

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Milan Štefek

Příprava nových proléčiv pro protivirovou terapii
Synthesis of novel prodrugs for antiviral therapy

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Radim Nencka, Ph. D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 5. 2017

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Radimu Nenckovi, Ph.D. za projevenou důvěru, pomoc a vedení při této práci. Dále bych chtěl poděkovat Milanu Dejmkovi, Ph.D. za cenné rady, pomoc při řešení celé řady problémů a především trpělivost. Dík patří také Michalu Šálovi, Ph.D. a mým ostatním kolegům.

V neposlední řadě děkuji také své rodině za dlouhodobou podporu a mé přítelkyni, která mi byla oporou po celou dobu studií, čímž prokázala značnou psychickou odolnost.

Abstrakt

Tato bakalářská práce pojednává o přípravě proléčiv odvozených od 2'-C-methyladenosinu, který je potentním inhibitorem RNA dependentní RNA polymerázy flavivirů. Byla připravována proléčiva s modifikací hydroxyskupin na 3' a 5' uhlících schopna zacílit tuto látku do mozku a centrální nervové soustavy. Jako cílicí skupiny byly využíván tropin a redoxní systém trigonellin/1,4-dihydrotrigonellin. V případě tropinu se podařilo vyvinout vhodnou metodu přípravy proléčiv, zatímco spolehlivý postup pro provedení posledního kroku syntézy látek využívajících zmíněného redoxního systému musí být teprve objeven.

Klíčová slova: flaviviry, antivirotika, hematoencefalická bariéra, proléčiva, cílení léčiv

Abstract

This bachelor thesis is dedicated to preparation of prodrugs derived from 2'-C-methyladenosine, which is a potent inhibitor of the RNA dependent RNA polymerase of flaviviruses. Prodrugs modifying 3' and 5' hydroxy groups able to deliver the drug to brain and were prepared. As targeting moieties tropine and the redox system trigonelline/1,4-dihydrotrigonelline were used. In the case of tropine a suitable method for the preparation of prodrugs was developed. Reliable procedure for performing the last step of synthesis of compounds utilizing the trigonelline redox system is yet to be discovered.

Keywords: flaviviruses, antiviral agents, blood-brain barrier, prodrugs, drug targeting

Obsah

	Poděkování.....	3
	Abstrakt.....	4
	Abstract.....	4
	Použité zkratky	7
1	Úvod.....	10
2	Cíle práce	11
3	Přehled problematiky	12
3.1	Flaviviry a inhibitory jejich RNA-dependentní RNA-polymerázy	12
3.1.1	Flaviviry jako významné lidské patogeny.....	12
3.1.2	Molekulárně-biologická charakteristika.....	13
3.1.3	Model replikace flavivirů	18
3.2	Inhibitory RdRp flavivirů	19
3.2.1	Typy inhibitorů.....	19
3.2.2	Obecné vlastnosti NI	20
3.2.3	Deriváty nukleosidů jako potenciální inhibitory flavivirové RdRp	21
3.3	Hematoencefalická bariéra a přeprava léčiv do mozku.....	24
3.3.1	Stavba a funkce hematoencefalické bariéry	24
3.3.2	Základní faktory významné pro schopnost látek vstoupit do centrální nervové soustavy.....	26
3.3.3	Metody překonání hematoencefalické bariéry	28
3.4	Proléčiva	30
3.4.1	Charakteristika	30
3.4.2	Funkční skupiny využívané při syntéze proléčiv	31
3.4.3	Příklady schválených proléčiv.....	32
3.4.4	Proléčiva dopravující látky do centrální nervové soustavy.....	34

4	Diskuze a výsledky	40
4.1	Příprava 2'-C- methyladenosinu.....	40
4.2	Zavádění chránících skupin na nukleosid.....	41
4.3	Příprava proléčiv obsahujících tropin jako cílí skupinu	43
4.4	Příprava proléčiv obsahujících 1,4-dihydrotrigonellin jako cílí skupinu	48
5	Experimentální část.....	53
5.1	Obecné postupy a chemikálie	53
5.2	Použité postupy a naměřená data.....	53
6	Závěr	63
7	Literatura.....	64

Použité zkratky

2'-CMA	2'-C-methyladenosin
2'-CMU	2'-C-methyluridin
ACN	Acetonitril
BBB	Hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
Bz	Benzoyl
Cbz	Benzyloxykarbonyl
CC₅₀	Cytotoxická koncentrace, při níž dojde k úmrtí 50 % buněk
CDS	Chemický přepravní systém
CNS	Centrální nervová soustava
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	N,N'-Dicyklohexylkarbodiimid
DENV	Virus dengue
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMAP	N,N-dimethylaminopyridin
DMF	N,N-dimethylformamid
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	Dvojvláknová RNA
EC₅₀	Koncentrace, při níž je požadovaný efekt pozorován u 50 % pozorování
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ER	Endoplazmatické retikulum
EtOAc	Ethylacetát

GABA	γ -aminomáselná kyselina
HBV	Virus hepatitidy B
HCV	Virus hepatitidy C
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
iPAW	Směs isopropanolu, 25% NH ₄ OH a vody
JEV	Virus japonské encefalitidy
MTáza	Methyltransferáza
NI	Nukleosidové inhibitory
NNI	Nenukleosidové inhibitory
NTP	Nukleosidtrifosfát
NTPáza	Nukleosidtrifosfatáza
NOAEL	Úroveň expozice látky, při níž nejsou pozorovány žádné vedlejší účinky
NS	Nestrukturní protein
ORF	Otevřený čtecí rámeček
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza
ssRNA	Jednovláknová RNA
TEA	Triethylamin
TEAAc	Triethylamonium acetát
TBAF	Tetra-n-butylamonium fluorid
TBDMS	<i>Tert</i> -butyldimethylsilyl
TBEV	Virus klíšťové encefalitidy
Tf	Trifluormethansulfonyl

TFA	Trifluoroctová kyselina
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TMS	Trimethylsilyl
Tol	Toluoyl
Ts	<i>p</i> -toluensulfonyl
UTR	Netranslatovaný úsek RNA
YFV	Virus žluté zimnice
WNV	Virus západonilské horečky
ZIKV	Virus zika

1 Úvod

Viry rodu *Flavivirus* jsou významnými lidskými patogeny vyskytujícími se především v tropických oblastech. Důležitými zástupci jsou například viry žluté zimnice, dengue, zika a ve středoevropském prostředí především virus klíšťové encefalitidy. Jelikož na léčbu flavivirových infekcí neexistuje žádná specifická léčba, je vývoj nových antivirotik nezbytný pro zvládnutí šíření těchto virů. Flaviviry jakožto RNA viry využívají pro replikaci své genetické informace RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp), která nemá v lidských buňkách funkční ekvivalent a která je tak velmi atraktivním cílem pro přípravu nových antivirotik.

Inhibitory RdRp mohou být rozděleny na nukleosidové a nenukleosidové. Nenukleosidové účinkují pomocí alosterické inhibice proteinu, zatímco nukleosidové jsou začleňovány do nově vznikající RNA, což vede buďto k okamžitému zastavení polymerace nebo k pozdější akumulaci chyb v genomu. Díky menšímu riziku vývoje rezistencí a větší selektivitě je využívání nukleosidových inhibitorů virových polymeráz obecně úspěšnějším přístupem.

Jednou ze skupin nukleosidových inhibitorů, která vykazuje vysokou aktivitu a zároveň jen velmi nízkou toxicitu jsou 2'-C-methylnukleosidy. Mezi nimi vyniká svou aktivitou 2'-C-methyladenosin. Z tohoto důvodu byl zvolen jako ústřední látka mé práce zaměřené na přípravu jeho prolečiv.

Obecnou vlastností nukleosidových inhibitorů je jejich velká polarita, která zamezuje jejich pasivní difuzi do mozku. Jelikož ale některé flaviviry napadají primárně mozek a centrální nervovou soustavu, je nezbytné pro úspěšnou terapii zlepšit jejich prostupnost hematoencefalickou bariérou, která odděluje mozek od systémové cirkulace. Jednou z možností zlepšení vstupu látek do mozku je příprava prolečiv, tedy takových léčiv, které musí nejprve projít enzymatickou reakcí *in vivo* a teprve poté vykazují účinek. Kromě možnosti maskování polárních skupin, a tedy zlepšení pasivní difuze skrz hematoencefalickou bariéru, je možné připravit i taková prolečiva, která budou aktivně transportována do mozku nebo se do něj sice dostanou difuzí, ale následná enzymatická reakce jim znemožní mozek pasivně opustit. Právě syntéze prolečiv dvou posledních zmíněných typů je věnována experimentální část této práce.

2 Cíle práce

Přípravit dostatečné množství 2'-C-methyladenosinu a seznámit se s metodami chránění nukleosidů a dalšími reakcemi v chemii nukleových kyselin..

Přípravit proléčiva 2'-C-methyladenosinu s modifikacemi esterovými vazbami v polohách 3' a 5' se schopností cílit léčiva do mozku a centrální nervové soustavy. Jako cílicí skupiny využít tropin a redoxní systém trigonellin/1,4-dihydrotrigonellin.

3 Přehled problematiky

3.1 Flaviviry a inhibitory jejich RNA-dependentní RNA-polymerázy

3.1.1 Flaviviry jako významné lidské patogeny

Rod *Flavivirus* je rodem virů s jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou z čeledi *Flaviviridae*. Dalšími rody z této čeledi jsou *Hepacivirus* a *Pestivirus*, ovšem co do počtu členů je největším rodem právě *Flavivirus*, který zahrnuje v současné době více než 70 virů. Mezi flaviviry patří mnoho významných lidských patogenů, které se v terminálních fázích onemocnění projevují obvykle encefalitou nebo hemorhagickou horečkou. Konkrétně to jsou například virus žluté zimnice (yellow fever virus, YFV), dengue virus (DENV), virus japonské encefalitidy (JEV), virus klíšťové encefalitidy (tick-borne encephalitis virus, TBEV), virus západonilské horečky (WNV) a virus Zika (ZIKV).¹ Jako typický zástupce rodu je uváděn YFV, projevující se v pokročilé fázi žloutenkou, podle kterého rod získal i své označení (latinsky flavus = žlutý). Zároveň byl v roce 1927 i úplně prvním lidským patogenním virem, který byl izolován.² Odhadem ročně prodělá těžkou formu nemoci 170 000 lidí, z nichž až 60 000 nemoci podlehnou.³ DENV je co do počtu nakažených nejvýznamnějším zástupcem s až 50 miliony nakažených ročně, přičemž přibližně u jednoho procenta dochází k propuknutí hemorhagické horečky.¹ TBEV je virus endemický v Evropě a ruské části Asie. Je zaznamenáno přibližně 11 000 případů ročně v Rusku a asi 3000 v Evropě. Projevy mohou být různě závažné, od chřipce podobných až po ochrnutí a (častěji v případě kmenů vyskytujících se na Dálném východě) smrt.⁴ JEV je významným patogenem v jihovýchodní Asii, přičemž je původcem asi 50 000 případů encefalitidy ročně s úmrtností přibližně 25 %. U přibližně 30 % pacientů, kteří prodělali závažnou encefalitidu dochází k vývoji trvalého fyzického nebo intelektuálního postižení.⁵ WNV byl původně lokalizován pouze v Africe, ale v průběhu minulého století se rozšířil i do Asie, Evropy, Austrálie a v roce 1999 i do Ameriky. Většina nálezů je asymptomatická nebo se projevuje horečnatými stavy. Relativně zřídka (1 ze 150 případů) se nemoc může rozvinout do formy závažné encefalitidy nebo meningitidy provázené ztuhlostí nebo paralýzou.⁶

Většina flavivirů (a všechny výše jmenované) patří mezi arboviry (z anglického arthropod-borne viruses), tedy viry jejichž vektorem je hmyz. Ve většině případů je člověk koncovým hostitelem, ze kterého se tedy už další hmyz nenakazí a ani nepřenesou nemoc přímo na dalšího

člověka. Toto ale neplatí třeba u YFV a DENV, které jsou přenášeny především antropofilním komárem *Aedes aegypti*. Dalšími častými přenašeči jsou komáři rodu *Culex* (WNV, JEV) a klíšťata *Ixodes ricinus* (TBEV). V případě TBEV je nákaza možná i při požití mléka a mléčných produktů od nakaženého zvířete.⁴

V současné době neexistuje specifická protivirová léčba na žádný z flavivirů, která by již byla používána v klinické praxi. Nejvýznamnějších úspěchů bylo dosaženo vyvinutím vakcín ve formě oslabeného YFV a inaktivovaného JEV a TBEV. Přesto jsou i tyto nemoci stále významnou hrozbou a to především proto, že se YFV a JEV vykytují především v oblastech s nižší dostupností kvalitní lékařské péče.⁷ Snahy o vytvoření vakcín proti ostatním flavivirům byly dlouho neúspěšné. Jedna z komplikací spočívala například v tom, že DENV má 4 příbuzné ale přesto velmi odlišné sérotypy, přičemž všechny mohou způsobit závažné onemocnění.⁸ Nicméně v nedávné době byla pro klinické použití schválena vakcína proti DENV, které sice má značná omezení, ale přesto má potenciál ovlivnit rozšíření tohoto viru.⁹

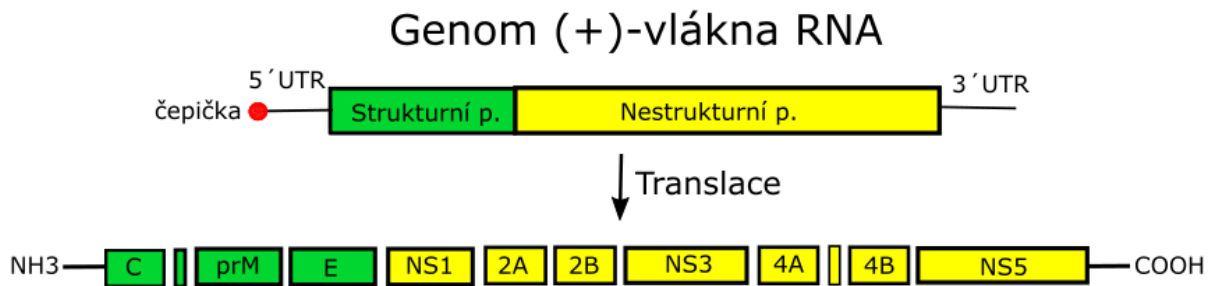
3.1.2 Molekulárně-biologická charakteristika

3.1.2.1 Virion a struktura genomu

Zralý virion flavivirů má hladký povrch a tvar koule o průměru 500 Å. Genom je obalený kapsidou tvořenou kapsidovým (C) proteinem. Ta je dále obalena lipidovou dvojrstvou odvozenou od hostitelských membrán, ve které jsou ukotveny virové strukturní proteiny M a E. Ty z vnější strany pokrývají lipidovou dvojrstvu do té míry, že není přístupná z vnějšího prostředí.¹ Uvnitř kapsidy je jednovláknová RNA dlouhá přibližně 11 kilobází (kb). Jelikož se jedná o RNA s pozitivní polaritou, je už sama o sobě infekční. Na 5' konci je RNA ukončena čepičkou typu 1 (m⁷GpppAmp), která nejenže umožňuje iniciaci translace, ale také brání degradaci RNA endogenními exonukleázami.¹⁰ Na 3' konci není RNA, s výjimkou některých kmenů TBEV, ukončena poly(A) úsekem.¹¹ Výrazným znakem RNA flavivirů je jediný otevřený čtecí rámec (ORF), který svou délkou přesahuje 10 kb. Žádný jiný ORF není přítomen ani na komplementárním vlákně. ORF je na koncích ohraničen netranslatovanými úseky o délce přibližně 130 bází na 5' konci a 400-700 bází na 3' konci.⁴ Nicméně v posledně jmenovaném parametru se od virů přenášovaných komáry výrazně odlišuje TBEV, u kterého je tento úsek jen 114 bází dlouhý.¹² Tyto koncové úseky vytváří sekundární smyčku, která patrně funguje jako cis-regulační element, a tedy může ovlivňovat amplifikaci, translaci nebo sestavování virionu.⁴

Jak již bylo zmíněno, RNA flavivirů obsahuje jediný ORF a kóduje tedy jediný virový polyprotein, který je rozdělen v průběhu translace a po jejím ukončení na jednotlivé proteiny

endogenními i virovou proteázou. Rozštěpením polyproteinu vznikají 3 strukturální proteiny a 7 nestrukturních. Od N-konce jsou to proteiny C (kapsid), prM (prekurzor membránového proteinu), E (envelope, obal) a dále nestrukturní proteiny, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5.¹³ V současné době jsou jedinými proteiny s jistou enzymatickou aktivitou NS3 a NS5, které oba katalyzují více reakcí.¹⁴ Ostatní nestrukturní proteiny jsou sice součástí replikačního komplexu na endoplasmatickém retikulu, ale plní jiné funkce.¹⁵



Obrázek 1 - Rozčlenění genomu flavivirů a rozdělení na proteiny po translaci

3.1.2.2 Nestrukturní proteiny

Kapsidový (C) protein je stavební jednotkou při tvorbě nukleokapsidu.¹ Pravděpodobně také interaguje s lipidovou membránou Golgiho aparátu a RNA a podílí se tak na skládání virové částice.¹⁶ Envelope (E) proteiny jsou ukotveny v lipidové membráně obalující virovou částici a zcela ji zakrývají.¹⁷ Jeho interakce s receptory na buněčném povrchu nejspíš umožňuje vstup do buněk a následně zajišťuje spojení obalové membrány s membránou endosomu a tím uvolnění nukleokapsidu do cytosolu.^{1,17} Úlohou prM proteinu je bránit předčasné maturaci virové částice, která by vedla ke splynutí membrány zrající částice s membránami Golgiho systému a tím k přerušení celého procesu maturace.^{17,18}

3.1.2.3 Proteiny NS1, NS2A/B a NS4A/B

Tyto proteiny nevykazují přímo enzymovou aktivitu, a tedy plní pomocnou funkci.

Protein NS1 je umístěn v lumen endoplazmatického retikula (ER), což je na opačné straně membrány ER, než ostatní NS proteiny. Hraje roli v ukotvení replikačního komplexu v membráně. Je prokázána jeho interakce s NS4A, který je transmembránovým proteinem a kofaktorem NS5. Další role NS1 jsou dosti rozporuplné. Může se nacházet asociovaný na povrchu hostitelské buňky nebo být sekretován jako hexamer. Obě zmíněné formy jsou silně imunogenní, což vede k tvorbě velkého množství protilátek. Ty sice mohou neutralizovat

infikované buňky, jelikož se ale sekretovaný NS1 může vázat typicky na buňky endotelu, hraje i významnou roli při patogenezi, kdy vyvolává apoptózu nebo nekrózu.¹⁹

NS2A, NS2B, NS4A a NS4B jsou malé proteiny, které jsou si napříč rody flavivirů strukturně velmi podobné, byť sekvence aminokyselin je jen málo konzervovaná. S ohledem na obsah hydrofobních úseků se předpokládá jejich přítomnost v membránách a účast na protein-proteinových interakcích s NS3 a NS5.¹²

3.1.2.4 NS3 protein

NS3 je enzym složený ze dvou domén spojených krátkým flexibilním úsekem umožňujícím změnu jejich vzájemné polohy, kdy každá z domén plní jinou enzymatickou funkci. N-konec slouží jako proteáza, zatímco asi třikrát větší doména u C-konce plní funkci helikázy, RNA trifosfatázy a nukleosid trifosfatázy. Dále NS3 má také funkci neenzymatickou, jelikož nejenže interaguje s ostatními složkami replikačního komplexu, ale ovlivňuje také funkce hostitelské buňky jako je autofágie, polymerace aktinu a syntéza mastných kyselin. Mimo zmíněného patrně hraje roli při skládání virionu a v důsledku proteolytické aktivity i při tlumení imunitní reakce.²⁰

Virová proteáza provádí přibližně polovinu štěpení potřebných pro zpracování polyproteinu. Štěpení vykonává jak intermolekulárně, tak i intramolekulárně. Pro funkci NS3 jako proteázy je nezbytná tvorba heterodimeru s NS2B, který má na obou koncích transmembránové úseky, kterými je ukotven v membráně ER a prostřední hydrofilní úsek. Ten nejenže svou vazbou na NS3 umožňuje dosažení správné konformace, ale dokonce se přímo podílí na proteolýze.¹⁴ S ohledem na svou klíčovou roli v replikačním cyklu viru je NS3 proteáza považována za atraktivní cíl pro návrh inhibitorů.⁷

Doména na C-konci vykonává především funkci helikázy, která pro svou funkci spotřebovává ATP (proto má i funkci NTPázy).¹⁸ Funkce tohoto proteinu je klíčová pro zahájení syntézy (-)-vlákna RNA, kdy je potřeba rozvinout sekundární strukturu 3'-netranslatovaného úseku a dále pro další opakování syntézy (+)-vlákna na základě dsRNA vytvořené jako intermediát.²⁰ Hydrolýza koncového fosfátu na 5'-konci, kterou také vykonává tato doména, je nezbytnou přípravou RNA před tím, než na ní může být vytvořena čepička.⁷

3.1.2.5 NS5 protein

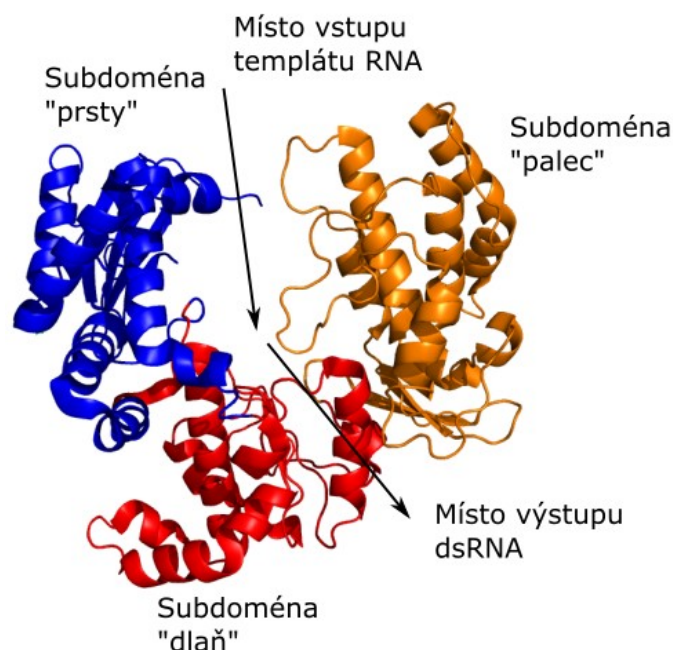
Jedná se o největší protein flavivirů s hmotností asi 100 kDa. Mimo to je také nejvíce konzervovaný napříč celým rodem.⁷ Stejně jako v případě NS3 se jedná o dvoudoménový

protein, který vykonává více enzymatických funkcí. Jeho N-terminální doména vystupuje jako methyl transferáza (MTáza) a dvě třetiny proteinu bližší C-konci tvoří RNA dependentní RNA polymeráza (RdRp).

MTáza flavivirů methyloje čepičku na 5'- konci RNA (typ1, m⁷GpppAm-RNA). V případě WNV a DENV se nedávno ukázalo, že methylují i báze uvnitř řetězce.²¹ Methylace N7 guanosinu je klíčová pro pokračování replikačního cyklu a defekt v této pozici je pro virus nepřekonatelným problémem. Naopak při chybějícím methylo v pozici 2'-O adenosinu je replikace stále možná v buňkách s narušenou produkcí interferonu.²¹ Úlohou této metylace je tedy vyhnout se vrozené imunitní odpovědi buňky. Použitím čepičky typu 1 totiž dochází k napodobení mRNA hostitelských buněk, čímž je dosaženo ochrany před exonukleázami.²³

RdRp doména proteinu NS5 je naprosto nezbytná pro replikaci flavivirů. Její funkcí je syntéza (-)-vlákna RNA na základě genomické RNA a následná syntéza (+)- vlákna RNA, které může být použito jako templát pro syntézu polyproteinu, (-)-vlákna nebo být zabaleno do kapsidy a stát se součástí vznikajícího virionu. Podstatnou vlastností této RdRp je, že vykonává syntézu RNA *de novo*, tedy bez nutnosti použití primeru.¹⁴

RdRp flavivirů má strukturu podobnou přivřenému pravému ruce typickou pro RdRp (Obrázek 2). Ta se sestává ze tří subdomén, které jsou s ohledem na zmíněnou podobnost někdy označovány jako palec, dlaň a prsty. Struktura proteinu je uzavřena propojující smyčkou (označovaná také jako fingertip, „koneček prstu“). Tato smyčka vymezuje v proteinu dva otvory, kterými mohou vstupovat/vystupovat RNA a NTP. V rámci proteinu lze nalézt 7 konzervovaných motivů, které se podílejí na vazbě RNA, NTP a kovových iontů a na katalýze.²³



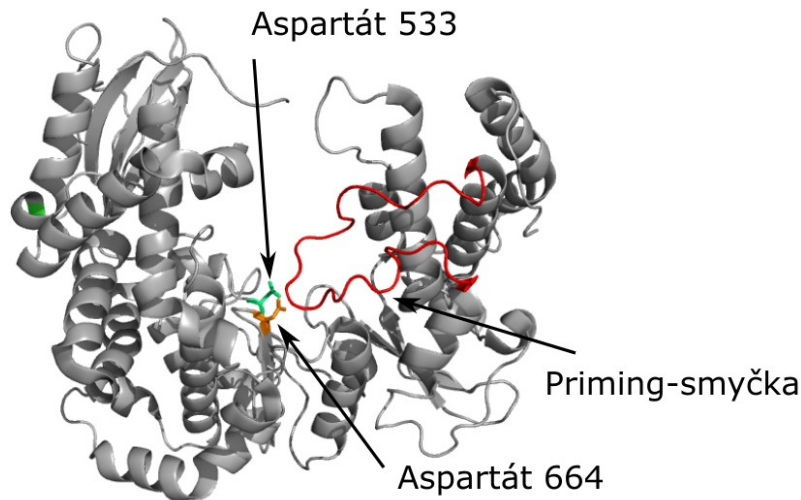
Obrázek 2 - RdRp viru dengue. Je zde patrný typický uzavřený tvar.

Nejvíce konzervovanou subdoménou je prostřední (tedy podle podobnosti s rukou dlaň) obsahující aktivní místo enzymu. Její součástí jsou tři ze zmíněných 7 konzervovaných motivů a dva z nich obsahují katalyticky aktivní kyselinu asparagovou. Jedna (533) slouží k deprotonaci 3'-hydroxyly na prvním NTP, který následně napadá α -fosfát dalšího začleňovaného NTP. Druhý aspartát (664) slouží k vytvoření vhodné geometrie pro zmíněnou reakci (Obrázek 3). Zároveň se tyto aminokyseliny podílejí na koordinaci hořčnatého iontu, který plní neznámou katalytickou funkci. Kromě tohoto katalytického iontu je v dlani koordinován další Mg^{2+} v nekatalytické pozici, který je pravděpodobně důležitý pro vysunutí vytvořeného prvního dinukleotidu nového vlákna vznikající dsRNA z aktivního místa.¹¹

Další subdoménu (označovanou také jako prsty) tvoří jádro a dva výběžky (nazývané fingertips, „konečky prstu“), z nichž jeden vytváří zmíněnou uzavřenou strukturu. Dále tato subdoména obsahuje motiv F a smyčku G. Motiv F ve většině RdRp váže nově přistupující NTP a směřuje ho k aktivnímu místu. S ohledem na nevhodnou polohu pro tento úkon ve flavivirové RdRp, je ale jeho úloha nejspíš jiná. G smyčka vystupuje k aktivnímu místu a existují domněnky, že se podílí na regulaci enzymové aktivity. V případě DENV tato subdoména obsahuje ještě sekvenci pro lokalizaci do jádra.¹¹

Poslední subdoména obsahuje motiv, který hraje roli ve vazbě prvního NTP. Nejzajímavější částí je ale smyčka, která zasahuje do aktivního místa (Obrázek 3). Ta je nazývána motiv G

nebo priming-smyčka, tedy smyčka potřebná pro tvorbu prvního dinukleotidu. Je potřebná pro stabilizaci *de novo* iniciačního komplexu.¹⁴



Obrázek 3 - RdRp viru dengue s vyznačením smyčky významné pro *de novo* iniciaci a dvou aspartátů, které se na iniciaci rovněž podílejí

Jak již bylo zmíněno, RdRp je součástí replikačního komplexu, který zahrnuje všechny virové proteiny a další hostitelské proteiny. Flaviviry upravují buněčné membrány, nejspíš aby zabránily degradaci replikačního komplexu buněčnými mechanismy. Vytváří tak kulovité jednomembránové vesikuly na povrchu endoplasmatického retikula invaginací do jeho lumen. Tyto váčky zůstávají spojeny s cytoplasmou pórem. Komplex je ukotven v membráně proteiny NS1, NS2A/B a NS4A/B. Patrně jedinou interakcí NS5, která způsobuje jeho lokalizaci na membráně je ta s NS3 spojeným s NS2B.²⁰

RNA se v hostitelských buňkách vyskytuje ve třech různých formách. Jsou to genomická (+)-ssRNA, dsRNA fungující jako replikační forma a replikační intermediát, který obsahuje rostoucí vlákno RNA a dsRNA templátu. Samostatné vlákno (-)ssRNA se *in vivo* nevyskytuje.¹⁰

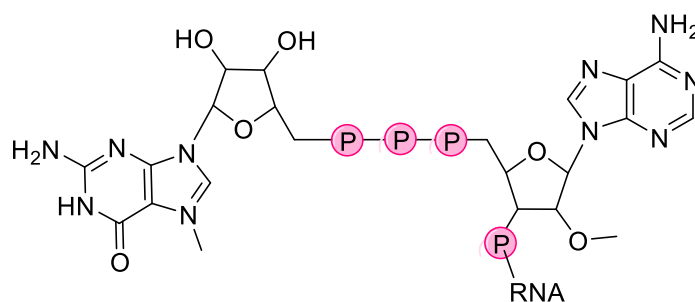
3.1.3 Model replikace flavivirů

Vlákno dsRNA s negativní polaritou je syntetizováno NS5 na základě genomické RNA. Pro tento krok patrně není potřeba funkce NS3. V UTR (netranslatovaných úsecích) na obou koncích (+)-ssRNA je umístěna cyklická sekvence a právě cyklická forma slouží jako templát rozeznávaný NS5. NS5 rozeznává vlásenku A umístěnou na 5'-konci a následně zahájí syntézu komplementárního řetězce na 3'-konci.²⁴

Virový replikační komplex používá (-)vlákno v dsRNA jako templát pro syntézu (+)-ssRNA. Syntéza (+)ssRNA výrazně převládá nad syntézou (-)vlákna. V tomto případě je potřeba

souhry aktivit NS3 a NS5. NS3 helikáza nejprve oddělí vlákna dsRNA a 3'-konec (-)-vlákna RNA se naváže do tunelu v RdRp, kudy vstupuje templát. V tomto případě není potřeba zvláštních sekundárních struktur vlákna, jako tomu bylo u syntézy (-)-vlákna. Po dokončení syntézy se z RdRp uvolní nově vzniklá dsRNA a zároveň je uvolněna (+)-ssRNA, která byla původně součástí dsRNA. Nová dsRNA je recyklována pro další syntézy.²⁴

Při tvorbě čepičky na 5'-konci (+)ssRNA (Obrázek 4) nejprve dochází k hydrolyze 5'-koncového fosfátu NS3 helikázou, čímž vzniká koncový difosfát. Takto upravená RNA se naváže na MTasu. Ta nejprve reaguje s GTP za vzniku intermediátu GMP-MTasa, který dále vytvoří na RNA čepičku. Následují methylace N7 guanosinu a 2'-OH adenosinu, kdy pro methylace N7 je potřeba přítomnost vlásenky A na 5'-UTR. Jelikož MTasa provádí 3 následné odlišné reakce na jediném aktivním místě, je potřeba v každém kroku disociace a opětovná asociace RNA a enzymu.²⁴



Obrázek 4 - 5'čepička typu I

3.2 Inhibitory RdRp flavivirů

3.2.1 Typy inhibitorů

RdRp je jedním z nejzajímavějších cílů pro vývoj antivirových terapií. Je to především proto, že její funkce je nezastupitelná a případná účinná látka by měla potenciál působit na širší spektrum virů, například u dengue viru také proti všem čtyřem sérotypům. Navíc, jelikož buňky postrádají enzym s obdobnou funkcí, mělo by být možné vytvořit poměrně selektivní inhibitory.⁷ Jako odrazový můstek pro vývoj nových látek slouží ty, které se již osvědčily při vývoji terapie proti viru hepatitidy C (HCV), který patří také do čeledi Flaviviridae.¹⁰

Inhibitory virové RNA polymerázy mohou být rozděleny do dvou širokých skupin. Jsou to analogy nukleosidů/nukleotidů (NI, nukleoside inhibitors) a nenukleosidové inhibitory (NNI). NI musí být nejprve metabolizovány na své trifosfáty, pročež dochází k jejich kompetici s přirozenými NTP. Pokud dojde k jejich začlenění do rostoucího řetězce, může dojít

k terminaci elongace. Kromě zastavení syntézy RNA může účinek látek spočívat i v tom, že NI jsou začleněny do vznikající molekuly bez narušení replikačního cyklu a jejich přítomnost se projeví, až když je molekula NI obsahující použita jako templát pro další syntézu. Nahromadění inhibitoru v molekule templátu vede ke vzniku velkého množství mutací a tzv. chybové pohromě (error catastrophe).²⁵ V tom spočívá část účinku ribavirinu, který je ověřen jako inhibitor polymerázy HCV.¹⁰ NNI se zpravidla vážou na alosterická místa na polymeráze. Tím může dojít buď ke konformační změně deaktivující enzym nebo k zadržení enzymu v sice přirozené konformaci, ale znemožnění potřebné konformační změny při přechodu od iniciace k elongaci. Alosterická inhibice je prověřenou strategií, která se uplatnila v případě RdRp HCV a reverzní transkriptázy HIV.²⁶

Okrajovou kategorií jsou v současné době látky narušující protein-proteinovou interakci nebo interakci mezi proteiny a RNA. Efektivní antivirotika narušující interakce virové polymerázy v rámci replikačního komplexu byla nalezena například pro herpes virus. V případě flavivirů je ale výzkum v této oblasti v počáteční fázi.¹¹

3.2.2 Obecné vlastnosti NI

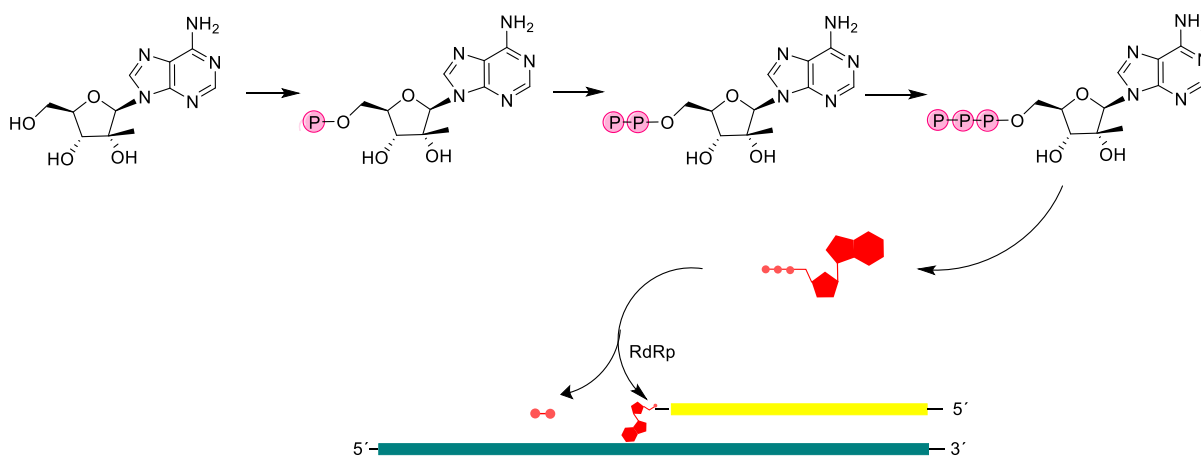
NI tvoří největší skupinu schválených antivirotik. Efektivita jejich používání již byla ověřena v případě HIV-1, HBV a v poslední době také významnými objevy inhibitorů HCV.²⁷ Běžným postupem při hledání potenciálních nových látek je využití tzv. high-throughput screening, kdy je u knihoven látek testována jejich aktivita a toxicita. Případné „hity“ (potenciálně zajímavé sloučeniny) jsou podkladem pro optimalizaci. Odhadnout závislost aktivity na struktuře je ovšem často složité až nemožné, což je zapříčeno mimo jiné i potřebou provedení několika enzymatických kroků pro aktivaci látky *in vivo*.⁷ Efektivní NI jsou tak často nalezeny náhodou. Také toxicita nukleosidových analogů je nepředvídatelná a mnohdy se ani neprojevuje *in vitro*.²⁷

NI jsou velmi atraktivní pro vývoj léčiv. Aktivní místa virových polymeráz jsou velmi konzervovaná, a tak je vývoj rezistence daleko menším problémem než v případě jiných typů inhibitorů. Ze stejného důvodu mají NI potenciál působit proti širšímu spektru virů. Příklady mohou být například tenofovir efektivní proti HIV a HBV⁷ nebo poměrně nový sofosbuvir proti HCV.²⁸

NI mají specifické vlastnosti, které je odlišují od jiných tříd antivirotik a představují tak další výzvy při jejich vývoji.

Díky obvykle značné polaritě NI nebývá problémem jejich rozpustnost ve vodném prostředí. Jejich polarita ovšem představuje překážku při jejich přijímání do buňky, které většinou probíhá pasivní difuzí, pouze v některých případech aktivně nukleosidovými přenašeči. Překonání hematoencefalické bariéry je pak obzvlášť velkou výzvou, a proto je pro usnadnění difuze skrz membrány využíváno maskování polárních skupin estery, tvorba tzv. proléčiv.²⁹

Po podání jsou NI neúčinné, dokud nejsou metabolizovány na své trifosfáty (Obrázek 5 - Schematické znázornění aktivace nukleosidových inhibitorů a jejich následného začlenění do RNA. Jelikož se aktivity potřebných enzymů v různých buňkách liší, je nutné při hodnocení efektivity inhibitorů používat buňky, ve kterých mají především působit. Limitujícím krokem při metabolismu NI je zpravidla jejich přeměna na monofosfát, méně často je to fáze následující, tedy reakce vedoucí ke vzniku difosfátu. Aby se předešlo problémům se zavedením prvního fosfátu, mají novější antivirotika monofosfátovou skupinu již připojenou.³⁰ Ta je ovšem velmi polární, a protože by ještě více znesnadňovala průchod membránou, je nutné použití maskovacích skupin. Ty sice musí být dostatečně stabilní, aby se dostaly do buněk, ale i dostatečně labilní, aby se v buňkách snadno a rychle rozpadaly.²⁷



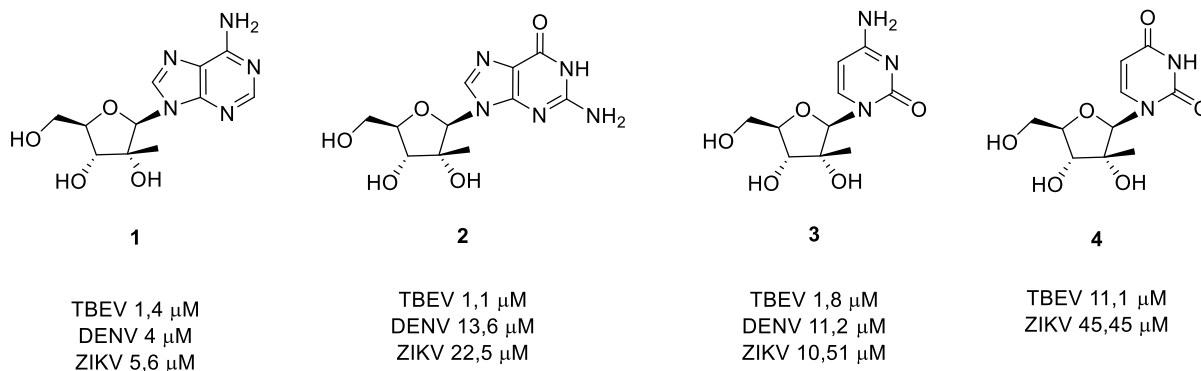
Obrázek 5 - Schematické znázornění aktivace nukleosidových inhibitorů a jejich následného začlenění do RNA. Jako příklad byl zvolen 2'-C-methyladenosin, jehož proléčiva byla finálními produkty mé práce.

3.2.3 Deriváty nukleosidů jako potenciální inhibitory flavivirové RdRp

3.2.3.1 2'-Methylnukleosidy

2'-C-methyl deriváty nukleosidů jsou schopny snižovat titry virových částic flavivirů, přičemž účinnost jednotlivých látek se liší u různých virů a 2'-CMU (**4**) je zpravidla nejméně potentní. Toxicita těchto látek je nízká ($CC_{50} > 50 \mu M$) a index selektivity (CC_{50}/EC_{50}) se pohybuje

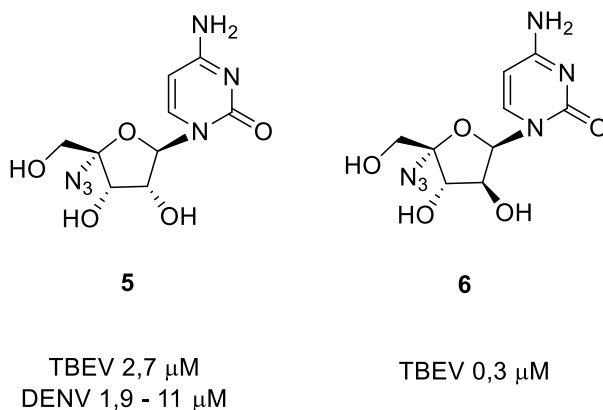
v rozmezí přibližně 2 až 40, přičemž nejnižších hodnot dosahuje 2'-CMU a nejvyšších 2'-CMA (1).³¹⁻³³



Obrázek 6- 2'-C-methylnukleosidy vykazující aktivitu proti flavivirům a jim příslušející hodnoty EC_{50} : (1) 2'-C-methyladenosin, (2) 2'-C-methylguanosin, (3) 2'-C-methylcytidin, (4) 2'-C-methyluridin

3.2.3.2 4'-Azidonukleosidy

Antivirové účinky látky R1479 (5) byly objeveny při screeningu jako inhibitor HCV. Později byl zjištěn i účinek na DENV. Je od ní odvozeno proléčivo balapiravir mající všechny hydroxyly maskované esterem s kyselinou izomáselnou. Balapiravir však v klinických testech nebyl schopen dosáhnout prokazatelné inhibice u dospělých pacientů při koncentraci, která by nebyla toxická.³⁴ Později bylo zjištěno, že nákaza virem dengue brání uvolnění R1479 z proléčiva. Také při experimentech s TBEV nebyla prokázána inhibice balapiravirem. Pro RO-9187 (6) neexistuje mnoho referencí v souvislosti s flaviviry, nicméně látka inhibovala replikaci TBEV s velmi nízkou EC_{50} . Efektivita byla ovšem silně závislá na testované linii buněk.³¹

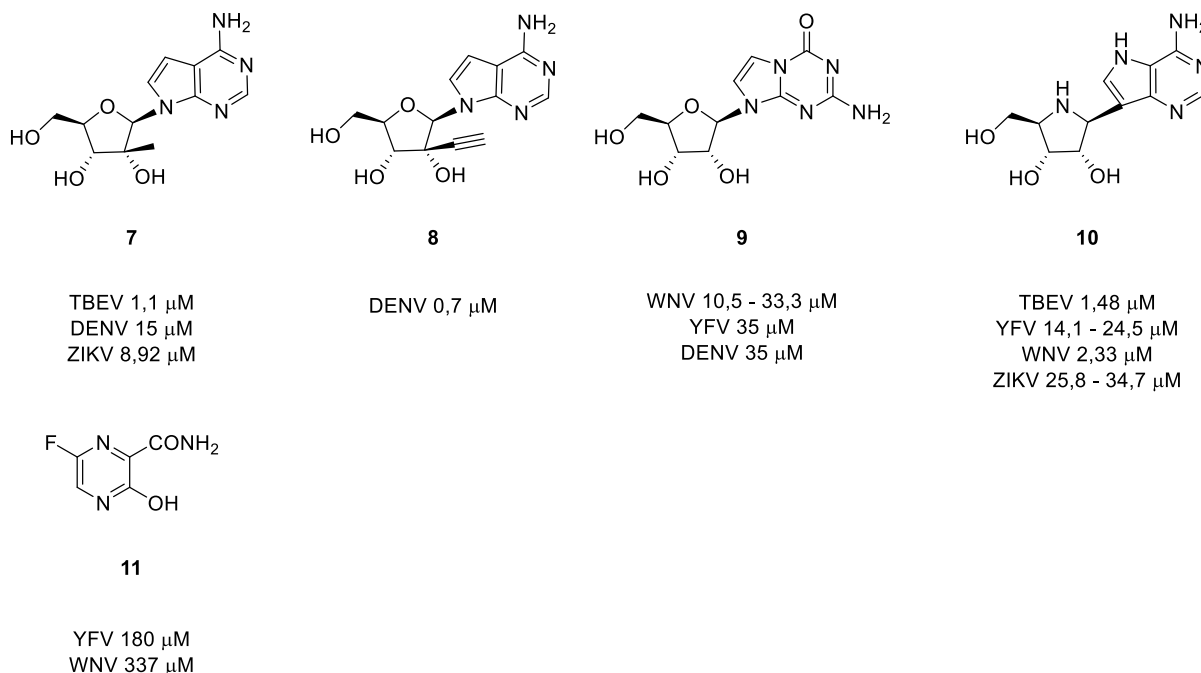


Obrázek 7- 4'-azidomukleosidy a jejich EC_{50} : (1) 4'-azidocytidin (R1479), (2) 2'- α -deoxy-2'- β -hydroxy-4'-azidocytidine (RO-9187)

3.2.3.3 Nukleosidy s pozměněnou bází

Do této skupiny byly v rámci této práce zařazeny analogy nukleosidů s různě pozměněnými bázemi a v některých případech cukernou složkou. Zvláště může působit zařazení T-705 do nukleosidům podobných inhibitorů, nicméně tato látka je *in vivo* metabolizována na nukleosid, který je účinnou látkou.

7-deaza-2'-CMA (**7**) se ukazuje být potentním inhibitorem mnoha zástupců flavivirů.^{31,32} Kromě relativně nízké EC₅₀ vykazuje také nízkou cytotoxicitu (CC₅₀ > 100 μM). Schopnost této látky působit jako antivirotikum proti DENV, je ale nižší, než u 2'-CMA, což vedlo k vývoji látky NITD008 vzniklé záměnou methyly 7-deaza-2'-CMA za ethynyl. Takto bylo dosaženo velmi vysoké schopnosti inhibice DENV.³³ Látka prošla *in vitro* testy, aniž by byly pozorovány cytotoxické účinky a rovněž byl dokončen NOAEL (pozorování, zda se daná míra expozice obejde bez vývoje vedlejších účinků) při týdenním podávání myším (50 mg/kg/den). Při podávání krysám a psům po dobu dvou týdnů se však u obou druhů v průběhu 2. týdne dostavily natolik závažné vedlejší účinky, že testování bylo přerušeno. Jelikož je ale onemocnění horečkou dengue akutní a léčba by zpravidla netrvala déle než 6 dní, zůstává otázkou, jestli by se během této doby vyvinuly vedlejší příznaky u člověka.²⁷ ZX-2401 (**9**) vykazuje antivirový efekt proti několika významným zástupcům flavivirů a má jen minimální cytotoxický efekt. EC₅₀ jsou nicméně ve srovnání s jinými látkami spíše vyšší.³⁵ BCX4430 (**10**) má kromě nukleobáze modifikovanou i cukernou část, která je azocukrem. Aktivní je proti komáry i klíšťaty přenášeným nemocem, byť EC₅₀ v řádu jednotek milimolů na litr bylo zaznamenáno jen pro WNV a TBEV. Cytotoxicita je opět jen nízká. *In vitro* testy nasvědčují tomu, že není zabudováván do DNA ani RNA savců.^{36,37} Favipiravir (**11**) je inhibitorem replikace mnoha RNA virů. Nejvíce se osvědčil u viru chřipky, kdy pro různým kmenům má submikromolární až mikromolární EC₅₀. Bylo úspěšně dokončeno již několik klinických studií fáze 2 a 3. Kromě viru chřipky inhibuje replikaci také u arenavirů, bunyavirů, flavivirů, alfavirů, picornavirů a norovirů. V případě flavivirů jsou však EC₅₀ nesrovnatelně vyšší oproti ostatním uvedeným inhibitorům.³⁸



Obrázek 8 - Deriváty nukleosidů s pozměněnou bází –(7) 7-deaza-2'-C-methyladenosin (7-deaza-2'-CMA), (8) 7-deaza-2'-C-acetyladenosin (NITD-008), (9) 5-aza-7-deazaguanosin (ZX-2401), (10) 9-deaza-azaadenosin (Immucilin-A, BCX4430), (11) 5-fluoro-2-hydroxypyrazine-3-carboxamide (Favipiravir, T-705)

3.3 Hematoencefalická bariéra a přeprava léčiv do mozku

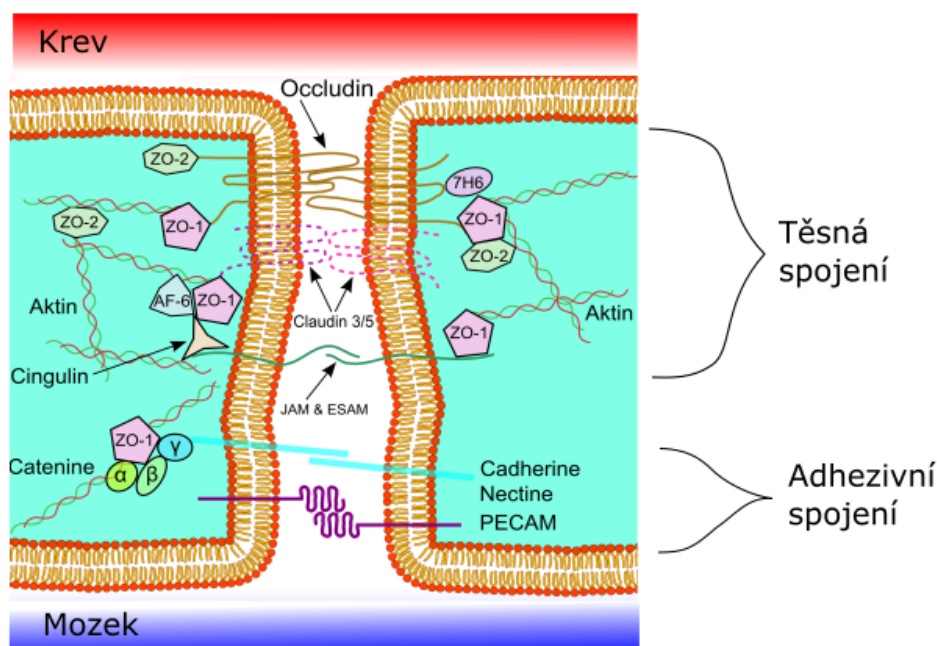
3.3.1 Stavba a funkce hematoencefalické bariéry

Mozek je, jakožto patrně nejcitlivější orgán lidského těla, chráněn před vniknutím potenciálně toxických látek hematoencefalickou bariérou (blood-brain barrier, BBB). Ta ovšem nejen chrání mozek před endogenními i exogenními toxiny, ale je také překážkou při vstupu léčiv do mozku a výzkum metod jejího překonání je tak v současné době klíčový pro rozvoj terapií cílících na centrální nervovou soustavu (CNS).³⁹ Na následujících stranách bude popsána struktura BBB a možnosti jejího překonání. Jedné z možností, využití proléčiv, bude věnována samostatná kapitola.

V oblasti CNS je možno rozlišit více různých bariér oddělujících mozek a míchu od zbytku těla. Z hlediska výživy ale i transportu léčiv je ale nejvýznamnější ta, kterou tvoří buňky endotelu vlásečnic zásobujících CNS. Dalšími bariérami jsou ta oddělující krev od cerebrospinální tekutiny (tvořena epiteliálními buňkami choroidního plexu) a pavoučnice, která odděluje extracelulární tekutiny CNS od těch ve zbytku těla. Zatímco některé látky se do mozku dostávají vlastně jen přes choroidní plexus, pavoučnice není pro transport do CNS významná.

V případě všech těchto bariér dochází ke kombinaci bariér fyzických (tvořeny těsnými spoji), transportních (přítomnost specifických přenašečů v membránách endothelu) a metabolických (přeměna látek procházejících skrz membrány).⁴⁰

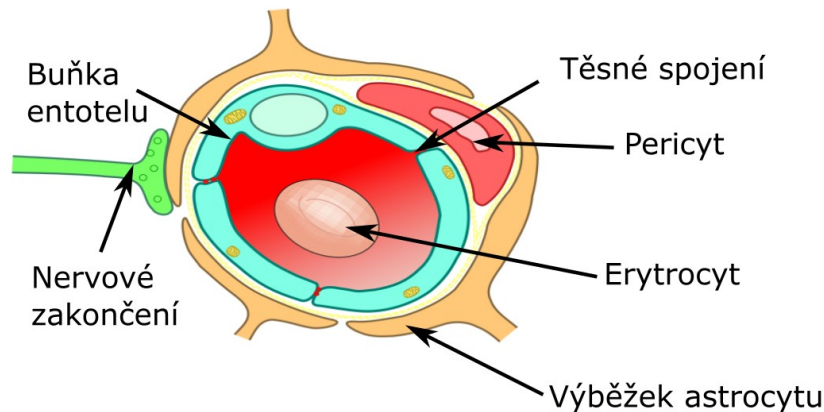
Bariéru pro makromolekuly, většinu polárních a nabitých látek tvoří těsná spojení mezi buňkami endothelu v CNS (Obrázek 9)⁷³. Stejně tak jsou klíčové i pro funkci obou dalších zmíněných bariér. Především brání paracelulární cestě vstupu do cerebrospinálního prostoru. Dále díky nim vykazuje BBB pozoruhodný elektrický odpor, který vysvětluje velmi omezený pohyb iontů. Těsná spojení jsou tvořena komplexy proteinů zasahujícími do mezibuněčného prostoru (occludiny a claudiny) a dále spojovými adhezivními molekulami. Occludiny i claudiny jsou spojeny s proteiny v cytoplasmě majícími zpevňující a regulační funkci. Těmito proteiny jsou ZO-1 až ZO-3 a cingulin, které zprostředkovávají napojení na cytoskelet. Významná není jen míra exprese claudinů a occludinů, ale také jejich uspořádání a interakce. Těsná spojení jsou velmi citlivá na intracelulární i extracelulární regulační faktory a její vlastnosti se mohou měnit doslova z minuty na minutu. Například koncentrace vápenatých iontů uvnitř i vně buňky ovlivňuje, nakořik představují těsná spojení překážku pohybu látek. Pro vznik těsných spojení je také nutná přítomnost jiného typu spojů, a to adhezivních.⁴⁰



Obrázek 9 - Schematické znázornění spojení mezi buňkami endothelu s vyznačením proteinů podílejících se na jeho stavbě.

Buňky endothelu jsou v CNS asociovány s dalšími buněčnými typy, plnícími různé úlohy (Obrázek 10)⁷⁴. Pericity vytvářejí na povrchu kapilár nesouvislou vrstvu. Jsou to buňky prezentující antigeny a také patrně mají kontraktální schopnosti, a tedy mohou regulovat průtok

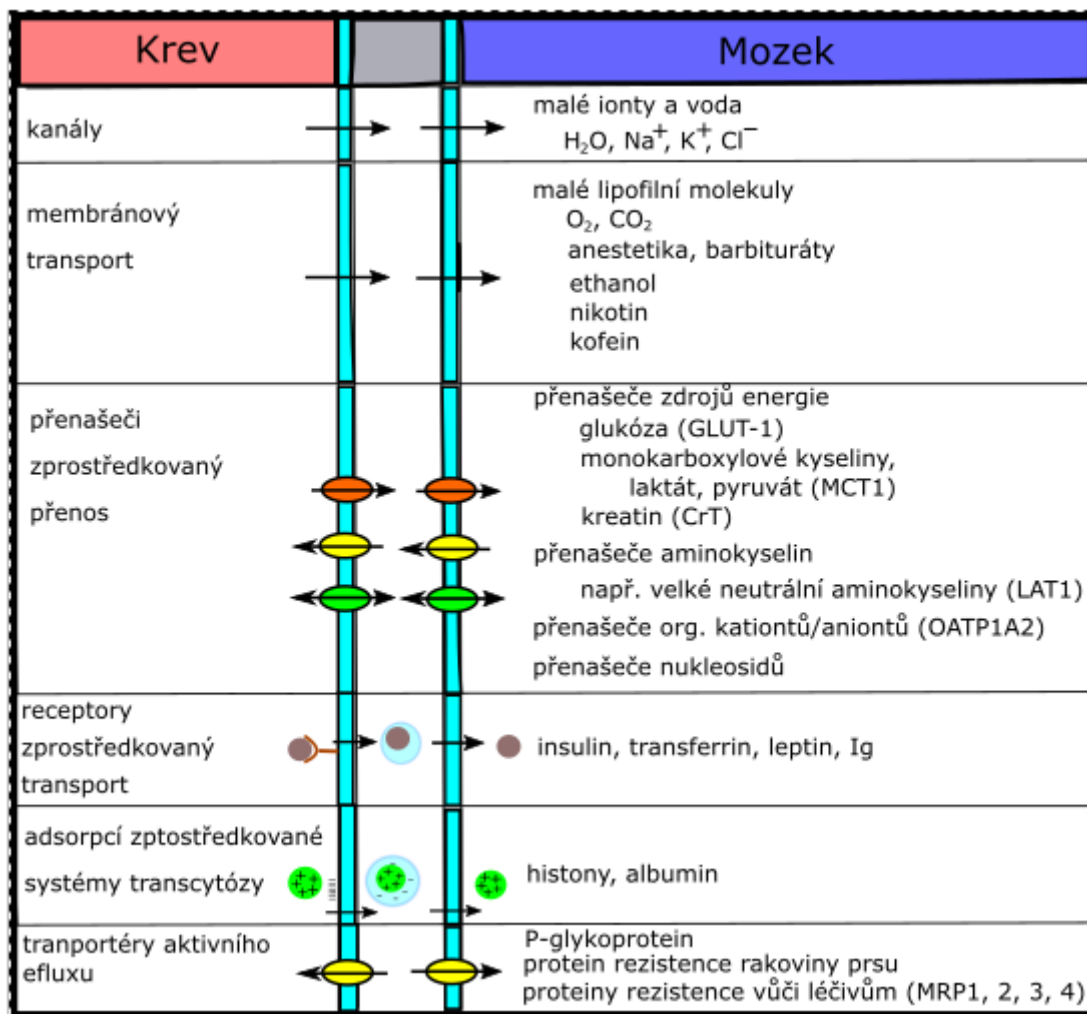
krve. Astrocyty, patřící do skupiny gliových buněk, se svými výběžky dotýkají stěn kapilár a vytváří souvislou vrstvu na jejich povrchu. Jejich úlohou je regulace a indukce tvorby spojů a exprese přenašečů na správné straně endotelu (luminární nebo abluminární). Čtvrtým typem buněk, které mají souvislost s BBB jsou neurony. Konkrétně se jedná o jejich výběžky zajišťující přímou inervaci kapilár.⁴¹



Obrázek 10 - Příčný řez hematoencefalickou bariérou s vyznačením buněčných typů podílejících se na její tvorbě

3.3.2 Základní faktory významné pro schopnost látek vstoupit do centrální nervové soustavy

Výše zmíněná těsná spojení zamezují prostupu látek mezi buňkami a většina organických látek, včetně léčiv, proto musí na cestě do CNS projít vrstvou buněk a překonat tak několik buněčných membrán. To se děje několika mechanismy, které jsou shrnuty na Obrázek 11.



Obrázek 11 - Transportní mechanismy využívané v buňkách hematoencefalické bariéry

Jelikož je pasivní vstup mnoha polárních látek potřebných jako výživa pro mozek přinejmenším velmi omezen BBB, jsou na buňkách endotelu exprimovány specifické přenašeče zásobující CNS živinami. Jsou to přenašeče například pro glukózu, aminokyseliny, cholin, purinové báze a nukleosidy. Tyto musí být přítomny vždy na luminární i abluminární (tedy vnitřní, v kontaktu s krví, i vnější) straně vlásečnic. Kromě přenašečů živin jsou v membránách endoteliálních buněk přítomny i receptory řízené transportéry například pro inzulin, transferin, inzulinu podobné růstové faktory nebo acylovaný LDL.⁴¹

Protože BBB je tvořena převážně dvojvrstvou lipidických molekul oddělujících 2 vodná prostředí, je logické, že průchod přes membrány pomocí pasivní difuze je mnohem snazší pro lipofilní molekuly. Zvyšování lipofilního charakteru látek je proto jedna ze základních strategií pro zlepšení dostupnosti látek přes BBB. Míra lipofilního charakteru se zpravidla vyjadřuje jako rozdělovací koeficient oktanol-voda, označovaný také jako P_{okt} (respektive jako jeho dekadický logaritmus $\log P_{okt}$).⁴²

Kromě lipofilního charakteru hraje při pasivním prostupu do mozku roli řada dalších parametrů molekuly, jedním z těch zásadních ale zřejmě je molekulová hmotnost. Obecně se předpokládá, že aby molekuly mohly samovolně vstupovat do mozku, měla by jejich relativní molekulová hmotnost být nižší než 500. Tento předpoklad vychází jak z „Lipinského pravidla pěti“, původně zavedeného pro absorpci látek z gastrointestinálního traktu. Jelikož se ale testy zkoumající závislost mezi molekulovou hmotností a permeabilitou skrze membrány prováděly na látkách značně hydrofilních, je složité odlišit vlivy molekulové hmotnosti a polarity.⁴²

3.3.3 Metody překonání hematoencefalické bariéry

3.3.3.1 Chemický přístup k vylepšení dostupnosti látek v mozku

Samovolně mohou BBB procházet pouze malé lipofilní molekuly. Právě ke zvýšení lipofilního charakteru směřuje většina chemických úprav látek. Zpravidla se jedná o modifikace hydrofilních skupin, které molekula obsahuje, přičemž skupiny, které byly k maskování použity, jsou odstraněny v buňkách za uvolnění aktivní látky. Maskování polárních skupin vede nejen ke snížení hydrofilnosti molekuly, ale také k úpravě farmakokinetických vlastností. Tyto upravené molekuly je možno zařadit mezi proléčiva, tedy látky, ze kterých jsou aktivní molekuly uvolněny až enzymatickou reakcí *in situ*. Proléčiva ale nemusí být nutně lipofilnější, naopak mohou vzniknout i spojením s polární molekulou, která je ale aktivně transportována do cílových buněk.²⁹ Proléčivům bude věnována další kapitola. Alternativním přístupem je úprava přímo aktivní molekuly zavedením lipofilních skupin. Takto byly například methylovány upravovány látky ze skupiny barbiturátů, které následně vykazovaly lepší penetraci do mozku.³⁹

Lipidizace molekul má ovšem i negativní dopady. Lipofilnější molekuly snadněji prostupují všemi membránami těla. Tím je ovlivněna distribuce léčiva v plasmě a jeho koncentrace po podání rychleji klesá. To může vést i k tomu, že distribuce lipofilizované látky je horší, než té původní. Lipofilnější molekuly se také lépe vážou na plasmatické proteiny což znemožňuje jejich difuzi do buněk. Navíc zaváděním dalších skupin do molekuly se zvyšuje její molekulová hmotnost, která je také významným faktorem pro prostupnost přes BBB.³⁹

3.3.3.2 Biologické systémy přepravy přes hematoencefalickou bariéru

Existují různé biologické mechanismy, kterými mohou látky překonávat hematoencefalickou bariéru. Některé z nich je možno využít pro aktivní přenos léčiv do mozku

Adsorpcí zprostředkovaná transcytóza je mechanismus, který umožňuje vstup do buňky kationizovaným proteinům, jako je třeba albumin nebo protilátky s upraveným isoelektrickým

bodem. Tyto proteiny jsou transcytovány díky interakci se zápornými náboji na BBB. Pokud je na albumin připojen látka, jež běžně neprochází skrz BBB, je pomocí albuminu vnesena do mozku. Protilátky jsou využívány na zobrazování při nemocech jako jsou nádory, Alzheimerova choroba nebo mrtvice.³⁹

Přenašečem zprostředkovaný přenos je možno využít u látek modifikovaných tak, aby napodobovaly živiny a mohly využít specifické přenašeče. Jako příklad může být uvedena transformace dopaminu na aminokyselinu levodopa, která je transportována přenašečem pro velké neutrální aminokyseliny. Tento princip je využíván pro dopravení dopaminu do mozku při léčbě Parkinsonovy choroby. Dalším příkladem mohou být produkty konjugací léčiv s glukózou, galaktózou nebo aminokyselinami.⁴³

3.3.3.3 Rozrušení hematoencefalické bariéry

Rozrušením těsných spojů mezi buňkami endotelu může usnadnit vstup léčiv do CNS paracelulární cestou. Jiný způsob narušení BBB vede k otevření transcelulární cesty přes buňky endothelu. Ať už je cílem usnadnění vstupu kterékoli z těchto cest, je zásadní, aby narušení BBB bylo jen dočasné. Významný je také rozsah, protože nekontrolovaný vstup látek obsažených v plazmě do CNS může způsobit i trvalé poškození mozku.³⁹

Narušení BBB může být dosaženo více cestami. Jednou z nich je hyperosmotický šok. Ten se vyvolává infuzí roztoku manitolu do krkavice. Byl schválen pro používání na pacientech a využívá se především při podávání protirakovinných látek. Při jeho používání je ale nutné postupovat se značnou opatrností, jelikož pokusy na hlodavcích ukázaly, že v místech narušení BBB dochází se strukturálnímu poškození mozku.⁴⁴

Relativně novou metodou je využití systémového podání alkylglycerolů. Při jejich podání byl pozorován nárůst permeability pro různé cytostatické a antibakteriální látky. Jejich působením dochází k dočasnému narušení těsných spojů, přičemž tento efekt je nejspíš zprostředkovan receptory.³⁹

3.3.3.4 Transkraniální podávání léčiv

Transkraniální podávání léčiv spočívá v neurochirurgickém zavedení látky přímo na místo působení. Obecným problémem těchto metod je to, že k šíření látky mozkem od místa aplikace dochází pouze v důsledku difuze. To v praxi znamená, že dochází k asi 90% poklesu koncentrace na vzdálenosti pouhého 0,5 mm. K působení tím pádem dochází takřka jen ve tkáni v přímém kontaktu s místem podání.⁴⁴ Metody transkraniálního podání lze rozdělit do tří

kategorií: intracerebrální implantát, intracerebroventrikulární infuze a konvekcí podpořená difuze. Posledně jmenovaný přístup do jisté míry překonává problém s pomalou difuzí.

Intracerebrální implantáty mohou mít různou podobu. Může se jednat o předměty z biodegradabilního polymeru uvolňující léčiva mající podobu tyčinek, plátků či mikrokuliček. Jsou používány i v praxi na postupné uvolňování chemoterapeutik v tumorech. Jinou možností je zavedení polymerních mikrokuliček, upravených tak, aby nebyly rychle eliminovány, přímo do tumorů.³⁹ Intracerebroventrikulární infuze spočívá v zavedení roztoku látky do cerebrospinální tekutiny ze které se může volně šířit do extracelulárních tekutin v CNS. Při využití konvekcí podpořené difuze je do pacientova mozku zaveden katetr připojený na pumpu zajišťující pohyb tekutiny v CNS. Podpořením difuze skutečně dochází k lepší penetraci, nicméně i k vývoji imunitní reakce a poškození mozku v blízkosti katetru.⁴⁴

3.3.3.5 Molekuloví trojští koně

V případě molekul, které nemohou být upraveny zvýšením lipofilního charakteru a nebo jsou příliš velké na to, aby samovolně procházely BBB, je někdy možné využít konjugace této látky s jinou, která se váže na specifický přenašeč. Jako trojský kůň, kterým je látka propašována dovnitř mohou sloužit endogenní ligandy a peptidomimetické jednoklonné protilátky. I v tomto případě se de facto jedná o proléčiva, jejichž detailní popis a použití budou rozvedeny v další kapitole.⁴⁴

3.4 Proléčiva

3.4.1 Charakteristika

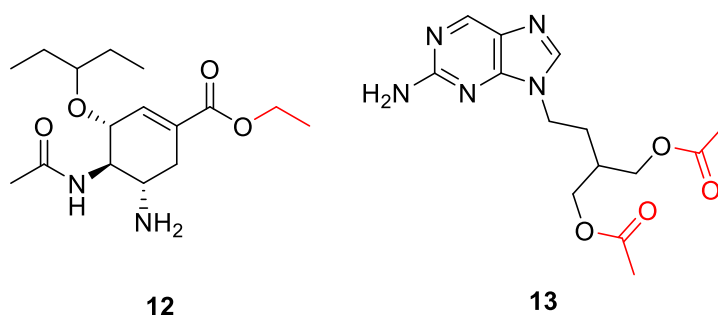
Proléčiva jsou dle IUPAC definována jako „Látky podstupující biotransformaci před tím, než vykazují farmakologický efekt“.⁴⁵ Jedná se tedy o deriváty léčiv, ze kterých se po enzymatické nebo chemické transformaci *in vivo* uvolňuje rodičovská látka, která pak může vykazat kýžený účinek. Cílem přípravy proléčiv je vylepšení fyzikálně-chemických, biofarmaceutických nebo farmakokinetických vlastností rodičovské látky. Příklady problémů léčiv, které mohou být potenciálně překonány přípravou proléčiv, jsou špatná rozpustnost ve vodě, nedostatečná absorpce při perorálním podání, chemická nestabilita, rychlá presystémová eliminace, nedostatečná prostupnost do cílových tkání (včetně mozku a CNS) nebo toxicita. Dále je možno dosáhnout akumulace látky v konkrétních orgánech.

Většina proléčiv jsou jednoduché deriváty, vyžadující maximálně dvě enzymatické reakce pro uvolnění léčiva. Zvláštní skupinou prolečiv jsou ta, která vznikla spojením dvou aktivních látek a slouží si navzájem jako pro-skupina. Tato jsou označována jako ko-léčiva. Bioprekursorová léčiva také naplňují definici, jelikož v těle dochází k jejich enzymatické aktivaci, neobsahují ale maskovací ani zaměřovací skupiny.²⁹

Z přípravy proléčiv se stal již standardní postup optimalizace vlastností léčiv. Dle informací z roku 2004 bylo asi 5-7 % schválených léčiv na světě proléčivy. Rostoucí význam proléčiv dále ukazuje, že v letech 2001 a 2002 bylo přibližně 15 % nově schválených látek proléčivy.⁴⁶

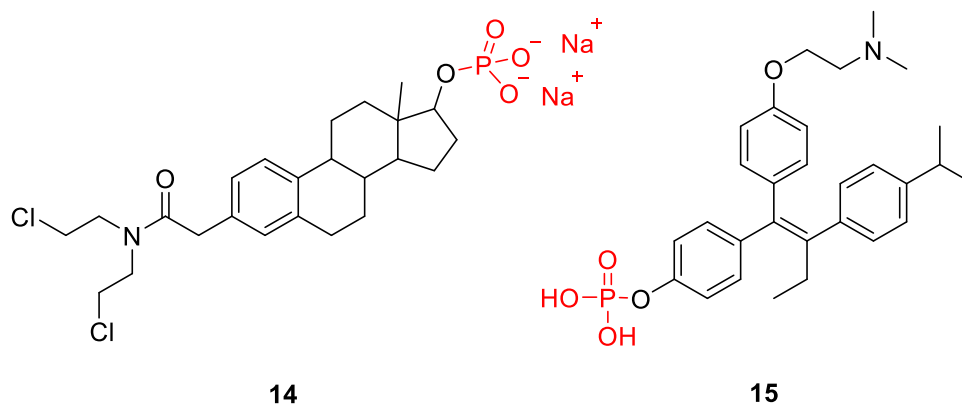
3.4.2 Funkční skupiny využívané při syntéze proléčiv

Nejběžnější skupinou proléčiv jsou estery aktivních látek, kdy přibližně 50 % schválených proléčiv jsou estery. Estery se využívají na maskování hydroxylů, thiolů a karboxylových kyselin. V těle probíhá jejich aktivace esterázami nacházejícími se v játrech, krvi i ostatních tkáních. Estery však mají i své nevýhody, přičemž nejvýznamnější jsou rozdílné aktivity různých esteráz v lidském těle a v živočiších používaných na preklinické testování. Je tedy obtížné odhadovat farmakokinetické vlastnosti v lidech.²⁹



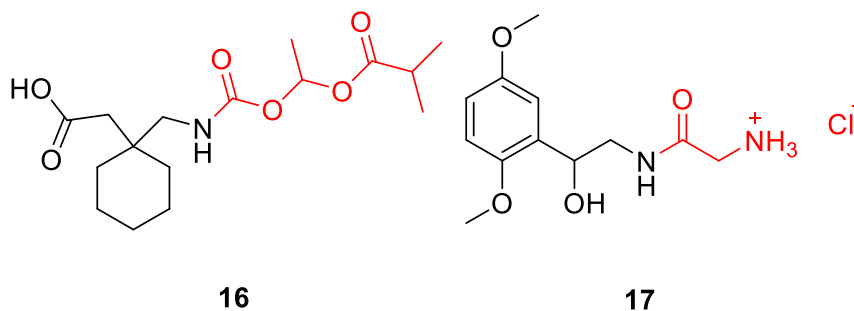
Obrázek 12 - Příklady esterových proléčiv (12) oseltamivir a (13) famciclovir. Proskupiny jsou vyznačeny červeně.

Estery kyseliny fosforečné jsou využívány pro úpravu hydroxy- a amino- skupin. Cílem je zvýšení polaritativy rodičovské sloučeniny, a tím i její rozpustnosti ve vodě, což je vhodné jak pro perorální, tak pro parenterální podávání. Fosfáty jsou obvykle chemicky stabilní a zároveň se snadno metabolizují do aktivní podoby. Oproti esterázám karboxylových kyselin navíc fosfatázy vykazují stejné aktivity u lidí i pokusných zvířat. Případným problémem při jejich využívání může být dosažení takové polaritativy molekuly, že dojde ke snížení prostupnosti skrze membrány, a tedy i snížení dostupnosti látky v těle.²⁹



Obrázek 13 - Příklady esterů kyseliny fosforečné s léčivy využívaných jako prolečiva (14) estramucin fosfát (cytostatikum), (15) miproxifen fosfát. Proskupiny jsou vyznačeny červeně.

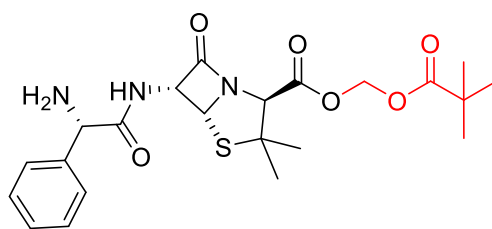
Karbonáty a karbamáty jsou využívány pro úpravu stejných skupin, jako estery. Jejich stabilita je vyšší než u esterů, ale zároveň nižší než stabilita amidů. Amidy jsou sice využívány pro karboxylové kyseliny a aminy, ovšem jen vzácně, kvůli značné stabilitě *in vivo*. Jsou hydrolyzovány karboxylesterázami, peptidasami a proteázami.²⁹



Obrázek 14 - Příklady prolečiv využívajících karbamáty a amidy: (16) ibobutanoyloxy-ethoxy karbamát gabapentinu (syndrom neklidných nohou), (17) midodrin (nízký krevní tlak). Proskupiny jsou vyznačeny červeně.

3.4.3 Příklady schválených prolečiv

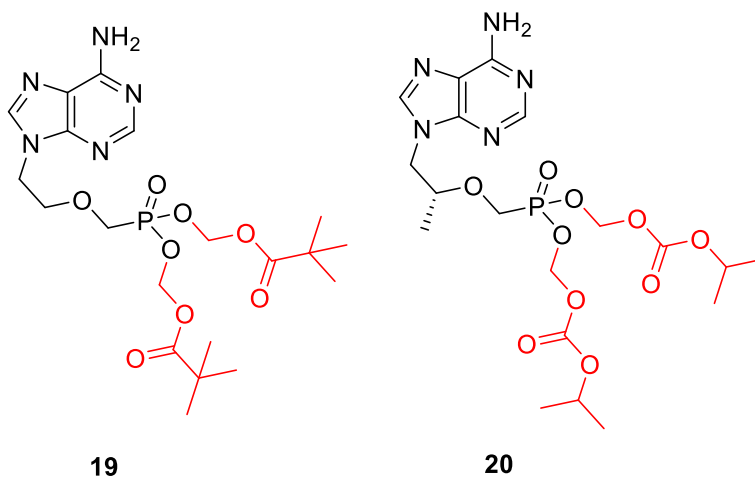
Zvyšování lipofilnosti molekul je nejobvyklejším přístupem při přípravě prolečiv a to především kvůli prostupnosti membránami a lepší absorpci při orálním podání. Příkladem tohoto typu prolečiva může být pivampicillin, což je pivaloylmethyl ester β -laktamového antibiotika ampicillinu. Zároveň se jedná o látku, při jejíž aktivaci je potřeba 2 hydrolyz esteru, kdy první je enzymatická a druhá spontánní.²⁹



18

Obrázek 15 – (18) Pivampicilin. Proskupina je vyznačena červeně.

Naprostá většina nukleosidových antivirotik je polární, a tedy má jen malou biologickou dostupnost při orálním podání. Jako ukázkové příklady mohou být zmíněny proléčiva odvozená od adefoviru a tenofoviru. Samotné aktivní látky nejsou v důsledku přítomnosti skupiny fosfonové kyseliny téměř vůbec absorbovány při orálním užití. V současné době používaná proléčiva tenofovir disoproxil a adefovir dipivoxyl jsou jak dobře absorbována, tak i tolerována.²⁹

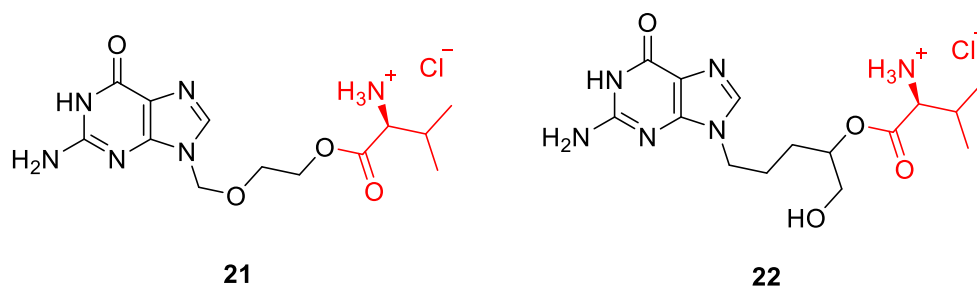


19

20

Obrázek 16 - Proléčiva antivirotik se zvýšeným lipofilním charakterem (19) adefovir dipivoxyl a (20) tenofovir disoproxil. Proskupiny jsou vyznačeny červeně.

Rozvoj molekulární biologie umožnil identifikaci přenašečů živin a pochopení jejich funkcí. Proléčiva využívající tyto přenašeče obsahují strukturální motivy umožňující jejich rozeznání a přenos například přes membrány buněk střevního epitelu. Kvůli své vysoké kapacitě přenosu a rozšíření v tenkém střevě jsou častým cílem přenašeče peptidů. Tato strategie byla využita při přípravě proléčiv z acycloviru a gancicloviru. Ty jsou dostupné ve formě svých esterů s L-valinem a jsou přenášeny přenašeči di- a tripeptidů.²⁹



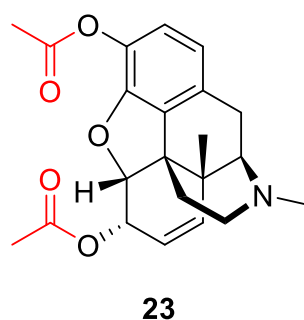
Obrázek 17 - Estery L-valinu sloužící jako proléčiva (21) Valacyclovir a (22) Valganciclovir. Červeně jsou označeny proskupiny.

3.4.4 Proléčiva dopravující látky do centrální nervové soustavy

Zacílení látky selektivně na místo v těle, kde má vykazovat účinek, je nejzajímavějším cílem a také patrně nejzajímavější možností, kterou proléčiva nabízí. Největší výzvu pro cílení léčiv představuje CNS chráněná hematoencefalickou bariérou. Pochopení mechanismů, která zajišťují přepravu přes BBB a výzkum metabolických odlišností CNS ale také umožňují těchto zvláštnost využít pro zvýšenou akumulaci v CNS ve srovnání s ostatními tkáněmi.

3.4.4.1 Látky s cílem v centrální nervové soustavě využívající pouze zvýšené lipofilitu

Přestože lipofilita látek je významným faktorem pro jejich vstup do CNS, lipofilní charakter zpravidla není dostačující pro dosažení selektivního působení látky v CNS. Existuje jen málo případů, kdy došlo k významnému zlepšení v terapeutických účincích jen díky maskování polárních skupin. Patrně nejznámějším a i nejvýznamnějším je proléčivo morfinu heroin.⁴³ Heroin díky acetylaci prostupuje membránami přibližně stokrát rychleji než morfin.⁴⁷



Obrázek 18 – Proléčivo morfinu (23) heroin

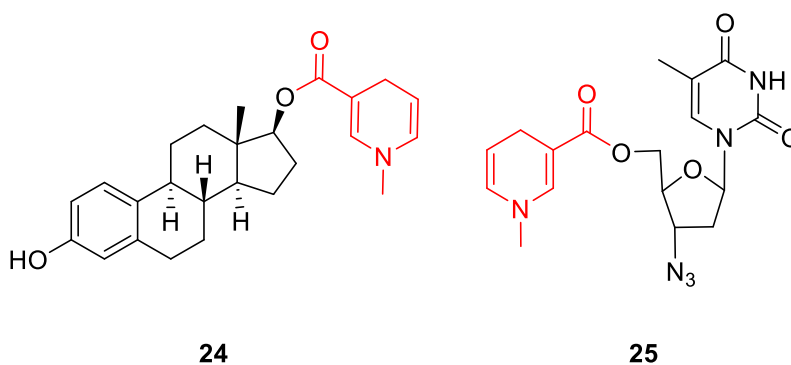
Naopak existuje mnoho případů látek, kdy zvýšení nevedlo ke zlepšení účinnosti léčiv. Jedním příkladem může být chlorambucil, protinádorové alkylační činidlo, jehož nejrůznějšími esterifikacemi bylo sice dosaženo lepší prostupnosti přes BBB, ale ne lepších účinků.⁴³ Bohužel existuje jen málo látek, u kterých je pouze tento přístup vhodný, například proto, že je tak

vytvořen substrát pro efluxní systémy BBB. Častěji jsou proto nyní využívány modernější systémy, vycházející ze základů proléčiv, ale nabízející selektivnější akumulaci látek v CNS.⁴⁸

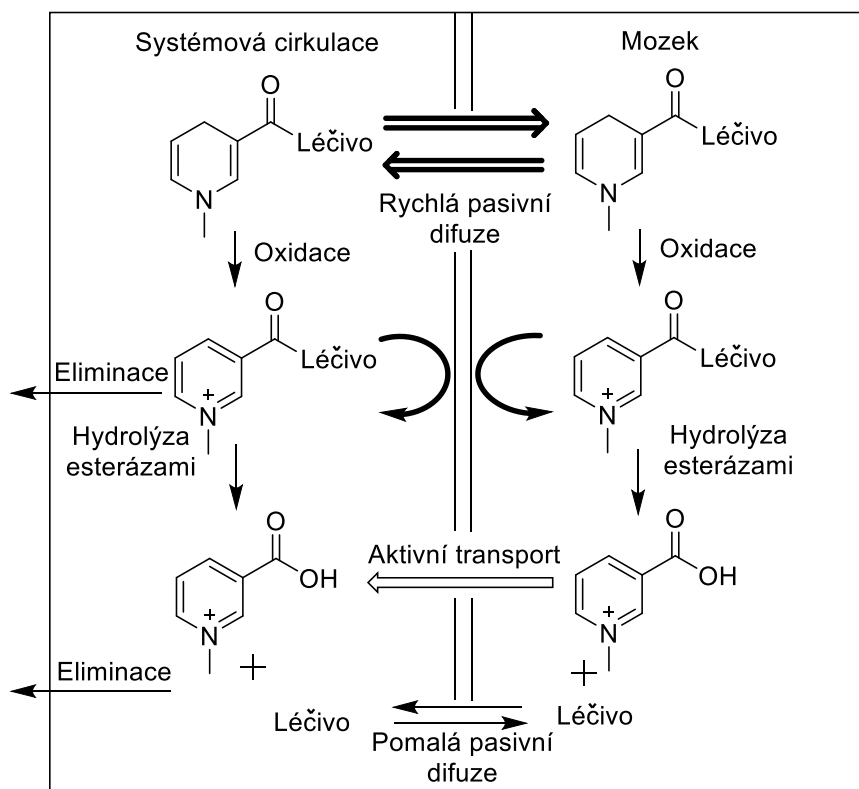
3.4.4.2 Redoxní chemické přepravní systémy

Pojem chemické přepravní systémy (CDS) byl vytvořen, aby bylo možno odlišit nově vzniklý přístup, kdy látka musí podstoupit několik enzymatických kroků, než dojde k uvolnění aktivní molekuly, od klasických proléčiv.⁴⁹ V současné době je ale u sofistikovaných proléčiv běžná aktivace v několika krocích.⁴³

Redoxní CDS kombinují zvýšení lipofility podávané látky, její enzymatické přeměny v buňkách a využití nepropustnosti CNS pro nabitě molekuly. Nejstudovanější skupinou využívanou pro zaměření do CNS je 1,4-dihydro-N-methylnikotinová kyselina, označovaná také jako dihydrotrigonellin. Látky upravené pomocí této skupiny se snadno dostávají do buněk, a to včetně průchodu do CNS. Ve všech buňkách je následně dihydrotrigonelinát oxidován na trigonelinát, obsahující kvarterní dusík. Tím se z lipofilní látky stane sloučenina s pozitivním nábojem. Ta je nejen snáze eliminována z ostatních tkání a systémového oběhu, ale především je zachycena uvnitř CNS, jelikož v nabitěm stavu nemůže projít přes BBB. Následnou hydrolýzou trigonelinátu je dosaženo uvolnění aktivní látky selektivně v mozku. Samotná cílicí skupina už je substrátem pro aktivní přenos přes BBB ven v CNS. Zlepšené distribuce díky využití tohoto systému bylo dosaženo například u zidovudinu, gancicloviru nebo estradiolu.⁴³

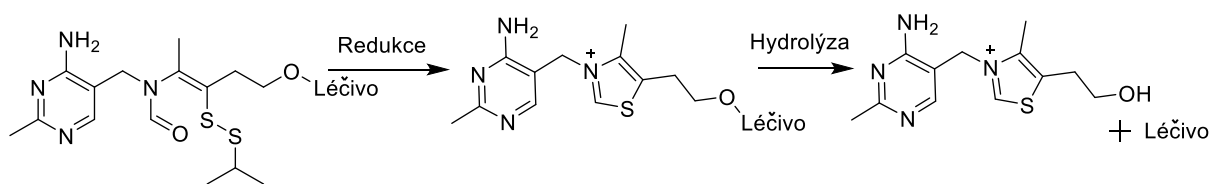


Obrázek 19 - Proléčiva využívající redoxního chemického systému odvozená od (24) estradiolu, (25) zidovudinu



Obrázek 20 - Ilustrace mechanismu akumulace léčiva v mozku využitím redoxního systému na příkladu systému 1,4-dihydrotrigonellin / trigonellin

Vlastností dihydrotrigonellinu komplikující jeho využití je snadná oxidace vzdušným kyslíkem i kyslíkem v roztoku. Alternativní řešení vyhýbající se problémům se spontánní oxidací zahrnuje naopak získání kladného náboje redukcí. Toto řešení využívá derivátů thiamin disulfidu, který je *in vivo* metabolizován na thiamin, obsahující ve své struktuře thiazolium nesoucí kladný náboj. Tento postup byl testován například pro zacílení *L*-dopa.⁵⁰



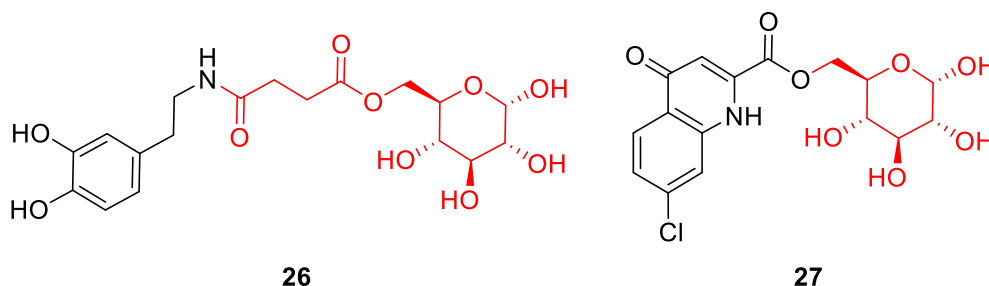
Obrázek 21 - Mechanismus získání náboje redukcí v redoxních systémech využívajících systému thiamin disulfid / thiazolium

3.4.4.3 Využití přenašeči zprostředkovaného přenosu

V CNS se vyskytuje velké množství přenašečů pro živiny a vitamíny. Jelikož molekuly mnohých léčiv svou strukturou připomíná přirozené substráty těchto přenašečů, je pochopitelné, že se na jejich přesunu do CNS podílejí i ony.⁵¹ Modifikace samotných molekul léčiv tak, aby se podobaly přirozeným substrátům a zároveň si zachovaly účinnost, se ale

ukazuje velmi náročná. Další možností je tedy příprava proléčiv. Jednou z variant je úprava molekuly tak, aby byla substrátem pro přenašeč a zároveň byla v buňkách enzymaticky transformována zpět na aktivní látku. Jiným přístupem k přípravě proléčiva je konjugace aktivní molekuly s endogenním substrátem přenašeče.⁴³ Z přenašečů vyskytujících se v BBB byly intenzivněji zkoumány tři. Jsou to GLUT1 pro hexózy, LAT1 pro velké neutrální aminokyseliny a SVCT2 pro kyselinu askorbovou.⁵²

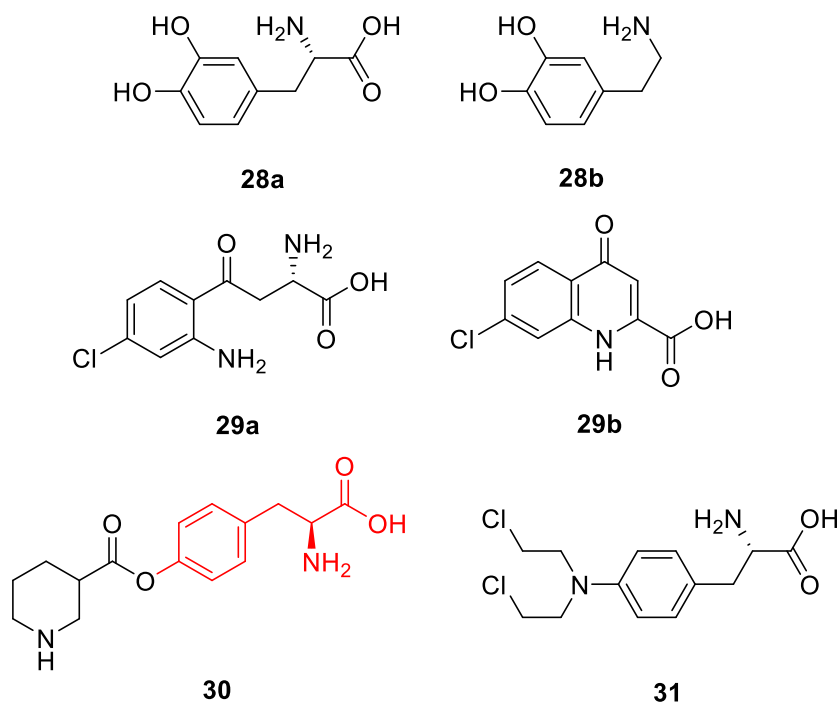
GLUT1 patří do skupiny přenašečů glukózy nezávislých na koncentraci sodíku a zajišťuje asi z asi 90 % zásobení mozku glukózou.⁵² Ze všech transportérů zajišťujících zásobení mozku má největší kapacitu, a tak je velmi atraktivní pro přenos proléčiv.⁴³ Nejvyšší afinitu má GLUT1, působící jako přenašeč i jiných hexóz, k D-glukóze. Konjugace s D-glukózou se ukázala být efektivním přístupem pro zlepšení přijímání léčiv do mozku. Úspěšný tento přístup byl například u 7-chlorokynurenové kyseliny (potenciální antidepresivum) nebo dopaminu.⁵³ Přípravě proléčiv dopaminu spojením dopaminu nebo *L*-dopy s glukózou nebo galaktózou pomocí kyseliny jantarové byla věnována práce od Bonina et al., podle které takto připravená proléčiva byla účinnější než *L*-dopa, která je běžně využívána v praxi.⁵⁴



Obrázek 22 - Proléčiva vytvořená konjugací s glukózou, kde rodičovská látka je (26) dopamin, (27) 7-chlorokynureinová kyselina. Proskupiny jsou vyznačeny červeně.

LAT1 je přenašečem pro velké neutrální aminokyseliny, jehož substrátem mohou být díky nízké specifitě mnohé aminokyseliny a jejich analogy. Obecnými požadavky na substrát jsou neutrální náboj a přítomnost delšího hydrofobního řetězce nebo aromatického jádra. Výhodné také je, že na rozdíl od glukózy, by případné dočasné narušení přísunu aminokyselin do mozku v důsledku inhibice transportu proléčiv nevedlo k jeho poškození. Jediným klinicky používaným proléčivem využívajícím primárně LAT1 je *L*-dopa, která podstupuje enzymatickou dekarboxylaci na dopamin. Dalšími příklady proléčiv využívajících LAT1 jsou *L*-4-chlorokynurein, který může být *in vivo* transaminázou transformován na 7-chlorokynurenovou kyselinu, nebo alkylační chemoterapeutikum melphelan, které je derivátem fenylalaninu. Jinou možností je konjugace léčiva s přirozeným substrátem. Například

tyrosinem, který má fenolický hydroxyl vhodný pro přípravu esterů. Takto bylo připraveno proléčivo například od nipekotové kyseliny, které je na rozdíl od samotné kyseliny přijímáno do mozku a je účinné při řešení epileptických záchvatů.⁵²

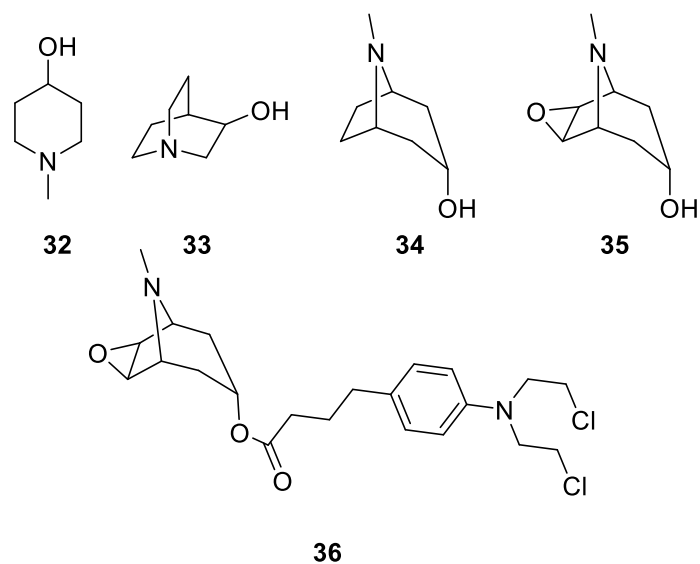


Obrázek 23 - Látky využívající transport LAT1: (28a) L-dopa je na rozdíl od (28b) dopaminu přenášena LAT1, totéž platí pro (29a) 4-chlorokynurein a (29b) 7-chlorokynureinovou kyselinu, (30) proléčivo nipekotové kyseliny vzniklé konjugací s tyrosinem (červeně) a (31) melphalan

3.4.4.4 Skopin jako skupina pro přípravu proléčiv cílících na CNS

Na základě předchozí studie při níž byl pozorován výrazně lepší příjem látek do mozku u látek, které byly upraveny zavedením N,N-dimethylamino skupiny byla zkoumána skupina cyklických terciárních aminů a vliv jejich konjugace s léčivými složkami s překonáním BBB. Jednalo se o N-methylpiperidinol, quinuclidinol, tropanol (označovaný také jako tropin) a skopin. Všechna připravená proléčiva vykazovala lepší příjem do mozku, přičemž nejlepší byl v případě derivátů skopinu (bližší informace o efektivitě nebyly publikovány).⁵⁵ V dalších testech prováděných s proléčivem vzniklým esterifikací skopinu a chlorambucilu, alkylačního činidla s protinádorovým účinkem používaným v klinické praxi, které však vykazuje zanedbatelnou prostupnost přes BBB, bylo dosaženo výrazného zlepšení v přepravě chlorambucilu do mozku. Podstatné je, že skopin vykazuje jen nízkou míru toxicity. Zajímavé je, že největší relativní nárůst koncentrace byl ze všech sledovaných tkání pozorován právě u mozku. Zkoumáním možných způsobů inhibice vstupu proléčiva do CNS, což mělo za cíl ozřejmit mechanismus akumulace, bylo zjištěno, že skopin je sice nejspíš aktivně přijímán,

ovšem žádným z běžně testovaných přenašečů. Roli v akumulaci může hrát také to, že aminoskupina tropinu je ve fyziologických podmínkách kladně nabitá a interaguje tedy s negativním nábojem na povrchu BBB. Nižší pH v buňkách mozku krvi může navíc indukovat terciárního aminu a tím jeho zablokování v CNS. Skopin je tedy velmi zajímavou skupinou pro zacílení CNS.⁵⁵



Obrázek 24- Terciární aminy vykazující schopnost zacílení léčiv do mozku: (32) *N*-methylpiperidinol, (33) quinuclidinol, (34) tropin, (35) skopin, (36) proléčivo vzniklé konjugací chlorambucilu se skopinem

4 Diskuze a výsledky

4.1 Příprava 2'-C- methyladenosinu

Syntéza 2'-C-methyladenosinu (**1**) byla provedena podle lehce modifikovaných publikovaných postupů. Sled syntetických kroků je patrný ze Schéma 1 - Postup syntézy 2'-C-methyladenosinu. Jako výchozí sloučenina byl použit ribonolakton **37** který, přestože komerčně dostupný, byl z ekonomických důvodů připraven v několikamolárním množství v naší laboratoři z D-glukózy přes Amadoriho ketózu podle známého postupu⁵⁶ a jeho příprava zde tedy nebude diskutována. Sloučenina **37** byla ochráněna v polohách 3 a 5 reakcí s toluoylchloridem. Nižší výtěžky ve srovnání s literaturními postupy⁵⁷ (okolo 60 %) byly způsobeny pravděpodobně nižší kvalitou vstupní suroviny. Keto skupina v poloze 1 byla následně zredukována reakcí ketocukru **38** s bis(2-methoxyethoxy)aluminiumhydridem (Red-Al®), čímž byl získán laktol **39**. Tato redukce byla prováděna při nízké teplotě s ekvimolárním množstvím redukčního činidla a byla zastavena při neúplné konverzi kvůli možnosti přeredukování. Výtěžky tohoto kroku byly v rozmezí 43–64 % a vždy byla získána zpět i část výchozí látky (18 – 37 %). Volné hydroxyskupiny **39** byly následně následně benzoylovány benzoylchloridem v DCM.⁵⁷ Nukleosid **41** byl připraven Vorbrüggenovou reakcí sloučeniny **40** s 6-benzoyladeninem, připraveným v naší laboratoři v multimolárním množství podle známého postupu,⁵⁸ a finální odstranění chránících skupin bylo provedeno zahřátím v 10M methanolickém amoniaku.⁵⁹

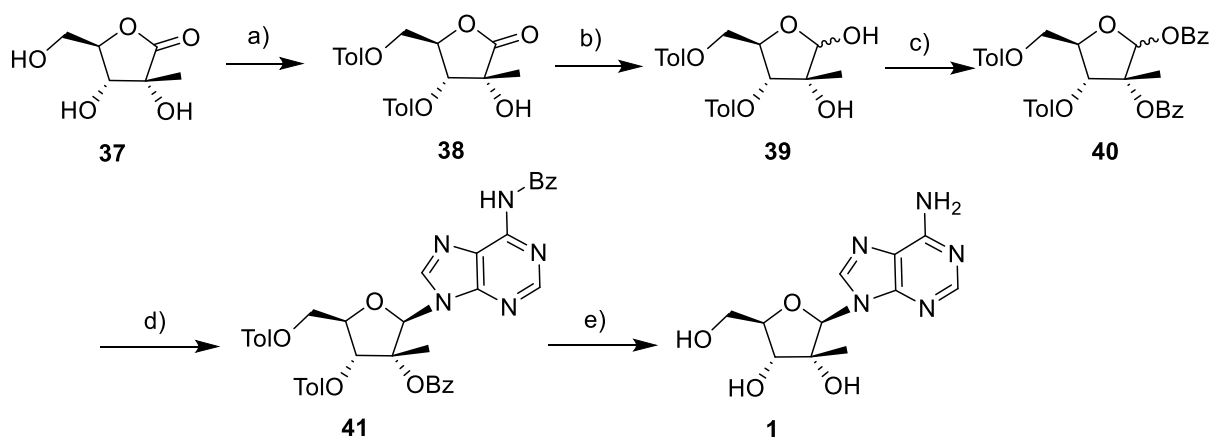


Schéma 1 - Postup syntézy 2'-C-methyladenosinu a) TolCl, DCM/pyridin 4:1, -20 °C, 2h, 55-67 % b) Red-A ©, toluen, -15-0 °C, 3h, 43-64 %, c) BzCl, DMAP, TEA, DCM, 25 °C, 2 h, 43-56 % d) BSA, TMS-OTf, acetonitril, reflux, 5 h, 70-80 %, e) 10M NH₃ v methanolu, 60°C, 20 h, 65-75 %

4.2 Zavádění chránících skupin na nukleosid

Jelikož cílem práce byla syntéza proléčiv 2'-CMA modifikovaných v poloze 3' nebo 5', bylo nutné ochránit některé ze skupin nukleosidu, aby bylo dosaženo potřebné selektivity (Schéma 2).

Rozlišení hydroxyskupin v polohách 3' a 5' bylo dosaženo použitím *tert*-butyldimethylsilyl etheru (TBDMS). Buď byl selektivně ochráněn pouze hydroxyl 5' (2 ekvivalenty TBDMSCl, teplota 0 °C) nebo byly nejdříve ochráněny hydroxyskupiny obě a následně byl silylether v poloze 5' odštěpen v kyselém prostředí.⁶⁰ Druhý zmiňovaný postup se ukázal být obtížně zastavitelný přesně na desilylaci pouze jedné skupiny a proto byl vždy ze směsi po reakci s trifluoroctovou kyselinou izolován také výchozí 2'-CMA.

Nečekaně obtížné se ukázalo být vhodné chránění adeninové aminoskupiny, kdy použitá skupina musela být odštěpitelná vedle esterovou vazbou připojeného funkčního řetězce proléčiva. Jednou z možností byl benzyloxykarbamát (Cbz), který je možné odštěpovat hydrogenolyticky, ovšem reakce volného 5'-TBDMS-2'-CMA s CbzCl vedla místo k cílové látce ke vzniku látky **44**, s cyklickým karbonátem mezi 2' a 3' hydroxyly. *In situ* chránění těchto hydroxyskupin pomocí chlorotrimethylsilanu, metoda běžně používaná v chemii adenosinových derivátů k např. benzoylaci adeninu nevedla ke kýženému produktu, který v reakci vůbec nevznikal. Ani pokus o Vorbrüggenovu reakci s Cbz-chráněným adeninem nevedl k cílovému chráněnému nukleosidu a použití tohoto karbamátového chránění bylo opuštěno.

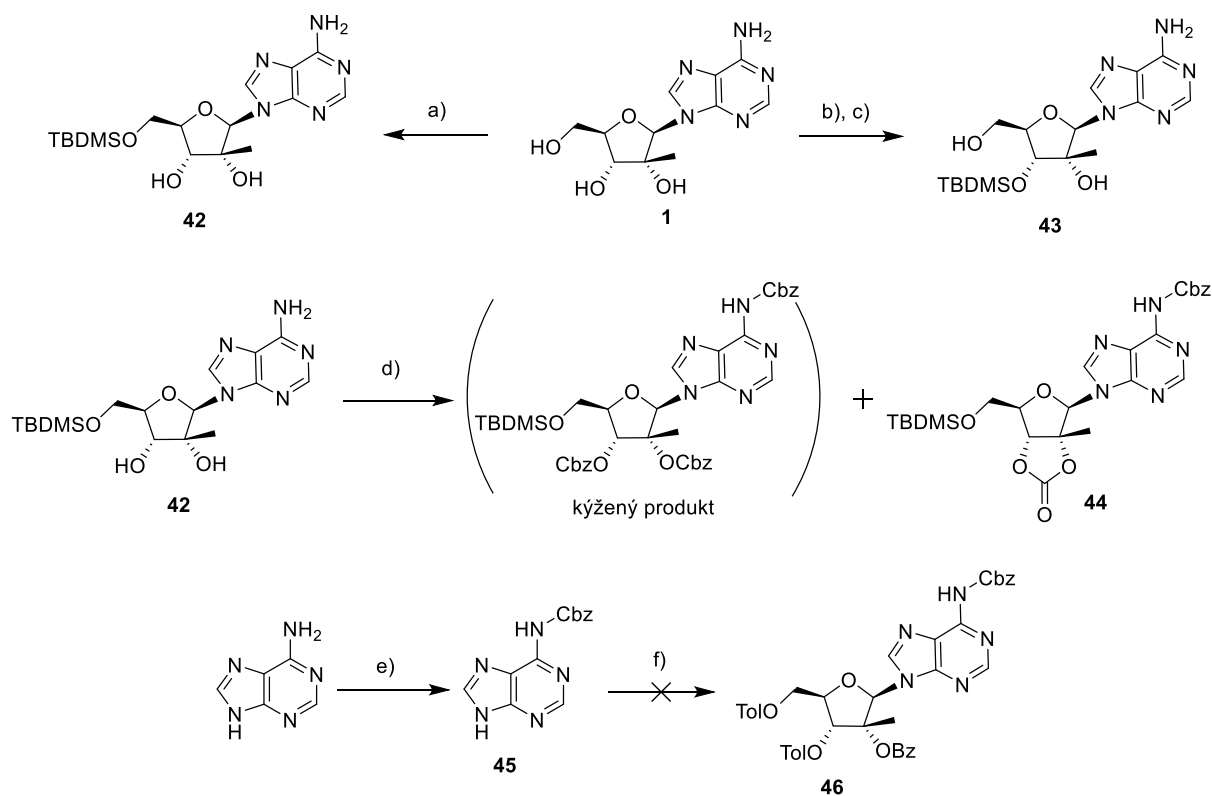


Schéma 2 - Zavádění chránicích skupin na 2'-C-methyladenosin a) TBDMSCl (2 ekv.), imidazol, pyridin, 0-25 °C, 16 h, 80 % b) TBDMSCl (4,4 ekv.), imidazol, DMF, 25 °C, 22 h, 51-71 % c) TFA, voda + THF, 0-25 °C, 4 h, 76 % d) CbzCl, H-methylimidazol, DCM, 0-25 °C, 3 dny e) 1) NaH, 0 °C, 45 min 2) CbzCl, 0-25 °C, 21 h, 54 % f) 40, BSA, TMS-OTf, acetonitril, reflux, 5 h

Při hledání alternativních způsobů chránění adeninové aminoskupiny bylo zjištěno, že lze selektivně odstranit acylové chránění z této aminoskupiny vedle acylů na hydroxyskupinách cukerné části a to pouhým přehřátým methanolem (105-120°C) za zvýšeného tlaku.⁶¹ Tímto způsobem by bylo možné chránění nukleobáze zcela vypustit a případné vzniklé amidy na konci reakční sekvence jednoduše odstranit.

Vzhledem ke značné spotřebě relativně těžko dostupného 2'-CMA bylo v této fázi výzkumu rozhodnuto testovat veškeré postupy nejdříve na velmi snadno dostupném adenosinu, který se reaktivitou a fyzikálními vlastnostmi od 2'-CMA příliš neliší.

Jako nejlépe použitelné řešení se nakonec ukázalo bidentátní chránění 2' a 3' hydroxyskupin orthoesterem reakcí s trimethyl orthoformiátem v DMF (Schéma 3 - Chránění nukleosidů pomocí trimethyl orthoformiátu), která byla provedena podle lezce modifikovaného literárního postupu.⁶²

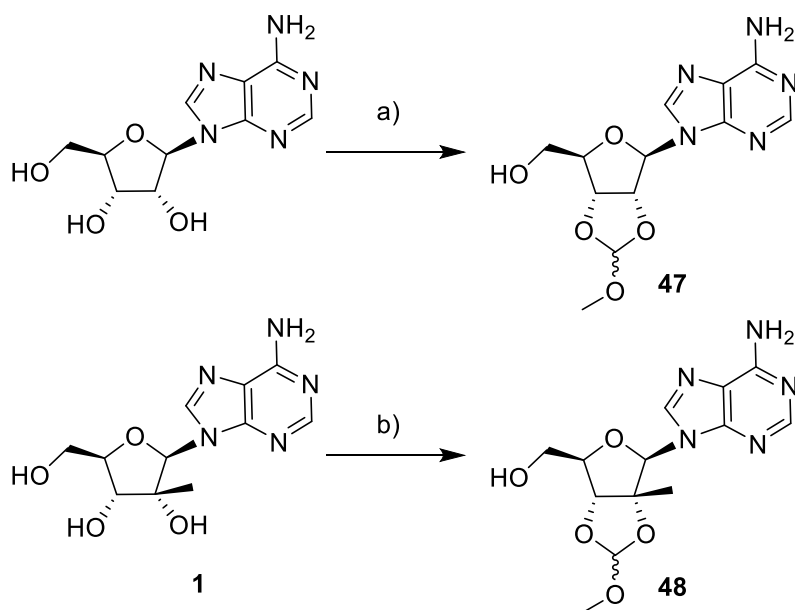


Schéma 3 - Chránění nukleosidů pomocí trimethyl orthoformátu a) $(\text{MeO})_3\text{CH}$, TsOH , DMF , $25\text{ }^\circ\text{C}$, 20 h, 74 % b) $(\text{MeO})_3\text{CH}$, TsOH , DMF , $25\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, 78 %

4.3 Příprava proléčiv obsahujících tropin jako cílicí skupinu

Cílem této části práce bylo stanovit možný způsob syntézy proléčiv nukleosidových inhibitorů obsahujících jako cílicí skupinu skopin. Jelikož by ale provádění experimentů se skopinem bylo velmi finančně náročné, byl místo něj používán tropin u kterého předpokládáme obdobné chemické chování. Jako článek spojující nukleosid a tropin byla zvolena kyselina jantarová. Tato dikyselina umožňuje vytvořením esterů na obou svých koncích vhodně propojit žádaný hydroxyl nukleosidu s tropinem.

Reakcí tropinu s anhydridem kyseliny jantarové byla připravena látka **16**, která má tropin připojen pouze na jednu karboxylovou skupinu. Prvotní snahy o reakci v DCM s přidavkem TEA ovšem vedly k reakční směsi, která sice obsahovala látku **49**, ale také značné množství neidentifikovaných vedlejších produktů. Látka **49** se ukázala být nečekaně náročná na čištění, za což je pravděpodobně z velké části odpovědný její zwitterionický charakter, kdy se látka chová rozdílně za různých pH. Po okyselení reakční směsi bylo provedeno několik pokusů o krystalizaci, které sice nakonec vedly k izolaci produktu, ale v nedostatečné čistotě (cca 80 %). Chromatografické čištění této látky bylo realizovatelné pouze metodou HILIC (silikagel jako stacionární fáze, gradient acetonitril-voda jako mobilní fáze) s přidavkem kyseliny nebo báze. Nicméně ani látka získaná chromatografií nevykazovala dostatečnou čistotu. Jako řešení se ukázalo provést reakci za zvýšené teploty bez přidavku jakékoli báze (Schéma 4).

Chromatografie byla provedena metodou HILIC s přidavkem čpavku a bylo získáno 71 % teoretického výtěžku látky **49**.

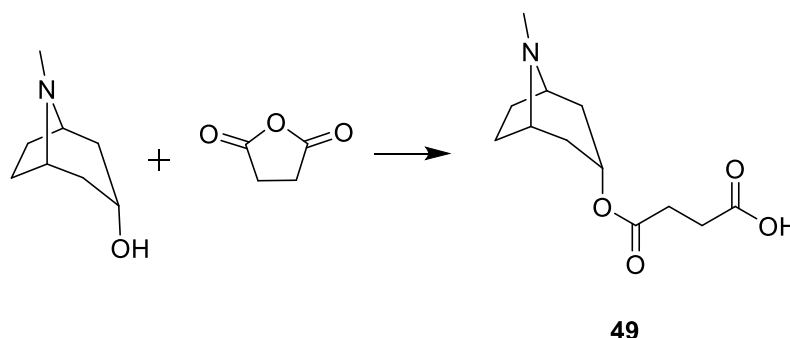


Schéma 4 - Příprava proskupiny obsahující tropin a) DCM, reflux, 16 h, 71 %

Jako první metoda vytvoření esterové vazby mezi **49** a látkami **1** (v poloze 5') a **42** (v poloze 3') byla zvolena Steglichova esterifikace využívající činidel pro coupling peptidů. Standartní systém s využitím různých karbodiimidů, TEA, HOBt a katalytickým množstvím DMAP ovšem nevedl ke vzniku produktů (průběžná kontrola UPLC-MS). Použití DMF jako rozpouštědla, které by vyřešilo případný problém s nerozpustností výchozích látek nenapomohlo průběhu reakce. Provedením reakce v pyridinu bez HOBt bylo sice dosaženo spotřebování výchozího nukleosidu a UPLC-MS analýza potvrdila přítomnost produktu, ale při zpracování reakce standardními postupy (odpaření pyridinu, HILIC s přidavkem TEA nebo mravenčí kyseliny, chromatografie na reverzní fázi C-18 s acetátovým pufrem nebo bez) vždy došlo k převážnému rozpadu produktu na výchozí látky. Po celé řadě neúspěšných experimentů byl postup využívající Steglichovu esterifikaci definitivně zavrhnut.

Další vyzkoušenou variantou (Schéma 5 - Využití chloridu látky 49 pro přípravu adenosinu s tropinovou proskupinou v poloze 5' bylo využít chloridu **50** připraveného zahříváním látky **49** v chloridu thionylu. Nepříliš stálý chlorid byl jen zbaven nadbytku SOCl₂ a ihned použit v reakci s chráněným adenosinem **47**. Navzdory očekávání látka **50** nereagovala s aminoskupinou nukleobáze a po rychlé chromatografii na silikagelu byl získán produkt **51**. Pro odstranění orthoesterové chránící skupiny byl využit methanolický chlorovodík a finální produkt **52** byl izolován chromatografií na reverzní fázi s triethylamonium acetátovým pufrem. Zbytky pufru byly odstraněny několikanásobnou lyofilizací.

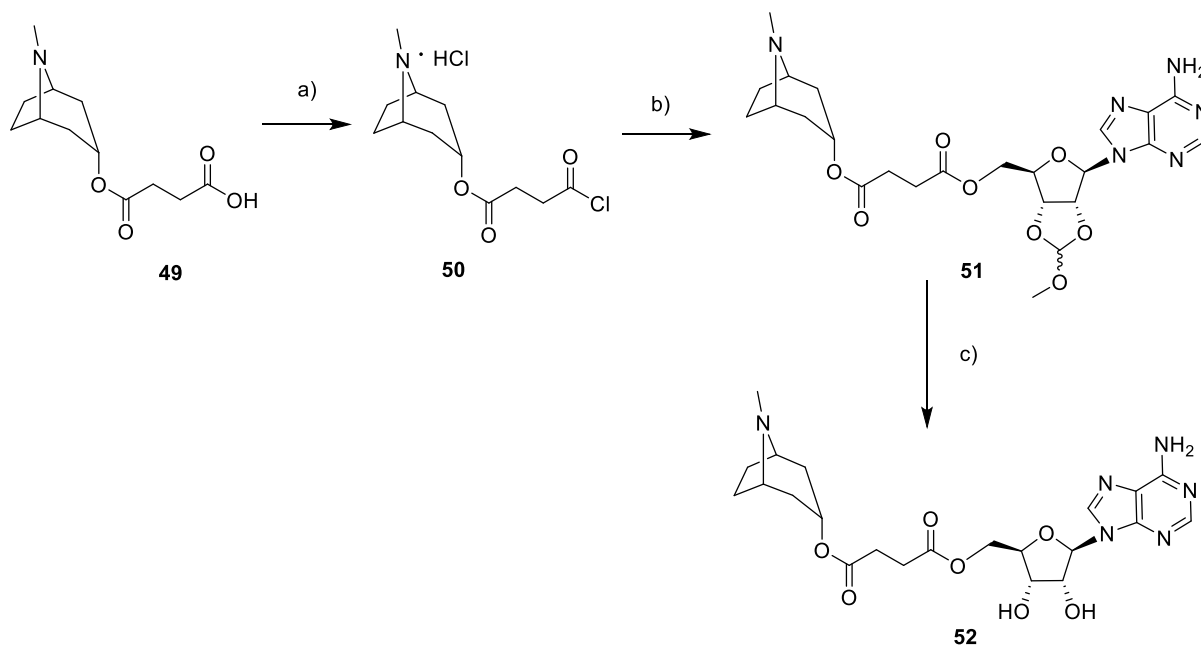


Schéma 5 - Využití chloridu látky **49** pro přípravu adenosinu s tropinovou proskupinou v poloze 5' a) SOCl_2 , reflux, 1h, 100% b) **47**, DMAP, ACN, 25 °C, 20 h c) 1% HCl v methanolu, 25 °C, 1,5 h, výtěžek kroků b) a c) celkově 25 %

Na základě tohoto úspěchu byla zkoumána také možnost provedení reakce chloridu **50** se zcela nechráněným adenosinem, vzhledem k tomu, že chlorid neatakoval aminoskupinu adeninu a pozice 5' by měla být výrazně reaktivnější, než 2' a 3'. Analýza reakční směsi (UPLC-MS) ovšem odhalila vznik velkého množství vedlejších produktů, které by pravděpodobně znemožňovaly efektivní separaci produktu za velmi nízkého výtěžku.

Analogicky přípravě látky **52** byla provedena reakce látek **42** a **50** (Schéma 6 - Zavedení tropinové proskupiny na 3' hydroxyl nukleosidu chráněného v poloze 5' silylem. V době psaní této práce je k dispozici pouze analýza UPLC-MS, kde je látka **53** hlavním produktem a v nejbližší době bude provedena separace a následně odchránění silylové skupiny.

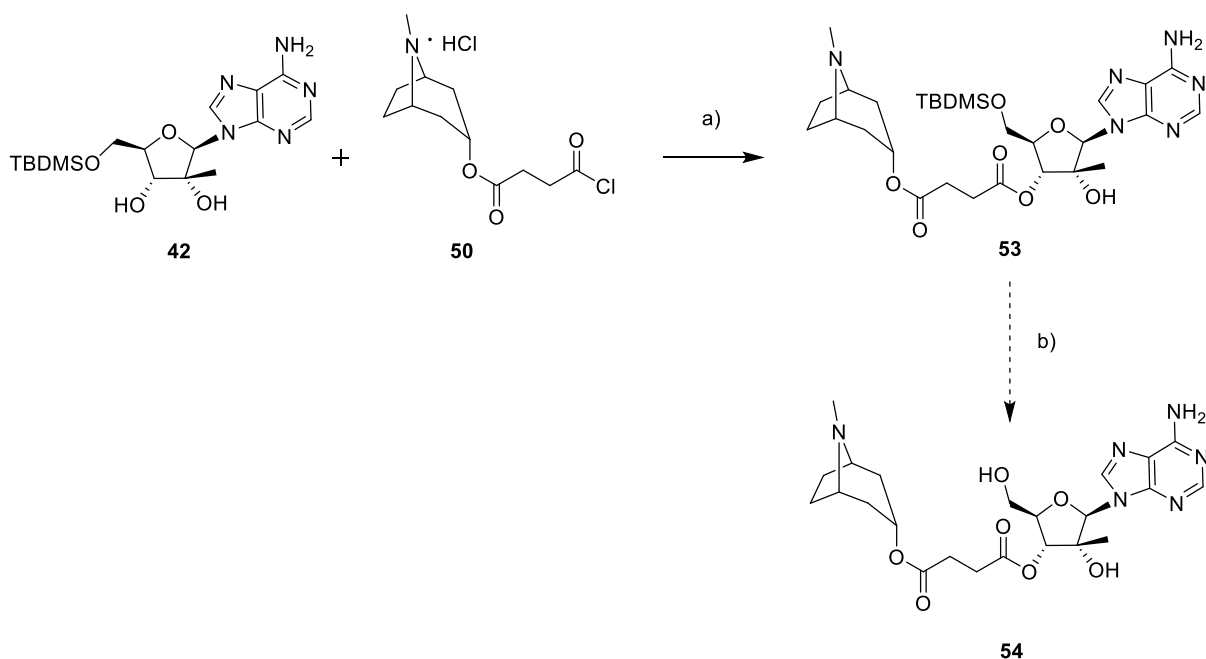
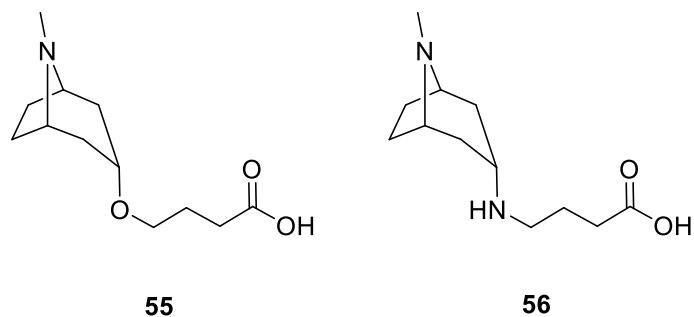


Schéma 6 - Zavedení tropinové proskupiny na 3' hydroxyl nukleosidu chráněného v poloze 5' silylem a) DMAP, ACN, 25 °C, 48 h b) TBAF

V průběhu projektu se velmi často projevovала nestabilita esterových vazeb, a proto jsem se rozhodl nahradit jednu z esterových vazeb vazbou etherovou (**55**) nebo aminovou (**56**) (Obrázek 25 - Alternativní proskupiny využívající pro vazbu mezi tropinem a spojujícím článkem ether (**55**) nebo amin (**56**)).



Obrázek 25 - Alternativní proskupiny využívající pro vazbu mezi tropinem a spojujícím článkem ether (**55**) nebo amin (**56**)

V případě látky **55** byly navrženy tři postupy na základě informací z literatury (Schéma 7). Reakce ethylesteru 4-bromomáselné kyseliny s tropinem, která podle autorů poskytuje nízké výtěžky (5-30%), pravděpodobně kvůli možnosti kvarternizace tropinového terciárního aminu.⁶³ Vzhledem ke snadné dostupnosti by to samo o sobě nepředstavovalo problém, ale ukázalo se, že v reakční směsi není možné detekovat vůbec žádný produkt, tím méně ho izolovat. Dalším pokusem byla aktivace hydroxyskupiny methyl 4-hydroxybutyrátu pomocí trichloroacetimidátu. Vzhledem k vysoké reaktivitě trichloroacetimidátů nebylo možné sledovat

jeho vznik, každopádně následná reakce s tropinem vedla ke vzniku velkého množství látek, mezi nimiž nebyl očekávaný produkt identifikován. Poslední vyzkoušenou metodou přípravy etheru byla aktivace hydroxyly tropinu mesylátem následovaná nukleofilní substitucí reakcí se sodnou solí methyl 4-hydroxybutyrátu. V této reakci by mělo docházet k retenci konfigurace v důsledku participace terciárního aminu tropinu,⁶⁴ ovšem ani v této reakci látka **59** nevznikala. Příprava těchto etherů byla následně opuštěna.

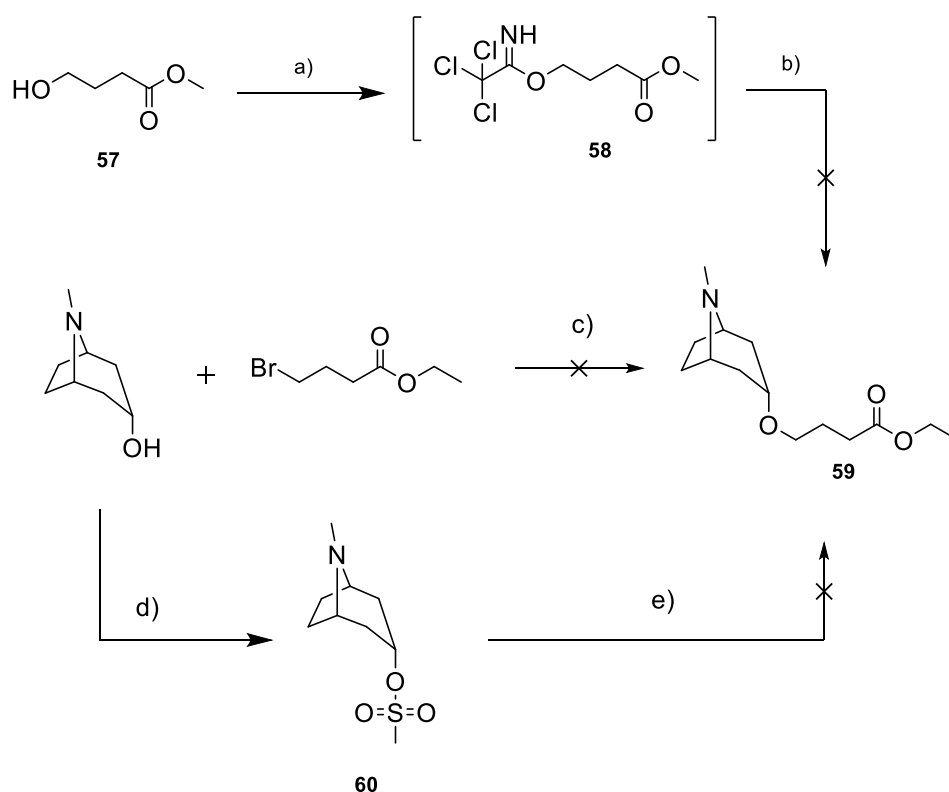


Schéma 7 - Zkoušené metody přípravy tropinové proskupiny využívající etherové vazby a) CCl_3CN , DBU, DCM, 0-25 °C, 16 h b) tropin, TFOH, 25 °C, 20 h c) 1) NaH, tropin, THF, 25 °C, 1h, 2)ethyl-4-bromobutyrát, 25 °C, 20 h d) MsCl, TEA, DCM, , 0-25 °C, 2 h e) 1) methyl 4-hydroxybutyrát, NaH, DMF, 25 °C, 30 min 2) 57, 80 °C, 18 h

Amin **56** byl nejprve připravován reduktivní aminací a to reakcí tropinonu a γ -aminomáselné kyseliny s použitím $NaBH(OAc)_3$ jako redukčního činidla. Po sérii experimentů s různými rozpouštědly a podmínkami bylo jako hlavní problém identifikováno použití GABA jako volné kyseliny a bylo přistoupeno k použití esteru, který byl snadno z GABA připraven (Schéma 8). Kvůli rychlé cyklizaci volného esteru GABA na laktam byl tento ester skladován a používán ve formě hydrochloridu. Reduktivní aminace byla v tomto případě úspěšná s výtěžkem látky 48 %. Podle měření NMR se jedná o jediný diastereoisomer, přičemž podle literatury by měla být vznikající aminoskupina spíše v axiální poloze, což bude ještě potvrzeno dalším měřením.⁶⁵ Hydrolyza esteru byla provedena ve směsi 1M NaOH a methanolu. Po okyselení směsi a

odpaření rozpouštědla byla sloučenina **63** použita bez dalšího čištění pro Steglichovu esterifikaci s látkou **47**, která ovšem neprobíhala. V blízké době je plánováno použít stejného postupu, jako v případě látky **49**, tj tvorba příslušného chloridu kyseliny a jeho použití v přímé tvorbě esteru.

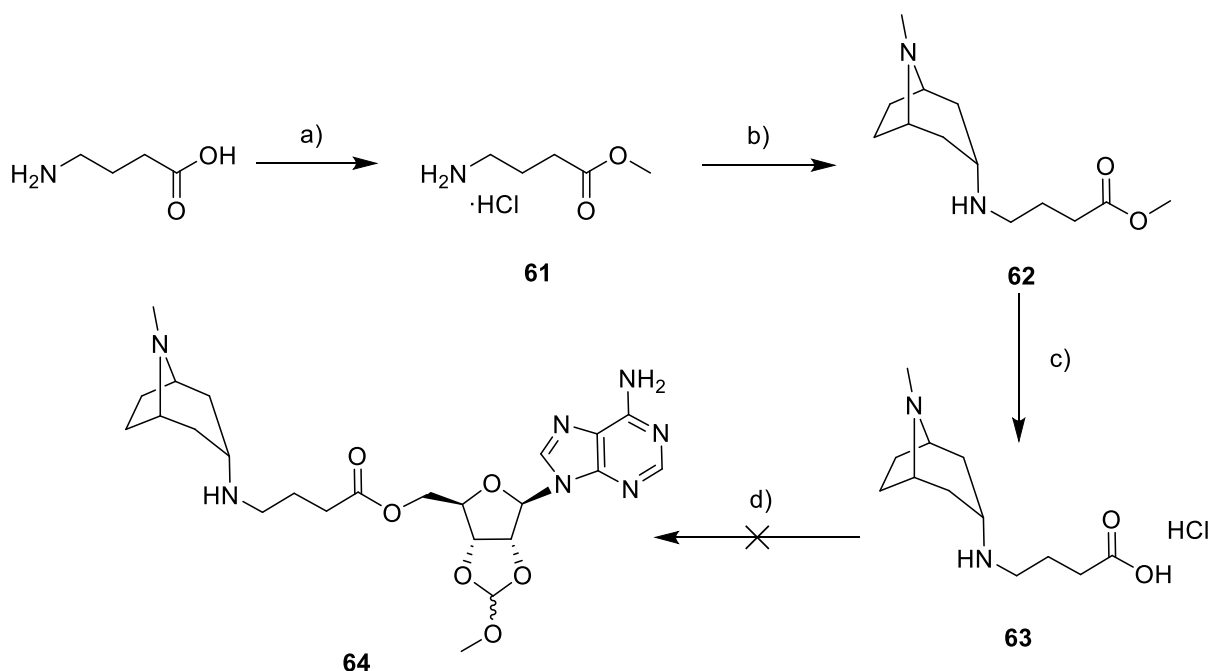
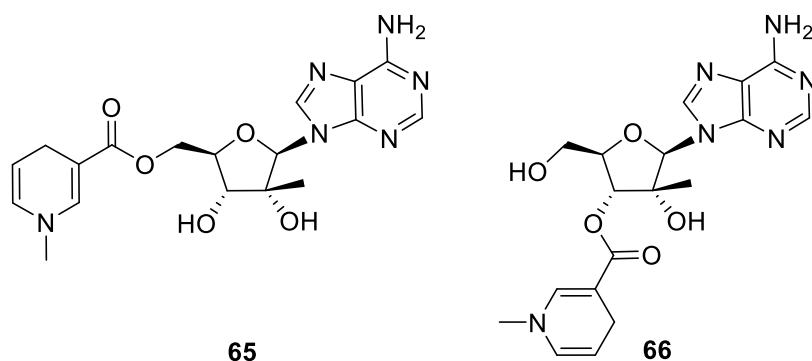


Schéma 8 - Příprava proléčiva využívajícího aminové vazby na tropinu a) SOCl_2 , methanol, 0-25 °C, 1 h, 100 % b) 1. tropinon, TEA, THF, 25 °C, 10 min, 2. $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$, 25 °C, 4 dny, 48% c) 1. 1M (aq)NaOH, methanol, 25 °C, 1 h, 2. HCl, výtěžek nestanoven d) **47**, EDC·HCl, DMAP, pyridin, 25 °C, 20 h

4.4 Příprava proléčiv obsahujících 1,4-dihydrotrigonellin jako cílicí skupinu

Při přípravě proléčiv, která mají využívat redoxního systému trigonellin/1,4-dihydrotrigonellin je standardně postupováno tak, že je připraven methylací nikotinové kyseliny její methyl jodid a ten je následně esterovou nebo amidickou vazbou spojen s léčivem. Alternativní možností je pořadí reakcí obrátit, tedy provést methylaci až po vytvoření vazby mezi nikotinovou kyselinou a léčivem. Po případném odstranění chránících skupin bývá jako poslední krok provedena redukce působením $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Tento obecně využívaný postup jsem využíval i já.

Cílem práce na této části projektu bylo připravit látky **65** a **66** (Obrázek 26). První pokusy o přípravu těchto proléčiv jsem prováděl přímo s 2'-CMA, ale po sérii neúspěšných reakcí jsem, stejně jako v případě tropinových proléčiv, začal využívat modelový systém s adenosinem a až po nalezení vhodného postupu se vrátím k 2'-CMA.



Obrázek 26- Připravovaná prolečiva 2'-CMA

Pro syntézu nukleosidů s trigonellinem v poloze 5' bylo úspěšně použito několik postupů (Schéma 9). První použitou metodou byl peptidový coupling (Steglichova esterifikace) jodidu N-methyl nikotinové kyseliny (**67**), připraveného reakcí nikotinové kyseliny s methyl jodidem, s nukleosidem **1**. V literatuře popsáný postup⁶⁶ čištění sérií extrakcí voda-DCM a následným srážením organických příměsí byl sice částečně úspěšný, nevedl ale k odstranění veškerých nečistot. Přesto byl produkt **68** v této podobě používán jako substrát redukce.

Dalším úspěšným postupem, tentokrát pro přípravu adenosinového analogu **72**, byla reakce orthoesterem chráněného adenosinu **47** s anhydridem nikotinové kyseliny **69**, která poskytovala dvakrát nikotinovaný produkt **70**. Anhydrid byl připraven kondenzací nikotinové kyseliny trifosgenem. Methylací látky **70** methyl jodidem byla připravena látka **71** a následnou hydrolyzou působením 1% chlorovodíku v methanolu byla získána látka **72**. Po odpaření byl produkt kontaminován jen trigonellinem a byl použit pro redukci bez další purifikace.

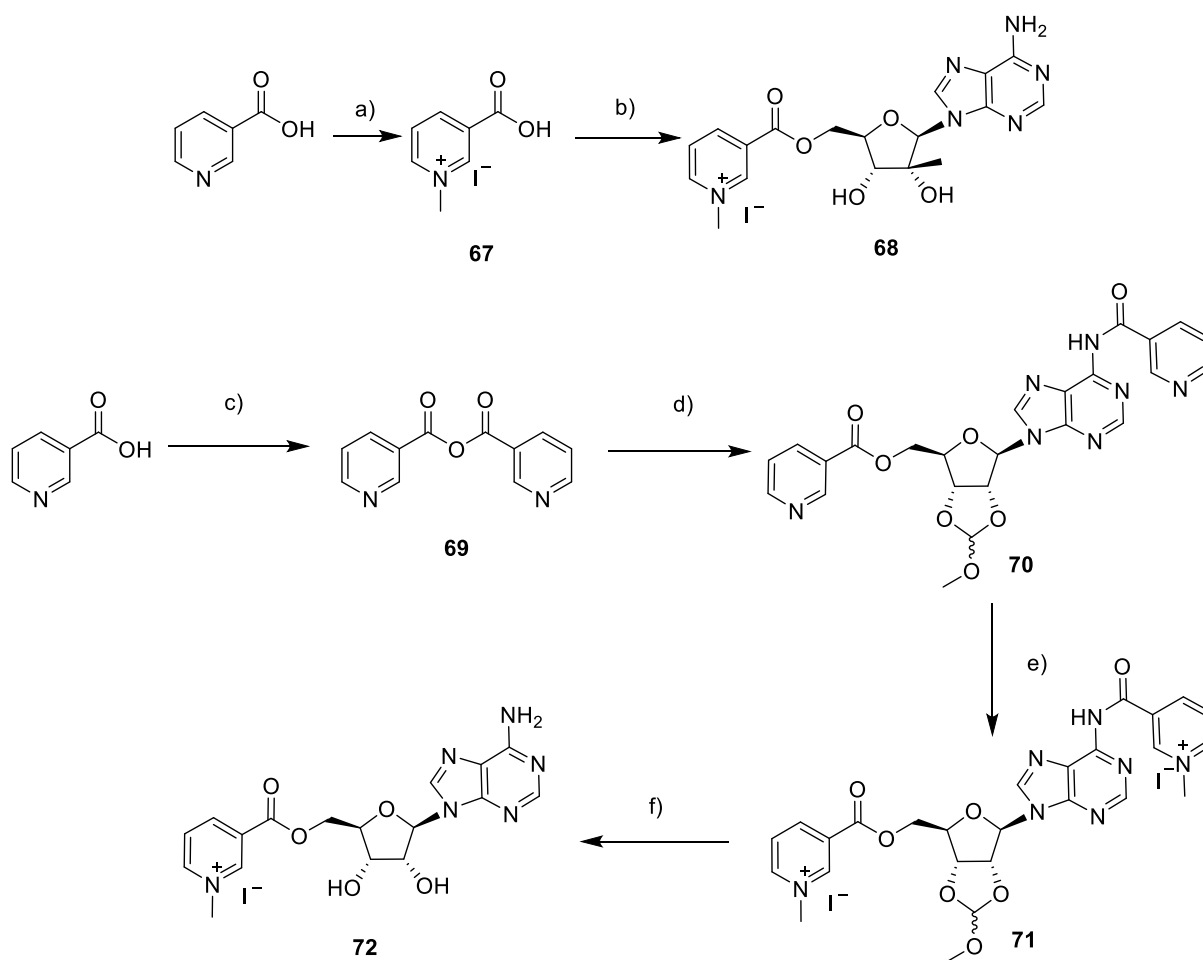


Schéma 9- Postupy použité pro přípravu látky 68 (respektive adenosinového analogu 72) a) MeI, methanol, reflux, 14 h, 61-86 %, b) 1, DCC, HOBt, pyridin, 25 °C, 4 h, c) trifosgen, DIPEA, THF, 0-25 °C, 1,25 h, 56-58 % d) 47, DMAP, DMF, 25 °C, 20 h, 60 %, e) MeI, aceton, reflux, 3 h, 46 %, f) 1% HCl v methanolu, 25 °C, 15 h

Kritickým krokem se ukázala být redukce. Publikované postupy zpravidla využívají k redukci trigellinové skupiny $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ jako redukčního činidla.^{66,67} Jako rozpouštědlo bývá používána buď jen voda nebo její kombinace s organickým rozpouštědlem (např. ethylacetátem). Kromě redukčního činidla bývá přidáván i NaHCO_3 , který má sloužit ke stabilizaci produktu redukce. Jak ale nasvědčují některé ze článků o přípravě prolečiv využívajících tento systém i moje vlastní zkušenosti, přídavek NaHCO_3 může v některých případech naopak vést k hydrolyze a je proto vhodnější provádět redukci ve fosfátovém pufru o $\text{pH} = 7-7,1$.⁶⁸

Redukci látky 68 (a v některých případech jejího analogu s adenosinem 72) jsem zkusel provést s přídavkem NaHCO_3 jak ve vodě, tak ve dvojfázové směsi vody s ethylacetátem. Rozpouštědla byla před provedením reakce vždy zbavena kyslíku probubláváním dusíkem a také v průběhu reakce procházel reakční směsí inertní plyn (dusík nebo argon). Po opakovaných neúspěších a obměnách tohoto postupu jsem zkusel provést redukci v 0,4M fosfátovém pufru

o pH=7,1. Ani tento postup ale nevedl k přípravě látky **65** - reakční směsi dle analýzy UPLC-MS obsahovaly především produkty rozpadu látky **68**, tedy samotný nukleosid a trigonellin. Stopy produktu byly také zaznamenávány, ale jednalo se o velmi malá množství. Redukce látky **68** je naznačena ve Schéma 10.

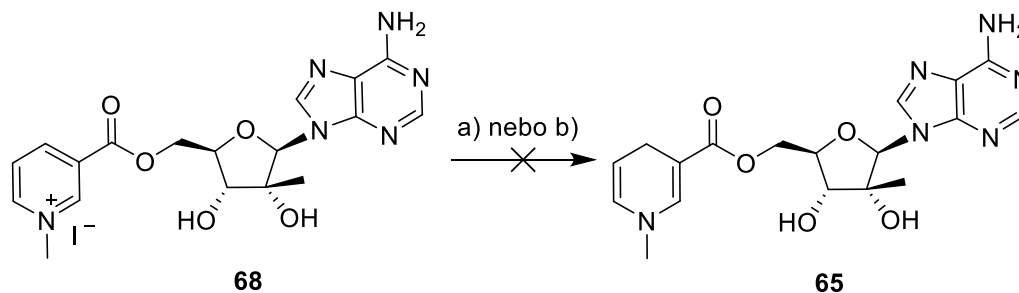


Schéma 10 - Redukce trigonellinu v poloze 5' nukleosidu 2'-CMA a) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, NaHCO_3 , voda (případně voda/EtOAc), 0-25 °C, 1-3 h, b) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, fosfátový pufr pH \approx 7,1, 0-25 °C, 3 h,

Alternativní metodou vyhýbající se redukcí N-methyl nikotinátu na nukleosidu se zdála být sekvence, kdy by byl k modifikaci nukleosidu použit už redukovaný 1,4-dihydrotrigonellin (**76**) (Schéma 11). Ačkoli je látka **76** zmíněna v patentové literatuře, není k dispozici přesný popis její přípravy. První tři kroky sekvence byly provedeny úspěšně, nicméně hydrolyzou esteru se nepodařilo získat produkt **76**. Při nižší koncentraci LiOH se nedařilo dosáhnout hydrolyzy a její zvýšení vedlo k demethylaci a vzniku nikotinové kyseliny.

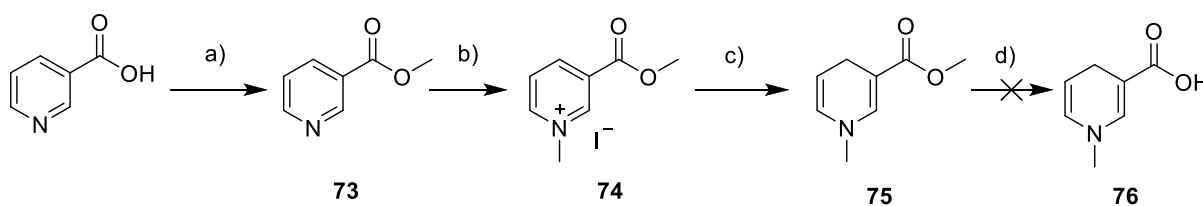
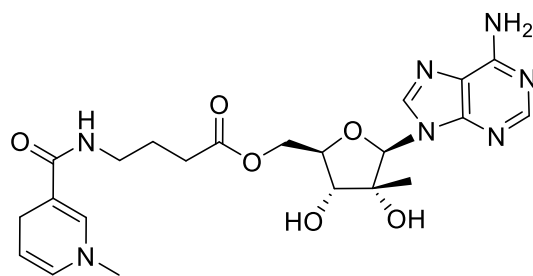


Schéma 11 - Postup přípravy 1,4-dihydrotrigonellinu a) H_2SO_4 , methanol, 60 °C, 15 h, 93% b) MeI, nitromethan, 60 °C, 2 h, 91 %, c) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, NaHCO_3 , směs voda/EtOAc, 0-25 °C, 3 h, 51 %, d) 1. 1M (aq) LiOH, THF, 25 °C, 1 den, 2. 60°C, 1 den, 3. 2,5M (aq) LiOH, 25 °C, 1 den

Protože se jako slabý článek původně navrženého proléčiva jeví esterová vazba mezi nukleosidem a 1,4-dihydrotrigonellinem, byla navržena jeho modifikovaná podoba **77** (Obrázek 27). V **77** je cílicí skupina připojena k nukleosidu pomocí propojovacího článku tvořeného γ -aminomáselnou kyselinou. Takto vzniklý amid by měl být obecně stabilnější než ester a mohl by být řešením problémů s nestabilitou a rozpadem molekuly při redukcí.



77

Obrázek 27- Podoba nově navrženého proléčiva 41 využívajícího amidové vazby mezi cílicí skupinou a spojovacím článkem

Nejprve byl připraven chlorid kyseliny nikotinové **78**, který by přidán do reakční směsi obsahující GABA, TMSCl a TEA. Látka **79** byla následně izolována v dobrém výtěžku, stejně jako **80** po následné methyloci. V době psaní této bakalářské práce ještě nebyly k dispozici konečné výsledky reakce, ale průběžná analýza reakční směsi odhalila, že **81** je hlavním produktem reakce uvedené níže ve Schéma 12.

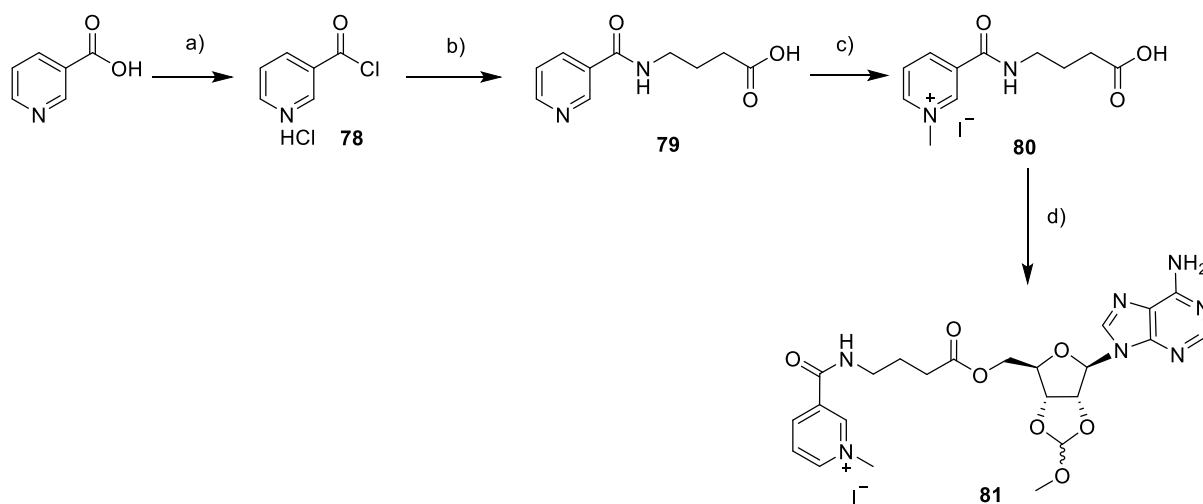


Schéma 12 - Postup přípravy dílčích produktů při syntéze proléčiva 41 a) SOCl_2 , $50\text{ }^\circ\text{C}$, 18 h, 100 %, b) 1. GABA, TEA, TMSCl, $25\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, 2. 79, $0\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$, 3 dny, 70 %, c) MeI, ACN, reflux, 14 h, 99 %, d) 47, EDC·HCl, DMAP, pyridin, $25\text{ }^\circ\text{C}$

5 Experimentální část

5.1 Obecné postupy a chemikálie

Používané chemikálie byly zakoupeny u běžných komerčních dodavatelů (např. Sigma-Aldrich, Fluorochem) s výjimkou látky **37** a 6-benzoyladenosinu, které byly dříve připraveny v naší laboratoři a byly mi k dispozici. Používaná rozpouštědla byla zakoupena u společnosti Lach-Ner. Suchá rozpouštědla byla sušena destilací a skladována nad aktivovanými molekulovými sítý.

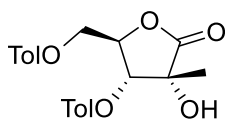
Průběžná analýza směsí byla prováděna buď pomocí TLC (Merck, Silikagel 60 F₂₅₄, detekce UV, KMnO₄, I₂ nebo Dragendorffovým činidlem) nebo s využitím UPLC-MS (gradient voda-acetonitril, 0,1 % kyseliny mravenčí, na koloně Phenomenex Gemini-NX 3μ C18 110 Å, 100 x 2.00 mm).

Pro sloupcovou chromatografii a HILIC byl používán 40-63 μm silikagel. Pro chromatografii na reverzní fázi byly využívány kolony RediSep Rf Gold® Reversed-phase C18 od společnosti Isco. Flash chromatografie byla prováděna na systému Isco Combiflash Rf resp. Rf+.

Vodíková, uhlíková a 2D (HSQC, HMBC, COSY) NMR spektra byla měřena na NMR spektrometru Bruker Avance III™ HD 400 MHz vybaveném Prodigy kryo-sondou (¹H při 400 MHz, ¹³C při 101 MHz) v CDCl₃ nebo DMSO-d₆. Spektra byla referencována na signál rozpouštědla (CDCl₃ δ 7,26 ppm pro ¹H, DMSO-d₆ δ 2,50 ppm pro ¹H a δ 39,70 ppm pro ¹³C), chemické posuny jsou uváděny ve stupnici δ v ppm a interakční konstanty *J* v Hz.

5.2 Použité postupy a naměřená data

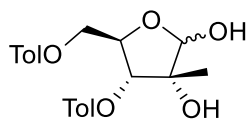
3,5-di-O-toluoyl-2-C-methyl-D-ribo-1,4-lakton (**38**)



Látka **37** (2,00 g, 12,3 mmol) byla rozpuštěna ve směsi suchého DCM (40 ml) a suchého pyridinu (10 ml) pod inertní atmosférou argonu. Směs byla zchlazena na -20 °C a po kapkách byl během asi 10 minut přidán toluoylchlorid (3,3 ml, 24,9 mmol). Reakce byla ponechána míchat 2 hodiny při -20 °C. Po odpaření rozpouštědel na vakuové odparce byl odparek rozpuštěn ve 150 ml EtOAc a roztok byl vytřepán 100 ml 3M HCl. Vodná fáze byla reextrahována 50 ml EtOAc. Spojené organické fáze byly promyty 150 ml nasyceného roztoku NaHCO₃ a 100 ml vody. Organická fáze byla

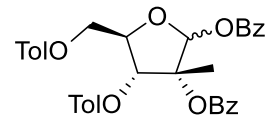
vysušena Na₂SO₄ a následně odpařena. Čistý produkt byl získán po sloupcové chromatografii na silikagelu (toluen/EtOAc, 8:1 -> 4:1). Látka **38** byla získána v množství 2,75 g (56 %). NMR charakteristika odpovídala publikovaným hodnotám.⁵⁷

3,5-di-O-toluoyl-2-C-methyl-D-ribofuranosa (směs α,β) (**39**)



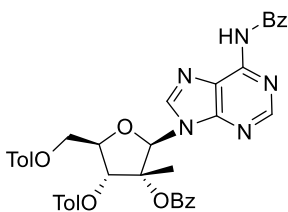
Substrát **38** (4,19 g, 10,5 mmol) byl při -15 °C suspendován ve 100 ml suchého toluenu pod atmosférou argonu. Během 15 minut byl přikapán Red-Al (3,12 ml, 10,9 mol). Následně byla teplota ponechána stoupnout na 0 °C a reakce byla míchána po dobu 2 hodin. Reakce byla ukončena přikapáním 3M HCl (41 ml) při 0 °C. Směs byla zfiltrována přes filtr připravený z křemeliny, fáze byly odděleny a vodná extrahována 2 x 50 ml toluenu. Spojené toluenové fáze byly vytřepány solankou a odpařeny na vakuové odparce do sucha. Následnou flash chromatografií (petrolether/EtOAc, 20 – 80 % EtOAc) byl získán produkt **39** (2,272 g, 54 %) a výchozí látka (0,766 g, 18 %). NMR charakteristika odpovídala publikovaným hodnotám.⁵⁷ Poměr isomerů α/β byl přibližně 3,75:1.

1,2-di-O-benzoyl-3,5-di-O-toluoyl-2-C-methyl-D-ribofuranosa (směs α,β) (**40**)



K roztoku DMAP (0,68 g, 5,57 mmol) a TEA (3,88 ml, 27,85 mmol) v suchém DCM (33 ml) byl přidán benzoylchlorid (1,97 ml, 17 mmol). K této směsi byl přidán substrát **39** rozpuštěný v suchém DCM (16 ml). Reakce byla ponechána míchat při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Po zředění 140 ml diethyletheru byla organická fáze vytřepána (vždy 100 ml) 1M HCl, nasyceným roztokem NaHCO₃ a vodou a vysušena Na₂SO₄. Po flash chromatografii (petrolether/EtOAc, 5 – 25 % EtOAc) bylo získáno 1,93 g (výtěžek 56 %) látky **40**. NMR charakteristika odpovídala publikovaným hodnotám.⁶⁹ Poměr isomerů α/β byl přibližně 3,75:1.

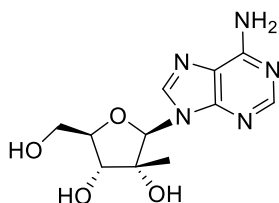
6-N-benzoyl-2'-O-benzoyl-3',5'-di-O-toluoyl-2'-C-methyladenosin (**41**)



N⁶-benzoyladenin (231 mg, 1,0 mmol) byl spolu s BSA (489 μ l, 2 mmol) refluxován ve 3 ml suchého acetonitrilu po dobu 30 minut. Po zchlazení na pokojovou teplotu byla přidána látka **40** (304 mg, 0,5 mmol) ve 3 ml suchého acetonitrilu a byl přikapán trimethylsilyl triflát (167 μ l, 0,75 mmol). Směs byla refluxována 5 hodin. Po zchlazení byla zředěna EtOAc (10 ml), dvakrát vytřepána 10 ml nasyceného roztoku NaHCO₃, 10 ml vody. Flash chromatografií (petrolether/EtOAc, 50 – 100% EtOAc) bylo získáno 145 mg (výtěžek 40 %) látky **41**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.00 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.19 –

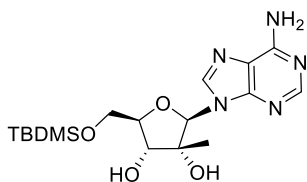
8.10 (m, 2H), 8.08 – 8.00 (m, 2H), 7.99 – 7.93 (m, 2H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.58 – 7.51 (m, 2H), 7.50 – 7.43 (m, 2H), 7.24 – 7.19 (m, 2H), 7.18 – 7.12 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.19 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.99 – 4.85 (m, 2H), 4.73 (td, $J = 6.0, 3.5$ Hz, 1H), 2.39 (d, $J = 4.5$ Hz, 5H), 1.61 (s, 3H).

2'-C-methyladenosin (1)



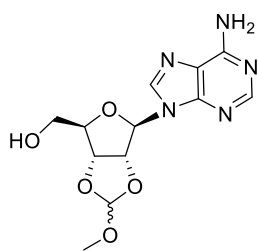
Sloučenina **41** (138 mg, 0,019 mmol) byla rozpuštěna v 10M amoniaku v methanolu (3,17 ml) a po uzavření v tlakové zkumavce byla míchána při 60 °C přes víkend. Produkt, který se vysrážel z reakční směsi byl po jejím zchladnutí zfiltrován a promyt methanolem. Bylo připraveno 40 mg (75 %) produktu **1** ve formě bílého prášku. NMR charakteristika produktu odpovídala publikovaným hodnotám.⁵⁹

5'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-C-methyladenosin (42)



Sloučenina **1** (281 mg, 1 mmol) byla rozpuštěna v suchém pyridinu (4 ml) pod argonovou atmosférou a baňka s tímto roztokem byla ochlazena na 0 °C. Do baňky byl přidán imidazol (0,272 ml, 4 mmol) a TBDMSCl (0,301 g, 2 mmol). Směs byla ponechána pomalu ohřát na laboratorní teplotu a následně byla míchána přes noc. Bylo přidáno 0,25 ml methanolu a po 30 minutách byla rozpouštědla odpařena a sloupcovou chromatografií (DCM/methanol, 0 – 5 % methanolu) byl získán produkt v množství 320 mg (81 %). NMR charakteristiky odpovídaly publikovaným hodnotám.⁷⁰

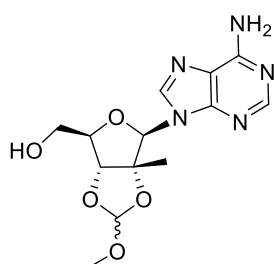
2',3'-O-(methoxymethyliden)adenosin (47)



Adenosin (0,96 g, 3,6 mmol) a monohydrát kyseliny paratoluensulfonové (1,37 g, 7,2 mmol) byly vysušeny koevaporací s DMF (2 x 10 ml) a pak rozpuštěny v 10 ml suchého DMF. Do míchané směsi byl přidán trimethyl orthoformiát (600 μ l, 5,5 mmol) a tato byla míchána při laboratorní teplotě 20 hodin. Reakce byla ukončena přisypáním methoxidu sodného (0,34 g) a po 15 minutách míchání byla reakční směs odpařena. Získaný kalný olej byl zfiltrován přes křemelinu a ta byla promyta 50 ml směsí DCM/methanol (95/5). Rozpouštědla byla odpařena a zbytek byl chromatograficky vyčištěn (DCM/methanol, 5–25 %). Produkt **47** byl získán v množství 823 mg (74 %) a to jako směs dvou diastereoisomerů v poměru 1:0,7. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) Většinový isomer: δ 8.34 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.36 (s,

2H), 6.18 (s, 1H), 6.15 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 5.48 (dd, $J = 6.3, 2.9$ Hz, 1H), 5.20 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 5.06 (dd, $J = 6.2, 2.9$ Hz, 1H), 4.20 (td, $J = 5.0, 2.9$ Hz, 1H), 3.56 – 3.49 (m, 2H), 3.23 (s, 3H) Menšinový isomer: δ 8.38 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.35 (s, 2H), 6.25 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.43 (dd, $J = 7.2, 3.2$ Hz, 1H), 5.17 – 5.11 (m, 1H), 4.98 (dd, $J = 7.2, 3.4$ Hz, 1H), 4.27 (td, $J = 5.0, 3.4$ Hz, 1H), 3.57 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.36 (s, 3H).

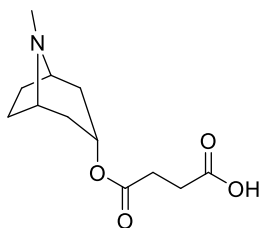
2',3'-O-(methoxymethyliden)-2'-C-methyladenosin (48)



2'-C-methyladenosin (**1**) (281 mg, 1 mmol) a monohydrát kyseliny paratoluensulfonové (380 mg, 2 mmol) byl vysušený odpařením s DMF (2 x 5 ml). Poté byly rozpuštěny ve 3 ml suchého DMF a baňka byla zaargonována. Za míchání byl přidán trimethyl orthoformiát (167 μ l, 1,5 mmol) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 2 hodiny.

Reakce byla ukončena přidáním 0,34 g methoxidu sodného a po odpaření, filtraci na křemelině a jejím promytí 50 ml směsí DCM/methanol (95/5) a opětovném odpaření byl produkt vyčištěn flash chromatografií (DCM/methanol 5-25 %) a byl získán v množství 253 mg (78 %) jako směs dvou diastereoisomerů v poměru 1:1. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) Isomer A: δ 8.36 (s, 1H), 8.16 – 8.15 (m, 1H), 7.36 (s, 2H), 6.41 (s, 1H), 6.15 (s, 1H), 5.35 – 5.42 (m, 1H), 4.65 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.28 (q, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.82 – 3.65 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 1.14 (s, 3H). Isomer B: δ 8.39 (s, 1H), 8.16 – 8.15 (m, 1H), 7.36 (s, 2H), 6.23 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.35 – 5.42 (m, 1H), 4.58 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 4.18 (q, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.82 – 3.65 (m, 2H), 3.25 (s, 3H), 1.04 (s, 3H).

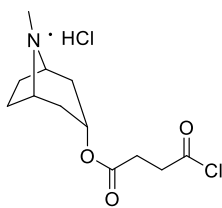
4-(3*R*-tropan-3-oxo)-4-oxomáselná kyselina (49)



Tropin (141 mg, 1,0 mmol) a anhydrid kyseliny jantarové (100mg, 1,0 mmol) byly rozpuštěny v DCM a refluxovány přes noc. Kontrola pomocí UPLC-MS ukázala, že hlavním produktem reakce je látka **16** a směs obsahuje jen zbytky tropinu. Čištění bylo provedeno pomocí HILIC na silikagelu (acetonitril/voda/25% NH_4OH , 7/5/0,5). Bylo získáno 171 mg

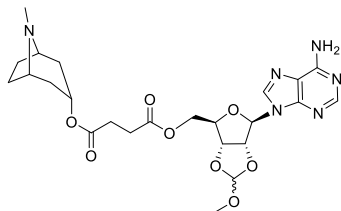
látky **49** (výtěžek 71%). $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.82 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.43 (m, 4H), 2.19 (s, 3H), 2.03 (dd, $J = 5.4, 3.6$, 1H), 2.00 (dd, $J = 5.3, 3.6$, 1H), 1.91 (m, 4H), 1.56 (m, 2H) $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 174.01, 171.69, 66.80, 59.29, 35.56, 29.97, 29.62, 25.42.

4-(3*R*-tropan-3-oxo)-4-oxobutyryl chlorid hydrochlorid(50)



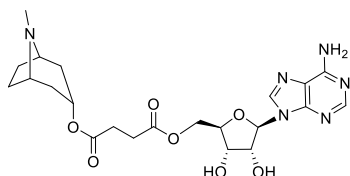
Látka **49** (241 mg, 1 mmol) byla refluxována v thionylchloridu (2 ml) 1 hodinu. Nadbytek thionylchloridu byl odpařen a produkt byl kdestilován se suchým toluenem. Produkt **50** (260 mg, 100 %) nebyl dále nijak čištěn a byl hned použit do další reakce.

5'-O-(4-(3*R*-tropan-3-oxo)-4-oxobutyryl)-2',3'-O-(methoxymethyliden)adenosin (51)



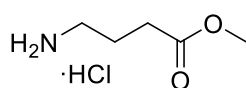
Látka **47** (16 mg, 0,05 mmol) byla pod argonovou atmosférou suspendována v suchém acetonitrilu (0,5 ml). Po zchlazení na 0 °C byl přidán DMAP (12 mg, 0,1 mmol) a čerstvě připravený chlorid **50** (18 mg, 0,06 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Po odpaření rozpouštědla byla surová reakční směs adsorbována na silikagel a čištěna flash chromatografií (isopropanol/25% NH₄OH/ voda, 14/1/2 -> 7/1/2). Výtěžek 14 mg (51%). UPLC-MS analýza prokázala přítomnost produktu o čistotě >95%, který byl ihned použit v další reakci.

5'-O-(4-(3*R*-tropan-3-oxo)-4-oxobutyryl)-adenosin (52)



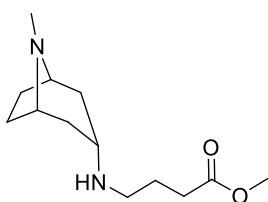
Látka **51** (14 mg, 0,026 mmol) byla rozpuštěna v 1% roztoku chlorovodíku v methanolu (1 ml) a míchána při laboratorní teplotě 1,5 h. TLC kontrola (iPAW, 14/1/2) prokázala plnou konverzi výchozí látky a produkt byl čištěn chromatografií na reverzní fázi (0,1M TEAAc/ směs 0,1M TEEAc ve směsi voda-ACN (1:1), 10-100 %). Výtěžek 6 mg (47%). Po trojnásobné lyofilizaci z vody byla kombinací 1D a 2D NMR experimentů potvrzena struktura produktu **52**. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.31 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.29 (s, 2H), 5.90 (d, 1H, J = 4.8), 4.80 (t, 1H, J = 5.3), 4.64 (t, 1H, J = 5.0), 4.34 (dd, 1H, J = 11.9, 3.5), 4.24 (t, 1H, J = 5.0), 4.19 (dd, 1H, J = 11.8, 6.4), 4.07 (dt, 1H, J = 6.2, 4.3), 3.03-2.93 (m, 2H), 2.61-2.56 (m, 2H), 2.54-2.48 (m, 2H, pod signálem DMSO) 2.14 (s, 3H), 1.97 (dq, 2H, J = 14.4, 4.7), 1.52 (dd, 2H, J = 14.9, 7.3) ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 172.08, 171.12, 156.27, 152.81, 149.50, 139.9, 119.33, 87.97, 81.61, 73.07, 70.46, 67.19, 64.60, 59.23, 35.61, 29.33, 28.71, 25.35.

Methyl 4-aminobutanoát hydrochlorid (61)



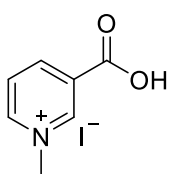
γ -aminomáselná kyselina (GABA, 1 g, 9,6 mmol) byla suspendována v methanolu (15 ml) a při 0 °C byl přikapán chlorid thionylu (0,72 ml, 10,0 mmol). Během 15 minut při 0 °C se veškerá GABA rozpustila a poté byla reakce míchána ještě 40 minut při laboratorní teplotě. Methanol a přebytečný SOCl₂ byly odpařeny a získaný produkt (1,47 g, kvantitativní) nebyl dále nijak čištěn. NMR charakteristiky produktu odpovídaly publikovaným hodnotám.⁷¹

Methyl 4-((3R)-tropan-3-amino)butanoát (62)



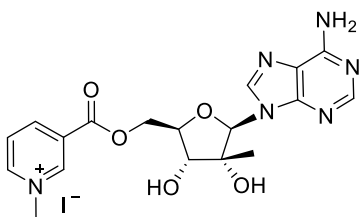
K suspenzi tropinonu (139 mg, 1 mmol) a **61** (374 mg, 2,4 mmol) v suchém THF (20 ml) byl přidán TEA (334 μ l, 2,4 mmol). Po 10 minutách míchání při teplotě místnosti byl přisypán NaBH(AcO)₃ (795 mg, 3,75 mmol). Po 4 dnech při laboratorní teplotě bylo analýzou UPLC-MS zjištěno, že došlo k úplné konverzi tropinonu. Po odpaření byl flash sloupcovou chromatografií (isopropanol/25% NH₄OH/voda, 14:1:2 -> 7:1:2) izolován produkt **62** (116 mg, 48 %) jako jediný isomer. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.57 (s, 3H), 2.91 (dq, *J* = 6.2, 3.0 Hz, 2H), 2.66 (dd, *J* = 6.8, 5.6 Hz, 1H), 2.43 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.96 – 1.85 (m, 2H), 1.85 – 1.75 (m, 4H), 1.68 – 1.59 (m, 2H), 1.44 (ddt, *J* = 14.2, 2.5, 1.2 Hz, 2H).

3-karboxy-1-methylpyridin-1-ium jodid (67)



K roztoku kyseliny nikotinové (1,03 g, 8,37 mmol) v methanolu (41 ml) byl přikapán metyljodid (2 ml, 32 mmol) a směs byla refluxována přes noc. Po odpaření byl produkt rekrystalizován ze směsi acetonu a methanolu. Výtěžek 1,898 g (86 %). NMR charakteristika produktu odpovídala hodnotám popsaným v literatuře.⁶⁶

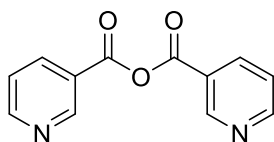
3-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)karbonyl)-1-methylpyridin-1-ium jodid (68)



Roztok nukleosidu **1** (84 mg, 0,3 mmol), **67** (119 mg, 0,45 mmol), DCC (618 mg, 3 mmol) a HOBT (459 mg, 3 mmol) v pyridinu (3 ml) byl míchán při pokojové teplotě 4 hodiny. Podle UPLC-MS bylo dosaženo úplné konverze a směs obsahovala **68** jako hlavní produkt. Směs byla odpařena, odparek rozpuštěn ve vodě (20 ml) a

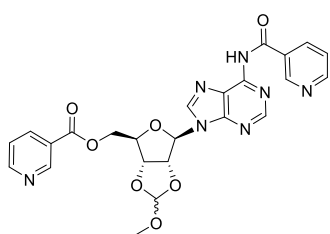
vzniklý roztok byl promyt DCM (5 x 10 ml). Vodná fáze byla zahuštěna (na cca 5 ml) a vykrytalizovaný HOBt byl odfiltrován. Po opětovném zředění vodou byly odpařeny a filtrace HOBt opakovány ještě jednou. Voda byla odpařena dosucha a látka **68** byla použita do další reakce bez dalšího čištění.

Nikotinanhydrid (**69**)



Kyselina nikotinová (1 g, 8,12 mmol) a DIPEA (1,41 ml, 8,12 mmol) byly, pod argonovou atmosférou, rozpuštěny v suchém THF (18 ml), po 10 minutách míchání při pokojové teplotě byla směs zchlazena na 0 °C a byl k ní po kapkách přidán roztok trifosgenu (402 mg, 1,35 mmol) v suchém THF (2 mL). Reakční směs byla míchána nejdříve 1 hodinu při 0 °C a pak ještě 15 minut při teplotě místnosti. Reakční směs byla zahuštěna částečným odpařením na vakuové odparce (na cca 3 ml), zředěna EtOAc (15 ml), promyta vodou (2 x 20 ml) a solankou (20 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena, čímž bylo získáno 540 mg (58 %) anhydridu, který byl použit bez dalšího čištění v následné reakci. ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.35 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 2H), 8.91 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 2H), 8.42 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.7 Hz, 2H), 7.52 (ddd, *J* = 8.0, 4.9, 0.9 Hz, 2H).

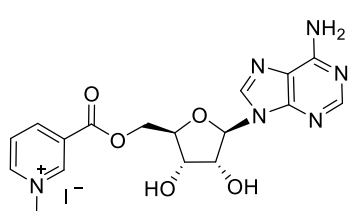
((**3aR,4R,6R,6aR**)-2-methoxy-6-(6-(nikotinamido)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl nikotínát (**70**)



K roztoku nukleosidu **47** (155 mg, 0,50 mmol) a DMAP (23mg, 0,19 mmol) v suchém DMF (20 ml) pod argonovou atmosférou byl přidán nikotinanhydrid (263 mg, 1,15 mmol) a směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Ačkoli kontrola TLC (DCM:methanol, 9:1) ukazovala pouze na přítomnost nezměněné výchozí látky, analýza UPLC-MS naopak odhalila, že reakce proběhla s plnou konverzí. Výchozí látka a produkt tedy mají ve výše zmíněné mobilní fázi stejný retenční faktor. Po odpaření rozpouštědla byl produkt izolován sloupcovou chromatografií (DCM/methanol, 5-20 % methanolu, 1 % TEA) v množství 156 mg (60 %) jako směs dvou diastereoisomerů v poměru 1:0,7. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) Většinový isomer δ 11.48 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 9.05 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.80 (m, 2H), 8.69 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.36 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.19 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.7 Hz, 1H), 7.62 – 7.50 (m, 2H), 6.38 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.68-5.74 (m, 1H), 5.40 (dd, *J* = 6.5, 3.7 Hz, 1H), 4.69 – 4.67 (m, 1H), 4.67 – 4.63 (m, 1H), 4.60 – 4.56 (m,

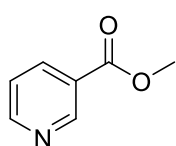
1H), 3.27 (s, 3H). Menšinový isomer ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 11.48 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 9.09 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.80 (m, 2H), 8.71 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.34 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.24 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.7 Hz, 1H), 7.62 – 7.50 (m, 2H), 6.44 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 5.68–5.74 (m, 1H), 5.29 (dd, *J* = 7.3, 3.7 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.51 – 4.47 (m, 1H), 3.41 (s, 3H).

3-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)carbonyl)-1-methylpyridin-1-ium jodid (72)



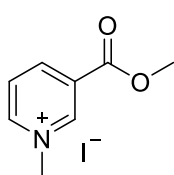
K roztoku **70** (151 mg, 0,29 mmol) v acetonu (12 ml) byl přidán methyljodid (723 μl, 5,8 mmol) a směs byla refluxována po dobu 3 hodin. Vzniklá žlutá sraženina látky **71** byla odfiltrována a promyta acetonem. Aceton byl odpařen a odparek byl rozpuštěn v 1% chlorovodíku v methanolu (5 ml). Reakce byla míchána do dalšího dne při teplotě místnosti. Podle analýzy UPLC-MS reakční směs obsahovala jako hlavní produkt **72**. Bez izolace produktu bylo se směsí pokračováno k následně redukci, jejíž výsledky jsou diskutovány v kapitole 4.4.

Methylnikotinát (73)



K roztoku kyseliny nikotinové (1,00g, 8,12 mmol) v methanolu (17 ml) byla při laboratorní teplotě přikapána koncentrovaná kyselina sírová (3,6 ml) a reakce byla přes noc míchána při 60 °C. Reakční směs byla zředěna 10 ml vody neutralizována nasyceným roztokem NaHCO₃ (asi 70 ml). Produkt byl extrahován chloroformem (4x10 ml), spojené chloroformové frakce byly vysušeny Na₂SO₄ a odpařením byl získán produkt **73** (1,035 g, 93%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.09 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H), 8.82 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 8.29 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.8 Hz, 1H), 7.57 (ddd, *J* = 8.0, 4.9, 0.9 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H).

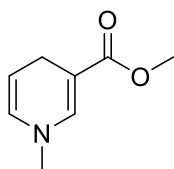
3-(methoxycarbonyl)-1-methylpyridin-1-ium jodid (74)



K roztoku methylnikotinátu (**73**) (0,5 g, 3,65 mmol) v nitromethanu (4,5 ml) byl přikapán methyljodid (685 μl, 10,95 mmol) a reakce byla zahřívána na 60 °C po dobu 2 hodin. Reakční směs byla odpařena do sucha a produkt byl rekrystalizován ze směsi EtOAc/methanol. Bylo získáno 925 mg (91 %) sloučeniny **74**. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.56 (ddt, *J* = 1.9, 1.3, 0.7 Hz, 1H), 9.18 (dtd, *J* = 6.1,

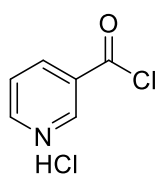
1.3, 0.6 Hz, 1H), 8.97 (dt, $J = 8.4, 1.6$ Hz, 1H), 8.26 (dd, $J = 8.1, 6.1$ Hz, 1H, H-5), 4.43 (s, 3H), 3.99 (s, 3H).

Methyl 1-methyl-1,4-dihydropyridin-3-karboxylát (75)



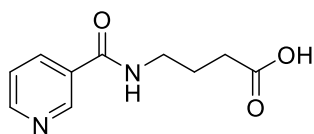
Směs 6 ml vody a 5 ml EtOAc byla degasována probubláváním dusíku po dobu 15 minut. Po zchlazení na 0 °C byla za stálého probublávání argonem do této směsi přidána látka **74** (500 mg, 1,79 mmol), NaHCO₃ (677 mg, 8,06 mmol) a po 15 minutách Na₂S₂O₄ (250 mg, 1,43 mmol). Kvůli nízké konverzi (TLC) byl v průběhu následující 1,5 hodiny přidán ještě 5 x 250 mg Na₂S₂O₄ a 2 x 300 mg NaHCO₃ a reakční směs již nebyla dále chlazená. Reakční směs byly zředěny vodou a dvakrát extrahována EtOAc. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny. Pomocí flash chromatografie (petrolether/EtOAc, 5-20 %) byla izolována látka **75** (140 mg, 51 %). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.04 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-2), 5.83 (dq, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 4.70 (dt, $J = 8.0, 3.4$ Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 2.94 (ddq, $J = 3.4, 1.7, 0.5$ Hz, 2H), 2.93 (t, $J = 0.6$ Hz, 3H).

Hydrochlorid nikotinoyl chloridu (78)



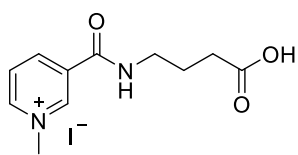
Ke kyselině nikotinové (1,00 g, 8,13 mmol) byl při pokojové teplotě přikapán thionylchlorid (2 ml) a reakce byla zahřívána pod zpětným chladičem (v atmosféře argonu) na 50 °C přes noc. Po zchlazení byla reakční směs zředěna 1,5 ml suchého toluenu a odpařena do. Nepříliš stabilní produkt **78** (1,43 g, kvant.) byl okamžitě použit v další reakci.

4-(nikotinamido)máselná kyselina (79)



K suspenzi GABA (1,258 g, 12,2 mmol) v suchém DCM (120 mL) pod argonovou atmosférou byl přidán TEA (6,1 ml) a trimethylsilyl chlorid (1,67 ml, 18,0 mmol). Reakční směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě, zchlazena na 0 °C a poté byl přidán nikotinoyl chlorid (**78**) (1,43 g, 8,13 mmol). Reakční teplota byla ponechána stoupnout na teplotu místnosti. Po 3 dnech míchání byl obsah baňky odpařen do sucha, k odparku byla přilita voda (80 ml) a po 30 minutách silného míchání byl vysrážený produkt zfiltrován, promyt 15 ml vody a diethyletherem, a vysušen. Výtěžek 1,191 g (70 %). NMR charakteristika produktu odpovídá publikovaným hodnotám.⁷²

3-((3-carboxypropyl)carbamoyl)-1-methylpyridin-1-ium jodid (**80**)



K suspenzi **79** (416 mg, 2 mmol) v suchém ACN (20 ml) pod atmosférou argonu byl přidán methyljodid (498 μ l, 8 mmol) a reakční směs byla refluxována přes noc. Analýza UPLC-MS odhalila pouze produkt velmi dobré čistoty, a tak byl pouhým odpařením získán produkt **80** ve kvantitativním výtěžku (0,69 g). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 12.11 (s, 1H), 9.38 (t, $J = 1.5$ Hz, 1H), 9.11-9.07 (m, 1H), 9.06 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H) 8.88 (dt, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 8.1, 6.0$ Hz, 1H), 4.39 (s, 3H), 3.38 – 3.34 (m, 2H), 2.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.78 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H).

6 Závěr

Byla úspěšně provedena syntéza 2'-C-methyl adenosinu v několikagramovém množství. Byla objevena metoda přípravy nukleosidů modifikovaných v polohách 3' a 5' esterovou vazbou na proskupinu obsahující tropin jako cílicí skupinu. Syntéza proléčiv využívajících redoxního systému trigonellin/1,4-dihydrotrigonellin sice doposud nebyla úspěšná, nicméně byla navržena alternativní podoba proskupiny, s potenciálně vyšší stabilitou. Po dokončení přípravy sérií proléčiv 2'-C-methyl adenosinu bude vyhodnocena úspěšnost těchto látek v biologických testech v laboratořích našich spolupracovníků.

7 Literatura

- (1) Mukhopadhyay, S.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 13.
- (2) Staples, J. E.; Monath, T. P. *JAMA* **2008**, *300*, 960.
- (3) *WHO* **2016**.
- (4) Gritsun, T. S.; Lashkevich, V. A.; Gould, E. A. *Antiviral Res.* **2003**, *57*, 129.
- (5) Solomon, T.; Gould, E. A. *The Lancet* **2008**, *371*, 500.
- (6) Sips, G. J.; Wilschut, J.; Smit, J. M. *Rev. Med. Virol.* **2012**, *22*, 69.
- (7) Kok, W. M. *Exp. Op. Drug Disc.* **2016**.
- (8) Heinz, F. X. *Vaccine* **2012**, *30*, 4301.
- (9) Guy, B.; Briand, O.; Lang, J.; Saville, M.; Jackson, N. *Vaccine* **2015**, *33*, 7100.
- (10) Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S. *Antiviral Res.* **2010**, *87*, 125.
- (11) Malet, H.; Massé, N.; Selisko, B.; Romette, J.-L.; Alvarez, K. *Antiviral Res.* **2008**, *80*, 23.
- (12) Chambers, T. J.; Hahn, C. S.; Galler, R.; Rice, C. M. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 649.
- (13) Rice, C.; Lenches, E.; Eddy; Shin, S.; Sheets, R.; Strauss, J. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1985**, *229*, 4715.
- (14) Noble, C. G.; Pei-Yong, S. *Antiviral Res.* **2012**, *96*, 115.
- (15) Mackenzie, J. *Traffic* **2005**, *6*, 967.
- (16) Ma, L.; Jones, C. T.; Groesch, T. D.; Kuhn, R. J.; Post, C. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10.
- (17) Stiasny, K.; Heinz, F. X. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 2755.
- (18) Sampath, A.; Padmanabhan, R. *Antiviral Res.* **2009**, *81*, 6.
- (19) Muller, D. A.; Young, P. R. *Antiviral Res.* **2013**, *98*, 192.

- (20) Luo, D.; Vasudevan, S. G.; Lescar, J. *Antiviral Res.* **2015**, *118*, 148.
- (21) Dong, H.; Chang, D. C.; Xie, X.; Toh, Y. X. *Virology* **2010**, *405*, 568.
- (22) Bollati, M.; Milani, M.; Mastrangelo, E.; Ricagno, S. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 140.
- (23) Lim, S. P.; Noble, C. G.; Shi, P.-Y. *Antiviral Res.* **2015**, *119*, 57.
- (24) Klema, V.; Padmanabhan, R.; Choi, K. *Viruses* **2015**, *7*, 4640.
- (25) De Clercq, E.; Neyts, J. H. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, *189*, 53.
- (26) De Clercq, E. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 552.
- (27) Lim, S. P.; Wang, Q.-Y.; Noble, C. G.; Chen, Y.-L. *Antiviral Res.* **2013**, *100*, 500.
- (28) Gane, E. J.; Stedman, C. A.; Hyland, R. H.; Ding, X.; Svarovskaia, E.; Symonds, W. T.; Hindes, R. G.; Berrey, M. M. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 34.
- (29) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 255.
- (30) Noble, C. G.; Chen, Y.-L.; Dong, H.; Gu, F.; Shi, P.-Y. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 450.
- (31) Eyer, L.; Šmídková, M.; Nencka, R.; Neča, Jiří; Kastl, T. *Antiviral Res.* **2016**, *133*, 119.
- (32) Eyer, L.; Nencka, R.; Huvarová, I.; Palus, M.; Joao Alves, M.; Gould, E. A.; De Clercq, E.; Růžek, D. *J. Infect. Dis.* **2017**, *214*, 707.
- (33) Chen, Y.-L.; Yokokawa, F.; Shi, P.-Y. *Antiviral Res.* **2015**, *122*, 12.
- (34) Nguyen, N. M.; Tran, C. N. B.; Phung, L. K.; Duong, K. T. H.; Huynh, H. I. A.; Farrar, J.; Nguyen, Q. T. H.; Tran, H. T.; Nguyen, C. V. V.; Merson, L.; Hoang, L. T.; Hibberd, M. L.; Aw, P. P. K.; Wilm, A.; Nagarajan, N.; Nguyen, D. T.; Pham, M. P.; Nguyen, T. T.; Javanbakht, H.; Klumpp, K.; Hammond, J.; Petric, R.; Wolbers, M.; Nguyen, C. T.; Simmons, C. P. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 1442.
- (35) Ojwang, J. O.; Ali, S.; Smee, D. F.; Morrey, J. D.; Shimasaki, C. D.; Sidwell, R. W. *Antiviral Res.* **2005**, *68*, 49.

- (36) Julander, J. G.; Bantia, S.; Taubenheim, B. R.; Minning, D. M.; Kotian, P.; Morrey, J. D.; Smee, D. F.; Sheridan, W. P.; Babu, Y. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 6607.
- (37) Eyer, L.; Zouharová, D.; Širmarová, J.; Fojtíková, M.; Štefánik, M. *Antiviral Res.* **2017**, *142*, 63.
- (38) Furuta, Y.; Gowen, B. B.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L. *Antiviral Res.* **2013**, *100*, 446.
- (39) Patel, M. M.; Goyal, B. R.; Bhadada, S. V.; Bhatt, J. S.; Amin, A. F. *CNS Drugs* **2009**, *23*, 35.
- (40) Abbott, J. N.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13.
- (41) Pardridge, W. M. *Drug Delivery* **1993**, *1*, 83.
- (42) Habgood, M.; Ek, J. *Ther. Delivery* **2010**, *1*, 483.
- (43) Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. *AAPS J.* **2008**, *10*, 92.
- (44) Pardridge, W. M. *NeuroRX* **2005**, *2*, 3.
- (45) Duffus, J. H.; Nordberg, M.; Templeton, D. M. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 1153.
- (46) Stella, V. J. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2005**, *14*, 277.
- (47) Pardridge, W. M. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2003**, *6*, 683.
- (48) Anderson, B. D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *19*, 171.
- (49) Bodor, N.; Farag, H. H.; Brewster, M. E. *Science* **1981**, *214*, 1370.
- (50) Ishikura, T.; Senou, T.; Ishihara, H.; Kato, T.; Ito, T. *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 51.
- (51) Tamai, I.; Tsuji, A. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1371.
- (52) Pavan, B.; Dalpiaz, A.; Ciliberti, N.; Biondi, C.; Manfredini, S.; Vertuani, S. *Molecules* **2008**, *13*, 1035.

- (53) Mangas-Sanjuan, V.; González-Alvarez, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. *Ther. Delivery* **2010**, *1*, 535.
- (54) Bonina, F.; Puglia, C.; Rimoli, M. G.; Melisi, D.; Boatto, G.; Nieddu, M.; Calignano, A.; La Rana, G.; Caprariis, P. *J. Drug Targeting* **2003**, *11*, 25.
- (55) Wang, X.; Li, J.; Xu, C.; Li, Y.; Gong, T.; Sun, X.; Fu, Y.; He, Q.; Zhang, Z. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 2046.
- (56) Booth, K. V.; Cruz, F. P. d.; Hotchkiss, D. J.; Jenkinson, S. F.; Fleet, G. J. W. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2417.
- (57) Nauš, P.; Perlíková, P.; Pohl, R.; Hocek, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **2011**, *76*, 957.
- (58) Chuan, F. L.; Zeng, Y.; Lu, X. W. 2011; US2011/245458.
- (59) Harry-O'kuru, R. E.; Smith, J. M.; Wolfe, M. S. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1754.
- (60) Zhu, X.-F.; Williams, H. J.; Scott, A. I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 2305.
- (61) Nowak, I.; Conda-Sheridan, M.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7455.
- (62) Mueller, E. G.; Crowder, M. W.; Averill, B. A.; Knowles, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2974.
- (63) Brand, S.; Norcross, N. R.; Thompson, S.; Harrison, J. R.; Smith, V. C.; Robinson, D. A.; Torrie, L. S.; McElroy, S. P.; Hallyburton, I.; Norval, S.; Scullion, P.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R. C.; Aalten, D. v.; Frearson, J. A.; Brenk, R.; Fairlamb, A. H.; Ferguson, M. A. J.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H.; Read, K. D. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9855.
- (64) Archer, S.; Bell, M. R.; Lewis, T. R.; Schulenberg, J. W.; Unser, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4677.
- (65) Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849.
- (66) Torrence, P. F.; Kinjo, J.; Khamnei, S.; Greig, N. H. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 529.

- (67) Kumar, R.; Wang, L.; Wiebe, L. I.; Knaus, E. E. *Arch. Pharm.* **2001**, *334*, 351.
- (68) Maillard, M. C.; Nikodijević, O.; Lanoue, K. F.; Berkich, D.; Ji, X.-D.; Bartus, R.; Jacobson, K. A. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 46.
- (69) Tamerlani, G.; Salsini, L. 2004, US2004/158059
- (70) Leisvuori, A.; Ahmed, Z.; Ora, M.; Blatt, L.; Beigelman, L.; Lönnberg, H. *Arkivoc* **2012**, *2012*, 226.
- (71) Kreye, O.; Türünç, O.; Sehlinger, A.; Rackwitz, J.; Meier, M. A. R. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 5767.
- (72) Rekasas, G. V.; Tani, E.; Demopoulos, V. J.; Kourounakis, P. N. *Arch. Pharm.* **1996**, *329*, 393.
- (73) Upraveno (oříznuto a přidány české popisky) z „Tight junction 03.png“ vytvořeného Arminem Kübelbeckem. Licencováno pod CC BY 3.0.
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9d/Tight_junction_03.png
- (74) Upraveno (oříznuto a přidány české popisky) z „Osmotic shrinkage 01.png“ vytvořeného Arminem Kübelbeckem. Licencováno pod CC BY 3.0.
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/87/Osmotic_shrinkage_01.png