

**Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**Syntéza prekursorů biologicky aktivních laktonů II.**

**Diplomová práce**

**Lenka Finková**

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Cíl diplomové práce</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>7</b>
<b>3.1.</b>	<b>Virová onemocnění a jejich dostupná terapie</b>	<b>7</b>
<b>3.1.1.</b>	Chřipkové viry (influenzaviry)	<b>8</b>
<b>3.1.2.</b>	Varicella zoster virus	<b>9</b>
<b>3.1.3.</b>	Cytomegalovirus	<b>10</b>
<b>3.1.4.</b>	Herpes simplex virus	<b>11</b>
<b>3.1.5.</b>	Virus Epstein-Barrové	<b>11</b>
<b>3.1.6.</b>	Virus hepatitidy typ A	<b>11</b>
<b>3.1.7.</b>	Virus hepatitidy typ B	<b>11</b>
<b>3.1.8.</b>	Virus hepatitidy typ C	<b>13</b>
<b>3.1.9.</b>	Human imunnodeficiency virus (HIV)	<b>14</b>
<b>3.1.10.</b>	Virus varioly (pravých neštovic)	<b>16</b>
<b>3.1.11.</b>	Ostatní virová onemocnění	<b>17</b>
<b>3.2.</b>	<b>Vývoj nových antivirotik obsahujících ve své struktuře lakton</b>	<b>18</b>
<b>3.2.1.</b>	Antivirotika obsahující ve své struktuře lakton izolovaná z přírodních zdrojů	<b>19</b>
<b>3.2.2.</b>	Synteticky připravená antivirotika obsahující ve své struktuře lakton	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>37</b>
<b>4.1.</b>	<b>Příprava pyridinium-hydrobromid perbromidu</b>	<b>38</b>
<b>4.2.</b>	<b>Příprava methyl-(E)-2,3-dibromakrylátu</b>	<b>39</b>
<b>4.3.</b>	<b>Příprava methyl-(E)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoátu Sonogashirovým couplingem</b>	<b>40</b>
<b>4.4.</b>	<b>Příprava methyl-(E)-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoátu Sonogashirovým couplingem</b>	<b>41</b>
<b>4.5.</b>	<b>Příprava methyl-(E)-5-(3-aminofenyl)-2-brompent-2-en-3-ynoátu Sonogashirovým couplingem</b>	<b>43</b>
<b>4.6.</b>	<b>Příprava methyl-(E)-5-(3-acetylaminofenyl)-2-brompent-2-en-3-ynoátu Sonogashirovým couplingem</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>Diskuse</b>	<b>45</b>

<b>6.</b>	<b>Závěr</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Abstrakt</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Přílohy</b>	<b>51</b>
<b>9.</b>	<b>Použitá literatura</b>	<b>56</b>

### **Seznam zkratk**

**ADA:** adenindeaminasa

**AIDS:** acquired immune deficiency syndrome

**CMV:** cytomegalovirus

**EBV:** virus Epstein-Barrové

**HAV:** virus virové hepatitidy A

**HBV:** virus virové hepatitidy B

**HCV:** virus virové hepatitidy C

**HIV:** human imunnodeficiency virus

**HRV:** rhinovirus

**HSV:** herpes simplex virus

**INF $\alpha$ :** interferon  $\alpha$

**PBP:** pyridinium-hydrobromid perbromidu

**PMEA:** 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin

**PMEG :** 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]guanin

**RSV:** respirační syncytiální virus

**VZV:** varicella zoster virus

**VZV TK $+$  :** varicella zoster virus thymidinkinasa-pozitivní

**VZV TK $-$  :** varicella zoster virus thymidinkinasa-negativní

**Děkuji Mgr. Martě Kučerové, Ph.D. za laskavé vedení a odbornou pomoc při vypracovávání diplomové práce.**

**Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.**

## 1. Úvod

Kolektiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy je začleněn do Výzkumného centra Nová antivirotika a antineoplastika na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR. Centrum vzniklo v roce 2005 s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy. Jeho cílem bylo spojení dosud volně spolupracujících skupin a laboratoří pracujících v řadě oborů (farmaceutická chemie, organická syntéza, biochemie, molekulární a buněčná biologie, molekulární virologie a onkologie) po celé České republice do jednoho subjektu a tím urychlit jejich společný výzkum na poli nových virostatik a protinádorových léčiv a zvýšit tak jejich konkurenceschopnost na mezinárodní úrovni.

Subjekty sdružené v centru Nová antivirotika a antineoplastika jsou Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Přírodovědecká fakulta a Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze a Ústav experimentální medicíny AV ČR.

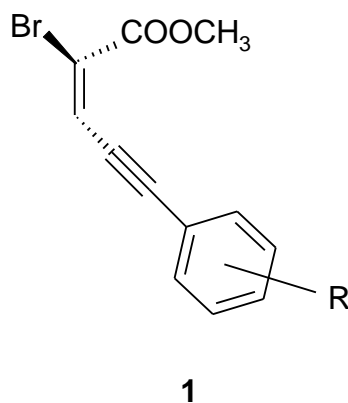
Kolektiv z Farmaceutické fakulty je do centra začleněn pod názvem Přírodní látky a transport léčiv. Zabývá se dvěma oblastmi výzkumu. První částí je výzkum zaměřený na biologicky aktivní přírodní látky. Druhá skupina se zabývá některými moderními metodami distribuce a podání léčiv.

V oblasti přírodních látek je výzkum zaměřen na vyhledávání nových předlohových struktur s potenciálně antineoplastickým účinkem, zejména těch, které obsahují laktonovou funkci, a následně vývoj syntéz těchto sloučenin. Ve spolupráci s dalšími laboratořemi probíhají rozsáhlé biologické testy a hodnocení vztahů struktura – účinek syntetizovaných sloučenin. V souvislosti s vlastním výzkumem se pracovníci fakulty rovněž zabývají vývojem látek proti oportunním infekcím způsobených patogeními houbami u pacientů s nakažou HIV a pacientů se sníženou imunitou.

Druhá část výzkumného týmu se zabývá transportem účinných látek, modulací distribuce vybraných sloučenin a hledáním nových lékových forem. Zvláštní pozornost je věnována akcelerantům transdermální penetrace, látkám, které významně urychlují průnik xenobiotik přes kůži.

## 2. Cíl diplomové práce

Jak již bylo výše uvedeno, jednou z výzkumných činností probíhajících na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové je syntéza bioaktivních laktonů s potenciálními účinky antivirovými, antineoplastickými i antifungálními. Na katedře probíhá syntéza laktonů z řady 5-fenylbutenolidů substituovaných na benzenovém jádře. Cílem mé diplomové práce bylo navázat na předchozí práci zabývající se syntézou prekursorů potenciálně bioaktivních laktonů a připravit sérii sloučenin odvozených od methyl-(*E*)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoátu (**1**, R = H), příp. optimalizovat podmínky syntéz.



### **3. Teoretická část**

#### **3.1. Virová onemocnění a jejich dostupná terapie**

Viry jsou částice schopné přenášet nukleové kyseliny (DNA, RNA) z jedné buňky do druhé a jejich životní cyklus probíhá výhradně v hostitelské buňce. Způsobují řadu onemocnění od lehkých jako je běžná rýma (rhinoviry) až po závažná onemocnění, která mohou vést až ke smrti (HIV, virová hepatitida aj.) a mohou přerůst v epidemii až pandemii. V dnešní době je v popředí zájmu pandemie způsobená HIV a hrozící další pandemie chřipky, která např. v roce 1918 zabila 20 mil. lidí, tedy více než 1. světová válka.

Ze způsobu rozmnožování a života viru vyplývá i složitá problematika léčby chorob jím způsobených. Jestliže chceme ovlivnit replikaci viru, musíme zákonitě zasáhnout do nakažené hostitelské buňky. V případě úplné likvidace virové nákazy je zapotřebí zničit i infikované buňky obvykle s pomocí aktivace imunitního systému. To je však možné jen u akutně probíhajících onemocněních. U chronických onemocnění, jako jsou herpesvirové infekce, AIDS, hepatitidy B a C ad., můžeme docílit pouze zbrzdění či zastavení progresu nemoci popř. snížení projevů a důsledků nemoci. Tak je tomu u pásového oparu (virus varicella zoster), zde jde o snížení bolestivých projevů, tak i u zmiňovaných hepatitid, u kterých se snažíme zabránit vzniku cirhózy jater a hepatocelulárního karcinomu. Nejúčinnější strategií boje s viry je vývoj očkovací vakcíny. Díky očkování nebyl již třicet let zaznamenán případ pravých neštovic, v České republice nehrozí po pokousání psem vzteklina a výskyt řady dalších nemocí se stal pouze sporadickým. Ale i očkování má svá úskalí. Je třeba proočkovat celou populaci, aby byly virové choroby vymýceny. V řadě případů je třeba přeočkování. Například chřipková vakcína je účinná na některé podtypy zhruba po dobu jednoho roku, což je dáno rychlým vznikem nových mutací viru chřipky. Problém vzniku mutací znesnadňuje též vývoj vakcíny proti hepatitidě typu C. Proto je i nadále úkolem moderní medicíny vyvíjet nová léčiva, vakcíny a strategie účinné v boji s viry.<sup>1</sup>

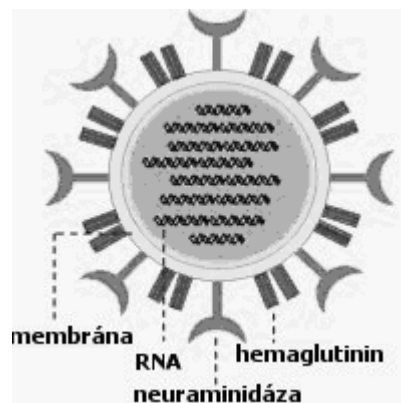
V následujících kapitolách je uveden přehled některých virových onemocnění a antivirotik používaných k jejich terapii.

### 3.1.1. Chřipkové viry (influenzaviry)

Viry chřipky patří mezi orthomyxoviry. Existují tři druhy: A (napadá savce včetně člověka), B a C (jen lidské).

Virion má dva hlavní povrchové proteiny. Hemagglutinin (H) zprostředkovává vazbu mezi virem a receptorem na povrchu buněk. Je cílem hemaglutinačných protilátek, ale je velmi variabilní. Druhým proteinem je neuramidáza (N) umožňující uvolnění virionů z hostitelské buňky. Podle těchto proteinů mají chřipkové viry své názvy, např. známý virus ptačí chřipky H5N1.

Povrchové antigeny viru chřipky:



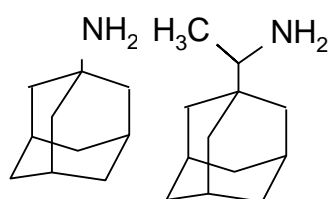
Chřipka má průměrnou morbiditu 10 % u dospělé populace a 30 % u dětí. V České republice je každoročně hlášeno okolo jednoho milionu případů. Epidemie se díky bodovým mutacím vyskytují ve dvou- až tříletých cyklech. Pandemie, které se mohou opakovat každých 10 – 40 let, způsobuje typ A. Nebezpečná je hlavně pro starší věkové kategorie nad 65 let a pro nemocné, hlavně s onemocněním kardiopulmonárního systému.

Kromě symptomatické léčby existuje dnes možnost použití chemoterapeutik. Amantadin (2) a rimantadin (3) jsou účinné pouze na typ A, zkracují trvání nemoci a mohou se použít i profylakticky, ale v tomto případě se musí užívat po celou dobu trvání epidemie. Na amantadin i rimantadin vzniká rychle rezistence. Novějšími léky jsou inhibitory neuramidasy zanamivir (4), který se vyrábí ve formě aerosolu, a oseltamivir (5) určený k perorální léčbě. Oba preparáty jsou účinné na typ A i B.<sup>1</sup>

Vakcíny se každoročně obměňují na základě virů převažujících v předcházejícím roce. Vakcinace se tedy musí každý rok opakovat.



Struktura antivirotik, používaných k léčbě chřipky:

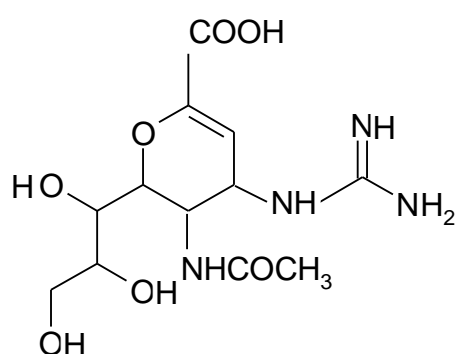


**2**

amantadin

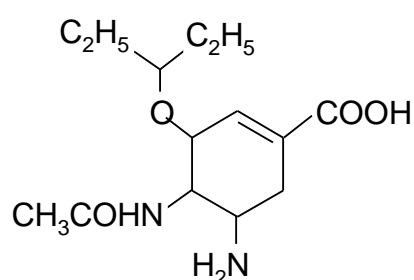
**3**

rimantadin



**4**

zanamivir



**5**

oseltamivir

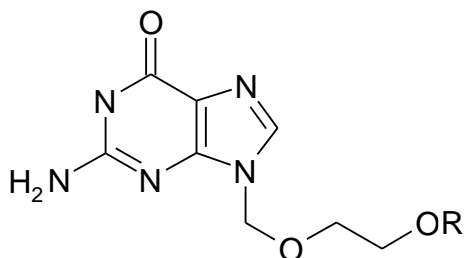
### 3.1.2. Varicella zoster virus

Varicella zoster virus (VZV) patří mezi herpetické viry a způsobuje v dětském věku poměrně neškodné onemocnění nazývané plané neštovice (výskyt v ČR asi 40 tisíc případů ročně). Virus po té přetrvává v senzitivních gangliích mozkových i míšních nervů. V dospělosti může proto dojít k reaktivaci viru a ke vzniku vleklého a bolestivého onemocnění nazývaného pásový opar (výskyt v ČR asi 6 tisíc případů ročně).<sup>2</sup>

U závažnějších forem pásového oparu se vedle symptomatické léčby přistupuje k terapii aciklovirem (**6**), valaciklovirem (**7**) nebo famciklovirem (**8**). Terapie zkracuje dobu výsevu vyrážky, brání dalšímu rozsevu a v akutní fázi snižuje intenzitu bolestí.<sup>3</sup>

U nás není očkování rozšířené. V zahraničí se používá oslabená vakcína, kterou lze očkovat i pacienty s oslabenou imunitou, u nichž se může též využít pasivní imunizace protilátkami.

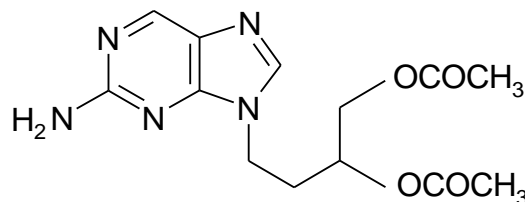
Struktura antivirotik používaných v léčbě pásového oparu:



**6, 7**

R = H aciklovir

R = L-Val valaciklovir



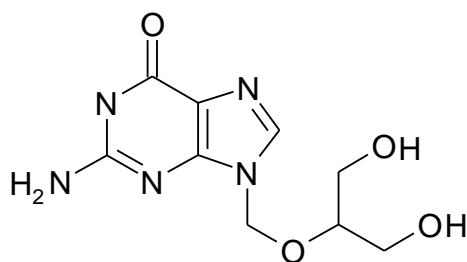
**8**

famciklovir

### 3.1.3. Cytomegalovirus

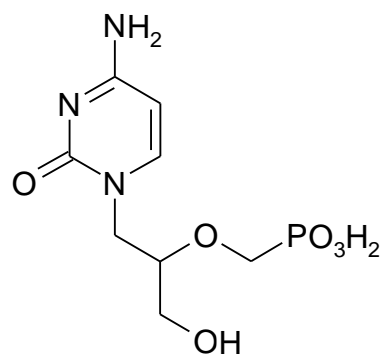
Cytomegalovirus (CMV) je dalším ze skupiny herpetických virů, který též perzistuje celoživotně v organismu. Běžně však nezpůsobuje závažná onemocnění. Nebezpečný je pro pacienty po transplantaci a nemocné AIDS, kde může vyvolat kolitidu, retinitidu i pneumonii. V těchto případech je dostupná terapie ganciklovirem (**9**), popřípadě cidofovirem (**10**), vyvinutým u nás prof. Holým, je možné podávat specifický cytomegalovirový imunoglobulin.<sup>1,3</sup>

Struktura antivirotik používaných k léčbě infekcí vyvolaných CMV:



**9**

ganciklovir



**10**

cidofovir

#### **3.1.4. Herpes simplex virus**

Herpes simplex virus (HSV) se vyskytuje ve dvou typech, HSV-1 se nazývá labiální, pro svou obvyklou lokalizaci na rtu a HSV-2 vyvolává kožně-slizniční projevy v oblasti genitálu, proto se mu říká genitální. Primoinfekce probíhá většinou asymptomaticky. Virus perzistuje v regionálních nervových gangliích a asi u 30 % nakažených způsobuje recidivu. Ta se nejčastěji projevuje jako opar rtu nebo genitálu, v těžších případech jako keratokonjunktivitida či eczema herpeticum, která vzniká při inokulaci HSV do kůže postižené ekzémem. Nebezpečná je infekce u novorozenců, kdy může dojít ke generalizované infekci s postižením mozku a vnitřních orgánů. Generalizovaná infekce může nastat i u nemocných AIDS.<sup>3</sup>

Při závažných stavech lze využít systémové terapie aciklovirem (6), valaciklovirem (7) a famciklovirem (8).

#### **3.1.5. Virus Epstein-Barrové**

Virus Epstein-Barrové (EBV) způsobuje infekční mononukleózu. Infekce probíhá různě, nejčastěji se projeví jako povlaková angína s oboustranným zduřením podčelistních a krčních uzlin. Komplikací je postižení jater, vzácně myokardu či útlum krvetvorby. Virus opět přetrvává v těle celoživotně. Specifická léčba neexistuje, sekundární bakteriální infekce se léčí antibiotiky.<sup>3</sup>

#### **3.1.6. Virus hepatitidy typ A**

Virus lidské žloutenky typu A patří mezi RNA viry a nákaza se šíří fekoorální cestou. U dětí probíhá asymptomaticky, zatímco u dospělých se ve většině případů klinicky projeví. Po nákaze vzniká doživotní imunita. Osobám, které přišly do přímého styku s infikovaným, je třeba podat profylakticky lidský imunoglobulin.<sup>3</sup> Je možné se nechat očkovat, pro celoživotní imunitu je potřeba přeočkování po 6 – 18 měsících. Specifická chemoterapie neexistuje.

#### **3.1.7. Virus hepatitidy typ B**

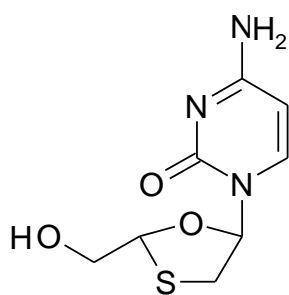
Virus žloutenky typu B (HBV) je DNA virus z čeledi Hepadnaviridae. Přenos se děje krví, tedy pohlavním stykem, transfúzí, společnou injekční jehlou či jiným kontaktem krve s krví nakaženého. Uvádí se, že nositelem viru je asi 5 % světové populace.<sup>2,3</sup> Nebezpečí hepatitidy typu B spočívá v přechodu do chronicity (asi v 5 %

případů) s následnou cirhózou jater a v nejhorším případě může vést až k hepatocelulárnímu karcinomu.

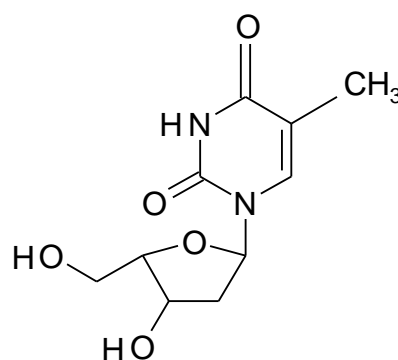
V České republice je povinné očkování dětí do 1 roku proti viru hepatitidy B. Očkování též probíhá u rizikových osob, jako je např. zdravotnický personál. K dispozici jsou rekombinantní vakcíny aplikované ve třech dávkách.

Terapie chronických forem spočívá v první řadě v subkutánním podávání interferonu alfa (INF- $\alpha$ ). Z virostatik je lékem volby inhibitor virové polymerasy lamivudin (**11**). Dalším již registrovaným lékem je telbivudin (**12**). Lamivudin ani telbivudin nejsou dle nových amerických doporučení z roku 2007 vhodné pro dlouhodobou léčbu nemocných s chronickou infekcí HBV vzhledem k vysokému riziku vzniku rezistentních mutant virů během léčby.<sup>4</sup> Pacienti s aktivní chronickou hepatitidou či progredující jaterní cirhózou jsou indikováni k dlouhodobé časově neomezené léčbě, jejímž cílem je dlouhodobě suprimovat replikaci HBV a zastavit či potlačit progresi jaterního onemocnění. Lékem volby pro dlouhodobou terapii je adefovir, v terapeutických dávkách má minimum nežádoucích účinků, je účinný i při rezistenci na lamivudin. Mutanty rezistentní na adefovir vznikají jen u 3 % léčených pacientů po jednom roce léčby. Používá se adefovir dipivoxil (**13**). Novějším lékem je entecavir (**14**), u kterého je pravděpodobnost tvorby a selekce rezistentních mutant výrazně potlačena. Jejich nevýhodou je však vysoká cena.<sup>5</sup>

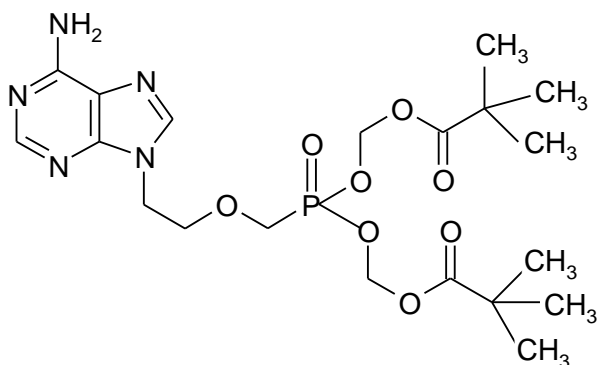
Struktura antivirotik používaných v léčbě hepatitidy B:



**11**  
lamivudin

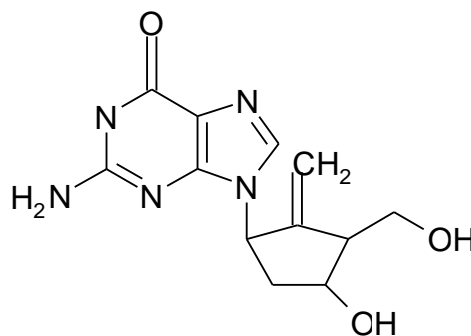


**12**  
telbivudin



13

adefovir dipivoxil



14

entecavir

### 3.1.8. Virus hepatitidy typ C

Virus hepatitidy typu C (HCV) je DNA virus z čeledi Flaviviridae. Nemoc většinou přechází do chronicity a je zde velké nebezpečí cirhózy jater, která se vyvine u 20 – 30 % infikovaných, a hepatocelulárního karcinomu, vyskytujícího se u 1 – 3 % nemocných.<sup>2</sup> Hepatitida typu C je nejčastější příčinou transplantace jater.

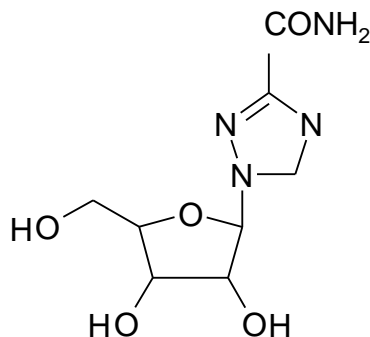
Výskyt je celosvětový, infikováno je cca 170 milionů osob, nejvíce je rozšířena v Japonsku, na Středním východě, v Africe a jižní Evropě. V posledních letech je v České republice evidováno několik stovek akutních a chronických onemocnění (údaje jsou nepochybně značně podhodnoceny).<sup>2</sup> Rozšířena je hlavně mezi narkomany a dialyzovanými, což je dáno způsobem přenosu viru, který se děje převážně parenterální cestou (transfúze krve a krevních derivátů, kontaminované jehly a nástroje), méně pak sexuálním stykem.

U chronické formy hepatitidy typu C je u pacientů s vysokým rizikem vzniku karcinomu doporučena kombinovaná léčba IFN- $\alpha$  s antivirotikem ribavirinem (15). Tato kombinace má větší účinnost než léčba samotným interferonem.

Stále se nepodařilo vyvinout účinnou vakcínu. Brání tomu především vysoká variabilita v genomu viru a rychlý vznik nových mutací. Kromě genetické variability jsou u HCV další obtíže, zahrnující slabou primární imunitní odpověď na infekci a reinfekci u jedinců, kteří se předtím setkali s virem. Typ imunitní odpovědi, která vytváří adekvátní ochranu proti HCV je proto nejasná, i když existuje domněnka, že protilátky, které interferují s iniciální vazbou viru na hostitelskou buňku, hrají v tomto procesu významnou roli. Četné studie ukazují, že imunitní odpověď může být zvýšena oligonukleotidovou sekvencí vpravenou přímo do organismu, obvykle myši. Další studie zaznamenávají, že by imunizace DNA vakcínou kódující jadrový

protein HCV mohla u genově upravených myší vést ke zvýšení pozorované imunitní odpovědi na infekci rekombinantním virem kravských neštovic vystavující stejný antigen.<sup>6</sup> Přes veškeré snahy dosud není k dispozici účinná vakcína.

Struktura ribavirinu:



**15**

ribavirin

### 3.1.9. Human imunnodeficiency virus (HIV)

HIV patří mezi retroviry, což znamená, že pomocí enzymu reverzní transkriptasy přepisuje RNA do DNA, která se dále integruje do genomu hostitelské buňky. Jsou známy dva typy HIV1 a HIV2, přičemž HIV2 se vyskytuje především v západní Africe, zatímco HIV1 se vyskytuje v populaci celého světa. HIV napadá CD4+ T4 lymfocyty a makrofágy. Onemocnění má tři fáze. V první fázi po infikování virem se mohou objevit příznaky podobné chřipce, následuje latentní fáze trvající 6 měsíců až 10 let, v důsledku snížení počtu lymfocytů je pacient v poslední fázi onemocnění náchylnější k jiným infekčním onemocněním, v této fázi již hovoříme o AIDS, v závěru nemoci pacienti umírají na různé oportunní infekce. Způsob přenosu je všeobecně známý, jedná se o přenos krví infikovaného jedince do krve druhé osoby. Celosvětově jsou vyvíjeny programy pro zabránění šíření infekce HIV. Největší problém představuje tato nemoc v Africe. Celosvětově se jedná o pandemii, nakaženo je několik desítek milionů lidí.<sup>1</sup>

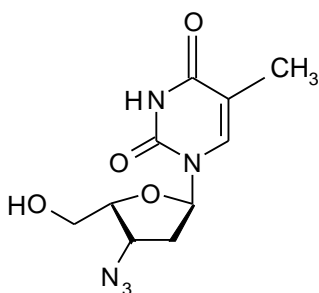
Po celém světě jsou vyvíjena léčiva, která zpomalují přechod z latentní fáze do AIDS, prodlužují tak život a zlepšují kvalitu života nemocných. Zatím není možno pacienta zcela vyléčit. Dnes používaná antivirotika jsou ze skupiny nukleosidových analogů a inhibitorů reverzní transkriptasy.

Mnoho nukleosidových analogů vykazuje aktivitu proti HIV, jako jsou zidovudin (**16**, AZT), zalcitabin (**17**, ddC), didanosin (**18**, ddI), stavudin (**19**, d4T),

lamivudin (**11**, 3TC) a abakavir (**20**, ABC). Aktivními metabolity těchto léčiv jsou 5'-trifosforylované deriváty, které se tvoří postupnou fosforylací katalyzovanou enzymy hostitelské buňky a které reprezentují účinné kompetitivní inhibitory virové reverzní transkriptasy. Navíc mohou tyto 5'-trifosforylované deriváty inkorporací do virového genomu ukončit prodlužování řetězce virové DNA.<sup>7</sup> Používání L-nukleosidů velice vzrostlo díky jejich dobré biologické aktivitě a menší toxicitě ve srovnání s D-nukleosidovými analogy. Nicméně, toxicita a výskyt nových rezistentních mutantů viru představuje kritický problém v použití těchto chemoterapeutik.<sup>8</sup> Avšak stále je základním lékem v terapii všech forem HIV zidovudin v časté kombinaci s didanosinem. Mezi inhibitory reverzní transkriptasy patří sachinavir, indinavir a ritonavir. Strukturně jsou to analogy peptidů, ve své molekule mají peptidickou vazbu, ale nejsou složeny výhradně z aminokyselin.

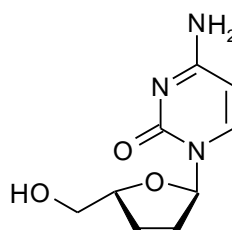
Vědci se snaží vyvinout vakcínu účinnou proti HIV, ale v nejbližších letech se nejeví reálná.

Struktura antivirotek používaných k léčbě infekcí HIV:



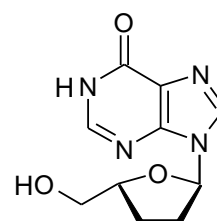
**16**

zidovudin



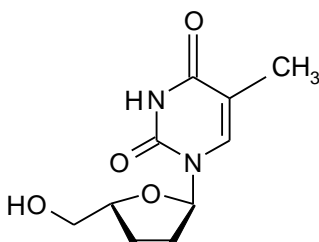
**17**

zalcitabin



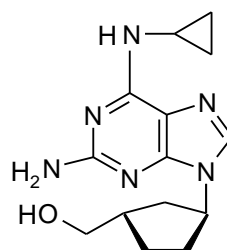
**18**

didanosin



**19**

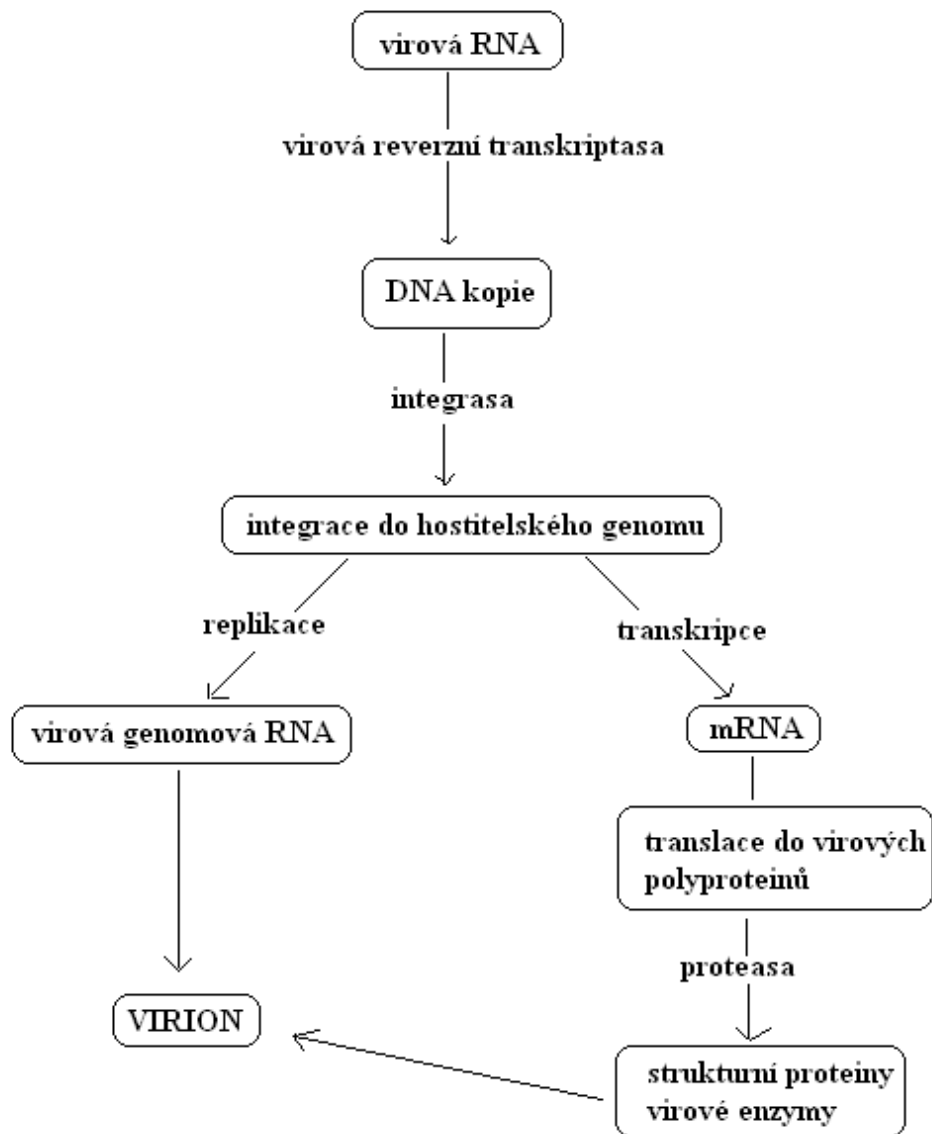
stavudin



**20**

abacavir

Replikace retrovirů:



### 3.1.10. Virus varioly (pravých neštovic)

Virus varioly patří mezi poxviry. Jak už bylo zmíněno, po zavedení plošného očkování proti pravým neštovicím, byla tato choroba plně eradikována. Pro případ, že by došlo k novému výskytu viru varioly, byly kultury různých kmenů viru uloženy v laboratořích v USA, tehdejším Sovětském svazu a ve Velké Británii. Kultury měly být po 25 letech zlikvidovány. Nedošlo k tomu z obavy, že by mohlo dojít k ukradení viru z laboratoří v Sovětském svazu a ty pak padly do rukou



teroristů. Pro případ teroristického útoku biologickými zbraněmi, jsou kultury viru varioly nadále k dispozici pro tvorbu vakcíny.

V USA byla obnovena výroba vakcíny, hledají se léky. Jako zatím nejúčinnější se jeví náš cidofovir (**10**), zvláště v aerosolové formě, který by mohl být použit profylakticky, a jeho neutrální profarmaka s hydrofobním esterovým zbytkem, která v buňce uvolňují cidofovir, jako např. alkoxyalkylester.<sup>1</sup>

### **3.1.11. Ostatní virová onemocnění**

Řada virových nákaz je pro nás exotická, v České republice se vyskytují pouze jako onemocnění zavlečená cizinci či lidmi, kteří se vrátili ze zemí, kde se tyto nemoci běžně vyskytují.

Patří mezi ně především viry vyvolávající hemoragické horečky, jako jsou Lassa, Ebola, argentinská, bolivijská a krymská hemoragická horečka, žlutá zimnice, horečka Dengue a další. Onemocnění má obvykle rychlý průběh i vysokou smrtnost. Proti dvěma posledním horečkám je možné se před cestou do oblastí výskytu nechat očkovat.

V ČR je díky systému povinného očkování řada nemocí eradikována, provádí se vakcinace proti viru dětské obrny, zarděnek, příušnic, spalniček a hepatitidě typu B. Dnes je též dostupná vakcína proti papillomavirům, které jsou jednou z příčin nádoru děložního čípku. Již delší dobu je možné se nechat očkovat proti viru klíšťové encefalitidy, viru hepatitidy typu A, chřipková vakcína byla zmíněna v příslušné kapitole.

Známým virovým onemocněním je rýma způsobená rinoviry. Významnými patogeny zvláště v rozvojových zemích jsou rotaviry, které mají na svědomí průjemová onemocnění zvláště kojenců a malých dětí. Enteroviry jsou hlavními původci virových meningitid a nespecifických horečnatých onemocnění u dětí, ale způsobují i respirační onemocnění, myokarditidy a konjunktivitidy. Společným znakem těchto infekcí je zatím absence specifické chemoterapie. Proto je dnes léčba pouze symptomatická.<sup>1,3</sup>

### 3.2. Vývoj nových antivirotik obsahujících ve své struktuře lakton

Vzhledem k stále rostoucímu počtu nakažených virem HIV, jehož celosvětové rozšíření dosahuje úrovně pandemie, je pozornost vývoje nových antivirotik zaměřena hlavně na hledání nových terapeutik proti tomuto viru. Velké množství prací se zaměřuje na výzkum léčiv účinných proti virům hepatitid, především hepatitidy typu C. Ale uspokojivá není ani situace dalších virových onemocnění a to především z důvodu rozvoje rezistence virů na stávající antivirotika. Terapie chybí též u řady tropických virových nákaz, jako jsou hemoragické horečky. Stále pokračuje vývoj antivirotik pro použití při infekcích herpesviru.

Vývoj nových antivirotik se zaměřuje různými směry. Už v minulosti byly v přírodě nalezeny sloučeniny, které mají řadu zajímavých účinků. Řada bylin je pro své léčivé vlastnosti používána v lidovém léčitelství. Zdrojem dosud ne plně prozkoumaných rostlin je východní Asie. Zde je užívání přírodní medicíny velice oblíbené, léčí se s ní různé choroby od kožních a jiných běžných onemocnění až po choroby stáří. Některým přírodním produktům je dokonce připisován nejen preventivní, ale i léčebný účinek na zhoubné novotvary. Proto není divu, že se vědci snaží izolovat účinné složky nejen z asijských druhů rostlin, popřípadě hub. Izolované sloučeniny jsou podrobovány řadě zkoušek, které mají ověřit jejich účinky, ať už cytostatické, antivirové či antimykotické. Jestliže se potvrdí účinnost některé ze získaných látek, navazuje výzkum zabývající se vývojem chemické syntézy těchto přírodních produktů, příp. strukturálních modifikací.

Odlišnou metodou je racionální vytváření nových chemických struktur léčiv na základě zkoumání souvislostí mezi chemickou strukturou a biologickými účinky skupin látek. Vědci vychází ze znalosti životního cyklu virů a snaží se vyvinout takové molekuly, které by cíleně zasahovaly do jednotlivých kroků cyklu. Jedná se o zabránění adsorpce viru na hostitelskou buňku, jeho penetraci do buňky, odkrytí (uncoating) infekční nukleové kyseliny, inhibici virových polymeras a v neposlední řadě o zabránění uvolnění vzniklých virionů z hostitelské buňky. Na příklad objev nových nukleosidů použitelných jako antivirové a antineoplastické látky byl velkým úspěchem chemie nukleosidů. Od okamžiku, kdy se objevila hrozba pandemie HIV, je vyvíjena intenzivní snaha zaměřená na modifikaci cukerné složky nukleosidů, díky ní byly získány léky dnes již zaregistrované pro terapii AIDS. Zatímco o modifikaci

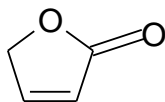
2' a 3' pozic nukleosidu byl značný zájem, o sloučeninách s modifikovanou pozicí 4' je toho známo mnohem méně. Proto jsou vytvářeny nové struktury cukerné složky nukleosidu s modifikací v poloze 4' nazývané apio-nukleosidy.<sup>9</sup> Ve vývoji jsou samozřejmě i nenukleosidová antivirotika se zaměřením na inhibici různých virových enzymů. I zde následuje vývoj syntézy předlohových struktur a následné ověřování jejich antivirové a antineoplastické aktivity *in vitro* a při slibných výsledcích i *in vivo*.

### 3.2.1. Antivirotika obsahující ve své struktuře lakton izolovaná z přírodních zdrojů

Mezi přírodní zdroje biologicky aktivních látek patří již tradičně houby, které produkují řadu působků s antibakteriální, antifungální, antivirotickou, ale i cytostatickou aktivitou. Tyto látky jim pomáhají přežít a prosadit se v tvrdých podmínkách jejich životního prostředí. Člověk pak může tyto látky použít pro lékařské účely, vlastně s tímž záměrem bránit se proti infekci. Dalším zdrojem jsou léčivé rostliny, které již naši předci používali k léčbě řady onemocnění. Dnes můžeme s pomocí moderní vědy izolovat látky, které jsou zodpovědné za léčebné účinky rostlin. Poznáním účinných látek můžeme přistoupit k vytváření obměn v jejich struktuře a tak vylepšovat jejich vlastnosti ve smyslu snížení toxicity či zlepšení průniku k místu účinku.

Sloučeniny s antivirotickým účinkem, které byly v přírodních zdrojích nalezeny, mají různou strukturu. Tato práce je zaměřena na látky obsahující ve své struktuře lakton a to především částečně nenasycený pětičlenný lakton (butenolid **21**). Strukturu butenolidu obsahují bicyklické sloučeniny, diterpeny a seskviterpeny, jež jsou hojně zastoupeny v rostlinných silicích.

Struktura butenolidu:



**21**

Nový inhibitor HCV proteasy označený jako SCH 351633 (**22**) byl izolován z houby *Penicillium griseofulvum*.<sup>10</sup> Tato malá molekula bicyklického butenolidu

inhibuje NS3 protein viru. NS3 protein má proteasovou aktivitu, ale funguje také jako ATP-asa a RNA-helikasa. V pokusech *in vitro* byla hodnota IC<sub>50</sub> 25 mM. Zatím však nebyla zveřejněna žádná klinická studie s inhibitory HCV proteas.

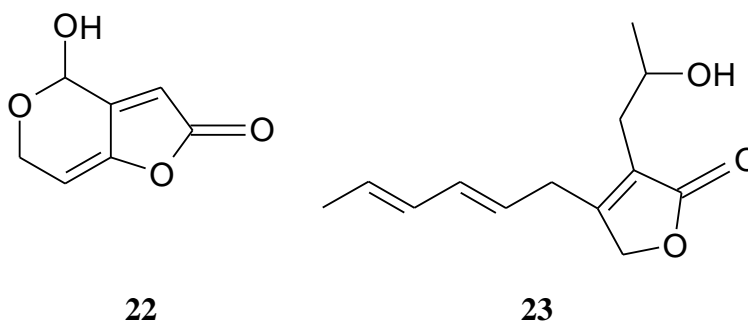
Z etherového extraktu houby *Trichoderma harzianum* byl získán další butenolid s potenciální biologickou aktivitou. Sloučenina byla identifikována jako 4-(hexa-2,4-dien-6-yl)-3-(2-hydroxypropyl)furan-2(5H)-on (**23**).<sup>11</sup>

Houby rodu *Trichoderma* spp. jsou v popředí zájmu rostlinných patologů i komerčních společností díky tvorbě řady antibiotických látek. Antibiotické metabolity hub rodu *Trichoderma* spp. jsou trojího charakteru. První skupina je tvořena prchavými látkami, např. izokyanidy. Látky druhé skupiny byly označeny za vyluhovatelné a mají určitou rozpustnost ve vodě, např. oktaketidy. Třetí skupina látek silně interaguje s biologickými membránami. Další metabolity jsou např. antrachinony, diterpeny, butenolidy či seskviterpenické laktony.

Jak prchavé sloučeniny z hub *Trichoderma harzianum* a *Trichoderma hamatum*, tak etherové extrakty z obou hub byly podrobeny testům na antivirovou aktivitu proti viru hepatitidy A (HAV) a Echoviru-9, který patří mezi enteroviry.

Prchavé sloučeniny z *T. hamatum* vykazovaly nejvyšší aktivitu (60% inhibici HAV i Echoviru-9), zatímco prchavé složky z *T. harzianum* měly 25% inhibiční efekt na první a 40% inhibiční efekt na druhý virus. Etherový extrakt z *T. harzianum* nevykazoval žádný inhibiční efekt na HAV, ale prokázal 25% inhibiční efekt na Echovir-9.<sup>11</sup> Druhý etherový extrakt nevykazoval žádnou antivirovou aktivitu.

Struktura butenolidů izolovaných z hub rodu *Penicillium* a *Trichoderma*:



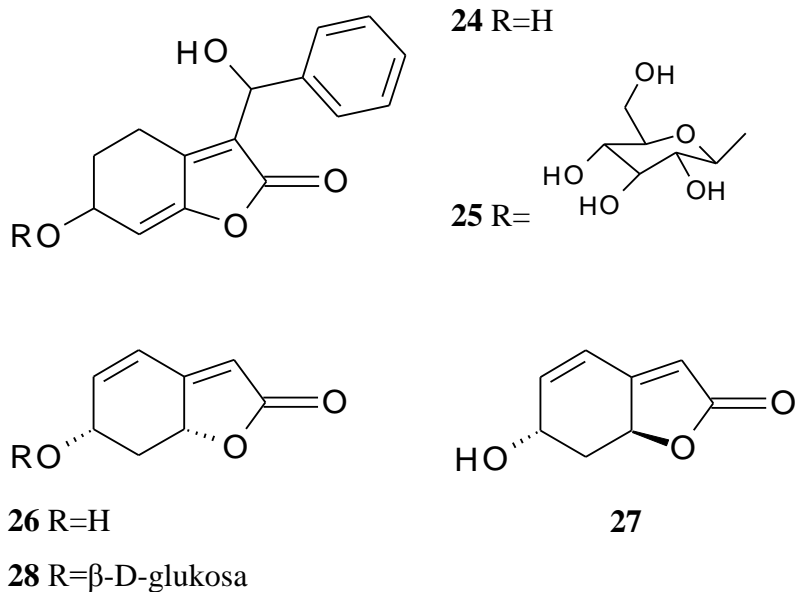
Sloučeniny s obdobnou strukturou jako butenolid z houby rodu *Penicillium* (**22**) jsou produkty tropické dřeviny *Homalium cochinchinensis* z čeledi Flacourtiaceae. *Homalium cochinchinensis* je na Taiwanu používána v lidovém léčitelství jako projímadlo a adstringent.<sup>12</sup> Z kůry kořene této rostliny byl izolován nový  $\gamma$ -alkylidensubstituovaný bicyklický butenolid nazvaný kochinolid (**24**). Spolu s ním

byl získán jeho  $\beta$ -glukopyranosid (**25**). Kochinolid vykazoval v testech *in vitro* mírnou aktivitu proti HSV-1 i HSV-2, přičemž  $EC_{50}$  u HSV-1 byla 8,0 mg/ml a u HSV-2 22,2 mg/ml.  $\beta$ -Glukopyranosid byl neaktivní.

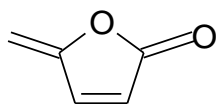
Je to první příklad izolace 6-hydroxy- $\gamma$ -alkylidensubstituovaného bicyklického butenolidu s benzylalkoholickou funkcí z přírodních zdrojů.<sup>12</sup> Již dříve byly izolovány 6-hydroxybicyklické butenolidy menisdaurilid (**26**), akvilegiolid (**27**) a fyllanthurinolakton (**28**) z rostlin čeledí Menispermaceae, Ranunculaceae a Euphorbiaceae. Tyto sloučeniny však neobsahují ve své molekule benzylalkoholickou skupinu, ani nebyly zkoušeny na antivirové účinky. Fyllanthurinolakton (**28**) je substance spouštějící fyziologické zavírání lístků u rostliny *Phyllanthus urinaria* L. Nedávno byla odhalena významná vlastnost butenolidů menisdaurilidu (**26**) a aquilegiolidu (**27**), byla popsána schopnost těchto laktonů indukovat apoptosu v lidských nádorových buňkách.<sup>13</sup>

Struktura kochinolidu (**24**) je též podobná další přírodní látce se zajímavou biologickou aktivitou protoanemoninu (**29**), jehož molekula představuje  $\gamma$ -alkylidenbutenolid. Protoanemonin (**29**) byl izolován z rostliny *Ranunculus bulbosus* z čeledi Ranunculaceae, ve které se vyskytuje i glykosid ranunkulin (**30**) též se strukturou butenolidu a s významnou biologickou aktivitou. Protoanemonin (**29**), jeho analogy a deriváty mají antivirovou, antibiotickou a antineoplastickou aktivitou.<sup>14</sup>

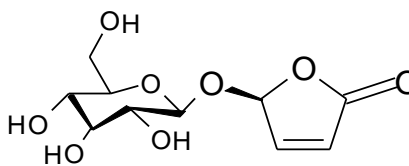
Struktura 6-hydroxybicyklických butenolidů:



Struktura butenolidů z rostlin rodu *Ranunculus*:



29

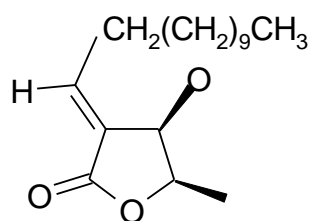


30

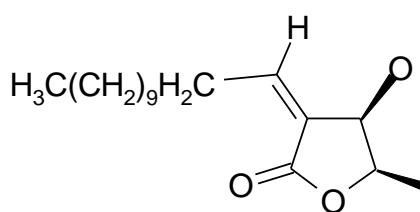
Obdobně jako butenolid z houby *Trichoderma harzianum* mají i butenolidy izolované z *Litsea verticillata* Hance z čeledi Lauraceae dlouhý postranní řetězec s tím rozdílem, že u butenolidů z *L. verticillata* se jedná o nasycený uhlovodíkový řetězec. Chloroformový extrakt listů a větviček této dřeviny nasbíraných v národním parku Cuc Phong ve Vietnamu, vykazoval vysoký inhibiční efekt na buňky infikované HIV a to bez zřejmé cytotoxicity. Proto byla provedena podrobnější analýza extraktu, který obsahoval více jak dvacet seskviterpenů. V následném výzkumu této rostliny bylo izolováno jedenáct dalších látek zahrnující tři nové seskviterpeny a jeden nový butenolid.<sup>15</sup> Celkem bylo získáno pět butenolidů, z toho čtyři již dříve popsané v literatuře byly 3-*epi*-litsenolid D<sub>2</sub> (**31**), *cis*-litsenolid D<sub>1</sub> (**32**), 4-hydroxy-2-methylbut-2-enolid (**33**) a hydroxydihydrobovolid (**34**), pátý nový butenolid byl nazván litseabutenolid (**35**).

Všechny látky izolované z *L. verticillata* byly testovány na anti-HIV aktivitu a cytotoxicitu. V anti-HIV studii byl jako standard použit lamivudin (**11**). Butenolidy vykazovaly anti-HIV aktivitu, přičemž nejvíce aktivní byl 3-*epi*-litsenolid D<sub>2</sub> (**31**). Vysoká cytotoxicita *cis*-litsenolidu D<sub>1</sub> (**32**) předem znemožnila přesné stanovení jeho anti-HIV aktivity na buněčných kulturách.<sup>15</sup> Kvůli malému množství izolovaného materiálu neproběhly všechny potřebné studie. Bude třeba hlavně ověřit antivirovou aktivitu a selektivitu slibného butenolidu **31**. Výzkum by se dále mohl zaměřit na vytváření syntetických analogů těchto přírodních látek, aby bylo docíleno větší selektivity a účinnosti.

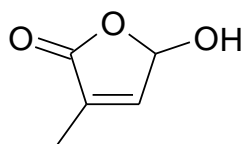
Struktura butenolidů izolovaných z *Litsea verticillata*:



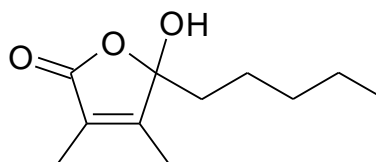
31



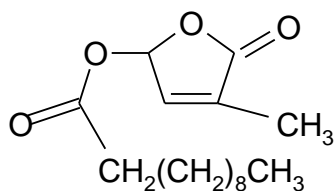
32



33



34

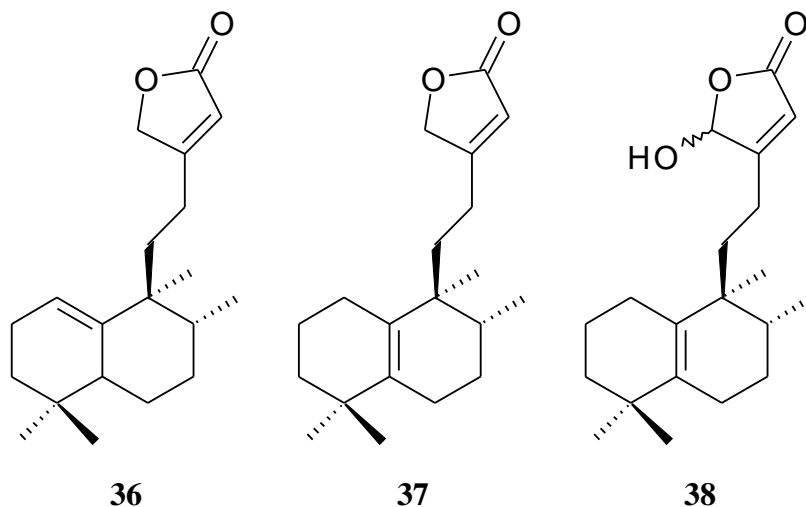


35

Bohatým zdrojem bioaktivních látek je čeleď Annonaceae. Přírodní diterpeny mající ve své struktuře hydroxybutenolidovou jednotku se vyskytují v rodech *Polyalthia*, *Acritopappus*, *Premna* a *Cyathocalux*. Rostliny z těchto rodů se velmi často používají v lidovém léčitelství pro své antimikrobiální účinky či jako přírodní léky napomáhající v boji s obezitou.

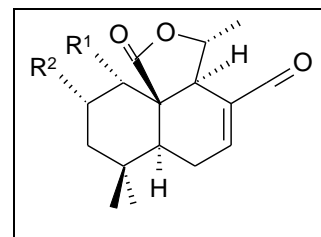
Z *Polyalthia langifolia* bylo již dříve izolováno velkého množství klerodanů a *ent*-halimanů, mezi nimi první tři dosud známé přírodní *ent*-halimanolidy **36**, **37** a **38**. Marcos a jeho kolegové popsali syntézu zmíněných *ent*-halimanolidů z *ent*-halimové kyseliny, popsaly jejich strukturu a absolutní konfiguraci. *Ent*-halimová kyselina je hlavní komponentou *Halimium viscosum* a používá se jako výchozí molekula u řady syntéz diterpenických sloučenin. Při výzkumu biologické aktivity vykazovala sloučenina **36** cytotoxickou a antivirovou aktivitu, konkrétně proti viru chřipky.<sup>16</sup>

Struktura *ent*-halimanolidů:



Struktura mniopetalů:

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>39a</b>	OH	 $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{H}_2\text{C}$
<b>39b</b>	OH	 $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{H}_2\text{C}$
<b>39c</b>	OH	 $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{H}_2\text{C}$
<b>39d</b>	 $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{H}_2\text{C}$	OH
<b>39e</b>	OH	OH
<b>39f</b>	OH	H



Další terpenické látky, tentokrát seskviterpeny, byly izolovány z houby rodu *Mniopetalum*. Jedná se o šest biologicky aktivních sloučenin označených jako mniopetaly A – F (**39a** – **f**). Ve své struktuře obsahují lakton. Mniopetaly jsou v popředí zájmu vědců, neb bylo zjištěno, že jsou inhibitory HIV reverzní transkriptasy. Kromě toho vykazují účinky antimikrobiální a protinádorové. Jauch představil syntézu mniopetalu F ve 14 krocích a s výtěžkem 10,1%.<sup>17</sup> Při syntéze



byla použita nová varianta Baylis-Hillmanovy reakce, což je Michealova aldol-eliminací reakce, která byla provedena s Feringa's butenolidem (butenolid substituovaný v pozici  $\gamma$ -O-methylem). Byly provedeny též syntézy mniopetalu E. Díky velkému potenciálu těchto přírodních antivirotik budou jistě brzy představeny i syntézy ostatních mniopetalů.

Seskviterpenické laktony jsou zastoupeny i v rostlinné říši. Bohatá je na ně čeleď *Asteraceae*. Kopretina řimbaba (*Tanacetum parthenium*) je v přírodním léčitelství oblíbeným prostředkem proti migréně, ale i bolestem kloubů a horečce. Mimo jiné látky obsahuje i seskviterpenický lakton parthenolid (**40**). Z rodu *Arnica* je možné izolovat helenalin (**41**), který má protizánětlivé a protinádorové účinky. Cytostatické účinky má i artemisinin (**42**) z rostliny *Artemisia annua*, jež se používá též jako antimalarikum. Ze stejného rodu pochází santoniny, látky účinné proti hlístům.

Je všeobecně známo, že  $\alpha$ -methylen- $\gamma$ -laktonová jednotka seskviterpenických laktonů je zodpovědná za jejich biologické účinky, protože zajišťuje jejich interakci s biologickými nukleofily, jako je cysteinová sulfanylová skupina cílových proteinů, cestou Michaelovy adice.<sup>18</sup> Proto Hwang a jeho spolupracovníci prověřili biologickou aktivitu řady přírodních látek charakteru seskviterpenických laktonů s  $\alpha$ -methylen- $\gamma$ -laktonovou jednotkou, které vybrali z komerčně dostupných knihoven přírodních produktů. Kromě výše zmíněných sloučenin **40**, **41** a **42** dále zkoumali kostunolid (**43**), dehydrokostuslakton (**44**) obsažené na příklad v *Laurus nobilis*, alantolakton (**45**) z rodu *Inula*, epoxy(4,5 $\alpha$ )-4,5-dihydrosantonin (**46**) a 4(5) $\alpha$ -epoxy-4,5-dihydrosantonin (**47**). Zajímaly je především účinky antivirové proti HCV. Skupina vědců dále připravila řadu derivátů parthenolidu (**40**) Michealovou adicí za použití sekundárních aminů a 2-sulfanylethan-1-olu, které měly sloužit k zjištění závislosti chemické struktury a účinku zkoumaných přírodních látek. K tomuto účelu sloužil i redukovaný parthenolid obsahující místo methylenové skupiny skupinu methylovou.

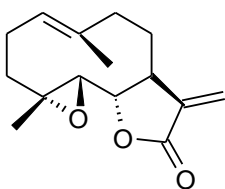
Anti-HCV aktivita parthenolidu (**40**), kostunolidu (**43**), dehydrokostuslaktonu (**44**), helenalinu (**41**) a alantolaktonu (**45**) vykazovala stejnou účinnost s EC<sub>50</sub> 1 – 3  $\mu$ M, zatímco sloučeniny **42**, **46** a **47** prokázaly EC<sub>50</sub> větší než 10  $\mu$ M, což značí, že *exo*-methylenlaktonová funkce může být zodpovědná za jejich aktivitu proti HCV.<sup>18</sup> Hwang a jeho spolupracovníci předpokládají, že v antivirové aktivitě hraje roli i prostorové uspořádání molekuly. Naproti tomu epoxidová skupina parthenolidu

není pro antivirový účinek podstatná. Svědčí pro to kostunolid, který epoxidovou skupinu postrádá, a přesto vykazoval naprosto stejnou aktivitu. Jak vědci předpokládali, po redukci methylenové skupiny ztratil parthenolid aktivitu. Na druhou stranu překvapením bylo, že aktivita adičních derivátů parthenolidu se od aktivity výchozí sloučeniny nelišila. Proto se předpokládá jejich konverze na parthenolid buď přímo v buňce nebo již *in vitro*.

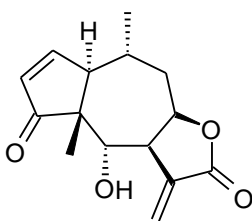
Za účelem zvýšení účinnosti terapie HCV se kombinují různá antivirotika. Proto byl zjišťován vliv parthenolidu na účinnost IFN- $\alpha$ . Výsledky ukázaly, že parthenolid v kombinaci s IFN- $\alpha$  vykazuje přinejmenším aditivní anti-HCV efekt.<sup>18</sup>

Výsledky výzkumu Hwanga a jeho spolupracovníků potvrdily antivirové účinky přírodních seskviterpenických laktonů s  $\alpha$ -metylen- $\gamma$ -laktonovou jednotkou.

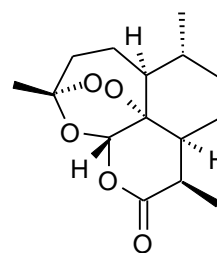
Struktura přírodních seskviterpenických laktonů s  $\alpha$ -metylen- $\gamma$ -laktonovou jednotkou:



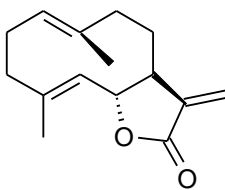
40



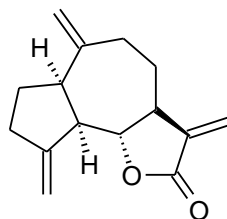
41



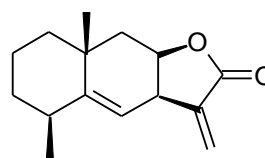
42



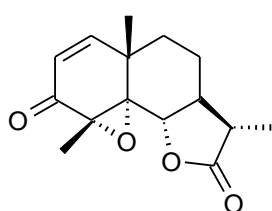
43



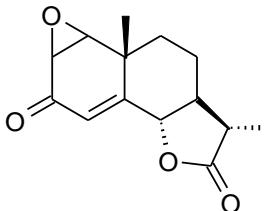
44



45



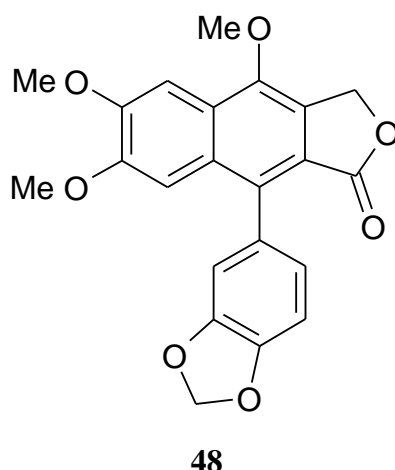
46



47

Z rostliny *Justicia procumbens* (Acanthaceae) byly izolovány bioaktivní arylnaftalenové lignany justicidiny, které ve své molekule obsahují laktonový kruh. Justicidin A i B jsou cytotoxicky aktivní sloučeniny. Další studie odhalily, že justicidin A (**48**) je schopen navodit v buňkách kolorektálního karcinomu apoptosu.<sup>19</sup> Analog justicidinu, který má v poloze  $\gamma$  laktonového kruhu navázanou methoxyskupinu, inhiboval lidský rhinovirus serotypu 2 (HRV-2).

Struktura justicidinu:



Z předchozích řádků je patrné, že mezi rostlinnými sekundárními metabolity je řada bioaktivních látek obsahujících ve své struktuře pětičlenný částečně nenasycený lakton. Účinky antivirové a cytostatické jsou výraznější, je-li oxoskupina laktonu konjugována s dalšími dvojnými vazbami. Přírodní sloučeniny obsahující ve své struktuře  $\gamma$ -methylenbutenolid slouží jako předlohy pro syntetická antivirotika a cytostatika.

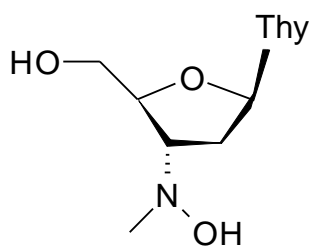
### 3.2.2. Synteticky připravená antivirotika obsahující ve své struktuře lakton

Syntetická antivirotika mají nejčastěji strukturu obdobnou nukleosidu. Po fosforylaci v infikované buňce slouží jako falešné baze, které se zabudovávají do replikované nukleové kyseliny a jejichž struktura neumožňuje další prodlužování řetězce. Nebo mohou interagovat s virovými reverzními transkriptasami či jinými enzymy viru a inhibovat je.

Laktonová jednotka je podobná svým prostorovým uspořádáním pentofuranose. Může být proto v různých obměnách použita u nukleosidových analogů místo cukerné části.

Případně jsou laktony využity jako prekursory při syntézách cukerných složek analogů nukleosidů. Tronchet a kol. použili  $\alpha,\beta$ -nenasycený lakton k syntéze cukerné složky thyminových analogů nukleosidů. Za účelem zjištění závislosti konfigurace na antivirové aktivitě 1-[2,3-dideoxy-3-(*N*-hydroxy-*N*-methylamino)pentofuranosyl]thyminů, připravili jejich  $\alpha$ -D-,  $\beta$ -D- a  $\alpha$ -L-*erythro*-isomery.  $\beta$ -D-isomery vykazovaly *in vitro* anti-HIV aktivitu vyšší než didanosin (**18**). Kromě již zmíněné anti-HIV aktivity, 1-[2,3-dideoxy-3-(*N*-hydroxy-*N*-methylamino)- $\beta$ -D-pentofuranosyl]thymin (**49**) vykazoval slabou anti-HSV-1 aktivitu.<sup>20</sup>

Struktura thyminového analogu nukleosidů:

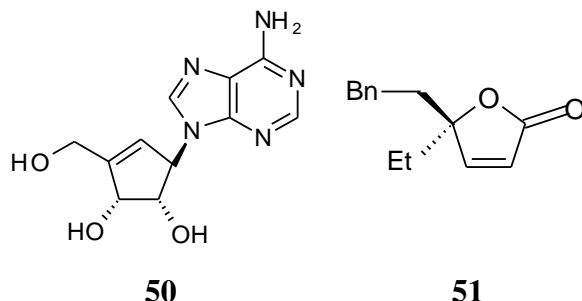


**49**

Také Hegedus a Geisler zvolili k syntéze (+)-neplanocinu A (**50**) jako výchozí molekulu opticky aktivní butenolid **51**. Butenolid **51** má strukturální rysy (dvojná vazba, která může být hydroxylována a dvě funkční skupiny v polohách sousedících s kyslíkem cyklu), které jej činí slibným prekursorem neplanocinu A.<sup>21</sup> Výsledná sloučenina **50** je cyclopentenylový analog adenosinu s protinádorovými a antivirovými účinky a je též silným inhibitorem hydrolasy *S*-adenosyl-L-homocysteinu (AdoHcy hydrolasa). AdoHcy hydrolasa katalyzuje hydrolýzu

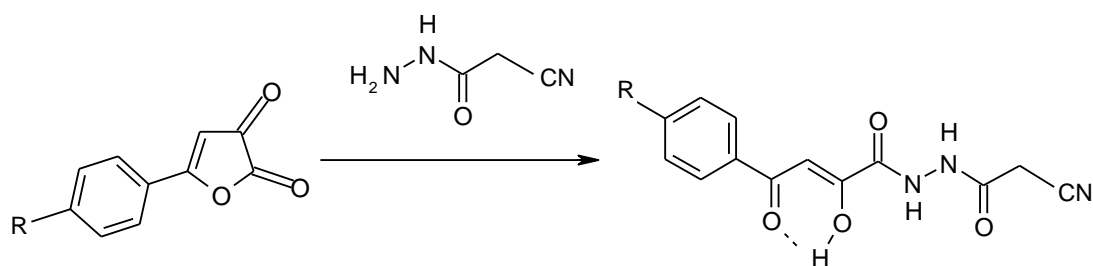
AdoHcy na homocystein a adenosin. Tento regulační enzym moduluje průběžnou biosyntézu nukleových kyselin právě rozštěpením AdoHcy,<sup>14</sup> což podporuje použití neplanocinu A v léčbě nádorových a virových onemocnění.

Struktura (+)-neplanocinu A a výchozí sloučenina jeho syntézy:



Nekrasov a kol. použili 4-substituovaný dihydrofurandion k syntéze bioaktivních sloučenin jiného typu než jsou analogy nukleotidů. Reakce 5-aryl-2,3-dihydrofuran-2,3-dionů s hydrazidem kyanoctové kyseliny vede za pokojové teploty k bezvodým dioxanům. *N*-Kyanacetylhydrazidy aroylpyruvátů se touto cestou tvoří ve vysokém výtěžku a jsou produkty rozštěpení vazby C-O furanového kruhu primární aminoskupinou činidla.<sup>22</sup> Vzniklé hydrazidy vykazovaly protizánětlivé, analgetické a antivirové účinky. Jedna sloučenina se jevila velice nadějná pro svou schopnost suprese replikace viru chřipky typu A.

Reakce 5-aryl-2,3-dihydrofuran-2,3-dionů s hydrazidem kyanoctové kyseliny:

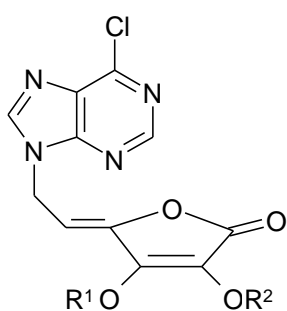


Laktony mají vynikající vlastnosti jako výchozí látky pro syntézy jiných sloučenin, ale nesmíme zapomenout na jejich biologickou aktivitu. Již zde byly zmíněny přírodní látky obsahující ve své molekule  $\gamma$ -alkylidensubstituované butenolidy, jednalo se o vysoce aktivní sloučeniny s antivirovými i cytostatickými účinky.  $\gamma$ -Alkylidenbutenolidová jednotka je podstatná pro jejich účinnost. Proto jsou připravovány i syntetické sloučeniny obsahující ve své struktuře tuto jednotku.

Hakimelahi a kol. syntetizovali purinové deriváty nenasycených laktonů, které byly zkoušeny pro schopnost inhibovat AdoHcy hydrolasu a následně byla

zjišťována jejich antivirová a protinádorová aktivita. Připravili 6-chlorpurinové deriváty  $\gamma$ -(Z)-ethylidenbutenolidů **52a – d** a jeden adeninový derivát  $\gamma$ -(Z)-ethyliden-2,3-dimethoxybutenolidu (**53**). Další dvě látky 6-chlorpurinový (**54**) a adeninový (**55**) derivát 4-ethyl-4-hydroxy-2,3-dimethoxybutenolidu neobsahují ve své struktuře  $\gamma$ -alkylidenbutenolidovou jednotku. Poslední sloučeninou, která byla v tomto výzkumu syntetizována, byl 6-chlorpurinový derivát dimethylfosfonyl- $\gamma$ -(Z)-ethyliden-2,3-dimethoxybutenolidu (**56**).

Struktura derivátů  $\gamma$ -(Z)-ethylidenbutenolidů:



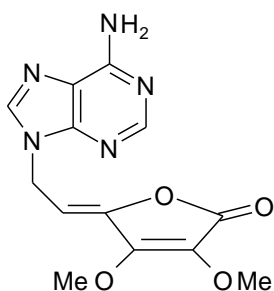
**a**  $R^1 = R^2 = \text{Me}$

**b**  $R^1 = \text{Me}, R^2 = 4\text{-(NO}_2\text{)-benzyl}$

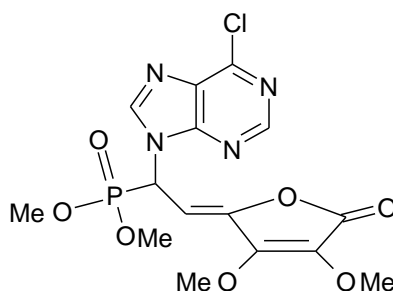
**c**  $R^1 = 4\text{-(NO}_2\text{)-benzyl}, R^2 = \text{Me}$

**d**  $R^1 = R^2 = 4\text{-(NO}_2\text{)-benzyl}$

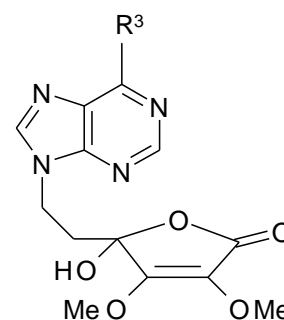
**52 a-d**



**53**



**56**



**54**  $R^3 = \text{Cl}$

**55**  $R^3 = \text{NH}_2$

Jako standard při měření inhibičních vlastností proti AdoHcy hydrolase sloužil již zmiňovaný velmi účinný inhibitor AdoHcy hydrolasy neplanocin A (**50**). Sloučeniny **52a – c** vykazovaly všechny přibližně stejný střední inhibiční efekt na enzymovou aktivitu a sloučenina **56** pouze slabě inhibovala enzym. Oproti tomu adeninový derivát **53** signifikantně inaktivoval AdoHcy hydrolasu (90 %) při koncentraci 100  $\mu\text{M}$ .<sup>14</sup> Předpokládá se, že mezi enzymem a adeninovým derivátem **53** se tvoří kovalentní vazba. Adeninový derivát **53** je substrátem enzymu. Je však i substrátem adenindeaminasy (ADA) a zároveň kompetitivním inhibitorem ADA. Sloučenina **55** je také substrátem, ale ne inhibitorem ADA.<sup>14</sup> Ostatní sloučeniny nebyly aktivní.

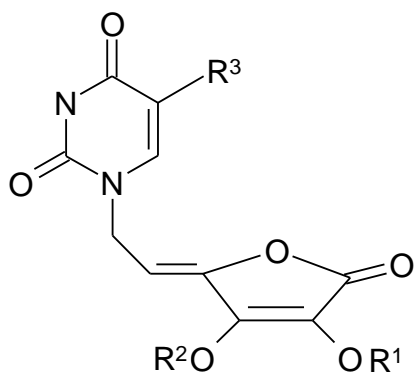
Sloučeniny byly testovány na aktivitu proti následujícím virům HSV-1, HSV-2, thymidinkinasa-pozitivní (TK+) a thymidinkinasa-negativní (TK-) druhy varicella zoster viru (VZV) v HeLa buněčné kultuře. Jako referenční látka posloužil aciklovir (6). Sloučeniny **52a – c**, **53** a **56** byly shledány více účinné než aciklovir proti TK-VZV.<sup>14</sup> Proti ostatním virům vykazovaly slabší aktivitu. Hydratované deriváty **54** a **55** neukázaly žádné inhibiční účinky na virovou replikaci a sloučenina **52d** s oběma hydroxylovými skupinami substituovanými vykazovala jen velmi slabé účinky.

Ačkoli se sloučenina **53** jevila velice slibně díky silné inhibici AdoHcy hydrolasy, testy na buněčných kulturách tak úspěšné nebyly. Nedostatek signifikantní biologické aktivity sloučeniny **53** může být zapříčiněn deaminací enzymem ADA v buněčném systému.<sup>14</sup> Výzkum také potvrdil důležitost  $\gamma$ -alkylidenbutenolidové části pro biologickou aktivitu, což dokazují sloučeniny **54** a **55**, kde byla dvojná vazba v poloze  $\gamma$  hydratována, a které nevykazovaly biologickou aktivitu.

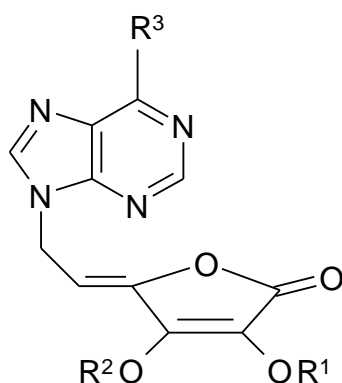
Stejný typ sloučenin syntetizovali Gazivoda a kol., avšak ti odvozovali strukturu vzniklých sloučenin od L-askorbové kyseliny (vitamin C), která působí jako antioxidant a zapojuje se do řady reakcí v lidském organismu. Bylo zjištěno, že hydroxyskupiny v polohách 2 a 3 L-askorbové kyseliny jsou zodpovědné za její antioxidační vlastnosti, protože na tomto místě probíhá redukce molekuly vitamínu C. Oproti tomu, se předpokládá, že 6-hydroxyskupina L-askorbové kyseliny je nedůležitá v transportu a funkci vitamínu.<sup>23</sup> Vědci syntetizovali pyrimidinové a purinové deriváty 2,3-*O,O*-dibenzyl-4,5-didehydro-5,6-dideoxy-L-askorbové kyseliny, čímž získali sloučeniny obsahující ve své molekule  $\gamma$ -ethylidenbutenolid a dá se předpokládat, že budou mít antivirové a cytostatické účinky.


Základní molekula nukleosidových analogů byla různě obměňována. Pyrimidinová base byla v poloze 5 substituována různými substituenty, stejně tak purin. 2,3-Dihydroxybutenolid byl buď substituován na obou hydroxylech benzylem nebo byla jedna či obě hydroxylové skupiny ponechány volné. Kombinací uvedených možností vznikl velký počet nukleosidových analogů, jejichž struktura je zobrazena na následujícím obrázku.

Struktura derivátů kyseliny askorbové:



R <sup>3</sup>	R <sup>1</sup> =benzyl R <sup>2</sup> =benzyl	R <sup>1</sup> = H R <sup>2</sup> =benzyl	R <sup>1</sup> = H R <sup>2</sup> = H
Br	<b>57a</b>	<b>58a</b>	<b>59a</b>
Cl	<b>57b</b>	<b>58b</b>	<b>59b</b>
F	<b>57c</b>	<b>58c</b>	<b>59c</b>
I	<b>57d</b>	<b>58d</b>	<b>59d</b>
CF <sub>3</sub>	<b>57e</b>	<b>58e</b>	<b>59e</b>



R <sup>3</sup>	R <sup>1</sup> =benzyl R <sup>2</sup> =benzyl	R <sup>1</sup> = H R <sup>2</sup> =benzyl	R <sup>1</sup> = H R <sup>2</sup> = H
Cl	<b>60a</b>	<b>61</b>	<b>62a</b>
	<b>60b</b>	<b>X</b>	<b>62b</b>

Sloučeniny **57a – d** a **58a – d** existují jako *E*- a *Z*-izomery, přičemž při syntéze převažovaly  $\gamma$ -(*Z*)-ethylidenbutenolidy.

Sloučeniny byly testovány na cytostatickou aktivitu. Výsledky ukázaly, že dibenzylové deriváty s purinovou i pyrimidinovou basí (**57a – e**, **60a** a **60b**) inhibovaly růst buněčných kultur lépe než odpovídající 2,3-dihydroxysloučeniny (**59a – e**, **62a** a **62b**). Neaktivnější derivát kyseliny askorbové byl 6-chlorpurinový derivát **61**, který měl nejvyšší cytotoxickou aktivitu. Sloučeniny **58b – d**, **59d**, **62a** a **62b** byly také zkoumány proti HSV-1 a HSV-2, viru vakcínie, CMV, VZV, viru vezikulární stomatitidy, Coxsackie viru B4, respiračnímu syncytiálnímu viru (RSV), parainfluenza-3 viru, reoviru, Sindibis viru a Punta Toro viru.<sup>23</sup> Bohužel se jejich aktivita v subtoxických koncentracích neprokázala, kromě monobenzylového derivátu 5-iodouracilu **58d**, který vykazoval slabou aktivitu proti vesicular stomatitis viru (EC<sub>50</sub>=102,6 $\mu$ M).<sup>23</sup>

Účinky léku též závisí na jeho schopnostech dostat se k místu svého působení. Z tohoto hlediska je u většiny antivirotik důležitá schopnost průniku přes buněčné membrány do nitra buňky. Průnik přes biologické membrány závisí na lipofilitě látky. Proto se často syntetizují proléčiva, která zvýší lipofilitu léku a po průchodu



membránami jsou buněčnými enzymy rozloženy za vzniku mateřské sloučeniny s vlastním léčebným účinkem.

V případě nukleosidových analogů se často setkáváme s problémem nízké lipofility a tedy i průniku k místu účinku. Hakimelahi a kol. syntetizovali analogy nukleotidů s estericky navázaným butenolidem, který zvyšoval lipofilitu mateřských sloučenin. Vycházeli z poznatku, že benzylestery kyseliny fosforečné substituované donorem podléhají rychlé hydrolyze. Podobně, kyslík C-2 methoxyskupiny butenolidové části může fungovat jako donorová skupina usnadňující hydrolyzu proléčiva na jeho aktivní formu.<sup>24</sup> Výhodou spontánní hydrolyzy je, že není potřeba enzymatická aktivace k rozpadu esterů na butenolid a mateřský nukleotid. Byly tedy připraveny lipofilní estery **63b**, **64b** a **65b**, které se v infikované buňce rozkládaly na odpovídající nukleotidy 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin (PMEA, **63a**), 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]guanin (PMEG, **64a**) a dinukleotid 5'-monofosfát **65a** a zároveň vznikal  $\gamma$ -(Z)-(2-hydroxyethylidenyl)-2,3-dimethoxybutenolid, již výše popisovaná struktura, která je sama o sobě nositelem biologické aktivity.

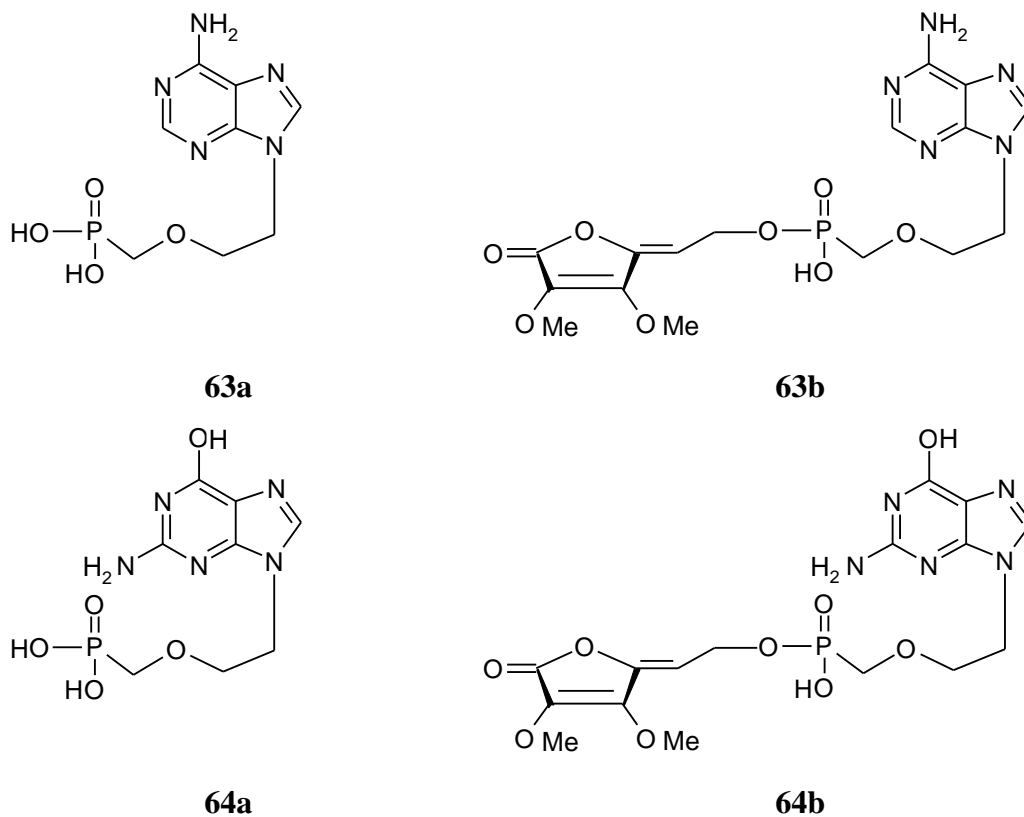
Sloučeniny byly podrobeny testům lipofility, kinetickým studiím inhibice ADA, testům zkoumajících konverzi nukleotidů na antivirově aktivní di- či trifosfonáty, aktivitu hadí a slezinné fosfodiesterasy proti nukleotidovým analogům a testům zaměřeným na antivirovou aktivitu proti HSV-1 a HSV-2, TK+ a TK- druhům VSV a lidskému CMV *in vitro*, testy *in vivo* probíhaly na myších infikovaných HSV-1.

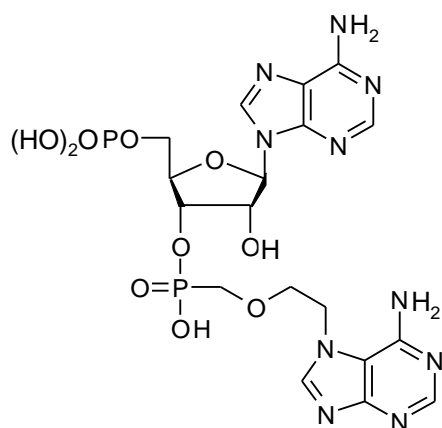
Výsledky ukázaly, že nukleotid 5'-monofosfát (**65a**) byl několikanásobně rychleji fosforylován než PMEa (**63a**) a také vykazoval vyšší aktivitu proti DNA virům než PMEa (**63a**). Avšak lipofilní proléčiva **63b**, **64b** a **65b** byla více aktivní proti testovaným virům v porovnání se svými mateřskými nukleotidy. Navíc, slezinná fosfodiesterasa je uvnitř infikovaných buněk schopna rozpoznat a přinejmenším částečně hydrolyzovat nukleotidový analog **65a** na biologicky méně aktivní fosfonát **66**, zatímco jeho butenolidesterový derivát **65b** byl shledán odolným proti fosfodiesterase.<sup>24</sup> Lipofilní proléčiva tedy dosahovala vyšší biodostupnosti, účinnosti a stability. V pokusech *in vivo* zkoumajících inhibiční efekt látek na mortalitu myší infikovaných HSV-1 byly též úspěšnější lipofilní estery. Butenolidový derivát odvozený od PMEa **63b** se ukázal být nejvíce účinnou anti-HSV-1 látkou *in vivo*, následovaný butenolidem obsahujícím nukleotid **65b**.<sup>24</sup> Mateřské nukleotidy PMEa (**63a**) a dinukleotid 5'-monofosfát (**65a**) poskytovaly též silnou ochranu proti mortalitě způsobené HSV-1 u infikovaných myší. Dávky, které účinně snížily

mortalitu u infikovaných myší, byly 100 mg/kg u esteru **63b**, u ostatních byly o něco vyšší (150 mg/kg). Látky v podaných dávkách nevyvolávaly žádné fyziologické ani morfologické změny orgánů laboratorních myší. V případě retrovirů HIV-1 a HIV-2 byl naopak rychleji fosforylován na difosfonát PMEa (**63a**) než dinukleotid 5'-monofosfát (**65a**), i jeho aktivita proti retrovirům byla vyšší v porovnání se sloučeninou **65a** i jejím butenolid esterem **65b**. Na druhou stranu, butenolid esterové deriváty **63b** a **64b** prokázaly vyšší antivirovou aktivitu oproti jejich mateřským molekulám PMEa (**63a**) a PMEG (**64a**).<sup>24</sup>

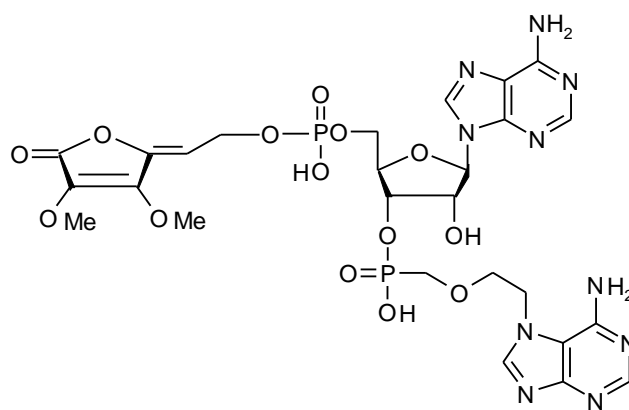
Uvnitř infikovaných buněk dochází díky donorovým vlastnostem methoxyskupiny v poloze 2 butenolidu rychle k rozpadu esterů na aktivní prekursory a již zmiňovaný  $\gamma$ -ethylidenbutenolid. Tento děj společně s vyšší biologickou dostupností zvyšuje účinnost nukleotidů s estericky navázaným butenolidem jak proti DNA virům tak proti retrovirům. I cytostatická aktivita těchto molekul je vyšší než aktivita jejich mateřských nukleotidů.

Struktura analogů nukleotidů a jejich derivátů s estericky navázaným butenolidem:



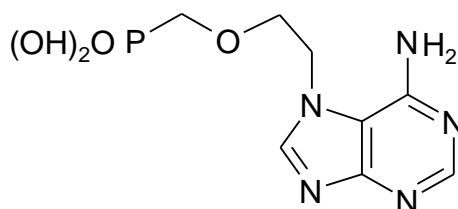


**65a**



**65b**

Produkt hydrolýzy dinukleotid 5'-monofosfát **63a**:



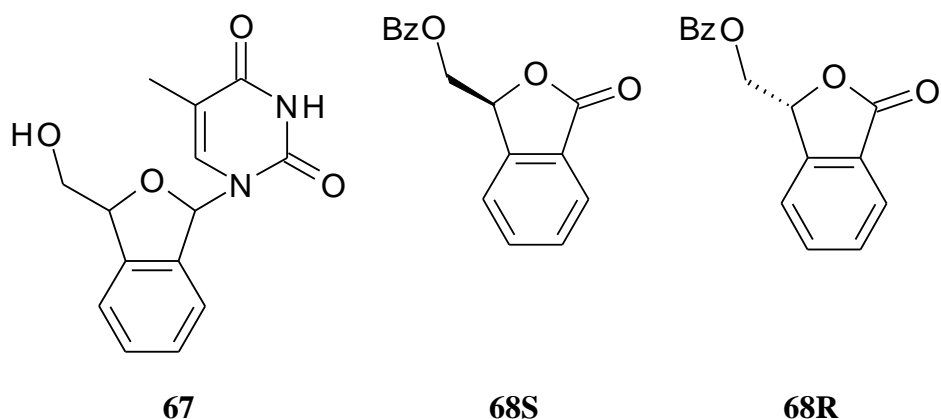
**66**

Jinými analogy nukleotidů se zabýval kolektiv Emanuela Lipky. Vycházeli ze struktury již používaných inhibitorů HIV reverzní transkriptasy zidovudinu (**16**) a stavudinu (**19**) a obměny v cukerné části nukleosidů. Základem pro jejich další postup se stal již dříve popsáný 1,3-dihydrobenzo[*c*]furanový analog thyminu **67**. Syntetizovali tedy deriváty benzo[*c*]furanu, které však nevykazovaly kromě jediného aktivitu proti HIV reverzní transkriptase. Jedinou aktivní sloučeninou byl uracilový derivát, který měl benzyl v poloze 5'. Aktivita nalezená u jedné výjimky mohla nastat díky laktonu **68S**, který vznikl rozštěpením glykosidické vazby, a nikoli díky mateřskému nukleotidu.<sup>8</sup> Proto se rozhodli syntetizovat sloučeniny vztahující se k *S*-benzoyloxymethyl- $\alpha,\beta$ -butenolidu, které by mohly být metabolity 5'-benzoylovaného derivátu thyminu **67**.

Cílovými molekulami byly enantiomery laktonů **68S** a **68R**. Jedná se o 3-benzoyloxymethylisobenzofuranony. Syntéza vycházela z ftalaldehydu bez optické aktivity. Klíčovým krokem této cesty bylo použití asymetrické dihydroxylace vyvinuté Sharplessem.<sup>8</sup> Oba enantiomery byly získány s výtěžkem 50 %. Byla určena absolutní konfigurace sloučenin a čisté enantimery **68S** a **68R** byly získány pomocí HPLC s chirální stacionární fází.

3-Benzoyloxymethylisobenzofuranony **68S** a **68R** byly podrobeny studiím, které měly zjistit, jaký je jejich inhibiční efekt na replikaci HIV-1. Sloučeniny **68S** a **68R** se ukázaly být inaktivní proti HIV-1 replikaci v koncentraci do 10  $\mu\text{M}$ .<sup>8</sup> Přesto mohou sloužit jako vzorové molekuly pro další výzkum antivirotický aktivních sloučenin.

Struktura derivátů benzo[*c*]furanu:



Na závěr lze říci, že vědci zabývající se racionální syntézou antivirotických vycházejí často ze struktury přírodních látek obsahujících ve své struktuře butenolid. Nejčastěji využívají laktonovou jednotku k modifikaci cukerné složky analogů nukleosidů. Ale jak vyplývá z některých prací, i samotné deriváty butenolidu mohou vykazovat vlastní biologickou aktivitu. I ve struktuře syntetických derivátů butenolidu byla použita struktura  $\gamma$ -ethylidenbutenolidu a sloučeniny ji obsahující prokazovaly antivirové i cytostatické účinky. Proto představuje tato struktura velkou naději v dalším vývoji biologicky aktivních molekul.

## 4. Experimentální část

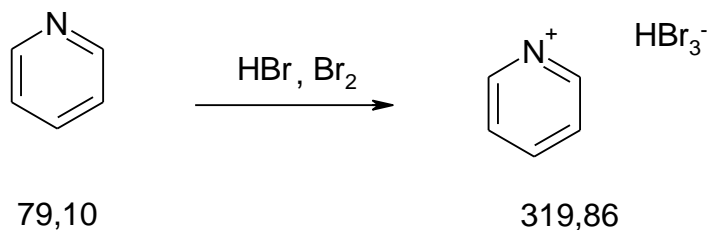
Výchozí látky pro syntézy byly zakoupeny u firmy Aldrich: fenylacetylen, 1-ethynyl-2-nitrobenzen, 4-ethynyl-*N,N*-dimethylanilin, 3-ethynylanilin, 2-ethynylpyridin. 4-Ethynylfenol ochráněný methoxymethylovou skupinou byl na katedře připraven dříve. Rozpouštědla byla použita v kvalitě dodané výrobcem, pokud není uvedeno jinak.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na DC-Alufolien 20 × 20 cm Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Jako stacionární fáze pro sloupcovou chromatografii byl používán Silicagel Merck (0,040 – 0,063 mm). Složení mobilních fází je vždy uvedeno u jednotlivých látek.

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném bloku podle Bötia a nejsou korigovány.

<sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-Vx BB 300. Chemické posuny jsou zaznamenány jako hodnoty  $\delta$  v ppm a jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) přes signál rozpouštědla (7,26 pro <sup>1</sup>H a 77,0 pro <sup>13</sup>C v CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1. Příprava pyridinium-hydrobromid perbromidu



##### *Postup:*

Za chlazení ledem jsem k 15 ml ( $d = 0,978 \text{ g/cm}^3$ ; 185,46 mmol) pyridinu přikapala 30 ml ( $d = 1,5 \text{ g/cm}^3$ ; 255,84 mmol) 46 – 48% kyseliny bromovodíkové. Po té jsem za stálého míchání a chlazení přikapala 8 ml ( $d = 3,14 \text{ g/cm}^3$ ; 156,45 mmol) bromu. Vypadlé červené krystaly jsem odsála a promyla 98% kyselinou octovou. Krystaly jsem překrystalizovala z 98% kyseliny octové a vysušila 24 h v exsikátoru nad oxidem fosforečným při 1,33 kPa.

Reakce byla provedena dvakrát za stejných podmínek.

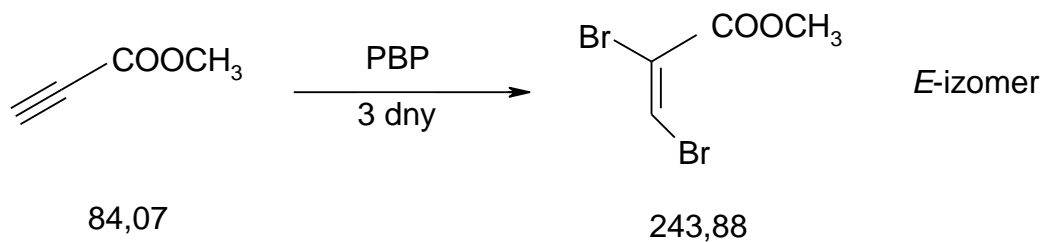
*Výtěžek:* 25,26 g (50 %), 25,24 g (50 %)

*Popis:* žlutooranžové krystaly

*T. t.:* 115 – 125°C, 105-110°C (132 – 134 °C)<sup>25</sup>

Produkt jsem použila jako činidlo k následující reakci.

#### 4.2. Příprava methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylátu



##### *Postup:*

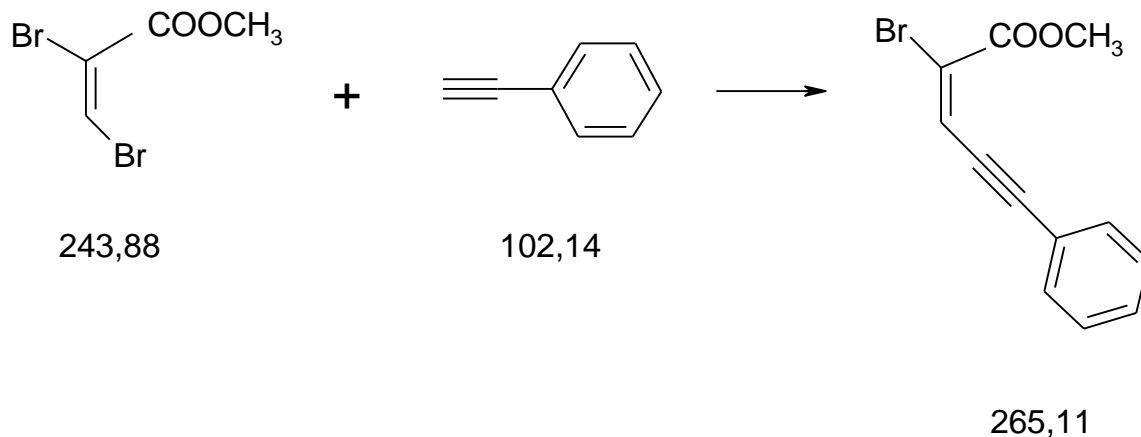
9,89 g (30,90 mmol) pyridinium-hydrobromid perbromidu (PBP) jsem rozpustila v 24 ml dichlormethanu. Poté jsem přikapala 2,1 ml ( $d = 0,945 \text{ g/cm}^3$ ; 23,79 mmol) methyl-propiolátu. Reakce probíhala tři dny za stálého míchání pod argonem za nepřístupu světla (hliníková folie). Reakci jsem ukončila vytřepáním nasyceným vodným roztokem thiosíranu sodného, což jsem opakovala ještě dvakrát. Spojené organické vrstvy jsem vysušila bezvodým síranem sodným a po odpaření rozpouštědla za vakua jsem získala produkt.

*Výtěžek:* 6,09 g (105 %)

*Popis:* oranžovožlutá kapalina

*<sup>1</sup>H-NMR spektrum:* viz příloha I

### 4.3. Příprava methyl-(*E*)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoátu Sonogashirovým couplingem



#### *Postup:*

1,35 ml ( $d = 0,93 \text{ g/cm}^3$ ; 12,30 mmol) fenylacetyleny jsem rozpustila pod argonem asi v 20 ml acetonitrilu. Za míchání jsem přidala 0,1171 g (5 mol. %) jodidu měďného a 0,4317 g (5 mol. %) palladiového katalyzátoru  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ . Poté jsem přikapala 3,000 g (12,30 mmol) methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylátu v 33 ml acetonitrilu. Na závěr jsem přidala 6,86 ml ( $d = 0,726 \text{ g/cm}^3$ ; 4 mol. ekv.) triethylaminu. Reakci jsem kontrolovala pomocí TLC (lékařský benzin + ethyl-acetát 80:20). Reakci jsem ukončila po 60 min odpařením rozpouštědla za vakua, zbytek jsem rozpustila v ethyl-acetátu a třikrát vytřepala nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Organickou vrstvu jsem vysušila bezvodým síranem sodným a po oddestilování rozpouštědla za vakua jsem reakční směs podrobila dělení sloupcovou chromatografií.

#### *Podmínky chromatografie:*

mobilní fáze – lékařský benzin + ethyl-acetát 99:1

Reakce byla provedena celkem dvakrát, v druhém případě z 12,75 mmol výchozích látek.

*Výtěžek:* 2,2709 g (70 %); 2,6702 g (79 %)

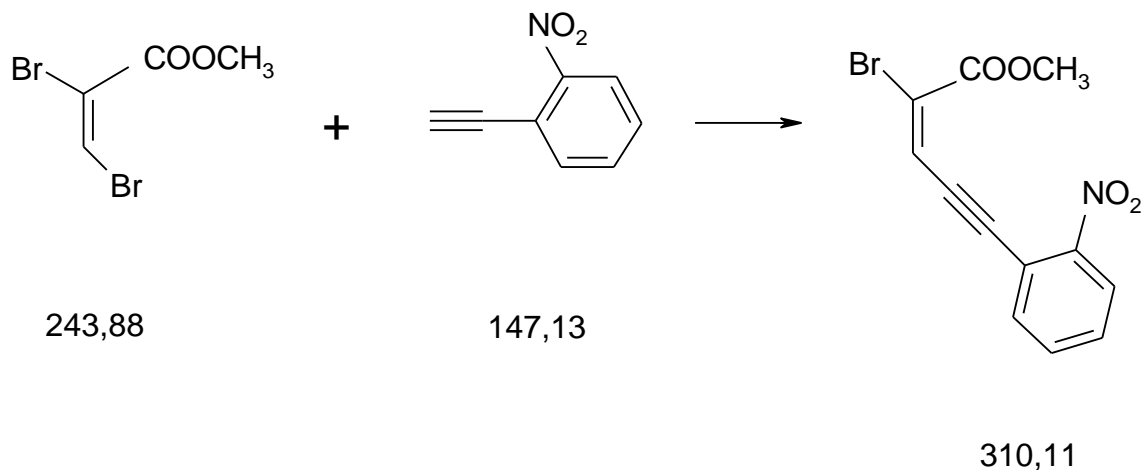
*Popis:* žlutý olej

*NMR spektrum:* Příloha II



#### 4.4. Příprava methyl-(*E*)-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoátu Sonogashirovým couplingem

##### 4.4.1. Běžné reakční podmínky



##### *Postup:*

0,1122 g (0,76 mmol) 1-ethynyl-2-nitrobenzenu jsem rozpustila pod argonem asi v 2 ml acetonitrilu. Za míchání jsem přidala 0,0073 g (5 mol. %) jodidu měďného a 0,0245 g (5 mol. %) palladiového katalyzátoru PdCl<sub>2</sub>[P(furyl)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>. Poté jsem přikapala 0,1860 g (0,76 mmol) methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylátu v 0,8 ml acetonitrilu. Na závěr jsem přidala 0,43 ml (d = 0,726 g/cm<sup>3</sup>; 4 mol. ekv.) triethylaminu. Reakci jsem kontrolovala pomocí TLC (lékařský benzin + ethyl-acetát 80:20). Reakci jsem ukončila po 75 min odpařením rozpouštědla za vakua, zbytek jsem rozpustila v ethyl-acetátu a třikrát vytřepala nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Organickou vrstvu jsem vysušila pomocí bezvodého síranu sodného a po oddestilování rozpouštědla za vakua jsem reakční směs podrobila dělení sloupcovou chromatografií.

##### *Podmínky chromatografie:*

mobilní fáze – lékařský benzin + ethyl-acetát 95:5

*Výtěžek:* 0,1086 g (46 %)

*Popis:* cihlově červené krystaly

*NMR spektrum:* Příloha III

#### 4.4.2. Úprava reakčních podmínek I

Reakci jsem provedla stejným způsobem jako v předchozím případě. Rozdíl byl v použitém látkovém množství výchozích látek (0,82 mmol), palladiovém katalyzátoru ( $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_4$ ) a reakční době (90 min).

*Podmínky chromatografie:*

mobilní fáze – lékařský benzin + ethyl-acetát 95:5

*Výtěžek:* 0,0512 g (20 %)

*Popis:* červenohnědé krystaly

*NMR spektrum viz 4.4.1*

#### 4.4.3. Úprava reakčních podmínek II

Reakci jsem provedla stejným způsobem jako v předchozím případě. Rozdíl byl v použitém látkovém množství výchozích látek (0,82 mmol), rozpouštědle (suchý dimethylformamid) a reakční době (60 min).

*Podmínky chromatografie:*

mobilní fáze – lékařský benzin + ethyl-acetát 95:5

*Výtěžek:* 0,1213 g (48 %)

*Popis:* červenohnědé krystaly

*NMR spektrum viz 4.4.1*

#### 4.4.4. Úprava reakčních podmínek III

Reakci jsem provedla stejným způsobem jako v předchozím případě. Rozdíl byl v použitém látkovém množství výchozích látek (0,82 mmol), rozpouštědle (tetrahydrofuran sušený molekulárními síty po 24 h) a reakční době (90 min).

*Podmínky chromatografie:*

mobilní fáze – lékařský benzin + ethyl-acetát 95:5

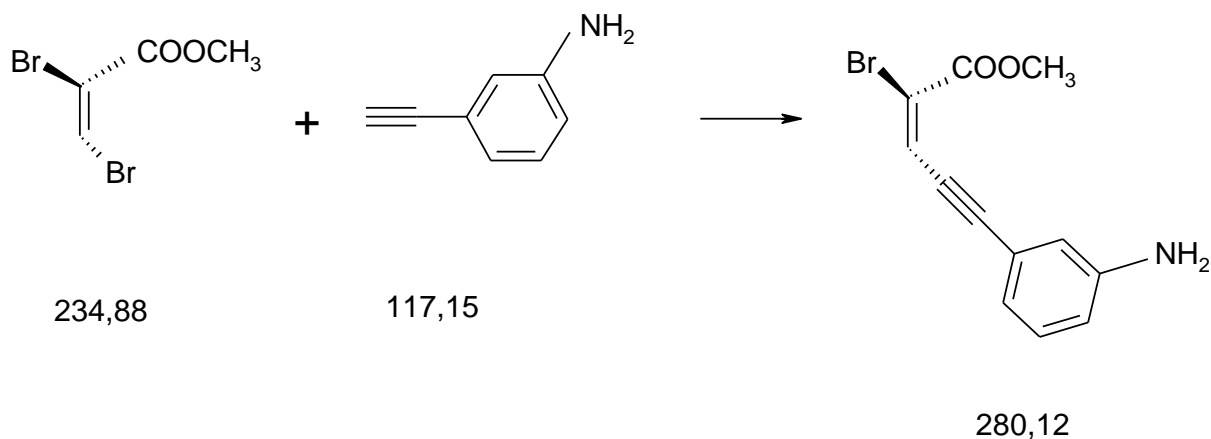
*Výtěžek:* 0,1432 g (56 %)

*Popis:* oranžové krystaly

*NMR spektrum viz 4.4.1*

#### 4.5. Příprava methyl-(E)-5-(3-aminofenyl)-2-brompent-2-en-3-ynoátu

Sonogashirovým couplingem



0,086 ml (0,82 mmol) 3-ethynylanilinu jsem rozpustila pod argonem asi ve 2 ml acetonitrilu. Za míchání jsem přidala 0,0078 g (5 mol. %) jodidu měďného a 0,0288 g (5 mol. %) palladiového katalyzátoru  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ . Poté jsem přikapala 0,2000 g (0,82 mmol) methyl-(E)-2,3-dibromakrylátu v 1ml acetonitrilu. Na závěr jsem přidala 0,46 ml ( $d = 0,726 \text{ g/cm}^3$ ; 4 mol. ekv.) triethylaminu. Reakci jsem kontrolovala pomocí TLC (lékařský benzin + ethyl-acetát 80:20). Reakci jsem ukončila po 90 min odpařením rozpouštědla za vakua, zbytek jsem rozpustila v ethyl-acetátu a vytřepala vodou. Organickou vrstvou jsem vysušila pomocí bezvodého síranu sodného a po oddestilování rozpouštědla za vakua jsem reakční směs podrobila dělení sloupcovou chromatografií.

*Podmínky chromatografie:*

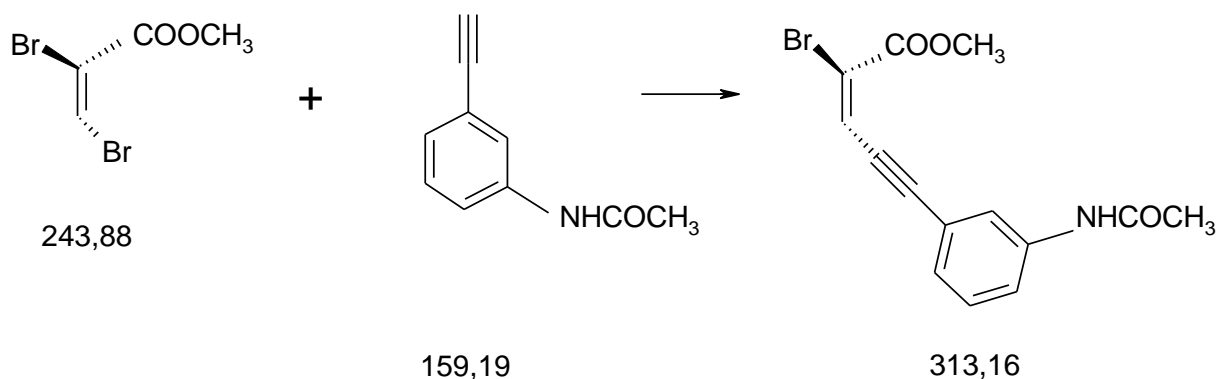
mobilní fáze – lékařský benzin + ethyl-acetát 90:10

*Výtěžek:* 0,0771 g (34 %)

*Popis:* žlutohnědý olej

*NMR spektrum:* Příloha IV

#### 4.6. Příprava methyl-(E)-5-(3-acetylaminofenyl)-2-brompent-2-en-3-ynoátu Sonogashirovým couplingem



0,1096 g (0,69 mmol) 3-ethynylfenylamid kyseliny octové jsem rozpustila pod argonem asi ve 1,5 ml acetonitrilu. Za míchání jsem přidala 0,0065 g (5 mol. %) jodidu měďného a 0,0242 g (5 mol. %) palladiového katalyzátoru  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ . Poté jsem přikapala 0,17 g (0,82 mmol) methyl-(E)-2,3-dibromakrylátu v 1ml acetonitrilu. Na závěr jsem přidala 0,39 ml ( $d = 0,726 \text{ g/cm}^3$ ; 4 mol. ekv.) triethylaminu. Reakci jsem kontrolovala pomocí TLC (lékařský benzin + ethyl-acetát 80:20). Reakci jsem ukončila po 90 min odpařením rozpouštědla za vakua, zbytek jsem rozpustila v ethyl-acetátu a vytřepala vodou. Organickou vrstvu jsem vysušila pomocí bezvodého síranu sodného a po oddestilování rozpouštědla za vakua jsem reakční směs podrobila dělení sloupcovou chromatografií. Vodnou fází jsem okyselila kyselinou octovou a vytřepala ethyl-acetátem. Takto získanou organickou vrstvu jsem zpracovala jako v předchozích případech.

*Podmínky chromatografie:*

mobilní fáze – lékařský benzin + ethyl-acetát 95:5

*Výtěžek:* Produkt nebyl získán

## 5. Diskuse

Cílem mé diplomové práce byla syntéza prekursorů bioaktivních laktonů, jednalo se o methyl-(*E*)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoáty substituované na benzenovém jádře. Má práce navázala na předchozí práci na katedře<sup>26</sup> věnující se tomuto tématu.

Bioaktivní laktony mají potenciálně cytostatické, antivirotické i antimykotické a další účinky. V teoretické části jsem se zaměřila na jejich účinky antivirotické. Zabývala jsem se látkami obsahujícími ve své struktuře pětičetnou částečně nasycenou laktonovou jednotku, které byly izolovány z přírodních zdrojů a také těmi, které vznikly na základě racionálního uvažování vědců chemickou syntézou. V popředí mého zájmu byly hlavně sloučeniny se strukturou butenolidu **21**.

V experimentální práci jsem připravovala požadované methyl-(*E*)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoáty a jejich prekursory. Nejprve jsem reakcí pyridinu s kyselinou bromovodíkovou v prostředí bromu připravila pyridinium-hydrobromid perbromid (PBP). Ten sloužil jako bromační činidlo v další reakci. Myers připravil čistý *E*-izomer alkyl-2,3-dibromakrylátu reakcí alkyl-propiolátu s PBP v methylenchloridu při 23 °C po 40 h.<sup>27</sup> Za těchto podmínek však v naší laboratoři vznikal *Z*-izomer. Reakce proto byla provedena za nepřístupu světla a pod ochranou atmosférou argonu za vzniku *E*-izomeru methyl-2,3-dibromakrylátu (**4.2.**) s výtěžkem 105 %. Takto vysoký výtěžek mohl mít příčinu v příměsi nečistot nebo v chybě při vážení či při výpočtu. Methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylát byl použit jako výchozí sloučenina pro syntézu cílových prekursorů bioaktivních laktonů. Syntéza proběhla Sonogashirovým couplingem<sup>28</sup>, kdy jsem reakcí methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylátu s různě substituovanými ethynylbenzeny opět pod argonem připravila methyl-(*E*)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoáty substituované na benzenovém jádře. Při reakci kromě připravovaných sloučenin vznikají i nežádoucí produkty homocouplingu. Methyl-(*E*)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoáty mohou být přímými prekursory pro cyklizaci na substituované butenolidy.<sup>29</sup>

V případě nesubstituovaného methyl-(*E*)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoátu (**4.3.**) a methyl-(*E*)-5-(3-aminofenyl)-2-brom-pent-2-en-3-ynoátu (**4.5.**) měly produkty vzhled žlutohnědé olejovité kapaliny. Methyl-(*E*)-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoát (**4.4.**) byl získán ve formě červené krystalky. Struktury

sloučenin byly potvrzeny analýzou NMR spekter. Výtěžky reakcí jsou uvedeny v následující tabulce.

Reakce	Produkt	Katalyzátor	Rozpouštědlo	Výtěžek
4.3.	methyl-( <i>E</i> )-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoát	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	acetonitril	70 %; 79 %
4.4.1.	methyl-( <i>E</i> )-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoát	$\text{PdCl}_2[\text{P}(\text{furyl})_3]_2$	acetonitril	46 %
4.4.2.	methyl-( <i>E</i> )-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoát	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_4$	acetonitril	20 %
4.4.3.	methyl-( <i>E</i> )-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoát	$\text{PdCl}_2[\text{P}(\text{furyl})_3]_2$	dimethylformamid	48 %
4.4.4.	methyl-( <i>E</i> )-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoát	$\text{PdCl}_2[\text{P}(\text{furyl})_3]_2$	tetrahydrofuran	56 %
4.5.	methyl-( <i>E</i> )-5-(3-aminofenyl)-2-brompent-2-en-3-ynoát	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	acetonitril	34 %
4.6.	methyl-( <i>E</i> )-5-(3-acetylaminofenyl)-2-brompent-2-en-3-ynoát	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	acetonitril	X

Výtěžek reakce 1-ethynyl-2-nitrobenzenu s methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylátem za použití palladiového katalyzátoru  $\text{PdCl}_2[\text{P}(\text{furyl})_3]_2$  (**4.4.1.**) byl pouze 46 %. Změnou použitého katalyzátoru jsem se snažila výtěžek zvýšit. Reakce s využitím palladiového katalyzátoru  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_4$  (**4.4.2.**) však nebyla úspěšnější, výtěžek se ještě snížil na 20 %. Proto jsem dále pokračovala v změnách reakčních podmínek. Jako další možnost připadala změna rozpouštědla. Při reakci v prostředí suchého dimethylformamidu (**4.4.3.**) se výtěžek zvýšil pouze nepatrně (48 %), použití tetrahydrofuranu (**4.4.4.**) bylo úspěšnější, dosáhla jsem výtěžku 56 %.

Nepodařilo se mi připravit methyl-(*E*)-5-(3-acetylaminofenyl)-2-brompent-2-en-3-ynoát (**4.6.**). Organická vrstva, která byla vysušena bezvodým síranem sodným, byla po oddestilování rozpouštědla za vakua podrobena sloupcové chromatografii. Získaná frakce byla odevzdána na analýzu NMR spektra. Bylo potvrzeno, že se jedná o výchozí methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylát. Abych zjistila, zda produkt nezůstal ve vodné fázi, tak jsem vodnou fázi okyselila a opět vytřepala s ethyl-acetátem. Sloupcovou chromatografií organické vrstvy však nebyl produkt získán. Po selhání syntézy derivátu s aminoskupinou chráněnou acetylem, jsem připravila derivát s nechráněnou aminoskupinou methyl-(*E*)-5-(3-aminofenyl)-2-brom-pent-2-en-3-ynoát (**4.5.**), který byl opět zpracován šetrně pouze vytřepáním s vodou. Výtěžek této reakce byl 34 %.

## 6. Závěr

V experimentální části mé diplomové práce jsem připravila výchozí sloučeninu pro syntézu prekursorů bioaktivních laktonů:

\* **methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylát**

Podařilo se mi připravit 3 prekursory bioaktivních laktonů:

\* **methyl-(*E*)-2-brom-5-fenylpent-2-en-3-ynoát**

\* **methyl-(*E*)-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoát**

\* **methyl-(*E*)-5-(3-aminofenyl)-2-brompent-2-en-3-ynoát**

Dále jsem se snažila úpravou reakčních podmínek zvýšit výtěžek reakce poskytující methyl-(*E*)-2-brom-5-(2-nitrofenyl)pent-2-en-3-ynoát. Nejvýhodnější se jevílo použít jako rozpouštědlo tetrahydrofuran namísto acetonitrilu.

Připravené sloučeniny budou podrobeny hydrolýze esterové skupiny a cyklizaci za vzniku bioaktivních laktonů, příp. substituci bromu v poloze 2.



**7. Abstrakt diplomové práce**  
**Syntéza prekursorů biologicky aktivních laktonů II.**

**Lenka Finková**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci  
Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty antivirové účinky butenolidů izolovaných z přírodních zdrojů i látek získaných synteticky.

V rámci experimentální práce byl připraven methyl-(*E*)-2,3-dibromakrylát jako prekursor pro methyl-(*E*)-2-brom-5-*subst.*fenylpent-2-en-3-ynoáty získané Sonogashirovým couplingem s různými alkyny. U některých derivátů byly syntézy optimalizovány úpravou reakčních podmínek.

Methyl-(*E*)-2-brom-5-*subst.*fenylpent-2-en-3-ynoáty mohou sloužit jako výchozí látky pro přípravu potenciálně biologicky aktivních laktonů.

**Abstract of diploma paper**

**Synthesis of Precursors for Biologically Active Lactones II.**

**Lenka Finková**

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec  
Králové, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug  
Control**

In the theoretical part of the diploma paper there are summarized antiviral effects of butenolides isolated from natural resources as well as substances obtained by synthesis.

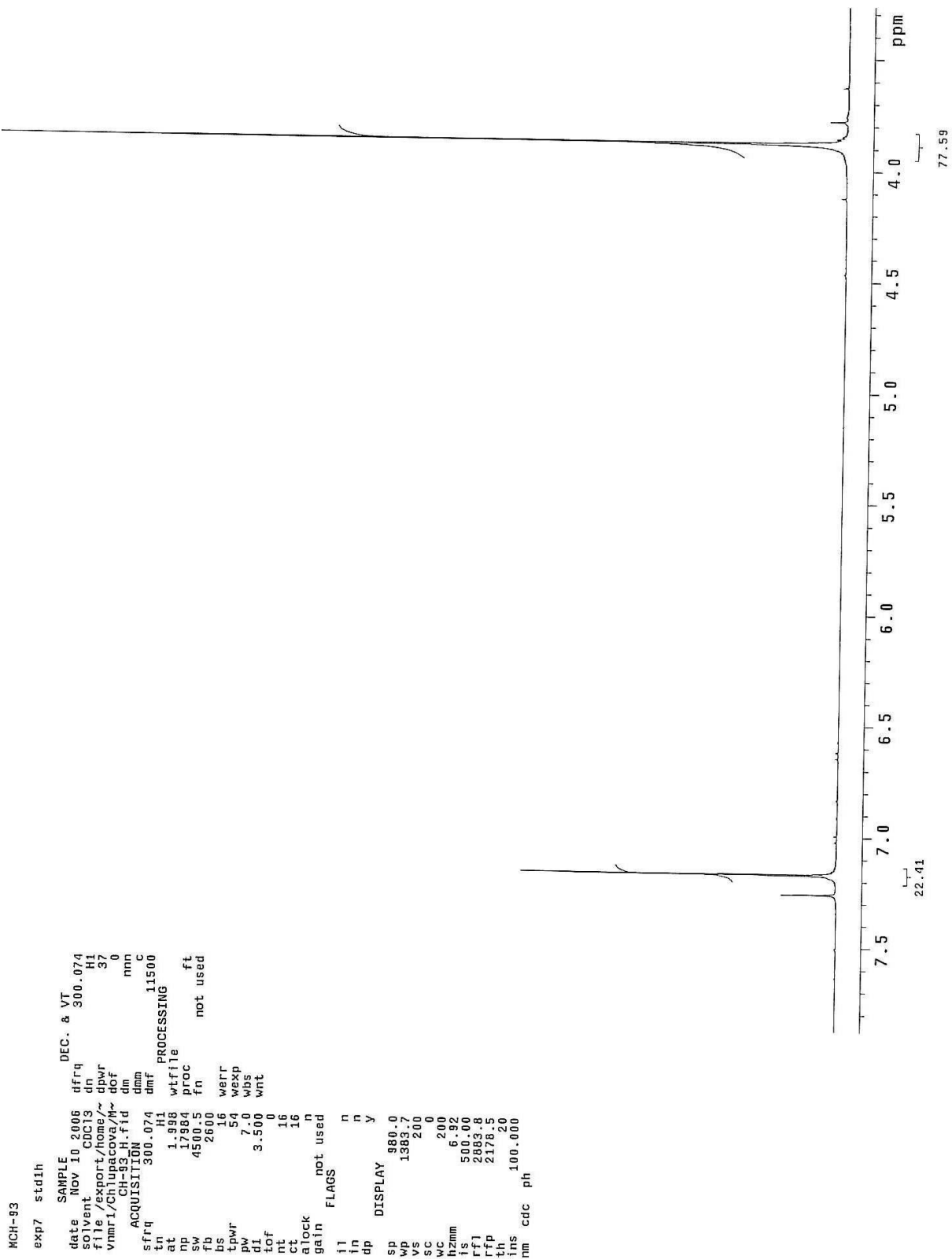
Methyl-(*E*)-2,3-dibromacrylate has been synthesized within the scope of the experimental work as a precursor for methyl-(*E*)-2-brom-5-*subst.*phenylpent-2-en-3-

ynoates which have been obtained by Sonogashira coupling with different alkynes. Syntheses of some derivatives have been optimized by modification of reaction conditions.

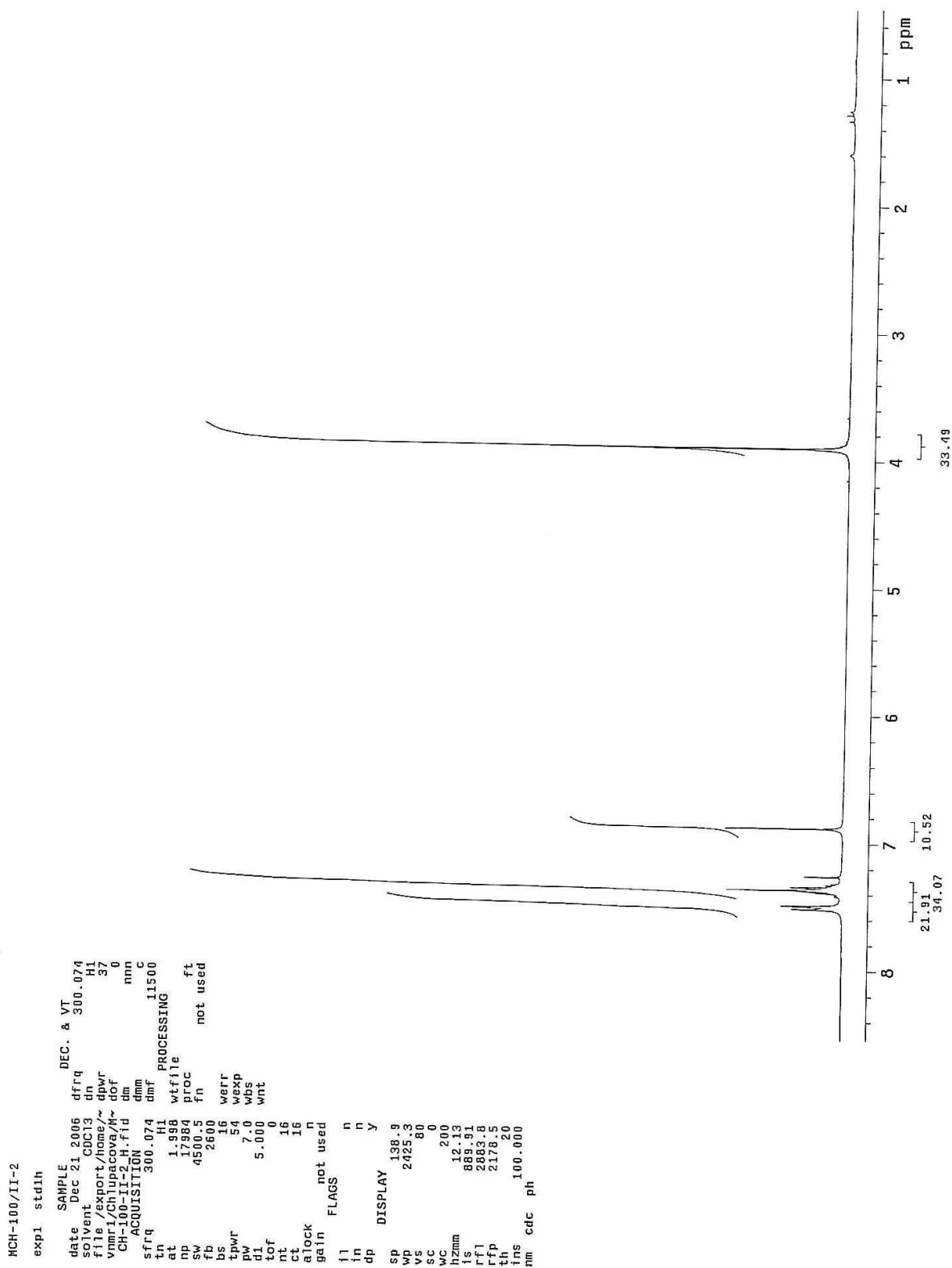
Methyl-(*E*)-2-brom-5-*subst.*phenylpent-2-en-3-ynoates can be used as starting compounds for synthesis of potential biological active lactones.

# 8. Přílohy

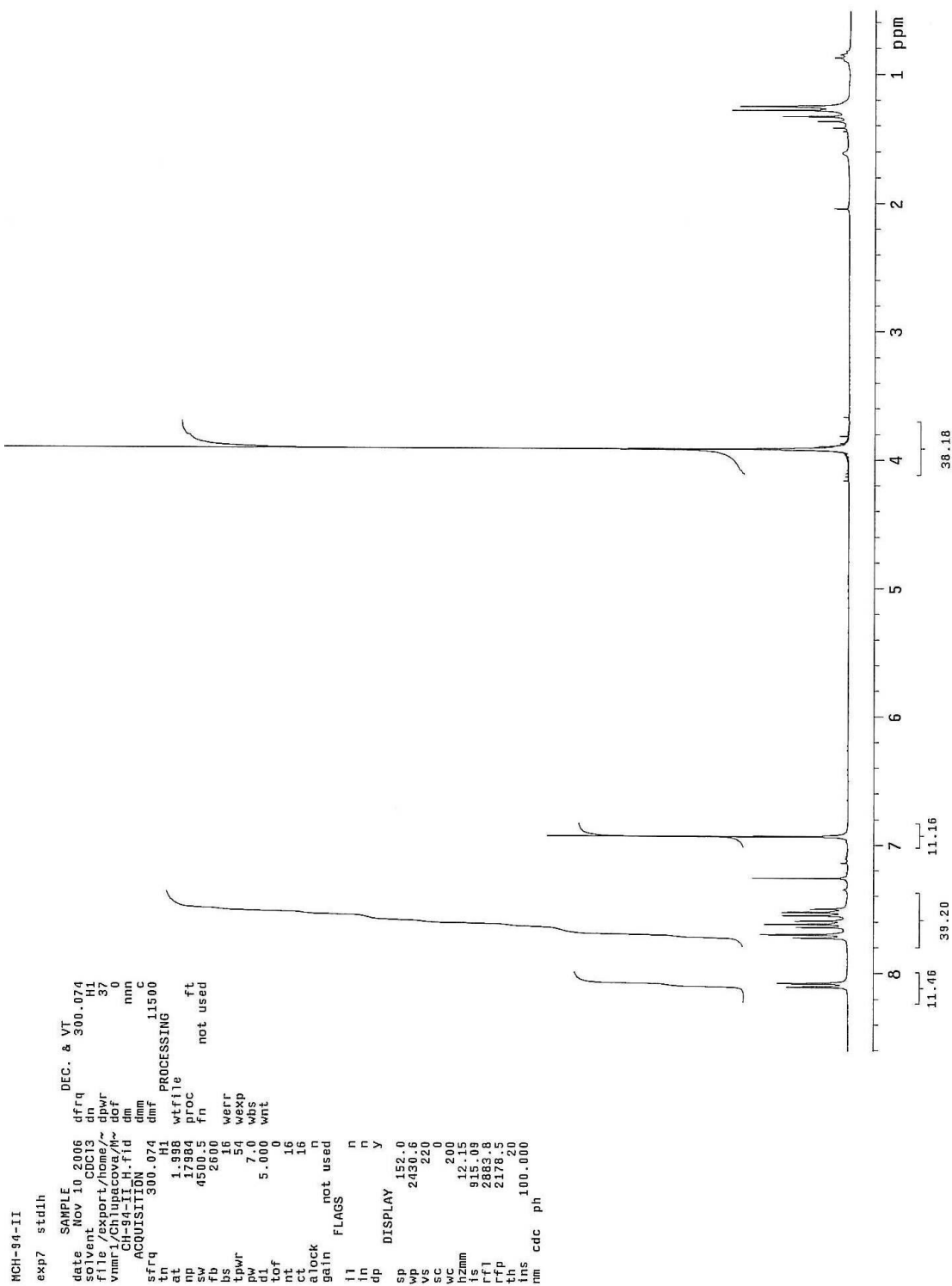
## 8.1. Příloha I



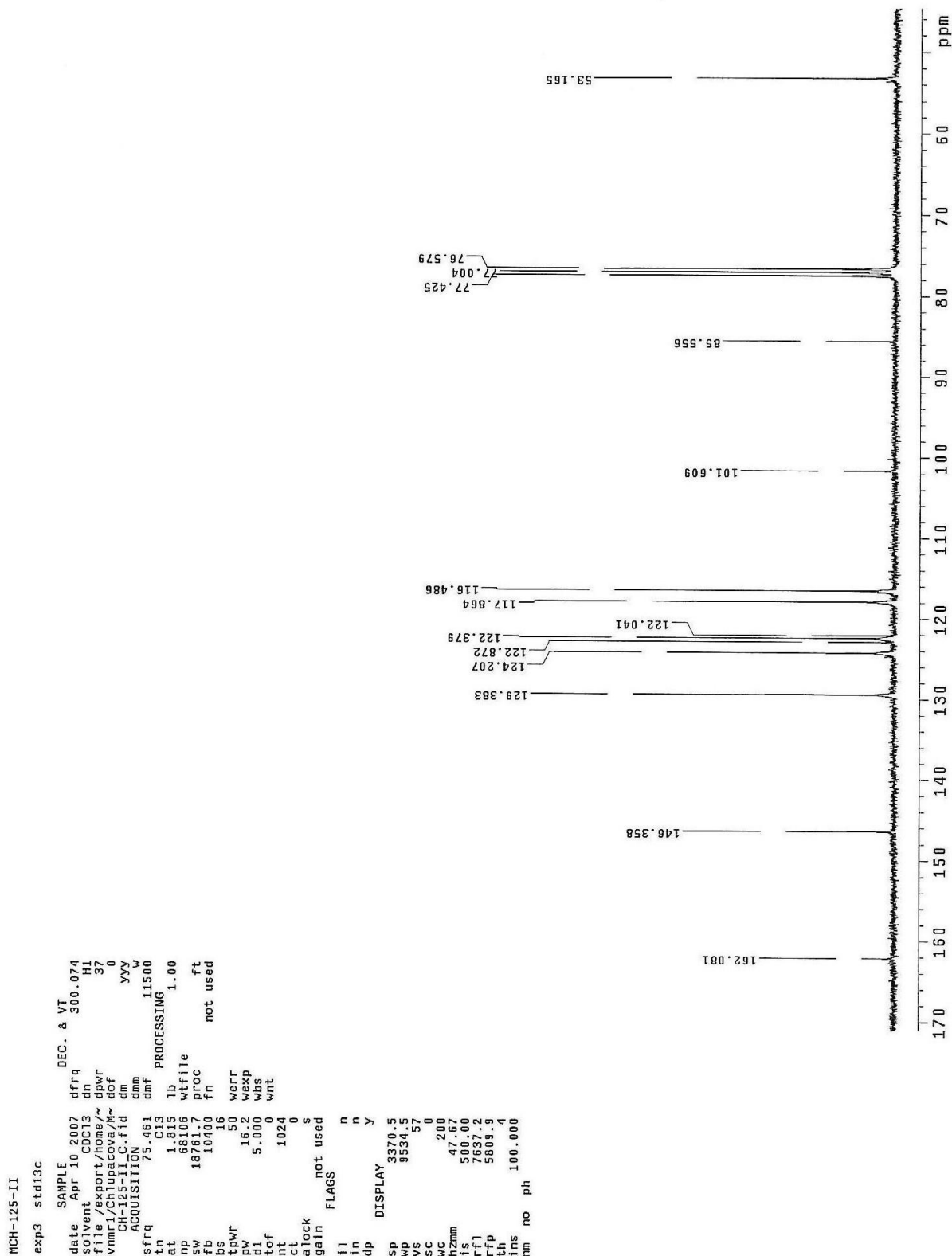
## 8.2. Příloha II



### 8.3. Příloha III



# 8.4. Příloha IV



## 9. Použitá literatura:

- <sup>1</sup> A. Holý; Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik; 1. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2004, 414 s., ISBN 80-244-0855-4
- <sup>2</sup> D.Göpfertová a kol.; Epidemiologie infekčních nemocí; 1. vydání, Univerzita Karlova v Praze - Karolinum, Praha 2003, 230 s., ISBN 80-246-0452-3
- <sup>3</sup> J.Havlík *et al.*; Infekční nemoci; 2. rozšířené vydání, Galén, Praha 2002, ISBN 80-7262-173-4
- <sup>4</sup> P. Husa; Novinky v léčbě chronických virových hepatitid; Interní Med. 2007;5: 217-220
- <sup>5</sup> J. Špercl; Léčba chronické hepatitidy B; Remedia 2005; 1: 67-74
- <sup>6</sup> M. T. Reading; Recent developments in hepatitis C antiviral research 1999-2000; Expert Opin. Ther. Patents 2000; 10: 1201-1220
- <sup>7</sup> X.J. Zhou *et al.*; Phase I dose-escalation pharmacokinetics of AZT-P-ddI (IVX-E-59) in patient with human immunodeficiency virus; J. Clin. Pharmacol. 1997; 37: 201-213
- <sup>8</sup> E.Lipka *et al.*; Enantiomeric excess determination, purification and biological evaluation of (3S) and (3R)  $\alpha,\beta$ -butenolide analogues of isobenzofuranone; Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005; 15: 501-504
- <sup>9</sup> A. Kim a J. H. Hong; Enantiomeric of novel apiosyl nucleosides as potential antiviral agents; Bull. Korean Chem. Soc. 2004; 25: 221-225
- <sup>10</sup> M. Chu *et al.*; Isolation and structure of SCH 351633: a novel hepatitis C virus (HCV) NS3 protease inhibitor from the fungus *Penicillium griseofulvum*; Bioorg. Med. Lett. 1999; 9: 1949-1952
- <sup>11</sup> A. H. Abou *et al.*; Chemical constituents of some fungi and their antiviral activity; Bull. NRC. Egypt 2003; 28: 1-20
- <sup>12</sup> T. Ishikawa *et al.*; Cochinelide, a new  $\gamma$ -alkylidene bicyclic butenolide with antiviral activity, and its  $\beta$ -glucopyranoside from *Homalium cochinchinensis*; J. Nat. Prod. 1998; 61: 534-537
- <sup>13</sup> J. McNulty *et al.*; Discovery of the Apoptosis-Inducing Activity and High Accumulation of the Butenolides, Menisdaurilide and Aquilegiolide, in *Dicentra spectabilis*; Planta Med. 2007; 73: 1543-1547
- <sup>14</sup> G. H. Hakimelahi *et al.*; Synthesis and biological evaluation of purine-containing butenolides; J. Med. Chem. 2001; 44: 1749-1757
- <sup>15</sup> H.-J. Zhang *et al.*; Sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from *Litsea verticillata*; Planta Med. 2005; 71: 452-457
- <sup>16</sup> I. S. Marcos *et al.*; Synthesis and absolute configuration of three natural ent-halimanolides with biological activity; Tetrahedron Lett. 2003; 44: 369-372
- <sup>17</sup> J. Jauch; A short synthesis of mniopetal F; Eur. J. Org. Chem. 2001; 3: 473-476
- <sup>18</sup> D.-R. Hwang *et al.*; Synthesis and anti-viral activity of a series of sesquiterpene lactones and analogues in the subgenomic HCV replicon system; Bioorg. Med. Chem. 2006; 14: 83-91
- <sup>19</sup> J.-Ch. Lee *et al.*; Justicidin A decreases the level of cytosolic Ku70 leading to apoptosis in human colorectal cancer cells, Carcinogenesis 2005; 26:1716-1730
- <sup>20</sup> J. M. J. Tronchet *et al.*; Stereospecific syntheses of 1-[2,3-dideoxy-3-(*N*-hydroxy-*N*-methylamino)- $\alpha$ -D- and  $\alpha$ -D-pentofuranosyl]thymine from L- and D-glutamic acids respectively, Carbohydr. Lett. 1996, 2: 205-212
- <sup>21</sup> L. S. Hegedus and L. Geisler; Synthesis of (+)-neplanocin A from a chromium-carbene complex-derived optically active butenolide; J. Org. Chem. 2000, 65: 4200-4203
- <sup>22</sup> D. D. Nekrasov *et al.*; Interaction of 5-aryl-2,3-dihydro-furan-2,3-diones with functionally substituted hydrazides and diaminoglyoxal diphenylhydrazone, Chem. Heterocyc. Compd. 2004; 40: 301-307
- <sup>23</sup> T. Gazivoda *et al.*; The novel pyrimidine and purine derivatives of L-ascorbic acid: synthesis, one- and two-dimensional <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR study, cytostatic and antiviral evaluation; Bioorg. Med. Chem. 2005; 14: 131-139
- <sup>24</sup> G. H. Hakimelahi *et al.*; Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Nucleoside and Nucleotide Analogues as Agents against DNA Viruses and/or Retroviruses; J. Med. Chem. 2001; 44: 3710-3720
- <sup>25</sup> A. G. Myers *et al.*; Tetrahedron Lett. 1989, 30 6997-7000
- <sup>26</sup> M. Chlupáčová, M. Pour, J. Kuneš; Studie syntézy prekurzorů pro přípravu biologicky aktivních 2,5-dihydrofuran-2-onů. Sborník 35. Konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice, 12. – 15. 9. 2006, s. 96
- <sup>27</sup> A. G. Myers *et al.*; Versatile precursors for synthesis of enynes and enediynes, Tetrahedron Lett. 1989; 30: 6997 - 7000

---

<sup>28</sup> E. Negishi; Handbook of organopalladium chemistry for organic synthesis, John Wiley and Sons, Inc., New York 2002, 493-529, ISBN 0-471-31506-0

<sup>29</sup> R. Rossi et al.; A new stereocontrolled synthesis of dihydroxerulin, a potent noncytotoxic inhibitor of the biosynthesis of cholesterol, Tetrahedron Lett. 2000; 56: 479-487