



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Výzkum a vývoj nových biologicky
aktivních látek s antileishmaniální
aktivitou: Syntéza (–)-Sanguinolignanu A**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Daniela Konrádová**
Studijní program: **Experimentální biologie**
Studijní obor: **Experimentální biologie**
Forma studia: **Prezenční**
Vedoucí práce: **RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: **2015**

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Daniela Konrádová |
| Název práce | Výzkum a vývoj nových biologicky aktivních látek s antileishmaniální aktivitou: Syntéza (–)-Sanguinolignanu A |
| Typ práce | Diplomová práce |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2015 |
| Abstrakt | Diplomová práce je zaměřena na syntézu (–)-Sanguinolignanu A, potvrzení jeho struktury a otestování biologické aktivity proti <i>L. turanica</i> . V teoretické části jsou shrnuty poznatky o leishmanióze jako o parazitárním onemocnění, dále o původci této nemoci, o epidemiologii a o možnostech léčby. Experimentální část je zaměřena na syntézu klíčových meziproductů a následně finálního produktu (–)-Sanguinolignanu A. V rámci práce byly provedeny testy biologické aktivity na vybraných látkách. Všechny připravené látky byly charakterizovány dostupnými spektrálními metodami. |
| Klíčová slova | Lignany, sekundární rostlinné metabolity, Leishmania, syntéza přírodních látek, parazitární onemocnění, |
| Počet stran | 73 |
| Počet příloh | 2 |
| Jazyk | česky |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Bc. Daniela Konrádová |
| Title of thesis | Development of novel biologically active compound with antileishmanial activity. Total synthesis of (–)-Sanguinolignan A. |
| Type of thesis | Diploma thesis |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D. |
| The year of presentation | 2015 |
| Abstract | <p>This diploma thesis is focused on the synthesis of (–)-Sanguinolignan A, its structure confirmation and the biological activity tests against <i>L. turanica</i>.</p> <p>Litterature overview of knowledge about leishmaniasis as a parasitic disease, its epidemiology and treatment prior to January 2015 is covered in the theoretical part of the thesis.</p> <p>Research part is targeted on the synthesis and the biological evaluation of several new derivatives synthesized during this journey. All new compounds were described and characterised using available structural and spectral methods.</p> |
| Keywords | Lignans, secondary plant metabolites, Leishmaniasis, synthesis of natural products, vector-borne diseases |
| Number of pages | 73 |
| Number of appendices | 2 |
| Language | czech |

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

/vlastnoruční podpis/

Poděkování

Mé upřímné poděkování patří především vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. A to za obrovskou trpělivost, vstřícnost, cenné rady, odborné vedení a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Kozubíkové za pomoc při syntéze a Mgr. Evě Řezníčkové za pomoc a čas, který mi věnovala v rámci biologické části. A v neposlední řadě skvělému kolektivu oddělení bioorganické chemie Laboratoře růstových regulátorů.

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam zkratk | 7 |
| 1. Úvod a cíle práce..... | 8 |
| 2. Současný stav řešené problematiky..... | 9 |
| 2.1 Leishmania | 11 |
| 2.2 Vývoj..... | 11 |
| 2.3 Patogenita | 14 |
| 2.4 Epidemiologie..... | 14 |
| 2.5 Choroba..... | 15 |
| 2.6 Léčba | 19 |
| 2.7 Rezistence | 25 |
| 2.8 Sanguinolignan A..... | 26 |
| 3. Experimentální část..... | 29 |
| 3.1 Chemikálie..... | 29 |
| 3.2 Metody a materiál..... | 29 |
| 3.3 Organická syntéza | 31 |
| 4. Výsledky a diskuze..... | 43 |
| 4.1 Syntéza Sanguinolignanu A | 44 |
| 4.2 Diverzně-orientovaná syntéza základního skeletu Sanguinolignanu A..... | 51 |
| 4.3 Biologické testy připravených látek | 61 |
| 5. Závěr..... | 64 |
| 6. Seznam citací..... | 65 |

Seznam zkratk

| | |
|------------------|--|
| AIDS | – syndrom získaného selhání imunity (A cquired I mmune D efficiency S ndrome) |
| ATP | – adenosintrifosfát |
| CVL | – psí viscerální leishmanióza (c anine v isceral l eishmaniasis) |
| d | – dublet |
| DCL | – difuzní kožní leishmanióza |
| DCM | – dichlormethan |
| ES+ | – ionizace pomocí elektrospreje |
| eq | – počet ekvivalentů |
| HIV | – virus lidské imunitní nedostatečnosti (H uman I mmunodeficiency V irus) |
| HPLC | – vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| IC ₅₀ | – polovina maximální inhibiční koncentrace (1/2 inhibitory concentration) |
| <i>J</i> | – štěpící konstanta |
| l.t. | – laboratorní teplota |
| m | – multiplet |
| ML | – mukózní leishmanióza |
| MS | – hmotnostní spektrometrie |
| NMR | – n ukleární m agnetická r ezonance |
| PKDL | – post kala azar dermální leishmanióza |
| ppm | – počet částic na milion (p arts p er m ilion) |
| PSG | – promastigotní sekreční gel |
| RVO | – rotační vakuové odparka |
| s | – singlet |
| t | – triplet |
| THF | – tetrahydrofuran |
| TLC | – chromatografie na tenké vrstvě |
| VL | – viscerální leishmanióza |
| δ | – chemický posun |

1. Úvod a cíle práce

Od druhé poloviny 20. století, společně se vzrůstající lidskou populací, začíná narůstat i globalizace naší společnosti, a přidáme-li k tomu i klimatické změny a migraci obyvatelstva, dochází tak ve zvýšené míře k rozšiřování tzv. neprávem opomíjených chorob (internetový zdroj 12). Tyto choroby mohou být způsobeny různými parazity, bakteriemi či viry a jsou šířeny pomocí různých přenašečů. Jedno mají však společné – primárně postihují tzv. země třetího světa. Důsledkem této geografické lokace je jen okrajový zájem výzkumných týmů a farmaceutických společností o léčbu a eradikaci těchto chorob.

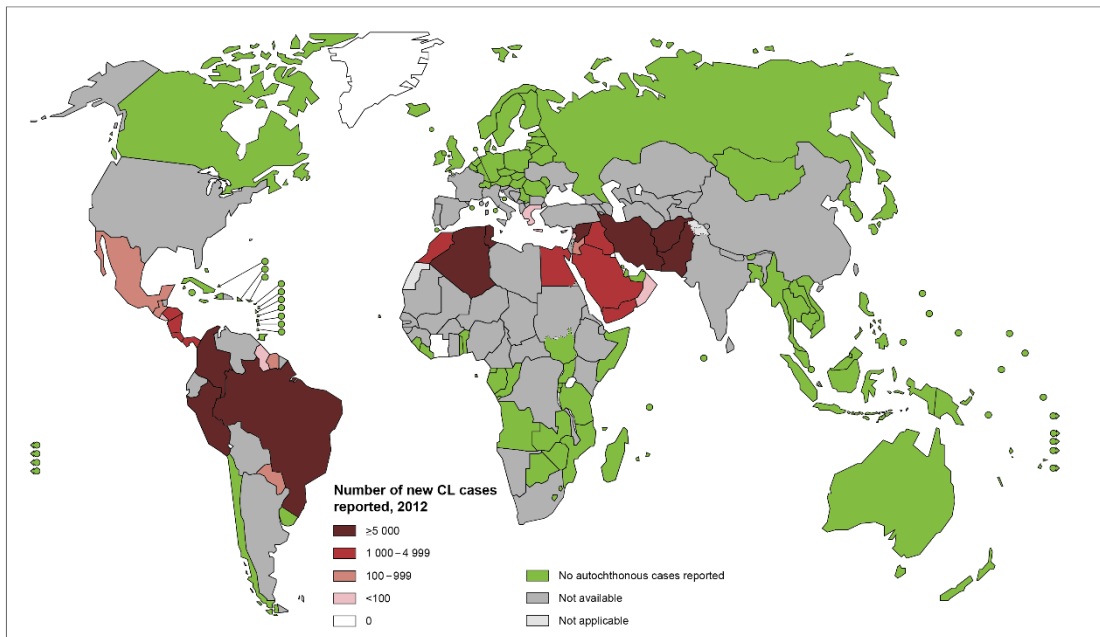
Leishmanióza zaujímá jedno z čelních míst v řebříčku těchto neprávem opomíjených chorob. Jde o onemocnění parazitického původu typické pro tropické a subtropické oblasti latinské Ameriky a západní a střední Asie. Nově se díky klimatickým změnám a migraci začíná objevovat i v jižní části Evropy. Celosvětově je postiženo 1,5 mil osob a dalších 350 milionů žije v oblasti s vysokým rizikem nakažení (internetový zdroj 10). Léčba onemocnění způsobeného tímto parazitem je komplikovaná, protože zde existuje 22 různých druhů parazitů a tudíž i několik různých projevů (viscerální, kožní a slizniční forma, kombinace a ko-infekce s jinými nemocemi), je také finančně náročná a často neefektivní. (Ashford, 1999; Tiuman *et al.*, 2011). V současné době s k léčbě těchto parazitických onemocnění používají soli pětimocného antimonu (od roku 1960), Miltefosin (od roku 2006) nebo antifungální přípravky na bázi imidazolu a triazolu (od roku 1990). Standardně se využívá i léčba Amfotericinem B, který je kvůli svým velice závažným vedlejším účinkům používán jako pomyslná „poslední linie obrany“ (Tiuman *et al.*, 2011). V rámci své diplomové práce se zaměřím na přípravu Sanguinolignanu A, látku s potencionálními antileishmaniálními vlastnostmi (Cabanillas *et al.*, 2010). Tato látka je založena na struktuře rostlinných sekundárních metabolitů fenypropanoidového typu, o které se již delší dobu v naší skupině zabýváme. Po přípravě Sanguinolignanu A ověřím jeho navrženou strukturu a očekávanou biologickou aktivitu na promastigotech *L. turanica*. Také se pokusím připravit další strukturně obdobné deriváty vhodné pro případnou studii porovnávací aktivitu se strukturními modifikacemi.

2. Současný stav řešené problematiky

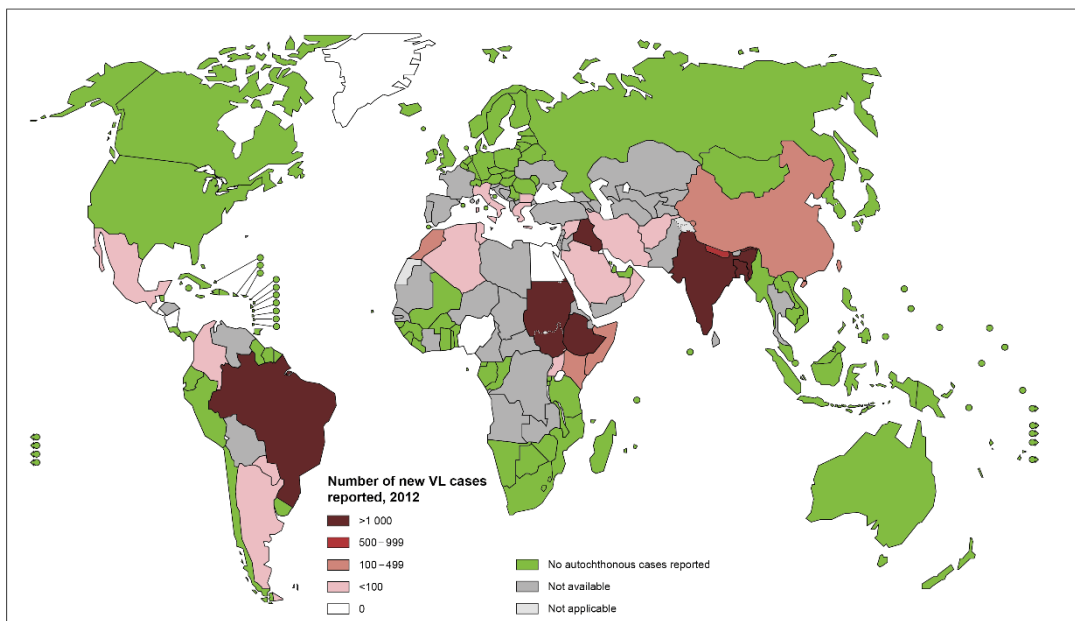
Od počátku rozvoje oboru tropické medicíny, jejímž jakýmsi patronem je zakladatel tropické medicíny sir Patrick Manson, který jako první objevil, že hmyz je schopen přenášet infekční agens, lékaři a vědci bojují s řadou zákeřných a mnohdy nevléčitelných nemocí (Molyneux, 2012). K nejznámějším a nejzávažnějším onemocněním patří AIDS (virus HIV), malárie nebo ebola, jejichž problematika je intenzivně řešena. Vedle těchto mediálně známých nemocí ale existuje skupina méně známých chorob, která postihuje obrovský počet obyvatel chudých a rozvojových zemí. Z tohoto důvodu světová zdravotnická organizace vydala seznam tzv. 16 nejvíce opomíjených chorob. Tyto choroby mají na svědomí obrovský počet obětí a proporcčně postihují největší procento populace na zemi. Na tomto seznamu 16 chorob je i leishmanióza (Molyneux, 2012).

Leishmanióza, někdy nazývaná jako *Kala Azar*, *black sickness* nebo *black fever*, je parazitické onemocnění charakteristické velkou škálou druhů, které ji mohou způsobovat, stejně jako komplexitou klinických příznaků, které ji provází (Herwaldt, 1999). Odhaduje se, že ročně přibude až 1,6 milionů nových případů. V oblastech s vysokým rizikem nakažení žije až 350 milionů osob v 98 zemích světa (internetový zdroj 12). Počet případů nakažení narůstá každým rokem. Klimatické změny posledních let umožnily expanzi leishmanie daleko za hranice jejího přirozeného ekotopu a zvýšily tak riziko nákazy pro člověka (Tiuman *et al.*, 2011). Epidemiologická, genetická a etiologická variability choroby, klimatické změny a migrace lidí a přenašečů redefinují leishmaniózu v nestabilní a nepředvídatelné onemocnění. Pro prevenci a úspěšnou léčbu je tedy třeba zvládnout jak medicínální stránku (zvýšení zdravotnické péče, přístup k lékům), tak i tu nemedicínální (koordinace technické i finanční podpory, dat a spolupráce mezi odborníky z celého světa) (internetový zdroj 16).

Cíle WHO jsou přiřadit leishmanióze statut nemoci podléhající kontrole WHO, dále pak identifikace environmentálních a socioekonomických faktorů, které usnadňují její přenos a také vytvoření nových národních programů a sítí laboratoří pro prevenci, optimalizaci a zvýšení dostupnosti léčebných postupů (internetový zdroj 16). Tomuto programu se v poslední době dostává více pozornosti, neboť se onemocnění způsobené těmito parazity stále častěji začíná vyskytovat i ve vyspělých zemích. Z tohoto důvodu také zaznamenáváme nárůst zájmu o tuto nemoc a její léčbu (např. nadace Melisy a Billa Gatese, 2012) (Herwaldt, 1999).



Obrázek 1: Mapa rozšíření kožní formy leishmaniózy ukazuje nejvyšší incidenci onemocnění v oblastech Jižní Ameriky, severozápadní části Afriky a Středního východu. Převzato z internetového zdroje 5.



Obrázek 2: Mapa rozšíření viscerální formy onemocnění. Nejvyšší incidence je soustředěna do oblastí Brazílie (Jižní Amerika), Súdánu a jižního Súdánu, Etiopie (Afrika) a Indie (Asie). Převzato z internetového zdroj 6.

2.1 Leishmania

Leishmania je eukaryotní jednobíčíkatý mikroorganismus, který se dále řadí do třídy Bičivek (*Kinetoplastida*), řád Trypanosomy (*Trypanosomatidae*), rod *Leishmania*. Existuje 30 *Leishmaniálních* druhů, z toho 20 přímo patogenních pro člověka, které se vyskytují jak ve starém světě (Evropa, Asie a Afrika) tak i v novém světě (S a J Amerika). Rozšíření choroby je znázorněno v obrázku 1. a 2. *Leishmania* je dělena do dvou podrodů *Leishmania* (nacházející se v novém i starém světě) a *Viannia* (pouze v Jižní Americe) (Lukes *et al.*, 2007)

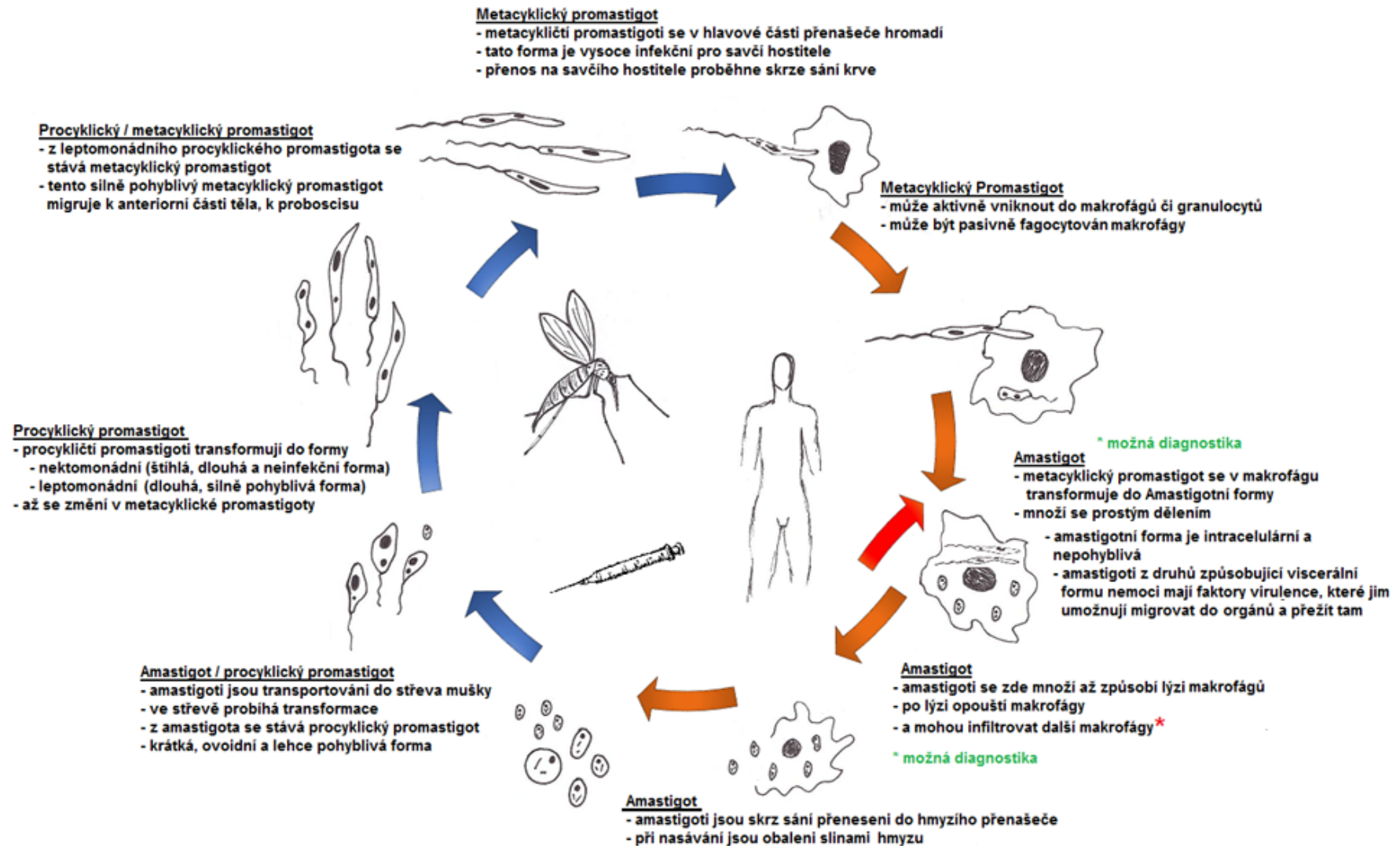
Vzhledem k parazitní formě života je vývoj tohoto organismu podmíněn přítomností hostitele. Více než 20 druhů *leishmanie* je schopno u člověka vyvolat nemoc, ale pouze dva druhy (*L. tropica* a *L. donovani*) člověka pro svůj vývoj přímo vyžadují. Do hostitele se dostanou skrz kousnutí písečnou muškou (*sandfly*) a vyvolávají viscerální formu nemoci (Santos *et al.*, 2014). *Leishmania* je dimorfický organismus, což znamená, že je schopen existovat ve dvou morfologických stavech v průběhu životního cyklu. První morfologický stav je forma amastigota, která se vyskytuje v mononukleárním fagocytárním systému savčího hostitele. Druhá forma - promastigotická je přítomna v zažívacím traktu přenašeče (Bates, 2007). Životní cyklus leishmanie je znázorněn v Obrázek 3.

2.2 Vývoj

Dimorfický životní cyklus parazita je definován měnicími se podmínkami v průběhu životního cyklu. Přenos parazita probíhá skrze krev sající samičky písečné mušky náležící do řádu *diptera* rodiny *Psychodidae* (Santos *et al.*, 2014). V této rodině je 700 druhů mušek a z toho 10 z nich slouží jako přenašeči pro *leishmanii* (Bates, 2007).

Nakažená samička písečné mušky infikuje savčího hostitele metacyklickými promastigoty. Ty jsou fagocytovány buňkami imunitního systému hostitele. Makrofágy jsou nejdůležitějšími buňkami pro proměnu parazita. Uvnitř makrofágu ve fagolysozomu vzrůstá teplota a klesá pH, to indukuje proměnu promastigota na amastigotní (intracelulární) formu. Amastigot pak může dále infikovat další makrofágy a může dojít ke vzniku onemocnění v závislosti na virulenci parazita a na imunitním stavu nakaženého hostitele – člověka. Dále může být nasát zpět do trávicího traktu mušky (Alvar *et al.*, 1997). V této fázi je parazit přichycen ke stěně trávicího traktu mušky. V trávicím aparátu amastigot diferencuje do procyklického, NECTOMONÁDNÍHO (neinfekčního) promastigota. Tato forma promastigota je migrující formou a je schopna migrovat stěvem písečné mušky směrem k anteriorní části. Tam začíná tento promastigot diferencovat do formy prodlouženého silně pohyblivého a infekčního LEPTOMONÁDNÍ PROMASTIGOTA. Tato forma je zodpovědná za sekreci PSG gelu – *promastigote secretary gel*, který je

klíčový pro přenos (Rogers *et al.*, 2002). Paraziti tohoto stádia se v přední části trávicího ústrojí a v proboscisu hromadí a čekají, až budou přeneseni do savčího hostitele, kde mohou pokračovat v jejich cyklu (Bates & Rogers, 2004; Kamhawi, 2006).



Obrázek 3: Životní cyklus *Leishmanie*. Překresleno a upraveno z internetových zdrojů 2, 8 a 11.

2.3 Patogenita

Existují tedy 3 klíčové komponenty pro úspěšný přenos a šíření *leishmanie*. Jsou to metacyklická forma parazita, PSG gel a sliny produkované muškou. Poslední dvě komponenty jsou důležité zejména pro urychlení přenosu a zvýšení patogenního dopadu pro hostitele. Přítomnost PSG gelu zatím nebyla prokázána u všech druhů (Rogers *et al.*, 2002). Velkou otázkou leishmaniózy je důvod proč u některých druhů zůstávají amastigoti pouze v kůži a jiné migrují do orgánů (*L. infantum*, *L. donovani*). Přes 15 – 100 milionů let rozdílné evoluce zůstává genom leishmaniálních druhů vysoce konzervovaný (obsahuje jen 1 % specifických genů). Porovnávání těchto genomů odhalilo 8000 genů. Z toho pouze 14 genů specifických pro *L. major*, 2 geny specifické pro *L. mexicana*, 19 genů specifických pro *L. infantum* a 67 genů specifických pro *L. braziliensis* (Rogers *et al.*, 2011). Výzkum druhově specifických genů a jejich proteinů u *leishmanie* je slibným nástrojem pro studium biologie a patogenity těchto parazitů. Doposud se uvažuje nad několika geny/proteiny, které hrají významnou roli ve viscerální formě nemoci. Nejstudovanější A2 gen představuje slibnou možnost vývoje vakcinace proti parazitům u psí leishmaniózy a tedy i možnou vakcinalizaci u lidských onemocnění. (Santos *et al.*, 2014). A2 je druhově specifický gen, jenž kóduje A2 protein, jeden z faktorů virulence, který umožňuje přežití parazita ve viscerálních orgánech. Deficience A2 proteinů za použití antisense RNA nebo genovým knock outem vede u *L. donovani* k potlačení schopnosti přežít ve viscerálních orgánech (Zhang *et al.*, 2003).

2.4 Epidemiologie

Leishmanióza je endemická v oblastech tropů, subtropů, dále v oblastech jižní Evropy a deštných lesů Jižní Ameriky a především pak v oblastech západní a střední Asie. Až na pár výjimek je člověk náhodným hostitelem. Kvůli narůstajícímu počtu obyvatelstva a vzrůstající migraci je tato incidence náhodného hostitele stále častější. (Herwaldt, 1999). V oblastech, kde se doposud leishmanióza nevyskytovala, byli nahlášeni pacienti, kteří v sobě s největší pravděpodobností nesli parazita, ale byly bez klinických příznaků a manifestace choroby nastala až v době potlačení imunity hostitele třeba jinou nemocí v řádech měsíců či let po nakažení (Alvar *et al.*, 1997).

V Evropě byly detekovány epidemiologické změny u případů viscerální leishmaniózy v posledních pár letech. V jihozápadní Evropě byla viscerální leishmanióza tradičně chorobou dětí (70 % případů byla tato nemoc diagnostikována u dětí pod 15 let). Díky koinfekci s virem HIV teď postihuje převážně dospělé (převážně v rozmezí 31 – 50 let života) (Desjeux & Alvar, 2003). Více než 90 % kožní formy onemocnění se objeví v Afghánistánu, Saudské Arábii, Alžíru, Brazílii, Iránu, Iráku, Sýrii a Súdánu. 90 %

viscerálních případů je lokalizováno v Indii a Súdánu. Přibližně 350 milionů osob žije v oblastech aktivního výskytu leishmanie. Z epidemiologického pohledu je leishmanióza brána jako zoonóza (nákaza zvířat přenosná i na člověka) i jako antroponóza (infekce přenosná pouze mezi lidmi) (Alvar *et al.*, 1997).

2.5 Choroba

Parazitě z rodu *Leishmania* způsobují tři hlavní klinické formy onemocnění – kožní, viscerální a slizniční. Tyto formy se mohou kombinovat mezi sebou nebo se přidružují ve velmi závažné koinfekce s jinými onemocněními (Herwaldt, 1999).

Vznik, šíření a projev nemoci je ovlivňován mnoha faktory, které nástup a průběh nemoci ovlivňují. Mezi tyto faktory se řadí genetická výbava a variabilita hostitele a přenašeče, specifika imunitního systému hostitele a jeho celkový zdravotní stav, variabilita a vnitřní prostředí přenašečů a environmentální prostředí (oblast výskytu). Hlavním a nejdůležitějším faktorem je ale druh parazita, který infikuje pacienta (Tabulka 1). Ostatní faktory pouze modulují infekci (Peacock *et al.*, 2007).

2.5.1 Viscerální forma

Viscerální leishmanióza (VL), nebo také *Kala Azar*, je chronické onemocnění a je tou nejzávažnější formou, při kterém paraziti opouští místo inokulace a migrují do vitálních orgánů viscerální oblasti – sleziny, jater, ale také do kostní dřeně. Jsou schopni zcela potlačit imunitu hostitele a způsobují závažné poškození organismu. Stav pacienta se při neléčených případech zhoršuje, což následně vyústí v jeho smrt (Tiuman *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2005). VL je způsobena *L. donovani* a *L. infantum* a vzácně i *L. amazonensis* (Barral *et al.*, 1991; Almeida *et al.*, 1996). I přes úspěšnou léčbu ale může VL časem znovu vzplanout v (PKDL) Post-kala-azar-dermální leishmaniózu (Murray *et al.*, 2005).

2.5.2 Kožní forma

Kožní forma je charakteristická lokalizovanými samohojícími se či v horším případě těžko hojícími se kožními lézemi (Obrázek 4), které vedou k následné imunitě nakaženého (Lynn & McMaster, 2008). Replikace parazita a formování lézí začíná do několika dnů či měsíců v místě bodnutí. Kožní léze gradují z papulů (pupínků) do nodulů (uzlíků) a následně do vlhkých ulcerózních vředů s typickým vulkánovitým vzhledem. Vředy jsou obvykle samohojící, ovšem tento proces trvá i několik měsíců až let. (Santos *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2005; internetový zdroj 12).

Difúzní kožní leishmanióza (DCL) je anergickou formou nemoci u pacientů, u kterých imunitní systém hostitele nereaguje specificky na antigeny parazita. Léze se

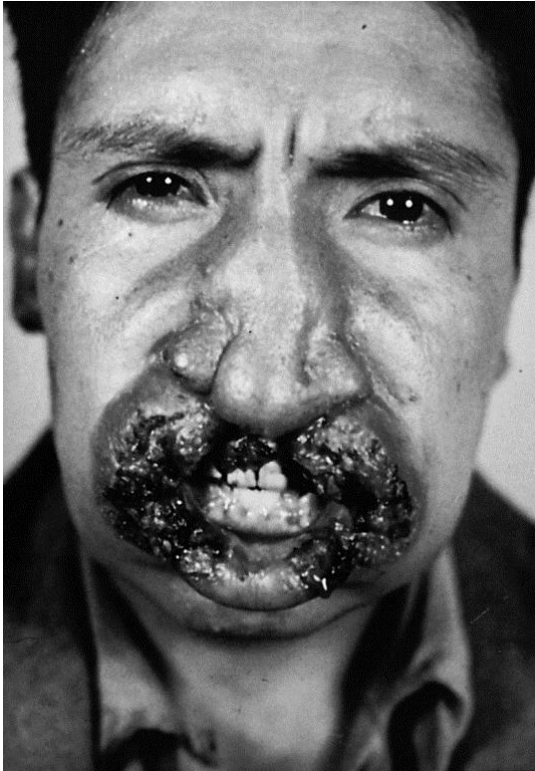
nehojí a nereagují na jakoukoli léčbu. DCL je způsobována hlavně *L. mexicana*, *L. amazonensis* (Jižní Amerika) a *L. aethiopica* (Evropa, Asie, Afrika) (Goto & Lauletta-Lindoso, 2012).



Obrázek 4: léze pacienta trpící kožní leishmaniózou (internetový zdroj 4)

2.5.3 Slizniční forma

Slizničně (mukózní) forma (ML) se nejdříve projevuje jako kožní leishmanióza s přítomností kožních lokalizovaných lézí, které mohou následně metastázovat jako kožně-slizniční léze s následným rozšířením do sliznic. Tento proces může trvat i několik let. Rychlost a rozsáhlost postižení je způsobeno rychlou replikací parazita v makrofázích hostitele a tím pak v celém fagocytyjícím systému, v kůži a v naso-orofaryngeálních sliznicích (Santos *et al.*, 2014). Klinické symptomy zahrnují ulceraci sliznic nosu a úst, následuje perforace nosního septa a destrukce sliznic a chrupavek nosu, úst a krku (znázorněno v Obrázek 5 a 6). Překvapivě ke smrti u těchto pacientů ve většině případů vede sekundární bakteriální infekcí. Nejčastějším původcem této formy je *L. braziliensis*, v menší míře i *L. panamensis* a *L. guyanensis* (*Viannia*) (Murray *et al.*, 2005; internetový zdroj 15).



Obrázek 6: Fotografie pacienta, který trpí kožní a slizničně-kožní formou onemocnění. Na obrázcích je názorně viditelná destrukce kůže a sliznic obličeje parazity (internetový zdroj 3).



Obrázek 5: Fotografie pacientky, která trpí kožní a slizničně-kožní formou onemocnění. Na obrázcích je názorně viditelná destrukce kůže a sliznic obličeje parazity (internetový zdroj 1).

2.5.4 Koinfekce

První hypotézy o koinfekci byly založeny na prevalenci pozitivní intradermální reakce u pacientů s *leishmanií*, kteří jsou ale bez klinických projevů. Tito pacienti jsou tedy asymptomatictí a nesou v sobě neaktivní *L. infantum*. Amastigoti *L. infantum* jsou nečinní až do okamžiku, kdy dojde k oslabení imunitního systému hostitele jinou nemocí, nejčastěji virem HIV. Poté se nemoc plně vyvine a nastanou klasické příznaky viscerálního syndromu (Alvar *et al.*, 1997). Přenos *leishmanie* na HIV pozitivní pacienty se děje skrz bodnutí písečnou muškou nesoucí parazita tak jako u normální populace, dále je ale možný i přenos skrz infikovanou jehlu tzv. umělý přenos. Jehla pak nahradí samotné bodnutí hmyzem a metacyklogeneze pak není nutná (Alvar *et al.*, 1997).

Virus HIV, respektive nemoc AIDS, se velmi rychle rozšiřuje v rurálních oblastech a viscerální leishmanióza je mnohem více běžnější v suburbánních oblastech Asie, Afriky a Jižní Ameriky. Díky migraci se tyto oblasti střetávají a míra vzniku koinfekcí se neustále zvětšuje. Doposud byly hlášeny případy z celkem 35 zemí světa, nejvíce však z jihozápadní Evropy do roku 2003 bylo nahlášeno 1911 případů ve Španělsku, Francii,

Itálii, Portugalsku a očekávalo se, že incidence poroste a to hlavně v západní Africe (Desjeux & Alvar, 2003).

Z klinických studií plyne, že nejvíce asociovaná s virem HIV je právě viscerální leishmanióza a to zejména v oblastech jihovýchodní Evropy. Případy těchto koinfekcí narůstají právě kvůli narůstajícím počtům pacientů s HIV a leishmanií a neustálého se zvětšování a překrývání geografických oblastí, kde se tyto nemoci vyskytují. (Desjeux & Alvar, 2003).

Tabulka 1: Shrnutí různých klinických manifestací leishmaniózy. Upraveno dle (Santos *et al.*, 2014)

| Forma nemoci | Projevy | Druh parazita | Výskyt |
|--|--|--|---|
| Kožní | ulcerózní červené kožní léze v místě bodnutí | <i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. major</i> | Amerika Amerika Afrika, Asie, Evropa |
| Slizničně-kožní | destrukce sliznice a okolní tkáně úst, nosu a krku lézemi | <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. aethiopica</i> | Amerika Amerika Afrika, Asie, Evropa |
| Difúzní kožní | roztroušené chronické kožní léze připomínající lepromatózní granulomy | <i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. aethiopica</i> | Amerika Amerika Afrika, Asie, Evropa |
| Viscerální (Kala-azar) | horečka, ztráta tělesné hmotnosti, splenomegalie, otok jater a anemie. | <i>L. infantum</i> (<i>syn. L. chagasi</i>) <i>L. donovani</i> | Afrika, Asie, Evropa, Amerika Afrika, Asie, Evropa |
| Post-KALA-azar dermální syndrom | relaps choroby po léčbě viscerálního syndromu | <i>L. infantum</i> (<i>syn. L. chagasi</i>) <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> | Afrika, Asie, Evropa, Amerika Afrika, Asie, Evropa Afrika, Asie, Evropa |

2.5.5 Leishmanióza jako zoonóza

Psi jsou vysoce náchylní k infekci ve většině případů způsobené *L. infantum* – psi viscerální leishmanióze (Canine visceral leishmaniasis – CVL), potencionálnímu velmi závažnému onemocnění, ačkoli ne u všech infikovaných psů se choroba rozvine (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Někteří psi jsou schopni se kompletně uzdravit z infekce, někteří jsou nakažení, avšak zůstávají asymptomatictí a u některých se rozvine infekce s různou závažností, od malých kožních lézí až po generalizovanou infekci se ztrátou srsti, kachexií a ledvinovým selháním, což může vyústit ve smrt zvířete. (Costa *et al.*, 2003; Ordeix *et al.*, 2005). Úzký vztah mezi psem a člověkem zvyšuje riziko přenosu infekce z psa na lidského hostitele. V Brazílii pro snížení rizika přenosu zavedli několik opatření, mezi něž patří i eutanazie séropozitivních psů. Ovšem efektivita tohoto opatření je stále diskutabilní. (Shaw, 2007; Miro *et al.*, 2008).

Kromě psů existuje řada jiných přirozených rezervoárů pro *leishmanii* (lenochodovití, pásovcovití, kočkovití, damani, hlodavci, primáti, vačnatci, lichokopytníci) (Dantas-Torres, 2007). U druhů *L. arabica*, *L. major*, *L. tropica*, *L. peruviana*, *L. donovani* byly zdokumentovány případy psů nositelů, ale jejich role v přenosu je jen malá. (Dantas-Torres, 2007).

2.6 Léčba

Přenos parazitů *leishmanie* nemůže být kontrolován a doposud neexistuje žádná vakcinace. V takovém případě je tedy nutné alespoň minimalizovat dopad a šíření infekce rychlou detekcí parazitů a správnou terapií (Ashford, 1999).

Samotná léčba leishmaniózy je dělena na lokální či systémovou terapii. Výběr jednoho ze dvou přístupů léčebného protokolu kožní formy leishmaniózy je ovlivněn rizikem přidružení dalšího syndromu – rozvoje slizniční formy onemocnění. Slizniční syndrom je způsoben hlavně *L. braziliensis*, ale byl již popsán u *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*. Rozvoj slizničního syndromu záleží na geografické oblasti a tudíž i druhu. (Blum *et al.*, 2004).

Lokální léčba je podávána pacientům s malými izolovanými lézemi do průměru 5 cm. Systémová léčba je pak nasazena v případě zhoršujících se symptomů, komplikací a lézí, které nereagují na lokální léčbu a u lézí s větším průměrem. U těhotných žen a pacientů s kontraindikacemi, jako jsou kardiaci, se systémová léčba nedoporučuje a je nasazena lokální léčba kožních lézí. V případě viscerální formy nelze nasadit lokální léčbu a je rovnou zahájena systémová léčba (Blum *et al.*, 2004).

2.6.1 Klinicky dostupná medikace

Na trhu je několik variant použitelných jak pro systémovou tak pro lokální léčbu. Existují léky první volby u jednotlivých forem onemocnění, volba však záleží na více faktorech. Výběr lékaře bývá ovlivněn dostupností léčiva, rizikem rozvoje další formy, fází onemocnění, vedlejšími účinky léčiva, cenou a formou podání a v neposlední řadě typem onemocnění (Blum *et al.*, 2004).

Klasickým postupem při léčbě leishmaniózy je v celosvětovém měřítku stále aplikace solí antimonu (Sb^{+5}), a to buď ve formě Stiboglukonátu sodného (Pentosam) nebo ve formě Megluminu antimonátu (Glucantime-Aventis Pharma, Suzano, Sp-Brazil). Soli antimonu stále zůstávají lékem první volby, a to i přes jejich velkou toxicitu, dlouhodobou léčbu a závažné vedlejší účinky z toho vyplívající. V posledních letech bylo dále povoleno použití dalších preparátů pro léčbu jak kožní tak i viscerální formy leishmaniózy. Jmenovitě Paromomycin (Aminosidine), lipidová forma Amfotericinu B, Miltefosin a Sitamaquine a dále pak látky standardně užívané pro jiná onemocnění jako jsou azoly, Itraconazol, Ketaconazol, Fluconazol. Bohužel ani jeden z nově vyvinutých nebo uznaných léků či léčivých forem nedosahuje účinků nejčastěji užívaných –

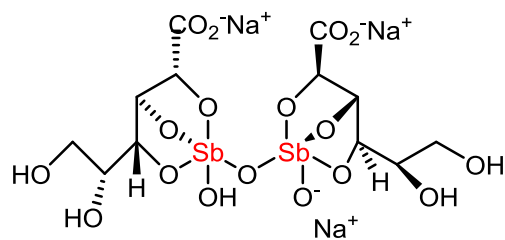
Pentosamu™ a Glucantimu™ nebo léčivých forem založených na Amfotericinu B (Blum *et al.*, 2004).

2.6.2 Deriváty antimonu

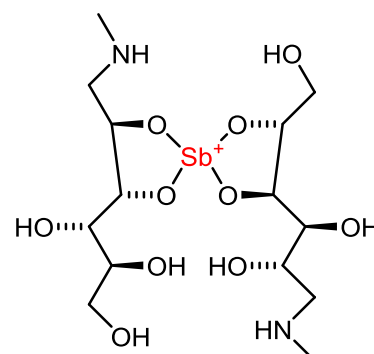
Deriváty antimonu jsou využívány k léčbě kožního syndromu již od 60. let 20. století. Mechanismus účinku je stále neobjasněn. Podle různých výzkumných prací je nejpravděpodobnější, že dochází k inhibici ATP syntetázy. Podání tohoto léku je pouze parenterální a má mnoho vedlejších účinků (Herwald & Berman, 1992; Aronson *et al.*, 1998; Seaton *et al.*, 1999).

Soli antimonu

Soli antimonu byly objeveny jako účinná látka pro léčbu leishmaniózy před sto lety (Croft *et al.*, 2006). Mechanismus jejich účinku zůstává zatím neobjasněn. Antimoglukonát sodný či meglumin antimonu má buď intramuskulární či intravenózní administraci v dávce obvykle 20 mg/kg po dobu 20 až 30 dní. Vedlejší účinky jsou mírně závažné až závažné. Projevují se především v podobě myalgie, artralgie, abdominálních problémů, bolestí hlavy či zvýšené hladiny aminotransferáz a amyláz a v nejhorším případě i smrt pacienta (Vásquez *et al.*, 2006).



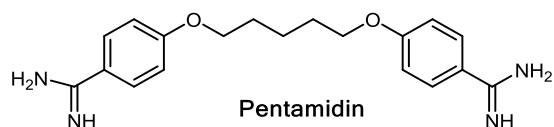
Antimonoglukonát sodný



Meglumin antimonu

2.6.3 Pentamidin

Chemicky se jedná o aromatický diamidin, který vykazuje velkou toxicitu pro protozoa, houby a především *leishmanii*, dále také *Pneumocystis carinii* i pro africkou trypanozomu. Stejně jako u solí antimonu je mechanismus účinku stále neznámý. Pentamidin se používá jako alternativa pro soli antimonu, a to zejména pro kožní formu leishmaniózy ve francouzské Guyaně vyvolanou *L. guyanensis*, která je zodpovědná za 90 % případů nakažení v této oblasti (Nacher *et al.*, 2001). Bohužel dávka vyšší nad 2000 mg za den, která je vyžadována v případech slizniční formy, má vedlejší účinky v podobě diabetu mellitu (Amato *et al.*, 1998).

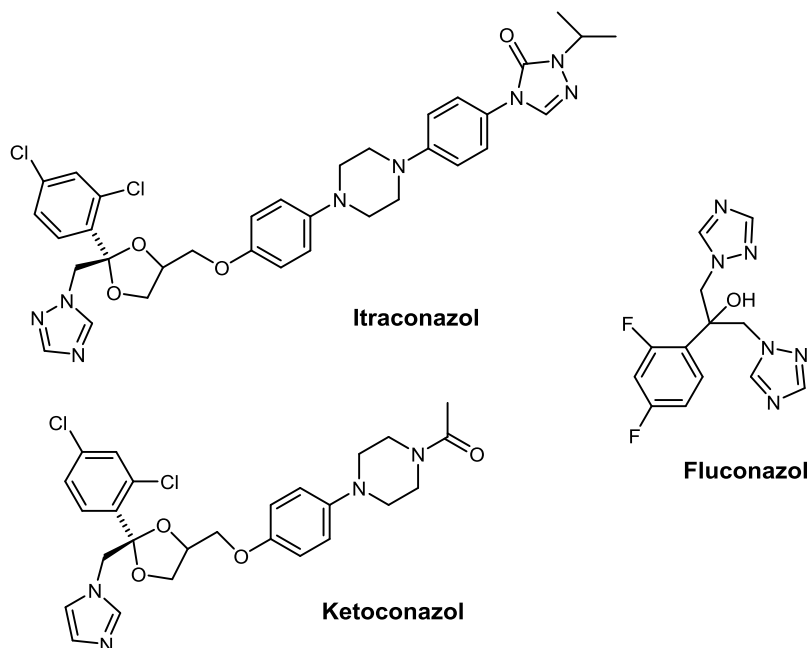


Pentamidin

2.6.4 Imidazoly/Triazoly

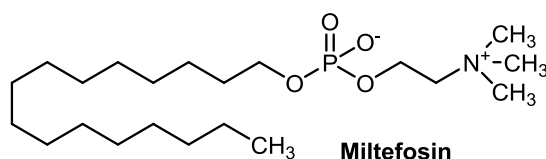
Na trhu jsou imidazoly a triazoly díky svým antimykotickým účinkům, ale vykazují i antileishmaniální aktivitu. Velkou výhodou těchto přípravků je jejich orální podání, bohužel jsou účinné pouze proti některým druhům *leishmanie* (Alrajhi *et al.*, 2002).

Vybrané azoly/triazoly



2.6.5 Miltefosin

Miltefosin – alkylfosfolipid byl vytvořen jako orální antineoplastické sérum proti kožní formě rakoviny. Zjištění jeho účinků proti *leishmanii* vedlo k vytvoření nové skupiny antiprotozoálních léčiv. Miltefosin, schválen jako Impavide™, se zdá být efektivní jak u viscerální tak i u kožní formy onemocnění. A to i v případech antimon rezistentních forem onemocnění (Tiuman *et al.*, 2011). Dávkování je 133 – 150 mg/den po dobu tří až čtyř týdnů. Tělo pacienta po terapii nevykazuje žádné parazity a u 94 % pacientů kompletní re-epitalizaci poškozené kůže po 3 měsících. Na druhou stranu Miltefosin vykazuje řadu vedlejších účinků jako gastrointestinální obtíže, nevolnost, bolesti hlavy či zvýšené hodnoty jaterních enzymů. Navíc vykazuje teratogenní účinky (Soto *et al.*, 2001).

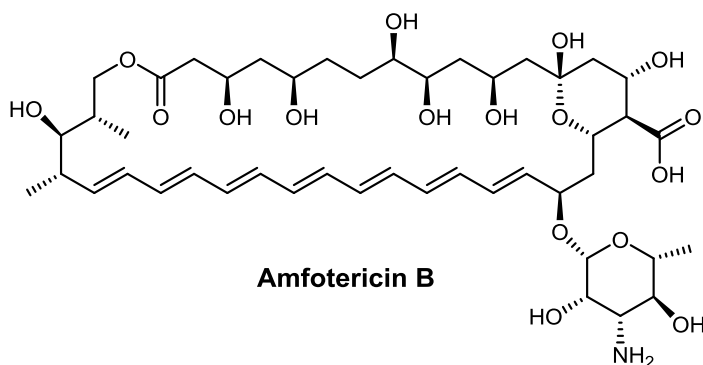


2.6.6 Amfotericin B / liposomální forma Amfotericinu B

Antileishmaniální chemoterapie zaznamenala pokrok od objevu lipidové formy amfotericinu B, která vykazuje sníženou toxicitu oproti klasické formě Amfotericinu B.

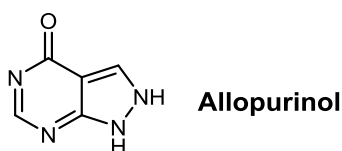
Antimykotický přípravek Amfotericin B deoxycholate je aktivní téměř proti všem druhům *leishmanie*. Ale i zde jsou jeho nevýhodou silné vedlejší účinky jako hyperpyrexie (horečka nad 40 °C), malátnost, hypotenze, zánět žil provázen srážením krve, azotemie (zvýšený obsah dusíku v krvi nebílkovinné povahy), poškození renálních tubulů, hypokalemie, anemie a hepatitida.

Pro odstranění těchto vedlejších účinků byly vyvinuty nové lipidové varianty s o poznání nižší toxicitou. Tyto formy léků již byly úspěšně použity při léčení viscerální leishmanie (Blum *et al.*, 2004). Liposomální formulace AmBisome™, lipidový komplex Abelcet™ či disperzní směs Amphocil™ již byly úspěšně testovány v klinických studiích pro viscerální a slizničně-kožní formu leishmaniózy, avšak vysoká cena komplikuje využití těchto léků v zemích třetího světa (Tiuman *et al.*, 2011).



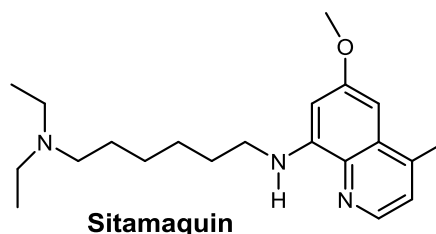
2.6.7 Allopurinol

Allopurinol je analog hypoxantinu a jeho účinnost je vázáná se současných použitím solí na bázi antimonu. V kombinaci s pentavalentem nebo stiboglukonátem zvyšuje jejich efektivitu z 36 – 39 % až na 71 – 74 %. Mechanismus účinků není znám, avšak důležité je, že Allopurinol nezvyšuje toxicitu léčby (Martinez & Marr, 1992).



2.6.9 Sitamaquin

Sitamaquin je jedním z dalších slibných orálně podávaných léčiv pro léčbu viscerální leishmanie v Africe. Klinické testy prováděné na pacientech (61 osob) v Keni ukázaly efektivnost léčby Sitamaquinem, avšak stále se závažnými vedlejšími účinky jako jsou bolest hlavy, abdominální bolesti a závažné renální postižení (Wasunna *et al.*, 2005).



2.7 Rezistence

Již přes 60 let se soli antimonu využívají jako univerzální lék při léčbě leishmaniózy. Avšak zhruba před 15 lety se začaly objevovat první rezistentní kmeny (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997; Lira *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2001; Abdo *et al.*, 2003; Croft *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2006). V současnosti je rezistence obrovským problémem v Indii a Nepálu, kde až 60 % pacientů neodpovídá na léčbu solemi antimonu (Internetový zdroj 12) a pro účinnost musí být pětímocný antimon redukován na toxičtější, ale aktivnější třímocný antimon. Ten pak interaguje rychleji s pravděpodobnými cíli parazita – tripanothion reduktázou, glutation reduktázou a s enzymy zúčastňující se β -oxidace mastných kyselin a glykolytické dráhy (Berman *et al.*, 1982; Cunningham *et al.*, 1994; Wyllie *et al.*, 2004). S narůstající rezistencí se začalo využívat léků druhé volby jako Amfotericinu B a dalších, u kterých je otázkou času další rezistence (Internetový zdroj 14).

2.8 Sanguinolignan A

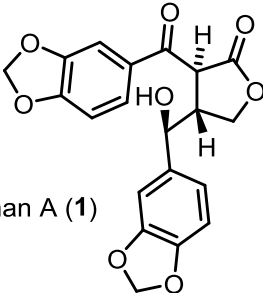
Zdlouhavost a nežádoucí vedlejší účinky stávajících léčebných látek a postupů spolu se vzrůstající rezistencí vůči existujícím léčebným postupům a léčivům nás nutí k hledání nových léčiv a klinických postupů. Tradiční léčba v latinské Americe založená na rostlinných extraktech místních rostlin obsahujících mnoho sekundárních rostlinných metabolitů s různým chemickým složením je tak relativně rychlou možností jak najít nová léčiva a léčebné postupy pro parazitární ale i jiná onemocnění. Screening extrahovaných, látek popřípadě jejich směsí, nám umožňuje získat velké množství dat o strukturně různorodých látkách. Tyto látky pak mohou být testovány přímo na promastigotech, axenických amastigotech i na intracelulárních amastigotech *leishmanie*. Takto prováděné pokusy prokázaly, že testy na axenických amastigotech mají nejenom prokazatelně relevantnější výsledky, ale jsou bezpečnější pro okolí díky jejich snadné manipulaci (Tiuman *et al.*, 2011).

Zástupci z čeledi *Piperaceae* poskytují extrakty s vysoce zajímavými a potencionálně využitelnými látkami. Fytochemická analýza rostlin z rodu *Piper* odhalila několik skupin antiprotozoálních látek zahrnující alkaloidy, lignany, chalkony, dihydrochalkony. (Parmar *et al.*, 1997; Jenett-Siems *et al.*, 1999; Rukachaisirikul *et al.*, 2002; Lee & Ley, 2003; Rukachaisirikul *et al.*, 2004). Kromě obecných antiprotozoálních účinků mají látky obsažené v rostlinách různých druhů *Piper* i antileishmaniální účinky (Ovadje *et al.*, 2014).

Jednou ze slibných přírodních látek s *in vitro* leishmanicidními účinky obsahují listy rostliny známé jako *Piper sanguineispicum* Trel. Extrakty z této rostliny jsou využívány pro své protizánětlivé účinky peruánskou etnickou skupinou zvanou Chayahuitas a vykazují také leishmanicidní účinky proti axenickým amastigotním formám *L. amazonensis* (Estevez *et al.*, 2007; Odonne *et al.*, 2009). Jednou z látek izolovaných z *Piper sanguineispicum* Trel. je (–)-Sangunolignan A (**1**) (obrázek 4). Tato látka vykazuje leishmanicidní aktivitu (Cabanillas *et al.*, 2010).

Strukturně (–)-Sangunolignan A (**1**) (Tabulka 2) patří do skupiny rostlinných sekundárních metabolitů, lignanů. V rostlinách jsou syntetizovány dimerizací dvou základních jednotek – fenylypropanoidů. Fenylypropanoidy jsou také sekundární metabolity a vznikají z primárního metabolitu, fenylyalaninu. Obecně se lignany v rostlinách podílí na obranných mechanismech, plní roli antioxidantů nebo fungují jako biocidní látky (Gross *et al.*, 2012).

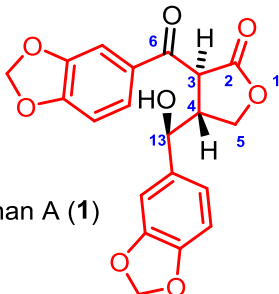
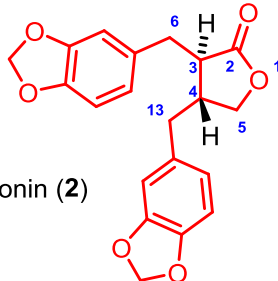
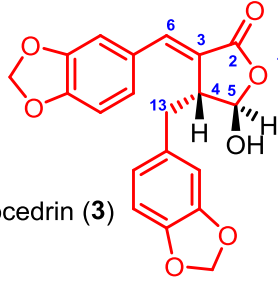
Tabulka 2: (–)-Sanguinolignan A a jeho publikované vlastnosti (internetové zdroje 9, 13 a 7).

| (–)- Sanguinolignan A | |
|--|--|
| ((–)-(8S,7'S,8'R)-3,3',4,4'-bis(methylenedioxy)-7'-hydroxy-7-oxolignano-9,9'-lactone) | |
|  <p>(-)-Sanguinolignan A (1)</p> | |
| Molekulová hmotnost | 384.336234 g/mol |
| Sumární vzorec | C ₂₀ H ₁₆ O ₈ |
| Aktivita IC₅₀: 36,7 μM | Antileishmaniální aktivita proti <i>L. amazonensis</i> |
| Aktivita IC₅₀: 109,4 μM | Cytotoxicita proti fibroblastům podobným <i>Green monkey Vero</i> buňkám. |

Deriváty fenylpropanoidů jsou obecně biologicky aktivní látky s různorodými vlastnostmi a deriváty některých z nich (např. deriváty podophillotoxinu) mají již využity v rámci léčby nádorových onemocnění (Wang *et al.*, 2015). Obecně vykazují sekundární rostlinné metabolity lignanového typu protinádorové, antimitotické, antivirální a antiparazitární vlastnosti (MacRae & Towers, 1984; Ayres & Loike, 1990; Umezawa, 2003).

Z našeho pohledu je struktura sanguinolignanu **A** zajímavá nejenom z důvodu jeho leishmanicidních vlastností, ale i z důvodu jeho strukturní podobnosti s jinými sekundárními metabolity lignanového typu (Cho *et al.*, 2001; Medola *et al.*, 2007). Již na první pohled je patrné, že dané látky mají společný základní skelet a nadále se liší pouze oxidačním stavem na uhlících C-3 až 6 anebo 13. Tudíž i v případě, že Sanguinolignan A (1) nebude vykazovat publikované leishmanicidní vlastnosti, může nám jeho syntéza otevřít příslovečné dveře do světa biologicky aktivních lignanů se zajímavými biologickými vlastnostmi.

Tabulka 3: (–)-Sanguinolignan A a jemu strukturně podobné lignany (Cho *et al.*, 2001; Medola *et al.*, 2007; Cabanillas *et al.*, 2010).

| <u>Struktura</u> | <u>Potenciální účinek</u> |
|---|---------------------------|
|  <p>(–)-Sanguinolignan A (1)</p> | leishmanicidní |
|  <p>(–)-Hikonin (2)</p> | trypanocidní |
|  <p>(+)-Calocedrin (3)</p> | protizánětlivý |

Cílem této diplomové práce tedy bylo připravit Sanguinolignan A (1) a tím potvrdit jeho strukturu (prozatím určena pouze na základě NMR strukturní analýzy) a ověřit zda má daná látka nějaké leishmanicidní vlastnosti.

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Pro jednotlivé kroky byly použity tyto chemikálie: L- Valin, borohydrid sodný (NaBH_4), I_2 , diethylkarbonát, uhličitan draselný (K_2CO_3), triethylamin (TEA), pivaloyl chlorid, LiCl, ethyldiisopropylamin, piperonal, 2,6-lutidine, *tert*-Butyldimethylsilyl triflát, $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 30% vodný roztok H_2O_2 , Na_2SO_3 , BH_3 , síran sodný bezvodý methanol, tetrahydrofuran (THF), dichlormethan (DCM) atp. od firem Sigma-Aldrich, Merck, Lachner, Fluka a Alfa Aesar. Všechny látky byly použity v takové čistotě, v jaké byly dodány, pakliže není uvedeno jinak. 20% vodný roztok KOH, 1 M vodný roztok HCl, nasycený vodný roztok NH_4Cl , nasycený vodný roztok NaHCO_3 a nasycený vodný roztok NaCl byly připraveny v Laboratoři Růstových regulátorů technickým personálem

3.2 Metody a materiál

3.2.1 Organická syntéza

Průběh reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 SIL G/UV₂₅₄ s fluorescentním indikátorem (Machery-Nagel). Spektra nukleární magnetické rezonance byla získána na přístroji Jeol 500 JNM-ECA 500 MHz pracující při frekvenci 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C) a Bruker Avance 300 pracující při frekvenci 300 MHz (^1H) a 75 MHz (^{13}C). Pro měření byla použita následující deuterovaná rozpouštědla: chloroform (CDCl_3), dimethylsulfoxid (DMSO-d_6), methanol (CD_3OD) a aceton (CD_3COCD_3). Kalibrace chemických posunů byla provedena na interní standard nebo signál reziduálního nedeuterovaného rozpouštědla. Syntéza pomocí mikrovlnného reaktoru byla provedena na přístroji CEM Discover SP pracujícím s maximálním výkonem 300 W. Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie na silikagelu. Hmotnostní spektra byla získána na přístroji značky Waters (Q-TOF MICRO).

Vizualizační roztoky

Zásaditý roztok KMnO_4 (9 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , 150 ml 10% NaOH),

Vanilin (2 g vanilinu, 100 ml ethanolu obsahující 1 ml koncentrované H_2SO_4),

Hannesianův vizualizační roztok (12 g fosfomolybdenové kyseliny v 250 ml ethanolu).

3.2.2 Biologické testování

Leishmanicidní aktivita

Pro testování leishmanicidní aktivity byla použita kultura *Leishmania turanica* (MRHO/MN/08/BZ18). Tento kmen je avirulentní (neschopný vyvolat onemocnění). Kultivace těchto promastigotů probíhala v kultivačním médiu RPMI-1640, které obsahovalo 10 % fetálního séra, 2 mM glutaminu a gentamicinu v koncentraci 80 µg/ml (všechny složky kultivačního média jsou ze Sigma-Aldrich) v inkubátoru (Biological thermostat BT 120M, Lab system Praha) při teplotě 25 °C. Před samotným experimentem byl alikvot kultury zafixován roztokem 2% formaldehydu v PBS a pomocí Bürkerovy komůrky byla stanovena koncentrace *leishmanií* (počet promastigotů na 1 ml). Poté byli promastigoti přeneseni do 96jamkové desky v počtu 150.000 buněk na jamku a následující den byli ovlivněni vybranými testovanými látkami v koncentracích 50 a 100 µM. Po 72 hodinové inkubaci byl do jednotlivých jamek přidán roztok alamarBlue® (Invitrogen) a po dalších 6 hodinách byla změřena fluorescence při excitační a emisní vlnové délce 544 nm a 590 nm za použití Fluoroskanu Ascent microplate readeru (Labsystems).

Tato metoda stanovení životaschopnosti je založena na redukci molekul oxidovaného nefluorescenčního barviva resazurinu (Alamar blue) pouze živými buňkami na růžově fluoreskující resorufin, který po ozáření světlem určité vlnové délky emituje záření (O'Brien *et al.*, 2000). Na základě zjištěných hodnot bylo poté stanoveno procento přeživších promastigotů po ovlivnění testovanými látkami v porovnání s neovlivněnou kontrolou.

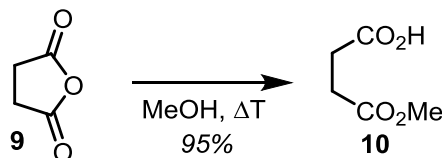
Viabilita lidských nádorových a nenádorových buněk

Vliv na viabilitu lidských nádorových a nenádorových lidských buněk byl studován na linii MCF-7 (odvozená od prsního adenokarcinomu), linii K562 (odvozená od chronické myeloidní leukemie) a na lidských kožních fibroblastech BJ. Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) doplněném o 10% fetální sérum, 2 mM glutamin, streptomycin (100 µg/ml) a penicilin (100 IU/ml) (Sigma Aldrich) v CO₂ inkubátoru (Sanyo) při teplotě 37 °C. Pro potřeby experimentu byly buňky vysazeny do 96jamkových desek v koncentraci 5000 buněk na jamku. O 12 hodin později byly aplikovány testované látky v různých koncentracích. Po 72 hodinách byl k buňkám přidán roztok Calceinu AM a změřena fluorescence při excitační a emisní vlnové délce 485 nm a 538 nm za použití Fluoroskanu Ascent microplate readeru (Labsystems). Ze stanovených hodnot byla vypočítána hodnota IC₅₀.

3.3 Organická syntéza

3.3.1 Cílená syntéza (-)-Sanguinolignanu A

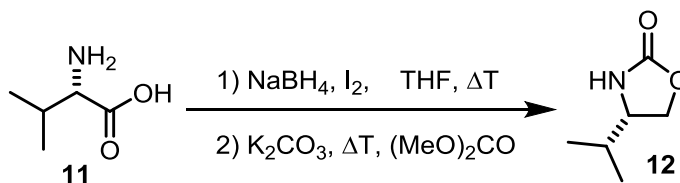
4-Methoxy-4-oxobutanoová kyselina (**10**)



Dihydrofuran-2,5-dion (10 g, 1,0 eq) byl rozpuštěn ve 100 mL MeOH a roztok byl refluxován po dobu 12h. Poté byl roztok schlazen na l.t. a MeOH byl odpařen za sníženého tlaku za vzniku bílé krystalické látky (12,5 g, 95%).

Bod tání: 56-57°C (litt.¹ 57°C); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.64 – 2.68 (m, 4H), 3.75 (s, 3H), 9.50 (broad s, H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 29.8, 31.0, 173.8, 175.7.

(S)-4-isopropylloxazolidin-2-one (**12**)



L-Valin (**11**) (5,9 g, 1,0 Eq) byla přidána do roztoku NaBH₄ (4,7 g, 2,5 eq) v suchém THF (160 mL) za 0°C. Výsledná reakční směs byla míchána při 0°C po dobu 10 minut a poté byl po dobu 1h přidáván roztok I₂ (12.7 g, 1,0 eq) v THF (30 mL). Chladicí lázeň byla odstraněna a reakční směs byla ponechána ohřát se na l.t. Po 13h za l.t. byl opatrně přidán MeOH (do zčeření reakční směsi), a výsledný roztok byl míchán po dobu dalších 30 min. THF byl odpařen a výsledný bílošedý odparek byl rozpuštěn ve 20% vodným roztokem KOH (roztok KOH přidán až do úplného rozpuštění). Reakční směs byla poté míchána za l.t. po dobu dalších 4 hodin. Vodná fáze byla poté extrahována pomocí CH₂Cl₂ (3x 100 mL) a spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (50 mL), sušeny nad Na₂SO₄, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový meziprodukt, valinol, byl poté použit v dalším kroku bez dodatečného čištění.

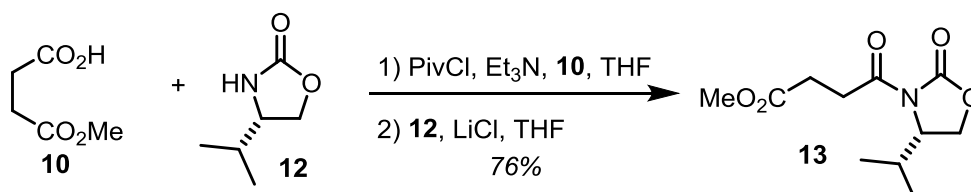
Valinol: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.869 (s, H), 0.910 (s, 6H), 0.919 (s, 2H), 1.547-1.587 (m, H), 2.063-2.132 (m, H), 3.273 – 3.345 (m, H), 3.623-3.655 (m, H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 18.58, 18.59, 31.0, 60.0, 66.5.

¹ Von Wantoch Rekowski, M.; Kumar, V.; Zhou, Z.; Moschner, J.; Marazioti, A.; Bantzi, M.; Spyroulias, G. A.; Van Den Akker, F.; Giannis, A.; Papapetropoulos, A. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8948 - 8952

Valinol z předcházející reakce (1,0 eq), K₂CO₃ (20,9 g, 3,0 eq) a dimethylkarbonát (15 mL) byly smíchány a refluxovány po dobu 4h. Reakční směs byla poté ochlazena na laboratorní teplotu a voda (50 mL) byla přidána. Celá směs byla poté extrahována pomocí CH₂Cl₂ (3x100 mL) a spojené extrakty byly vysušeny nad Na₂SO₄ a odpařeny za sníženého tlaku. Separace surového produktu pomocí flash kolonové chromatografie na silikagelu s použitím petrolether/EtOAc = 4:1 jako eluentu poskytlo produkt **12** (3,71 g, 57%) jako bílou krystalickou látku.

Bod tání: 69–70°C (lit.² 70–71°C); [α]^D +8.0 (c 1.0 in CHCl₃), (lit.² +8.92) (c 1.11 in CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 0.80 (d, *J* = 6.8Hz, 3H), 0.87 (d, *J* = 6.8Hz, 3H), 1.57–1.69 (oct, *J* = 6.8Hz, 1H), 3.51–3.57 (m, 1H), 4.00 (dd, *J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 8.6Hz, 1H), 7.43 (s, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 17.8, 18.2, 32.9, 58.6, 68.8, 160.7.

Methyl (S)-4-(4-isopropyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-4-oxobutanoát (**13**)

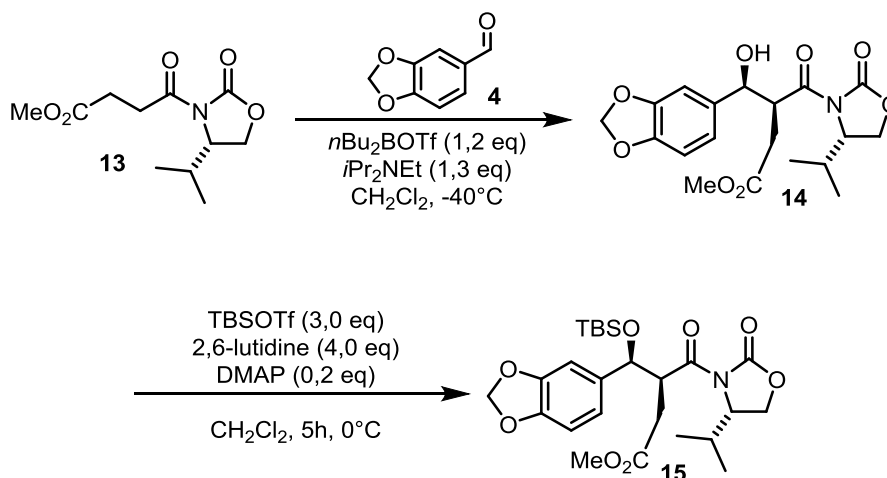


Roztok karboxylové kyseliny **10** (3,0 g, 12,3 mmol, 1,0 eq) a Et₃N (4,46 mL, 2,6 eq) v suchém THF (41 mL) byl ochlazen na -20°C. Do tohoto roztoku byl pomalu přidán Piv-Cl (1,06 mL, 1,05 eq) a výsledná reakční směs byla míchána při -20°C po dobu 1h. Ve vedlejší baňce byla smíchána Evansova chirální pomocná skupina **12** (13,5 mmol, 1,1 eq) s LiCl (27 mmol, 2,2 eq) v suchém THF (24 mL) a výsledná směs byla ochlazena na -25°C. Tento roztok byl poté transferován pod tlakem argonu na směs Piv-Cl aktivované karboxylové kyseliny. Reakční směs byla poté míchána po dobu 3 hodin při -20°C předtím než byla reakce ukončena přidáním 50 mL 1,0M vodného roztoku HCl. Směs byla poté extrahována pomocí EtOAc (3x100 mL) a spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl (100 mL), sušeny nad Na₂SO₄, filtrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Odparek byl čištěn pomocí flash kolonové chromatografie na silikagelu (petroleum ether/EtOAc = 10:1->4:1) a poskytl 2,27g (76 %) cílové látky **13**.

Bod tání: 75-76°C; [α]_D +19,2 (c 1.2 in CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 0.80 (d, *J* = 6.8Hz, 3H), 0.87 (d, *J* = 6.8Hz, 3H), 2.59 (oct, *J* = 6.8Hz, 1H), 3.17-3.21 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 4.05 (dd, *J* = 9.2, 2.9 Hz, 1H), 4.16-4,19 (m, 2H), 4.37 (dd, *J* = 9.2, 7.3 Hz, 1H), 4.36-4.42 (m, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 17.8, 18.2, 28.9, 30.1, 31.3, 51.8, 59.7, 67.8, 156.1, 166.8, 173.8; MS (ESI⁺) *m/z*: 243 [M⁺] (100%), 244 [M⁺+1] (15%).

² Bégis, G.; Cladingboel, D. E.; Jerome, L.; Motherwell, W. B.; Sheppard, T. D. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 1532-1548.

Methyl (3*S*,4*S*)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-((*S*)-4-isopropyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butanoát (**15**)



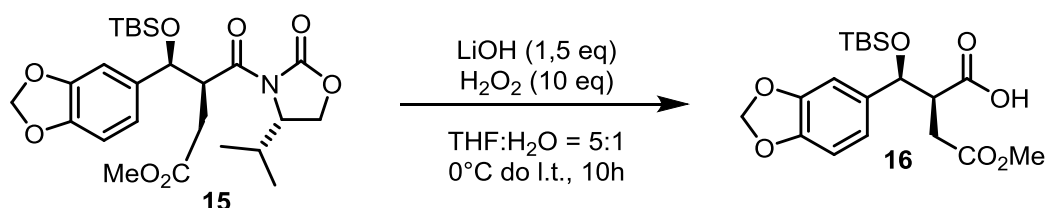
Do roztoku substrátu **13** (500 mg, 2,05 mmol, 1,0 eq) byla rozpuštěna v suchém CH₂Cl₂ (21mL, 0.1M) a ochlazena na -40°C. Do tohoto roztoku byl přidán 1,0M roztok *n*Bu₂BOTf (2,47 mL, 2,47 mmol, 1,2 eq) v CH₂Cl₂. Tento roztok byl míchán po dobu 1h při -40°C předtím než *i*Pr₂Net (465 μL, 2,67 mmol, 1,3 eq) byl přidán. Vzniklá reakční směs byla i nadále míchána při -40°C po dobu 1h předtím než byl po kapkách přidán aldehyd **4** (432 mg, 2,88 mmol, 1,4 eq) v CH₂Cl₂ (5 mL). Výsledná reakční směs byla míchána po dobu 3h při -40°C. Při téže teplotě byl přidán nasycený vodný roztok NH₄Cl (25 mL) a reakční směs byla ponechána ohřát se na l.t. Obě fáze byly odděleny a vodná vrstva byla extrahována pomocí CH₂Cl₂ (3x50 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (25 mL), sušeny nad Na₂SO₄ a těkavé organické prvky byly odpařeny za sníženého tlaku. Abychom zamezili nežádoucímu laktonizačnímu procesu (tvorba produktu **21**), tak byla surová reakční směs rychle přefiltrována přes malou kolonku silikagelu (5 g, CH₂Cl₂ jako mobilní fáze). Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku a vzniklý produkt aldolizace, adukt **14**, byl okamžitě reagován s TBSOTf v přítomnosti 2,6-lutidinu.

Produkt aldolizace **14** z předcházejícího kroku byl rozpuštěn v CH₂Cl₂ (20 mL) a celá reakční směs byla ochlazena na 0°C. Do této reakční směsi byly postupně přidány DMAP (90 mg, 0,1 mmol, 0,2 eq), 2,6-lutidin (927 μL, 8,0 mmol, 4,0 eq) a nakonec TBSOTf (1,36mL, 6,0mmol, 3,0eq) a výsledná reakční směs byla míchána při 0°C po dobu 5-12h (TLC). Nasycený roztok NH₄Cl (50 mL) byl přidán a reakční směs byla ponechána ohřát na l.t. Vrstvy byly odděleny a vodná fáze byla extrahována pomocí CH₂Cl₂ (3x100 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty pomocí nasyceného vodného roztoku CuSO₄ (2x50 mL, odstranění 2,6-lutidinu), nasyceného vodného roztoku NaCl (50 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrány a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Výsledná kapalina byla přečištěna pomocí flesh kolonové

chromatografie na silikagelu (petrolether/EtOAc = 20:1). Výsledný TBS ochráněný produkt aldolový adukt **14** byl izolován ve formě viskózní kapaliny (675 mg, 65 % - dva kroky, d.r. = 95:5).

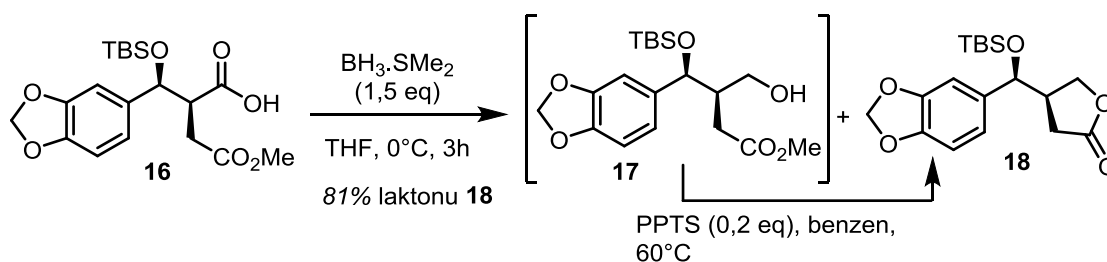
$[\alpha]_D = +50.3$ (c 1.2, CHCl₃), ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -0.22 (s, 3H), -0.05 (s, 3H), 0.11 (s, 6H), 0.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 2.36-2.38 (m, 1H), 2.52 (dd, *J* = 17.2, 3.2 Hz, 1H), 2.47 (dd, *J* = 17.2, 3.2 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 17.2, 11.6 Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 4.03 (dd, *J* = 9.2, 2.9 Hz, 1H), 4.09-4.20 (m, 2H), 4.38 (dd, *J* = 9.2, 7.3 Hz, 1H), 4.89 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -5.4, -4.7, 14.6, 17.9, 18.1, 25.7 (3C), 29.0, 33.3, 48.3, 51.8, 59.2, 64.8, 74.0, 102.7, 107.01, 110.3, 120.50, 134.5, 148.2, 148.5, 153.6, 172.5, 172.7; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 507 [M⁺] (100), 508 [M⁺+1] (25), 509 (10).

(*S*)-2-((*S*)-benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-4-methoxy-4-oxobutanová kyselina (**16**)



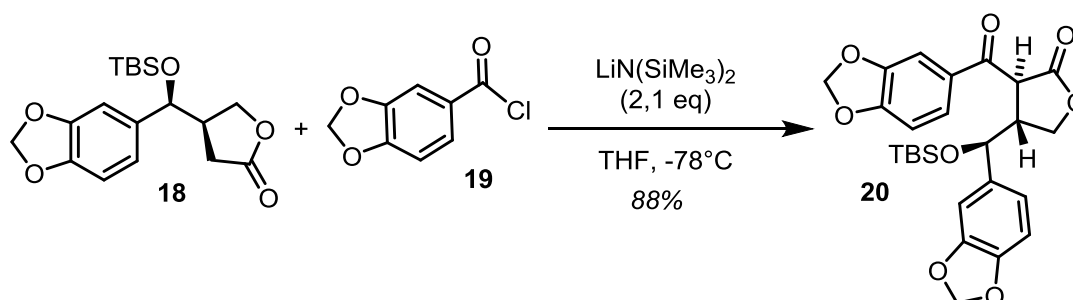
Látka **15** (250 mg, 0,49 mmol, 1,0 eq) byla rozpuštěna v THF (5 mL, 0,1M) a ochlazena na 0°C. Po 5 min byl přidán 30 % vodný roztok H₂O₂ (4,9 mL, 4,9 mmol, 10,0 eq) následovaný roztokem LiOH.H₂O (31 mg, 0,74 mmol, 1,5 Eq) v H₂O (1 mL). Reakční směs byla poté ponechána ohřát na l.t. a při l.t. míchána po dobu 10h. Po ochlazení na 0°C, nasycený vodný roztok Na₂SO₃ (10 mL) byl přidán a vodní fáze byla extrahována pomocí EtOAc (25 mL, odstranění chirální pomocné skupiny). Vodní vrstva byla poté okyselena pomocí 10% roztoku HCl na pH~6 a extrahována pomocí EtOAc (3x25 mL). Ethylacetátové vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl, sušeny nad Na₂SO₄ a odpařeny na RVO. Po odpaření byla izolována kyselina **16** (160 mg, 82 %) jako bílá krystalická látka. Bod tání: 124-125 °C; $[\alpha]_D = -4.9$ (c 0.9, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -0.19 (s, 3H), -0.01 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 2,32 (dd, *J* = 17.1, 3.8 Hz, 1H), 2.84 (dd, *J* = 17.1, 10.6 Hz, 1H), 3.09-3.16 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 5.24 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.95 (s, 2H), 6.75-6.78 (m, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): -5.3, -4.5, 18.2, 25.7 (3C), 29.6, 50.6, 51.8, 74.2, 102.1, 109.2, 110.8, 118.4, 134.3, 148.5, 148.8, 172.9, 178.5; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 396 [M⁺] (100), 397 [M⁺+1] (25).

(*R*)-4-((*S*)-benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl) dihydrofuran-2(3*H*)-one (**18**)



Karboxylová kyselina **16** (250 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq) byla rozpuštěna v THF (10 mL) a roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led). Do této směsi bylo přidáno $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$ (671 μL , 0.74 mmol, 1.5 eq) po kapkách a výsledná reakční směs byla ponechána ohřát na l.t. MeOH (5 mL) byl přidán po 8 hodinách při l.t. a celá reakční směs byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v EtOAc (20 mL) a celá směs byla zfiltrována přes Celite 545[®]. Filtrační koláč byl promyt pomocí EtOAc (3x25 mL) a spojené filtráty byly odpařeny na RVO. Odparek obsahoval směs alkoholu **17** a laktonu **18**. Tato směs byla rozpuštěna v benzenu (10 mL) a odpařena na RVO (azeotrop). Poté ještě jednou v benzenu (20 mL) a do této směsi byla přidána PPTS (11 mg, 0.1 mmol, 0.2 eq). Celá reakční směs byla zahřívána na 70 °C po dobu 8 hodin. Po ochlazení na l.t. byla reakční směs přímo nanesena na kolonu a lakton **18** (140 mg, 81 %, bílý prášek) byl izolován pomocí flash kolonové chromatografie (silikagel jako sorbent, petroleum ether/EtOAc = 20:1). Bod tání: 68-69 °C; $[\alpha]_D = -23.4$ (*c* 1.1, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): -0.22 (s, 3H), 0.00 (s, 3H), 0.86 (s, 9H), 2.42 (dd, $J = 17.4, 8.8\text{Hz}$, 1H), 2.61 (dd, $J = 17.1, 6.6\text{Hz}$, 1H), 2.76-2.78 (m, 1H), 4.07 (dd, $J = 7.4, 6.1\text{ Hz}$, 1H), 4.18 (dd, $J = 9.2, 7.4\text{ Hz}$, 1H), 4.56 (d, $J = 5.6\text{ Hz}$, 1H), 6.01 (s, 2H), 6.71-6.85 (m, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): -5.0, -4.3, 18.2, 25.8 (3C), 30.3, 44.4, 70.4, 75.3, 101.3, 109.0, 110.9, 118.4, 134.9, 148.7, 149.2, 177.2; MS (ESI⁺), m/z (%): 350 [M^+] (28), 351 [M^++1] (100), 352 (20).

(3*S*,4*R*)-4-((*S*)-benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxole-5-carbonyl)dihydrofuran-2(3*H*)-one (**20**)

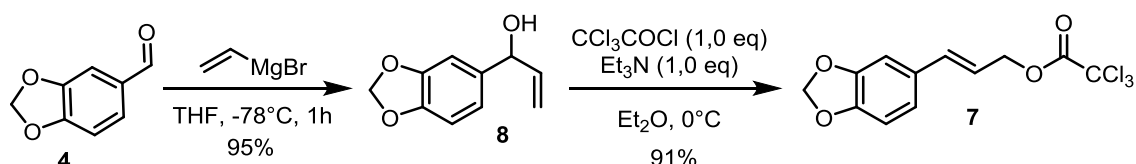


Roztok laktonu **18** (100 mg, 0,29 mmol, 1.0 eq) v suchém THF (5 mL) byl ochlazen na -78 °C a $\text{LiN}(\text{TMS})_2$ (1.0M roztok v THF) (480 μL , 0.48 mmol, 2.2 eq) byl přidán po

kapkách. Po 10 sekundách byl přidán roztok acyl chloridu **19** (100mg, 0,52mmol, 1,05 eq) v THF (0.5 mL). Výsledná reakční směs byla míchána při -78 °C po dobu 30 min, při 0 °C po dobu dalších 30 minut předtím než byl přidán vodný nasycený roztok NH₄Cl (10 mL). Vrstvy byly odděleny a vodná vrstva byla extrahována EtOAc (3x25 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty pomocí nasyceného roztoku NaCl (10 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrovány a následně odpařeny pomocí RVO. Odpařená reakční směs byla čištěna pomocí flash kolonové chromatografie na silikagelu (petroleum ether/EtOAc = 20:1->10:1->4:1) a poskytla TBS-ochráněný Sanguinolignan A (199 mg, 88%) v podobě viskózní kapaliny. $[\alpha]_D = -15.4$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): -0.18 (s, 3H), 0.02 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 3.33-3.40 (m, 1H), 4.29 (dd, $J = 9.1, 5.8$ Hz, 1H), 4.38 (dd, $J = 9.1, 5.8$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.89 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.97 (dd, $J = 5.2, 1.1$ Hz, 2H), 6.13 (s, 2H), 6.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.92 (dd, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): -4.7, -4.1, 18.2, 25.8 (3C), 49.0, 50.8, 70.2, 73.7, 102.1, 103.1, 107.1, 108.5, 108.6, 108.8, 120.3, 126.8, 131.6, 137.7, 148.0, 148.7, 149.2, 153.3, 174.0, 193.5; MS (ESI⁺), m/z (%): 499 [M⁺] (18), 500 [M⁺+1] (50), 367 (100).

3.3.2 Cílená syntéza *rac*-sanguinolignan A

(*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)allyl 2,2,2-trichloroacetát (**7**)

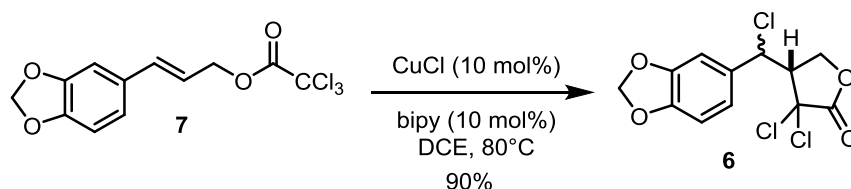


Do roztoku pipenoralu **4** (2.0 g, 13.3 mmol, 1.0 eq) v bezvodém THF (50 mL) ochlazeném na -78 °C byl přidán Grignárdův reagent (14.6mL, 1.0M roztok v THF, 14.7 mmol, 1.1 eq) a výsledná reakční směs byla ponechána ohřát na l.t. Při l.t. byla reakční směs míchána po dobu 30 min a pak byla ochlazena na 0 °C. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NH₄Cl (20 mL). Vrstvy byly odděleny a poté vodná vrstva byla extrahována etherem (3x30 mL). Spojené extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (20 mL), sušeny nad MgSO₄, filtrovány a odpařeny na RVO. Odparek poskytl alkohol **8** (2,27 g, 95 %), dostatečně čistý aby mohl být použitý v dalším kroku. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.00 (broad s, 1H), 5.07 (broad d, $J = 6$ Hz, 1H), 5.18 (dt, $J = 10.0, 1.5$ Hz, 1H), 5.32 (dt, $J = 16.0, 1.5$ Hz, 1H), 5.94 (s, 2H), 5.96-6.06 (m, 1H), 6.76-6.88 (m, 3H).

Alkohol **8** (2.27 g, 12.6 mmol) byl rozpuštěn v suchém etheru (100 mL) a směs byla ochlazena na 0°C. Do této směsi byl přidán Et₃N (1.8mL, 12.8 mmol, 1,01 eq) okamžitě

následovaný CCl_3COCl (1.4 mL, 12.8 mmol, 1.01 eq). Výsledná reakční směs byla míchána při 0 °C po dobu 1 hodiny. H_2O (30 mL) bylo poté přidáno a výsledné vrstvy byly odděleny. Vodní vrstva byla extrahována etherem (3x30 mL) a kombinované organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl (30 mL), sušeny nad MgSO_4 a koncentrovány na RVO. Odpaření produktu poskytlo dostatečně čistý produkt **7** (4.04 g, 91 %) ve formě žluté viskózní kapaliny. Produkt je nestálý na silikagelu a nemůže tedy být čištěn pomocí kolonové chromatografie. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.00 (dd, $J = 7.0, 1.5$ Hz, 2H), 6.00 (s, 2H), 6.20 (dt, $J = 16.1, 7.2$ Hz, 1H), 6.66 (broad d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.70-6.90 (m, 2H), 6.95 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 70.2, 90.2, 101.7, 106.2, 108.6, 118.8, 122.3, 130.3, 136.8, 148.3, 148.4, 162.1; MS (ESI⁺), m/z (%): 323 [M^+-1], 325 [M^++1], 329.

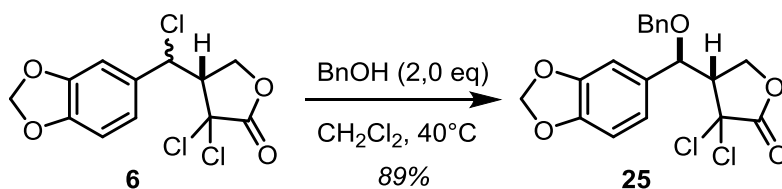
4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylchloromethyl)-3,3-dichlorodihydrofuran-2(3*H*)-one
(**6**)



Vyžíhaná Schlenkova baňka pod argonovou atmosférou byla naplněna postupně následujícími reagenty: CuCl (28 mg, 0.1 eq), bipyridin (95 mg, 0.1 eq) a bezvodým DCE (3 mL). Výsledný roztok byl míchán po dobu 10 minut za l.t., kdy celá směs se zbarvila do hněda. Tato směs byla teď degasována pomocí klasického freeze-pump-throw cyklu (3x opakováno). Do degasovaného roztoku byla pomocí stříkačky přidán roztok trichloroacetátu **7** (900 mg, 2.8 mmol, 1. eq) v DCE (1.0 mL). Celý cyklus degasování byl ještě jednou opakován (3x) a pečlivě uzavřená Schlenkova baňka pak byla umístěna v olejové lázni předehřáté na 90 °C. Po 3,5h při této teplotě byla Schlenkova baňka ponechána ochladit na l.t., otevřena, a veškeré rozpouštědla byla odpařena na RVO. Odparek byl pak purifikován pomocí flash kolonové chromatografie na silikagelu (petroleum ether/ $\text{EtOAc} = 20:1 \rightarrow 15:1$). Produkt **6** (810 mg, 90 %) byl izolován jako směs dvou diastereoizomerů *syn-6/anti-6* = 3:2. Tyto izomery nebyly separovány, protože to nebylo nezbytně nutné pro další syntézu. *Syn-6*: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.59 (dt, $J = 10.1, 8.2$ Hz, 1H), 3.75 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H), 3.90 (dd, $J = 9.2, 7.8$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.95 (s, 2H), 6.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.88 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 57.8, 58.4, 67.5, 79.3, 102.0, 107.4, 108.8, 121.4, 130.6, 149.0, 149.1, 167.9; *Anti-6*: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.50-3.64 (m, 1H), 4.20 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.75-4.85 (m, 1H), 5.20 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.95 (s, 2H), 6.72 (dd, $J = 7.9, 2.1$ Hz, 1H), 6.95-7.05 (m, 2H); ^{13}C NMR (75

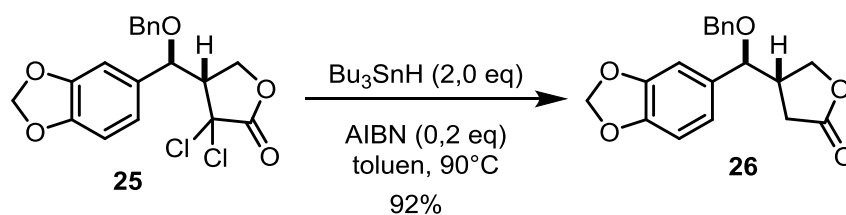
MHz, CDCl₃) δ (ppm): 57.7, 60.5, 69.1, 78.8, 101.8, 108.2, 108.4, 122.5, 130.6, 148.4, 149.1, 167.8; *Syn-6*: MS (ESI⁺), m/z (%): 323 [M⁺] (10), 287 (20), 169 (100), 135 (40), 122 (40).

(S^{*})-4-((S^{*})-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl(benzyloxy)methyl)-3,3-dichlorodihydrofuran-2(3H)-one (**25**)



Směs trichlorolaktonů *syn-6/anti-6* (560 mg, 1.73 mmol, 1.0 eq) a benzyl alkoholu (374 mg, 3.46 mmol, 2.0 eq) v bezvodém CH₂Cl₂ (2.5 mL) bylo zahříváno na 40 °C ve Schlenkově baňce po dobu 6h. Solvent byl odpařen na RVO a odparek byl přečištěn pomocí flash kolonové chromatografie na silikagelu (petroleum ether/EtOAc = 15:1). Benzyl lakton **25** byl izolován v 615 mg (89 %) a d.r. = >95:5 (H NMR) jako bílá crystalická látka. Bod tání: 155-156 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.20 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.28 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.34 (dd, J = 9.2, 7.2 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 4.62 (dd, J = 9.2, 7.1 Hz, 1H), 4.80 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.05 (s, 2H), 6.85-6.95 (m, 3H), 7.22-7.40 (m, 5H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 57.1, 60.6, 68.1, 70.5, 79.1, 79.3, 101.6, 107.5, 108.7, 121.6, 128.0, 128.2, 128.8, 131.0, 137.2, 142.2, 148.4, 148.6, 168.3; MS (ESI⁺), m/z (%): 394 [M⁺] (5), 324 (5), 287 (10), 241 (10), 149 (30), 91 (100).

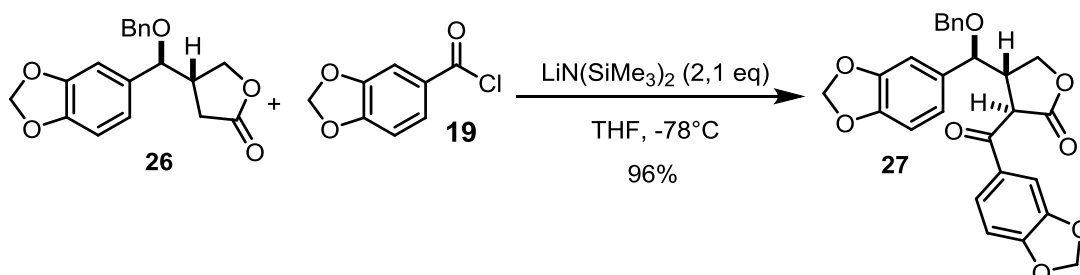
(S^{*})-4-((S^{*})-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl(benzyloxy)methyl)dihydrofuran-2(3H)-one (**26**)



Do roztoku laktonu **25** (1.04 g, 2.65 mmol, 1.0 eq) a AIBN (88 mg, 0.53 mmol, 0.2 eq) v toluenu (35 mL) byl přidán tri-*n*-butyltin hydrid (1.42 mL, 5.30 mmol, 2.05 eq). Výsledný roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 12h. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí RVO a odparek byl čištěn pomocí kolonové chromatografie na silikagelu (petroleum ether/EtOAc = 10:1->5:1), aby poskytla lakton **26** (795 mg, 92 %) jako bílou krystalickou látku. Bod tání = 124-125 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.28 (dd, J = 17.8, 7.8 Hz, 1H), 2.32 (dd, J = 17.8, 7.9 Hz, 1H), 2.85-2.95 (m, 1H), 4.15 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 4.34 (dd, J = 10.2, 6.2 Hz, 1H), 4.42 (dd, J = 10.3, 6.2 Hz, H), 4.48 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 6.00 (s, 2H), 6.75-6.78 (m, 3H), 7.22-7.40 (m, 5H); ¹³C NMR (75

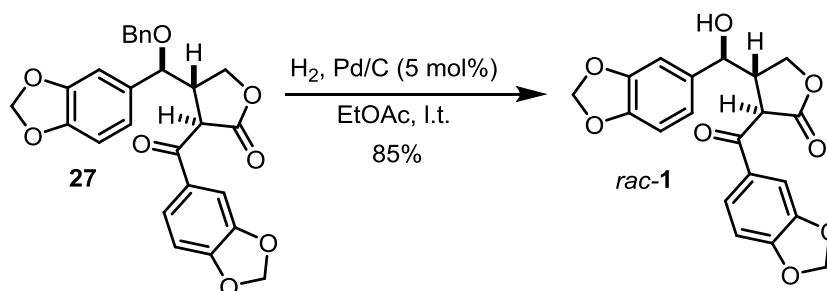
MHz, CDCl₃) δ(ppm): 31.3, 42.3, 70.3, 70.9, 81.7, 101.2, 106.7, 108.3, 120.9, 127.9, 128.5, 132.8, 137.4, 147.8, 148.4, 176.4; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 326 [M⁺] (20), 219 (40).

(3*R**,4*S**)-4-((*S**)-benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl(benzyloxy)methyl)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxole-5-carbonyl)dihydrofuran-2(3*H*)-one (**27**)



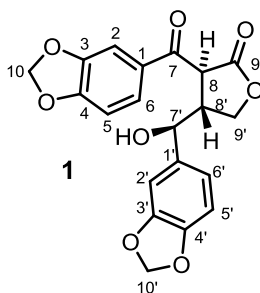
Roztok laktону **26** (100 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq) v suchém THF (5 mL) byl ochlazen na -78 °C a LiN(TMS)₂ (1.0 M roztok v THF) (670 μL, 0.67 mmol, 2.2 eq) byl přidán po kapkách. Po 10 sekundách byl přidán roztok acyl chloridu **19** (59 mg, 0.32 mmol, 1,05 eq) v THF (0.5 mL). Výsledná reakční směs byla míchána při -78 °C po dobu 30 min, při 0 °C po dobu dalších 30 minut předtím než byl přidán vodný nasycený roztok NH₄Cl (10 mL). Vrstvy byly odděleny a vodná vrstva byla extrahována EtOAc (3x25 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty pomocí nasyceného roztoku NaCl (10 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrovány a následně odpařeny pomocí RVO. Odpařená reakční směs byla čištěna pomocí flash kolonové chromatografie na silikagelu (petroleum ether/EtOAc = 20:1->10:1->4:1) a poskytla Bn-ochráněný Sanguinolignan A (140 mg, 96 %) v podobě viskózní kapaliny. ¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ(ppm): 3.36-3.42 (m, 1H), 4.20 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 9.1, 5.8Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 9.1, 5.8Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.97 (dd, *J* = 5.2, 1.1Hz, 2H), 6.13 (s, 2H), 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 6.93 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.28-7.38 (m, 5H), 7.54 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO) δ(ppm): 32.1, 49.0, 50.8, 70.2, 73.7, 102.1, 103.1, 107.1, 108.5, 108.6, 108.8, 120.3, 120.9, 126.8, 127.9, 128.5, 131.6, 132.8, 137.7, 148.0, 148.7, 149.2, 153.3, 174.0, 193.5.

Sanguinolignan A (*rac*-1)



Roztok Bn-chráněného Sanguinolignanu A **27** (100 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq) v EtOAc (5mL) byl hydrogenolyzován za katalýzy 5% Pd/C (50mg) při l.t. a 1 barr H₂. Po 8h za l.t., reakční směs byla filtrována přes Celite® a filtrační koláč byl promyt EtOAc (3x20 mL). Zkombinované filtráty byly odpařeny na RVO a čištěny pomocí kolonové chromatografie na silikagelu (DCM/MeOH = 20:1->10:1) a poskytly *rac*-1 jako bílý prášek (69 mg, 85 %).

Tabulka 4: Porovnání námi připraveného sanguinolignanu *rac*-1 s publikovanými výsledky.



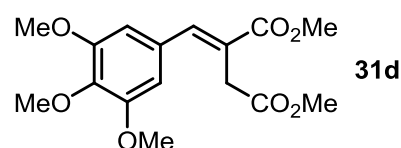
| Atomy | Porovnání ¹ H NMR spekter; 300 MHz, (CD ₃) ₂ C=O | | Porovnání ¹³ C NMR spekter; 75 MHz, (CD ₃) ₂ C=O | |
|-------|--|--|--|------------------------|
| | <i>rac</i> -1 [δ, multip (Hz)] | Cabanillas et al. 2010 [δ, multip (Hz)] | <i>rac</i> -1 | Cabanillas et al. 2010 |
| 1 | | | 131.6 | 131.6 |
| 2 | 7.28, d (1.7) | 7.29, d (1.8) | 108.8 | 108.8 |
| 3 | | | 149.2 | 149.2 |
| 4 | | | 153.3 | 153.3 |
| 5 | 6.92, dd (7.6, 1.1) | 6.32, dd (7.5, 1.1) | 108.6 | 108.6 |
| 6 | 7.54, dd (8.2, 1.8) | 7.54, dd (8.2, 1.8) | 126.8 | 126.8 |
| 7 | | | 193.5 | 193.5 |
| 8 | 4.73, d (6.1) | 4.76, d (6.1) | 50.8 | 50.8 |
| 9 | | | 174.0 | 174.0 |
| 10 | 6.13, s | 6.13, s | 103.1 | 103.2 |
| 1' | | | 137.7 | 137.7 |
| 2' | 6.91, d (1.9) | 6.91, d (1.8) | 107.1 | 107.1 |
| 3' | | | 148.0 | 148.0 |
| 4' | | | 148.7 | 148.8 |
| 5' | 6.77, d (8.2) | 6.77, d (8.2) | 108.5 | 108.5 |
| 6' | 6.92, dd (8.2, 1.9) | 6.92, dd (8.1, 1.8) | 120.3 | 120.3 |
| 7' | 4.89, d (6.0) | 4.89, d (5.9) | 73.7 | 73.8 |
| 8' | 3.34-3.40 | 3.34-3.39 | 49.0 | 49.0 |
| 9'a | 4.29, dd (9.1, 5.8) | 4.29, dd (9.0, 5.9) | 70.2 | 70.2 |
| 9'b | 4.38, dd (9.1, 8.0) | 4.38, dd (9.0, 8.0) | | |
| 10' | 5.97, dd (5.2, 1.1) | 5.97, dd (5.2, 1.1) | 102.1 | 102.0 |

3.3.3 Diverzitně orientovaná syntéza

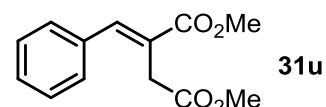
Syntéza Wittigových ylidů

Obecný postup přípravy. Suspenze stabilizovaného ylidu **30** nebo **33** (1,1 mmol, 1,1 eq) a aldehydu **35** (1,0 mmol, 1.0 eq) v toluenu (1 mL, 1,0M) byl umístěn v mikrovlnném reaktoru a reakční směs byla zahřívána na 150 °C (nastavené teplotní maximum, další nastavená maxima: 300W, 295 psi) po dobu 10 min. Reakční směs byla poté ponechána ochladnout na l.t. Rozpouštědla byla odpařena na RVO. Odparek byl následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie na silikagelu s použitím petrol etheru/EtOAc jako mobilní fáze. Standardně bylo využíváno gradientu mobilních fází v poměrech: petrol ether/EtOAc = 10:1->4:1->2:1->1:1->1:2.

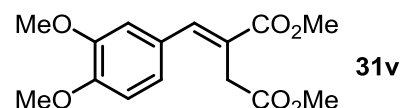
Dimethyl (E)-2-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)sukcinát (**31d**). 74 %, (E/Z) = 95:5. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.58 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.75 (s, 6H), 3.82 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.87 (s, 2H), 7.87 (s, 1H); MS (ESI^+), m/z (%): 324 [M^+].



Dimethyl (E)-2-benzylidenesukcinát (**31u**). 72 %, (E/Z) = 95:5. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.55 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 7.30-7.45 (5H, m), 7.91 (1H, s). MS (ESI^+), m/z (%): 234 [M^+].



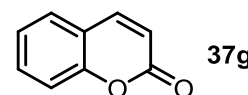
Dimethyl (E)-2-(3,4-dimethoxybenzylidene)sukcinát (**31v**). 80 %, (E/Z) = 95:5. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.56 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.89 (s, 1H), 7.15-7.29 (m, 2H), 7.88 (s, 1H); MS (ESI^+), m/z (%): 294 [M^+].



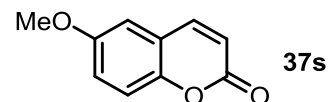
Syntéza Kumarinů

Obecný postup přípravy. Suspenze stabilizovaného ylidu **33** (1,1 mmol, 1,1 eq) a 2-hydroxy aldehydu **35** (1,0 mmol, 1.0 eq) v toluenu (1 mL, 1,0M) byl umístěn v mikrovlnném reaktoru a reakční směs byla zahřívána na 220 °C (nastavené teplotní maximum, další nastavená maxima: 300W, 295 psi) po dobu 60 min. Reakční směs byla poté ponechána ochladnout na l.t. Toluén byl odpařena na RVO a odparek byl následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie na silikagelu s použitím petrol etheru/EtOAc jako mobilní fáze. Standardně bylo využíváno gradientu mobilních fází v poměrech: petrol ether/EtOAc = 10:1->4:1->2:1->1:1->1:2.

2H-chromen-2-one (37g). 89%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6.37 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.16 – 7.34 (m, 2H), 7.37 – 7.56 (m, 2H), 7.63 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, (CDCl₃) δ(ppm): 116.6, 166.8, 118.8, 124.4, 127.9, 131.8, 143.5, 154.0, 160.8; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 146 [M⁺] (100), 127 (18), 118 (88).



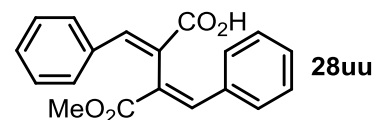
7-methoxy-2H-chromen-2-one (37s). 85 %. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.82 (s, 3H), 6.39 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 2.9Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 9.1, 2.9Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 9.1Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 9.5Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, (CDCl₃) δ(ppm): 55.9, 110.1, 117.1, 117.9, 119.2, 119.5, 143.3, 148.5, 156.1, 161.1; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 146 [M⁺] (100), 127 (18), 118 (88).



Stobbeho kondenzace

Obecný postup přípravy. Roztok dimethyl sukcinátu **31** (1,0 mmol, 1,0 eq) a aromatického aldehydu **35** (1.0 mmol, 1,0 eq) v THF (4 mL) byl přidán do roztoku *tert*-BuO⁻K⁺ (120 mg, 1 mmol, 1,0 eq) v *tert*-BuOH (10 mL) za laboratorní teploty po kapkách. Výsledná reakční směs byla míchána při l.t. po dobu 30 min. Výsledná směs byla nalita na směs led/voda a promyta pomocí Et₂O (25 mL). Výsledná vodná fáze byla okyselena pomocí 37% HCl, a extrahována pomocí EtOAc (3x25 mL). Spojené organické extrakty (jenom EtOAc vrstvy) byly promyty pomocí nasyceného roztoku NaCl (10 mL), sušeny nad MgSO₄, filtrovány a odpařeny na RVO. Odparek byl čištěn pomocí kolonové chromatografie na silikagelu.

Methyl hydrogen (2E,3E)-2,3-Dibenzylidenesukcinát (**28uu**). Eluce pomocí petroleum etheru/EtOAc = 4:1; 75 %, (2E/Z,3E/Z) = 98:2, 98:2; Bod tání: 149-150°C, (lit.³ 148-149°C); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.66 (s, 3H), 7.25-7.35 (m, 6H), 7.40-7.50 (m, 4H), 7.85 (s, 1H), 7.90 (s, 1H); MS (ESI⁺), *m/z* (%): 308 [M⁺].

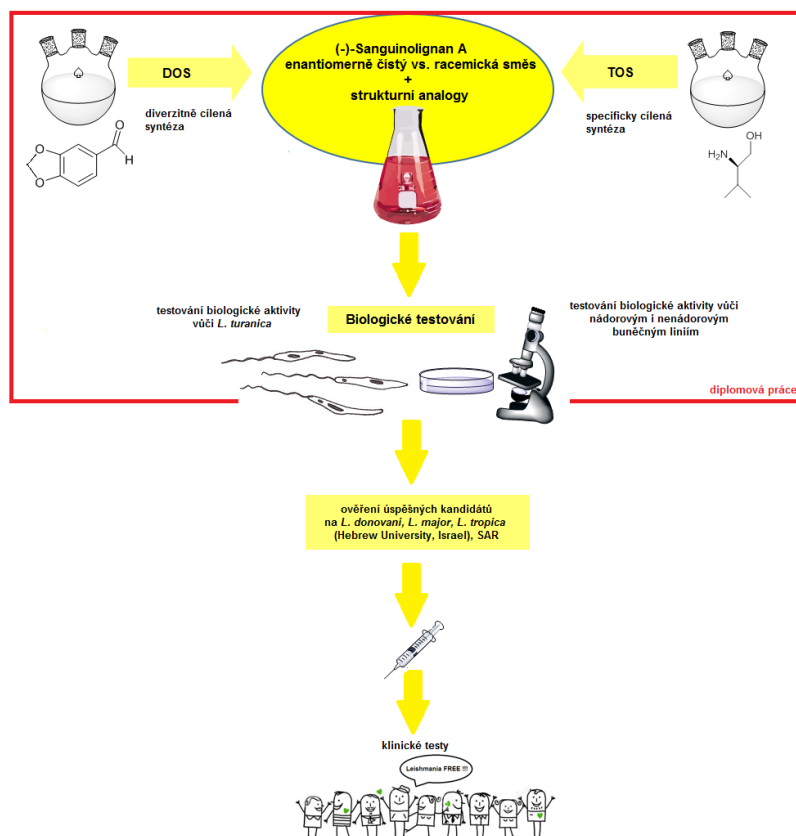


³ Sai, H. *et al. Chem. Pharm. Bull.* **54**(12) 1686—1693 (2006)

4. Výsledky a diskuze

Cílem této diplomové práce je syntéza (–)-Sanguinolignanu A (**1**), jeho strukturních analogů a ověření leishmanicidních vlastností této skupiny látek. Abychom dosáhli těchto cílů tak musíme zajistit (a) syntézu cílového Sanguinolignanu A (kapitola 4.1) a jeho derivátů (kapitola 4.2), a (b) otestovat biologickou aktivitu těchto látek (kapitola 4.3). Z literatury je patrné (viz. kapitola 2.8), že látky strukturně podobné lignanu **1**, mají velice zajímavé biologické vlastnosti (tabulka č. 3). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli připravit předpokládanou strukturu lignanu **1** užitím dvou různých přístupů: (1) pomocí cíleně orientované syntézy (Target-Oriented synthesis – TOS), a (2) pomocí diverzitně orientované syntézy (Diversity-Oriented synthesis – DOS).

V prvním případě bylo naše úsilí zaměřeno na syntézu lignanu **1**, a to jak v enantiomerně čisté formě, tak v racemické směsi. Tento přístup měl za úkol připravit danou látku a aplikace tohoto přístupu na budoucí syntézu strukturních analogů nebyla plánována. DOS přístup k **1** byl na druhou stranu koncipován tak, aby všechny různé stereoizomery a strukturní deriváty lignanu **1** mohly být připraveny tímto postupem. Všechny připravené látky poté budou testovány na leishmanicidní aktivitu vůči amastigotům *L. turanica*. Jejich aktivita vůči nádorovým a nenádorovým buněčným liniím bude také testována. Schematické znázornění našeho přístupu je popsáno níže (Obrázek 7).



Obrázek 7: Schematické znázornění našeho přístupu při syntéze sanguinolignanu A a jeho derivátů. Pouze červeně orámovaná část je předmětem našeho výzkumu.

4.1 Syntéza Sanguinolignanu A

Cestou cílené syntézy Sanguinolignanu A jsme se vydali, protože její struktura byla prozatím navržena na základě spektroskopických metod, a to zejména NMR analýzy. Tato metoda je *a priori* velice přesná, ale není to metoda absolutní. V dnešní době existují pouze dvě metody jak určit nebo potvrdit strukturu izolované přírodní látky, (a) vypěstovat její monokrystal a změřit jej pomocí RTG analýzy, nebo (b) připravit navrženou strukturu pomocí organické syntézy a porovnat její veškerá dostupná spektroskopická data s těmi získanými při navrhování struktury původně izolované látky (NMR spektra, MS spektra, optická rotace...).

Na základě retrosyntetické analýzy navržené struktury lignanu **1** (Cabanillas *et al.*, 2010) jsme navrhli dva různé přístupy k dané molekule. První z nich by nám měl poskytnout látku **1** v její (–)-formě a druhý jako racemickou směs obou enantiomerů *rac-1* (Schéma 1).

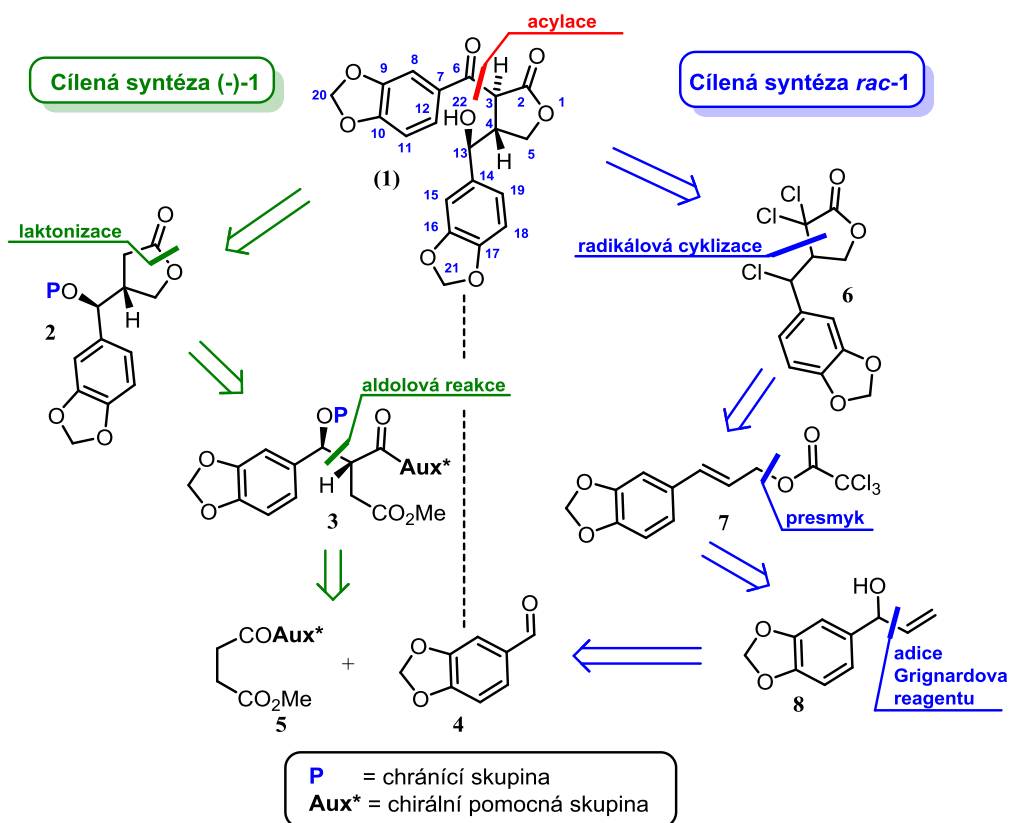
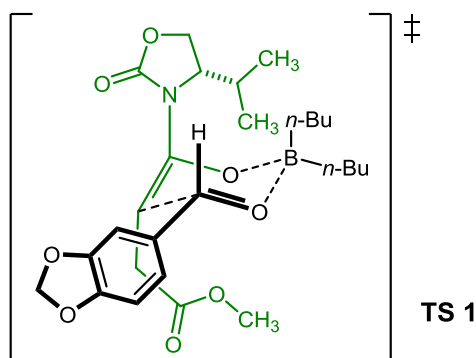


Schéma 1: Retrosyntetická analýza cílené syntézy Sanguinolignanu A

4.1.1 Cílená syntéza (-)-Sanguinolignanu A

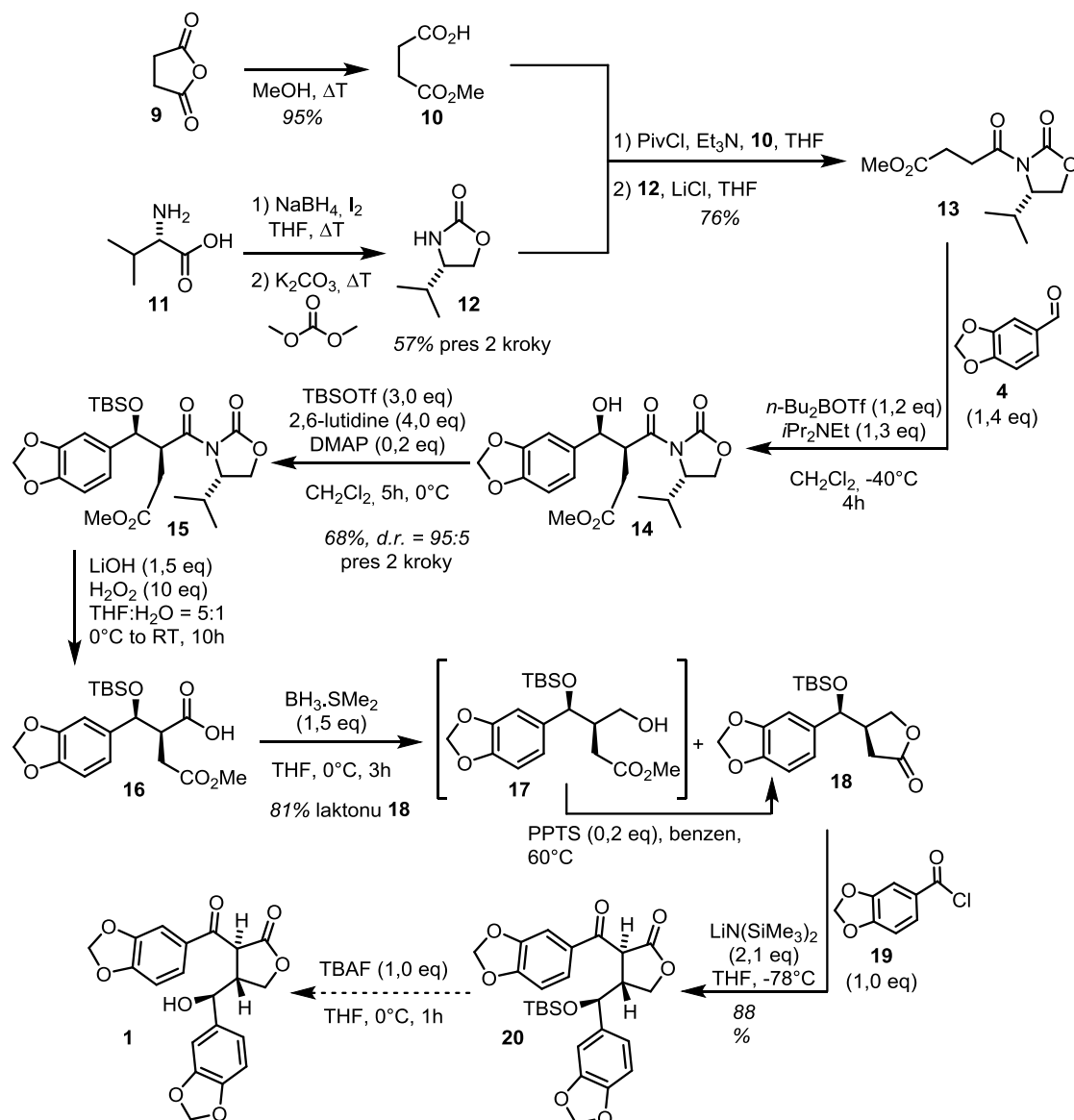
TOS syntéza lignanu (-)-1 je založena na dvou základních krocích, (a) diastereoselektivní aldolové reakci a následné selektivní redukci chirální pomocné skupiny, a (b) následné acylaci vzniklého laktonu. Stereogenní centra vytvořené při aldolové reakci mezi dikarbonylovou sloučeninou **5** a aldehydem **4**, pak určí všechna následně vytvořená stereogenní centra.

Klíčovým krokem tedy je diastereoselektivní aldolová kondenzace mezi intermediátem **5** a aldehydem **4**. Abychom tento krok dovedli do zdárného konce, rozhodli jsme se využít osvědčené Evansovi chirální pomocné skupiny založené na oxazolidinech v kombinaci s užitím boronových enolátů (Evans *et al.*, 1981). Značnou výhodou tohoto přístupu je velká selektivita aldolové reakce způsobená značnou rigiditou tranzitního stavu reakce za zvolených reakčních podmínek (Obrázek 8).



Obrázek 8: Model vystihující stereoselektivitu u Evansovy aldolové reakce

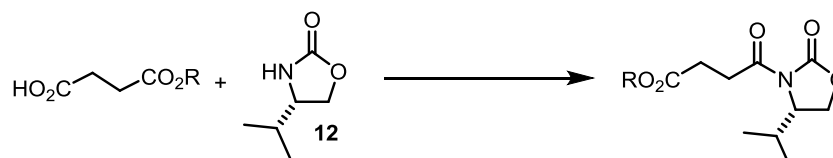
Po důkladné literární rešerši jsme navíc našli užití tohoto typu chirální pomocné skupiny v rámci syntézy matairesinolu – jiného lignanu obsahujícího dibenzylbutyrolactonový skelet (Hajra *et al.*, 2013).



Naše syntéza Sanguinolignanu A (**1**) začala přípravou chirální pomocné skupiny **12** (připravena ve dvou krocích z L-valinu **11** (Evans & Mathre, 1985; McKennon & Meyers, 1993) a ester-kyseliny **10**, která byla připravena metanolýzou anhydridu **9** (Schéma 2). Karbonylová skupina v karboxylové kyselině **10** byla poté *in situ* transformována na směsný anhydrid, který byl reagován s amidem **12** v přítomnosti Lewisovy kyseliny (LiCl). Produkt **13** byl izolován v 76%.

Je nutno podotknout, že tato reakce je velice citlivá na přítomnost vody (Tabulka 4). Původně jsme si mysleli, že v průběhu reakce dochází k hydrolyze methyl esteru, a to tedy způsobuje nižší výtěžky reakce. Abychom tedy zamezili tomuto jevu, tak jsem se rozhodla použít *tert*-butylovou skupinu místo methylové (vstup 4). Bohužel tato změna nepřinesla žádaný výsledek. Zdá se, že přítomnost vody nemá na svědomí hydrolyzu esteru, ale spíše vede ke snížení Lewisovy aktivity LiCl jeho hydratací.

Tabulka 4: Optimalizace reakčních podmínek pro syntézu ester-amidu **13**



| Vstup | R | Podmínky | Výtěžek [%] ^a |
|----------------|-----------------|---|--------------------------|
| 1 | CH ₃ | 1) PivCl (1,5 eq), Et ₃ N (3,0 eq), THF, 0°C, 5h 2) 12 (1,0 eq), LiCl (1,5 eq), THF, -20°C, 2h | >5 |
| 2 | CH ₃ | 1) PivCl (3,0 eq), Et ₃ N (3,0 eq), THF, -25°C, 2h 2) 12 (1,0 eq), LiCl (2,6 eq), THF, -20°C, 1,5h | 15 |
| 3 ^b | CH ₃ | 1) PivCl (3,0 eq), Et ₃ N (3,0 eq), THF, -25°C, 2h 2) 12 (1,0 eq), LiCl (2,6 eq), THF, -20°C, 1,5h | 75 |
| 4 | <i>t</i> -Bu | 1) PivCl (3,0 eq), Et ₃ N (3,0 eq), THF, -25°C, 2h 2) 12 (1,0 eq), LiCl (2,6 eq), THF, -20°C, 1,5h | >5 |

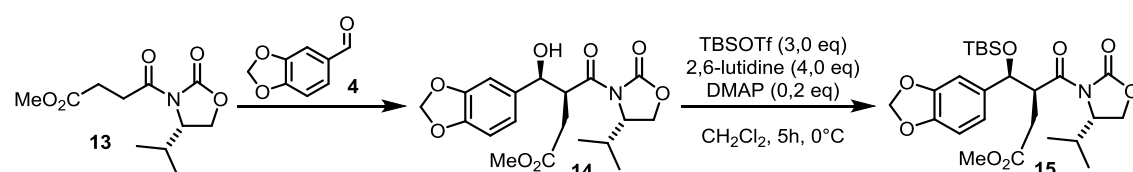
a) Odpovídá čisté izolované látce. b) Pro tuto reakci LiCl bylo sušeno ve vakuu, aby došlo k desorpci molekul vody (vakuum, 60°C, 14h).

Získaný amid **13**, nám umožnil přistoupit ke klíčovému kroku naší syntézy, diastereoselektivní aldolové reakci. Jednou z komplikací, která provází tuto reakci, je retroadice výsledného produktu **14** na výchozí látku a laktonizace **13** na nežádoucí lakton **21** (Schéma 3). Tato laktonizace probíhá spontánně, pakliže je produkt **13** vystaven působení Brønstedovy báze nebo kyseliny. Abychom snížili nežádoucí vedlejší reakce, tak výsledný nečistý produkt **14** byl okamžitě reagován s TBSOTf v přítomnosti 2,6-lutidinu a transformován na TBS-chráněný alkohol.

Abychom dostali produkt v co nejlepším výtěžku a diastereoselektivně, reakce byla prováděna za různých reakčních podmínek a s použitím různých Lewisových kyselin (Tabulka 5).

Peroxolýza výsledného ochráněného produktu aldolové reakce **15** pomocí LiOH (generován *in situ* z LiOH a H₂O₂), poskytla karboxylovou kyselinu **16**, která byla okamžitě redukována pomocí BH₃.SMe₂ komplexu na odpovídající alkohol **17**. Tento alkohol spontánně cyklizoval na odpovídající lakton **18**. Bohužel, když byla reakce prováděna ve větším měřítku (~500mg) tak reakce poskytovala směs laktonu **18** a necyklizovaného alkoholu **17**. Proto byla směs látek **17** a **18** rozpuštěna v benzenu a za přítomnosti PPTS zahřívána při 60°C po dobu 8h. Za těchto reakčních podmínek došlo k převedení veškerého alkoholu **17** na lakton **18**, aniž by došlo k ochránění či migraci TBS chránící skupiny.

Tabulka 5: Optimalizace aldolové reakce mezi amido-esterem **13** a aldehydem **14**



| Vstup | Podmínky | Výtěžek aduktu ^a 14 [%] | d.r. ^b | Výtěžek aduktu ^{a,c} 15 [%] | d.r. ^c |
|----------|--|--|-------------------|--|-------------------|
| 1 | <i>n</i> -Bu ₂ BOTf (1,2 eq), <i>i</i> Pr ₂ NEt (1,3 eq), CH ₂ Cl ₂ , -78°C až l.t., 12h | 12 | 95:5 | n.d. | n.d. |
| 2 | <i>n</i> -Bu ₂ BOTf (1,2 eq), <i>i</i> Pr ₂ NEt (1,3 eq), CH ₂ Cl ₂ , -40°C až l.t., 14h | 15 | 95:5 | n.d. | n.d. |
| 3 | <i>n</i> -Bu ₂ BOTf (1,2 eq), <i>i</i> Pr ₂ NEt (1,3 eq), CH ₂ Cl ₂ , -40°C až l.t., 14h | n.d. | 95:5 | 38 | 95:5 |
| 4 | <i>n</i> -Bu ₂ BOTf (1,2 eq), <i>i</i> Pr ₂ NEt (1,3 eq), CH ₂ Cl ₂ , -40°C, 4h | 27 | 95:5 | n.d. | n.d. |
| 5 | <i>n</i> -Bu ₂ BOTf (1,2 eq), <i>i</i> Pr ₂ NEt (1,3 eq), CH ₂ Cl ₂ , -20°C, 4h | n.d. | 87:13 | 78 | 85:15 |
| 6 | <i>n</i>-Bu₂BOTf (1,2 eq), <i>i</i>Pr₂NEt (1,3 eq), CH₂Cl₂, -40°C, 4h | n.d. | 95:5 | 65 | 95:5 |
| 7 | <i>cyc</i> -Hex ₂ BOTf (1,2 eq), <i>i</i> Pr ₂ NEt (1,3 eq), CH ₂ Cl ₂ , -40°C, 4h | n.d. | 98:2 | 42 | 98:2 |
| 8 | TiCl ₄ (1,0 eq), TMEDA (1,3 equiv), THF, -78°C až l.t., 12h | <5% | n.d. | n.d. | n.d. |

a) Odpovídá čisté izolované látce b) Určeno na základě analýzy ¹H-NMR spektra. c) Výtěžek přes 2 kroky.

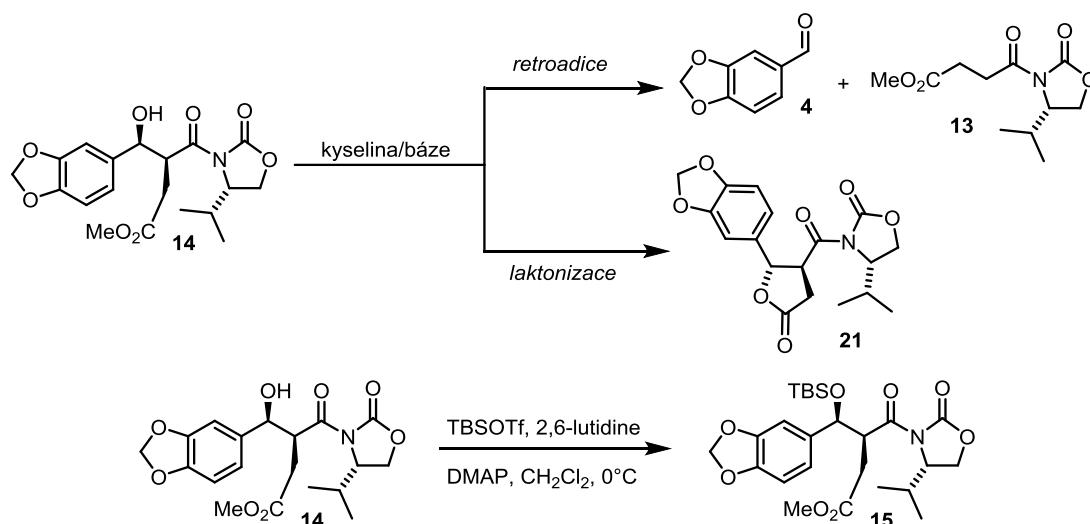


Schéma 3

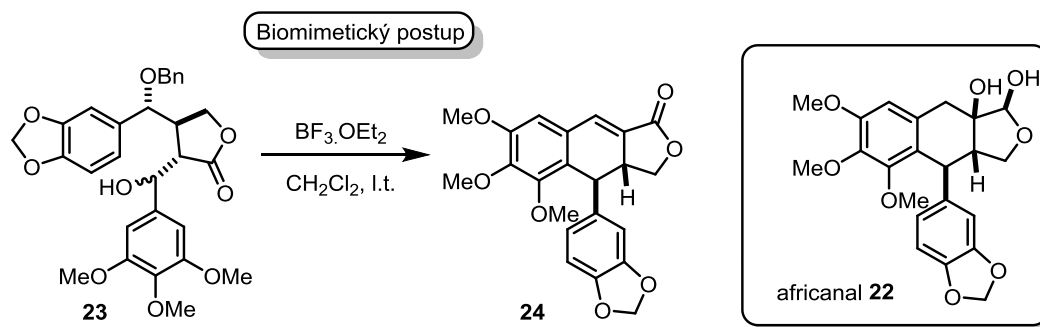
Acylace laktonu **18** pak byla provedena pomocí acyl chloridu **19** v přítomnosti nadbytku LiN(SiMe₃)₂ (2,1 eq). Tento typ reakce byl již v minulosti s úspěchem použit několikrát v naší skupině a poskytl produkt **20** v 88% výtěžku (Pospíšil & Sato, 2011; Pospíšil *et al.*, 2012). Tento krok bude proveden a optimalizován pro naše podmínky v následujícím doktorandském studiu.

4.1.2 Cílená syntéza *rac*-Sanguinoliganu A

Stereoselektivní, ale ne enantiomerní syntéza *rac*-**1**, by měla být robustní a potencionálně aplikovatelná na multigramovou syntézu této látky. Případné enantiomery by poté mohly být odděleny např. ko-krystalizací, ale zejména pak transformací na estery opticky obohacených karboxylovými kyselinami. Výsledné diastereoizomery by pak byli oddělitelné krystalizací nebo separovány pomocí chromatografických separačních metod. Hydrolyza těchto esterů by pak vedla k uvolnění obou antipodů Sanguinoliganu A (**1**). Připravený *rac*-**1** by nám také umožnil otestovat biologickou aktivitu **1** jako racemátu.

V mnoha případech se totiž stává, že lignany jsou tvořeny v rostlinách nejen jako jednotlivé antipody, např. (+)-**1** nebo (-)-**1**, ale také jako racemické směsi. V těchto případech může dojít k tomu, že jednotlivé enantiomery mají různé biologické aktivity, jejich aktivita se násobí, nebo anihiluje (Umezawa, 2014).

Naše retrosyntéza *rac*-**1** je založena na radikálové cyklizaci a byla inspirována biomimetickou syntézou africanalu **22** (Edlin *et al.*, 2006). Při této syntéze je v přítomnosti Lewisovy kyseliny intermediát **23** přeměněn v jednom kroku na žádaný skelet africanalu **24** (Schéma 4). A příprava tohoto intermediátu je aplikovatelná na naši syntézu *rac*-**1**.



Dle navržené retrosyntézy (Schéma 1), začala syntéza *rac*-1 adicí vinylu magnesiumu bromidu na aldehyd **4** (Schéma 5). Acylace s trichloroacetyl chloridem výsledného alkoholu **8** následována *in situ* Overmansovým přesmykem poskytla substituovaný allyl alkohol **7**, který byl podroben radikálové cykлизaci a poskytl lakton **6** ve formě dvou epimerů na nově vytvořené vazbě uhlík-chlor. Substituce atomu chloru na této pozici benzyl alkoholem vedla k tvorbě pouze jednoho stereoizomeru **25**. Následná radikálová reakce laktonu **25** s tributylcínhydridem poskytla des-chloro-lakton **26** v 92% výtěžku. Kondenzace laktonu **26** s acylchloridem **19** za našich standardních podmínek (Pospíšil & Sato, 2011; Pospíšil *et al.*, 2012) poskytla chráněný Sanguinolignan A **27**. Debenzylace **27** potom poskytla konečný produkt *rac*-1 v 85% výtěžku.

Porovnání spekter produktu *rac*-1 s publikovanými spektry (viz. experimentální část), ukázalo, že navržená struktura Sanguinolignanu A odpovídá námi připravené látce. Bohužel tuto látku máme pouze jako racemát, a tedy nemůžeme potvrdit, jestli také absolutní stereochemie molekuly je správně přiřazena.

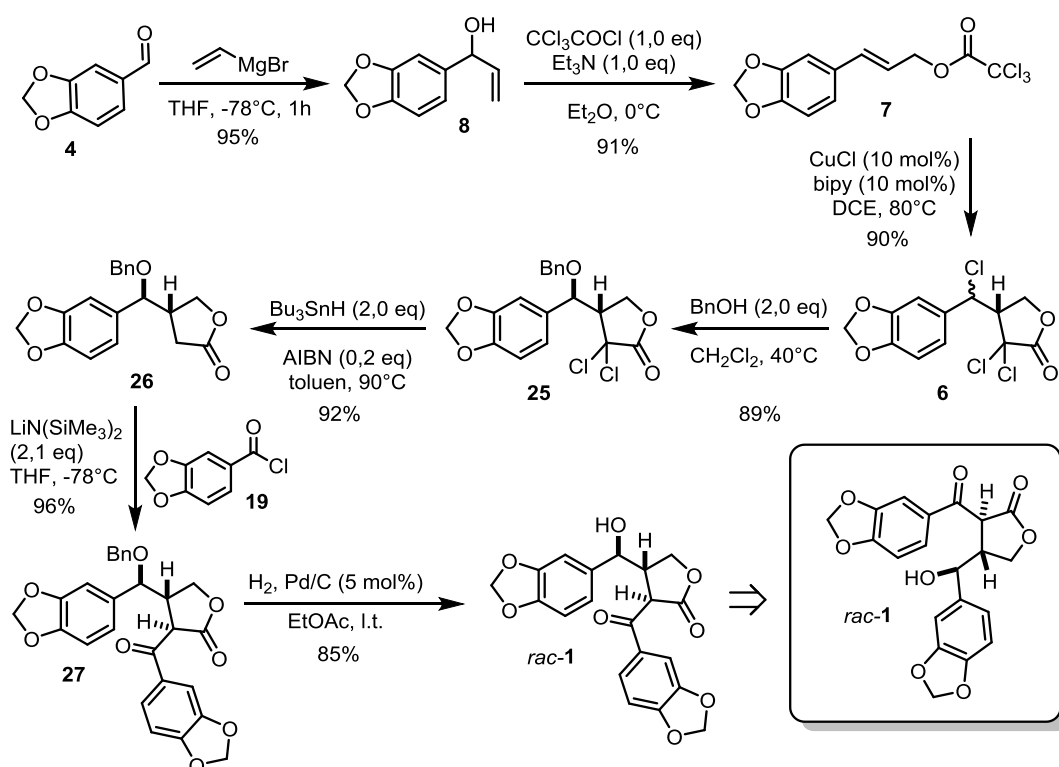


Schéma 5

4.2 Diverzně-orientovaná syntéza základního skeletu Sanguinolignanu A

Hlavním úkolem naší diverzně orientované syntézy (DOS) je prozkoumat možnost jak rychle a hlavně versatilně připravit základní modul lignanového typu **28** (Schéma 6). Tento základní skelet by měl naší skupině umožnit jednoduchý, rychlý ale hlavně velice modulární přístup k dimerům fenylypropanoidového typu, zejména lignanového typu. Náš obecný přístup, který bude pouze nastíněn v rámci mé diplomové práce, je založen na modulární syntéze založené na dvou základních krocích – Wittigově olefinaci a Stobbeho kondenzaci (Schéma 7).

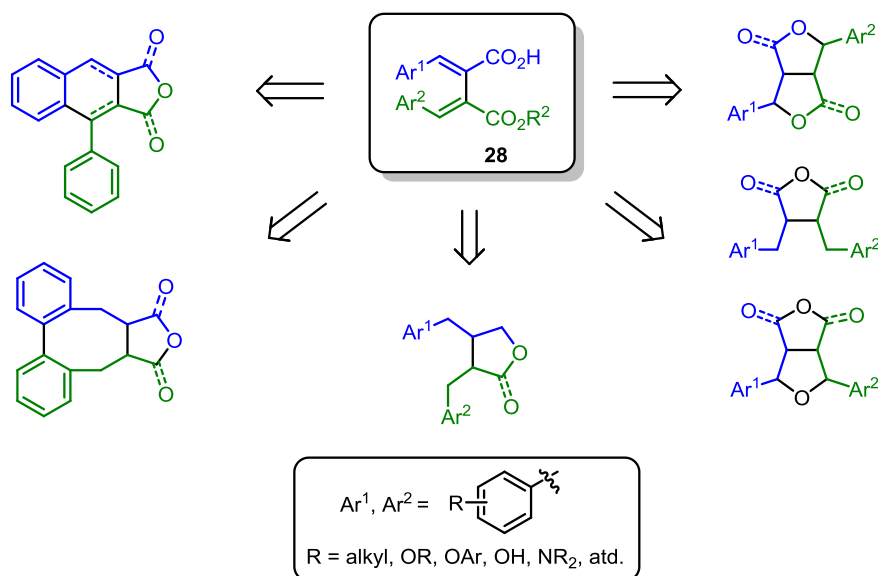


Schéma 6

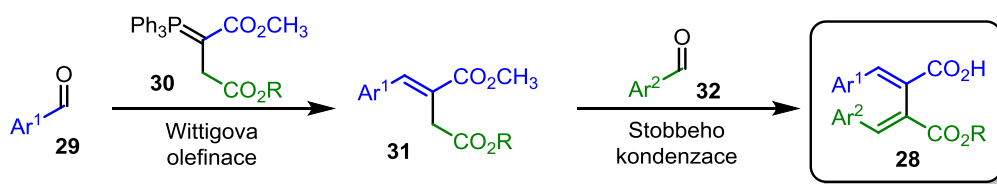


Schéma 7

4.2.1 Wittigova olefinační reakce – první klíčový krok

Nejprve jsme se zaměřili na Wittigovu olefinační reakci. Syntéza tedy začala přípravou stabilizovaných fosforylových ylidů **30** a **33** (Siebum *et al.*, 2003). Tyto ylidy byly připraveny z odpovídajících α -bromo esterů **34** a trifenylofosfinu (Schéma 8). Z důvodu relativní náchylnosti těchto ylidů k reakci se vzdušnou vlhkostí jsme se rozhodli provádět tuto syntézu v multigramovém množství a poté skladovat dané ylidy za laboratorní teploty v nepřítomnosti vzdušné vlhkosti.

Generované ylidy byly pak reagovány s aromatickými aldehydy a ketony (Tabulka 7). Na základě našich předchozích zkušeností s olefinačními reakcemi (Markó & Pospíšil, 2009) a obecně termickými reakcemi iniciovanými mikrovlnným zářením (Pospíšil & Potáček, 2007) jsme se rozhodli iniciovat tuto reakci mikrovlnným zářením (ylidy fosforu mají značný dipólový moment, takže jsou vhodným substrátem pro reakce iniciované mikrovlnným zářením (Pospíšil & Potáček, 2007).

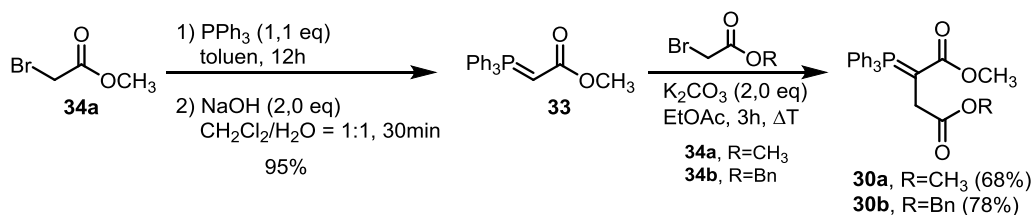
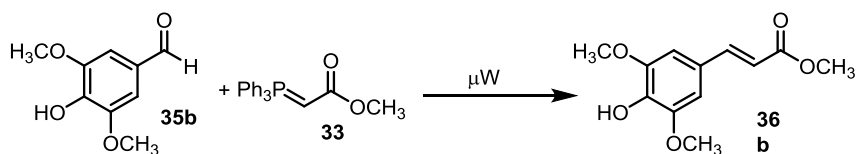


Schéma 8

Abychom našli vhodné reakční podmínky pro olefinační reakci, nejprve jsme se zaměřili na reakci ylidu **33** s aldehydem **35b** (Tabulka 6). V literatuře se samozřejmě vyskytuje celkem značné množství olefinačních reakcí stabilizovaných Wittigových ylidů s aldehydy. Většina z nich, jak se bohužel ukázalo, se nedá aplikovat na naše substráty, protože tyto reakční podmínky vedly k nízkým výtěžkům nebo degradaci ylidu (Frattoni *et al.*, 2001 (ref 1); Rodrigues *et al.*, 2012 (ref 2)). Domníváme se, že publikované reakční podmínky, které byly vždy optimalizovány na reakce s aldehydy substituované elektronově deficitními substituenty (Frattoni *et al.*, 2001) nebo byly reagovány s aldehydy nesoucími chráněné fenolické skupiny (Rodrigues *et al.*, 2012), byly naprosto nevhodné pro reakce s aldehydy nesoucí jednu nebo více nechráněných fenolických skupin (např. aldehyd **35b**). Ale protože my jsme potřebovali mít ve finálních produktech jednu, ne více volných fenolických skupin (sekundární metabolity fenypropanoidového typu), chtěli jsme zamezit prodlužování syntézy těchto látek zavedením a odstraněním chránících skupin (Trost, 1997).

Abychom dosáhli požadovaných výsledků, bylo v našem případě nezbytné použít takové rozpouštědlo, které (1) neabsorbuje mikrovlnné záření (nepolární) a (2) má vyšší bod varu. V našem případě se nejlépe osvědčil toluen. Předpokládáme tedy, že role toluenu jako rozpouštědla je v tom aby zamezila lokálnímu přehřátí směsi a tedy k degradaci výchozích látek a/nebo produktu. Náš teplotní „mediátor“ – toluen – samozřejmě nerozpouští ani jednu z výchozích látek a ve většině případů ani produkty. V našich experimentech se ukázalo, že ve většině případů byla reakce za optimálních podmínek hotova již během 3 minut, ale protože jsme neměli možnost kontrolovat průběh reakce (uzavřený systém), rozhodli jsme se ponechat reakční čas na 10 minutách. Za těchto podmínek reakce vždy proběhla s úplnou konverzí výchozího aldehydu.

Tabulka 6: Optimalizace reakčních podmínek Wittigovy olefinační reakce

| Vstup | Podmínky | Výtěžek [%] ^a | Litt |
|-------|--|--------------------------|-------|
| 1 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), 150°C, 30 min, bez rozpouštědla | degradace | ref 2 |
| 2 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), 100°C, 30 min, bez rozpouštědla | degradace | ref 2 |
| 3 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), THF (0,1M), 100°C, 60 min | 20 | ref 1 |
| 4 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), EtOAc (0,1M), 100°C, 60 min | <5 | ref 1 |
| 5 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), toluen (0,1M), 100°C, 60 min | 35 | - |
| 6 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), toluen (0,1M), 150°C, 60 min | 42 | - |
| 7 | 35b (1,0 eq), 33 (2,0 eq), toluen (0,1M), 150°C, 60 min | 85 | - |
| 8 | 35b (1,0 eq), 33 (2,0 eq), toluen (0,1M), 150°C, 10 min | 40 | - |
| 9 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), toluen (1,0M), 150°C, 10 min | 95 | - |
| 10 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), toluen (1,0M), 110°C, 10 min | 85 | - |
| 11 | 35b (1,0 eq), 33 (1,1 eq), toluen (1,0M), 150°C, 6 min | 93 | - |

a) Odpovídá čisté izolované látce.

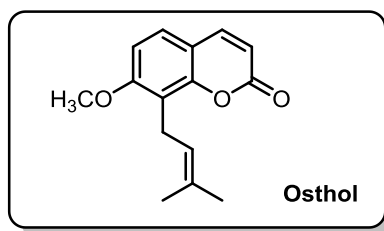
Tyto optimalizované reakční podmínky byly poté aplikovány na komerčně dostupné aldehydy a ketony (Tabulka 7). Ukázalo se, že pokud byly aldehydy použity jako výchozí látky, produkty olefinace **36** byly izolovány ve výtěžcích >90% a *E/Z* selektivitou >90:10. Jedinou výjimkou byla reakce salicylaldehydu **35g** (vstup 7), kde výtěžek produktu **36g** byl pouze 82%. Pečlivou analýzou reakční směsi jsme objevili stopy jiného produktu (1-5%), který jsme předběžně analyzovali na základě ¹H-NMR spekter jako kumarin **37g** (Schéma 9).

Následný pohled do literatury nám ukázal, že produkty typu **36** substituované v *ortho*-poloze hydroxylovou skupinou podléhají, jsou-li vystaveni dlouhodobě vysokým teplotám (nad 190 °C), termické *E/Z* izomerizaci a následné cyklizaci (Narasimham *et al.*, 1979). Domníváme se tedy, že v našem případě došlo k lokálnímu přehřátí reakční směsi, která měla za následek tvorbu stopových množství produktu **36g** s kumarinovým skeletem. Abychom potvrdili náš předpoklad, tak byla reakce mezi aldehydem **35g** a ylidem **33** provedena ještě jednou, ale tentokrát za zvýšené teploty (Tabulka 8).

Ukázalo se, že pokud provedeme reakci při 220 °C po dobu 60 minut, dojde k exkluzivní formaci kumarinu **37g** a to s 89% výtěžkem. Stejného efektu jsme mohli pozorovat, pokud aldehydy **35i**, **35o**, **35s** a **35t** byly reagovány za stejných podmínek

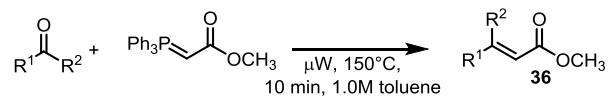
s ylidem **33**. I v těchto případech byly produkty kumarinového typu **37i**, **37o**, **37s** a **37t** připraveny v 86%, 72%, 78% a 68% výtěžku.

Výsledky těchto experimentů znamenají to, že můžeme za méně než 2 hodiny (včetně purifikace) připravit z komerčně dostupných výchozích látek substituované kumarinové deriváty. Abychom ještě zvýšili efektivnost této mikrovlnami iniciované transformace, rozhodli jsme se vyzkoušet *in situ* selektivní tvorbu kumarinového skeletu se selektivní substitucí aromatického jádra nově vytvořeného kumarinu. Pokud by náš předpoklad fungoval, tak by se některé biologicky aktivní kumariny mohly připravovat *in situ* v jedнокrokové syntéze (např. kumarin Osthol (Hadeček *et al.*, 1994)) (Obrázek 9), cena v katalogu Sigma-Aldrich, 10 mg – 2 727 Kč, internetový zdroj 16). Náš návrh vycházel z naší předcházející zkušenosti s mikrovlnami iniciovanými reakcemi (Pospíšil & Potáček, 2007).



Obrázek 9: Kumarin Osthol: potenciální cíl naší mikrovlnné metody

Tabulka 7: Syntéza fenylpropanoid-esterů 36 pomocí stabilizovaných ylidů a komerčně dostupných aldehydů.



| Vstup | Aldehyd | Produkt | Výtežek ^{a)} | (E/Z) ^{b)} | Vstup | Aldehyd | Produkt | Výtežek ^{a)} | (E/Z) ^{b)} | Vstup | Aldehyd/keton | Produkt | Výtežek ^{a)} | (E/Z) |
|-------|---------|---------|-----------------------|---------------------|-------|---------|---------|-----------------------|---------------------|-------|---------------|---------|-----------------------|-------|
| 1 | | | 96% | >95:1 | 7 | | | 82% | 92:8 | 14 | | | 92% | >95:1 |
| 2 | | | 98% | >95:1 | 8 | | | 95% | 90:10 | 15 | | | 94% | >95:1 |
| 3 | | | 92% | >95:1 | 9 | | | 89% | >95:1 | 16 | | | 76% | 80:20 |
| 4 | | | 98% | >95:1 | 10 | | | 91% | 81:19 | 17 | | | 78% | 82:18 |
| 5 | | | 98% | >95:1 | 11 | | | 84% | 92:8 | 18 | | | 75% | - |
| 6 | | | 94% | 92:8 | 12 | | | 95% | 92:8 | 19 | | | 62% | - |
| | | | | | 13 | | | 98% | >95:1 | | | | | |

a) Odpovídá čisté izolované látce.

b) Určeno ze ¹H NMR spekter reakční směsi.

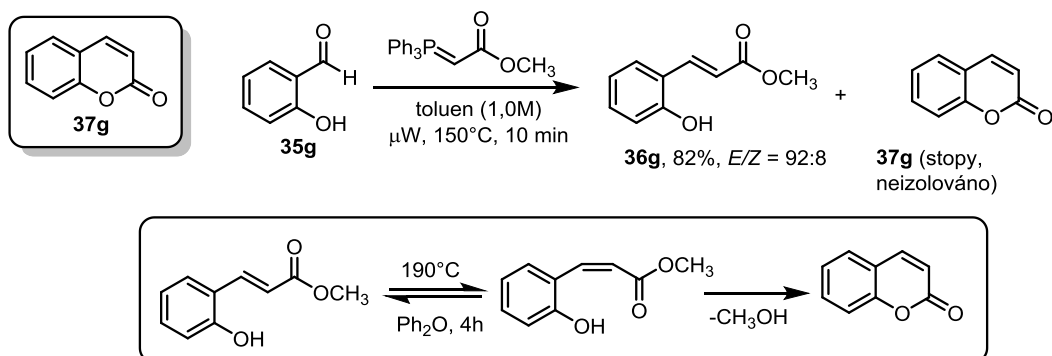


Schéma 9

Tabulka 8: Syntéza kumarinů 37

| Vstup | Aldehyd | Produkt | Výtežek ^{a)} |
|-------|---------|---------|-----------------------|
| 1 | | | 89% |
| 2 | | | 86% |
| 3 | | | 72% |
| 4 | | | 78% |
| 5 | | | 68% |

a) Odpovídá čisté izolované látkce.

Předpokládali jsme, že pokud necháme reagovat *o*-allyl substituovaný salicylaldehyd **35i** s ylidem **33** za výše zmíněných podmínek, tak by mělo dojít k olefinační reakci (**36i**), která bude následována Claisenovým přesmykem ([3,3]-sigmatropním přesmykem) na látku **38** a cyklizací „odchráněného“ rearomatizovaného fenolu (*Z*)-**39** na izomerizovaný metyl ester (Schéma 10). V rámci této transformace je tedy formálně jedna vazba přerušena (znázorněna **červeně**) a čtyři vytvořeny (znázorněna **zeleně**). Náš předpoklad se vyplnil lépe, než jsme čekali a výsledný kumarin **40** byl za těchto podmínek vytvořen v 85% výtěžku.

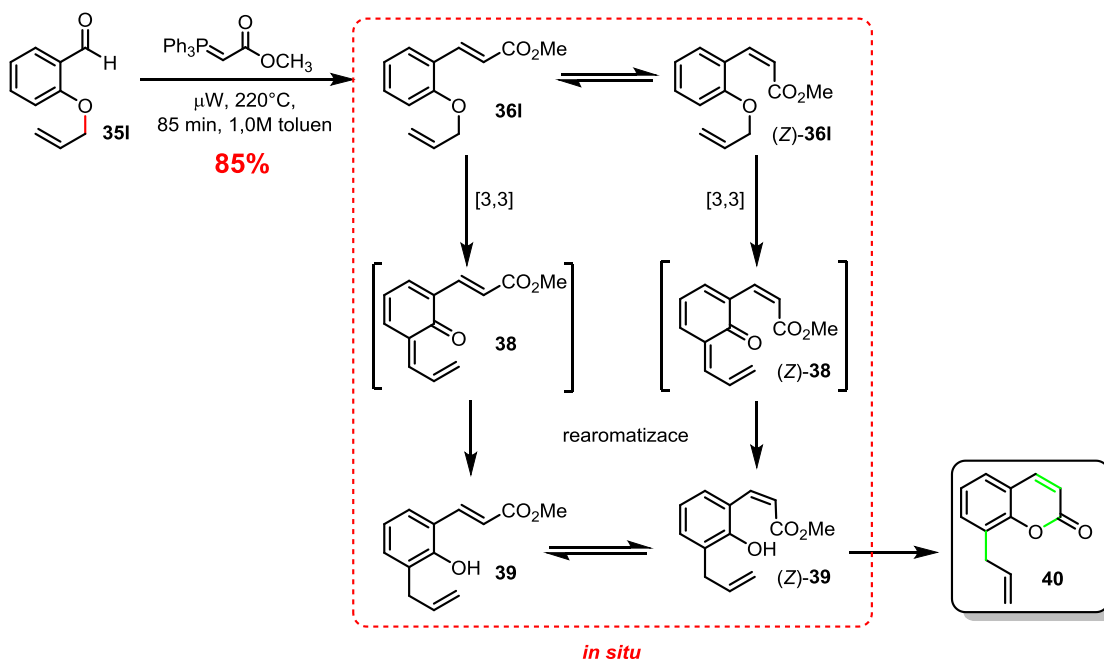
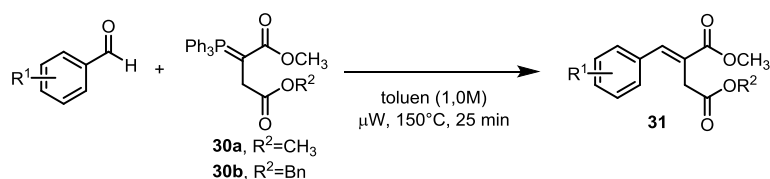


Schéma 10

Po optimalizaci olefinačního kroku mezi aldehydy **35** a ylidem **33** jsme přistoupili k rozšíření této metodologie na ylid **30**. Aplikací našich teď již standardních podmínek se nám podařilo připravit prekurzory pro Stobbeho kondenzaci v jednom kroku a výtěžcích přesahujících 59-88 % a selektivitě >90:10 (Tabulka 9). Jedinou změnou bylo prodloužení reakční doby na 25 minut.

Tímto jsme tak dokončili první krok našeho syntetického přístupu zaměřeného směrem k diverzitně orientované syntéze (DOS syntéze) lignanů sanguinolignanového typu **1**.

Tabulka 9: Syntéza prekurzorů Stobbeho reakce – první klíčový krok



| Vstup | Aldehyd | Produkt | Výtežek ^{a)} (E/Z) ^{b)} | | Vstup | Aldehyd | Produkt | Výtežek ^{a)} (E/Z) ^{b)} | |
|-------|---------|---------|---|------|-------|---------|---------|---|------|
| 1 | | | 72% | 95:5 | 7 | | | 72% | 95:5 |
| 2 | | | 59% | 95:5 | 8 | | | 80% | 98:2 |
| 3 | | | 71% | 96:4 | 9 | | | 75% | 98:2 |
| 4 | | | 74% | 95:5 | 10 | | | 88% | 98:2 |
| 5 | | | 69% | 92:8 | 11 | | | 81% | 98:2 |
| 6 | | | 69% | 95:5 | 12 | | | 74% | 95:5 |

a) Odpovídá čisté izolované látce.

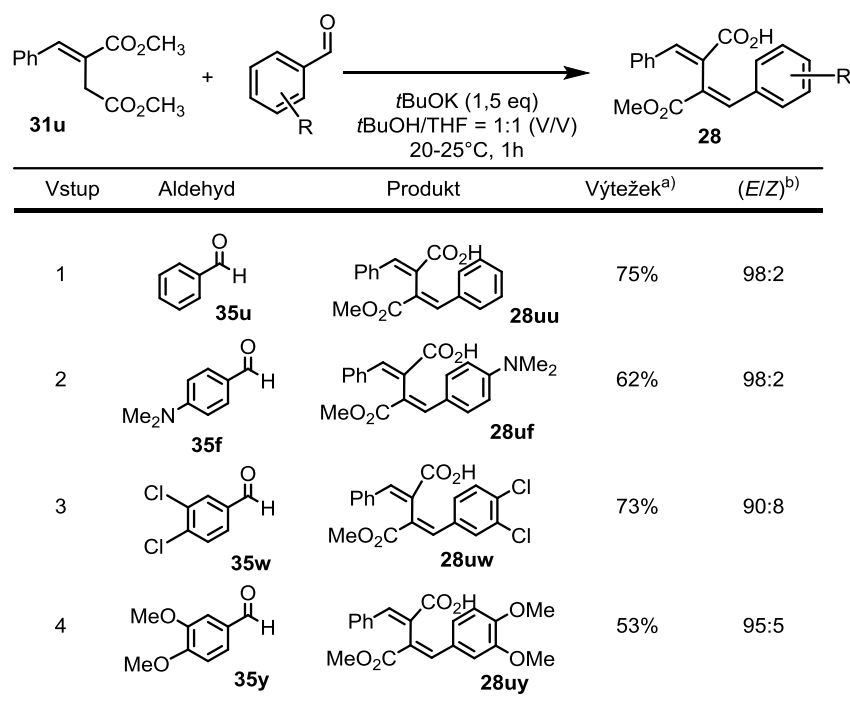
b) Určeno ze ¹H NMR spekter reakční směsi.

4.2.2 Stobbeho kondenzace – druhý klíčový krok

Druhým klíčovým krokem DOS syntézy lignanů byla Stobbeho kondenzace mezi diesterem **31** a vybranými aromatickými aldehydy **35** (Tabulka 10). Tato tzv. jmenná reakce probíhá za přítomnosti nenukleofilní báze (*tert*-BuOK – aby nedošlo k hydrolyze esteru) v přítomnosti polárních protických rozpouštědel. V našem případě se nám osvědčilo použití *tert*-BuOH jako rozpouštědla (protické) ve směsi s THF (aprotické rozpouštědlo). V jejich přítomnosti reakce probíhala již za laboratorní teploty a úplné konverze výchozích látek bylo dosaženo během 1 hodiny. Po okyselení reakční směsi pomocí konc. HCl jsme mohli vyizolovat žádaný produkt Stobbeho kondenzace – kyselinu **28** ve výtěžcích mezi 50 a 80 % v závislosti na substituentech výchozího aldehydu **35**.

Konečný produkt, estero-kyseliny **28** tak mohou být použity podle plánovaného schématu (Schéma 7) k přípravě jiných strukturně obdobných lignanů v rámci DOS syntézy těchto látek a případně i při syntéze strukturních derivátů Sanguinolignanu **1**.

Tabulka 10: Stobbeho kondenzace mezi aromatickými aldehydy a diesterem 31.



a) Odpovídá čisté izolované látce.

b) Určeno ze ¹H NMR spekter reakční směsi.

4.3 Biologické testy připravených látek

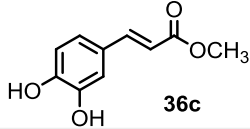
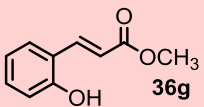
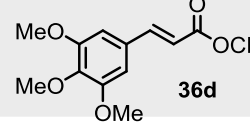
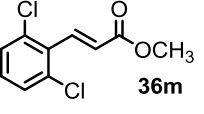
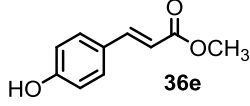
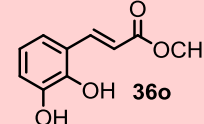
V okamžiku sepisování mé diplomové práce jsme se bohužel dostali pouze k *rac-1* derivátu sanguinolignanu A. Enantiomerně obohacený (–)-**1** bohužel ještě nebyl k dispozici a tak jsme se rozhodli otestovat alespoň námi připravené deriváty fenylypropanoidů, kumarinů a zejména intermediáty připravené pro syntézu Sanguinolignanu A. Námi vybrané látky byly testovány zejména pro své leishmanicidní vlastnosti (*L. turanica*), ale ověřili jsme si i jejich cytotoxicitu na buněčných liniích odvozených od chronické myeloidní leukémie (MCF-7), prsního adenokarcinomu (K562) a na kožních fibroblastech (BJ).

Pro první kolo testování jsme si vybrali velice jednoduché fenylypropanoid estery, a otestovali jsme jejich aktivitu vůči *L. turanica* (Tabulka 11) a výše uvedeným buněčným liniím (Tabulka 12).

Z vybraných testovaných látek pouze dvě vykazovali vyšší leishmanicidní aktivitu. Po 72 hodinové inkubaci s látkou **36g** přežilo pouze 22 % parazitů v případě 100 μM koncentrace a 44,2 % parazitů v případě 50 μM koncentrace testované látky. Pro testovanou látku **36o** byla míra přežití promastigotů pro 100 a 50 μM koncentraci 33,4 % a 36,4 %.

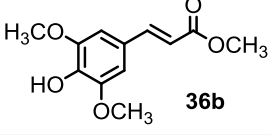
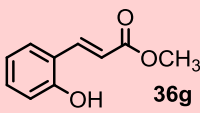
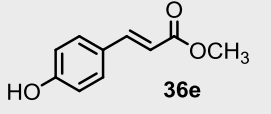
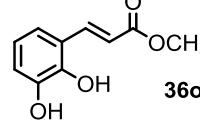
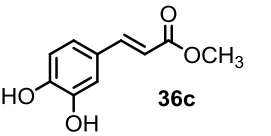
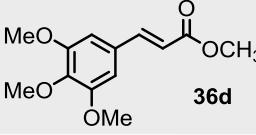
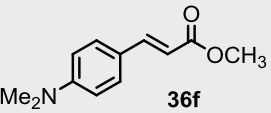
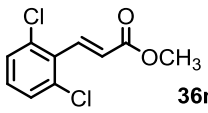
Dále jsme testovali naše jednoduché fenylypropanoidy na buněčných liniích odvozených od chronické myeloidní leukémie (MCF-7), prsního adenokarcinomu (K562) a na kožních fibroblastech (BJ). Ani jedna z testovaných látek nevykazovala žádnou významnou aktivitu. Zajímavou se jevila pouze látka **36g**, která vykazovala jednu z nejvyšších leishmanicidních aktivit (Tabulka 11) oproti ostatním testovaným látkám, ale zároveň nevykazovala toxicitu pro lidské buňky (Tabulka 12). Tyto vlastnosti jsou pro látky potenciálně využitelné pro léčbou leishmaniózy velice vhodné, jelikož se tak omezí sekundární toxické efekty pro organismus v průběhu léčby.

Tabulka 11: Výsledky biologických testů na *L. turanica* pro vybrané testované látky. Látky byly testovány v koncentraci 100 a 50 μM a byla zjišťována životaschopnost promastigotů po 72 h inkubaci.

| Testovaná látka | <i>L. turanica</i> životaschopnost [%]* | | Testovaná látka | <i>L. turanica</i> životaschopnost [%]* | |
|---|--|------------------|--|--|------------------|
| | 100 μM | 50 μM | | 100 μM | 50 μM |
|  36c | 42,0 | 61,2 |  36g | 22,0 | 44,2 |
|  36d | 51,4 | 64,3 |  36m | 79,8 | 89,7 |
|  36e | 58,5 | 73,5 |  36o | 33,4 | 36,4 |

* 72h inkubací doba s testovanými látkami

Tabulka 12: Výsledky biologických testů na třech buněčných liniích (K562 - odvozeno od chronické myeloidní leukémie, MCF-7 – odvozeno od prsního adenokarcinomu a BJ – kožní fibroblasty) pro vybrané testované látky. Látky byly testovány pro různé koncentrace a vyhodnoceny po 72 h inkubaci.

| Testovaná látka | IC_{50} (μM) bunecne linie | | | Testovaná látka | IC_{50} (μM) bunecne linie | | |
|---|---|-------|------|--|---|----------------|----------------|
| | K562 | MCF-7 | BJ | | K562 | MCF-7 | BJ |
|  36b | >100 | 81,2 | >100 |  36g | >100 | >100 | >100 |
|  36e | >100 | >100 | >100 |  36o | 41,4 | 14,0 | 3,7 |
|  36c | 64,5 | 55,6 | 5,7 |  36d | >100 | >100 | >100 |
|  36f | >100 | >100 | >100 |  36m | >50 | >50 | >50 |

Závěrem bych chtěla poznamenat, že hodnoty leishmanicidních aktivit našich látek samozřejmě ani zdaleka nedosahují aktivity doposud užívaných antileishmanik (Blum *et al.*, 2004). Předpokládáme ale, že u našeho finálního produktu, (–)-Sanguinolignanu A (**1**), nebo jeho derivátů by tato aktivita měla být mnohem vyšší. Důvodem našeho předpokladu pro vyšší aktivitu je fakt, že Sanguinolignan A byl již testován proti axenickým amastigotům *Leishmanie amazonensis* MHOM/BR/76/LTB-012 (internetový zdroj 7) a jeho hodnota IC₅₀ byla stanovena na 36,7 μM. Druhým důvodem je již potvrzená trypanocidní aktivita Hinokininu, lignanu se strukturou velmi podobnou struktuře (–)-Sanguinolignanu A.

Tím, že jsme si teď jisti relativní strukturou Sanguinolignanu A **1** a musíme „jen“ potvrdit její absolutní konfiguraci, nám dává dobrý důvod předpokládat, že leishmanicidní aktivita z rostlin izolovaného Sanguinolignanu A (**1**) odpovídá a my tak budeme moci na základě této struktury připravit mnohem aktivnější obdobu Sanguinolignanu A. Všechny naše biologické testy, které měříme na veškerých intermediátech a strukturně podobných látkách, nám pak budou sloužit k tomu, abychom mohli navrhnout takové modifikace, které nám umožní zvýšit leishmanicidní aktivitu modifikovaných látek a zároveň snížit toxicitu vůči lidským buňkám.

5. Závěr

V rámci této diplomové práce byly shrnuty poznatky dostupné do ledna 2015 týkající se parazitárního onemocnění leishmanióza. Byl popsán mechanismus a důležité faktory přenosu, epidemiologie nemoci a biologie infekčního agens a jeho přenašečů. V praktické části se nám podařilo připravit racemickou směs Sanguinolignan A a tím i potvrdit jeho relativní stereochemii. Ta však bude úplně potvrzena až po dokončení syntézy (–)- Sanguinolignan A od které nás dělí pouze jeden krok.

Podařilo se nám navrhnout a zrealizovat obecný přístup vedoucí k základnímu skeletu Sanguinalignanového typu. Naše DOS je složena ze dvou klíčových kroků z Wittigovy olefinace a Stobbeho kondenzace. V rámci těchto kroků jsme připravili fenylpropanoidové deriváty a kumariny. Výsledkem této práce je syntéza různých derivátů fenylpropanoidů a kumarinů a intermediátů nezbytných k syntéze Sanguinolignan A. Vybranou skupinu látek jsme otestovali na biologickou aktivitu vůči promastigotů *L. turanica* a dalším nádorovým i nenádorovým liniím.

Optimalizace některých kroků, další ověření jeho struktury, syntéza jeho derivátů a široké spektrum biologických testů, které jsou těmito kroky umožněny, budou provedeny v navazujícím studiu.

6. Seznam citací

Internetový zdroj 1: (22.12.2014)

<http://www.sgul.ac.uk/depts/id/espundia.jpg>

Internetový zdroj 2: (17.11.2014)

<file:///C:/Users/xx/Downloads/tropmed-86-606.pdf>

Internetový zdroj 3: (17.11.2014)

[http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/blood-proto.htm/.](http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/blood-proto.htm/)

Internetový zdroj 4: (17.11.2014)

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cutaneous_Leishmaniasis.jpg

Internetový zdroj 5: (17.11.2014)

<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

Internetový zdroj 6: (17.11.2014)

<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

Internetový zdroj 7: (3.3.2015)

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=549989>

Internetový zdroj 8: (3.3.2015)

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e0/Leishmaniasislifecyclediagramen.svg>

Internetový zdroj 9: (3.3.2015)

<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:70485> tabulka 2

Internetový zdroj 10: (Staženo 12.1.2015)

World Health Organization (2010) Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, WHO technical report series 949.

<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

Internetový zdroj 11: (1.11.2014)

<http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx>

Internetový zdroj 12: (3.11.2014)

http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/

Internetový zdroj 13: (3.11.2014)

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=549987>

Internetový zdroj 14: (Staženo 3.3.2015)

WHO, (2005) Report of a WHO informal consultation on liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis.

Internetový zdroj 15: (Staženo 3.3.2015.)

WHO, záznam ze zasedání WHO - informal Consultative meeting for the control of cutaneous Leishmaniasis in the Middle East and Maghreb, Geneva (2007).

Internetový zdroj 16: (Staženo 29.4.2015)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o9265?lang=en®ion=CZ>

Abdo, M. G., Elamin, W. M., Khalil, E. A. G, Mukhtar, M. M. (2003) Antimony-resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and *in vitro* correlation. *East Mediterranean Health* **9** (4): 837-843.

Almeida, R. P., Barral-Netto, M., De Jesus, A. M., De Freitas, L. A., Carvalho, E. M., Barral, A. (1996) Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *The American Journal of Tropical medicine and hygiene* **54**: 178-184.

Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R., Moreno, J. (1997) Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical microbiology reviews* **10** (2): 298-319.

Amato, V., Amato, J., Nicodemo, A., Uip, D., Amato-Neto, V., Duarte, M. (1998) Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. *Annals de Dermatologie et de Venerologie* **125**: 492-495.

Aronson, N. E., Wortmann, G. W., Johnson, S. C., Jackson, J. E., Gasser Jr., R. A., Magill, A. L., Endy, T. P., Coyne, P. E., Grogl, M., Benson, P. M., Beard, J. S., Tally, J. D., Gambel, J. M., Kreutzer, R. D., Oster, Ch. N. (1998) Safety and efficacy of intravenous sodium stibogluconate in the treatment of leishmaniasis: recent U. S. military experience. *Clinical infectious diseases* **27**: 1457-1464.

Ashford, R. W. (1999) Cutaneous Leishmaniasis: Strategies for prevention. *Clinics in dermatology* **17**: 327-332.

Ayres, D. C., Loike, J. D. (1990) Lignans, chemical, biological and clinical properties. Chemistry & Pharmacology of natural product. Cambridge University press.

Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Júnior, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E. M., Johnson, W. D. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of tropical medicine and hygiene* **44**: 536-546.

Bégis, G., Cladingboel, D. E., Jerome, L., Motherwell, W. B., Sheppard, T. D. (2009) Asymmetric synthesis of aminocyclopropanes and N-cyclopropylamino alcohols through direct aminocyclopropanation of alkenes using chiral organozinc carbenoids. *European Journal of organic Chemistry* **2009** (10) 1532-1548.

Bates P. A., Rogers, M. E. (2004) New insight into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Current Molecular medicine* **4**: 601-609.

- Bates**, P. A. (2007). Transmission of leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* **37**: 1097-1106.
- Berman**, J. D., Chulay, J. D., Hendricks, L. D. (1982) *In vitro* susceptibility of antimony resistant *Leishmania* to alternative drugs. *The Journal of Infectious diseases* **145** (2): 279.
- Blum**, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B., Hatz, C., (2004) Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53** (2): 158-166.
- Cabanillas**, B. J., Le Lamer, A. C., Castillo, D., Arevalo, J., Rojas, R., Odone, G., Bourdy, G., Moukarzel, B., Sauvain, M., Fabre, N. (2010) Caffeic acid esters and lignans from *Piper sanguineispicum*. *Journal of Natural Product* **73** (11): 1884-1890.
- Costa**, F. A., Goto, H., Saldanha, L. C., Silva, S. M., Sinhorini, I. L. Silva, T. C., Guerra, J. L. (2003) Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology* **40**: 677-684.
- Chajbullinova**, A., Votypka, J., Sadlova, J., Kvapilova, K., Seblova, V., Kreisinger, J., Jirku, M., Sanjoba, C., Sambuu, G., Matsumoto, Y., Volf, P. (2012) The development of *Leishmania turanica* in sandflies and competition with *L. major*. *Parasites and Vectors* **5**: 219.
- Croft**, S. L., Sundar, S., Fairlamb, A. H. (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiol Review* **19**: 111-126.
- Cunningham**, M. L., Zvelebil, M. J., Fairlamb, A. H. (1994) Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. *European Journal of Biochemistry* **221**: 285-295.
- Dantas-Torres**, F. (2007) The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, With emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary parasitology* **149**: 139 -146.
- De Oliveira-Silva**, F., de Moraes-Teixeira, E., Rabello, A. (2008) Antileishmanial activity of Azithromycin against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *American journal of Tropical medicine and Hygiene* **78** (5): 745-749.
- Desjeux**, P., Alvar, J. (2003) Leishmania/HIV coinfections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **97**: (1).
- Edlin**, C. D., Faulkner, J., Helliwell, M., Knight, C. K., Parker, J., Quayle, P., Raftery, J. (2006) Atom transfer radical cyclizations (ATRC): Synthetic applications, *Tetrahedron* **62**: 3004-3015.
- Estevez**, Y., Castillo, D., Tangoa-Pisango, M., Arevalo, J., Rojas, R., Alban, J., Deharo, E., Bourdy, G., Sauvain, M. J. (2007) Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* **114**: 254-259.

- Evans**, D. A., Bartroli, J., Shih, T. L. (1981) Enantioselective aldol condensations. 2. Erythro-selective chiral aldol condensations via boron enolates". *The Journal of American Chemistry Society* **103** (8): 2127-2129.
- Evans**, D. A., Mathre, D. J. (1985) Asymmetric synthesis of the enkephalines inhibitor thiorphan. *The Journal of Organic Chemistry* **50**: 1830-1835.
- Faraut-Gambarelli**, F., Piarroux, R., Deniau, M., Giusiano, B., Marty, P., Michel, G., Faugère, B., Dumon, H. (1997) *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 827-830.
- Franttini**, S., Quai, M., Cereda, E. (2001) Kinetic study of microwave-assisted Wittig reaction of stabilised ylides with aromatic aldehydes. *Tetrahedrons letters* **42** (39): 6827-6829.
- Goto**, H., Lauletta-Lindoso, J. A. (2012) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious Diseases clinics of North America* **26**: 293-307.
- Gross**, G. G., Hemingway, R. W., Yoshida, T. (2012) Plant polyphenols: chemistry, biology, pharmacology, ecology 23-60. Springer Science & Media, E-kniha. Staženo 12. 3. 2015.
- Hadeček**, F., Muller, C., Werner, A., Greger, H., Proksch, P. (1994) Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apioideae). *Journal of Chemical Ecology* **20** (8): 2035-2054.
- Hajra**, S., Mandal, A., Hazra, S. (2013) Asymmetric aldol approach to dibenzylbutyrolactone lignans: synthesis of (-)-(7'S)-hydroxymatairesinol and (-)-(7'S)-hydroxyarctigenin. *Tetrahedron Letters* **54**: (17) 2171-2173.
- Herwald**, B. L., Berman, J. D. (1992) Recommendations for treating leishmaniasis with stibogluconate (Pentosan) and review of pertinent clinical studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 296-306.
- Herwaldt**, B. L. (1999) Leishmaniasis. *The Lancet* **354**: 1191-1199.
- Cho**, J. Y., Parl, J., Su Kim, P., Sook Yoo, E., Up Baik, K., Park, M. H. (2001) Savinin, a Lignan from *Pterocarpus santalinus* inhibits tumor necrosis factor- α production and Tcell proliferation. *Biological and pharmaceutical bulletin* **24**(2): 167-171.
- Jenett-Siems**, K., Mockenhaupt, F. P., Bienzle, U., Gupta, M. P., Eich, E. (1999) *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Tropical medicine & International Health* **4**: 611-615.
- Kamhawi**, S. (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitology* **22**: 439 – 445.
- Lee**, A. L., Ley, S. V. (2003) The synthesis of the anti-malarial natural product polysphorin using polymer-supported reagents and scavengers. *Organic & Biomolecular Chemistry* **1**: 3957-3966.

- Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E., Sacks, D. (1999)** Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *The Journal of Infectious Diseases* **180**: 564–567.
- Lukeš, J., Mauricio, I. L., Schönián, G., Dujardin, J. C., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Kuhls, K., Tintaya, K. W. Q., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, Ch., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F. J., Miles, M. A. (2007)** Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **104**: 9375-9380.
- Lynn, M. A., McMaster, W. R. (2008)** Leishmania: conserved evolution – diverse diseases. *Trends in parasitology* **24** (3).
- MacRae, W. D., Towers, G. H. N. (1984)** Biological activities of lignans. *Phytochemistry* **23** (6): 1207-1220.
- Markó, I. E., Pospíšil, J. (2009)** Julia, Julia-Kocienski and related sulfur-based alkenylation. *Science of Synthesis 47a Alkenes*, de Meijere, A., Ed., Thieme, 105-160.
- Martinez, S., Marr, J. J. (1992)** Allopurinol in the treatment of american cutaneous leishmaniasis. *The New England Journal of medicine* **326** (11).
- McKennon, M. J., Meyers, A. I. (1993)** A Convenient reduction of amino acids and their derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* **58**: 3568-3571.
- Medola, J. F., Cintra, V. P., Pesqueira de Silva, E. P., de Andre Royo, V., da Silva, R., Saraiva, J., Albuquerque, S., Bastos, J. K., Andre de Silva, M. L., Tavares, D. C. (2007)** (–)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. *Food and Chemical toxicology* **45** (4): 638-642.
- Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., Baneth, G. (2008)** Canine leishmaniasis- new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* **24**(8): 371-377.
- Molyneux, D. H. (2012)** The „Neglected” Tropical Diseases: now a brand identity; responsibilities, context and promise. *Parasit Vectors* **5** (23).
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. (2005)** Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**: 1561-1577.
- Nacher, M., Carne, B., Sainte, M. D., Couppié, P., Clyti, E., Guibert, P., Pradinaud, R. (2001)** Influence of clinical presentation on efficacy of short course of Pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in french Guiana. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **95**: 331-336.
- Narasimham, S., Mali, R. S., Barve, M. V. (1979)** “Synthetic application of lithiation reactions; part XIII. Synthesis of 3-phenylcoumarins and their benzo derivatives,” *Synthesis* **1979** (11): 906-909.

- O'Brien**, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000) Investigation of the Almar Blue (resazurin) fluorescent dye the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* **267** (17): 5421-5426.
- Odone**, G., Bourdy, G., Castillo, D., Estevez, Y., Lancha-Tangoa, A., Alban-Castillo, J., Deharo, E., Rojas, R., Stein, D., Sauvain, M., J. (2009) TaTa, Huayani: perception of leishmaniasis and evaluation of medical plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. *Journal of Ethnopharmacology* **126**: 149-158.
- Ordeix**, L., Solano-Gallego, L., Fondevila, D., Ferrer, L., Fondati, A. (2005) Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. Infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Veterinary Dermatology* **16**: 187-191.
- OVADJE**, P., Ma, D., Tremblay, P., Roma, A., Steckle, M., Guerrero, J. A., Arnason, J. T., Pandey, S. (2014) Evaluation of the efficacy & biochemical mechanism of cell death induction by Piper longum extract selectively in-vitro and in-vivo models of human cancer cells. *PLOS One* **9** (11): 113250.
- Palacios**, R., Osorio, L. E., Grajalew, L. F., Ochoa, M. T. (2001) Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *The American Journal of Tropical Medicine and hygiene* **64**: 187-193.
- Parmar**, V., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. D., Prasad, A. K., Wengel, A. J., Olsen, C. E., Boll, P. M. (1997) Phytochemistry of genus *Piper*. *Phytochemistry* **46**: 591-673.
- Peacock**, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Cruz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ordmond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, m F., Baldauf, S. L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D. P., Oyola, S. O., Hilley, J. D., Brito, L. O., Tosi, L. R. O., Barrell, B., Cruz, A. K., Mottram, J. C., Smith, F. D., Berriman, M. (2007) Comparative genomic analysis of three leishmania species that cause diverse human disease. *Nature genomics* **39** (7).
- Periti**, P., Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A. (1993) Adverse effect of macrolide antibacterials. *Drug Safety* **9**: 346-364.
- Pospíšil**, J., Potáček, M. (2007) Microwave-assisted solvent-free intramolecular 1,3Dipolar cycloaddition reaction leading to hexahydrochromeno[4,3,-b] pyrroles. Scope and limitations. *Tetrahedron* **63**: 337-346.
- Pospíšil**, J., Sato, H. (2011) Practical synthesis of β -acyl and β -alkoxycarbonyl heterocyclic sulfones. *The Journal of Organic Chemistry* **76** (7): 2269-2272.

- Pospíšil**, J., Robiette, R., Sato, H., Debrus, K. (2012) Practical synthesis of b-oxobenzo[d]thiazol sulfones: scope and limitations. *Organic & Biomolecular Chemistry* **10**, 1225-1234.
- Rodrigues**, T., Lopes, F., Moreira, R. (2012) Microwave-assisted Wittig reaction of semistabilized nitro-substituted benzyltriphenyl-phosphorus ylides with aldehydes in phase-transfer conditions. *Synthetic communications* **42** (5): 747-755.
- Rogers**, M. E., Chance, M. L., Bates, P. A. (2002) The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stages of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* **124**: 495-450.
- Rojas**, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M. X., Ouellette, M., Saravia, N. G. (2006) Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. *The Journal of Infectious Diseases* **193**: 1375-1383.
- Rukachaisirikul**, T., Siriwattanakit, P., Sukcharoenphol, K., Wongvein, C., Ruttanaweng, P., Wongwattanavuch, P., Suksamrarn, A. J. (2004) Chemical constituents and bioactivity of *Piper sermantosum*, *Ethnopharmacology* **93**, 173-176.
- Rukachaisirikul**, T., Prabpai, S., Champung, P., Suksamram, A. (2002) Chabamide a novel piperine from stems of *Piper Chaba*. *Planta medica* **68**: 853-855.
- Sai**, H., Ogiku, T., Ohmizu, H., Ohtani, A. (2006) Synthesis of 1,4-Diphenylbutadiene derivatives: Novel inducer of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in cultured bovine endothelial cells. *Chemical and Pharmaceuticals Bulletin* **54** (12): 1686-1693.
- Santos**, A. L. S., Branquinha, M. H., d'Avila-Levi, C. M., Kneipp, L. F., Sodr , C. L. (2014) Proteins and proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*, Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London.
- Seaton**, R. A., Morrison, J., Man, I., Watson, J., Nathwani, D. (1999) Out-patient parenteral antimicrobial therapy – viable option for the management of cutaneous leishmaniasis. *Quarterly Journal of medicine* **92**: 659-666.
- Shaw**, J. (2007) The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem rias do Instituto Oswaldo Cruz* **10** (5): 541-547.
- Scheinfeld**, N. S., Tutrone, W. D., Torres, O., Weinberg, J. M. (2004) Macrolides in dermatology. *Clinics in dermatology* **21** (1): 40-49.
- Siebum**, A. H. G., Woo, W. S., Lugtenburg, J. (2003) Preparation and characterization of [5-¹³C]-(2S,4R)-Leucine and [4-¹³C]-(2S,3S)-Valine – Establishing synthetic schemes to prepare any site-directed Isotopomer of L-Leucine, L-Isoleucine and L-Valine. *European Journal of Organic Chemistry* **2003** (23): 4664-4678.
- Solano-Gallego**, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. (2001) Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 560-563.

- Soto**, J., Toledo, J., Gutierrez, P., Nicholls, R. S., Padilla, J., Engel, J., Fischer, C., Voss, A., Berman, J. (2001) Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clinical Infectious Diseases* **33**: 57-61.
- Sundar**, S., Jha, T. K., Thakur, Ch. P., Sinha, P. K., Bhattacharya, S. K. (2007) Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine* **356** (25).
- Tiuman**, T. S., Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B. D., Nakamura, C. V. (2011) Recent advances in Leishmaniasis treatment. *International Journal of infectious diseases* **15**: 525-523.
- Trost**, B. M. (1995) Atom Economy. A Challenge for organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English* **34** (3): 259-281.
- Umezawa**, T. (2003) Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* **2**: 371-390.
- Vásquez**, L., Scorza Dagert, J. V., Scorza, J. V., Vicuña-Fernández, N., Petit de Peña, Y., López, S., Bendezú, H., Rojas, E., Vásquez, L., Pérez, B. (2006) Pharmacokinetics of experimental Pentavalent antimony after intramuscular administration in adult volunteers. *Current Therapeutic research* **67** (3).
- Wang**, B., Yu Xiu-Chun, X. U., Song-Feng, Xu. M. (2015) Paclitaxel and etoposide co-loaded polymeric nanoparticles for the effective combination therapy against human osteosarcoma. *Journal of Nanobiotechnology* **13** (12).
- Wasunna**, M. K., Rashid, J. R., Mbui, L., Kirigi, G., Lodenyo, H., Felton, J. M., Sabin, A. J., Horton, J. (2005) A Phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **73**: 871-876.
- Von Wantoch Rekowski**, M., Kumar, V., Zhou, Z., Moschner, J., Marazioti, A., Bantzi, M., Spyroulias, G. A., Van Den Akker, F., Giannis, A., Papapetropoulos, A. (2013) Insights into soluble guanylyl cyclase activation derived from improved heme-mimetics. *Journal of medicine chemistry* **56** (21): 8948-8952.
- Wyllie**, S., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H. (2004) Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 39925-39932.
- Zhang**, W. W., Mendez, S., Ghosh, A., Myler, P., Ivens, A., Clos, J., Sacks, D. L., Matlashewski, G. (2003) Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *The journal of Biological Chemistry* **278** (37): 35508-35515.
- Zuckerman**, J. M. (2000) The newer macrolides: Azithromycin and Clarithromycin. *Infectious Disease Clinics of North America* **14** (2): 449-462.

Přílohy jsou přiloženy na CD.

Příloha 1 obsahuje skupinu spekter základných meziproductů

Příloha 2 obsahuje skupinu záznamu z mikrovlnných reakcí a ms spekter