

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Optimalizace syntézy 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-5,6-  
dihydro-2H-pyran-2-onu**

**Hradec Králové 2008**

**Ondřej Krenk**

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

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

# OBSAH

<b>OBSAH</b>	3
<b>ABSTRAKT</b>	5
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	6
<b>1. ÚVOD</b>	7
1.1. <b>Biologicky aktivní <math>\delta</math>-laktony</b>	7
1.2. <b>Biologicky aktivní analoga 5-alkenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onu</b>	8
1.2.1. CR 377	8
1.2.2. Dikelliková kyselina	8
1.2.3. Gelastatin	9
1.2.4. Podolaktony	9
1.3. <b>Biologicky aktivní analoga 5-alkyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onu</b>	10
1.3.1. Leptomycin B	10
1.3.2. Kalystatin A	11
1.3.3. Leptostatiny	11
1.3.4. Ratjadon	12
1.3.5. Leptofuraniny	12
1.3.6. Kazusamycin A	13
1.3.7. Bitungolidy	14
1.3.8. 2,3-anhydrodiskodermolid	14
1.3.9. Podoblastin	15
1.3.10. Pironetin	16
1.3.11. Aspyron	16
1.3.12. Skupina foslaktomycinů	17
1.3.13. Leustroduktiny	18
1.3.14. Fostriecin	18
1.4. <b>Biologicky aktivní analoga 5-alkyl-tetrahydropyran-2-onu</b>	19
1.4.1. Diskodermolid	19
1.4.2. Simplakton	20
1.4.3. Inhibitory HMG-CoA reduktázy	21
<b>2. MOŽNOSTI PŘÍPRAVY PENTENOLIDŮ</b>	22
2.1. Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených pentenolidů z hydroxykyselin	22
2.2. Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů aldolovou reakcí	25

2.3.	Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů hetero Diels-Alderovou reakcí	26
2.4.	Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů metathesí dienů (RCM reakce)	26
2.5.	Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů karbonylativní laktonizací	27
2.6.	Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů z cukrů	27
2.7.	Využití genového inženýrství	28
<b>3.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	29
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY S DISKUZÍ</b>	30
4.1.	Rozbor syntézy 5-hydroxy-3-(subst. fenyl)5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-2-onů	30
4.2.	Realizace syntézy 3,5-disubstituovaných pyranonů	30
4.3.	Optimalizace syntézy	32
4.3.1.	Plán A: ethyl 2,2 dimethyl-1,3-dioxan-5-karboxylát jako alkylační činidlo	33
4.3.2.	Plán B: 5-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan jako alkylační činidlo	34
4.3.3.	Další optimalizace	34
4.3.3.1.	Příprava methylesteru 4-bromfenylocotvé kyseliny	34
4.3.3.2.	Příprava 2,2-dimethyl-5-hydroxymethyl-1,3-dioxanu	35
4.3.3.3.	Zavádění dvojné vazby: oxidace selenidu	35
4.3.3.4.	Ochránění hydroxylové skupiny	36
4.3.3.5.	Odstranění chránicí skupiny	36
<b>5.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	37
5.1.	Použité experimentální metody	37
5.2.	Syntéza 5-hydroxymethyl-3-(4-bromfenyl)-5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-2-onu	38
5.2.1.	Esterifikace 4-bromfenylocotvé kyseliny	38
5.2.2.	Příprava alkylačního činidla (2,2-dimethyl-5-jodmethyl-1,3-dioxan)	39
5.2.2.1.	Příprava diethyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5,5-dikarboxylátu	39
5.2.2.2.	Příprava ethyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5,5-karboxylátu	40
5.2.2.3.	Příprava 2,2-dimethyl-5-hydroxymethyl-1,3-dioxanu	40
5.2.2.4.	Příprava 5-jodmethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxanu	41
5.2.2.5.	Alkylace 4-bromfenylocotvé kyseliny	41
5.2.2.6.	Cyklizace	42
5.2.2.7.	Ochránění hydroxylové skupiny	43
5.2.2.8.	Zavedení dvojné vazby do cyklu tetrahydropyran-2-onu	44
5.2.2.9.	Odstranění chránicí skupiny	46
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	48
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b>	49

## **ABSTRAKT**

Léčba rakoviny vyžaduje stálé hledání nových antineoplastik. Studie biologické aktivity přírodních látek ukázaly, že široké spektrum biologické aktivity vykazují látky s  $\alpha,\beta$ -nenasyceným- $\delta$ -laktonem. Vznikla řada syntéz přírodních analogů  $\alpha,\beta$ -nenasycených- $\delta$ -laktonů jako potencionálních biologicky aktivních látek. Tato práce se zabývá optimalizací syntézy 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-onu jako analogu biologicky aktivních přírodních látek s navazujícím biologickým hodnocením cytostatického účinku na buněčnou linii kolorektálního karcinomu. Získané poznatky by měly sloužit jako základ pro další návrhy jednodušší a ekonomičtější přípravy potencionálně biologicky aktivních analogů  $\alpha,\beta$ -nenasycených  $\delta$ -laktonů.

## **ABSTRAKT**

Treatment of cancer still requires searching of new antineoplastics. Studies of biological activity of natural products show, that wide spectrum of biological activity have  $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\delta$ -lactones as potential substance with cytostatic activity. Goal of this work is optimalization of synthesis of 3-(4-bromphenyl)-5-hydroxymethyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one as analogue of biologically active substance with potential cytostatic effect against cell line of colorectal carcinoma. Results obtained from this work can be employed in the development of simpler and more economical synthesis of potential biologically active analogues of  $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\delta$ -lactones.

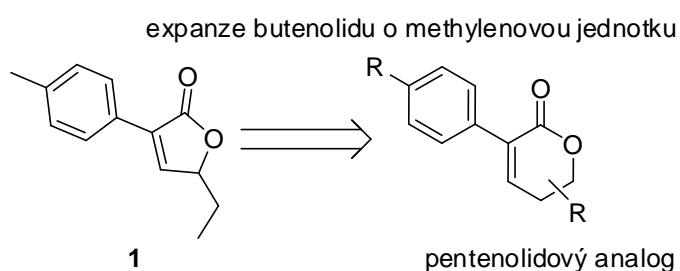
## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DHP	3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-2-on
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace
IR	infračervená spektroskopie
LDA	diisopropylamid lithný
LRMS	hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením
MCPBA	<i>m</i> -chlorperoxybenzoová kyselina
MS	hmotnostní spektroskopie
NMR	nukleární magnetická rezonance
Obr.	obrázek
PE	petrolether
PPTS	pyridinium- <i>p</i> -toluensulfonát
( <i>S,S</i> - A)	μ-oxo bis(bisnaftoxy)(isopropyl)titanium
TBSCl	<i>tert</i> -butyldimethylsilylchlorid
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TsCl	tosylchlorid
TsOH	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
t.t.	teplota tání

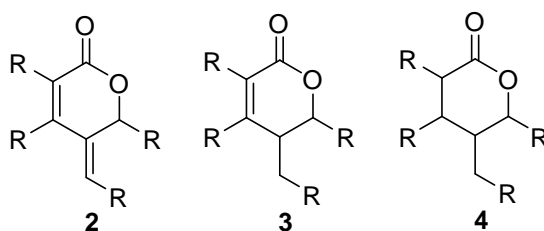
# 1. ÚVOD

## 1.1. Biologicky aktivní $\delta$ -laktony

Vznik a vývoj medicíny byl už od počátku lidstva závislý na terapeuticky účinných látkách získávaných z přírodních zdrojů. I v dnešní době, kdy na základě SAR studií lze teoreticky navrhnout nové struktury biologicky aktivních látek, je výzkum léčiv neodmyslitelně spojen s izolací potenciálně účinných látek z přírodních zdrojů. Například strukturální obměnami přírodního butenolidu inkrustoporinu (**1**) s antifugálním účinkem byly získány látky, srovnatelné s amfotericinem B *in vitro*<sup>1,2</sup>. Studie biologické aktivity analogických laktonů<sup>2</sup> ukázaly, že široké spektrum biologické aktivity vykazují rovněž látky s analogickým šestičlenným kruhem. Další krok obměny skeletu inkrustoporinu proto vedl k syntéze šestičlenných analog tj. 5,6-dihydro-2H-pyran-2-onů<sup>2</sup>.



Biologicky aktivní látky, založené na  $\delta$ -laktonovém skeletu lze rozdělit na několik strukturálních typů. (Obr. 1)

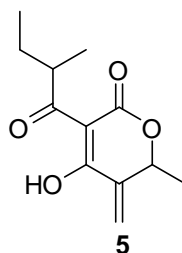


Obr. 1

## 1.2. Biologicky aktivní analoga 5-alkenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onu

### 1.2.1. CR 377

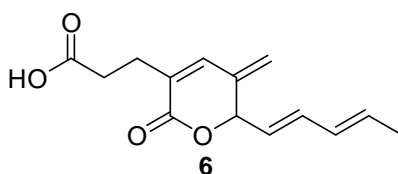
Vláknité houby jsou tradičně velmi bohatým zdrojem přírodních látek, které lze využít jako prototypy pro farmaceutická agens. Při systematickém screeningu antifugálně účinných látek byly shromážděny kultury endofytických hub, které byly podrobeny testům na antifugální aktivitu<sup>3</sup>. Tímto způsobem byla objevena látka CR 377 (**5**), která byla izolována z houby *Selaginella pallescens*, *Fusarium sp.*



Strukturně se jedná o šestičlenný lakton s exocyklickou dvojnou vazbou v poloze 5, konjugovanou s enonovým systémem. Ve srovnávacích testech byla porovnávána antifugální aktivita CR 377 s aktivitou nystatinu proti *Candida albicans*, druhům *wisconsin* a *109* a *Saccharomyces cerevisiae*. Třicet mikrogramů CR 377 produkuje inhibiční zóny o velikosti 20 a 24 mm proti *Candida albicans*, druhům *wisconsin* a *109*, zatímco 100 jednotek nystatinu (odpovídá množství 30 µg) produkuje inhibiční zóny o průměru 19 a 22 mm proti druhům *wisconsin* a *109*. Na kultuře *Saccharomyces cerevisiae* se inhibice růstu u CR 377 neprokázala<sup>3</sup>.

### 1.2.2. Dikelliková kyselina

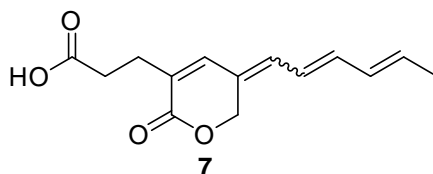
Izolací z houby *Westerdykella multispora* byla získána dikelliková kyselina<sup>4</sup> (**6**). Tato látka je výsledkem cíleného hledání inhibitorů apoptózy. S úspěchem se ukázalo, že tento šestičlenný lakton se systémem konjugovaných dvojných vazeb je účinným inhibitorem buněčné apoptózy u monocytární leukémie<sup>4</sup>.





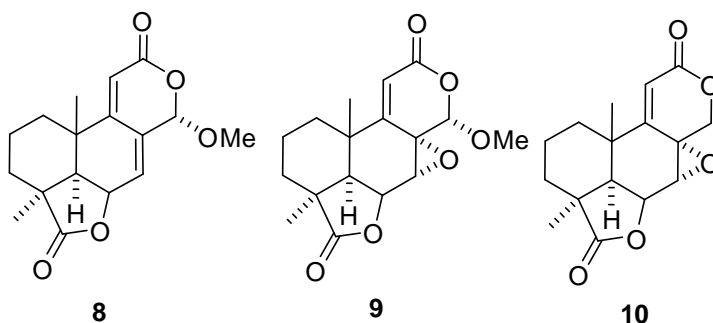
### 1.2.3. Gelastatin

Při výzkumu rakoviny byl ve tkáni tumoru a metastázujících buněk nalezen enzym gelatinasa A<sup>5</sup>. Tento enzym patří do velké rodiny Zn–dependentních matricových metaloproteáz, označovaných jako MMP. Gelatináza A (MMP-2) má schopnost štěpit jednu ze základních struktur bazálních membrán buněk – kolagen typu IV, a takto se uplatňovat v procesu invazivity a metastázování. V uskutečněném screeningovém programu na inhibitory gelatinasy A byla v roce 1997 získána z půdního vzorku houba *Westerdykella multispora* F50733. Z bujónové kultury této houby byl izolován inhibitor gelatinasy A gelastatin (7) jako směs dvou stereoisomerů E a Z (gelastatin A a gelastatin B). Možnost antineoplastického uplatnění gelastatinu naznačuje i objevení jeho inhibiční aktivity na enzym konvertující faktor TNF- $\alpha$ , který hraje důležitou roli u mnoha zánětlivých a degenerativních onemocnění, včetně roztroušené sklerózy, revmatoidní artritidy, mrtvice a v neposlední řadě v rozvoji metastáz a invazivity tumoru<sup>5</sup>.



### 1.2.4. Podolaktony

Podobné strukturální uspořádání<sup>6,7,8</sup> lze nalézt v polycyklických nor- nebo bisnorditerpenických sloučeninách – podolaktonech, např. LL-Z1271 $\alpha$  (8) a epoxidová analoga PR-1388 (9) a oidiolakton C (10), izolovaných z různých druhů rodu *Podocarpus* (Podocarpaceae). Můžeme sem zařadit také dilaktony, izolované z vláknitých hub<sup>7</sup> *Oidiodendrum truncatum*, *Aspergillus wentii* a *Acrostalamus* sp.

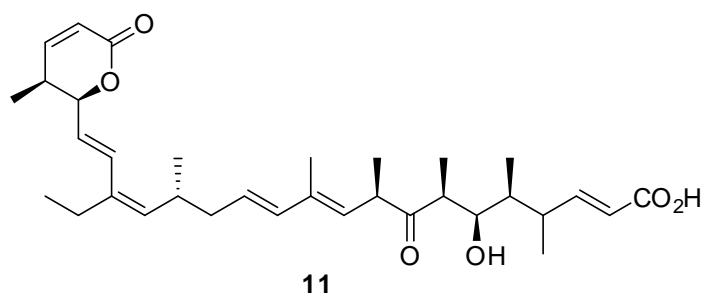


Tyto látky se vyznačují širokým spektrem biologických aktivit, které zahrnují antitumorózní<sup>6</sup>, insekticidní<sup>7</sup> a významné antifungální účinky<sup>8</sup>. U mnoha látek této skupiny byly publikovány výsledky stanovení jejich antifungální, antimikrobiální a cytotoxické aktivity, přičemž některé z nich vykazovaly významnou účinnost proti kvasinkám a cytotoxicitu. Nejvyšší aktivitu proti kvasinkám vykazovaly dieny dilaktonů (**8**) a na tomto základě Barrero a kol. vyslovili hypotézu, že dienolidové seskupení je nutnou podmínkou aktivity proti kvasinkám<sup>9</sup>. Tuto hypotézu podporuje i biologická aktivita CR 377 (**1**), jehož hlavní strukturní rys je identický.

### 1.3. Biologicky aktivní analoga 5-alkyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onu

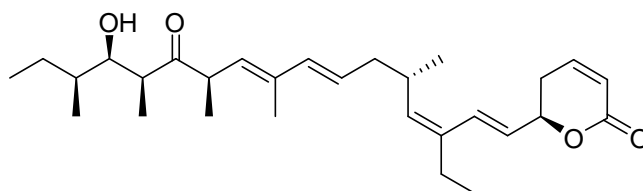
#### 1.3.1. Leptomycin B

Sekundární metabolity vznikající z acetylkoenzymu A Claisenovou kondenzací se nazývají polyketidy<sup>10</sup>. Jedná se o látky s uhlíkovým řetězcem obsahující dvojně vazby, karbonylové a hydroxylové skupiny<sup>11</sup>. Z praktického hlediska jsou známé rodiny polyketidů, které mají základní strukturní znaky společné. Látka izolovaná ze *Streptomyces spp.* původně jako antifungální antibiotikum, leptomycin B<sup>12</sup> (**11**), dala analogicky vzniknout rodině polyketidů – leptomycinů. Současné studie<sup>12</sup> biologické aktivity leptomycinu B (LMB) popisují antitumorózní aktivitu na myších experimentálních tumorech, zastavení buněčného cyklu v G1 fázi v savčích buňkách, v nanomolárním množství cytotoxicitu proti buňkám kolorektálního karcinomu HCT – 116 a indukci apoptózy u leukemických buněk U937<sup>12,13</sup>. Výzkum mechanismu indukce apoptózy ukazuje na snížení exprese inhibičních faktorů apoptózy Mlc – 1 a XIAP a aktivaci proapoptózních enzymů kaspáz<sup>12</sup>. Studie<sup>12,13</sup> prokazují úzké propojení mezi cytotoxicitou, indukci apoptózy a inhibicí buněčného cyklu v G1 fázi. Přesný mechanismus však není objasněn. Důležitou roli v těchto mechanismech hraje jaderný transport zprostředkovaný receptorem CRM1. LMB se specificky váže na CRM1 a inhibuje tak celulární transport proteinů a RNA z jádra do cytoplazmy. Díky této specifičnosti je LMB využíván také k podrobnějšímu pochopení mechanismu jaderného transportu<sup>12,13</sup>.



### 1.3.2. Kalystatin A

Do rodiny leptomycinů patří také biologicky aktivní kalystatin A<sup>14</sup> (**12**) izolovaný z mořské houby *Callyspongia truncata*. Jeho antineoplastický účinek (IC<sub>50</sub> = 0,01 ng/ml na buňky KB<sup>15</sup>, odvozené od karcinomu nosohltanu spočívá v inhibici NES sekvence (jaderný exportní signál), nezbytné pro aktivní transport proteinů z jádra do cytoplazmy. Inhibice nastává po vzniku kovalentní vazby mezi látkou a CRM1<sup>14</sup>.



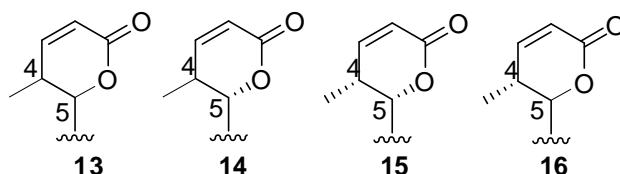
12

### 1.3.3. Leptostatiny

Současný výzkum látek rodiny leptomycinů je zaměřen na zkoumání vztahů struktura-aktivita (SAR). Studie aktivity kalystatinu A a jeho analog bez dvojné vazby v laktonovém kruhu ukázaly<sup>16</sup> dramatické snížení aktivity proti linii buněk KB. U analog leptomycinu s nasyceným laktonem byla pozorována nižší inhibiční aktivita růstu HeLa buněk. Analoga ratjadonu<sup>17</sup> (viz 1.3.4), u kterých byl odstraněn laktonový karbonyl ztratila aktivitu proti třem různým nádorovým buněčným liniím. Hypotéza $\alpha,\beta$  –nenasyceného laktonu jako farmakoforu lze úspěšně aplikovat na látky se stejným laktonem, ale nepatřících do rodiny leptomycinů. Výzkum<sup>13</sup> mechanismu účinku látek $\alpha,\beta$  –nenasyceným laktonem zjistil nezbytnost přítomnosti  $\alpha,\beta$ –nenasyceného laktonu jako místo Michaelovy adice cysteinových zbytků receptoru CRM1. Michaelovou adicí vzniká kovalentní vazba: látka – CRM1 receptor. Takto vzniklý komplex není schopen účastnit se transportu proteinů jádro – cytoplazma a buňka je uvedena do buněčného klidu. Nadějně výsledky výzkumu rodiny leptomycinu iniciovaly syntetický experiment zaměřený na přípravu látek s  $\alpha,\beta$ –nenasyceným laktonem totožným s laktonem leptomycinu a s polyketidovým řetězcem kalystatinu A. Výsledkem byly čtyři hybridní diastereomerní látky pojmenované jako leptostatiny 1–4 (**13-16**). Biologická aktivita těchto hybridů spolu s kalystatinem A byla testována na linii buněk kolorektálního karcinomu HCT–116. Přítomnost methylu na C4 se projevila signifikantní ztrátou aktivity. Až 1000krát menší aktivitu oproti kalystatinu A vykazuje leptostatin 4. Nejvyšší aktivitu vykazuje leptostatin 3, který má laktonový segment enantiomerní s leptomycinem B (**11**). V neposlední

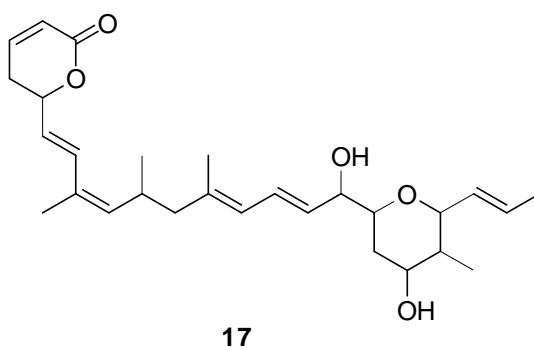
řadě provedené testování diastereomerů kalystatinu A a ratjadonu, u kterých je změněna konfigurace na C5 ukázalo snížení aktivity proti liniím KB a HEPG2. Z provedených studií je tedy zřejmé, že  $\alpha,\beta$  –nenasycený lakton je podmínkou pro cytotoxicitu, substituent v poloze C4 a konfigurace na C5 pak ovlivňují míru aktivity<sup>13</sup>.

4 stereomerní 4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-ony leptomycinu B



#### 1.3.4. Ratjadon

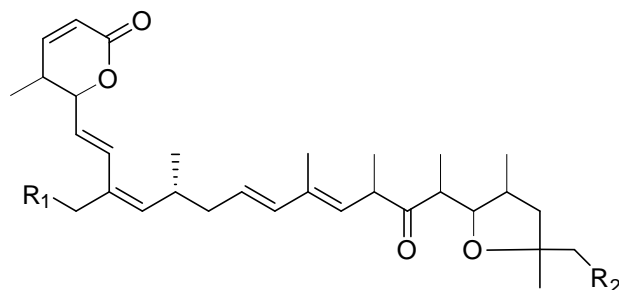
Látkám z rodiny leptomycinu je z hlediska biologického profilu i struktury podobný ratjadon<sup>18</sup> (17), izolovaný v roce 1994 z organismu *Sorangium cellulosum* získaného z půdního vzorku. Ratjadon vykazuje vysokou cytotoxicitu u kultivovaných myších buněk ( $IC_{50} = 50$  pg/ml) a inhibici růstu linie HeLa buněk ( $IC_{50} = 40$  pg/ml). Kromě slibné cytotoxicity vykazuje ratjadon úzké spektrum antifugální aktivity (MIC = 0.04-0.6  $\mu$ g/ml u *Mucor hiemalis*, *Hythophthora drechsleri*, *Ceratocystis ulmi* a *Monila brunnea*). I přes slibné biologické vlastnosti a provedení totální syntézy není mechanismus účinku ratjadonu ani cílové buněčné struktury plně objasněny<sup>18</sup>.



#### 1.3.5. Leptofuraniny

Do obsáhlé rodiny polyketidů patří i čtyři struktury označované jako leptofuraniny A–D (18-21). Tyto strukturně velice blízké látky byly izolovány<sup>19</sup> z houby *Streptomyces*

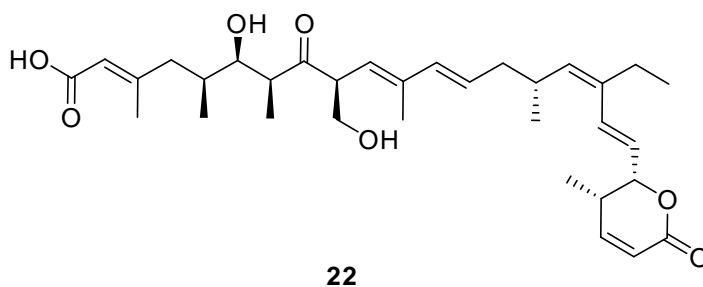
*tanashiensis*. Jejich antineoplastické spektrum je poměrně široké. Uvádí se indukce<sup>19</sup> apoptózy u HeLa buněk cervikálního nádoru, u Saos 2 buněk osteosarkomu a apoptóza buněk transformovaných adenovirem E1A<sup>19</sup>.



- 18 leptofuranin A,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = CH_2OH$   
 19 leptofuranin B,  $R^1 = CH_3$ ,  $R^2 = CH_2OH$   
 20 leptofuranin C,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = CHO$   
 21 leptofuranin D,  $R^1 = CH_3$ ,  $R^2 = CHO$

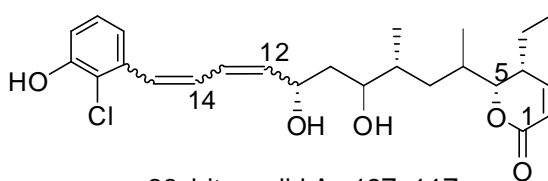
### 1.3.6. Kazusamycin A

Poměrně širokou cytostatickou aktivitu vykazuje opět přírodní produkt<sup>20</sup> získaný izolací z bujónové kultury hub druhů actinomycet kazusamycin A (**22**). Vykazuje antitumorózní aktivitu u leukémie, sarkomu a inhibuje růst HeLa buněk (MIC = 3.3 ng/ml). Projevuje inhibiční aktivitu<sup>20</sup> na translokaci Rev proteinu z jádra do cytoplazmy. Rev protein hraje hlavní roli v expresi HIV proteinů tím že kontroluje míru přenosu mRNA<sup>21</sup>, inhibice Rev proteinu tak může být užitečně využita v terapii HIV. Kazusamycin A vykazuje také antimikrobiální aktivitu<sup>20</sup>.

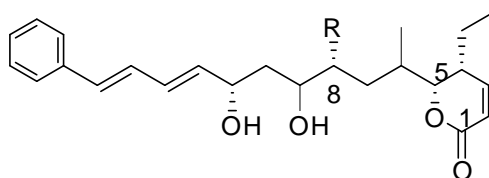


### 1.3.7. Bitungolidy

Mořská houba *Theonella swinhoei* je ceněna pro produkci širokého spektra zajímavě biologicky aktivních látek. V roce 2002 byla z této houby izolována série polyketidů<sup>22</sup> pojmenovaných bitungolidy A–F (**23–28**). Bitungolidy vykazují cytotoxický efekt proti normálním krysím 3Y1 fibroblastům (MIC = 10 µg/ml) a slabě inhibují fosfatázu VHR<sup>22</sup>.



23 bitungolid A : 12Z, 14Z  
24 bitungolid B : 12E, 14E  
25 bitungolid C : 12Z, 14E  
26 bitungolid D : 12E, 14Z

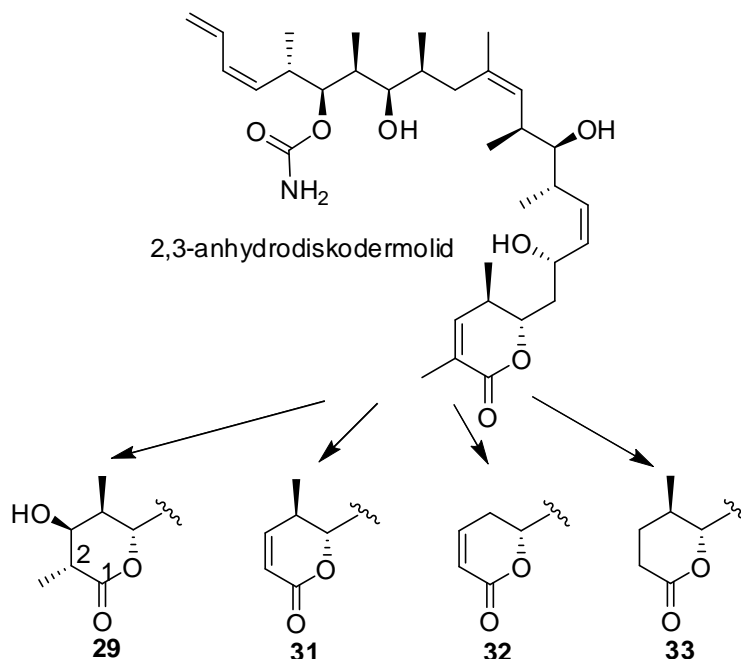


27 bitungolid E : R = Me  
28 bitungolid F : R = H

### 1.3.8. 2,3-anhydrodiskodermolid

Z hlubinné mořské houby *Discodermia dissoluta* byla izolována<sup>23</sup> antimitoticky aktivní látka diskodermolid (**29**). Mechanismus antimitotického účinku<sup>23</sup> spočívá ve vázání a stabilizaci mikrotubulů, což vede k mitotickému klidu a buněčné smrti. Tento mechanismus je příbuzný klinicky používanému antineoplastiku taxolu. Cytotoxický potenciál diskodermolidu vedl k syntéze analogů s úmyslem využití v klinických testech. Vznikla tak série<sup>24</sup> různě obměněných struktur diskodermolidu, které vykazovaly větší či menší aktivitu než diskodermolid. Z pohledu struktury je relevantní aktivnější 2,3-anhydrodiskodermolid (**30**), který vznikl zavedením dvojné vazby do polohy 2 a odstraněním hydroxyly v poloze 3. Na základě této syntézy vznikla hypotéza, že substituenty na laktonovém kruhu nejsou rozhodující pro aktivitu. Tato hypotéza byla potvrzena syntézou 2- a 2,4-dinormethyl-2,3-anhydrodiskodermolidů (**31**, **32**), které dokonce prokázaly zlepšení aktivity. Taktéž bylo zjištěno, že nasycení laktonového kruhu ve struktuře (**33**) nevede k dramatické změně

aktivity. Porovnání cytotoxicity bylo provedeno na buněčné linii MCF-7 (viz. tab. 1). Látky **31** a **33** byly vybrány pro *in vivo* studie<sup>24</sup>.

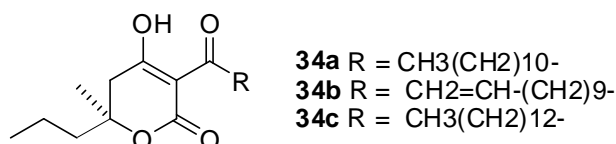


tab. 1

	cytotoxická aktivita IC <sub>50</sub> (nM)				
analog	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>
MCF-7	28	5.6	2.1	3.2	2.7

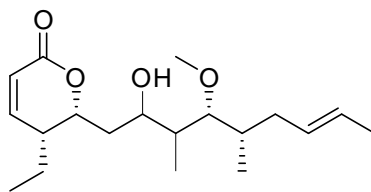
### 1.3.9. Podoblastin

Antifugálně aktivní látka podoblastin<sup>25</sup> (**34a-c**), izolovaná z *Podophyllum peltatum* jako směs tří 3-acyl-4-hydroxyl-5,6-dihydro-pyran-2-onů vykazuje dobrou účinnost proti *Pyricularia oryzae* Cav.<sup>19</sup> Houba *Pyricularia oryzae* je parazit travin a způsobuje jedno z nejdůležitějších onemocnění rýže<sup>26</sup>. Přírodní směs tvořená podoblastinem A (**34a**), B (**34b**) a C (**34c**) v poměru A:B:C = 32:50:18 inhibuje 84% infikované plochy při koncentraci 100 µg/ml. Syntetický podoblastin B pak vykazuje inhibici 85% plochy při poloviční koncentraci, tj. 50 µg/ml<sup>25</sup>.



### 1.3.10. Pironetin

Kratší polyketidický řetězec obsahuje látka PA-48153<sup>27</sup>, která byla velice ceněna pro svůj imunopresivní účinek. Nezávisle na objevení látky PA-48153, byl objeven rostlinný růstový regulátor pironetin<sup>27</sup> (**35**). Následně se ukázalo, že obě látky jsou identické. Pironetin byl izolován z *Streptomyces prunicolor* a vykazoval imunopresivní aktivitu podobnou cyklosporinu A (CsA) a takrolimusu (kódové označení FK-506). Zatímco mechanismus působení CsA a FK-506 vede k inhibici proliferace cytotoxických T lymfocytů, pironetin inhibuje T i B lymfocyty. Předpokládalo se tedy, že se nová přírodní látka zařadí vedle CsA a FK-506 v léčbě autoimunitních onemocnění, především při posttransplantačním odmítnutí orgánů. Bohužel, studie *in vivo* prokázaly vysokou toxicitu<sup>28</sup>.

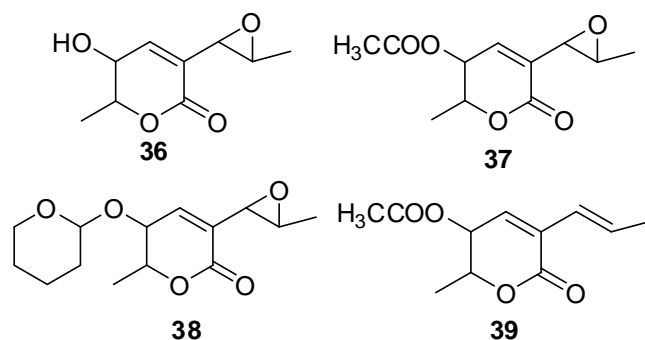


**35**

### 1.3.11. Aspyron

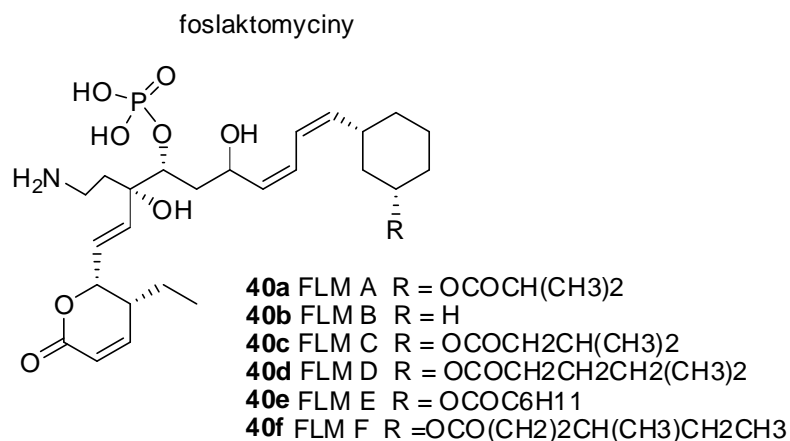
Aspyron<sup>29</sup> (**36**) je fungicidně a baktericidně aktivní sekundární metabolit izolovaný z *Aspergillus ochraceus*. Aspyron a jeho deriváty byly zkoušeny v testech<sup>29</sup> na antifugální a antibakteriální aktivitu. Antifugálně účinkuje nejvíce proti *Helminthosporium monoceras* (83 % kolonie při dávce 20 µg/ml), u bakterií se inhibiční účinek (MIC) projevuje např. u *E. coli* 100 µg/ml, *Pseudomonas testosteroni* 200 µg/ml, *Bacillus subtilis* H17 100 µg/ml a *Staphylococcus aureus* 200 µg/ml. Deriváty (**37-39**) v porovnání s aspyronem nemají lepší aktivitu<sup>29</sup>, dokonce derivát (**39**) ztrácí aktivitu u většiny vnímavých mikroorganismů. Tento výsledek vede k závěru, že epoxidová skupina je nezbytná pro antifugální i antibakteriální účinek aspyronu a jeho analog<sup>29</sup>.





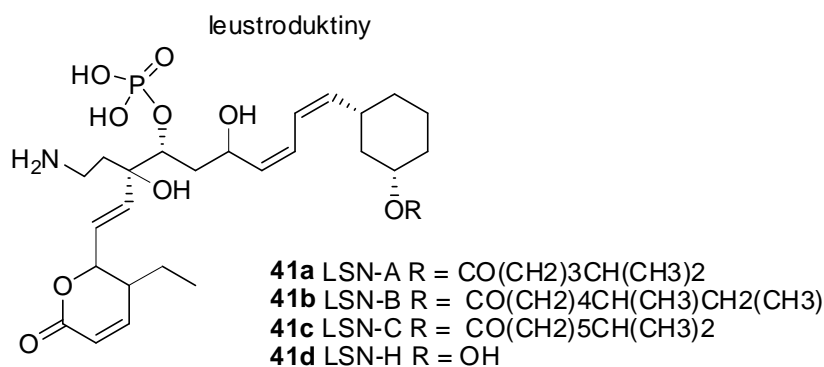
### 1.3.12. Skupina foslaktomycinů (40a-f)

Ze *Streptomyces sp.* byla izolována série<sup>30</sup> nových antitumorózních polyketidů foslaktomycinů (FLM, **40**) obsahujících ve své struktuře ester kyseliny fosforečné. FLMs daly vzniknout skupině přírodních látek s esterem kys. fosforečné, do které patří strukturně velmi podobné leustroduktiny a fostriecin, který oproti FLMs neobsahuje aminoethylový zbytek na C8 a terminální cyklohexyl. Foslaktomyciny vykazují širokou biologickou aktivitu<sup>30</sup>, zahrnující antifungální, antivirovou a cytotoxickou aktivitu. Mechanismus účinku spočívá ve vysoce selektivní inhibici fosfatázy PP2A ( $IC_{50} = 3,7-5,8 \mu M$ ) a v menší míře fosfatázy PP1 ( $IC_{50} > 1 mM$ ). Současný výzkum prezentuje PP2A jako agens regulující buněčnou smrt apoptózou, mající roli v aktivaci NK (natural killer) buněk a cytotoxických T-lymfocytů a také ovlivňující transkripci a replikaci HIV 1 (lidský imunodeficientní vir 1). Látky ze skupiny foslaktomycinů jsou pro svoji vlastnost selektivně inhibovat PP2A považovány za nadějnou třídu potenciálních antineoplastických a antivirových látek. Foslaktomycin E v *in vitro* testech vykazuje inhibici růstu *Aspergillus fumigatus* jako důsledek inhibice 1,3-glukan syntázy<sup>30</sup>.



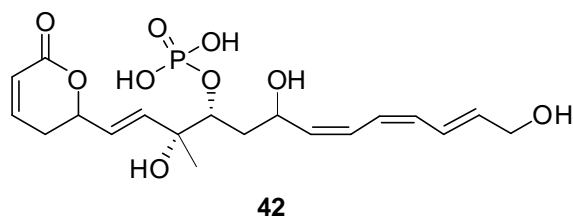
### 1.3.13. Leustroduktiny (41a-d)

Další struktury obsahující ester kys. fosforečné, leustroduktiny (LSN, **41**) byly izolovány<sup>31</sup> z bujónové kultury *Streptomyces platensis* v rámci screeningového programu zaměřeného na hledání aktivátorů produkce faktoru CSF. Tyto látky patří do tzv. rodiny foslaktomycinů (FLM), od kterých se liší pouze jiným acylem, vazaným na terminální cyklohexyl. LSN v testech potvrdily<sup>31</sup> předpokládaný účinek indukovat produkci CSF, což jsou růstové faktory, které řídí celoživotní sebeobnovu krvetvorných kmenových buněk v kostní dřeni a proliferaci zárodečných buněk jednotlivých vývojových řad<sup>32</sup> LSN-B a LSN-H ukázaly<sup>31</sup> v *in vivo* pokusech srovnatelnou aktivitu. LSN-H má potenciál stát se novým léčivem hematologických poruch a lze ho také prakticky využít při studiích mechanismu hematopoézy v kostní dřeni<sup>31</sup>.



### 1.3.14. Fostriecin

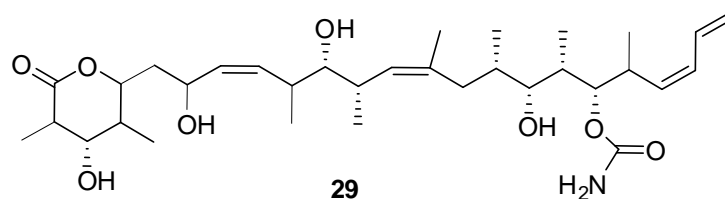
Vstah mezi cytotoxicitou a přítomností $\alpha,\beta$  -nenasyceného laktonu byla testována<sup>30</sup> i na polyketidu fostriecinu (**42**) izolovaného<sup>30</sup> z *Streptomyces pulveraceus* subsp. *fostreus*. I na této přírodní látce byla potvrzena nezbytnost přítomnosti nenasyceného laktonu pro cytotoxický účinek. Po zavedení nasyceného<sup>13</sup> laktonového cyklu klesla aktivita fostriecinu dvěstěkrát. Fostriecin vykazuje široké spektrum účinku proti buňkám tumoru *in vitro* a vysokou *in vivo* aktivitu proti leukemickým buňkám, rakovině plic, prsu a vaječníků. Mechanismus účinku spočívá v inhibici DNA topoisomerázy II (IC<sub>50</sub> = 140nM), inhibici fosfatázy 2A (IC<sub>50</sub> = 1,5 nM), a fosfatázy 1 (IC<sub>50</sub> = 45nM). Nadějně se fostriecin ukazuje jako látka limitující rozsah infarktu myokardu a protektivně působící na kardiomyocyty během ischemie. Současně je fostriecin v 1. fázi klinických studií<sup>30</sup>.

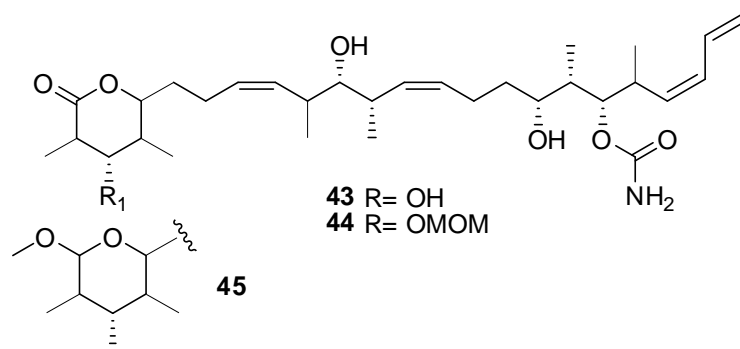


## 1.4. Biologicky aktivní analoga 5-alkyl-tetrahydropyran-2-onu

### 1.4.1. Diskodermolid

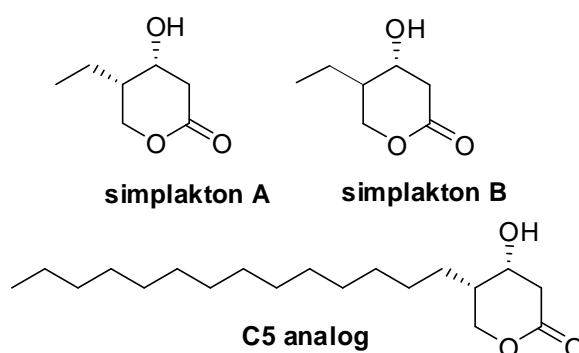
Z hlubinné mořské houby *Discodermia dissoluta* byla izolována<sup>23</sup> antimitoticky aktivní látka diskodermolid (**29**) obsahující nasycený  $\delta$ -lakton, na který je navázán polyketidový řetězec. V *in vitro* pokusech vykazuje diskodermolid schopnost stabilizovat mikrotubuly silněji než paklitaxel. Slibná antineoplastická aktivita diskodermolidu iniciovala syntézu série analog<sup>30</sup>, která se měla stát potenciálně aktivnější a zároveň byla podrobena SAR studii. Bohužel, žádný derivát neprokázal zlepšení aktivity. Studie SAR ověřila některé hypotézy, ale nepřispěla k celkovému porozumění vztahu struktura – aktivita. Tři látky (**43-45**), které mají nejbližší k aktivitě mateřské látky jsou strukturně 4-epi-7-dehydroxy-14,16-didemethyl analoga. U látek byl záměrně prodloužen řetězec na C3 uhlíku laktonového cyklu pomocí MOM (methoxymethyl) za vzniku etheru. U všech tří byl cíleně odstraněn hydroxyl z polohy C7 a metyly z uhlíků 14 a 16. Biologické studie<sup>32</sup> těchto analog provedené na rakovinových buňkách prsu, prostaty, vaječníku a hovězím tubulinu ověřily, že tyto substituenty mohou být eliminovány bez ztráty aktivity. Analog **44** s methoxymethyl etherem na C3 vykazuje lepší antiproliferační aktivitu a stabilizaci tubulinu než analoga **43** a **45**. Myšlenku, že prodloužený C3 řetězec napomáhá udržet prostorově blízkou polohu laktonu s terminálním karbamátem, podporují výsledky biologických testů, v kterých jsou analoga **44** a **45** aktivnější než analog **43**<sup>33,34,35</sup>.





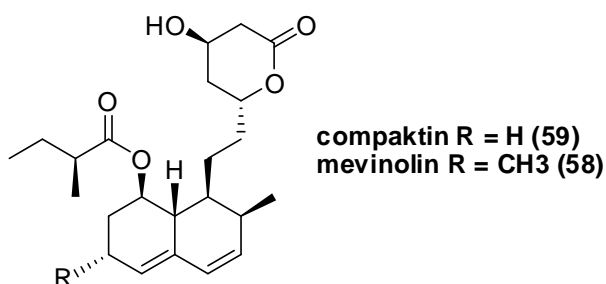
### 1.4.2. Simplakton

Jednoduché simplaktony A a B (**55**, **56**), vykazující cytotoxickou aktivitu *in vitro*, byly izolovány<sup>36</sup> z karibské mořské houby *Plakortis simplex*. *In vitro* vykazuje cytotoxickou aktivitu. Strukturně se jedná o dva diastereomery (4*R*,5*S*)-5-ethyl-4-hydroxytetrahydropyran-2-on a (4*R*,5*R*)-5-ethyl-4-hydroxytetrahydropyran-2-on. Při syntéze analog<sup>36</sup> simplaktonu byl připraven tzv. C5-analog (**57**). Při testech cytotoxicity na buněčné linii rakoviny plic vykazuje C5 analog aktivitu  $IC_{50} = 0.176 \mu\text{M}$ , zatímco mateřský lakton neprojevil významný účinek<sup>36</sup>.



### 1.4.3. Inhibitory HMG-CoA reductázy

Mevinolin (**58**) je metabolit izolovaný<sup>37</sup> z houby *Aspergillus terreus*. Látka je v praxi používána<sup>37</sup> pod názvem lovastatin jako úspěšný inhibitor syntézy cholesterolu. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy kyseliny nebalonové na úrovni enzymu HMG-CoA reductázy. Mevinolin a jeho 6-demethyl derivát kompaktin (**59**, mevastatin) jsou kompetitivní inhibitory HMG-CoA reductázy. Po perorálním užití dochází v játrech k vytvoření vlastní účinné látky otevřením laktonového kruhu<sup>37</sup>.



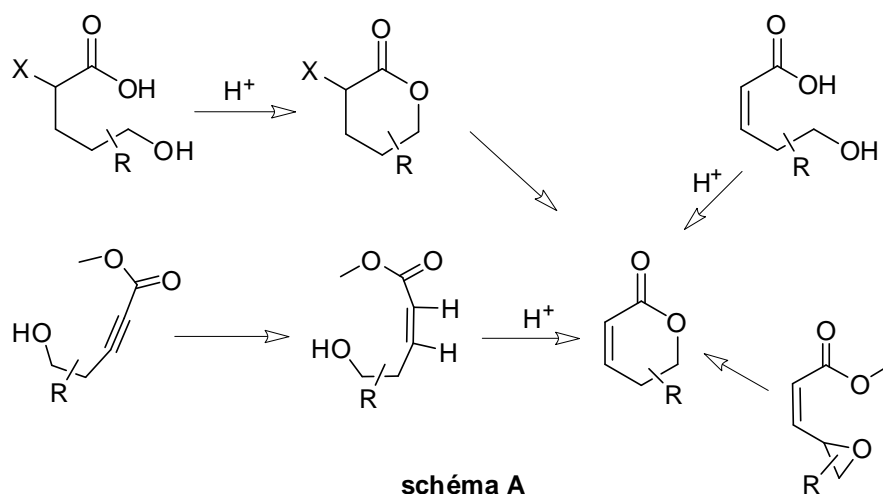
## 2. MOŽNOSTI SYNTÉZY PENTENOLIDŮ

Přírodní látky obsahující ve struktuře  $\delta$ -lakton jsou pro své rozmanité biologické účinky již několik desetiletí v popředí zájmu. Výzkum biologické aktivity, struktur a syntézy těchto látek vedl k několika obecným postupům syntézy pentenolidů. Syntéza se solidním výtěžkem a použitím na různá analoga  $\delta$ -laktonů usnadňuje následný výzkum biologické aktivity, SAR studie a vývoj aktivnějších látek.

Nejsnadnější cestu k  $\alpha,\beta$ -nenasyceným laktonům poskytuje cyklizace  $\delta$ -hydroxykyselin nebo jejich esterů, které lze připravit mnoha způsoby. Z modernějších postupů lze zmínit aldolové reakce, Diels-Alderovy reakce, metathese dienů, karbonylativní laktonizace a transformace některých cukrů. V odvětví biotechnologií se využívá genové inženýrství.

### Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených pentenolidů z hydroxykyselin

Jako výchozí látky lze v principu použít nasycené  $\delta$ -hydroxykyseliny nebo jejich estery, u kterých se po laktonizaci zavede dvojná vazba. Dle substituce na uhlíkovém řetězci hydroxykyseliny vznikají různě substituované laktony. Dalšími výchozími látkami jsou  $\alpha,\beta$ -nenasycené hydroxykyseliny, u kterých konfigurace na dvojně vazbě umožňuje vznik laktonu, deriváty kyseliny propiolové, u nichž redukcí trojně vazby připravíme alkenový meziprodukt, který za vhodných podmínek podléhá cyklizaci,  $\beta$ -diketoestery, které po redukcí oxo skupiny poskytují vhodné  $\delta$ -hydroxykyseliny a epoxidy, které otevřením oxiranového kruhu umožňují laktonizaci (obecně schéma A). Proces cyklizace je iniciován kyselým prostředím např. *p*-toluensulfonovou kyselinou v nepolárním rozpouštědle nebo  $H_2SO_4$ , přičemž použití silně kyselých podmínek zpravidla vede i k eliminaci<sup>38,39</sup>. Všechny tyto postupy lze demonstrovat následujícími příklady publikovanými v poslední době.



Schiller připravil sérii analogů 3,5-disubstituovaných-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-onů<sup>40</sup>. Jako výchozí látku použil deriváty methylesteru kyseliny propionové. Laktonizace byla katalyzována kyselou pryskyřicí Dowex 50.

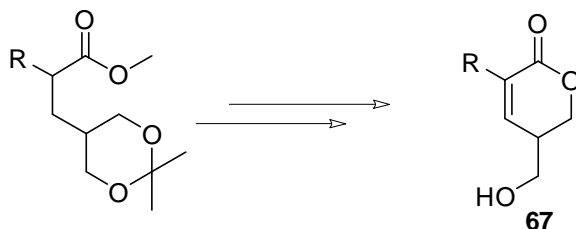


schéma 1

Příkladem přípravy nenasyceného pentenolidu  $\alpha,\beta$ -nenasycené  $\delta$ -hydroxykyseliny je syntéza tarchonanthuslaktonu<sup>41</sup>. Požadovaný *Z*-alken vzniká redukcí esterové skupiny pomocí diisobutylaluminiumhydridu (DIBAL) za vzniku aldehydu, který reaguje s methyl bis-(trifluorethyl)-fosfonoacetátem v přítomnosti 18-crown-6 etheru a KHMDS (hexamethyldisilazan draselný).  $\delta$ -hydroxyl se získá odstraněním acetalové chránicí skupiny v methanolickém roztoku HCl. Závěrečná laktonizace probíhá za varu v roztoku chloridu zinečnatého s THF nad molekulovými sítí 4A (schéma 2)<sup>41</sup>.

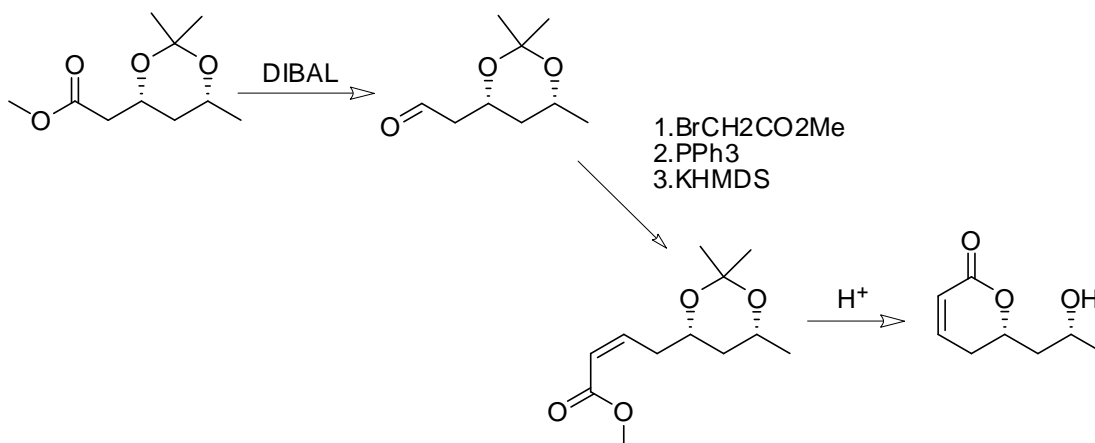
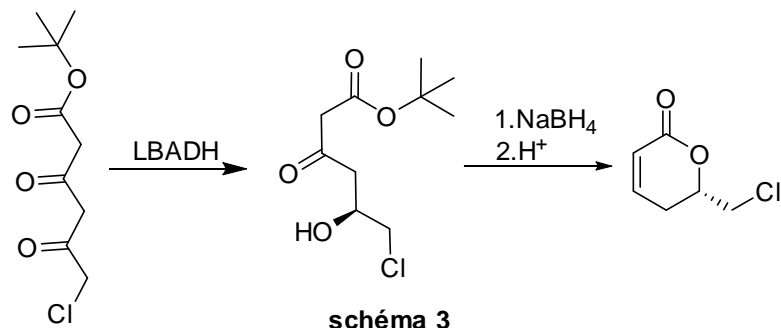


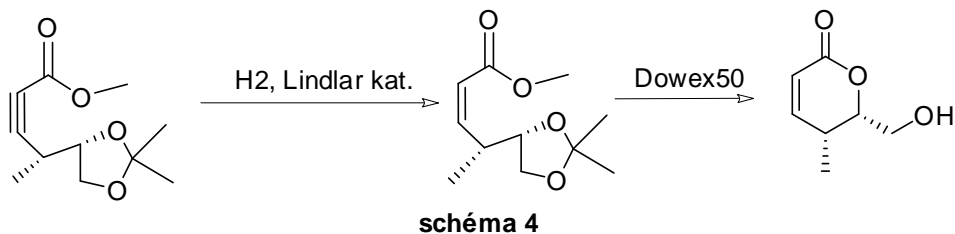
schéma 2

Dalším substrátem, který poskytuje vhodné prekurzory pro laktonizační jsou  $\alpha,\beta$ -diketoestery. Příkladem takové syntézy je výstavba nenasycených laktonových segmentů, které slouží jako stavební bloky pro další syntézy. Enders a Miller<sup>41</sup> používají k selektivní redukci  $\delta$ -oxo skupiny (vůči esteru) alkoholdehydrogenázu (LBADH) z *Lactobacillus brevis*,

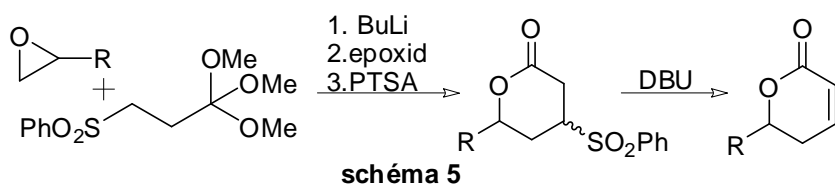
keto skupina v poloze  $\beta$  je redukována borohydridem sodným. K laktonizaci a eliminaci vody za vzniku  $\alpha,\beta$ -nenasyceného systému dochází za varu směsi v toluenu s *p*-toluensulfonovou kyselinou (schéma 3)<sup>42,43</sup>.



Při syntéze nenasyčeného pentenolidového segmentu kazusamycinu A<sup>15</sup> byl jako výchozí látka použit derivát kyseliny propiolové. Cílem bylo získat látku analogickou s  $\alpha,\beta$ -nenasycenou  $\delta$ -hydroxykyselinou, která cyklizuje na nenasyčený lakton. Trojná vazba byla redukována pomocí Lindlarova katalyzátoru. Nenasyčený lakton vzniká odstraněním chránící acetonidové skupiny a cyklizací pomocí Dowexu 50 v methanolu (schéma 4)<sup>15</sup>.



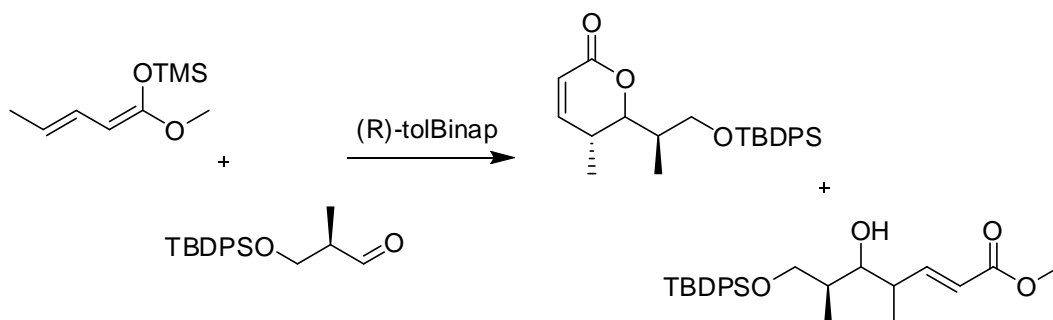
Ghosez<sup>43</sup> využívá jako výchozí látky epoxidy, které s lithnou solí methyl 3-fenylsulfonylorthopropionátu poskytují  $\beta$ -fenylsulfonyl- $\delta$ -laktony. Reakce je katalyzována kyselým prostředím, uvádí se PTSA nebo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Požadovaný  $\alpha,\beta$ -nenasycený  $\delta$ -lakton je získán odstraněním fenylsulfonylové skupiny použitím DBU<sup>44</sup> (schéma 5).



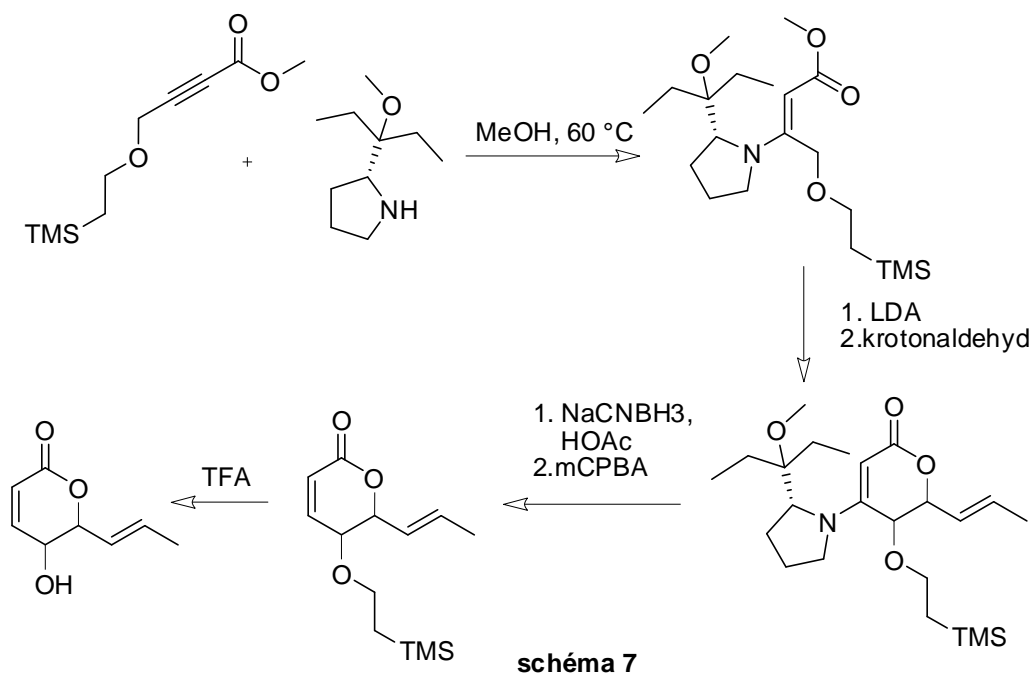


## Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů aldolovou reakcí

Mukaiyamova reakce<sup>45</sup> opět poskytuje analogickou  $\alpha,\beta$ -nenasycenou  $\delta$ -hydroxykyselinu, resp. methylester, která podléhá laktonizaci. Jedná se o reakci enolátu esteru a aldehydu v přítomnosti Carreirova katalyzátoru (*R*)-tolBinap<sup>46</sup>. Lineární aldolový produkt vzniká pouze minoritně, hlavním produktem je substituovaný  $\alpha,\beta$ -nenasycený  $\delta$ -lakton (schéma 6)<sup>47</sup>.



Aldolová reakce derivátu D-prolinu a aldehydu byla použita i u syntézy fomalaktonu<sup>48</sup>. Jedná se o aldolovou reakci vinylového derivátu pyrrolidinu s krotonaldehydem. Syntéza začíná Michaelovou adicí derivátu D-prolinu na derivát propiolové kyseliny. U vzniklého pyrrolidinového derivátu je generován anion pomocí LDA. Přidáním krotonaldehydu dochází ke vzniku kondenzačního produktu, který samovolně cyklizuje za vzniku laktonu. Poté následuje 1,4-redukce a odstranění pyrrolidinové části Copeho eliminací. Syntéza končí ochráněním C5-hydroxyly trifluoroctovou kyselinou (schéma 7)<sup>48</sup>.



## Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů hetero Diels-Alderovou reakcí

Aldehydy se jako výchozí látky při syntéze  $\alpha,\beta$ -nenasycených  $\delta$ -laktonů využívají také u hetero Diels-Alderovy reakce (HDA). Jako klíčový krok u syntézy laktonové části ratjadonu<sup>18</sup> byla využita HDA reakce mezi 1-methoxybutadienem a ethyl glyoxylátem. Reakce byla katalyzována tetraisopropoxidem titaničitým a BINOLEm. Výsledný ethylester byl redukován na alkohol pomocí  $\text{LiAlH}_4$ . Po navázání na polyketidický řetězec byl laktol oxidován směsí TPAP/NMO (tetrapropylamonium perruthenát/*N*-methylmorfolin-*N*-oxid) na požadovaný  $\alpha,\beta$ -nenasycený  $\delta$ -lakton (schéma 8)<sup>18</sup>.

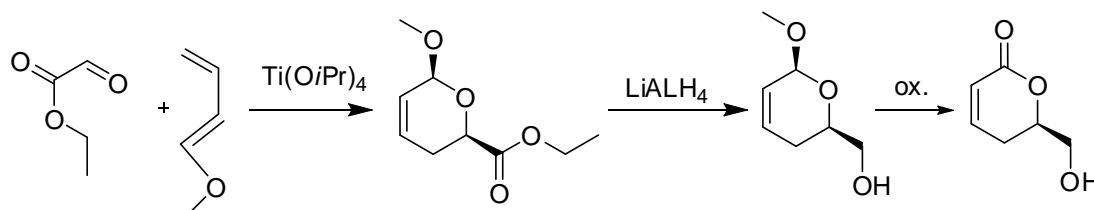


schéma 8

Aldehyd jako jedna z výchozích látek byl také použit u HDA reakce vypracované Fengem. Jedná se o reakci mezi Brassardovým dienem a aldehydem v přítomnosti chirální Lewisovy kyseliny založené na titanu<sup>49</sup>. Mechanismus reakce závisí na teplotě, při  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  probíhá reakce jako Mukaiyamaova aldolová kondenzace, při  $0\text{ }^\circ\text{C}$  jako hetero Diels-Alderova reakce (schéma 9)<sup>50</sup>.

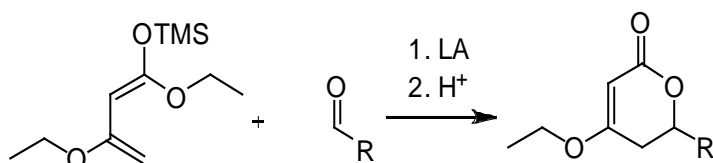
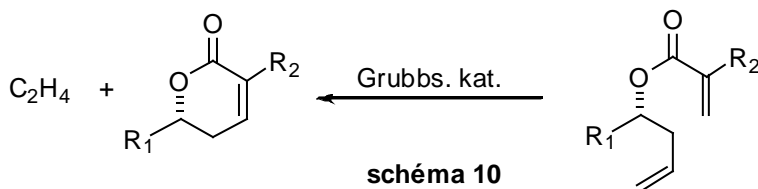


schéma 9

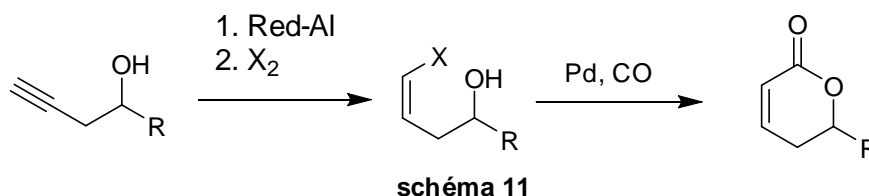
## Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů metathesí dienů (RCM reakce)

Metathese je dalším atraktivním postupem pro syntézu biologicky aktivních látek získaných z přírodních zdrojů. V případě syntézy nenasycených pentenolidů se většinou vychází z homoallylového alkoholu, který reakcí s chloridem substituované kyseliny akrylové poskytuje dien vhodný jako substrát pro metathesi za vznik  $\alpha,\beta$ -nenasyceného  $\delta$ -laktonu. Homoallylový alkohol lze enantioselektivně připravit reakcí aldehydu a allyltributylcínu při použití Maruokova komplexu (*S,S*)-**A**<sup>51</sup>. Metathese dvojných vazeb je katalyzována katalyzátorem Grubbsova typu<sup>52</sup> (schéma 10).



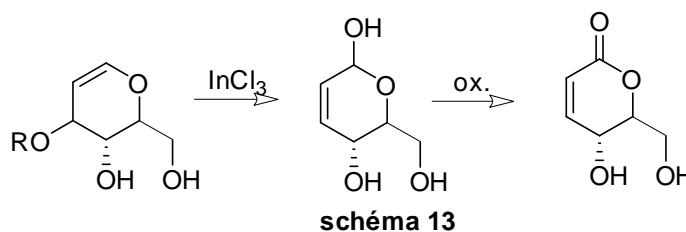
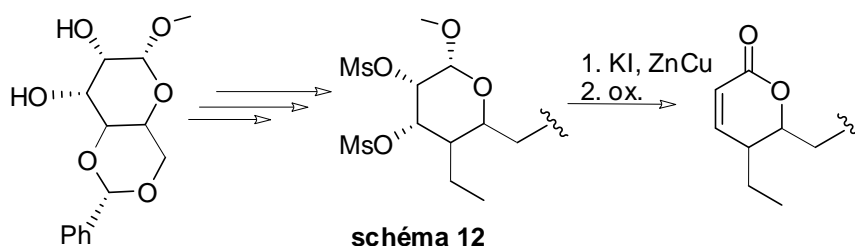
### Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů karbonylativní laktonizací

Metoda karbonylativní laktonizace byla mnohokrát užita při tvorbě butenolidů<sup>53</sup>, při syntéze pentenolidů byla využívána méně. Jedná se o využití kaskádových cyklizačních karbopaladačních reakcí v přítomnosti CO, zakončených intramolekulárním nukleofilním atakem volné OH skupiny na acylpalladiový zbytek. Výchozí látkou je homopropargylový alkohol, který je podroben *trans*-hydrometalaci a výměně kovu za halogen. Vzniklý homoallylový alkohol je možné karbonylovat v přítomnosti Pd katalyzátoru a přechodně vzniklý acylpalladnatý intermediát je zachycen OH skupinou za vzniku pentenolidu (schéma 11).



### Příprava $\alpha,\beta$ -nenasycených $\delta$ -laktonů z cukrů

Vzhledem k podobnosti některých cukrů a polyhydroxylovaných  $\alpha,\beta$ -nenasycených  $\delta$ -laktonů je zřejmé, že by mohly být využity jako základní stavební jednotky při syntéze některých přírodních látek. Například pro laktonový segment při syntéze pironetinu<sup>54</sup> vycházel Yasui z methyl 4,6-O-benzyliden- $\alpha$ -glukopyranosidu. Celá syntéza je poměrně složitá a mnohastupňová. Z výchozího cukru se získal laktol, který byl napojen na polyketidickou část. Požadovaný  $\alpha,\beta$ -nenasycený  $\delta$ -lakton je získán eliminací mesylátů za varu v přítomnosti KI a Zn(Cu) v dimethylformamidu a oxidací laktolu (schéma 12)<sup>54</sup>. Zjednodušení přinesla přímá konverze 1,2-nenasycených derivátů pentóz a hexóz na  $\alpha,\beta$ -nenasycené  $\delta$ -laktony pomocí  $\text{InCl}_3/\text{IBX}$ . Nejdříve jde o intramolekulární allylový přesmyk vyvolaný Lewisovou kyselinou a poté oxidací laktolové skupiny na laktonovou (schéma 13)<sup>55,56,57</sup>.

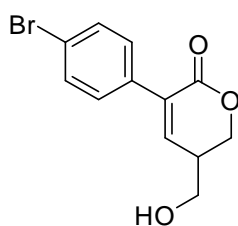


## Využití genového inženýrství

U látek skupiny foslaktomycinů (viz. kap. 1.3.12) bylo využito genového inženýrství<sup>30</sup> k zvýšení a selektivitě produkce jednotlivých derivátů. Nejprve byl nalezen gen pro foslaktomyciny, poté klonován a analyzován<sup>30</sup>. Pomocí PCR metody se upravila sekvence genu tak, aby produkoval požadovaný analog. Takto připravený mutant *Streptomyces*, selektivně a v šestinásobku oproti přírodnímu druhu produkoval foslaktomycin-B<sup>30</sup>.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo optimalizovat a ekonomizovat syntézu 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-onu jako analoga biologicky aktivních přírodních látek s navazujícím biologickým hodnocením na buněčnou linii kolorektálního karcinomu. Získané poznatky by měly sloužit jako základ pro další návrhy jednodušší a ekonomičtější přípravy potenciálně biologicky aktivních analog 3,5-disubstituovaných-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-onů.



### 3. VÝSLEDKY S DISKUZÍ

#### 4.1. Rozbor syntézy 5-hydroxymethyl-3-(subst. fenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onů

Pour a Schiller<sup>2</sup> připravili sérii 5-hydroxymethyl-3-(subst. fenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onů. Při retrosyntéze byla z  $\alpha,\beta$ -nenasyceného  $\delta$ -laktonu **A** v prvním kroku odstraněna dvojná vazba za vzniku nasyceného laktonového kruhu typu **B**. Rozpojením vazby -O-C vzniká dihydroxykyselina typu **C** jako vhodný cyklizační prekurzor. Následuje odstranění fragmentu se dvěma hydroxylovými skupinami, vedoucí ke komerčně dostupné substituované fenylactové kyselině **D** a syntonu **E** jako výchozím látkám celé syntézy (Schéma 14).

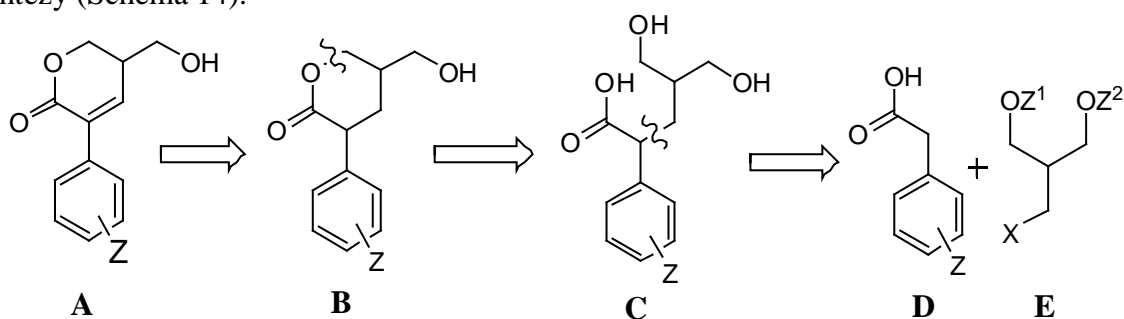
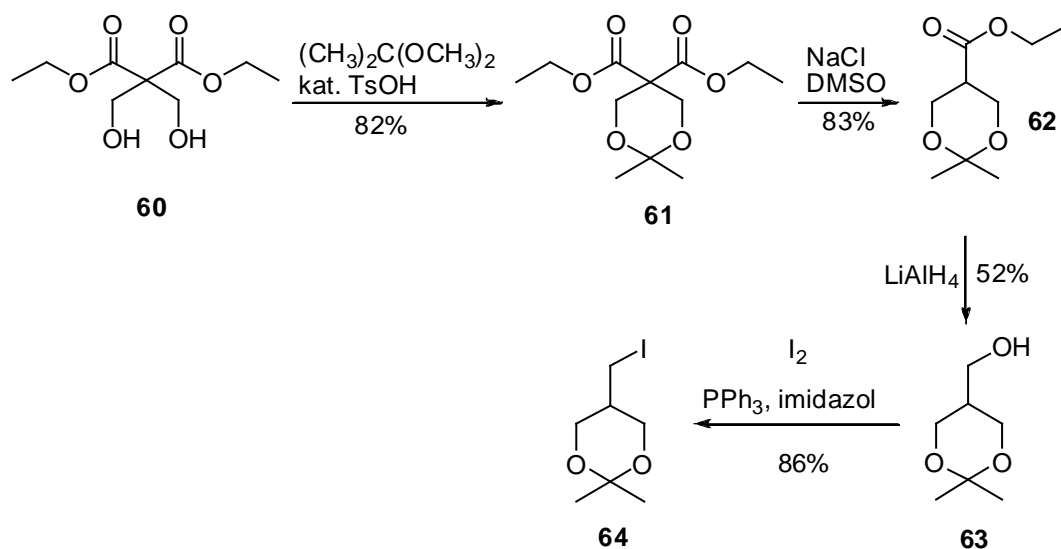


schéma 14

V syntetickém směru tak lze přípravu rozdělit na tři klíčové kroky. První je alkylace substituované fenylactové kyseliny vhodným alkylačním činidlem. Druhým je cyklizace na nasycený lakton a třetí klíčový krok je zavedení dvojně vazby za vzniku  $\alpha,\beta$ -nenasyceného  $\delta$ -laktonu.

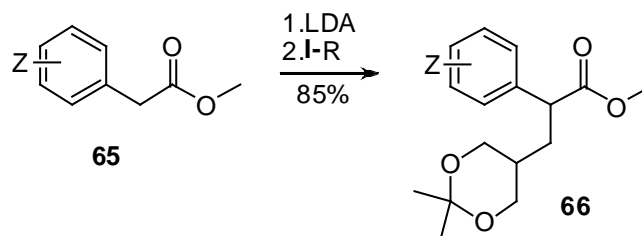
#### 4.2. Realizace syntézy 3,5-disubstituovaných pyranonů

Jako ekvivalent syntonu **E** byl navrhnout 5-jodmethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan, připravitelný z komerčně dostupného diethyl-bis(hydroxymethyl)malonátu (**60**). Nejprve byly ochráněny hydroxylové skupiny malonátu jako acetyl (**61**) působením acetonu v dimethoxypropanu za kyselé katalýzy TsOH. Vzniklý diester byl dekarboxylován varem s NaCl ve vlhkém DMSO. V následujícím kroku bylo nutné zredukovat esterovou funkční skupinu varem s  $\text{LiAlH}_4$  v  $\text{Et}_2\text{O}$  na alkohol(**63**), který byl následně substituován jodem. Posledním krokem přípravy činidla tak byla jodace reakcí s jodem v přítomnosti  $\text{PPh}_3$  a imidazolu (Schéma 15).



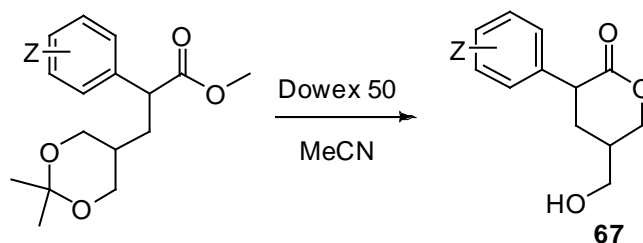
Takto bylo připraveno alkylační činidlo schopné reagovat s enolátem esteru fenylactové kyseliny.

Alkylace esteru fenylactové kyseliny byla provedena pomocí LDA, které generovalo karbanion na  $\alpha$  uhlíku kyseliny **D**. Po přidání jodidu **64** vzniká produkt alkylace (**66**) (Schéma 16).



**schéma 16**

V dalším kroku byla odstraněna acetalová chránící skupina pomocí kyselé pryskyřice Dowex50 v MeOH/H<sub>2</sub>O 3:1 a uzavření kruhu bylo dokončeno působením stejného činidla v prostředí MeCN (Schéma 17).



**schéma 17**

Zavedení dvojné vazby probíhá v kaskádě enolizace-reakce s PhSeBr-oxidace. Vzhledem k enolizaci v prvním kroku je nutné ochránění hydroxylové skupiny (**67**), kde se

osvědčil *tert*-butyldimethylsilyl (TBS). Ochráněný substrát (**68**) byl deprotonován působením LDA a vzniklý enolát podroben reakci s fenylselenenylchloridem nebo bromidem. Schiller uvádí výtěžek větší o 20 % při použití fenylselenenylbromidu. Vzniklý selenid (**69**) je nestabilní a musí být rychle přečištěn sloupcovou chromatografií a podroben oxidaci působením MCPBA v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Přechodně vzniklý selenoxid, pak podléhá spontánní *syn*-eliminaci za vzniku  $\alpha,\beta$ -nenasyceného  $\delta$ -laktonu (**70**). V posledním kroku je odstraněna ochránící skupina kyselou hydrolyzou ve směsi CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O/THF 3:1:1 (Schéma 18).

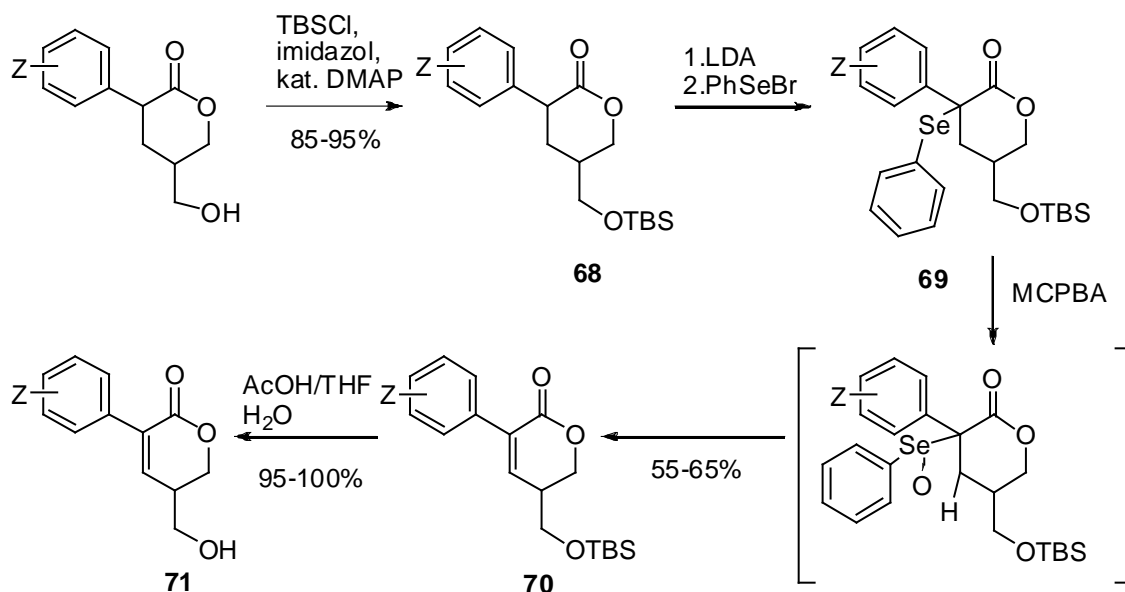
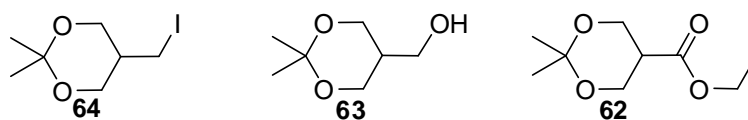


schéma 18

#### 4.3. Optimalizace syntézy 5-hydroxymethyl-3-(subst.fenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onů

Příprava 5-hydroxymethyl-3-(4-bromfenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onu dle Schillera byla komplikována nízkými výtěžky v důležitých krocích syntézy. Jedná se zejména o přípravu alkylačního činidla a následnou alkylaci 4-bromfenyloctové kyseliny (Schéma 15 a 16). V případě alkylačního činidla se nejedná pouze o samotnou syntézu, ale ukázala se i nestabilita činidla při delším skladování. Nejprve jsme vyzkoušeli změnu podmínek přípravy alkylačního činidla i alkylace, ale tento krok nevedl k zlepšení. Proto jsme se rozhodli pro zkoumání podmínek, za jakých by methylester fenylacetové kyseliny mohl reagovat s navrženými alkylačními činidly **62** a **63**. Navrhli jsme tak dvě cesty optimalizace, plán A a plán B. Je patrné, že nalezení vhodných podmínek pro tyto reakce by ekonomizovalo přípravu.





#### 4.3.1. Plán A: ethyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-karboxylát jako alkylační činidlo

Navržené alkylační činidlo (**62**) je vlastně ester, který může s esterem fenylactové kyseliny poskytovat produkt Claisenovy kondenzace, tj.  $\beta$ -diketon. Očekávaný  $\beta$ -diketon (**72**) je tautomerní se syntonem (**F**), který by za vhodných podmínek cyklizoval na požadovaný  $\alpha,\beta$ -nenasycený  $\delta$ -lakton. Pro studium reakce byl zvolen methyl-4-bromfenylacetát (**65**) jako modelová látka. Pro generování karbaniontu na  $\alpha$ -uhlíku methylesteru (**65**) bylo použito LDA (Schéma 19). V případě úspěšného provedení navržené optimalizace by se podstatně zjednodušila příprava alkylačního činidla a v molekule by přibyla další OH skupina, která by dala využít pro rozšíření série látek a SAR studie. Bohužel se ukázalo, že došlo pouze k reesterifikaci methylesteru fenylactové kyseliny na ethylester (**73**). Pravděpodobným důvodem neúspěchu je vyšší stabilita enolátu látky (**65**) a tedy snížená reaktivita.

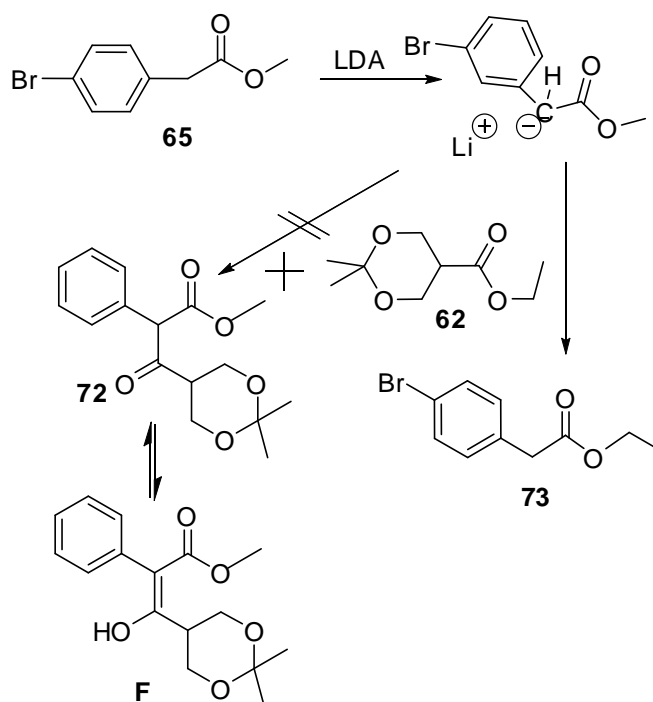


schéma 19

#### 4.3.2. Plán B: 5–hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan jako alkylační činidlo

Druhá optimalizace byla navržena podle metody Ruepinga, který vyvinul benzylaci arenů katalyzovanou triflátem bismutu. Metoda vychází z Friedel-Craftsovy alkylace založené na reakci arenu s alkylchloridem v přítomnosti Lewisovy kyseliny např. chloridu hlinitého. Nahrazení běžnějšího chloridu hlinitého triflátem bismutu vedlo k zjednodušení přípravy a k větším výtěžkům. Metoda byla úspěšně vyzkoušena i na jiném nukleofilu než arenu, v případě Ruepinga byl použit acetylaceton<sup>48</sup>. Na základě alkylace acetylacetonu jsme navrhli jako nukleofil methylester fenylacetové kyseliny. Bohužel i tato optimalizace nevedla k signifikantnímu produktu a byla získána pouze nedělitelná směs mnoha produktů.

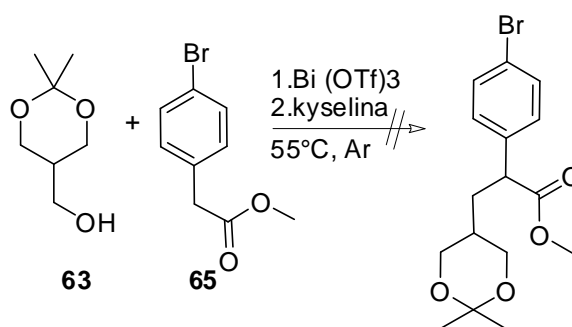
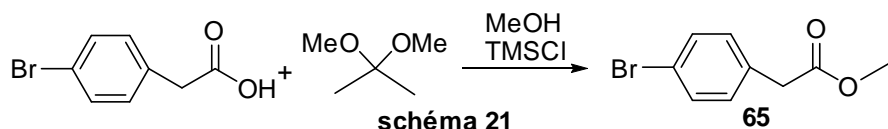


schéma 20

#### 4.3.3. Další optimalizace

V průběhu celé syntézy 5-hydroxymethyl-3-(4-bromfenyl)-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-onu jsme vyzkoušeli několik částečných optimalizací pro syntézu jednotlivých meziproduktů. Některé obměny vedly k zvýšení výtěžku, u jiných kroků se zjednodušila příprava při zachování výtěžku.

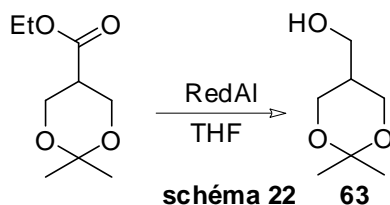
##### 4.3.3.1. Příprava methylesteru 4-bromfenyloctvé kyseliny



Kyselina 4-bromfenyloctová (74) byla rozpuštěna v MeOH, poté byl přidán dimethoxypropan a naposled byl přikapán TMSCl. Zjednodušení přípravy spočívá ve

zpracování produktu, které spočívá v prostém odpaření rozpouštědel. Výtěžek této optimalizace je srovnatelný s původní přípravou (Schéma 21).

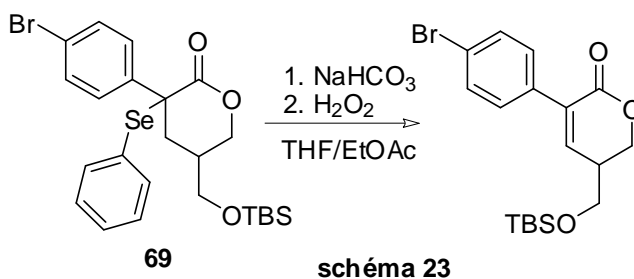
#### 4.3.3.2. Příprava 2,2-dimethyl-5-hydroxymethyl-1,3-dioxanu



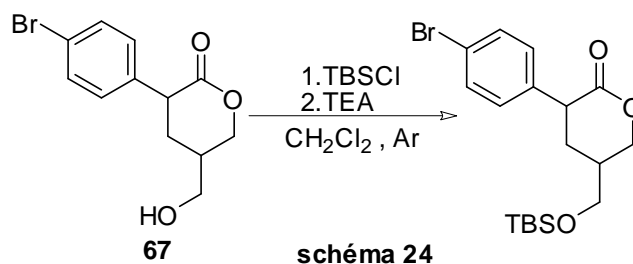
Jak již bylo zmíněno, redukce esteru (**62**) na alkohol (**63**) pomocí pomocí  $\text{LiAlH}_4$  vykazovala výtěžky kolem 50 %. Při použití RedAlu jako oxidačního činidla bylo dosahováno lepších výtěžků (o 5-10 %) než při použití  $\text{LiAlH}_4$  (Schéma 22).

#### 4.3.3.3. Zavádění dvojně vazby: oxidace selenidu

Oxidaci selenidu (**69**) ztěžovala manipulace s MCPBA. Stejných výtěžků (50 %) a zjednodušení přípravy jsme dosáhli použitím méně toxického 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  místo MCPBA při jinak stejných podmínkách.

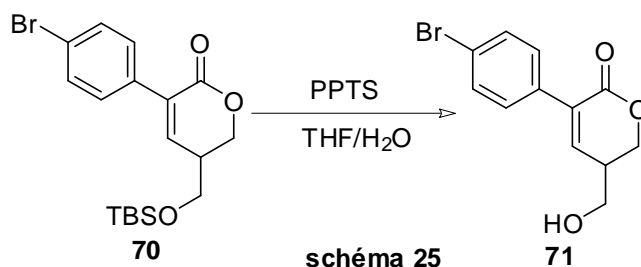


#### 4.3.3.4. Ochránění hydroxylové skupiny 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-tetrahydropyran-2-onu



Zvýšení výtěžku o 10% přineslo ochránění alkoholu (**67**) v atmosféře argonu s využitím triethylaminu jako baze a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  jako rozpouštědla místo původně používané kombinace reagentů TBSCl a imidazolu v DMF. Všechna činidla byla sekvenčně přidána k roztoku alkoholu (**67**) v suchém  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Schéma 24).

#### 4.3.3.5. Odstranění chránící skupiny 3-(4-bromfenyl)-5-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-onu



Při odstraňování chránící skupiny v posledním kroku reakce byla původně využívána kyselá hydrolyza pomocí  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ . Reakce však často probíhala až několik dní. Zrychlení reakce jsme dosáhli postupným přidáváním PPTS, které pak plně nahradilo  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Schéma 25).

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Použité experimentální metody

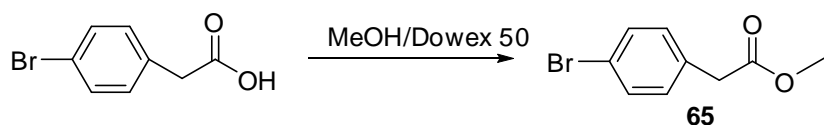
Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. Tetrahydrofuran byl před použitím předestilován z benzofenon ketylu. Dichlormethan byl destilován z  $\text{CaH}_2$  v čas potřeby. Dimethylformamid byl vysušen opakovaným stáním nad čerstvě aktivovanými molekulovými síty.

NMR spektra všech látek byla měřena v roztocích  $\text{CDCl}_3$  při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro  $^1\text{H}$  a při 75 MHz pro  $^{13}\text{C}$ . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty  $\delta$  v *parts per million* (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7.26 pro  $^1\text{H}$  a 77.00 pro  $^{13}\text{C}$ ). Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet), interakční konstanty (Hz) a přiřazení. Měření IR spekter všech látek bylo provedeno na přístroji NICOLET IMPACT 400, u pevných látek v tabletách 400 mg KBr s 0.7 mg vzorku, u olejovitých látek v 0.25 ml  $\text{CDCl}_3$  nebo  $\text{CHCl}_3$  s 15 mg vzorku. Hmotnostní spektra všech látek byla měřena na hmotnostním spektrometru MAGNUM FINNIGAN MAT s nízkou rozlišovací schopností. Průběh reakce a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) s detekcí pod UV lampou a s pomocí detekčního činidla  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 g),  $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$  (4 g), konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (200 ml) a následného zahřátí.

## 5.2. Syntéza 5-hydroxymethyl-3-(4-bromfenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2- onu

### 5.2.1. Esterifikace 4-bromfenyloctové kyseliny

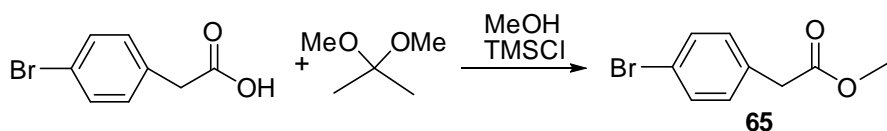
a) Esterifikace pomocí Dowexu 50 v prostředí methanolu:



Postup esterifikace Dowexem 50 v methanolu:

Do roztoku 4-bromfenyloctové kyseliny ( $M_r=215.04$ , 5g, 23.25mmol) v MeOH (100 ml) byl přidán Dowex 50 (4 g) a reakční směs byla míchána na magnetické míchačce za laboratorní teploty 12 hodin. Po ukončení reakce byl Dowex 50 z reakční směsi odstraněn filtrací přes fritu. Zbýlý Dowex 50 byl na fritě promyt pomocí EtOAc a rozpouštědla byla z roztoku odpařena. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze Pe/EtOAc 8:2. Výtěžek 95%.

b) Esterifikace v prostředí methanol/dimethoxypropan pomocí TMSCl:



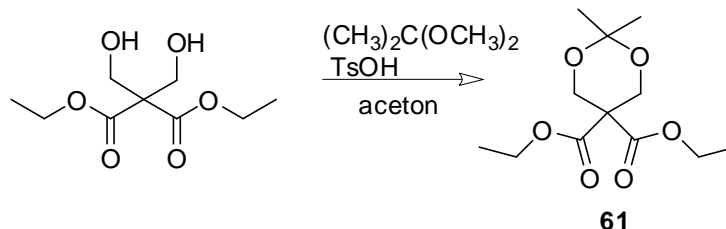
Postup esterifikace v dimethoxypropanu:

Kyselina 4-bromfenyloctová ( $M_r=215.04$ , 5g, 23.25mmol) byla rozpuštěna v MeOH (13 ml), poté byl přidán dimethoxypropan (51ml) a naposled byl pipetou přikapán 0,1 ekvivalent TMSCl ( $M_r = 108,64$ ; 2,33mmol). Směs byla míchána 12h na magnetické míchačce při laboratorní teplotě. Zpracování reakční směsi proběhlo velice jednoduše a to odpařením rozpouštědla na vakuové odparce. Produktu byl porovnána na TLC s ověřeným standardem v mobilní fázi Pe/EtOAc 8:2. Výtěžek 98%.

**Methylester 4-bromfenyloctové kyseliny (75)**,  $M_r=229.07$ , bezbarvá kapalina.

## 5.2.2. Příprava alkylačního činidla 2,2-dimethyl-5-jodmethyl-1,3-dioxanu

### 5.2.2.1. Příprava diethyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5,5-dikarboxylátu

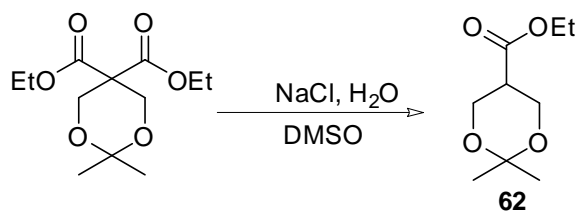


Malonát (**60**) ( $M_r=220.22$ , 20.0g, 90.81mmol) byl rozpuštěn v acetonu (200 ml). Poté byl za laboratorní teploty přikapán dimethoxypropan (12.3 ml, 99.9mmol). Reakce byla katalyzovaná TsOH (0.02 g, 0.1mmol), ten byl přisypán nakonec. Reakce byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Reakční směs se zpracovala odpařením acetonu a následným vytřepáním zbytku mezi  $\text{Et}_2\text{O}$  a 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Pro vysušení etherové vrstvy byl použit bezvodý  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Po odstranění  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pomocí filtrace přes vatou byl  $\text{Et}_2\text{O}$  odpařen. Produkt byl dle množství přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze Pe/EtOAc 9:1. V případě výtěžku nad 10g se pro čištění použil přístroj VerzaFlesh ve stejné mobilní fázi .

#### Diethyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5,5-dikarboxylát (**61**).

Výtěžek: 90%,  $M_r=260.28$ , nažloutlá olejovitá kapalina.  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.28 (4H, s,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.23 (4H, q,  $J=7.1$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 1.40 (6H, s,  $\text{CCH}_3$ ) 1.26 ( 6H, t,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.93 (CO), 98.45 (  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  ), 62.41 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 61.87 ( $\text{OCH}_2$ ), 53.65 ( $\text{CCH}_2$ ), 23.50 (  $\text{CCH}_3$ ), 13.97 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

### 5.2.2.2. Příprava ethyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-karboxylátu

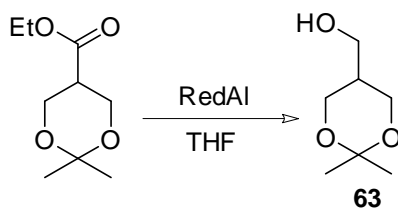


Diester dikarboxylátu (**61**) ( $M_r=260.28$ , 20.0g, 76.84mmol) byl rozpuštěn v DMSO (desetinásobek navážky, 200 ml). Poté byla přidána H<sub>2</sub>O (2.9 ml, 161.1mmol) a NaCl (4.5 g, 76.84mmol) a reakční směs byla refluxována 8 hodin nad kahanem. Po ochlazení byla směs zředěna vodou a vytřepána s Et<sub>2</sub>O. Etherová vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O odpařen a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází Pe/EtOAc 9:1.

#### Ethyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-karboxylát (**62**).

Výtěžek: 85%,  $M_r=188.22$ , nažloutlá olejovitá kapalina. <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.15 (2H, q,  $J=7.2$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.08-4.02 (4H, m, CH<sub>2</sub>O), 2.84-2.75 (1H, m, CH), 1.43 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.26 (3H, t,  $J=7.2$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### 5.2.2.3. Příprava 2,2-dimethyl-5-hydroxymethyl-1,3-dioxanu



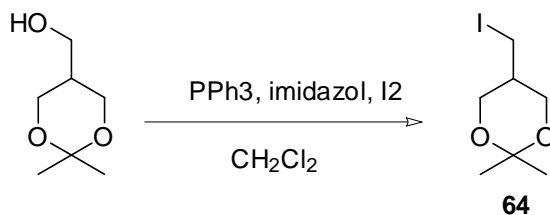
Ester karboxylátu (**62**) ( $M_r=188.22$ , 9.0g, 47.81mmol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (200 ml). Roztok byl ochlazen na 0°C v ledové lázni. K roztoku byl po kapkách přikapán Red-Al, (10.3ml, 52.6mmol) a reakční směs byla za chlazení míchána na magnetické míchačce. Průběh reakce byl sledován na TLC v mobilní fází PE/EtOAc 6:4. Reakce trvala přibližně 30min. Poté byla reakční směs zředěna H<sub>2</sub>O (2,5 násobek) a následně 3krát vytřepána do EtOAc. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rozpouštědlo odpařeno a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází Pe/EtOAc 1:1.



### 2,2-dimethyl-5-hydroxymethyl-1,3-dioxan (**63**).

Výtěžek: 60%, Mr=146.18, bezbarvá olejovitá kapalina.  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.08-3.96 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.84-3.70 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.92-1.78 (1H, m,  $\text{CH}$ ), 1.75 (1H, s,  $\text{OH}$ ), 1.45(3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.41 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

#### 5.2.2.4. Příprava 5-jodmethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxanu

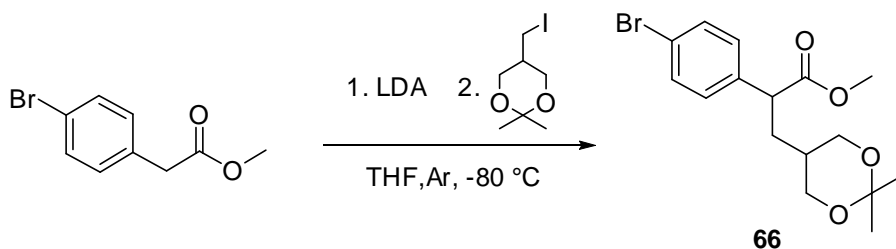


Alkohol (**63**) (Mr=146.18, 3.0g, 20.52mmol) byl rozpuštěn v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml). Po ochlazení na  $0\text{ }^\circ\text{C}$  v ledové lázni, byl přidán  $\text{PPh}_3$  (6,5 g, 24,63 mmol) poté imidazol (1,g, 24.63mmol). Po promíchání reakční směsi byl přikápan roztok  $\text{I}_2$  (6,8g, 26,68 mmol) v toluenu . Reakční směs byla míchána 3hod v ledové lázni. Po 3 hodinách byla reakční směs vytřepána s nasyceným vodným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  , nasyceným vodným roztokem  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  a s vodou. Organická fáze byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a rozpouštědlo odpařeno. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází PE/ $\text{Et}_2\text{O}$  8:2.

#### 5-jodmethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan (**64**).

Výtěžek: 55%, Mr=256.08, žlutooranžová krystalická látka.  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.01 (2H, dd,  $J_1= 4.0\text{ Hz}$ ,  $J_2= 12.0\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{Oa}$ ), 3.72 (2H, dd,  $J_1= 6.3\text{ Hz}$ ,  $J_2= 12.0\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{Ob}$ ), 3.22 (2H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{I}$ ), 2.01-1.86 ( 1H, m,  $\text{CH}$ ), 1.42 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.40 (3H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  98.31 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 64.67 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 64.28 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 36.59 ( $\text{CH}$ ), 23.80 ( $\text{CH}_3$ ), 23.66 ( $\text{CH}_3$ ), 4.77 ( $\text{CH}_2\text{I}$ ).

#### 5.2.2.5. Alkylace methylesteru 4-bromfenyloctové kyseliny

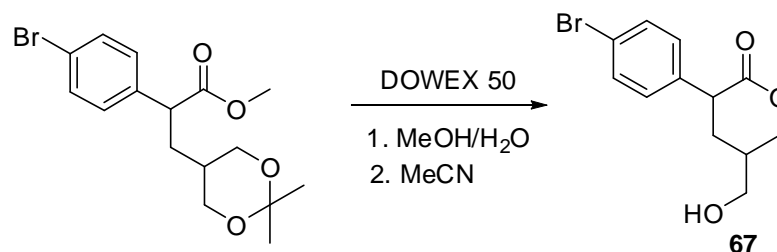


Před reakcí je potřeba vyžít daný počet baněk a potřebný počet skleněných injekčních stříkaček. Do evakuované Schlenkovy baňky pod atmosférou argonu byl v roztoku THF (100ml) injektován methylester 4-bromfenyloctové kyseliny ( $M_r=215.04$ , 3.0g, 13.1 mmol). Směs byla pomocí chladicího zařízení ochlazená na  $-80^\circ\text{C}$ . Po ochlazení bylo pomalu přikapáno LDA (13.75 mmol, 9.2ml) a směs se ponechala míchat 60min. Po hodině bylo k směsi injekcí přikapáno alkylační činidlo (**64**) ( $M_r=256.08$ , 3.4g, 13.1mmol). Poté se chlazení vypnulo a teplota reakční směsi byla v průběhu 1hodiny vyrovnána na laboratorní teplotu. Směs se pod atmosférou argonu nechala míchat 12hodin. Pro zpracování se směs zředila EtOAc a byla vytřepána nasyceným roztokem  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Organická frakce byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a ten následně odfiltrován pomocí vaty. Z vysušené organické frakce bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze PE/EtOAc 9:1.

**Methylester 3-(2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-yl)-2-(4-bromfenyl)propionové kyseliny (**66**).**

Výtěžek: 55%,  $M_r=357.2$ , nažloutlá olejovitá kapalina.  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.48-7.42 (2H, m, AA'BB', Ar), 7.21-7.14 (2H, m, AA'BB', Ar), 3.90-3.71 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.65 (3H, s,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.63-3.50 (3H, m,  $\text{CH}_2\text{O}+\text{H}_2$ ), 2.05-1.93 (1H, m, CH), 1.81-1.59 (2H, m, H3), 1.39 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.37 (3H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.6, 137.4, 131.93, 131.89, 129.6, 129.5, 121.6, 97.9, 64.3, 64.2, 58.4, 48.1, 32.3, 32.2, 26.4, 21.3; **IR**: ( $\text{CDCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  2955 (w), 2880 (w), 2253 (w), 1735 (m), 1711 (m), 1490 (m), 1362 (w)  $\text{cm}^{-1}$ ; **LRMS**: 341 ( $\text{M}^+ - \text{Me}$ , 12), 300 (58), 281 (18), 267 (5), 240 (8), 223 (100), 209 (15), 182 (12), 169 (8), 142 (100), 129 (28), 103 (18), 89 (12), 77 (18), 59 (28), 51 (10).

**5.2.2.6. Cyklizace methylester 3-(2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-yl)-2-(4-bromfenyl)propionové kyseliny**



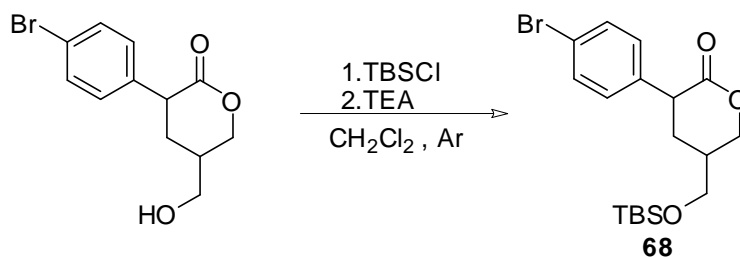
Methylester (**66**) ( $M_r=357.2$ , 2g, 44.76mmol) byl rozpuštěn ve směsi MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  3:1 (40 ml). Poté byl přisypán Dowex 50 (1.3g) v množství odpovídající 2/3 navážky

methylesteru. Reakční směs byla míchána a refluxována 2hodiny. Pro zpracování reakční směsi byl Dowex odfiltrován na fritě. Směs se zředila EtOAc a byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl a organická vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po vysušení byl síran odfiltrován a rozpouštědlo odpařeno. V dalším kroku reakce byl meziprodukt nejdříve rozpuštěn v MeCN (40 ml) poté přisypán Dowex 50 ve stejném množství (1.3g) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 12 hodin. Po ukončení reakce byl Dowex odfiltrován na fritě, směs zředěna EtOAc a vytřepána NaCl. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází Pe/EtOAc 1:1 a byl bez charakterizace použit do následující reakce.

### 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyltetrahydropyran-2-on (67).

Výtěžek: 90%, Mr=285.13, nažloutlá olejovitá kapalina.

#### 5.2.2.7. Ochránění hydroxylové skupiny



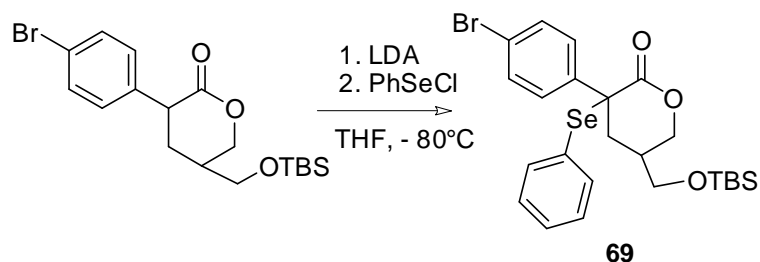
V atmosféře argonu byl alkohol (67) rozpuštěn (Mr=285.13, 1g, 3.5mmol) v suchém CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml), potom byl přidán TBSCl (Mr=150.72, 0.63g, 4.2mmol) a nakonec injektován TEA (Mr=101.19, 1.1 ml, 5.26mmol). Reakční směs byla míchána 24 hodin za laboratorní teploty. Pro zpracování byla směs zředěna EtOAc a vytřepána nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická frakce byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a rozpouštědlo odpařeno. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze Pe/EtOAc 8:2.

### 3-(4-bromfenyl)-5-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyltetrahydropyran-2-on (68).

Výtěžek: 98%, Mr=399.39, nažloutlá olejovitá kapalina, směs diastereoizomerů. <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.51-7.44 (2H, m, AA'BB', Ar, A+B), 7.14-7.09 (2H, m, AA'BB', Ar, A+B), 4.51-4.26 (2H, m, H6, A+B), 3.84-3.53 (3H, m, H3+CH<sub>2</sub>O, A+B), 2.41-2.05 (3H, m, H4+H5, A+B), 0.89 (9H, s, CCH<sub>3</sub>, A+B), 0.06 (6H, s, SiCH<sub>3</sub>, A), 0.05 (6H, s, SiCH<sub>3</sub>, B); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0, 172.3, 137.3, 137.1, 131.8, 130.1, 130.0, 121.4, 70.0, 69.6,

63.5, 63.2, 45.9, 44.1, 35.9, 33.9, 29.8, 25.9, 18.23, 18.18, -5.49, -5.53; **IR:** (CDCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  2955 (w), 2930 (w), 1471 (m), 1491 (w), 1255 (m) cm<sup>-1</sup>; **LRMS:** 399 (M<sup>+</sup>, 4), 368 (10), 341 (10), 315 (22), 281 (8), 255 (5), 221 (32), 207 (12), 195 (60), 171 (10), 161 (5), 142 (30), 129 (20), 116 (55), 105 (88), 89 (19), 75 (100), 59 (32).

### 5.2.2.8. Zavedení dvojné vazby do cyklu tetrahydropyran-2-onu

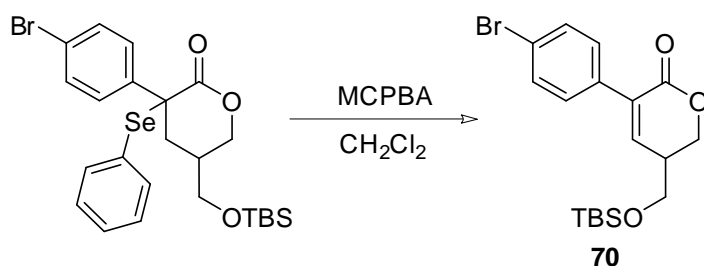


Ve vyžíhané Schlenkově baňce pod atmosférou argonu byl v suchém THF ( 20ml ) rozpuštěn ochráněný alkohol (Mr=399.39, 1g, 2.5mmol) Směs byla ochlazena na – 80°C a intenzivně míchána. Potom byl pomalu injektován LDA ( 2.63mmol ) a směs byla při – 80°C míchána 30 min. Po uplnutí dané doby byl injektován PhSeCl (720mg, 3.75mmol) rozpuštěný v suchém THF. Chlazení bylo vypnuto a reakční směs byla míchána 4hodiny. Teplota směsi se postupně ohřála na laboratorní teplotu. Pro zpracování byla reakční směs zředěna EtOAc a vytřepána nasyceným roztokem NH<sub>4</sub>Cl. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a EtOAc odpařen na vakuové odparce. Meziprodukt – selenid, je nestabilní a proto je potřeba provést rychlé přečištění sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází Pe/EtOAc 98:2. Vyčištěná látka byla hned použita do dalšího kroku reakce.

**3-fenylselenenyl-3-(4-bromfenyl)-5-*terc*-butyldimethylsilyloxymethyltetrahydropyran-2-on (69).** Výtěžek: 50%, Mr=554.45, nažloutlá olejovitá látka.

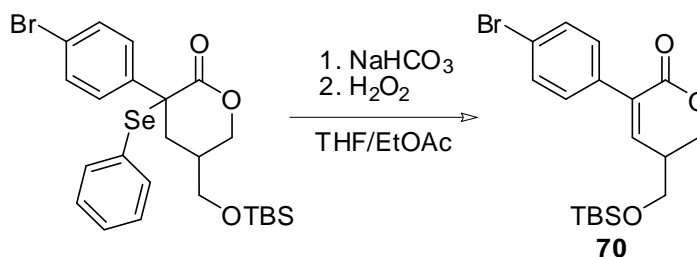
2. krok reakce: oxidace selenidu

a)



Roztok vzniklý rozpuštěním selenidu ( $M_r=554.45$ , 1.1g, 1.98mmol) v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) byl v ledové lázni ochlazen na  $0^\circ\text{C}$ . Poté byla přisypána MCPBA (2.97 mmol) a reakční směs byla míchána 1 hodinu při  $0^\circ\text{C}$ . Reakce byla ukončena zředěním EtOAc a vytřepána 5% roztokem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Organická frakce byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Rozpouštědlo bylo z vysušené organické fáze odpařeno a produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze 98:2 Pe/ EtOAc.

b)



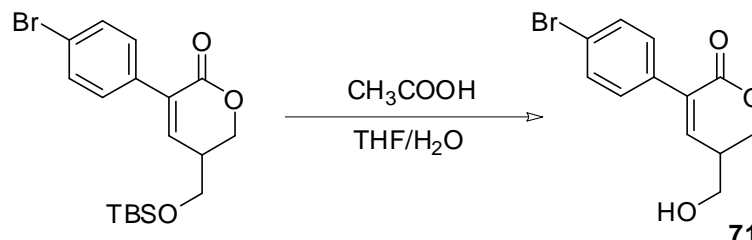
Selenid ( $M_r=554.45$ , 1.1g, 1.98 mmol) byl rozpuštěn v roztoku EtOAc/THF (5.5:3.5ml) a tento roztok byl ochlazen na  $0^\circ\text{C}$  v ledové lázni. Poté byl přisypán  $\text{NaHCO}_3$  (2.4g) a pipetou přikapán  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%, 2.5ml). Reakční směs byla při  $0^\circ\text{C}$  míchána 30minut. Po ohřátí reakční směsi na laboratorní teplotu, byla směs zředěna EtOAc. Pro vytřepání se použil nasycený roztok  $\text{NaCl}$ , organická frakce byla vysušena síranem a rozpouštědlo odpařeno. Látka byla vyčištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází Pe/EtOAc 98:2.

**3-(4-bromfenyl)-5-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-on (70).**

Výtěžek: 50%,  $M_r=397.38$ , nažloutlá olejovitá kapalina;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.52-7.46 (2H, m, AA'BB', Ar), 7.37-7.31 (2H, m, AA'BB', Ar), 6.89 (1H, d,  $J=4.4$  Hz, H4), 4.55-4.38 (2H, m, H6), 3.79-3.67 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.91-2.79 (1H, m, H5), 0.90 (9H, s,  $\text{CCH}_3$ ), 0.08 (6H, s,  $\text{SiCH}_3$ ).

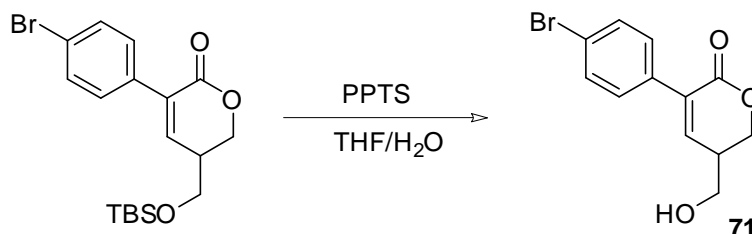
### 5.2.2.9. Odstranění chránící skupiny

a)



Nenasycený lakton ( $M_r=397.38$ , 1.4g, 3.52mol) byl rozpuštěn ve směsi  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$  (3:1:1, 10 ml) a reakční směs byla míchána po dobu 15 hodin za laboratorní teploty. Následně byla směs zředěna EtOAc a vytřepána nasyceným roztokem NaCl. Po vysušení organické vrstvy bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpaření rozpouštědel byl získaný produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu mobilní fází Hexan/EtOAc 9:1. Výtěžek: 95%.

b)



Nenasycený lakton ( $M_r=397.38$ , 1.4g, 3.52 mmol) byl rozpuštěn ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$  (1:1, 10 ml) a k reakční směsi byla přisypána PPTS ( $M_r=251.3$ , 0.1g, 0.2 mmol). Vzniklá směs byla míchána po dobu 12 hodin za laboratorní teploty. Následně byla směs zředěna EtOAc a vytřepána 5% roztokem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Po vysušení organické vrstvy bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpaření rozpouštědel byl získaný produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu mobilní fází Hexan/EtOAc 9:1. Výtěžek: kvantitativní.

#### 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-on (71)

$M_r = 283.12$ , bílá krystalická látka, t.t. 118-120 °C.  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7.56-7.50 (2H, m, AA'BB', Ar), 7.47-7.41 (2H, m, AA'BB', Ar), 7.14 (1H, d,  $J=4.1$  Hz, H4), 4.65-

4.54 (2H, m, H6), 4.18 (1H, t,  $J=5.4$  Hz, OH), 3.85-3.69 (2H, m, CH<sub>2</sub>O), 2.76-2.53 (1H, m, H5); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  163.6, 145.2, 136.3, 131.9, 131.8, 131.2, 122.2, 68.7, 61.4, 38.8; IR: (KBr)  $\nu_{\max}$  3390 (s), 1684 (s), 1489 (m), 1208 (m), 1012 (m) cm<sup>-1</sup>; LRMS: 282 (M<sup>+</sup> - H, 8), 264 (8), 254 (5), 237 (12), 222 (11), 196 (8), 172 (6), 157 (7), 144 (60), 128 (10), 115 (100), 101 (8), 89 (17), 75 (11), 63 (18), 50 (11).

## 6. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla provedena celková syntéza 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-onu (**71**) dle přípravy Schillera a v několika krocích se podařilo tuto syntézu optimalizovat, zjednodušit a zvýšit výtěžek. Optimalizace se zdařila u přípravy methylesteru-4-bromfenylocotvé kyseliny (**65**), redukce esteru (**62**) na alkohol (**63**), oxidace selenidu (**69**), ochránění alkoholu (**67**) a odstranění chránicí skupiny za vzniku finálního produktu (**71**). Provedení syntézy podle navrženého plánu A a plánu B se bohužel nezdařilo. Ze získaných poznatků lze sestavit syntézu vedoucí k přípravě dostatečného množství 3,5-disubstituovaných-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-onů jako potencionálních kandidátů pro následné *in vitro* studie cytostatické aktivity.



## 7. LITERATURA

1. Zapf S., Anke T.; Sterner O.; *Acta Chem. Scand.* **1995**, *49*, 223.
2. Schiller R., disertační práce, Faf UK Hradec Králové, **2004**.
3. Brady S. F. and Clardy J.; *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 1447.
4. Ho-Jae L., Choong-Hwan L., Myung-Chul C., Hyo-Kon C., Joon-Shick R. and Yung-Hee K.; *Tetrahedron Letters*, **1999**, *40*, 6949.
5. Hee-Yoon L., Hyun Seop T., Byung Gyu K. and Hyun-Moo C.; *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 5803.
6. Hembree J. A., Chang C., McLoughlin J. L., Cassady J. M., Watts D. J., Wenkert E., Fonseca S. F., De Paiva C.; *J. Phytochemistry*, **1979**, *18*, 1961.
7. Singh P., Russell G. B., Hayashi Y., Gallagher R. T., Fredericksen S.; *Entomol. Exp. Apl.* **1979**, *25*, 121.
8. Hosoe T., Nozawa K., Lumley T. C., Currah R. S., Fukushima K., Takizawa K., Miyaji M., Kawai K.; *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1591.
9. Barrero A. F., Arseniyadis S., Moral J., Herrador M., Valdivia M., Jimenez D.; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2501.
10. [http://www.faf.cuni.apps/daidalea/docs/Compound/2-4\\_Polyketidy.pdf](http://www.faf.cuni.apps/daidalea/docs/Compound/2-4_Polyketidy.pdf), 19.5. 2008.
11. <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/bioh.pdf>, 18.5. 2008.
12. Byeong-Churl J., Ji-Hye P., Hye-Yun J., Hyun-Ji O.; *Biochemical Pharmacology*, **2004**, *68*, 263.
13. Marshall J. A., Mikowski A. M., Bourbeau M. P., Schaafa G. M. and Valerioteb F.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 320.
14. Langille N. F., Panek J.S.; *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 3203.
15. Kobayashi M., Higuchi K., Murakami N., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 2859.
16. Murakami M., Sugimoto M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 2651
17. Kalesse M., Christmann M., Bhatt U., Quitschalle M., *ChemBioChem*, 2001, *2*, 709.
18. Christmann M. et al.; *Angel. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, No. 23.
19. Marshall J. A. and Schaaf G. M.; *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 7428.
20. Arai N., Chikaraishi N., Omura S. and Kuwajima I.; *Org. Lett.*, **2004**, *6(17)*, 2845.
21. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch5B2.htm>, 18.5. 2008.
22. Sirirath S., Tahala J. et al.; *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1820.
23. Smith A. B., Scott Freeze B., *Org. Lett.*, 2005, *7*, No. 2, 311-314.

24. Shaw S. J., Sundermann K. F., Burlingame M. A., Myles D. C., Freeze B. S., Xian M., Brouard I., and Smith A. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6532.
25. Miyakado M., Inoue S., et al.; *Chem. Lett.*, **1982**, 1539.
26. <http://rum.bf.jcu.cz/public/mykol/asco01.doc>, 19.5. 2008.
27. Gurjar M. K., Henri J. T., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, No. 36, 6615
28. Keck G. E., Knutson C. E. and Wales S. A.; *Org. Lett.*, **2001**, *3*(5), 707.
29. Torres M., Balcells M., Sala N., Sanchis V. and Daněla R.; *Pestic. Sci.*, **1998**, *53*, 9.
30. Palaniappan N., Seok-Kim B., Sekiyama Y., Osada H. and Reynolds K. A.; *J. B. Chem.*, **2003**, *278*(37), 35552.
31. Shibata T., Kurikara S.; *Tetrahedron*, **1995**, *51*(44), 11999.
32. Trojan S. a kolektiv, *Lékařská fyziologie, Grada*, **2003**, kap. 4.4.2, 120.
33. Choy N., Shin Y, Nguyen P. Q., Curran D. P., Balachandran R., Madiraju C. and Day B. W.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 2846.
34. Paterson I., Delgado O., Florence G. J., Lyothier I., O'Brien M., Scott J. P. and Sereinig N.; *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 150.
35. Smith A. B., Scott Freeze B., LaMarche M. J. et al.; *Org. Lett.*, **2005**, *7*(2), 315.
36. Kumar A. R., Sudhakar N., Venkateswara B., Rao N., Raghunandan A., Venkateshb A. and Sarangapanib M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 2085.
37. Alberts A. W., Chen J., Kuron G, Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J, Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J. and Springer J.; *PNAS*, **1980**, *77*(7), 3957.
38. Liao X., Wu Y., Brabander J. K. D.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1648
39. Collum D. B., McDonald J. H., Still W. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 2118.
40. Schiller R., disertační práce, Faf UK Hradec Králové, **2004**.
41. Garaas S. D., Hunter T. J.; *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*(8), 2682.
42. Enders D., Lenzen A., Miller M.; *Synthesis*, **2004**, 1486.
43. Drochner D., Miller M.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 211.
44. Carretero J. C., Ghosez L.; *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 2059.
45. Denmark S. E., Heemstra J. R., Beutner G. L.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 4682.
46. Kalesse M.; *Top. Curr. Chem.*, **2005**, *224*, 43.
47. Bluet G., Campagne J.-M.; *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 5507.
48. Schlessinger R. H., Gillman K. W.; *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 1257.
49. Fan Q., Lin L., Juany Y., Feng X., Zhang G.; *Org. Lett.*, **2006**, *6*, 2185.

50. Midland M. M., Graham S. R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *84*, 4294.
51. de Tatina A., Pilli R. A.; *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 8721.
52. Fuerstner A., Thiel O. R., Ackermann L., Schanz H., Nolan S. P.; *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 2204.
53. Fáková H., Pour M., Kuneš J., Šenel P.; *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 8137.
54. Yasui K., Tamura Y., Nakatani T, Kawada K. and Ohtani M.; *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 7567.
55. Valverde S., Hernandez A., Herradon B., Rabanal R. M., Mertin-Lomas M.; *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 3499.
56. Gomez A. M., Polez de Uralde B.; *Chem. Commun.*, **1997**, 1647.
57. Yadav J. S., Reddy B. V. S., Reddy C. S.; *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 4583.