

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

SYNTÉZA DERIVÁTŮ

2-ARYL-4-METHYLCYKLOPENT-2-EN-1-ONU
S POTENCIÁLNÍ ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITOU

Za všestrannou pomoc, cenné rady a připomínky při vypracování této práce děkuji svému školiteli doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a prof. RNDr. Milanu Pourovi, PhD. za spolupráci při syntézách a příjemné pracovní prostředí Mgr. Janu Pavlíkovi a Mgr. Ivanu Šnajdrovi.

OBSAH

OBSAH	3
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
1. ÚVOD	5
1.1. Antimykotika	5
1.2. Inkrustoporin a jeho analoga	13
2. CÍL PRÁCE	14
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM	15
3.1. Návrh syntézy karbanalog inkrustoporinu	15
3.2. Syntéza 2-jod-4-methylcyklopent-2-en-1-onu	16
3.3. Syntéza 2-arylderivátů 4-methylcyklopent-2-en-1-onu	17
3.4. Hodnocení biologické aktivity	20
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1. Použité experimentální postupy	23
4.2. Příprava 2-jod-4-methylcyklopent-2-en-1-onu	24
4.3. Příprava 2-aryl-4-methylcyklopent-2-en-1-onů	25
5. ZÁVĚR	31
6. LITERATURA	32

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIDS	syndrom získané imunodeficiencie
ATCC	American Type Culture Collection
BuLi	butyllithium
BCy ₂ P	bifenyldicyklohexylfosfin
dba	dibenzylidenaceton
DMF	dimethylformamid
EtAc	ethylacetát
FDA	americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
IR	infračervená spektroskopie
M	mol.l ⁻¹
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektroskopie
NMR	nukleární magnetická rezonance
Pe	petrolether
PPh ₃	trifenylfosfin
ppm	<i>parts per million</i>
RNA	ribonukleová kyselina
TFP	tri(2-furyl)fosfin
THF	tetrahydrofuran

1. ÚVOD

1.1. Antimykotika

Antimykotika (antifungální látky) jsou léčiva používaná k terapii mykotických infekcí, tj. infekcí způsobených patogenními kmeny kvasinek a vláknitých hub. Tyto látky mohou působit *fungistaticky* (inhibovat růst patogenů), nebo *fungicidně* (způsobovat jejich usmrcení).

Podle mechanismu účinku lze antimykotika rozdělit na *nespecifická*, která mají fungistatický účinek daný obecným toxickým působením na houbové organismy (denaturují bílkoviny nebo ovlivňují permeabilitu buněčné membrány), a *specifická*, která zasahují na definovaném místě jejich buněčného metabolismu. Do skupiny nespecifických antimykotik patří některé organické kyseliny (salicylová, boritá, benzoová, undecylenová), aldehydy (formaldehyd), organická barviva (methylrosanilinium chlorid), deriváty fenolů (resorcinol, 2-chlor-4-nitrofenol, kloroxin), a také sloučeniny jodu nebo rtuti.² Specifický účinek antimykotik je založen na rozdílech v metabolismu savčích a houbových buněk. Problémem je, že v obou případech se jedná o buňky eukaryotické, a proto mají do značné míry shodnou strukturu i metabolismus. Většina látek v klinické praxi působí na ergosterol, základní složku plazmatické membrány hub.³ Vhodným místem zásahu antifungálních látek je buněčná stěna, neboť některé enzymy, které se podílejí na její biosyntéze, jsou specifické pouze pro houby a v buňkách savců se nevyskytují.² Jedná se zejména o syntézu chitinu a β -1,3-glukanu.¹¹

Antimykotika můžeme rovněž rozdělit podle způsobu aplikace a místa účinku, a to na antimykotika pro terapii systémových infekcí (perorální nebo parenterální), perorální antimykotika pro léčbu mukokutánních infekcí a látky k topické aplikaci.¹

Látky s antifungální aktivitou mohou být původu syntetického (azolové deriváty, allylaminové deriváty a flucytosin), přírodního (polyenová antibiotika a griseofulvin) nebo polosyntetického (echinokandinové deriváty).³

1.1.1. Systémová antimykotika

V posledních desetiletích výrazně vzrůstá incidence závažných systémových mykotických onemocnění.^{1,2,3,4,6,9} Tento jev je způsoben zvyšujícím se počtem imunosuprimovaných pacientů, a to v důsledku využívání nových chemoterapeutik při léčbě nádorů, rozsáhlého používání širokospektrých antibiotik, transplantací a také z důvodu rozšiřující se pandemie AIDS. Zároveň se vzrůstajícím počtem systémových infekcí roste i rozmanitost houbových patogenů. Velkým problémem je také rozvíjející se rezistence k antifungálním látkám.⁵

Nejčastějším původcem systémových mykóz je rod *Candida*. Se závažnými nozokomiálními kandidózami je spojován především druh *Candida albicans*, ale hlavně v poslední době se zvyšuje množství infekcí vyvolaných tzv. non-albicans druhy: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* nebo *C. crusei*. Dalším z klinicky významných patogenů je rod *Aspergillus*, jenž je původcem aspergilózy, *Cryptococcus neoformans*, způsobující kryptokokózy a *Penicillium marneffeii*, původce penicilózy.

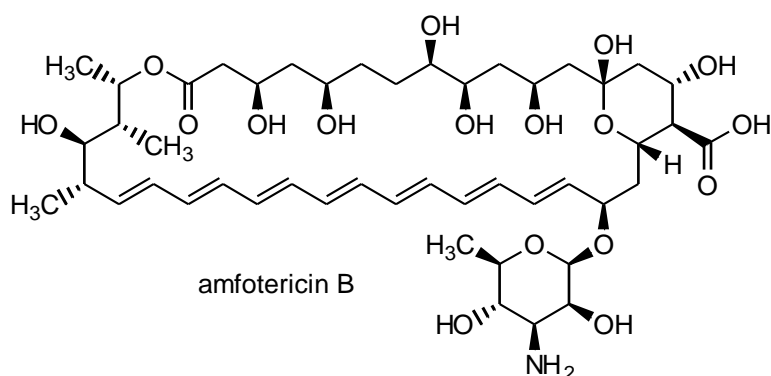
Zatímco k léčbě povrchových mykóz je k dispozici poměrně široká škála antimykotik, v terapii systémových onemocnění našlo uplatnění pouze několik sloučenin.² Proto přetrvává nutnost výzkumu nových léčiv se širokým antifungálním spektrem, zanedbatelnými nežádoucími účinky a minimálním sklonem k vývoji rezistence.⁹ V následujících kapitolách bude podrobněji pojednáno o současném stavu a vývoji v oblasti antifungálních látek.

Amfotericin B

Amfotericin B je polyenové makrolidové antibiotikum izolované ze *Streptomyces nodosus*. Základem jeho struktury je makrocyclický laktonový kruh tvořený hydrofilním polyhydroxylovým řetězcem a lipofilním polyenovým uhlovodíkovým fragmentem. Amfotericin B má nejširší spektrum účinnosti ze známých antimykotik a působí fungicidně.^{1,3} Lipofilní část molekuly se váže na ergosterol plazmatické membrány hub a vytváří v ní hydrofilní póry, které způsobí únik iontů a buněčnou smrt.¹ Amfotericin B nadále zůstává nejpoužívanějším antimykotikem k léčbě systémových infekcí, i když jeho využití je limitováno jeho značnou toxicitou.⁴ Jedná se hlavně o poškození ledvin, které je způsobeno jeho částečnou afinitou k cholesterolu lidských membrán. Navíc má nevýhodné

farmakokinetické vlastnosti – je téměř nerozpustný ve vodě a nevstřebává se z trávicího traktu. Proto se pro léčbu systémových infekcí musí podávat intravenózně.

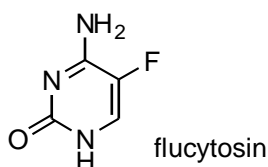
Nežádoucí účinky amfotericinu se podařilo účinně omezit vhodnou technologickou úpravou. Použitím lékových forem založených na lipidovém nosiči se snížila toxicita a zvýšila terapeutická účinnost. V současné době jsou dostupné tři lékové formy amfotericinu B na lipidovém nosiči: liposomální amfotericin B, lipidový komplex a koloidní disperze.⁵ Vysoká cena těchto preparátů však omezuje jejich širší použití.



Flucytosin

Flucytosin (5-fluorocytosin) je ve vodě rozpustný pyrimidinový analog, původně vyvíjený jako antineoplastikum.¹ Později se ukázalo, že neúčinkuje na nádorové buňky, ale má aktivitu antifungální. V houbové buňce dochází k jeho konverzi na 5-fluorouracil, jenž se inkorporuje do RNA jako falešná báze, a inhibuje tak syntézu nukleových kyselin. V buňkách savců tato enzymatická přeměna neprobíhá, proto je flucytosin pro lidský organismus relativně netoxický.¹¹ Pouze malé procento je činností střevních bakterií konvertováno na 5-fluorouracil, který po resorpci může způsobovat myelotoxicitu.²

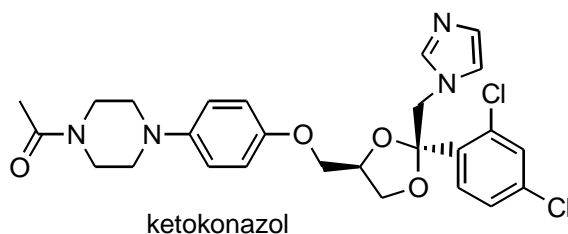
Spektrum účinku flucytosinu je relativně úzké a snadno se na něj vyvíjí rezistence. V současné době se proto podává výhradně v kombinaci s amfotericinem B, v poslední době i s itraconazolem.¹



Azolová antimykotika

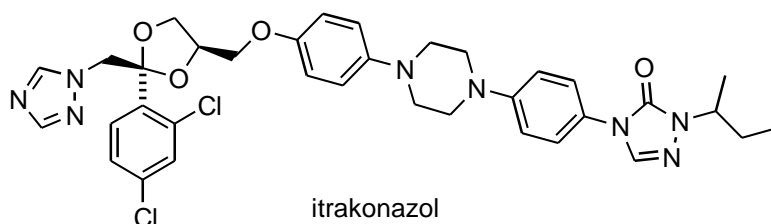
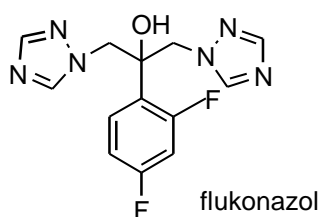
Syntetická antimykotika typu azolů můžeme rozdělit na deriváty imidazolu a deriváty triazolu. Jejich fungistatický účinek spočívá v zásahu do syntézy ergosterolu inhibicí cytochrom P450 dependentní lanosterol-14 α -demethylasy.^{1,3} Přestože azoly mohou částečně interferovat i se savčím cytochromem P450, což může vést k ovlivnění endokrinního systému (pokles hladiny testosteronu a glukokortikoidů),² jsou azolové deriváty daleko méně toxické než amfotericin B. Antifungální spektrum těchto látek je poměrně široké, zahrnuje mnoho druhů kvasinek i vláknitých hub. Největší nevýhodou je zvyšující se počet rezistentních kmenů, což je dáno především častějším používáním azolů v terapii i profylaxi systémových mykóz.

První z imidazolových derivátů byly vyvinuty na konci 60. let dvacátého století. Byl to například **mikonazol**, dnes již překonaný modernějšími triazoly. V roce 1977 pak bylo uvedeno na trh první perorální systémové antimykotikum, imidazoldioxolanový derivát **ketokonazol**.^{2,3} Dnes se tato látka užívá zejména v dermatologii a gynekologii. V terapii systémových infekcí byla nahrazena daleko selektivnějšími, a tedy méně toxickými, deriváty triazolu. Díky své nízké ceně zůstává nejužívanějším systémovým antimykotikem v zemích třetího světa.⁴

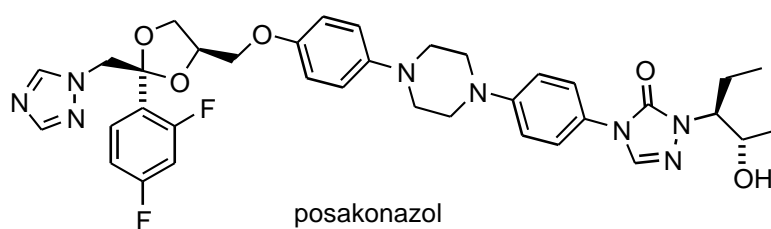
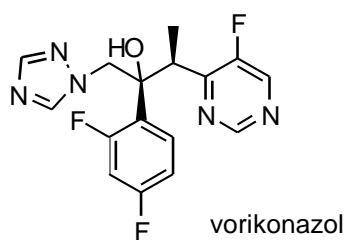


Výměnou imidazolového kruhu za triazolový byla v polovině 80. let získána nejdůležitější skupina syntetických systémových antifungálních látek. Antifungální spektrum triazolů je zpravidla širší a jejich minimální inhibiční koncentrace jsou nižší než u imidazolových antimykotik.² **Flukonazol** je fluorovaný derivát s výbornými farmakokinetickými parametry. Je rozpustný ve vodě, dobře se absorbuje po perorálním podání a proniká i hematoencefalickou bariérou. Optimální profil udělal z tohoto antimykotika široce používaný lék, včetně profylaktického podávání. Široké využití však s sebou přináší značné riziko vývoje rezistence, hlavně u pacientů s AIDS trpících chronickou orofaryngeální kandidózou.³ Flukonazol se používá především k léčení systémových kandidóz

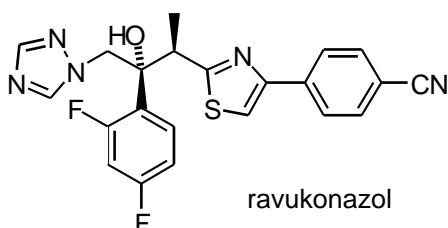
a kryptokokových infekcí, včetně meningitidy. Bohužel nemá žádnou aktivitu proti vláknitým houbám. **Itrakonazol** má širší spektrum účinku, ale omezenou biodostupnost.



V posledních letech byla vyvinuta další generace azolových antimykotik s ještě výhodnějšími vlastnostmi. Lékem volby pro terapii aspergilózy se stal nový triazolový derivát **vorikonazol**, registrovaný FDA v roce 2002.⁴ Jeho spektrum účinku se podobá itrakonazolu, zahrnuje i flukonazol-rezistentní druhy kandid a dimorfní houby, farmakokinetickými parametry připomíná spíše flukonazol.^{1,3} Je dostupný pro perorální i intravenózní podání. V listopadu 2005 byl v Evropě registrován další derivát triazolu **posakonazol**¹⁷ pro profylaxi aspergilóz a kandidóz u imunosuprimovaných pacientů. O rok později ho registrovala FDA.¹² Posakonazol je hydroxylovaný analog itrakonazolu, také s velmi širokým spektrem, zejména pak s vystupňovanou aktivitou proti aspergilům. Je účinný i proti zygomycetům.^{3,6} Má také vysokou trypanocidní aktivitu, a to i na kmeny *Trypanosoma cruzi* rezistentní k nitrofuránům, nitroimidazolům a běžným antifungálním azolům.¹³



Do závěrečné klinické fáze zkoušení vstoupil rovněž **ravukonazol**. Ravukonazol je širokospektrý derivát flukonazolu s velmi dobrým efektem na kandidy a kryptokoky, včetně kmenů rezistentních k flukonazolu.³ Aktivita proti aspergilům je sice o něco nižší než u jiných azolů, ale to může být vyváženo jeho dobrým farmakokinetickým profilem.⁷

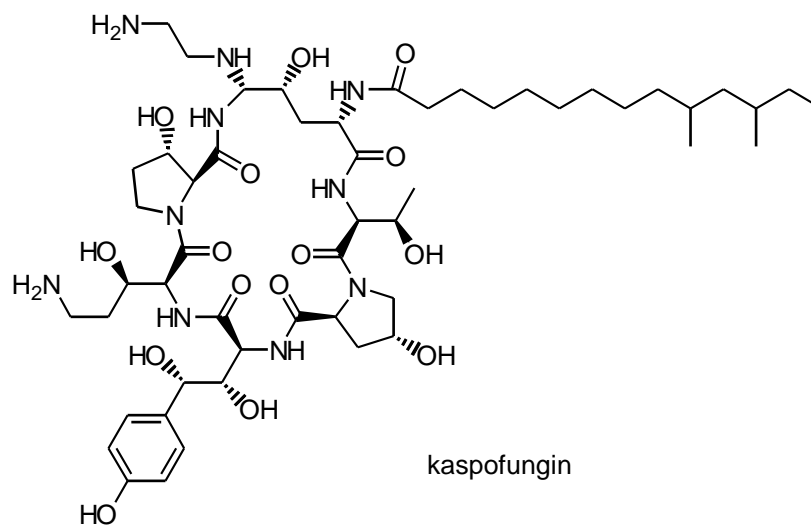


Ve vývoji jsou i další deriváty triazolu, jako například CS-758 s širokým spektrem a vhodnou farmakokinetikou,¹⁸ nebo TAK-456.¹⁹

Echinokandiny

Lipopeptidová antimykotika skupiny echinokandinů představují perspektivní typ sloučenin s novým mechanismem účinku. Inhibují syntézu β -1,3-D-glukanu, který je hlavní složkou buněčné stěny mnoha patogenních hub.⁸ Předlohou strukturou jim byl pneumocandin B₀ izolovaný z *Glarea lozoyensis*.

Jako první byl do klinické praxe zaveden **kaspofungin**, jenž se ukázal být vhodnou a bezpečnou alternativou pro léčbu systémových mykotických onemocnění.^{1,8,10} Roku 2005 byl zaregistrován druhý ze skupiny echinokandinů **mikafungin**⁹ a v loňském roce také **anidulafungin**.¹⁰ Všechny tři látky se vyznačují nízkým výskytem nežádoucích účinků a signifikantní aktivitou proti kandidám a aspergilům.^{1,4,9}



Další vývoj antifungálních látek

Výzkum a vývoj antimykotik prožívá v posledních letech nebývalý rozvoj.³ Strukturálně nové skupiny antifungálních látek jsou získávány klasickou syntézou, izolací z přírodních zdrojů nebo testováním již známých molekul.

Polyoxiny a **nikkomyciny** jsou antibiotika typu peptidových nukleosidů produkovaná bakteriemi rodu *Streptomyces*.³ Působí na buněčnou stěnu hub inhibicí syntézy chitinu.¹¹ Další skupinou látek přírodního původu jsou **sordariny**, které v molekule obsahují tetracycklý diterpenický aglykon sordaricin a liší se sacharidovým zbytkem.³

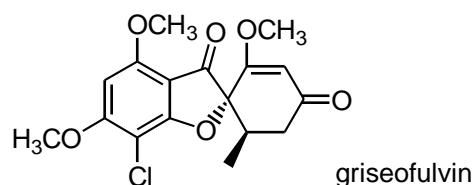
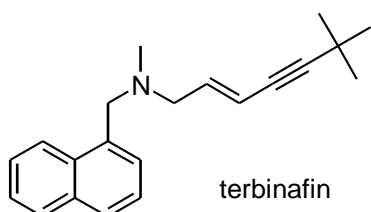
Jsou to vysoce selektivní inhibitory proteosyntézy houbových organismů. Jejich antifungální spektrum zahrnuje kvasinky i vláknité houby, včetně *Pneumocystis carinii*.¹⁴ Do syntézy proteinů zasahuje také β -aminokyselina **icofungipen** s dobrým efektem proti kandidám, působící jako kompetitivní inhibitor isoleucyl-tRNA synthasy.¹⁵

Antifungálně aktivní jsou i některé peptidy.³ Jsou to například cyklické nonapeptidy **aureobasidiny**, mající silnou fungicidní aktivitu proti mnoha houbovým patogenům, včetně *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a některých druhů rodu *Aspergillus*. Zabraňuje také replikaci parazita *Toxoplasma gondii*. Mechanismus jejich účinku spočívá v blokádě syntézy sfingolipidu inositol-P-ceramidu.¹⁶ Ve vývoji jsou také **pradimiciny**, které interferují s mannoproteiny na povrchu houbových buněk.⁴

1.1.2. Perorální antimykotika pro léčbu mukokutánních infekcí

Do této skupiny patří antifungální látky, které se sice vstřebávají z trávicího traktu, ale jejich farmakokinetické vlastnosti limitují klinické použití pouze na infekce kůže a nehtů.³ Po absorpci se totiž kumulují v kůži a jejích adnexech (vlasech a nehtech).

Terbinafin je syntetický allylamin zasahující do syntézy ergosterolu reverzibilní blokádou skvalen epoxidasy. Působí fungicidně na širokou škálu patogenních hub a dosahuje výborných výsledků při léčbě onychomýkóz.^{1,3}

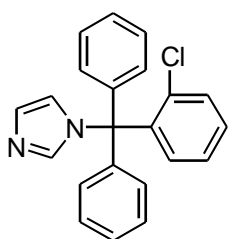


Antibiotikum **griseofulvin**, produkované mikromycetou *Penicillium griseofulvum*, má oproti terbinafinu úzce vymezené spektrum účinku, které zahrnuje pouze dermatofyty. Funguje jako mikrotubulární jed, a tím znemožňuje dělení buněk. Protože je špatně rozpustný ve vodě, lépe se vstřebává v mikronizované formě. Dnes je však ve většině indikací postupně vytlačován inhibitory ergosterolu.³

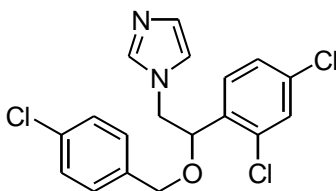
1.1.3. Lokální antimykotika k topické aplikaci

Nystatin a **natamycin** patří stejně jako amfotericin B mezi polyenová antimykotika, ale na rozdíl od amfotericinu jsou z důvodu značné toxicity vyhrazena pouze pro lokální použití. Jsou vhodné zejména pro léčbu slizničních kandidóz.^{2,3}

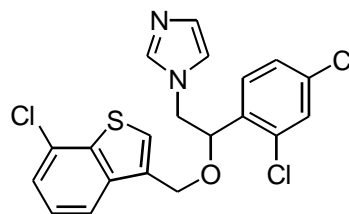
Ve skupině azolových antimykotik najdeme celou řadu látek užívaných k lokální terapii, např. **klotrimazol**, **izonazol**, **ekonazol**, **tiokonazol**, **oxikonazol**, **sulkonazol**, **sertakonazol** a další. Jejich hlavní indikací jsou infekce způsobené dermatofyty a vulvo-vaginální kandidóza. Při lokální aplikaci těchto látek je systémová absorpce zanedbatelná, proto i výskyt nežádoucích účinků je nízký.



klotrimazol

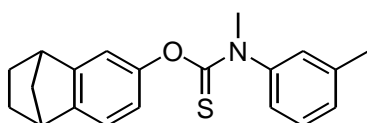


ekonazol

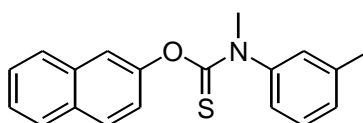


sertakonazol

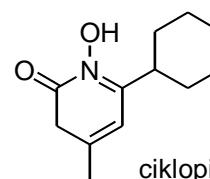
Kromě terbinafinu se jako topické antimykotikum využívá i starší allylaminový derivát **naftifin**. Oba jsou účinné proti dermatofytům.^{1,3} Stejným mechanismem, tedy inhibicí skvalen epoxidasy, působí také thiokarbamáty. **Tolciclát** a **tolnaftát** však patří k dnes již překonaným antimykotikům, neboť jejich účinek nedosahuje léčebných parametrů azolových chemoterapeutik.



tolciclát



tolnaftát

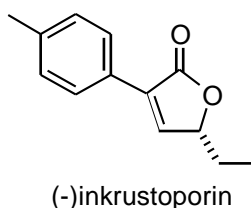


ciklopirox

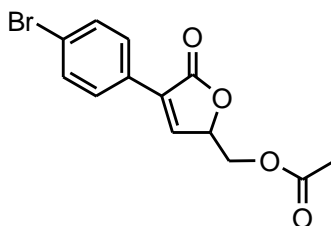
Další syntetickou antifungální látkou je N-hydroxypyridonový derivát **ciklopirox**. Kromě širokého spektra houbových patogenů má také aktivitu proti Gram-pozitivním kokům a protizánětlivý účinek. Dobře proniká do hlubších vrstev kůže a nehtů a způsobuje změnu permeability buněčné membrány hub, a tak narušuje transport bílkovin do buněk.³

1.2. Inkrustoporin a jeho analoga

Naše výzkumná skupina se již několik let zabývá vývojem nových látek s antimykotickou a cytotoxickou aktivitou. Jednou z předlokových struktur pro tento výzkum je molekula inkrustoporinu. Inkrustoporin je přírodní látka izolovaná v roce 1995 z bazidiomycety *Inkrustoporia carneola* a vyznačuje se antifungální aktivitou proti řadě rostlinných patogenů a slabou cytotoxicitou.²⁰ Jde o látku opticky aktivní, což bylo potvrzeno spektrálními metodami a následně totální syntézou obou enantiomerů. Bylo také dokázáno, že přírodní levotočivý izomer má absolutní konfiguraci R.^{21,22}



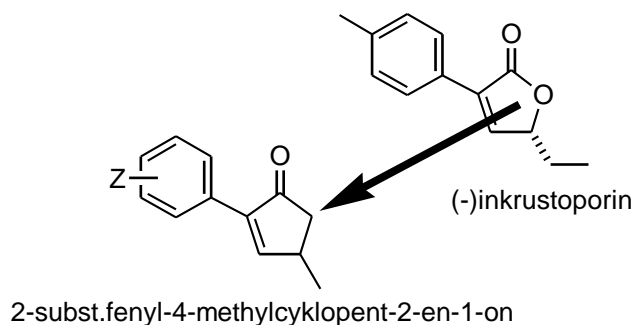
Účinnost inkrustoporinu proti rostlinným patogenům slibovala, že by mohl mít určitý efekt i proti patogenům humánním, podobně jako tomu bylo v případě griseofulvinu.²³ Náš výzkum se zaměřil na přípravu analog této poměrně jednoduché molekuly a ukázalo se, že tento předpoklad byl oprávněný. Byla provedena celá řada syntetických obměn. Jednalo se jednak o substituce v poloze 3 (substituce fenylu různými substituenty a jeho náhrada za heteroaryl), jednak substituce v poloze 5 a v neposlední řadě i obměny týkající se samotného nenasyceného laktonového kruhu. Antifungální aktivita nejúčinnějšího z dosud připravených derivátů inkrustoporinu je srovnatelná s amfotericinem B.²⁴ Touto sloučeninou je 3-(4-bromfenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on:



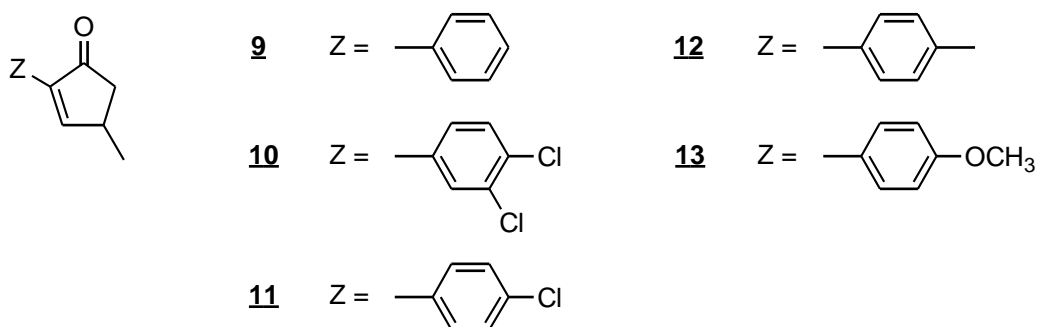
Při syntetických obměnách struktury inkrustoporinu bylo zjištěno, že pro antifungální aktivitu je nezbytná přítomnost dvojně vazby v konjugaci s karbonylovou skupinou. Aktivita může být zvýšena zavedením halogenu do polohy 3 aromatického jádra, zatímco náhrada arylu za heteroaryl antifungální efekt snižuje. V poloze 5 se osvědčila acyloxymethylová skupina. Chiralita na tomto uhlíku přitom pravděpodobně nemá na aktivitu vliv.²⁴

2. CÍL PRÁCE

Cílem mojí práce byla syntéza karbanalog inkrustoporinu, tj. látek, kde je kyslík laktonové vazby nahrazen methylenovou skupinou, a zjistit tak, jaký bude mít tato změna struktury vliv na antimykotickou aktivitu. Předpokládalo se, že laktonová vazba je pro antifungální účinek inkrustoporinu a jeho derivátů je nezbytná. Syntézou karbanalog se tato domněnka měla potvrdit nebo vyvrátit.



Mým úkolem tedy bylo připravit 2-fenyl-4-methylcyklopent-2-en-1-on a jeho deriváty s různě substituovaným fenylovým jádrem. Substituenty byly vybrány podle principů vytvořených Toplisseem,²⁵ aby měly různé fyzikálně-chemické vlastnosti a dal se tak případně odvodit vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou. Konkrétně se jedná o následující deriváty:

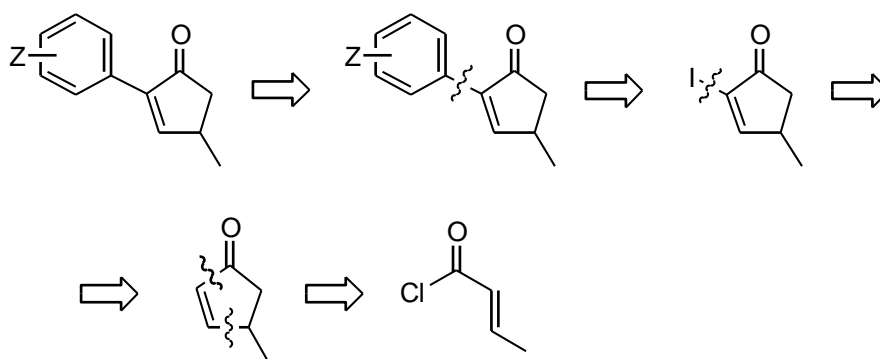


Cílem bylo rovněž otestovat antimykotickou aktivitu všech cílových sloučenin proti humánním houbovým patogenům a také jejich aktivitu cytotoxickou.

3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

3.1. Návrh syntézy karbanalog inkrustoporinu

Z níže uvedeného retrosyntetického rozboru vyplývá, že v prvním stupni dojde ke zrušení vazby C-C a odstranění aromatické části molekuly. Otevřením cyklopentenonového kruhu se pak dostáváme k chloridu kyseliny krotonové.

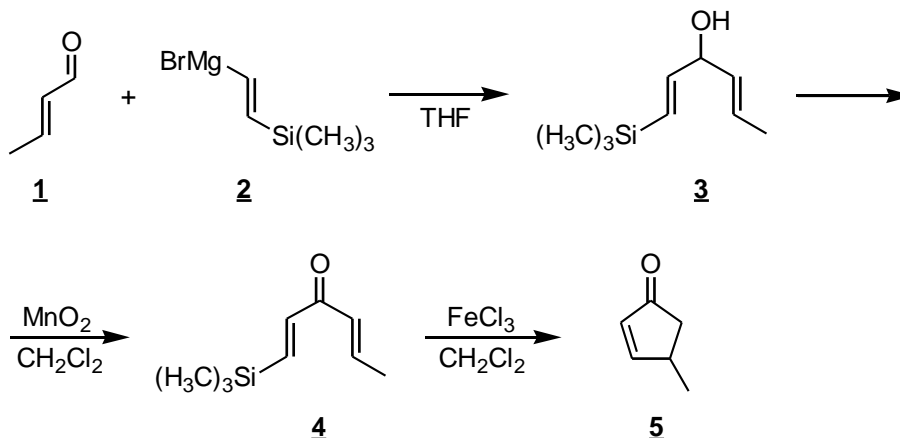


V syntetickém směru musí být nejprve vytvořen methylcyklopentenonový skelet a na něj pak bude do polohy 2 vhodnou couplingovou reakcí zaveden aromatický substituent. Zvolili jsme metodu Negishiho couplingu, při němž se vychází z jodovaných syntonů. Proto je třeba 4-methylcyklopentenon nejprve v poloze 2 najodovat, a vzniklý jodenon pak podrobit reakci s organozinečnatou sloučeninou za vzniku požadovaného produktu.

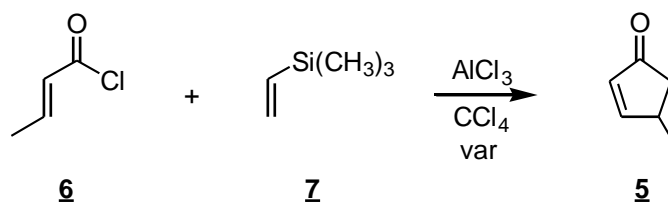
3.2. Syntéza 2-jod-4-methylcyklopent-2-en-1-onu

Jak vyplynulo z retrosyntetického rozboru, prvním krokem syntézy byla příprava 4-methylcyklopentenonu **5**. Jedná se o popsanou látku, jejíž syntéza je uvedena v několika pracích.

Jedna z možných cest vycházela z krotonaldehydu **1**, z něj reakcí s Grignardovým činidlem připravený alkohol **3** byl zoxidován na keton **4** a poté mělo dojít k jeho cyklizaci.²⁶

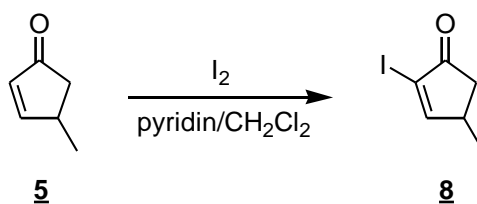


Touto metodou se produkt nepodařilo získat, protože v posledním kroku k cyklizaci nedocházelo. 4-methylcyklopentenon jsme nakonec připravili reakcí krotonylchloridu **6** s trimethylvinylsilanem **7**. Obě látky jsou komerčně dostupné. Reakce probíhala v tetrachlormethanu za varu a byla katalyzována chloridem hlinitým jako Lewisovou kyselinou.²⁷



Produkt **5** nebyl příliš stabilní. Při sloupcové chromatografii na silikagelu docházelo pravděpodobně k přesmyku methylové skupiny do polohy 3. Proto jsme jej použili do další reakce bez čištění a charakterizace.

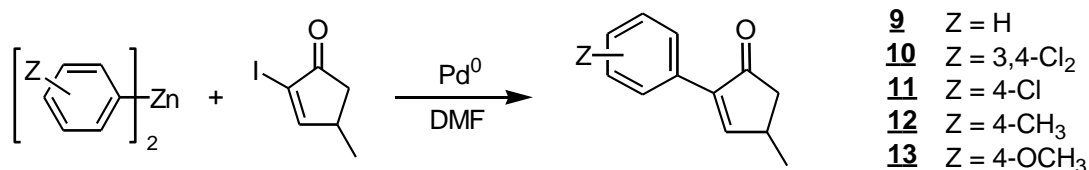
Příprava 2-jod-4-methylcyklopent-2-en-1-onu **8** spočívala v reakci 4-methylcyklopentenonu **5** s I₂ v prostředí pyridinu a dichlormethanu v poměru 1:5.²⁸ Výtěžek po prvních dvou krocích syntézy byl okolo 30 %, přičemž měl tendenci se s velikostí navážky snižovat.



Po vyčištění jsme totožnost produktu ověřili pomocí ^1H a ^{13}C NMR spektroskopie. V ^1H NMR spektru je patrný dublet vodíku na dvojné vazbě (7.91 ppm), multiplet vodíku na C4 (3.14-3.01 ppm), signály diastereotopických vodíků v poloze 5 (2.74 a 2.06 ppm) a dublet methylové skupiny (1.25 ppm). V ^{13}C NMR spektru můžeme najít signál karbonylové skupiny (203.70 ppm), signály dvojné vazby (174.61 a 101.97 ppm), signály uhlíků C4 a C5 (39.60 a 38.33 ppm) a signál methylové skupiny (19.87 ppm).

3.3. Syntéza 2-arylderivátů 4-methylcyklopent-2-en-1-onu

Jak již bylo zmíněno, k zavedení aromatického substituentu do polohy 2 jsme použili metodu Negishiho couplingu. Reakci zjednodušeně vyjadřuje následující reakční schéma:

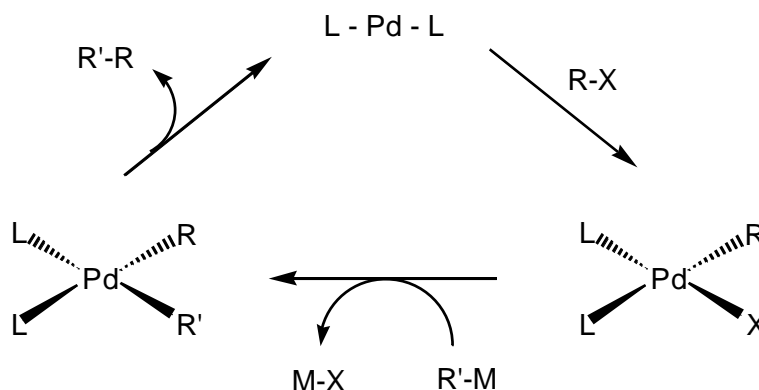


3.2.1. Obecný mechanismus Pd-katalyzovaných couplingů

Palladiem katalyzované cross-couplingové reakce organického elektrofilu (R-X) s organokovovou sloučeninou (R'-M) se za posledních třicet let staly jednou z nejběžnějších a nejselektivnějších metod využívaných k vytvoření vazby C-C. Různé typy couplingů se liší zejména kovem obsaženým v organokovové sloučenině. Mezi nejčastěji používané kovy patří Zn, Al nebo Zr (Negishiho coupling), B (Suzukiho coupling), Sn (Stilleho coupling) a dále také Li, Mg, Cu, Si a další.²⁹

Obecný mechanismus je naznačen na níže uvedeném schématu. Nejprve dochází k oxidativní adici halogenidu (R-X) na aktivní formu katalyzátoru s palladiem v oxidačním čísle 0. Přitom se palladium oxiduje na Pd^{II}. Dalším krokem je transmetalace, při které se nukleofil (R') z organokovové sloučeniny naváže na palladium výměnou za halogen (X).

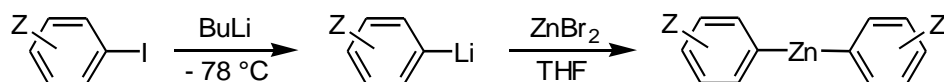
Vytvořený komplex se dvěma organickými ligandy pak podstoupí reduktivní eliminaci za vzniku výsledného produktu (R'-R) a obnovení původní formy katalyzátoru.



3.2.2. Praktické provedení Negishiho couplingu

Jak vyplývá z obecného mechanismu, bylo třeba nejprve připravit organozinečnatou sloučeninu a tu přidat k připravenému komplexu jodenonu s palladiovým katalyzátorem. Celá reakce musela probíhat ve striktně bezvodém prostředí pod inertní atmosférou argonu, protože činidla i vznikající meziproducty jsou velice citlivé na jakoukoli vlhkost.

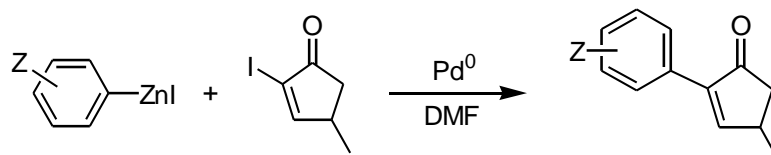
V první fázi jsme příslušný aryljodid převedli na organolithnou sloučeninu působením butyllithia při $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ v prostředí tetrahydrofuranu. Po přidání ZnBr_2 pak došlo k výměně lithia za zinek a vzniku požadovaného diarylzinku.



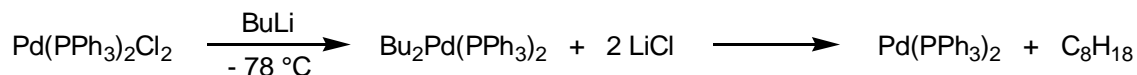
Bromid zinečnatý ochotně váže vzdušnou vlhkost, proto musel být před přidáním do reakce vysušen roztavením za působení silného vakua. Jeho roztok v suchém THF bylo nejvýhodnější přenášet kanylací, aby se ZnBr_2 vůbec nedostal do styku se vzduchem.

Pro průběh Negishiho couplingu je vhodnější použít jako rozpouštědlo dimethylformamid. Proto jsme před dalším krokem z reakční směsi s organozinečnatou sloučeninou nejprve pomocí vodní vývěvy odstranili THF a nahradili ho suchým DMF.

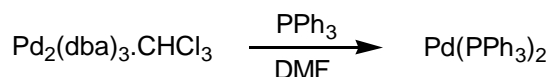
Některé organozinečnaté sloučeniny jsou i komerčně dostupné. Jejich použitím se syntéza značně zjednodušila, ale zjistili jsme, že výtěžky byly nižší. Mohlo by to být dáno vyšší aktivitou diarylzinku oproti komerčně dostupnému arylzinkjodidu. Důvodem by také mohlo být to, že jsou tyto látky dodávány jako roztok v THF. Navíc jsou to značně nestabilní sloučeniny, které se pravděpodobně časem rozkládají.



Dalším problémem byla volba vhodného katalyzátoru. Nejprve jsme použili $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$, který lze připravit dvěma způsoby. První z nich spočívá v působení butyllithia na suspenzi $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ v THF při $-78\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 hodiny.



Druhou možností bylo přidání 2 mol.ekv. PPh_3 do roztoku $\text{Pd}_2(\text{dba})_3\cdot\text{CHCl}_3$ v DMF. Směs se míchala za laboratorní teploty do vyčerení (asi 30 minut).

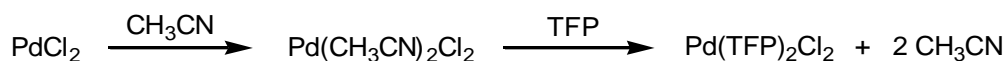


Tento způsob je sice jednodušší, ale jeho značnou nevýhodou je, že vznikající dibenzylidenaceton přetrvává v reakční směsi a pokud je svou polaritou blízky produktu, je prakticky neoddělitelný. Tak tomu bylo v případě látek **9** a **12**, kdy se ani po opakované sloupcové chromatografii a krystalizaci z hexanu nepodařilo dibenzylidenaceton od produktu oddělit.

V reakční směsi nadto zůstávalo poměrně velké množství nezreagované výchozí látky (jodmethylcyklopentenonu **8**), která zase měla podobný retenční faktor jako produkty **10** a **11**. Proto jsme se snažili upravit reakční podmínky tak, aby pokud možno zreagovala veškerá výchozí látka.

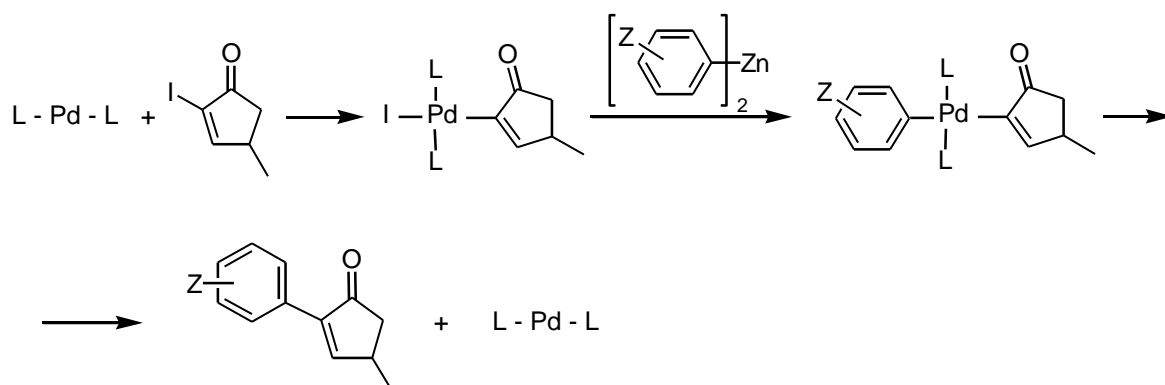
Pro zvýšení výtěžku jsme použili aktivnější katalyzátory se snadněji odstupujícími ligandy, bifenyldicyklohexylfosfinem a tri(2-furyl)fosfinem. Postup jejich přípravy byl stejný jako v předešlém případě: k roztoku $\text{Pd}_2(\text{dba})_3\cdot\text{CHCl}_3$ v DMF byly přidány 2 mol.ekv. BCy_2P nebo TFP. Výtěžky se o něco zvýšily, ale nevyřešil se tak problém dibenzylidenacetonu v reakční směsi.

Jako nejúčinnější katalyzátor se ukázal být $\text{Pd}(\text{TFP})_2\text{Cl}_2$. Ten na rozdíl od dříve uvedených katalyzátorů nebyl připraven in situ, ale reakcí $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$ s TFP. Výchozí látkou pro přípravu $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$ byl PdCl_2 .



S použitím tohoto katalyzátoru se podařilo u látky **12** dosáhnout výtěžku 47,3 %, oproti 36 % s $\text{Pd}(\text{BCy}_2\text{P})_2$ a 23 % při užití $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$ a produkt byl čistý. Katalyzátor byl ve všech případech použit v množství 5 mol. % vzhledem k jodenonu **8**.

K vytvořenému katalyzátoru jsme pak přidali roztok jodmethylcyklopentenonu **8** v DMF a následně roztok organozinečnaté sloučeniny ve stejném rozpouštědle. Reakce probíhala níže uvedeným mechanismem.



Tímto způsobem jsme nasyntetizovali látky **9**, **10**, **11** a **12**. 4-methoxy derivát **13** se připravit nepodařilo, protože při couplingu vznikala směs látek, mezi nimiž požadovaný produkt vůbec nebyl.

Všechny finální produkty byly charakterizovány ^1H a ^{13}C NMR, IR a MS spektry. V NMR spektrech přibýly signály aromatického substituentu v poloze 2. V ^1H NMR spektrech to v případě fenyl derivátu **9** jsou dva multiplety při 7.72-7.66 a 7.42-7.27 ppm. U 3,4-dichlorfenyl derivátu **10** se objevily dublety při 7.84 a 7.44 ppm a dublet dubletů při 7.58 ppm. Ve spektru 4-chlorfenyl derivátu **11** jsou zřetelné opět dva multiplety (7.68-7.60 a 7.38-7.29 ppm) a ve spektru 4-methylfenyl derivátu **12** je kromě dvou multipletů p-substituovaného jádra (7.62-7.57 a 7.23-7.16 ppm) patrný také singlet methylové skupiny při 2.36 ppm. Odpovídající signály se objevily také v ^{13}C NMR spektrech.

3.4. Hodnocení biologické aktivity

3.3.1. Antifungální aktivita

Antifungální aktivita u připravených látek **9**, **10**, **11** a **12** byla testována pomocí mikrodiluční bujónové metody (testovací médium RPMI 1640 s glutaminem) na základě stanovení minimální inhibiční koncentrace (v $\mu\text{mol.l}^{-1}$) ve dvou časových intervalech. Testovací soubor kmenů zahrnoval zástupce běžných původců infekčních onemocnění

a obsahoval devět kmenů kvasinek (*Candida spp.*, *Trichosporon beigelii*) a tři druhy vláknitých hub (*Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*). Výsledky jsou zaznamenány v tab. 1.

Tab. 1 Antifungální aktivita

Kmen	Čas	Testovaná látka - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)			
		<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
CA1	24 h	250	31,25	62,5	>500
	48 h	500	125	125	>500
CA2	24 h	500	250	500	>500
	48 h	>500	500	500	>500
CP	24 h	500	125	250	>500
	48 h	>500	500	500	>500
CK1	24 h	500	250	500	>500
	48 h	>500	500	500	>500
CK2	24 h	>500	250	500	>500
	48 h	>500	250	500	>500
CT	24 h	>500	250	500	>500
	48 h	>500	500	500	>500
CG	24 h	>500	250	500	>500
	48 h	>500	500	500	>500
CL	24 h	>500	250	250	>500
	48 h	>500	500	500	>500
TB	24 h	250	250	250	>500
	48 h	>500	500	500	>500
AF	24 h	>500	>500	500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	500	250	500	>500
	48 h	>500	250	500	>500
TM	72 h	62,5	31,25	125	>500
	120 h	125	62,5	250	>500

Pozn: **tučně** = MIC se nachází v rámci testovaného rozmezí koncentrací

CA1 – *Candida albicans* ATCC 44859

CA2 – *Candida albicans* ATCC 90028

CP – *Candida parapsilosis* ATCC 22019

CK1 – *Candida krusei* ATCC 6258

CK2 – *Candida krusei* E28

CT – *Candida tropicalis* 156

CG – *Candida glabrata* 20/I

CL – *Candida lusitaniae* 2446/I

TB – *Trichosporon beigelii* 1188

AF – *Aspergillus fumigatus* 231

AC – *Absidia corymbifera* 272

TM – *Trichophyton mentagrophytes* 445

Z tabulky je zřejmé, že antifungální aktivita připravených sloučenin není příliš vysoká, v případě látky **12** je prakticky nulová. Nejúčinnější je 3,4-dichlorfenyl derivát **10**, ale ani jeho aktivita se zdaleka nepřibližuje standardně používaným antimykotikům.

3.3.2. Cytotoxická aktivita

U všech cílových produktů bylo provedeno také *in vitro* testování cytotoxické aktivity (tab. 2). Test byl proveden na čtyřech typech buněčných kultur: buňkách L1210 myší lymfocytární leukémie, HL-60 lidské promyelocytární leukémie, HeLa S3 lidského karcinomu děložního čípku a buňkách CCRF-CEM lidské akutní lymfoblastické leukémie. Buněčné linie L1210, HL-60 a CCRF-CEM byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s fetálním telecím sérem na 24-jamkových destičkách s tkáňovou kulturou. Buněčný nárůst byl odečten 72 hodin po přidání testovaných látek. Buňky HeLa S3 byly suspendovány v buněčném kultivačním médiu RPMI 1640 – HEPES s fetálním telecím sérem a hodnocení bylo provedeno po 48 hodinách. Současně byl hodnocen kontrolní vzorek, který kvantifikoval buněčnou viabilitu.

Tab. 2 Cytotoxická aktivita – inhibice buněčného růstu (v % proti nárůstu kontroly)

Testovaná látka	Buněčná linie			
	L1210	HL-60	HeLa S3	CCRF-CEM
9	81	94	90	94
10	101	89	84	99
11	81	99	88	101
12	86	104	90	100

L 1210 – buňky myší lymfocytární leukémie ATCC CCL 219

HL-60 – buňky lidské promyelocytární leukémie ATCC CCL 240

HeLa S3 – buňky lidského karcinomu děložního čípku ATCC CCL 2.2

CCRF-CEM – T-lymfoblastická buněčná linie ATCC CCL 119

Testování bylo provedeno při koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a inhibice růstu je vyjádřena v procentech oproti nárůstu kontroly. Jak je patrné z tab. 2, připravené deriváty nevykazují v podstatě žádnou inhibiční aktivitu. Nebyla ani stanovena hodnota IC_{50} , protože již z tohoto prvního screeningu je zřejmé, že by se nenacházela pod hranicí $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$. A jen látky s IC_{50} pod touto hranicí mohou být zajímavé jako potenciální antineoplastika.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité experimentální postupy

Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. Tetrahydrofuran byl před použitím predestilován z benzofenon ketylu. Dimethylformamid byl vysušen opakovaným stáním nad čerstvě aktivovanými molekulovými síty.

NMR spektra všech látek byla měřena v roztocích CDCl_3 při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro ^1H a při 75 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v *parts per million* (ppm) a byly nepřímým vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7.26 pro ^1H a 77.00 pro ^{13}C). Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet), interakční konstanty (Hz) a přiřazení. Měření IR spekter všech látek bylo provedeno na přístroji NICOLET IMPACT 400, u pevných látek v tabletách 400 mg KBr s 0.7 mg vzorku, u olejovitých látek v 0.25 ml CDCl_3 nebo CHCl_3 s 15 mg vzorku. Hmotnostní spektra všech látek byla měřena na hmotnostním spektrometru MAGNUM FINNIGAN MAT s nízkou rozlišovací schopností.

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) s detekcí pod UV lampou a s pomocí detekčního činidla $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 g), $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ (4 g), konc. H_2SO_4 (10 ml), H_2O (200 ml) a následného zahřátí.

Antifungální aktivita látek byla stanovena na Katedře biologických a lékařských věd, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze. Čtyři z kmenů použitých na testování pocházely z American Type Culture Collection (ATCC), ostatní byly klinické izoláty.

Stanovení cytotoxické aktivity bylo provedeno RNDr. Ivanem Votrubou v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze. Použité buněčné kultury pocházely z American Type Culture Collection (ATCC).

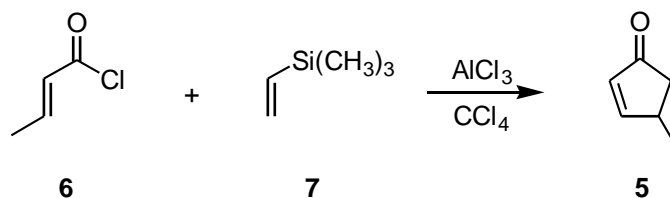
4.2. Příprava 2-jod-4-methylcyklopent-2-en-1-onu

4.2.1. 4-methylcyklopent-2-en-1-on

Sumární vzorec: C₆H₈O

Molekulová hmotnost: 96.13

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Roztok krotonylchloridu **6** (0.96 ml, 10 mmol) a AlCl₃ (1.4 g, 10.4 mmol) ve 14 ml CCl₄ byl zahřát na 50 °C a pak přidán roztok trimethylvinylsilanu **7** (1.84 ml, 12 mmol) v 10 ml stejného rozpouštědla. Směs byla zahřáta k varu a při této teplotě míchána po dobu 30 minut. Po zchlazení byla reakční směs hydrolyzována roztokem 5 g NH₄Cl ve 40 ml destilované vody, vytřepána do CCl₄, vysušena bezvodým Na₂SO₄ a po odpaření rozpouštědla byl produkt bez čištění použit do následující reakce.

Teoretický výtěžek: 0.961 g

Praktický výtěžek: 0.770 g surového produktu (80.1 %)

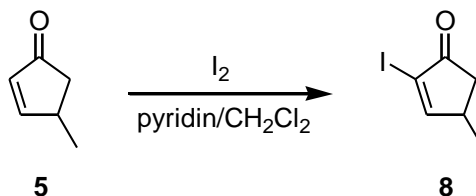
Charakteristika: žlutohnědá olejovitá kapalina

4.2.2. 2-jod-4-methylcyklopent-2-en-1-on

Sumární vzorec: C₆H₇IO

Molekulová hmotnost: 222.02

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

K roztoku 4-methylcyklopentenonu **5** (0.770 g, 8 mmol) ve 12 ml směsi pyridinu a CH₂Cl₂ (1:5) byl přikapán roztok I₂ (2.436 g, 9.6 mmol) ve stejném objemu směsi. Po 90 minutách míchání za laboratorní teploty byla reakční směs vytřepána nasycenými

roztoky $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, NH_4Cl a NaCl . Z organické fáze vysušené bezvodým Na_2SO_4 bylo odpařeno rozpouštědlo a produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi Pe:EtAc (9:1) jako mobilní fáze.

Teoretický výtěžek: 1.778 g

Praktický výtěžek: 0.724 g (40.7 %), výtěžek za první dva kroky 30.6 %

Charakteristika: žlutá olejovitá kapalina

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.91 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H3), 3.14-3.01 (1H, m, H4), 2.74 (1H, dd, $J=18.8$ Hz, $J=6.5$ Hz, H5), 2.06 (1H, dd, $J=18.8$ Hz, $J=2.1$ Hz, H5), 1.23 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH_3)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 203.70, 174.61, 101.97, 39.60, 38.33, 19.87

4.3. Příprava 2-aryl-4-methylcyklopent-2-en-1-onů

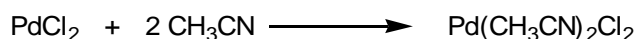
4.3.1. Příprava katalyzátoru

Chlorid bis(acetonitril)palladnatý

Sumární vzorec: $\text{C}_4\text{H}_6\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Pd}$

Molekulová hmotnost: 259.43

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Chlorid palladnatý (4.0 g, 22.6 mmol) byl suspendován ve 40 ml acetonitrilu a reakční směs byla míchána 18 hodin za laboratorní teploty. Produkt byl zfiltrován přes fritu a promyt hexanem.

Teoretický výtěžek: 5.852 g

Praktický výtěžek: 5.023 g (85.8 %)

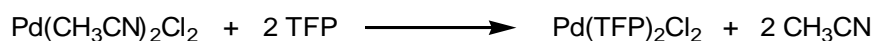
Charakteristika: žlutá práškovitá látka

Chlorid bis[tri(2-furyl)fosfin]palladnatý

Sumární vzorec: $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{O}_6\text{P}_2\text{Pd}$

Molekulová hmotnost: 641.67

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Chlorid bis(acetonitril)palladnatý (0.415 g, 1.6 mmol) byl suspendován ve 20 ml toluenu a po přidání tri(2-furyl)fosfinu (0.825 g, 3.52 mmol) byla směs 3 hodiny zahřívána k varu pod zpětným chladičem. Sraženina byla odfiltrována přes fritu a vysušena na vakuu.

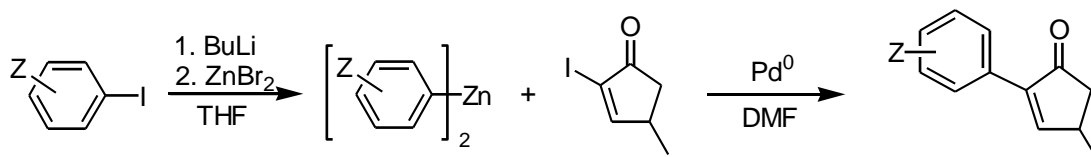
Teoretický výtěžek: 1.026 g

Praktický výtěžek: 0.918 g (89.5 %)

Charakteristika: žlutozelená práškovitá látka

4.3.2. Obecný postup Negishiho couplingu

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Roztok I:

A: Do vyžíhané srdcovité baňky byl pod atmosférou argonu vpraven roztok příslušného jodbenzenu (1.5 mmol) v 5 ml suchého THF. Po ochlazení na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo přidáno 1.6 M BuLi v hexanu (1.0 ml, 1.58 mmol) a směs byla při této teplotě míchána 20 minut. ZnBr₂ (0.236 g, 1.05 mmol) byl vysušen tavením za působení silného vakua a po zchladnutí byl pomocí kanyly přenesen v 5 ml suchého THF do připravené reakční směsi. Vzniklý roztok byl pomalu ohřát na laboratorní teplotu, pomocí vodní vývěvy z něj byl odstraněn THF a nahrazen 5 ml suchého DMF.

B: Při reakci s komerčně dostupnými arylzinkjodidy byl jako roztok I použit 0.5 M roztok příslušné organozinečnaté sloučeniny v THF (3 ml, 1.5 mmol).

Roztok II:

A: Ve druhé vyžíhané baňce byl pod atmosférou argonu suspendován Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.035 g, 0.05 mmol) v 1 ml suchého THF. Po ochlazení na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo přidáno 1.6 M BuLi v hexanu (0.07 ml, 0.11 mmol) a směs byla míchána 1 hodinu při téže teplotě. Pak byl přidán roztok jodmethylcyklopentenonu **8** (0.222 g, 1.0 mmol) ve 4 ml suchého DMF a reakční směs byla postupně ohřívána na laboratorní teplotu.

B: Do vyžíhané baňky byl pod atmosférou argonu vpraven Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (0.026 g, 0.025 mmol), příslušný ligand (0.10 mmol, PPh₃: 0.026 g, BCy₂P: 0.035 g, TFP: 0.023 g) a 3 ml suchého DMF. Suspenze byla míchána za laboratorní teploty do vyčeření (20 až

30 minut). Potom byl přidán roztok jodmethylcyklopentenonu **8** (0.222 g, 1.0 mmol) ve 2 ml suchého DMF.

C: Ve vyžíhané baňce byl pod atmosférou argonu suspendován Pd(TFP)₂Cl₂ (0.032 g, 0.05 mmol) ve 3 ml suchého DMF. Ke směsi byl přidán roztok jodmethylcyklopentenonu **8** (0.222 g, 1.0 mmol) ve 2 ml suchého DMF.

Roztok I byl pomocí kanyly přenesen do baňky s roztokem II a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty přes noc. Pak byla zředěna EtAc, vytřepána nasyceným roztokem NaCl a vysušena bezvodým Na₂SO₄. Po odpaření rozpouštědla byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi Pe:EtAc (9:1) jako eluentu.

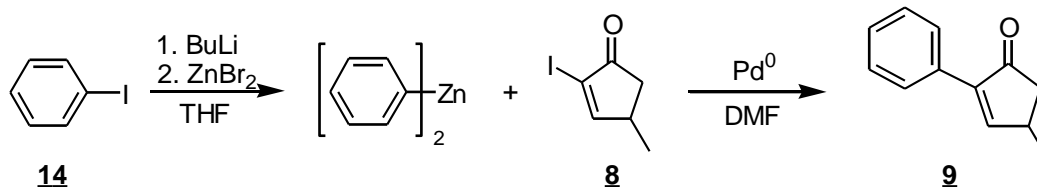
4.3.3. Přehled připravených látek

2-fenyl-4-methylcyklopent-2-en-1-on

Sumární vzorec: C₁₂H₁₂O

Molekulová hmotnost: 172.22

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz. 4.3.2.

Roztok I: **A:** jodbenzen **14** (0.17 ml, 1.5 mmol), 1.6 M BuLi (1.0 ml, 1.58 mmol), ZnBr₂ (0.236 g, 1.05 mmol)

Roztok II: **A:** Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.035 g, 0.05 mmol), 1.6 M BuLi (0.07 ml, 0.11 mmol), jodmethylcyklopentenon **8** (0.222 g, 1.0 mmol)

Teoretický výtěžek: 0.172 g

Praktický výtěžek: 0.033 g (19.2 %)

Charakteristika: žlutá olejovitá kapalina

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.72-7.66 (3H, m, H₃, H₂', H₆'), 7.42-7.27 (3H, m, H₃', H₄', H₅'), 3.08-2.95 (1H, m, H₄), 2.83 (1H, dd, *J*=19.0 Hz, *J*=6.3 Hz, H₅), 2.18 (1H, dd, *J*=19.0 Hz, *J*=2.2 Hz, H₅), 1.27 (3H, d, *J*=7.1 Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 207.38, 163.92, 142.29, 131.42, 128.38, 128.35, 127.09, 44.39, 32.89, 20.16

IR (CHCl_3): ν_{max} 3027, 2965, 2930, 1741, 1704, 1449 cm^{-1}

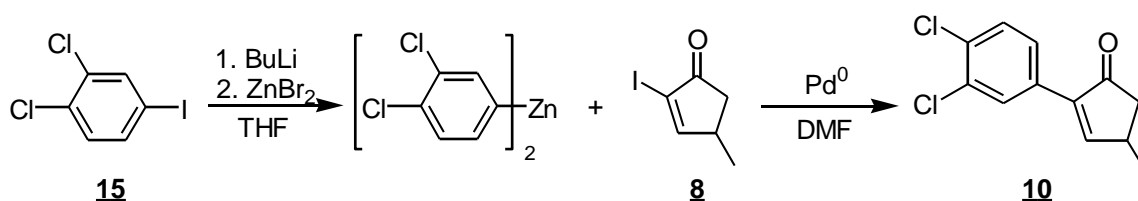
MS: 172 (M^+ , 42), 157 (8), 144 (21), 129 (100), 115 (15), 102 (27), 89 (5), 77 (12), 63 (11), 51 (14), 42 (7)

2-(3,4-dichlorfenyl)-4-methylcyklopent-2-en-1-on

Sumární vzorec: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$

Molekulová hmotnost: 241.11

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz. 4.3.2.

Roztok I: **A:** 1,2-dichlor-4-jodbenzen **15** (0.819 g, 3.0 mmol), 1.6 M BuLi (1.98 ml, 3.16 mmol), ZnBr₂ (0.472 g, 2.1 mmol)

Roztok II: **B:** Pd₂(dba)₃.CHCl₃ (0.026 g, 0.025 mmol), BCy₂P (0.035 g, 0.10 mmol), jodmethylcyklopentenon **8** (0.222 g, 1.0 mmol)

Teoretický výtěžek: 0.241 g

Praktický výtěžek: 0.050 g (20.7 %)

Charakteristika: žlutá polotuhá látka

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.84 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H2'), 7.74 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H3), 7.58 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=2.0$ Hz, H6'), 7.44 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5'), 3.10-2.97 (1H, m, H4), 2.83 (1H, dd, $J=19.0$ Hz, $J=6.3$ Hz, H5), 2.18 (1H, dd, $J=19.0$ Hz, $J=2.2$ Hz, H5), 1.27 (3H, d, $J=7.2$ Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 206.59, 164.79, 140.08, 132.56, 132.38, 131.31, 130.35, 128.89, 126.33, 44.26, 33.02, 20.04

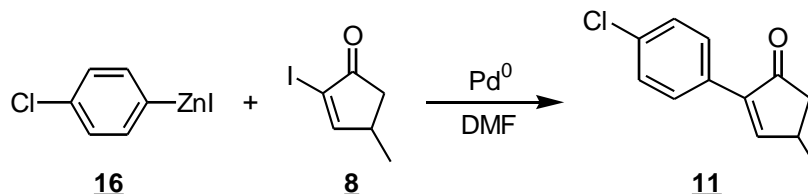
IR (CHCl_3): ν_{max} 2964, 2929, 1745, 1706, 1472 cm^{-1}

MS: 240 (M^+ , 65), 225 (12), 212 (9), 197 (42), 177 (100), 170 (17), 162 (40), 149 (8), 142 (48), 135 (12), 127 (16), 115 (11), 109 (6), 99 (21), 87 (8), 74 (17), 63 (14), 50 (14)

2-(4-chlorfenyl)-4-methylcyklopent-2-en-1-onSumární vzorec: C₁₂H₁₁ClO

Molekulová hmotnost: 206.67

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz. 4.3.2.

Roztok I: **B:** 0.5 M 4-chlorfenylzinkjodid **16** (3 ml, 1.5 mmol)Roztok II: **B:** Pd₂(dba)₃.CHCl₃ (0.026 g, 0.025 mmol), BCy₂P (0.035 g, 0.10 mmol), jodmethylcyklopentenon **8** (0.222 g, 1.0 mmol)

Teoretický výtěžek: 0.207 g

Praktický výtěžek: 0.054 g (26.1 %)

Charakteristika: hnědá krystalická látka, t.t. 47-53 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.70 (1H, d, *J*=2.8 Hz, H3), 7.68-7.60 (2H, m, AA'BB', H2', H6'), 7.38-7.29 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 3.08-2.95 (1H, m, H4), 2.82 (1H, dd, *J*=18.9 Hz, *J*=6.5 Hz, H5), 2.17 (1H, dd, *J*=18.9 Hz, *J*=2.2 Hz, H5), 1.27 (3H, d, *J*=7.1 Hz, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 207.07, 164.04, 141.10, 134.24, 129.82, 128.57, 128.37, 44.31, 32.92, 20.09

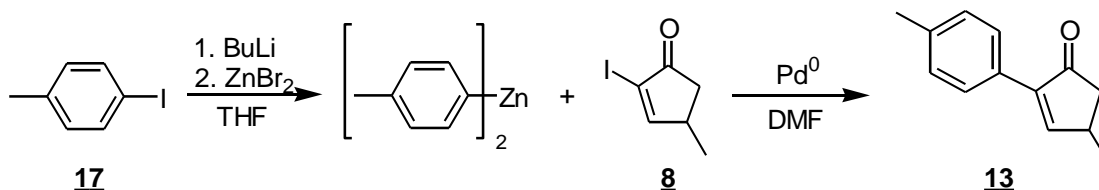
IR (KBr): ν_{max} 2961, 2873, 1704, 1490, 1092, 831 cm⁻¹

MS: 206 (M⁺, 90), 191 (14), 178 (13), 171 (5), 163 (44), 143 (100), 136 (16), 128 (78), 115 (17), 101 (18), 87 (5), 75 (16), 69 (4), 63 (14), 51 (13), 42 (10)

2-(4-methylfenyl)-4-methylcyklopent-2-en-1-onSumární vzorec: C₁₃H₁₄O

Molekulová hmotnost: 186.25

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz. 4.3.2.

Roztok I: A: 4-jodtoluen **17** (0.327 g, 1.5 mmol), 1.6 M BuLi (1.0 ml, 1.58 mmol), ZnBr₂ (0.236 g, 1.05 mmol)

Roztok II: C: Pd(TFP)₂Cl₂ (0.032 g, 0.05 mmol), jodmethylcyklopentenon **8** (0.222 g, 1.0 mmol)

Teoretický výtěžek: 0.186 g

Praktický výtěžek: 0.088 g (47.3 %)

Charakteristika: nažloutlá krystalická látka, t.t. 48-51 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.66 (1H, d, *J*=2.7 Hz, H3), 7.62-7.57 (2H, m, AA'BB', H2', H6'), 7.23-7.16 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 3.06-2.95 (1H, m, H4), 2.82 (1H, dd, *J*=18.8 Hz, *J*=6.5 Hz, H5), 2.36 (3H, s, CH₃), 2.16 (1H, dd, *J*=18.8 Hz, *J*=2.3 Hz, H5), 1.26 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 207.56, 163.10, 142.15, 138.24, 129.08, 128.56, 126.95, 44.42, 32.83, 21.26, 20.21

IR (KBr): ν_{\max} 2958, 2878, 1698, 1513, 1409, 1302, 1132, 822 cm⁻¹

MS: 186 (M⁺, 47), 171 (11), 158 (11), 143 (100), 128 (43), 115 (42), 102 (3), 89 (7), 77 (8), 63 (9), 51 (9), 41 (6)

5. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla připravena série čtyř karbanalog inkrustoporinu (2-arylderivátů 4-methylcyklopent-2-en-1-onu) s různou substitucí na aromatickém jádře. 4-methoxyderivát se za stejných podmínek připravit nepodařilo. Všechny látky byly charakterizovány ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR a MS spektry.

Připravené sloučeniny byly podrobeny *in vitro* testování antifungální aktivity. Z výsledků je zřejmé, že jejich aktivita proti humánním houbovým patogenům je velmi nízká. Z toho lze usuzovat, že pro účinek derivátů inkrustoporinu je nutná přítomnost laktonového seskupení, neboť náhrada kyslíku methylenovou skupinou způsobí ztrátu antimykotické aktivity. U všech látek bylo také provedeno hodnocení cytotoxicity. Připravené deriváty cytotoxickou aktivitu nevykazovaly.

Závěrem lze konstatovat, že další modifikace struktury s cílem zvýšení antimykotické nebo cytotoxické aktivity v této skupině sloučenin není perspektivní.

6. LITERATURA

1. Katzung B.G., Basic & Clinical Pharmacology. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, **2004**, 792-800
2. Hartl, J. a kol., Farmaceutická chemie IV. Karolinum, Praha, **2006**, 35-48
3. Doležal, M., Buchta, V., *Praktické lékárenství*. **2006**, 1, 10-14
4. Wu, J. J., Pang, K. R., Huang, D. B., Tyring, S. K., *Dermatologic Therapy*. **2004**, 17 (6), 532-538
5. Veerareddy, P. R., Vobalaboina, V., *Drugs of Today*. **2004**, 40 (2), 133-145
6. Kale, P., Johnson, L. B., *Drugs of Today*. **2005**, 41 (2), 91-105
7. Moore, C. B., Walls, C. M., Denning, D. W., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44 (2), 441-443
8. Chandrasekar, P. H., Manavathu, *Drugs of Today*. **2002**, 38 (12), 829-846
9. Fromtling, R. A., *Drugs of Today*. **2002**, 38 (4), 245-257
10. Cohen-Wolkowicz, M., Benjamin Jr., D. K., Steinbach, W. J., Smith, P. B., *Drugs of Today*. **2006**, 42 (8), 533-544
11. Georgopapadakou, N. H., Walsh, T. J., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40 (2), 279-291
12. <http://www.fda.gov/>, staženo dne 8.3.2007
13. Molina, J. a kol., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44 (1), 150-155
14. Herreros, E., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42 (11), 2863-2869
15. Hasenoehrl, A. a kol., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50 (9), 3011-3018
16. Sonda, S., Sala, G., Ghidoni, R., Hemphill, A., Pieters, J., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49 (5), 1794-1801
17. <http://www.sukl.cz/>, staženo dne 10.3.2007
18. Kagoshima, Y., Konosu, T., *Journal of Fluorine Chemistry*. **2006**, 127 (4-5), 643-650
19. Tsuchimori, N. a kol., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46 (5), 1388-1393
20. Zapf, S., Anke, T., Sterner, O., *Acta Chem. Scand.* **1995**, 49, 233-234
21. Yajima, A., Mori, K., *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 1091-1093
22. Rossi, R., Bellina, F., Biagetti, M., Mannina, L., *Tetrahedron Assymetry*. **1999**, 10, 1163-1172
23. De Carli, L., Larizza, L., *Mutation Research*. **1988**, 195, 91-126
24. Pour, M., Špulák, M., Balšánek, V., Kuneš, J., Kubanová, P., Buchta, V., *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11 (13), 2843-2866

25. Topliss, J. G., *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 1006-1011
26. Jones, T. K., Denmark, S. E., *Helv. Chim. Acta.* **1983**, 66 (8), 2377-2396
27. Kjeldsen, G., Knudsen, J. S., Ravn-Petersen, L. S., Torssell, K. B. G., *Tetrahedron Lett.* **1983**, 39 (13), 2237-2240
28. Balšánek, V., Doktorská disertační práce. UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2002**
29. Negishi, E., Hu, Q., Huang, Z., Qian, M., Wang, G., *Aldrichimica Acta.* **2005**, 38 (3), 71-88