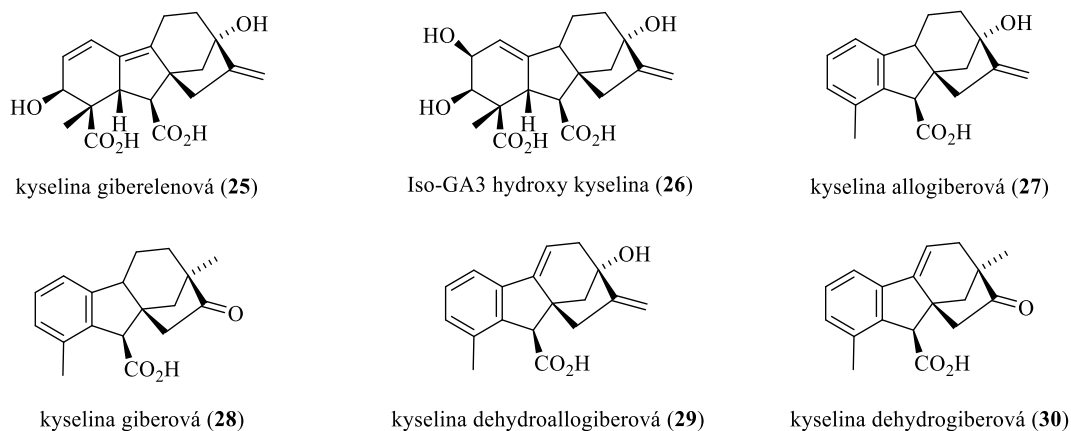
Obr. 8 - Struktury giberelin A₃ methyl esteru (22), A₄ methyl esteru (23) a A₁₃ trimethylesteru (24).



Obr. 9 – Prostorové struktury giberelinů A₃ methyl esteru (22), A₄ methyl esteru (23) a A₁₃ trimethylesteru (24).

Dále struktura GA₃ s dvojnou vazbou mezi C-1 a C-2 ($\Delta^{1,2}$) způsobuje, že kruh A zaujímá židličkovou konformaci, zatímco kruh B se nachází v obálkové konformaci. Kruh C má vaničkovou konformaci, zatímco pětičlenný kruh D zaujímá znovu konformaci obálkovou.³⁸ Ve vodném roztoku za neutrálního pH a při teplotě 100 °C se GA₃ samovolně rozkládá na kyselinu giberelenickou. Stačí však změnit reakční dobu nebo pH roztoku a rozkladné produkty GA₃ se podstatně změni. Některé

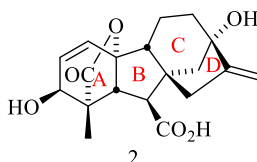
z nich jsou znázorněny na obr. 8. Je důležité si připomenout, že tyto změny struktury mají drastický vliv na biologickou aktivitu vzniklých látek.³⁹



Obr. 10 - Struktury vzniklé rozkladem GA₃ ve vodných roztocích za různých teplot a pH.³⁹

3.3.1 Strukturní deriváty GA₃

Díky své kompletní tetracyklické struktuře, vysoké hustotě funkčních skupin a relativně snadné dostupnosti se GA₃ stala základním stavebním kamenem pro přípravu různých giberelinových derivátů. Následující podkapitoly se zabývají vybranými modifikacemi, které jsou nejvíce charakteristické pro jednotlivé kruhy.



Obr. 11 - Struktura GA₃

3.3.1.1 Modifikace kruhu A

GA₃, jakožto hlavní prekurzor vhodný pro semisyntézu ostatních giberelinů, má jeden hlavní strukturní rys, který musí být brán v potaz – dvě dvojné vazby ($\Delta^{1,2}$ na kruhu A a $\Delta^{16,17}$ na kruhu D). Dvojná vazba $\Delta^{16,17}$ je obsažena u většiny ostatních giberelinů a hlavně je součástí všech biologicky aktivních. Tedy prvním hlavním úkolem při modifikacích GA₃ bylo zredukování $\Delta^{1,2}$ olefinu na A kruhu bez toho, aniž by došlo k redukci $\Delta^{16,17}$ dvojné vazby na kruhu D.¹⁹

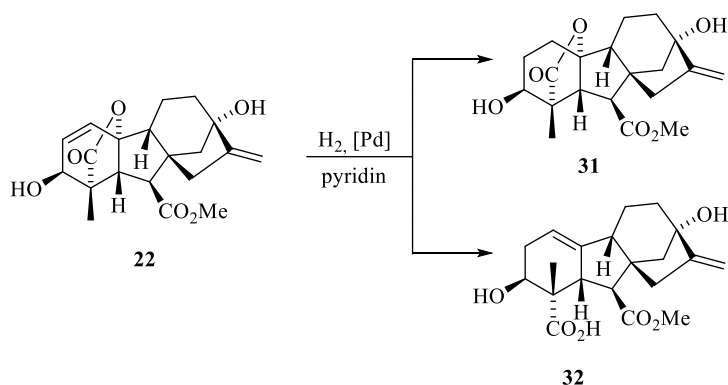


Schéma 3 - Hydrogenace methyl esteru GA₃ pomocí speciálně deaktivovaného Pd katalyzátoru

Olefiny $\Delta^{1,2}$ a $\Delta^{16,17}$ se liší ve svých elektronických vlastnostech. $\Delta^{1,2}$ na kruhu A je v allylické pozici substituován pomocí O-karboxylové skupiny. Přítomnost elektron akceptorní skupiny tak snižuje reaktivitu $\Delta^{1,2}$ vůči elektrofilům. Je také možné ji selektivně hydrogenovat pomocí speciálně upravených paladiových katalyzátorů (deaktivovaných pomocí přídavku aminů).³⁹ Za těchto podmínek nedocházelo k hydrogenaci $\Delta^{16,17}$ olefinu. Při této hydrogenaci ale na druhou stranu vznikl vedle cílového derivátu methyl esteru GA₁ (22), otevřený produkt 32. A látka 32 je zde bohužel hlavním produktem reakce (Schéma 3). Naštěstí, látka 32 lze snadno převést na methyl ester GA₁ (MEGA₁, 31) pomocí jodolaktonizace následované dehalogenací (Schéma 4).⁴⁰

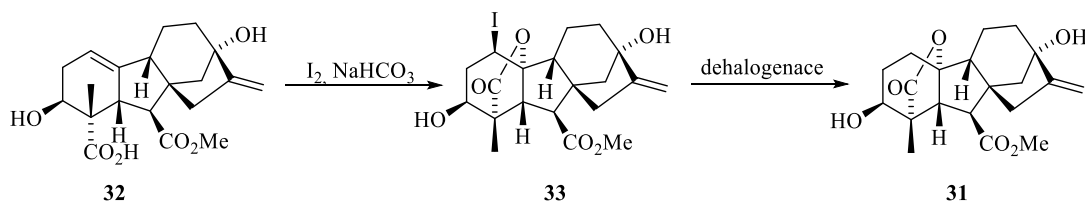


Schéma 4 – Příprava methyl esteru GA₁

Další typickou reakcí na A kruhu GA₃ je bazická izomerace (Schéma 5).¹⁷ V bazickém prostředí dochází ke tříkrokové transformaci, kde nejprve dojde k translokaci dvojné vazby via epoxidový intermediát a následná hydrolyza nově vzniklého laktonu 34 pak poskytne *trans*-2,3-diol 35. Tato izomerace může být také katalyzována pomocí komplexů tranzitních kovů (Pd(OAc)₂ nebo PdCl₂) či slabých Lewisových kyselin (FeCl₃, ZnBr₂) (Schéma 5).⁴¹

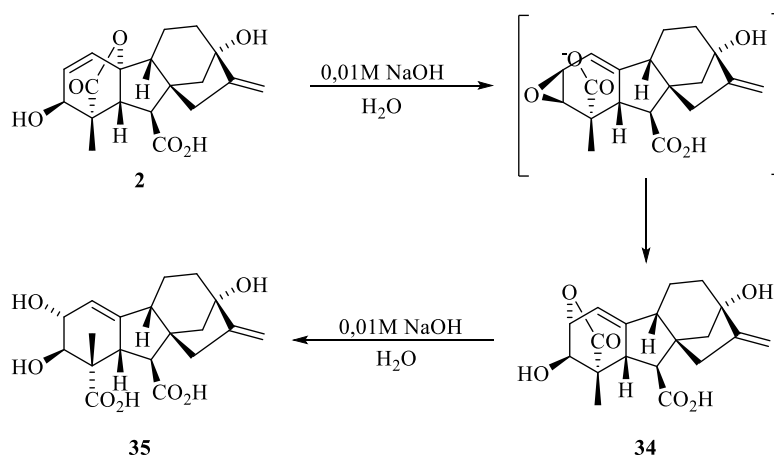


Schéma 5 - Izomerace GA₃

Působením kyselého prostředí na GA₃ dochází k aromatizaci kruhu A. Nejprve dochází ke vzniku směsi dienových kyselin, převážně kyseliny giberelenové (**36**), která je významným meziproduktem při syntéze neobvyklých derivátů GA.⁴² Při dalším snížení pH dochází k dekarboxylační eliminaci spojené s aromatizací A kruhu a epimerizací na C-9. Vznikne tak kyselina allogiberová (**37**).⁸ Pakliže je kyselina giberelová vystavena působení hydrazínu, dojde také k aromatizaci A kruhu, ale tentokrát nedochází k epimerizaci na uhlíku C-9. Vznikne tak kyselina epiallogiberová (**38**) (Schéma 6).¹³

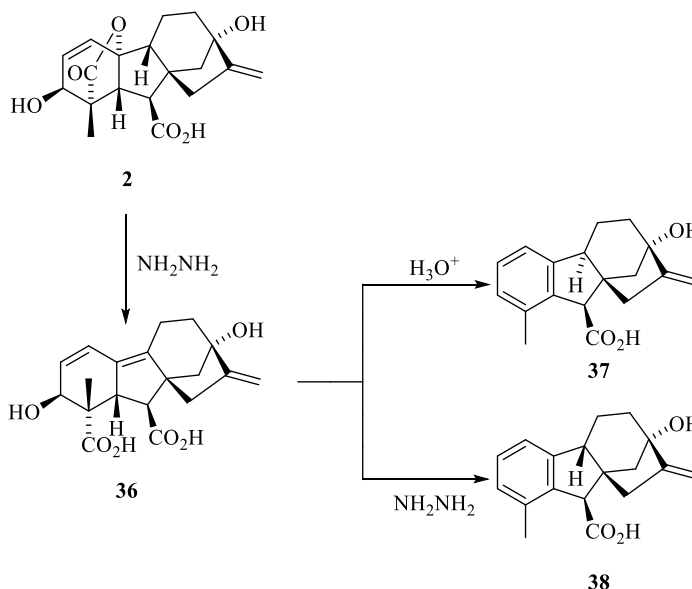


Schéma 6 – Hydrazinolýza GA₃ a reakce výsledného produktu v přítomnosti kyselin – aromatizace kruhu A.

Další modifikace A kruhu mohou být způsobené redukčními nebo substitučními reakcemi. GA₃ methyl ester 3-tosylát (**40**) (připravený z GA₃ methyl esteru (**22**) a toluensulfonyl chloridu) reaguje s bromidem sodným v HMPA za vzniku bromidu (**41**). Redukce (**41**) pomocí aktivovaného zinku

následně generuje dien (**42**). Následně bylo prokázáno, že 3-O-acetát MEGA₃ může být zredukován na **42** přímo využitím Zn a CH₃ CN.⁸

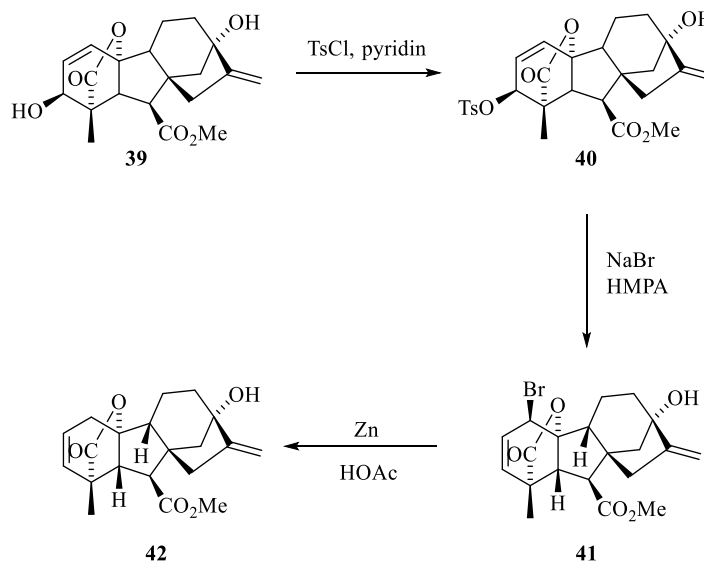


Schéma 7 - Příprava GA₃ methyl esteru **39**.

Nakonec bych se také ráda věnovala reaktivitě 3-hydroxylové skupiny GA₃. Tato je ze dvou hydroxylových skupin obsažených ve struktuře GA₃ reaktivnější.⁴³ Z tohoto důvodu jsou známy jak 3-monoacetáty **43**, tak 3,13-diacetáty **44**. 3-Acetát **43** je rovněž rychleji hydrolyzován za přítomnosti slabších nukleofilů (methanolát).⁴⁴ Všechny tři reaktivní skupiny 3,13-dihydroxy a 7-karboxy, mohou být methylovány pomocí NaH/MeI systém. Avšak tento produkt nemá žádného praktického využití.⁸

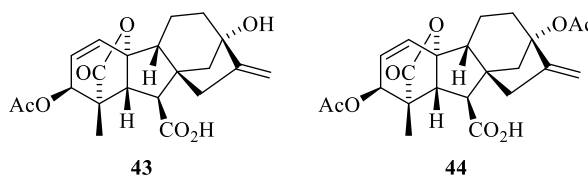


Schéma 8 - GA₃ 3-acetát a GA₃ 3,13-diacetát

3.3.1.2 Modifikace kruhu B

První a hlavní reakcí prováděnou na kruhu B GA₃ je transformace C-7 karboxylové kyseliny na odpovídající methyl ester. Nejčastěji je tato transformace prováděna pomocí diazomethanu. Další alkyl estery mohou být připraveny reakcí s odpovídajícími diazoalkany či dimethylforamid dialkylacetaly.⁴³ Další metody zahrnují reakci s draselnou solí kyseliny GA₃ s alkyl halogenidy či

reakci symetrického C-7 GA₃ anhydridu s alkoholem při teplotě 100 °C. Kvůli studiím biologické aktivity GA₃ derivátů bylo připraveno množství amidů a konjugátů aminokyselin s GA₃.⁴⁶

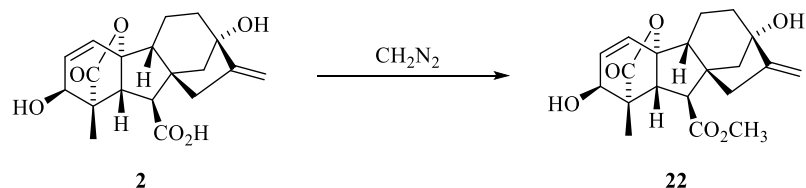


Schéma 9 – Nejčastější příprava methyl esteru kyseliny gibberelové – MEGA₃ (22).

Chemie kruhu B je z velké části zaměřena a omezena na C-7 karboxylovou skupinu. Tato pozice má značný vliv na prostorové uspořádání atomů v GA₃ (konformaci) a jejich derivátů. Je zajímavé, že stereochemie uhlíku na C-6 je z termodynamického hlediska v nevýhodném 6 β pozici. Epimerizace stereochemie na C-6 z β na 6 α a následné vyhodnocení vlivu této změny na biologickou aktivitu těchto giberelinových derivátů bylo tedy hlavním cílem syntetických transformací. Tato přeměna byla úspěšně završena sérií oxido-reduktivních kroků (obr. 17), při které dochází k epimerizaci pozice C-6 u C-7 aldehydického derivátu GA₃. Následná oxidace aldehydu pak vede k tvorbě cílové 6-*epi*-GA₃ (47).⁴⁷

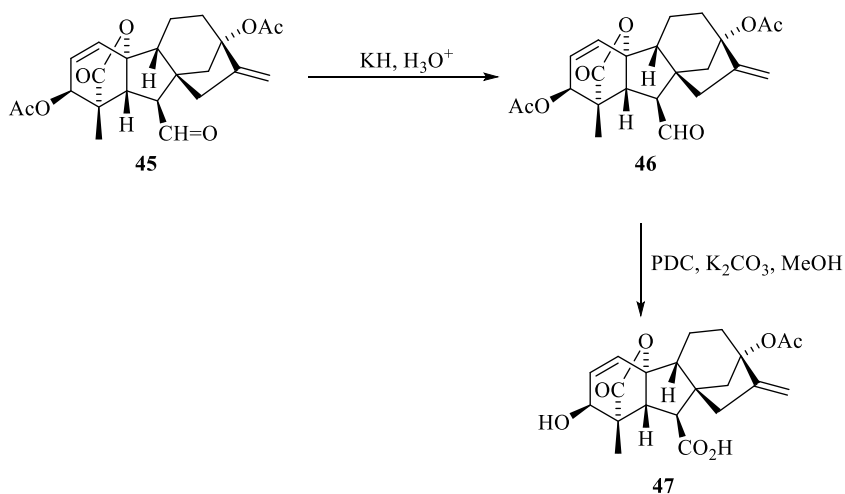


Schéma 10 - Příprava 6-*epi*-GA₃

Poslední modifikací popsanou v literatuře je příprava C-7 alkoholu, který byl připraven redukcí odpovídajícího anhydridu GA₃ pomocí NaBH₄.⁴⁵

3.3.1.3 Modifikace na kruzích C a D

Chemie kruhu C giberelinů je relativně neprozkoumaná. Na vlastním C kruhu je známo pouze několik málo modifikací (zavedení hydroxylových skupin do pozic C-11 a C-12). Nejvíce modifikací je ovšem spojeno s C-13 hydroxylovou skupinou. Tato skupina, která je společná pro C i D kruh má několik významných vlastností. Co se týče reaktivity, je ze sterických důvodů (terciální alkohol vs. sekundární C-3 alkohol na A kruhu) méně reaktivní než C-3 alkohol u GA₃. Na druhou stranu její allylická pozice vůči $\Delta^{16,17}$ olefinu ji předurčuje k mnoha dalším chemickým transformacím.⁴¹

Nejjednodušší z nich je H⁺ nebo Lewisovou kyselinou iniciovaný přesmyk. Broenstetova nebo Lewisova kyselina tak aktivuje $\Delta^{16,17}$ allylický olefin k pseudo-pinakolovému přesmyku za tvorby ketonu **48**.⁴¹

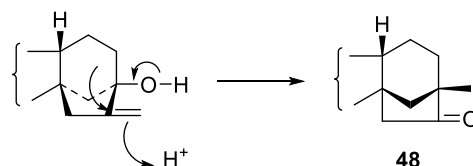


Schéma 11 - Aktivace $\Delta^{16,17}$ olefinu spojená s migrací vazby C-C – tvorba ketonu **48**.

Obdobně, přítomnost halogenového kationtu X⁺ bude mít za následek tvorbu odpovídajícího přesmyknutého halogenidu. Tvorba tohoto produktu probíhá přes halogenidový cyklický intermediát umožňující stereoselektivní přesmyk vedoucí k inkorporaci halogenidového iontu do pseudo C-13 pozice. Tato transformace je svým mechanismem podobá přeměně allogiberové kyseliny na kyselinu giberovou (Schéma 12).⁴⁸

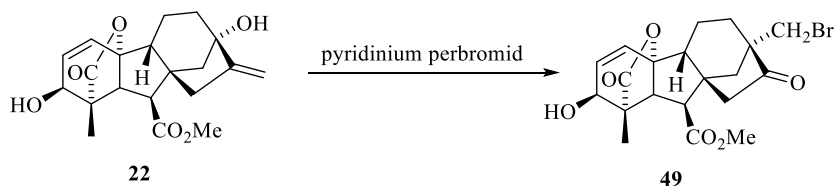


Schéma 12 – Tvorba halogenidového derivátů GA₃ pomocí přesmyku na kruhu C/D.

Jednou z možností, jak selektivně modifikovat vazbu $\Delta^{16,17}$ je její ozonolýza. Pakliže ale tato reakce (ozonolýza) bude prováděna v přítomnosti nechráněné C-13 hydroxylové skupiny, výsledným produktem bude keton **50** pouze v minimálním množství. Hlavním produktem reakce bude seko-GA₃ kyselina **51**. Tato látka může také být připravena oxidací GA₃ pomocí bismutátu sodného (Na₂BiO₃).⁴

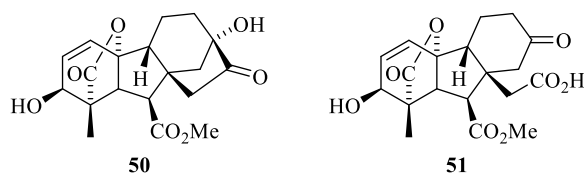


Schéma 13 – Produkty ozonolýzy GA₃.

Z důvodu velké reaktivity olefinu $\Delta^{16,17}$ je často vhodné tuto skupinu chránit ve formě epoxidu.¹⁹ Olefin $\Delta^{16,17}$ je totiž elektronově bohatší než olefin $\Delta^{1,2}$ na kruhu A, a tedy bude přednostně reagovat s elektrofilním epoxidačním činidlem jako je např. kyselina *m*-chlorperoxybenzoová (*m*CPBA). Reakce s kovovým zinkem pak vede k regeneraci $\Delta^{16,17}$ olefinu. Pakliže je ale C-13 alkohol ponechán nechráněn, bude vzniklý hydroxy epoxid **53** podléhat Wagnerovu Meerweinovu přesmyku na keton.

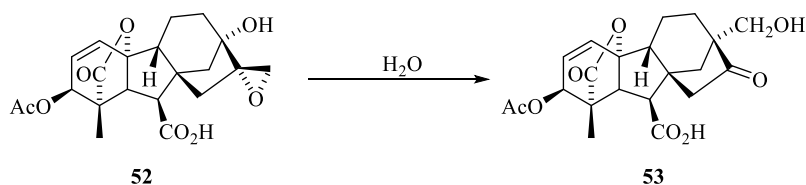


Schéma 14 – Přesmyk nechráněného 16,17- epoxidu **52**.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.1.1., zaměřující se na modifikace na kruhu A, katalytické hydrogenační reakce bohužel nejsou selektivní a obě dvojné vazby, $\Delta^{1,2}$ a $\Delta^{16,17}$, jsou selektivně redukovány za vzniku směsi produktů.

3.4 Návrh syntézy neznámého giberelinu

3.4.1 Původ nového giberelinu a návrh jeho pravděpodobné struktury

Výzkum naší skupiny se zaměřuje především na syntézu přírodních látek a vývoj nových syntetických metodologií vhodných k jejich přípravě. Jedním ze tří hlavních projektů (chemie fenypropanoidů, vývoj nových syntetických metod založených na chemii síry, a právě chemie giberelinů), kterým se v naší skupině zabýváme poslední čtyři roky, je příprava nových izotopově a fluorescenčně značených giberelinů. V rámci tohoto projektu velice úzce spolupracujeme se skupinou prof. Heddena (Rotsham Research, UK a Laboratoř Růstových Regulátorů (LRR), UEB AV CR) a skupinou Dr. Tarkowské (LRR, UEB), kteří se zabývají výzkumem v oblasti giberelinů a jejich detekcí a kvantifikací v rostlinných vzorcích. V rámci jednoho z těchto projektů prof. Hedden detekoval ve vzorcích cukrové řepy novou látku, která dle retenčního času v rámci LC, charakteristické fragmentaci v MS/MS spektru (fragmentace v MS spektrech neodpovídalo žádné z dosud popsanych 137 známých giberelinů) byla označena za nový, dosud nepopsaný giberelin.

Na základě molekulové hmotnosti, sumárního vzorce ($C_{19}H_{24}O_6$; $[M+H]^+ = 349$), a zkušeností s giberelinovými skelety pak Dr. Pospíšil a prof. Hedden odvodili, že hledaná sloučenina bude mít podobnou strukturu jako giberelin A_1 . Tedy, že hledaná molekula obsahuje dvě karboxylové funkční skupiny ($2 \times CO_2$), dvě hydroxylové skupiny ($2 \times OH$) a jednu násobnou vazbu (1 x olefin) (Schéma 15). Na základě MS/MS fragmentačních spekter a jejich porovnání se známými gibereliny prof. Hedden následně došel k závěru, že obě hydroxy skupiny musí být na kruhu C nebo D neznámého giberelinu.

Na základě těchto informací Dr. Pospíšil usoudil, že neznámý giberelin s velkou pravděpodobností bude derivátem giberelinů s C-13 hydroxy skupinou. Tedy, že neznámý giberelin bude derivátem giberelinu A_{20} s dodatečnou hydroxy skupinou na jednom z uhlíků C11, C12 nebo C15. Podrobná analýza těchto struktur ale ukázala, že 4 z navržených osmi možných kandidátů již jsou popsány endogenní gibereliny A_{67} , A_{77} , A_{130} a A_{136} . Zbývající čtyři látky byly pak jako možní kandidáti vyloučeny, protože jejich možná produkce v rámci biosyntézy se zdála být málo pravděpodobná (stereochemické faktory). Následná detailní a podrobná analýza MS/MS spekter látky vedla k názoru, že detekovaná struktura nemá C-13 hydroxy skupinu. Pozornost Dr. Pospíšila se tak zaměřila spíše směrem k derivátům giberelinu A_9 substituovaného dvěma hydroxy skupinami na kruhu C (pozice C11 nebo C12) nebo kruhu D (pozice C15). Porovnáním fragmentačních MS/MS spekter známých giberelinů s vodíkovým atomem v pozici C-13 a hydroxy skupinou v pozici C-15 (žádná možná korelace) ale vedla k závěru, že nový giberelin nebude mít hydroxy skupinu na kruhu D.

Tím se snížil počet možností toho, jak by nově objevený giberelin mohl vypadat, na čtyři kandidáty. Z těchto pak 11 β , 12 α -dihydroxy GA₉ přitáhl naši pozornost jako nejvážnější kandidát (Schéma 15). Hydroxy skupiny takto umístěné totiž nejvíce respektují termodynamicky nejstabilnější konfiguraci cílové látky. 11 β , 12 α -dihydroxy GA₉ se tak stal cílovou látkou pro syntézu neidentifikovaného giberelinu z cukrové řepy.

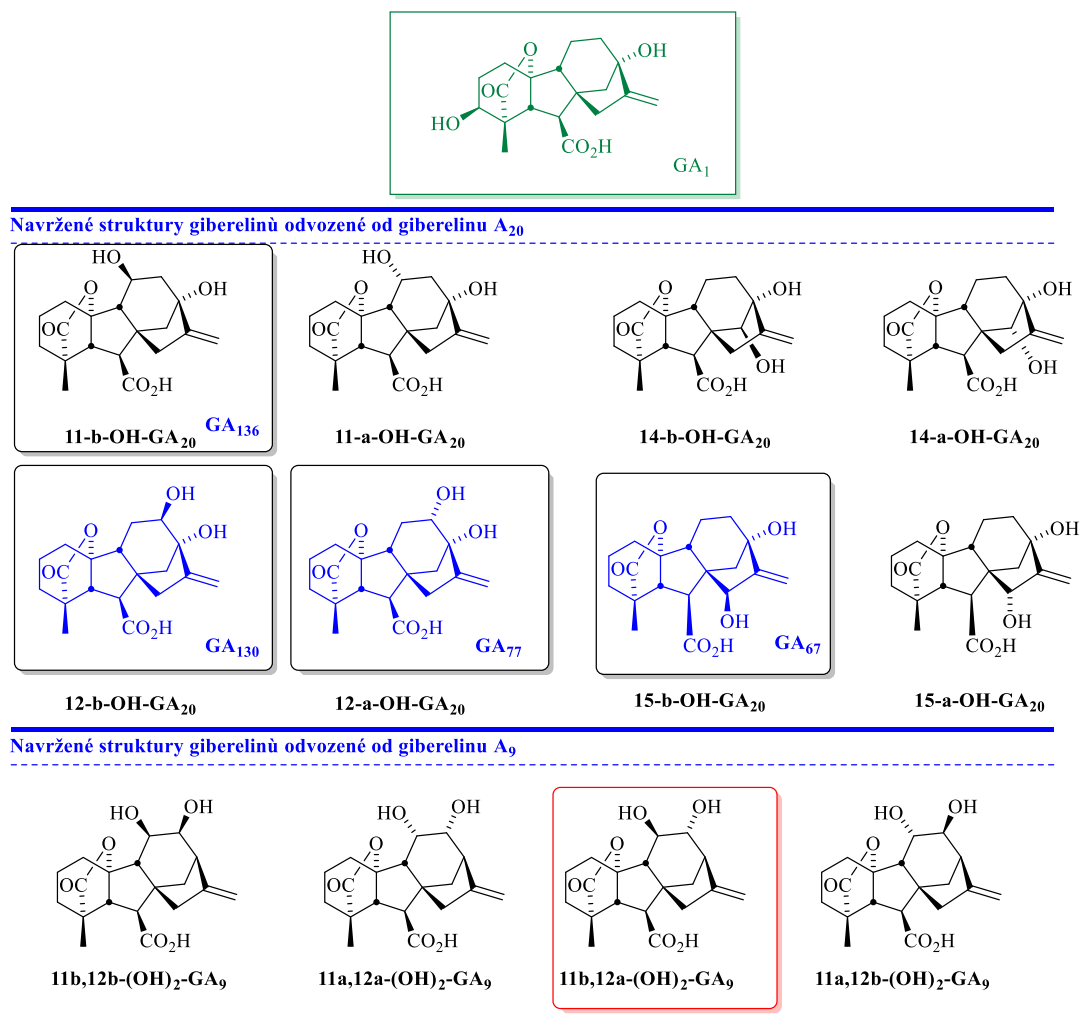


Schéma 15 – Postupně uvažování kandidátů na neznámý giberelin.

3.4.2 Klíčové syntetické kroky umožňující zavedení klíčových 11 β a

12 α hydroxy skupin

Návrh pomyslné stereoselektivní instalace těchto dvou hydroxylových skupin na strukturu giberelinu A₉ je založen na reaktivitě intermediátu **21**. Tako látka byla již dříve připravena⁴⁹ ve skupině prof. Mander a v našem případě by sloužila jako základní intermediát nezbytný k následné instalaci obou hydroxylových skupin (Schéma 16). Nejprve by tak byla zavedena C-12 hydroxylová skupina pomocí selektivní allylické oxidace. V tomto případě se tedy bude muset ochránit $\Delta^{16,17}$ olefin na D kruhu, aby nedocházelo ke kompetitivní allylační oxidaci na pozici C-15 kruhu D.

Avšak $\Delta^{16,17}$ olefin se bude muset zpětně regenerovat (odchránit) před tím, než bude zavedena C-11 hydroxylová skupina. V tomto případě je totiž přítomnost $\Delta^{16,17}$ olefinu na D kruhu nejenom žádoucí, ale i nezbytná. Zavedení hydroxylové skupiny je totiž založeno na inter-intra molekulární stereoselektivní hydroborace olefinu $\Delta^{10,11}$, která instaluje C-11 hydroxylovou skupinu.

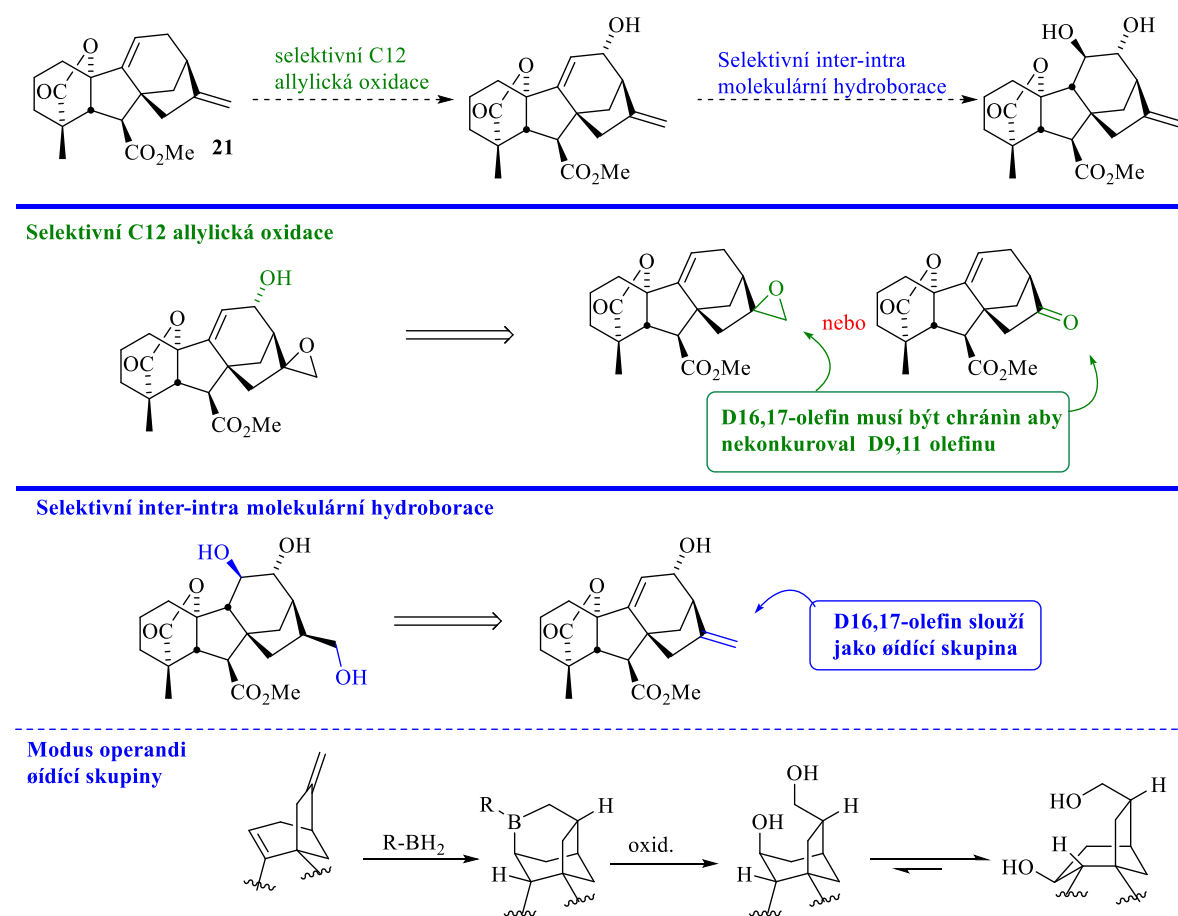


Schéma 16– Instalace klíčových hydroxylových skupin na skeletu giberelinu A₉.

3.4.3 Navržené syntetické schéma vedoucí k přípravě cílové struktury nového giberelinu

Na základě navržené struktury (viz 3.4.1) a kontextu navržených klíčových kroků umožňujících stereoselektivní zavedení obou hydroxylových skupin na uhlíky C-11 a C-12, Dr. Pospíšil navrhl zahájit syntézu cílové látky ze standardně dostupného giberelinu A₃. Celkový syntetický plán je pak přiblížen na následujících dvou schématech (Schéma 17 a Schéma 18).

Klíčovými kroky této syntézy pak jsou:

- 1) Příprava intermediátu **4** obsahujícího dvě orthogonální chránící skupiny na C-19 a C-7 esterových skupinách.
- 2) Výběr a zavedení chránící skupiny pro olefin $\Delta^{16,17}$.
- 3) Příprava intermediátů **15** resp. **20** vhodných k selektivní allylické oxidaci pozice C-12 a provedení inter-intra molekulární hydroborace vedoucí k selektivní instalaci C-11 hydroxy skupiny.

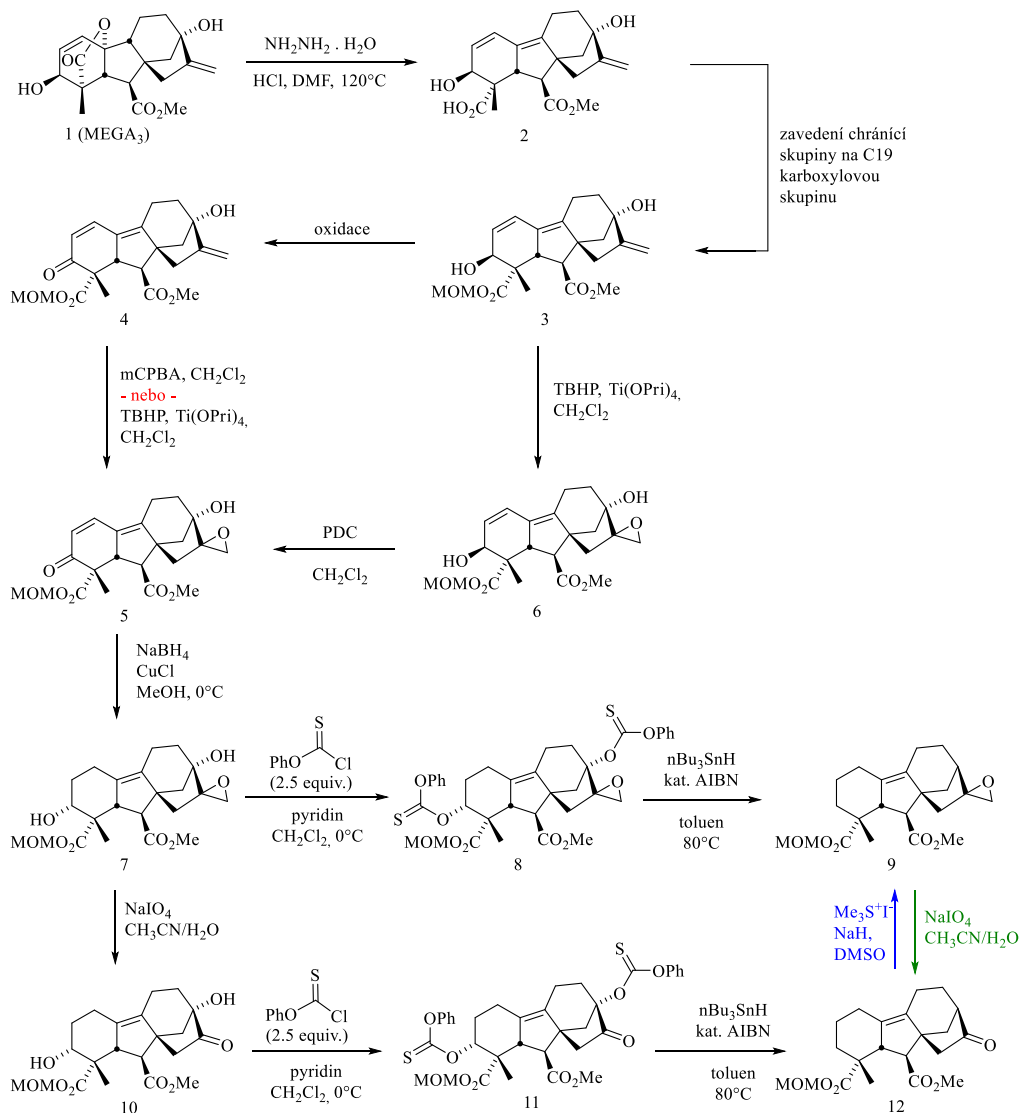
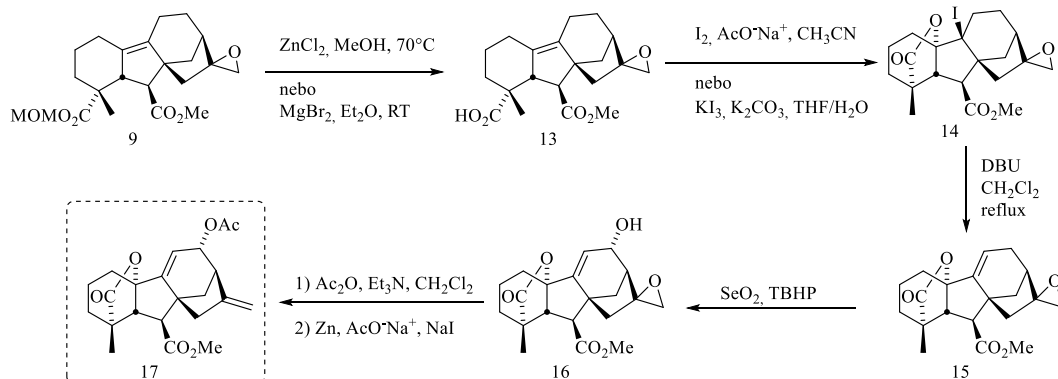


Schéma 17 – Navržené syntetické schéma – část 1.

Syntéza intermediátu 17 z epoxidu 9



Syntéza intermediátu 17 z ketonu 12

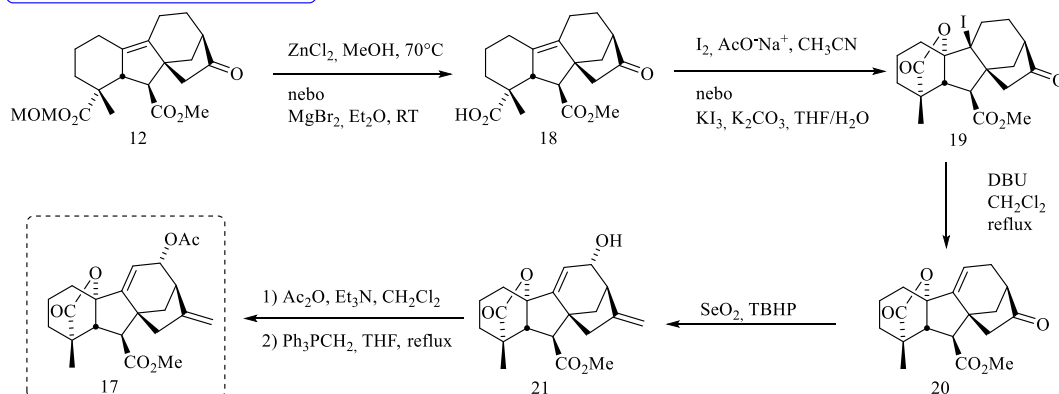
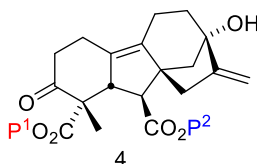


Schéma 18 – Navržené syntetické schéma – část 2.

3.4.4 Cíle bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce není samozřejmě dokončit syntézu navržené struktury nově izolovaného giberelinu, ale „pouze“ optimalizovat syntézu intermediátu 4. Podrobněji, mým úkolem bude najít vhodné orthogonální chránící skupiny pro C-7 a C-19 karboxylové kyseliny tak, abychom mohli selektivně C-19 karboxylovou skupinu ochránit v přítomnosti chránící skupiny na karboxylu C-7. V navrženém syntetickém postupu vycházíme z předpokladu, že MOM chránící skupina bude tou nejvhodnější chránící skupinou pro C-19 karboxyl, ale několik dalších chránících skupin bude testováno. Následně pak budu mít za úkol optimalizovat veškeré syntetické kroky vedoucí k látce 4 tak, aby poskytovaly cílové produkty za vysokých výtěžků a aby dané syntetické kroky mohly být prováděny v multigramovém množství.



Obr. 12 - Struktura cílového intermediátu.

Vybrané intermediáty pak budou otestovány na jejich biologickou aktivitu vůči vybraným nádorovým liniím a také budou testovány na jejich protizánětlivé účinky.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie

Pro jednotlivé kroky byly použity tyto chemikálie: aceton, allylbromid, benzyl bromid (BnBr), bromid zinečnatý (ZnBr_2), deuterovaný chloroform (CDCl_3), Dess-Martinovo činidlo (DMP), dichlormethan (DCM), dimethylformamid (DMF), ethyl acetát (EtOAc), TEMPO-činidlo, K-selektrid, *N*-chlorsukcinimidu (NCS), tetrabutylamonium chlorid (TBAC), hydrazin hydrát ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), hydrazin monochlorid ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), hydroxid draselný (KOH), chloroform (CHCl_3), K-selektrid, kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina sírová (H_2SO_4), metanol (CH_3OH), methyl jodid (CH_3I), *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), nasycené roztoky NaCl, NaHCO_3 a Na_2CO_3 , *N*-methylnitrosourea, diethylether, petrolether (PE), pyridinium-chlorchromát (PCC), pyridinium-dichromát (PDC), síran hořečnatý MgSO_4 , síran sodný (Na_2SO_4), tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4), tetrahydrofuran (THF), toluen, uhličitan draselný (K_2CO_3) od firem Sigma-Aldrich, Merck, Lachner a Fluka. Veškeré látky byly, pakliže není uvedeno jinak, použity ve stejné čistotě, v jaké byly dodány.

4.2 Metody a materiál

4.2.1 Obecné informace

Průběh reakcí, orientační čistota meziproduktů a produktů byla stanovena pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 SIL G/UV254 s fluorescentním indikátorem (Machery-Nagel nebo Sigma-Aldrich). Jednotlivé sloučeniny přítomny v reakční směsi byly vizualizované pomocí vizualizačních roztoků, a to pomocí Hannesianova roztoku a KMnO_4 . Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie (CC) na silikagelu 34 od firmy Sigma Aldrich (velikost částic 230-400 mesh; velikost pórů 60 Å). Eluované frakce byly jímány po 15-30 mL a jejich obsah byl monitorován pomocí TLC. Frakce obsahující stejný obsah byly spojeny, zahuštěny na RVO a následně analyzovány pomocí spektrálních metod.

Analýza pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) byla provedena na spektrometru JEOL 500 JNM-ECA 500 MHz pracující při frekvenci 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Měření probíhala za laboratorní teploty a pro měření byla použita deuterovaná rozpouštědla chloroform

(CDCl₃) a aceton (CD₃COCD₃). Chemické posuny (δ , ppm) a štěpící konstanty (Hz) ¹H NMR spekter jsou uvedeny standardním způsobem vzhledem ke zbývajícimu CHCl₃ přítomnému v CDCl₃ (δ H = 7,27 ppm) a prostřednímu signálu v CHD₂C(O) CD₃ přítomném v acetonu-*d*₆ (δ H = 2,05 ppm). ¹³C NMR chemické posuny (δ , ppm) jsou uváděny vzhledem k CDCl₃ (δ C = 77,23 ppm, prostřední signál) a CD₃C(O)CD₃ (δ C = 29.84 ppm, prostřední signál). Protonové interakce jsou reprezentovány jako singlet (s), dublet (d), dublet dubletu (dd), triplet (t), triplet tripletu (tt), pentet (p) a multiplet (m). Hodnoty HRMS byly získány za použití kvadrupolové /iontové pasti hmotnostního analyzátoru. Analýza a přiřazení byly provedeny porovnáním s literárními spektroskopickými daty nebo pomocí experimentů 2D-COSY, HSQC, HMBC, 2D-NOESY a 1D-NOEdiff. Čistota konečných sloučenin byla stanovena dle následujícího postupu: 1 mg sloučeniny byl rozpuštěn v 1 ml 1% methanolu a vstříknut (10 ul) na kolonu s reverzní fází (Symmetry C18, 5 μ m, 150 mm x 2,1 mm; Milford, MA, USA), inkubováno při 25 ° C. Rozpouštědlo (A) bylo tvořeno 15 mM mravenčanem amonným upraveným na pH 4,0. Rozpouštědlo (B) bylo tvořeno methanolem. Při průtoku 200 ul / min byl použit binární gradient: 0 min, 10% B; 0-24 min. lineární gradient na 90% B; 25-34 min. izokratické eluce 90% B; 35-45 min. lineární gradient na 10% B. Eluovaná fáze byl poté zaveden do PDA detektoru (rozsah snímání 210-700 nm s rozlišením 1,2 nm) a elektrosprejový zdroj (zdrojová teplota 120 ° C, desolvační teplota 300 ° C, kapilární napětí 3 kV, kuželové napětí 20 V). Dusík byl použit jako kuželový (50 l / h) i desolvační plyn (500 l / h). Sběr dat byl prováděn v režimu úplného skenování (50-1000 Da), doba skenování 0,5 s a srážkovou energií 6 V. Analýzy byly provedeny v pozitivním módu (ES⁺) nebo v záporném módu (ES⁻), a proto byly shromážděny jako kvazimolekulární ionty [M + H]⁺ a [M-H]⁻.

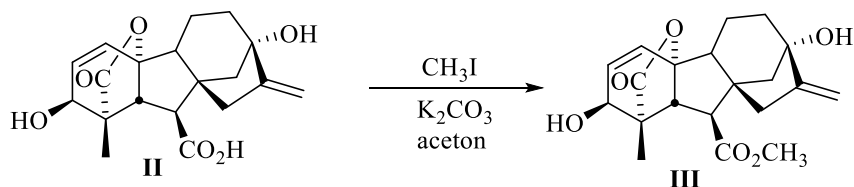
Teploty tání (b.t.) byly měřeny na přístroji B-540 Büchi® a nejsou korigovány. Látky byly navažovány na analytických vahách značky AS 220.R2. Veškeré reakce probíhaly za pomoci laboratorní magnetické míchačky s ohřevem Heidolph MR 3001 K (Heidolph, Německo). Látky byly odpařovány a zahušťovány za použití vakuové rotační odparky Interface I-300 (Büchi, Švýcarsko).

4.2.2 Vizualizační roztoky pro TLC

- Zásaditý roztok KMnO₄ byl připraven rozpuštěním 9 g KMnO₄ a 20 g K₂CO₃ ve 150 mL 10% NaOH.
- Hannesianův vizualizační roztok byl připraven rozpuštěním 12 g kyseliny fosfomolybdenové v 250 mL ethanolu.

4.3 Organická syntéza

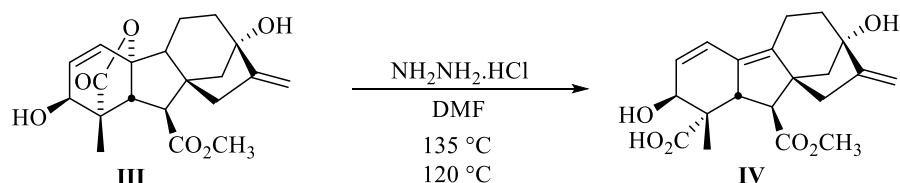
4.3.1 Methylester kyseliny giberelové (III)⁵⁰



Krystalická látka **II** (5 g, 14.4 mmol, 1.0 ekviv) byla za laboratorní teploty rozpuštěna v acetonu (18 mL, 0.1 M vůči **I**) a směs byla míchána po dobu 5 minut. Následně byl přidán bezvodný K_2CO_3 (3 g, 21.7 mmol, 1.5 ekviv). Po dalších 5-ti minutách byl pomalu přikapáván methyl iodid (1,01 mL, 17,6 mmol, 1.2 ekviv) a výsledná směs byla míchána po dobu 24 hodin. Po ukončení reakce byla směs zředěna destilovanou vodou (250 mL) a následně extrahována pomocí EtOAc (3x250 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (200 mL), sušeny nad bezvodným Na_2SO_4 , zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 , P.E.: EtOAc = 2: 1 $\rightarrow$ 1: 1 $\rightarrow$ 3:7) a poskytl produkt **III** (3.9 g, 86 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. = b.t. 189-189.5 °C, litt.⁵⁰ 209 – 210 °C; $\alpha_D^{24} = 56.5^\circ$, litt.⁵⁰ $\alpha_D^{16} = 75^\circ$ (c 0.5, CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 1.26 (s, 3H), 1.66 – 1.72 (m, 1H), 1.75 (dd, $J = 10.8, 1.4$ Hz, 1H), 1.82 (dddd, $J = 10.4, 9.3, 7.6, 3.6$ Hz, 1H), 1.90 – 1.97 (m, 1H), 2.03 – 2.12 (m, 2H), 2.13 – 2.26 (m, 2H), 2.80 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.22 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.17 (dd, $J = 3.9, 0.9$ Hz, 1H), 4.98 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.29 (dd, $J = 3.1, 1.9$ Hz, 1H), 5.92 (dd, $J = 9.3, 3.7$ Hz, 1H), 6.33 (dd, $J = 9.2, 0.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 14.6, 17.2, 38.4, 43.3, 45.0, 50.7, 50.8, 51.3, 52.4, 53.0, 53.7, 70.0, 78.4, 90.6, 107.9, 132.5, 133.2, 157.1, 172.7, 178.5; MS (ES^+), m/z (%): 378.30 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 399.17 $[\text{M}+\text{K}]^+$; R.t. = 14.06 min.

4.3.2 Syntéza dienu IV pomocí hydrazinolýzy⁵¹

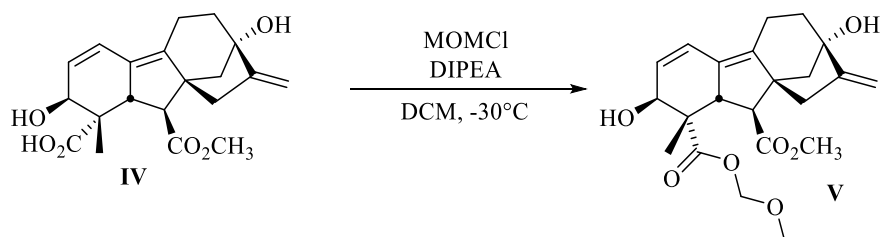


K roztoku **III** (14 g, 38.84 mmol, 1.0 ekviv) rozpuštěném v DMF (125 mL) byl přidán hydrazin monochlorid (35 g, 0.511 mmol). Suspenze byla zahřáta na 135 °C a míchána pod argonovou atmosférou, dokud nedošlo k homogenizaci směsi. Teplota byla posléze rychle snížena na 120 °C a při této teplotě byla reakční směs míchána 4 hodiny. Následovalo chlazení na laboratorní teplotu a s následným chlazením v ledové lázni. Reakční směs byla zředěna destilovanou vodou (300 mL), okyselena na pH 3 pomocí 6 M HCl a extrahována EtOAc (3x200 mL). Spojené organické fáze byly promyty 1 M HCl (2x100 mL) a zahuštěny na RVO. Suchý produkt byl rozpuštěn v EtOAc (150 mL) a promyt roztokem nasyceného NaHCO₃ a Na₂CO₃ (1:1, 2x75 mL). Získaná organická fáze obsahuje výchozí produkt. Spojené vodní fáze byly promyty EtOAc (3x200 mL) a vzniklá organická fáze byla přidána k organické fázi vzniklé během předchozí extrakce. Spojené vodné fáze byly okyseleny na pH 3 pomocí koncentrované HCl a extrahovány EtOAc (3x300 mL). Spojené organické fáze byly zahuštěny na RVO a poskytly výsledný produkt **IV** (1.15 g, 11 %) ve formě žluté látky. Produkt byl skladován pro další použití bez dodatečné purifikace.

B.t. 127-128 °C; $\alpha_D^{24} = -52,4$ (*c* 1.51, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) = 1.16 (s, 3H), 1.63 – 1.77 (m, 3H), 1.79 – 1.87 (m, 1H), 1.88 – 1.96 (m, 1H), 1.96 – 2.04 (m, 2H), 2.12 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H), 2.15 – 2.26 (m, 2H), 2.70 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.25 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.02 – 4.05 (m, 1H), 4.72 (d, *J* = 6.8 Hz, 0H), 4.87 (td, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 1H), 5.20 (ddd, *J* = 3.0, 1.8, 1.0 Hz, 1H), 5.89 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 6.38 (dd, *J* = 9.4, 0.9 Hz, 1H); MS (ES⁺), *m/z* (%): 361 [M+H]⁺; 39 [M+K]⁺; R.t.=13.5 min.

4.3.3 Chránění karboxylové skupiny na C-19

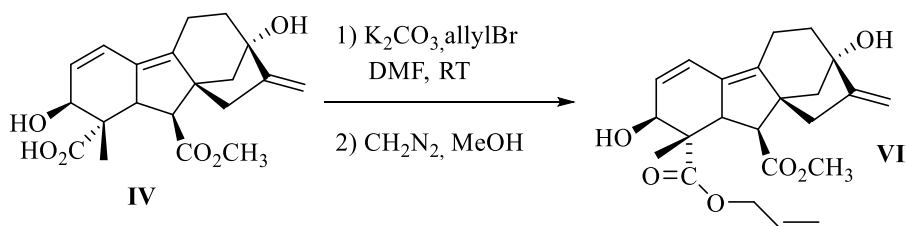
4.3.3.1 Zavedení MOM chránicí skupiny



K rozpuštěné kyselině **IV** (2.5 g, 6.96 mmol, 1.0 ekviv) v CH_2Cl_2 (75 mL, 0.1 M vůči **IV**) byla přidána DIPEA (2.4 mL, 13.91 mmol, 2.0 ekviv) a reakční směs byla ochlazena na teplotu -30°C . Po 5-ti minutách byl po kapkách přidáván MOMCl a výsledná reakční směs byla míchána 20 minut. NH_4Cl (150 mL) byl přidán a po samovolném ohřátí na laboratorní teplotu byla směs extrahována pomocí EtOAc (3x200 mL), promyta nasyceným roztokem NaCl (200 mL), sušena nad bezvodým MgSO_4 , zfiltrována a zahuštěna na RVO. Výsledný surový produkt byl následně purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 ; aceton/hexan = 2:3) a poskytl produkt **V** (505.5 mg, 18 %) ve formě bílé krystalické látky

B.t. $132-133^\circ\text{C}$; $a_D^{22} = -82.7^\circ$ (c 1.32; CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ (ppm) = 1.29 (s, 3H), 1.66 – 1.92 (m, 3H), 2.05 – 2.15 (m, 1H), 2.18 (dd, $J = 10.5, 2.8$ Hz, 1H), 2.20 – 2.27 (m, 1H), 2.27 – 2.33 (m, 1H), 2.61 (dd, $J = 16.4, 6.4$ Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.49 – 3.57 (m, 1H), 3.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 4.38 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.95 – 5.04 (m, 1H), 5.13 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.20 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.94 – 6.05 (m, 1H), 6.39 (dd, $J = 9.6, 0.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ (ppm) = 19.9, 20.9, 39.2, 39.3, 47.9, 49.3, 49.8, 52.0, 52.3, 56.3, 57.8, 69.9, 79.3, 90.4, 106.5, 125.1, 126.7, 128.4, 140.5, 154.4, 173.9, 175.0; MS (ES^+), m/z (%): 405.36 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 443.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$; R.t. = 16.76 min.

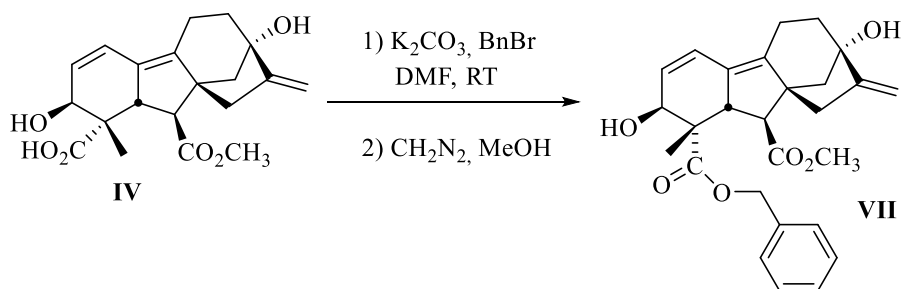
4.3.3.2 Chránění karboxylové skupiny pomocí allylu



IV (100 mg, 0.278 mmol, 1.0 ekviv) byla rozpuštěna v DMF (2.78 mL, 0.1 M vůči **IV**) a míchána za laboratorní teploty. Po 5-ti minutách byl přidán K_2CO_3 , po dalších 5-ti minutách po kapkách allylbromid. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC a po zreagování veškeré výchozí látky (80 minut) byla reakční směs zředěna destilovanou vodou (10 mL). Následovala extrakce pomocí EtOAc (3x15 mL), promytí destilovanou vodou (1x15 mL), sušení nad bezvodným Na_2SO_4 , filtrace a zahuštění na RVO. Výsledný surový produkt byl rozpuštěn v MeOH (5 mL) a roztok byl ochlazen na 0°C . Do tohoto roztoku byl přikapán roztok diazomethanu v Et₂O až do perzistentního žlutého zbarvení reakční směsi. Roztok byl pak probublán dusíkem tak aby žlutá barva vybledla a výsledný roztok byl odpařen do sucha na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 ; aceton/hexan = 2:3) a poskytl produkt **VI** (86 mg, 77 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. $130 - 130,5^\circ\text{C}$; $\alpha_{\text{D}}^{25} = 17^\circ$ (c 1.09, CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 1.27 (s, 3H), 1.73 (ddd, $J = 10.4, 7.6, 2.6$ Hz, 1H), 1.78 (dd, $J = 10.5, 2.3$ Hz, 1H), 1.83 (dq, $J = 11.9, 6.4$ Hz, 3H), 2.09 (dddd, $J = 16.6, 12.5, 7.7, 4.9$ Hz, 1H), 2.17 (dd, $J = 10.2, 2.7$ Hz, 1H), 2.24 (dq, $J = 16.6, 2.2$ Hz, 1H), 2.30 (dt, $J = 16.5, 2.8$ Hz, 1H), 2.62 (dd, $J = 16.2, 6.1$ Hz, 1H), 3.52 (dd, $J = 8.6, 4.3$ Hz, 1H), 3.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 4.36 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.49 (ddt, $J = 13.4, 5.5, 1.4$ Hz, 1H), 4.54 (ddt, $J = 13.5, 5.4, 1.5$ Hz, 1H), 4.99 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.17 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.21 (dq, $J = 10.4, 1.3$ Hz, 1H), 5.26 (dq, $J = 17.3, 1.7$ Hz, 1H), 5.83 (ddt, $J = 17.2, 10.7, 5.5$ Hz, 1H), 5.98 (dd, $J = 9.6, 5.5$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 20.0, 20.9, 39.2, 39.3, 48.0, 49.3, 49.7, 52.0, 52.3, 56.3, 65.1, 69.9, 79.3, 106.4, 118.2, 124.8, 126.8, 128.7, 132.2, 140.2, 154.4, 174.1, 175.1; MS (ES^+), m/z (%): 401 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 440 $[\text{M}+\text{K}]^+$

4.3.3.3 Chránění karboxylové skupiny pomocí benzylu

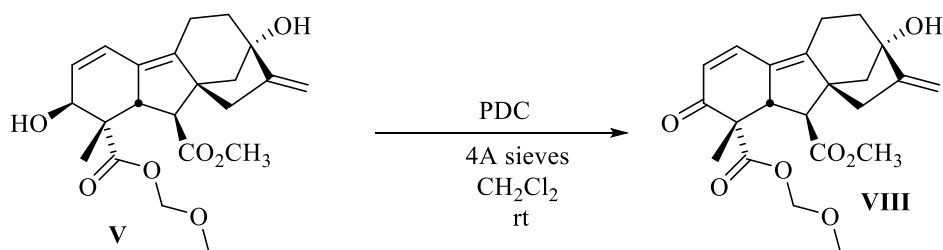


IV (3 g, 8.35 mmol, 1.0 ekviv) byla rozpuštěna v DMF (84 mL, 0.1 M vůči **IV**) a míchána za laboratorní teploty. Po 5-ti minutách byl přidán K_2CO_3 , po dalších 5-ti minutách po kapkách BnBr. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC a po zreagování veškeré výchozí látky (22 hod) byla reakční směs zředěna destilovanou vodou (40 mL). Následovala extrakce pomocí EtOAc (3x90 mL), promytí destilovanou vodou (1x90 mL), sušení nad bezvodným Na_2SO_4 , filtrace a zahuštění na RVO. Výsledný surový produkt byl rozpuštěn v MeOH (50 mL) a roztok byl ochlazen na $0^\circ C$. Do tohoto roztoku byl přikapán roztok diazomethanu v Et_2O až do perzistentního žlutého zbarvení reakční směsi. Roztok byl pak probublán dusíkem tak aby žlutá barva vybledla a výsledný roztok byl odpařen do sucha na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 , aceton: hexan = 2:3) a poskytl produkt **VI** (3.12 g, 84 %) ve formě bílé krystalické látky.

$\alpha_D^{22} = -26.5^\circ$ (c 1.69, CH_3OH); 1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ (ppm) = 1.28 (s, 3H), 1.51 (dd, J = 10.5, 2.3 Hz, 1H), 1.68 (ddd, J = 9.2, 4.6, 2.2 Hz, 3H), 1.74 – 1.94 (m, 3H), 2.00 – 2.17 (m, 4H), 2.20 (dq, J = 17.7, 2.4 Hz, 1H), 2.26 (dt, J = 16.5, 2.9 Hz, 1H), 2.49 – 2.58 (m, 1H), 3.52 (dd, J = 8.6, 4.4 Hz, 1H), 3.61 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.37 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.96 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.11 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.14 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 5.97 (dd, J = 9.7, 5.5 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.30 – 7.43 (m, 5H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ (ppm) = 20.0, 20.8, 39.1, 39.2, 47.9, 49.3, 49.7, 51.9, 52.0, 56.2, 66.3, 70.0, 79.2, 106.4, 124.8, 126.8, 128.3, 128.4, 128.6, 128.7, 128.7, 128.8, 136.0, 140.2, 154.4, 174.3, 175.0; MS (ES^+), m/z (%): 473.29 $[M+Na]^+$, 489.18 $[M+K]^+$; R.t.=20.59 min.

4.3.4 Oxidace hydroxy skupiny na C-3

4.3.4.1 Oxidace látky V pomocí PDC

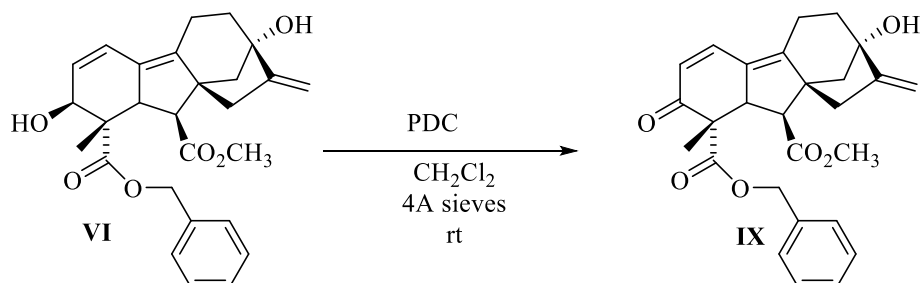


Alkohol **V** (1.5 g, 3,7 mmol, 1.0 ekviv) byl rozpuštěn v DCM (52.5 mL, 0.1 M vůči **V**) a PDC (5.5 g, 0.5 mmol, 2.0 ekviv) spolu s aktivovanými kuličkovými molekulárními síty 4A (1g) byli přidány. Směs byla ponechána reagovat při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Celý roztok byl rozředěn pomocí Et₂O (180 mL) a výsledná směs byla zfiltrována přes Celit[®]. Filtrát byl následně promyt 1 M aq. HCl (150 mL), nasyceným roztokem NaCl (150 mL), sušen nad MgSO₄, zfiltrován a zahuštěn na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; P.E.: EtOAc = 4: 1 → 2: 1) a poskytl produkt **VIII** (269 mg, 18%) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 128 – 128.5 °C; $\alpha_D^{23} = -95,6^\circ$ (c 1.69, CH₃OH), (lit.) $\alpha_D^{25} = -184^\circ$ (c 1.09, CH₂Cl₂); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 1.44 (s, 3H), 1.71 – 1.93 (m, 4H), 2.15 – 2.27 (m, 2H), 2.31 (dq, *J* = 4.3, 2.7 Hz, 2H), 2.72 (dd, *J* = 16.5, 6.2 Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.65 – 3.73 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 5.03 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 5.20 – 5.23 (m, 2H), 6.05 (dd, *J* = 9.8, 1.1 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 21.3, 23.9, 38.0, 42.8, 45.3, 49.5, 51.7, 51.8, 54.0, 56.8, 59.8, 78.6, 92.8, 106.4, 127.2, 131.3, 133.8, 140.9, 154.6, 169.9, 173.8, 196.5; MS (ES⁺), *m/z* (%): 426 [M+Na]⁺, 442 [M+K]⁺

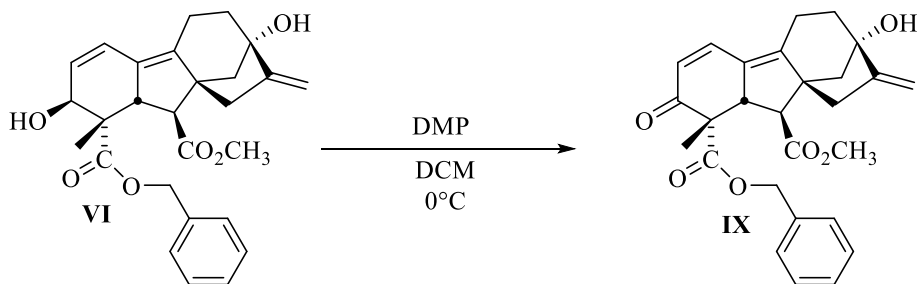
4.3.4.2 Oxidace látky VI na keton IX

4.3.4.2.1 Pomocí PDC



Diester **VI** (420 mg, 1 mmol) byl rozpuštěn v DCM (10 mL, 0.1M vůči **5**) za laboratorní teploty a PDC (1.5 g, 4 mmol) byl přidán společně s aktivovaným kuličkovým molekulárním sítím 4A (0.4 g). Po 20 h byl přidán diethylether (100 mL) a výsledná směs byla zfiltrována přes Celit® a filtrační koláč byl promyt pomocí DCM (100 mL). Filtrát byl následně promyt 1M aq. HCl (90 mL), nasyceným roztokem NaCl (90 mL), sušen nad bezvodým MgSO_4 , filtrován a zahuštěn na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 ; Et_2O /hexan = 4:1) a poskytl produkt **IX** (58 mg, 13%) ve formě bílé krystalické látky.

4.3.4.2.2 Pomocí Dess-Martinova činidla (DMP)

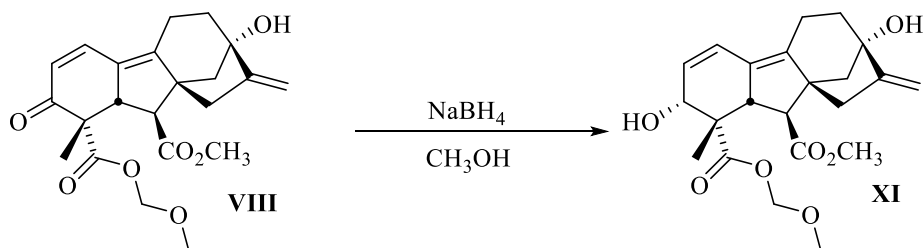


Diester **VI** byl rozpuštěn v DCM (2,8 mL, 0,2 M vůči **5**) a DMP (283 mg, 0,6721mmol) byl přidán. Výsledná směs byla míchána 20 h při 0°C a posléze byla zfiltrována přes Celit®, filtrační koláč byl promyt pomocí Et_2O (3x30 mL) a filtrát byl zahuštěn na RVO. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 ; Et_2O /hexan = 4:1) a poskytl produkt **IX** (137 mg, 55 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. $127\text{--}128^\circ\text{C}$; $\alpha_{\text{D}}^{23} = -95,6$ (c 1.69, CH_3OH); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, Chloroform- d) δ 1.35 (s, 3H), 1.39 – 1.46 (m, 1H), 1.64 – 1.80 (m, 2H), 2.06 – 2.19 (m, 2H), 2.26 (q, $J = 2.5$ Hz, 2H), 2.59 (dd, $J = 16.5, 6.2$ Hz, 1H), 3.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J = 8.5, 4.1$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 5.01 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 5.14 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 5.18 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.05 (dd, $J = 9.9, 1.1$ Hz, 1H),

7.19 (dd, $J = 9.8, 0.9$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 7.6, 1.9$ Hz, 2H), 7.30 – 7.38 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) $\delta = 18.6, 21.2, 38.9, 39.2, 49.5, 52.0, 52.2, 54.0, 57.1, 67.0, 78.9, 106.9, 126.1, 127.2, 128.2, 128.6, 128.7, 135.7, 137.9, 147.3, 153.6, 170.7, 173.8, 196.3$; MS (ES^+), m/z (%): 449.32 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R.t. = 22.8 min.

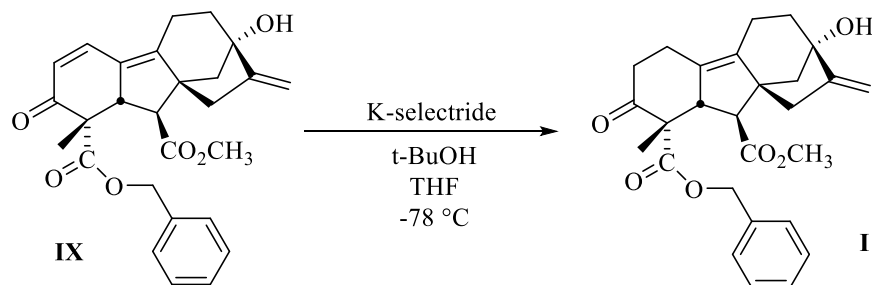
4.3.5 Redukce C-3 keto skupiny ketonu VIII na alkohol



Keton **VIII** (53 mg, 0.131 mmol, 1.0 ekviv) byla rozpuštěna v methanolu (2.65 mL) a NaBH_4 (12.45 mg, 0.329 mmol, 2.5 ekviv) byl přidán. Reakční směs byla nechána míchat při laboratorní teplotě a monitorována pomocí TLC a po zreagování veškeré výchozí látky (120 minut) byla zředěna destilovanou vodou (20 mL). Následovala extrakce pomocí EtOAc (3x25 mL), promytí nasyceným roztokem NaCl (1x25 mL), sušení nad bezvodným MgSO_4 , filtrace a zahuštění na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (SiO_2 , ether) a poskytl produkt **XI** (39 mg, 55 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. 139– 141 $^{\circ}\text{C}$; $\alpha_{\text{D}}^{23} = -71.2^{\circ}$ (c 1.02; CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ (ppm) = 1.28 (s, 3H), 1.73 (dddd, $J = 11.6, 7.8, 2.9, 1.1$ Hz, 1H), 1.78 – 1.87 (m, 2H), 2.03 – 2.14 (m, 1H), 2.15 – 2.34 (m, 3H), 2.61 (dd, $J = 16.4, 6.4$ Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.52 (dd, $J = 8.6, 4.4$ Hz, 1H), 3.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 4.37 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.98 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.13 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.17 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H), 5.20 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.98 (ddd, $J = 9.6, 5.6, 1.0$ Hz, 1H), 6.38 (dd, $J = 9.7, 0.8$ Hz, 1H); MS (ES^+), m/z (%): 405.29 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 443.26 $[\text{M}+\text{K}]^+$; R.t. = 15.77 min.

4.3.6 Příprava klíčového intermediátu I – selektivní redukce α,β -olefinu na A kruhu

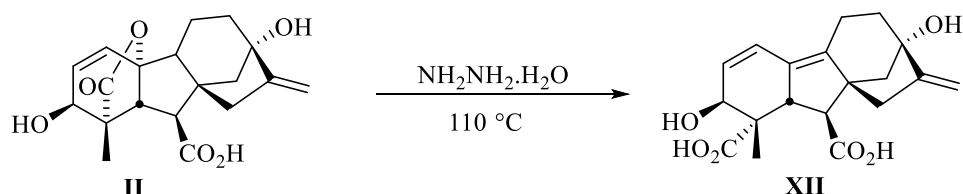


Roztok K-selektřidu (196 μL , 222 mmol, 3 ekviv) a THF (1 mL) byl míchán při teplotě $-78\text{ }^\circ\text{C}$ a po kapkách byl přidáván roztok enonu **IX** (120 mg, 447.4 μmol , 1.0 ekviv) v THF (1.5 mL) a *t*-butanolu (60 μL). Získaná směs byla míchána po dobu 20 minut následně byl k reakční směsi přidán nasycený roztok NH_4Cl (5mL). Výsledný roztok byl ponechán ohřát na RT a extrahován pomocí Et_2O (2x20 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (1x25 mL), sušeny nad bezvodým MgSO_4 , zfiltrvány a zahuštěny na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 ; ether/hexan = 3:1) a poskytl produkt **XII** (54 mg, 45 %) ve formě bílé krystalické látky.

$\alpha_D^{26} = -102.7^\circ$ (c 1.00, CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 1.28 (s, 3H), 1.56 (dd, $J = 10.3, 2.6$ Hz, 1H), 1.61 – 1.78 (m, 3H), 2.01 (dd, $J = 10.3, 2.4$ Hz, 1H), 2.13 – 2.23 (m, 1H), 2.23 – 2.38 (m, 3H), 2.43 – 2.73 (m, 3H), 3.23 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.39 – 3.46 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.96 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.06 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 5.14 – 5.18 (m, 2H), 7.28 – 7.40 (m, 5H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 14.3, 18.9, 20.8, 22.4, 22.9, 31.8, 37.6, 39.1, 39.4, 50.1, 52.1, 52.8, 56.1, 57.3, 60.9, 67.2, 79.3, 106.1, 125.9, 128.4, 128.7, 128.9, 135.4, 137.4, 154.4, 170.9, 174.5, 207.9; MS (ES^+), m/z (%): 452 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 490 $[\text{M}+\text{K}]^+$

4.3.7 Příprava dimethyl esterů a jejich derivátů

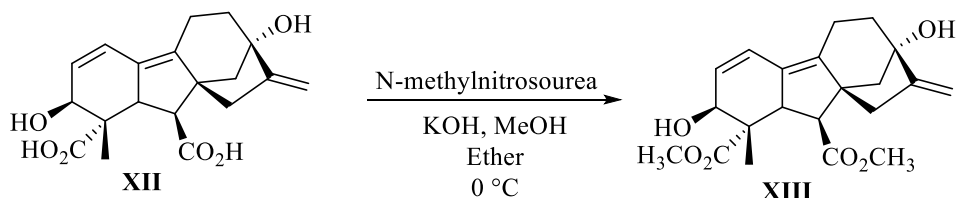
4.3.7.1 Syntéza dikarboxylové kyseliny XII



GA₃ (**II**) (10 g, 28.87 mmol, 1.0 ekviv) byl při 110 °C rozpuštěn v NH₂NH₂.H₂O (20 mL, 400 mmol) a vzniklá suspenze byla při této teplotě míchána po dobu 30 minut. Následně byla reakční směs ponechána ochladit na laboratorní teplotu, zředěna vodou (160 mL) a okyslena na pH 2 pomocí 35 % HCl. Vzniklá bílá sraženina byla zfiltrována a filtrát byl extrahován pomocí EtOAc (4x150 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (2x 150 mL), sušeny nad bezvodým Na₂SO₄, zfiltrovány a odpařeny do sucha na RVO. Výsledný produkt **XII** (8,0 g, 79 %) byl získán ve formě žluté olejovité látky. Produkt byl použit do další reakce bez další dodatečné purifikace.

$\alpha_D^{21} = -28.2$ (c 1.63, acetone); ^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ (ppm) = 1.27 (s, 3H), 1.60 – 1.85 (m, 4H), 2.15 – 2.23 (m, 2H), 2.28 – 2.35 (m, 1H), 2.50 (dt, J = 16.4, 3.0 Hz, 1H), 2.61 (dd, J = 16.2, 6.3 Hz, 1H), 2.87 (d, J = 74.2 Hz, 2H), 3.57 (dd, J = 8.5, 4.4 Hz, 1H), 3.72 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.33 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 4.91 (dt, J = 1.8, 0.9 Hz, 1H), 5.13 (t, J = 1.5 Hz, 1H), 5.86 – 5.97 (m, 1H), 6.32 (d, J = 9.7 Hz, 1H); MS (ES⁺), m/z (%): 347 [M+H]⁺, 386 [M+K]⁺

4.3.7.2 Syntéza dimethyl diesteru XIII

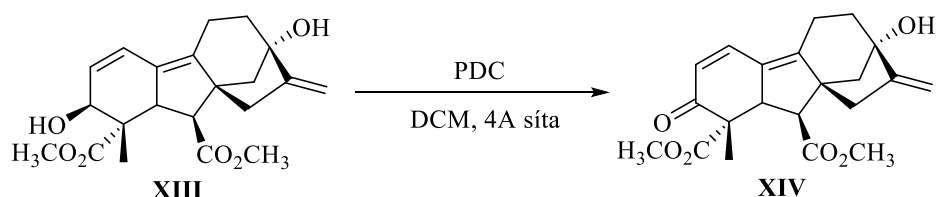


Dikarboxylová kyselina **XII** (7.2 g, 22.86 mmol, 1.0 ekviv) byla rozpuštěna v methanolu (45.7 mL, 0.5M vůči **XIV**) a reakční směs ochlazena na 0 °C. Ve vedlejší tmavé reakční nádobě byla suspendována *N*-methylnitrosourea (23.57 g, 228.65 mmol, 10 ekviv) v etheru (143 mL, 1,6M vůči *N*-methylnitrosourea) a 50% aq. KOH (80 mL) byl přidán. Generovaný CH₂N₂ byl zachycen v Et₂O vrstvě a tento hnědožlutý roztok byl postupně přikapáván do roztoku dikyseliny **XII** pomocí skleněné

Pasteurovi pipety až do doby, než barva reakční směsi zůstala permanentně žlutá. Následně byla směs samovolně ohřáta na laboratorní teplotu a ponechána míchat po dobu 1 h. Následně byla reakční směs probublávána po dobu 5 minut pomocí N₂. Výsledná reakční směs byla zahuštěna na RVO. Odparek byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; P.E./EtOAc = 2:1 → 1:1 → 3:7) a poskytl produkt **XIII** (3.49 g, 41 %) ve formě bílé krystalické látky.

B.t. = 64 – 65 °C; $\alpha_D^{23} = -54.7$ (c 1.48, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 1.26 (s, 3H), 1.71 – 1.81 (m, 2H), 1.86 (td, *J* = 11.9, 6.5 Hz, 1H), 2.03 – 2.16 (m, 1H), 2.20 (dd, *J* = 10.4, 2.8 Hz, 1H), 2.23 – 2.29 (m, 1H), 2.32 (dt, *J* = 16.4, 2.8 Hz, 1H), 2.63 (dd, *J* = 16.3, 6.4 Hz, 1H), 3.50 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H), 3.61 (s, 3H), 3.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.00 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.18 (dd, *J* = 3.0, 2.1 Hz, 1H), 5.92 – 6.03 (m, 1H), 6.38 (dd, *J* = 9.7, 0.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 19.9, 20.9, 39.2, 39.4, 48.1, 49.3, 49.7, 51.8, 52.0, 52.6, 56.3, 69.9, 79.4, 106.4, 124.9, 126.8, 128.6, 140.4, 154.5, 174.9, 175.1; MS (ES⁺), *m/z* (%): 397.28 [M+Na]⁺, 413.31 [M+K]⁺; R.t. = 15.74 min.

4.3.7.3 Oxidace dimethyl diesteru **XIII** na keton **XIV**



Alkohol **XIII** (1.5 g, 4 mmol, 1.0 ekviv) byl rozpuštěn v DCM (52.5 mL) a PDC (5.5 g, 14.61 mmol) spolu s 4A molekulárními síty (1.2 g) byl přidán. Výsledná reakční směs byla míchána po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Po této době byla reakční směs zfiltrována přes Celit[®] a filtrační koláč byl promyt pomocí DCM (2x25 mL). Filtrát byl promyt pomocí 1M aq. HCl (25 mL), nasyceného roztoku NaCl (25mL), sušen nad bezvodým Na₂SO₄, zfiltrován a zahuštěn na RVO. Odparek byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; aceton/hexan = 2:3) a poskytl produkt **XIV** (154 mg, 10 %) ve formě žlutého oleje.

$\alpha_D^{24} = -42.5$ (c 1.03, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.55 – 1.65 (m, 2H), 1.68 – 1.86 (m, 2H), 1.93 – 2.08 (m, 1H), 2.16 (ddt, *J* = 14.8, 6.9, 2.9 Hz, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.49 – 2.57 (m, 1H), 2.79 (dt, *J* = 16.4, 2.9 Hz, 1H), 3.42 – 3.50 (m, 1H), 3.67 (d, *J* = 2.2 Hz, 6H), 5.06 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.20 (dd, *J* = 3.2, 2.0 Hz, 1H), 6.98 – 7.04 (m, 1H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H); MS (ES⁺), *m/z* (%): 395 [M+Na]⁺, 411 [M+K]⁺

4.4 Biologické testování připravených látek

Cytotoxicita námi vybraných látek a jejich vliv na viabilitu byly testovány na buněčných liniích prsního adenokarcinomu MCF7. Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM doplněném o 10% fetální sérum, 2 mM L-glutamin, streptomycin (100 µg/ml) a penicilin (100 IU/ml) v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C. Buněčné linie byly vysazeny do 96 jamkové desky v objemu 80 µl dle standardního protokolu. Druhého dne byly do jamek přidány testované látky v celkovém objemu 20 µl v šesti koncentracích, přičemž nejvyšší koncentrace činila 50nM. Látky byly testovány vždy v triplicátu po dobu 72 hodin. Po uplynutí doby byl do jamek přidán roztok resazurinu o objemu 10 µl. Desky byly umístěny do inkubátoru a po 3 hodinách byla měřena fluorescence na destičkovém spektrofotometru při excitační vlnové délce 544 nm a emisní vlnové délce 590 nm. Ze stanovených hodnot byla vypočítána hodnota IC₅₀.

Tato metoda stanovení životaschopnosti je založena na redukci molekul oxidovaného nefluorescenčního barviva resazurinu (Alamar blue) pouze živými buňkami na růžově fluoreskující resorufin, který po ozáření světlem určité vlnové délky emituje záření.

5 Výsledky

5.1 Syntéza klíčového intermediátu

Dle postupů uvedených v kapitole 4.3. byl připraven cílový intermediát **I**. Veškeré popsané syntetické kroky byly optimalizovány tak, aby vedly k co největším výtěžkům a čistotě získaných látek. Při vlastní práci bylo vycházeno z komerčně dostupné kyseliny giberelevé (**II**), ze které byly postupně připraveny jednotlivé syntetické intermediáty až do cílové molekuly **I** (Schéma 19). Kapitola 5.1. shrnuje dosažené výsledky, jejichž detailní diskuze bude následovat v následující kapitole (kapitola 6).

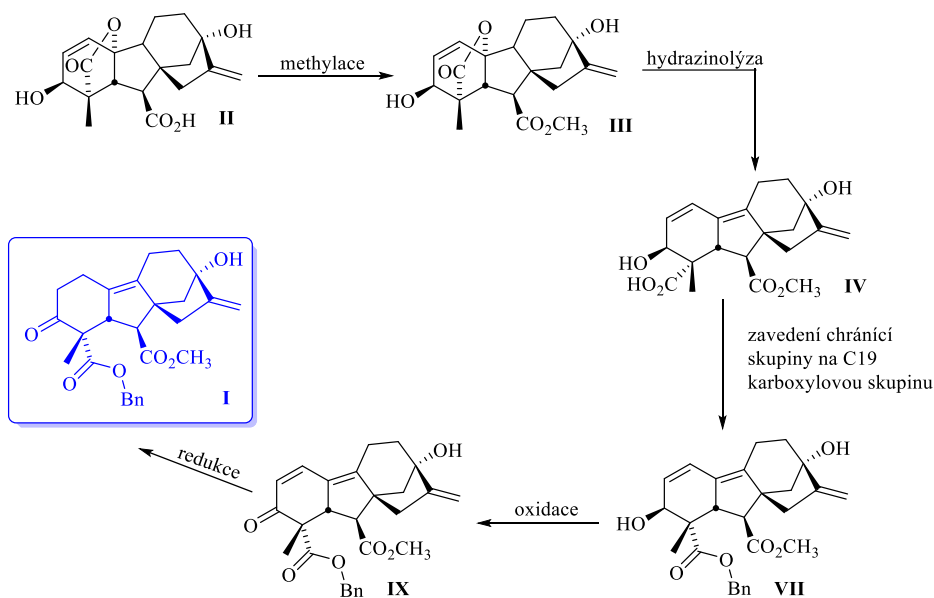
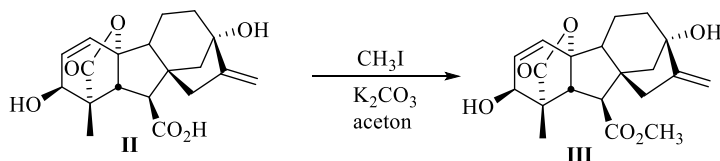


Schéma 19 - Příprava klíčového intermediátu **I**.

Prvním krokem syntézy byla příprava methylesteru kyseliny giberelevé **III** vycházející z kyseliny giberelevé **II**. Esterifikace probíhala v roztoku acetonu za přítomnosti CH_3I vystupujícího jako methylační činidlo. Methyl ester na pozici C-7 se tak stal první využitou chránicí skupinou karboxylové kyseliny. Reakce probíhala s adekvátním výtěžkem, takže nebyla podstatně optimalizována. Dle dosažených výsledků (Tabulka 1, vstupy 1 až 3) je však zřejmé, že reakce má optimální výtěžnost v úzkém rozmezí a kvantitativně probíhá při nižších navážkách. Ekvivalentem této reakce je reakce s diazomethanem v methanolu (vstup 4). Z bezpečnostních důvodů (dizaomethan je explozivní činidlo) ale tato reakce nemůže být prováděna v multigramovém množství.

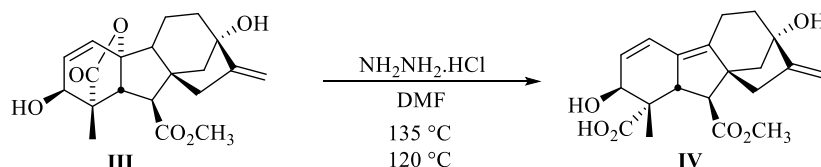
Tabulka 1 – Příprava methyl esteru kyseliny giberelové MEGA₃ (**III**).



Vstup	Reakční podmínky	Výtěžnost (%)	Navážka (g)
1	MeI, aceton (0,1M), 24 h, r.t.	80	5
2	MeI, aceton (0,1M), 24 h, r.t.	39	10
3	MeI, aceton (0,1M), 24 h, r.t.	27	50
4	CH ₂ N ₂ , MeOH (0,1M), 0 °C, 1 h	98	1

Následně byl připraven otevřený systém, látka **IV**, pomocí hydrazinolýzy methyl esteru **III** (Tabulka 2). Reakce byla prováděna nejprve v přítomnosti NH₂NH₂·H₂O (Tabulka 2, vstup 1 a 2) a následně v přítomnosti NH₂NH₂·HCl (Tabulka 2, vstupy 3 až 8). Při reakci došlo k bazicky katalyzované b-eliminaci laktonového kruhu a k tvorbě konjugovaného dienu na A a B kruhu. Původní publikované podmínky byly shledány neadekvátní (Tabulka 2, vstup 1⁵² a vstup 3⁵³) a optimalizovány.

Tabulka 2 – Optimalizace přípravy dienu **IV**.



Vstup	Reakční podmínky	Výtěžnost (%)	Izolovaná výchozí látka III (%)
1	NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O, DMF, 135 °C (1 hod.), 125 °C (3 hod)	-	36
2	NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O, DMF, 135 °C (homogen.) *, 120 °C (2 hod)	2	39
3	NH ₂ NH ₂ ·HCl, DMF, 135 °C (1 hod.), 125 °C (3 hod)	-	72
4	NH ₂ NH ₂ ·HCl, DMF, 135 °C (homogen.) *, 120 °C (2 hod)	8	63
5	NH ₂ NH ₂ ·HCl, DMF, 135 °C (homogen.) *, 120 °C (2,5 hod)	9	64
6	NH ₂ NH ₂ ·HCl, DMF, 135 °C (homogen.) *, 120 °C (4 hod)	25	65
7	NH ₂ NH ₂ ·HCl, DMF, 135 °C (homogen.) *, 120 °C (6 hod)	24	59
8	NH ₂ NH ₂ ·HCl, DMF, 135 °C (homogen.) *, 120 °C (8 hod)	26	47

*homogen = reakční čas při dané teplotě odpovídá době homogenizace (plně rozpuštění reaktantů ve směsi) reakční směsi.

Následně byla pozornost věnována výběru vhodné chránicí skupiny na karboxylu C-19, kterou by následně bylo možné selektivně ochránit v přítomnosti protekční skupiny karboxylové skupiny na

C-7. V našem hledáčku zůstala MOM skupina, která byla přidána na C-19 karboxylovou skupinu v přítomnosti DIPEA při -30 °C a dala vzniku molekule **V** ve výtěžku 18 % (Schéma 20). Jako druhá chránicí skupina byla vybrána allylová skupina. Odpovídající látka **VI** byla připravena s 45% výtěžkem. Nakonec jsme se zaměřili na benzylickou skupinu. Odpovídající produkt **VII** byl připraven z karboxylové skupiny na **IV** pomocí benzyl bromidu v přítomnosti K₂CO₃ v 55% výtěžku (Schéma 20). Následně byla volná C-3 hydroxy kyselina na C-19 ochráněných derivátech **VIII** a **IX** oxidována na odpovídající ketony **VIII** a **IX** pomocí PDC ve 3% respektive 18% výtěžku. Oxidace založená na radikálovém mechanismu pomocí TEMPO neposkytla žádný produkt. Naštěstí oxidace pomocí Dess-Martinova reagentu poskytla cílený produkt **IX** ve výtěžcích 45-55 % v závislosti na množství substrátu (45% pro 500 mg výchozího alkoholu, 55% pro 1,5g výchozího alkoholu) (Schéma 21). Je velice zajímavé, že v případě zavedení allylické a benzylické chránicích skupin docházelo k částečné hydrolyze methylové skupiny na C-7 karboxylové funkční skupině.

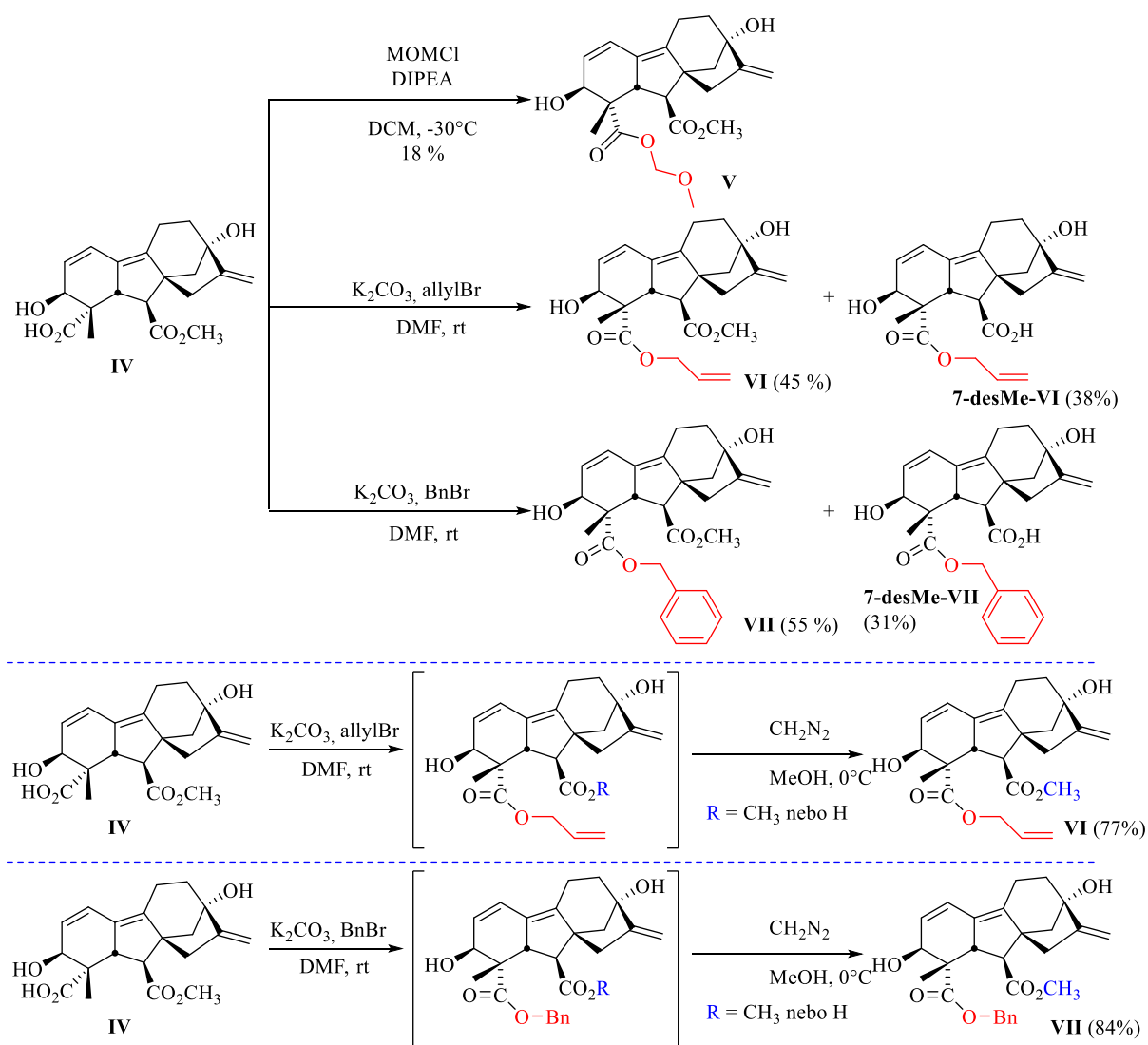


Schéma 20 – Selektivní protekce C-19 karboxylové skupiny.

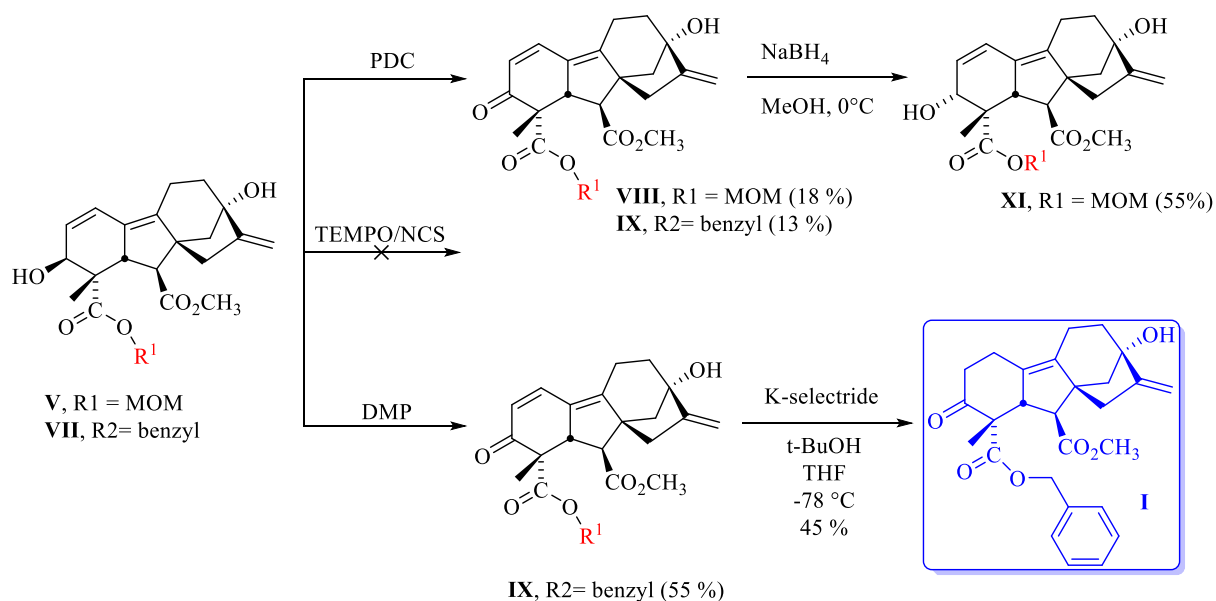


Schéma 21 – Oxidace C-3 hydroxy skupiny u diesteru **V** a **VII** na C-3 keton a následná redukce $\Delta^{1,2}$ olefinu.

Poslední krok zahrnoval selektivní redukci $\Delta^{1,2}$ -olefinu na A kruhu diesteru **IX** v přítomnosti ketonu a konjugovaného γ,δ -olefinu. Reakce byla provedena na ketonu **IX** při -78 °C v suchém THF pomocí selektivního redukčního činidla K-selectride a poskytla cílový klíčový intermediát **I** ve výtěžku 45 % (Schéma 21).

5.1.1 Neselektivní chránění karboxylových skupin

V rámci mé práce byl také sledován reakční postup, kde C-19 a C-7 karboxylové skupiny nebyly *orthogonálně* ochráněny (Schéma 22). V tomto případě pak byla GA₃ (**III**) hydrazinolizována podle literatury na dikyselinu **XII** v 80% výtěžku. Následná dimethylace pomocí CH₂N₂ poskytla dimethyl ester **XIII**, který byl následně oxidován pomocí PDC na ketone **XIV** (9% výtěžek).

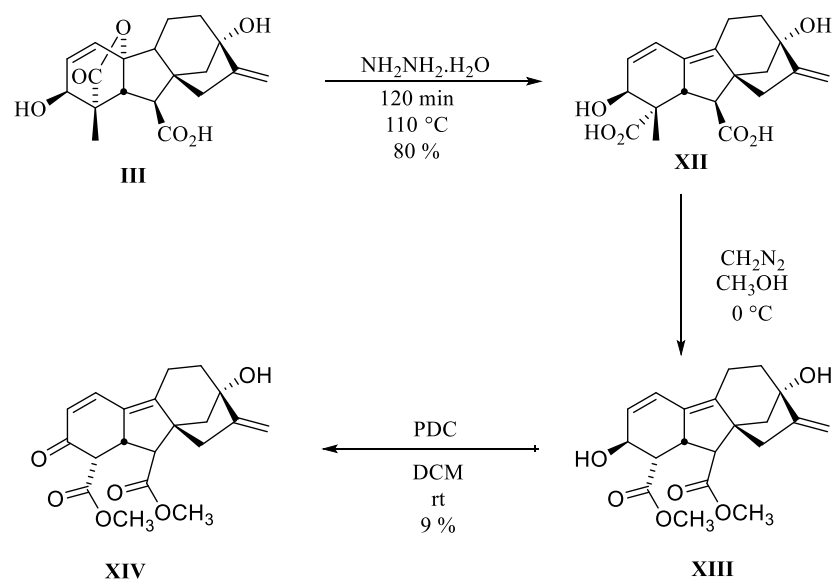
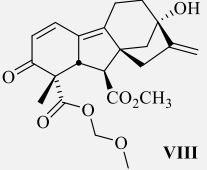
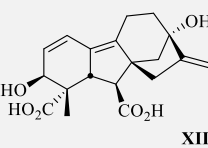
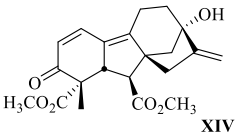
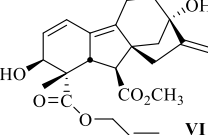
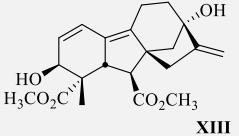
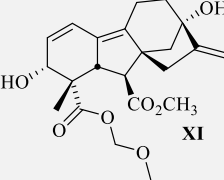
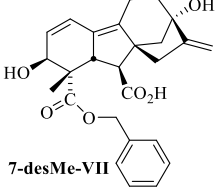
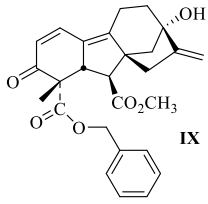
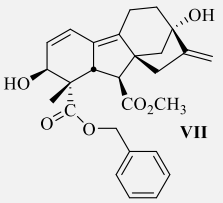
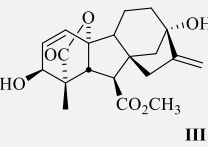


Schéma 22 - Příprava dimethyl esterů **XIII** a **XIV**.

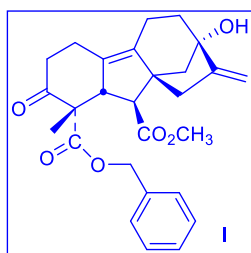
5.2 Biologické testování připravených látek

Tabulka 3 - Výsledky biologických testů na buněčné linii MCF7 (odvozeno od prsního adenokarcinomu) pro vybrané testované látky. Látky byly testovány v různých koncentracích (maximální koncentrace 50 nM) a vyhodnoceny po 72 h inkubaci.

Testovaná látka	IC ₅₀ (μM) MCF7	Zvýšení proliferace	Testovaná látka	IC ₅₀ (μM) MCF7	Zvýšení proliferace
 VIII	10,4 ± 1,6	-	 XII	>50	150 %
 XIV	6,75 ± 2,35	-	 VI	>50	-
 XIII	>50	153 %	 XI	>50	-
 7-desMe-VII	>50	153 %	 IX	>50	-
 VII	>50	150 %	 III	>50	-

6 Diskuze

Cílem bakalářské práce byla syntéza intermediátu **I**, který by napomohl k identifikaci struktury nově izolovaného giberelinu a zároveň biologické testování vybraných připravených látek vůči vybraným nádorovým liniím. Navržená syntéza Dr. Pospíšilem byla popsána v kapitole 3.4. a mým primárním záměrem byla příprava žádaného meziproduktu (**I**) s co nejvyšším výtěžkem včetně optimalizace dílčích kroků syntézy na základě konfrontace s literaturou. Z literatury je patrné (kapitola 3.1.4), že deriváty giberelinů, především ty, které ve svých strukturách obsahují α,β -nenasycené ketony, disponují zajímavými protinádorovými a protizánětlivými účinky. Na tomto základě jsme se rozhodli otestovat biologickou aktivitu všech stabilních připravených látek.



Obr. 13 - Struktura cílového intermediátu

V následujících dvou podkapitolách je shrnuta veškerá provedená laboratorní práce. Podkapitola 6.1. popisuje jak pokusy úspěšných experimentů organické syntézy, tak i těch, které prvotní domněnku nepotvrdily. Popsané pokusy jsou chronologicky seřazeny dle toho, jak bylo postupováno. Druhá podkapitola 6.2. se zabývá diskuzí výsledků biologického testování připravených molekul. V obou podkapitolách jsou sloučeniny číslovány vzestupně podle pořadí jejich přípravy římskými číslicemi pro odlišení od teoretické části.

6.1 Organická syntéza

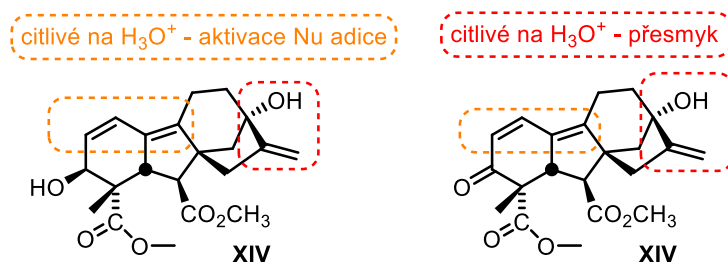
Hlavním záměrem práce byla optimalizace přípravy produktu **I**, a to konkrétně zavedení vhodných chránících skupin na karboxyl C-7 a C-19. Výběr vhodné chránicí skupiny, především u karboxylu C-19, byl stěžejním krokem celé syntézy. Chránicí skupina na C-19 se totiž musí vyznačovat stabilitou vůči následným modifikacím molekuly a musí ji být možné selektivně odstranit v přítomnosti chránicí skupiny na karboxyl C-7.

Syntéza cílové molekuly započala navázáním protekční skupiny na C-7 karboxyl v molekule GA_3 (Tabulka 1). Bylo třeba nalézt velice stabilní chránicí skupinu, která daný karboxyl dokáže chránit až do posledního kroku navržené totální syntézy neznámého giberelinu (Schéma 17 a Schéma 18). Dle literatury⁸ nejběžnější a nejrobustnější stabilní chránicí skupinou karboxylových kyselin

u giberelinů je methylová skupina. Navázání methylové skupiny na C-7 karboxyl proběhlo mechanismem nukleofilní substituční reakce mezi **II** a methyljodidem v přítomnosti K_2CO_3 jako báze. Příprava **III** patří mezi již několikrát publikované experimenty,⁵⁴ a tak protokol, ze kterého jsme vycházeli, byl již optimalizován tak, aby vedl k co největším výtěžkům. Zpozorovali jsme však, že největšího výtěžku bylo dosaženo při nižší navážce výchozí látky. Při pětigramové navážce bylo dosaženo výtěžku až 80 %, při jejím zdvojnásobení výtěžnost klesla na 39 %. Při dalších pokusech výtěžnost klesala se vzrůstající hmotností navážky. Domníváme se tedy, že reakce při daných podmínkách probíhá kvantitativně s nižší navážkou a v úzkém hmotnostním rozmezí. Alternativní použití diazomethanu bohužel není nejvhodnější z důvodu značné toxicity tohoto reagentu.

Syntéza dále pokračovala přes získaný methyl ester kyseliny giberelové **III**. Laktonový kruh molekuly **III** byl atakován hydrazinem v roztoku DMF pod inertní atmosférou. Reakce probíhala za teploty 135 °C po dobu jedné hodiny s následným snížením teploty lázně na 125 °C, ve které byla reakční směs ponechána po dobu 3 hodin. Při daných podmínkách však nedošlo ke konverzi a produktu **IV** nebylo dosaženo (Tabulka 2, vstup 1 a 3). Při tomto experimentu bylo využito dvou zdrojů hydrazinu, hydrazin monohydrát a hydrazin HCl komplex.

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole (kapitola 5), zároveň při pokusech optimalizace přípravy molekuly **IV** jsme se rozhodli aplikovat shodný přístup (hydrazinolýzu) rovnou na GA_3 (**II**). V tomto případě tedy eliminovaný produkt **XII** by obsahoval dvě karboxylové kyseliny, což by samozřejmě znemožňovalo jejich selektivní orthogonální ochránění (Schéma 22). Na druhou stranu, pakliže by hydrazinolýza byla úspěšná, pak by to znamenalo, že máme hydrazinolýzu $MEGA_3$ (**III**) optimalizovat. Hydrazinolýza GA_3 (**II**) probíhala v přítomnosti hydrazin hydrátu při 110 °C velice rychle a poskytla dikyselinu **XII** s výtěžkem 80 %.⁵³ Získaná kyselina giberelenová **XII** byla následně methylována pomocí diazomethanu v methanolu za vzniku dimethyl esteru **XIII** s výtěžkem 70 %. Připravená molekula **XIII** tedy měla obě karboxylové kyseliny chráněny stejnou protekční skupinou (methyl), což nebylo vhodné pro další syntézu, ale umožnilo nám to otestovat další syntetické kroky, oxidaci C-3 alkoholu. Hydroxylová skupina na C-3 tedy byla oxidována pomocí PCC v CH_2Cl_2 . Reakce však nebyla úspěšná a došlo pouze k degradaci výchozí látky. Předpokládali jsme, že tato situace byla způsobena příliš kyselým charakterem PCC reagentu, který mohl způsobit degradaci dienového systému (nebo následně aktivovaného systému s $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ketodienem (Obr. 14). Rozhodli jsme se tedy využít neutrálnějšího oxidačního činidla PDC, které je vhodnější pro oxidaci substrátů citlivých na kyselé prostředí. S jeho pomocí byl získán produkt **XIV** obsahující keto skupinou na C-3 a dvě methyl esterové skupiny (C-7 a C-19). Tato sekvence tedy prokázala, že jak hydrazinolýza, tak oxidace C-3 hydroxylové skupiny lze provést.



Obr. 14 – Možné H^+ -mediované degradační reakce.

S těmito výsledky jsme se vrátili opět na začátek našeho snažení, k přípravě monoester monokyseliny **IV**. Hydrazinolýza methyl esteru **III** byla tedy optimalizována zejména s ohledem na typ reagentu ($NH_2NH_2 \cdot H_2O$ vs. $NH_2NH_2 \cdot HCl$) a délky reakční doby (Tabulka 2), abychom nakonec mohli získat cílový produkt **IV** ve 25% výtěžku. Po přepočítání na re-izolovanou výchozí látku ale tento výtěžek vzrostl na 71 %. Jak se ukázalo, prodloužení reakční doby nevedlo k vyššímu výtěžku, ale snížilo množství re-izolované výchozí látky. Z praktického hlediska se ukázalo, že reakční směs musí být míchána při 135 °C až do okamžiku, kdy je všechna výchozí látka rozpuštěna (vznik čirého homogenního roztoku). Nerozpuštěná výchozí látka totiž vůbec nereaguje při hydrazinolýze a podléhá termické degradaci (snížení výtěžku, absence výchozí látky). Po homogenizaci byla směs přenesena do lázně vyhřáté na 120 °C a tam byla ponechána po dobu 4 hodin. Na základě dalších kontrolních experimentů jsme zjistili, že mít dvě lázně s různou teplotou je naprosto nezbytné. Pakliže byla lázeň pouze ponechána samovolně ochladit, došlo k degradaci jak výchozí látky, tak produktu.

Majíce rychlý a snadný přístup k látce **IV**, mohla jsem přistoupit k selektivní protekci karboxylové kyseliny na uhlíku C-19. Tato chránicí skupina musí mít takové vlastnosti, aby ji bylo možné selektivně ochránit v přítomnosti methyl esteru na uhlíku C-7. Z tohoto důvodu jsme se nejprve zaměřili na využití MOM chránicí skupiny. Tato chránicí skupina totiž již byla v literatuře na obdobném substrátu využita. Publikovaný výtěžek u této reakce byl 91 %.⁵² Navázání chránicí skupiny MOM bylo provedeno dle publikovaných podmínek za -30 °C v CH_2Cl_2 za pomoci MOMCl. Reakce sice poskytla kýžený produkt **V**, ale pouze ve 2% výtěžku. Zbytek reakční směsi tvořila nezreagovaná výchozí látka. Z tohoto důvodu bylo při dalších pokusech přistoupeno ke změně ekvivalentů MOMCl, změně reakční teploty (testovány teploty -20 °C, -10 °C, 0 °C a RT) a nakonec i ke změně rozpouštědla (mimo CH_2Cl_2 zkoušeno i $C_2H_4Cl_2$ a THF). Ani to však neposkytovalo produkt v adekvátním výtěžku. Pozorovali jsme, že reakce probíhající při teplotách nad -30 °C probíhají s úplnou konverzí výchozí látky **IV**. Ale výtěžky v žádném případě nereflektovaly tuto skutečnost. Maximální výtěžek této reakce tak byl pouze 18 %. Chloromethyl methyl ether (MOMCl) byl připraven dle standardního protokolu, kdy methoxymethyl ether byl nechán reagovat s acetylchloridem v toluenu za přítomnosti $ZnBr_2$.

MOM-chráněný produkt **V** byl pak oxidován na příslušný keton **VIII** pomocí 2 ekvivalentů PDC při laboratorní teplotě (Schéma 21). Reakce byla prováděna za různých podmínek s přidavkem/bez přidavku molekulových sít (vliv molekul vody na reakci), větším množstvím PDC (mimo 2 ekviv. byly zkoušeny také 3, 4, 5 a 10 ekvivalentů), či alternativními rozpouštědly (mimo CH₂Cl₂ byl také zkoušen CHCl₃ a dichlorethan). Ve všech případech probíhala reakce s neúplnou konverzí výchozí látky **V**. Při všech reakcích byla mimo produktu **VIII** detekována pouze výchozí látka **V**. V nejlepším případě jsme dosáhli 18% výtěžku.

V rámci tohoto projektu jsme se také rozhodli vytvořit C-3 epimer látky **V**, alkohol **XI**. Tato látka nás zajímala z pohledu jeho biologické aktivity (viz dále). Keton **VIII** tak byl reagován s NaBH₄ v MeOH při 0 °C a termodynamicky stabilnější C-3 epimer **XI** byl izolován v 55% výtěžku (Schéma 21). Redukce jako taková probíhala velice pomalu a ani pomalé přidání až 5-ti ekvivaletů NaBH₄ nezajistilo plnou konverzi výchozí látky.

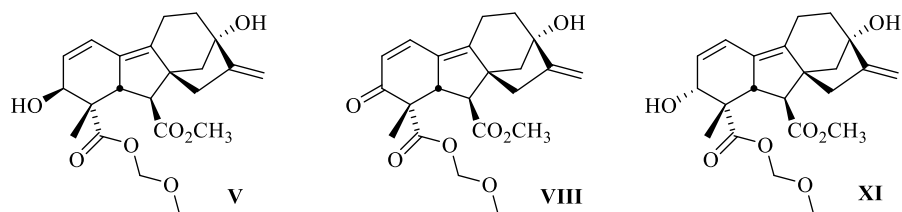


Schéma 23

Přes toto všechno byl ale cílový orthogonálně chráněný diester **V** izolován pouze ve velice nízkém výtěžku. Z tohoto důvodu jsme začali hledat jiné chránící skupiny. Náš zájem tak padl na allylovou a benzylovou chránící skupinu, které mohou být odstraněny v přítomnosti methyl esteru pomocí Lewisových kyselin nebo tranzitních kovů (typicky paládium). Nejprve jsme se zaměřili na allylickou chránící skupinu. Již první reakční podmínky nám umožnily připravit cílený produkt **VI** reakcí monokyseliny **IV** s allyl bromidem v přítomnosti K₂CO₃ (Schéma 20). Bohužel spolu s cílovým produktem **VI** (45 %) jsme izolovali i překvapivý produkt methyl ester hydrolyzy **7-desMe-VI** v 38% výtěžku. Tato překvapivá reakce, hydrolyza C-7 esteru, ale nijak nesnižovala potenciál reakce, protože následná reakce surové reakční směsi po zavedení allylické chránící skupiny na uhlík C-19 s diazomethanem v MeOH poskytla cílovou látku **IV** v 77 % (přes dva kroky). Obdobně byla následně připravena benzylem ochráněná C-19 karboxylová kyselina, látka **VII** (55% výtěžek). I v tomto případě došlo ke vzniku demethylovaného produktu **7-desMe-VII**, tentokrát ale v nižším 31% výtěžku. I v tomto případě nám reakce diazomethanu se surovou reakční směsí umožnila vznik cíleného produktu **VII** jako jediného produktu v 84% výtěžku.

Protože benzylem ochráněný produkt **VII** vznikl v o trochu vyšším výtěžku, a protože takto ochráněná látka byla lépe detekovatelná pomocí UV/VIS detektorů (LC-MS, TLC), rozhodli jsme se dále pokračovat v naší syntéze s látkou **VII** (Schéma 21). Látka **VII** tak byla podrobena oxidační

reakci v přítomnosti 2 ekvivalentů PDC s využitím CH_2Cl_2 jako rozpouštědla. Po 20 hodinách reakční směs stále obsahovala velké množství výchozí látky, které po přidání dalšího nadbytku PDC reagovalo pouze velice pomalu. Výtěžek reakce byl opravdu velice nízký (~4 %). Navíc v průběhu reakce docházelo k pozvolné degradaci výchozí látky **VII** a/nebo produktu **IX**. V průběhu reakce byl pozorován vzniklý dehtovitý zbytek, který se pravděpodobně připojil k produktu a tím značně snížil výtěžnost. Následně jsem podrobila látku **VII** oxidaci pomocí TEMPO-reagentu.⁵⁵ Tato reakce je prováděna ve dvoufázovém systému DCM/uhličitanový pufr ($\text{pH} = 8,6$) v přítomnosti *N*-chlorsukcinimidu (NCS) jako stechiometrického oxidantu reaktivního katalyzátoru, tetrabutylamonium chloridu (TBAC) jako katalyzátoru fázového přenosu a TEMPO jako oxidantu. Po 24 hodinách byla izolována směs produktů, v které však nebyl detekován kýžený produkt. Rozhodli jsme se tedy provést reakci pomocí Dess–Martinova reagentu (DMP).⁵⁶ Výchozí látka **VII** tak byla reagována s DMP při teplotě 0 °C v CH_2Cl_2 . Reakce proběhla s úplnou konverzí a výsledný keton **IX** byl izolován ve výtěžku 55 %. V průběhu reakce jsme pozorovali (TLC) několik nežádoucích vedlejších reakcí o kterých jsme se domnívali, že jsou způsobené kyselinou octovou, která je v malém množství přítomna v DMP reagentu. Proto byla vyzkoušena oxidace pomocí DMP, která byla prováděna v přítomnosti 4 ekvivalentů NaHCO_3 přidanych za účelem neutralizace přítomné kyseliny octové. Reakce měla značně pomalejší průběh než v původním případě a pozorované vedlejší reakce byly potlačeny. Avšak cílový produkt byl izolován pouze ve 45% výtěžku.

Posledním krokem syntézy vedoucí k přípravě prvního klíčového produktu **I** pak byla selektivní redukce α,β -olefinu na kruhu A u látky **IX**. Jako selektivního redukčního činidla bylo využito K-selektridu. Tento redukční činidlo bylo reagováno s látkou **IX** v přítomnosti *t*-BuOH v THF při -78 °C dle publikovaného protokolu⁵⁷ a cílový intermediát **I** byl připraven ve výtěžku 45 %. Získáním této molekuly byla syntéza završena.

6.2 Biologické testování

Vybrané látky jsme testovali na buněčných liniích prsního adenokarcinomu MCF7. Ze všech testovaných látek pouze látky **VIII** a **XIV** vykazovaly cytotoxickou aktivitu. Inhibiční koncentrace (IC_{50}) pro intermediát **VIII** činila $10,4 \pm 1,6$ nM, pro **XIV** pak $6,75 \pm 2,35$ nM. Struktura obou látek se liší od všech ostatních přítomností ketonové skupiny v pozici C-3. Předpokládáme tedy, že tento vysoce reaktivní Michaelův akceptor stojí za pozorovanou protinádorovou aktivitou.²³ Je velice zajímavé, že molekula **IX**, která se od **VIII** a **XIV** liší pouze přítomností benzylové skupiny na esteru C-19 (oproti MOM (**VIII**) a Me (**XIV**) skupině), nevykazovala žádnou aktivitu vůči buňkám MCF7.

Další zajímavostí, kterou jsme pozorovali, bylo zvýšení proliferace (růstu buněk) u látek **VII**, **7-desMe-VII**, **XII** a **XIII**, a to až o 153 %. Zdá se, že hlavním společným rysem u těchto látek je přítomnost C-3 hydroxy skupiny a $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -nenasyceného systému. V tomto okamžiku se domníváme, že tyto molekuly se asi váží do estrogenových receptorů a tímto podporují proliferaci testovaných buněk.

7 Závěr

V rámci předložené bakalářské práce byla započata totální syntéza nového giberelinu nedávno izolovaného v laboratoři prof. Heddena v Rotsham Research center. Teoretická část byla především věnována chemii kyseliny gibberelové. Zaměřila jsem se na strukturní modifikace této molekuly a reaktivitu jednotlivých kruhů skeletu. Během experimentální části se nám podařilo připravit klíčový intermediát **I**, který je nezbytný pro naplánovanou totální syntézu. Celkově jde o 6-ti krokovou syntézu a cílová látka je připravena v globálním výtěžku 14%. Přípravy jednotlivých intermediátů až po naší cílovou molekulu jsme optimalizovali tak, aby vedly k co nejvyšším výtěžkům, stabilitě produktů a reprodukovatelnosti reakcí.

Vybrané molekuly byly biologicky testovány. Hlavní důraz byl primárně kladen na jejich protinádorovou aktivitu. Avšak za cytotoxické látky byly označeny pouze dva deriváty, u dalších čtyřech jsme naopak zaznamenali vliv na zvýšení proliferace buněk. Do budoucna se tak při testování zaměříme zejména na tyto dva strukturní typy produktů.

V naplánované syntéze, zároveň s biologickým testováním, bych ráda pokračovala v rámci navazujícího magisterského studia.

8 Literatura

1. Davies, P. J.; Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, **1987**.
2. Stowe, B. B.; Yamaki, T. „Gibberellins: Stimulants of Plant Growth“ *Science* **1959**, *129*, 807–816.
3. Brückner, B.; Blechschmidt, D. „The Gibberellin Fermentation“ *Crit. Rev. Biotechnol.* **1991**, *11*(2), 163–192.
4. Camara, M. C.; Vandenberghe, L. P. S.; Rodrigues, C. et al. „Current advances in gibberellic acid (GA₃) production, patented technologies and potential applications“ *Planta* **2018**, *248*, 1049.
5. Tian, H.; Xu, Y.; Liu, S.; Jin, D.; Zhang, J.; Duan, L.; Tan, W. „Synthesis of Gibberellic Acid Derivatives and Their Effects on Plant Growth“ *Molecules* **2017**, *22*, 694.
6. Singh, D. P.; Jermakow, A. M.; Swain, S. M. „Gibberellins Are Required for Seed Development and Pollen Tube Growth in Arabidopsis“ *Plant Cell* **2002**, *14*, 3133–3147.
7. Brian, P. W. „Effects of Gibberellins on Plant Growth and Development“ *Biol. Rev.* **1959**, *34*(1), 37–77.
8. Mander, L. „Twenty years of gibberellin research“ *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 50
9. Brückner, B.; Blechschmidt, D. „The Gibberellin Fermentation“ *Crit. Rev. Biotechnol.* **1991**, *11*(2), 163–192.
10. Hedden, P.; Sponsel, V. „A Century of Gibberellin Research“ *J. Plant Growth Regul.* **2015**, *34*, 741–745.
11. Verbiscar, A. J.; Cragg, G.; Geissman, T. A.; Phinney, B. O. „Studies on the biosynthesis of gibberellins—II“ *Phytochemistry* **1969**, *6*, 807–814.
12. Hanson, J. R.; White, A. F. „The Oxidative Modification of the Kauranoid Ring B during Gibberellin Biosynthesis“ *J. Chem. Soc.* **1969**, *0*, 410–411.
13. Grove, J. F.; Mulholland, T. P. C. „Gibberellic Acid. Part XII. The Stereochemistry of Allogibberic acid“ *J. Chem. Soc.* **1960**, *0*, 3007–3022.
14. MacMillan, J. „Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi, and Bacteria“ *J. Plant growth Regul.* **2001**, *20*(4), 387–442.
15. MacMillan, J.; Takahashi, N. „Proposed Procedure for the Allocation of Trivial Names to the Gibberellins“ *Nature* **1968**, *217*, 170–171.
16. Cross, B. E.; Grove, J. F.; Morrison, A. „Gibberellic acid. XVIII. Some Rearrangements of Ring A“ *J. Chem. Soc.* **1961**, *0*, 2498.
17. Cross, B. E.; Galt, R. H. B.; Hanson, J. R. „The Biosynthesis of the Gibberellins. Part I. (—)-Kaurene as a Precursor of Gibberellic Acid“ *J. Chem. Soc.* **1964**, *0*, 295–300.

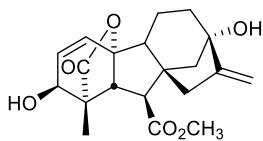
18. Podlešáková, K.; Tarkowská, D.; Pěňčík, A.; Oklešťková, J.; Turečková, V.; Floková, K.; Tarkowski, P. „Nové trendy v analýze fytohormonů“ *Chem. Listy* **2015**, *106*, 373–379.
19. Mander, L. N. „The Chemistry of Gibberellins: An Overview“ *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 573.
20. Yamaguchi, S. „Gibberellin Metabolism and its Regulation“ *Ann. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 225–251.
21. Hashimoto, T.; Rappaport, L. „Variations in Endogenous Gibberellins in Developing Bean Seeds I. Occurrence of Neutral and Acidic Substances“ *Plant Physiol.* **1966**, *41*, 623–628
22. de Oliveira, B. H.; Stiirmer, J. C.; de Souza Filho, J. D.; Ayub, R. A. „Plant growth regulation activity of steviol and derivatives“ *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1528–1533.
23. Murase, K.; Hirano, Y.; Sun, T. P.; Hakoshima, T. „Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1“ *Nature* **2008**, *456*, 459–463.
24. Yamaguchi, S. „Gibberellin Metabolism and its Regulation“ *Ann. Rev. Plant. Biol.* **2008**, *59*, 225–251.
25. Chen, J.; Sun, Z.; Zhang, Y.; Zeng, X.; Qing, C.; Liu, J.; Li, L.; Zhang, H. „Synthesis of gibberellin derivatives with anti-tumor bioactivities“ *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5496–5499.
26. Zhang, Y.; Zhang, H.; Chen, J.; Zhao, H.; Zeng, X.; Zhang, H.; Qing, C. „Antitumor and antiangiogenic effects of GA-13315, a gibberellin derivative“ *Invest. New. Drugs* **2012**, *30(1)*, 8–16.
27. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Gibberellic Acid, CASRN: 77-06-5. Last revised 8-30-2006 <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>
28. Corey, E. J.; Danheiser, R. L.; Chandrasekaran, S.; Siret, P.; Keck, G. E.; Gras, J. L. „Stereospecific Total Synthesis of Gibberellic Acid. A Key Tricyclic Intermediate“ *J. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 8031–8034.
29. Corey, E. J.; Munroe, J. E. „Total Synthesis of Gibberellic Acid. A Simple Synthesis of a Key Intermediate“ *J. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6129–6130.
30. Hook, J. M.; Mander, L. N.; Urech, R. „Total Synthesis of Gibberellic Acid. The Hydrofluorene Route“ *J. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6628–6629.
31. Maria, C.; Machado, M.; Soccol C.R.; Gibberellic Acid Production. In: Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (eds) *Current Developments in Solid-state Fermentation*. Springer, New York, **2008**.
32. Holbrook, A.; Edge, W.; Bailey, F. „Spectrophotometric Method for Determination of Gibberellic Acid“ *Adv. Chem. Ser.* **1961**, *28*, 159–167.
33. Rios-Irube, E.; Hernández-Calderón, O.; Escamilla-Silva, E. „Kinetic analysis of the uptake of glucose and corn oil used as carbon sources in batch cultures of *Gibberella fujikuroi*“ *World J. Mikrob. Biot.* **2016**, *32*, 182.

34. Hao, Y. H.; Zhang, Z.; Wang, L.; Liu, C.; Lei, A.W.; Yuan, B.F.; Feng, Y.Q. „Stable isotope labeling assisted liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for quantitative analysis of endogenous gibberellins“ *Talanta* **2015**, *144*, 341–348.
35. Urbanová, T.; Tarkowská, D.; Novák, O.; Hedden, P.; Strnad, M. „Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spektrometry“ *Talanta* **2013**, *112*, 85–94.
36. Murillo Pulgarín, J. A.; García Bermejo, L. F.; Becedas Rodríguez, S. „Direct Determination of Gibberellic Acid in Tomato and Fruit by Using Photochemically Induced Fluorescence“ *J. Agr. Food. Chem.* **2013**, *61*, 9769–9775.
37. Ellames, G.; Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Thomas, S. A. „The Molecular and Crystal Structures of Gibberellin A₄ and Gibberellin A₁₃ Methyl Esters“ *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1979**, *0*, 1922–1926.
38. Duri, Z. J.; Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B. „The Stereochemistry of Reduction of the 1- and 16-Carbonyl Group in the Normal and 8,13-Isogibberellins“ *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1984**, *0*, 1099–1103.
39. Jones, D. F.; Mccloskey, P. „Selective reduction of gibberellic acid“ *J. App. Chem.* **2007**, *13*, 324–328.
40. Murofushi, N.; Sugimoto, M.; Itoh, K.; Takahashi, N. „Three Novel Gibberellins Produced by *Gibberella fujikuroi*“ *Agr. Biol. Chem. Tokyo* **1979**, *43*, 2179–2185.
41. Hanson, J. R. „The Chemistry of the Gibberellins“ *Natl. Prod. Rep.* **1990**, *7*, 41–59.
42. Pryce, R. J. „Decomposition of aqueous solutions of gibberellic acid on autoclaving“ *Phytochemistry* **1973**, *12*, 507–514.
43. Cross, B. E. „Gibberellic Acid. Part XIII. The Structure of Ring A“ *J. Chem. Soc.* **1960**, *606*, 3022.
44. Stork, G.; Singh, J. „An Unusually Simple Construction of Ring A of Gibberellic acid“ *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7109–7110.
45. Moffatt, J. S.; Radley, M.; „Gibberellic acid. XI.—The Growth-Promoting Activities of Some Functional Derivatives of Gibberellic Acid“ *J. Sci. Food Agr.* **1960**, *11*, 386–390.
46. Adam, G.; Lischewski, M.; Sych, F.J.; Ulrich, A. „Gibberelline—XLVI“ *Tetrahedron Lett.* **1977**, *33*, 95–100.
47. Lischewski, M.; Adam, G. „Partialsynthese von 6-epi-gibberellin-A₃“ *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1627–1628.
48. Bourn, P. M.; Grove, J. F.; Mulholland, T. P. C.; Tidd, B. K.; Klyne, W. „Gibberellic Acid. Part XXI. The Stereochemistry of Rings B, C, and D“ *J. Chem. Soc.* **1963**, *0*, 154.
49. Furber, M.; Kraftklaunzer, P.; Mander, L.; Pour, M.; Yamauchi, T.; Murofushi, N.; Yamane, H.; Schraudolf, H. „Synthesis and Structure Determination of Gibberellin-Derived

- Antheridiogens From Fern Gametophytes of the *Lygodium* Genus“ *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 427–444.
50. Brian, P. W.; Radley, M. E.; John, P. „Gibberellic acid compounds, and preparation and use thereof“ *Imperial Chemical Industries Ltd* **1955**, *518*, 5.
 51. Phuoc, L. T.; Mander, L. N., Koshioka, M.; Oyama-Okubo, N., Nakayama, M.; Ito, A. „Confirmation of structure and synthesis of three new 11 β -OH C₂₀ gibberellins from loquat fruit“ *Tetrahedron* **2008**, *64*(21), 4835–4851.
 52. Furber, M.; Mander, L. N. „Conversion of Gibberellin A7 into Antheridic Acid, the Antheridium Inducing Factor from the Fern *Anemia phyllitidis*: A New Protocol for Controlled 1,2-Bond Shifts“ *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*(21), 6389–6396.
 53. Grove, J. F.; MacMillan, J.; Mulholland, T. P. C.; Turner, W. B. „Gibberellic acid. Part XVII. The stereochemistry of gibberic and epigibberic acid“ *J. Org. Chem.* **1960**, *0*, 3049.
 54. Bon, D. J. Y. D.; Mander, L. N.; Lan, P. „Syntheses of Gibberellins A15 and A24, the Key Metabolites in Gibberellin Biosynthesis“ *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 6566–6572.
 55. Einhorn, J.; Einhorn, C.; Ratajczak, F.; Pierre, J. L. „Efficient and Highly Selective Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes by N-Chlorosuccinimide Mediated by Oxoammonium Salts“ *J. Org. Chem.* **1996**, *61*(21), 7452–7454.
 56. Meyer, S. D.; Schreiber, S. L. „Acceleration of the Dess-Martin Oxidation by Water“ *J. Org. Chem.* **1994**, *59*(24), 7549–7552.
 57. Fortunato, J. M.; Ganem, B. „Lithium and Potassium Trialkyl borohydrides. Reagents for Direct Reduction of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds to Synthetically Versatile Enolate Anions“ *J. Org. Chem.* **1976**, *41*(12), 2194–2200.

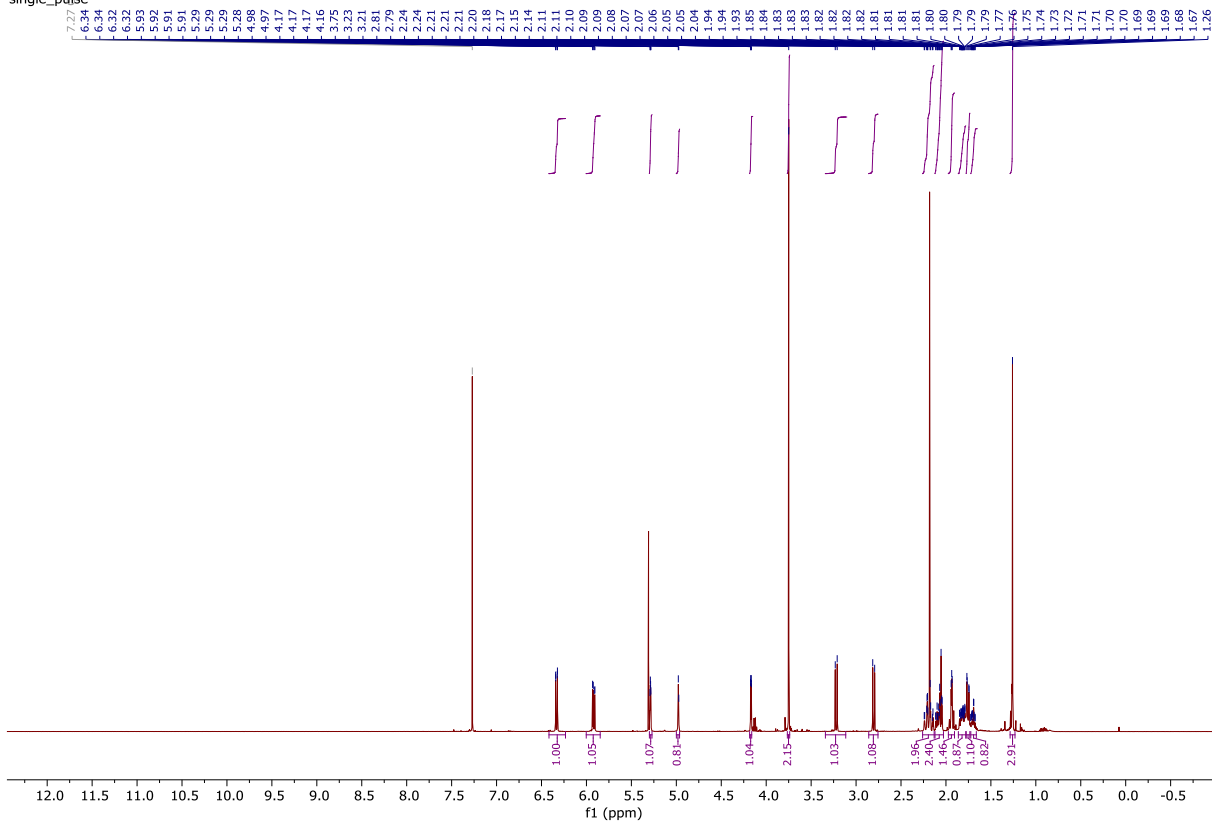
9 Příloha č. 1: Kopie spekter připravených produktů

Methyl (1S,2S,4aR,7S,9aS,10S,10aR)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-13-oxo 1,2,4b,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-4a,1-(epoxymethano)-7,9a-methanobenzo[a]azulene-10-carboxylate (**III**)

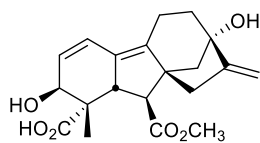


MW: 360.4	B. t.	189-189.5 °C
	R.t.	14.06 min.
	α_D^{26}	56.5°
	MS (ES⁺), m/z (%)	378.30 [M+H] ⁺ , 399.17 [M+K] ⁺

FAM-01-004-01
single_pulse

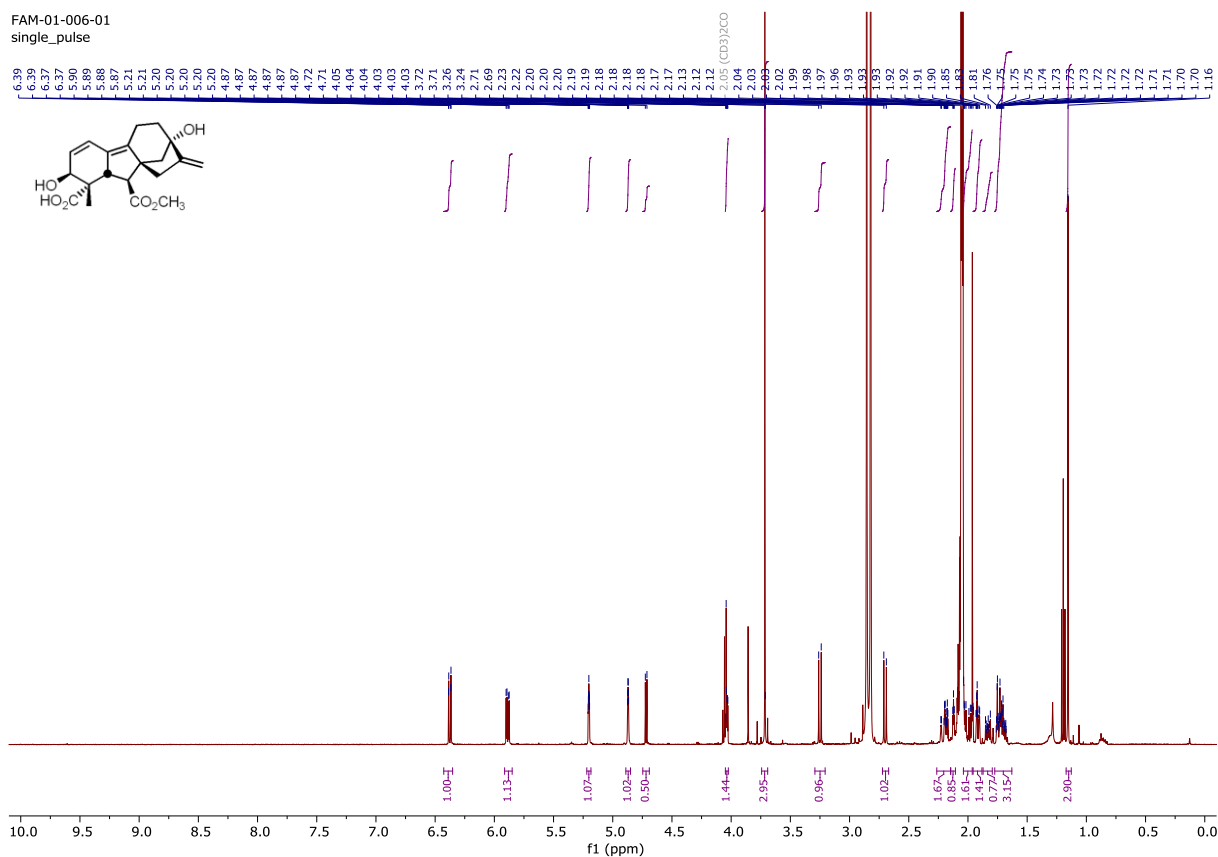


(1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-10-(methoxycarbonyl)-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1-carboxylic acid (**IV**)

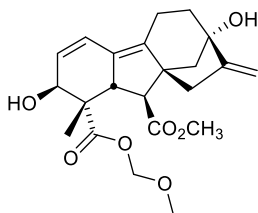


MW: 360.4	B. t.	127-128 °C
	R.t.	13.5 min
	α_D^{26}	-52,4 (c 1.51, CH ₃ OH)
	MS (ES⁺), m/z (%)	361 [M+H] ⁺

FAM-01-006-01
single_pulse

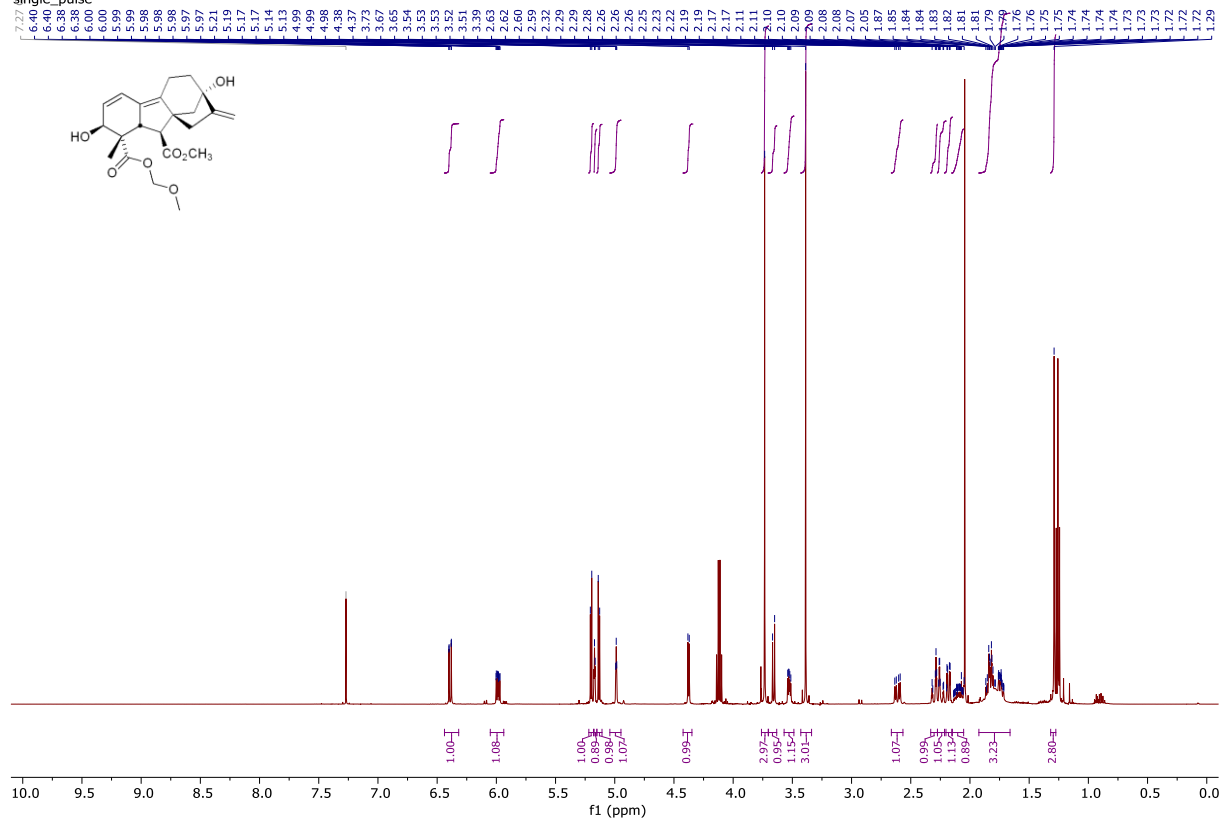


1-(methoxymethyl) 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-
2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate (V)



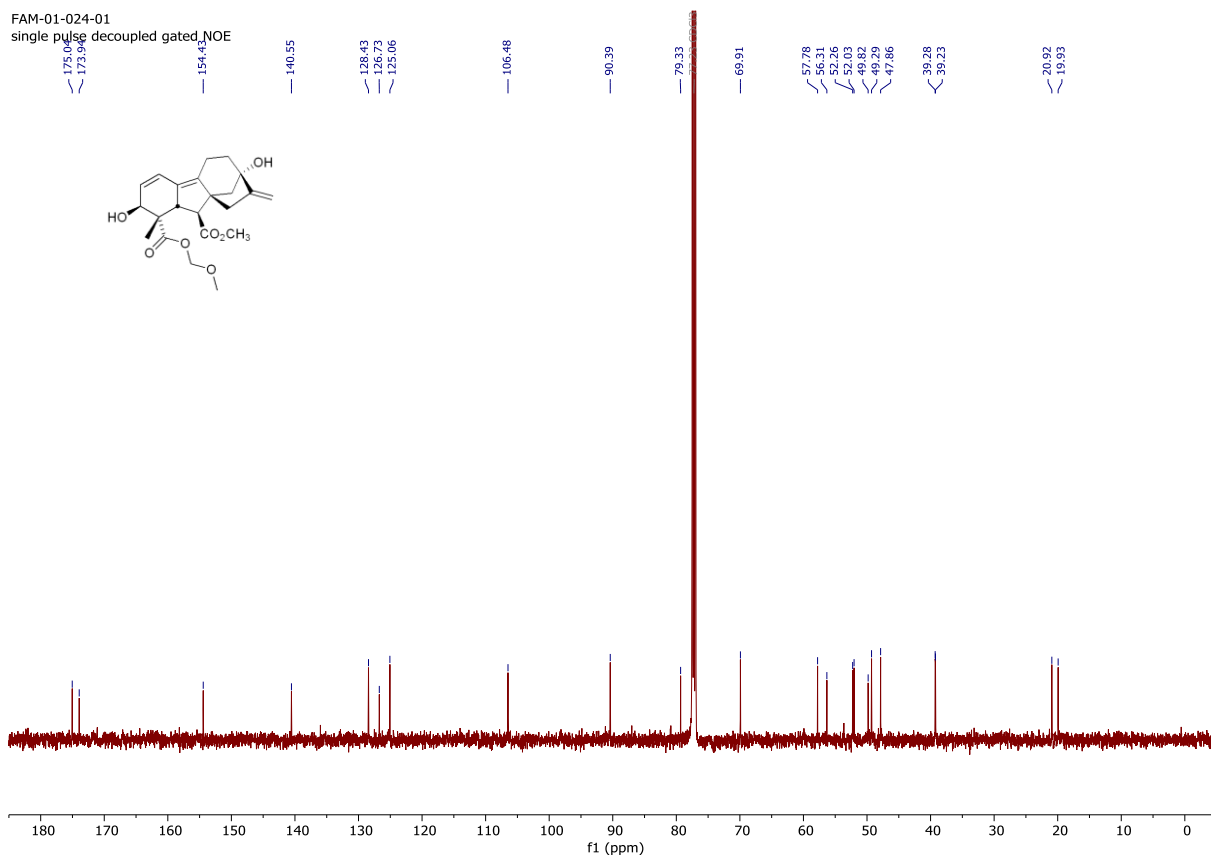
MW: 404.46	B. t.	132– 133 °C
	R.t.	16.76 min
	α_D^{22}	– 82.7° (c 1.32; CH ₃ OH)
	MS (ES⁺), m/z (%)	405.36 [M+H] ⁺

FAM-01-024-01
single_pulse

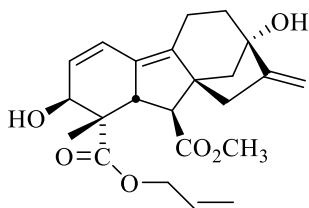


FAM-01-024-01

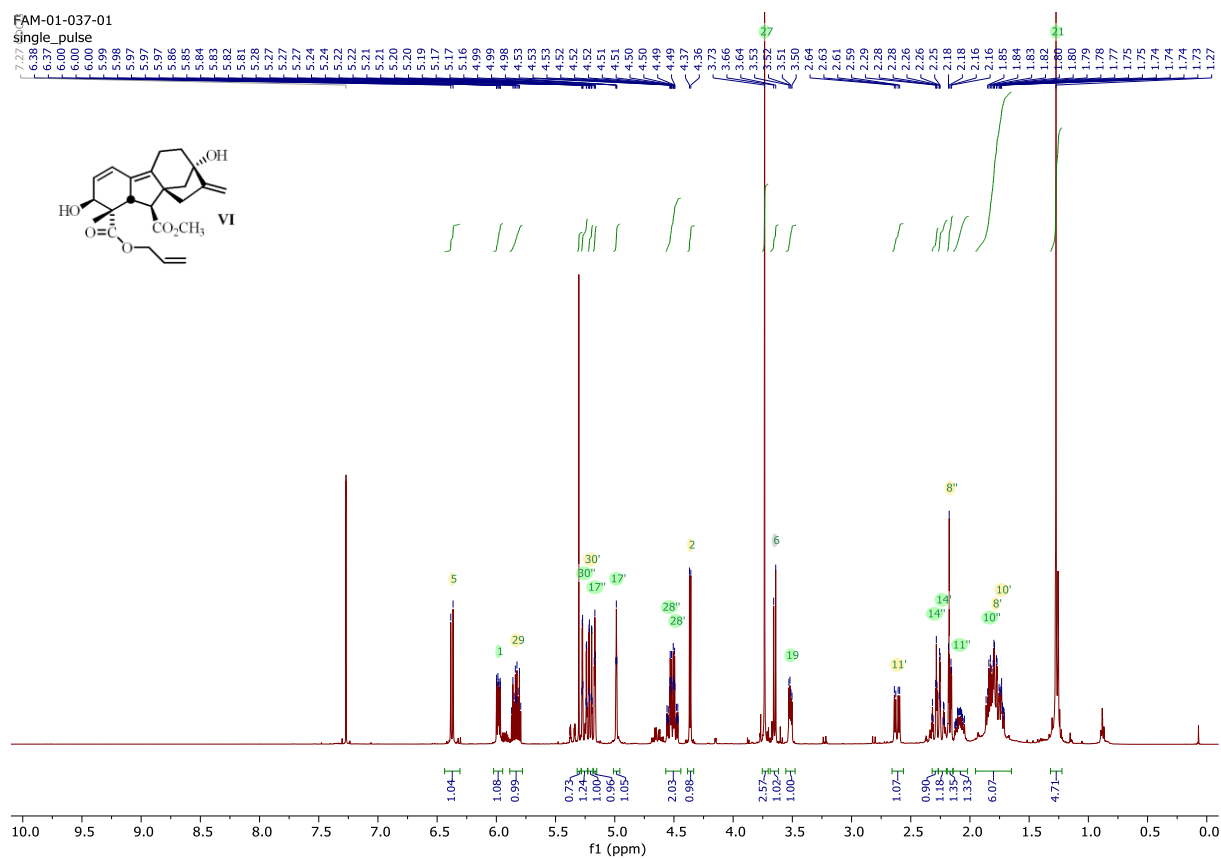
single pulse decoupled gated NOE



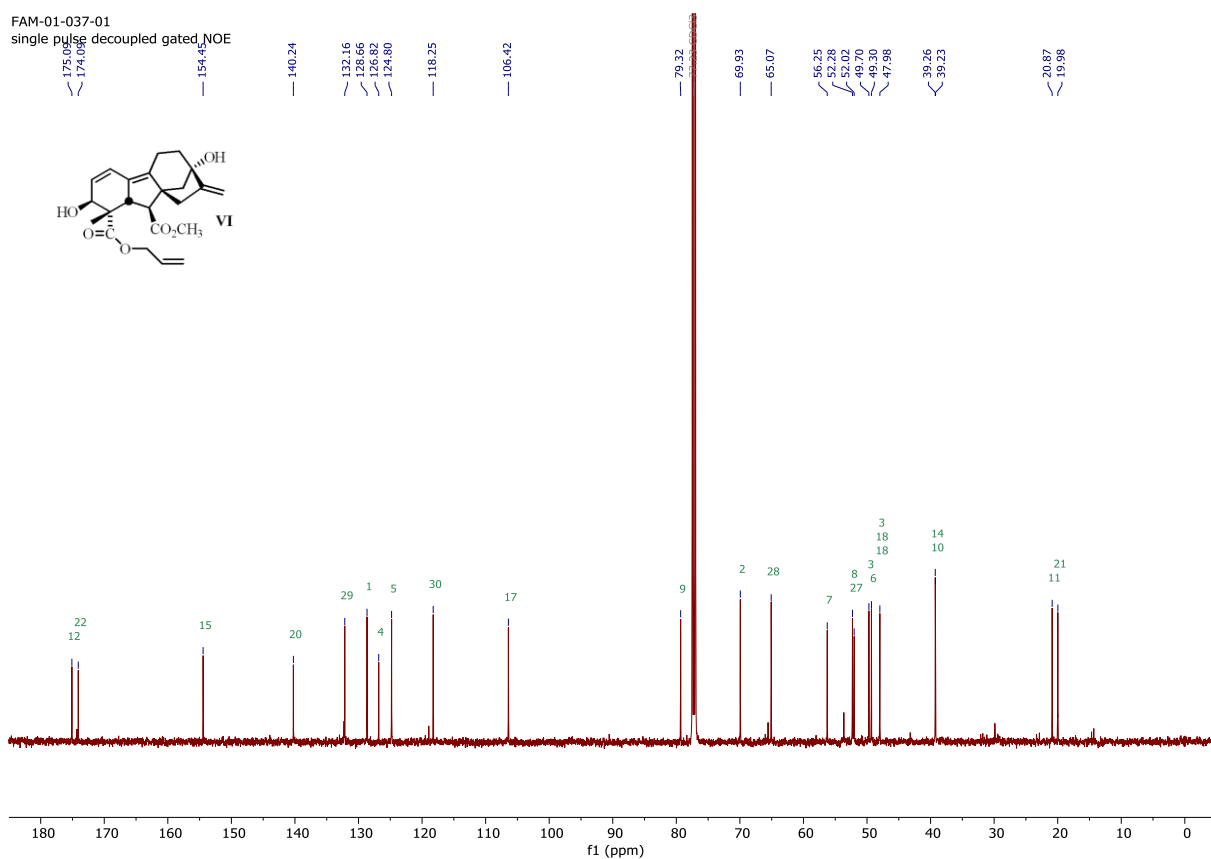
1-allyl 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate (**VI**)

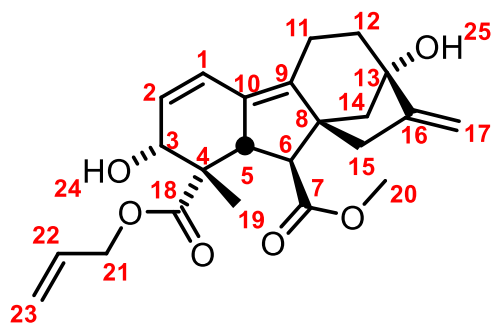


MW: 400.47	B. t.	130 – 130,5 °C
	R.t.	-
	α_D^{25}	17° (c 1.09, CH ₃ OH)
	MS (ES⁺), m/z (%)	401 [M+H] ⁺ , 440 [M+K] ⁺



Chemical structure of compound VI is shown. It is a complex polycyclic molecule featuring a hydroxyl group (HO), a methoxycarbonyl group (CO₂CH₃), and an allyl ester group (O-C(=O)-CH₂-CH=CH₂). The structure is labeled VI.

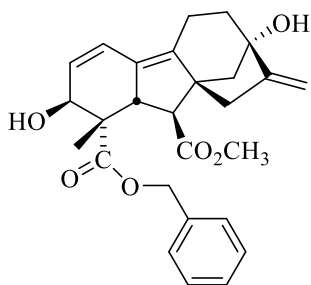




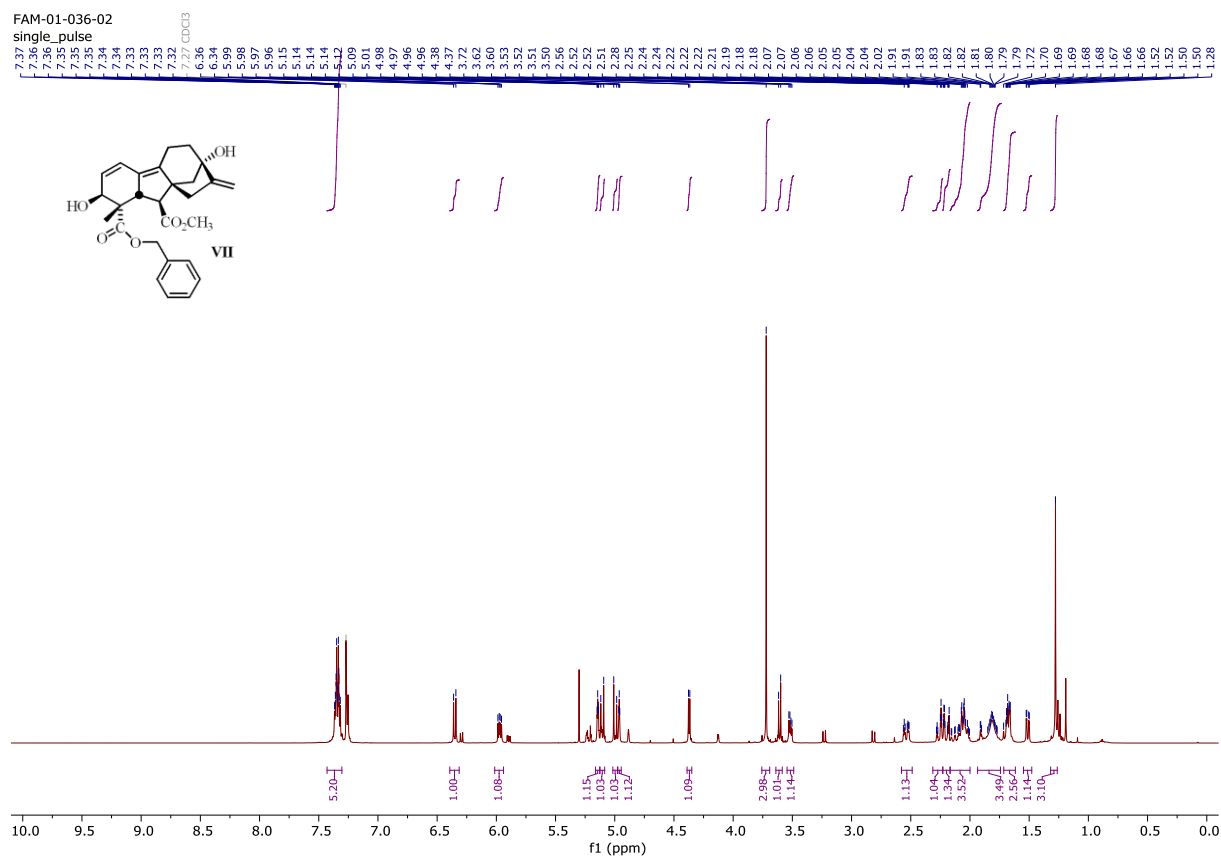
Atom	¹ H NMR	Intensity	(500 MHz, CDCl ₃) [ppm]	¹³ C NMR	APT experiment ^[1]	(126 MHz, CDCl ₃) [ppm]
1	H-1	1	6.38 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz)	C-1	*	124.8
2	H-2	1	5.98 (dd, <i>J</i> = 9.6, 5.5 Hz)	C-2	*	128.7
3	H-3	1	4.36 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz)	C-3	*	69.9
4	-	-	-	C-4	X	49.7
5	H-5	1	3.52 (dd, <i>J</i> = 8.4, 4.3 Hz)	C-5	*	48.0
6	H-6	1	3.52 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz)	C-6	*	49.3
7	-	-	-	C-7	X	175.1
8	-	-	-	C-8	X	56.3
9	-	-	-	C-9	X	140.2
10	-	-	-	C-10	X	126.8
11	H-11a	1	2.09 (dddd, <i>J</i> = 16.6, 12.5, 7.7, 4.9 Hz)	C-11	**	20.9
	H-11b	1	2.62 (dd, <i>J</i> = 16.2, 6.2 Hz)			
12	H-12a	1	1.73 (ddd, <i>J</i> = 10.4, 7.6, 2.6 Hz)	C-12	**	39.2
	H-12b	1	1.83 (dq, <i>J</i> = 11.9, 6.4 Hz)			
13	-	-	-	C-13	X	79.3
14	H-14a	1	1.78 (dd, <i>J</i> = 10.5, 2.3 Hz)	C-14	**	52.3
	H-14b	1	2.17 (dd, <i>J</i> = 10.2, 2.7 Hz)			
15	H-15a	1	2.24 (dq, <i>J</i> = 16.6, 2.2 Hz)	C-15	**	39.3
	H-15b	1	2.30 (dt, <i>J</i> = 16.5, 2.8 Hz)			
16	-	-	-	C-16	X	154.5
17	H-17a	1	4.99 (t, <i>J</i> = 2.2 Hz)	C-17	**	106.4
	H-17b	1	5.17 (t, <i>J</i> = 2.6 Hz)			
18	-	-	-	C-18	X	174.1
19	H-19	3	1.27 (s)	C-19	***	19.9
20	H-20	3	3.73 (s)	C-20	***	52.0
21	H-21a	1	4.49 (ddt, <i>J</i> = 13.4, 5.5, 1.4 Hz)	C-21	**	65.1
	H-21b	1	4.54 (ddt, <i>J</i> = 13.5, 5.4, 1.5 Hz)			
22	H-22	1	5.83 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.7, 5.5 Hz)	C-22	*	133.2
23	H-23a	1	5.21 (dq, <i>J</i> = 10.4, 1.3 Hz)	C-23	**	118.3
	H-23b	1	5.26 (dq, <i>J</i> = 17.3, 1.7 Hz)			
24/25	H-24/H-25	2	<i>not observed</i>	-		

^[1] X = carbon bearing no hydrogen atom; * = carbon atom with one hydrogen atom (CH); ** = CH₂; *** = CH₃

1-benzyl 10-methyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate (**VII**)

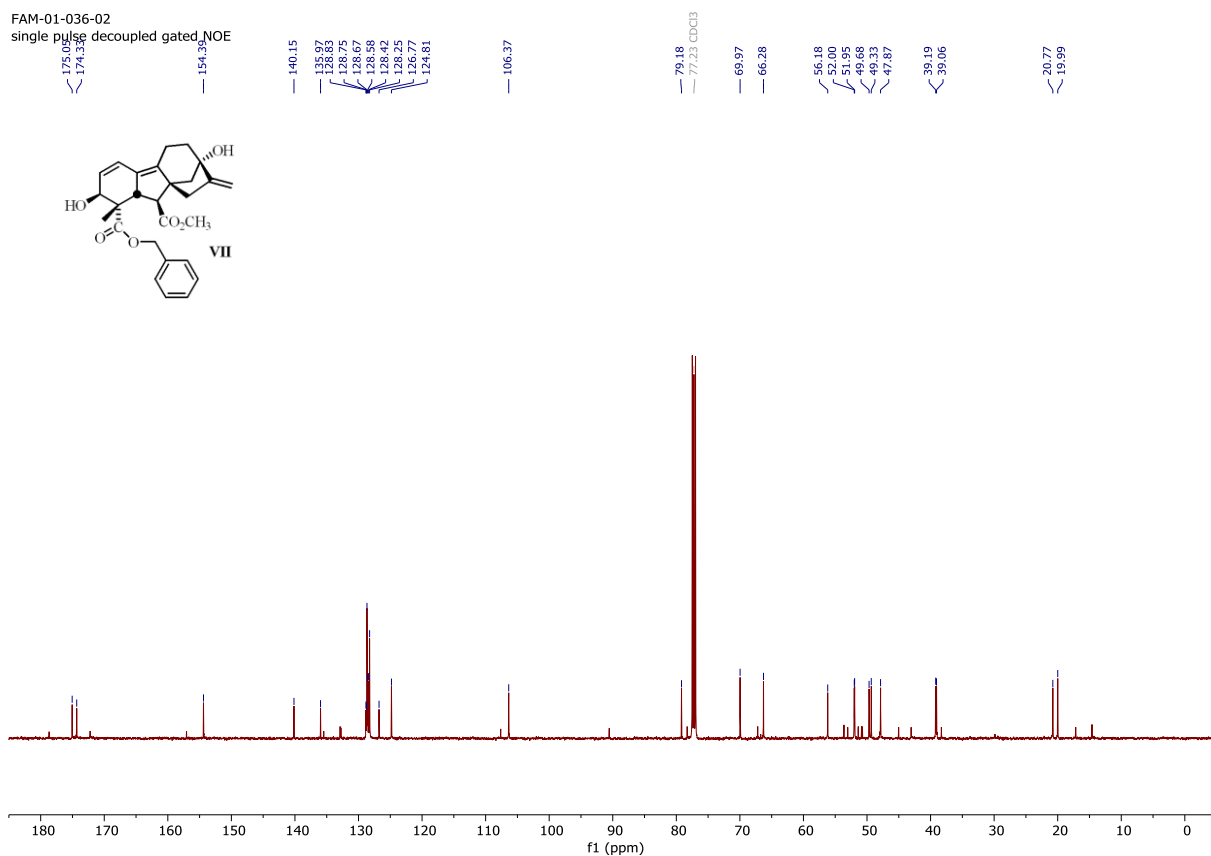
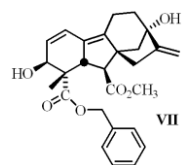


MW: 450.53	B. t.	Olej
	R.t.	20.59 min.
	α_D^{22}	- 26.5° (c 1.69, CH ₃ OH)
	MS (ES⁺), m/z (%)	473.29 [M+Na] ⁺ , 489.18 [M+K]

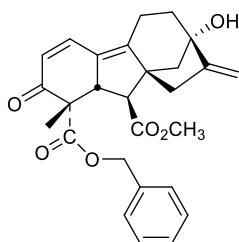


FAM-01-036-02

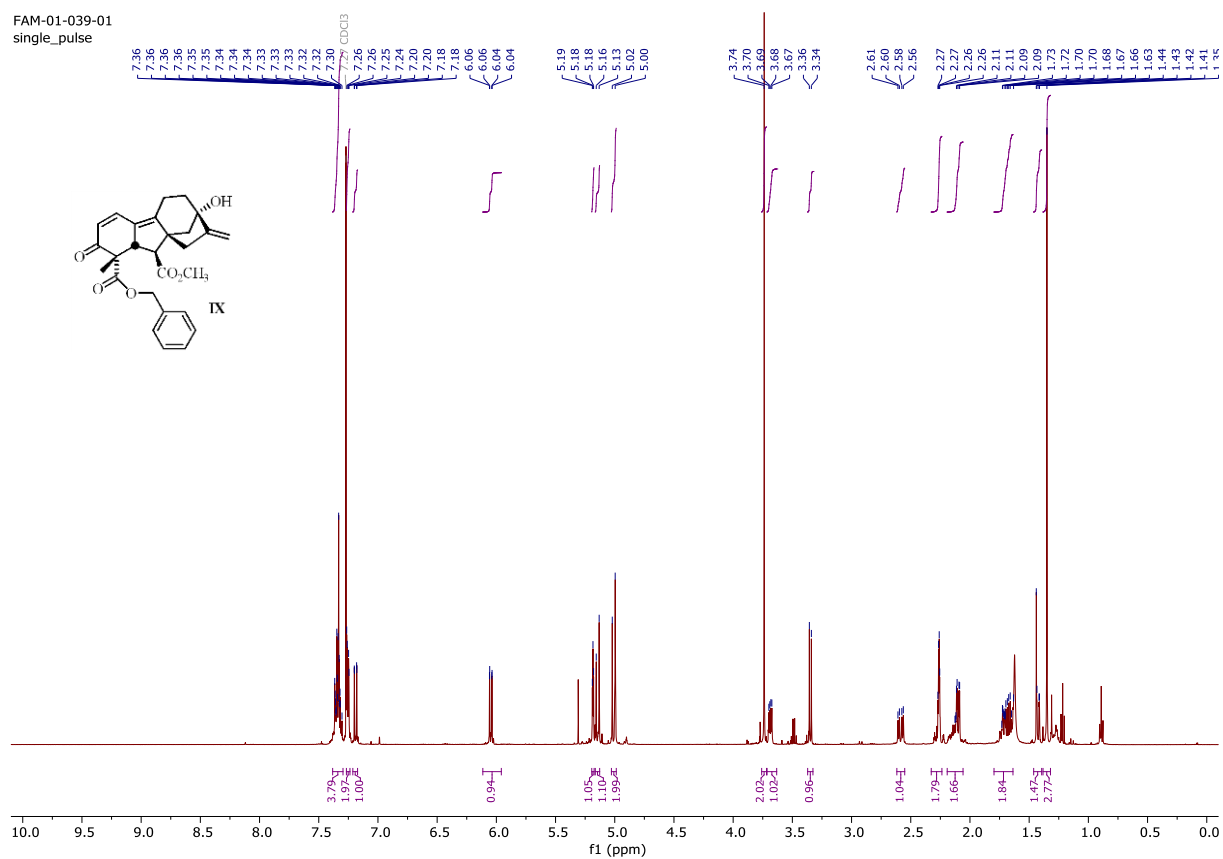
single pulse decoupled gated NOE



1-benzyl 10-methyl (1S,7S,9aR,10S,10aS)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylene-2-oxo-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate (**IX**)

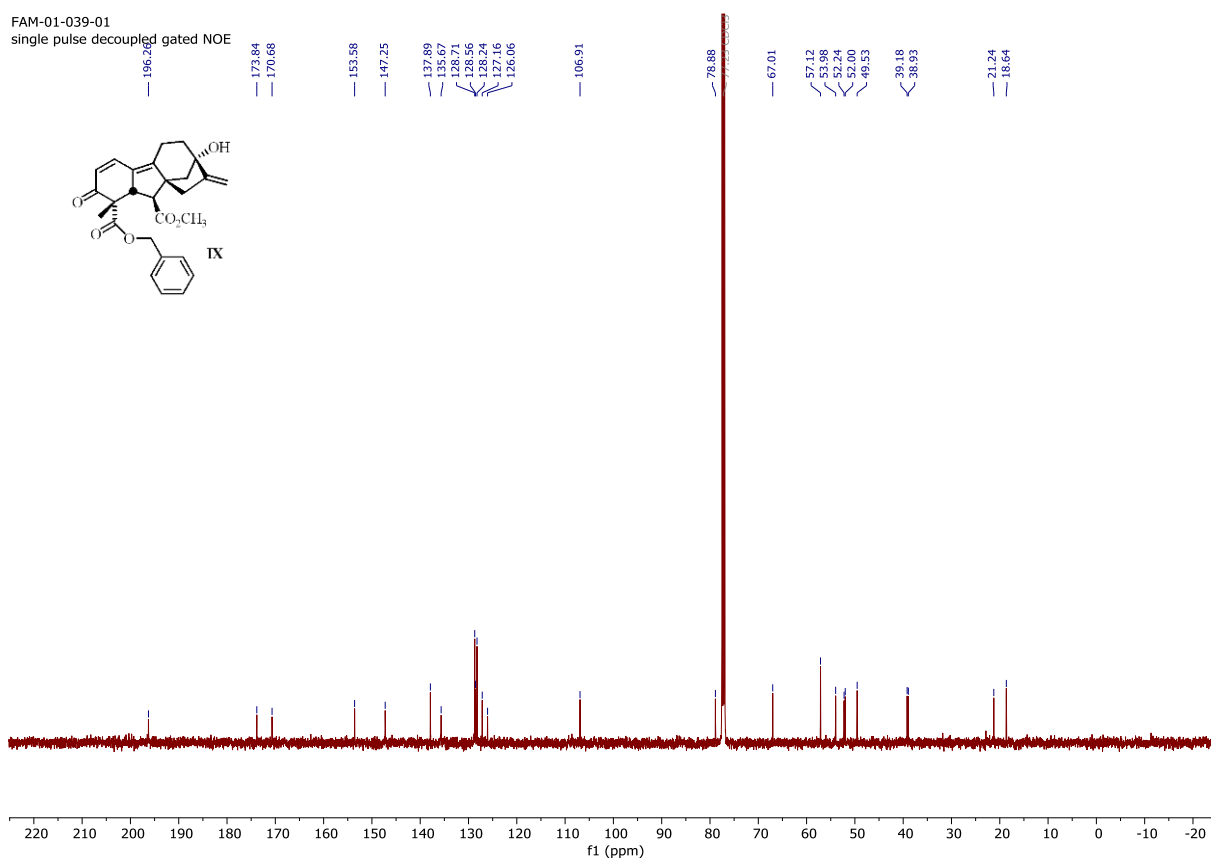


MW: 402.44	B. t.	127 – 128 °C
	R.t.	22.8 min
	α_D^{23}	– 95.6° (c 1.69, CH ₃ OH)
MS (ES⁺), m/z (%)		MS (ES⁺), m/z (%): 449.32 [M+H]⁺

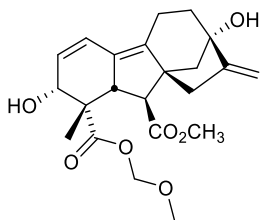


FAM-01-039-01

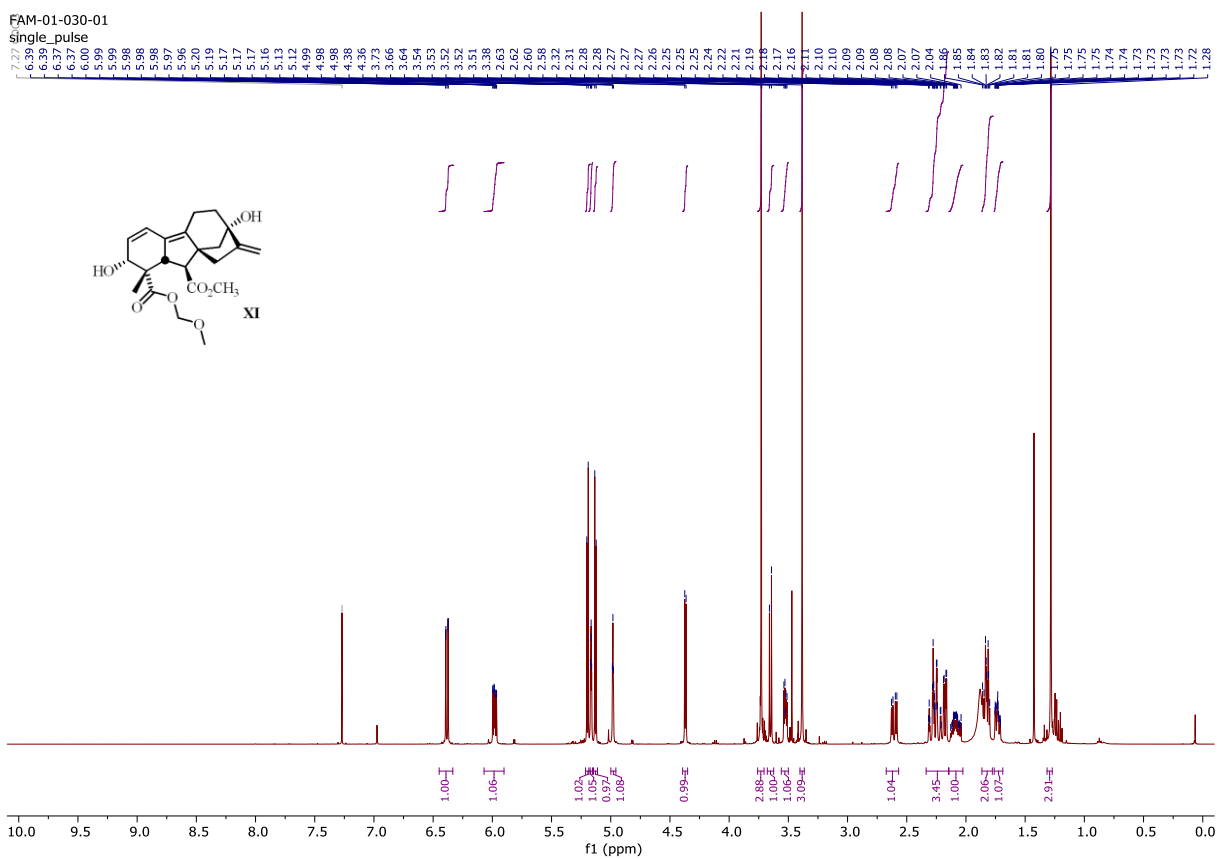
single pulse decoupled gated NOE



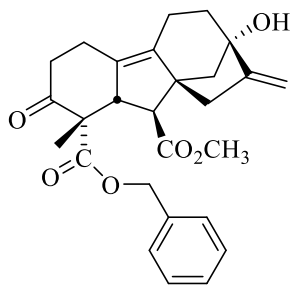
1-(methoxymethyl) 10-methyl (1S,2R,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate (**IX**)



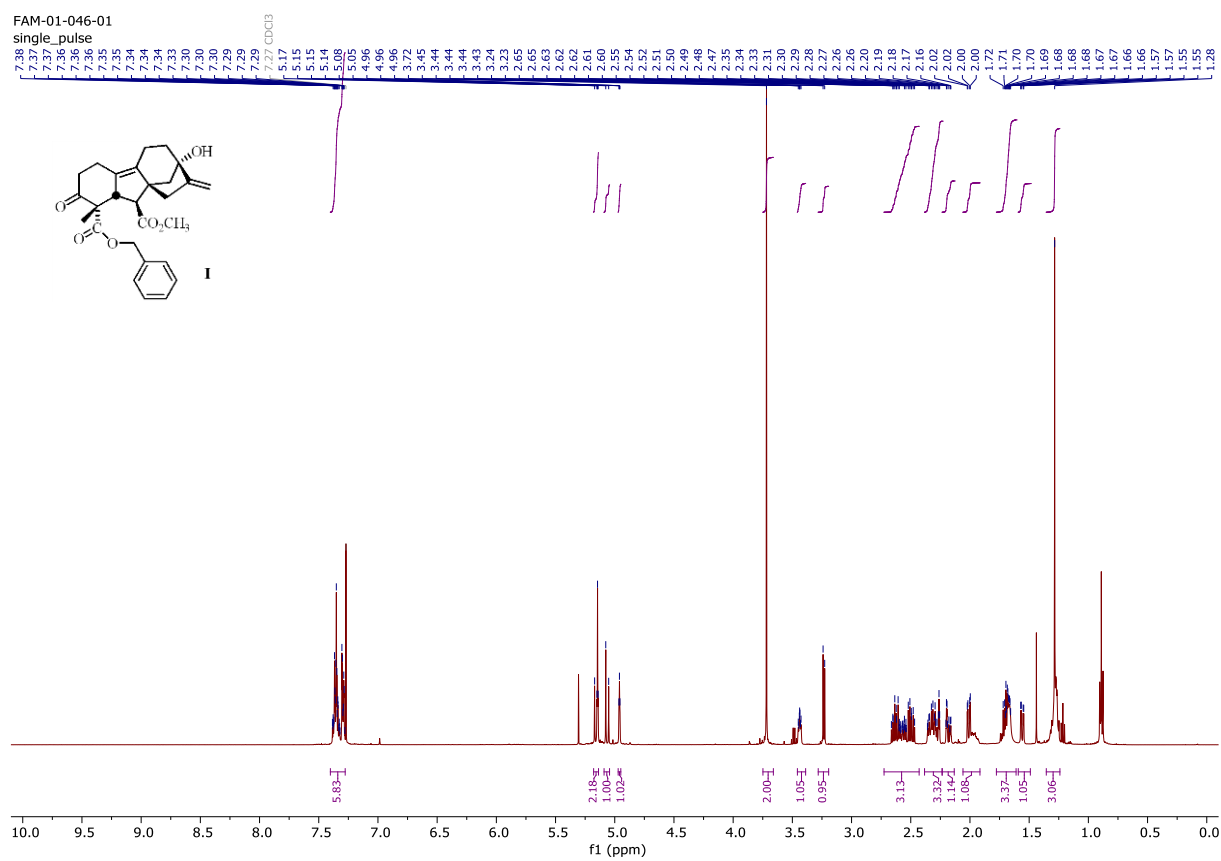
MW: 402.44	B. t.	128 – 128.5 °C
	R.t.	R.t. = 15.77 min
	α_D^{23}	– 95.6° (c 1.69, CH ₃ OH)
	MS (ES⁺), m/z (%)	405.29 [M+H] ⁺ , 443.26 [M+K] ⁺



1-benzyl 10-methyl (1S,7S,9aR,10S,10aS)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylene-2-oxo-2,3,4,5,6,7,8,9,10,10a-decahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate (**I**)

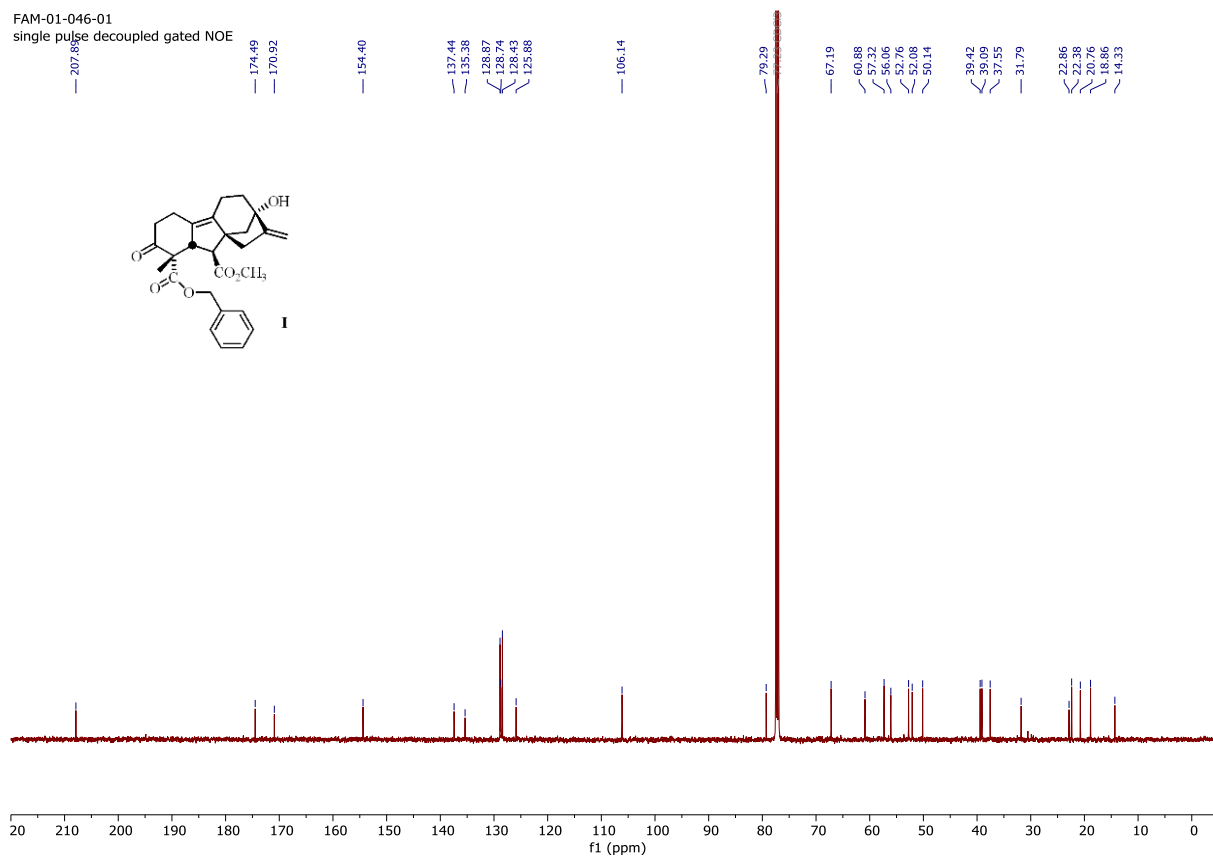


MW: 402.44	B. t.	Olej
	R.t.	-
	α_D^{23}	- 102.7° (c 1.00, CH ₃ OH)
	MS (ES⁺), m/z (%)	452 [M+H] ⁺ , 490 [M+K] ⁺

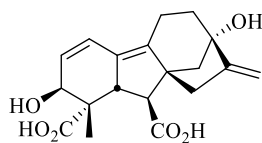


FAM-01-046-01

single pulse decoupled gated NOE

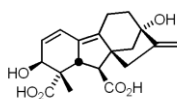


(1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylic acid (**XII**)

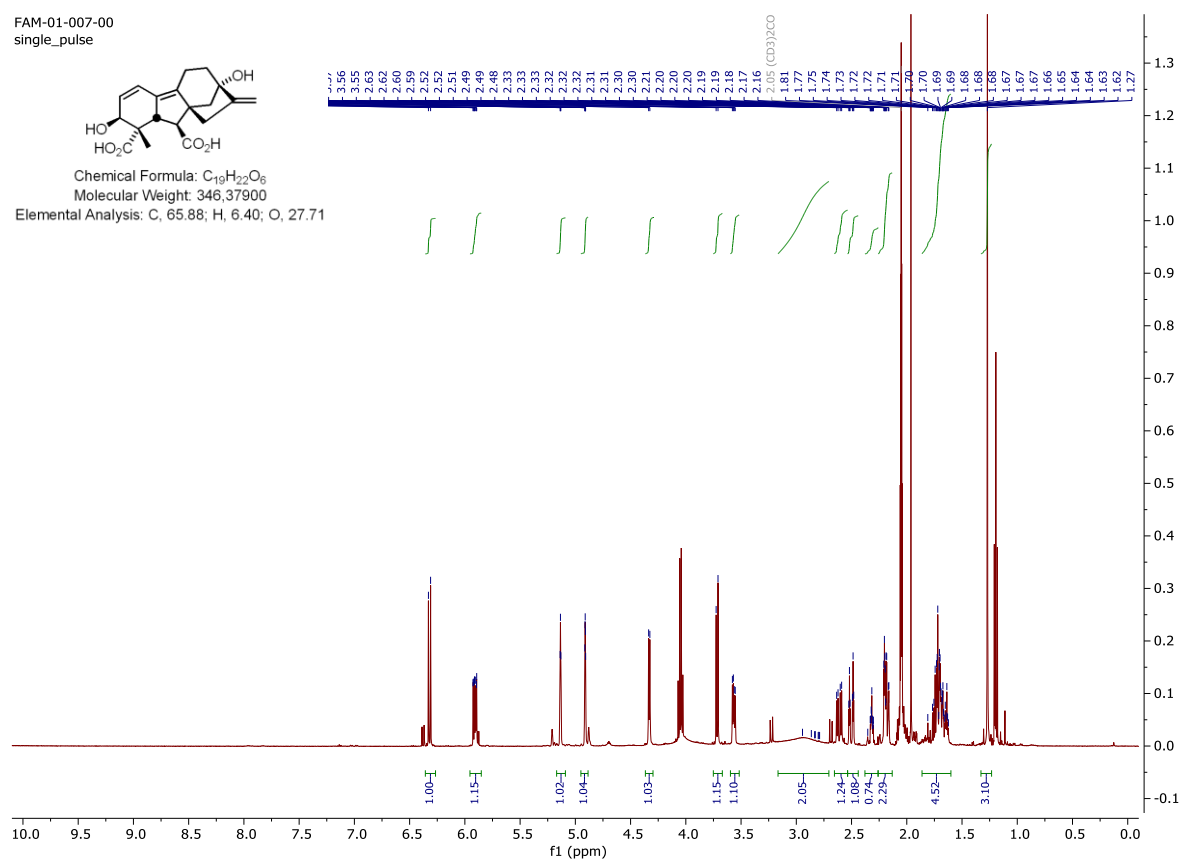


MW: 346.38	B.t.	Žlutá kapalina
	R.t.	-
	α_D^{23}	- 28.2 (c 1.63, aceton)
	MS (ES⁺), m/z (%)	347 [M+H] ⁺ , 386 [M+K] ⁺

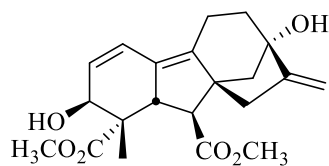
FAM-01-007-00
single_pulse



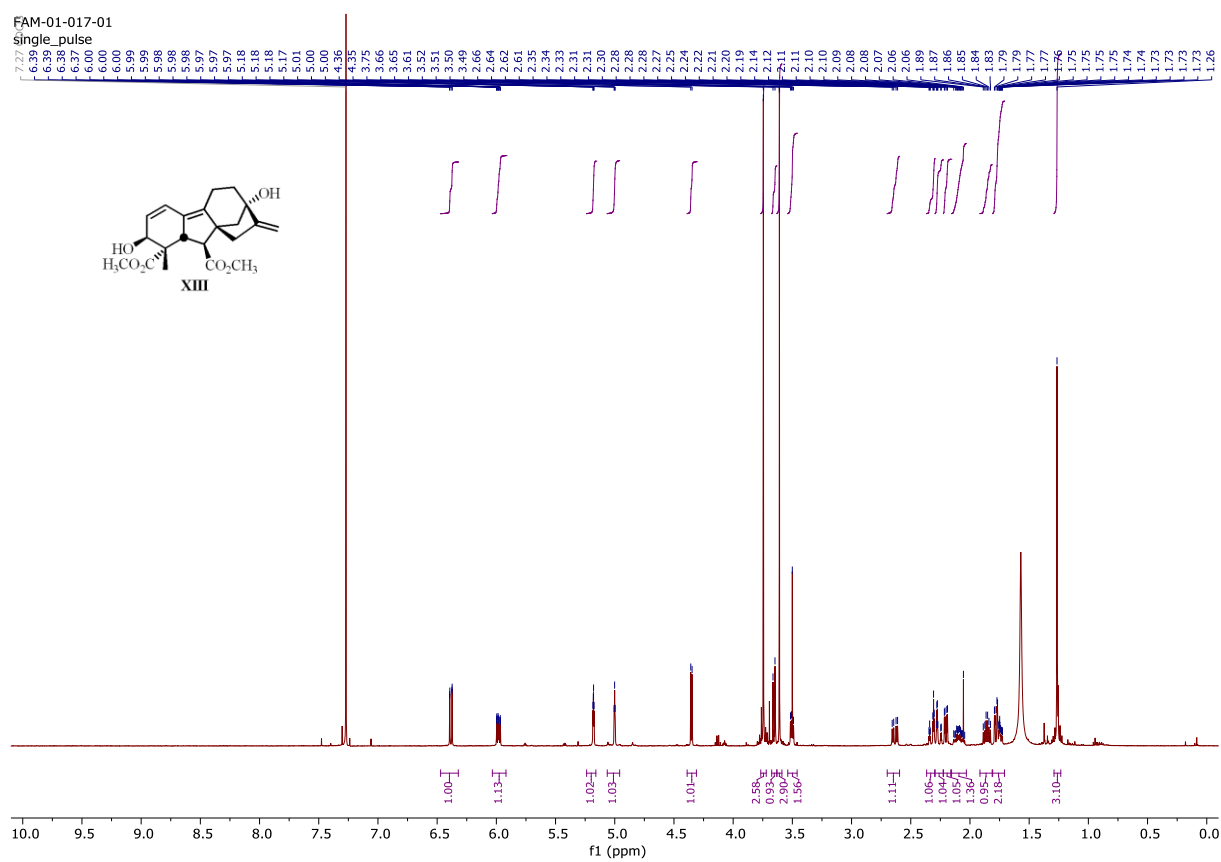
Chemical Formula: C₁₉H₂₂O₆
Molecular Weight: 346,37900
Elemental Analysis: C, 65.88; H, 6.40; O, 27.71



dimethyl (1S,2S,7S,9aR,10S,10aS)-2,7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate (**XIII**)

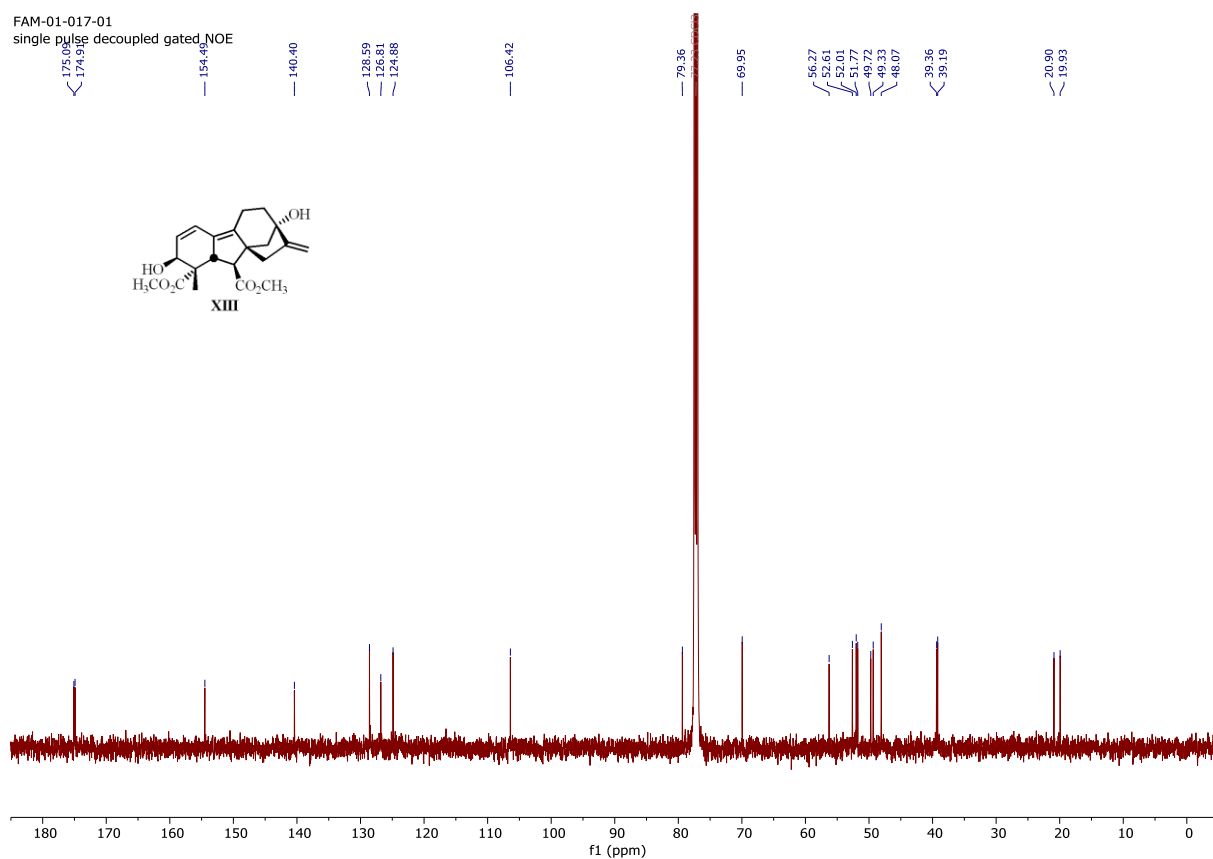


MW: 374.43	B. t.	64 – 65 °C
	R.t.	15.74 min.
	α_D^{23}	– 54.7 (c 1.48, CH ₃ OH)
	MS (ES⁺), m/z (%)	397.28 [M+Na] ⁺ , 413.31 [M+K] ⁺

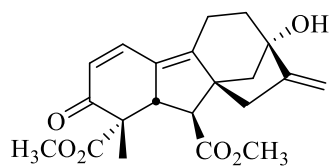


FAM-01-017-01

single pulse decoupled gated NOE



dimethyl (1S,7S,9aR,10S,10aS)-7-hydroxy-1-methyl-8-methylene-2-oxo-2,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1H-7,9a-methanobenzo[a]azulene-1,10-dicarboxylate (**XIV**)



MW: 37.43	B. t.	Žlutý olej
	R.t.	-
	α_D^{24}	- 42.5 (c 1.03, CH ₃ OH)
	MS (ES⁺), m/z (%)	395 [M+Na] ⁺ , 411 [M+K] ⁺

