

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

CYKLIZAČNÍ REAKCE NĚKTERÝCH DERIVÁTŮ
ANTHRANILAMIDU

Hradec Králové, květen 2006

Jitka Sedláková

Za ochotu, cenné rady a připomínky, za vytvoření příjemného pracovního prostředí v průběhu mé činnosti na zdejší katedře a při zpracování této diplomové práce děkuji doc.RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D., doc.PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Csc., PharmDr. Heleně Fákové, PhD., PharmDr. Janě Suchánkové, PhD., Mgr. Janu Pavlíkovi a Petru Jančárkovi.

OBSAH

1. ÚVOD	5
1.1. Současný stav asthma bronchiale	5
1.2. Současný stav terapie astmatu	6
1.3. Biologické účinky alkaloidů obsažených v <i>Adhatoda vasica</i>	15
1.4. Biologická aktivita látek strukturně odvozených od alkaloidů <i>A. vasica</i>	16
2. CÍL PRÁCE	19
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM	20
3.1. Návrh syntézy vasicinonu	20
3.2. Výsledky s komentářem	22
3.2.1. Příprava (<i>S</i>)-acetoxy-sukcinanhydridu	22
3.2.2. Příprava kyseliny (3 <i>S</i>)-acetoxy-4-(2-karbamoylfenylamino)-4-oxobutanové	22
3.2.3. Redukce	23
3.2.4. Dehydratace a cyklizace	23
3.2.5. Intramolekulární cyklizace	25
3.2.6. Pokus o přípravu (<i>S</i>)-acetoxypegaminu a (<i>S</i>)-acetoxyvasicinonu	25
3.2.7. Pokus o spontánní cyklizaci	26
3.3. Předběžné farmakologické testy	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1. Použité experimentální postupy	30
4.2. Vlastní experimentální část	31
5. ZÁVĚR	36
6. LITERATURA	37

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CysLT1	receptor pro cysteinylové leukotrieny 1
DEAD	diethylazodikarboxylát
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
IgE	imunoglobulin třídy E
IKS	inhalační kortikosteroidy
IL-4	interleukin 4
IR	infračervená spektroskopie
LABA	bronchodilatancia s dlouhodobým účinkem
LAH	tetrahydridohlinitan lithný
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDE IV	enzym fosfodiesteráza, typ IV
PE	petrolether
PGE	prostaglandin E
ppm	<i>parts per million</i>
SABA	bronchodilatancia s krátkodobým účinkem
SIT	speciální alergenová imunoterapie
Th	pomocné T lymfocyty
THF	tetrahydrofuran
TMS	tetramethylsilan
t.t.	teplota tání

1. ÚVOD

1.1. Současný stav asthma bronchiale

Asthma bronchiale patří mezi onemocnění postihující významnou část celosvětové populace. Je nejčastější chronickou nemocí dětského věku a představuje nezanedbatelnou medicínskou, sociální i ekonomickou zátěž pro nemocného, jeho rodinu, ale i pro celou společnost, a to jak z hlediska absence v zaměstnání či ve škole, tak z hlediska přímých nákladů na léčebně-preventivní péči.¹

V několika posledních letech došlo ke změně definování astmatu. Astma je definováno jako chronický zánět dýchacích cest. V posledních dvaceti pěti letech došlo k zásadnímu pokroku v poznání významu zánětu u astmatu. Nyní je astma chápáno jako nemoc dlouhodobého charakteru probíhající i v době, kdy nejsou zjistitelné funkční změny a pacient je bez obtíží. Jedna z posledních *definic* pochází z roku 2002:

*Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky a buněčné působky. Chronický zánět je spojen s průduškovou hyperreaktivitou a vede k opakujícím se epizodám pískotů, dušnosti, tíže na hrudi a kašle, zvláště v noci nebo časně ráno. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s variabilní obstrukcí, která je často reverzibilní buď spontánně, nebo vlivem léčby.*¹

Na vzniku astmatu se podílí dědičné faktory spolu s negativním vlivem vnějšího prostředí. Dříve se astma s oblibou rozdělovalo podle etiologie na „*extrinsic astma*“, tj. alergické astma a „*intrinsic astma*“, které se objevuje i bez průkazu alergie. Avšak pro terapii astmatu není důležité zda se jedná o astma alergické či nealergické.¹

Podle současného názoru se na rozvoji a vzniku astmatu podílí zejména: zánět dýchacích cest, bronchiální hyperreaktivita a obstrukce dýchacích cest. Zánět, jeden z hlavních faktorů odpovědných za patologii a patofyziologii astmatu, je hlavním cílem preventivní léčby. Nejúčinnějšími léky jsou inhalační kortikosteroidy.¹

Klinicky se astma projevuje exacerbacemi (astmatickými záchvaty) s příznaky bronchiální obstrukce a pískáním na hrudi.¹ Existují různé faktory, které podporují vznik exacerbací. Zahrnují podněty, které provokují pouze k bronchokonstrikci (spouštěče), nealergické (fyzikální) podněty jako např. studený vzduch, mlha nebo

tělesná námaha, a podněty, které podporují zánět (induktory), jako např. expozice alergenům, profesním senzibilizujícím látkám, ozónu nebo infekci respiračními viry.²

Astma nedokážeme plně vyléčit. Hlavním cílem léčby je *astma pod dobrou kontrolou*, tzn. dosáhnout a udržet kontrolu příznaků onemocnění, předcházet exacerbacím astmatu, udržet funkci plic v normě, zajistit možnost provozovat běžné aktivity včetně cvičení, zabránit nežádoucím účinkům farmakologické léčby a předcházet úmrtí na astma.²

Léky proti astmatu mohou být podávány různými způsoby, zahrnujícími cesty inhalační, perorální a parenterální (subkutánní, intramuskulární, intravenózní). Hlavní výhodou podání léku inhalační cestou je, že lék dosahuje vysokých účinných koncentrací v dýchacích cestách a nežádoucí systémové účinky nejsou téměř žádné nebo pouze minimální.²

1.2. Současný stav terapie astmatu

Antiastmatika můžeme rozdělit do dvou skupin:

- *rychle účinná bronchodilatancia* (záchranná, úlevová medikace) – jsou určena k odstranění akutních obtíží, ale zánět neovlivňují, takže z dlouhodobého hlediska nemají vliv na průběh onemocnění
- *preventivní antiastmatika* (udržovací, dlouhodobá medikace) – představují hlavní a nejdůležitější složku léčby trvalého astmatu všech stupňů tíže. Tato skupina zahrnuje inhalační kortikosteroidy (IKS), kromony, theofylliny s prodlouženým účinkem a antileukotrieny. Jsou sem zařazena i β_2 -mimetika s dlouhodobým účinkem (LABA), která by však neměla být podávána bez kombinace s IKS. Patří sem i perorální kortikosteroidy, které by měly být používány pouze minimálně a v případě, kdy není jiná volba. Mezi preventivní léky patří i monoklonální protilátka proti IgE, tj. omalizumab.¹

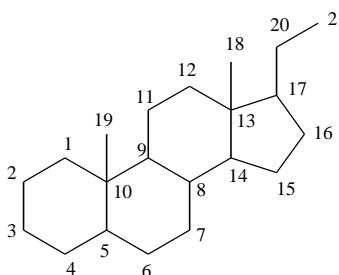
1.2.1. Preventivní antiastmatika

Preventivní antiastmatika se podávají denně a dlouhodobě. Patří sem látky protizánětlivé a také bronchodilatancia s dlouhodobým účinkem (LABA).

1.2.1.1. Inhalační kortikosteroidy

V současnosti patří tato skupina léků k *nejúčinnějším preventivním antiastmatikům*.¹ Nepůsobí bronchodilatačně a používají se zejména k dlouhodobé terapii perzistujícího astmatu. Základem působení kortikosteroidů je vazba na buněčné glukokortikoidní receptory, následný přesun komplexu hormon-receptor do jádra a vazba na represor (bílkovina blokující DNA) a jeho odstranění. Tím se spustí syntéza mRNA a v ribozomech se začne tvořit enzymová bílkovina (ovlivnění transkripce cytokinů).^{3,10} Cytokiny, buněčné působky, jsou produkovány T-lymfocyty při senzitivaci pacienta. T lymfocyty rozpoznají antigen a produkcí cytokinů pak řídí zánětlivou odpověď. Při diferenciaci pomocných (Th) lymfocytů u astmatu převažuje podtyp Th2, který zejména produkcí cytokinu IL-4 stimuluje B lymfocyty k produkci protilátek třídy IgE. Vznikají ještě další interleukiny, které mimo jiné indukují expresi IgE-receptorů hlavně na mastocytech, eozinofilech a makrofagách. IgE se naváže na své receptory na povrchu buněk a organismus je takto připraven na další setkání s alergenem. Nová expozice vyvolá u organismu odpověď, která může vyústit až v astmatický záchvat.^{1,3}

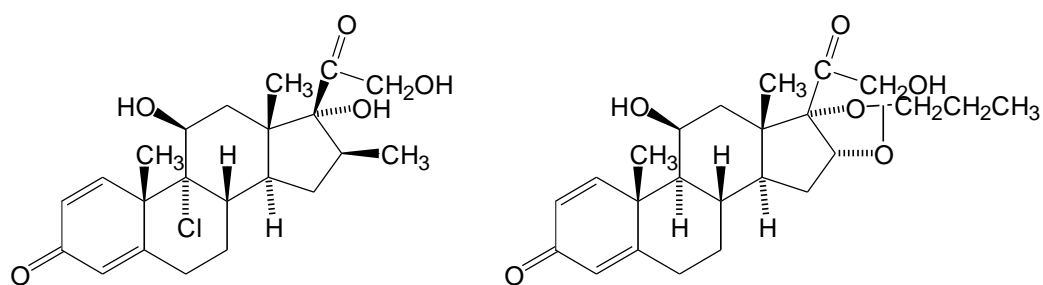
Základní strukturou, od které jsou tyto látky odvozeny, je molekula pregnanu (21C):



Nezbytná pro účinek je tedy steroidní struktura, násobná vazba v poloze 4,5, dále karbonylová skupina v poloze 3, 17 α -hydroxyskupina a 17 β -postranní řetězec s oxoskupinou v poloze 20. Zavedením další násobné vazby do polohy 1,2 se podařilo významně zvýšit aktivitu těchto látek (např. prednison, prednisolon, beclometason, budesonid aj.).¹⁰

Používané látky: beclometason (**1**), budesonid (**2**), fluticasonpropionát, flunisolid, triamcinolon acetonid.

Obr. 1. Inhalační kortikosteroidy



1 beclometason

2 budesonid

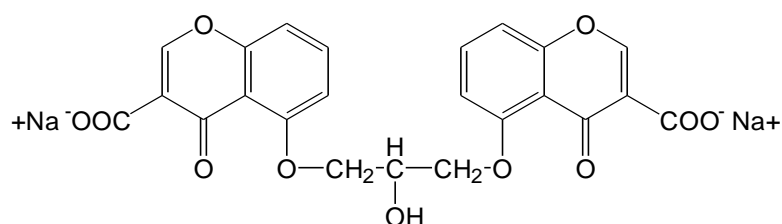
1.2.1.2. Systémové kortikosteroidy

Kortikosteroidy se podávají perorálně nebo intravenózně buď pro zvládnutí akutních astmatických stavů, které nereagují na inhalační β_2 -sympatomimetika, nebo na úvod dlouhodobé léčby inhalačními kortikosteroidy.³ Při dlouhodobém perorálním, event. i injekčním podávání kortikosteroidů hrozí riziko vzniku vážných systémových nežádoucích účinků. Nejčastěji se používá methylprednison, dále pak prednison a prednisolon.

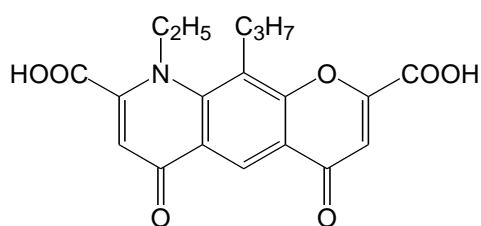
1.2.1.3. Kromony

Mechanismus působení těchto látek není zatím zcela objasněn. Je zřejmé, že kromony brzdí uvolňování histaminu a dalších mediátorů alergické reakce stabilizačním vlivem na membrány žírných buněk. Mezi zástupce této skupiny patří kromoglykát sodný (**3**) a nedokromil (**4**), který vykazuje vyšší inhibiční působení na žírné buňky.⁴ Obě tyto látky působí i na ostatní buňky zánětu (monocyty a eozinofily).¹ Společným strukturním rysem obou látek je přítomnost nezbytného chromonového cyklu s kyselou karboxylovou skupinou.⁴

Obr. 2. Kromony



3 kromoglykát sodný

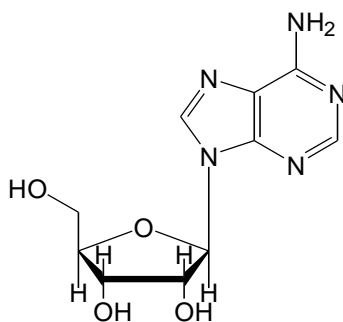


4 nedokromil

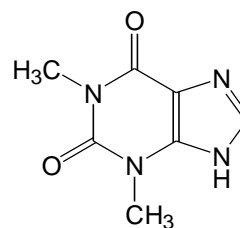
1.2.1.4. Methylxanthiny (theofylliny)

Xantinové deriváty mají bronchodilatační účinky a působí i protizánětlivě.¹ Jejich mechanismus účinku není zcela jasný. Je možné, že působí jako kompetitivní antagonisté adenosinu (**5**) na jeho receptoru (na základě podobnosti struktury adenosinu a theofyllinu). Dalším vysvětlením by mohlo být, že xantiny inhibují enzym fosfodiesterázu (typ PDE IV) a tak zvyšují hladinu cAMP, který je důležitý pro relaxaci hladkého svalu. Jako preventivní antiastmatika se používají xantiny v retardované formě: theofyllin (**6**), aminofyllin a etofyllin.⁴

Obr. 3. Podobnost struktury adenosinu a theofyllinu



5 adenosin

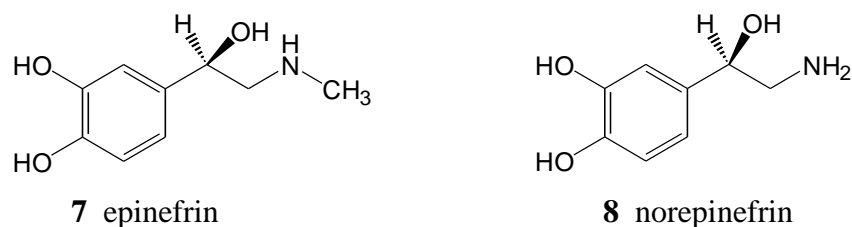


6 theofyllin

1.2.1.5. Inhalační β_2 -mimetika s dlouhodobým účinkem (LABA)

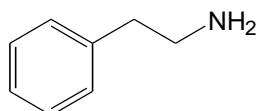
β_2 -sympatomimetika působí jako agonisté na β_2 -receptorech a mají tak stejné, resp. podobné účinky jako endogenní katecholaminy norepinefrin (**7**) a epinefrin (**8**). β_2 -receptory jsou převážně v bronších, některých cévách a děloze a mají vyšší afinitu k epinefrinu než k norepinefrinu. Přes tyto receptory působí inhalační β_2 -mimetika jako bronchodilatancia v terapii astmatu, dále jako tokolytika při předčasných stazích dělohy a i v dalších indikacích.⁴

Obr. 4. Endogenní katecholaminy



Základní strukturou, od které jsou β_2 -mimetika odvozena, je β -fenylethylamin (**9**). Nezbytný pro účinek je alkoholický hydroxyl na β uhlíku fenylethylaminu, dále pak fenolická $-OH$ skupina v poloze 3 a/nebo 4 benzenového jádra, event. může být $-OH$ skupina z polohy 4 na benzenovém jádře přesunuta do polohy 5 za vzniku 3,5-dihydroxyfenylderivátů (terbutalin, fenoterol). Fenolické skupiny v poloze 3,5 mohou být nahrazeny lipofilními substituenty (klenbuterol). Dále může být fenolická skupina v poloze 3 nahrazena hydroxymethylovou (salbutamol, salmeterol).⁴

Obr. 5. β -fenylethylamin

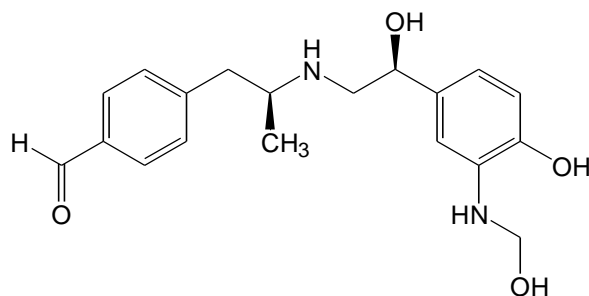


9 β -fenylethylamin

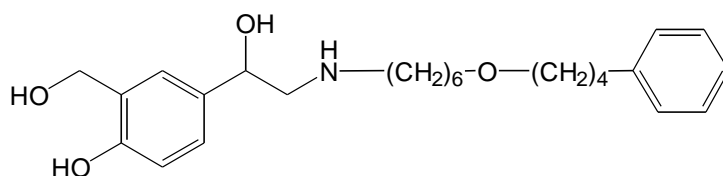
Inhalační β_2 -mimetika s dlouhodobým účinkem (LABA) jsou bronchodilatační léky, jejichž účinek trvá nejméně 12 hodin. Studiemi *bylo prokázáno*,

že chronický zánět dýchacích cest u astmatu se léčbou LABA nezhoršuje, dokonce byl prokázán při dlouhodobé léčbě protizánětlivý účinek. Zástupci této skupiny: formoterol (**10**) a salmeterol (**11**).¹

Obr. 6. Inhalační β_2 -mimetika s dlouhodobým účinkem (LABA)



10 formoterol

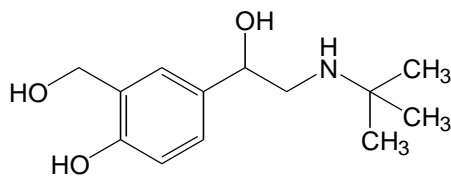


11 salmeterol

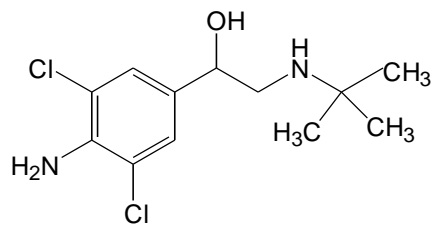
1.2.1.6. Perorální β_2 -mimetika s dlouhodobým účinkem

Do této skupiny patří pomalu se uvolňující lékové formy salbutamolu (**12**), terbutalinu a bambuterolu (proléčivo), který se v těle mění na terbutalin. Mechanismus účinku těchto látek je stejný jako u inhalačních forem. V současnosti však nejsou na našem trhu k dispozici. K prevenci bronchospasmu se podávají prokaterol a klenbuterol (**13**), což jsou sice látky, které patří do skupiny β_2 -mimetik s krátkodobým účinkem, ale v retardované formě se podávají po 12 hodinách a nejsou tedy určeny k léčbě akutního bronchospasmu.¹

Obr. 7. Perorální β_2 -mimetika s dlouhodobým účinkem



12 salbutamol



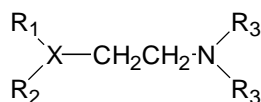
13 clenbuterol

1.2.1.7. Antileukotrieny

Jedná se o novou třídu antiastmatik, do které patří antagonisté receptoru pro cysteinylové leukotrieny 1 (CysLT1) (montelukast, pranlukast, zafirlukast) a inhibitory 5-lipooxygenázy (zileuton). Mechanismus účinku: inhibitory 5-lipooxygenázy blokuji syntézu všech leukotrienů. Antagonisté leukotrienového receptoru blokuji CysLT1 receptor hladkých svalů dýchacích cest a tím inhibují účinky cysteinylových leukotrienů uvolňovaných z žírných buněk a eozinofilů. Výsledkem je pak malý bronchodilatační účinek a redukce bronchokonstrikce indukované alergenem, námahou a oxidem siřičitým. Antileukotrieny mají i určité protizánětlivé účinky.²

1.2.1.8. Antihistaminika II. generace

Mechanismus působení této skupiny látek na astma není dosud plně objasněn, ale je ověřeno, že mají některé inhibiční účinky na alergickou odpověď.^{1,2} H₁ antihistaminika selektivně blokuji účinky histaminu na H₁-receptorech a zabraňují tak histaminové vasodilataci, edémům, poklesu krevního tlaku a spastickým účinkům histaminu na trávicí ústrojí a bronchy. Z chemického hlediska se jedná o terciární aminy. Společný strukturní základ lze vyjádřit vzorcem:



Substituenty R₁ a R₂ jsou nejčastěji fenylly nebo aromatické heterocyklické zbytky jako pyridin-2-yl, pyrimidin-2-yl a další, které na X mohou být vázány přímo nebo prostřednictvím methylenové skupiny. Substituenty R₁ a R₂ mohou být společně s X zapojeny do tricyklického systému. Obecně rozlišujeme H₁ antihistaminika na tři základní typy. Je-li X tvořeno dusíkem, jedná se o ethylendiaminy, pokud je X kyslík,

jde o aminoethylethery a v případě, že X je uhlík, se jedná o propylaminy. Substituenty R₃ jsou většinou methyly.⁴

V terapii astmatu se používají tyto látky: akrivastatin, astemizol, azelastin, cetirizin, ebastin, fexofenadin, ketotifen, loratidin, mizolastin a terfenedin, mezi nejnovější preparáty pak patří desloratidin a levocetirizin s minimálními nežádoucími účinky (téměř žádné sedativní účinky).¹

1.2.1.9. Látky šetřící potřebu systémových kortikosteroidů

Do této skupiny látek patří imunomodulancia a některé makrolidy. Terapeutické režimy ke snížení dávky perorálních kortikosteroidů potřebné pro nemocné s těžkým astmatem zahrnují takové léky jako např. troleandromycin, methotrexát, cyklosporin a zlato. Mají sice potenciální kortikosteroidy šetřící účinek, ale kromě toho mají tyto léky i velmi závažné vedlejší účinky (bolesti břicha, nauzea a zvracení, hepatitida, hematologické, teratogenní a plicní účinky).¹

1.2.1.10. Specifická alergenová imunoterapie (SIT)

Specifická imunoterapie (SIT) využívající alergenové extrakty je používána v mnoha zemích k léčbě alergických onemocnění včetně astmatu. Největšího úspěchu v této léčbě bylo docíleno v terapii alergické rýmy.² Co se týče mechanismu účinku u SIT, nebyl prozatím plně objasněn.¹

1.2.1.11. Rekombinantní monoklonální protilátka proti imunoglobulinu E

Omalizumab je anti-IgE protilátka, která se podává subkutánně. Indikací je alergické, tj. těžké astma mediované IgE, které není dobře kontrolované odpovídající léčbou (tzn. vysokou dávkou IKS a LABA) nebo astma kortikodependentní, tj. takové astma, které je léčeno dlouhodobě perorálními kortikosteroidy. Výhodou léčby omalizumabem je neexistence nežádoucích účinků, nevýhodou je však příliš vysoká cena léčby.¹

1.2.2. **Rychle účinná úlevová antiastmatika**

Mezi léky rychle uvolňující bronchokonstrikci patří inhalační β_2 -mimetika s rychlým nástupem účinku, systémové kortikosteroidy, inhalační anticholinergika, theofyliny s krátkodobým účinkem a perorální β_2 -mimetika s krátkodobým účinkem.

1.2.2.1. Inhalační β_2 -mimetika s rychlým nástupem účinku (SABA)

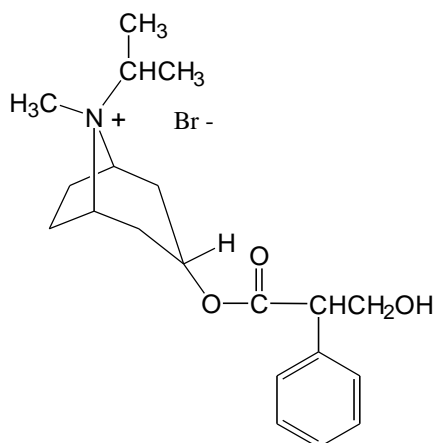
Patří sem látky s rychlým nástupem účinku, tj. do 3 minut po aplikaci: salbutamol (**12**), terbutalin a fenoterol. Mechanismus účinku mají stejný jako ostatní β_2 -mimetika. Inhalační β_2 -mimetika s rychlým nástupem účinku jsou *léky první volby pro léčbu akutní exacerbace astmatu a jsou použitelná také jako preventivní léčba před námahou indukovaným astmatem*.^{1,2}

1.2.2.2. Inhalační anticholinergika s krátkodobým účinkem

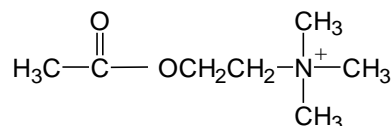
Patří sem: ipratropium bromid (**14**), který blokuje účinek acetylcholinu uvolňovaného z cholinergních nervů v dýchacích cestách.¹ Působí neselektivně na všechny typy muskarinových receptorů. Základem účinku je blokáda M_3 receptoru v hladkém svalstvu dýchacích cest, která navozuje relaxaci.³

Mezi anticholinergika patří látky, které obsahují ve své molekule určité strukturální analogie s acetylcholinem (**15**), díky nimž vyvolávají reverzibilní kompetitivní blokádu účinků acetylcholinu na muskarinových receptorech. Při interakci s receptorem dojde nejprve k navázání kationtové skupiny acetylcholinu na aniontové místo receptoru, které je v případě M-receptoru tvořeno aniontem asparagové kyseliny. Na stabilizaci vzniklého iontového páru se podílejí aromatické aminokyseliny obklopující asparagovou kyselinu. Potom dochází k vytvoření vodíkového můstku mezi jedním z kyslíků esterové skupiny acetylcholinu a hydroxylovou skupinou receptoru. Pro interakci je výhodné, aby „etherový“ kyslík esterové skupiny byl ve vzdálenosti asi 0,5 nm a karbonylový kyslík 0,7 nm od kationtové skupiny.⁴

Obr. 8. Strukturální podobnost acetylcholinu a ipratropium bromidu



14 ipratropium bromid



15 acetylcholin

1.2.2.3. Systémové kortikosteroidy

Systémové kortikosteroidy se podávají jako úlevová antiastmatika perorálně nebo parenterálně. Jsou důležité v léčbě akutní exacerbace astmatu, protože působí preventivně proti zhoršování exacerbace, snižují potřebu urgentní návštěvy ambulancí a hospitalizace. Podávají se prednison, prednisolon a methylprednisolon.¹

1.2.2.4. Methylxanthiny (theofylliny)

Jako rychle účinná úlevová antiastmatika se podávají theofylliny s krátkodobým účinkem perorálně nebo parenterálně. Jejich bronchodilatační účinek je obecně slabší ve srovnání s inhalačními β_2 -mimetiky.² Mechanismus jejich bronchodilatačního účinku viz výše. Jejich užívání a význam však klesá.

1.2.2.5. Perorální β_2 -mimetika s krátkodobým nástupem účinku

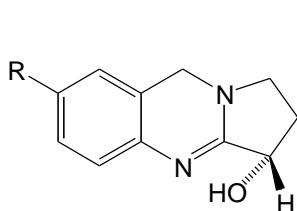
Jsou používány pouze u malého počtu pacientů, kteří nejsou schopni používat inhalační formy léků. Používají se: prokaterol, salbutamol, klenbuterol a terbutalin.¹

1.3. **Biologické účinky alkaloidů obsažených v *Adhatoda vasica***

Adhatoda vasica (L.) Nees. (*Acanthaceae*), synonyma *Adhatoda zeylanica* Medic. nebo *Justica adhatoda* L., je rostlina pocházející z Indie. Používá se v ájurvédské medicíně více než 2000 let. V lidové medicíně se tato rostlina používá

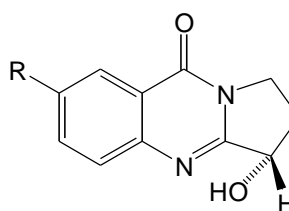
k tlumení projevů nemocí respiračního systému jako je kašel, astma, bronchitida, laryngitida a sinusitida, kde se uplatňuje její expektorační, sekretolytický, bronchodilatační a spasmolytický účinek.⁵ Kromě těchto účinků byly studovány v posledních 25 letech ještě další účinky, a to oxytocinový a abortivní. Ve vysokých dávkách může vyvolat průjem a zvracení.⁶ Hlavní obsahovou látkou v *A. vasica* je hořký chinazolinový alkaloid (-)-vasicin^{5,6} (**16**), který je obsažen v listech, kořenech a květech. Obsah vasicinu se pohybuje v rozmezí 0.541 – 1.105 %.⁶ Kromě (-)-vasicinu obsahuje *A. vasica* ještě řadu dalších alkaloidů, a to (+)-vasicinol⁵ (**17**), (-)-vasicinon⁵ (**18**), (±)-vasicinon⁵, vasicinolon^{5,6} (**19**), adhatonin⁶, adhavašon^{5,6}, anisotin^{5,6}, peganin^{5,6}, 5-methylvasicin⁵, 3-deoxyvasicinon⁵, vasicol⁵, vasicolinon⁵ a vasnetin⁵.

Obr. 9. Hlavní obsahové látky *A. vasica*



16 (-)-vasicin R=H

17 (+)-vasicinol R=OH



18 (-)-vasicinon R=H

19 vasicinolon R=OH

Experimentální studie s vasicinem ukázaly relaxační aktivitu na hladkých svalech na izolovaných tracheách morčat. Po perorálním nebo inhalačním podání morčatům vykazuje vasicin antialergické účinky.⁶ Byly pozorovány i účinky hypoglykemické po perorálním podání ethanického extraktu z listů *A. vasica*.⁶

Po perorálním podání podléhá vasicin first pass efektu v játrech a je metabolizován na vasicinon (**18**) a další metabolity.⁶

Na základě výše zmíněných faktů (velké množství farmakologických účinků: expektorační, bronchodilatační, sekretolytický, spasmolytický a antialergický) lze předpokládat, že některé látky obsažené v *A. vasica* budou moci být použity jako modelové struktury pro vývoj nových léčiv.

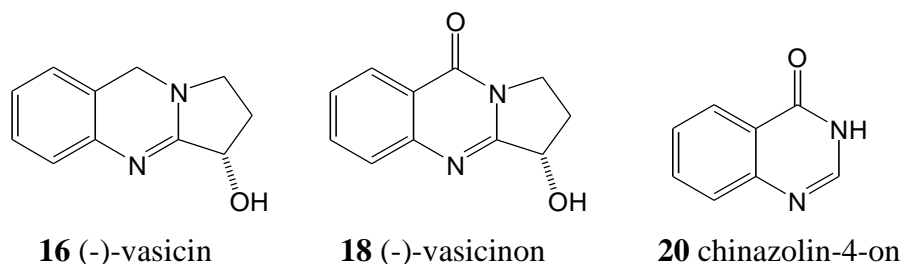
1.4. Biologická aktivita látek strukturně odvozených od alkaloidů

A. vasica

1.4.1. Chinazolin-4-on

Vasicinon (**18**) a vasicin (**16**), alkaloidy obsažené v *A. vasica*, vykazují bronchodilatační aktivitu.⁶ Tato jejich vlastnost byla inspirací pro nalezení základní struktury, které by bylo možné tuto vlastnost připsat, a která by se tak stala podkladem pro syntézu dalších jednoduchých derivátů. Touto strukturou se stal chinazolin-4-on (**20**). Vasicinon, vasicin a chinazolin-4-on byly podrobeny testování *in vivo* a *in vitro*.

Obr. 10 Vasicinon, vasicin a chinazolin-4-on



Při testech *in vitro* na izolovaných tracheách morčat¹¹ se ukázalo, že vasicinon a chinazolin-4-on mají bronchodilatační aktivitu (100 µg/ml), při dvojnásobné dávce než aktivita adrenalinu (50 µg/ml), zatímco vasicin způsobil pouze nepatrnou relaxaci při koncentraci 10 µg/ml, ale při vyšších koncentracích působil bronchokonstrikčně.¹¹

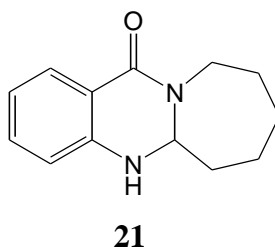
Testy *in vivo* na živých morčatech prokázaly u vasicinu antihistaminovou aktivitu. Bylo prokázáno, že 38 µg vasicinu je třeba na redukci bronchospasmu vyvolaného podáním 2 µg histaminu. Vasicin byl podán intravenózně 30 sekund před podáním histaminu, jeho bronchodilatační účinek se dostavil do 5 minut po podání histaminu. Pokud byl vasicin podán 4 - 6 minut před podáním histaminu, neobjevila se žádná antagonistická aktivita vůči histaminu. Vasicinon a chinazolin-4-on nevykazovaly v tomto testu téměř žádnou bronchodilatační aktivitu a při vyšších dávkách (nad 100 µg) byla pozorována aktivita bronchokonstrikční. Ačkoliv je bronchodilatační účinek vasicinu velmi specifický, je poměrně slabý a trvá pouze krátkou dobu. To svědčí o jeho rychlém odstranění nebo metabolizaci v organismu.¹¹

1.4.2. RLX

Další látkou působící bronchodilatačně je RLX (**21**) (6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-b]chinazolin-12-on), který byl získán chemickou modifikací molekuly vasicinu, 5-členný cyklus pyrrolidinu je zde nahrazen 7-členným cyklem azepanu. Byl sledován vliv RLX (po p.o. podání) na degranulaci žírných buněk, uvolňování histaminu a prostaglandinu E (PGE), uptake ^{45}Ca a aktivitu cAMP dependentní fosfodiesterázy (PDE) a lipooxygenázy. Jako materiál byly použity peritoneální žírné buňky a zhomogenizovaná plicní tkáň. Účinek byl pozorován na modelu uměle navozeného astmatu u potkanů. RLX v dávce 10 a 20 mg/kg inhiboval degranulaci žírných buněk a uvolňování histaminu, zvyšoval odplavování PGE z plic a inhiboval uptake ^{45}Ca v peritoneálních žírných buňkách. Dále byl zaznamenán pokles aktivity PDE a lipooxygenázy v plicích.¹²

Tyto výsledky ukazují, že látka RLX by mohla být účinná stejně jako kromoglykát sodný a aminofyllin (viz oddíl 1.2.1.) s účinností po perorálním podání a dlouhou dobou působení.¹²

Obr. 11 Syntetická látka RLX

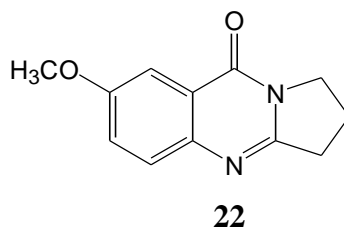


1.4.3. Sloučenina 73/602

Sloučenina 73/602 (**22**) (7-methoxyvasicinon; 2,3-dihydro-7-methoxypyrrolo[2,1-b]chinazolin-9(1H)-on) je strukturním analogem vasicinonu a byla u ní nalezena potenciální antialergická aktivita na myších, potkanech a morčatech. Antialergická aktivita byla studována jako antagonistické působení proti kožní alergické reakci u myši a potkanů. Výsledky ukazují, že látka 73/602 účinně inhibuje antigenem zprostředkovanou alergickou kožní reakci o 77 – 92 % po perorálním podání dávky 0.5 – 1.0 mg/kg. Uvolňování histaminu indukované antigenem bylo také významně

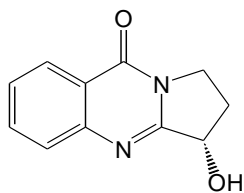
redukováno, a to o 62 – 100 %. Jako sloučenina pro kontrolu výsledků byl použit kromoglykát sodný. Látka 73/602 je nová antialergická sloučenina ve vývoji.¹³

Obr. 12 Nová antialergická sloučenina 73/602



2. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce byla modifikace syntézy vasicinonu (schéma 1) s použitím co nejmenšího počtu reakčních kroků a provedení základních farmakologických testů s danou látkou.



3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

3.1. Návrh syntézy vasicinonu

Při zkoumání možností totální syntézy (-)-vasicinonu (**18**) jsme vycházeli z publikovaných syntéz. Nejkradší byla poslední syntéza publikovaná v roce 2001 Argadem a Mhaskem.⁷ Tento postup vychází z anthranilamidu, který je ve čtyřech krocích převeden na vasicinon (schéma 2). Reakcí anthranilamidu s (*S*)-acetoxysukcinanhydridem vzniká kyselina **A**. Konverzí této kyseliny na methylester **B** a následnou redukcí esterové funkce vzniká primární alkohol **C**. Tato látka pak podléhá spontánní cyklizaci na chinazolinový derivát **D** a zbylý kruh je pak uzavřen reakcí s diethylazodikarboxylátem v přítomnosti trifenyfosfinu za vzniku vasicinonu.

Při pokusu o rekonstrukci tohoto postupu jsme se setkali s několika problémy způsobenými relativně kyselým vodíkem amidové skupiny kyseliny **A** a použitím tetrahydridohlinitanu lithného jako redukčního činidla. Při methylovaní karboxylové kyseliny **A** pomocí diazomethanu, za podmínek uvedených ve zmíněné syntéze 7, došlo k současné methylovaní karboxylové funkce i anodického dusíku (schéma 1). I když se později podařilo připravit ester **B**, při jeho redukcí pomocí LAH jsme dosáhli pouze 15 % výtěžku.¹⁵ Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli pro modifikaci syntézy. Z literatury¹⁴ je známo, že specifickým redukčním činidlem pro karboxylové funkce je redukční činidlo boranového typu, které selektivně redukuje karboxylovou skupinu na primární alkohol i v přítomnosti řady dalších funkčních skupin.⁹

Schéma 1

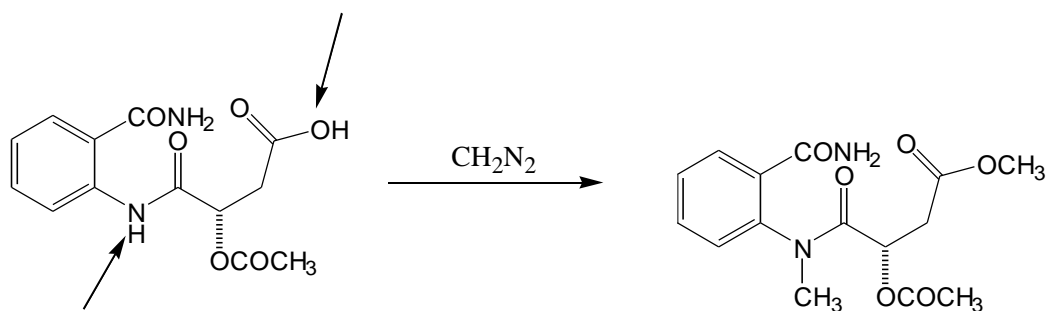
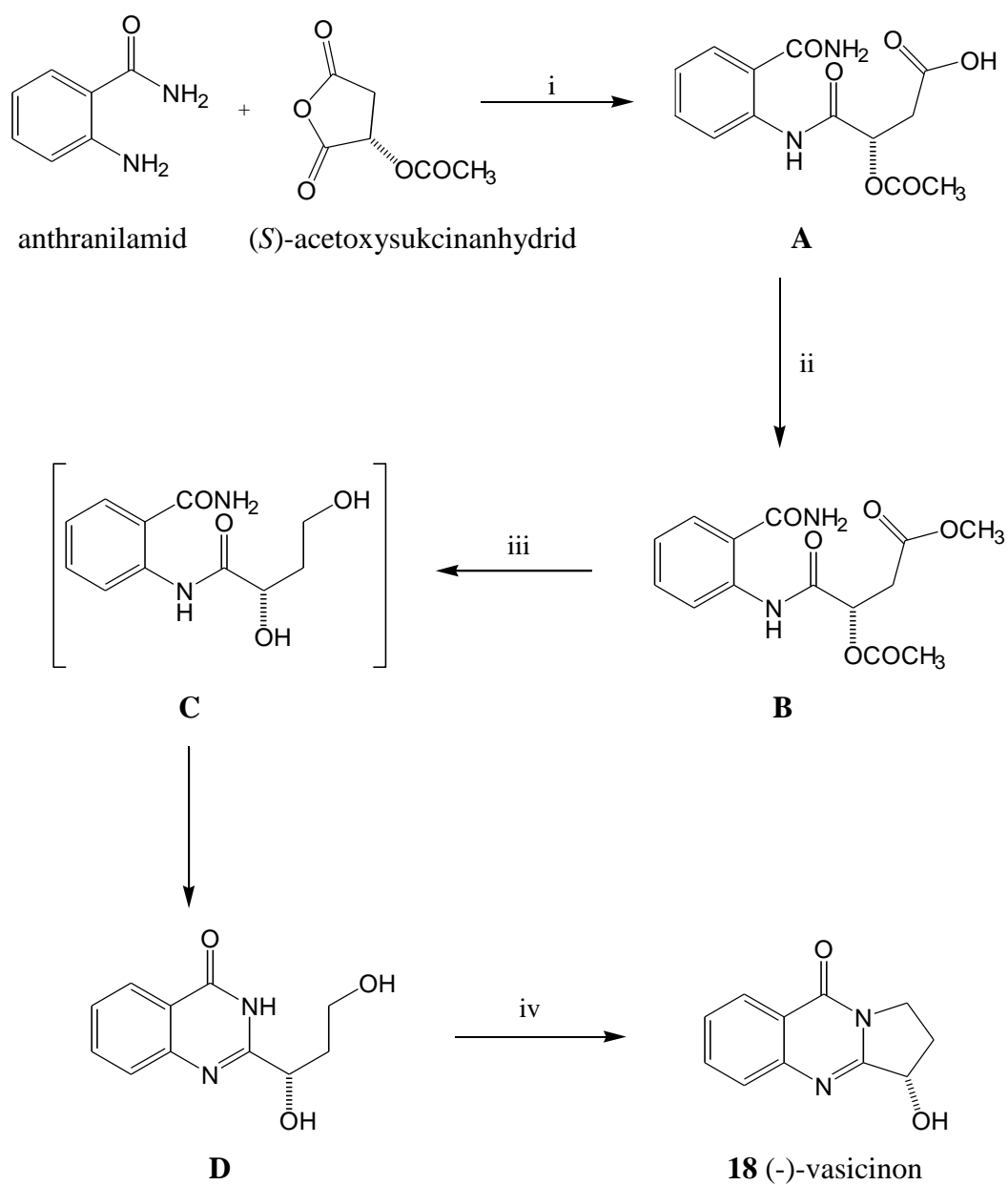


Schéma 2 Syntéza (-)-vasicinonu podle Argade a Mhaske⁷



(i) Et₂O/C₆H₆/1,4-dioxan (2:2:1), laboratorní teplota, 2h

(ii) CH₂N₂, Et₂O, laboratorní teplota, 1h

(iii) LAH, THF, 90 min

(iv) DEAD, PPh₃, THF, laboratorní teplota, 1h

3.2. Výsledky s komentářem

3.2.1. Příprava (*S*)-acetoxy-sukcinanhydridu

Jako výchozí látku jsme použili kyselinu (*S*)-jablečnou (**23**), kterou jsme převedli na (*S*)-acetoxy-sukcinanhydrid (**24**) několikahodinovým varem s acetylchloridem (schéma 3)⁷. Vzniklý produkt (**24**) jsme pak použili do další reakce bez čištění. Podstatou této reakce je nukleofilní substituce a cyklizace za vzniku anhydridu. Identita (*S*)-acetoxy-sukcinanhydridu se v ¹H NMR spektru projevila výskytem dubletu dubletů s chemickým posunem 3.04 ppm a 3.40 ppm, přítomnost acetoxykupiny jako singlet při 2.20 ppm. Podařilo se nám dosáhnout výtěžku 88 % (Argade a Mhaske⁷ dosáhli téměř kvantitativní reakce - 98 %).

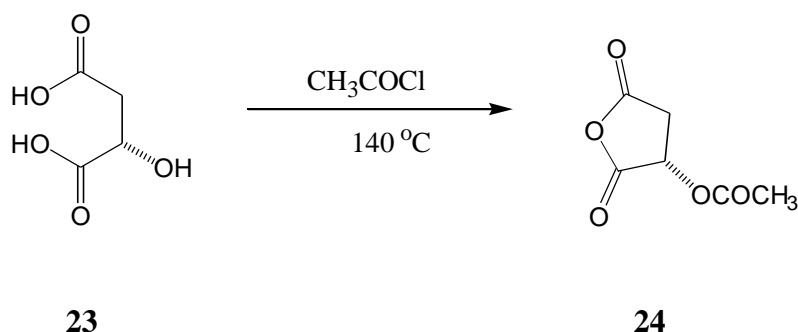


Schéma 3

3.2.2. Příprava kyseliny (*S*)-acetoxy-4-(2-karbamoylphenylamino)-4-oxobutanové

Připravený (*S*)-acetoxy-sukcinanhydrid (**24**) jsme převedli na kyselinu **26** reakcí s anthranilamidem (**25**) v dioxanu jako rozpouštědle. Podstatou této reakce je jednoduchá nukleofilní adice dusíkaté báze na anhydrid kyseliny za vzniku amidu (schéma 4)⁷. Surový produkt (**26**) jsme přečistili sloupcovou chromatografií a získali jsme tak výtěžek 69 % (literatura⁷ uvádí 98 %). Přítomnost benzenového jádra se v ¹H NMR spektru projevila výskytem signálů s chemickým posunem 7.16, 7.49, 7.76 a 8.51 ppm.

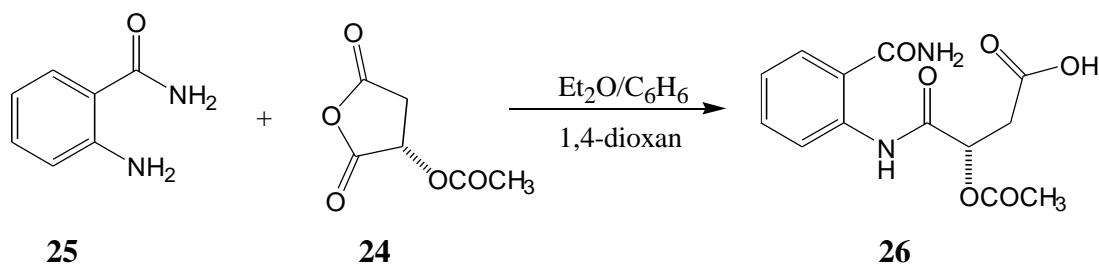


Schéma 4

3.2.3. Redukce

V dalším reakčním kroku jsme testovali průběh redukce kyseliny **26** na (2*S*)-(2,4-dihydroxybutyramido)benzamid. Reakci jsme prováděli v inertní atmosféře (Ar) a za stálého chlazení na 0 °C. Roztok kyseliny **26** v THF jsme při této teplotě postupně přikapávali k roztoku redukčního činidla ($\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$) (schéma 5), a po přidání veškeré výchozí látky jsme reakci nechali probíhat další 2 hodiny. Vzniklý produkt jsme charakterizovali pomocí ^1H NMR a bez přečištění použili do další reakce. Při použití malých množství (desítky mg) byla výchozí kyselina kvantitativně převedena na požadovaný alkohol **27**. Ve větším množství (1.30 g) byl výtěžek této reakce 55 %. Přítomnost methylenové skupiny s primární $-\text{OH}$ skupinou se ve spektru projevila tripletem s chemickým posunem 3.70 ppm. Druhá methylenová skupina se ve spektru projevila jako multiplet s chemickým posunem 1.55 – 1.65 ppm a methinový vodík skupiny CH-OH jako multiplet při 4.15 – 4.25 ppm. Tímto postupem se nám podařilo zkrátit syntézu navrženou Argadem a Mhaskem⁷ o jeden krok.

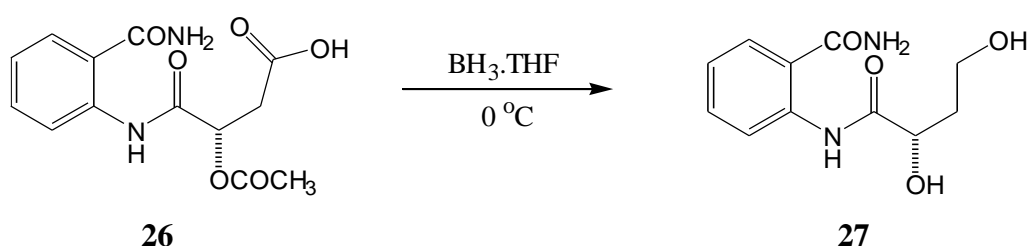


Schéma 5

3.2.4. Dehydratace a cyklizace

Primární alkohol **27** byl podroben cyklizaci na (*S*)-hydroxypegamin (**28**) v bazickém prostředí (schéma 6). Podstatou této reakce je deprotonizace amidu

karboxylové kyseliny působením báze (NaOH) a vznik aniontu. Následuje nukleofilní adice tohoto aniontu na karbonylovou skupinu, uzavření cyklu, dehydratace a izomerace na (*S*)-hydroxypegamin 2-[(1*S*),3-dihydroxypropyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (schéma 7). Vzniklý produkt **28** jsme vyčistili sloupcovou chromatografií a získali čistou látku ve výtěžku 63 % (literatura⁷ uvádí 92 %). Identitu (*S*)-hydroxypegaminu jsme ověřili pomocí ¹H NMR spektra a látku použili do následující reakce.

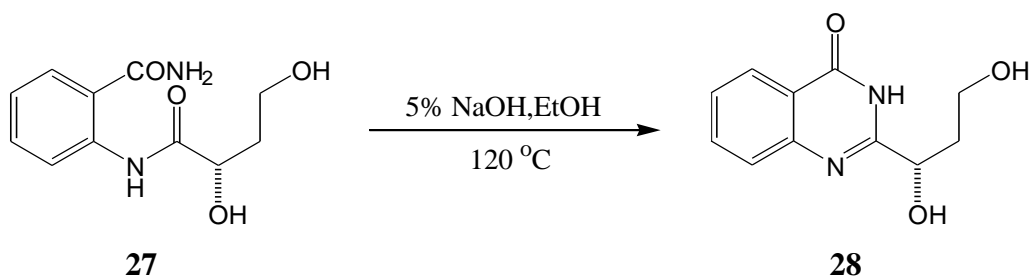


Schéma 6

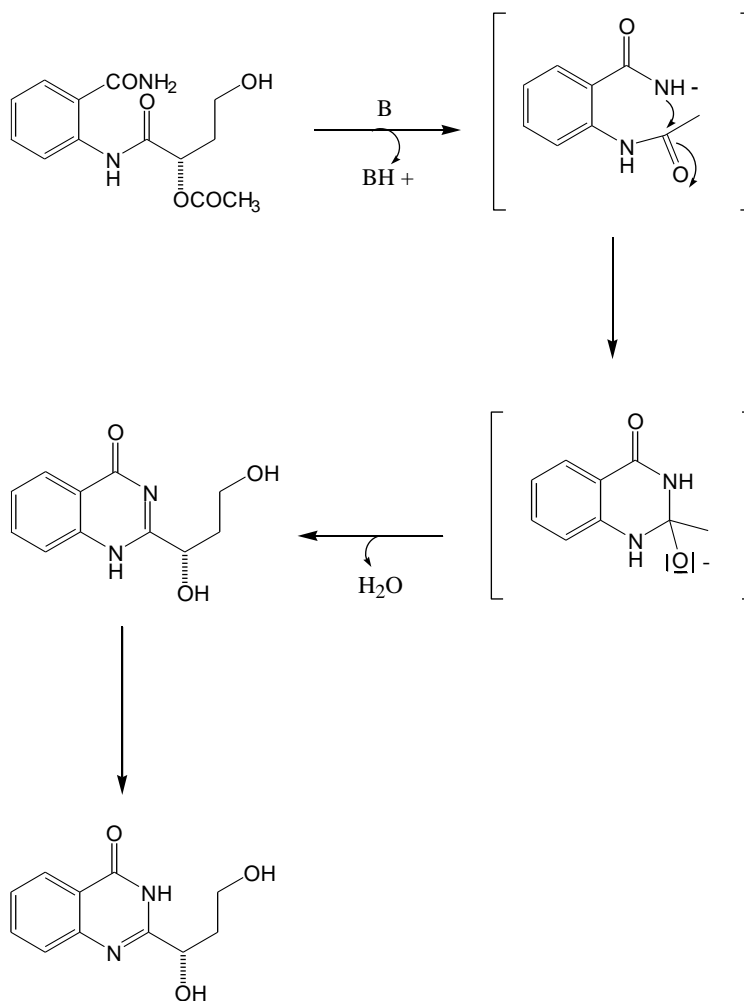


Schéma 7

3.2.5. Intramolekulární cyklizace

V posledním kroku syntézy dochází k cyklizaci (*S*)-hydroxypegaminu (**28**) na (-)-vasicinon (**18**) stejně jako v postupu dle Argada a Mhaska⁷. Podstatou reakce je intramolekulární cyklizace dle Mitsunobu (schéma 8)⁷. Jedná se o variantu nukleofilní substituce, kdy primární hydroxyskupina je aktivována pomocí DEAD a PPh₃, následně dochází k jejímu odštěpení a uzavření cyklu. Výtěžek této reakce byl pouze 45 % (literatura⁷ uvádí 90 %). Identitu získaný produktu jsme ověřili pomocí ¹H NMR, ¹³C NMR a IR spekter. NMR a další spektra byla ve shodě s již publikovanými údaji.

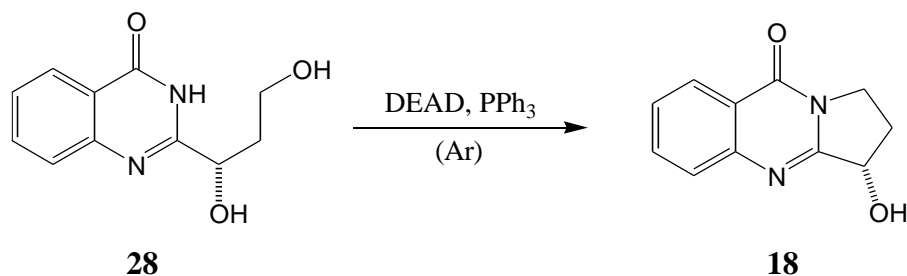


Schéma 8

3.2.6. Pokus o přípravu (*S*)-acetoxypegaminu a (*S*)-acetoxypegaminu

Na základě nízkého výtěžku při intramolekulární cyklizaci s DEAD-PPh₃ jsme se pokusili o cyklizaci alkoholu **27** pomocí uhličitanu draselného (je slabší bázi než NaOH) v bezvodém prostředí acetonitrilu (schéma 9). Na základě TLC chromatografie jsme zjistili, že došlo ke vzniku jediného produktu. Po vyčištění tohoto produktu sloupcovou chromatografií a charakterizaci pomocí ¹H NMR spektra jsme zjistili, že nejde o jeden produkt, ale o směs dvou látek, a to (*S*)-hydroxypegaminu (**28**) a (*S*)-acetoxypegaminu (**29**). Přítomnost acetoxyskupiny se v tomto spektru projevila jako singlet s chemickým posunem 2.15 ppm. Domníváme se tedy, že acetoxyskupina je značně labilní a dochází k její hydrolyze při čištění (*S*)-acetoxypegaminu na silikagelu.

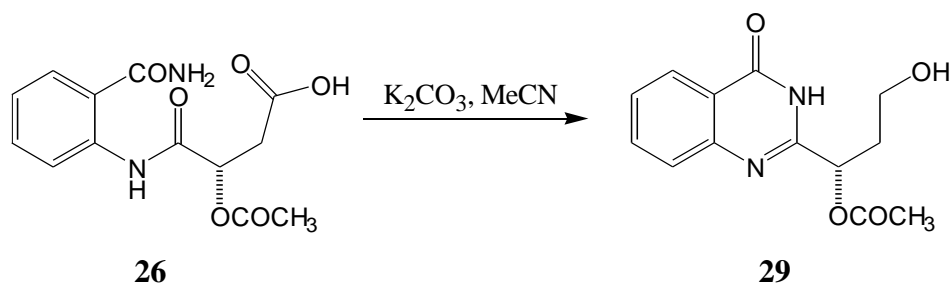


Schéma 9

Směs obou látek (hydroxypegaminu a acetoxypegaminu) jsme pak použili při pokusu o přípravu (*S*)-acetoxyvasicinonu, ve snaze získat vyšší výtěžek při intramolekulární cyklizaci. Směs obou látek jsme podrobili cyklizaci dle Mitsunobu v přítomnosti DEAD a PPh₃ (schéma 10). Vzniklý produkt jsme charakterizovali pomocí ¹H NMR spektroskopie a zjistili jsme, že se nejedná o (*S*)-acetoxyvasicinon, ale o (-)-vasicinon (**18**). Toto zjištění nás dále utvrdilo o značné nestabilitě acetoxyskupiny za uvedených podmínek. Výtěžek (-)-vasicinonu (**18**) se nám tímto způsobem zvýšit nepodařilo.

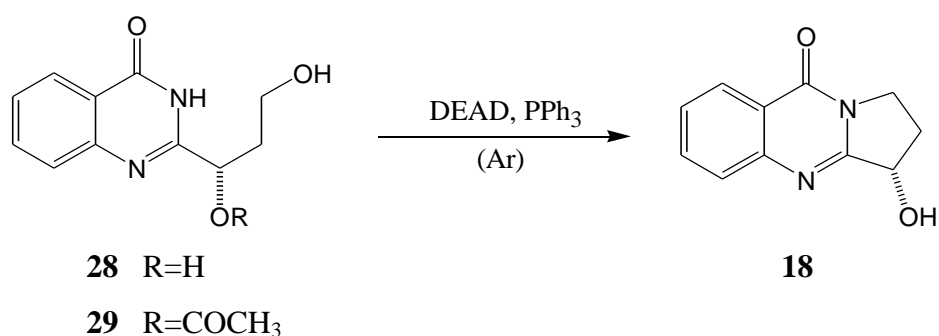


Schéma 10

3.2.7. Pokus o spontánní cyklizaci

Ze struktury kyseliny **26** plyne, že je v principu možné převést tuto látku na tricyklický produkt **32** dvojnásobnou dehydratací v jednom kroku. Pokusili jsme se proto dosáhnout této transformace varem s molekulovými síty (schéma 11). Předpokládali jsme, že dojde k dehydrataci kyseliny za vzniku meziproductu **30**, který izomerací přejde na druhý meziproduct **31**. Ten by podlehl další dehydrataci a došlo by k uzavření třetího cyklu za vzniku produktu **32** 2,3-dihydro-(3*S*)-acetoxo-1*H*,9*H*-

pyrrolo[2,1-b]chinazolin-1,9-dion. Na základě TLC chromatografie jsme zjistili, že v reakční směsi došlo k vymizení výchozí látky, a proto jsme provedli ^1H NMR analýzu, na základě které jsme zjistili, že se jedná o zcela neidentifikovatelnou reakční směs.

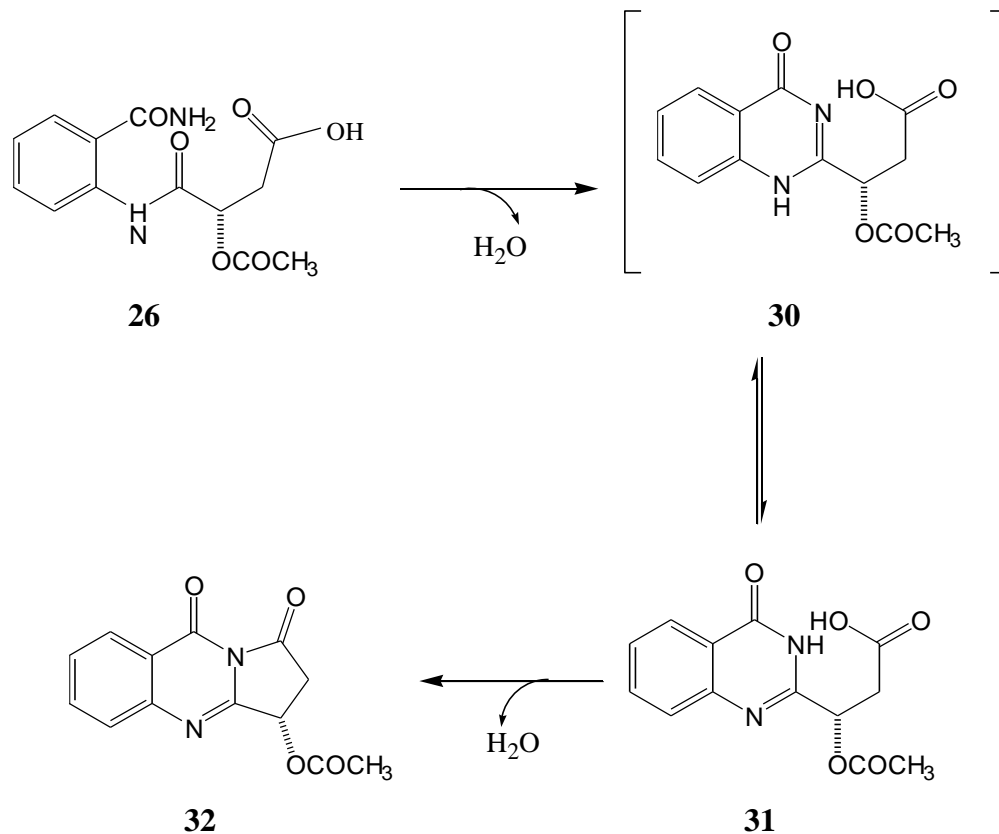


Schéma 11

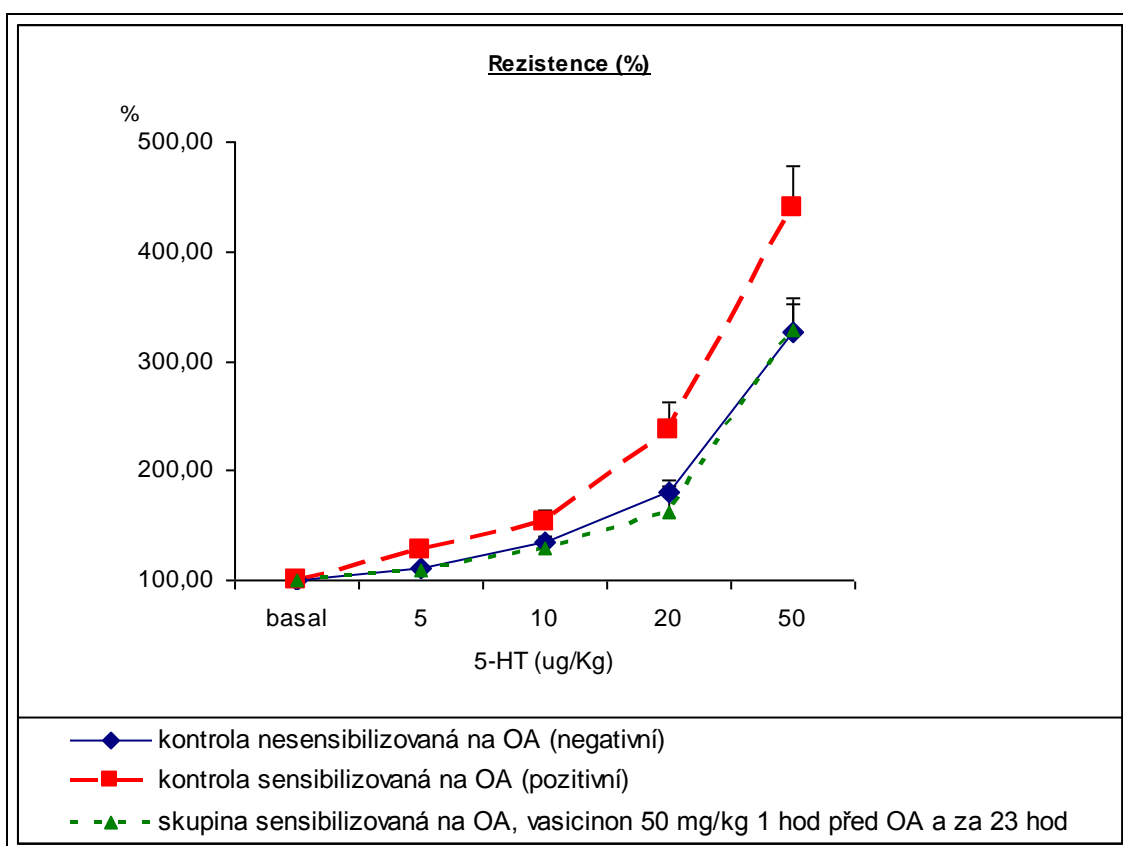
3.3. Předběžné farmakologické testy

Synteticky připravená látka **18** byla podrobena předběžným farmakologickým testům na katedře farmakologie a toxikologie. Byla provedena pilotní studie, ve které byly zkoumány účinky vasicinonu na modelu alergického astmatu (ovalbuminem aktivně senzitivizovaní potkani kmene Wistar, samci, 260 – 320 g) za 24 hodin po senzitivizaci antigenem. Byla stanovena reaktivita dýchacích cest na i.v. podaný bronchokonstriktor (5-HT, 5 – 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) a provedena analýza buněk v bronchoalveolární laváži (BALF). Vasicinon (50 mg.kg^{-1}) nebo vehikulum (kontrolní skupina) byly podávány žaludeční sondou 1 hodinu před senzitivizací antigenem a za 23

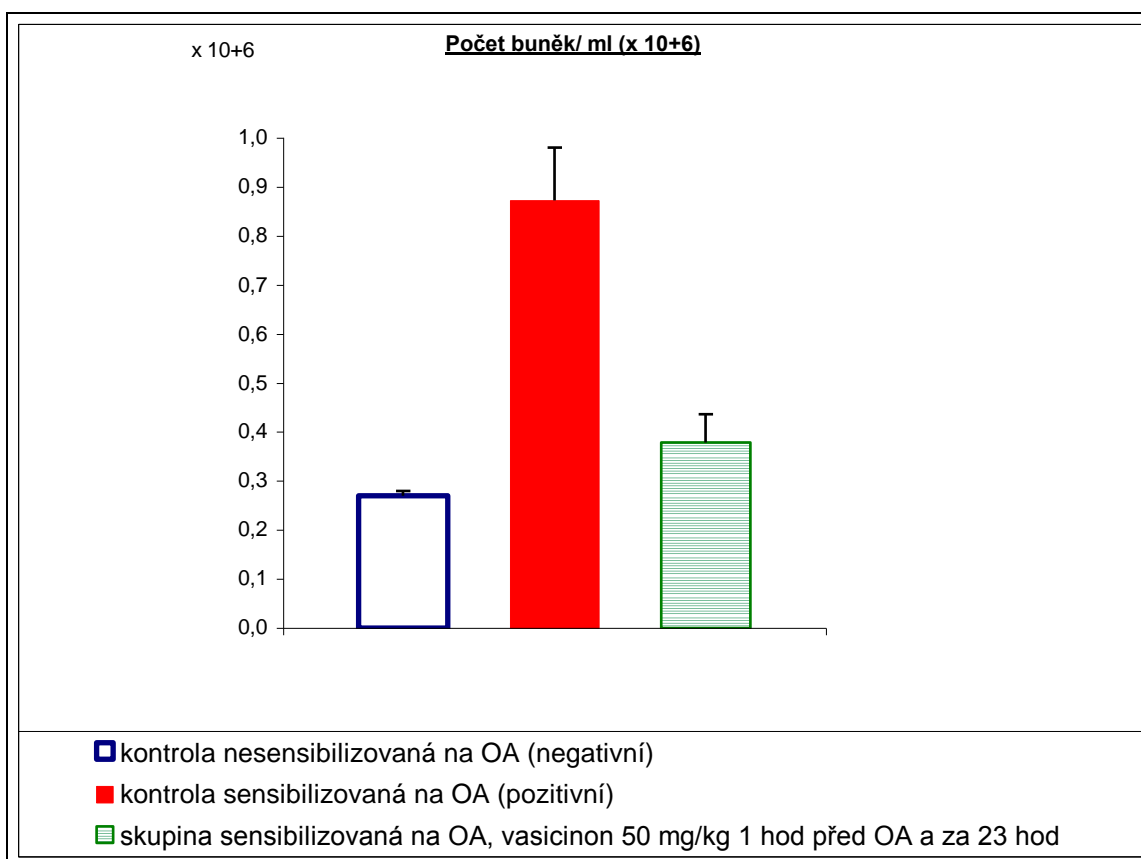
hodin po senzitivaci. Navození experimentálního astmatu bylo ověřeno histopatologickou analýzou plic. Vasicinon v tomto modelu astmatu:

- snížil reaktivitu dýchacích cest na serotonin (obr. 13)
- snížil významně infiltraci buněk do plic (obr. 14)
- snížil podíl buněk zánětu (neutrofilů a eozinofilů) v bronchoalveolární laváži (obr. 15).⁸

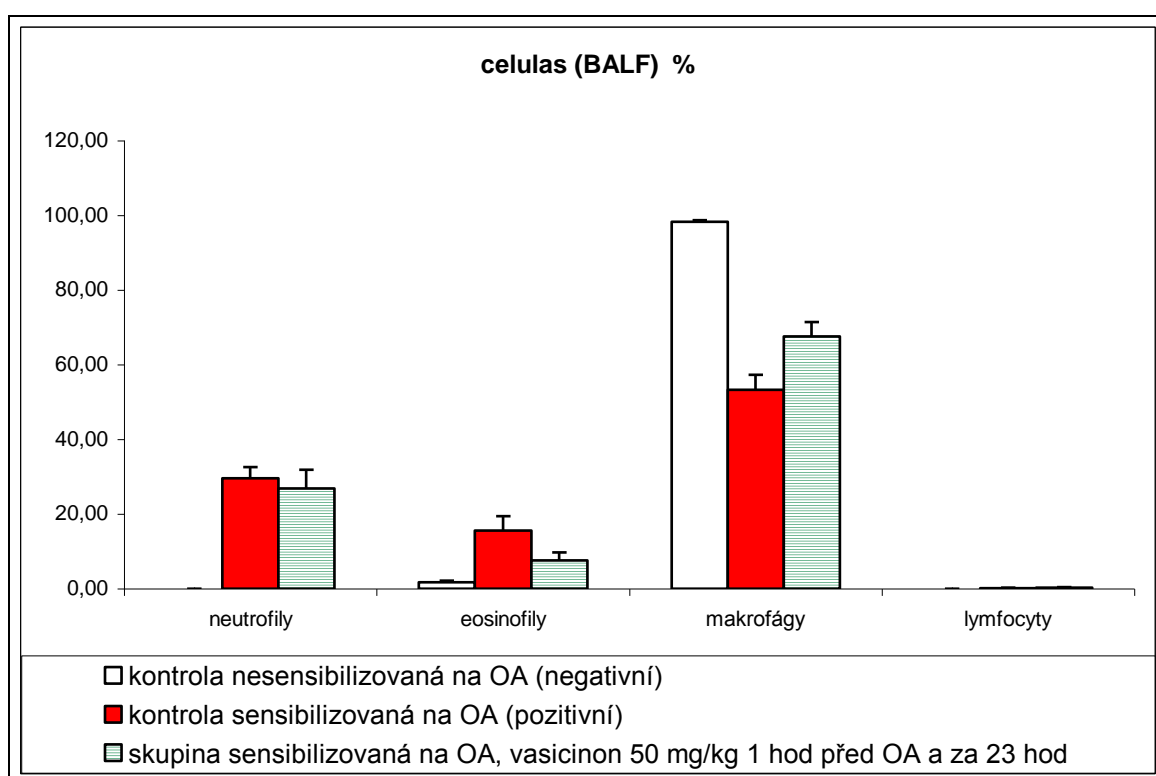
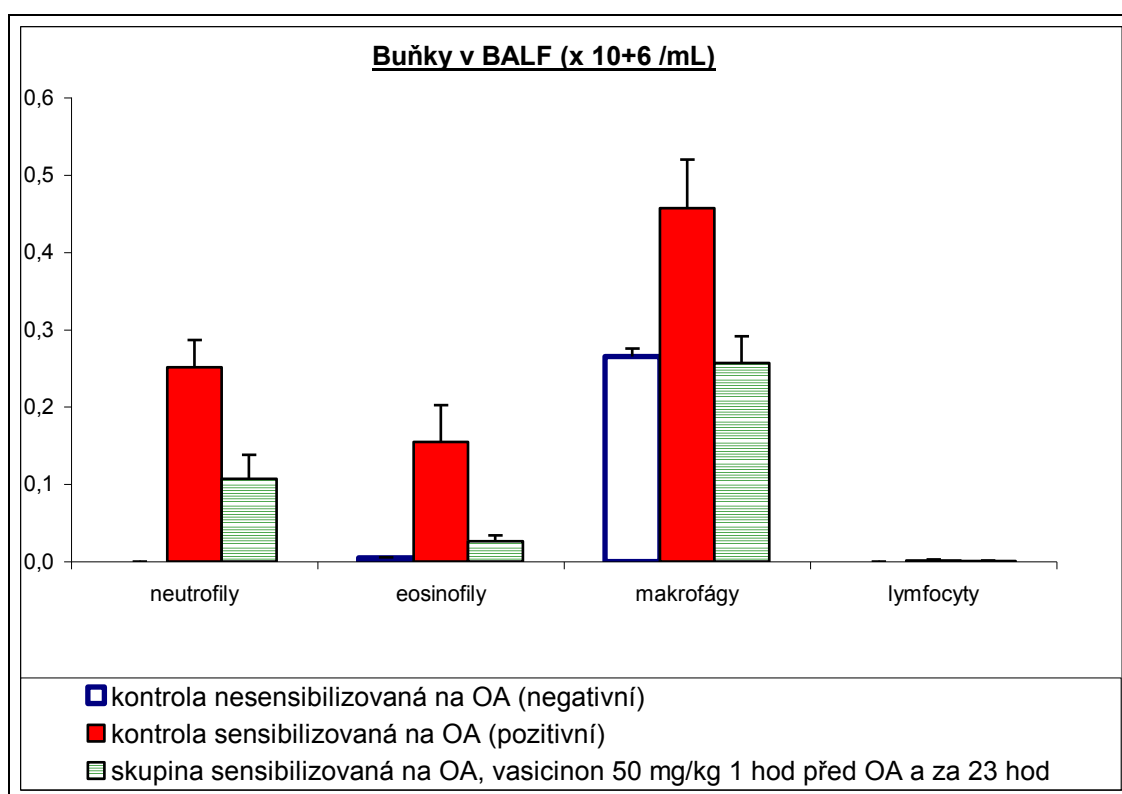
Obr. 13 Reaktivita dýchacích cest



Obr. 14 Počet buněk zánětu (celkem)



Obr. 15 Počet buněk v bronchoalveolární laváži



4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité experimentální postupy

Pro syntézu byly zakoupeny výchozí látky od firmy Sigma-Aldrich, a to kyselina (*S*)-jablečná a anthranilamid.

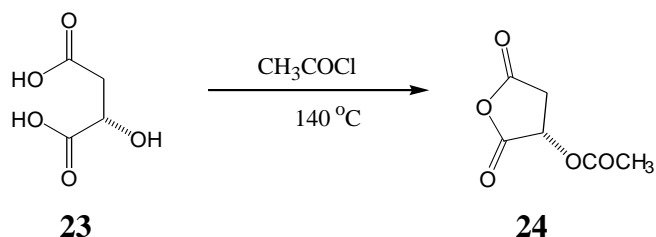
Teploty tání všech látek byly měřeny na Koflerově bloku. Měření IČ spekter bylo provedeno na přístroji NIKOLET IMPACT 400, u pevných látek v tabletách 400 mg KBr s 0.7 mg vzorku, u olejovitých látek v 0.25 ml CDCl_3 nebo CHCl_3 s 15 mg vzorku. NMR spektra všech látek byla měřena v roztoku CDCl_3 při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro ^1H a při 75 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v *parts per milion* (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7.26 pro ^1H a 77.00 pro ^{13}C). Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, qd: kvartet dubletů, bd: široký dublet, dd: dublet dubletů, m: multiplet), interakční konstanty (Hz) a přiřazení (v některých případech).

Konečné produkty syntéz byly čištěny sloupcovou chromatografií na Silicagelu 60 (Merck).

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na Silufolu UV 254 (Kavalier) s detekcí pod UV lampou a na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) s pomocí detekčního činidla $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 g), $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ (4 g), konc. H_2SO_4 (10 ml), H_2O (200 ml) a zahřátí.

4.2. Vlastní experimentální část

4.2.1. 2(S)-acetoxy-sukcinanhydrid

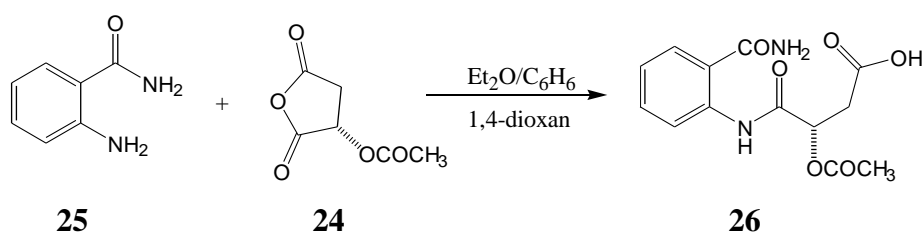


Pracovní postup:

Ke kyselině (*S*)-jablečné (**23**) (3.50 g, 26.1 mmol) jsem přidala acetylchlorid (15 ml). Vzniklou reakční směs jsem zahřála na 40°C a při této teplotě a za stálého míchání nechala reagovat 2 hodiny. Poté, co TLC analýza ukázala přechod výchozí látky na (*S*)-acetoxy-sukcinanhydrid (**24**), jsem reakční směs zpracovala a vzniklý produkt jsem použila do další reakce bez čištění.

Výtěžek: 3.70 g (88 %), bílá krystalická látka, t.t. 55.0°C ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.20 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 3.04 (1H, dd, $J_1=18\text{ Hz}$, $J_2=8\text{ Hz}$), 3.40 (1H, dd, $J_1=20\text{ Hz}$, $J_2=8\text{ Hz}$), 5.55 (1H, dd, $J_1=8\text{ Hz}$, $J_2=6\text{ Hz}$).

4.2.2. 3(S)-acetoxy-4-(2-karbamoylfenylamino)-4-oxobutanová kyselina



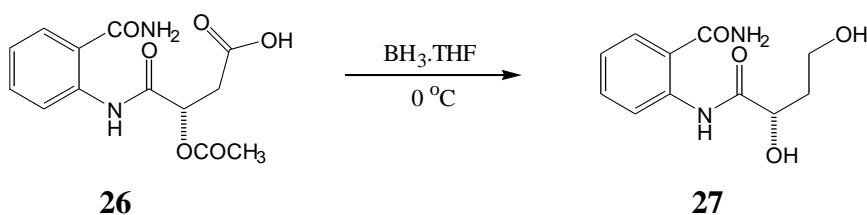
Pracovní postup:

Roztok anthranilamidu (**25**) (2.58 g, 18.9 mmol) ve směsi rozpouštědel benzenu (19 ml) a 1,4-dioxanu (9.5 ml) (2:1) jsem pomalu přidávala k roztoku anhydridu kyseliny jablečné (**24**) (3.00 g, 18.9 mmol) v diethyletheru (19 ml). Vzniklou reakční směs jsem za stálého míchání nechala probíhat za laboratorní teploty 2 hodiny. Po ukončení reakce jsem reakční směs zpracovala a vzniklý

produkt (**26**) jsem přečistila sloupcovou chromatografií na silikagelu (PE:EtOAc 1:1 až 3:7).

Výtěžek: 3.85 g (69 %), hnědá olejovitá kapalina; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.26 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.92 (1H, d, $J=6$ Hz), 2.95 (1H, d, $J=2$ Hz), 5.53 (1H, dd, $J_1=8$ Hz, $J_2=4$ Hz), 7.16 (1H, t, $J=8$ Hz), 7.49 (1H, t, $J=8$ Hz), 7.76 (1H, d, $J=8$ Hz), 8.51 (1H, d, $J=8$ Hz).

4.2.3. (S)-2-(2,4-dihydroxybutanamido)-benzamid

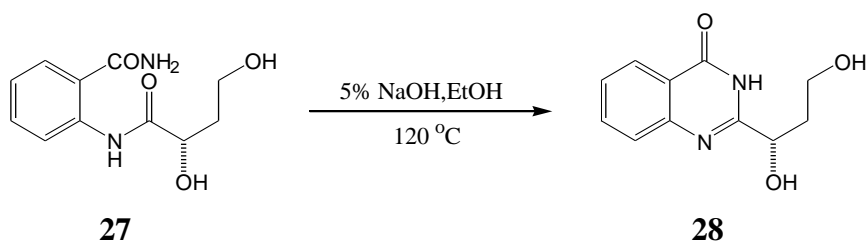


Pracovní postup:

K roztoku redukčního činidla ($\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$) (3.63 g, 21.255 mmol) v tetrahydrofuranu (10 ml) jsem pomalu po částech přidávala roztok kyseliny (**26**) (2.5 g, 8.49 mmol) v tetrahydrofuranu (20 ml) při 0 °C pod inertní atmosférou (Ar). Takto vzniklou reakční směs jsem nechala za stálého míchání a chlazení reagovat ještě 2 hodiny. Poté, co TLC analýza ukázala přechod výchozí kyseliny na primární alkohol, jsem reakční směs zpracovala a vzniklý produkt (**27**) jsem bez čištění použila do další reakce.

Výtěžek: 1.30 g (55 %), žlutá viskózní kapalina; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.55 – 1.65 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 3.70 (2H, t, $J=6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{OH}$), 4.15 – 4.25 (1H, m), 7.19 (1H, t, $J=8$ Hz), 7.50 (1H, d, $J=8$ Hz), 7.65 (1H, t, $J=8$ Hz), 8.52 (1H, d, $J=8$ Hz).

4.2.4. (S)-hydroypegamin

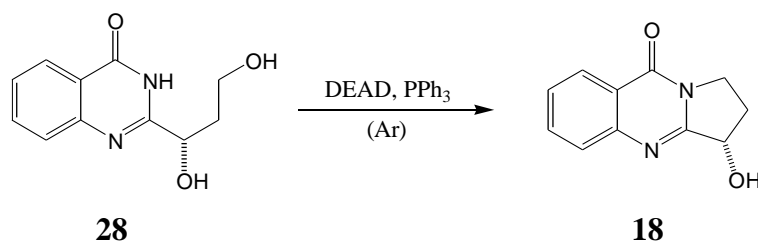


Pracovní postup:

Roztok primárního alkoholu (**27**) (1.0 g, 3.6 mmol) ve směsi rozpouštědel hydroxidu sodného (8.6 ml) a ethanolu (4.3 ml) (2:1) jsem za stálého míchání a zahřívání (120 °C) nechala reagovat po dobu 5 minut. Poté, co TLC analýza naznačila změnu primárního alkoholu na (*S*)-hydroxypegamin (**28**), jsem reakční směs po vychladnutí na laboratorní teplotu zpracovala pomocí nasyceného roztoku NaCl (10 ml) a EtOAc (10 ml) a vzniklý produkt jsem přečistila sloupcovou chromatografií na silikagelu (hexan:EtOAc 4:6 až 3:7).

Výtěžek: 0.50 g (63 %), žlutá krystalická látka, t.t. 134 – 136 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.85 – 2.25 (2H, m), 3.78 (2H, t, J=6 Hz, -CH₂-OH), 4.65 – 4.85 (1H, m), 7.49 (1H, t, J=8 Hz), 7.66 (1H, d, J=8 Hz), 7.79 (1H, t, J=8 Hz), 8.18 (1H, d, J=8 Hz).

4.2.5. (-)-vasicinon



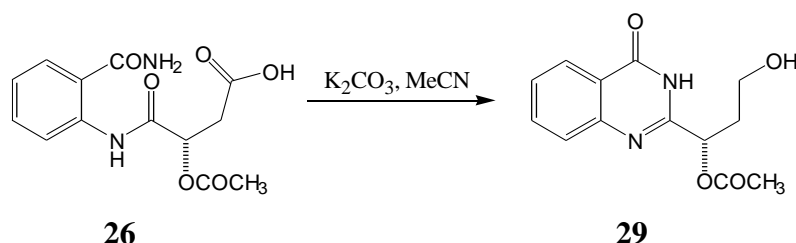
Pracovní postup:

K roztoku (*S*)-hydroxypegaminu (**28**) (0.50 g, 2.25 mmol) v tetrahydrofuranu (10 ml) jsem přidala trifenylofosfin (0.77 g, 2.94 mmol) a diethylazodikarboxylát (0.43 g, 2.48 mmol) pod inertní atmosférou (Ar). Reakční směs jsem nechala za stálého míchání při laboratorní teplotě reagovat 30 minut. Poté, co TLC analýza ukázala přechod výchozí látky na (-)-vasicinon (**18**), jsem reakční směs zpracovala a konečný produkt přečistila sloupcovou chromatografií na silikagelu (hexan:EtOAc 4:6).

Výtěžek: 0.21 g (45 %), bílá krystalická látka, t.t. 200 – 201 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.20 – 2.45 (1H, m), 2.60 – 2.80 (1H, m), 3.90 – 4.15 (1H, m), 4.30 – 4.50 (1H, m), 5.27 (1H, t, J=6 Hz), 7.40 – 7.60 (1H, m), 7.65 – 7.85 (2H, m), 8.13 (1H, d, J=6 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 29.4, 43.5, 72.0,

121.1, 126.7, 126.8, 126.9, 134.4, 148.6, 160.1, 160.6; **IR** (*Nujol*) ν_{\max} 3169, 1683, 1635, 1463 cm^{-1} .

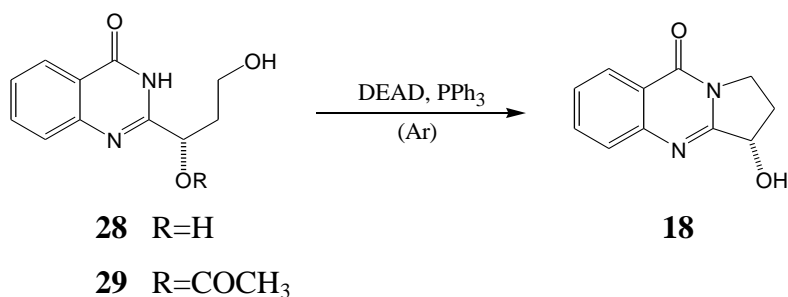
4.2.6. Pokus o přípravu (*S*)-acetoxypegaminu a (*S*)-acetoxyvasicinonu



Pracovní postup:

K roztoku kyseliny (**26**) (200 mg, 0.71 mmol) v acetonitrilu (5 ml) jsem přidala uhličitan draselný (176 mg, 1.78 mmol). Takto vzniklou reakční směs jsem zahřívala (85 – 90 °C) a reakci nechala probíhat 2 hodiny. Potom, co TLC analýza prokázala přechod výchozí látky v produkt, jsem reakci ukončila a po zchlazení na laboratorní teplotu jsem reakční směs zpracovala přidáním nasyceného roztoku NaCl (5 ml) a EtOAc (5 ml). Vzniklý produkt (**29**) jsem vyčistila sloupcovou chromatografií (hexan:EtOAc 75:25).

Výtěžek: 103 mg (55 %), žlutá krystalická látka; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) směs dvou látek (**28,29**).



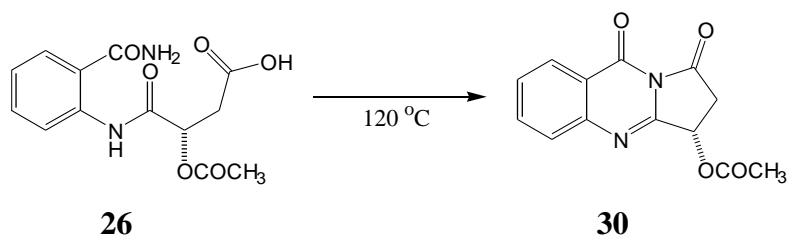
Pracovní postup:

K roztoku směsi (*S*)-hydroxypegaminu (**28**) a (*S*)-acetoxypegaminu (**29**) (86 mg, 0.328 mmol) v THF (2 ml) jsem přidala trifenylofosfin (112 mg, 0.426 mmol) a diethylazodikarboxylát (63 mg, 0.361 mmol) pod inertní atmosférou (Ar). Reakční směs jsem nechala za laboratorní teploty a stálého míchání reagovat

30 minut. Poté, co TLC analýza po 30 minutách prokázala úplný přechod obou výchozích látek na jediný produkt, jsem reakční směs zpracovala a vzniklý produkt jsem přečistila sloupcovou chromatografií (hexan:EtOAc 4:6).

Výtěžek: 38 mg (47 %), bílá krystalická látka, t.t. 200 – 201 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.20 – 2.45 (1H, m), 2.60 – 2.80 (1H, m), 3.90 – 4.15 (1H, m), 4.30 – 4.50 (1H, m), 5.27 (1H, t, $J=6$ Hz), 7.40 – 7.60 (1H, m), 7.65 – 7.85 (2H, m), 8.13 (1H, d, $J=6$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 29.4, 43.5, 72.0, 121.1, 126.7, 126.8, 126.9, 134.4, 148.6, 160.1, 160.6; **IR** (*Nujol*) ν_{max} 3169, 1683, 1635, 1463 cm^{-1} .

4.2.7. Spontánní cyklizace



Pracovní postup:

Roztok kyseliny (**26**) (250 mg, 0.85 mmol) v toluenu (5 ml) jsem zahřívala (120 °C) spolu s molekulovými síty po dobu 3 hodin pod inertní atmosférou (Ar). Poté co TLC analýza ukázala úplný přechod výchozí kyseliny na produkt, jsem reakci ukončila, reakční směs zpracovala a vzniklý produkt přečistila sloupcovou chromatografií (hexan:EtOAc 85:15).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) neidentifikovatelná látka.

5. ZÁVĚR

Úspěšně se nám podařilo modifikovat syntézu vasicinonu, a to použitím redukčního činidla boranového typu, které selektivně zredukovalo karboxylovou skupinu na primární alkohol. Tímto krokem se nám podařilo zkrátit syntézu vasicinonu (Argade a Mhaske⁷) o jeden krok.

S připravenou látkou byly provedeny základní farmakologické testy, které ukázaly, že vasicinon v modelu uměle navozeného astmatu snížil reaktivitu dýchacích cest, snížil infiltraci buněk do plic a snížil podíl buněk zánětu v bronchoalveolární laváži.

6. LITERATURA

1. Kašák V. *Asthma bronchiale*, Maxdorf, Praha **2005**
2. Špičák V., Kašák V., Pohunek P. *Globální strategie péče o astma a jeho prevenci*, ČIPA, Jalna, Praha **2003**
3. Fendrich Z. a kol. *Farmakologie pro farmaceuty I.*, Karolinum, Praha **2002**
4. Hartl J., Palát K., Doležal M., Miletín M., Opletalová V. *Farmaceutická chemie II/1*, Karolinum, Praha **1997**
5. Joshi B.S., Newton M.G., Lee D.W., Barker A.D., Pelletier S.W. *Tetrahedron Assymetry* **1996**, 7, 25-28 a odkazy tam uvedené
6. Claeson U.P., Malfors T., Sukman G., Bruhn J.G. *J. Ethnopharmacology* **2000**, 72, 1 - 20 a odkazy tam uvedené
7. Mhaske S. B., Argade N. P. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 9038 – 9040 a odkazy tam uvedené
8. Suchánková J. – osobní sdělení
9. Pour M. – osobní sdělení
10. Paleček J., Hampl F. *Farmakochemie*, VŠCHT, Praha **1997**
11. Cambridge G.W., Jansen A.B.A., Jarman D.A. *Nature* **1962**, 22, 1217 a odkazy tam uvedené
12. Johri R.K., Zutshi U. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **2000**, 44 (1), 75 – 81 a odkazy tam uvedené
13. Paliva J.K., Dwivedi A.K., Singh S., Gupta R.C. *Intern. J. Pharamac.* **2000**, 197 213 – 220 a odkazy tam uvedené
14. Carruthers W., Coldham I. *Modern Methods of Organic Synthesis*, Fourth edition, Cambridge **2004**
15. Fáková H. – nepublikované výsledky