



Akademie věd České republiky

Teze doktorské disertační práce
k získání vědeckého titulu „doktor věd“
ve skupině věd – chemické vědy

Steroidy s heterocykly a jejich uplatnění v syntéze supramolekulárních sloučenin

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru - organická a bioorganická
chemie

Pavel Drašar

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

a

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR Praha

Praha 2004

(rukopis dokončen 4. 2. 2004)

Přehled o současném stavu problematiky

Přehled o stavu problematiky, která je předmětem disertace a vlastní odborné literatury zabývající se zkoumanými otázkami je uveden u každého z dílčích témat zvlášť, pro snadnější orientaci.

Cíl disertační práce

V našich studiích jsme se v oblasti steroidních heterocyklů soustředili na konstrukci supramolekul s předem navrženými vlastnostmi a jejich studium a zkoumání možného využití. Jako podpůrná práce nám sloužilo několik typických okruhů, které souvisely jeden s druhým a které lze rozdělit spíše jen metodicky, na: a) steroidní heterocykly jako součást a případně cíl reakcí vedoucích k výstavbě bočního řetězce steroidů, b) syntéza steroidních heterocyklů jako látek s potenciální biologickou účinností, c) syntéza malých konjugátů steroidních heterocyklů, d) studium vlivu způsobu spojení heterocyklu a steroidu na vlastnosti vzniklé sloučeniny, e) izolace steroidních heterocyklů a jejich konjugátů z přírodního materiálu, f) studium fyzikálně chemických a biologických vlastností připravených a izolovaných látek, g) molekulární modelování.

Zvolené metody zpracování

Pokud se týče metod, které jsou k dispozici pro zpracování daných témat je nasnadě celá škála method organické a bio-organické chemie, metody spektrometrické, chiroptické, chemická analýza, testy biologické účinnosti a zkoumání některých produktů z hlediska materiálové vědy. Pokud se dotýkáme molekulárního modelování, je, vzhledem k rozměrům některých molekul, k dispozici relativně prosté modelování pomocí metod jako MM2¹² či CHARMM³ a metod příbuzných. Dlužno však říci, že modely i získané hodnoty některých pozorovatelných vlastností odpovídají jak změřeným fyzikálně-chemickým veličinám tak hodnotám získaným parciálními výpočty kvalitnějšími metodami, které ovšem nepovažujeme za předmět této práce pro jejich speciální charakter. Byla provedena řada výpočtů na úrovních vyšších, ať již programy Gaussian 98W⁴, MOPAC⁵, většinou prostřednictvím rozhraní Cambridge Software ChemOffice Ultra⁶.

Vlastní metodický přístup ke zpracování zvoleného tématu zahrnoval prostudování vlastností řady heterocyklických systémů obsahujících steroidy a následně inkorporace steroidů jako stavebních kamenů supramolekul a studium jejich vlastností.

Nejdůležitější výsledky disertace s uvedením nových poznatků

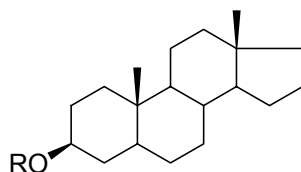
V rámci této studie byla syntetizována celá řada nových typů steroidních heterocyklů, které se, až na výjimky, dají charakterizovat jedním krátkým můstkem (tj. zpravidla 1-5 uhlíků) spojujícím sekundární uhlíkový atom kruhu steroidního skeletu s kruhem více či méně nenasyceného heterocyklu. V následující diskusi je uvedeno několik

typických příkladů takových steroidních heterocyklů s tím, že se krátce zamyslíme nad jejich vybranými vlastnostmi. Obecně byly v této práci syntetizované steroidy testovány na svoji aktivitu vůči *Escherichia coli* (ÚOCHB AV ČR), na buněčné linii screeningového systému NCI odvozené z myší lymfocytické leukemie P388 (CRI ASU, Tempe), na inhibici inkorporace rubidia do erythrocytů (IBCH Moskva, FarmÚ FVL UK a SÚKL Praha) a na NCS anti-HIV screeningové *in vitro* testovací linii T4 lymphocytů z buněčné linie CEM (NCI Bethesda). U vybraných látek byla prováděna zkouška pozitivně inotropní aktivity přímo na Langendorfově preparátu ze srdečního svalu (ÚEBF Hradec Králové). Pokud byly úspěšně prováděny testy další, jsou uvedeny u příslušných aktivních látek.

V oblasti steroidních molekul a heterocyklů supramolekulárního typu byly zužitkovány zkušenosti z předchozích prací s tím, že bylo syntetizováno několik druhů supramolekul, majících nové vlastnosti, které do nich byly zakomponovány jako vlastnosti vnášené částečnými strukturami a které v symbióze poskytly vlastnosti nové, ne vždy očekávané, ale o zajímavější. Byla tak prostudována komplexace steroidních kalix[4]pyrrolů s D- a L-vinnou a mandlovou kyselinou a byly zjištěny významné rozdíly v antipodální selektivitě těchto komplexací. Byly připraveny analogické, *meso*-substituované porfyriny a byla studována jejich komplexace se sacharidy. Zde byly zjištěny významné asociace mezi různými sacharidy od mono až po pentasacharid; bylo zjištěno i skládání molekul v různých roztocích. Steroid s navázaným fenanthrolinovým zbytkem ukázal na možnost ovládnutí samoskladných mechanismů pomocí koordinace s kationtem kovu. Přestože bylo dosaženo velmi zajímavých výsledků, mnoho práce v této oblasti nás teprve čeká.

Pro přehlednost je na začátku každé podkapitoly uveden seznam vlastních prací, které v plném textu o problematice pojednávají. Citace na literaturu obecného charakteru jsou uvedeny odkazem, pomocí klasického způsobu, se seznamem na konci práce. V řazení kapitol není skryt žádný význam.

Pokud je uveden steroidní skelet v obecném tvaru



jde o sloučeninu, která se vyskytuje ve více variantách, ať již stran substituce na skeletu, tak stran nenasycenosti, či anelace kruhů a druh příslušné varianty není podstatný.

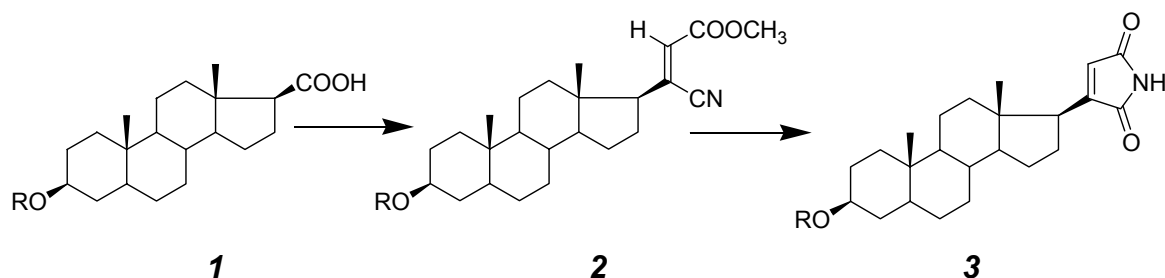
Steroidní maleinimidy

Drašar P., Havel M.: Syntheses of 17 β -(2-maleimido)androstanes. On Steroids CCXLIX. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 46, 1976 (1981).

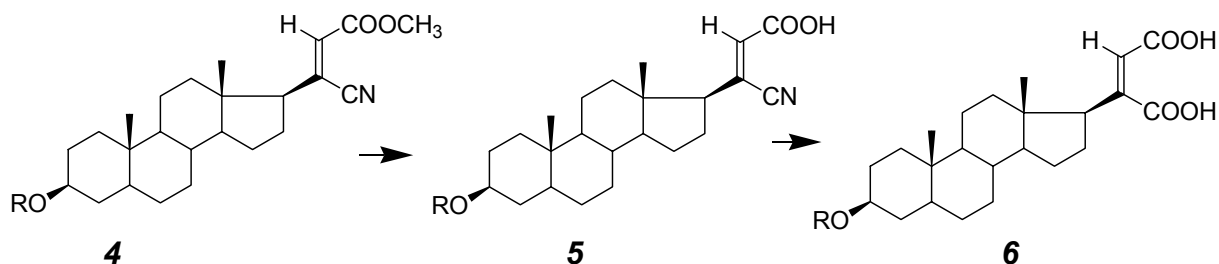
Pouzar V., Drašar P., Kočovský P., Havel M.: Synthesis of some Isocardenolide Analogs and 17 β -Maleimidoandrostane of Westphalen Structural Type. On Steroids CCLVI. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 96 (1982).

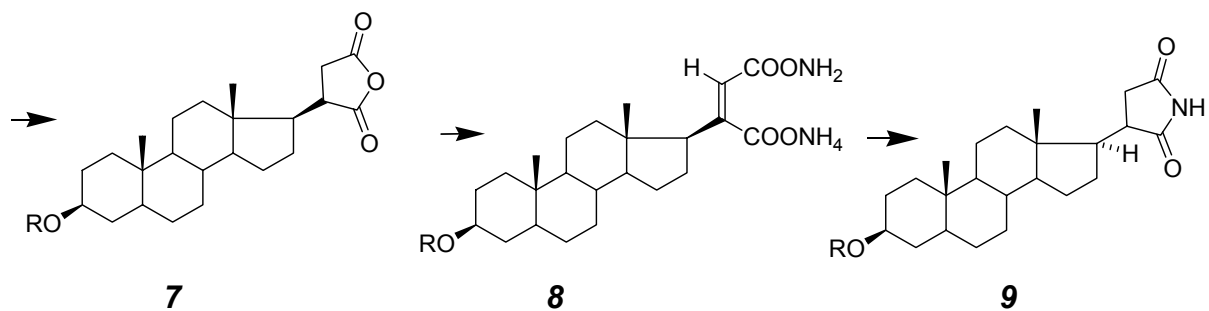
Drašar P., Pouzar V., Černý I., Havel M.: Alternative Synthesis of Steroidal Maleimides. On Steroids CCLXXXI. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 48, 1224 (1983).

Série steroidních kyselin byla převedena reakcí, příbuznou syntéze showdomycinu⁷, na kyanoakryláty, které vznikají reakcí *in situ* vzniklého acylykyanidu s methoxykarbonylmethylentriphenylfosforanem, za přítomnosti kyanovodíku.

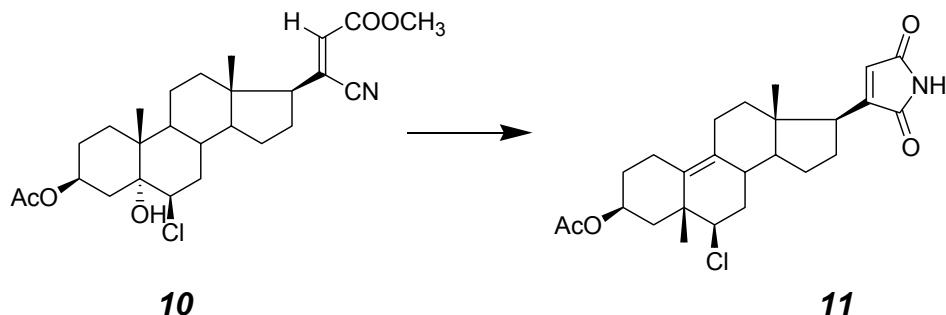


Ze vznikajících *E* a *Z* izomerů je izolován *Z* izomer 2 a je dále cyklizován na nový typ steroidního heterocyklu, cyklický imid 3 (maleinimidod derivát steroidu). Vzhledem k tomu, že cyklizace probíhá za tepla v koncentrované kyselině sírové a že při těchto podmínkách dochází u některých steroidních typů k významným degradacím je v některých případech citlivějších skeletů podstatně snížen výtěžek. Tuto nesnáz se podařilo obejít uplatněním alternativní syntézy maleinimido steroidů. Esternitril 4 byl postupně hydrolyzován až na dikyselinu jejíž dehydratací byl připraven cyklický anhydrid 7. Tento cyklický anhydrid byl amonolyzován na amidosůl 8. Amidosůl pak oxidem fosforečným v dimethylformamidu poskytla cyklický imid 9.

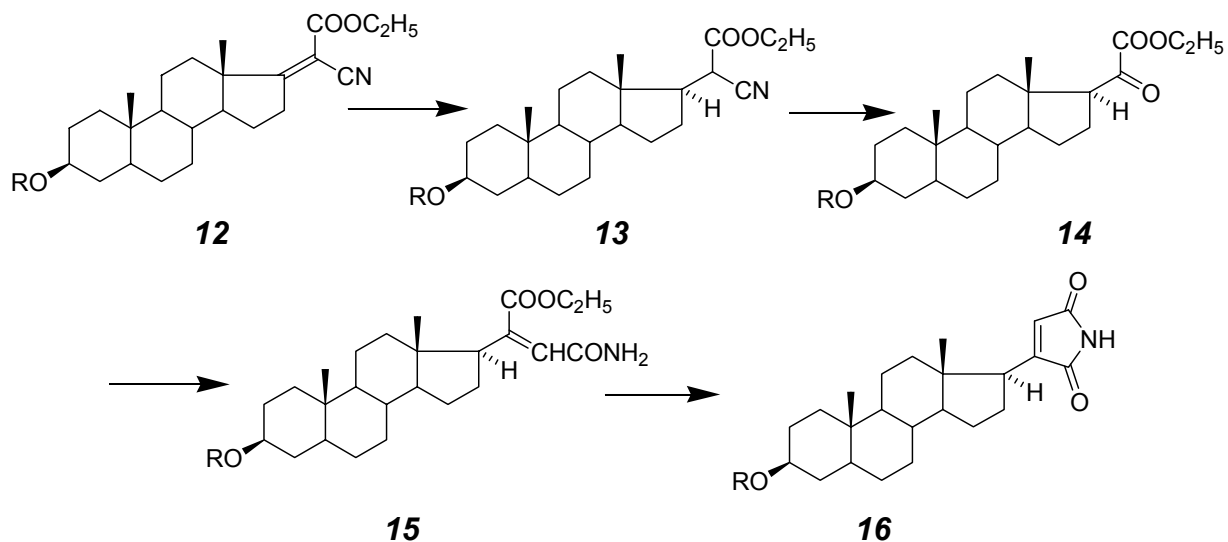




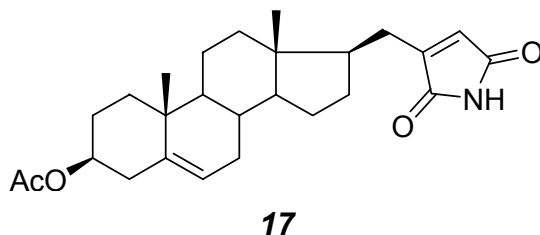
Poprvé popsaným způsobem „přímé cyklizace“ maleinimidu typu **3** byl připraven i derivát, který při cyklizaci zároveň s tvorbou maleinimidu podlehl skeletálnímu přesmyku na steroidu za vzniku sloučeniny Westphalena typu. Uskutečnění této reakce za daných podmínek si vysvětlujeme fakt, že přímá cyklizace za takových podmínek nedosahuje očekávaného výsledku proto, že u některých steroidů dochází m.j. i k degradaci (nedefinovaným změnám) steroidního skeletu, podobně, jako u prozkoumaného Westphalena přesmyku.



Steroidní maleinimidy byly syntetizovány i dalším způsobem, z ketoesterů **14**, kondenzací s karbamoylmethyltrifenyfosforanem, a následnou cyklizací esteramidu **15**. Takto se podařilo připravit cyklické imidy i u případů, kdy jednoduchá cyklizace, pravděpodobně vlivem menší stability steroidního skeletu neposkytla dostatečný či žádný výtěžek heterocyklického derivátu.



Podobně byl připraven homologický derivát **17**, s prodlouženým můstkem spojujícím heterocyklus a steroidní jádro.



Protože steroidní maleinmidy nepřispěly při hledání vhodného meziprojektu pro snadné prodlužování steroidního řetězce, nebyl mezi nimi nalezen žádný typ sloučeniny se slibnou biologickou aktivitou bylo od dalšího studia této skupiny látek upuštěno.

Steroidní thiazoly s vazbou 17-4'

Pouzar V., Drašar P., Kočovský P., Havel M.: Synthesis of some Isocardenolide Analogs and 17 β -Maleimidoandrostane of Westphalen Structural Type. On Steroids CCLVI. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 96 (1982).

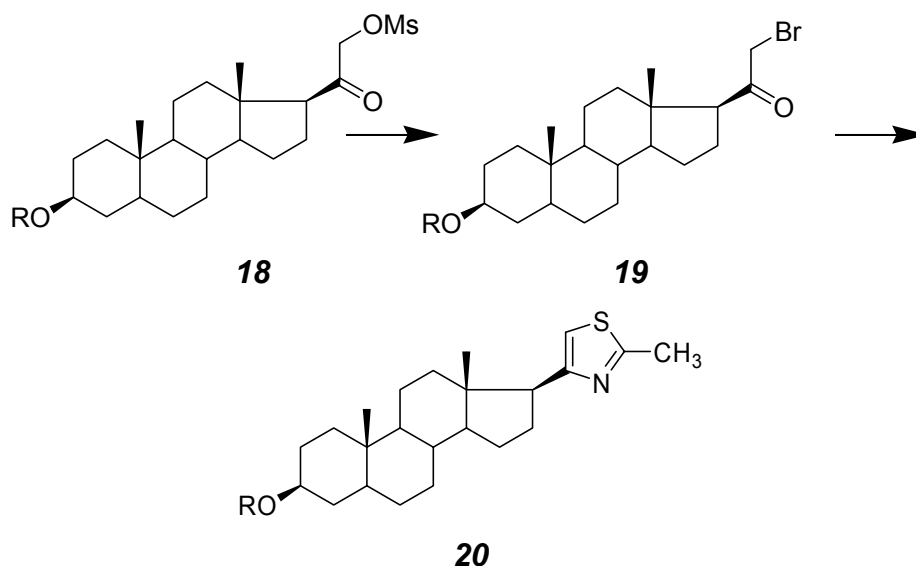
Kočovský P., Drašar P., Pouzar V., Havel M.: Synthesis of some Westphalen-type Cardenolide Analogs. On Steroids CCLVII. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 108 (1982).

Drašar P., Pouzar V., Černý I., Smolíková J., Havel M.: Synthesis of 17 β -[4-(1,3-Thiazolyl)]androstane 3 β -Hemisuccinate and Glycoside. On Steroids CCCVII. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 49, 1039 (1984).

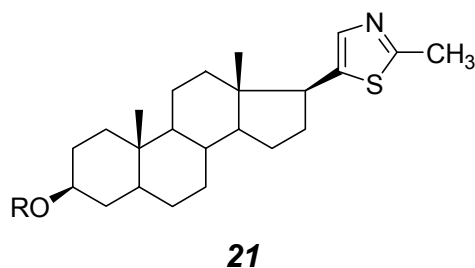
Drašar P., Pouzar V., Černý I., Pettit G.R., Havel M.: Synthesis and *in vitro* Antimetabolic Evaluation of some Steroidal Thiazoles. On Steroids CCCXLVII. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 54, 3339 (1989).

Drašar P., Pouzar V., Černý I., Havel M.: RP HPLC Separation of Some Steroidal Thiazoles. *J. Chromatogr.* 283, 396 (1984).

Zajímavým problémem se ukázala syntéza thiazolů⁸ v poloze 17 steroidního skeletu a důkaz jejich struktury. Zatímco Hantzschova reakce na přípravu thiazolů je známa již od předminulého století, její aplikace na steroidní systémy nebyla všestranně propracována. K jejímu prostudování byl tak z mesylketonu připraven bromketon, který byl použit jako složka pro kondenzaci s thiomocovinou a jejími deriváty za klasických Hantzschových podmínek¹¹.

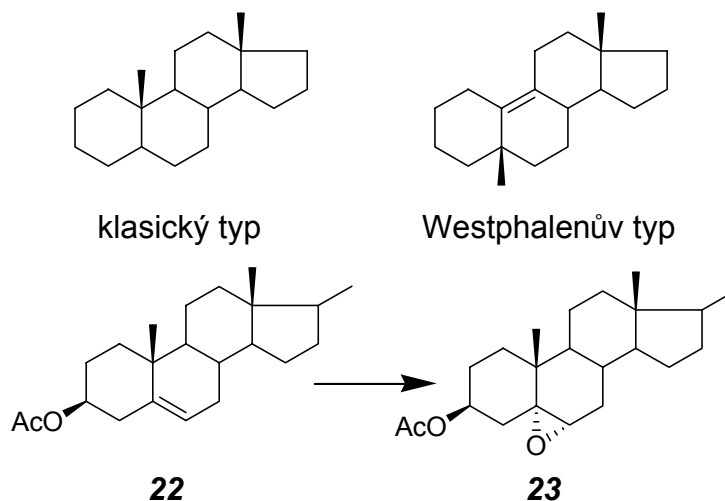


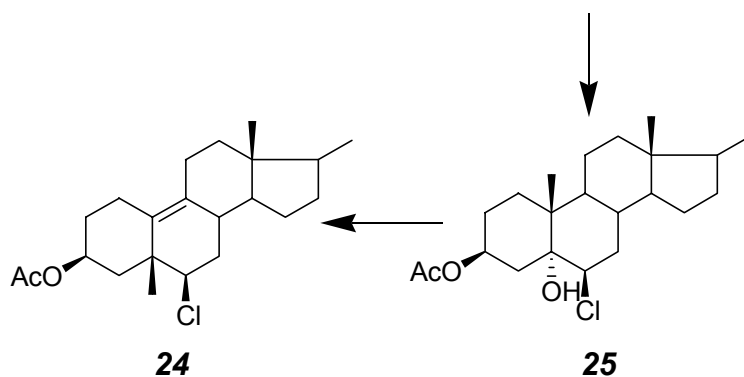
Původní cíl práce, prověřit syntézu izomerního heterocyklu **21**, uvedeného v literatuře, však nebyl splněn. Byl prokázán pouze vznik thiazolu **20** podle horního schématu.



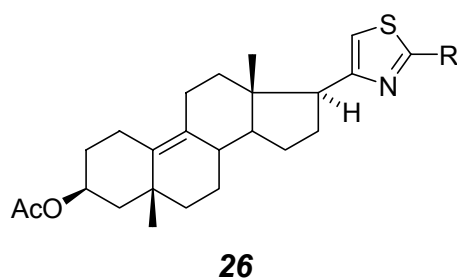
Thiazol **21** se sírou v poloze blíže steroidnímu heterocyklu (tj. derivát s vazbou 17-5'), se však prokázat nepodařilo. Naopak, redukcí získaného steroidního heterocyklu na Ranneyově niklu bylo prokázáno, že vzniklý steroidní thiazol je typu 17-4', podobný závěr byl učiněn i z ^{13}C NMR spekter.

Celá řada derivátů byla připravena na steroidním skeletu Westphalenova strukturního typu, podobně jako je zmíněno u syntéz maleinimidu.

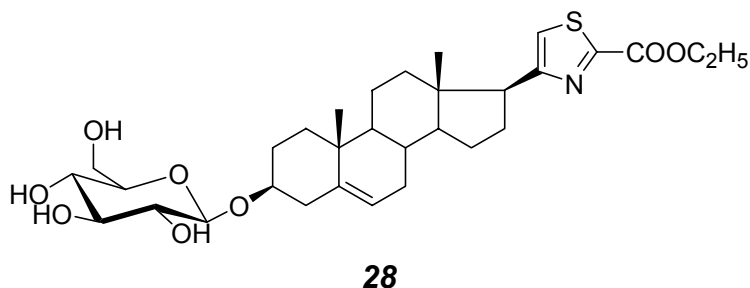
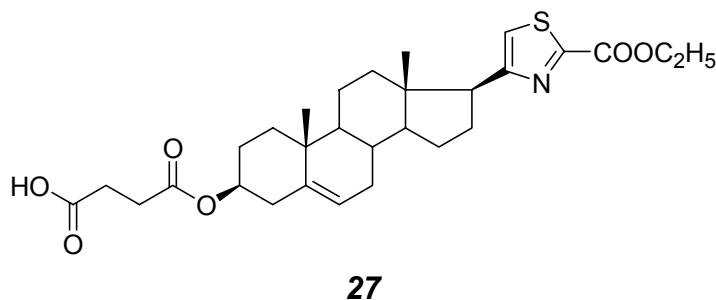




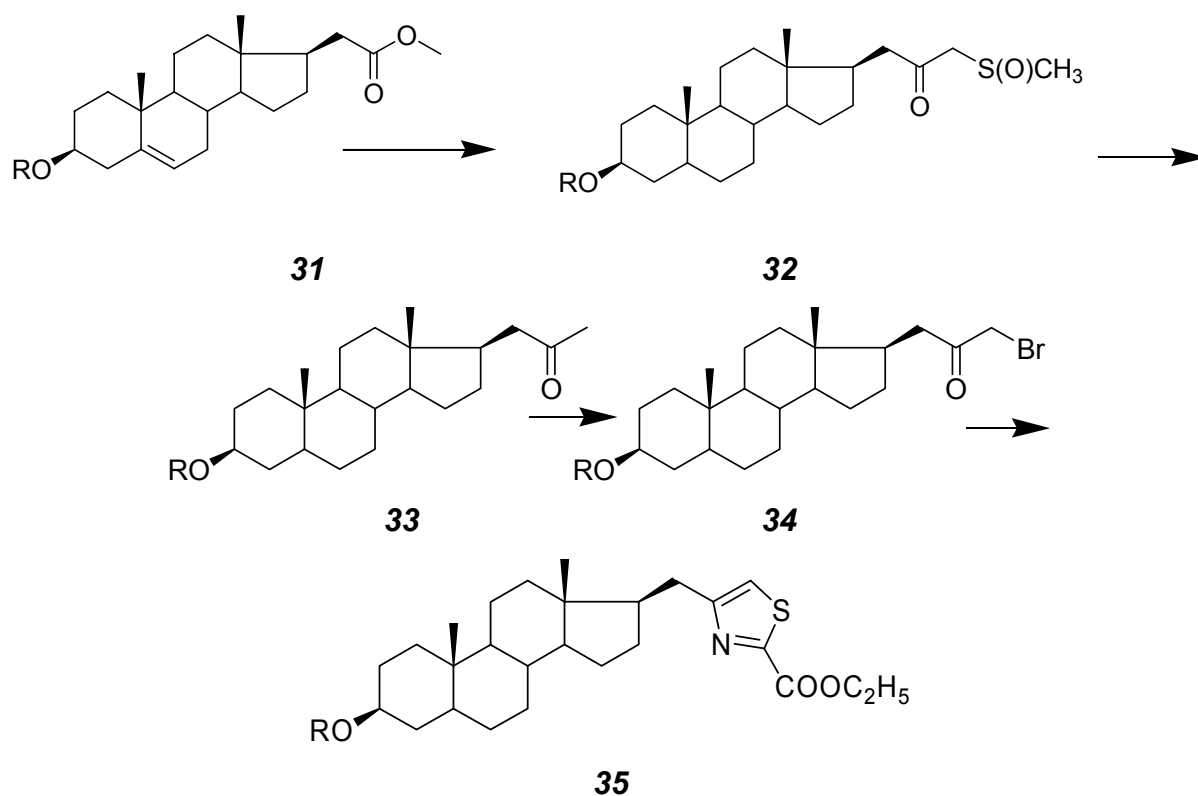
Na schématu výše znázorněný Westphalenův přesmyk⁹ byl využit v reakčních schématech u syntéz laktonů i thiazolu **26**.



Pro možnost studia inhibice Na^+, K^+ -ATPasy (3.6.3.9, dříve označované jako 3.6.1.37), s jejímiž preparáty se pracuje ve vodném prostředí, byla vypracována syntéza konjugátů steroidních thiazolů, vhodných pro studia v tomto polárním prostředí. Metodikou popsanou níže¹⁰ byl připraven hemisukcinát **27** a metodou používající silikát stříbrný byl připraven i glukosid **28**.



V rámci studia steroidních thiazolů byla studována skupina látek s vazbou typu 17-4' (typy **29** a **30**). Záměrně byl měněn jak steroidní skelet tak substituce v poloze 2'.



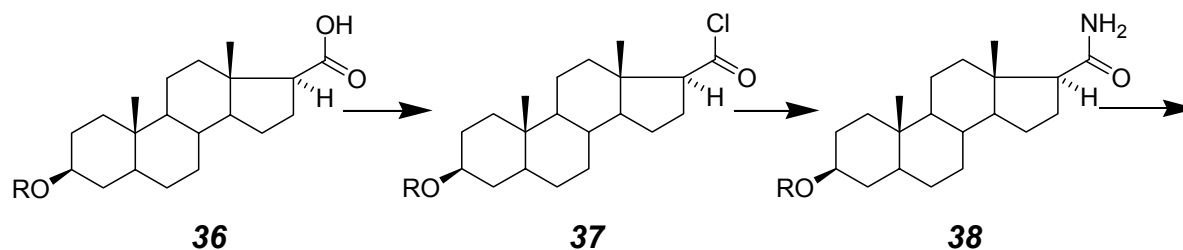
K prodloužení bočního řetězce o jeden uhlík bylo použito redukce ketosulfoxidu typu **32** na amalgamovaném hliníku. Hantzschova reakce¹¹ byla provedena analogicky jako u derivátů výše popsaných. Deriváty byly studovány při HPLC na reverzní fázi, byly změřeny kapacitní faktory a navržena snadná možnost jejich identifikace. Zaznamenání hodná biologická aktivita u nich nebyla nalezena.

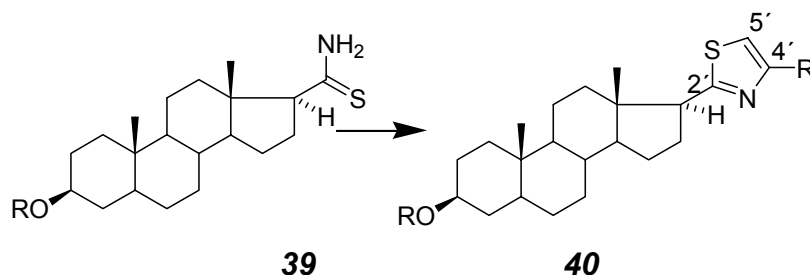
Steroidní thiazoly s vazbou 17-2'

Urbanský M., Drašar P.: Simple Syntheses of Steroidal 17 β -(2'-Thiazolyl) Derivatives. *Synth. Commun.* 23, 829 (1993).

Drašar P., Urbanský M.: Reversed-Phase HPLC Separation and Chromatographic-Spectral Characterization of 17 β -(2'-Thiazolyl)androst-5-en-3 β -ols and their Acetates. *Biomed. Chromatogr.* 8, 95 (1994).

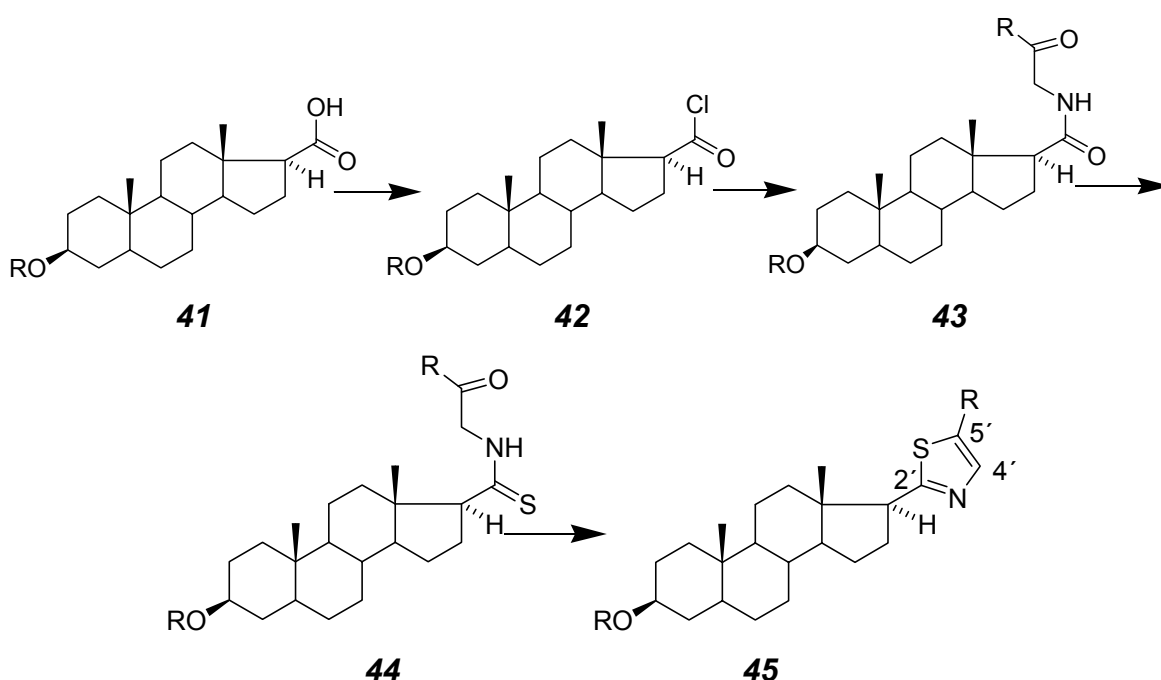
Byla syntetizována též skupina nových alternativních 17-2' thiazolových derivátů typu **40**. Cesta k nim vedla přes thioamid **39** přičemž posledním stupněm byla opět





Hantzschova reakce, použitá ovšem, vzhledem ke steroidu v opačném smyslu než výše, tj. se synthonem typu $\text{BrCH}_2\text{CO-R}$.

Příprava thiazolu typu **40**, substituovaného na uhlíku C-5' dvojné vazby (blíže síry) byla vedena odlišným způsobem. K uzavření kruhu docházelo již při vlastní thiační reakci pomocí P_2S_5 v dioxanu.



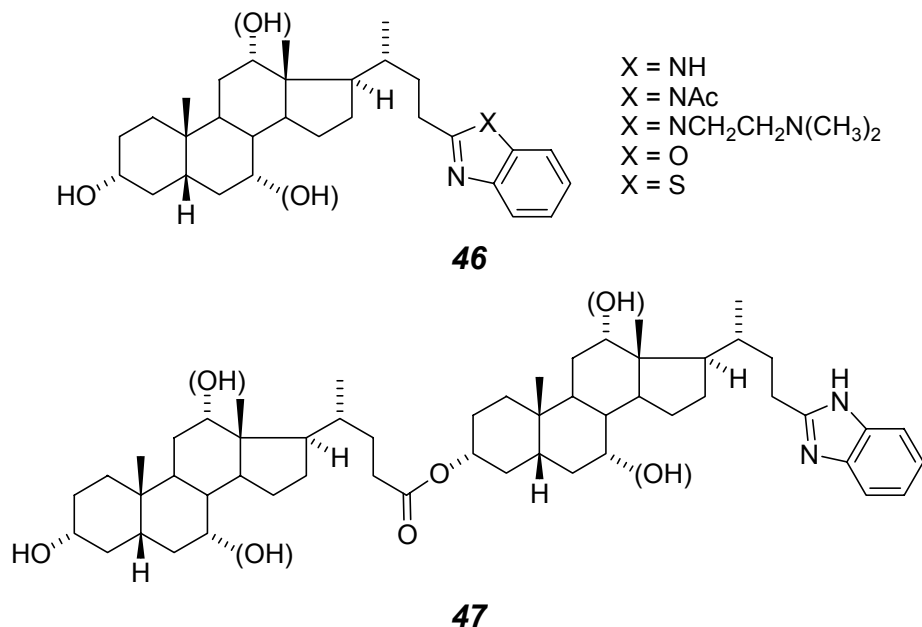
U thiazolů typu 17-2' byla provedena obširnější studie jejich identifikace a čištění pomocí HPLC na reverzní fázi. Bylo prostudováno jejich dělení a možnost charakterizace touto cestou.

Bicycklé heterocykly odvozené od cholových kyselin

Nguyen T.T.H., Urban J., Klinotová E., Sejbal J., Protiva J., Drašar P., Protiva M.: Synthesis of Several Hydroxylated 23-(Benzimidazol-2-yl-, Benzoxazol-2-yl and Benzothiazol-2-yl)norcholanes and Some Related Compounds. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 257 (1995).

Nová skupina heterocyklů byla syntetizována z látek, které se vyznačují celou řadou biologických funkcí a fyzikálních vlastností žlučových (cholových) kyselin. Řada

žlučových kyselin (lithocholová, chenodeoxycholová, cholová a deoxycholová) byla jak z vlastních kyselin tak z jejich chloridů převedena na benzimidazoly, benzthiazoly a benzoxazoly (typ **46**) kondenzací s 1,2-diaminobenzenem, 2-aminofenolem a 2-aminothiofenolem. Bylo experimentováno jak s funkcionalizací heterocyklického jádra tak s funkcionalizací pozice 3 steroidního skeletu. Zajímavý derivát **47** byl připraven esterifikací benzimidazolového steroidního derivátu další molekulou cholové kyseliny.



Steroidní deriváty obsahující bicyklické heterocykly byly testovány na biologickou aktivitu ve smyslu výše citovaného ANTI-HIV screeningu NCI. Nejzajímavější byla nalezena u benzimidazolu odvozeného od chenodeoxycholové kyseliny, acetylované v poloze 3 a 7. Zjištěnou aktivitu je možno vyjádřit v koncentraci $1,58 \times 10^{-5}$ mol.l⁻¹ jako 10,72 % ochrany T4 lymfocytů *in vitro*. Benzoxazolová sloučenina odvozená od peracetylované kyseliny cholové měla v koncentraci 5×10^{-6} mol.l⁻¹ analogickou hodnotu 31,45 %. Nicméně byly tyto naměřené hodnoty hodnoceny NCI jako „velmi nízká“ aktivita.

Steroidní laktony

Drašar P., Černý I., Pouzar V., Havel M.: New Preparation of Steroidal 3-Hemisuccinates. On Steroids CCCIII. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 49, 306 (1984).

Pouzar V., Drašar P., Černý I., Havel M.: A Novel Indirect Preparation of Hemisuccinates. *Synth. Commun.* 14, 501 (1984).

Schmiedová D., Vereš K., Drašar P.: Synthesis of Components for Radioimmunoassay of Digoxin. *Radioisotopy* 25, 658 (1984).

Drašar P., Pouzar V., Černý I., Havel M., Tureček F. et al. Preparation of 3-Carboxypropanoates of Digitoxin Digoxin and their Conjugates with L-Tyrosine. On Steroids CCCXVII. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 50, 2760 (1985).

Pouzar V., Černý I., Drašar P., Havel M.: New Method of Preparation of Cardioglycoside Hemisuccinates. On Steroids CCCXXV. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 51, 2019. (1986).

Pouzar V., Černý I., Drašar P., Havel M.: New Approach to Steroidal Hemisuccinates and Glycosides. On Steroids CCCXXIX. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 52, 775 (1987).

Kamano Y., Drašar P., Pettit G.R., Tozawa M.: Synthesis of 5 α -Cinobufagin. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 52, 1325 (1987).

Pettit G.R., Kamano Y., Drašar P., Inoue M., Knight J.C.: Synthesis of Bufalitoxin and Bufotoxin. *J. Org. Chem.* 52, 3573 (1987).

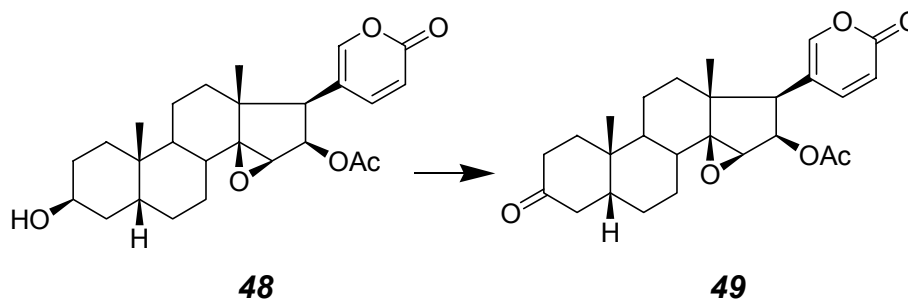
Mráz M., Opletal L., Sovová M., Drašar P., Havel M.: Inhibition of Na⁺ K⁺ -ATPase by the Glycosides from *Coronilla varia*. *Planta Medica* 58, 467 (1992).

Kamano Y., Kotake A., Nogawa T., Hashima H., Tozawa M., Morita H., Takeya K., Itokawa H., Matsuo I., Ichihara Y., Drašar P., Pettit G.R.. Conformational preference of two toad poison Bufadienolides, Cinobufagin and Bufotalin. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 1663 (1998).

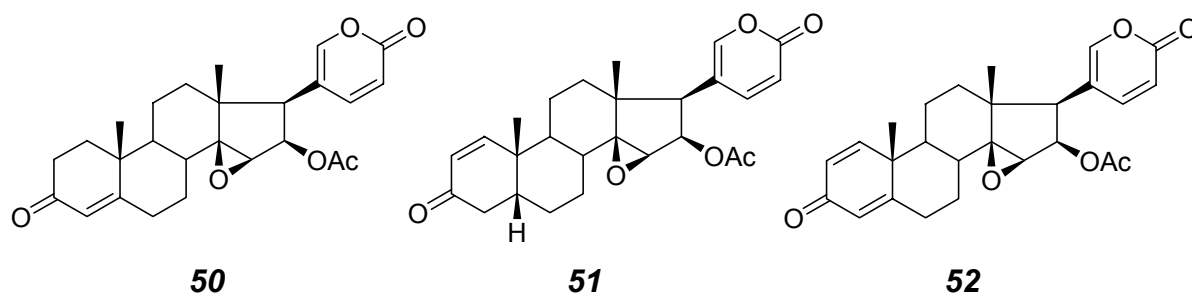
Kamano Y., Nogawa T., Yamashita A., Hayashi M., Inoue M., Drašar P., Pettit G. R.: Isolation and Structure of a 20,21-Epoxybufenolide Series from "Ch'an Su". *J. Nat. Prod.*; 65, 1001 (2002).

Série prací byla věnována studiu „heterocyklů“ z oblasti přírodních a semisyntetických kardenolidů a bufadienolidů.

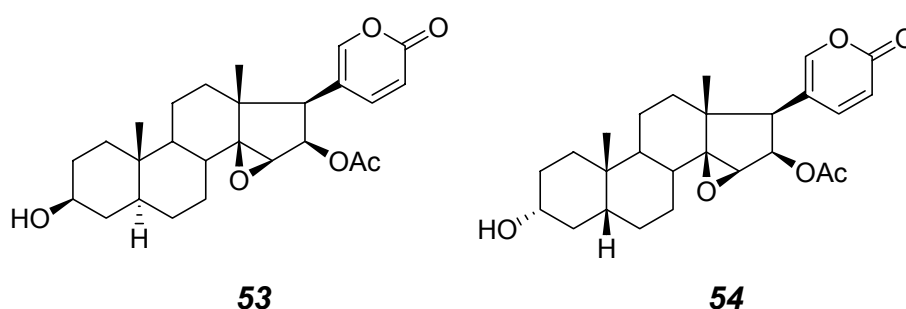
Tak byla obměnami¹² stereochemie kruhů A a B z přírodního cinobufaginu **48** připravena dvojice nepřírodních derivátů cinobufaginu (3 α ,5 α) se stereochemií 3 α ,5 β (5 α -cinobufagin) a 3 β ,5 α (3-epicinobufagin).



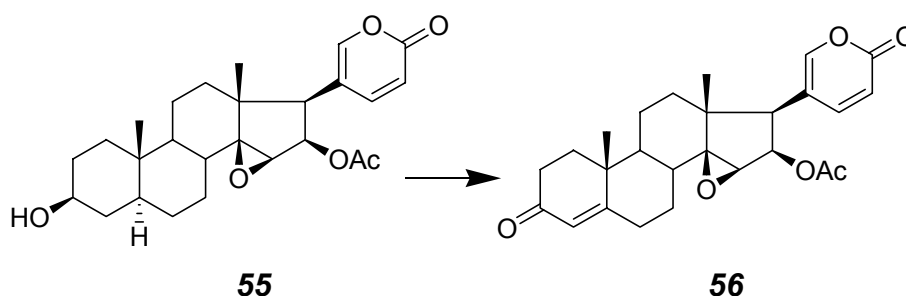
Obměna stereochemie byla provedena přes přípravu derivátů 3-ketonů typu **49** nenasycených v A-kruhu (např. Δ -2,3 a Δ -4,5, tj. sloučenin **50** až **52**) redukcí za různých podmínek.



Při redukci vznikaly podle podmínek $3\beta,5\beta$ (**48**), $3\alpha,5\beta$ (**54**) a $3\beta,5\alpha$ (**53**) deriváty v preparativním měřítku. Derivát $3\alpha,5\alpha$ nebyl izolován ani jako minoritní produkt redukce.

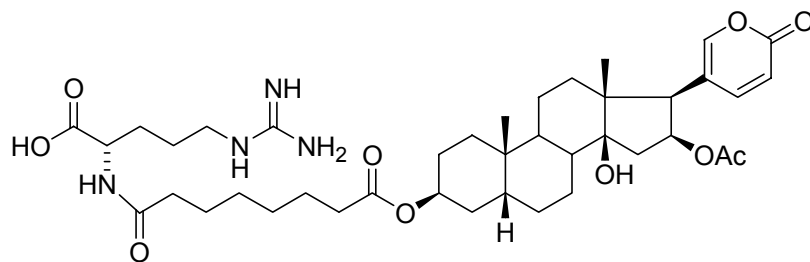


Syntéza byla doplněna přípravou nenasyceného ketonu **56** z jiného přírodního bufadienolidu, z cinobufotalinu **55**.



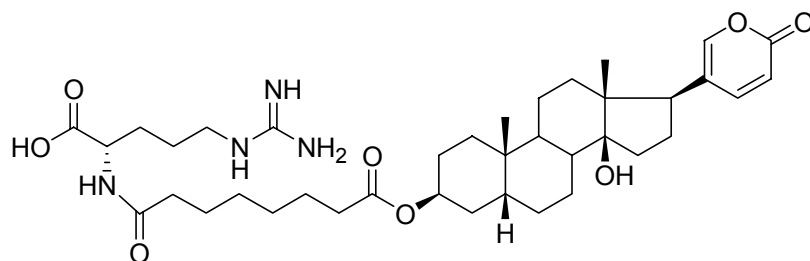
5α -Cinobufagin (**55**) připravený z přírodního cinobufaginu vykázal na testech s výše popsanou P388 buněčnou linií marginální inhibiční efekt, zatímco přírodní $3\beta,5\beta$ derivát **48** byl naprosto inaktivní.

Aplikací výše popsaných reakcí s poloestery dikarboxylových organických kyselin, např. s jantarovou či suberovou kyselinou a následně kondenzací s argininem byla vyvinuta reakce, která dokončila formální totální syntézu bufotoxinu **57**.



57

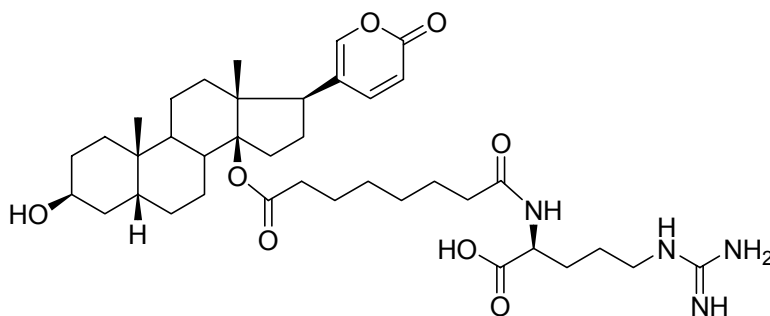
Podobně byl syntetizován i bufalitoxin **58**. Výchozí steroidní prekursorů byly izolovány z čínské drogy Ch'an-su (Senso)¹³ pomocí extrakce a mnohonásobné chromatografie. Tato droga, získaná z kůže orientálních žab *Bufo bufo* je tradiční východní lidovou medicínou, používanou již přes 2000 let. Dodnes se prodává na vesnických trzích.



58

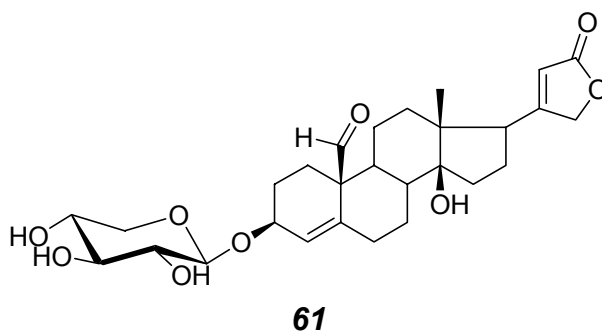
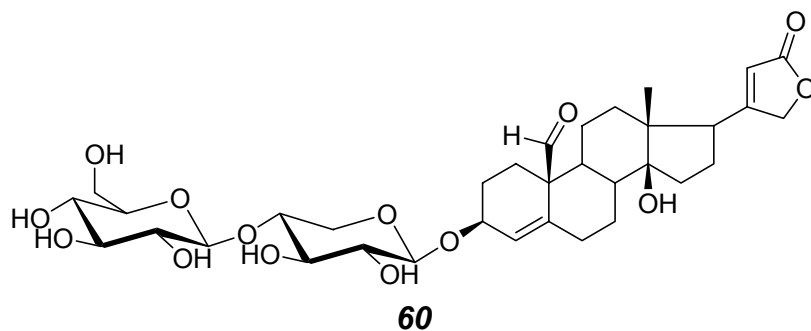
Ropuší toxiny, látky s toxicitou LD₅₀ 0,29 mg/kg (kočka), jsou látky odpovědné za významnou biologickou aktivitu Ch'an-su. Do roku 1972 však nebyla s dostatečnou přesností známa jejich struktura.

Do doby potvrzení struktury se m.j. nesprávně soudilo¹⁴, že steroid je konjugován v poloze 14, jak je znázorněno na struktuře **59**.

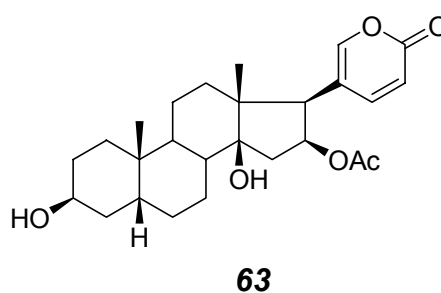
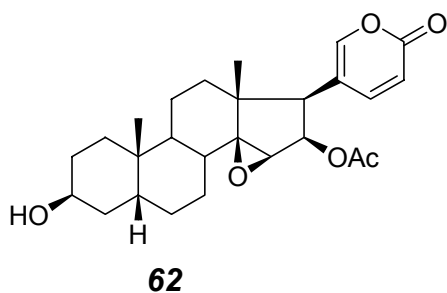


59

U kardioglykosidů izolovaných z *Coronilla varia* L.¹⁵ byla sledována kardiotonická aktivita. Bylo shledáno, že biologická aktivita není zcela závislá na přítomnosti obou monosacharidových jednotek a že inhibice Na⁺,K⁺-ATPasy je u hyrkanosidu **60** a deglukohyrkanosidu **61** srovnatelná s inhibičními konstantami naměřenými u klasických kardiotonických (pozitivně inotropických) standardů, digitoxinu a ouabainu v rozmezí koncentrací 10⁻⁹-10⁻⁶ mol.l⁻¹.

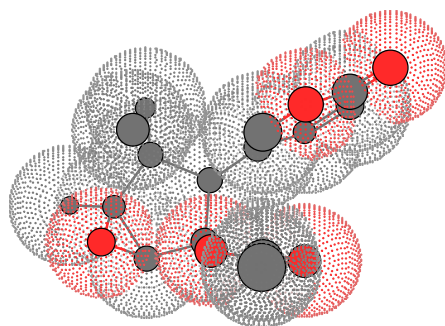


Byla studována konformační preference u dvou bufadienolidů z ropuších jedů (*Bufo bufo gargarizans*) izolovaných též z čínské drogy Ch'an-su, cinobufaginu a bufotalinu.



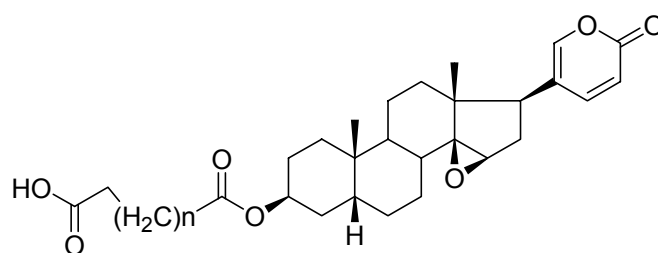
Bylo shledáno, že laktonový kruh těchto bufadienolidů je energeticky nejvýhodněji umístěn nad rovinu kruhu, přičemž rovina jím proložená je téměř shodná s rovinou symetrie pětičlenného kruhu s epoxidem (parciální struktura **64**, je znázorněn kruh D steroidu a připojený laktonový kruh).

Struktura byla navržena pomocí metody MM2 v kombinaci s PM3 a HF/STP-3G. Výpočty byly podpořeny NOE experimenty v NMR studii za nízkých teplot (230 a 330 K).



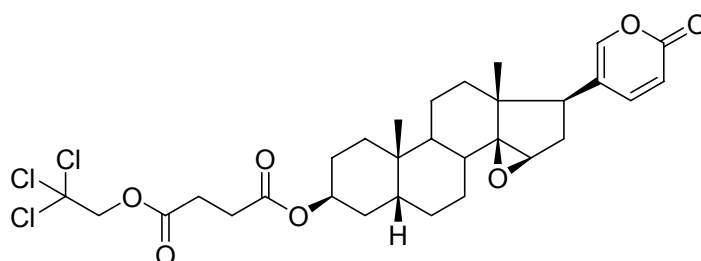
V této sérii prací byla mj. vyvinuta metoda na syntézu stavebních bloků pro sestavení RIA souprav pro některé kardiotonické steroidy. Na rozdíl od „klasické“ metody uplatnila vyvinutá metoda použití derivátů, které byly chemickými individuali a které byly plně chemicky charakterizovány. Metoda byla podle postupu, na vypracování jehož neradioaktivní části jsme se podíleli, použita v naší republice i komerčně.

Základem pro syntézu komponenty RIA soupravy byla příprava steroidní sloučeniny relativně pevně vázané na „můstek“ vhodné délky¹⁶. Pro jednoduchost byl zvolen „můstek“ ve formě poloesteru kyseliny jantarové, respektive i poloester kyseliny suberové (typ **65**). Oba deriváty nebyly zvoleny náhodně, takové poloestery se vyskytují jako přírodní látky a vykazují aktivitu (kardiotonickou, či pozitivně inotrop-



65

ní) podobnou jako glykosidy. Řada steroidních poloesterů byla syntetizována z důvodu srovnávání kardiotonické aktivity, nicméně, propracování této syntézy vedlo i k přípravě čistých komponent pro sestavení RIA souprav.

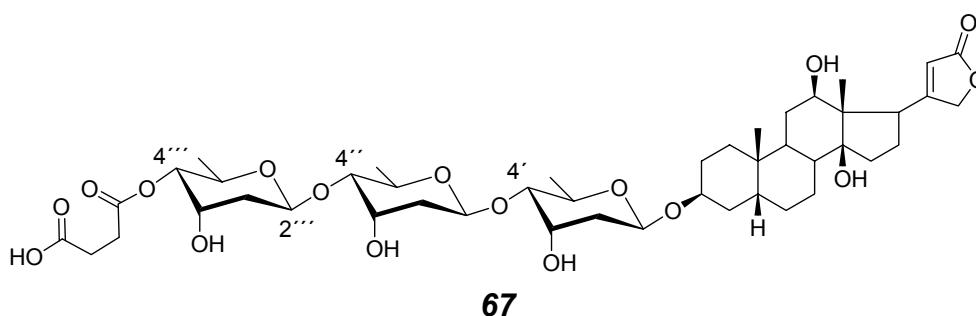


66

Jako klíčová sloučenina byl připraven monosubstituovaný 2,2,2-trichlorethylester jantarové kyseliny, kterým byl dále esterifikován steroidní hydroxyderivát. Trichlorethylová „chránící“ skupina byla odstraněna působením zinkového prachu v rozpouštědle s přidavkem kyseliny octové, za podmínek, kdy ještě nedocházelo k hydrolýze esterové vazby mezi steroidem a jantarovou kyselinou.

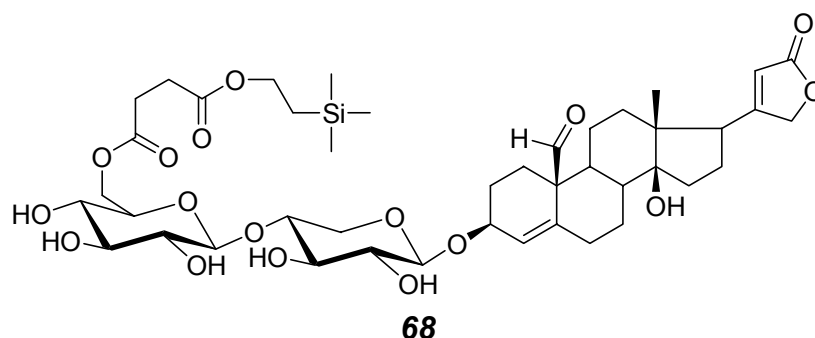
Při esterifikaci digoxinu monosubstituovaným 2,2,2-trichlorethylesterem jantarové kyseliny došlo, vzhledem ke sterické přístupnosti a reaktivitě cukerných hydroxylů k přednostní substituci na hydroxylu v poloze 4''' za vzniku chráněného digoxin 4'''-hemisukcinátu **67**. Po odblokování zinkem byl připraven z hemisukcinátu

reakcí s hovězím sérovým albuminem (BSA) byl připraven konjugát pro imunizaci a reakcí s methylesterem L-tyrosinu substrát pro radiojodaci, která byla provedena s 50 % výtěžkem ^{125}I -radioligandu.

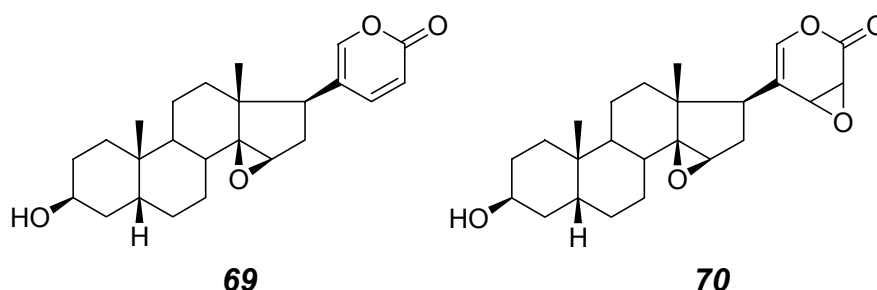


V řadě případů byla použita i alternativní metoda, kdy místo trichlorethylové chránící skupiny byla použita skupina 2-(trimethylsilyl)ethylová. Její odštěpení bylo prováděno působením tetrabutylamonium fluoridu.

Metodika byla uplatněna i u hyrkanosidu. Byl připraven 2-(trimethylsilyl)ethylderivát 6''-sukcinátu hyrkanosidu **68**, který byl deblokován a převeden na konjugát s L-tyrosinem pomocí reakce s EEDQ.



Fakt, že v přírodním materiálu, preparátu z kůží japonských ropuch *Bufo bufo* „Ch' an-su“ byl nalezen neobvyklý typ steroidních laktonů obsahujících na šestičlenném laktonovém kruhu epoxid v poloze 20-21, podnítil jak syntézu takového derivátu, tak studium jeho stereochemie a určení chiralilty.



Oxidací resibufogeninu **69** podle Kimury^{17,18} pomocí komplexu tris(acetylacetonátu)železitého a peroxidu vodíku byly získány oba stereoisomery 20,21-epoxidu **70**, jejichž stereochemické přiřazení bylo provedeno pomocí řady

NMR experimentů, neboť všechny pokusy o získání krystalů vhodných pro rentgenostrukturní analýzu selhaly.

Při zkoumání biologické aktivity těchto epoxidů bylo zjištěno, že na testovací linii leukemie MH-60 oba 20,21-epoxydy byly více jak 5x účinnější než resibufogenin, od kterého jsou odvozeny, tj. vykázaly IC_{50} 1,8 $\mu\text{g/ml}$. Pro lidské rakovinné buňky KB byl obrázek přesně opačný (resibufogenin 1,34; epoxydy 8-10 $\mu\text{g/ml}$). Současně s aglykony byly z přirozeného materiálu izolovány i 3-formiáty, jejichž protirakovinná účinnost jak na MH-60, tak na lidských rakovinných buňkách KB nebyla vůbec zaznamenána. Z pokusů plyne, že je nutno tato zajímavá zjištění prohloubit dalším studiem.

Lineární supramolekuly se steroidy

Nguyen TTH, Urban J, Klinotová E, Sejbal J, Protiva J, Drašar P, Protiva M. Synthesis of Several Hydroxylated 23-(Benzimidazol-2-yl-, Benzoxazol-2-yl and Benzothiazol-2-yl)norcholanes and Some Related Compounds. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 257 (1995).

Reschel M, Budešínský M, Černý I, Pouzar V, Drašar P. Synthesis of Linear Steroid Oligoesters Based on Etienic Acid. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67, 1709 (2002).

Reschel M, Pouzar V, Černý I, Drašar P. 2+2 Synthone Approach to Synthesis of Etienyl Etienates (2+2 Synthonový přístup k syntéze etienyletienátů). *Chemické Listy*, 96, 955 (2002).

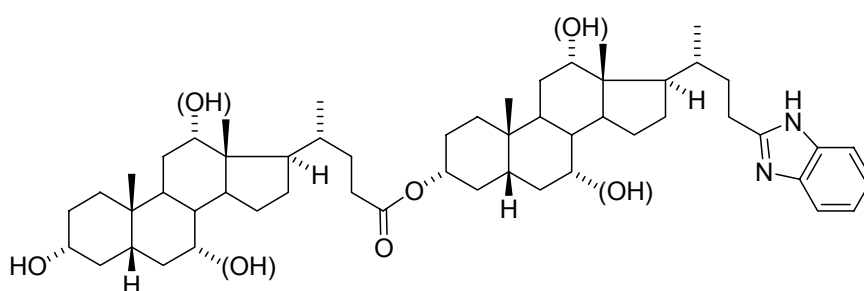
Řetězení steroidních molekul byla věnována značná pozornost z důvodu, že se od takových řetězců očekává, že mohou vytvořit organizovanou poruchu v membráně a umožnit cílený transport substrátu jenž porucha rozpozná a propustí¹⁹. Za tímto účelem jsme se zabývali steroidy řetěženými amidickou vazbou²⁰, či řetěženými pomocí heterocyklických můstků²¹. V literatuře se vyskytuje i typ řetězený pomocí heterooligoesterové vazby²². Takové deriváty steroidů se nacházejí v přírodě²³ či jsou syntetizovány, např. z různých steroidů^{24,25}, či z cholových kyselin^{26,27} a jejich derivátů^{28,29}. Dokonce se účastní konstrukce polymerních materiálů³⁰. Jako elementy vyšších syntetických celků byly studovány i pomocí relativně kvalitních výpočtů korelujících strukturu a vlastnosti měřené pomocí NMR^{31,32}.

Heterocyklický aspekt těchto řetězců je možno vidět v tom, že jsou k jejich spojování heterocykly použity²¹, anebo, že například lineární řetězce esterů jsou

zřetězeny do velkého cyklického makrolaktonu, který připomíná cyklodextrin, ale liší se od něj polaritou^{33,34}. Zajímavá je i výstavba dendritických stuktur^{35,36}.

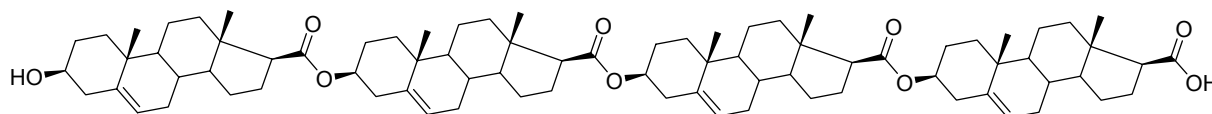
Zmíním se zde o detailnějším studiu některých možností spojení steroidních kyselin pomocí esterové vazby. Jakkoli se zdá takový problém relativně snadno řešitelný, naráží na některá podstatné experimentální úskalí.

Lineární ester dvou žlučových kyselin **71** byl připraven esterifikací benzimidazolového steroidního derivátu další molekulou cholové kyseliny. V tomto případě proběhla esterifikace relativně snadno a takové reakce jsou i popsány, i když u jiných derivátů^{26,37,38}. U tohoto derivátu nebyly nalezeny žádné zajímavé vlastnosti.



71

Systematickému studiu byla podrobena možnost esterového spojení steroidních hydroxykyselin vytvářejících molekulární stužky. Poté, co byla zevrubně prostudována možnost tvorby steroidních oligomerů spojených amidickou vazbou²⁰, byl vysloven předpoklad, že syntéza podobných esterových oligomerů bude snadná. Cílovou molekulou byl oligoester kyseliny etienové **72**, který by měl zaujímat přibližně takovou délku molekuly, jakou má sílu lipidická dvojvrstva, tj. 4 nm (40 Å).



72

Jednou ze zajímavých vlastností, která byla studována je i gelační schopnost³⁹, která svědčí m.j. o významné uspořádanosti gelu, kde zejména steroidní jádra (u nízkomolekulárních gelátorů) hrají podstatnou roli svými hydrofobními interakcemi a van der Waalsovými silami^{40,41}.

Heterocyklické supramolekuly se steroidy

Dukh M., Šaman D., Kroulík J., Černý I., Pouzar V., Král V., Drašar P.: Metal Coordination as a Tool for Controlling the Self-Assembling and Gelation Properties of Novel Type Cholic Amide–Phenanthroline Gelating Agent, *Tetrahedron* 59, 4069 (2003),

Dukh M., Černý I., Urbanský M., Pouzar V., Král V., Drašar P.: Polycyklické makrocykly obsahující pyrrol s přímo vázanými steroidními substituenty v mesopolohách, *Czech Pat. Appl.* 1999, PV3098-99 (31. 08. 1999), *Czech* 290491 (2002).

Dukh M., Drašar P., Černý I., Pouzar V., Shriver J.A., Král V., Sessler J.L.: Novel Deep Cavity Calix[4]pyrroles Derived from Steroidal Ketones, *Supramolecular Chemistry* 14, 237 (2002).

Dukh M, Černý I, Pouzar V, Král VM, Drašar P. Porphyrin Receptors with Single Steroid Moiety. *Chemické Listy* 95, 749 (2001).

M. Dukh., I. Černý, V. Pouzar, V. Král, J. Berek P. Drašar, New Types Steroid Chiral Inducing Moiety Containing Oligopyrrole Heterocycle Receptors for Electrochemical Utilisation. *US-CZ Workshop on Electrochemical Sensors Prague 2001*, June 19-22, Prague, Book of Abstracts, p. 5, Czech Chemical Society Prague.

Dukh M., Černý I., Pouzar V., Drašar P., Král V.M. Novel meso-Tetraphenyl-porphyrin conjugate with Single Steroid Moiety as a Chiral Ligand. 2001, *Zborník příspěvků*, I-PO27, p. 205. ISBN/ISSN 80-89029-24-8. 53. Sjezd chemických společností. B. Bystrica FPV Univ. MB.

Král V.M., Drašar P.: Supramolekulární přístup k nanotechnologiím. *Chemické Listy* 95, 737 (2001).

Zelenka K., Trnka T., Drašar P., Dukh M.: Syntéza porfyrinů substituovaných v meso-polohách steroidy s monosacharidovými kotvami. *Chemické Listy* 95, 777 (2001).

Dukh M., Pouzar V., Král V.M., Černý I., Drašar P.: Syntéza pyrrolových makrocyklů s kombinovanými substituenty v meso-polohách steroidních kalixfyrinů. *Chemické Listy* 94, 1045 (2000).

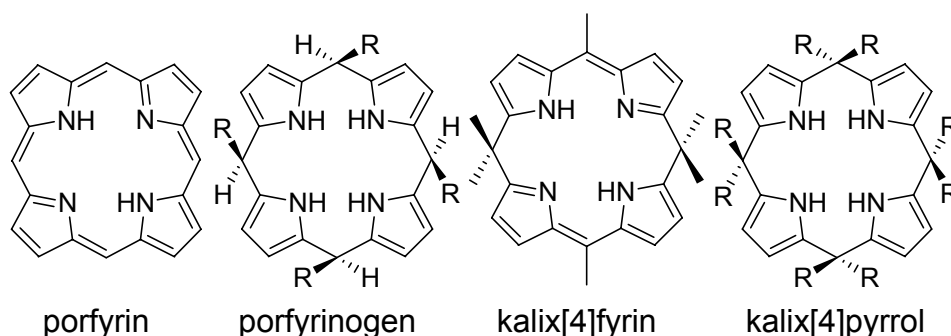
Dukh M., Šaman D., Lang K., Pouzar V., Černý I., Drašar P., Král V.: Steroid–porphyrin conjugate for saccharide sensing in protic media, *Org. Biomol. Chem.*, 1, 3458 (2003).

Uplatnění velkých či složitějších heterocyklických kruhů v přírodě tak v syntetických operacích a stále častěji i v technických výstupech vede k návrhům systémů, které mají ve své struktuře zakotveny předpoklady k předem očekávanému chování, které jsou navrhovány i syntetizovány tak, aby se tyto designované vlastnosti daly prakticky využít⁴². V našem případě byla očekávanou

(programovanou) vlastností rozpoznání molekul⁴³ a iontů⁴⁴ či komplexace či rozpoznání vybraných organických látek jako např. cukrů^{45,46,47}, neutrálních substrátů⁴⁸, aminokyselin⁴⁹, případně i aniontů⁵⁰ o značné velikosti, viz. např. 5'-guanosinmonofosfátu⁵¹. Taková vlastnost se pak předpokládá i u vyšších systémů, které mohou vytvářet např. iontový kanál zabudovatelný do buněčné stěny⁵², tvořené makrocycly se substitucí odvozenou z cholových kyselin. Jako jedna z vlastností, které byly studovány je schopnost vytvářet nadmolekulární organizované systémy⁵³ a gely^{54,55}, kde u takových molekul majících substituent s inherentní chiralitou lze očekávat zajímavé jevy v oblasti studia chiralit, jako například enantioselektivní transport⁵⁶ či rozpoznání molekulární asymetrie⁵⁷ či vytváření chirálně organizovaných struktur. Je m.j. známo, že porfyrinové gelátory substituované sacharidovými jednotkami vytvářejí jednodimenzionální agregáty⁵⁸ jež mohou přispívat ke vzniku fibrilárních struktur^{59,60}. Cholové kyseliny jako modifikátory vlastností komponent supramolekul nebyly zvoleny náhodně, jsou k tomuto účelu používány již v řadě (byť odlišných) aplikací^{61,26}. Jsou používány i jiné steroidy, i když velmi ojediněle⁶². Jejich role však může být spatřována i v tom, že pomohou tomu, že molekulární rozpoznání lze provádět i v polárním protickém prostředí, což se zatím dařilo jen velmi zřídka⁶³. Použití steroidů je známo i v modulování imunitní odpovědi⁶⁴. Molekulární fragment molekuly, odpovědný za určitou funkcionalitu můžeme nazvat funkcionofor.

Ovlivnění tvorby supramolekulárních agregátů si lze představit m.j. i koordinací jejich komponent s ionty či jinými substráty^{65,66} či samoskladbou⁶⁷.

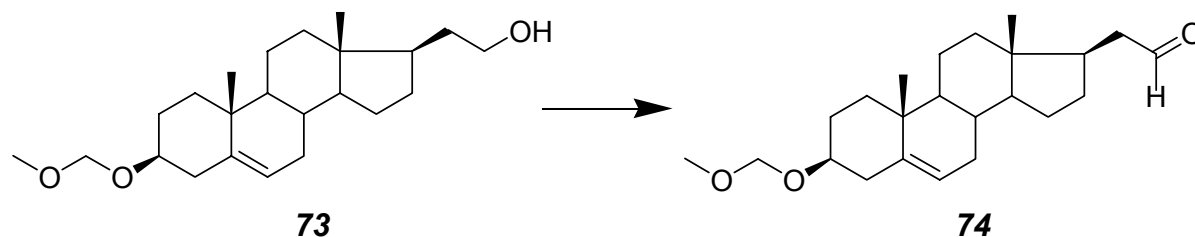
Za modelové komponenty supramolekul pro aplikaci steroidních systémů⁶⁸ jako nositelů požadovaných vlastností⁶⁹ byly zvoleny pyrrolové deriváty⁷⁰, porfyrinové (kalixfyrinové⁷¹, porfyrinové⁷², kalixpyrrolové⁷³ aj.) a 1,10-fenanthrolinové^{74,75} skelety.



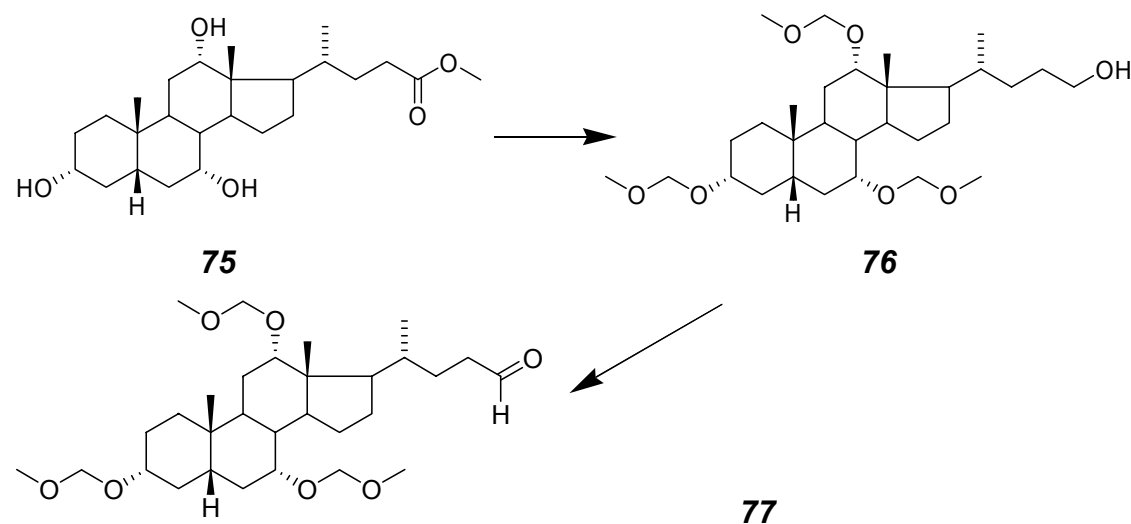
Syntéza porfyrinů substituovaných v *meso*- pozicích čtyřmi identickými steroidními zbytky otevírá novou skupinu makrocyclických látek. Taková syntéza byla rozpracována již v 30. letech minulého století, ale její důkladné využití čekalo až na

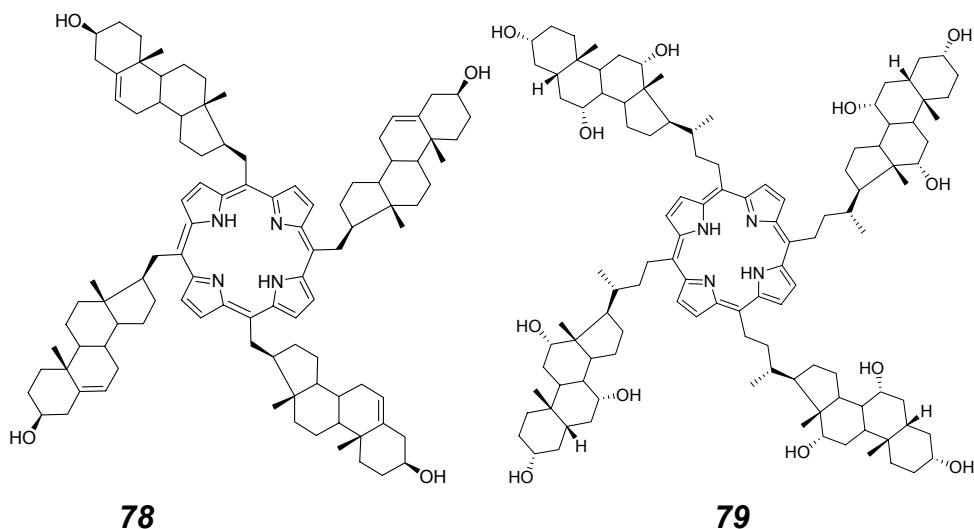
poslední léta.⁷⁶ Syntéza poskytla *meso*-tetrakis(3 α ,7 α ,12 α -tris(methoxymethoxy)-5 β -cholan-24-yl)porfyrin a *meso*-tetrakis(3 β -methoxymethoxy-pregn-5-en-21-yl)porfyrin. Syntetická cesta byla dokončena klíčovou kondenzací karbonylové sloučeniny s pyrrolem v dichlormetanu s relativně malým výtěžkem (~5%) využívaje katalýzu bor trifluorid eterátem. Reakci komplikují vedlejší procesy jako řada druhů polymerace pyrrolových sloučenin⁷⁷. Odblokovaný *meso*-tetrakis(3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-yl)porfyrin ukázal zajímavou komplexaci s D-glukosou jako jeden z mála, zatím popsaných, ve vodě rozpustných, porfyrinů⁷⁸. Aplikací získaného principu na další látky se otevírá možnost cílené přípravy selektivních sensorů pro praktické elektroanalytické⁷⁹ či komponent pro elektrooptické⁸⁰ aplikace a fotodynamickou terapii.⁸¹

Jako výchozí karbonylová sloučenina byl připraven aldehyd typu **74**, odvozený od různých typů steroidních skeletů.

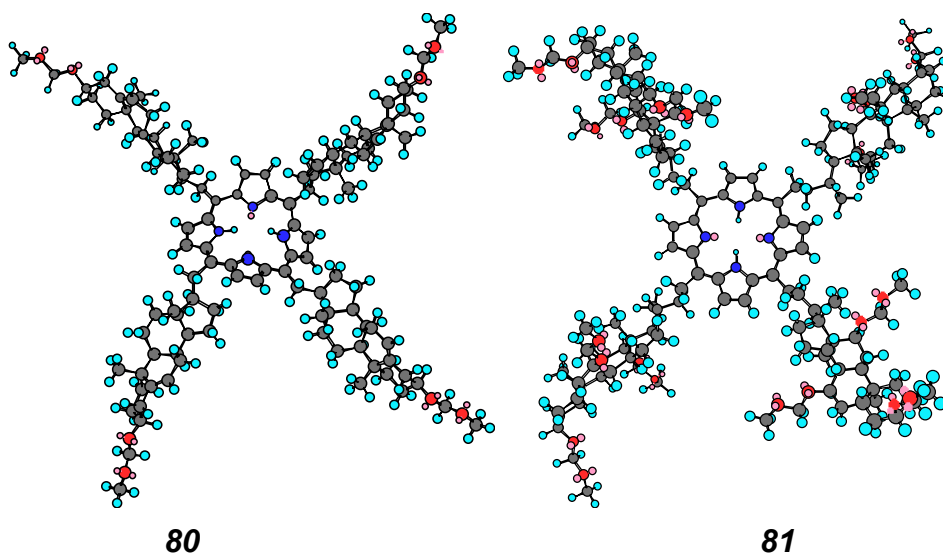


Více substituované cholové kyseliny (**75**) byly použity jako prekursor s přesně definovanou stereochemií, jenž může po odblokování vést k systémům s nevelkou energetickou bariérou pro konformaci, jenž však mohou, vzhledem k nízkým rotačním bariérám kolem vazeb spojujících steroid a porfyrin, vytvořit komplexující systémy u kterých jsou všechny hydroxyly obráceny k jednomu substrátu. Mohou pak interagovat mechanismem indukovaného přizpůsobení (induced fit) s vhodným substrátem. Takový předpoklad byl experimentálně potvrzen pokusy s komplexací cukrů ve vodě.



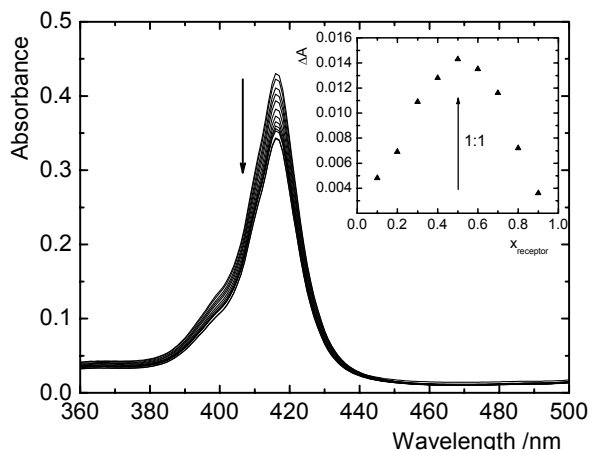


Prostorová struktura těchto látek byla studována, vzhledem k tomu, že nebyly získány krystaly, pomocí molekulového modelování programem Cambridge Software Chem3D 2002 (ver 7.0) MM2. Získané modely ukazují téměř planární heterocyklus se steroidními substituenty uspořádanými do hvězdice. U podobných systémů bylo nalezeno entropicky ovládané skládání do mnohakanálových rozetových nanotrubic.⁸²



Uspořádání $\alpha,\beta,\alpha,\beta$ (rtct) *meso*- substituovaného porfyriu se jeví jako nejvýhodnější. Právě malá zjištěná rotační bariera kolem spojky mezi steroidem a makrocylem na úrovni 1 kcal/mol potvrzuje předpoklad, že očekávané samoskladné vlastnosti nebudou mít velké energetické překážky.

Výše zmíněná komplexace ve vodě byla studována na sérii sacharidů a byly nalezeny konstanty komplexace značící významné mezimolekulární asociace ale i určitou selektivitu. Jev je dále studován.



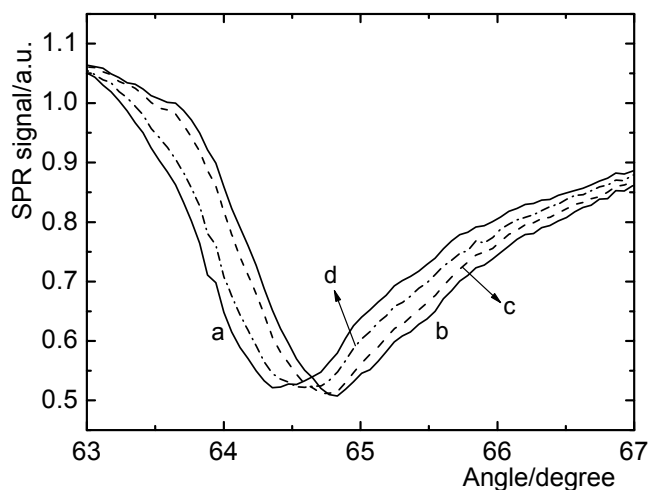
UV-VIS titrace 5.6 μM roztoku profyrinu derivatizovaného čtyřmi cholovými kyselinami roztokem maltopentaosy v 50 % 2-propanolu ukázal zajímavé změny spektrálního chování zejména změnou absorbance při 416 nm.

Tabulka I, Vazebné konstanty profyrinu **79**

sacharid	K_b/M^{-1}
D-glukopyranosa	$(3.4 \pm 0.5) \times 10^4$
maltosa	$(8.8 \pm 1.0) \times 10^4$
maltotriosa	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^5$
maltotetraosa	$(4.3 \pm 0.5) \times 10^5$
maltopentaosa	$(7.6 \pm 1.2) \times 10^5$

Experimenty byly provedeny ve vodném 2-propanolu, 1:1 (v/v). Vazebné konstanty jsou založeny na modelu 1:1 komplexu.

Byla nalezena také velmi zajímavá závislost změn chemických posunů protonů steroidní části molekuly profyrinu v závislosti na poměru koncentrací sacharidu a profyrinu, svědčící o tom, že vlastní asociace se zúčastní všechny steroidní jednotky na rozdíl od profyrinu, u něhož dochází pouze k subtilním změnám (které jsme pozorovali v UV spektru). Mechanistická představa z toho plynoucí může molekulu profyrinu přirovnat ke květu, jehož okvětní lístky se nakloní k asociujícímu se sacharidu změni svoji geometrii (do tvaru tulipánu) a přiblíží se k molekule sacharidu na vzdálenost možných interakcí, kdežto porfyrinové jádro systém pouze geometricky stabilizuje. Možnost takového chování byla potvrzena i pomocí modelování na úrovni molekulární mechaniky.

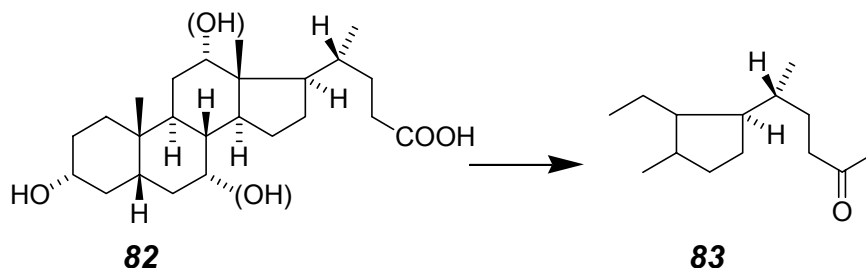


SPR látky **79** s glukosou

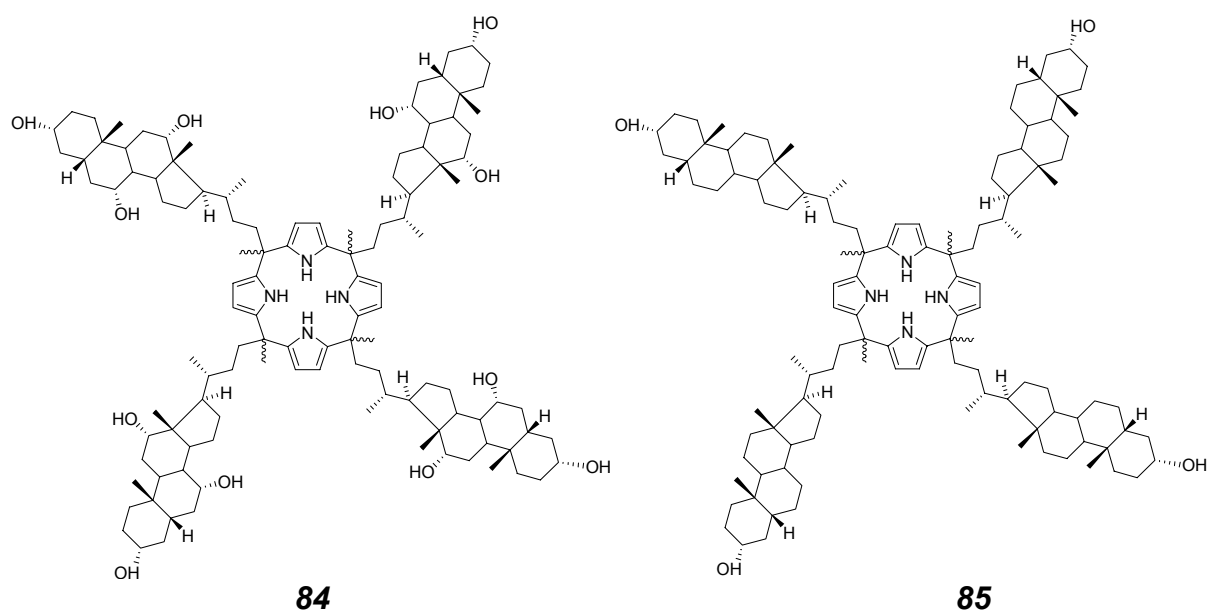
Také povrchová plazmonová rezonance (SPR) ukazuje vazbu mezi sacharidy (D-glukosa na obr. výše) a porfyrinem na povrchu zlata v měřící cele. Křivky (a) a (b) představují stav, kdy je samotný porfyrin převrstven vodou a (b) 5 mM vodným roztokem D-glukosy. Křivka (c) byla zaznamenána po omytí komplexu charakterizovaného křivkou (b) vodou poprvé a křivka (d) po sedmém omytí. Z této analýzy plyne potvrzení kvalitní interakce porfyrintetrasteroidu se sacharidem.

Samoskladné vlastnosti porfyrinu se čtyřmi zbytky cholové kyseliny a povaha mezimolekulárních sil ke skládání použitých plynou i z faktu, že se jednak mění absolutní hodnota molární elipticity s koncentrací v protickém polárním prostředí a že se tato hodnota zvýší téměř o řád při přechodu z roztoku dipolárně aprotického rozpouštědla k polárně protickému. Tento efekt slábne s rostoucí teplotou.

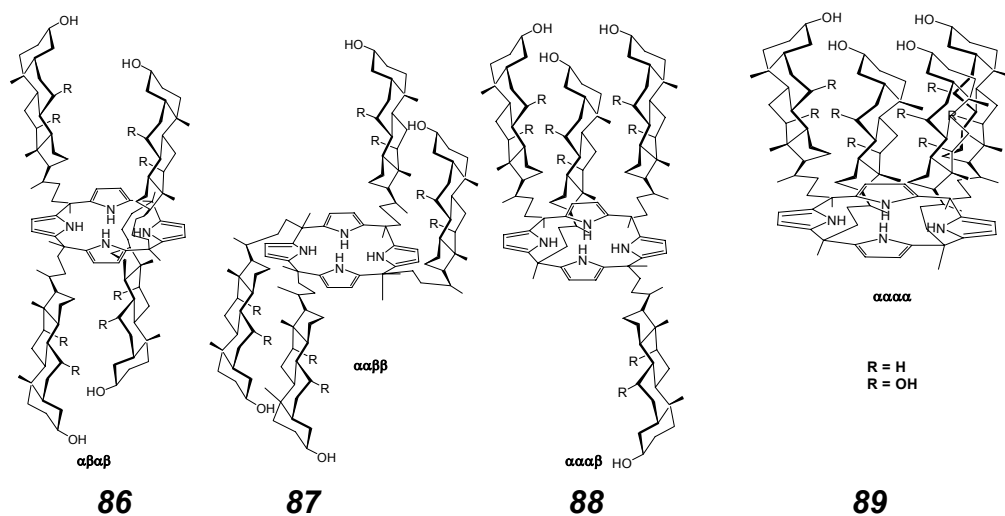
Podobně, ze steroidních ketonů typu **83**, syntetizovaných z cholových kyselin



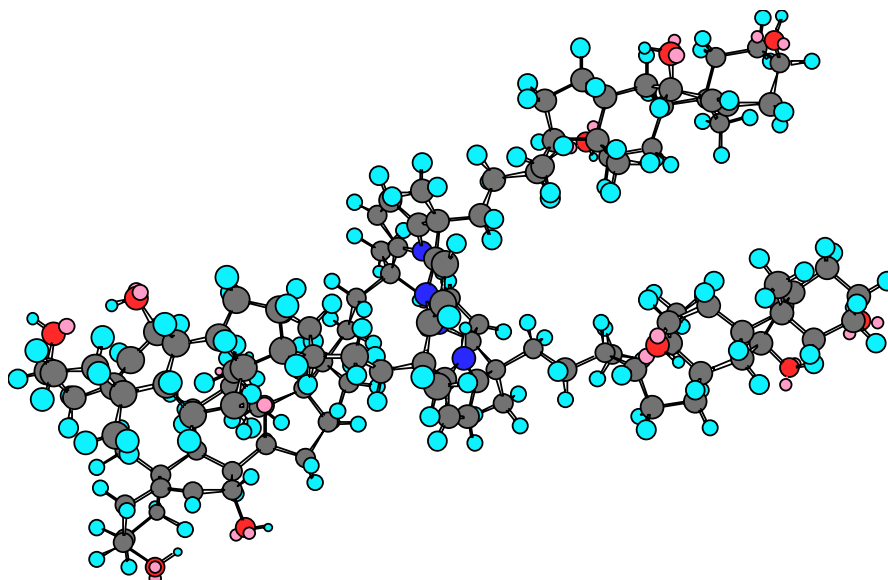
(typ **82**) byla připravena, kondenzací s pyrrolem série modelových sloučenin typu



kalix[4]pyrrolů (*meso*-oktaalkylporfyrinogenů) substituovaných opět, symetricky, v *meso*- polohách steroidy. Látku typu **84** odvozenou od lithocholové kyseliny označíme **85**.



Zajímavé uspořádání této molekuly naznačuje trubici o délce téměř 2 nm (20 Å) (kromě $\alpha\alpha\alpha\alpha$), ať již u kterékoliv stereokonfigurace, znázorněna je ta s $\alpha,\beta,\alpha,\beta$ (rtct) konfigurací steroidních substituentů, tentokrát s jejich orientací směrem téměř „kolmým“ na rovinu proloženou heterocyklem. I zde byly informace o prostorové struktuře získány molekulárním modelováním metodou MM2.



90, prostorová projekce molekuly

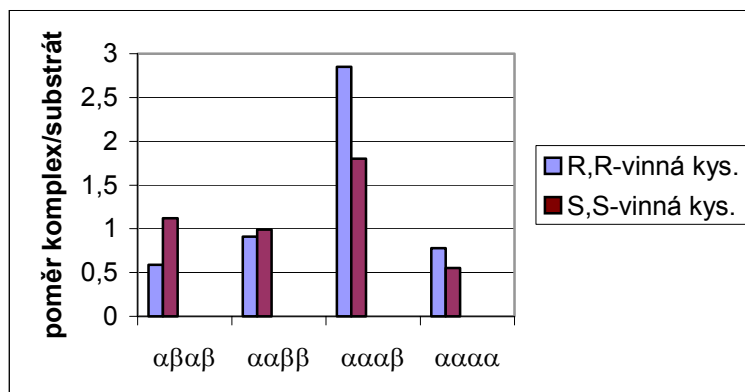
Zajímavý je i poměr izomerů získaný z kvantitativní analýzy HPLC reakční směsi. Izomer s nejvyšším zastoupením zřejmě představuje látku, která, kromě sterických faktorů souvisejících se vznikem molekuly může být favorizována i např. supramolekulárními vztahy.

Tabulka II, Zastoupení izomerů látek LXX a LXXI

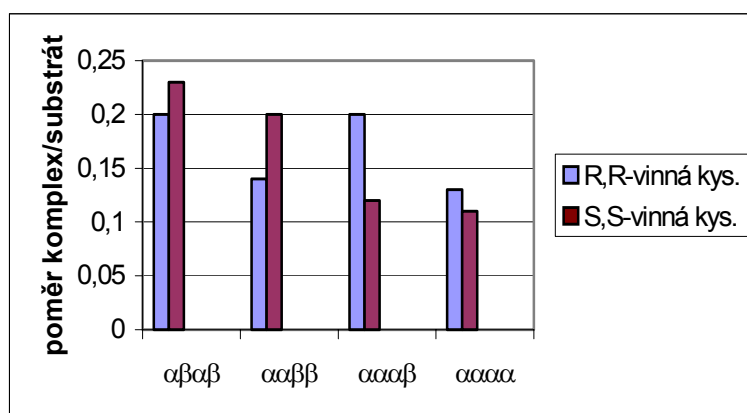
Izomer	$\alpha\beta\alpha\beta$	$\alpha\alpha\beta\beta$	$\alpha\alpha\alpha\beta$	$\alpha\alpha\alpha\alpha$
85	1	2.60	3.86	2.30
84	1	1.56	2.73	1.46

Zastoupení bylo normalizováno na izomer nejméně zastoupený.

U látky **84** jsme zjistili zajímavý rozdíl ve vazbě D- (*S,S*) a L-kyseliny vinné (*R,R*) zejména u $\alpha\alpha\alpha\beta$ a $\alpha\beta\alpha\beta$ izomeru, jak ukazuje graf:

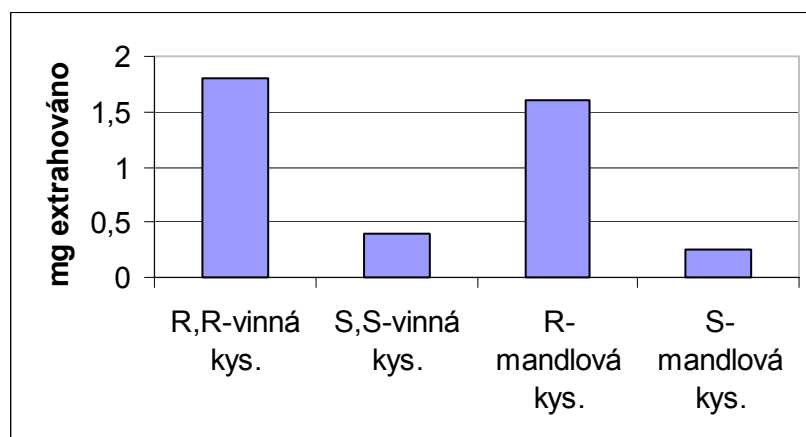


U látky **85**, odvozené od lithocholové kyseliny byla prokázána též zajímavá interakce s D- a L-kyselinou vinnou, i když chirální diskriminace nebyla zjištěna velká u žádného z izomerů. Podobně i zde je výsledek dokumentován grafem:



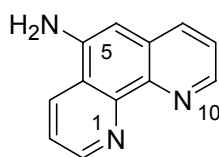
U obou těchto experimentů byl velký přebytek ($> 100 \times$) aniontu smíchan s receptorem a směs analyzována FAB-MS. Poměry pak značí poměr intenzity signálu vs. intenzita iontu. Přestože tyto výsledky ukazují výraznou asociaci a v některých případech i chirální diskriminaci je třeba je považovat za orientační, neboť ve své podstatě neumožňují odlišení některých jevů (asociace vs. stabilita iontu aj.).

Podobné výsledky byly zjištěny i pro D- (S) a L-mandlovou (R) kyselinu. Jejich praktické zdůraznění přinesl experiment s extrakcí pomocí **84** (izomeru $\alpha\alpha\alpha\beta$) dané látky z vody do dichlormethanu:



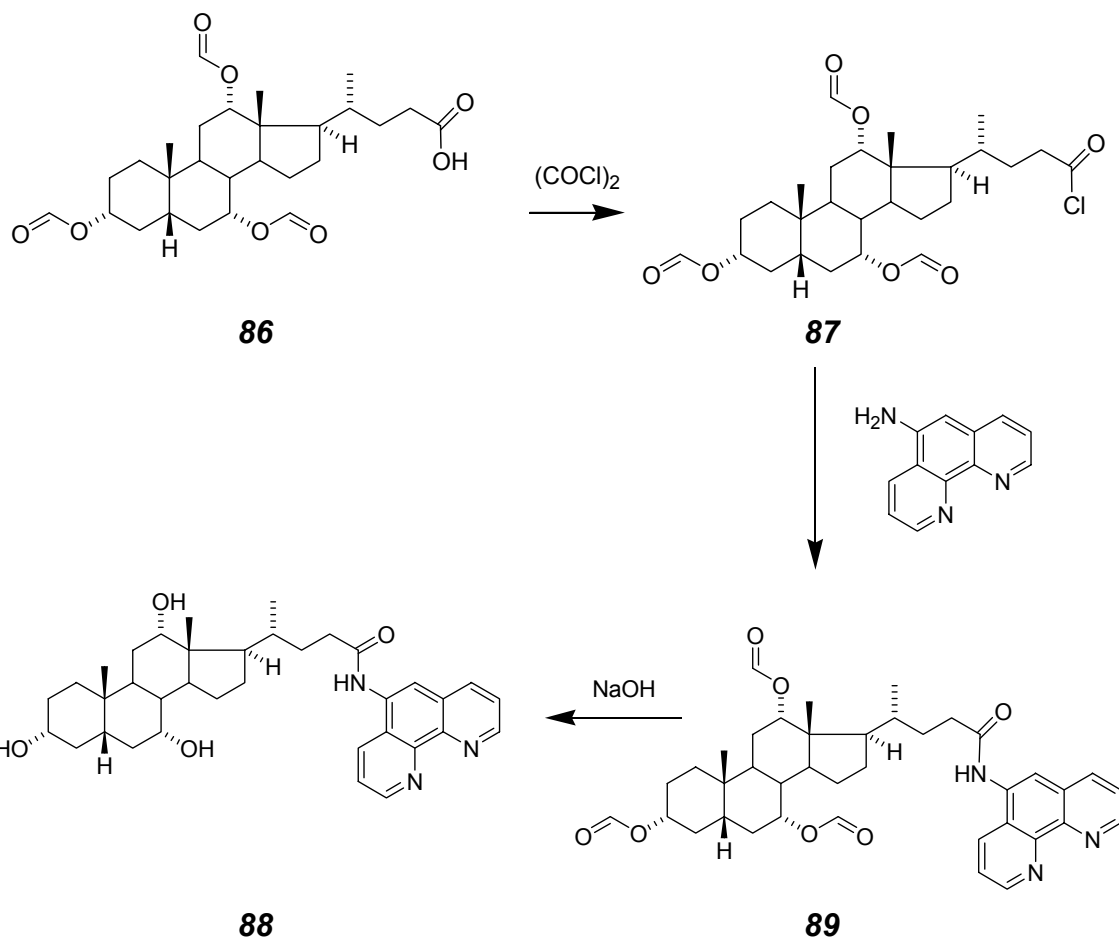
Předložené výsledky ukazují významné interakce, které v dalším rozvoji chemie i využití těchto látek mohou přinést nejen chirální rozpoznání, ale i možnost ovlivnění chemických reakcí.

Jako třetí modelovou komponentu supramolekul pro aplikaci steroidních systémů, nositelů požadovaných vlastností byl zvolen 1,10-fenanthrolinový skelet s aminovou skupinou připojenou do polohy 5.



85

Tato aminová skupina měla umožnit navázání cholové kyseliny amidickou vazbou, která je dostatečně pevná vůči hydrolyze a o níž je dostatečně známo, že se zapojuje do supramolekulových interakcí. Amidická vazba měla být dostatečně daleko od heterocyklických dusíků, aby je minimálně ovlivňovala.

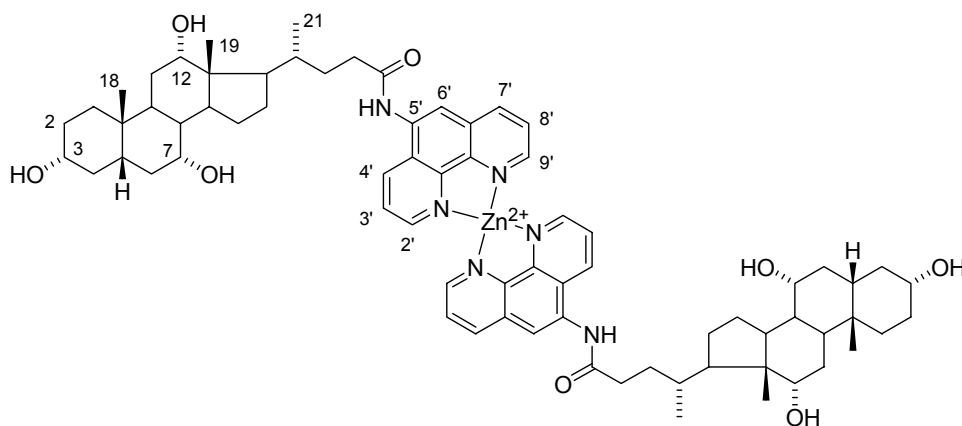


88

89

Syntetický postup vedl ke produktu **88**, který již ve velmi malých koncentracích (0,1 %) v roztocích (např. methanol-voda 1/1) tvořil stabilní gely s kvalitní fibrilární strukturou, potvrzenou řádkovací elektronovou mikroskopií (SEM). Zajímavé bylo zjištění, že cholylamidofenanthrolin tvoří po komplexaci se zinkem také gely, nicméně ve vyšší koncentraci (od 1 %, MeOH/H₂O 1/1). Takový gel byl podle SEM globulární a navíc nebyl dostatečně stabilní a za normální teploty přecházel do pravého roztoku.

Překvapivé bylo zjištění, že pravý roztok po zahřátí opět vytvořil gel, který se po ochlazení časem opět přeměnil na roztok. Odparek roztoku (vpravo) a gel (vlevo) měly strukturu skoro stejnou.



90

Prostudováním tohoto jevu se otevírají možnosti ovládní struktury gelu pomocí koordinace receptoru s různými ionty.

Vlastnosti výše uvedených supramolekul jsou dále studovány s ohledem na jejich samoskladné vlastnosti, elektrochemické parametry i jejich nezměnitelnou chirální strukturu.

Konkrétní závěry pro realizaci v praxi a další rozvoj vědy (Závěr)

Výše uvedený komentář k souboru uveřejněných prací, zpracovaný ve smyslu Směrnice Akademické rady AV ČR „Pravidla pro udělování vědeckého titulu „doktor věd“ v Akademii věd ČR“ č.j.: K – 9191/VR/03, uvádí nejdůležitější dosažené cíle a některé závěry prací jichž jsem spoluautorem. V případě prací z nejnovější doby na tématu supramolekulárních struktur přináší i nejčerstvější výsledky, jejichž časopisecké publikování v plné podobě je souběžně připravováno. Z toho důvodu jsou citovány např. i některé práce z časopisu Chemické listy a sdělení konferenční, které nebyly jinak publikovány.

Společným rysem předloženého souboru prací je:

- a/ Syntetické zvládnutí stereo- i regioselektivně ovládaného prodloužení (zavedení) steroidního bočního řetězce tak, aby bylo možno studovat serii analog a modelů biologicky aktivních steroidů;
- b/ Praktické vypracování syntéz steroidních heterocyklů využívající steroidní základnu z přírodních zdrojů tak, aby byly zachovány určené „přírodní“ stereochemické atributy;
- c/ Studium připravených látek jak fyzikálně chemickými metodami, studium jejich chromatografického, spektrálního chování asociačních jevů a případně i jejich biologické aktivity;
- d/ Moderněji, potom, syntéza a studium makrocyclických suprasystémů obsahující opět, jako přírodní chirální doménu, steroidní zbytek, jehož polarita a stereochemie mohou být velmi snadno cíleně obměňovány;
- e/ Vypracování syntézy „malých“ konjugátů, které vedly k praktické realizaci v designu soupravy na RIA detekci digoxinu a u nichž použité chemické reakce jsou používány pro syntézu nových typů, zejména asymetrických, komponent makrocyclických suprasystémů.
- f/ Syntetických cílů práce bylo dosaženo s tím, že poslední jmenovaná oblast ad d/ se jeví jako velice perspektivní a je dále intenzivně rozvíjena, např. syntézou látek ve kterých je silně omezena možnost rotace steroidních substituentů v oblasti jejich spojky s makrocyklem. Dále je rozpracováváno využití syntetizovaných látek pro konstrukci elektrod a sensorů, prakticky využívající připravené látky.
- g/ Biologické testy ukázaly několik nadějných látek, nicméně zejména proto, že se nepodařilo najít klinického partnera zajímajícího se o kardiotonika s lepším terapeutickým indexem (nižší toxicitou) byly syntetické práce v této oblasti

prozatím ukončeny. U ostatních aktivit nebyla nalezena látka s předpokládatelnou praktickou využitelností.

- h/ V syntéze vybraných komponent imunologických diagnostických souprav bylo dosaženo prakticky využitých výsledků a tato linie je dále rozvíjena ve spolupráci s endokrinology, ovšem mimo oblast steroidních heterocyklů, mimo vlastní hlavní směr, presentovaný touto předloženou prací.
- i/ V syntéze látek porfyrinového typu byla vypracována (a patentována) snadná syntéza látek, z nichž několik prvních syntetizovaných typů receptorů jsme podrobili studiu spektrálních a vazebných vlastností. Naším předpokladem je, že z látek tohoto typu bude možno sestavit nové druhy velmi specifických sensorů. Práce v této oblasti probíhají.
- j/ V oblasti syntéz kalix[n]pyrrolů byla vypracována praktická syntéza kalix[4]pyrrolů se steroidními substituenty v *meso*-polohách, m.j. jako „semi-rigid scaffold“ pro supramolekulární konstrukce. Taková konstrukce byla zkoumána na příkladu různých stereochemických uspořádání a serie sacharidů. V současné době probíhají práce na využití takových receptorů zakotvených na pevnou fázi k chirálnímu dělení.

Literatura

1. Burkert U, Allinger NL, Molecular Mechanics, American Chemical Society: Washington, DC, 1982.
2. Allinger N.L., J. Amer. Chem. Soc., 1977, 99, 8127.
3. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M., J. Comput. Chem. 1983, 4, 187.
4. Program Gaussian 98W, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
5. <http://www.cachesoftware.com/mopac/Mopac2002manual/in=dex.html#refs> [16/2 2003].
6. <http://products.cambridgesoft.com/family.cfm?FID=1> [16/2 2003].
7. Kalvoda L., J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides 1976, 3, 47.
8. Catsoulacos P., Camoutis C., J. Heterocycl. Chem. 1981, 18, 1485.
9. Kirk D.N., Shaw P.M., J. Chem. Soc., Perkin Trans 1, 1975, 2284.
10. Drašar P., Černý I., Pouzar V., Havel M., Collect. Czech. Chem. Commun. 1984, 49, 306.
11. Hantzsch A, Justus Liebigs Ann. Chem. 1888, 249, 1.
12. Kamano Y., Pettit G.R., Inoue M., Tozawa M., Komeichi Y, J. Chem. Soc. 1977, (S) 78, (M) 0843.
13. Kondo H., Ikawa S., J. Pharm. Soc. Jpn. 1933, 53, 23.
14. Pettit G.R., Kamano Y., Chem. Commun. 1972, 45.
15. Komissarenko N.F., Zoz I.G., Plant Resour., 1969, 5, 178.
16. Blazey N.D., Clin. Chim. Acta, 1977, 80, 403.
17. Yamamoto M., Kimura M., J. Chem.Soc., Chem. Commun. 1977, 948.
18. Tohma M., Tomita T., Kimura M., Tetrahedron Lett., 1973, 1973.
19. Matile S., Nakanishi K., Angew. Chem., Int. Ed., 1996, 35, 757.
20. Černý I, Buděšínský M, Pouzar V, Drašar P. Collect. Czech. Chem. Commun. 2001, 66, 933.

-
21. Černý I, Pouzar V, Buděšínský M, Drašar P. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2000, 65, 1597.
 22. Gouin S., Zhu X.X., Lehnert S., *Macromolecules*, 2000, 33, 5379.
 23. Pettit G.R., Inoue M., Kamano Y., Herald D.L., Arm C., Dufresne C., Christie N.D., Schmidt J.M., Doubek D.L., Krupa T.S., *J. Amer. Chem. Soc.* 1988, 110, 2006.
 24. Shawakfeh K.Q., Al-Ajlouni A.M., Ibdah A., *Acta Chim. Slov.* 2002, 49, 805.
 25. Taubert H.-D., Kuhl H., US Patent 1973, 3,916,002; *Chem. Abstr.* 1976, 84, 59864.
 26. Davis P.A., Bonar-Law R.P., Sanders J.K.M., *Comp. Supramol. Chem.* 1996, 264.
 27. Gouin S., Zhu X.X., Lehnert S., *Macromolecules*, 2000, 33, 5379.
 28. Janout V., Jing B., Staina I.V., Regen S.L., *J. Amer. Chem. Soc.* 2003, 125, 4436.
 29. Davis A.P., Joos J.B., *Coord. Chem. Rev.*, 2003, 240, 143.
 30. Zhu X.X., Nichifor M., *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 539.
 31. Virtanen E., Nissinen M., Suontamo R., Tamminen J., Kolehmainen E., *J. Mol. Struct.* 2003, 649, 207.
 32. Virtanen E., Valkonen A., Tamminen J., Kolehmainen E., *J. Mol. Struct.* 2003, 650, 201.
 33. Dias J.R., Pascal R.A., Morril J., Holder A.J., Gao H., Barnes C., *J. Amer. Chem. Soc.* 2002, 124; 4647.
 34. Dias J.R., Gao H., Kolehmainen E., *Spectrochim. Acta, A*, 2000, 56, 53.
 35. Ropponen J., Tamminen J., Kolehmainen E., Rissanen K., *Synthesis*, 2003, 2226.
 36. Shen Y., Livant P., *Book of Abstr. 217 ACS Natl Meeting*, ORGN-085; 1999, *Chem. Abstr.* 1999, 145518.
 37. Li Y., Dias J.R., *Org. Prep. Proced. Int.*, 1996, 28, 203; *Synthesis*, 1997 425.
 38. Zhu X.-X., Nichifor M., *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 539.
 39. Willemen H.M., Vermonden T., Marcelis A.T.M., Sudholter E.J.R., *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 2329.
 40. Geiger C., Stanescu M., Chen L., Whitten D.G., *Langmuir*, 1999, 15, 2241.
 41. Lu L., Cocker T.M., Bachman R.E., Weiss R.G., *Langmuir*, 2000, 16, 20.
 42. Král V., Rusin O., Shishkanova T., Volf R., Matejka P., Volka K., *Chem. Listy*, 1999, 93, 546.
 43. Kim Y.H., Hong J.I., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2947.
 44. Takeguchi M., Ikeda M., Sugasaki A., Shinkai S., *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34, 865.

-
45. Rusin O., Lang K., Král V., *Chem. Eur. J.*, 2002, 8, 655.
 46. Ladomenou K., Bonar-Law R.P., *Chem. Commun.* 2002, 4, 2108.
 47. Král V., Rusin O., Schmidtchen F.P., *Org. Lett.* 2001, 873.
 48. Allen W.E., Gale P.A., Brown C.T., Lynch V.M., Sessler J.L., *J. Amer. Chem. Soc.* 1996, 118, 12471.
 49. Qiming M., Cuihua X., Shuhua C., *Huaxue Yanjiu Yu Yingyong*, 2001, 13, 473; *Chem. Abstr.* 2001, 136, 355432.
 50. Gale P.A., Sessler J.L., Král V., Lynch V., *J. Amer. Chem. Soc.* 1996, 118, 5140.
 51. Sessler J.L., Král V., Shiskanova T.V., Gale P.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 4848.
 52. Yoshino N., Satake A., Kobuke Y., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 457.
 53. Haycock R.A., Hunter C.A., James D.A., Michelsen U., Sutton L.R., *Org. Lett.*, 2000, 2, 2435.
 54. Tamaru S., Takeuchi M., Sano M., Shinkai S., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 853.
 55. Gronwald O., Snip E., Shinkai S., *Curr. Opinion Colloid Interface Sci.*, 2002, 7, 148.
 56. Baragaña B., Blackburn A.G., Breccia P., Davis A.P., Mendoza J., Padrón-Carillo J.M., Prados P., Riedner J., de Vries J.G., *Chem. Eur. J.*, 2002, 8, 2931.
 57. Mizukami F., Akiyama Y., Izutsu H., *Supramolecular Science*, 1998, 5, 433.
 58. Tamaru S., Nakamura M., Takeuchi M., Shinkai S., *Org. Lett.*, 2001, 3, 3631.
 59. van Gorp J.J., Vekemans J.A.J.M., Meijer E.W., *J. Amer. Chem. Soc.* 2002, 124, 14759.
 60. Tamaru S., Takeuchi M., Sano M., Shinkai S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, 853.
 61. Zhu X.X., Nichifor M., *Acc. Chem. Res.* 2002, 539.
 62. Swamy N., James D.A., Mohr S.C., Hanson R.N., Ray R., *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10, 3237.
 63. Brewster E.R., Shuker S.B., *J. Amer. Chem. Soc.* 2002, 124, 7902.
 64. Konoplya N.A., Kuzmitsky B.B., Lakhvich F. A., Nasek V.M., *Doklady Akad. Nauk Belarus.*, 1996, 40, 70.
 65. Phillips-McNaughton K., Groves J.T., *Org. Lett.* 2003; 5; 1829.
 66. Mizukami F., Akiyama Y., Izutsu H., *Supramol. Sci.* 1998, 5, 433.
 67. Balaban T.S., Bhise A.D., Fischer M., Sinke-Schaetzl M., Roussel C., Vanthuyne N., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 2140.
 68. Wallimann P., Marti T., Fürer A., Diedrich F., *Chem Rev.* 1997, 1567.
 69. Brandenburger F., Matthes B., Seifert K., Strohriegl P., *Liquid Crystals*, 2001, 1035.

-
70. Sessler J.L., Camiolo S., Gale P.A., *Coord. Chem. Rev.*, 2003, 240, 17.
 71. Král V., Sessler J.L., Zimmermann R.S., Seidel D., Lynch V., Andrioletti B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, 1055.
 72. Sessler J. L., Cyr M., Furuta H., Kral V., Mody T., Morishima T., Shionoya M., Weghorn S., *Pure Appl. Chem.*, 1993, 65, 393.
 73. Sessler J.L., Anzenbacher P., Jursíková K., Miyaji H., Genge J.W., Tvermoes N.A., Allen W.E., Shriver J.A., Gale P.A., Král V., *Pure Appl. Chem.*, 1998, 70, 2401.
 74. Gladiali S., Chelucci G., Mudadu M. S., Gastaut M.-A., Thummel R.P., *J. Org. Chem.* 2001, 400.
 75. Jung J.H., Nakashima K., Shinkai S., *Nano Lett.*, 2001, 145.
 76. Rothmund P., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1938, 57, 2010 a *J. Amer. Chem. Soc.* 1938, 57, 2010 a 1939, 58, 625.
 77. Yuan C., Li P., Shan J., Zhang H., *Supramol. Sci.*, 1998, 5, 751.
 78. Arimori S., Takeuchi M., Shinkai S., *Supramol. Sci.*, 1998, 5, 1.
 79. Zhang X.B., Guo C.C., Li Z.Z., Shen G.L., Yu R.Q., *Anal. Chem.*, 2002, 74; 821.
 80. Chen Y., Cao C., Xie T., Wang X., Lu R., Wang D., Bai Y., Li T., *Supramol. Sci.*, 1998, 5, 461.
 81. James D.A., Swamy N., Paz N., Hanson R.N., Ray R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, 9, 2379.
 82. Fenniri H., Deng B.L., Ribbe A.E., Hallenga K., Jacob J., Thiyagarajan P. J. *Amer. Chem. Soc.*; 2001, 123; 3854; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 6487.

Summary

The presented part of a study of various steroid heterocycles was aimed towards the construction of new types of supramolecules with tailored properties, their study and the search of their possible utilization. As the supporting base were exploited several typical crosslinked spheres of interest, whose we can separate just methodically: a) steroidal heterocycles in the syntheses employed in the steroid side chain construction; b) synthesis of steroid heterocycles as compounds with potential biological activity; c) synthesis of small conjugates of steroidal heterocycles; d) study of influence of heterocycle – steroid linkage on properties of compound synthesized; e) isolation of some special steroid heterocycles and their conjugates from natural sources; f) study of the physico-chemical and biological properties of compounds prepared and isolated, g) molecular modeling.

Common feature of the collected works is:

- a/ Synthetic control of stereo- and regio-selective prolongation (introduction) of the steroid side chain with a possibility to study the range of compounds obtained as analogues and models of biologically active steroids;
- b/ Practical expansion of syntheses of steroidal heterocycles by using steroids from natural sources with utilization of their selected „natural“ functional or stereochemical attributes;
- c/ Study of the compounds prepared with different physico-chemical methods, study of their chromatographic and spectral properties, as well as the study of their association and assembly phenomena, and biological activities;
- d/ Moreover, synthesis and study of the macrocyclic suprasystems containing, again as natural chiral domain, a steroidal moiety, the polarity and stereochemistry of which could be very easy custom controlled;
- e/ Development of the synthesis of „small“ conjugates that led to the practical utilization in a design of a component for RIA detection kit for digoxin, which also enabled us to utilize the introduce these reaction procedures in the syntheses of new types of asymmetric components of macrocyclic suprasystems;
- f/ Synthetic targets of the study were achieved in a way that mainly the area ad d/ is very perspective and suitable to be further exploited, i.a. via synthesis of compounds where rotation of steroidal moieties is restrained at the connection bonding to the macrocycle. Further there is being investigated the utilization of compounds synthesized for the construction of electrodes and sensors;
- g/ Biological tests showed several interesting leading structures. However, mainly for the reason there was no possibility to find a medical partner interested in the

range of compounds prepared, some synthetic pathways were not further exploited;

- h/ In the synthesis of selected components of immunologic diagnostic sets were gained interesting new results, however this line was explored with endocrinologists aside from the steroid heterocycles line, presented by this dissertation, and is reported elsewhere;
- i/ Within the synthetic experiments of compounds of porphyrin type there was developed and patented simple synthesis of compounds that were in first several cases studied as for their binding and spectral properties. The results clearly show that it could be a way towards new types of sensors with high sensitivity. Work in this area is under further progress;
- j/ In the area of calix[n]pyrroles there was introduced a simple practical synthesis of the skeleton with steroid substituents in *meso*-positions, i.a. as a „semi-rigid scaffold“ for supramolecular constructions. This phenomenon was studied on the example of different chiral and achiral substrates and a series of saccharides. Now, the experiments with the utilization of these receptors bonded to solid phase for chiral separations are studied.

Within the range of steroidal molecules and heterocycles of the supramolecular type presented, there were utilized synthetic pathways developed and all expertise gained in preceding tasks. There were synthesized new types of supramolecules and supramolecular synthons with quite new properties brought into them by their components. The new values and properties found were sometimes not expected, however, they are very interesting and important. I.a., there was studied complexation of steroidal calix[4]pyrroles with D-, or L-tartaric, and mandelic acids and found interesting differences in antipodal selectivity. There were prepared analogous, *meso*-substituted porphyrins and studied their complexation with different saccharides, from mono- to penta-saccharides, behaving differently in different media. Steroids with phenanthroline moiety showed a possibility of self-assembly mechanism control with metal coordination, etc. Despite the fact, we have in hands many interesting and promising results, we are happy to have the most interesting parts of our work ahead of us.