

PROTINÁDOROVÉ A ANTI-HIV DERIVÁTY BETULINOVÉ KYSELINY

DAVID KODR^a, MICHAELA RUMLOVÁ^b,
TOMÁŠ ZIMMERMANN^a, PETR DŽUBÁK^c,
PAVEL DRAŠAR^a a MICHAL JURÁŠEK^a

^a Ústav chemie přírodních látek, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, ^b Ústav biotechnologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc
jurasekm@vshct.cz

Došlo 22.6.20, přijato 29.6.20.

Klíčová slova: kyselina betulinová, anti-HIV-1, anti-HIV-2, protinádorová aktivita

Obsah

1. Úvod
2. Protinádorové účinky
3. Anti-HIV účinky
4. Deriváty
 - 4.1. Protinádorové deriváty
 - 4.1.1. C-3 deriváty
 - 4.1.2. C-28 deriváty
 - 4.1.3. Další deriváty
 - 4.2. Anti-HIV deriváty
 - 4.2.1. Deriváty zabraňující vstupu viru HIV-1 do buňky
 - 4.2.2. Maturační inhibitory HIV-1
 - 4.2.3. Deriváty s anti- HIV-2 aktivitou
5. Závěr

1. Úvod

Betulinová kyselina (angl. betulinic acid, **BA**) je přírodní pentacyklický triterpen lupanového typu (obr. 1) se širokým spektrem farmakologických indikací. Větší pozornost si získala v 70. letech minulého století, kdy byla pozorována její inhibiční aktivita vůči nádorovým buňkám. **BA** je bílá krystalická látka, která je téměř nerozpustná ve vodě (0,02 µg ml⁻¹, laboratorní teplota)¹ a jen omezeně rozpustná v běžných organických rozpouštědlech. Nevykazuje žádnou absorpci v UV-Vis oblasti.

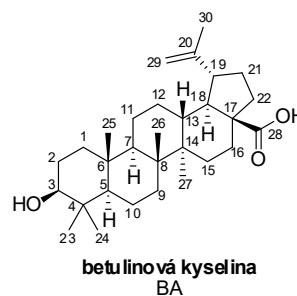
Jedna z prvních studií popisuje extrakci a izolaci **BA** z listů rostliny *Vauquelinia corymbosa*², či z listů a květů

*Hyptis emoryi*³. Nachází se ve svrchní bílé části kůry rostlin z čeledi *Betulaceae*, ale je možné ji nalézt i v jiných rostlinách, např. *Ziziphus spp.*⁴, nebo *Syzygium spp.*⁵.

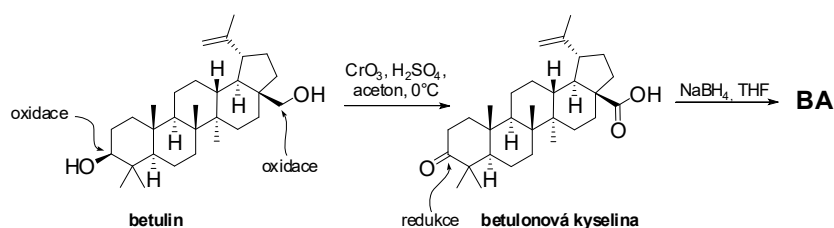
Ačkoliv je **BA** v rostlinné říši hojně rozšířeným sekundárním metabolitem, její procentuální zastoupení v samotném rostlinném materiálu není příliš vysoké. Pouhá extrakce z rostlinného materiálu tak není dostatečná pro její získávání. **BA** lze snadno připravit semisynteticky⁶ či mikrobiální biotransformací⁷ z jiného přírodního triterpenu betulinu (obr. 2), který může tvořit až 20 % váhy sušeného rostlinného materiálu⁸. Samotný výskyt betulinu v březové kůře popsal ve své práci Lowitz již v 18. století⁹. Synteticky je betulin oxidován směsí oxidu chromového a kyseliny sírové, za vzniku betulonové kyseliny. Působením NaBH₄ je v dalším kroku stereoselektivně redukována 3-oxoskupina za vzniku **BA** (obr. 2).

I přes nízkou rozpustnost ve vodných roztocích si **BA** získává velkou pozornost svým širokým spektrem více či méně zajímavých účinků. Velkou výhodou je také její velmi nízká toxicita 500 mg kg⁻¹ (mysš)¹⁰. K méně významným účinkům **BA** patří slabá antimikrobiální¹¹ či spasmogenní¹² aktivita. Zajímavějším faktem je, že byla pozorována toxicita *in vitro* proti parazitickému prvokovi *Plasmodium falciparum*¹³. Nicméně nepříznivé výsledky testů *in vivo*, potenciální využití **BA** jako nového antimalarika vyloučily¹⁴. V současné době jsou, především v zemích zasažených epidemií, vyvíjeny nové a účinnější deriváty, které by bylo možné využít jako účinný lék¹⁵. Jedna ze současných studií též naznačuje možné využití **BA** při léčbě diabetu druhého typu¹⁶. Jak již bylo uvedeno výše, **BA** je jen velmi málo toxická. O to překvapivější je pak její selektivní cytotoxicita vůči nádorovým buňkám¹⁰. V neposlední řadě patří k významným účinkům **BA** antivirová aktivita vůči viru HIV (cit.¹⁷).

Mimo svou širokou škálu biologických aktivit je také **BA** ne vazebnými interakcemi schopna v některých organických rozpouštědlech¹⁸ samoskladby (self-assembly). Díky tomuto procesu mohou pak vznikat různé supramolekulární systémy, které vytváří stabilní gely. Těto vlastnosti



Obr. 1. Číslovaná struktura betulinové kyseliny



Obr. 2. Příprava BA z betulinu

může být využito především v kombinaci s deriváty lépe rozpustnými ve vodě, k vytvoření cíleného systému dávkování léčiv¹⁹. Mast obsahující 20 % BA byla předmětem klinického testování (číslo NTC00346502) pro léčbu dysplastického névu, nicméně proces testování byl z finančních důvodů pozastaven.

Zastoupení v přírodě, dobrá dostupnost, protinádorové, antivirové účinky a velmi nízká toxicita dělají z BA ideálního kandidáta pro vývoj nového léčiva. V současnosti je BA předmětem mnoha rozsáhlých studií. Vývoj nových derivátů BA se nejčastěji soustřeďuje na modifikace vedoucí ke zlepšení biodostupnosti a zvýšení konkrétní biologické aktivity.

2. Protinádorové účinky

Asi nejzajímavější vlastností BA je její selektivní cytotoxicita. BA vyvolává apoptózu celé řady nádorových buněk již při nízkých nanomolárních koncentracích, avšak na nenádorové buňky vliv nemá²⁰. Schopnost vyvolat selektivní apoptózu má za následek nebývale příznivý terapeutický index. To BA staví oproti, v současnosti užívaným léčivům pro terapii rakoviny (např.: taxol, vinkristin), do naprosto výsadní pozice. Většina těchto látek je silně cytotoxická, a to nejen vůči nádorovým buňkám, ale také vůči buňkám normálním, což může mít za následek i nežádoucí vedlejší účinky. Ačkoliv je mechanismus zodpovědný za selektivitu stále předmětem diskusí, předpokládá se souvislost s nižším pH ($\leq 6,8$) v nádorových buňkách, které pravděpodobně napomáhá absorpci této slabé organické kyseliny²¹. BA potlačuje některé deubiquitinasy a snižuje tak celkovou hladinu onkoproteinů, což by mohlo také vysvětlovat výše zmiňovaný selektivní účinek²².

Další výhodou BA je její mechanismus účinku, neboť neexistuje pouze jedna dráha, ale hned několik možných způsobů, kterými je schopna vyvolat programovanou buněčnou smrt. Jedním je přímé působení BA na mitochondriální membránu. Předpokládá se, že je BA inkorporována do fosfolipidové dvojvrstvy. Dochází k významnému zvýšení permeability vnější membrány, její depolarizaci a uvolnění cytochromu *c* do cytosolu. Ten je následně zodpovědný za spuštění apoptózy, přičemž tento proces je nezávislý na proteinu p53 (cit.²³). Mimo jiné dochází ke vzniku reaktivních kyslíkových částic (ROS – z angl. Reactive Oxygen Species), které způsobují nespecifická po-

škození^{24,25}. V normálních (nenádorových) buňkách je funkce BA opačná, kde má spíše funkci antioxidantu a napomáhá vychytávání ROS (cit.²⁶). V důsledku poškození mitochondrií je indukována kaspasová aktivita (aktivuje kaspasu 3 a 8)²⁷. Obvykle dochází k vychlípení buněčné membrány, ke smršťování buněk, fragmentaci DNA a ke kondenzaci a fragmentaci jádra²³. BA dále vykazuje inhibiční aktivitu vůči topoisomerase I²⁸ a proteasom dependentní i independentní regulační cestou je zodpovědná za inhibici funkce transkripčního faktoru Sp1, Sp3 a Sp4 (cit.²⁹). Také je schopna inhibovat aktivaci stresového transkripčního faktoru NF- κ B, který zajišťuje rezistenci poškozených, tedy i nádorových buněk vůči apoptóze. Právě tato vlastnost by mohla být využita při prevenci vzniku rakoviny³⁰. Ačkoliv jiná studie poukazuje na fakt, že v závislosti na buněčné linii může být tento transkripční faktor BA spíše aktivován³¹. Poněkud odlišný způsob, jakým je inhibován růst tumoru v organismu, je kompletní, či alespoň částečné zpomalení angiogeneze. Předpokládalo se, že BA je schopna inhibovat významný angiogenní faktor aminopeptidasu N (ANPEP gen). Způsob, jakým k inhibici dochází, nebyl objasněn³². Pozdější studie nakonec ukázaly, že antiangiogenního efektu je dosaženo spíše skrze modulaci mitochondrií³³. Byla také prokázána schopnost zastavení buněčného cyklu v G₂, nebo v M fázi, nicméně bez jasného mechanismu³⁴.

Schopnost vyvolávat apoptózu a inhibovat další růst byla u BA i jejích derivátů studována *in vitro* na mnohých buněčných liniích jednotlivých typů tumorů. V některých případech pak probíhaly i další studie *in vivo* na myších. Apoptóza a inhibice růstu byla postupně pozorována u mnohých buněčných linií nádorových buněk, které jsou zodpovědné za melanom¹⁰, neuroblastom, medulloblastom, leukémii, rakovinu tlustého střeva, prsu a plic²³, gliom³⁵, rakovinu prostaty³⁶, rakovinu vaječnicků³⁷, rakovinu děložního čípku³⁸, endoteliální karcinom³⁹, rakovinu krku, hlavy a slinivky⁴⁰, rhabdomyosarkom, osteosarkom, hepatocelulární karcinom⁴¹ či rakovinu jícnu⁴². Předmětem dalších studií je také možnost synergických účinků s jinými, při chemoterapii již využívanými, látkami a možné kombinované využití BA za současné radioterapie. Byl popsán aditivní efekt BA a ionizujícího záření při inhibici růstu některých nádorových buněk^{43,44}. Stejně tak v kombinaci BA s některými současnými protinádorovými léčivy (jako např. doxorubicinem, VP16, taxolem, mithramycinem A, cisplatinou či vinkristinem^{40,45}) bylo

dosaženo duálního efektu při indukci apoptózy. Při kombinovaném podávání bylo pozorováno zvýšení citlivosti rezistentních tumorů, např. vůči 5-fluoruracilu, či oxaliplatině⁴⁶.

3. Anti-HIV účinky

Obdobně jako jiné pentacyklické triterpeny byla v minulosti u **BA** testována anti-HIV aktivita. Tato vlastnost byla úspěšně prokázána, ačkoliv výsledky testů nebyly příliš uspokojivé, neboť zmíněný účinek byl pozorován až při poměrně vysokých koncentracích¹⁷. Výsledky této studie však nevyhnutelně vedly k syntéze a testování řady derivátů. Jeden z prvních pozitivních výsledků přinesl derivát kyseliny betulonové – RPR103611 (obr. 6, **19a**), který vykazoval mnohonásobně vyšší aktivitu vůči viru HIV (cit.⁴⁷). Významným derivátem s velmi silnou inhibiční aktivitou byl 3-*O*-(3,3-dimethylsukcinylderivat betulonové kyseliny, neboli bevirimat⁴⁸. Nicméně u dospívajících samčích kryš byla zjištěna toxicita vůči dopaminergním a serotoninergním nervovým zakončením, za současného podání bevirimatu a metamfetaminu. Vzhledem k tomu, že významné procento nakažených virem HIV je také drogově závislých, může být vyvolána neurotoxicita závažným problémem při aplikaci léčiva⁴⁹.

Většina léčiv určených pro antiretrovirální terapii (ART) působí několika různými mechanismy. Jedná se nejčastěji o inhibitory reverzní transkriptasy, proteasy, či integrasy⁵⁰. Současná kombinovaná ART nedokáže kompletně zastavit infekci, pouze potlačuje její projev. Dlouhodobá terapie má tak za následek několik významných negativ vedoucích k selhání léčby jako např. chronická toxicita⁵¹, nutnost velmi dobré spolupráce pacienta⁵², a především se při dlouhodobém podávání jednoho typu léčiva zvyšuje riziko vzniku rezistentních kmenů⁵³. Současným trendem je tak hledání nových látek, jejichž mechanismy jsou založeny na odlišném principu. RPR103611 zabraňuje tvorbě komplexu „virová částice – napadená buňka“, znemožňuje tak vstup infekčních částic viru HIV-1 do neinfikovaných buněk⁴⁷. Velmi brzy byla objevena rezistence kmenů s mutací v glykoproteinu gp41 virové obálky⁵⁴. Unikátní mechanismus blokáce vstupu není v ART příliš běžný, a proto by mohlo být v kombinované léčbě dosaženo významného pokroku. Jiným příkladem je právě druhý jmenovaný derivát, bevirimat. Ten působí jako inhibitor dozrávání částic viru HIV-1 (maturační inhibitor)⁴⁸. Inhibice dozrávání virových částic se skutečně ukazuje jako kritický bod zásahu⁵⁵. Během fáze dozrávání virová proteasa opakovaně štěpí Gag polyprotein za současného uvolnění jednotlivých strukturních proteinů. Posledním krokem je štěpení p25 Gag (CA/SP1) na funkční p24 (CA) protein. Inhibicí posledního kroku vznikají virové částice s nesprávně vytvořenou maturní kapsidou, které nejsou schopny další infekce⁵⁶. Bevirimat postoupil do druhé fáze klinického testování^{57–59}. Během fáze II byla pozorována redukce viru pouze u 40–50 % pacientů. U zbylé části došlo ke vzniku rezistence přirozenou polymorfni variací v Gag polyproteinu. Další klinické studie tohoto léčiva byly zastaveny⁶⁰. Většina derivátů **BA**

je připravována a studována s vizí vývoje léčiva pro pacienty nakažených rizikovějším virem HIV-1. Některé deriváty **BA** byly též úspěšně testovány vůči méně rozšířenému a pomaleji postupujícímu kmenu viru HIV-2 (cit.⁶¹).

4. Deriváty

Vzhledem k výše zmíněným významným vlastnostem **BA** není žádným překvapením, že se jí začalo věnovat velké množství výzkumných skupin po celém světě. Předmětem jejich studií je jak zkoumání podrobného mechanismu účinku v jednotlivých případech aplikace, tak výzkum zabývající se přípravou a testováním nových derivátů. Největší překážkou v uvedení do klinické praxe je právě lipofilní charakter této látky. Za posledních několik desítek let byly připraveny stovky derivátů, které mnohdy vykazovaly lepší rozpustnost ve vodě. Nicméně s derivatizací se například vytratil sledovaný efekt, došlo k rychlému vzniku rezistence, či k dramatickému zvýšení toxicity vůči normálním buňkám. U protinádorových preparátů dochází často ke ztrátě inhibiční aktivity vůči některým typům tumoru, ale k významnému posílení účinku vůči jinému typu tumoru. U anti-HIV derivátů bylo pak nalezeno několik tzv. „vůdčích struktur“, neboli strukturních motivů **BA** pravděpodobně vedoucích k vytvoření účinného léčiva. Na základě pozorovaných vztahů mezi strukturou a aktivitou derivátů **BA** jsou neustále připravovány nové, účinnější látky proti HIV, rakovině, či malárii.

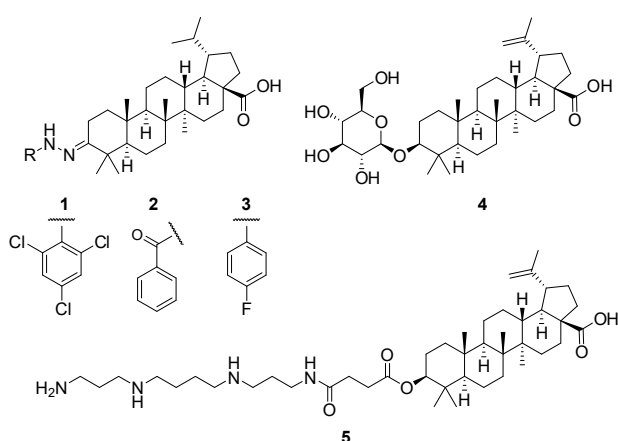
Nejčastěji se **BA** modifikuje v polohách C-3 a C-28. Při adici na dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku C-20 a C-29 nedochází obvykle k výraznému posílení aktivity, naopak se aktivita často vytrácí. Tento poznatek platí obecně jak pro protinádorové, tak i pro anti-HIV účinky^{28,36,62}.

Zvýšené rozpustnosti nemusí být dosaženo jen zaváděním polárních funkčních skupin, ale také například přípravou farmaceuticky akceptovatelných solí⁶³, vytvořením inkluzního komplexu s vhodným nosičem, kterým může být například β -cyklodextrin⁶⁴, či formulací do liposomu²⁹.

4.1. Protinádorové deriváty

4.1.1. C-3 deriváty

Kyslík vázaný v poloze C-3 (obr. 1) se zdá být esenciálním substituentem¹⁷. Oxidovaná forma **BA**, betulonová kyselina (obr. 2) je aktivnější například vůči melanomu⁶⁵. Na druhou stranu je i typickým případem, kdy dochází ke ztrátě aktivity například vůči rakovině prostaty či plic⁶². Acetylace hydroxyly v poloze C-3 nemá významnější vliv na změnu cytotoxicity³⁶, nicméně některé 3-*O*-acylderiváty s elektronegativními substituenty vykazují silné antiangiogenní účinky³⁹. Kyslíkový atom může být také nahrazen atomem dusíku (obr. 3). Například deriváty 3-hydrazono-20,29-dihydrobetulonové kyseliny (**1–3**) vykazují podstatně vyšší toxicitu vůči endotheliálnímu karcinomu plic³⁹. Z řady glykosylovaných derivátů byla největší pozornost věnována β -D-glukopyranosidu **BA** (**4**), který vykazoval dobrou rozpustnost a zvýšenou cytotoxicitu vůči rezistentním nádorovým buňkám^{66,67}. Za účelem zvý-

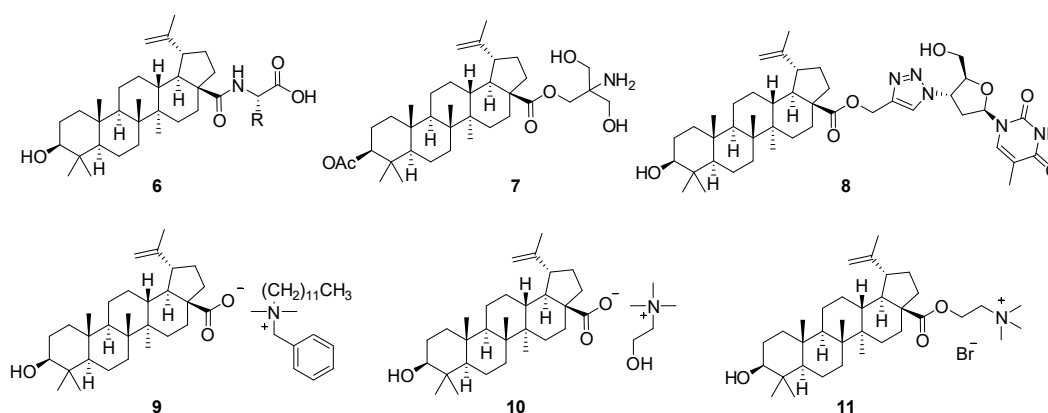


Obr. 3. Významné protinádorové C-3 deriváty

šení rozpustnosti byla aplikována strategie konjugace **BA** za vzniku tzv. proléčiva, které se v organismu enzymaticky rozštěpí. Příkladem mohou být C-3 konjugáty s rozvětvenými polyethylenglykolovými spojovacími můstky (PEGy), které jsou 250–750× rozpustnější ve vodě a zároveň dochází k zachování protinádorové aktivity⁶⁸. Jiným přístupem může být zavádění polyaminů. Sperminový C-3 derivát (**5**) vykazoval velmi dobrou cytotoxicitu například vůči buňkám rakoviny prsu. Analogický C-28 derivát **BA** byl toxický i na normální buňky⁶⁹. Tyto amfifilní molekuly jsou díky přítomnosti sperminového řetězce schopny utvářet zmiňované supramolekulární gely¹⁹.

4.1.2. C-28 deriváty

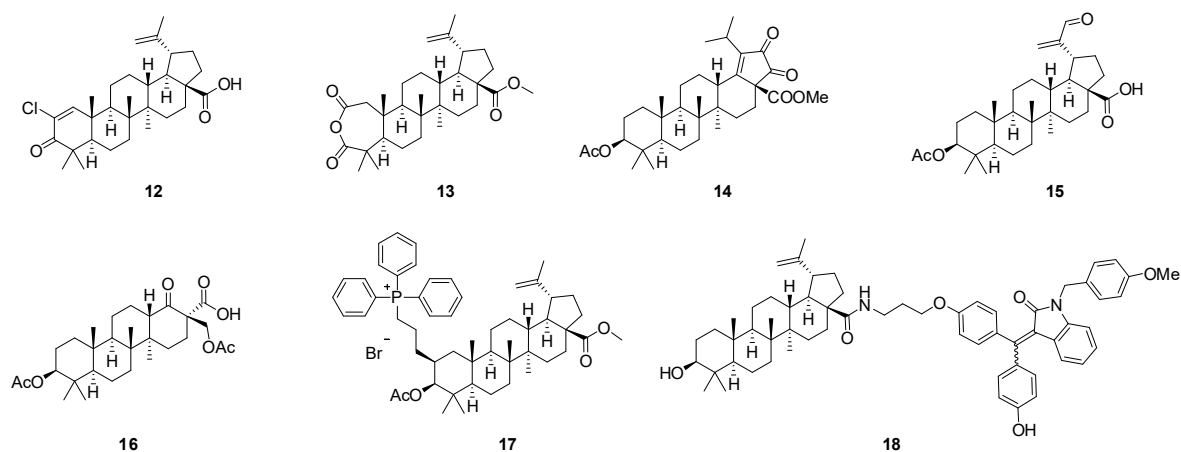
Při porovnávání oxidovaných forem betulinu, který sám o sobě nevykazuje příliš silné cytotoxické účinky, bylo zjištěno, že mezi vlastnostmi C-28 aldehydu a **BA** není příliš velký rozdíl^{70,71}. Tímto zjištěním byl vyvrácen původní předpoklad, že pro účinnost je nezbytná přítomnost karboxylové skupiny v poloze C-28 (obr. 1) a dále se předpokládá, že právě karbonylová skupina je esenciálním

Obr. 4. Významné protinádorové C-28 deriváty **BA**

farmakoforem. Nejčastější modifikací v této poloze je tvorba esterů, či amidů (obr. 4). Příprava amidů s aminokyselinami může zvyšovat rozpustnost ve vodě⁷² (**6**). Speciálním případem C-28 derivátů je látka NVX-207 (**7**), kdy při deacetylaci v poloze C-3 dochází ke ztrátě aktivity. Tato látka vykazuje velmi dobrou rozpustnost, selektivitu a též je cytotoxická vůči široké škále nádorových buněčných linií⁷³. Obdobně jako u C-3 derivátů byla navržena proléčiva modifikovaná v poloze C-28, jako např. 28-O-β-D-glukuronopyranosid **BA** (cit.⁷⁴). Azidothymidinový derivát **BA** (**8**) připravený „click“ reakcí vykazoval oproti **BA** téměř čtyřnásobnou účinnost vůči některým typům rakoviny.⁷⁵ Výhodou iontových sloučenin **BA** je minimální strukturální modifikace a výrazné zvýšení rozpustnosti. K „vysolování“ je možné použít látky, které jsou farmaceuticky akceptovatelné, netoxické, případně disponující aditivní biologickou aktivitou. Předpokládá se, že vzhledem k mírně kyselému prostředí v nádorových buňkách dochází po vstupu do buňky k obnovení původní struktury. Mezi látky, u kterých byla prokázána významná selektivní cytotoxicita, patří deriváty benzalkoniových a choliniových kationtů (**9–10**, obr. 3)⁷⁶. Tyto deriváty vykazují též velmi dobrou anti-HIV aktivitu skrze inhibici dimerizace proteasy, čímž se zásadně liší v mechanismu účinku od níže rozebíraných derivátů s anti-maturační aktivitou, působící na kapsidový protein⁷⁷. Na základě předpokladu dobré rozpustnosti iontových sloučenin byly dále připraveny účinné estery **BA** s ligandy obsahujícími kvartérní amoniou skupinu v molekule (**11**)⁷⁸.

4.1.3. Další deriváty s protinádorovou aktivitou

Řada studií se zabývá modifikacemi kruhu lupanového skeletu (obr. 5). Mezi látky, které stojí za pozornost, patří enony, odvozené od betulonové kyseliny s elektronegativním substituentem v poloze C-2 (obr. 1 a obr. 5), které vykazují až 59× vyšší cytotoxicitu než **BA** (**12**)⁷⁹. *Seko*-anhydridy vykazují významné posílení cytotoxicity vůči mnohým nádorovým buněčným liniím (**13**)⁸⁰. Studie zabývající se derivatizací kruhu E demonstruje potenciál „nové“ skupiny velmi účinných látek souhrnně označovaných jako betulininy (**14–16**). Řada z nich vyka-



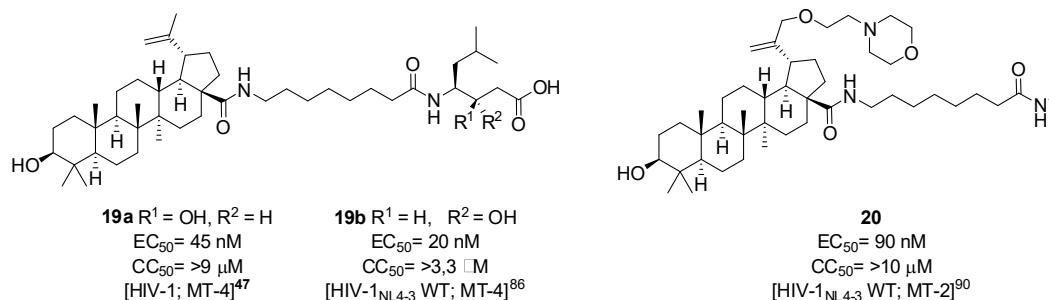
Obr. 5. Další protinadorové deriváty BA

zuje cytotoxicitu i proti rezistentním liniím nádorových buněk, ačkoliv nebyla prokázána jejich zvýšená solubilita ve vodných roztocích⁴¹. Byla připravena celá řada silně cytotoxických solí BA (34–40× účinnějších než BA), jež mají ve své struktuře vázaný trifenylofosfoniový kation (reprezentativní příklad – látka 17). Tyto sole byly navrženy na základě faktu, že kationový trifenylofosfoniový zbytek ($R\text{-PPh}_3^+$) v molekulách je schopen cíleně transportovat biologicky aktivní látky do mitochondrií nádorových buněk⁸¹. Pro možné využití BA v radioterapii a pro sledování distribuce BA *in vivo* (případně diagnostice) byl připraven derivát značený ¹³¹I (molekulární struktura derivátu není v publikaci vyobrazena). Byla prokázána selektivní akumulace v nádorových buňkách. Iodovaný derivát by mohl najít uplatnění v radioterapii, zvláště při léčbě hepatocelulárního tumoru cílenou radionuklidovou brachyterapií⁸². Pro bližší porozumění účinku a detekci za současného vyvolání apoptózy byl syntetizován konjugát BA-bis (aryliden)indolu (18). Touto studií byla potvrzena selektivní buněčná lokalizace i cytotoxicita proti nádorovým buňkám v porovnání s doxorubicinem⁸³.

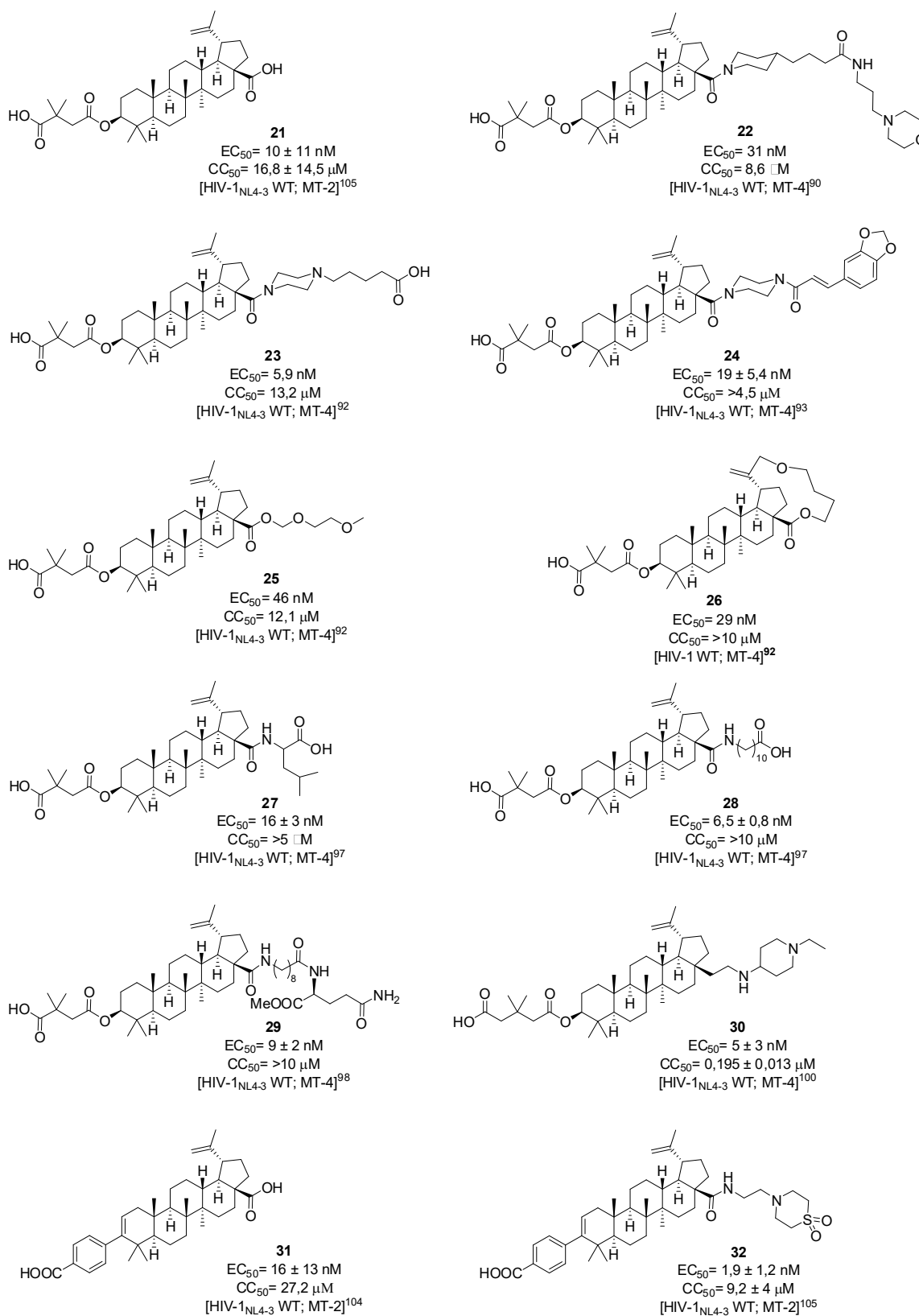
4.2. Anti-HIV deriváty

4.2.1. Deriváty zabraňující vstupu viru HIV-1 do buňky

Jak již bylo uvedeno výše, jedním z prvních derivátů BA, u kterého byla prokázána schopnost zabránit vytvoření komplexu „infekční částice viru HIV-1 a napadené buňky“ byl derivát γ -aminokyseliny ((3*S*,4*S*)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanové kyseliny) RPR103611 (19a, obr. 6)⁴⁷ a jeho isomeru IC9564 (19b, obr. 6)⁸⁶. Látka 19b na rozdíl od 19a pravděpodobně zabraňuje vstupu viru do buněk vazbou na jinou část glykoproteinu virové obálky (gp120). V tomto případě, jako i v dalších, dochází k mutacím a vzniku rezistence (obr. 6)⁸⁴. Závěrem těchto studií bylo, že 3 β -hydroxyl je esenciálním substituentem pro tento mechanismus účinku. Malé změny ve struktuře BA na kruhu A jsou příčinou úplné ztráty účinku. 3 β -Hydroxylová skupina není vhodným místem chemických modifikací. Stejně tak je důležitá i amidová vazba v poloze C-28, nebo délka uhlovodíkového řetězce vázaného na karbonyl^{85,86}. Aktivita derivátu pak zůstává zachována i v případě, že je 3-hydroxyaminokyselinový zbytek nahrazen L-leucinem⁸⁷. Obdobnou aktivitu a lepší rozpustnost v porovnání s látkou 19b vykazovala i látka 20 (obr. 6), která je navíc derivatizována v poloze C-29. Tato poloha se zdá být vhodným místem pro zavádění substituentů zvyšujících hydrofilitu, bez ztráty aktivity (obr. 6)⁸⁸.



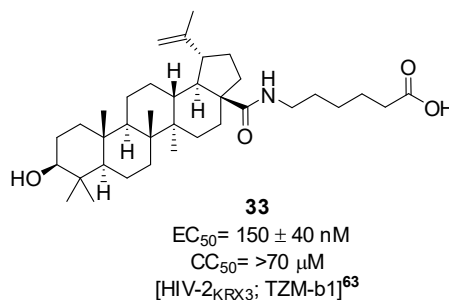
Obr. 6. Významné deriváty BA zabraňující vstupu HIV-1 do buňky



Obr. 7. Významné maturační inhibitory HIV-1

4.2.2. Maturační inhibitory HIV-1

Výše zmiňovaný C-3 ester **BA** s 2,2-dimethylsukcinanhydridem (**21**) se zdál být jedním z největších úspěchů v boji s infekcí virem HIV-1 (obr. 7)⁴⁸. Nicméně selhání léčby nakažených vedly k zastavení klinických testů. Strukturální motiv bevirimatu (**21**) je ale nesporně vhodnou předlohou pro přípravu řady jiných látek, které by disponovaly lepšími farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnostmi. Lepšího účinku pak bylo dosaženo u disubstituovaných isomerů, 3,28-di-*O*-(dimethylsukcinyl)betulinu⁸⁹. Vzhledem k zdanlivé nezaměnitelnosti substituentu v poloze C-3 bylo připraveno nepřehledné množství inhibitorů „druhé generace“ s modifikací v poloze C-28 (obr. 7). Někteří dokážou překonat rezistenci viru oproti původní sloučenině. Z těchto C-28 derivátů pak největší aktivitu vykazovala látka **22**. Navázáním cyklického sekundárního aminu je navíc dosaženo vyšší metabolické stability⁸⁸. Významný byl objev tzv. „privilegované struktury“ (volně přeložený z angl. Privileged Structures), tj. substituovaných C-28 piperazinyamidů (**23**)⁹⁰. Následnou konjugací s další „privilegovanou strukturou“ odvozenou od skořicové kyseliny (**24**)⁹¹ bylo dosaženo ještě uspokojivějších výsledků. Pojem „privilegovaná struktura“ označuje motivy, často přítomné v přírodních látkách, které mají afinitu k širokému spektru receptorů a obecně zlepšují biodostupnost, biologickou aktivitu či metabolismus léčiva^{92,93}. Za zmínku stojí také dobře rozpustný methoxyethoxymethylový derivát (**25**)⁹⁰. Vliv konformace struktury na aktivitu byl zkoumán pomocí rigidních makrocyclických derivátů (**26**), které vykazovaly účinek obdobný **21**, nicméně žádný nebyl schopen překonat přirozeně se vyskytující mutaci⁹⁴. Derivatizací **21** v poloze C-28 se podařilo připravit i duálně aktivní konstrukty, látky LH15 (**27**), LH55 (**28**) a **29**, působící jednak jako maturační inhibitory, ale současně dokáží zabránit vstupu virové částice do buňky^{95,96}. Právě kombinací více mechanismů se dá obvykle nejlépe rezistence překonat. Na základě těchto poznatků byla také připravena řada aktivních látek odvozených od 3-*O*-(3,3-dimethylglutaryl)betulinové kyseliny⁹⁷, např. alkylaminoderivátů (**30**). Tyto látky překonávají přirozenou rezistenci vzniklou polymorfni variací v Gag polyproteinu⁹⁸. Byla také připravena série derivátů **21** substituovaných v různých pozicích fluorem. Fluor je pro svou vysokou elektronegativitu a malý atomový poloměr často inkorporován do nových struktur vyvíjených jako potenciální léčiva⁹⁹. Pouze při substituci v poloze C-29 došlo k zachování anti-HIV aktivity, což naznačuje, že tato pozice by mohla být dalším vhodným místem modifikace¹⁰⁰. Příprava jiných 3-*O*-acyl derivátů vedla většinou ke ztrátě sledované aktivity¹⁰¹, nicméně právě předpoklad zachování vzdálenosti mezi uhlíkem C-3 a karboxylovou skupinou vedl k úspěšné „cross-coupling“ syntéze dalšího aktivního C-3 derivátu s navázanou benzoovou kyselinou (**31**)¹⁰². Objevení látky **31** pak nevyhnutelně vedlo k syntéze dalších derivátů, z nichž BMS-955176 (**32**) vykazovala schopnost úspěšně překonávat rezistenci, která byla zásadní překážkou u původního **21**. BMS-955176 je také velmi dobře rozpustná, tudíž je, v zásadě, možné i její perorální podání¹⁰³.



Obr. 8. Příklad inhibitoru HIV-2

4.2.3. Deriváty s anti-HIV-2 aktivitou

Většina látek, které byly dosud připraveny, ale i látky, které jsou předmětem současných studií, vykazují selektivní aktivitu vůči viru HIV-1. Ačkoliv virus HIV-2 není v civilizovaných částech světa tolik rozšířen, jde o nevyléčitelnou infekci, která vede k úmrtí pacienta. Vzhledem k tomu, že oba viry vykazují genetickou homologii pouze asi z 50 %, není žádným překvapením, že většina látek, které inhibují šíření jednoho typu, je vůči druhému typu neaktivní¹⁰⁴. Vzhledem k tomuto předpokladu vznikla série látek odvozená od RPR103611, která se lišila v délce alifatického uhlovodíku, který je vázán v poloze C-28. Bylo zjištěno, že molekula se zkráceným substituentem na řetězec o délce 5-ti uhlíků může vykazovat inhibiční aktivitu vůči viru HIV-2 (**33**, obr. 8)⁶¹.

5. Závěr

V případě hledání derivátů **BA** s anti-HIV aktivitou bylo v posledních letech učiněno mnoho zásadních pokroků vedoucích k nalezení několika vhodných kandidátů na nové léčivo. U protinádorových preparátů je pak situace poněkud komplikovanější, neboť existuje velké množství různých buněčných linií, které jsou jinak citlivé vůči rozdílným derivátům. Hledání ideálního kandidáta pro vývoj nového léčiva se tak zdá být mnohem obtížnější. Ačkoliv je **BA** intenzivně studována již od 90. let minulého století, nepodařilo se dosud připravit žádný dostatečně účinný a bezpečný derivát použitelný v klinické praxi, jež by mohl být uveden na trh jako registrované léčivo.

Tento přehledový článek vznikl z podpory interního grantu z rozpočtu na realizaci aktivit Institucionálního plánu VŠCHT Praha v roce 2020 a institucionálního grantu MŠMT A1_FPBT_2020_004.

LITERATURA

- Jager S., Winkler K., Pfuller U., Scheffler A.: *Planta Med.* 73, 157 (2007).
- Trumbull E. R., Bianchi E., Eckert D. J., Wiedhopf R. M., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.* 65, 1407 (1976).
- Sheth K., Jolad S., Wiedhopf R., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.* 61, 1819 (1972).

4. Schuhly W., Heilmann J., Calis I., Sticher O.: *Planta Med.* **65**, 740 (1999).
5. Chang C. W., Wu T. S., Hsieh Y. S., Kuo S. C., Chao P. D.: *J. Nat. Prod.* **62**, 327 (1999).
6. Kim D. S. H. L., Chen Z., Nguyen v. T., Pezzuto J. M., Qiu S., Lu Z.-Z.: *Synth. Commun.* **27**, 1607 (1997).
7. Feng Y., Li M., Liu J., Xu T.-Y., Fang R.-S., Chen Q.-H., He G.-Q.: *Food Chem.* **136**, 73 (2013).
8. Hayek E. W. H., Jordis U., Moche, W. Sauter F.: *Phytochem.* **28**, 2229 (1989).
9. Lowitz J. T.: *Chemische Annalen für die Freunde der Naturlehrere, Arzneygelahrtheit, Haushaltungskunst und Manufacturen* **2**, 321 (1788).
10. Pisha E. a 14 autorů: *Nature Med.* **1**, 1046 (1995).
11. Wachter G. A., Valcic S., Flagg M. L., Franzblau S. G., Montenegro G., Suarez E., Timmermann B. N.: *Phytomedicine* **6**, 341 (1999).
12. Bejar E., Amarquaye A., Che C., Malone M. H., Fong H. H.: *Int. J. Pharmacogn.* **33**, 25 (1995).
13. Bringmann G., Saeb W., Assi L. A., Francois G., Sankara Narayanan A. S., Peters K., Peters E. M.: *Planta Med.* **63**, 255 (1997).
14. Steele J. C., Warhurst D. C., Kirby G. C., Simmonds M. S.: *Phytother. Res.* **13**, 115 (1999).
15. de Sa M. S. a 10 autorů: *Parasitol. Res.* **105**, 275 (2009).
16. Kim S. J., Quan H. Y., Jeong K. J., Kim D. Y., Kim G., Jo H. K., Chung S. H.: *J. Agricult. Food Chem.* **62**, 434 (2014).
17. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L. M., Ballas L. M., Jiang J. B., Janzen W. P., Chen I. S., Lee K. H.: *J. Nat. Prod.* **57**, 243 (1994).
18. Bag B. G., Dash S. S.: *Nanoscale* **3**, 4564 (2011).
19. Bildziukevich U., Kaletova E., Saman D., Sievanen E., Kolehmainen E. T., Slouf M., Wimmer Z.: *Steroids* **117**, 90 (2017).
20. Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F.: *Cancer Lett.* **175**, 17 (2002).
21. Noda Y., Kaiya T., Kohda K., Kawazoe Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1665 (1997).
22. Reiner T., Parrondo R., de Las Pozas A., Palenzuela D., Perez-Stable C.: *PloS one* **8**, e56234 (2013).
23. Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer P. H., Peter M. E., Debatin K. M.: *Cancer Res.* **57**, 4956 (1997).
24. Liu W. K., Ho J. C., Cheung F. W., Liu B. P., Ye W. C., Che C. T.: *Eur. J. Pharmacol.* **498**, 71 (2004).
25. Fulda S., Scaffidi C., Susin S. A., Krammer P. H., Kroemer G., Peter M. E., Debatin K. M.: *J. Biol. Chem.* **273**, 33942 (1998).
26. Szuster-Ciesielska A., Plewka K., Daniluk J., Kanderfer-Szerszen M.: *Toxicology* **280**, 152 (2011).
27. Fulda S., Jeremias I., Steiner H. H., Pietsch T., Debatin K. M.: *Int. J. Cancer* **82**, 435 (1999).
28. Chowdhury A. R., Mandal S., Mitra B., Sharma S., Mukhopadhyay S., Majumder H. K.: *Med. Sci. Monit.* **8**, Br254 (2002).
29. Mullauer F. B., van Bloois L., Daalhuisen J. B., Ten Brink M. S., Storm G., Medema J. P., Schiffelers R. M., Kessler J. H.: *Anti-Cancer Drugs* **22**, 223 (2011).
30. Takada Y., Aggarwal B. B.: *J. Immunol.* **171**, 3278 (2003).
31. Kasperczyk H., La Ferla-Bruhl K., Westhoff M. A., Behrend L., Zwacka R. M., Debatin K. M., Fulda S.: *Oncogene* **24**, 6945 (2005).
32. Melzig M. F., Bormann H.: *Planta Med.* **64**, 655 (1998).
33. Kwon H. J., Shim J. S., Kim J. H., Cho H. Y., Yum Y. N., Kim S. H., Yu J.: *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 417 (2002).
34. Yang L. J., Chen Y., Ma Q., Fang J., He J., Cheng Y. Q., Wu Q.-l.: *Acta Pharmacol. Sin.* **31**, 66 (2010).
35. Wick W., Grimm C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1306 (1999).
36. Kim J. Y., Koo H. M., Kim D. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2405 (2001).
37. Deng Y., Snyder J. K.: *J. Org. Chem.* **67**, 2864 (2002).
38. Thurnher D., Turhani D., Pelzmann M., Wannemacher B., Knerer B., Formanek M., Wacheck V., Selzer E.: *Head Neck* **25**, 732 (2003).
39. Mukherjee R., Jaggi M., Rajendran P., Siddiqui M. J., Srivastava S. K., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 2181 (2004).
40. Gao Y., Jia Z., Kong X., Li Q., Chang D. Z., Wei D., Le X., Suyun H., Huang S., Wang L., Xie K.: *Cancer Res.* **71**, 5182 (2011).
41. Sarek J., Klinot J., Dzubak P., Klinotova E., Noskova V., Krecek V., Korinkova G., Thomson J. O., Janost'akova A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajduch M.: *J. Med. Chem.* **46**, 5402 (2003).
42. Yamai H. a 10 autorů: *Int. J. Cancer* **125**, 952 (2009).
43. Selzer E., Pimentel E., Wacheck V., Schlegel W., Pehamberger H., Jansen B., Kodym R.: *J. Invest. Dermatol.* **114**, 935 (2000).
44. Bache M. a 10 autorů: *Radiat. Oncol.* **6**, 111 (2011).
45. Sawada N., Kataoka K., Kondo K., Arimochi H., Fujino H., Takahashi Y., Miyoshi T., Kuwahara T., Monden Y., Ohnishi Y.: *Br. J. Cancer* **90**, 1672 (2004).
46. Jung G. R., Kim K. J., Choi C. H., Lee T. B., Han S. I., Han H. K., Lim S. C.: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **101**, 277 (2007).
47. Mayaux J. F., Bousseau A., Pauwels R., Huet T., Henin Y., Dereu N., Evers M., Soler F., Poujade C., De Clercq E.: *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3564 (1994).
48. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* **39**, 1016 (1996).
49. Killinger B., Shah M., Moszczynska A.: *J. Neurochem.* **128**, 764 (2014).
50. Pau A. K., George J. M.: *Infect. Dis. Clin. North Am.* **28**, 371 (2014).
51. Dau B., Holodny M.: *Drugs* **69**, 31 (2009).

52. Paterson D. L., Swindells S., Mohr J., Brester M., Vergis E. N., Squier C., Wagener M., M. Singh N.: *Ann. Intern. Med.* 133, 21 (2000).
53. Wainberg M. A., Zaharatos G. J., Brenner B. G.: *N. Engl. J. Med.* 365, 637 (2011).
54. Labrosse B., Pleskoff O., Sol N., Jones C., Henin Y., Alizon M.: *J. Virol.* 71, 8230 (1997).
55. Blair W. S. a 12 autorů: *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 5080 (2009).
56. Sundquist W. I., Krausslich H. G.: *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 2, a006924 (2012).
57. Smith P. F., Ogundele A., Forrest A., Wilton J., Salzwedel K., Doto J., Allaway G. P., Martin D. E.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3574 (2007).
58. Martin D. E., Blum R., Doto J., Galbraith H., Ballow C.: *Clin. Pharmacokinet.* 46, 589 (2007).
59. Martin D. E., Blum R., Wilton J., Doto J., Galbraith H., Burgess G. L., Smith P. C., Ballow C.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3063 (2007).
60. Margot N. A., Gibbs C. S., Miller M. D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2345 (2010).
61. Dang Z., Lai W., Qian K., Ho P., Lee K. H., Chen C. H., Huang L.: *J. Med. Chem.* 52, 7887 (2009).
62. Mukherjee R., Jaggi M., Siddiqui M. J., Srivastava S. K., Rajendran P., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4087 (2004).
63. Reddy B. P., Sharma V. M., Reddy K. R., Reddy M. M.: *US20110218204 A1* (2011).
64. Sun Y. F., Song C. K., Viernstein H., Unger F., Liang Z. S.: *Food Chem.* 138, 1998 (2013).
65. Kim D. S., Pezzuto J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1707 (1998).
66. Kommera H., Kaluderovic G. N., Bette M., Kalbitz J., Fuchs P., Fulda S., Mier W., Paschke R.: *Chem. Biol. Interact.* 185, 128 (2010).
67. Gonzalez P., Mader I., Tchoghandjian A., Enzenmuller S., Cristofanon S., Basit F., Debatin K. M., Fulda S.: *Cell Death Differ.* 19, 1337 (2012).
68. Dai L., Li D., Cheng J., Liu J., Deng L.-H., Wang L.-Y., Lei J.-D., He J.: *Polym. Chem.* 5, 5775 (2014).
69. Bildziukevich U., Vida N., Rarova L., Kolar M., Saman D., Havlicek L., Drasar P., Wimmer Z.: *Steroids* 100, 27 (2015).
70. Hata K., Hori K., Takahashi S.: *J. Nat. Prod.* 65, 645 (2002).
71. Hata K., Hori K., Ogasawara H., Takahashi S.: *Toxicol. Lett.* 143, 1 (2003).
72. Jeong H. J., Chai H. B., Park S. Y., Kim D. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 1201 (1999).
73. Willmann M., Wacheck V., Buckley J., Nagy K., Thalhammer J., Paschke R., Triche T., Jansen B., Selzer E.: *Eur. J. Clin. Invest.* 39, 384 (2009).
74. Gauthier C., Legault J., Rondeau S., Pichette A.: *Tetrahedron Lett.* 50, 988 (2009).
75. Dang Thi T. A., Kim Tuyet N. T., Pham The C., Thanh Nguyen H., Ba Thi C., Doan Duy T., D'Hooche M., Van Nguyen T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5190 (2014).
76. Suresh C., Zhao H., Gumbs A., Chetty C. S., Bose H. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1734 (2012).
77. Zhao H., Holmes S. S., Baker G. A., Challa S., Bose H. S., Song Z.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 27, 715 (2012).
78. Biedermann D., Eigenerova B., Hajduch M., Sarek J.: *Synthesis* 2010, 3839 (2010).
79. You Y. J., Kim Y., Nam N. H., Ahn B. Z.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3137 (2003).
80. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* 67, 1100 (2004).
81. Spivak A. Y. a 11 autorů: *Russ. Chem. Bull.* 62, 188 (2013).
82. Xu Y.-P., Yang M., Pan D.-H., Wang L.-Z.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 288, 157 (2011).
83. Pal A., Ganguly A., Chowdhuri S., Yousuf M., Ghosh A., Barui A. K., Kotcherlakota R., Adhikari S., Banerjee R.: *ACS Med. Chem. Lett.* 6, 612 (2015).
84. Holz-Smith S. L., Sun I. C., Jin L., Matthews T. J., Lee K. H., Chen C. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 60 (2001).
85. Evers M. a 15 autorů: *J. Med. Chem.* 39, 1056 (1996).
86. Soler F. a 11 autorů: *J. Med. Chem.* 39, 1069 (1996).
87. Sun I. C., Chen C. H., Kashiwada Y., Wu J. H., Wang H. K., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* 45, 4271 (2002).
88. Qian K., Yu D., Chen C.-H., Huang L., Morris-Natschke S. L., Nitz T. J., Salzwedel K., Reddick M., Allaway G. P., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.* 52, 3248 (2009).
89. Kashiwada Y., Chiyo J., Ikeshiro Y., Nagao T., Okabe H., Cosentino L. M., Fowke K., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 183 (2001).
90. Qian K., Bori I. D., Chen C.-H., Huang L., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.* 55, 8128 (2012).
91. Zhao Y., Gu Q., Morris-Natschke S. L., Chen C. H., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* 59, 9262 (2016).
92. Horton D. A., Bourne G. T., Smythe M. L.: *Chem. Rev.* 103, 893 (2003).
93. Evans B. E. a 16 autorů: *J. Med. Chem.* 31, 2235 (1988).
94. Tang J. a 20 autorů: *Open Med. Chem. J.* 8, 23 (2014).
95. Huang L., Yuan X., Aiken C., Chen C. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 663 (2004).
96. Dang Z., Ho P., Zhu L., Qian K., Lee K. H., Huang L., Chen C. H.: *J. Med. Chem.* 56, 2029 (2013).
97. Hashimoto F., Kashiwada Y., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem.* 5, 2133 (1997).
98. Urano E., Ablan S. D., Mandt R., Pauly G. T., Sigano D. M., Schneider J. P., Martin D. E., Nitz T. J., Wild C. T., Freed E. O.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 190 (2015).
99. Gillis E. P., Eastman K. J., Hill M. D., Donnelly D. J., Meanwell N. A.: *J. Med. Chem.* 58, 8315 (2015).
100. Li J., Goto M., Yang X., Morris-Natschke S. L., Huang L., Chen C. H., Lee K. H.: *Bioorg. Med.*

- Chem. Lett. 26, 68 (2016).
101. Qian K., Kuo R. Y., Chen C. H., Huang L., Morris-Natschke S. L. Lee K. H.: *J. Med. Chem.* 53, 3133 (2010).
102. Liu Z. a 16 autorů: *Bioorg. Med. Chem.* 24, 1757 (2016).
103. Regueiro-Ren A. a 27 autorů: *ACS Med. Chem. Lett.* 7, 568 (2016).
104. Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L. Alison M.: *Nature* 326, 662 (1987).

D. Kodr^a, M. Rumlová^b, T. Zimmermann^a, P. Džubák^c, P. Drašar^a, and M. Jurásek^a (^a*Dpt of Chemistry of Natural Compounds*, ^b*Dpt of Biotechnology*; *University of Chemistry and Technology Prague*, ^c*Palacky University Olomouc*): **Anticancer and Anti-HIV Derivatives of Betulinic Acid**

Betulinic acid and its derivatives modifying its physicochemical and biological properties contain a promising pharmacophore, which, so far only experimentally, are used as a structural basis for substances that function as antitumor and anti-HIV-1 and -2 agents. An overview of derivatives, classified according both structural characteristics and the type of the effect, is given. Although betulinic acid has been extensively studied since the 1990s, it has not yet been possible to prepare any sufficiently effective and safe derivative useful in clinical practice that could be marketed as a registered drug.

Full text English translation available in the on-line version.

Keywords: betulinic acid, anti-HIV-1, anti-HIV-2, antitumor activity

ANTITUMOR AND ANTI-HIV DERIVATIVES OF BETULINIC ACID

DAVID KODR^a, MICHAELA RUMLOVÁ^b,
TOMÁŠ ZIMMERMANN^a, PETR DŽUBÁK^c,
PAVEL DRAŠAR^a, and MICHAL JURÁŠEK^a

University of Chemistry and Technology in Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 5, Praha 6, CZ-16628; ^aDpt Chemistry of Natural Compounds; ^bDpt Biotechnology; ^cInstitute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry Palacký University Olomouc, Hněvotínská 5, Olomouc, CZ-17900
jurasekm@vscht.cz

Keywords: betulinic acid, anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-tumor activity

Table of content

1. Introduction
2. Antitumor effects
3. Anti-HIV effects
4. Derivatives
 - 4.1. Antitumor derivatives
 - 4.1.1. C-3 derivatives
 - 4.1.2. C-28 derivatives
 - 4.1.3. Other derivatives
 - 4.2. Anti-HIV derivatives
 - 4.2.1. Derivatives that prevent HIV-1 from entering the cell
 - 4.2.2. Maturation inhibitors of HIV-1
 - 4.2.3. Derivatives with anti-HIV-2 activity
5. Conclusion

1. Introduction

Betulinic acid (**BA**) is a natural pentacyclic lupane-type triterpene (Fig. 1) with a wide range of pharmacological indications. It gained more attention in the 1970s when its inhibitory activity against tumor cells was observed. **BA** is a white crystalline substance which is almost insoluble in water (0.02 g/mL, room temperature)¹ and only sparingly soluble in common organic solvents. **BA** shows no absorption in the UV-VIS region. One of the first studies describes the extraction and isolation of **BA** from the leaves of *Vauquelinia corymbosa*² or the leaves and flowers of *Hyptis emoryi*³. **BA** can be found in the upper white part of the bark of plants of the *Betulaceae* family, but also

in others, such as *Ziziphus spp.*⁴, or *Syzygium spp.*⁵

Although **BA** is a widespread secondary metabolite in the plant kingdom, its content in the plant material itself is not very high. Thus, mere extraction from plant material is not sufficient to obtain it. **BA** can be easily prepared semi-synthetically⁶ or by microbial biotransformation⁷ from another naturally occurring triterpene, namely betulin (Fig. 2). Plant material can contain up to 20% of it by weight of dried material⁸. Professor Lowitz described the occurrence of betulin in birch bark already in 18th century⁹.

The synthetic transformation of betulin towards **BA** is depicted in Fig. 2. Betulin is oxidized by a mixture of chromium oxide and sulfuric acid to form betulonic acid. Stereoselective reduction of 3-oxo group by sodium borohydride gives **BA**.

Despite the low solubility in aqueous solutions, **BA** is gaining a lot of attention due to a wide range of interesting biological effects. Moreover, low toxicity in the mouse model (500 mg/kg)¹⁰ is very promising. Less significant effects of **BA** include a weak antimicrobial¹¹, or spasmogenic¹² activity. More interestingly, *in vitro* toxicity to the parasitic protozoan *Plasmodium falciparum* was observed¹³. However, unfavorable *in vivo* test results have ruled out the potential use of **BA** as a new antimalarial agent¹⁴. New and more effective derivatives are still being developed¹⁵. One of the current studies also suggests the possible use of **BA** in the treatment of diabetes type 2 (ref.¹⁶). As mentioned above, **BA** itself has a very low toxicity. Surprisingly, **BA** is selectively cytotoxic against tumor cells¹⁰. To the last but not least significant effects of **BA** belongs its antiviral activity against HIV¹⁷.

In addition to its wide range of biological activities, **BA** is capable of the so-called "self-assembly" by non-binding interactions¹⁸. Due to this process, various stable supramolecular gels can be formed. This property can be used mainly in combination with derivatives more easily soluble in water for developing a targeted drug dosing system¹⁹. An ointment containing 20% **BA** was subjected to clinical testing (NTC00346502) for the treatment of

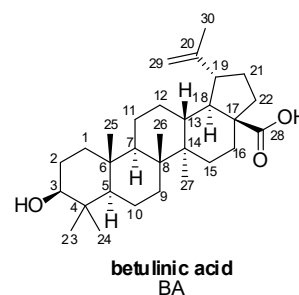


Fig. 1. Numbered molecular structure of BA

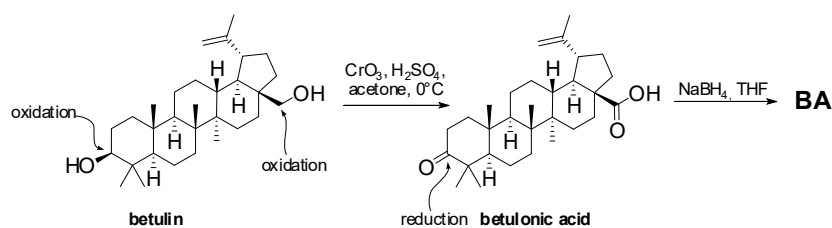


Fig. 2. Synthesis of BA from betulin

dysplastic nevi. Nevertheless, the testing process was suspended for financial reasons.

Natural origin, excellent availability, antitumor, antiviral effects, and a very low toxicity make **BA** an ideal candidate for the development of a new drug. **BA** is currently the subject of many extensive studies. The development of new **BA** derivatives most often focuses on modifications leading to alterations in bioavailability and an increase in specific biological activity towards cancer.

2. Antitumor effects

Probably the most exciting property of **BA** is its selective cytotoxicity. **BA** induces apoptosis in a number of tumor cells even at low nanomolar concentrations but has no effect on non-tumor cells²⁰. The ability to cause targeted apoptosis results in an unprecedentedly favorable therapeutic index. This puts **BA** in an absolutely privileged position compared to currently used drugs for cancer therapy (e.g., taxol, vincristine). Most of such substances are highly cytotoxic, not only to tumor cells but also to healthy cells. This activity might result in undesirable side effects. The mechanism responsible for the selectivity of **BA** is still under discussion. However, it is thought to be very likely associated with lower pH (≤ 6.8) in tumor cells²¹. **BA** suppresses some deubiquitinases and reduces overall oncoprotein levels. This fact may explain the above-mentioned selective effect²².

Another advantage of **BA** is its mechanism of action. There is not only one pathway but several possible mechanisms by which **BA** is able to induce apoptosis. One of them is the direct action of **BA** on the mitochondrial membrane. It is thought that **BA** is incorporated into the phospholipid bilayer, resulting in a significant increase of the permeability of the outer membrane. Its depolarization and the release of cytochrome *c* into the cytosol is then responsible for triggering apoptosis. This process is independent of the p53 protein²³. Among other associated actions, reactive oxygen species (ROS) are formed, which cause a non-specific damage^{24,25}. In normal (non-tumor) cells, **BA** function seems to be opposite as it acts as an antioxidant and aids in the uptake of ROS²⁶. The result is the induction of caspase activity due to mitochondrial damage (activates caspases 3 and 8)²⁷. Therefore, what comes to pass is the

cell membrane cleavage, cell shrinkage, DNA fragmentation, and nuclear fragmentation²³. **BA** further exhibits topoisomerase I (ref.²⁸) inhibitory activity and, through the proteasome-dependent and independent regulatory pathway, it is responsible for inhibiting the function of transcription factors Sp1, Sp3, and Sp4 (ref.²⁹). **BA** is also able to inhibit the activation of the stress transcription factor NF- κ B, which imparts resistance to apoptosis of the damaged (also non-tumor) cells. It is just this property that can be used to prevent cancer³⁰. Although another study suggests that, depending on the cell line, this transcription factor might be more activated³¹. The slightly different way in which **BA** inhibit tumor growth *in vivo* is impeding or at least slowing of angiogenesis processes. **BA** was thought to be able to inhibit the significant angiogenic factor aminopeptidase N (encoded by ANPEP gene). The way in which it occurs has not been elucidated yet³². Later studies showed that the antiangiogenic effect is achieved through modulation of mitochondria³³. The ability to stop the cell cycle in G2 or M phase was demonstrated, but even without providing a clear mechanistic reason³⁴.

The ability to induce apoptosis and inhibit further growth were studied for **BA** and its derivatives on plethora of cell lines of diverse tumor types *in vitro*; further, in the most promising cases, *in vivo* studies in mice were performed. Apoptosis and growth inhibition have been observed in many tumor cell lines responsible for melanoma,¹⁰ neuroblastoma, medulloblastoma, leukemia, colon, breast and lung cancer²³, glioma³⁵, prostate cancer³⁶, ovarian cancer³⁷, cervical cancer³⁸, endothelial carcinoma³⁹, cancer of the neck, head and pancreas⁴⁰, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, hepatocellular carcinoma⁴¹ or esophageal cancer⁴².

The subject of other studies is also the possibility of combining the effects of both **BA** and other substances already used in chemotherapy or radiotherapy. Enhanced inhibiting effect of the combination of **BA** and ionizing radiation on the growth of some tumor cells was proved^{43,44}, as well as an achievement of apoptosis induction with some current antitumor drugs such as doxorubicin, VP16, taxol, mithramycin A, cisplatin or vincristine^{40,45}. Increased susceptibility of resistant tumors to, e.g., 5-fluorouracil or oxaliplatin were observed with combination administration⁴⁶.

3. Anti-HIV effects

Similar to other pentacyclic triterpenes, **BA** has been tested for anti-HIV activity in the past. This property was successfully demonstrated, though the results were not very satisfactory, since this effect has only been observed at relatively high concentrations¹⁷. However, this fact inevitably led to the synthesis and testing of a number of other derivatives. The first positive results were described for the derivative RPR103611 (Fig. 6, 19a), which showed many times higher activity against the HIV⁴⁷. Another significant derivative with a very strong inhibitory activity was 3-*O*-(3,3-dimethylsuccinyl)betulinic acid, also known as bevirimat⁴⁸. On the other hand, bevirimat was found to be toxic to dopaminergic and serotonergic nerve endings in adolescent male rats. Thus, the concomitant administration of bevirimat and methamphetamine might be a serious problem because a high percentage of people living with HIV are also drug addicts⁴⁹.

Most antiretroviral therapy (ART) drugs have several different mechanisms of action. Among them drugs inhibiting nucleoside and nucleotide reverse transcriptase, protease or integrase⁵⁰ are often applied. The current combined ART cannot completely stop the infection, but only suppresses its manifestation. Long-term therapy thus results in several significant negatives leading to treatment failure, such as chronic toxicity⁵¹ and the need for patient cooperation⁵²; above all, however, the long-term administration of one type of one drug increases the risk of the development of drug resistance⁵³. The current trend is to search for new substances, with novel mechanisms of action. Compound RPR103611 prevents the formation of a "virus particle-infected cell" complex, blocking HIV-1 infectious particles from entering uninfected cells⁴⁷. Resistant strains with a mutation in the gp41 glycoprotein of the viral envelope were discovered very soon⁵⁴. A unique mechanism of entry blockade is not very common in ART, and a significant progress could therefore be made in combination therapy. Another example is the second mentioned derivative, bevirimat. It acts as an inhibitor of HIV-1 particle maturation⁴⁸. The inhibition of the viral particle maturation does prove to be a critical point of intervention⁵⁵. During the maturation phase, the viral protease repeatedly cleaves the Gag polyprotein while releasing individual structural proteins. The final step is the cleavage of p25 Gag (CA/SP1) into a functional p24 (CA) protein. Inhibition of the last step produces immature virus particles that are incapable of further infection⁵⁶. Bevirimat has previously advanced to the second phase of clinical trials^{57–59}. During the phase II, a reduction in the virus in only 40–50% of patients was observed. The remaining group developed resistance by natural polymorphic variation in the Gag polyprotein. Therefore, further clinical trials of this drug were interrupted⁶⁰. Most **BA** derivatives are being prepared and studied with a vision for drug development for patients infected with the high-risk HIV-1 virus. Nevertheless, some **BA** derivatives have also been successfully tested against the less common and slower-moving strain of HIV-2 (ref.⁶¹).

4. Derivatives

Given the important features of **BA** mentioned above, it is no surprise that a large number of research groups around the world have begun to address it. The subject of their studies is both the investigation of the detailed mechanism of action in individual cases of application and research dealing with the preparation and testing of new derivatives. The biggest obstacle in putting **BA** into clinical practice is its lipophilic nature. Hundreds of derivatives have been prepared over the last few decades, often with better water solubility. However, with derivatization or particular skeleton modification, the pristine effect disappeared, resistance developed rapidly, or toxicity to normal (non-cancerous) cells increased. In antitumor derivatives, a loss of inhibitory activity against some types of tumor have been often observed but, on the other hand, at the same time a significant enhancement of the effect against another type of tumor appeared. For anti-HIV derivatives, several so-called "lead structures" or structural motifs of **BA**, probably leading to the development of an effective drug, were established. Based on the observed relationships between the structure and activity of **BA** derivatives, new and more effective substances against HIV, cancer, or malaria are constantly being synthesized and tested.

Most often, **BA** is modified at positions C-3 and C-28. Usually, the addition to the double bond between the C-20 and C-30 does not significantly enhance the activity, and the activity often disappears. This finding is generally valid for both antitumor and anti-HIV effects^{28,36,62}.

Increased solubility may not only be achieved by the introduction of polar functional groups but also by, e.g., the preparation of pharmaceutically acceptable salts⁶³, by forming an inclusion complex with a suitable carrier such as β -cyclodextrin⁶⁴, or by formulation into a liposome²⁹.

4.1. Antitumor derivatives

4.1.1. C-3 derivatives

The oxygen atom in the hydroxyl group at the C-3 position (Fig. 1) appears to be the essential pharmacophore¹⁷. The oxidized form of **BA**, betulonic acid (Fig. 2) is more active against, e.g., melanoma⁶⁵. On the other hand, it is also a typical case of loss of activity against, for example, prostate or lung cancer⁶².

Acetylation of the hydroxyl at the C-3 position has no significant effect on the change in cytotoxicity³⁶; however, some 3-*O*-acyl derivatives with electronegative substituents show strong antiangiogenic effects³⁹. The oxygen atom can also be replaced by a nitrogen atom (Fig. 3). For example, 3-hydrazono-20,29-dihydrobetulinic acid derivatives (**1-3**) showed significantly higher toxicity to endothelial lung cancer³⁹. Most attention was paid to **BA** β -D-glucopyranoside (**4**), which showed increased solubility and, within the plethora of glycosylated derivatives, also a good cytotoxicity toward resistant tumor cells^{66,67}. In order to increase the solubility, a strategy of the **BA** conjugation with other hydrophilic molecules to form the so-

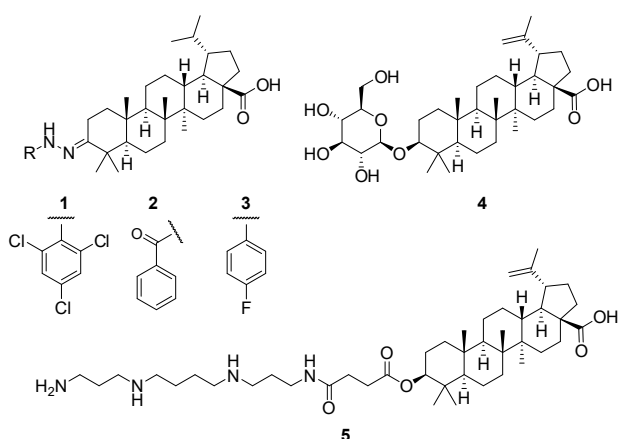


Fig. 3. Important anticancer derivatives

called "prodrug" was applied. The prodrug is then cleaved enzymatically in the body and thus releases the active component at the desired tissue. C-3 conjugates with branched polyethylene glycol linkers (PEGs), which are 250–750 times more soluble in water while maintaining antitumor activity⁶⁸, may serve as examples of such prodrugs. Another approach stems from the introduction of polyamines. The spermine C-3 derivative (**5**) showed a very good cytotoxicity against, e.g., breast cancer cells. The analogous C-28 derivative of **BA** was toxic to normal cells⁶⁹. These amphiphilic molecules are able to form the supramolecular gels due to the presence of the spermine side chain¹⁹.

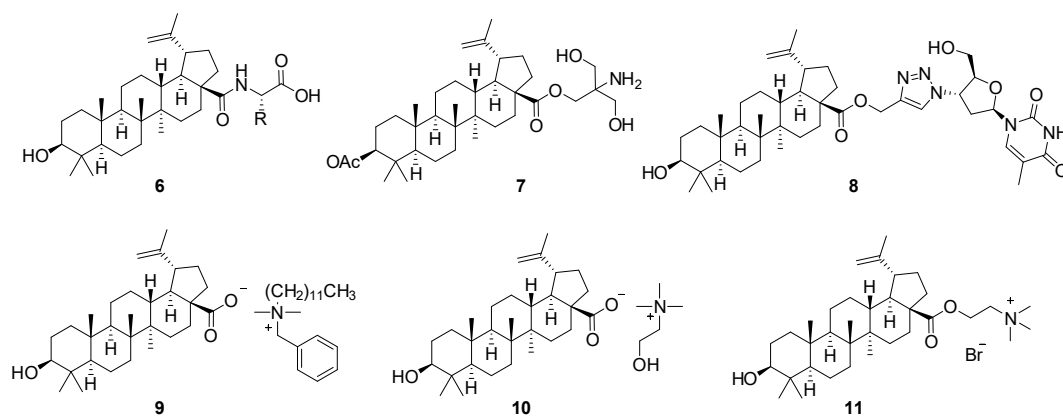
4.1.2. C-28 derivatives

When comparing oxidized forms of betulin, which itself does not show powerful cytotoxic effects, it was found that there is not much difference between the properties of C-28 aldehyde and **BA**^{70,71}. This finding refuted the original assumption that the presence of a carboxylic group at C-28 position (Fig. 1) is necessary for the efficacy

of **BA**. Therefore, it is further assumed that the carbonyl group is the essential pharmacophore. The most common modification in the above mentioned position is the formation of esters or amides (Fig. 4). The preparation of **BA** amides via reaction with amino acids can increase the solubility in water (**6**)⁷². A special case of the C-28 derivative is NVX-207 (**7**), where deacetylation at the C-3 position resulted in a loss of activity. This substance showed a very good solubility, selectivity, and was also cytotoxic to a wide range of tumor cell lines⁷³. Similar to C-3 derivatives, prodrugs modified at the C-28 position, such as **BA** 28-*O*- β -D-glucuronopyranoside, have been proposed⁷⁴. The azido thymidine derivative of **BA** (**8**) prepared by the "click" reaction showed almost four times higher potency against some types of cancer⁷⁵. The advantage of **BA** ionic compounds is a minimal structural modification and a significant increase in solubility. Substances that are pharmaceutically acceptable, non-toxic, or have additive biological activity can be used for "salting out." It is believed that due to the slightly acidic environment in the tumor cells, the original structure is restored upon entry into the cell. Substances that proved to have significant selective cytotoxicity include derivatives of benzalkonium and cholinium cations (**9–10**, Fig. 3)⁷⁶. These derivatives also showed perfect anti-HIV activity through the inhibition of protease dimerization and differ fundamentally in the mechanism of action from the derivatives with anti-HIV activity discussed below⁷⁷. Based on the assumption of a good solubility of ionic compounds, active esters of **BA** with ligands containing a quaternary ammonium group in the molecule (**11**) were also prepared⁷⁸.

4.1.3. Other derivatives with antitumor activity

A number of studies deal with modifications of the lupane skeleton (Fig. 5). Substances of interest include "enones" derived from betulonic acid with an electronegative substituent at the C-2 position (Fig. 1 and Fig. 5). These compounds showed up to 59 times higher cytotoxicity than **BA** (**12**)⁷⁹. *Seco*-anhydrides showed a significant enhancement of cytotoxicity against many tumor cell lines (**13**)⁸⁰. A study dealing with the derivatization of E ring of **BA** has demonstrated the potential of a "new" class of



Obr. 4. Významné protinádorové C-28 deriváty BA

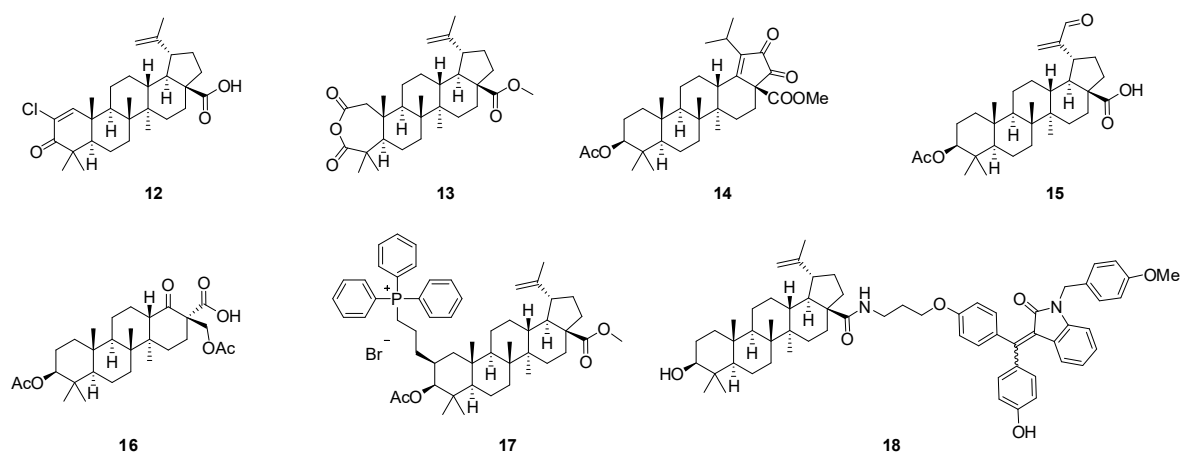


Fig. 5. Other anticancer derivatives of BA

highly active substances collectively referred to as betulinines (**14–16**). Many of them also showed cytotoxicity against resistant tumor cell lines, though no increased solubility in aqueous solutions was demonstrated⁴¹. A number of highly cytotoxic salts of BA (34 – 40 times more potent than BA) containing triphenylphosphonium cation (representative example – substance **17**) were prepared. These salts were designed based on the fact that the particular cationic residue (R-PPh₃⁺X⁻) bound to the molecules is capable of a targeted transport of the biologically active compound into the mitochondria of tumor cells⁸¹. For possible use of BA in radiotherapy and *in vivo* monitoring of BA distribution (possible diagnosis), a ¹³¹I-labeled derivative is not shown in the publication). The selective accumulation in tumor cells was demonstrated. The iodinated derivative could find an application in radiotherapy, especially in the treatment of hepatocellular tumors by targeted radionuclide brachytherapy⁸². To a better understanding of the effect and detection under ongoing BA-induced apoptosis, a BA-bis(arylidene)indole conjugate was synthesized (**18**)⁸³. This study confirmed a selective cell localization and cytotoxicity against tumor cells compared to doxorubicin.

4.2. Anti-HIV derivatives

4.2.1. Derivatives that prevent HIV-1 from entering the cell

As mentioned above, one of the first BA derivatives, proved to be able to prevent the formation of a complex of "HIV-1 infectious particles and infected cells", was a γ -amino acid derivative ((3*S*,4*S*)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid) RPR103611 (**19a**, Fig. 6)⁴⁷ and its isomer IC9564 (**19b**, Fig. 6). The compound **19a** is likely preventing the virus from entering the cells by binding to another glycoprotein of the viral envelope (gp120), whereas **19b** not. In this case, as in others, mutations and resistance development was observed (Fig. 6)⁸⁴. The conclusion of these studies was that 3 β -hydroxyl is an essential substituent for this mechanism of action. Small changes in the structure of BA on the ring A cause a complete loss of the required effect; thus, the 3 β -hydroxyl group was not assumed as a suitable site for further chemical modifications. Equally important is the amide bond at the C-28 position, or the length of the hydrocarbon chain attached to the carbonyl^{85,86}. Activity of the derivative is retained also in the case when the 3-hydroxyaminoacid moiety is replaced by L-leucine⁸⁷. Similar activity and better solubility compared to compound **19b** have been reported with compound **20** (Fig. 6), which is additionally modified at the

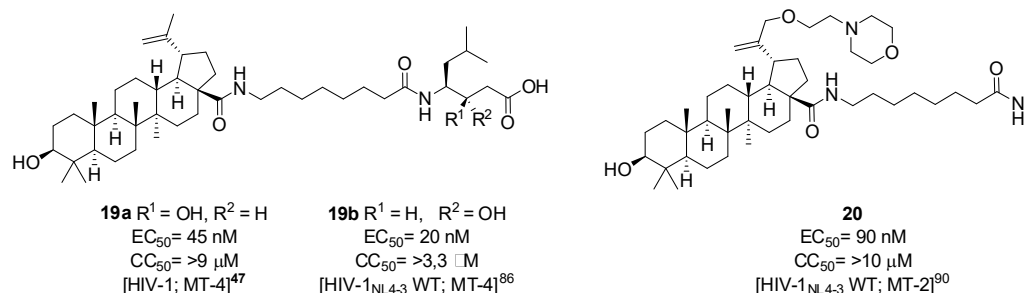


Fig. 6. Important derivatives of BA preventing HIV-1 from entering the cell

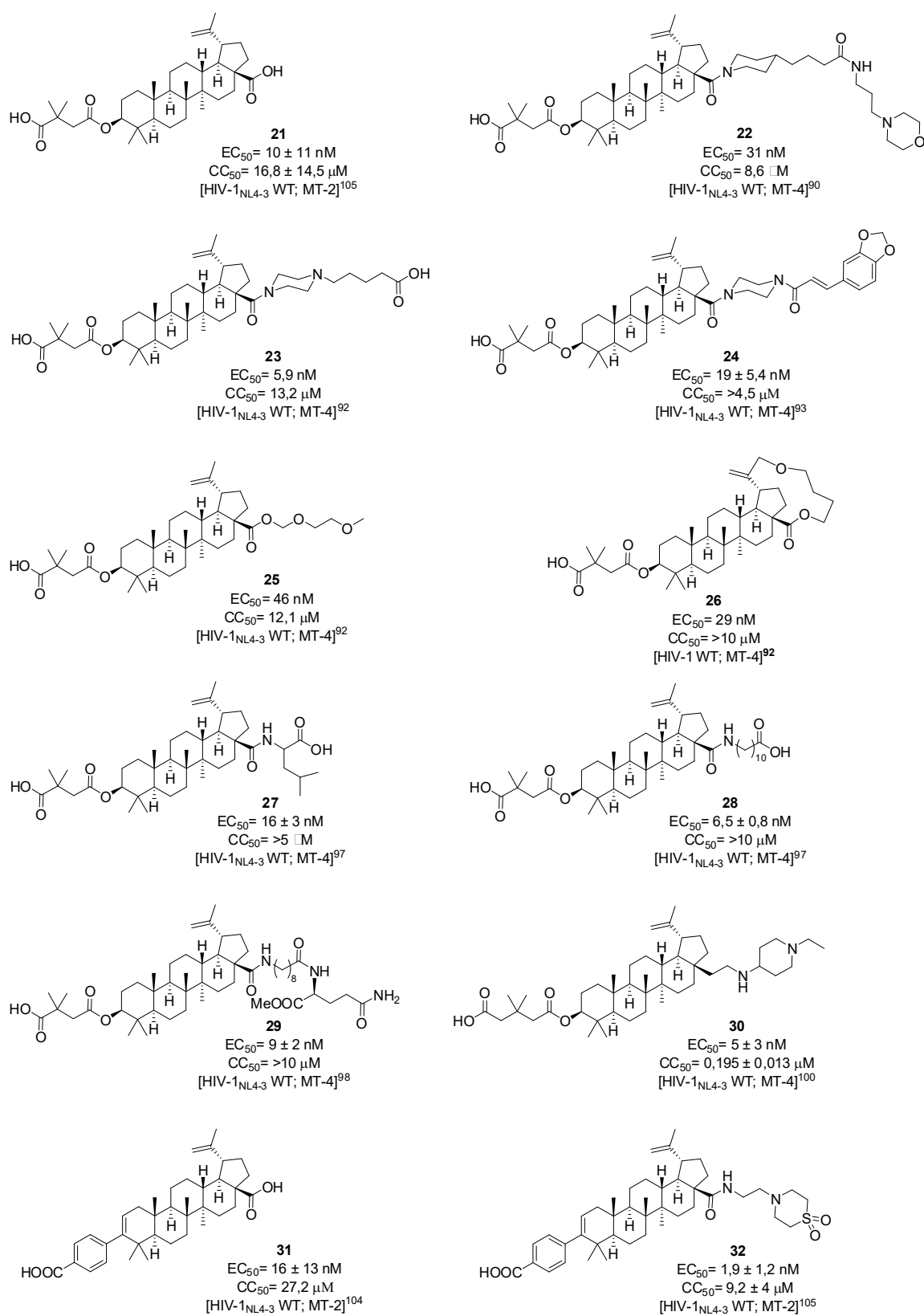


Fig. 7. Important maturation inhibitors

C-29 position. The latter position appears to be a suitable site for the introduction of hydrophilicity-increasing substituents (Fig. 6)⁸⁸.

4.2.2. Maturation inhibitors of HIV-1

The above-mentioned C-3 hemiester of **BA** with 2,2-dimethylsuccinate (**21**) appeared to be one of the greatest successes in the fight against HIV-1 infection (Fig. 7)⁴⁸. However, the failure to treat patients led to the cessation of clinical trials. In any case, the structural motif of bevirimat (**21**) is undoubtedly a suitable template for the preparation of a number of other substances that might have better pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. A better effect was then obtained with the disubstituted isomers, 3,28-di-*O*-(dimethylsuccinyl) betulin⁸⁹. Due to the apparent unmistakability of the substituent at the C-3 position, a plethora of "second generation" inhibitors modified at the C-28 position were prepared (Fig. 7). Of these C-28 derivatives, substance **22** showed the most considerable activity. Moreover, by binding a cyclic secondary amine, higher metabolic stability was achieved⁸⁸. A highly significant discovery was the report of the so-called "privileged structure", i.e., C-28 substituted **BA** by piperazinyl amides (**23**)⁹⁰. Subsequent conjugation with another "privileged structure" derived from cinnamic acid (**24**)⁹¹ yielded even more satisfactory results. The term "privileged structure" refers to motifs often present in natural substances that have an affinity for a wide range of receptors and generally improve the bioavailability, biological activity, or metabolism of the drug^{92,93}. Also noteworthy is the readily soluble methoxyethoxymethyl derivative (**25**)⁹⁰. The influence of conformation on activity was investigated using rigid macrocyclic derivatives (**26**). It was found that the effect was similar to **21**; however, none was able to overcome the naturally occurring mutation⁹⁴. Derivatization of **21** at the position C-28 also was an inspiration to prepare dual active constructs, LH15 (**27**), LH55 (**28**), and **29**, which act as maturation inhibitors but at the same time are able to prevent the entry of the viral particle into the cell^{95,96}. It is the combination of several mechanisms that usually best overcomes resistance. Based on these findings, a number of active substances derived from 3-*O*-(3,3-dimethylglutaryl) betulonic acid have also been prepared⁹⁷, e.g., alkylamino derivatives (**30**). These substances overcome the natural resistance caused by polymorphic variation in Gag p19 protein⁹⁸. A series of 21 derivatives substituted at various positions by fluorine were also prepared. Due to its high electronegativity and small atomic radius, fluorine is often incorporated into new structures developed as potential drugs⁹⁹. Only substitution at the C-29 position preserved anti-HIV activity, suggesting that this position could be another suitable site for modification¹⁰⁰. The preparation of other 3-*O*-acyl derivatives mostly led to a loss of activity¹⁰¹; nevertheless, the assumption of maintaining the distance between the C-3 carbon and the carboxyl group led to the successful synthesis of another active C-3 benzoic acid derivative (**31**)¹⁰² via cross-coupling reaction. The discovery of compound **31** then inevitably led to the synthesis of other derivatives, of which BMS-

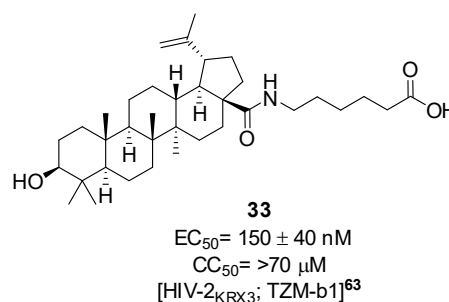


Fig. 8. Example of anti-HIV-2 inhibitor derived from **BA**

955176 (**32**) showed the ability to overcome the resistance (major obstacle in the case of **21**). BMS-955176 also showed enhanced solubility. Therefore, it might be in principle possible to administrate it orally¹⁰³.

4.2.3. Derivatives with anti-HIV-2 activity

Most of the substances that were prepared so far, but also the substances that have been the subject of current studies, show selective activity against the HIV-1 virus. Although HIV-2 is not so widespread in civilized parts of the world, it is still an incurable infection leading to patient's death. Given that both viruses show only about 50% genetic homology, there is no surprise that most substances that inhibit the spread of one type are inactive against the other one¹⁰⁴. With this assumption, a series of substances derived from RPR103611 were prepared differing in the length of the aliphatic moiety bound to the C-28 position. It was found that the shortening of a substituent to a chain with 5 carbons can lead to the HIV-2 inhibitory activity (**33**, Fig. 8)⁶¹.

5. Conclusion

In the search for derivatives of **BA** with anti-HIV activity to find several suitable candidates for a new drug, many major advances have been made in recent years. The situation regarding the development of new and more effective antitumor preparations is somewhat more complicated, as there are a large number of different cell lines that are more or less sensitive to a particular type of derivatives. Generally, the search of the ideal candidate for new drug development and evaluation seems therefore much more difficult. Although **BA** has been extensively studied since the 1990s until now, it has not been possible yet to develop any sufficiently effective and safe derivative for clinical practice that could be marketed as a registered drug.

Internal grant from the budget for the implementation of the activities of the Institutional Plan of the UCT Prague in 2020 and grant A1_FPBT_2020_004 supported the production of this review.

REFERENCES

- Jager S., Winkler K., Pfuller U., Scheffler A.: *Planta Med.* 73, 157 (2007).
- Trumbull E. R., Bianchi E., Eckert D. J., Wiedhopf R. M., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.* 65, 1407 (1976).
- Sheth K., Jolad S., Wiedhopf R., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.* 61, 1819 (1972).
- Schuhly W., Heilmann J., Calis I., Sticher O.: *Planta Med.* 65, 740 (1999).
- Chang C. W., Wu T. S., Hsieh Y. S., Kuo S. C., Chao P. D.: *J. Nat. Prod.* 62, 327 (1999).
- Kim D. S. H. L., Chen Z., Nguyen v. T., Pezzuto J. M., Qiu S., Lu Z.-Z.: *Synth. Commun.* 27, 1607 (1997).
- Feng Y., Li M., Liu J., Xu T.-Y., Fang R.-S., Chen Q.-H., He G.-Q.: *Food Chem.* 136, 73 (2013).
- Hayek E. W. H., Jordis U., Moche, W. Sauter F.: *Phytochem.* 28, 2229 (1989).
- Lowitz J. T.: *Chemische Annalen für die Freunde der Naturlehrere, Arzneygelahrtheit, Haushaltungskunst und Manufacturen* 2, 321 (1788).
- Pisha E. a 14 autorů: *Nature Med.* 1, 1046 (1995).
- Wachter G. A., Valcic S., Flagg M. L., Franzblau S. G., Montenegro G., Suarez E., Timmermann B. N.: *Phytomedicine* 6, 341 (1999).
- Bejar E., Amarquaye A., Che C., Malone M. H., Fong H. H.: *Int. J. Pharmacogn.* 33, 25 (1995).
- Bringmann G., Saeb W., Assi L. A., Francois G., Sankara Narayanan A. S., Peters K., Peters E. M.: *Planta Med.* 63, 255 (1997).
- Steele J. C., Warhurst D. C., Kirby G. C., Simmonds M. S.: *Phytother. Res.* 13, 115 (1999).
- de Sa M. S. a 10 autorů: *Parasitol. Res.* 105, 275 (2009).
- Kim S. J., Quan H. Y., Jeong K. J., Kim D. Y., Kim G., Jo H. K., Chung S. H.: *J. Agricult. Food Chem.* 62, 434 (2014).
- Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L. M., Ballas L. M., Jiang J. B., Janzen W. P., Chen I. S., Lee K. H.: *J. Nat. Prod.* 57, 243 (1994).
- Bag B. G., Dash S. S.: *Nanoscale* 3, 4564 (2011).
- Bildziukevich U., Kaletova E., Saman D., Sievanen E., Kolehmainen E. T., Slouf M., Wimmer Z.: *Steroids* 117, 90 (2017).
- Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F.: *Cancer Lett.* 175, 17 (2002).
- Noda Y., Kaiya T., Kohda K., Kawazoe Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 45, 1665 (1997).
- Reiner T., Parrondo R., de Las Pozas A., Palenzuela D., Perez-Stable C.: *PloS one* 8, e56234 (2013).
- Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer P. H., Peter M. E., Debatin K. M.: *Cancer Res.* 57, 4956 (1997).
- Liu W. K., Ho J. C., Cheung F. W., Liu B. P., Ye W. C., Che C. T.: *Eur. J. Pharmacol.* 498, 71 (2004).
- Fulda S., Scaffidi C., Susin S. A., Krammer P. H., Kroemer G., Peter M. E., Debatin K. M.: *J. Biol. Chem.* 273, 33942 (1998).
- Szuster-Ciesielska A., Plewka K., Daniluk J., Kanderfer-Szerszen M.: *Toxicology* 280, 152 (2011).
- Fulda S., Jeremias I., Steiner H. H., Pietsch T., Debatin K. M.: *Int. J. Cancer* 82, 435 (1999).
- Chowdhury A. R., Mandal S., Mitra B., Sharma S., Mukhopadhyay S., Majumder H. K.: *Med. Sci. Monit.* 8, Br254 (2002).
- Mullauer F. B., van Bloois L., Daalhuisen J. B., Ten Brink M. S., Storm G., Medema J. P., Schiffelers R. M., Kessler J. H.: *Anti-Cancer Drugs* 22, 223 (2011).
- Takada Y., Aggarwal B. B.: *J. Immunol.* 171, 3278 (2003).
- Kasperczyk H., La Ferla-Bruhl K., Westhoff M. A., Behrend L., Zwacka R. M., Debatin K. M., Fulda S.: *Oncogene* 24, 6945 (2005).
- Melzig M. F., Bormann H.: *Planta Med.* 64, 655 (1998).
- Kwon H. J., Shim J. S., Kim J. H., Cho H. Y., Yum Y. N., Kim S. H., Yu J.: *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 417 (2002).
- Yang L. J., Chen Y., Ma Q., Fang J., He J., Cheng Y. Q., Wu Q.-l.: *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 66 (2010).
- Wick W., Grimm C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1306 (1999).
- Kim J. Y., Koo H. M., Kim D. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 2405 (2001).
- Deng Y., Snyder J. K.: *J. Org. Chem.* 67, 2864 (2002).
- Thurnher D., Turhani D., Pelzmann M., Wannemacher B., Knerer B., Formanek M., Wacheck V., Selzer E.: *Head Neck* 25, 732 (2003).
- Mukherjee R., Jaggi M., Rajendran P., Siddiqui M. J., Srivastava S. K., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 2181 (2004).
- Gao Y., Jia Z., Kong X., Li Q., Chang D. Z., Wei D., Le X., Suyun H., Huang S., Wang L., Xie K.: *Cancer Res.* 71, 5182 (2011).
- Sarek J., Klinot J., Dzubak P., Klinotova E., Noskova V., Krecek V., Korinkova G., Thomson J. O., Janost'akova A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdich M.: *J. Med. Chem.* 46, 5402 (2003).
- Yamai H. a 10 autorů: *Int. J. Cancer* 125, 952 (2009).
- Selzer E., Pimentel E., Wacheck V., Schlegel W., Pehamberger H., Jansen B., Kodym R.: *J. Invest. Dermatol.* 114, 935 (2000).
- Bache M. a 10 autorů: *Radiat. Oncol.* 6, 111 (2011).
- Sawada N., Kataoka K., Kondo K., Arimochi H., Fujino H., Takahashi Y., Miyoshi T., Kuwahara T., Monden Y., Ohnishi Y.: *Br. J. Cancer* 90, 1672 (2004).
- Jung G. R., Kim K. J., Choi C. H., Lee T. B., Han S. I., Han H. K., Lim S. C.: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101, 277 (2007).
- Mayaux J. F., Bousseau A., Pauwels R., Huet T., Henin Y., Dereu N., Evers M., Soler F., Poujade C., De Clercq E.: *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3564 (1994).

48. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* 39, 1016 (1996).
49. Killinger B., Shah M., Moszczynska A.: *J. Neurochem.* 128, 764 (2014).
50. Pau A. K., George J. M.: *Infect. Dis. Clin. North Am.* 28, 371 (2014).
51. Dau B. Holodniy M.: *Drugs* 69, 31 (2009).
52. Paterson D. L., Swindells S., Mohr J., Brester M., Vergis E. N., Squier C., Wagener M., M. Singh N.: *Ann. Intern. Med.* 133, 21 (2000).
53. Wainberg M. A., Zaharatos G. J., Brenner B. G.: *N. Engl. J. Med.* 365, 637 (2011).
54. Labrosse B., Pleskoff O., Sol N., Jones C., Henin Y., Alizon M.: *J. Virol.* 71, 8230 (1997).
55. Blair W. S. a 12 autorů: *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 5080 (2009).
56. Sundquist W. I., Krausslich H. G.: *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 2, a006924 (2012).
57. Smith P. F., Ogundele A., Forrest A., Wilton J., Salzwedel K., Doto J., Allaway G. P., Martin D. E.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3574 (2007).
58. Martin D. E., Blum R., Doto J., Galbraith H., Ballow C.: *Clin. Pharmacokinet.* 46, 589 (2007).
59. Martin D. E., Blum R., Wilton J., Doto J., Galbraith H., Burgess G. L., Smith P. C., Ballow C.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3063 (2007).
60. Margot N. A., Gibbs C. S., Miller M. D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2345 (2010).
61. Dang Z., Lai W., Qian K., Ho P., Lee K. H., Chen C. H., Huang L.: *J. Med. Chem.* 52, 7887 (2009).
62. Mukherjee R., Jaggi M., Siddiqui M. J., Srivastava S. K., Rajendran P., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4087 (2004).
63. Reddy B. P., Sharma V. M., Reddy K. R., Reddy M. M.: *US20110218204 A1* (2011).
64. Sun Y. F., Song C. K., Viernstein H., Unger F., Liang Z. S.: *Food Chem.* 138, 1998 (2013).
65. Kim D. S., Pezzuto J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1707 (1998).
66. Kommera H., Kaluderovic G. N., Bette M., Kalbitz J., Fuchs P., Fulda S., Mier W., Paschke R.: *Chem. Biol. Interact.* 185, 128 (2010).
67. Gonzalez P., Mader I., Tchoghndjian A., Enzenmuller S., Cristofanon S., Basit F., Debatin K. M., Fulda S.: *Cell Death Differ.* 19, 1337 (2012).
68. Dai L., Li D., Cheng J., Liu J., Deng L.-H., Wang L.-Y., Lei J.-D., He J.: *Polym. Chem.* 5, 5775 (2014).
69. Bildziukevich U., Vida N., Rarova L., Kolar M., Saman D., Havlicek L., Drasar P., Wimmer Z.: *Steroids* 100, 27 (2015).
70. Hata K., Hori K., Takahashi S.: *J. Nat. Prod.* 65, 645 (2002).
71. Hata K., Hori K., Ogasawara H., Takahashi S.: *Toxicol. Lett.* 143, 1 (2003).
72. Jeong H. J., Chai H. B., Park S. Y., Kim D. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 1201 (1999).
73. Willmann M., Wacheck V., Buckley J., Nagy K., Thalhammer J., Paschke R., Triche T., Jansen B., Selzer E.: *Eur. J. Clin. Invest.* 39, 384 (2009).
74. Gauthier C., Legault J., Rondeau S., Pichette A.: *Tetrahedron Lett.* 50, 988 (2009).
75. Dang Thi T. A., Kim Tuyet N. T., Pham The C., Thanh Nguyen H., Ba Thi C., Doan Duy T., D'Hooche M., Van Nguyen T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5190 (2014).
76. Suresh C., Zhao H., Gumbs A., Chetty C. S., Bose H. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1734 (2012).
77. Zhao H., Holmes S. S., Baker G. A., Challa S., Bose H. S., Song Z.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 27, 715 (2012).
78. Biedermann D., Eignerova B., Hajduch M., Sarek J.: *Synthesis* 2010, 3839 (2010).
79. You Y. J., Kim Y., Nam N. H., Ahn B. Z.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3137 (2003).
80. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* 67, 1100 (2004).
81. Spivak A. Y. a 11 autorů: *Russ. Chem. Bull.* 62, 188 (2013).
82. Xu Y.-P., Yang M., Pan D.-H., Wang L.-Z.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 288, 157 (2011).
83. Pal A., Ganguly A., Chowdhuri S., Yousuf M., Ghosh A., Barui A. K., Kotcherlakota R., Adhikari S., Banerjee R.: *ACS Med. Chem. Lett.* 6, 612 (2015).
84. Holz-Smith S. L., Sun I. C., Jin L., Matthews T. J., Lee K. H., Chen C. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 60 (2001).
85. Evers M. a 15 autorů: *J. Med. Chem.* 39, 1056 (1996).
86. Soler F. a 11 autorů: *J. Med. Chem.* 39, 1069 (1996).
87. Sun I. C., Chen C. H., Kashiwada Y., Wu J. H., Wang H. K., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* 45, 4271 (2002).
88. Qian K., Yu D., Chen C.-H., Huang L., Morris-Natschke S. L., Nitz T. J., Salzwedel K., Reddick M., Allaway G. P., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.* 52, 3248 (2009).
89. Kashiwada Y., Chiyo J., Ikeshiro Y., Nagao T., Okabe H., Cosentino L. M., Fowke K., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 183 (2001).
90. Qian K., Bori I. D., Chen C.-H., Huang L., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.* 55, 8128 (2012).
91. Zhao Y., Gu Q., Morris-Natschke S. L., Chen C. H., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* 59, 9262 (2016).
92. Horton D. A., Bourne G. T., Smythe M. L.: *Chem. Rev.* 103, 893 (2003).
93. Evans B. E. a 16 autorů: *J. Med. Chem.* 31, 2235 (1988).
94. Tang J. a 20 autorů: *Open Med. Chem. J.* 8, 23 (2014).
95. Huang L., Yuan X., Aiken C., Chen C. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 663 (2004).
96. Dang Z., Ho P., Zhu L., Qian K., Lee K. H., Huang L., Chen C. H.: *J. Med. Chem.* 56, 2029 (2013).
97. Hashimoto F., Kashiwada Y., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem.* 5, 2133 (1997).

98. Urano E., Ablan S. D., Mandt R., Pauly G. T., Sigano D. M., Schneider J. P., Martin D. E., Nitz T. J., Wild C. T., Freed E. O.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 190 (2015).
99. Gillis E. P., Eastman K. J., Hill M. D., Donnelly D. J., Meanwell N. A.: *J. Med. Chem.* **58**, 8315 (2015).
100. Li J., Goto M., Yang X., Morris-Natschke S. L., Huang L., Chen C. H., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 68 (2016).
101. Qian K., Kuo R. Y., Chen C. H., Huang L., Morris-Natschke S. L., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* **53**, 3133 (2010).
102. Liu Z. a 16 autorů: *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1757 (2016).
103. Regueiro-Ren A. a 27 autorů: *ACS Med. Chem. Lett.* **7**, 568 (2016).
104. Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L. Alizon M.: *Nature* **326**, 662 (1987).

Abstract

Betulinic acid and its derivatives modifying its physicochemical and biological properties contain a promising pharmacophore, which, so far only experimentally, are used as a structural basis for substances that function as antitumor and anti-HIV-1 and -2 agents. An overview of derivatives, classified according both structural characteristics and the type of the effect, is given. Although betulinic acid has been extensively studied since the 1990s, it has not yet been possible to prepare any sufficiently effective and safe derivative useful in clinical practice that could be marketed as a registered drug.