

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



DISERTAČNÍ PRÁCE

Nové deriváty přírodních látek s biologickým účinkem

Hradec Králové, 2019

Mgr. Pavel Horký

Za odborné vedení, všestrannou pomoc během postgraduálního studia a při vypracování této práce děkuji svému školiteli prof. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D., dále pak doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi CSc. a PharmDr. Marcelu Špulákovi, Ph.D. Za příjemné pracovní prostředí děkuji svým spolupracovníkům Mgr. Jiřímu Mikuškovi, Ph.D., Mgr. Jiřímu Kratochvílovi, Ph.D., Mgr. Petru Matoušovi, Mgr. Zbyňku Brůžovi a Mgr. Manuele Voráčové. Poděkování dále patří RNDr. Petru Bartůňkovi, Ph.D. a zejména Mgr. Davidu Sedlákovi, Ph.D. za stanovení cytotoxické aktivity. Idě Dufkové děkuji za stanovení antifungální a antibakteriální aktivity.

ABSTRAKT

V rámci této disertační práce bylo připraveno několik sérií 3,4-diarylfuranonů a 3,4-diarylfuranů analogických k přírodnímu kombretastatinu A-4 a k antifungálně aktivnímu 5-(acyloxymethyl)-3-(halofenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu, které byly podrobeny biologickému screeningu (antimikrobiální, antifungální, cytostatická a cytotoxická aktivita). Dále byla u těchto sloučenin sledována schopnost aktivace kaspáz 3 a 7. Zajímavý profil cytotoxické aktivity byl nalezen u některých halogenovaných derivátů, např. 3-(3,4-dichlorfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on vykazoval hodnoty IC_{50} vůči většině testovaných linií 0,12–0,23 μM . U těchto sloučenin byla zároveň zaznamenána i vysoká aktivita vůči nemaligním lidským liniím. Zavedením hydroxymethylového fragmentu do C5 furanonového kruhu byla navíc u zkoumaných struktur objevena značná antibakteriální aktivita se selektivitou vůči G(+) bakteriím. Nejzajímavější látka z této série, 3-(4-bromfenyl)-5,5-bis(hydroxymethyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on, vykazoval hodnoty MIC_{95} vůči linii *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) po 24 h a 48 h 0,98 μM a 3,9 μM . Navíc, hydroxymethylace C5 furanonového kruhu kompletně blokuje cytotoxický efekt.

V druhé části práce, zabývající se syntézou analogických pyrrolidinonů bylo provedeno testování enantioselektivity klíčové Seyferth-Gilbertovy homologace. Byly optimalizovány podmínky, za kterých dochází k nepatrné racemizaci (< 5 %). Analogicky byla vytvořena knihovna alkynů, které vycházely z následujících aminokyselin: alaninu (ALA), fenylalaninu (PHE), valinu (VAL) a leucinu (LEU). Z nich byla za použití upravené procedury Seyferth-Gilbertovy homologace připravena série alkynů, s nízkým stupněm racemizace (< 10 %), které mohou sloužit jako stavební kameny případných pyrrolidinonů.

ABSTRACT

Within the framework of this Thesis, several series of 3,4-diphenylfuranones related to both combretastatin A-4 and antifungal 5-(acyloxymethyl)-3-(halophenyl)-2,5-dihydrofuran-2-ones was prepared. Cytotoxic effects on a panel of cancer and normal cell lines as well as anti-infective activity were evaluated, and the data were complemented with tests for the activation of caspase 3 and 7. High cytotoxicity was observed in some of the halogenated analogues, eg. 3-(3,4-dichlorophenyl)-4-(4-methylphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-one with IC_{50} 0.12–0.23 μM , but the compounds were also highly toxic against non-malignant control cells. Interestingly, notable antibacterial activity indicating G(+) selectivity has been found in the 3,4-diarylfuranone class of compounds for the first time. Hydroxymethylation of furanone C5 knocked out cytotoxic effects (up to 40 μM) while maintaining significant activity against *Staphylococcus* strains in some derivatives. MIC_{95} of the most promising compound, 3-(4-bromophenyl)-5,5-bis(hydroxymethyl)-4-(4-methylphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-one against *S. aureus* strain ATCC 6538 was 0.98 μM a 3.9 μM after 24 h and 48 h, respectively.

Following synthesis of closely related pyrrolidinones, enantioselectivity of the key step (Seyferth–Gilbert homologation) was tested. A new conditions towards enantiopure (racemization < 5 %) 3,5-disubstituted pyrrol-2-ones has been developed. This conditions were also tested with using ALA, PHE, VAL and LEU as a starting material with similar results of enantioselectivity (< 10 %).

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením svého školitele prof. RNDr. Milana Poura, Ph.D.). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Seznam zkratk:

5-FU	5-fluorouracil
AcOH	kyselina octová
AIBN	2,2'-azobis(2-methylpropionitril)
ALA	alanin
BLys	stimulátor B lymfocytů
BnBr	benzyl bromid
Boc ₂ O	di- <i>terc</i> -butyl dikarbonát
BuLi	butyllithium
CA-4	kombretastatin A-4
DCM	dichlormethan
DIBAL-H	diisobutylaluminium hydrid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
EMA	Evropská léková agentura
EtOH	ethyl-acetát
HER-2	receptor 2 pro epidermální růstový faktor
HUAVEC	lidská pupečnicková endotelová buněčná linie
KOtBu	<i>terc</i> -butanolát draselný
LEU	leucin
MeOH	methanol
MosherCl	chlorid Mosherovy kyseliny
NaN ₃	azid sodný
PHE	fenylalanin
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluen sulfonyl
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylammonium fluorid
TBDMSCl	<i>terc</i> -butyldimethylsilyl chlorid
TEA	triethylamin

THF	tetrahydrofuran
TNF- α	faktor nádorové nekrózy
TsN ₃	tosyl azid
VAL	valin
VDA	látky působící disrupci cév
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor

1 Obsah

1. ÚVOD - ANTINEOPLASTIKA.....	11
1.1 Alkylancia.....	11
1.1.1 Interkalancia.....	14
1.1.2 Antimetaboly.....	14
1.1.3 Inhibitory IMP-dehydrogenázy.....	16
1.1.4 Cytostatika založená na selektivním účinku v hypoxických buňkách.....	17
1.1.5 Biologická léčba (imunoterapie, cílená léčba).....	17
1.1.6 Tubulin a látky ovlivňující jeho polymeraci (antimitotika).....	18
1.1.7 Inhibitory angiogeneze.....	21
1.1.8 Kombretastatiny.....	25
1.1.9 Heterocyklická analoga molekuly kombretastatinu a jejich antineoplastická aktivita .	28
2 CÍL PRÁCE.....	36
3 VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM.....	39
3.1 Návrh a syntéza látek.....	39
3.2 Syntéza.....	40
3.3 Příprava 1. série oxygenovaných 3,4-diarylfuranonů (strukturní typ A).....	40
3.4 Vyhodnocení cytotoxického <i>in vitro</i> testování na vybraných buněčných liniích.....	43
3.5 Syntéza a biologické hodnocení 2. série halogenovaných 3,4-diarylfuranonů (strukturní typ B)	49
3.6 Syntéza heterocyklických analog 3,4-diarylfuranonů a jejich biologické hodnocení.....	55
3.7 Další vývoj 3,4-diarylfuranonů strukturního typu B.....	58
3.8 Syntéza a biologické hodnocení γ -substituovaných 3,4-diarylfuranonů.....	64
3.8.1 Reakce s paraformaldehydem.....	64
3.8.2 Pokus o přípravu substituovaných 3,4-diarylfuranonů Mannichovou reakcí.....	68
3.8.3 Pokus o syntézu laktonů s jinými polárními skupinami na γ -uhlíku.....	71
3.8.4 Pokus o redukci nitroskupiny na aromatickém jádře.....	72
3.8.5 Příprava 3,4-diarylfuranů.....	72
3.8.6 Pokus o přípravu laktamových analog.....	75
3.9 Příprava chirálně čistého [1-(<i>terc</i> -butyldimethylsilyloxy)but-3-yn-2-yl]karbamátu.....	76
3.10 Příprava <i>N</i> -Boc alkynů z methylesterů opticky čistých aminokyselin.....	82
3.11 Příprava <i>O</i> -desmethylangolensinu (ODMA).....	84
4 ZÁVĚR.....	86
5 EXPERIMENTÁLNÍ SEKCE.....	88
5.1 Použité experimentální postupy při přípravě a hodnocení látek.....	88
5.2 Použité experimentální postupy při biologickém hodnocení.....	88

5.2.1	Hodnocení antifungální aktivity	88
5.2.2	Hodnocení antibakteriální aktivity	89
5.2.3	Hodnocení cytostatické aktivity	90
5.3	Syntéza	91
5.3.1	Obecný postup přípravy 1. série oxygenovaných laktonů (strukturní typ A) 82a-c , 82e-f , 82i ; 2. série halogenovaných laktonů (strukturní typ B) 89a-q a 98a-d	91
5.3.2	Příprava 3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu (92).....	98
5.3.3	Příprava 3-(pyridin-4-yl)-4-[4-(trifluormethyl)fenyl]-2,5-dihydrofuran-2-on (94).....	98
5.3.4	3-(5-brompyridin-2-yl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (97).....	99
5.3.5	Postup demethylace při přípravě 4-(3,4-dihydroxyfenyl)-3-(4-hydroxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu (82d)	99
5.3.6	Obecný postup redukce 3,4-diarylfuranonů na 3,4-diarylfurany.....	99
5.3.7	Příprava 3-(3-chlor-4-hydroxyfenyl)-4-(<i>p</i> -tolyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu (103).....	100
5.3.8	Obecný postup přípravy laktonů derivatizovaných v γ -pozici	102
5.3.9	Obecný postup esterifikace laktonů.....	104
5.3.10	Příprava 3-(4-bromfenyl)-8,8-dimethyl-4-(4-methylfenyl)-1,7,9-trioxaspiro[4.5]dec-3-en-2-onu (106).....	104
5.3.11	Příprava 3-(4-bromfenyl)-5-[(4-chlorfenyl)[(3,4-dimethoxyfenyl)amino]methyl]-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (113)	105
5.3.12	Příprava methyl <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- <i>L</i> -serinátu (133)	106
5.3.13	Příprava methyl <i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxykarbonyl)- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- <i>L</i> -serinátu (134) 106	
5.3.14	Příprava <i>tert</i> -butyl (<i>L</i>)-1-[[(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy]-3-oxopropan-2-yl]{-karbamátu (135) 106	
5.3.15	Příprava 4-methylbenzensulfonyl azidu	107
5.3.16	Příprava dimethyl-(1-diazo-2-oxopropyl)-fosfonátu (136).....	107
5.3.17	Příprava dimethyl-(diazomethyl)-fosfonátu (145)	107
5.3.18	Příprava <i>tert</i> -butyl (<i>L</i>)-{1-[(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy]but-3-yn-2-yl}-karbamátu (130) 108	
5.3.19	Příprava methyl <i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxykarbonyl)- <i>O</i> -((<i>R</i>)-2-methoxy-2-fenyl-2-trifluormethoxy)acetyl)- <i>L</i> -serinátu (138).....	108
5.3.20	Obecný postup přípravy karbamátů (149a-d)	108
5.3.21	Obecný postup přípravy karbamátů s alkynylovou funkční skupinou	109
5.3.22	Příprava diastereotopických derivátů pomocí pomoci (<i>S</i>)-chloridu Mosherovy kyseliny 110	
5.3.23	Příprava 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)propan-1-onu (<i>O</i> -desmethylangolensinu) (79).....	111
6	LITERATURA.....	113

7	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ, ÚČAST NA KONFERENCÍCH.....	117
---	--	-----

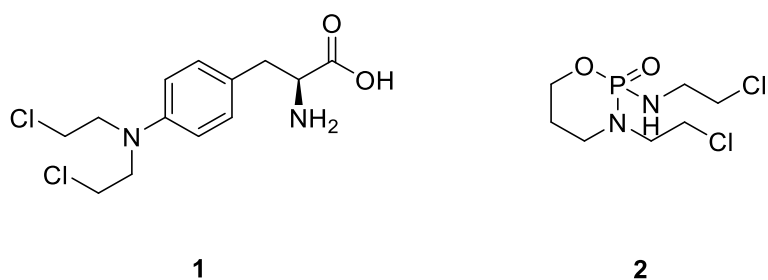
1. ÚVOD - ANTINEOPLASTIKA

Nádorová onemocnění jsou jednou z hlavních příčin předčasného úmrtí pacientů v ČR i ve světě. Vývoj léčiv s antineoplastickou aktivitou se datuje do období po 2. světové válce, kdy byly deriváty dusíkatého yperitu úspěšně zkoušeny u pacientů s lymfosarkomem. Od té doby bylo vyvinuto velké množství látek s rozmanitým mechanismem účinku. Chemoterapie se stala vedle chirurgie základní léčebnou metodou v onkologii. Obvyklým postupem při protinádorové léčbě je kombinace chemoterapeutik. Díky kombinaci cytostatik je v dnešní době možné klinicky zvládnout většinu onkologických onemocnění (např. pokročilý maligní lymfom). Nevýhodou cytostatických látek ovšem zůstává fakt, že negativně působí i na zdravé tkáně s vysokou proliferační aktivitou. Následkem toxicity cytostatik bývá např. silné zvracení a následná kachexie, kvůli kterým je nutno léčbu ukončit. Tento důsledek je vyvolán především působením cytostatik na chemorecepční spouštěcí oblast v prodloužené míše, která obsahuje 5-HT₃ receptory. Cytostatika, zejména ta s vysokým stupněm emetogenního účinku (zejm. alkylující hydraziny jako je dakarbazin, prokarbazin a temozolomid) jsou těmito receptory vychytávány a následně spouštějí úporné zvracení. Tento problém byl částečně vyřešen zavedením antiemetik, 5-HT₃ antagonistů, např. ondansetronu [1]. Toto je jeden z mnoha důvodů, proč je dnešním trendem hledání antineoplastických látek, které by vykazovaly co nejnižší toxicitu a vysokou aktivitu proti lidským maligním buněčným liniím. Antineoplastické látky můžeme rozdělit do několika skupin [2] podle mechanismu účinku.

1.1 Alkylancia

Jsou nejstarší skupinou cytostatik. Ve své struktuře obsahují nejčastěji *bis*(2-chlorethyl)aminové seskupení. Předpokládá se, že hlavní účinnou látkou je v organismu vzniklý 2-chlorethylaziridiniový ion, který působí navázáním na N7 guaninu a znemožněním čtení genetické informace. Buňka s takto modifikovanou DNA není schopna replikace. Do skupiny alkylancií - dusíkaté yperity řadíme např. melfalan (**1**, Obr. 1), pipobroman, azalin a dopan.

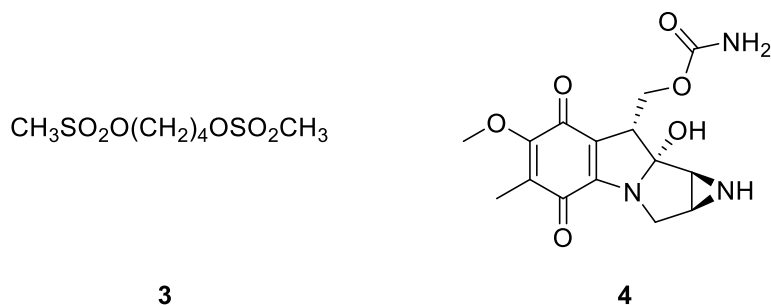
Zajímavou látkou ze skupiny alkylancií je cyklofosfamid. Tento oxazafosforin vykazuje vysokou účinnost v léčbě Hodgkinova lymfomu. Jeho častá klinická aplikace je způsobena nejmenším profilem vedlejších účinků z této skupiny látek. Při jeho aplikaci se nevyskytují zásadní poruchy krvetvorby či poruchy zažívacího traktu. Dalším příkladem zástupců z této skupiny léčiv je např. ifosfamid (**2**, Obr. 1) [2].



Obr. 1 Melfalan (1) a ifosfamid (2)

Další podskupinou alkylancí jsou alkylsulfonáty, reprezentované především busulfanem (3, Obr. 2), který se používá při léčbě primární polycystémie popř. chronické promyeloidní leukémie. Jeho toxicita je ovšem tak vysoká, že expozici touto látkou nepřežívají ani buňky v klidovém stavu [2].

Aziridiny se vyznačují přítomností tříčlenného heterocyklického fragmentu, který je elektronově neutrální. Přírodní antibiotikum mitomycin C (4, Obr. 2) vytváří kovalentní vazbu mezi komplementárními řetězci DNA. Alkylací jedné aminoskupiny guaninu a následně i komplementární skupiny guaninu vytváří propojení mezi řetězci DNA. Nejpoužívanější z aziridinů je thiotepa [2].



Obr. 2 Busulfan (3) a mitomycin C (4)

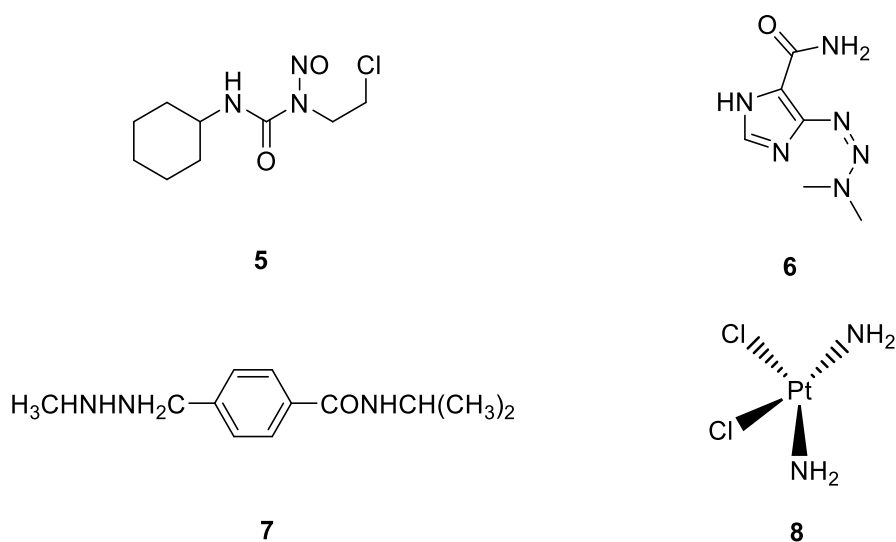
Účinek nitrosomočovin je založen na tvorbě 2-chlorethyl diazoniového kationtu. Hlavní zástupci karmustin, lomustin (5, Obr. 3) a semustin jsou vzhledem ke své lipofilitě využívány při léčbě intracerebrálních tumorů a mnohočetných myelomů.

U alkylujících hydrazinů nejsou přesně známy jejich mechanismy účinku, alkylace je pravděpodobně jedním z mnoha. Dakarbazin (6, Obr. 3) uvolňuje za fyziologických podmínek vysoce toxický, methylojící diazometan. Dále jako analog purinu ovlivňuje i S-fázi buněčného

cyklu. Prokarbazin (**7**, Obr. 3) po metabolizaci uvolňuje methylový radikál, který alkyluje DNA [2].

Sloučeniny platiny jsou další využívanou podskupinou alkylancií. Jejich objev byl učiněn náhodně při studiu vlivu elektrolýzy na růst kultury *E. coli* při použití platinové elektrody a chloridu amonného. Od ostatních alkylačních látek se liší chemickou strukturou komponenty tvořící kovalentní vazbu s DNA a dále silným emetogenním efektem. Jedná se o komplexní sloučeniny platiny s koordinačním číslem 4 (oxidační stav + 2) nebo 6 (oxidační stav + 4). Ligandy těchto komplexů mohou být nahrazeny jinými nukleofilními částicemi, tedy např. dusíkatým atomem v molekule DNA. Nejvyužívanější derivát je v současné době znám jako *cis*-platina (**8**, Obr. 4), avšak kromě své vysoké účinnosti způsobuje ve velkém počtu i následující nežádoucí účinky: neutropenie, astenie a trombocytopenie. Profylakticky se pacienti silně hydratují. Kombinace *cis*-platiny s gemcitabinem nebo pemetrexedem je v dnešní době úspěšně využívána v léčbě nemalobuněčného plicního karcinomu [3]. V případě selhání léčby *cis*-platinou se ukázala velmi výhodná kombinace s cetuximabem. Po přidání této protilátky se zvýšila léčebná odpověď na 21 % u nemocných s pokročilými epiteliálními nádory [4]. Komplexy s koordinačním číslem 6 jsou méně toxické; nejprve se musí přeměnit na reaktivnější planární částici. Chloridy mohou být zaměněny karboxyláty (karboplatina, oxaliplatina). Tyto modifikace jsou sice doprovázeny poklesem účinnosti, ale také toxicity a vzrůstem snášenlivosti. *Trans*-izomery platiny jsou zásadně inaktivní, ale vykazují mutagenitu [2].

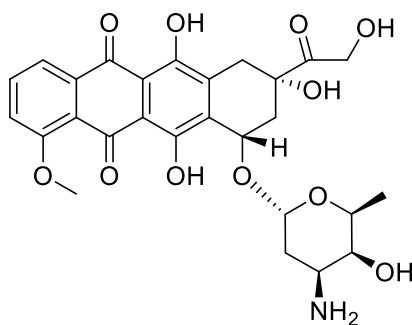
Přes všechny uvedené nedostatky jsou alkylancia stále součástí kombinované léčby neoplazmat [5].



Obr. 3 Lomustin (**5**), dakarbazin (**6**), prokarbazin (**7**), *cis*-platina (**8**)

1.1.1 Interkalancia

Tato skupina látek je reprezentována především antracyklinovými glykosidy, nazývanými také jako cytostatická antibiotika. Jejich planární molekuly jsou schopny interkalace mezi řetězce DNA. Tímto mechanismem blokují zejména funkci topoizomerázy II, což inhibuje replikaci a transkripci DNA a RNA. Hlavními zástupci jsou doxorubicin (9, Obr. 4), epirubicin, idarubicin, antrachinonová analoga mitoxantron, aktinomyciny daktinomycin, bleomycin či mitomycin. Nežádoucí účinky této skupiny látek nejsou způsobeny pouze neselektivní tkáňovou toxicitou. Jejich přítomnost v buňce generuje reaktivní kyslíkové radikály, které vedou k peroxidaci lipidů a poškozují především myokard. K prevenci kardiotoxicity se používá léčivo dexrazoxan. Navíc je interkalační schopnost zastoupena v podobné míře i u zdravých buněk. To přispívá k vysoké toxicitě léčiv, která se nejzávažněji může manifestovat jako fatální srdeční selhání. Dalším závažným nežádoucím účinkem je plicní fibróza, vyskytující se zejm. při léčbě bleomycinem [6]. Vysoký výskyt srdeční kardiotoxicity, manifestovaný srdečním selháním, je v dnešní době vyřešen použitím lipozomální formy. Technologická úprava léčiv je tak jedním z hlavních řešení toxicity cytostatik. Lipozomální kombinace doxorubicin/cyklofosamid je v současné době schválená agenturou EMEA pro léčbu první linie v indikaci metastatického karcinomu prsu.[7, 8]. Profylakticky se u léčby doxorubicinem používá koenzym Q. Svým mechanismem antioxidačního působení a opětovného získání energie je vhodným potravinovým doplňkem, zajišťujícím protektivní účinek na kardiomyocyty[9].



9

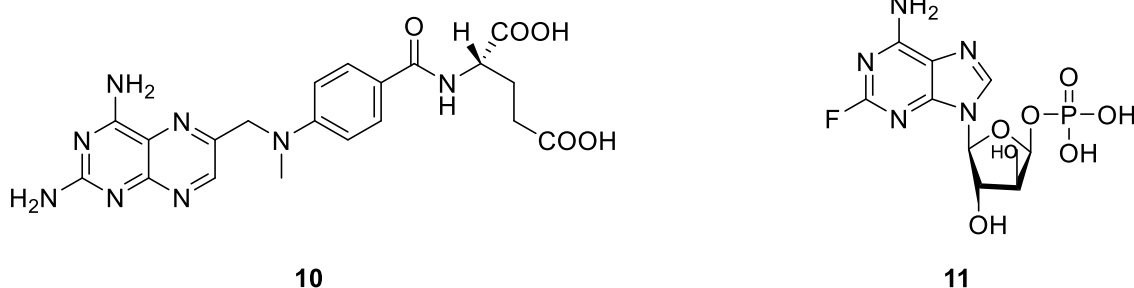
Obr. 4 Doxorubicin (9)

1.1.2 Antimetabolity

Antimetabolity jsou sloučeniny, působící jako falešný substrát, který je inkorporován do řetězce DNA. Dvoušroubovice je následně defektní a buňka je nucena zastavit své dělení. Dalším mechanismem účinku antimetabolitů může být také inhibice

dihydrofolátreduktázy, narušení reparačních mechanismů DNA, deplece ATP, nahromadění fragmentů DNA a konečně apoptóza maligních buněk [10]. Methotrexát je jedním ze zástupců inhibitorů dihydrofolátreduktázy (**10**, Obr. 5).

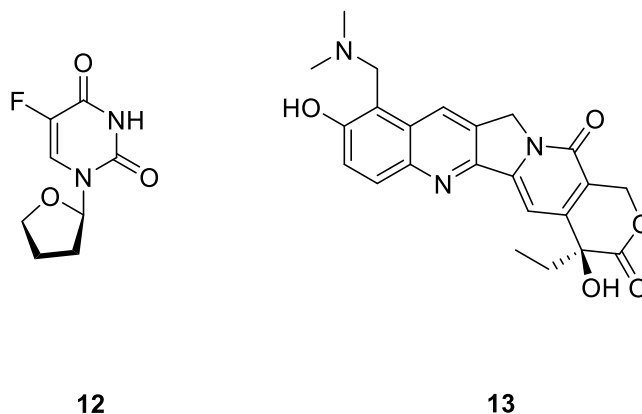
Raltitrexed, chinazolinový analog kyseliny listové, je zástupcem další podskupiny antimetabolitů, inhibitorů enzymu thymidylátsyntetázy. Dalšími zástupci antimetabolitů jsou analoga purinových a pyrimidinových bazí. Z velkého množství purinových antimetabolitů jsou nejčastěji používanými fludarabin (**11**, Obr. 5), merkaptopurin, tioguanin, kladribin, klofarabin a nelarabin. Mezi nejčastější nežádoucí účinky fludarabinu patří opět hematologická toxicita (neutropenie, lymfopenie), s následným zvýšením rizika oportunních infekcí (mykóz a pneumocystóz). Z tohoto důvodu mnoho pacientů obdrží od lékaře i antimikrobiální profylaxi.



Obr. 5 Methotrexát (**10**) a fludarabin (**11**)

Pyridinové antimetabolity jsou reprezentovány cytarabinem, 5-fluorouracilem (5-FU), tegafurem (**12**, Obr. 6) (z něhož v játrech vzniká 5-FU), gemcitabinem, kapecitabinem nebo azacytidinem. Pyridinové antimetabolity jsou i dnes součástí moderní léčby ne Hodgkinsonských lymfomů, v kombinaci s rituximabem, dexamethasonem, *cis*-platinou a prednisonem [11].

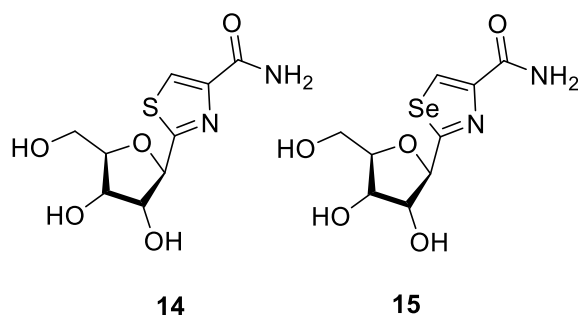
Inhibitory topoizomeráz, tedy enzymů zaručujících správný chod replikace DNA, jsou kamptotekany a podofylotoxiny. Původně klinicky aplikovaná látka kamptothecin byla opuštěna pro příliš velkou ireverzibilní toxicitu a nízkou rozpustnost ve vodě. 9-nitrokamptothecin je profarmakem 9-aminokamptothecinu, který se přeměňuje na aktivní formu v hypoxickém prostředí nádorové buňky. Další zástupce, topotekan (**13**, Obr. 6), je příkladem syntetické molekuly vzniklé modifikací přírodní předlohy.



Obr. 6 Tegafur (**12**) a topotekan (**13**)

1.1.3 Inhibitory IMP-dehydrogenázy

Z této podskupiny antimetabolitů jsou inhibitory IMP-Dehydrogenázy zastoupeny tiazofurinem (**14**, Obr. 7). Látka způsobuje depleci guaninových nukleotidů mechanismem inhibice IMP-dehydrogenázy a následně zastavuje buněčné dělení v S-fázi. Náhrada atomu síry v tiazofurinu selenem poskytuje silné, byť výrazně toxické cytostatikum selenazofurin (**15**, Obr. 7).

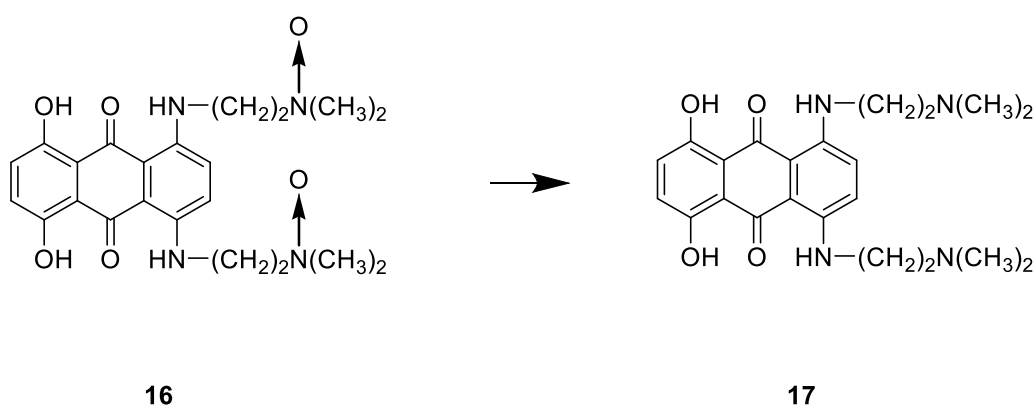


Obr. 7 Tiazofurin (**14**) a selenazofurin (**15**)

Izosterní náhrada selenem je oblíbená i u nových molekul, u kterých jsou vyzdvihovány vysoké protinádorové aktivity, ale nenalezneme zde zmínku o jejich celkové toxicitě (1,2,5-selendiazolové deriváty kombretastatinu, vide infra)[12].

1.1.4 Cytostatika založená na selektivním účinku v hypoxických buňkách

Neoplastická tkáň vykazuje oproti normální tkáni nižší prokrvení, se značným podílem buněk v hypoxickém stavu. Snížený přívod krve má za následek i snížený přívod cytostatika. Redukční mechanismy jsou však v buňce zachovány a díky tomu byla identifikována cytostatika se selektivním účinkem v hypoxické tkáni. Využívají se nitroderiváty a aminoxidy (**16**, Obr. 8), které samy o sobě nejsou účinné, ale po jejich redukci na aminy (**17**, Obr. 8) se účinek dostaví.

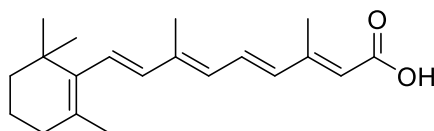


Obr. 8 Aminoxidy se selektivním účinkem v hypoxickém prostředí

1.1.5 Biologická léčba (imunoterapie, cílená léčba)

Tato dynamicky se rozvíjející disciplína v onkologii je v mnoha případech součástí konvenční radioterapie, popř. chemoterapie. Na rozdíl od chemoterapie, která v mnoha případech neselektivně inhibuje růst i nemaligně transformovaných tkání, imunoterapie nezastavuje buněčné dělení nemaligních buněk. Na makromolekulární úrovni zasahuje především receptorové systémy, případně interaguje se signálními buněčnými drahami. To ve výsledku vede k ovlivnění genové transkripce. Zjednodušeně můžeme biologickou léčbu rozdělit dle mechanismu účinku na monoklonální protilátky, léčiva namířená proti TNF – α , léčiva namířená proti B lymfocytům, léčiva namířená proti aktivačním markerům T lymfocytů, protilátky proti receptoru pro interleukin 2, antagonistu receptoru pro interleukin-1, léčiva namířená proti adhezním molekulám, léčiva namířená proti komplementovým složkám, monoklonální protilátky namířené proti BlyS. Z obrovského množství biologických léčiv užívaných při léčbě neoplazmat je možné zmínit např. trastuzumab, který se využívá k léčbě prsních malignit. Základním předpokladem pro léčbu trastuzumabem je přesné určení nadměrné exprese transmembránového proteinu HER-2 v nádoru, což simultánně koresponduje se špatnou prognózou. Dalším příkladem biologické cílené léčby je tretinoin (**18**, Obr. 9). Tato skupina léčiv není zaměřena přímo na zničení nádorové buňky, ale umožní její vyvrátění do stadia s malou nebo žádnou proliferační aktivitou. Tyto schopnosti mají

retinoidy, skupina léčiv, která indukují buněčnou diferenciaci a brzdí proliferaci nádorových buněk. Tretinoin (**18**, Obr. 9) (Vesanoid, ATRA - kyselina *all-trans* retinová) je přirozeným metabolitem retinolu. Byl schválen k léčbě pacientů s akutní promyelocytární leukémií, u nichž často navozuje remisi. Biologická léčba je progresivně rozvíjející se oblastí, která je v dnešní době limitována ekonomickým zatížením. Tak např. léčba bevacizumabem se u mediánu onemocnění 10 měsíců pohybuje u dospělého muže okolo miliónu korun [2].



18

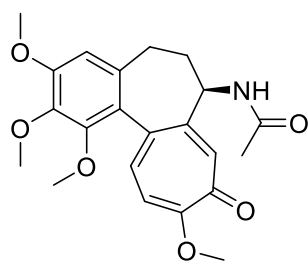
Obr. 9 Kyselina *all-trans* retinová (**18**)

1.1.6 Tubulin a látky ovlivňující jeho polymeraci (antimitotika)

Pohyb chromosomů při buněčném dělení (mitóza) je zajištěn pomocí mikrotubulů a jeho tubulinových podjednotek. Jedná se o kyselý globulární protein s GTPasovou aktivitou, složený ze dvou podjednotek: α -tubulin a β -tubulin. Mikrotubuly zajišťují rozmístění buněčných organel. V prometafázi buněčného dělení vnikají mikrotubuly do prostoru jádra a váží chromosomy, které jsou poté vyrovnány do ekvatoriální roviny vřeténka a dislokují k pólům buňky. Růst mikrotubulů (elongace) je velmi dynamický proces a jeho podmínkou je skutečnost, že v rostoucím řetězci polymeru jsou molekuly tubulinu řazeny za sebou stejným způsobem. Na plus-konci mikrotubulu probíhá polymerace nejrychleji, vždy je odhalena β -podjednotka tubulinu. Polymerace probíhá na úkor štěpení GTP na GDP. V blízkosti vazebných míst pro GTP jsou vazebná místa pro kolchicin a vinka alkaloidy. Všechny látky, které se váží do těchto center (antimitotika) silně narušují tvorbu komplexu s GTP a brání polymeraci tubulinu. Dochází ke spontánní depolymeraci a zastaví se buněčné dělení[2].

1.1.6.1 Látky, rozvolňující strukturu mikrotubulů na vazebném místě kolchicinu

Kolchicin (**19**, Obr. 10) se získává z rostliny *Colchicum autumnale*. Své uplatnění nyní nalézá jako antiuratikum. Ovlivňuje množství a funkci leukocytů, odpovědných za zánět a tím ho utlumuje. Tlumí motilitu i fagocytózu. Snižuje se agregace fagozomů a lysozomů. Snížením invaze leukocytů a fagocytózy je redukováno uvolňování zánětlivých lysozomálních enzymů. Molekulární mechanismus zodpovědný za tyto vlastnosti je zejména depolymerace fibrilárních mikrotubulů buňky.

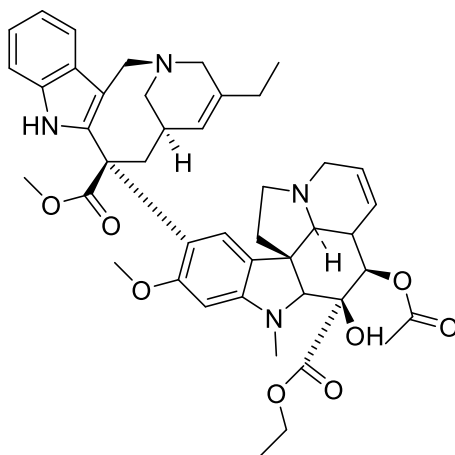


19

Obr. 10 Kolchicin (19)

1.1.6.2 Látky rozvolňující strukturu mikrotubulů na vazebném místě vinkristinu

Vinblastin neboli vanaleukoblastin, vinkristin, vindensin, vindolin a navelbin, izolované z *Vinca rosea* a *Catarantha rosea*, se využívají zejména při léčbě maligních lymfomů a nádorů varlat. Jedná se o dimery s indolovým, popř. dihydroindolovým skeletem. Velkou nevýhodou této léčby je především neurotoxicita, která způsobuje silné bolesti a poruchy rovnováhy. Tato periferní neuropatie je způsobena poškozením mikrotubulů axonů, které jsou důležité pro výživu. Kvůli tomuto nežádoucímu účinku byly připraveny deriváty výše zmíněných přírodních alkaloidů, např. vinorelbin (20, Obr. 11) nebo vindenzin. Vinorelbin je anhydroderivát vinblastinu a má nižší neurotoxicitu, protože nepůsobí polymeraci tubulinu v neuronech. Jeho využití je terapie bronchogenního karcinomu, karcinomu prsu a maligních lymfomů[2].

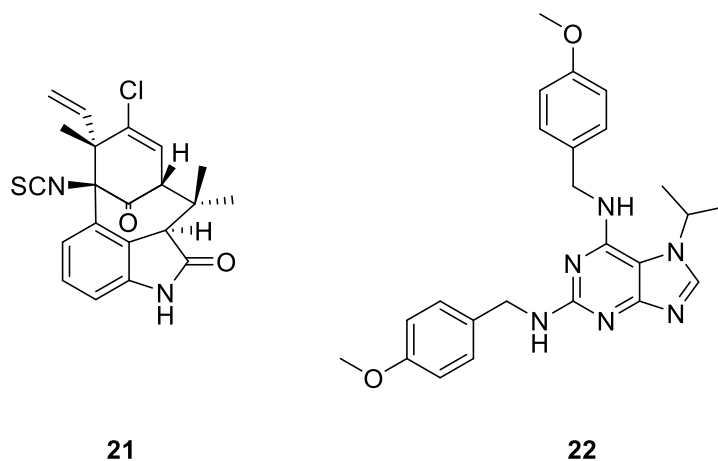


20

Obr. 11 Vinorelbin (20)

1.1.6.3 Makrolidové inhibitory polymerace tubulinu

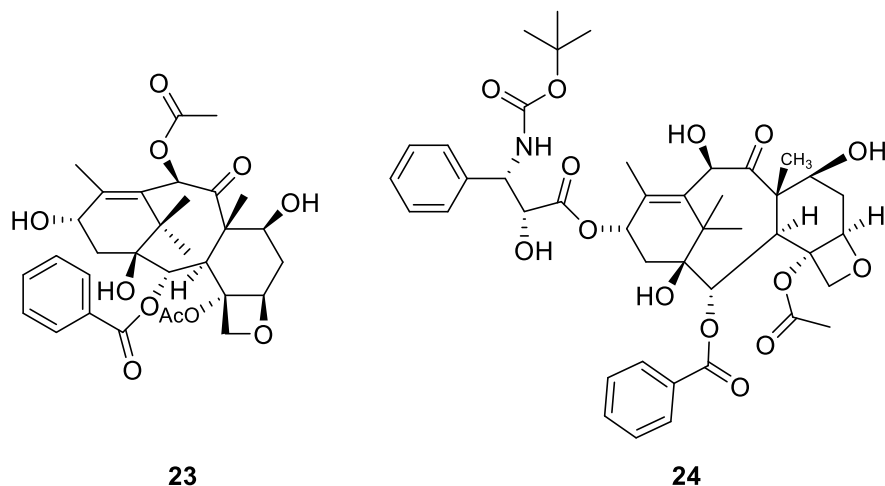
Mezi tyto inhibitory patří např. welwistatin (**21**, Obr. 12), obsažený ve východoafrické rostlině *Maytenus ovatus*. Vyznačuje se podobným spektrem účinku jako vinka alkaloidy. Mezi další látky této podskupiny patří rhizoxin, kryptofycin, myoseverin (**22**, Obr. 12) a welwistatin, který je zajímavý přítomností α -isothiokyanoskupiny.



Obr. 12 Welwistatin (**21**) a myoseverin (**22**)

1.1.6.4 Látky, stabilizující strukturu mikrotubulů

Taxany, konkrétně paklitaxel, byl izolován z kůry *Taxus Brevifolia*, tisu krátkolistého. Látky, označované jako taxany, se vyskytují v celé rostlině i dalších druzích rodu *Taxus*. Jeho obsah je velmi nízký (0,004 %). Francouzská firma Rhone-Poulenc našla v tisu bezprostřední prekurzor, bakatin (**23**, Obr. 13). Kromě zmíněného paklitaxelu se v rostlině vyskytuje také bakatin III a 10-deacetylakatin III. Z obou těchto sloučenin se připravuje paklitaxel a jeho analog docetaxel. Příprava je možná také biotechnologicky. Paklitaxel je mimořádně významným cytostatikem na bázi tubulinového efektoru. Na rozdíl od vinka alkaloidů se jedná o inhibitory depolymerace. Taxol urychluje tvorbu mikrotubulů a brání jejich depolymeraci, blokuje přechod buněk z fáze G2 do fáze M a indukuje apoptózu. Při léčbě touto látkou je velmi častým nežádoucím účinkem neutropenie, která je zvládnutelná podáváním faktorů, stimulujících krvetvorbu. Docetaxel (**24**, Obr. 13), další taxan, je využíván u karcinomu ovaria, karcinomu prsu a u bronchogenního karcinomu.



Obr. 13 Bakatin (23) a docetaxel (24)

1.1.7 Inhibitory angiogeneze

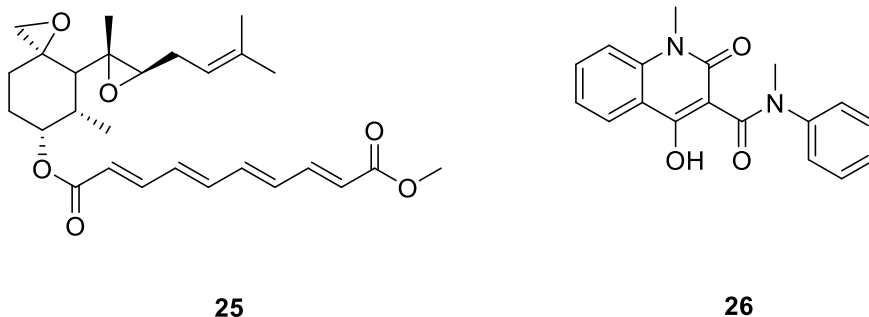
Angiogeneze neboli neokapilarizace má zásadní vliv na růst nádoru. Kromě růstu ovlivňuje angiogeneze i proces metastázování do okolních tkání a tedy vznik nádorů v jiných orgánech. Tento proces je charakterizovaný uvolněním transformované buňky z nádorové tkáně, vstupem do krevního řečiště a vstupem do cílové tkáně a následně uchycení. Marginální roli v tomto procesu hrají metaloproteasy a dále i tyrosinkinasy (vida infra). V inhibici angiogeneze je v současné době možno přistupovat na několika molekulárních úrovních:

1.1.7.1 Inhibitory angiogenní kaskády

Mezi několika možnými způsoby inhibice je nejúčinnější inhibice signální dráhy VEGF-VEGFR, která je v konečném důsledku zodpovědná za novotvorbu cév. Nejvíce zkušeností je prozatím s humanizovanou monoklonální protilátkou bevacizumabem. Tato molekula účinně blokuje novotvorbu cév, navázáním na VEGF receptor. Používá se pouze v kombinaci s chemoterapií. Bevacizumab se ukázal účinný v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu, kde byla u buňek nádoru zjištěna vysoká exprese receptorů pro VEGF. Nejčastěji se kombinuje s prověřenými cytostatiky (např. s 5-fluorouracilem, skapicitabinem). Přidání bevacizumabu zvyšovalo léčebnou odpověď až o 10 %. Nově nalezenou indikací je karcinom prsu (v kombinaci s paklitaxelem).

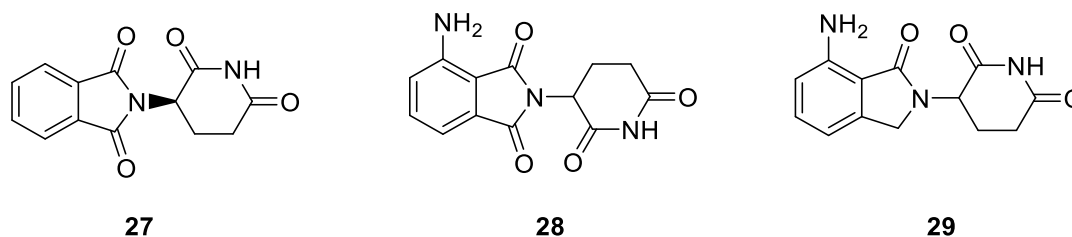
1.1.7.2 Inhibitory proliferace endotelových buněk

Blokádou proliferace endotelií účinkuje fumagilin (**25**, Obr. 14), obsažený v houbě *Aspergillus fumigatus*. Jeho toxicita limituje jeho klinické využití. Další látkou této skupiny je linomid (**26**, Obr. 14). S úspěchem je zkoušen u jaterních metastáz. Jeho schopnost proniknout hematoencefalitickou bariérou otvírá nové možnosti v léčbě mozkových nádorů [2].



Obr. 14 Fumagilin a linomid

Inhibice endoteliální proliferace je jeden z mechanismů antiangiogenního účinku imunomodulačních látek, mezi něž patří thalidomid (**27**, Obr. 15), pomalidomid (**28**, Obr. 15) a lenalidomid (**29**, Obr. 15). Nechvalně známý thalidomid se silným teratogenním účinkem nalézá v dnešní době uplatnění v léčbě mnohočetného myelomu. Dramatická teratogenita je prostým důsledkem zástavy tvorby krevních kapilár (zástava prokrvení) vyvíjejícího se končetinového pupene embrya [2].

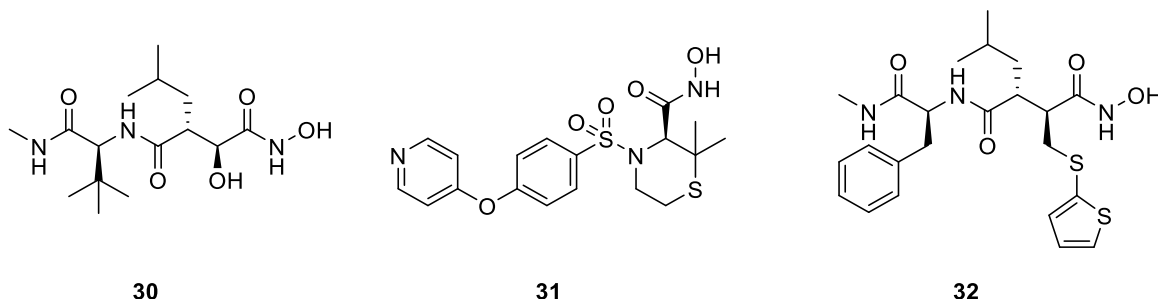


Obr. 15 Thalidomid (**27**), pomalidomid (**28**) a lenalidomid (**29**)

1.1.7.3 Stabilizátory bazální membrány

Extracelulární matrix zabírá větší část tkáňových struktur. Jedná se o prostorovou strukturu složenou z glykoproteinů nebo proteinů. Tvoří podle okolností např. kost, zubní sklovinu apod. V průběhu invaze nádoru dochází k odbourávání extracelulární matrix. Na tomto odbourání extracelulární matrix se podílí tzn. matrixové metaloproteázy. Pokud jsou matrixové

metaloproteázy inhibovány, je inhibována i angiogenese a růst nádoru. Mezi látky, které inhubují tyto proteázy patří např. marimastat. Tato látka bohužel nezaznamenala úspěch v klinickém testování a byla vyřazena.



Obr. 16 Marimastat (**30**), prinomastat (**31**) a batimastat (**32**)

Prinomastat je dalším inhibítorem matrixových metaloproteáz. V kombinaci s gemcitabinem postoupil prinomastat (**31**, Obr. 16) do klinické fáze III u nemalobuněčné rakoviny plic. Nicméně bylo zjištěno, že prinomastat nezlepšil výsledek chemoterapie u této formy nádoru.

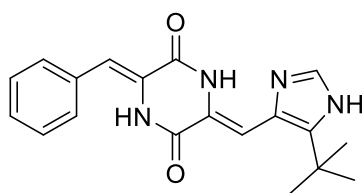
Batimastat postoupil také do fáze III klinického testování, bohužel jeho rozšíření do více oblastí onkologie brání fakt, že nemůže být podáván perorálně. Při peritoneální aplikaci způsoboval navíc silnou peritonitidu.

Praktické aplikace těchto sloučenin přinesly určité zklamání a jejich používání je omezené[2].

1.1.7.4 Disruptory nádorových buněk (VDA).

Odlíšným přístupem k zamezení novotvorby cév, které by přispívaly k zásobení a šíření nádoru je zamezení růstu cévy pomocí látek cílených proti cévám (vascular disruption agents, VDA). Sloučeniny s tímto mechanismem účinku jsou schopny ničit již vytvořenou vaskulaturu nádoru a umožňují tak zcela odlišný přístup k zamezení cévního zásobení tumoru.

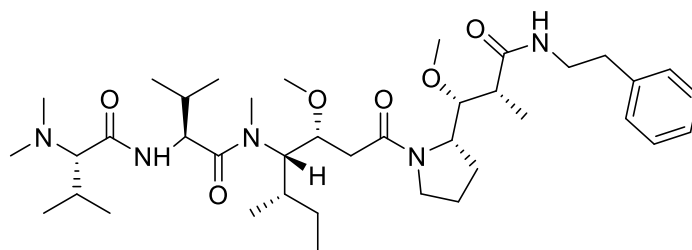
Mezi VDA je řazen diketopiperazinový derivát NPI-2358 (**33**, Obr. 17). Jedná se o syntetický analog NPI-2350, přírodního produktu izolovaného z *Aspergillus sp.* Má schopnost depolymerovat mikrotubuly, zejména u lidské maligní linie A549. I přesto, že vykazuje strukturální odlišnost od kolchicinu a jemu podobných struktur, váže se na stejné mikrotubulární místo jako kolchicin. Jeho *in vitro* cytotoxicita byla stanovena u linií, které jsou rezistentní vůči tradičním chemoterapeutickým agens. Při vyhodnocení aktivity vůči lidským umbilikálním cévám (HUAVEC) vykazoval hodnoty $IC_{50} < 10$ nM, což svědčí o silné schopnosti inhibice angiogenese.



33

Obr. 17 NPI-2358

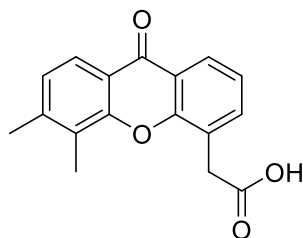
Dalším zajímavým VDA je derivát dolastatinu-10, soblidotin (**34**, Obr. 18). Jeho protinádorová aktivita je nyní testována v klinickém screeningu.



34

Obr. 18 Soblidotin

Některé flavonoidní látky mohou také sloužit jako VDA. Jednou z těchto látek je vadimezan (**35**, Obr. 19), známý také pod zkratkou DMXAA. Jeho velmi dobré výsledky v preklinických studiích nebyly v klinickém testování potvrzeny. Vadimezan působí cestou STING (stimulátor interferonových genů). Tento efekt, jak se ukázalo, byl specifický pouze pro myši. Vadimezan byl testován v II. fázi klinických testů pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic[2].

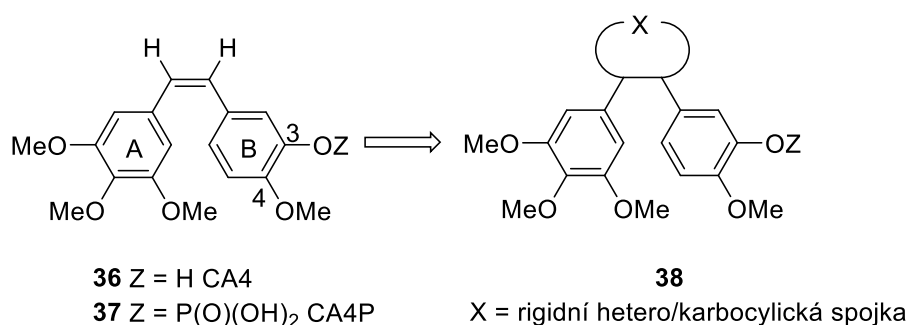


35

Obr. 19 Vadimezan

1.1.8 Kombretastatiny

Cis-stilbenová strukturní předloha je dobře známé uskupení, které se uplatňuje ve velké míře v medicíně. Kombretastatin A-4 je přírodní produkt, který byl v roce 1989 izolovaný z kůry jihoafrického stromu, *Combretum caffrum*. Poté Pettit během mnoha let výzkumu izoloval další sloučeniny z velké skupiny kombretastatinů a následně prezentoval jejich biologické aktivity[13]. Jejich schopnost inhibovat polymeraci tubulinu prostřednictvím interakce s kolchicinovým vazebným místem se stala podnětem pro další výzkum v medicíně[13]. Bylo zjištěno, že tyto *cis*-stilbeny zasahují široké spektrum lidských maligních buněk, dokonce i multirezistentních. Nejsilnější antineoplastické účinky byly nalezeny u kombretastatinu A4 (**36**, Obr. 20)[13]. Jedná se o silný inhibitor buněčného růstu a angiogeneze. Jeho aplikace v klinické praxi je limitována nízkou rozpustností ve vodě a chemickou nestabilitou. Vysoké hodnoty logP byly vyřešeny konverzí CA-4 na jeho proléčivo (**37**, Obr. 20), fosfát (CA-4P). CA-4P se momentálně nachází v II/III fázi klinických testů v kombinaci s bevacizumabem[14]. Chemická nestabilita se projevuje zejména izomerací na neúčinnou *trans*-konfiguraci[15-17]. Standardním způsobem, jak tento problém vyřešit, je nahrazení olefinické spojky pomocí heterocyklické nebo karbocyklické struktury (**38**, Obr. 20). Při této náhradě je zachována pozice dvou vicinálních substituovaných fenylových kruhů, a ve většině případů i biologická aktivita[18-21].



Obr. 20 Kombretastatin A-4 a jeho fosfátové proléčivo

Původní izolace CA-4 bylo dosaženo pomocí extrakce dichlormethanem. Macerací větví, plodů a kůry (77 kg) stromu *C. caffrum* a následnou separací extraktů bylo získáno pouhých 26.4 mg CA-4 [22-24]. Tento fakt odstartoval vývoj syntetické cesty pro přípravu CA-4, která vychází ze substituovaného benzaldehydu (**39**, Schéma 1). Jeho volná OH skupina byla nejprve ochráněna silylovou skupinou (**40**, Schéma 1) a následně byl aldehyd zredukován působením tetrahydridoboritanu sodného na primární alkoholickou skupinu.

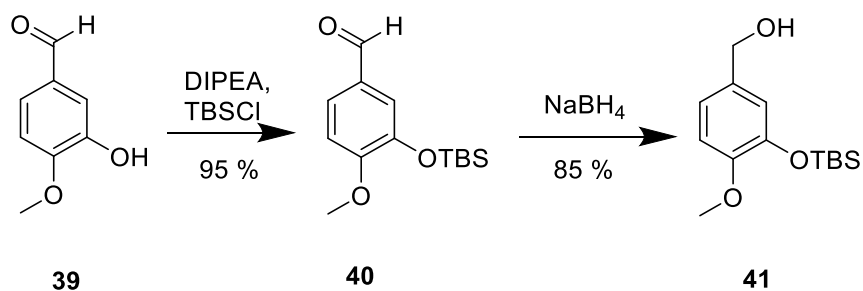


Schéma 1 Příprava alkoholu pro syntézu CA-4

Alkohol byl posléze přeměněn ve dvou krocích na Wittigovu sůl (**44**, Schéma 2).

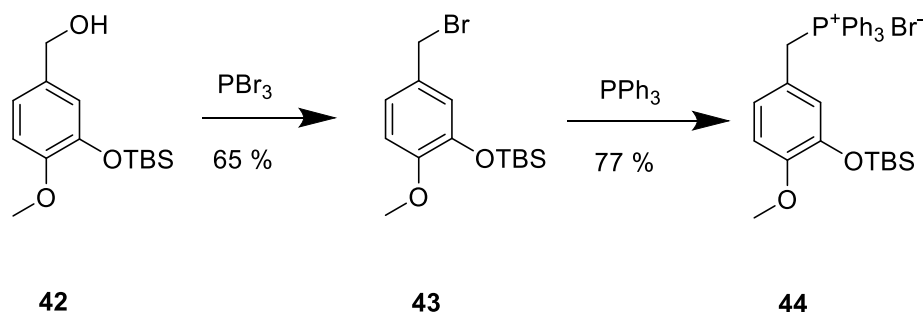


Schéma 2 Příprava Wittigovy soli

Sůl (**45**, Schéma 3) reagovala v dalším sledu reakcí s 3,4,5-trimethoxybenzaldehydem (**46**, Schéma 3) za vznihu *E* a *Z* izomerů CA-4 ochráněného jako TBS ether v poměru 5 : 1. Posledním krokem syntézy bylo odstranění chránící skupiny (Schéma 3).

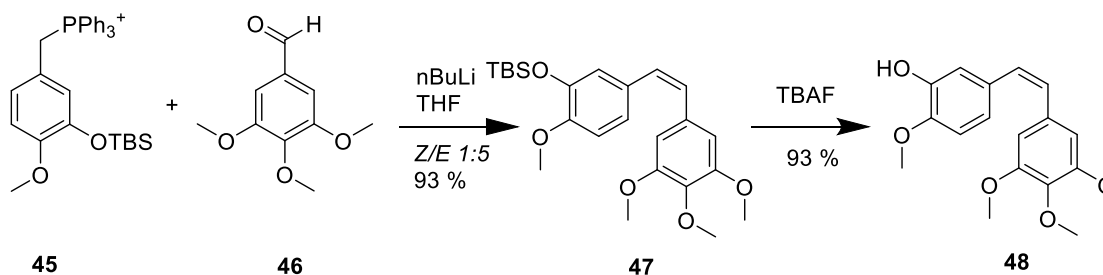
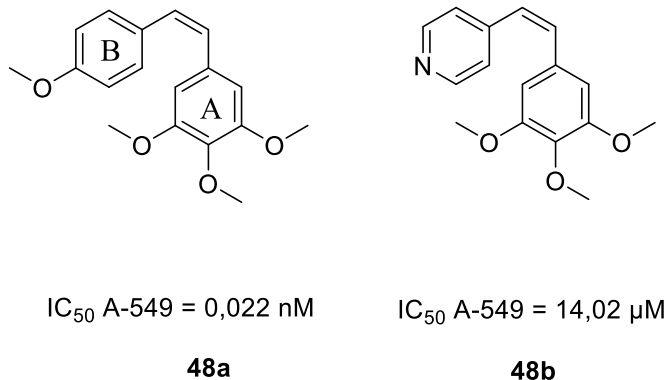


Schéma 3 Wittigova reakce a ochránění za vzniku CA-4

1.1.8.1 Syntetická analoga molekuly kombretastatinu a jejich antineoplastická aktivita

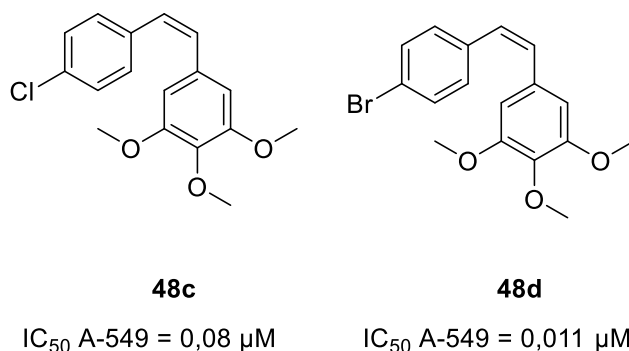
Fenylové jádro B v molekule CA-4 nabízí větší možnosti obměn než kruh A, u kterého někteří autoři považují přítomnost tří methoxylových skupin za nezbytnou [21]. Kruh B může být

nahrazen nesubstituovaným nebo substituovaným monocyklickým heterocyklem. V prvních pracích byl kruh B modifikován pomocí šestičlenných dusíkatých heterocyklů (**48b**, Obr. 21). Důvodem k této modifikaci bylo zvýšení rozpustnosti ve vodě[25]. Bylo ale zjištěno, že touto náhradou dochází k významnému snížení protinádorové aktivity proti leukemické linii A-549.



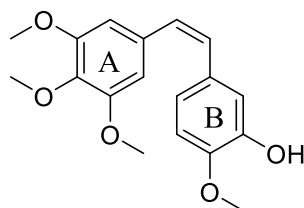
Obr. 21 Pokles účinku při náhradě kruhu B dusíkatým heterocyklem

Ve stejné práci bylo zjištěno, že náhradou 4-methoxy skupiny v kruhu B atomem chloru (**48c**, Obr. 22) a především atomem brómu (**48d**, Obr. 22) nedochází k rapidnímu snížení aktivity a látky jsou stále antineoplasticky aktivní[25].



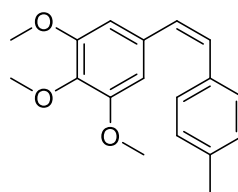
Obr. 22 Náhrada *p*-methoxyskupiny v kruhu B halogeny

V roce 1992 Cushman a kol. provedli extenzivní screening velké knihovny *cis*-stilbenoidů, ve kterých byla nahrazena 4-methoxyskupina v kruhu B thiomethylovou, methylovou, ethylovou a dokonce i propylovou funkční skupinou. Žádná z těchto modifikací nevedla k výrazné ztrátě účinku a hodnoty ED_{50} se pohybovaly pod 10 nmol/L. Záměna za butyl zvýšila hodnoty ED_{50} , nicméně i tato čísla, pohybující se v jednotkách mikromolů, jsou stále zajímavá[26]. Navíc, nutnost přítomnosti 4-methoxyskupiny i 3-hydroxyskupiny na kruhu B byla touto prací zpochybněna (**49**, Schéma 4) [27]. Substitute většiny analog kombretastatinu tak sleduje vysoce oxygenované uskupení přírodní předlohy zejména na kruhu A.



48

IC₅₀ A-549 = 3,2 nM



49

IC₅₀ A-549 = 9,4 nM

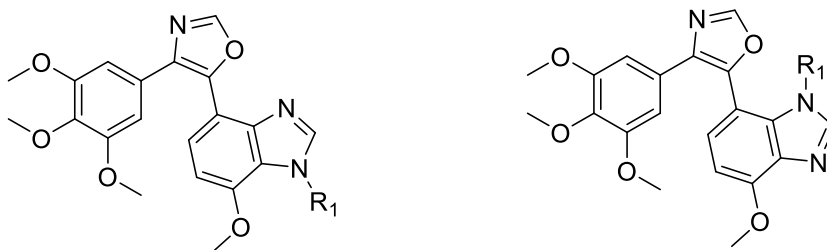
Schéma 4 Možnosti modifikace substituce v kruhu B

1.1.9 Heterocyklická analoga molekuly kombretastatinu a jejich antineoplastická aktivita

Výše zmíněná náhrada dvojně vazby heterocyklickým kruhem bylo popsáno v několika publikacích, které využívaly např. thiadiazol[28], pyrazol[29] a thiazol[30]. Kromě nesporné výhody, kdy *cis*-konfigurace zůstane rigidní díky heterocyklickému kruhu, tato modifikace navíc nabízí možnost variace farmakokinetických a farmakodynamických vlastností. Obecně lze říci, že návrhy *cis*-heterocyklických analog berou v úvahu vztahy struktura-aktivita, zjištěné pro substituci fenylových jader. Zejména 3,4,5-trimethoxy substituce na kruhu A, je považována za nezbytnou součástí těchto analog (i přesto, že toto tvrzení nebylo definitivně doloženo) [27].

1.1.9.1 Oxazolové deriváty kombretastatinu

Zhou připravil nová analoga s 4-methoxy-1*H*-benzo[d]imidazolem jako náhradou kruhu B a oxazolem místo olefinického mostu. Kruh A s 3,4,5-trimethoxy substitucí byl zachován, zatímco benzo[d]imidazol slouží jako bioizoster kruhu B v molekule CA-4. Čtyři sloučeniny (**50-53**, Obr. 23) vykazovaly excelentní cytotoxické aktivity IC₅₀ (3,0 - 56 nM) proti buňkám prsního karcinomu. Tyto sloučeniny byly rovněž testovány na panelu buněk s rezistencí na vinkristin (vincristine resistant KB) a buněk rezistentních na taxol (MX-1/T). Všechny sloučeniny inhibovaly růst buněk v nanomolárních koncentracích [31].

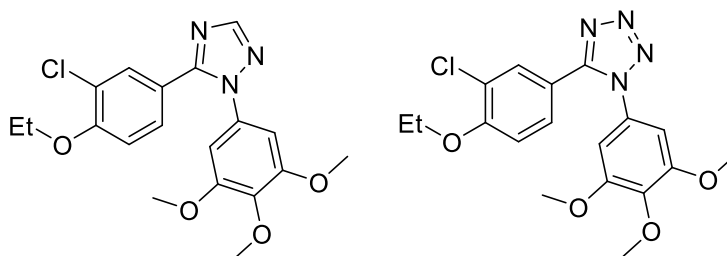


50 R₁ = H IC₅₀ MCF-7 = 39 nM
51 R₁ = COCH₃ IC₅₀ MCF-7 = 47 nM **52** = CH₃ IC₅₀ MCF-7 = 25 nM
53 = COCH₃ IC₅₀ MCF-7 = 17 nM

Obr. 23 Oxazolové deriváty kombretastatinu a jejich cytotoxická aktivita

1.1.9.2 Triazolové a tetrazolové deriváty kombretastatinu

V roce 2010 Romagnoli připravil skupinu 1,5-diaryl-1,2,4-triazolů a 1,5-diaryl-1,2,3,4-tetrazolů (**54**, **55**, Obr. 24), které vykazovaly vysoké aktivity v rozmezí 0,16-28,8 nM vůči buněčné linii karcinomu děložního čípku HeLa, které jsou dokonce nižší než aktivity CA-4P. Bylo zjištěno, že antiproliferativní aktivita závisí na substituci v pozici 5 tetrazolového kruhu. *p*-Methoxy a ethoxy skupiny zvyšovaly biologickou aktivitu. Zavedení fluoru, chloru nebo methylové skupiny do meta pozice 4-methoxyfenylového kruhu opět zvýšilo aktivitu[32, 33].



54

IC₅₀ HeLa = 2,6 nM

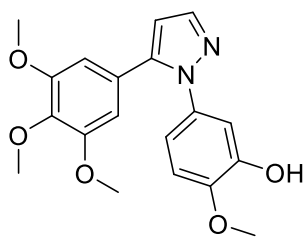
55

IC₅₀ HeLa = 6,0 nM

Obr. 24 Triazolový a tetrazolový derivát kombretastatinu a jejich biologická aktivita

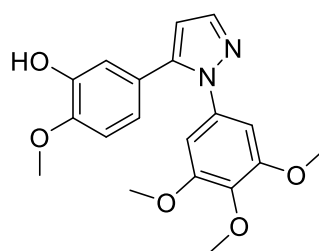
1.1.9.3 Pyrazolové deriváty kombretastatinu

Práce Browna a kol. popisuje přípravu a cytotoxickou aktivitu dvanácti připravených derivátů. Jejich syntéza vycházela z regioselektivní cykloadice. Dvě z připravených látek (**56**, **57**, Obr. 25) disponovaly podobnými *in vitro* aktivitami jako CA-4, s analogickým mechanismem působení[34].



56

GI₅₀ HUAVEC = 7 nM



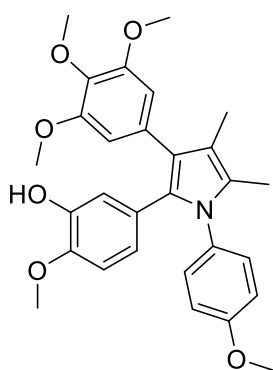
57

GI₅₀ HUAVEC = 28 μM

Obr. 25 Pyrazolové deriváty CA-4

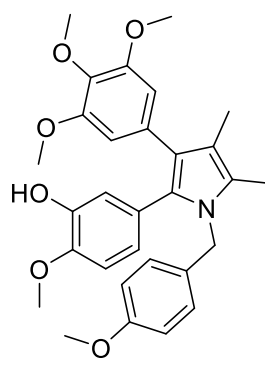
1.1.9.4 Pyrrolové deriváty kombretastatinu

Práce z roku 2016 uvádí sérii látek s pyrrolovým jádrem, imitujícím dvojnou vazbu CA-4. Z celé série látek vykazovaly zajímavé aktivity dvě sloučeniny (**58**, **59**, Obr. 26).



58

IC₅₀ K562 = 3,82 μM



59

IC₅₀ K562 = 0,21 μM

Obr. 26 Pyrrolové deriváty CA-4

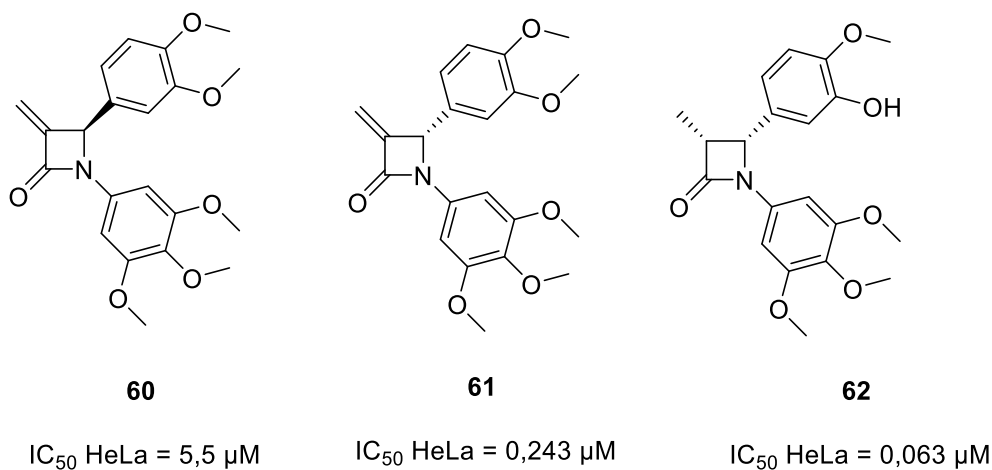
Testování probíhalo pouze na leukemické linii K562 a na buňkách prsního adenokarcinomu MDA-MB-231. *N*-benzyl uskupení ve sloučenině **59** vykazovalo největší potenciál s hodnotami IC₅₀ = 0,07 μM pro buněčnou linii MDA-MB-231. Sloučenina **58** zasahovala buňky téže linie v jednotkách mikromolů (IC₅₀ = 1,43 μM)[35].

Sloučenina	Cytotoxicita [ED ₅₀ , μM]	
	K562	MDA-MB-231
58	3,820	1,430
59	0,210	0,070
CA-4	0,003	0,030

Tabulka 1 Cytotoxické profilování sloučenin. K562: lidská chronická myeloidní leukémie; MDA-MB-231: lidský prsní adenokarcinom. CA-4= kombretastatin A-4.

1.1.9.5 β-Laktamová analoga kombretastatinu

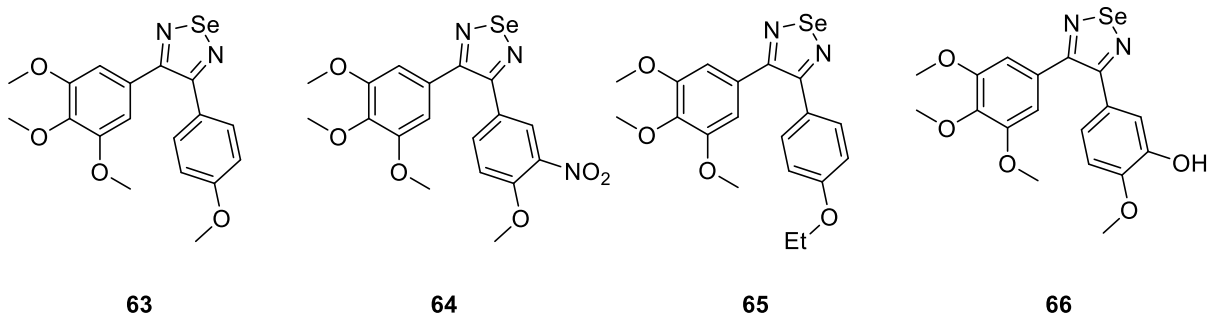
Zhou ve své práci připravil další deriváty kombretastatinu A-4, které obsahovaly 1,4-diaryl-azetidín-2-on (β-laktamové) uskupení (Obr. 27). Dvě z jejich sloučenin (**60**, **61**, Obr. 27) demonstrovaly lepší schopnost inhibovat polymeraci tubulinu než CA-4. Další dvě sloučeniny (**61**, **62**, Obr. 27) při testování antivaskulárního efektu na buňky HUAVEC ukázaly silnou schopnost inhibice antiangiogeneze. Při testování migrace buněk MDA-MB-231 bylo zjištěno antimetastatické působení těchto látek [36]. Azetidín **62** tvořil kokystalovou strukturu s tubulinem a takto byla prokázána interakce s kolchicinovým místem.



Obr. 27 β-laktamové deriváty kombretastatinu

1.1.9.6 1,2,5-selendiazolové deriváty kombretastatinu

V práci Qui Guana byl použit jako spojka dvou *cis* uspořádaných fenylových jader 1,2,5-selendiazol. Některé z finálních struktur (**63-66**, Obr. 28) vykazovaly vysoké nanomolární *in vitro* cytotoxické aktivity, zejména proti linii HT-1080 (lidský fibrosarkom) [12].



IC_{50} HT-1080 = 0,084 μ M IC_{50} HT-1080 = 24,78 μ M IC_{50} HT-1080 = 0,16 μ M IC_{50} HT-1080 = 0,021 μ M

Obr. 28 Seliendiazolové deriváty kombretastatinu

1.1.9.7 Thiazolové deriváty kombretastatinu

Dalším zajímavým heterocyklem, kterým byl nahrazen olefinický můstek, byl 2,3-dihydrothiazol. Cytotoxická aktivita byla měřena na panelu lidských nádorových prsních liniích (T47D, MCF-7 a MDA-231). Na těchto liniích vykazovala sloučenina **67** (Obr. 29) vysoké aktivity (T47D IC_{50} = 16.3 μ g/ml; MCF-7 IC_{50} = 19 μ g/ml; MDA-231 IC_{50} = 11.8 μ g/ml)¹. Tato látka se vyznačovala přítomností 3,4,5-trimethoxyfenylové skupiny na jednom jádře a dále přítomností 4-methylskupiny na druhém jádře. Navíc nevykazovala žádnou signifikantní toxicitu proti nemaligním buňkám (MRC-5 IC_{50} > 100 μ g/ml)² a tato látka může být označena jako selektivní pro nádorové buňky.

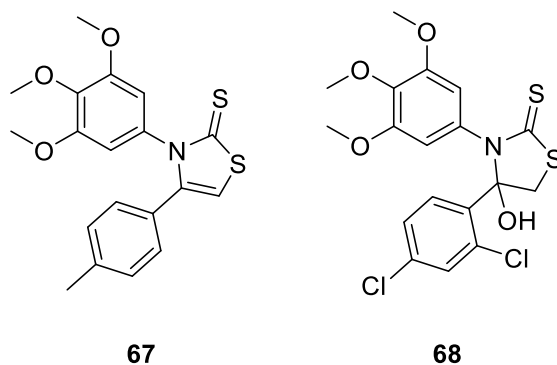
Dalším zajímavým derivátem thiazolu je sloučenina **68** (Obr. 29). Tato látka měla ještě lepší profil účinnosti než předchozí proti maligním liniím (T47D IC_{50} = 16.3 μ g/ml; MCF-7 IC_{50} = 19 μ g/ml; MDA-231 IC_{50} = 11.8 μ g/ml)³. Vyšší aktivita byla doprovázena mírným zvýšením toxicity vůči zdravým buňkám (MRC-5 IC_{50} = 47,3 μ g/ml)⁴.

¹ Zmíněná čísla vypadají po přepočtu na μ mol/l následovně: 0,0437 μ mol/l; 0,051 μ mol/l; 0,0316 μ mol/l

² Zmíněné číslo vypadá po přepočtu na μ mol/l následovně: 0,268 μ mol/l

³ Zmíněná čísla vypadají po přepočtu na μ mol/l následovně: 0,037 μ mol/l; 0,043 μ mol/l; 0,026 μ mol/l

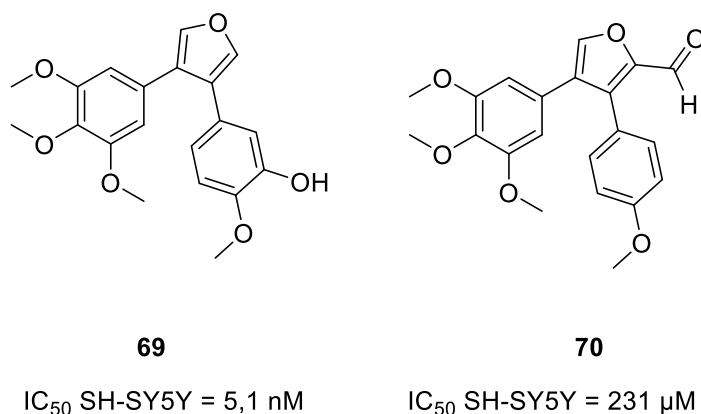
⁴ Zmíněné číslo vypadá po přepočtu na μ mol/l následovně: 0,106 μ mol/l



Obr. 29 Tiazolové deriváty kombretastatinu

1.1.9.8 Furanové deriváty kombretastatinu

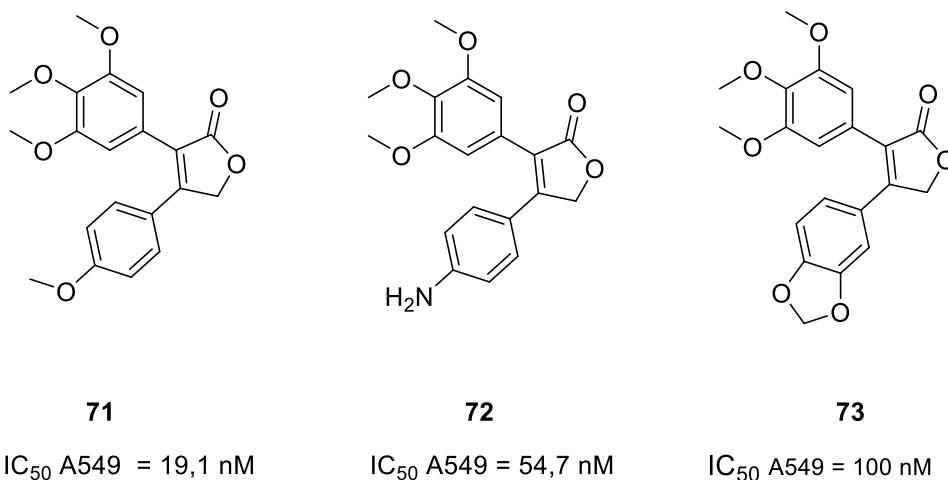
Furanové deriváty kombretastatinu byly vyvíjeny jako potenciální duální antineoplastika. Cytotoxická aktivita u nejslibnějšího furanového derivátu **69** byla 5,1 nM proti lidským neuroblastomovým buňkám (Obr. 30). Aldehydická skupina navázaná na C2 furanonového kruhu byla původně zamýšlena jako místo pro vazbu další biologicky aktivní molekuly. Jak se ovšem ukázalo, jakákoliv další modifikace molekuly vedla k několikanásobnému snížení aktivity (**69, 70**, Obr. 30) [37].



Obr. 30 3,4-diarylfurany a jejich antineoplastická aktivita

1.1.9.9 2,5-Dihydrofuranonové deriváty kombretastatinu

V roce 2002 Ahn a kol. publikovali sérii deseti 3,4-difenyl-2,5-dihydrofuran-2-onů. Je pozoruhodné, že karbonyl vysoce polarizuje dvojnou vazbu mezi oběma jádry. Navíc byla připravena jen analoga s trimethoxyfenylovým kruhem v α-pozici vůči karbonylu (C3). Obměnou substituentů na fenylovém kruhu v poloze C4 furanonu byly získány derivátů s nanomolárními aktivitami (**71-73**, Obr. 31), ale celková buněčná toxicita nebyla zmíněna[38].



Obr. 31 Furanonové deriváty kombretastatinu

V rámci naší pracovní skupiny byly připraveny strukturně podobné 3-(subst. fenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-ony (**74**, **75**, **Obr. 32**) a 3,5-disubstituované pyrrol-2-ony (**76**, **Obr. 32**), odvozené od přírodního (-)-inkrustoporinu. V první práci byl zjištěn příznivý vliv halogenové substituce na antifungální aktivitu[39]. Některé halofenylové-2,5-dihydrofuran-2-ony byly svými aktivitami srovnatelné s aktivitou antifungálního agens amfotericinu B. Analogické 3,5-disubstituované pyrrol-2-ony vykazovaly pouze mírnou antifungální aktivitu (**Obr. 32**) [40].



74 Z = H
75 Z = COR

76

antifungální IC_{50} = 0,49 - 15,63 μ M

antifungální IC_{50} = 31,25 - 250 μ M

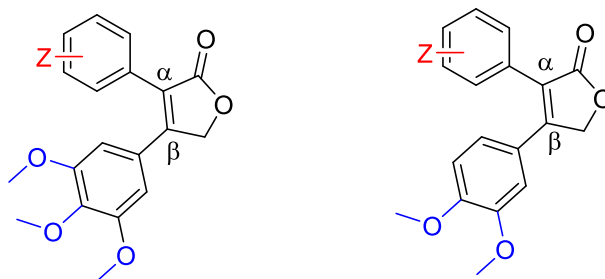
Obr. 32 Antifungální 3-(fenyl substituované)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-ony

U látek tohoto typu po přidání 3,4,5-trimethoxysubstituovaného fenylu vznikne 3,4-diarylfuranonové uskupení, které bioisosterně imituje strukturu kombretastatinů. Není pochyb o tom, že by mohlo dojít k potenciálně zajímavé modifikaci jak cytotoxické, tak antifungální aktivity.

2 CÍL PRÁCE

Na základě výše uvedeného lze cíle této práce shrnout do několika bodů:

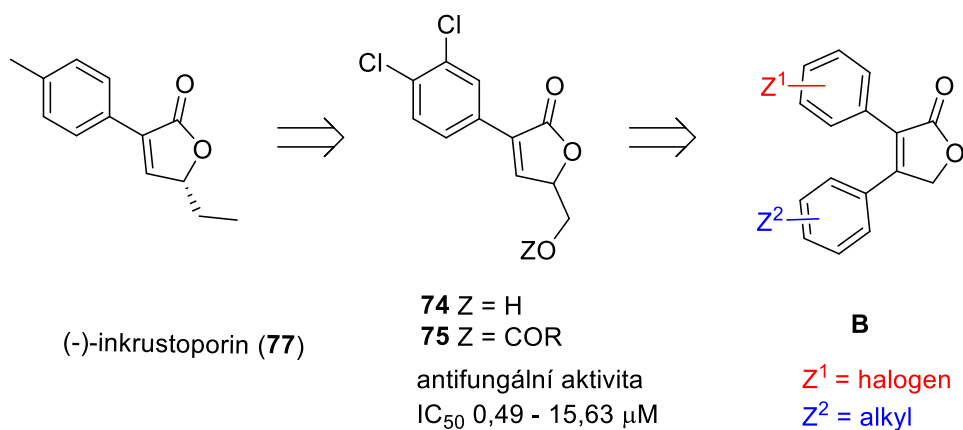
1. Vytvoření knihovny derivátů kombretastatinu se zachovaným *cis*-stilbenovým uskupením v podobě 3,4-diarylfuranonu a se substitucí fenylových jader kyslíkatými funkčními skupinami (**A, Obr. 33**). Jako předlohová struktura sloužil kombretastatin A-4 (**36, Obr. 20, vide supra**). Dalším úkolem bylo tuto skupinu látek dále podrobit biologickému screeningu (antibakteriální, antifungální, cytotoxická aktivita). Vzhledem k tomu, že podobná skupina látek již byla publikována [38] bylo žádoucí se zaměřit na nové deriváty, ve kterých je 3,4,5-trimethoxyfenylový kruh umístěn do polohy β vůči karbonylu a také na deriváty, které jsou substituovány pouze dvěma methoxylovými skupinami v poloze 3 a 4 fenylového jádra v β poloze vůči karbonylu (**A, Obr. 33**).



A

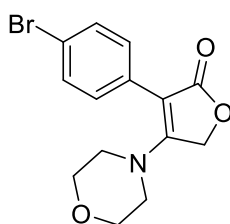
Obr. 33 Příklady nově navržených oxygenovaných derivátů (strukturní typ A)

2. Příprava další série 3,4-diarylfuranonů, jejichž substituce je inspirována antifungálně aktivními 3-(halofenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-ony (**74,75, Obr. 34**) [39]. Cílem této části bylo zjistit, jak se bude měnit biologická aktivita přidáním dalšího fenylového jádra (**B, Obr. 34**).



Obr. 34 Logika dalšího vývoje derivátů strukturního typu B

V literatuře takové látky doposud popsány nejsou; určitou podobnost nabízí práce z roku 2011 [36], pojednávající o mikromolárních antibakteriálních aktivitách laktonu **78** (**Obr. 35**), izolovaného z houby *Aspergillus terreus*.

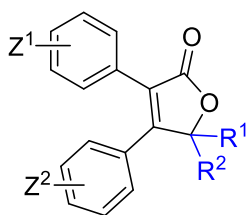


78

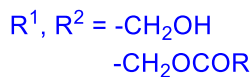
S. aureus ATCC 25923 3.0 μM

Obr. 35 Antibakteriální 3-arylfuranon z houby *Aspergillus terreus*

3. V návaznosti na předchozí cíl provést derivatizování vybraných sloučenin hydroxymethylovou/acyloxymethylovou skupinou. Od této modifikace bylo možné očekávat změnu fyzikálně chemických parametrů i biologické aktivity (**C**, **Obr. 36**).

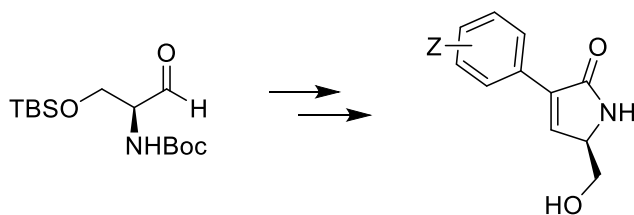


C



Obr. 36 γ -substituované deriváty kombretastatinu (strukturní typ C)

5. V návaznosti na publikaci Krenka [40], která popisuje enantioselektivní přípravu 3,5-disubstituovaných pyrrol-2-onů (**Schéma 5**), identifikovat krok, ve kterém dochází k částečné racemizaci a optimalizovat jeho podmínky pro získání opticky čistého produktu. Dále testovat vyvinutý protokol i na dalších aminokyselinách.

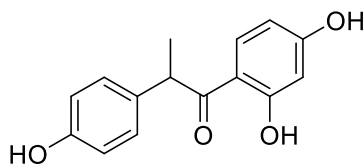


opticky čistý

poměr enantiomerů 7:3

Schéma 5 Příprava 3,5-disubstituovaných pyrrol-2-onů

6. V rámci spolupráce připravit strukturně spřízněný fytosterolový derivát *O*-desmethyngolensin, a podrobit ho testování s hOATP2B1 transportérovým systémem (**79**, **Obr. 37**).



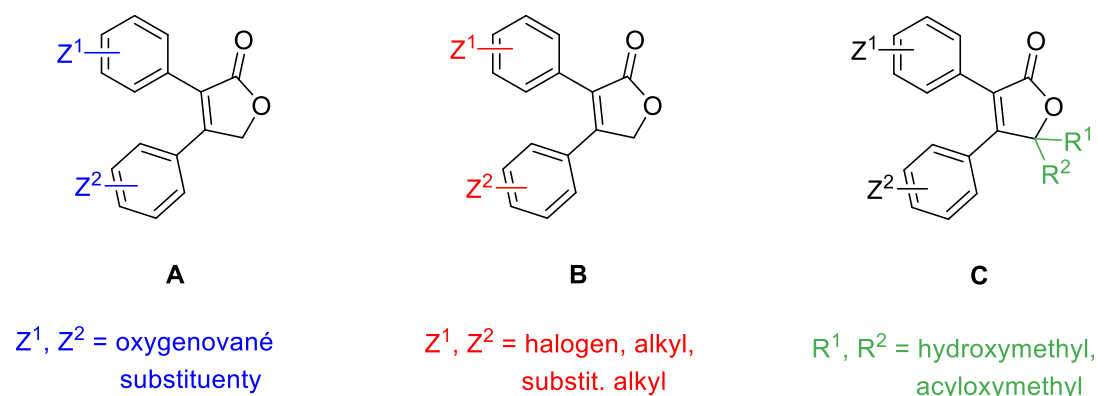
79

Obr. 37 *O*-desmethyngolensin

3 VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

3.1 Návrh a syntéza látek

Základem připravovaných látek je *cis*-stilbenové uskupení, které je, stejně jako u ostatních heterocyklických analog kombretastatinu, fixováno furanonovým kruhem (**A**, **B**, **C**, **Obr. 38**). V souladu s cíli práce byly navrženy tři série diarylfuranonů, tj. příprava dosud neznámých kombretafuranonů s trimethoxyfenylovým uskupením, umístěným do polohy β vůči karbonylu (**A**, **Obr. 38**), příprava látek s halogenovanými či alkylovanými arylly v polohách 3 a 4 (**B**, **Obr. 38**), a nakonec příprava série derivátů substituovaných v γ -poloze furanonového jádra (**C**, **Obr. 38**).



Obr. 38 Tři subsérie 3,4-diarylfuranonů

Retrosyntetický rozbor jasně naznačuje intramolekulární aldolovou kondenzaci jako klíčový krok (**Schéma 6**).

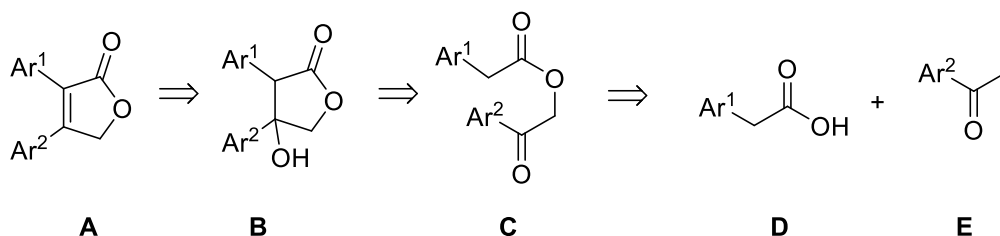


Schéma 6 Retrosyntetický rozbor přípravy 3,4-diarylfuranonů

Podobný přístup byl použit při přípravě protizánětlivého rofecoxibu [41]. Vzhledem k jednoduchosti, minimálnímu ekonomickému zatížení a rychlosti jsme zvolili kondenzační reakci, která je popsána v práci Petra Šenela [42].

3.2 Syntéza

Výchozími látkami pro syntézu byly, v souladu s výše uvedeným rozbohem, substituovaný fenacylbromid **80** a fenylactová kyselina **81**. V prvním kroku tohoto jednostupňového procesu byl α -halogenketon podroben nukleofilní substituci s fenylactovou kyselinou za přítomnosti Et_3N . Vzniklý ester byl dále cyklizován s použitím hydridu sodného v DMSO. Po okyselení na $\text{pH} \cong 1$ pomocí kyseliny chlorovodíkové vznikl α,β -diarylfuranon **82** (**Schéma 7**). Pro přečištění byly tyto látky použity pro *in vitro* testování. Jejich totožnost byla potvrzena kompletní sadou spekter. V ^1H NMR byl patrný signál dvou vodíků v γ -poloze furanonového kruhu v rozmezí 4.0 – 5.0 ppm. V reakci bylo možné u každé sloučeniny pozorovat typické tmavě zelené zbarvení po přidání hydridu sodného. Po okyselení přecházela tmavě zelená barva do žluté až oranžové, pravděpodobně způsobené vznikem konjugovaného systému dvojných vazeb.

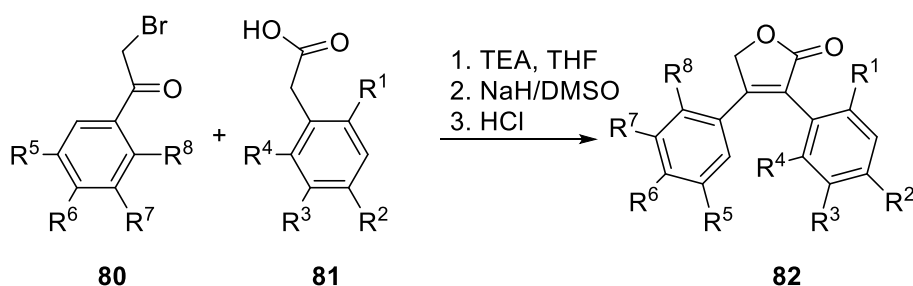


Schéma 7 Příprava oxygenovaných derivátů kombretastatinu

3.3 Příprava 1. série oxygenovaných 3,4-diarylfuranonů (strukturní typ A)

První série α,β -diarylfuranonů se vyznačovala přítomností kyslíkatých funkčních skupin na aromatických jádrech. Vzhledem k tomu, že část kombretafuranonů byla již dříve připravena [38], přistoupili jsme k přípravě dosud nepopsaných kombretafuranonů s 3,4,5-trimethoxyfenylovou substitucí (**82f-82i**, **Tabulka 2**). Vzhledem k tomu, že v literatuře doposud není vyjasněno, zda přítomnost tří methoxylových skupin na jednom jádře je nutná k zajištění cytotoxicity [27], rozhodli jsme se připravit 3,4-diarylfuranony pouze se dvěma methoxylovými skupinami, popř. jejich methyldioxo izostery (**82a-b**, **82e**, **Tabulka 2**). Příprava probíhala dle výše zmíněného schématu (**Schéma 7**) s dobrými celkovými výtěžky (60-70 %). U finálních laktonů se vyskytovala charakteristická rezonance v ^1H NMR spektru v rozmezí 4,2 – 5,0 ppm, odpovídající signálu dvou vodíků v γ -poloze furanonového kruhu.

Tabulka 2. Oxygenované deriváty kombretastatinu 82a-i

Sloučenina	Substituce								Výtěžek
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	
82a	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₂ O		H	65
82b	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	63
82c	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	60
82d	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	70
82e	H	OCH ₂ O		H	H	OCH ₂ O		H	69
82f	H	OCH ₂ O		H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	60
82g	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	65
82i	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	70

Kyselinu **83** bylo nutné podrobit sérii více reakcí, kvůli nutnosti ochránit fenolickou OH skupinu (viz **Schéma 8**). Pokud by byl tento krok reakce vynechán, mohlo by docházet ke konkurenční reakci za vzniku nežádoucího esteru.

Fenyloctová kyselina **83** byla proto nejprve esterifikována působením Dowexu 50 v MeOH za vzniku methylesteru **84**. Za těchto podmínek nedocházelo k esterifikaci fenolického hydroxyly. V dalším kroku byla provedena ochrana fenolické skupiny pomocí benzylbromidu a hydridu sodného v DMSO (**85**). Takto ochráněný ester fenyloctové kyseliny byl posléze převeden zpět na volnou kyselinu **86**, která dále reagovala mechanismem nukleofilní substituce se substituovaným brómketonem za vzniku ketoesteru **87**.

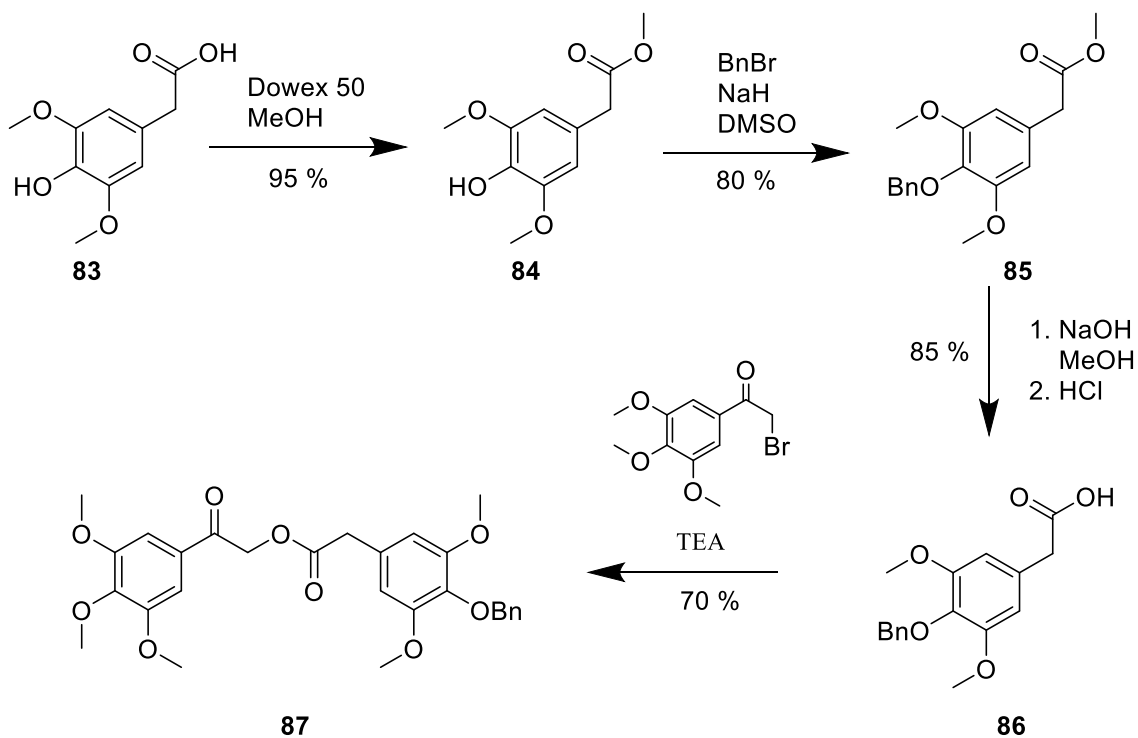


Schéma 8 Příprava cyklizačního prekurzoru **87**

Ketoester **87** podléhal intramolekulární aldolové kondenzaci v prostředí hydridu sodného a DMSO za vzniku diarylfuranonu **88**. V posledním kroku byla ochráněna benzyletherová skupina působením TFA v toluenu za vzniku finálního laktonu **82g**.

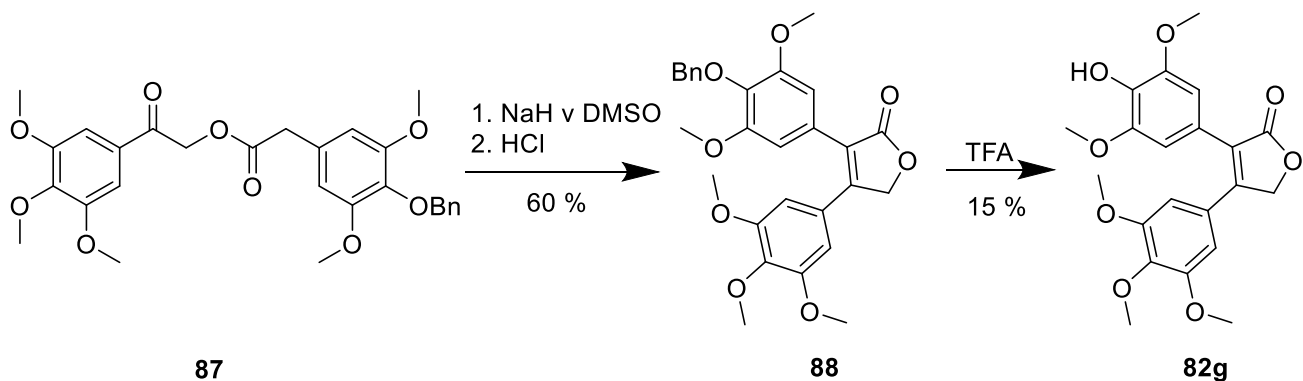


Schéma 9 Příprava kombretafuranonu **82g** s volnou fenolickou skupinou

Pro ochránění benzylové skupiny bylo nejprve použito 5 % Pd/C v MeOH v atmosféře vodíku, ale izolovány byly pouze výchozí látky. Proto byly testovány další podmínky ochránění: 5 % Pd/H₂ v THF; Pd(OAc)₂, Et₃SiH, TEA, DCM a konečně TFA v toluenu - pouze za těchto podmínek byl získán výtěžek 15 %, zatímco ostatní zmíněné reakce neprobíhaly a byla izolována pouze výchozí látka.

Odchránění methoxyskupin ve sloučenině **82b** bylo provedeno pomocí bromidu boritého, s výtěžkem 70 %. Identita produktu byla ověřena pomocí spekter. Signály methoxyskupin v C^{13} NMR spektru u sloučeniny **82d** vymizely, v IČ spektrech bylo možné pozorovat typické vibrace fenolických OH skupin s hodnotami 3314, 3566 a 3629 cm^{-1} .

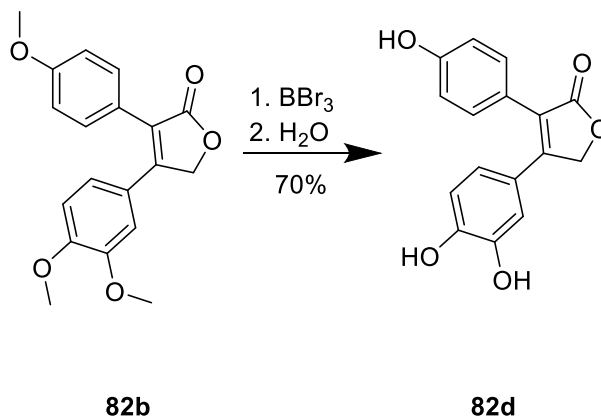


Schéma 10 Odchránění methoxylových skupin

3.4 Vyhodnocení cytotoxického *in vitro* testování na vybraných buněčných liniích

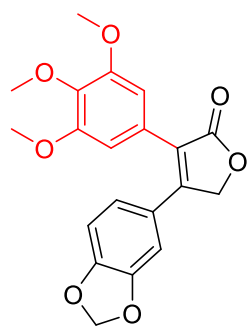
Cytotoxické aktivity oxygenovaných derivátů kombretastatinu byly vyhodnoceny na panelu následujících buněčných linií: dva leukemické modely (K562, HL-60), adenokarcinom prostaty (PC-3), prsní karcinom (MCF7), hepatocelulární karcinom (Hep G2). Dále byl testován cytotoxický efekt proti dvěma nemaligním buněčným liniím: immortalizované epiteliální buňky z retiny (RPE-1) a primární fibroblasty (BJ). Pro detailnější objasnění mechanismu cytotoxického efektu byla současně stanovována i aktivace kaspáz 3/7. Aktivace kaspázových enzymů indikuje apoptotický typ buněčné smrti. Výsledky pro podskupinu oxygenovaných derivátů sumarizuje **Tabulka 3**.

Tabulka 3. Cytotoxické a apoptotické profilování furanonů 82a – 82i a sloučeniny 64

Látka	Cytotoxicita [ED ₅₀ , μM]							Kaspázová 3/7 aktivita [ED ₅₀ , μM]				
	RPE-1	BJ	K562	HL-60	PC-3	MCF7	Hep G2	RPE-1	K562	HL-60	PC-3	Hep G2
82a	>40	>40	15,65	15,46	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
82b	>40	>40	>40	42,72	15,87	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
82c	>40	>40	22,81	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
82d	>40	>40	16,19	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
82e	35,53	n.d.	16,01	17,39	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
82f	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
82g	>40	>40	40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
82i	>40	>40	20	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
64	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,05	0,02	ND	ND	ND	ND	ND
Kamp	>40	>40	0,090	0,018	0,396	0,340	0,430	ND	ND	ND	ND	ND
Doxo	18,57	ND	0,67	ND	17,28	27,43	9,06	ND	ND	ND	ND	ND

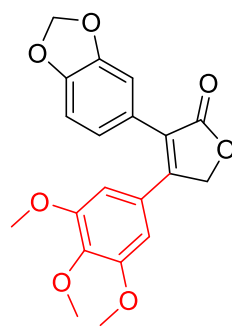
Použité buněčné linie: RPE-1: lidské imortalizované epiteliální buňky z retiny; BJ: lidské primární fibroblasty; Hep G2: lidský hepatocelulární karcinom; MCF7: lidský adenokarcinom prsu; K562: lidská chronická myeloidní leukémie; HL-60: lidská akutní myeloidní leukémie; PC-3: lidský adenokarcinom prostaty. Kamp= (S)-(+)-kamptothecin. Doxo = Doxorubicin hydrochlorid. ND- nestanoveno.

Z výsledků a z porovnání s výsledky Ahna a kol. [38] je patrné, že přesunutí 3,4,5-trimethoxyfenylového kruhu do polohy β vůči karbonylu (**82f-i**) vede ke kompletnímu vymizení cytotoxického účinku na celé spektrum nádorových i nemaligních buněčných linií (**Obr. 39**).



73 ref. [38]

MCF-7 IC_{50} = 80 nM



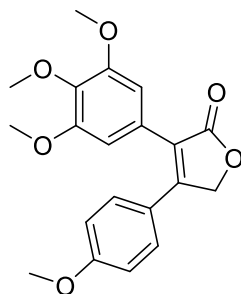
82f

MCF-7 IC_{50} > 40 μ M
RPE-1 IC_{50} > 40 μ M

Obr. 39 Změna účinku při přesunutí trimethoxyfenylového kruhu do polohy β vůči karbonylu

Z tohoto zjištění vyplývá, že pouze deriváty substituované 3,4,5-trimethoxyfenylovým kruhem v α poloze mohou být aktivní. V případě látky **82a** s 3,4-methylenedioxy substitucí fenylového jádra v poloze β a jejích analogů **82b**, **82d**, **82e** jsme zaznamenali mírnou cytotoxicitu pouze proti leukemickým buňkám, bez participace kaspáz, což svědčí o nespecifickém cytotoxickém účinku. Látky z této série nezasahovaly (s výjimkou **82e**) RPE-1 a BJ buňky.

Ahn ve své práci [38], pojednávající o analogických kombretafuranonech, předkládá nanomolární hodnoty cytotoxické aktivity vůči maligním lidským liniím (např. sloučenina **64** (**Obr. 40**) vykazuje vůči maligní linii MCF-7 hodnoty IC_{50} 80 nM, ovšem toxicita vůči zdravým buňkám nebyla uvedena. Provedli jsme proto syntézu téže sloučeniny dle standardního postupu (**Schéma 7**) a při testování toxicity vůči zdravým buňkám jsme pozorovali nanomolární toxicity (**64**, **Tabulka 3**). Toxicita je dokonce o řád vyšší než u vysoce toxického doxorubicinu (**Tabulka 3**). Tyto výsledky přesvědčivě dokládají, že vysoká aktivita celé řady potenciálně atraktivních derivátů kombretastatinu je velmi pravděpodobně pouze důsledek obecné buněčné toxicity.



64

IC_{50} (RPE-1) = 10 nM

Obr. 40 Cytotoxicita publikovaného kombretafuranonu **64**

Žádná z námi připravených oxygenovaných sloučenin nezaznamenala *in vitro* toxicitu vůči nemaligní kontrole, proto jsme dále otestovali i jejich antibakteriální efekt (**Tabulka 4**). U sloučenin **82a a 82c** byla zaznamenána určitá schopnost narušit růst bakterií při MIC < 125 μM. U sloučeniny **82a** byla zaznamenána selektivita vůči *Staphylococcus aureus* s hodnotou MIC = 7,81 μM. Sloučeniny **82b a 82d** - i nezasahovaly žádné bakteriální kmeny.

Tabulka 4. Antimikrobiální aktivity furanonů 82a - i

Bakt. kmen a inkubační doba		Sloučenina [MIC, $\mu\text{mol/l}$]								
		82a	82b	82c	82d	82e	82f	82g	82h	82i
SA	24h	7.81	>125	31.25	250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	15.62	>125	31.25	500	>125	>125	>125	>125	>125
MRSA	24h	>500	>125	62.5	250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	62.5	500	>125	>125	>125	>125	>125
SE	24h	125	>125	125	250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	500	>125	125	500	>125	>125	>125	>125	>125
EF	24h	>500	>125	>500	500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	500	>125	>125	>125	>125	>125
EC	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
KP	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
KP-E	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
PA	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125

SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, MRSA: *Staphylococcus aureus* HK5996/08, SE: *Staphylococcus epidermidis* HK6966/08, EF: *Enterococcus* sp. HK14365/08, EC: *Escherichia coli* ATCC 8739, KP: *Klebsiella pneumoniae* HK11750/08, KP-E: *Klebsiella pneumoniae* HK14368/08; and PA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Sloučenina **82a** může vzhledem ke své antimikrobiální aktivitě $< 10 \mu\text{M}$ a nulové toxicitě sloužit jako templát pro vývoj další knihovny kyslíkatých 3,4-diarylfuranonů s potenciálním antibakteriálním účinkem.

U žádné z našich látek jsme nezaznamenali efekt proti druhům hub *Candida*, resp. *filamentózním houbám* ani při koncentraci 1 mM (Tabulka 5).

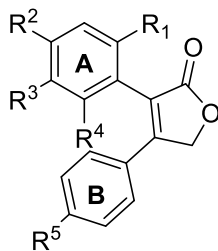
Tabulka 5. Antifungální aktivita sloučenin 82a - i

Fung. kmen a inkubační doba		Sloučenina [MIC, μM]								
		82a	82b	82c	82d	82e	82f	82g	82h	82i
CA1	24h	>500	>125	>500	250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	500	>125	>125	>125	>125	>125
CA2	24h	>500	>125	>500	250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	500	>125	>125	>125	>125	>125
CP	24h	>500	>125	>500	250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	500	>125	>125	>125	>125	>125
CK1	24h	>500	>125	>500	500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	500	>125	>125	>125	>125	>125
CK2	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
CT	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
CG	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
CL	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
TA	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
AF	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
AC	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
TA	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>125	>125	>125	>125

CA1: *Candida albicans* ATCC44859, CA2: *Candida albicans* ATCC90028, CP: *Candida parapsilosis* ATCC22019, CK1: *Candida krusei* ATCC 6258, CK2: *Candida krusei* E28, CT: *Candida tropicalis* 156, CG: *Candida glabrata* 20/I, CL: *Candida lusitaniae* 2446/I, TA: *Trichosporon beigelii* 1188m, AF: *Aspergillus fumigatus* 231, AC: *Absidia corymbifera* 272, TA: *Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách).

3.5 Syntéza a biologické hodnocení 2. série halogenovaných 3,4-diarylfuranonů (strukturní typ B)

Po syntéze a vyhodnocení biologických účinků látek první série jsme přistoupili k přípravě a k testování druhé série derivátů (strukturní typ B). Zaměřili jsme se především na substituci jádra A halogeny, na jádře B jsme ponechali alkylovou, případně alkoxylovou substituci. Látky byly bez výjimky připraveny výše popsaným obecným postupem (vide supra, **Schéma 7**), jejich přehled je uveden v **Tabulce 6**.



B

Obr. 41 Návrh halogenovaných derivátů

Tabulka 6. Přehled derivátů strukturního typu B

Sloučenina	Substituce					Výtěžek
	R1	R2	R3	R4	R5	%
89a	H	Br	H	H	H	62
89b	H	Br	H	H	CH ₃	69
89c	H	Br	H	H	CF ₃	57
89d	H	Br	H	H	CH ₂ CH ₃	59
89e	H	H	H	Cl	CH ₃	61
89f	H	H	Cl	H	CH ₃	62
89g	H	Cl	H	Cl	CH ₃	57
89h	H	Cl	Cl	H	CH ₃	55
89i	H	F	H	H	H	58
89j	H	F	H	H	CH ₃	63
89k	H	H	CF ₃	H	CH ₃	59
89l	H	H	CF ₃	H	H	75
89m	H	CF ₃	H	H	Cl	70
89n	H	Br	H	H	OCH ₃	65
89o	H	Br	H	H	OH	62
89p	Cl	H	H	Cl	OCH ₃	55
89q	H	OCH ₃	H	H	SO ₂ CH ₃	50

Po připravení 17 furanonových derivátů byl proveden screening cytotoxicity (**Tabulka 7**).

Tabulka 7. Cytotoxická aktivita látek 89a – 89m

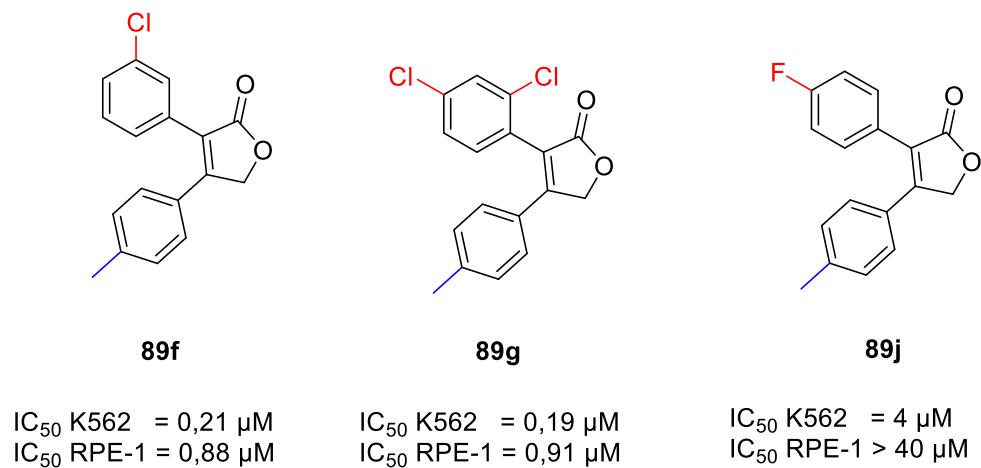
Látka	Cytotoxicita [IC ₅₀ , μM]							Kaspázová 3/7 aktivita [IC ₅₀ , μM]				
	RPE-1	BJ	K562	HL-60	PC-3	MCF7	Hep G2	RPE-1	K562	HL-60	PC-3	Hep G2
89a	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
89b	0,97	>40	0,30	0,65	>40	14,80	>40	8,16	0,29	2,77	>40	>40
89c	16,41	>40	>40	>40	>40	6,37	11,36	>40	>40	>40	>40	>40
89d	1,30	>40	0,47	1,02	>40	13,00	>40	>40	>40	>40	>40	>40
89e	2,09	>40	0,78	1,04	>40	>40	>40	13,29	>40	>40	>40	>40
89f	0,88	>40	0,21	0,48	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
89g	0,91	>40	0,19	0,27	>40	23,92	>40	10,09	>40	0,44	>40	>40
89h	0,54	>40	0,12	0,23	>40	15,40	>40	3,50	>40	0,54	>40	>40
89i	>40	>40	n.d.	n.d.	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
89j	>40	>40	4,00	9,34	>40	>40	>40	>40	3,23	7,53	>40	>40
89k	1,33	>40	0,29	0,66	>40	19,06	>40	>40	0,31	2,66	>40	>40
89l	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
89m	14,86	>40	>40	>40	>40	12,34	>40	>40	>40	>40	>40	>40
Kamp	>40	>40	0,090	0,018	0,396	0,340	0,430	ND	ND	ND	ND	ND

Použité buněčné linie: RPE-1: lidské imortalizované epiteliální buňky z retiny; BJ: lidské primární fibroblasty; Hep G2: lidský hepatocelulární karcinom; MCF7: lidský adenokarcinom prsu; K562: lidská chronická myeloidní lekémie; HL-60: lidská akutní myeloidní leukémie; PC-3: lidský adenokarcinom prostaty. Kamp= (S)-(+)-kamptothecin. ND- nestanoveno.

Z testování cytotoxického účinku vyplývá, že některé látky ze druhé série látek vykazují účinek, zejména vůči leukemickým buňkám. Nejzajímavější poměr cytotoxické aktivity vůči maligním buňkám/cytotoxicity vůči nemaligním buňkám byl nalezen pro sloučeninu **89j**, která zasahovala linii K562 a HL60 s hodnotami IC₅₀ 4,0 a 9,34 μM při zachování nulové toxicity vůči nemaligním liniím do hodnoty 40 μM. Vzhledem k aktivaci kaspáz 3/7 je pravděpodobné, že látky působí jako spouštěče apoptózy. Ostatní sloučeniny vykazaly podobný efekt, ale současně i stejně vysoké toxicity vůči nemaligně transformovaným liniím. V porovnání s běžně používaným cytostatikem, (S)-(+)-kamptothecinem, nevykazují tyto látky podobně příznivý profil cytotoxické aktivity. Žádná z látek této série nevykazovala toxicitu vůči HepG2 buňkám s výjimkou **89c**.

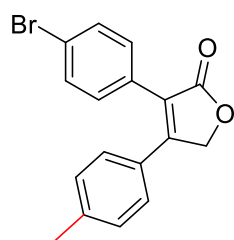
Na základě dat v Tab. 7 lze učinit následující závěry:

a) Substituce aromatických jader halogenem (jádro A) a alkylem (jádro B) v poloze 4 obou jader, je provázena výrazným cytotoxickým efektem proti leukemickým liniím (např. **89g, f, j**; **Obr. 42**).



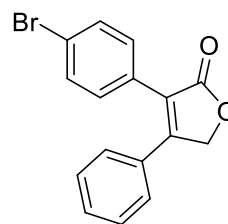
Obr. 42 Vybrané 3,4-diarylfuranony a jejich profil cytotoxicity

b) Na rozdíl od jádra A, které může být modifikováno halogeny bez významnější ztráty účinku, vede odstranění alkylu z jádra B k úplnému vymizení cytotoxicity (**Obr. 43**).



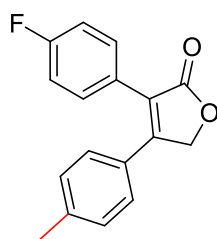
89b

K562 $IC_{50} = 0.3 \mu M$
RPE-1 $IC_{50} = 0.9 \mu M$



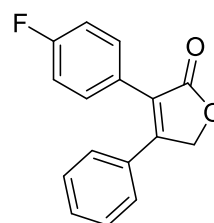
89a

K562 $IC_{50} > 40 \mu M$
RPE-1 $IC_{50} > 40 \mu M$



89j

K562 $IC_{50} = 4 \mu M$
RPE-1 $IC_{50} > 40 \mu M$



89i

K562 $IC_{50} > 40 \mu M$
RPE-1 $IC_{50} > 40 \mu M$

Obr. 43 Ztráta aktivity při odstranění alkylu z kruhu B

c) Náhrada brómu za fluor (**89b**, **89j**, **Obr. 43**) je provázena mírným snížením aktivity vůči maligním liniím a výrazným snížením toxicity vůči nemaligním buňkám. Fluor se tedy jeví jako příznivá změna ve prospěch zlepšení cytotoxického profilu těchto sloučenin.

Po provedení screeningu biologické aktivity bylo dále provedeno testování antimikrobiální aktivity. U tří sloučenin z této série se objevila zajímavá aktivita ($MIC < 10 \mu M$) zejména vůči G+ kmenům (**Tabulka 8**).

Tabulka 8. Antimikrobiální aktivita sloučenin 89a – m

Bakt. kmen, inkubační doba	Sloučenina [MIC, μM]												
	89a	89b	89c	89d	89e	89f	89g	89h	89i	89j	89l	89m	
SA	24h	3.9	7.81	>1000	>1000	62.5	1.95	>125	>125	15.62	125	15.62	>125
	48h	15.62	15.62	>1000	>1000	62.5	1.95	>125	>125	15.62	125	15.62	>125
MRSA	24h	31.25	62.5	>1000	>1000	62.5	15.62	>125	>125	125	>500	62.5	>125
	48h	62.5	62.5	>1000	>1000	62.5	15.62	>125	>125	125	>500	62.5	>125
SE	24h	31.25	15.62	>1000	>1000	125	15.62	>125	>125	125	125	31.25	>125
	48h	62.5	31.25	>1000	>1000	125	15.62	>125	>125	125	125	31.25	>125
EF	24h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
	48h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
EC	24h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
	48h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
KP	24h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
	48h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
KP-E	24h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
	48h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
PA	24h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125
	48h	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500	>125

SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, MRSA: *Staphylococcus aureus* HK5996/08, SE: *Staphylococcus epidermidis* HK6966/08, EF: *Enterococcus* sp. HK14365/08, EC: *Escherichia coli* ATCC 8739, KP: *Klebsiella pneumoniae* HK11750/08, KP-E: *Klebsiella pneumoniae* HK14368/08; and PA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Nejvyšší aktivity vůči kmenu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 MIC₉₅ byly nalezeny u sloučeniny **89a** a **89f** (Tabulka 8). Sloučenina **89a** obsahuje v poloze 4 fenylového jádra A bróm. Sloučenina **89f** má oproti halogenové substituci fenylového jádra A i substituci v poloze 4 jádra B (methyl). V případě sloučeniny **89f** se může jednat o kompletní buněčnou toxicitu, vzhledem k tomu, že zasahuje nemaligně transformované buňky v nanomolárních koncentracích (Tabulka 7). U sloučeniny **89a** se toto dá vyvrátit (látka není toxická vůči nemaligním buňkám RPE-1 až do koncentrace 40 μM). Sloučenina **89b** vykazuje rovněž

zajímavé MIC₉₅ < 10 μM proti stafylokokům, ale vzhledem k toxicitě vůči linii RPE-1 (0,97 μM) lze usuzovat, že se pravděpodobně jedná o obecnou buněčnou toxicitu.

3.6 Syntéza heterocyklických analog 3,4-diarylfuranonů a jejich biologické hodnocení

Vzhledem k tomu, že izosterie je jednou z možností obměny aktivních biologických molekul v medicíně, rozhodli jsme se naše látky podrobit izosterní náhradě fenylů heterocykly. Přítomnost heteroatomu v molekule 3,4-diarylfuranonu může dále ovlivnit biologickou aktivitu (možnost tvorby vodíkových vazeb při interakci s biologickými strukturami). Příprava těchto látek vycházela z komerčně dostupné indolyloctové kyseliny **91**, popř. pyridyloctových kyselin **93** a **96**. V případě indolového derivátu byl použit standardní postup esterifikace s následnou cyklizací hydridem sodným (**Schéma 11**). V případě pyridinového derivátu byl pro účely esterifikace a cyklizace použit *tert*-butanolát draselný v methanolu. Vzhledem k tomu, že lipofilní charakter pravděpodobně výrazně přispívá ke zvýšení cytotoxického efektu, byly tyto sloučeniny substituovány trifluormethylovou skupinou. Látku **97** bylo možné připravit standardní procedurou (**Schéma 11**).

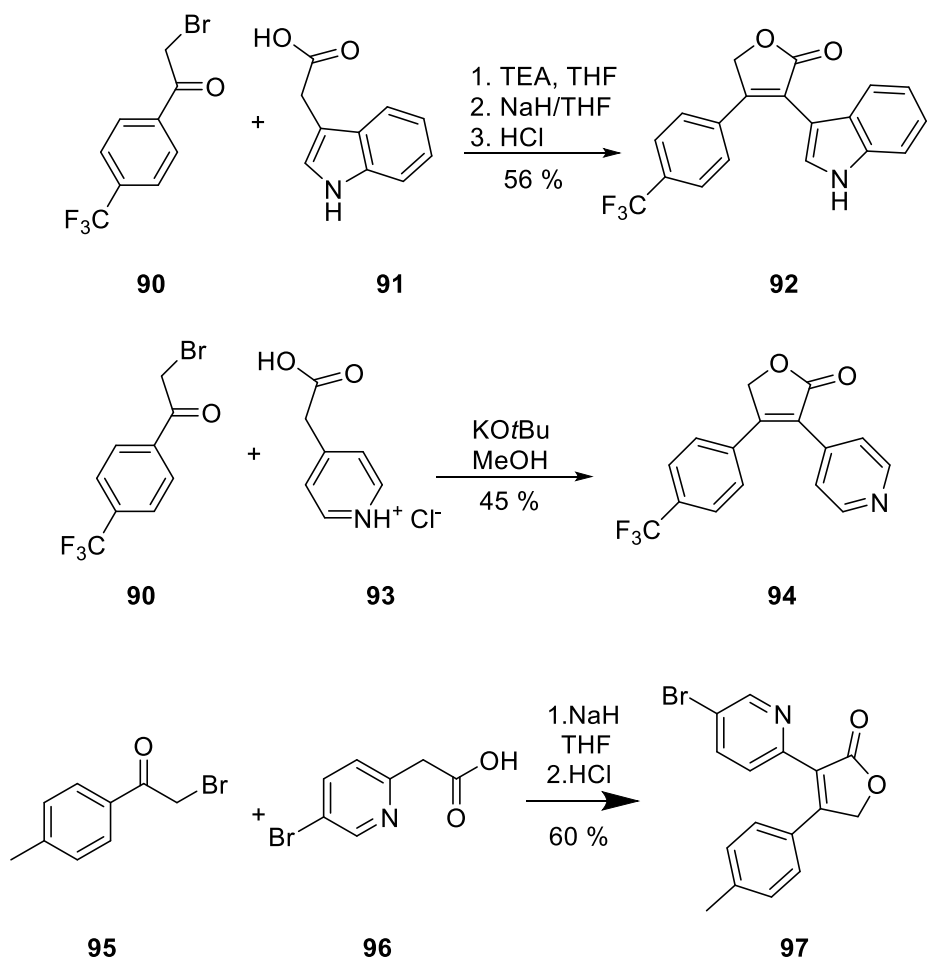


Schéma 11 Příprava heterocyklických analog

U látek byla nejprve stanovena cytotoxická aktivita s použitím (S)-(+)-kamptothecinu jako vnitřního standardu (**Tabulka 9**).

Tabulka 9. Cytotoxické a apoptotické profilování sloučenin 92, 94 a 97

Látka	Cytotoxicita [IC ₅₀ , μM]							Kaspázová 3/7 aktivita [IC ₅₀ , μM]				
	RPE-1	BJ	K562	HL-60	PC-3	MCF7	Hep G2	RPE-1	K562	HL-60	PC-3	Hep G2
92	0,87	>40	0,26	0,67	>40	>40	>40	1.54	>40	2,94	>40	>40
94	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
97	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
kamp	>40	>40	0,090	0,018	0,396	0,340	0,430	ND	ND	ND	ND	ND

Použité buněčné linie: RPE-1: lidské imortalizované epiteliální buňky z retiny; BJ: lidské primární fibroblasty; Hep G2: lidský hepatocelulární karcinom; MCF7: lidský adenokarcinom prsu; K562: lidská chronická myeloidní leukémie; HL-60: lidská akutní myeloidní leukémie; PC-3: lidský adenokarcinom prostaty. kamp= (S)-(+)-kamptothecin. ND- nestanoveno.

Z výsledků vyplývá, že indolový derivát **92** vykazuje výraznou nanomolární toxicitu výhradně proti leukemickým buněčným liniím K562, HL-60 a linii RPE-1. Pyridinový kombretafuranon **94** nevykazoval při koncentraci 40 μmol/l žádnou aktivitu. Látka **97**, analog vysoce cytotoxicky aktivního laktonu **89b**, ztratil přidáním heteroatomu svou cytotoxickou aktivitu.

Látky byly dále podrobeny antimikrobiálnímu a antifungálnímu testování, jejichž výsledky sumarizuje **Tab. 10** a **11**.

Tabulka 10. Antimikrobiální aktivita heterocyklických analog 92, 94, 97

Kmen, ink. doba		Sloučenina			Kmen, ink. doba		Sloučenina		
		92	94	97			92	94	97
SA	24h	>500	>500	>500	EC	24h	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500		48h	>500	>125	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500	KP	24h	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500		48h	>500	>125	>500
SE	24h	>500	>500	>500	KP-E	24h	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500		48h	>500	>125	>500
EF	24h	>500	>500	>500	PA	24h	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500		48h	>500	>125	>500

SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, MRSA: *Staphylococcus aureus* HK5996/08, SE: *Staphylococcus epidermidis* HK6966/08, EF: *Enterococcus* sp. HK14365/08, EC: *Escherichia coli* ATCC 8739, KP:

Klebsiella pneumoniae HK11750/08, KP-E: *Klebsiella pneumoniae* HK14368/08; and PA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Jak je patrné z dat v těchto tabulkách, látky nevykazovaly žádný antifungální, ani antimikrobiální efekt.

Tabulka 11. Antifungální aktivita látek 92, 94, 97

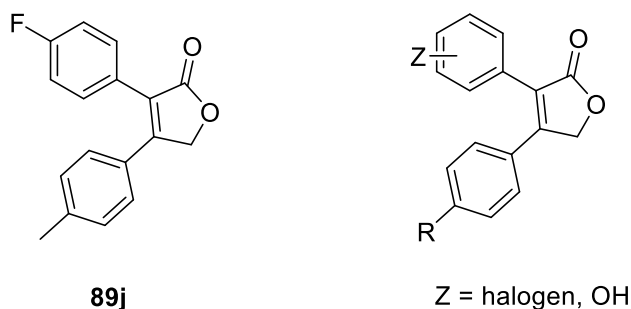
Kmen, ink. doba		Sloučenina			Kmen, ink. doba		Sloučenina		
		92	94	97			92	94	97
CA1	24h	>500	>125	>500	CG	24h	>125	>125	>500
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>500
CA2	24h	>500	>125	>500	CL	24h	>125	>125	>500
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>500
CP	24h	>500	>125	>500	TA	24h	>125	>125	>500
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>500
CK1	24h	>500	>125	>500	AF	24h	>125	>125	>500
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>500
CK2	24h	>500	>125	>500	AC	24h	>125	>125	>500
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>500
CT	24h	>500	>125	>500	TA	24h	>125	>125	>500
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>500

CA1: *Candida albicans* ATCC44859, CA2: *Candida albicans* ATCC90028, CP: *Candida parapsilosis* ATCC22019, CK1: *Candida krusei* ATCC 6258, CK2: *Candida krusei* E28, CT: *Candida tropicalis* 156, CG: *Candida glabrata* 20/I, CL: *Candida lusitanae* 2446/I, TA: *Trichosporon beigelii* 1188m, AF: *Aspergillus fumigatus* 231, AC: *Absidia corymbifera* 272, TA: *Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách)

3.7 Další vývoj 3,4-diarylfuranonů strukturního typu B

Zajímavé výsledky cytotoxického profilování u látek typu B z druhé série nás vedly k dalšímu rozvoji analog typu **89j** (vide supra). Vzhledem k tomu, že v předchozí skupině látek byla testována variabilita substituce zejména na jádře A, v této sérii jsme se zaměřili na obměny jádra B - zejm. využití alkylové homologace a izosterie alkylového substituentu v poloze 4

fenylového jádra B (**Tabulka 12**). Další obměna směřovala k zjištění, zda bude hydrofilní funkční skupina v molekule cytotoxického 3,4-diarylfuranonu **89f** výrazně ovlivňovat aktivitu (**103**, **Schéma 13**).



Obr. 44 Příprava fluorovaných kombretafuranonů

Tabulka 12. Fluorované deriváty **98a - d**

Sloučenina	Substituce		Výtěžek
	Z	R	
98a	3,4-diF	4-Me	14 %
98b	4-F	4-Et	75 %
98c	4-F	4-iPr	95 %
98d	4-F	4-SMe	78 %

Příprava látek byla analogická předchozímu postupu při přípravě první knihovny (**Schéma 7**). Výtěžky reakcí se, s výjimkou difluorovaného derivátu, pohybovaly nad 75 %. Struktura výsledných laktonů byla opět zřejmá z ^1H NMR spekter, kde vodíky na γ -uhlíku furanonového kruhu vykazovaly signály v rozmezí 4,0 – 5,0 ppm, náležící dvěma vodíkům na tomto uhlíku. U těchto látek bylo dále provedeno hodnocení cytotoxicity (**Tabulka 13**).

Vzhledem k tomu, že molekuly látek **98a – 98d** jsou značně lipofilní, rozhodli jsme se rovněž připravit derivát s volnou fenolickou skupinou. Příprava této látky vycházela z fenylactové kyseliny **99**, která byla sekvencí reakcí (esterifikace, ochrana volné fenolické funkční skupiny, bazická hydrolýza) přeměněna na benzylether **100**, který reagoval se substituovaným bromketonem za vzniku oxoesteru **101**.

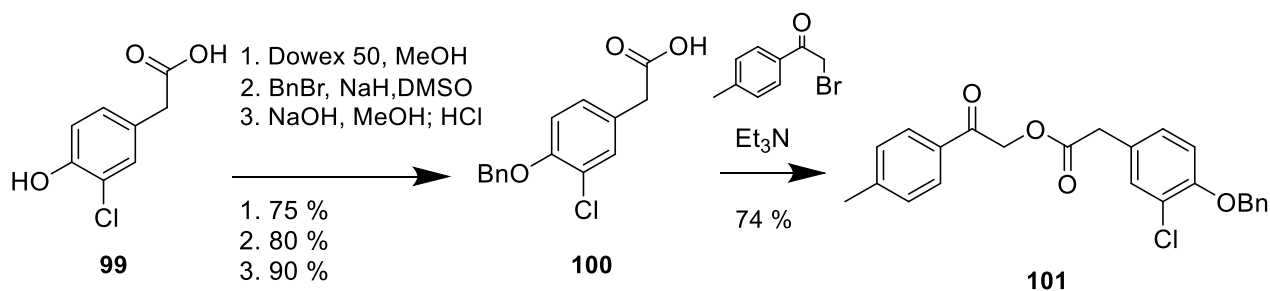


Schéma 12 Příprava esteru 101

Tento ketoester byl působením hydridu sodného a za následné eliminace vody převeden na 3,4-diarylfuranon **102**. V posledním kroku jsme provedli ochránění benzylové skupiny pomocí TFA a vzniku výsledné molekuly **103** (Schéma 13).

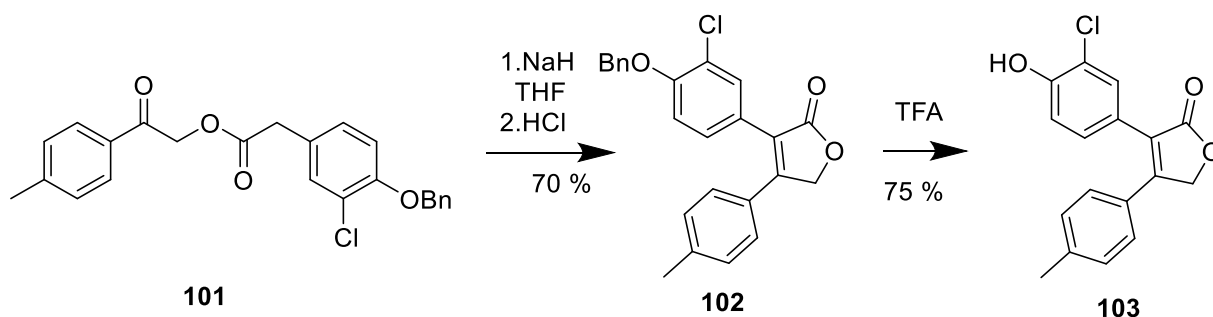


Schéma 13 Příprava 3,4-diarylfuranonu **103** s volnou fenolickou funkční skupinou

Biologické hodnocení látek sumarizuje **Tabulka 13**.

Tabulka 13. Cytotoxické a apoptotické profilování sloučenin 98a – 98d a látky 103

Látka	Cytotoxicita [ED ₅₀ , μM]											
	BJ	RPE-1	HCT11 6	HEPG 2	HL-60	HT-29	K562	MCF-7	MiaPaCa-2	Pc3	CAPA N-2	U-937
98a	>40	3,92	2,78	0,91	2,43	2,03	1,61	3,57	2,8	>40	>40	0,69
98b	>40	>40	7,62	3,99	10,01	7,7	7,49	8,18	9,2	>40	>40	2,61
98c	>40	>40	5,71	11,41	15,75	16,43	>40	6,22	4,81	>40	>40	20,68
98d	>40	>40	10,37	6,52	14,15	13,26	6,03	10	11,9	>40	>40	4,4
103	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
imat	26,79	21,94	32,88	25,91	12,52	21,35	0,75	11,7	16	18,86	16,38	9,07
doxo	0,34	1,93	0,98	0,68	0,09	1,81	0,82	4,35	2,08	1,43	4,1	0,16

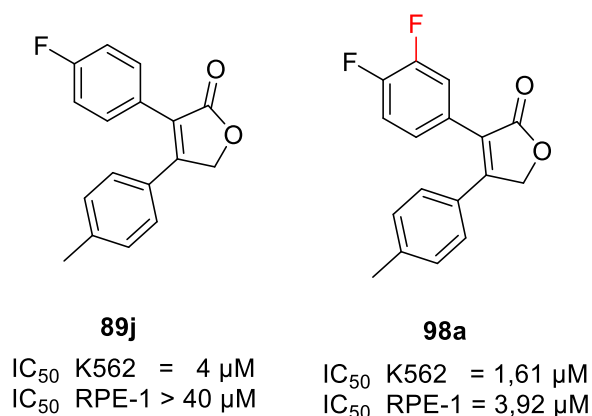
Použité buněčné linie: RPE-1: lidské normální immortalizované epitelální buňky z retiny; BJ: lidské primární fibroblasty; Hep G2: lidský hepatocelulární karcinom; MCF7: lidský adenokarcinom prsu. K562: lidská chronická myeloidní leukémie; HL-60: lidská akutní myeloidní leukémie; PC-3: lidský adenokarcinom prostaty; Capan-2: lidský adenokarcinom slinivky; HT-29: lidský kolorektální karcinom;

MiaPaCa-2: Lidský duktální adenokarcinom slinivky; U-937 lidský plicní lymfoblast; HCT-116 lidský kolorektální karcinom. Imat. = imatinib mesylát, Doxo = Doxorubicin hydrochlorid.

Hodnocení biologické aktivity bylo obohaceno o dvě nové linie buněk a také dva standardy běžně používaných léčiv v onkologii (imatinib mesylát, doxorubicin hydrochlorid) [43]. Látky **98a-b** a **98d** zasahují především nemaligně transformované buněčné linie při koncentracích < 10 μM . Současně není v těchto koncentracích zasažena (s výjimkou látky **98a**) nemaligní buněčná kontrola (BJ, RPE-1), což výrazně zlepšuje terapeutický poměr těchto sloučenin. Tyto látky se cytotoxickým účinkem *in vitro* blíží klinicky používaným léčivům.

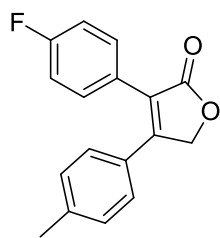
Z těchto výsledků lze učinit následující závěry:

a) Obměnou molekuly furanonu **89j** zavedením dalšího fluoru stoupá cytotoxicita vůči všem maligním buněčným liniím, ale současně výrazně stoupne toxicita proti RPE-1 buňkám na řádově stejnou úroveň ($\text{IC}_{50} = 3,92 \mu\text{M}$) (viz **98a**, **Obr. 45**). To je pravděpodobně způsobeno zvýšením lipofility molekuly a její kumulace v buňce. Společně se vzrůstem toxicity lze pozorovat i zajímavý efekt vůči plicním lymfoblastům U-937 ($\text{IC}_{50} = 0,69 \mu\text{M}$), jaterním nádorovým buňkám (HEPG2) ($\text{IC}_{50} = 0,91 \mu\text{M}$) i proti leukemickým buňkám (K562) ($\text{IC}_{50} = 1,61 \mu\text{M}$). V porovnání s doxorubicinem tato látka nezasahuje nemaligní fibroblasty v klidovém stavu (BJ).



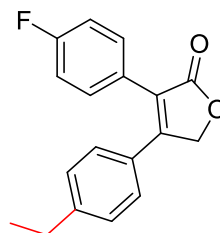
Obr. 45 Vliv dvojnásobné halogenace na výslednou aktivitu látky **98a**

b) Homologací alkylového řetězce se mírně snižuje aktivita vůči chronické myeloidní leukémii (K562), toxicita vůči nemaligním buněčným liniím (RPE-1) zůstává nezměněna. Zároveň je možné pozorovat zajímavý cytotoxický účinek proti jaterním nádorovým buňkám HEPG2 ($\text{IC}_{50} = 3,99 \mu\text{M}$) a proti buňkám plicních fibroblastů U-937 ($\text{IC}_{50} = 2,61 \mu\text{M}$) (**Obr. 46**).



89j

IC₅₀ K562 = 4 μM
IC₅₀ RPE-1 > 40 μM

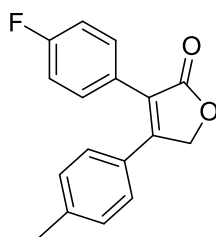


98b

IC₅₀ K562 = 7,49 μM
IC₅₀ RPE-1 > 40 μM

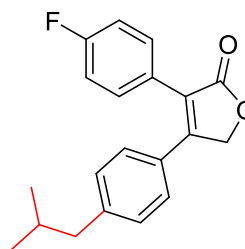
Obr. 46 Vliv homologace na cytotoxicitu látky 98b

c) Rozvětvením spodního alkylového řetězce klesá a v případě leukemických buňek (K562) i mizí účinek. Některé nádorové linie jsou stále zasaženy v koncentraci < 10 μM (zejména buňky kolorektálního karcinomu (HCT116) (IC₅₀ = 5,71 μM), prsního adenokarcinomu (MCF7) (IC₅₀ = 6,22 μM) a buňky karcinomu slinivky (MiaPaCa-2) (IC₅₀ = 4,81 μM) (**Obr. 47**).



89j

IC₅₀ K562 = 4 μM
IC₅₀ RPE-1 > 40 μM

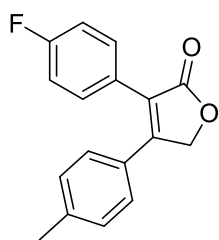


98c

IC₅₀ K562 > 40 μM
IC₅₀ RPE-1 > 40 μM

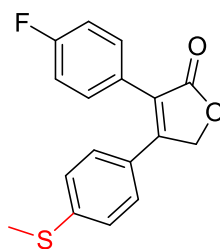
Obr. 47 Vliv rozvětvení na výslednou aktivitu látky 98c

d) Náhrada methylové skupiny za methylsulfanylovou výrazně nemění účinek (**Obr. 48**).



89j

IC₅₀ K562 = 4 μM
IC₅₀ RPE-1 > 40 μM

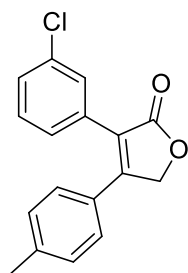


98d

IC₅₀ K562 = 6,03 μM
IC₅₀ RPE-1 > 40,00 μM

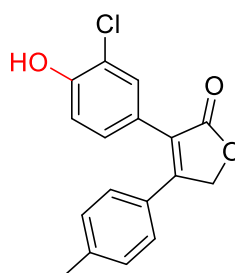
Obr. 48 Vliv izosterní záměny na aktivitu látky 98d

e) Zavedením fenolické skupiny na fenylové jádro A vymizí účinek vůči celému spektru použitých linií (**Obr. 49**).



89e

IC₅₀ K562 = 0,3 μM
IC₅₀ RPE-1 = 0,5 μM



103

IC₅₀ K562 > 40 μM
IC₅₀ RPE-1 > 40 μM

Obr. 49 Vliv adice fenolického hydroxyly na výslednou aktivitu látky 103

Pro cytotoxický účinek se zdá být esenciální substituce fenylového jádra na C3 furanonového kruhu halogeny, ze kterých se fluor ukazuje jako nevýhodnější. Fenylové jádro v C4 furanonovém kruhu je nezbytné substituovat elektrondonorovou skupinou, jako nejslibnější se jeví substituce alkylovým řetězcem v poloze 4. Na druhou stranu, zavedení fenolické skupiny vede k vymizení cytotoxických účinků. Lze tak uzavřít, že pro zachování účinku je nezbytný relativně lipofilní charakter.

3.8 Syntéza a biologické hodnocení γ -substituovaných 3,4-diarylfuranonů

3.8.1 Reakce s paraformaldehydem

Ze struktur dosud připravených furanonů, popsaných v předchozích kapitolách, je zřejmý výrazný hydrofobní charakter. Pozice γ v molekule 3,4-diarylfuranonů je přitom lehce enolizovatelná, a díky tomu je možné zavést řadu funkčních skupin za účelem: a) **zvýšení rozpustnosti ve vodě**, b) **zjištění vlivu substituce v této pozici na biologickou aktivitu**. V této části jsme se proto zaměřili na derivatizaci γ -pozice neaktivnějších sloučenin. Jako první reakce byla provedena již dříve popsaná aldolizace mezi formaldehydem a enolickou formou 3,4-diarylfuranonu [44]. V této studii pozoroval Harmon enolizaci rofecoxibu při pH 11. Jako elektrofil byl do reakční směsi zaveden formaldehyd za vzniku monohydroxymethylovaného a bishydroxymethylovaného 3,4-diarylfuranonu. Vzhledem k jednoduššímu a bezpečnějšímu provedení reakce jsme v naší práci zaměnili formaldehyd za paraformaldehyd.

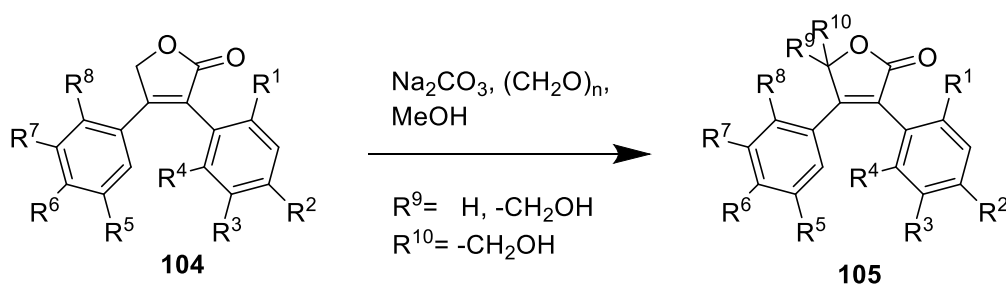


Schéma 14 Obecný postup přípravy γ substituovaných 3,4-diarylfuranonů

Výsledky získané za těchto podmínek jsou shrnuty v **Tabulce 14**.

Tabulka 14. γ -substituované furanony 105a – 105g

Sloučenina	Substituce							Výtěžek
	R2	R3	R4	R6	R7	R9	R10	
105a	Br	H	H	CH ₃	H	CH ₂ OH	H	50
105b	Br	H	H	CH ₃	H	CH ₂ OH	CH ₂ OH	47
105c	Br	H	H	CH ₃	H	CH ₂ OAc	CH ₂ OAc	59*
105d	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ OH	H	48
105e	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ OH	CH ₂ OH	43
105f	Cl	Cl	H	Br	H	CH ₂ OH	CH ₂ OH	44
105g	Cl	Cl	H	OCH ₃	H	CH ₂ OH	CH ₂ OH	40

*..produkt vzniklý acylací 105b

Z výsledků je zřejmé, že ve všech případech byla získána směs mono- a bishydroxymethylovaného produktu, které byly snadno separovatelné pomocí sloupcové chromatografie. I přesto, že reakce byla neselektivní, obě získané látky jsou potenciálně zajímavé pro biologické hodnocení. Původně byl pro abstrakci vodíku v C5 furanonovém jádře látky **89a** použit LDA jako báze, ale za těchto podmínek byl z reakce získán pouze bishydroxymethylovaný produkt v nízkém výtěžku (15 %). Látka **105b** byla dále podrobena acetylaci (**Schéma 15**).

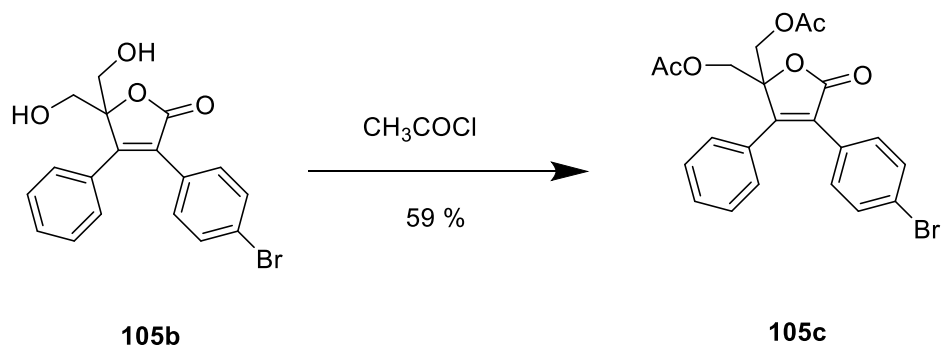


Schéma 15 Acetylace látky **105b**

Poslední snadnou obměnou bishydroxymethylovaných laktonů bylo uzavření šestičlenného spirocyklického kruhu. Reakce laktonu s 2,2-dimethoxypropanem, katalyzovaná kyselinou *p*-toluensulfonovou poskytla spirocyklický lakton **106** ve výtěžku 60 % (**Schéma 16**).

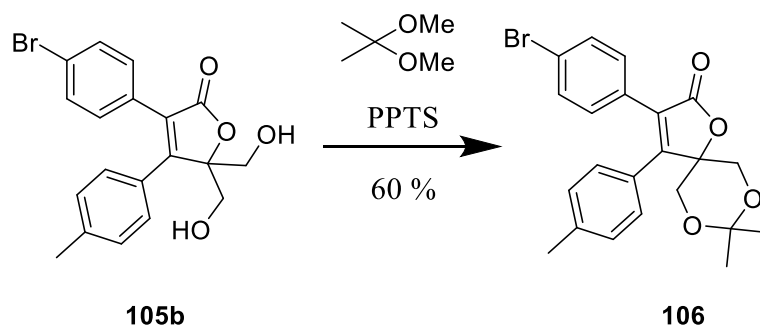


Schéma 16 Příprava spirocyklického laktonu **106**

U všech látek bylo provedeno vyhodnocení cytotoxicity a schopnosti aktivace kaspáz 3/7, jejich hodnoty sumarizuje **Tabulka 15**.

Tabulka 15. Cytotoxické a apoptotické profilování sloučenin 105a – g a látky 106

Látka	Cytotoxicita [IC ₅₀ , μM]							Kaspázová 3/7 aktivita [IC ₅₀ , μM]				
	RPE-1	BJ	K562	HL-60	PC-3	MCF7	Hep G2	RPE-1	K562	HL-60	PC-3	Hep G2
105a	>40	>40	31,45	21,32	>40	>40	>40	>40	46,68	294	>40	>40
105b	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
105c	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
105d	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
105e	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
105f	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
105g	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
106	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
kamp	>40	>40	0,090	0,018	0,396	0,340	0,430	ND	ND	ND	ND	ND

Použité buněčné linie: RPE-1: lidské imortalizované epiteliální buňky z retiny; BJ: lidské primární fibroblasty; Hep G2: lidský hepatocelulární karcinom; MCF7: lidský adenokarcinom prsu. K562: lidská chronická myeloidní leukémie; HL-60: lidská akutní myeloidní leukémie; PC-3: lidský adenokarcinom prostaty. Kamp= (S)-(+)-kamptothecin. ND- nestanoveno.

Slabá cytotoxicita, která pravděpodobně souvisí s aktivací kaspáz 3/7, byla nalezena u látky **105a**, ve které je pouze jeden hydroxymethylový fragment. Ostatní sloučeniny se ukázaly jako neaktivní vůči všem testovaným liniím (IC₅₀ > 40 μM). Z těchto výsledků je tedy zřejmé, že zavedení hydroxymethylových skupin do molekul cytotoxicky aktivních 3,4-diarylfuranonů potlačí cytotoxický efekt do testované koncentrace 40 μmol.

Dále bylo v této sérii látek provedeno stanovení antimikrobiální aktivity (**Tabulka 16**).

Tabulka 16. Antimikrobiální aktivity látek 105a - g vyjádřeny jako MIC

Bakter. kmen a inkub. čas		Sloučenina [MIC ₉₅ , μM]						
		105a	105b	105c	105d	105e	105f	105g
SA	24h	15.62	0.98	>125	125	>500	15.62	7.81
	48h	15.62	3.9	>125	125	>500	31.25	15.62
MRSA	24h	62.5	250	>125	125	500	>500	62.5
	48h	62.5	500	>125	125	500	>500	125
SE	24h	62.5	62.5	>125	62,5	250	62.5	250
	48h	62.5	500	>125	62,5	250	250	250
EF	24h	500	500	>125	>125	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>125	>125	>500	>500	>500

SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, MRSA: *Staphylococcus aureus* HK5996/08, SE: *Staphylococcus epidermidis* HK6966/08, EF: *Enterococcus* sp. HK14365/08, EC: *Escherichia coli* ATCC 8739, KP: *Klebsiella pneumoniae* HK11750/08, KP-E: *Klebsiella pneumoniae* HK14368/08; and PA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Jak je patrné z údajů v Tab. 16, některé z našich γ -substituovaných laktonů (**105a**, **105b**, **105f**, **105g**) byly schopny inhibovat růst kmenu *Staphylococcus aureus* v koncentracích MIC₉₅ 0,98–31,25 μM. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla nalezena u sloučeniny **105b** proti referenčnímu kmenu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 po 24 h inkubace. Tato sloučenina se vyznačovala přítomností dvou hydroxymethylových skupin na C5 furanonového kruhu. Oproti parentnímu derivátu **89b** bez substituce v poloze γ ztratil furanon **105b** zavedením dvou hydroxymethylových skupin svou cytotoxicitu. Další deriváty **105a** a **105g** byly rovněž aktivní, ale ve vyšších koncentracích než **105b**. Závěrem lze shrnout, že naprostá většina původně cytotoxických derivátů ztratila zavedením hydroxymethylových skupin svou cytotoxicitu (vůči maligním i nemaligním buněčným liniím), ale v některých případech se objevila zajímavá antimikrobiální aktivita.

3.8.2 Pokus o přípravu substituovaných 3,4-diarylfuranonů Mannichovou reakcí

Vzhledem k tomu, že reakce 3,4-diarylfuranonů s paraformaldehydem poskytovala monohydroxymethylované a bishydroxymethylované produkty, předpokládali jsme úspěch i při nukleofilnímu útoku laktonu na Schiffovy báze. Nejprve byla testována reakce s $\text{EtNH}_2/(\text{CH}_2\text{O})_n$ v methanolu. Přebytek ethylaminu měl zajistit deprotonizaci γ -uhlíku laktonu a následnou Mannichovu reakci (**Schéma 17**).

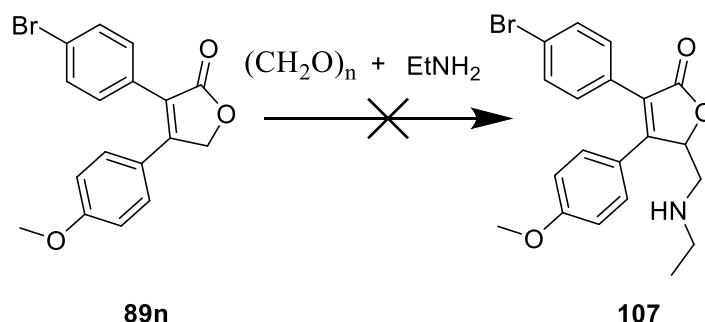


Schéma 17 Pokus o přípravu furanonu s ethylaminomethylovou skupinou

K výše zmíněné reakci nedošlo, z reakční směsi byla izolována pouze výchozí látka. Reakce byla dále testována i v bezvodém acetonitrilu, tetrahydrofuranu, dichlormethanu. Ve všech případech byla ze směsi izolována výchozí látka. Ani zvýšená teplota až k bodu varu rozpouštědel nevedla k požadovanému výsledku.

Dále jsme reakci testovali i s použitím sekundárního aminu a isobutanalu (**Schéma 18**), kde jsme očekávali vznik substituovaného furanonu 109. Z této reakce jsme opět izolovali pouze výchozí látku.

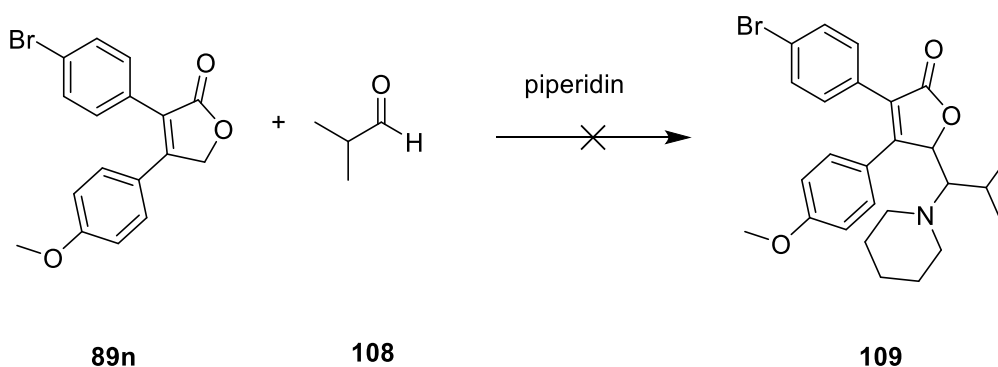


Schéma 18 Neúspěšný pokus o Mannichovu reakci

Jediný úspěch, který byl při pokusu o provedení Mannichovy reakce zaznamenán, byl při použití aromatického aldehydu **110** a anilinu **111** s náhodně zvolenou substitucí. Pomocí Dean-Starkovy aparatury byla připravena Schiffova báze **112** ve vysokém výtěžku (**Schéma 19**) [45].

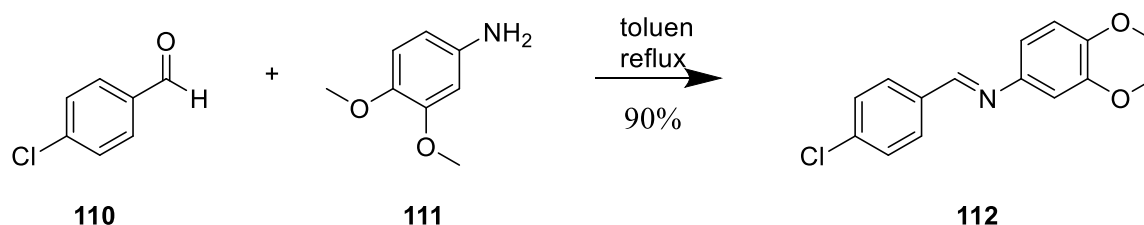


Schéma 19 Příprava aromatické Schiffovy báze **112**

Při reakci mezi 3,4-diarylfuranonem **89a** a iminem **112** pak došlo k vytvoření produktu Mannichovy reakce **113** (**Schéma 20**).

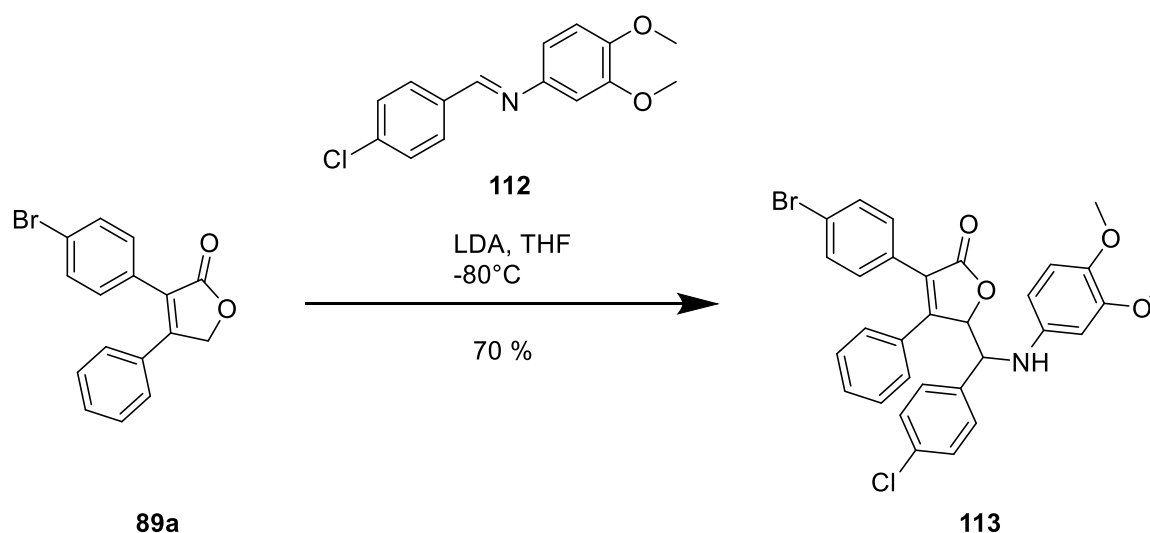


Schéma 20 Mannichova reakce

Polysubstituovaný furanon **113** při testování cytotoxicity nevykázal zajímavé hodnoty IC_{50} vůči všem maligním i nemaligním liniím ($IC > 40 \mu\text{M}$). Možným vysvětlením neúspěchu předchozích reakcí je rychlá transformace Schiffovy báze na enamín (**Schéma 21**). Přechod iminu **112** na enamín je vyloučen vzhledem k arylové substituci.

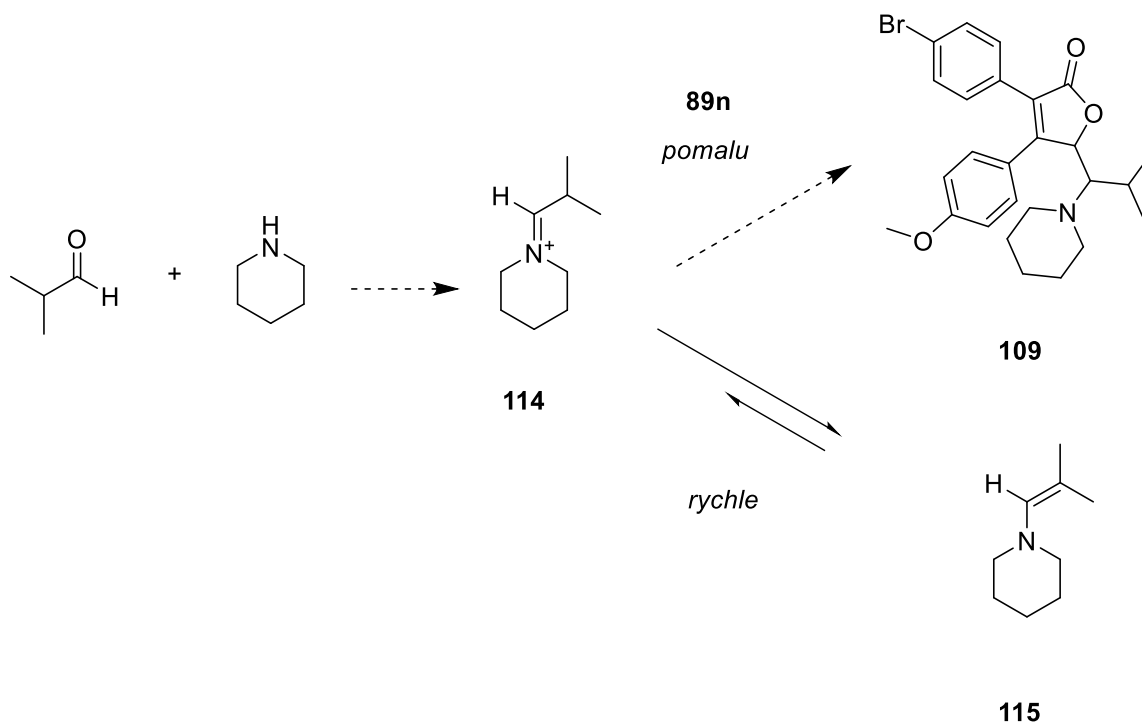


Schéma 21 Předpokládaný mechanismus transformace Schiffovy báze 114

Vzhledem k neúspěšným pokusům o provedení Mannichovy reakce s alifatickým aldehydem a aminem jsme se rozhodli prověřit možnost alternativní cesty k isosterní aminomethylové substituci na C5 furanonu. Nejprve jsme připravili monohydroxymethylovaný produkt **105a**, který měl podléhat v dalším kroku oxidaci na aldehyd **116**, a následně tento aldehyd podrobit sekvenci kondenzace/redukce za vzniku laktonu s terciární aminoskupinou **117**.

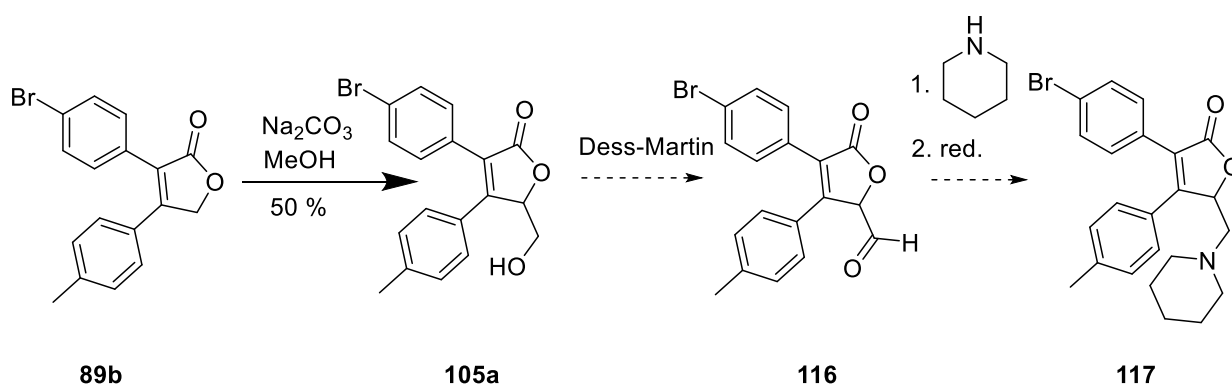


Schéma 22 Pokus o alternativní přípravu produktu Mannichovy reakce

Při pokusu o oxidaci primární alkoholické skupiny furanonu **105a** byla izolována pouze neidentifikovatelná směs sloučenin a další reakce nebyly provedeny.

3.8.3 Pokus o syntézu laktonů s jinými polárními skupinami na γ -uhlíku

Jako další alternativu substituce v γ poloze 5 jsme se pokusili zavést karboxymethylovou skupinu (**Schéma 23**). Plán syntézy vycházel z laktonu **89a**, který byl podroben působení LDA v suchém THF. Do této směsi byl následně přikapán methyl-bromacetát. Předpokládali jsme, že nejprve dojde k nukleofilní substituci, po které by následovala hydrolyza esteru za vzniku kyseliny **120**. Bohužel, k nukleofilní substituci nedošlo a příprava této látky byla ukončena.

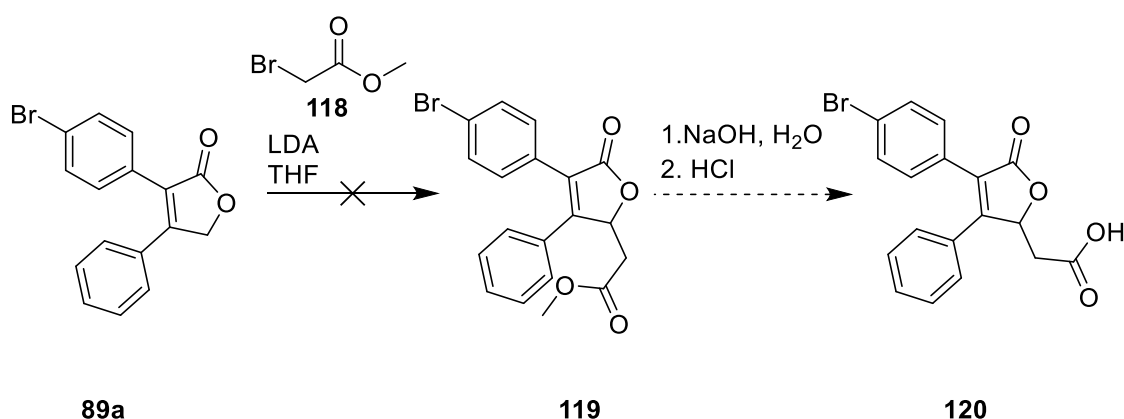


Schéma 23 Příprava furanonu s polární funkční skupinou

Vzhledem k neúspěchům při zavádění jiné skupiny než hydroxymethylu do γ -polohy laktonového kruhu, jsme se rozhodli přepólovat molekulu pomocí halogenace na C5. Vzniklý brómderivát **121** měl reagovat s nitromethanem za vzniku γ -substituovaného laktonu **122**, následně měla být provedena redukce na aminomethylovou skupinu (**Schéma 24**). Bromace probíhala za vzniku neidentifikovatelné směsi látek, takže další experimenty v tomto směru rovněž nebyly provedeny.

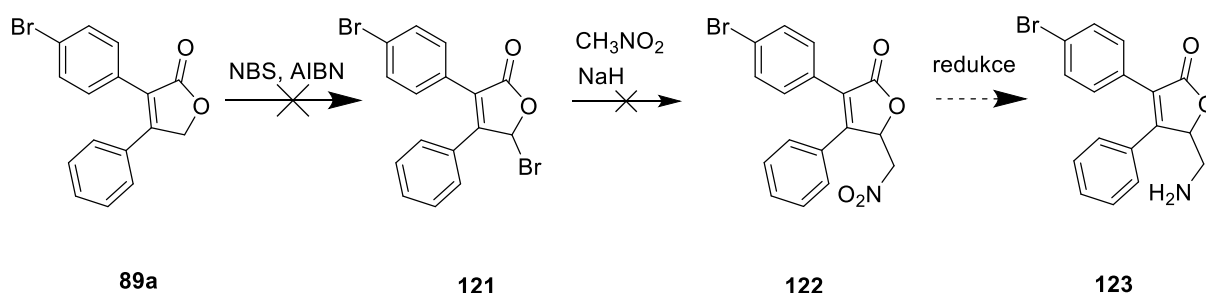


Schéma 24 Změna polarity na γ -uhlíku látky **89a**

3.8.4 Pokus o redukci nitroskupiny na aromatickém jádře

V diplomové práci Brůži [46] bylo zjištěno, že acyklické prekurzory 3,4-diarylfuranonů s nitroskupinou na aromatickém jádře nepodléhají cyklizaci. Rozhodli jsme se tedy nejprve podrobit nitroskupinu redukci na primární aromatickou aminoskupinu pomocí několika činidel (**Schéma 25**). Ve všech případech (1. chlorid cínatý ve 100% ethanolu, 2. práškový zinek ve směsi dioxan : H₂O (9 : 1), 3. železo a chlorid vápenatý ve směsi EtOH : H₂O (20 : 1), 4. vodík v přítomnosti palladia na uhlí v ethyl-acetátu, 5. práškový zinek v kyselině octové) byly izolovány složité směsi, které nebyly dále analyzovány.

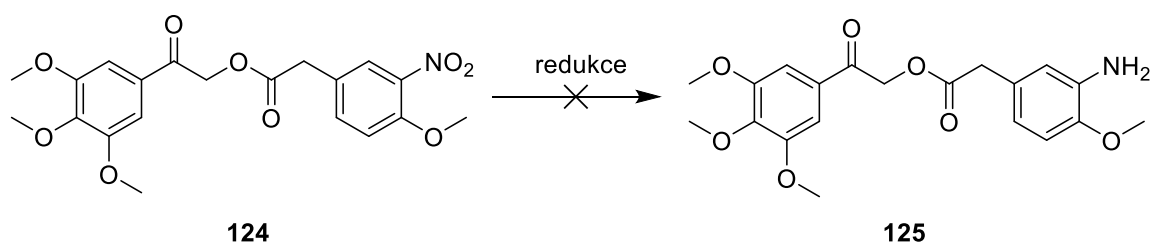


Schéma 25 Redukce aromatické nitroskupiny

3.8.5 Příprava 3,4-diarylfuranů

V práci Piralioho z roku 2009 [37] byla připravena cytotoxická furanová analoga kombretastatinů. Rozhodli jsme se tedy vyzkoušet, zda při konverzi furanonového kruhu na furanový zůstane zachována cytotoxická aktivita, popř. antimikrobiální aktivita. Redukce probíhala v prostředí bezvodého toluenu za pomalého přikapávání roztoku redukčního činidla DIBAL-H (**Schéma 26**). Výtěžky redukce se pohybovaly nad 30 %, pouze u derivátu **127c** s 4-methylsulfanylovou skupinou na jádře B byl výtěžek redukce pouze 25 % (**Tabulka 17**). U všech látek byla dále izolována nezreagovaná výchozí látka, která již nepodléhala redukci, ani při prodloužení reakčního času.

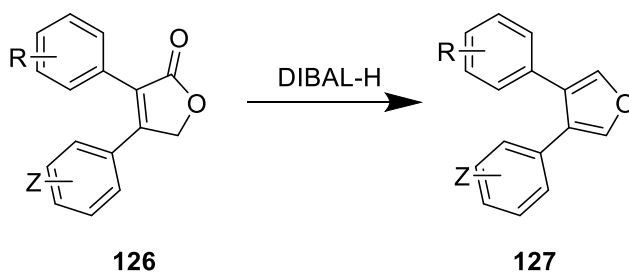


Schéma 26 Redukce furanonu na furan

Tabulka 17. Výtěžky redukce na furanonů na furan

Sloučenina	Substituce		Výtěžek
	R	Z	
127a	4-Br	H	50
127b	4-F	4-Et	30
127c	4-F	4-SCH ₃	25

U látek bylo dále provedeno testování cytotoxicity na rozšířeném panelu buněčných linií. Výsledky sumarizuje **Tabulka 18**.

Tabulka 18. Cytotoxické a apoptotické profilování sloučenin 127a-c

Látka	Cytotoxicita [ED ₅₀ , μM]											
	BJ	RPE-1	HCT1 16	HEPG 2	HL-60	HT-29	K562	MCF-7	MiaPaC a-2	Pc3	CAPA N-2	U- 937
127a	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
127b	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
127c	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
Imat	26,79	21,94	32,88	25,91	12,52	21,35	0,75	11,7	16	18,86	16,38	9,07
Doxo	0,34	1,93	0,98	0,68	0,09	1,81	0,82	4,35	2,08	1,43	4,1	0,16

Použité buněčné linie: RPE-1: lidské imortalizované epiteliální buňky z retiny; BJ: lidské primární fibroblasty; Hep G2: lidský hepatocelulární karcinom; MCF7: lidský adenokarcinom prsu. K562: lidská chronická myeloidní lekéemie; HL-60: lidská akutní myeloidní leukémie; PC-3: lidský adenokarcinom prostaty; Capan-2: lidský adenokarcinom slinivky; HT-29: lidský kolorektální karcinom; MiaPaCa-2: Lidský duktální adenokarcinom slinivky; U-937 lidský plicní lymfoblast; HCT-116 lidský kolorektální karcinom. Imat. = imatinib mesylát, Doxo = Doxorubicin hydrochlorid. ND- nestanoveno.

U všech látek došlo konverzí na furanový kruh ke ztrátě cytotoxicity a z tohoto důvodu jsme se rozhodli od této modifikace upustit. U výsledných 3,4-diarylfuranů nebyla rovněž zaznamenána výrazná antibakteriální ani antifungální aktivita (**Tabulky 19, 20**).

Tabulka 19. Antimikrobiální aktivity látek 127a-c

Slouč.	Bakteriální kmen [MIC, µM]													
	SA		MRSA		SE		EF		EC		KP		PA	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
127a	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
127b	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
127c	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	>1000	>1000	>1000	>1000	>500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, MRSA: *Staphylococcus aureus* HK5996/08, SE: *Staphylococcus epidermidis* HK6966/08, EF: *Enterococcus* sp. HK14365/08, EC: *Escherichia coli* ATCC 8739, KP: *Klebsiella pneumoniae* HK11750/08, KP-E: *Klebsiella pneumoniae* HK14368/08; and PA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Tabulka 20. Antifungální aktivita látek 127a-c

Kmen, ink. doba		Sloučenina [MIC, µM]			Kmen, ink. doba		Sloučenina [MIC, µM]		
		127a	127b	127c			127a	127b	127c
CA1	24h	>500	>125	>500	CG	24h	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>125
CA2	24h	>500	>125	>500	CL	24h	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>125
CP	24h	>500	>125	>500	TA	24h	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>125
CK1	24h	>500	>125	>500	AF	24h	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>125
CK2	24h	>500	>125	>500	AC	24h	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>125
CT	24h	>500	>125	>500	TA	24h	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>500		48h	>125	>125	>125

CA1: *Candida albicans* ATCC44859, CA2: *Candida albicans* ATCC90028, CP: *Candida parapsilosis* ATCC22019, CK1: *Candida krusei* ATCC 6258, CK2: *Candida krusei* E28, CT: *Candida tropicalis* 156, CG: *Candida glabrata* 20/I, CL: *Candida lusitanae* 2446/I, TA: *Trichosporon beigelii* 1188m, AF: *Aspergillus*

fumigatus 231, AC: *Absidia corymbifera* 272, TA: *Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách)

3.8.6 Pokus o přípravu laktamových analog

Jak bylo řečeno výše, většina námi připravených látek se vyznačuje relativně vysokou lipofilitou. Poslední modifikací tak byl pokus o konverzi laktonů na odpovídající laktamy, které jsou polárnější. Přítomnost dusíku v laktamovém kruhu oproti laktonovému navíc nabízí další možnost vazby na případné biologické struktury pomocí vodíkových můstků (**Schéma 27**). Vodítkem pro volbu podmínek byla práce Guana z roku 2016 [47], ve které byly 3,4-diarylderiváty anhydridu kyseliny maleinové převedeny na 3,4-diarylderiváty imidu kyseliny maleinové za pomoci hydroxidu amonného v prostředí ethanolu.

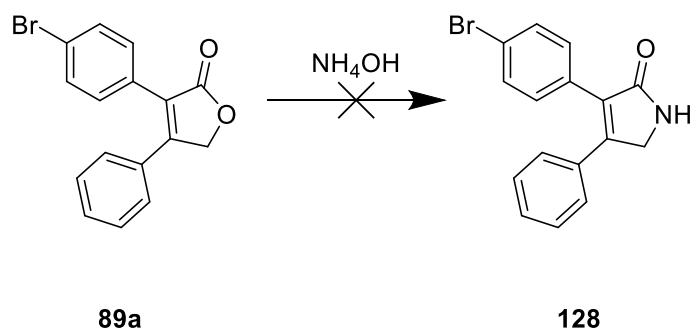
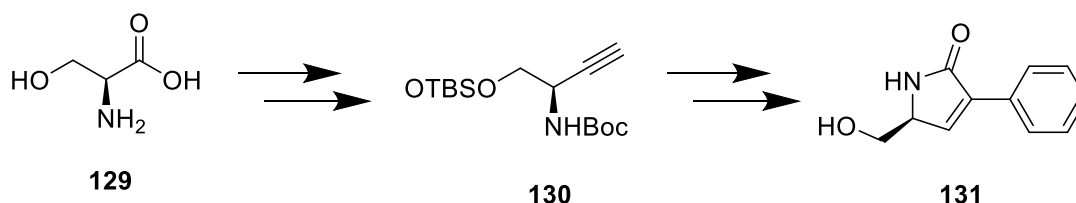


Schéma 27 Pokus o konverzi na laktam 128

V případě našich látek k reakci nedocházelo, a byla izolována pouze výchozí látka, zřejmě z důvodu vyšší stability laktonu oproti anhydridu. Při reakci v toluenu, provedené v autoklávu, docházelo pravděpodobně k rozkladu molekuly a izolována byla pouze směs neidentifikovatelných produktů.

3.9 Příprava chirálně čistého [1-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)but-3-yn-2-yl]karbamátu

Poslední úzce příbuznou skupinou látek byly 5-hydroxymethylpyrrol-2-ony (**131**, **Schéma 28**). Tyto látky připravil Krenk z opticky čistého *L*-serinalu [40]. Při podrobnější analýze optické čistoty látek bylo zjištěno, že v průběhu níže uvedené reakční sekvence došlo k částečné racemizaci.



opticky čistý

poměr stereoizomerů 7:3

Schéma 28 Příprava 5-hydroxymethylpyrrol-2-onů

Naším úkolem bylo zjistit, ve kterém kroku k racemizaci dochází a pokusit se o optimalizaci tohoto kroku (**Schéma 29**).

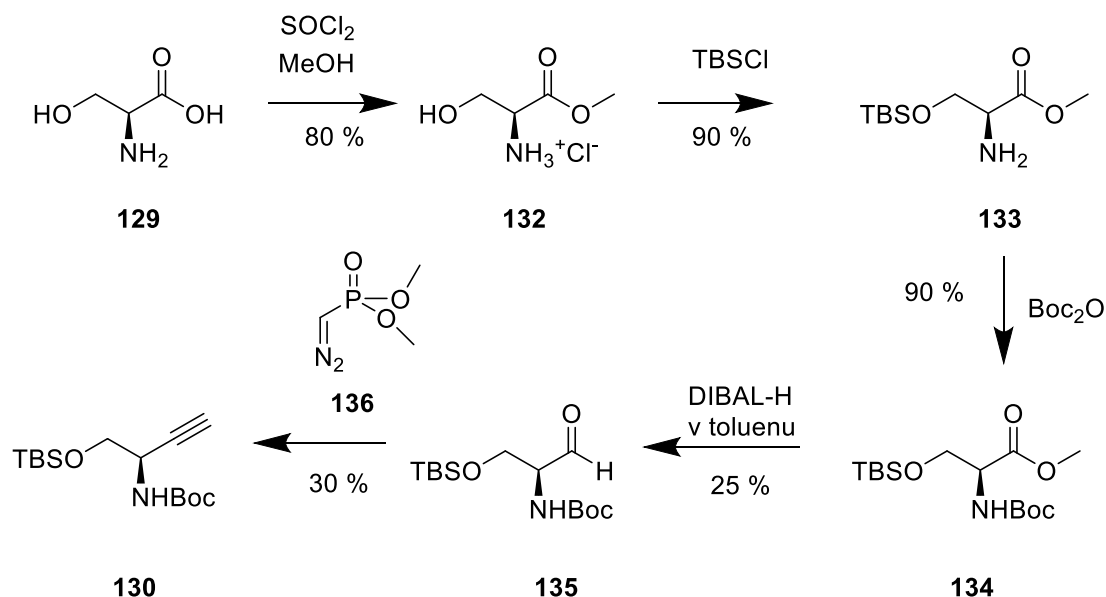


Schéma 29 Příprava chirálního alkynu z aminokyseliny

Předpokládali jsme, že nežádoucí racemizace probíhala nejpravděpodobněji během Seyferth-Gilbertovy (SG) homologace aldehydu **135**. Látky, vzniklé v předchozích krocích, které předcházely této homologaci, jsme měli v úmyslu derivatizovat jako Mosherovy estery, s cílem ověřit možnou racemizaci v jednotlivých krocích. První krok (převod serinu na methylester **132** probíhá dle literatury bez racemizace, nebylo tedy nutné provádět kontrolu

[40, 48]. V dalším kroku byla volná alkoholická skupina ochráněna pomocí TBSCl s TEA jako bází za vzniku silyletheru **133** [40, 49], jehož volná aminoskupina byla následně převedena na karbamát **134**. V případě těchto reakcí bylo již nutné provést kontrolu racemizace. Silylová skupina karbamátu **134** proto byla nejprve odchráněna pomocí TBAF v THF za nízké teploty (**Schéma 30**).

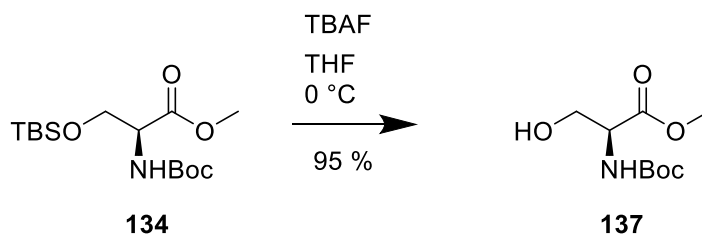


Schéma 30 Odchránění silyletheru

Takto odchráněný alkohol byl dále převeden pomocí (*S*)-chloridu Mosherovy kyseliny na diester **138**. Z ^1H NMR spekter látky **138** bylo zřejmé, že obsahuje jediný stereoizomer (**Obr. 50**). Signály vodíků, náležící methoxylové skupině vykazovaly v ^1H NMR spektru hodnotu chemického posunu 3,25 ppm.

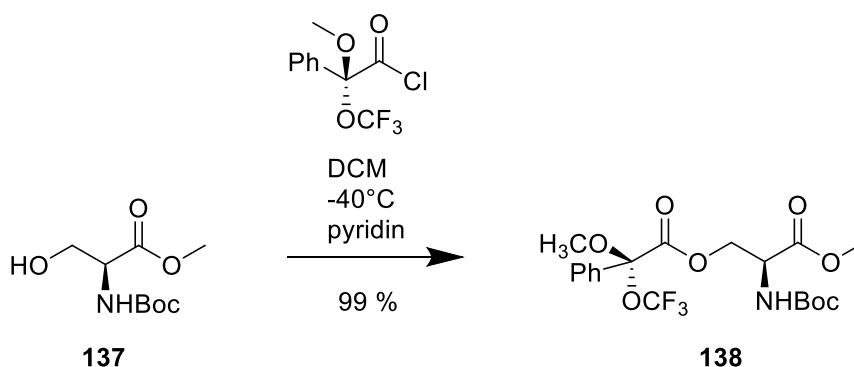
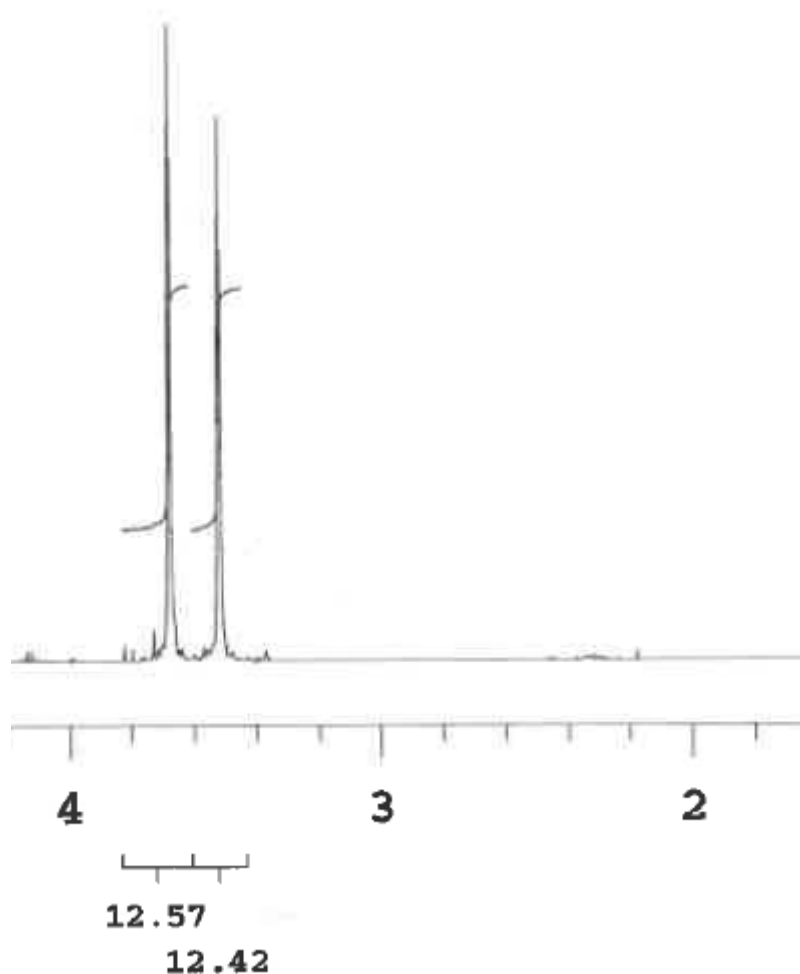


Schéma 31 Převedení na Mosherův ester



Obr. 50 ^1H NMR analýza látky **138**

Poměr obou diastereomerů byl 99 : 1, racemizaci v tomto kroku tak bylo možné považovat za zanedbatelnou. Pro účely Seyferth-Gilbertovy homologace bylo nutné připravit z esteru **134** aldehyd **135** pomocí DIBAL-H v toluenu [40]. Tato reakce probíhala s velmi nízkým výtěžkem (25 %). Při použití jiných rozpouštědel (THF, DCM popř. směsi s toluenem) reakce neprobíhala a izolovali jsme pouze výchozí látku. Předpokládali jsme, že právě tento aldehyd bude vysoce náchylný k racemizaci, vzhledem k relativně vysoké kyselosti vodíků na α -uhlíku ($\text{pK}_a = 16$) [50]. Pro účely derivatizace bylo opět nutné ochránit primární alkoholickou skupinu. Při použití TBAF v THF poskytovala reakce neidentifikovatelnou směs produktů, za použití mírnějších podmínek (AcOH, THF, H_2O) opět došlo k rozkladu. Při důkladném průzkumu literatury jsme objevili studii o selektivním ochránění TBS skupiny v přítomnosti Boc skupiny za pomoci $\text{NaHSO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ [51], avšak izolovali jsme pouze výchozí látku (**Schéma 32**).

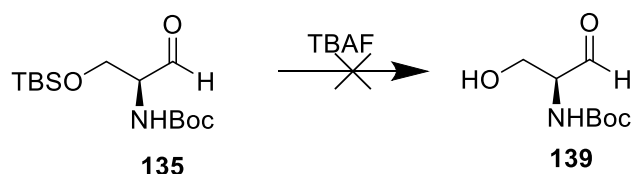


Schéma 32 Pokus o odchránění silylové skupiny aldehydu **135**

S ohledem na velmi pravděpodobnou nestabilitu aldehydu **135** a vysokou pravděpodobnost racemizace jsme se rozhodli provést Seyferth-Gilbertovu reakci na aldehydu **135**, neboť jsme předpokládali, že po zániku aldehydické skupiny se rovněž potlačí možnost racemizace. Po konverzi na alkyne byla silylová skupina bez problémů odstraněna (**Schéma 33**) a alkohol **140** derivatizován pomocí (*S*)-chloridu Mosherovy kyseliny. ¹H NMR analýza esteru **141** se dvěma centry chiralit ukázala, že se jedná o směs dvou diastereomerů v poměru 70 : 30 (viz **Obr. 51**).

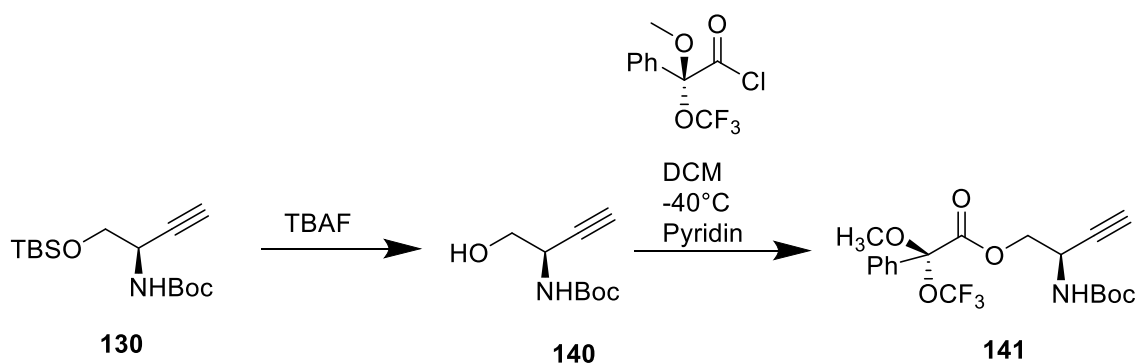
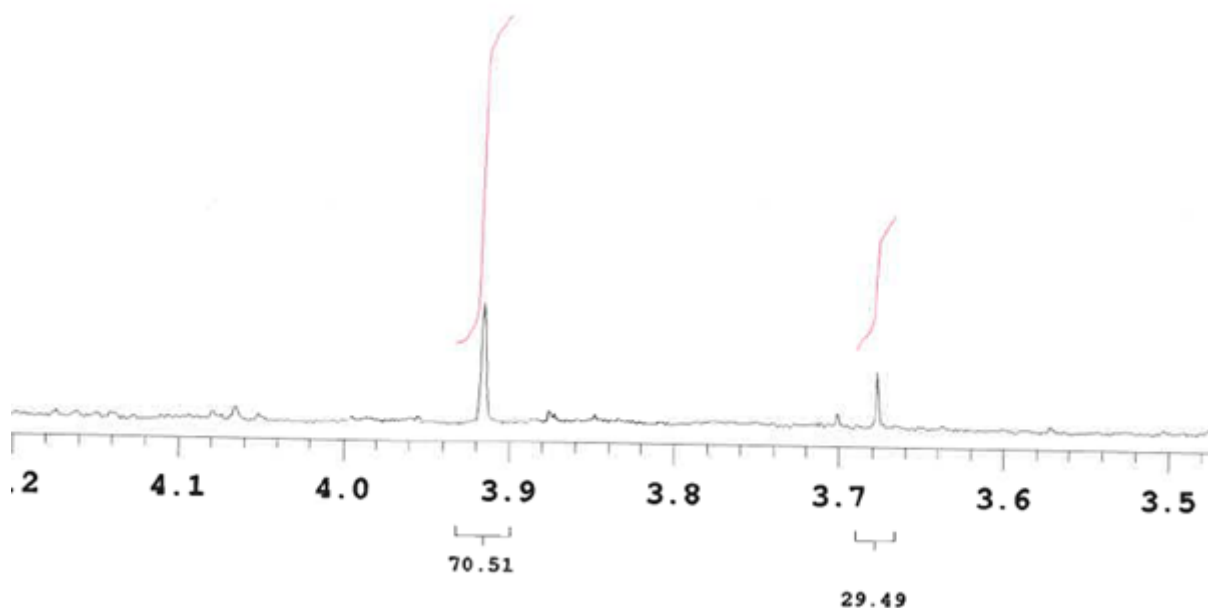


Schéma 33 Odchránění silyletheru **135** a převedení na jeho Mosherův ester



Obr. 51 ^1H NMR analýza Mosherova esteru **141** (signály skupin CH_3O -)

Jak jsme předpokládali, Seyferth-Gilbertova homologace je klíčovým krokem k udržení optické čistoty substrátu. Za použití obvyklého dimethyl-(1-diazo-2-oxopropyl)fosfonátu (reagent Ohiry-Bestmanna) [52] docházelo k racemizaci. Důvodem byl pravděpodobně syntetický protokol, při kterém je reagent postupně aktivován deacetylací působením K_2CO_3 v methanolu. Aldehyd je pak po relativně dlouhou dobu vystaven působení báze, která katalyzuje enolizaci a tedy i racemizaci (**Schéma 34**).

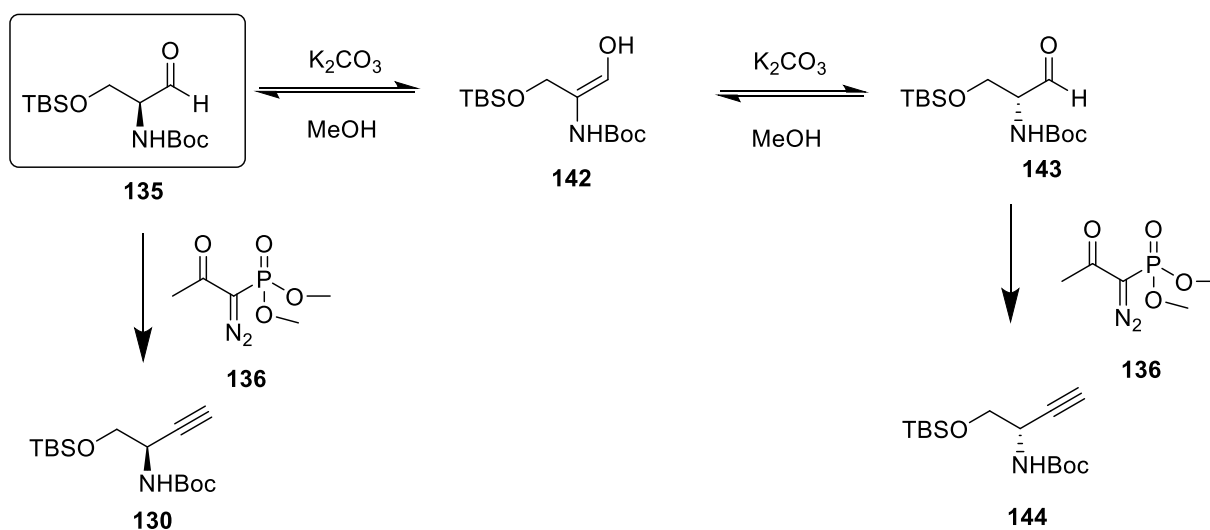


Schéma 34 Pravděpodobný mechanismus racemizace

Dalším úkolem bylo optimalizovat podmínky tak, aby aktivace reagentu bází proběhla v nepřítomnosti substrátu (aldehydu) a tím došlo k potlačení racemizace.

Z tohoto důvodu jsme připravili diazofosfonát **136** a pokusili jsme se o jeho aktivaci v samostatné operaci [52]. Úprava spočívala v hydrolýze diazofosfonátu **136** na jednodušší diazofosfonát **145** působením fosforečnanu sodného v methanolu (**Schéma 35**). Přepokládali jsme, že u takto upraveného reagentu bude možná aktivace v bezvodém prostředí, následovaná rychlou adicí na aldehyd.

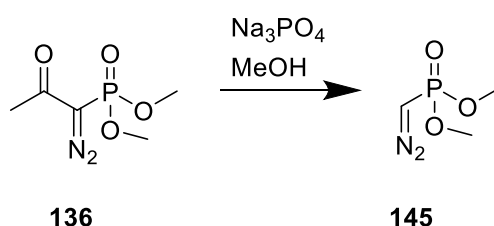


Schéma 35 Hydrolýza diazofosfonátu

Takto deacetylovaný diazofosfonát působením silné báze vytvořil karbanion, který následně reaguje s aldehydem (**Schéma 36**).

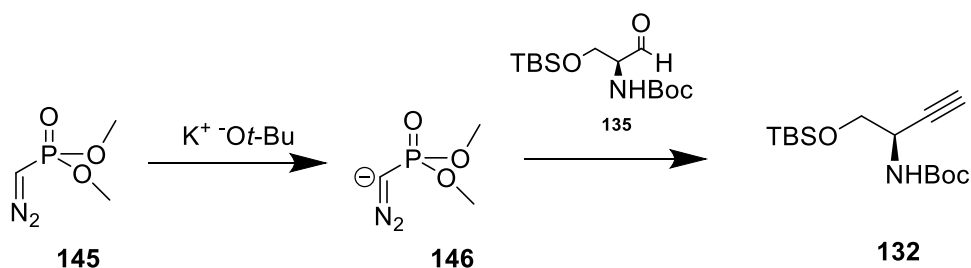
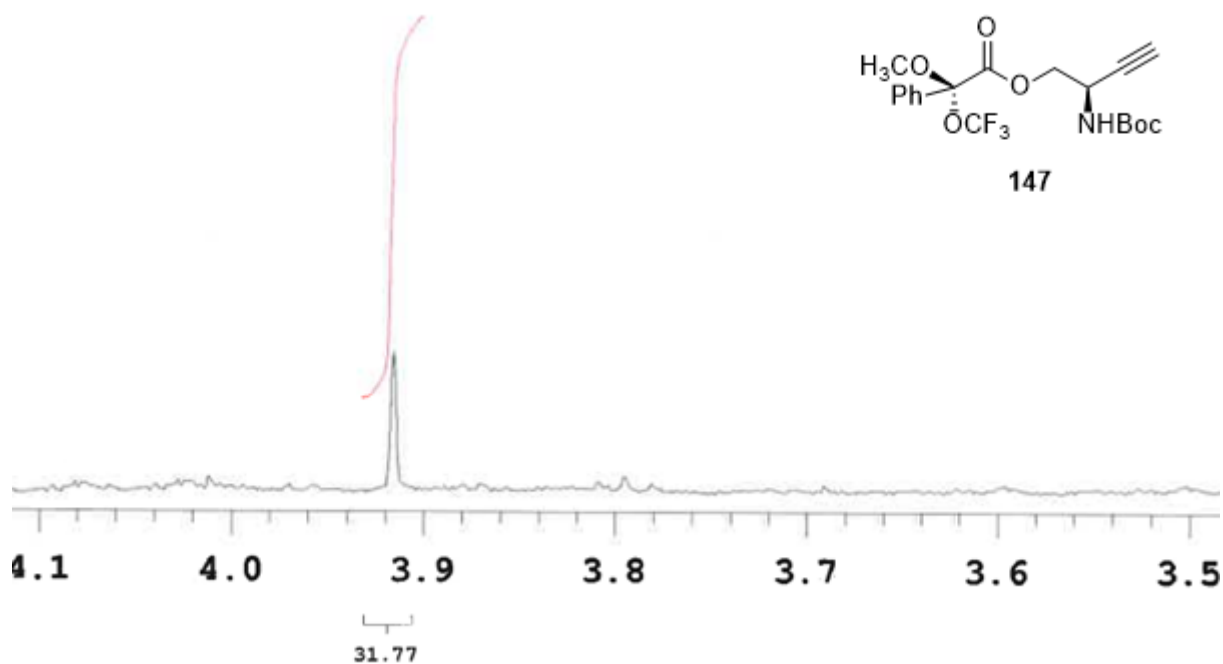


Schéma 36 Vytvoření aktivní formy diazofosfonátu a Seyferth-Gilbertova homologace

Po provedení Seyferth-Gilbertovy homologace byla silylová skupina bez problémů odstraněna a alkohol derivatizován pomocí (*S*)-chloridu Mosherovy kyseliny (viz **Schéma 36**). ¹H-NMR analýza takto získaného esteru **147** (**Obr. 52**) ukázala, že se jedná o selektivní reakci ve prospěch jednoho enantiomeru (**Obr. 52**).



Obr. 52 ^1H NMR analýza směsi Mosherova esteru **147** za použití aktivovaného diazofosfonátu (signály skupin $\text{CH}_3\text{O}-$)

Přestože byla při reakci téměř úplně potlačena racemizace, její výtěžek byl nízký (30 %), ze zbytku byla ze směsi izolována výchozí látka **140**. Nízké výtěžky jsou pravděpodobně způsobeny nízkou teplotou při provádění reakce.

3.10 Příprava *N*-Boc alkinů z methylesterů opticky čistých aminokyselin

Vzhledem k tomu, že se nám podařilo optimalizovat postup Seyferth-Gilbertovy homologace, rozhodli jsme se reakci vyzkoušet i na jiných aminokyselinách. Některé opticky čisté *N*-Boc alkylnylaminy jsou v literatuře popsány [53]. Tyto látky mohou být s výhodou využívány např. jako součásti nepeptidových skeletů, které nesou předem definované konformace, obsahují podobné aminokyselinové zbytky jako proteiny a mohou sloužit jako peptidomimetika [54-56]. Rozhodli jsme se provést analogickou reakci s dalšími methylestery aminokyselin. Vzhledem k tomu, že jsme nepředpokládali racemizaci při konverzi opticky čistých aminokyselin na jejich odpovídající methylestery, byly jako výchozí látky použity komerčně dostupné methylestery **148a-d**. U každého methylesteru příslušné aminokyseliny jsme provedli nejprve redukci na příslušný aldehyd **149a-d**, který byl bez čištění podroben Seyferth-Gilbertově homologaci použitím dvou syntetických postupů (**A**, **B**, Schéma 37).

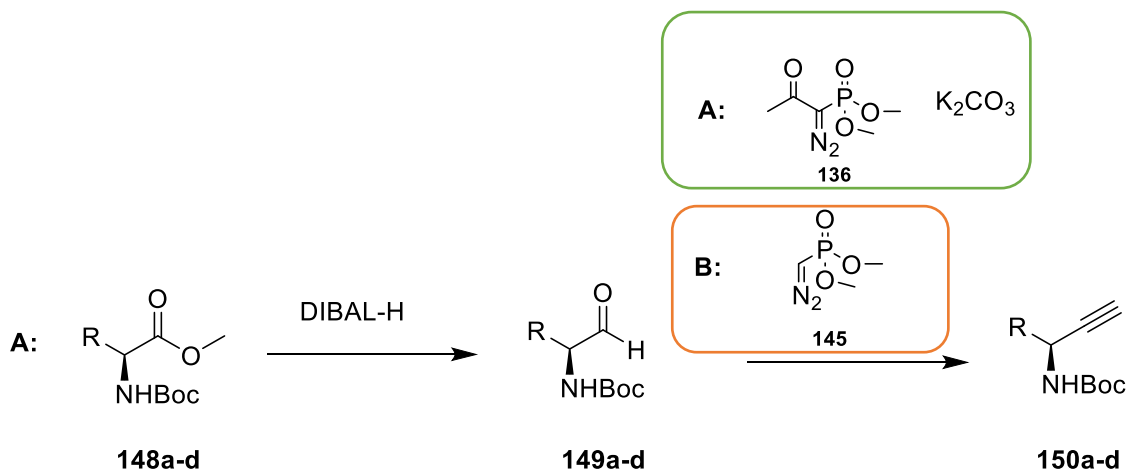


Schéma 37 Příprava *N*-Boc alkynů Seyferth-Gilbertovou homologací

Tabulka 21. Výtěžky reakcí

Výchozí látka	Substituce R	Výtěžek redukce	Výtěžek SG homologace	
			A	B
148a	CH ₃	50	50	45
148b	CH ₂ Ph	55	56	55
148c	iPr	50	50	50
148d	iBu	40	55	50

A: dimethyl ester kyseliny (1-diazo-2-oxo-propyl)-fosforečné, Na₂CO₃, MeOH;

B: dimethyl (diazomethyl) ester kyseliny fosforečné, terc-butanolát draselný, THF

N-Boc alkynaminy vycházející z aminokyselin *L*-alaninu (ala), *L*-fenylalaninu (phe), *L*-valinu (val) a *L*-leucinu (leu) byly dále převedeny na odpovídající Mosherovy estery pomocí (*S*)-chloridu Mosherovy kyseliny (**Schéma 38**) a byl zjištěn stupeň racemizace (viz **Tabulka 22**).

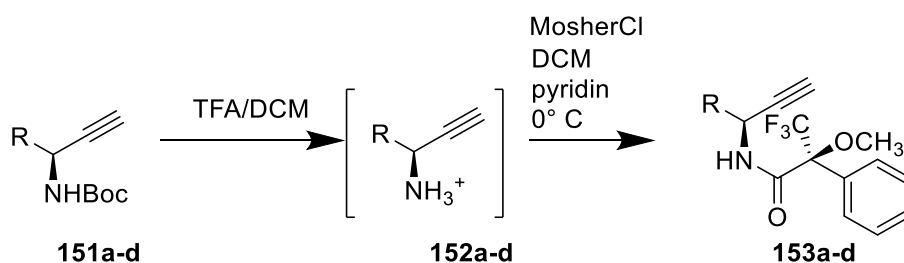


Schéma 38 Převedení *Boc*-alkynů na Mosherovy estery

Tabulka 22. Výsledky racemizačních studií

Výchozí látka	Substituce R	Metoda SG homologace	
		A	B
148a	CH ₃	70:30	93:7
148b	CH ₂ Ph	95:5	90:10
148c	iPr	50:50	90:10
148d	iBu	92:8	94:6

A: dimethyl ester kyseliny (1-diazo-2-oxo-propyl)-fosforečné, Na₂CO₃, MeOH;

B: dimethyl (diazomethyl) ester kyseliny fosforečné, terc-butanolát draselný, THF

Z výsledků je patrný vyšší stupeň racemizace při použití neaktivovaného reagentu **150** v důsledku aktivace bází in situ. Je pozoruhodné, že některé literární zdroje uvádí tento syntetický postup bez racemizace (zejm. u přípravy *N*-Boc alkynu z *L*-valinu) [57]. V případě použití předem vytvořeného karbaniontu **152** lze racemizaci potlačit pod 10 % (**Tabulka 22**).

3.11 Příprava *O*-desmethylangolensinu (ODMA)

O-desmethylangolensin (**79**, **Schéma 39**) je *trans*-stilbenový derivát, jedná se o metabolický produkt daidzeinu, fytoestrogenu nacházejícího se v rostlině *Glycine max* [58]. Je běžně produkován po pozření sójových isoflavonů po střevní metabolizaci. Sójové isoflavony jsou známé svou schopností inhibovat transmembránové přenašeče, zodpovědné za transport léčiv. Jeden z hlavních přenašečů (OATP2B1 transporter) je inhibován velkým množstvím přírodních látek [58]. V této části byl zjišťován efekt inhibice enzymu OATP2B1 sójovými izoflavony. V rámci spolupráce byl připraven komerčně nedostupný *O*-desmethylangolensin Friedel–Craftsovou reakcí mezi substituovaným fenolem **154** a fenylctovou kyselinou **155** v přítomnosti bromidu boritého diethyletherátu jako katalyzátoru a rozpouštědla zároveň [59–61]. Výtěžek Friedel–Craftsovy reakce byl 70 %, dále byly ve směsi identifikovány nezreagované výchozí látky, které dále již netvořily produkt ani po přidání katalyzátoru. Jiný produkt reakce nebyl zaznamenán.

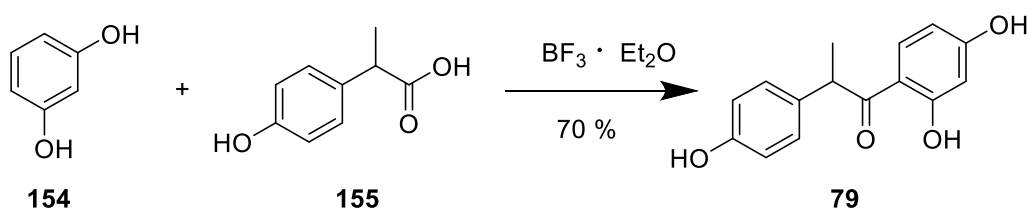
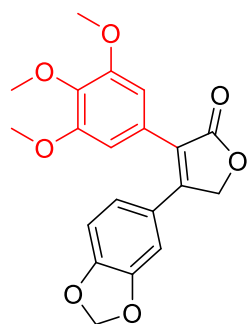


Schéma 39 Příprava *O*-desmethylangolensinu

Hodnoty biologického testování byly vyjádřené jako 50% inhibice absorpce substrátu do buňky (IC_{50}) a inhibiční konstanta (K_i). Výsledky biologického hodnocení ODMA vykázaly nízkou schopnost inhibice transmembránového proteinu OATP2B1 ($K_i > 20 \mu M$) oproti ostatním isoflavonovým derivátům [62].

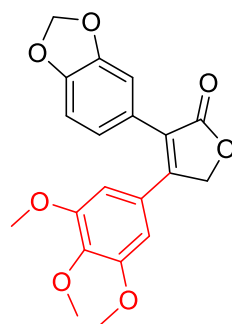
4 ZÁVĚR

1. Z výsledků cytotoxického profilování 1. série (strukturní typ A) oxygenovaných 3,4-diarylfuranonů vyplývá, že přesunutím 3,4,5-trimethoxyfenylového kruhu do β -pozice laktonového kruhu kompletně vymizí cytotoxická aktivita (vůči maligním i nemaligním buněčným liniím) (**Obr. 52**).



73 ref. [38]

MCF-7 IC_{50} = 80 nM



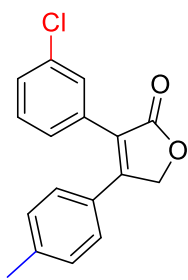
82f

MCF-7 IC_{50} > 40 μ M

RPE-1 IC_{50} > 40 μ M

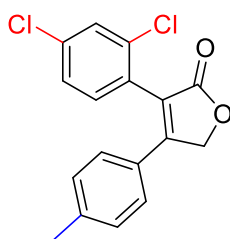
Obr. 52 Vliv přesunutí 3,4,5-trimethoxyfenylového kruhu

2. Substitucí fenylových kruhů pomocí halogenové substituce (strukturní typ B), na rozdíl od vysoce oxygenovaného systému (který je možné nalézt u kombretastatinových analogů), bylo u některých derivátů dosaženo vysokých cytotoxických aktivit (IC_{50} < 1 μ M) vůči širokému spektru nádorových linií. Většina těchto derivátů vykazuje vysoké toxicity i vůči nemaligní buněčné kontrole (IC_{50} < 1 μ M). U těchto sloučenin byla také nalezena antibakteriální aktivita (< 10 μ M) vůči Staphylococcovým kmenům.



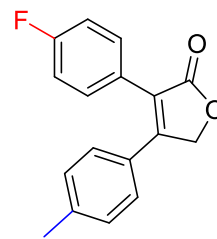
89f

IC_{50} K562 = 0,21 μ M
 IC_{50} RPE-1 = 0,88 μ M



89g

IC_{50} K562 = 0,19 μ M
 IC_{50} RPE-1 = 0,91 μ M

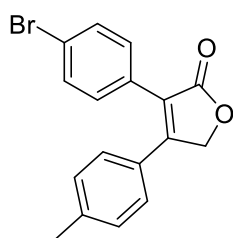


89j

IC_{50} K562 = 4 μ M
 IC_{50} RPE-1 > 40 μ M

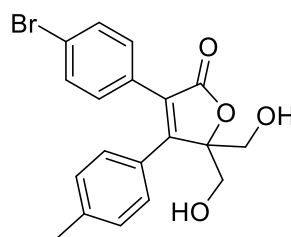
Obr. 52 Vybrané 3,4-diarylfuranony a jejich profil cytotoxicity

3. Funkcionalizací cytotoxicky aktivních sloučenin (hydroxymethylace, bishydroxymethylace) byla dramaticky snížena cytotoxická aktivita (vůči maligním i nemaligním buněčným liniím). Ztrátu cytotoxické aktivity ovšem doprovázel výrazný antibakteriální efekt. MIC₉₅ hodnota nejaktivnější sloučenina 3-(4-bromfenyl)-5,5-bis(hydroxymethyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on vykazovala zajímavé aktivity (**0,98** μM) po 24 hodinové inkubaci vůči bakteriální linii *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



89b

K562 IC₅₀ = 0.3 μM
RPE-1 IC₅₀ = 0.9 μM



89a

K562 IC₅₀ > 40 μM
RPE-1 IC₅₀ > 40 μM
Staphylococcus aureus MIC₉₅ = 0,98 μM

Obr. 53 Vliv dvojnásobné hydroxymethylace na výslednou aktivitu látky 89b

4. Byly optimalizovány podmínky pro přípravu opticky čistého [1-(terc-butyldimethylsilyloxy)but-3-yn-2-yl]karbamátu, pomocí úpravy reakčních podmínek. Tento protokol byl dále testován na dalších aminokyselinách (ALA, PHE, VAL, LEU) a byla připravena knihovna propargyl aminů s minimálním stupněm racemizace (< 10 %)

5. Byly optimalizovány podmínky přípravy *O*-desmethylangolensinu a provedeno jeho biologické hodnocení, které ukázalo minimální schopnost inhibice transportních transmembránových proteinů.

5 EXPERIMENTÁLNÍ SEKCE

5.1 Použité experimentální postupy při přípravě a hodnocení látek

Všechny reagenty byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. THF a DCM byly před použitím predestilovány. THF z benzofenon ketylu, DCM byl destilován z CaH_2 v čas potřeby. DMF, MeOH a EtOH byly vysušeny opakovaným stáním nad čerstvě aktivovanými molekulovými síty typu 3A.

Měření IČ spekter všech látek bylo provedeno na přístroji NICOLET 6700 FT-IR. Hmotnostní spektra látek byla měřena na hmotnostním spektrometru Agilent Tech 500 Iontrap spectrometer. Elementární analýza byla provedena na přístroji CHNS-OCE FISIONS EA 1110. NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, $\text{DMSO}-d_6$, $\text{THF}-d_8$ nebo CD_3OD při laboratorní teplotě na přístroji Varian Mercury VxBB 300 nebo VNMR S500. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v parts per million (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. 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, td: triplet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet), interakční konstanty (Hz). Všechna přiřazení byla provedena na základě DPGNOE, gHSQC a gHMBC experimentů. V případě směsí diastereomerů jsou oba popsány jako A a B.

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 nebo s pomocí detekčního činidla $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 g), $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ (4g), konc. H_2SO_4 (10 ml), H_2O (200 ml); KMnO_4 (2 g), KOH (0.176 g), K_2CO_3 (13.3 g), H_2O (204 ml) a následného zahřátí. Silikagel 60 (0.040–0.063 mm) pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen od firmy E. Merck.

5.2 Použité experimentální postupy při biologickém hodnocení

5.2.1 Hodnocení antifungální aktivity

U připravených látek byla hodnocena *in vitro* antifungální aktivita vůči humánně patogenním houbám mikrodiluční bujónovou metodou¹¹⁴. Testovací soubor kmenů zahrnoval zástupce běžných původců infekčních onemocnění a byl tvořen čtyřmi kmeny kvasinek z American Type Culture Collection (*Candida albicans* ATCC 44859, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258) a osmi klinickými izoláty kvasinek (*Candida krusei* E28, *Candida tropicalis* 156, *Candida glabrata* 20/I, *Candida lusitaniae* 2446/I,

Trichosporon beigeli 1188) a vláknitých hub (*Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, *Trichophyton mentagrophytes* 445) získaných z depozitu Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické Fakulty UK v Hradci Králové. 3 z uvedených ATCC kmenů (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258) sloužily také jako kontrola kvality. Všechny kultury byly před testováním kultivovány na Sabouraudově dextrózovém agaru. DMSO (100 %) byl použit pro rozpouštění všech testovaných látek; jeho výsledná koncentrace nepřekročila 2 %. Jako testovací medium sloužilo RPMI 1640 (Sevapharma, Praha) medium obohacené L-glutaminem pufrované pomocí 0.165 M morfolinpropansulfonové kyseliny (Serva) a 10 N NaOH na pH 7,0. Jamky mikrodilučních testovacích destiček obsahovaly 100 μ l RPMI 1640 media s klesající koncentrací testovaných látek (od 500 do 0,48 μ mol.l⁻¹) a 100 μ l suspenze inokula. Výsledná koncentrace inokula v RPMI 1640 mediu byla $5 \times 10^3 \pm 0,2$ cfu . ml⁻¹. Destičky byly inkubovány při 35 °C a MIC byly vizuálně odečteny po 24 a 48 hodinách. Hodnoty MIC pro *T. mentagrophytes* byly odečteny po 72 a 120 hodinách. Minimální inhibiční koncentrace byly definovány jako 80 % inhibice růstu kontroly a byly stanoveny dvakrát a duplicitně. Odchytky od tabelovaných hodnot MIC nebyly vyšší než jedno ředění použité při testování.

5.2.2 Hodnocení antibakteriální aktivity

U vybraných látek byla hodnocena in vitro antibakteriální aktivita vůči humánně patogenním bakteriím mikrodiluční bujónovou metodou 115. Testovací soubor kmenů zahrnoval zástupce běžných původců infekčních onemocnění a byl tvořen třemi kmeny mikroorganismů z American Type Culture Collection (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) a pěti klinickými izoláty (*Staphylococcus aureus* MRSA HK5996/08, *Staphylococcus epidermidis* HK6966/08, *Enterococcus* sp. HK14365/08, *Klebsiella pneumoniae* HK11750/08, *Klebsiella pneumoniae* ESBL HK14368/08) získaných z depozitu Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické Fakulty UK v Hradci Králové. Uvedené ATCC kmeny sloužily také jako kontrola kvality. Všechny kultury byly před testováním kultivovány na Mueller-Hintonově dextrózovém agaru. DMSO (100 %) byl použit pro rozpouštění všech testovaných látek; jeho výsledná koncentrace nepřekročila 2 %. Jako testovací medium sloužil Mueller-Hintonův bujón (MH, HiMedia, Čadersky-Envitek, Czech Republic) pufrovaný na pH 7,4 ($\pm 0,2$). Jamky mikrodilučních testovacích destiček obsahovaly 200 μ l Mueller-Hintonova media s klesající koncentrací testovaných látek (od 500 do 0,48 μ mol/l) a 10 μ l suspenze inokula. Výsledná koncentrace inokula ve sterilní vodě dosáhla hodnoty 0.5 McFarlandovy stupnice (1.5×10^8 cfu. ml⁻¹). Destičky byly inkubovány při 36 °C a MIC byly vizuálně odečteny po 24 a 48 hodinách. Minimální inhibiční koncentrace byly definovány jako 80 % inhibice růstu kontroly a byly stanoveny dvakrát a duplicitně. Odchytky od tabelovaných hodnot MIC nebyly vyšší než jedno ředění použité při testování.

5.2.3 Hodnocení cytostatické aktivity

Profilování buněčné toxicity bylo provedeno na panelu následujících lidských linií: RPE-1: lidské normální imortalizované epiteliální buňky z retiny; BJ: lidské primární fibroblasty; Hep G2: lidský hepatocelulární karcinom; MCF7: lidský adenokarcinom prsu. K562: lidská chronická myeloidní leukémie; HL-60: lidská akutní myeloidní leukémie; PC-3: lidský adenokarcinom prostaty; Capan-2: lidský adenokarcinom slinivky; HT-29: lidský kolorektální karcinom; MiaPaCa-2: Lidský ductální adenokarcinom slinivky; U-937 lidský plicní lymfoblast; HCT-116 lidský kolorektální karcinom. Buněčné kultury byly zakoupeny z American Type Culture Collection (ATCC). Buňky byly rozmnoženy v monovrstvách v médiu obsahující 10 % fetální bovinní sérum, 2 mM glutamax, 1 mM neesenciální aminokyseliny (NEAA) a penicilin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Inkubace probíhala v 5 % CO₂ atmosféře při 37 °C. DMEM bylo použito jako médium pro RPE-1, Hep G2 a BJ buňky, F-12K pro PC3 a IMDM pro K562 a HL-60. BJ buňky byly množeny v médiu nasyceném 10 ng/ml bFGF. Pro účely sledování buněčné viability a apoptózy byly buňky množeny v buněčném médiu až do potřebného počtu pro provedení experimentu. Poté byly buňky spočítány a zředěny v médiu do finální koncentrace 0,1x10⁶/ml a dávkovány kapalným dávkovačem Multidrop (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), do buněčných kultur. Dva dny po výměně média byly bunky sklizeny, spočítány a resuspendovány v médiu stejného složení v koncentraci 0,5x10⁶/ml. Buněčná suspenze byla dávkově přenesena do 1536-jamkových bílých destiček s úpravou pro kultivaci adherentních buněk (Corning Inc., NY, USA). Do každé jamky byly vneseno 5 µl buněčné suspenze odpovídající 2500 buněk. Testované sloučeniny byly naředěny v DMSO a přeneseny do jamek k buňkám pomocí bezkontaktního akustického dávkovače sloučenin Echo 520 (Labcyte). Testování bylo provedeno v 12 koncentračních bodech v rozsahu od 10 µM do 1 nM, v triplicátech. Buněčná viabilita byla hodnocena po 48 hod inkubace se sloučeninami a byla determinovaná množstvím intracelulárního ATP za použití ATPlite™ (Perkin Elmer, USA) luciferázové aktivity. Luciferázová aktivita byla stanovena komerčním kitem Britelite plus luciferase reporter gene assay reagent (Perkin Elmer, USA), 24 h po přidání sloučenin k buňkám. Intenzita luminescence byla změřena na multimode spektrofotometru Envision (PerkinElmer). Indukce apoptózy byla měřena po 24 hod inkubace se sloučeninami pomocí měření aktivity kaspázy-3 a -7. Pro tyto účely posloužila Caspase-Glo® 3/7 luminescenční assay (Promega, USA). V obou případech byl luciferázový signál měřen pomocí systému Envision (Perkin Elmer, USA). Data byla nahrána a zpracována v LIMS databázovém systému vyvíjeném na pracovišti CZ-OPENSREEN: National Infrastructure for Chemical Biology v Praze.

5.3 Syntéza

5.3.1 Obecný postup přípravy 1. série oxygenovaných laktonů (strukturní typ A) 82a-c, 82e-f, 82i; 2. série halogenovaných laktonů (strukturní typ B) 89a-q a 98a-d

Substituovaný α -brommethyl aryl keton (1,0 mmol) a příslušná fenylctová kyselina (1,0 mmol) byly rozpuštěny v suchém THF (15 ml) a triethylaminu (1,0 mmol) pod atmosférou argonu. Reakce byla míchána po dobu 24 hodin při pokojové teplotě. Poté byl přidán 60 % olejová suspenze hydridu sodného (1,0 mmol) a výsledná směs byla míchána po dobu 1 hodiny. Nakonec byla do reakční směsi přikapána koncentrovaná kyselina chlorovodíková (do $\text{pH} \cong 1$) a míchána 15 minut. Dále byla přidána voda (15 ml) a směs byl extrahována ethylacetátem (3 \times 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 7:3).

4-(3,4-methylendioxyfenyl)-3-(4-methoxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (82a)

Výtěžek 65 %, žlutá olejovitá látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.45–7.32 (m, 2H), 6.95–6.90 (m, 2H), 6.89–6.86 (m, 1H), 6.81–6.76 (m, 2H), 5.99 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 3.83 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.9, 159.9, 154.2, 149.5, 148.1, 130.6, 124.9, 124.5, 122.4, 122.0, 114.3, 108.8, 107.6, 101.6, 70.5, 55.3. **IR** (ATR) ν_{max} 1057, 1172, 1294, 1307, 1335, 1353, 1379, 1445, 1466, 1489, 1514, 1571, 1605, 1634, 1727, 1747, 2926 cm^{-1} . **LRMS** (APCI⁺): m/z (relativní intenzita) 311.0 [M+H]⁺, 292.9 (14). **HRMS** (TOF-ESI⁺) m/z vypoč. pro $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_5^+$ 310.0814; nalezeno 310.0816. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_5$: C, 69.67; H, 4.55; nalezeno: C, 69.72; H, 4.59.

4-(3,4-dimethoxyfenyl)-3-(4-methoxyfenyl)- 2,5-dihydrofuran-2-on (82b)

Výtěžek 63 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.46 – 7.38 (m, 2H), 7.00 – 6.91 (m, 3H), 6.89 – 6.82 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.59 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.9, 159.8, 154.6, 151.0, 148.9, 130.8, 124.1, 123.5, 122.8, 120.4, 114.1, 111.0, 110.5, 70.3, 55.9, 55.6, 55.3. **IR** (ATR) ν_{max} 1015, 1151, 1179, 1249, 1263, 1329, 1449, 1464, 1507, 1653, 1792, 1844, 1868, 2838, 2935, 3618, 3629 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI⁺) m/z vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5^+$ 327,1227; nalezeno 327,1234. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$: C, 69.93; H, 5.56; nalezeno: C, 69.94; H, 5.59.

4-(2,3,4-trimethoxyfenyl)-3-(2,4,6-trimethoxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (82c)

Výtěžek 60 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.78 – 7.49 (m, 1H), 6.80 – 6.59 (m, 1H), 6.15 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 6H), 3.81 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 192.16, 172.07, 160.41, 159.03, 158.06, 154.31, 141.53, 126.00, 122.54, 107.33, 103.86, 90.56, 69.31, 61.25, 60.77, 56.11, 55.81, 55.29, 28.11. **IR** (ATR) ν_{max} 1013, 1043, 1055, 1078, 1104, 1156, 1190, 1205, 1238, 1257, 1289, 1366, 1412, 1438, 1493, 1587, 1676, 1732, 2841, 2945 cm^{-1} . **LRMS** (APCI⁺): m/z (relativní intenzita) 417.2 [M+H]⁺. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_8$: C, 63.45; H, 5.81; nalezeno: C, 63.46; H, 5.80.

3-(3,4-methylenedioxyfenyl)-4-(3,4-dimethoxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (82e)

Výtěžek 69 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.99 – 6.91 (m, 3H), 6.90 – 6.83 (m, 3H), 5.98 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.64 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.7, 155.0, 151.1, 148.9, 147.8, 147.8, 124.1, 124.0, 123.4, 123.2, 120.5, 111.0, 110.5, 109.7, 108.6, 101.2, 70.2, 55.9, 55.6. **IR** (ATR) ν_{max} 1018, 1071, 1124, 1163, 1250, 1272, 1335, 1441, 1548, 1640, 1728, 1754, 1778, 1820, 1900, 1950, 2031, 2855, 2927, 3019 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI⁺) m/z vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_6$ 341,1020; nalezeno 341,1024. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_6$: C, 67.06; H, 4.74; nalezeno: C, 67,44; H, 5.75.

3-(3,4-methylenedioxyfenyl)-4-(3,4,5-trimethoxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (82f)

Výtěžek 60 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.03 – 6.69 (m, 3H), 6.56 (s, 2H), 5.95 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.68 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.4, 155.1, 153.4, 147.9, 147.8, 140.1, 125.8, 125.1, 123.8, 123.5, 109.7, 108.6, 104.9, 101.2, 70.4, 60.9, 56.1. **LRMS** (APCI⁺): m/z (relativní intenzita) 371 [M+H]⁺, 372 (20). **IR** (ATR) ν_{max} 1078, 1175, 1199, 1236, 1344, 1368, 1416, 1457, 1494, 1508, 1581, 1635, 1744, 2929 cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_7$: C, 64.86; H, 4.90; nalezeno: C, 64.90; H, 4.98.

3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)-4-(3,4,5-trimethoxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (82g)

Výtěžek 62 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.54–7.49 (m, 2H), 7.47–7.41 (m, 1H), 7.41–7.36 (m, 2H), 7.35–7.30 (m, 4H), 5.17 (s, 2H), 4.00 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.0, 156.7, 131.9, 130.9, 130.8, 130.5, 129.1, 129.0, 127.4, 125.0, 123.1, 70.6, 50.8. **IR** (ATR) ν_{max} 1086, 1099, 1158, 1230, 1338, 1368, 1395, 1452, 1485, 1497, 1575, 1589, 1652, 1746, 3075 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI⁺) m/z vypoč. pro $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$ 402.1300; nalezeno 402.0030. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$: C, 62.68; H, 5.51; nalezeno: C, 62.69; H, 5.50.

3,4-bis(3,4,5-trimethoxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (82i)

Výtěžek 60 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.03 – 6.70 (m, 4H), 5.13 (s, 2H), 3.86 (s, 6H), 3.85 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 3.69 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 174.4, 156.1, 154.4, 148.9, 147.8, 140.1, 125.8, 125.1, 123.8, 123.5, 104.9, 101.2, 73.4, 61.8, 60.8, 59.6, 56.1. **HRMS (TOF-ESI+)** m/z vypoč. pro $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_8^+$ 416,1500; nalezeno 416.1550. **IR (ATR)** ν_{max} 1079, 1176, 1198, 1336, 1344, 1369, 1417, 1459, 1509, 1581, 1669, 1745 cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_8$: C, 64.86; H, 4.90; nalezeno: C, 64.90; H, 4.98.

3-(4-bromfenyl)-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-on (89a)

Výtěžek 62 % bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.54–7.49 (m, 2H), 7.47–7.41 (m, 1H), 7.41–7.36 (m, 2H), 7.35–7.30 (m, 4H), 5.17 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.0, 156.7, 131.9, 130.9, 130.8, 130.5, 129.1, 129.0, 127.4, 125.0, 123.1, 70.6. **IR (ATR)** ν_{max} 1086, 1099, 1158, 1230, 1338, 1368, 1395, 1452, 1485, 1497, 1575, 1589, 1652, 1746, 3075 cm^{-1} . **HRMS (TOF-ESI+)** m/z vypoč. pro $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrO}_2^+$ 315.0015; nalezeno 315.0030. **Anal.** vypoč. pro $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrO}_2$: C, 60.98; H, 3.52; nalezeno: C, 60.69; H, 3.50.

3-(4-bromfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89b)

Výtěžek 69 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.54–7.48 (m, 2H), 7.36–7.30 (m, 2H), 7.24 – 7.20 (m, 2H), 7.20 – 7.15 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.2 156.8, 141.5, 131.9, 130.9, 129.8, 129.3, 127.6, 127.3, 124.2, 123.2, 70.6, 21.5. **IR (ATR)** ν_{max} 1064, 1112, 1125, 1186, 1241, 1337, 1367, 1379, 1450, 1488, 1514, 1586, 1609, 1650, 1752, 2920 cm^{-1} . **HRMS (TOF-ESI+)** m/z vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrO}_2^+$ 329.0170; nalezeno 329.0182. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrO}_2$: C, 62.03; H, 3.98; nalezeno: C, 62.15; H, 4.02.

3-(4-bromfenyl)-4-[4-(trifluormethyl)fenyl] -2,5-dihydrofuran-2-on (89c)

Výtěžek 57 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.71 – 7.61 (m, 2H), 7.57 – 7.49 (m, 2H), 7.48 – 7.39 (m, 2H), 7.34 – 7.28 (m, 2H), 5.18 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 172.5, 154.9, 134.3, 132.6 (q, $J = 33.02 \text{ Hz}$), 132.3, 130.9, 128.4, 128.0, 127.2, 126.3 (q, $J = 3.42 \text{ Hz}$), 123.9, 123.6 (q, $J = 272.55 \text{ Hz}$), 70.7. **LRMS (APCI+)**: m/z (relativní intenzita) 383.1 [M+H]⁺; 385 (97). **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{BrF}_3\text{O}_2$: C, 53.29; H, 2.63; nalezeno: C, 53.15; H, 2.52.

3-(4-bromfenyl)-4-(4-ethylfenyl)- 2,5-dihydrofuran-2-on (89d)

Výtěžek 59 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.56 – 7.47 (m, 2H), 7.36 – 7.31 (m, 2H), 7.26 – 7.23 (m, 2H), 7.22 – 7.18 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 2.75 – 2.60 (m, 2H), 1.25 (t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.17, 156.74, 147.64, 131.88, 130.92, 130.91, 129.29, 128.60, 127.77, 127.40, 122.97, 70.59, 28.73, 15.07. **IR (ATR)** ν_{max} 1055, 1067, 1133,

1167, 1191, 1340, 1390, 1366, 1434, 1458, 1484, 1519, 1559, 1609, 1647, 1698, 1737, 2933, 2969 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrO}_2$ + 343,0328; nalezeno 343,0329. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrO}_2$: C, 62.99; H, 4.41; nalezeno: C, 62.95; H, 4.37.

3-(2-chlorfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89e)

Výtěžek 61 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.54 – 7.46 (m, 1H), 7.43 – 7.32 (m, 2H), 7.34 – 7.28 (m, 1H), 7.16 – 7.08 (m, 4H), 5.31 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 172.92, 157.65, 141.75, 133.91, 131.28, 130.35, 130.19, 130.07, 129.74, 127.58, 127.28, 127.00, 123.54, 70.52, 21.49. **IR** (ATR) ν_{max} 1036, 1059, 1128, 1164, 1337, 1364, 1438, 1472, 1516, 1611, 1651, 1750 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClO}_2$ + 285,0677; nalezeno 285,0682. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClO}_2$: C, 71.71; H, 4.60; nalezeno: C, 71.75; H, 4.65.

3-(3-chlorfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89f)

Výtěžek 62 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48–7.45 (m, 2H), 7.38 – 7.29 (m, 4H), 7.23 – 7.15 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.07, 157.22, 141.59, 134.57, 132.22, 129.93, 129.83, 129.27, 128.87, 127.42, 127.37, 124.02, 70.55, 21.48; **IR** (ATR) ν_{max} 1023, 1038, 1063, 1103, 1158, 1236, 1338, 1358, 1434, 1477, 1560, 1612, 1652, 1764, 2913 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClO}_2$ + 285,0677; nalezeno 285,0686. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClO}_2$: C, 71.71; H, 4.60; nalezeno: C, 71.78; H, 4.66.

3-(2,4-dichlorfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89g)

Výtěžek 57 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.38 – 7.31 (m, 1H), 7.28 – 7.24 (m, 1H), 7.18 – 7.14 (m, 2H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 5.55 – 5.04 (m, 2H), 2.37 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 172.61, 158.32, 142.04, 135.52, 134.76, 132.17, 130.04, 129.84, 128.92, 127.73, 127.35, 126.95, 122.44, 70.58, 21.49; **IR** (ATR) ν_{max} 1044, 1062, 1070, 1163, 1188, 1337, 1368, 1476, 1558, 1610, 1646, 1683, 1746, 1792, 1844, 1868, 1922, 2929, 3674 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}_2$ + 319,0287; nalezeno 319,0295. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}_2$: C, 63.97; H, 3.79; nalezeno: C, 64,27 ; H, 3,77.

3-(3,4-dichlorfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89h)

Výtěžek 55 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.33 – 7.24 (m, 1H), 7.24 – 7.16 (m, 4H), 5.17 (s, 2H), 2.39 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 172.79, 157.67, 141.79, 132.92, 132.89, 131.10, 130.63, 130.33, 129.92, 128.62, 127.30, 127.19, 122.97, 70.61, 21.48. **IR** (ATR) ν_{max} 1070, 1137, 1166, 1190, 1230, 1321, 1344, 1368, 1437, 1457, 1473, 1489, 1517, 1541, 1558, 1610, 1637, 1652, 1684, 1717, 1737, 1934,

3082 cm⁻¹. **HRMS** (TOF-ESI+) *m/z* vypoč. pro C₁₇H₁₂Cl₂O₂+ 319,0287; nalezeno 319,0294; **Elem. anal.** vypoč. pro C₁₇H₁₂Cl₂O₂: C, 63.97; H, 3.79; nalezeno: C, 63,64 ; H, 3,77.

3-(4-fluorfenyl)-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-on (89i)

Výtěžek 58 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.47 – 7.40 (m, 3H), 7.40 – 7.34 (m, 2H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 7.12 – 7.03 (m, 2H), 5.18 (s, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.4, 163.2 (d, *J* = 249.0 Hz), 156.4, 131.3 (d, *J* = 8.3 Hz), 130.8, 130.8, 129.2, 127.6, 126.2 (d, *J* = 3.5 Hz), 125.3, 115.9 (d, *J* = 21.6 Hz), 70.8. **IR** (ATR) *v*_{max} 1002, 1028, 1067, 1085, 1100, 1163, 1217, 1338, 1365, 1408, 1447, 1498, 1510, 1541, 1575, 1596, 1640, 1707, 2922, 3051 cm⁻¹; **LRMS** (APCI⁺): *m/z* (relativní intenzita) 255.1 [M+H]⁺.

3-(4-fluorfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89j)

Výtěžek 63 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.47 – 7.40 (m, 2H), 7.24 – 7.14 (m, 4H), 7.08 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.6, 163.0 (d, *J* = 248.8 Hz), 156.5, 141.4, 131.3 (d, *J* = 8.2 Hz), 129.9, 127.9, 127.5, 126.5 (d, *J* = 3.4 Hz), 124.5, 115.9 (d, *J* = 21.7 Hz), 70.7, 21.6. **IR** (ATR) *v*_{max} 1020, 1068, 1117, 1129, 1193, 1337, 1364, 1407, 1444, 1505, 1518, 1598, 1611, 1645, 1708, 1745, 1915, 2864, 2922, 3067 cm⁻¹. **LRMS** (APCI⁺): *m/z* (relativní intenzita) 269.1 [M+H]⁺; 267 (5). **Elem. anal.** vypoč. pro C₁₇H₁₃FO₂: C, 76.11; H, 4.88; nalezeno: C, 76.12 ; H, 4.90.

4-(4-methylfenyl)-3-[3-(trifluormethyl)fenyl]- 2,5-dihydrofuran-2-on (89k)

Výtěžek 59 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.79 – 7.71 (m, 1H), 7.67 – 7.58 (m, 2H), 7.56 – 7.44 (m, 1H), 7.24 – 7.07 (m, 4H), 5.20 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 157.8, 141.9, 132.9, 131.4, 131.2 (q, *J* = 32.55), 130.3, 129.3, 127.5, 127.4, 126.5 – 126.3 (m), 126.0 (q, *J* = 3.7 Hz), 124.0 (q, *J* = 272.47 Hz), 70.8 (t, *J* = 5.91), 21.6; **IR** (ATR) *v*_{max} 1074; 1128; 1135; 1157; 1180; 1280; 1322; 1348; 1445; 1611; 1649; 1703; 1741; 2926; 3070 cm⁻¹. **HRMS** (TOF-ESI+) *m/z* vypoč. pro C₁₈H₁₃F₃O₂+ 319,0940; nalezeno 319,0952. **Elem. anal.** vypoč. pro C₁₈H₁₃F₃O₂: C, 67.92; H, 4.12; nalezeno: C, 67.94; H, 4.20.

4-fenyl-3-[3-(trifluormethyl)fenyl]-2,5-dihydrofuran-2-on (89l)

Výtěžek 75 %, žlutá olejovitá látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.75 – 7.70 (m, 1H), 7.70 – 7.60 (m, 2H), 7.56 – 7.48 (m, 1H), 7.48 – 7.42 (m, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.34 – 7.28 (m, 2H), 5.22 (s, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.0. 157.8. 132.8, 131.3 (q, *J* = 32.64 Hz) 131.2, 131.1, 130.4, 129.4, 127.6, 126.5 – 126.3 (q≈m, *J* = 1.71 Hz), 125.7 (q, *J* = 3.80 Hz), 124.9, 123.9 (q, *J* = 272.57 Hz), 70.9 (t, *J* = 4.98 Hz). **LRMS** (APCI⁺): *m/z* (relativní intenzita) 305.5 [M+H]⁺. **Elem. anal.** vypoč. pro C₁₇H₁₁F₃O₂: C, 67.11; H, 3.64; nalezeno: C, 67.15; H, 3.72.

4-(3-chlorfenyl)-3-[4-(trifluormethyl)fenyl]-2,5-dihydrofuran-2-on (89m)

Výtěžek 70 %, bílá kapalná látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.48 – 7.42 (m, 3H), 7.41 – 7.36 (m, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 7.29 – 7.23 (m, 1H), 5.20 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 155.5, 135.0, 134.0 (d, $J = 1.3$ Hz), 132.6 (q, $J = 33.0$ Hz), 131.3, 130.3, 129.6, 129.3, 128.1, 127.5, 127.0, 126.3 (q, $J = 3.76$ Hz), 123.6 (q, $J = 272.6$), 70.6. **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{ClF}_3\text{O}_2$ + 339,0394; nalezeno 339,0396.

3-(4-bromfenyl)-4-(4-methoxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89n)

Výtěžek 65 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.53 (m, 2H), 7.31 (m, 4H), 6.87 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 3.83 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.3, 161.6, 156.3, 131.9, 130.9, 129.5, 129.1, 123.0, 122.9, 122.7, 114.5, 70.4, 55.4. **IR** (ATR) ν_{max} 1165, 1100, 1165, 1181, 1261, 1306, 1369, 1426, 1454, 1488, 1518, 1571, 1605, 1641, 1727, 1915, 2852, 2925 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrO}_3$ + 345,0131; nalezeno 345,0130. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrO}_3$: C, 59.15; H, 3.80; nalezeno: C, 59.37; H, 3.78.

3-(4-bromfenyl)-4-(4-hydroxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89o)

Výtěžek 62 %, žlutá olejovitá látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.61 – 7.48 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 7.29 – 7.22 (m, 2H), 6.84 – 6.70 (m, 2H), 5.28 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 176.00, 161.60, 159.99, 132.94, 132.42, 131.72, 130.70, 123.56, 122.84, 122.70, 116.85, 72.27. **IR** (ATR) ν_{max} 1037, 1043, 1064, 1171, 1251, 1344, 1396, 1540, 1608, 1636, 1709, 1792, 1869, 3237 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrO}_3$ + 330,9964; nalezeno 330,9961. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrO}_3$: C, 58.03; H, 3.35; nalezeno: C, 58.12; H, 3.42.

3-(2,6-dichlorfenyl)-4-(4-methoxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (89p)

Výtěžek 55 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.45 – 7.41 (m, 2H), 7.36 – 7.29 (m, 1H), 7.19 – 7.13 (m, 2H), 6.91 – 6.73 (m, 2H), 5.35 (s, 2H), 3.81 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 172.0, 162.1, 158.2, 135.7, 130.6, 130.0, 128.5, 128.4, 122.7, 120.2, 114.7, 70.6, 55.4. **IR** (ATR) ν_{max} 1028, 1063, 1098, 1181, 1261, 1335, 1431, 1518, 1606, 1650, 1711, 1748, 2850, 2928, 3075 cm^{-1} . **LRMS** (APCI+): m/z (relativní intenzita) 345 [M+H]+, 348 (20), 349 (1,5). **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}_3$: C, 60.92; H, 3.61; nalezeno: C, 60.99; H, 3.66.

3-(4-methoxyfenyl)-4-[4-(methylsulfonyl)fenyl]-2,5-dihydrofuran-2-on (89q)

Výtěžek 50 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.04 – 7.89 (m, 2H), 7.62 – 7.49 (m, 2H), 7.44 – 7.32 (m, 2H), 6.98 – 6.65 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.08 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 172.7, 160.5, 151.8, 141.7, 136.7, 130.6, 128.5, 128.4, 128.1, 121.2, 114.4, 70.3, 55.3, 44.3. **IR** (ATR) ν_{max} 1024; 1114; 1126; 1178; 1253; 1287; 1310; 1365; 1458;

1541; 1607; 1753; 1922; 2894; 2952; 2958; 3009 cm^{-1} . **LRMS** (APCI⁺): m/z (relativní intenzita) 345 [M+H]⁺, 346 (20), 347 (2). **Elem. anal.** vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{S}$: C, 62.78; H, 4.68; nalezeno: C, 62.84; H, 4.73.

3-(3,4-difluorfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (98a)

Výtěžek 14 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.50 – 7.44 (m, 1H), 7.24 – 7.14 (m, 4H), 7.90 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 175.6, 169.0, 159.5, 145.4, 133.3, 132.9, 127.9, 128.5, 127.5, 124.5, 115.9, 75.7, 22.6. **IR** (ATR) ν_{max} , 1069, 1127, 1130, 1293, 1337, 1369, 1410, 1450, 1505, 1518, 1599, 1615, 1645, 1708, 1745, 1920, 2865, 2922, cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_2$: C, 71.32; H, 4.23; nalezeno: C, 71.22 ; H, 4.25.

4-(4-ethylfenyl)-3-(4-fluorfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (98b)

Výtěžek 75 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.50 – 7.40 (m, 2H), 7.33 – 7.14 (m, 4H), 7.12 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 2.75 – 2.60 (m, 2H), 1.25 (t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 175.6, 165.0, 156.5, 141.4, 131.3, 130.9, 130.8, 15, 127.5, 125.5, 115.9, 75.7, 24.6, 22.73, 15.07. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{FO}_2$: C, 76.58; H, 5.36; nalezeno: C, 76.60 ; H, 5.40.

3-(4-fluorfenyl)-4-[4-(methylsulfonyl)fenyl]-2,5-dihydrofuran-2-on (98c)

Výtěžek 95 %, žlutá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.57 – 7.45 (m, 2H), 7.30 – 7.14 (m, 4H), 7.08 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 2.55 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 177.6, 169.0, 160.5, 145.4, 138.3, 130.9, 129.9, 127.5, 127.4, 125.5, 116.9, 75.7, 28.6. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{FO}_2\text{S}$: C, 67.98; H, 4.36; nalezeno: C, 67.99 ; H, 4.40.

3-(4-fluorfenyl)-4-(4-isopropylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (98d)

Výtěžek 78 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.80 – 7.60 (m, 2H), 7.30 – 7.20 (m, 4H), 7.20 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 2.40 – 1.25 (m, 7H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 180.6, 165.0, 156.5, 145.4, 134.3, 130.9, 127.9, 127.5, 125.5, 124.5, 115.9, 70.7, 35.4, 25.3, 21.6. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{FO}_2$: C, 77.01; H, 5.78; nalezeno: C, 77.12 ; H, 5.90.

5.3.2 Příprava 3-(1*H*-indol-3-yl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu (92)

Indol-3-yl octová kyselina (1,0 mmol) byla rozpuštěna v ve směsi THF (15 ml) a TEA (1,0 mmol). Do tohoto roztoku byl přikapán 4-methyl-2'-bromacetofenon (1,0 mmol) předem rozpuštěný v THF (5 ml). Směs byla zahřívána po dobu 3 hodin na 70 °C a dále ponechána při pokojové teplotě přes noc. Poté byla do reakční směsi přidána olejová suspence hydridu sodného (1,0 mmol) a míchána 2 hodiny při 0°C. Nakonec byla do reakční směsi přidána koncentrovaná kyselina chlorovodíková (do pH \cong 1) a míchána 15 minut. Do reakční směsi byla přidána voda (15 ml) a směs byl extrahována ethylacetátem (3 \times 20 ml). Spojené organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 6:4).

Výtěžek 56 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 10.67 (s, 1H), 7.79 – 7.73 (m, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 1H), 7.42 – 7.36 (m, 2H), 7.25 – 6.99 (m, 3H), 6.90 – 6.74 (m, 2H), 5.34 (s, 2H), 2.33 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 174.60, 153.15, 140.86, 137.49, 130.37, 129.96, 128.34, 127.85, 125.82, 122.48, 121.63, 120.03, 119.85, 112.57, 106.45, 71.27, 21.37; **IR** (ATR) ν_{max} 1108; 1246; 1295; 1342; 1350; 1380; 1438; 1459; 1506; 1559; 1616; 1652; 1683; 2928; 3277 cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_2$: C, 78.87; H, 5.23; N, 4.84; nalezeno: C, 79.86; H, 5.25; N, 4.82. **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_2^+$ 290,1176; nalezeno 290,1181.

5.3.3 Příprava 3-(pyridin-4-yl)-4-[4-(trifluormethyl)fenyl]-2,5-dihydrofuran-2-on (94)

Hydrochlorid pyridine-4-yl octové kyseliny (1,0 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém methanolu (10 ml) a do této směsi byl přidán *terc*-butanolát draselný (2,0 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu patnácti minut pod atmosférou argonu a poté bylo odstraněno rozpouštědlo. Surový produkt byl rozpuštěn v 10 ml suchého DMF. Poté byl přidán příslušný α -bromketon (1,0 mmol) a výsledná směs míchána po dobu 1 hodiny a vytřepán mezi ethyl acetát (50 ml) a vodu (100 ml). Organické faze byly vysušeny pomocí síranu sodného a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 40:60).

Výtěžek 45 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 10.67 (s, 1H), 7.79 – 7.73 (m, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 1H), 7.42 – 7.36 (m, 2H), 7.25 – 6.99 (m, 3H), 6.90 – 6.74 (m, 2H), 5.34 (s, 2H), 2.33 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 174.60, 153.15, 140.86, 137.49, 130.37, 129.96, 128.34, 127.85, 125.82, 122.48, 121.63, 120.03, 119.85, 112.57, 106.45, 71.27, 21.37.

IR (ATR) ν_{\max} 1108; 1246; 1295; 1342; 1350; 1380; 1438; 1459; 1506; 1559; 1616; 1652; 1683; 2928; 3277 cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_2$: C, 78.87; H, 5.23; N, 4.84; nalezeno: C, 79.86; H, 5.25; N, 4.82. **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_2^+$ 290,1176; nalezeno 290,1181.

5.3.4 3-(5-brompyridin-2-yl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (97)

Výtěžek 60 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.54–7.48 (m, 1H), 7.36–7.30 (m, 2H), 7.24 – 7.20 (m, 2H), 7.20 – 7.15 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 174.2, 156.8, 132.5, 131.9, 130.9, 128.3, 126.6, 125.3, 124.8, 124.2, 70.6, 20.5. **IR** (ATR) ν_{\max} 1064, 1113, 1135, 1196, 1252, 1450, 1490, 1530, 1686, 1709, 1750, 1752, 2951 cm^{-1} . **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrNO}_2$ 329.0110; nalezeno 329.0122. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrNO}_2$: C, 58.20; H, 3.66; nalezeno: C, 59.00; H, 3.60.

5.3.5 Postup demethylace při přípravě 4-(3,4-dihydroxyfenyl)-3-(4-hydroxyfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu (82d)

K roztoku laktonu **82b** (1,0 mmol) v suchém dichlormethanu (20 ml) byl při -78°C přikapán roztok BBr_3 (1 M roztok v dichlormethanu, 1,0 mmol). Reakční směs byla pozvolna ohřáta na 10°C během 2 hodin. Reakce byla ukončena přidáním vody (15 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3×20 ml), organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 2:8).

Výtěžek 70 %, žlutá olejovitá látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 7.33 – 7.13 (m, 2H), 6.87 – 6.80 (m, 4H), 6.75 – 6.72 (m, 1H), 5.20 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ 177.01, 158.99, 158.06, 149.38, 146.61, 131.83, 123.89, 123.82, 123.20, 121.26, 116.52, 116.47, 115.71, 72.16; **IR** (ATR) ν_{\max} 1043, 1101, 1127, 1164, 1226, 1263, 1437, 1489, 1559, 1570, 1606, 1653, 1716, 1792, 1868, 2853, 2923, 3314, 3566, 3629 cm^{-1} . **LRMS** (APCI $^+$): m/z (relativní intenzita) 345 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 346 (20), 347 (2). **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$: C, 67.60; H, 4.26; nalezeno: C, 67.62; H, 4.29.

5.3.6 Obecný postup redukce 3,4-diarylfuranonů na 3,4-diarylfurany

Postup přípravy byl dříve popsán [37, 63]. Do předem zchlazené lázně na -20° C byl přikapán výchozí lakton (1,0 mmol) v suchém THF (10 ml) pod argonovou atmosférou. Dále byl přikapán DIBALH v THF (4,0 mmol). Směs byla míchána po dobu 3 hodin. Reakce byla ukončena pomalým přidáváním 4 % H₂SO₄. Po 30 minutách byl roztok zředěn etherem a organická vrstva vytřepána s vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného (15 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 2:8).

3-(4-bromfenyl)-4-fenylfuran (127a)

Výtěžek 50%, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.50 – 7.33 (m, 4H), 7.33 – 7.29 (m, 4H), 7.25 – 7.11 (m, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 140.85, 140.66, 131.62, 131.52, 130.94, 130.01, 129.32, 128.46, 127.16, 125.72, 124.87. **Elem. anal.** vypoč. pro C₁₆H₁₁BrO₂: C, 64.24; H, 3.71; nalezeno: C, 64.25; H, 3.72.

3-(4-ethylfenyl)-4-(4-fluorfenyl)furan (127b)

Výtěžek 30 %, bílá amorfnní látka. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.00-7.20 (m, 4H), 7.30-7.50 (m, 6H), 2.75 – 2.60 (m, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 174.6, 164.0 (d, *J* = 248.8 Hz), 157.5, 141.4, 132.3 (d, *J* = 8.2 Hz), 129.9, 127.9, 127.5, 126.5 (d, *J* = 3.4 Hz), 124.5, 115.9 (d, *J* = 21.7 Hz), 70.7, 21.6, 14.50.

3-(4-fluorfenyl)-4-(4-methylfenyl)furan (127c)

Výtěžek 25 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.15-7.29 (m, 4H), 7.33-7.40 (m, 6H), 2.65 – 2.60 (m, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 175.6, 166.0 (d, *J* = 248.8 Hz), 158.5, 143.4, 134.3 (d, *J* = 8.2 Hz), 130.9, 127.9, 127.5, 126.5 (d, *J* = 3.4 Hz), 124.5, 115.9 (d, *J* = 21.7 Hz), 70.7, 21.6, 14.50.

5.3.7 Příprava 3-(3-chlor-4-hydroxyfenyl)-4-(p-tolyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu (103)

Příprava 3-chlor-4-hydroxyfenyl acetátu (99a)

3-chlor-4-hydroxyfenyloctová kyselina (1,0 mmol) byla rozpuštěna v 10 ml bezvodého methanolu. Do této směsi byl přidán DOWEX 50 (200 mg; 0,5 mmol) a reakční směs byla míchána po dobu 12 hodin. Poté byla směs zfiltrována přes fritu s Celitem a rozpouštědlo bylo odpařeno. Surový produkt byl bez čištění a charakterizace použit do další reakce.

Příprava methyl 2-[4-(benzyloxy)-3-chlorfenyl]acetátu (99b)

Methylester fenylactové kyseliny (1,0 mmol) byl rozpuštěn v 15 ml bezvodého DMSO. Do této směsi byla přidána 60 % suspenze hydridu sodného (1,0 mmol) a reakce byla míchána po dobu 1 hodiny. Dále byl do směsi přidán benzylbromid (2,5 mmol) a směs byla ponechána po dobu 1 dne při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena pomalým přidáváním H₂O. Po 30 minutách byl roztok zředěn etherem (15 ml) a organická vrstva byla vytřepána s a nasyceným roztokem chloridu sodného (15 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 8:2).

Výtěžek 80 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.40-7.20 (m, 4), 7.44-7.41 (m, 1H), 7.00 – 6.80 (m, 3H), 3.77 (m, 2H), 3.55 (m, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 172.00, 150.59, 129.73, 129.19, 126.85, 119.87, 116.30, 77.25, 77.00, 76.75, 60.48, 52.13, 39.86, 20.97.

Příprava 2-oxo-2-(4methylfenyl)ethyl-2-(4-(benzyloxy)-3-chlorfenyl)acetátu (101)

Fenylactová kyselina (1,0 mmol) byla rozpuštěna v 10 ml THF a byl přikapán TEA (1,1 mmol). Ve vedlejší baňce byl rozpuštěn bromacetofenon (1,0 mmol) v 10 ml THF a tento roztok byl přikanylován do směsi fenylactové kyseliny v THF. Reakce byla míchána po dobu 12 hodin. Po 12 hodinách byl roztok zředěn ethylacetátem a organická vrstva vytřepána s vodou a 5 % vodným roztokem NaCl (15 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (hexan : ethylacetát 7:3). Produkt byl bez čištění použit do další reakce.

Příprava 3-[4-(benzyloxy)-3-chlorfenyl]-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu (102)

Ketoester **101** (1,0 mmol) byl rozpuštěn ve směsi THF (15 ml) a 60 % olejové suspenze hydridu sodného (1,0 mmol) a mícháno po dobu 1 hodiny. Poté byla do reakční směsi přidána koncentrovaná kyselina chlorovodíková (do pH \cong 1) a míchána 15 minut. Do reakční směsi byla přidána voda (15 ml) a směs byl extrahována ethylacetátem (3 \times 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 7:3).

Výtěžek 70 %, žlutá amorfnní látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.48–7.45 (m, 2H), 7.38 – 7.29 (m, 4H), 7.23 – 7.15 (m, 4H), 5.20 (s, 2H), 3.69 (s, 2H), 2.39 (s, 3H).

Příprava 3-(3-chlor-4-hydroxyfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu (103)

Lakton **102** byl rozpuštěn ve směsi TFA/DCM (5 ml / 5 ml). Po půl hodině byla TFA i DCM odstraněn na vakuové odparce a surový reakční produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (hexan – hexan : ethylacetát 1:9).

Výtěžek 75 %, žlutá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 7.30 – 7.27 (m, 1H), 7.20 – 7.15 (m, 4H), 7.10 – 7.00 (m, 1H), 5.20 (s, 2H), 2.40 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ 173.45, 156.03, 151.76, 141.36, 129.82, 129.59, 127.72, 127.31, 123.67, 123.62, 120.23, 116.44, 70.56, 29.68, 21.48. **IR (ATR)** ν_{max} 1299, 1318, 1444, 1509, 1522, 1575, 1611, 2854, 2924, 3240 cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClO}_3$: C, 67.90; H, 4.36; nalezeno: C, 67.91; H, 4.37.

5.3.8 Obecný postup přípravy laktonů derivatizovaných v γ -pozici

Směs laktonu **105a-g** (2,0 mmol) a uhličitanu sodného (2,0 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém methanolu (20 ml) pod atmosférou argonu. Poté byl přidán paraformaldehyd (2,0 mmol) a směs byla míchána po dobu 12ti hodin při pokojové teplotě. Reakční směs byla rozdělena mezi ethyl acetát (50 ml) a vodu (100 ml). Organické faze byly vysušeny pomocí síranu sodného a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 1:1).

3-(4-bromfenyl)-5-(hydroxymethyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (105a)

Výtěžek 50%, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.53 – 7.39 (m, 2H), 7.36 – 7.28 (m, 2H), 7.24 – 7.10 (m, 4H), 5.60 – 5.46 (m, 1H), 4.02 (dd, $J = 12.5, 2.7$ Hz, 1H), 3.68 (dd, $J = 12.5, 4.8$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 172.1, 157.9, 141.0, 131.7, 130.8, 129.9, 128.8, 127.8, 127.5, 126.1, 123.0, 82.6, 62.4, 21.4. **IR (ATR)** ν_{max} 1039, 1105, 1072, 1170, 1233, 1334, 1356, 1396, 1418, 1456, 1473, 1507, 1540, 1653, 1684, 1699, 1736, 2855, 2926, 3402 cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrO}_3$: C, 60.19; H, 4.21; nalezeno: C, 60.24; H, 4.25. **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrO}_3^+$ 359,0277; nalezeno 359,0283.

3-(4-bromfenyl)-5,5-bis(hydroxymethyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (105b)

Výtěžek 47 %, bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.40 – 7.34 (m, 2H), 7.32 – 7.17 (m, 6H), 3.89 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 3.73 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.6, 163.0, 140.7, 132.2, 132.1, 130.7, 130.5, 130.2, 130.1, 129.1, 123.4, 94.3, 62.1,

21.4. **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $C_{19}H_{17}BrO_4$ + 389,0383; nalezeno 389,0393. **Elem. anal.** vypoč. pro $C_{19}H_{17}BrO_4$: C, 58.63; H, 4.40; nalezeno: C, 58.71; H, 4.49.

4-(3,4-dimethoxyfenyl)-5-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyfenyl)- 2,5-dihydrofuran-2-on (105d)

Výtěžek 48 %, bílá amorfnní látka; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44 – 7.36 (m, 2H), 6.95 – 6.85 (m, 4H), 6.81 – 6.77 (m, 1H), 5.55 – 5.40 (m, 2H), 4.08 – 4.00 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.73 – 3.66 (m, 2H), 3.62 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 172.72, 159.84, 155.29, 150.74, 149.09, 130.70, 125.99, 123.29, 122.28, 121.00, 113.97, 111.22, 111.13, 82.15, 63.15, 55.91, 55.68, 55.27. **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $C_{20}H_{20}O_6$ + 356,1300; nalezeno 356,1300. **Elem. anal.** vypoč. pro $C_{20}H_{20}O_6$: C, 67.41; H, 5.66 nalezeno: C 68.00; H, 5.67.

4-(3,4-dimethoxyfenyl)-5,5-bis(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyfenyl)- 2,5-dihydrofuran-2-on (105e)

Výtěžek 43 %, bílá amorfnní látka; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.46 – 7.32 (m, 2H), 6.90 – 6.87 (m, 2H), 6.83 – 6.74 (m, 3H), 4.02 – 3.95 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.87 – 3.79 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.73 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 172.48, 159.67, 158.21, 149.75, 149.39, 130.50, 128.73, 124.19, 121.99, 120.66, 113.62, 111.55, 111.16, 91.98, 62.54, 55.90, 55.84, 55.17. **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $C_{21}H_{22}O_7$ + 386,1400; nalezeno 386,1400. **Elem. anal.** vypoč. pro $C_{21}H_{22}O_7$: C, 65.28; H, 5.74 nalezeno: C 65.30; H, 5.75.

4-(4-bromfenyl)-3-(3,4-dichlorfenyl)-5,5-bis(hydroxymethyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (105f)

Výtěžek 44 %, bílá amorfnní látka; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.55 – 7.46 (m, 1H), 7.45 – 7.36 (m, 2H), 7.31 – 7.19 (m, 3H), 7.17 – 7.06 (m, 1H), 4.02 – 3.88 (m, 2H), 3.79 – 3.68 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.9, 157.6, 134.2, 133.9, 131.7, 131.5, 131.4, 130.6, 130.3, 129.6, 127.5, 127.4, 123.6, 92.0, 61.7. **LRMS** (APCI⁺): m/z (relativní intenzita) 443.0 [M+H]⁺ 447 (70); **IR** (ATR) ν_{max} 1013, 1030, 1080, 1137, 1159, 1202, 1271, 1296, 1321, 1352, 1375, 1403, 1448, 1469, 1485, 1497, 1572, 1585, 1641, 1658, 1721, 1758, 1819, 1839, 1852, 1903, 1962 cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $C_{18}H_{13}BrCl_2O_4$: C, 48.68; H, 2.95; nalezeno: C, 48.73; H, 3.09.

3-(3,4-dichlorfenyl)-5,5-bis(hydroxymethyl)-4-(4-methoxyfenyl)- 2,5-dihydrofuran-2-on (105g)

Výtěžek 40 %, bílá amorfnní látka; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.67 – 7.53 (m, 1H), 7.30 – 7.23 (m, 1H), 7.22 – 7.16 (m, 2H), 7.16 – 7.07 (m, 1H), 6.98 – 6.86 (m, 2H), 4.02 – 3.92 (m, 2H), 3.85 – 3.75 (m, 5H), 3.07 (bs, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 171.90, 162.04, 160.65, 132.69, 132.41, 130.95, 130.13, 129.57, 129.27, 128.46, 127.24, 122.84, 114.86, 92.84, 62.05, 55.32.

IR (ATR) ν_{\max} 1030, 1053, 1092, 1179, 1252, 1292, 1349, 1473, 1512, 1570, 1607, 1645, 1736, 2840, 2934, 3401 cm^{-1} . **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_5$: C, 57.74; H, 4.08; nalezeno: C, 57.78; H, 4.13.

5.3.9 Obecný postup esterifikace laktonů

Roztok diolu **105b** (1,0 mmol), bezvodého pyridinu (2,0 mmol) a acetylchloridu (2,0 mmol) v bezvodém dichlormethanu (15 ml) byl míchán za laboratorní teploty 1,5 hodiny. Reakční směs byla poté zředěna EtOAc (50 ml) a vytřepána s nasyceným vodným roztokem chloridu sodného. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (hexan : ethylacetát 1:1).

5,5-bis(acetoxymethyl)-3-(4-bromfenyl)-4-(4-methylfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-on (105c)

Výtěžek 59 %, bílá olejovitá látka; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.32 – 7.25 (m, 2H), 7.25 – 7.19 (m, 2H), 7.05 – 6.98 (m, 2H), 4.55 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 4.30 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.05 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 170.05, 169.94, 158.28, 140.25, 131.57, 130.65, 130.24, 129.05, 128.01, 127.75, 127.45, 123.38, 86.28, 62.76, 21.32, 20.51. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{BrO}_6$: C, 58.37; H, 4.47; nalezeno: C, 58.40; H, 4.48; HRMS (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{BrO}_6^+$ 472,0500; nalezeno 472,0610.

5.3.10 Příprava 3-(4-bromfenyl)-8,8-dimethyl-4-(4-methylfenyl)-1,7,9-trioxaspiro[4.5]dec-3-en-2-onu (106)

Diol **105b** (1,4 mmol) byl rozpuštěn v 15 ml suchého THF. Poté byla do směsi přidána *p*-toluensulfonová kyselina (katal. množství) a 2,2-dimethoxypropan (1,65 mmol). Reakce byla ukončena přidávkem vodného roztoku amoniaku (2 ml). Reakční směs byla poté zředěna EtOAc (50 ml) a vytřepána s nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (30 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (hexan : ethylacetát 50:50).

Výtěžek 60 %, bílá amorfnní látka. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.44 – 7.34 (m, 2H), 7.33 – 7.17 (m, 6H), 3.87 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 3.71 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 2.31 (s, 3H); 1.31 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 174.6, 162.0, 141.7, 133.2, 132.1, 131.7, 130.5, 130.2, 130.1, 129.1, 123.4, 114.1, 94.3, 62.1, 26.2, 21.4. **HRMS** (TOF-ESI+) m/z vypoč. pro $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{BrO}_4^+$ 428,0600; nalezeno 428,0610. **Elem. anal.** vypoč. pro $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{BrO}_4$: C, 61.55; H, 4.93; nalezeno: C, 61.65; H, 4.95.

5.3.11 Příprava 3-(4-bromfenyl)-5-((4-chlorfenyl)((3,4-dimethoxyfenyl)amino)methyl)-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (113)

(E)-N-(4-chlorbenzyliden)-3,4-dimethoxyanilin (112)

4-chlorbenzaldehyd (3,5 mmol) a 3,4-dimethoxyanilin (3,5 mmol) byl rozpuštěn v suchém toluenu pod atmosférou argonu. Směs byla azeotropicky destilována v Dean-Starkově aparatuře na teplotu 110° C. Po vymizení výchozích látek (monitorováno pomocí TLC) bylo rozpouštědlo odstraněno a surový reakční product byl bez čištění použit do další reakce.

Výtěžek 90 %, bílá amorfni látka; Spektrální data jsou v souladu s literaturou [64]; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (s, 1H), 7.85 (d, 2H, J=8.4 Hz), 7.30 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.04-7.02 (m, 2H), 2.41 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 158.61, 151.62, 139.02, 137.25, 134.69, 129.89, 129.02(d, J = 4.8 Hz), 126.95, 121.58, 117.79, 21.38. HRMS (TOF-ESI+) m/z vypočteno C₁₅H₁₄ClNO₂ [M+H]⁺: 230.0731; nalezeno: 230.0734.

3-(4-bromfenyl)-5-((4-chlorfenyl)((3,4-dimethoxyfenyl)amino)methyl)-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (113)

Lakton **89a** (0,79 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (10 ml) a směs byla zchlazena na -78° C. K tomuto roztoku byl přikapán 1.4 M roztok LDA v hexanu (1,6 mmol). Směs byla míchána po dobu 1 hodiny a poté byl do roztoku přikapán imin (1,6 mmol) rozpuštěný v 10 ml bezvodého THF. Po 3 hodinách míchání byla reakční směs zředěna nasyc. roztokem NH₄Cl (5 ml). Dále byla přidána voda (15 ml) a směs byl extrahována dichlormethanem (3 × 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 80:20).

Výtěžek 70 %, bílá amorfni látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.54–7.49 (m, 5H), 7.47–7.42 (m, 5H), 7.41–7.36 (m, 2H), 7.35–7.30 (m, 4H), 5.17 (s, 2H), 4.5 (d, J=1.8, 1H), 3.80 (m, 7H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.37; 156.95; 149.90; 142.37; 139.98; 134.11; 133.59; 131.87; 131.06; 130.39; 130.11, 129.39, 129.11, 128.33, 128.13, 127.38, 123.23, 112.68, 104.87, 100.26, 82.45, 76.57, 59.63, 56.38, 55.71. HRMS (TOF-ESI+) m/z vypočteno C₃₁H₂₅BrClNO₄ [M+H]⁺: 589,0700; nalezeno: 589.0734.

5.3.12 Příprava methyl *O*-(*terc*-butyldimethylsilyl)-*L*-serinátu (133)

Methyl *L*-serinát (1,0 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu (20 ml) a směs byla zchlazena na -50°C. Poté byl přidán TEA (2,0 mmol) předem rozpuštěný v dichlormethanu (20 ml). Nakonec byl přidán TBDMSCl (1,0 mmol) a směs byla míchána po dobu 12 hodin. Reakce byla ukončena přidáním vody (15 ml) a směs byla extrahována dichlormethanem (3 × 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 80:20).

Výtěžek 90 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [65]; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.66 (d, 2H, *J* = 4.0 Hz), 3.63 (d, 2H, *J* = 4.0 Hz), 3.53 (s, 1H), 3.27 (t, 1H, *J* = 4.0 Hz), 1.44 (s, 2H), 0.85 (s, 9H), 0.05 (s, 6H). ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 174.4, 65.4, 56.5, 51.9, 25.7, 18.2, -5.5, -5.6.

5.3.13 Příprava methyl *N*-(*terc*-butoxykarbonyl)-*O*-(*terc*-butyldimethylsilyl)-*L*-serinátu (134)

Ester **133** (1,0 mmol) byl rozpuštěn v THF (20 ml) a směs byla zchlazena na -80°C. Po deseti minutách byl do směsi přikanylován Boc₂O (1,0 mmol) předem rozpuštěný v 15 ml suchého THF. Reakční směs byla ponechána po dobu 12ti hodin při RT. Reakce byla ukončena přidáním vody (15 ml) a směs byla extrahována dichlormethanem (3 × 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno za nízké teploty. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 80:20).

Výtěžek 90 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [66]; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.32 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 4.31 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 4.00 (d, 1H, *J* = 9.7), 3.75 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz), 3.70 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 0.82 (s, 9H), -0.01 (s, 6H). ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 171.4, 155.5, 63.9, 55.7, 52.3, 28.4, 25.8, 18.3, -5.6. IR (ATR) ν_{max} 3402, 1712, 1604 cm⁻¹. [α]_D²⁵ = +56.7 (c = 0.08, CHCl₃).

5.3.14 Příprava *terc*-butyl (*L*)-1-[(*terc*-butyldimethylsilyl)oxy]-3-oxopropan-2-yl(-karbamátu (135)

Ester **134** (1,0 mmol) byl rozpuštěn v 20 ml suchého toluenu a reakční směs byla zchlazena na -60°C. Poté byl přikanylován DIBAL-H v toluenu (1M, 13 ml, 1.5 eq). Po 12 hodinách míchání byla reakce ukončena přidáním 10 ml H₂O a 10 ml MeOH. Reakce byla ohřáta na laboratorní

teplotu. Poté byla směs přefiltrována přes fritu s celitem a směs byla extrahována dichlormethanem (3 × 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno za nízké teploty. Surový produkt byl bez čištění použit do další reakce.

5.3.15 Příprava 4-methylbenzensulfonyl azidu

p-Toluensulfonyl chlorid (30,0 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (60 ml) a zchlazen na 0°C. Poté byl přikapán azid sodný (45,0 mmol, 1.5 eq) předem rozpuštěný ve vodě (20 ml) a ponecháno po dobu 12ti hodin při RT. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno a reziduální vodná vrstva byla vytřepána s etherem a 5 % hydrogenuhličitanem sodným. Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno za nízké teploty. Surový produkt byl bez čištění použit do další reakce.

Výtěžek 90 %, bílá amorfni látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [67]; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.85-7.80 (m, 4H), 2.49 (s, 3H). **¹³C NMR** (175 MHz, CDCl₃) δ 146.2, 135.5, 130.3, 127.6, 21.8. **IR** (ATR) ν_{\max} 3067, 1808, 1650, 1594, 1399, 1190 cm⁻¹.

5.3.16 Příprava dimethyl-(1-diazo-2-oxopropyl)-fosfonátu (136)

Hydrid sodný (20.9 mmol) byl rozpuštěn ve 40 ml toluenu a 20 ml THF. Směs byla zchlazena na 0°C. Fosfonát (19,0 mmol) byl ve vedlejší baňce rozpuštěn v 15 ml toluenu a byl přikapán po dobu 1 hodiny ke směsi hydridu v toluenu/THF. Po půl hodině míchání byl do této suspenze přikanylován *p*-toluensulfonylazid předem rozpuštěný v toluenu (15 ml). Reakce byla míchána po dobu 12 hodin. Reakce byla ukončena přidáním vody (15 ml) a směs byla extrahována dichlormethanem (3 × 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno za nízké teploty. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 50:50).

Výtěžek 70 %, žlutozelená olejovitá látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [68]; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.85 (d, 6H, *J* = 12.0 Hz), 2.26 (s, 3H). **IR** (ATR) ν_{\max} 2960, 2127, 1660 cm⁻¹. **HRMS** (TOF-ESI+) *m/z* vypoč. pro C₅H₉O₄N₂P⁺ : 192.0300, nalezeno: 192.0304.

5.3.17 Příprava dimethyl-(diazomethyl)-fosfonátu (145)

Diazofosfonát (2,5 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (30 ml) a do tohoto roztoku byl přidán fosforečnan sodný (2,5 mmol) a ponecháno 12 hodin při RT. Směs byla následně přefiltrována přes fritu s celitem, vysušena síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl bez čištění použit do další reakce.

Výtěžek 65 %, žlutozelená olejovitá látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [69]; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 3.81 (d, 1H, *J* = 0.6 Hz), 3.79 (d, 3H, *J* = 11.8); **IR** (ATR) ν_{\max} 2110, 1250, 1030 cm⁻¹.

5.3.18 Příprava *tert*-butyl (*L*)-{1-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)but-3-yn-2-yl]}-karbamátu (130)

Do diazofosfonátu **136** v suchém THF (10 ml) byl přidán *tert*-butanolát draselný (0,9 ekv.) a směs byla míchána 1 hodinu za stálého chlazení na -80°C. Po hodině byl přikapán aldehyd (1,1 mmol) předem rozpuštěný v THF (8 ml). Reakce byla míchána po dobu 3 hodin a poté byla ukončena přidáním nasyceného chloridu amonného (15 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3 × 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno za nízké teploty. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 95:5).

Výtěžek 30 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [40]; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.93 (s, 1H), 4.42 (s, 1H), 3.67 (d, *J* = 4.7 Hz, 2 H), 2.19 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H), 1.41 (s, 9 H), 0.86 (s, 9 H), 0.04 (s, 3 H), 0.03 (s, 3 H). **¹³C NMR** (175 MHz, CDCl₃) δ 154.78, 81.84, 79.82, 71.03, 65.28, 44.66, 28.27, 25.77, 18.27, -5.41, -5.46. **IR** (ATR) ν_{\max} 3312, 2931, 2858, 2118, 1698, 1507, 1367, 1252, 1170, 1121, 837, 778 cm⁻¹. HRMS: vypoč. pro C₁₅H₂₉NO₃SiNa [M + Na]⁺ 322.1812; nalezeno 322.1814.

5.3.19 Příprava methyl *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*O*-((*R*)-2-methoxy-2-fenyl-2-trifluormethoxy)acetyl)-*L*-serinátu (138)

Výtěžek 99 %, bílá amorfnní látka; **¹H NMR** (500MHz, CDCl₃) δ 7.60-7.20 (m, 5H), 4.88 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz), 3.65 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 1.50-1.00 (m, 9H).

5.3.20 Obecný postup přípravy karbamátů (149a-d)

Ester (**148a-d**) byl rozpuštěn v 20 ml suchého toluenu a reakční směs byla zchlazena na -60°C. Poté byl přikanylován DIBAL-H v toluenu (1M, 13 ml, 1.5 ekv.). Po 12ti hodinách míchání byla

reakce ukončena přidáním 10 ml H₂O a 10 ml MeOH. Reakce byla přivedena na RT. Poté byla směs přefiltrována přes fritu s celitem a směs byla extrahována dichlormethanem (3 × 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno za nízké teploty. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 95:5).

***tert*-butyl-(1-oxopropan-2-yl)-karbamát (149a)**

Výtěžek 50 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [70]; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ 9.56 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.22 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.33 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃), δ 199.82, 155.44, 80.25, 55.66, 28.44, 15.00. C₈H₁₅NO₃.

***tert*-butyl-(1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)-karbamát (149b)**

Výtěžek 55 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [71]; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 1.44 (s, 9H), 3.12 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz), 4.43 (m, 1H), 5.03 (s, 1H), 7.15 – 7.35 (m, 5H), 9.64 (s, 1H). ¹³C NMR (175MHz, CDCl₃) δ 28.3, 35.5, 60.9, 80.2, 127.1, 128.8, 129.7, 135.9, 155.5, 199.5.

***tert*-butyl (3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-karbamát (149c)**

Výtěžek 50 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [72]; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.65 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.26(m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.04 (d, 3H *J*= 6.8 Hz), 0.94 (d, 3H, *J*= 6.8 Hz).

***tert*-butyl (4-methyl-1-oxopentan-2-yl)-karbamát (149d)**

Výtěžek 40 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [73]; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 9.60 (s, 1H), 5.05 (d,1H), 4.30 (m, 1H), 1.50 (s, 9H), 0.98–0.92 (m, 6H).

5.3.21 Obecný postup přípravy karbamátů s alkynylovou funkční skupinou

Do diazofosfonátu **136** v suchém THF (10 ml) byl přidán *tert*-butanolát draselný (0,9 ekv.) a směs byla míchána 1 hodinu za stálého chlazení na -80°C. Po hodině byl přikapán aldehyd **149a-d** (1,1 mmol) předem rozpuštěný v THF (8 ml). Reakce byla míchána po dobu 3 hodin a poté byla ukončena přidáním nasyceného chloridu amonného (15 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3 × 20 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno za nízké teploty. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 95:5).

***tert*-butyl-(1-oxobut-3-yn-2-yl)karbamát (150a)**

Výtěžek 50 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [74]; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 4.73 (s, 1H), 4.51 (s, 1H), 2.28 (d, 1H, *J*=2.5 Hz), 1.48 (s, 9H), 1.43 (d, 3H, *J*=7 Hz). ¹³C NMR (175MHz, CDCl₃) δ 154.6, 84.6, 79.9, 70.1, 38.2, 28.4, 22.5. IR (ATR) ν_{\max} 2864, 1691, 1562, 1312, 1293, 1252, 989, 899, 722 cm⁻¹.

***tert*-butyl-(1-fenylbut-3-yn-2-yl)karbamát (150b)**

Výtěžek 56 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [52]; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.34-7.26 (m, 5H), 4.68 (br, 2H), 2.98-2.94 (m, 2H), 2.27 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 154.6, 136.4, 129.8, 128.3, 126.9, 82.9, 79.9, 72.3, 43.9, 41.8, 28.4. IR (ATR) ν_{\max} 3448, 3309, 2971, 1707, 1489, 1159 cm⁻¹.

***tert*-butyl-4-methylpent-1-yn-3-ylkarbamát (150c)**

Výtěžek 50 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [75]; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.7 (b, 1H), 4.31 (b, 1H), 2.24 (s, 1H), 1.93–1.84 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H). ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 155.1, 82.2, 79.8, 77.6, 77.2, 76.8, 71.8, 48.7, 33.1, 28.5, 18.8, 17.6. [α]_D²⁰ = +28.3 (c, 0.5, CH₂Cl₂). IR (ATR) ν_{\max} 3313, 2967, 1694, 1515, 1339, 1172, 865 cm⁻¹.

***tert*-butyl-4-methylpent-1-yn-3-yl-karbamát (150d)**

Výtěžek 55 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou [57]; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.63 (s, 1H), 4.43 (m, 1H), 2.25 (d, 1H, *J*=2.2 Hz), 1.78 (m, 1H), 1.52 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 0.94 (d, *J*=2.8 Hz). ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 154.8, 83.8, 79.9, 70.7, 45.2, 41.3, 28.4, 25.0, 22.7, 21.9.

***tert*-butyl-{1-[4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)fenyl]but-3-yn-2-yl}-karbamát (141)**

Výtěžek 30 %, bílá amorfnní látka; ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 154.61, 130.70, 128.95, 119.81, 82.97, 71.95, 60.36, 31.57, 28.31, 25.65, 22.63, 18.152, 14.18, -4.45.

5.3.22 Příprava diastereotopických derivátů pomocí pomocí (*S*)-chloridu Mosherovy kyseliny

Alkyn **151a-e** (1,0 mmol) byl rozpuštěn ve směsi TFA/DCM (5 ml). Poté byla směs odpařena na vakuové odparce. Následně byla tato směs zředěna DCM (5 ml) a byl přikapán pyridin (1,0 mmol) a ihned poté (*S*)-chlorid Mosherovy kyseliny (1,0 mmol). Směs byla míchána po dobu 2

hodin. Reakce byla ukončena přidáním vody (5 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3 × 5 ml). Organické frakce byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 9:1).

(2S)-N-(but-3-yn-2-yl)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-fenylpropanamid (153a)

Výtěžek 50 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.20-7.70 (m, 5H), 4.10 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 2.20 (s, 1H), 1.50 (d, 3H, *J*=7 Hz).

(2S)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-fenyl-N-(1-fenylbut-3-yn-2-yl)propanamid (153b)

Výtěžek 55 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.15 (m, 10H), 5.00 (q, 1H, *J*=1.7), 3.60 (s, 3H), 3.05-3.00 (d, 2H, *J*=1.7 Hz), 2.40 (s, 1H).

(2S)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-N-(4-methylpent-1-yn-3-yl)-2-fenylpropanamid (153c)

Výtěžek 59 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.50-7.20 (m, 5H), 4.66 (t, 1H, *J*=1.7 Hz), 3.60 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 2.4 (s, 1H), 2.2 (s, 1H), 1.00 (m, 12H).

3,3,3-trifluor-2-methoxy-N-(5-methylhex-1-yn-3-yl)-2-fenylpropanamid (153d)

Výtěžek 45 %, bílá amorfnní látka; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.60-7.20 (m, 5H), 4.88 (t, 1H, *J*=1.7 Hz), 3.55 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 2.35 (s, 1H), 1.50-1.00 (m, 9H).

5.3.23 Příprava 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)propan-1-onu (*O*-desmethylangolensinu) (79)

Do směsi resorcinolu (100 mg) a 2-(4-hydroxyfenyl)propanové kyseliny (158 mg) byl přidán BF₃·Et₂O (0.5 ml). Reakční směs byla zahřívána na 120 °C po dobu 10ti min a poté byla zchlazena na pokojovou teplotu. Do reakční směsi byla přidána voda (20 ml) a produkt byl extrahován ethylacetátem (3 x 50 ml). Organické frakce byly promyty brinem (3 x 100 ml) a nasyceným NaHCO₃ (3 x 100 ml), vysušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo odstraněno na vakuové odparce. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (hexan : ethylacetát 70:30).

Výtěžek 70 %, bílá amorfnní látka. Spektrální data jsou v souladu s literaturou[59]; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.78-7.76 (1H, m), 7.17-7.05 (2H, m), 6.79-6.68 (2H, m), 6.27-6.26 (1H, m), 6.23-6.22 (1H, m), 4.65 (1H, q, *J*=6.8 Hz), 1.42 (3H, d, *J*=6.8 Hz). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 206.64, 167.02, 166.05, 157.36, 134.24, 134.12, 129.60, 116.62, 113.26, 108.88, 103.71, 46.86,

19.61. **Elem. anal.** vypočteno pro $C_{15}H_{14}O_4$: C, 69.76; H, 4.46; nalezeno: C, 69.80; H, 5.47.
HRMS (TOF-ESI+) m/z vypočteno pro $C_{15}H_{14}O_4^+$ 258,0900; nalezeno 258.0890.

6 LITERATURA

1. Navari, R.M., *Management of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting Focus on Newer Agents and New Uses for Older Agents*. *Drugs*, 2013. **73**(3): p. 249-262.
2. Holý, A., *Principy bioorganické chemie ve vývoji nových antivirotik a cytostatik*. Vol. 1.vydání. 2004, Olomouc 2004.
3. Scagliotti, G.V., et al., *Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2008. **26**(21): p. 3543-3551.
4. Herbst, R.S. and W.K. Hong, *IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer*. *Seminars in Oncology*, 2002. **29**(5): p. 18-30.
5. Van Sanden, S., et al., *Comparative Efficacy of Ibrutinib Versus Obinutuzumab plus Chlorambucil in First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Matching-Adjusted Indirect Comparison*. *Advances in Therapy*, 2017. **34**(7): p. 1650-1661.
6. Lüllmann, H., *Atlas farmakologie*. GRADA Publishing.
7. Chan, S., et al., *Phase III trial of liposomal doxorubicin and cyclophosphamide compared with epirubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for metastatic breast cancer*. *Annals of Oncology*, 2004. **15**(10): p. 1527-1534.
8. Harris, L., et al., *Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma*. *Cancer*, 2002. **94**(1): p. 25-36.
9. Opletal, L., *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. 2010: Univerzita Karlova v Praze.
10. Pettitt, A.R., *Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia*. *British Journal of Haematology*, 2003. **121**(5): p. 692-702.
11. Romaguera, J.E., et al., *Ten-year follow-up after intense chemoimmunotherapy with Rituximab-HyperCVAD alternating with Rituximab-high dose methotrexate/cytarabine (R-MA) and without stem cell transplantation in patients with untreated aggressive mantle cell lymphoma*. *British Journal of Haematology*, 2010. **150**(2): p. 200-208.
12. Guan, Q., et al., *Synthesis and biological evaluation of novel 3,4-diaryl-1,2,5-selenadiazol analogues of combretastatin A-4*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014. **87**: p. 1-9.
13. Cragg, G.M., D.G.I. Kingston, and D.J. Newman, *ANTICANCER AGENTS from NATURAL PRODUCTS Second Edition Introduction*. *Anticancer Agents from Natural Products*, 2nd Edition, ed. G.M. Cragg, D.G.I. Kingston, and D.J. Newman. 2012. 1-3.
14. Monk, B.J., et al., *Randomized Phase II Evaluation of Bevacizumab Versus Bevacizumab Plus Fosbretabulin in Recurrent Ovarian, Tubal, or Peritoneal Carcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2016. **34**(19): p. 2279-+.
15. Pettit, G.R., et al., *Antineoplastic agents 442. Synthesis and biological activities of dioxostatin*. *Anti-Cancer Drug Design*, 2000. **15**(5): p. 361-371.
16. Pettit, G.R. and M.R. Rhodes, *Antineoplastic agents 389. New syntheses of the combretastatin A-4 prodrug*. *Anti-Cancer Drug Design*, 1998. **13**(3): p. 183-191.
17. Nam, N.H., *Combretastatin A-4 analogues as antimetabolic antitumor agents*. *Current Medicinal Chemistry*, 2003. **10**(17): p. 1697-1722.
18. Kaur, R., et al., *Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014. **87**: p. 89-124.
19. Lu, Y., et al., *An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site*. *Pharmaceutical Research*, 2012. **29**(11): p. 2943-2971.
20. Siebert, A., et al., *Synthesis of Combretastatin A-4 Analogs and their Biological Activities*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2016. **16**(8): p. 942-960.

21. Wu, X.X., Q.H. Wang, and W. Li, *Recent Advances in Heterocyclic Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine Binding Site*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2016. **16**(10): p. 1325-1338.
22. Pettit, G.R., G.M. Cragg, and S.B. Singh, *ANTINEOPLASTIC AGENTS .122. CONSTITUENTS OF COMBRETUM-CAFFRUM*. *Journal of Natural Products*, 1987. **50**(3): p. 386-391.
23. Pettit, G.R., et al., *ANTINEOPLASTIC AGENTS .291. ISOLATION AND SYNTHESIS OF COMBRETASTATINS A-4, A-5, AND A-6*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995. **38**(10): p. 1666-1672.
24. Pettit, G.R., et al., *ANTINEOPLASTIC AGENTS .145. ISOLATION AND STRUCTURE OF THE STRONG CELL-GROWTH AND TUBULIN INHIBITOR COMBRETASTATIN-A-4*. *Experientia*, 1989. **45**(2): p. 209-211.
25. Cushman, M., et al., *SYNTHESIS AND EVALUATION OF STILBENE AND DIHYDROSTILBENE DERIVATIVES AS POTENTIAL ANTICANCER AGENTS THAT INHIBIT TUBULIN POLYMERIZATION*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1991. **34**(8): p. 2579-2588.
26. Cushman, M., et al., *SYNTHESIS AND EVALUATION OF ANALOGS OF (Z)-1-(4-METHOXYPHENYL)-2-(3,4,5-TRIMETHOXYPHENYL)ETHENE AS POTENTIAL CYTOTOXIC AND ANTIMITOTIC AGENTS*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1992. **35**(12): p. 2293-2306.
27. Tron, G.C., et al., *Medicinal chemistry of combretastatin A4: Present and future directions*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006. **49**(11): p. 3033-3044.
28. Kamal, A., et al., *Synthesis and Biological Evaluation of Imidazo 2,1-b 1,3,4 thiadiazole-Linked Oxindoles as Potent Tubulin Polymerization Inhibitors*. *Chemmedchem*, 2014. **9**(7): p. 1463-1475.
29. El-Dakdouki, M.H., et al., *Hypoxia Activated Prodrugs of a 9-Aza-anthrapyrazole Derivative That Has Promising Anticancer Activity*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011. **54**(23): p. 8224-8227.
30. Wang, F., et al., *Synthesis and biological evaluation of diarylthiazole derivatives as antimitotic and antivascular agents with potent antitumor activity*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015. **23**(13): p. 3337-3350.
31. Zhou, J., et al., *Synthesis and antiproliferative evaluation of novel benzoimidazole-contained oxazole-bridged analogs of combretastatin A-4*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013. **68**: p. 222-232.
32. Romagnoli, R., et al., *Synthesis and Evaluation of 1,5-Disubstituted Tetrazoles as Rigid Analogues of Combretastatin A-4 with Potent Antiproliferative and Antitumor Activity*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012. **55**(1): p. 475-488.
33. Aziz, G., et al., *Combretastatin A-4 and structurally related triazole analogues induce caspase-3 and reactive oxygen species-dependent cell death in PC12 cells*. *European Journal of Pharmacology*, 2013. **703**(1-3): p. 25-32.
34. Brown, A.W., et al., *Sydnone Cycloaddition Route to Pyrazole-Based Analogs of Combretastatin A4*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016. **59**(20): p. 9473-9488.
35. Jung, E.K., E. Leung, and D. Barker, *Synthesis and biological activity of pyrrole analogues of combretastatin A-4*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016. **26**(13): p. 3001-3005.
36. Zhou, P.F., et al., *Potent Antitumor Activities and Structure Basis of the Chiral beta-Lactam Bridged Analogue of Combretastatin A-4 Binding to Tubulin*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016. **59**(22): p. 10329-10334.
37. Pirali, T., et al., *Synthesis and cytotoxic evaluation of combretafurans, potential scaffolds for dual-action antitumoral agents*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006. **49**(17): p. 5372-5376.
38. Kim, Y., et al., *Synthesis and cytotoxicity of 3,4-diaryl-2(5H)-furanones*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2002. **12**(4): p. 719-722.
39. Pour, M., et al., *3-Phenyl-5-acyloxymethyl-2H,5H-furan-2-ones: Synthesis and biological activity of a novel group of potential antifungal drugs*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2001. **44**(17): p. 2701-2706.

40. Krenk, O., et al., *Methodology for Synthesis of Enantiopure 3,5-Disubstituted Pyrrol-2-ones*. European Journal of Organic Chemistry, 2015(24): p. 5414-5423.
41. Carter, N.B., A.E. Nadany, and J.B. Sweeney, *Recent developments in the synthesis of furan-2(5H)-ones*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 2002(21): p. 2324-2342.
42. Šenel, P., *Studium vztahů struktura – antifungální aktivita u substituovaných butenolidů*. 2009, Univerzita Karlova.
43. Italiano, A., *Targeted therapies in bone and soft tissue tumours: Progress towards individualised treatment*. Oncologie, 2016. **18**(4): p. 230-234.
44. Harmon, P.A., et al., *Mechanism of the solution oxidation of rofecoxib under alkaline conditions*. Pharmaceutical Research, 2005. **22**(10): p. 1716-1726.
45. Jaiswal, G., et al., *Iron-based nanocatalyst for the acceptorless dehydrogenation reactions*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 2147.
46. Brůža, Z., *Syntéza nových derivátů kombretastatinu*. 2014.
47. Guan, Q., et al., *Direct cycle between co-product and reactant: an approach to improve the atom economy and its application in the synthesis and protection of primary amines*. Green Chemistry, 2016. **18**(21): p. 5794-5799.
48. Eldo, J., S. Heng, and E.R. Kantrowitz, *Design, synthesis, and bioactivity of novel inhibitors of E-coli aspartate transcarbamoylase*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(7): p. 2086-2090.
49. Lee, J.M., H.S. Lim, and S.K. Chung, *A short and efficient stereoselective synthesis of all four diastereomers of sphingosine*. Tetrahedron-Asymmetry, 2002. **13**(4): p. 343-347.
50. McMurry, J., *Organic Chemistry*. 2011: Brooks/Cole Cengage Learning.
51. Das, B., K.R. Reddy, and P. Thirupathi, *A simple, efficient and highly selective deprotection of t-butyldimethylsilyl (TBDMS) ethers using silica supported sodium hydrogen sulfate as a heterogeneous catalyst*. Tetrahedron Letters, 2006. **47**(33): p. 5855-5857.
52. Proteau-Gagne, A., et al., *Systematic replacement of amides by 1,4-disubstituted 1,2,3 triazoles in Leu-enkephalin and the impact on the delta opioid receptor activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013. **23**(19): p. 5267-5269.
53. Tam, A., et al., *Protein prosthesis: 1,5-disubstituted 1,2,3 triazoles as cis-peptide bond surrogates*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(42): p. 12670-+.
54. Yin, H. and A.D. Hamilton, *Strategies for targeting protein-protein interactions with synthetic agents*. Angewandte Chemie-International Edition, 2005. **44**(27): p. 4130-4163.
55. Gellman, S.H., *Foldamers: A manifesto*. Accounts of Chemical Research, 1998. **31**(4): p. 173-180.
56. Ko, E., et al., *Universal Peptidomimetics*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(3): p. 462-477.
57. Slootweg, J.C., et al., *Semi-synthesis of biologically active nisin hybrids composed of the native lanthionine ABC-fragment and a cross-stapled synthetic DE-fragment*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014. **22**(19): p. 5345-5353.
58. Navratilova, L., et al., *Interaction of soy isoflavones and their main metabolites with hOATP2B1 transporter (vol 391, pg 1063, 2018)*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2018. **391**(10): p. 1073-1073.
59. Goto, H., Y. Terao, and S. Akai, *Synthesis of Various Kinds of Isoflavones, Isoflavanes, and Biphenyl-Ketones and Their 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical-Scavenging Activities*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2009. **57**(4): p. 346-360.
60. Gupta, A. and S. Ray, *Simple and Efficient Synthesis of (+/-)-Equol and Related Derivatives*. Synthesis-Stuttgart, 2008(23): p. 3783-3786.
61. Wahala, K. and T.A. Hase, *EXPEDIENT SYNTHESIS OF POLYHYDROXYISOFLAVONES*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 1991(12): p. 3005-3008.

62. Navratilova, L., et al., *Interaction of soy isoflavones and their main metabolites with hOATP2B1 transporter*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2018. **391**(10): p. 1063-1071.
63. Minato, H. and T. Nagasaki, *A NEW SYNTHETIC METHOD FOR FURAN COMPOUNDS*. Chemistry & Industry, 1965(21): p. 899-&.
64. Jaiswal, G., et al., *Sustainable iron-catalyzed direct imine formation by acceptorless dehydrogenative coupling of alcohols with amines*. Green Chemistry, 2016. **18**(11): p. 3232-3238.
65. Baldwin, J.E., S.C. Mackenzieturner, and M.G. Moloney, *THE SYNTHESIS OF SUBSTITUTED PYRROLIDINES BY A SAMARIUM(II) IODIDE-MEDIATED RING-CLOSURE .1*. Tetrahedron, 1994. **50**(31): p. 9411-9424.
66. Bhowmik, S. and S. Batra, *Morita-Baylis-Hillman Approach toward Formal Total Synthesis of Tamiflu and Total Synthesis of Gabaculine*. European Journal of Organic Chemistry, 2013. **2013**(31): p. 7145-7151.
67. Ryu, T., et al., *Synthesis of 2-Aryl-2H-benzotriazoles from Azobenzenes and N-Sulfonyl Azides through Sequential Rhodium-Catalyzed Amidation and Oxidation in One Pot*. Organic Letters, 2014. **16**(11): p. 2810-2813.
68. Zanatta, S.D., *The Bestmann-Ohira reagent for the conversion of aldehydes into terminal alkynes*. Australian Journal of Chemistry, 2007. **60**(12): p. 963-963.
69. Nahrwold, M., et al., *"Clicktophycin-52": A Bioactive Cryptophycin-52 Triazole Analogue*. Organic Letters, 2010. **12**(5): p. 1064-1067.
70. De Rosa, M., et al., *Design, synthesis and in vitro biological evaluation of oligopeptides targeting E-coli type I signal peptidase (LepB)*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2017. **25**(3): p. 897-911.
71. Jedrzejczak, K., et al., *Synthesis and biological activity of cyclolinopeptide A analogues modified with gamma(4)-bis(homo-phenylalanine)*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2017. **25**(16): p. 4265-4276.
72. Kitahata, S., et al., *Design, Synthesis, and Biological Activity of Isosyringolin A*. Organic Letters, 2016. **18**(9): p. 2312-2315.
73. Yang, X.M., et al., *Synthesis of beta-secretase inhibitors containing a hydroxyethylene dipeptide isostere*. Synthetic Communications, 2007. **37**(1-3): p. 9-24.
74. Majhail, M.K., P.M. Ylioja, and M.C. Willis, *Direct Synthesis of Highly Substituted Pyrroles and Dihydropyrroles Using Linear Selective Hydroacylation Reactions*. Chemistry-a European Journal, 2016. **22**(23): p. 7879-7884.
75. Rajagopal, B., et al., *Cu(I)-Catalyzed Synthesis of Dihydropyrimidin-4-ones toward the Preparation of beta- and beta(3)-Amino Acid Analogues*. Journal of Organic Chemistry, 2014. **79**(3): p. 1254-1264.

7 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ, ÚČAST NA KONFERENCÍCH

Účast na vědeckých konferencích:

XX. Studentská vědecká konference, **Hradec Králové**, (4. 4. 2012)

Aktivní účast: Prezentace práce - Synthesis of derivatives of Combretastatin

Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – "Liblice 2012"; **Lázně Bělohrad**, Česká Republika (2. 11. – 4. 11. 2012)

Aktivní účast: Poster- New Derivatives of Combretastatin

Balticum Organicum Syntheticum 2014 (BOS2014); **Vilnius**, Lithuania (6. 7. – 9. 7. 2014)

Aktivní účast: Poster- New Derivatives of Combretastatin

Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – "Liblice 2014"; **Lázně Bělohrad**, Česká Republika (7. 11. – 9. 11. 2014)

Aktivní účast: Poster - Synthesis of novel α,β -diphenyl furanones as potential antitumorous and antimicrobial agents

Frontiers Meeting in Medicinal Chemistry (FMC 2015); **Antwerp**, Belgium (14. 9. – 16. 9. 2015)

Aktivní účast: Poster Synthesis of novel α,β -diphenyl furanones as potential antitumorous and antimicrobial agents

Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – "Liblice 2015"; **Olomouc**, Česká Republika (6. 11. – 8. 11. 2015)

Aktivní účast: Poster - Synthesis of novel α,β -diphenyl furanones as potential antitumorous and antimicrobial agents

Syntéza a analýza léčiv; **Hradec Králové**; 22. 6. – 24. 6. 2016

Aktivní účast: Poster - Synthesis of novel α,β -diphenyl furanones as potential antitumorous and antimicrobial agents

XXVII European Colloquium on Heterocyclic Chemistry - **Amsterdam**, Netherlands – (3. 7. – 6. 7. 2016)

Aktivní účast: Poster - Synthesis of novel α,β -diphenyl furanones as potential antitumorous and antimicrobial agents

Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – Liblice 2016; Lázně Bělohrad, Česká Republika (11. 11. - 13. 11. 2016)

Aktivní účast: Poster - Synthesis of novel α,β -diphenyl furanones as potential antitumorous and antimicrobial agents

7th Paul Ehrlich MedChem EuroPhD Network Symposium, Vienna, Austria (25. 8. - 27. 8. 2017)

Aktivní účast: Poster - Synthesis of novel α,β -diphenyl furanones as potential antitumorous and antimicrobial agents

Seznam publikovaných prací:

Publikace v časopise European Journal of Medicinal Chemistry (IF 4.519)

P. Horký, M. Voráčová, K. Konečná, D. Sedlák, P. Bartůněk, J. Vacek, M. Pour, *Nontoxic combretafuranone analogues with high in vitro antibacterial activity*, European Journal of Medicinal Chemistry, 143 (2017) 843- 853.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.078>

Publikace v časopise Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (IF 2.558)

L. Navrátilová, L. Applová, P. Horký, P. Mladěnka, P. Pávek, M. Pour, F. Trejtnar, *Interaction of soy isoflavones and their metabolites with hOATP2B1 transporter*

<https://doi.org/10.1007/s00210-018-1528-y>

Disertační práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 401.