

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

# Syntéza nových metallakarbonových inhibitorů HIV-1 proteasy

Robin Kryštůfek



STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

2012/2013

35. ročník

Obor: 03 – Chemie

Syntéza nových metallakarboranových inhibitorů HIV-1 proteasy

*Preparation of novel metallacarborane HIV-1 Protease inhibitors*

**Autor:**

Robin Kryštůfek

Na Domovině 692/18, Praha 4, 142 00

**Škola:**

3. ročník

Gymnázium Na Vítězné pláni, Praha 4,

Na Vítězné pláni 1160, 140 00

**Konzultant:**

Mgr. Václav Šícha, Ph.D.

Ústav anorganické chemie AV ČR, v. v. i.

250 68 Řež u Prahy

**Místo vypracování:**

Ústav anorganické chemie AV ČR, v. v. i.

250 68 Řež u Prahy

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně, použil jsem pouze podklady citované v práci a uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V ..... dne .....

podpis: .....

## Poděkování

Zde bych na prvním místě poděkoval konzultantovi práce Mgr. Václavu Šíchovi, Ph.D. za všechnu pomoc, ochotu, skvělé pracovní prostředí, obdivuhodnou trpělivost a zabezpečení výborného materiálového a přístrojového vybavení. Osvojil jsem si díky němu mnoho znalostí, naučil jsem se manipulovat s pestrou škálou přístrojového vybavení laboratoře a byl mi příkladem i v krizových situacích, kdy dokázal vždy zachovat chladnou hlavu. Zároveň bych se chtěl omluvit za čas, který strávil se mnou a ne doma se svým čerstvě narozeným synem.

Moje poděkování taktéž patří dalším pracovníkům oddělení syntéz, zejména Ing. Jaroslavu Švehlovi za provedená měření a vedoucímu RNDr. Bohumíru Grünerovi, CSc. za se mnou strávený čas a všestrannou pomoc.

Velice děkuji Ing. Janě Pokorné a doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. z oddělení biochemie patogenních proteas ÚOChB AV ČR za provedená měření inhibičních konstant zkoumaných látek.

Dále bych rád poděkoval RNDr. Heleně Vondráčkové, bez které bych do Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži nikdy nezavítal a tato práce by tudíž ani nemohla vzniknout.

Můj velký dík taktéž patří celé mé rodině, které bych chtěl poděkovat za morální podporu a pochopení, a všem kamarádům, se kterými jsem v průběhu tvorby této práce nemohl trávit tolik času, kolik bych chtěl.

## Anotace

Předkládaná práce se zabývá jednotlivými aspekty syntézy nových metallakarboranových substitučních derivátů kobalt bis(dikarbolidu), navržených s cílem vyvinout účinná virostatika účinkující jako inhibitory HIV-1 proteasy (HIV-1 PR) s účinností proti kmenům rezistentním vůči konvenčním organickým inhibitorům. Tyto látky budou předány k provedení testů kinetiky inhibice na izolovaném enzymu HIV-1 PR pro stanovení inhibiční koncentrace nutné k poklesu aktivity enzymu o 50% ( $IC_{50}$ ). Hodnoty  $IC_{50}$  spolu s druhem mechanismu účinku, pokud bude stanoven, budou posléze porovnány s vlastnostmi funkčního substituentu daného derivátu kobalt bis(dikarbolidu). Tyto poznatky poslouží k pochopení vlivu různých funkčních skupin na klíčové vlastnosti možného budoucího léčiva. Pro tyto účely bylo navrženo, připraveno a charakterizováno 5 nových sloučenin, obsahující motiv jedné, nebo dvou kobalt bis(dikarbolidových) jednotek vzájemně propojených diethylenglykolovým řetězcem se zabudovanou funkční skupinou v centru molekuly. Syntetizované látky byly charakterizovány s použitím pokročilých instrumentálních metod strukturního výzkumu – hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprayem (MS ESI) a nukleární magnetické rezonance (NMR).

**Klíčová slova:** metallakarborany, kobalt bis(dikarbolid), COSAN, HIV-1 proteasa, inhibitor, virostatika

## Annotation

Presented work deals with various aspects of the synthesis of new derivatives of substitutional metallacarborane cobalt bis(dicarbollide) derivatives, designed to develop effective antivirals acting as inhibitors of HIV-1 Protease (HIV-1 PR) with activity against resistant strains to conventional organic inhibitors. These substances will be forwarded for testing the kinetics of inhibition on the isolated enzyme HIV-1 PR to determine inhibitory concentrations required to decrease enzyme activity by 50% ( $IC_{50}$ ).  $IC_{50}$  values, combined with the type of mechanism of inhibition, if determined, will then be compared with the properties of the functional substituent of the cobalt bis(dicarbollide) derivative. These findings will be used to improve the knowledge about influence of different functional groups on key characteristics of potential future carborane antivirals. For this purpose, five new compounds containing a motif of one or two cobalt bis (dicarbollide) units interconnected via dioxane chain with integrated functional group in the center of the molecule were designed, prepared and characterized. Synthesized compounds were characterized using advanced instrumental methods of structural research - mass spectrometry with electrospray ionization (MS ESI) and nuclear magnetic resonance (NMR).

**Keywords:** metallacarboranes, cobalt bis-(dicarbollide) COSAN, HIV-1 protease, inhibitor, antivirals

# Obsah

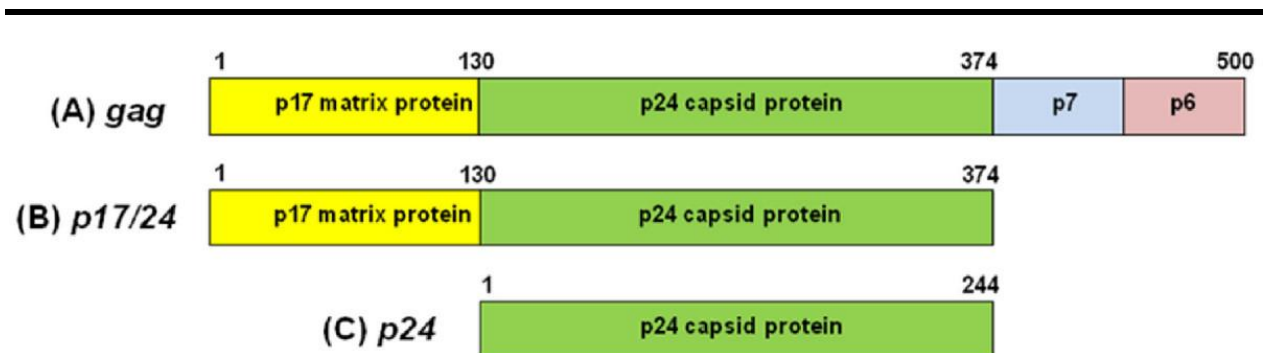
1. Úvod .....	8
2. Cíl práce .....	11
3. Teoretická část.....	12
3.1. HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti .....	12
3.1.1. Životní cyklus.....	13
3.1.2. Stávající léčiva .....	14
3.1.2.1. Inhibitory vstupu .....	15
3.1.2.2. Inhibitory reverzní transkriptasy .....	15
3.1.2.3. Inhibitory integrasy .....	16
3.1.2.4. Inhibitory proteasy.....	16
3.2. Borany .....	17
3.2.1. COSAN - Cobaltacarborane Sandwich Anion .....	18
3.2.2. Metallakarboranové inhibitory HIV-1 proteasy .....	19
3.3. Kompetitivní inhibice.....	22
4. Experimentální část .....	23
4.1. 8-dioxan-COSAN.....	23
4.2. L-Tyrosin-bis-COSAN-dioxanát.....	25
4.3. Thymin-bis-COSAN-dioxanát .....	27
4.4. Dopamin-bis-COSAN-dioxanát .....	29
4.5. L-fenylalaninmethylester–COSAN-dioxanát .....	31
4.6. D-Fenylalanin-bis–COSAN-dioxanát .....	33
4.7. Metody strukturní analýzy.....	35
4.7.1. NMR spektroskopie.....	35
4.7.2. Hmotnostní spektrometrie .....	37
4.7.3. Tenkovrstevná chromatografie .....	38
4.8. Použité chemikálie a laboratorní materiál .....	39
5. Výsledky.....	40
5.1. Výsledky inhibice HIV-1 PR .....	44
6. Závěr a diskuze.....	46
7. Seznam použitých zkratk.....	52
8. Přílohy .....	53
9. Reference.....	72

# 1. Úvod

K blokaci funkce HIV-1 proteasy (HIV-1 PR), homodimerního enzymu s primární strukturou sestávající z 99 aminokyselin, jehož funkce je zásadní pro replikaci viru HIV uvnitř buněk hostitele, bylo do klinické praxe uvedeno již 10 nízkomolekulárních proteasových inhibitorů (PI).<sup>(1)</sup> Stávající PI jsou složité organické molekuly, které svou strukturou napodobují peptidické vazby v polymerním substrátu (peptidomimetika), které však proteasa nedokáže štěpit. Zpravidla se jedná o látky s nízkou biologickou dostupností, vysokými náklady na jejich až 11-ti krokovou syntézu,<sup>(2)</sup> nežádoucími vedlejšími účinky a látky, ke kterým si velmi často hostující virus vytvořil rezistenci mutacemi aminokyselin v primární struktuře enzymu.<sup>(3)</sup>

Viru HIV zbaveného funkční proteasy není umožněno syntetizovat nové podjednotky virových kapsid – kapsomery, neboť tyto podjednotky resp. jejich základní protein p24 (obr. 1-1c) vznikají štěpením řetězce prekurzoru Pr55Gag (obr. 1-1a) právě pomocí HIV-1 PR.<sup>(4) (5)</sup>

V současné době nejsou PI v rámci léčby užívány samostatně, nýbrž v kombinaci s jinými druhy virostatik dle současné metodiky léčby AIDS, HAART (highly active anti-retroviral therapy), která určuje jako optimální 3-4 druhy léčiv podávaných v souběhu.<sup>(6)</sup> Předchází se tak předčasnému vzniku rezistence, který je v případě organických PI jinak velmi častý. Prvně byl vznik rezistence pozorován u Saquinaviru, prvního inhibitoru HIV-1 PR schváleného pro klinické použití, vůči kterému si vyvinulo rezistenci mnoho kmenů viru zejména v počátcích, kvůli příliš nízkému dávkování.<sup>(7)</sup>



**Obr. 1-1.** Schéma štěpení peptidického řetězce Pr55Gag. Podjednotka p17 pomáhá HIV proniknout do jádra hostitelské buňky, podjednotka p24 je základním proteinem kapsidy virionu, podjednotky p6 a p7 se vážou na molekulu RNA viru a chrání ji před účinky jaderných nukleas. Převzato z práce A. Meyers et al.; Expression of HIV-1 antigens in plants as potential subunit vaccines; BMC Biotechnology 2008 8:53.



Dnes je Saquinavir obdobně jako jiná PI obvykle užíván v kombinaci s jiným léčivem, Ritonavirem, který spíše než jako PI působí jako kompetitivní inhibitor jedné z isoform 3A4 komplexu jaterního enzymu Cytochromu P-450, který jinak Saquinavir a další antivirotika inaktivuje C-H hydroxylací a umožňuje tak jejich rychlé vylučování z organismu. <sup>(8)</sup> Aktivní systém Cytochromu P-450 tak snižuje biologickou dostupnost léčiva v séru a léčivo musí být podáváno v opakovaných vysokých dávkách, které přinášejí výrazné nežádoucí vedlejší účinky vlivem zvyšující se cytotoxicity. <sup>(9)</sup>

Mocnou zbraní v boji proti HIV by se jednou mohly stát abiogenní metallakarboranové sloučeniny, <sup>(10)</sup> zejména deriváty tzv. COSANu (Cobaltacarborane Sandwich Anion), což je látka sestávající ze dvou strukturně stálých trojrozměrných dvacetistěnných karboranových subklastrů (klecí) sestávajících ze dvou atomů uhlíku a devíti atomů boru. Dohromady jsou subklastry svázány atomem kobaltu s formálním oxidačním číslem III, ve kterém je sloučenina nejstabilnější. COSAN v této podobě je monoaniont, nejčastěji se s ním setkáváme ve formě bezvodé cesné soli. Poprvé byl připraven M. F. Hawthornem a spolupracovníky v roce 1965. <sup>(11)</sup>

Důkazem, že karboranové sloučeniny mohou jednou hrát velkou roli v terapii proti HIV, jsou dosavadní výsledky stanovení účinnosti inhibice HIV-1 PR *in vitro* a *in vivo*. <sup>(12)</sup> Klíčovými vlastnostmi boranových klastrů, které jim propůjčují jejich výjimečné vlastnosti, jsou jejich neobvyklá chemická a fyzikální stálost, 3D uspořádání atomů boru v klastru a především hydrofobní charakter molekul. Kavita dimeru HIV-1 PR je totiž až na katalyticky aktivní místo převážně hydrofobní. Klastr COSANu se nekovalentně váže ke kavitě enzymu v místě dvou hydrofobních kapes tvořených postranními řetězci aminokyselinových zbytků Pro81, Val82 a Ile84 a klapek Ile47, Gly48 a Ile54 HIV-1 PR <sup>1</sup>, kterou tak kompetitivně inhibuje (obr. 1-2a) zabráním místa určeného pro substrát v kavitě enzymu a následnými konformačními změnami enzymu. <sup>(10)</sup>

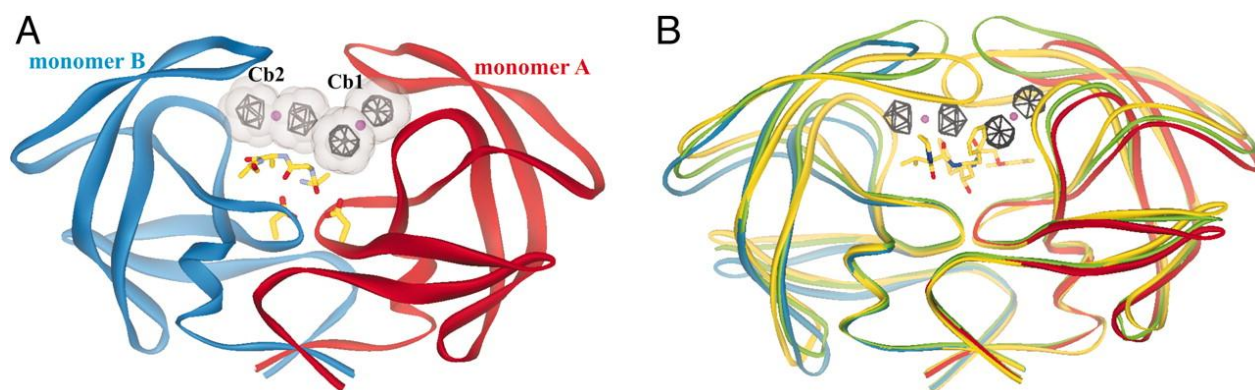
Metallakarboranové inhibitory vykazují unikátní způsob vazby na molekulu HIV-1 PR. <sup>(12)</sup> Velikou výhodou jsou ve srovnání s konvenčními PI výrazně nižší hodnoty vitality při inhibici mutantních variant HIV-1 PR (viz příloha 1a).

---

<sup>1</sup> Aminokyselinové zbytky mohou být jiné v závislosti na příp. mutacích zkoumaného typu HIV.

Zavedení proteasových inhibitorů do klinické praxe se ukázalo být velikým krokem ke zlepšení kvality i délky života nakažených pacientů.<sup>(3)</sup> Zatímco v roce 1995 zaujímal HIV ve Spojených státech amerických první místo mezi příčinami smrti lidí mezi 25 až 44 lety života (viz příloha 2), po uvedení Saquinaviru<sup>(13)</sup> v roce 1995 a Indinaviru a Ritonaviru<sup>(14)</sup> v roce 1996 úmrtnost v důsledku nakažení virem HIV výrazně poklesla.

Skutečným problémem se ale stává schopnost viru překonávat pomyslnou “genetickou bariéru” jednotlivých funkčních inhibitorů a nevyhnutelný vznik rezistence. Ve výsledku je pak nutno používat PI druhé, příp. třetí volby (Saquinavir, Indinavir a Nelfinavir dle HAART<sup>(3)</sup>), u kterých lze očekávat výraznější vedlejší účinky a nižší účinnost.<sup>(3) (15)</sup> Navíc u pacientů dochází ke vzniku tzv. křížových rezistencí, které mohou znemožnit použití dalších PI.<sup>(6) (7)</sup> Tomuto trendu lze zabránit jenom soustavným vývojem nových, účinnějších virostatik, metod zvyšování jejich biologické dostupnosti v organismu a zkoumáním nových cest k inhibici metabolických drah klíčových pro maturaci a šíření viru.



**Obr. 1-2.** Snímek z rentgenové krystalografie znázorňující inhibovanou molekulu HIV-1 PR s kavitou vyplněnou dvěma anionty COSANu (A). Obrázek B znázorňuje molekulu proteasy inhibovanou lopinavirem (žlutá), neinhibovanou (zelená) a inhibovanou COSANovými anionty (A). Jsou zde patrné výrazné konformační změny HIV-1 PR, které zabraňují činnosti enzymu. Převzato z práce Petr Cígler, Milan Kožíšek, Pavlína Řezáčová et al. From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: Metallocarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease, 102:43, PNAS, 2005

## 2. Cíl práce

Cílem této práce je návrh, příprava a charakterizace zcela nových potenciálně účinných molekul inhibitorů HIV-1 PR se strukturou substituovaných metallakarboranových derivátů na základě studia struktury stávajících molekul metallakarboranových inhibitorů a formulace souboru vlastností zvyšujících, či snižujících jejich účinnost (inhibiční konstanty, vitalita, rozpustnost ve vodě, toxicita aj.) v závislosti na druhu substituentu.

Tyto metallakarboranové deriváty budou tvořené dvěma podjednotkami COSANu spojenými organickým řetězcem s centrální skupinou, kterou by měla být některý z katecholaminů, příp. jeho prekurzorů, neboť HIV-1 PR dle předchozích studií jeví vysokou afinitu k dimerům Tyr-Pro a Phe-Pro<sup>(16)</sup>, což je základem fungování některých antivirotik, např. Saquinaviru.<sup>(17)</sup> Požadavky na centrální funkční skupinu derivátu jsou shrnuty v oddíle 3.2.2.

Zkoumání fyzikálních, chemických a biologických vlastností připravených látek vycházející z jejich struktury by mělo posloužit jako vodítko k syntéze složitějších derivátů s centrální skupinou obsahující např. isosterů hydroxyethylaminu a k hlubšímu pochopení vlivu slabých vazebných interakcí a zejména vodíkových vazeb na míru účinnosti inhibice vyjádřenou jako IC<sub>50</sub>, příp. způsobu inhibice, pokud bude stanoven.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti

Roku 1981 byla ve Spojených státech amerických ve městě Los Angeles klinicky pozorována skupina 5 homosexuálních mužů, se zvláštními oportunními infekcemi bez zjevné příčiny. Jednalo se o napadení plic houbami rodu *Pneumocystis*<sup>(18)</sup> a později o tzv. Kaposiho sarkom,<sup>(19) (20)</sup> vzácné rakovinné onemocnění.

Onemocnění původně nemělo svůj vlastní název, označovalo se jako forma lymfadenopatie,<sup>(21)</sup> později GRID (gay-related immune deficiency),<sup>(22)</sup> příp. nemoc 4H, neboť nemoc si vybírala častěji homosexuály, hemofiliky, nitrožilní narkomany (heroin) a Haitřany.<sup>(23)</sup> Jakmile se však zjistilo, že syndrom není izolován jen v těchto komunitách, americké CDC (Centrum pro kontrolu nemocí a prevenci) jej pojmenovalo AIDS.<sup>(24)</sup> Původce nemoci byl však stále neznámý.

O dva roky později v roce 1983 byl skupinami dr. Roberta Charlese Galla a dr. Luca Montagniera simultánně objeveny viry HTLV-III<sup>(25)</sup> (human T-lymphotropic virus - Gallo) a LAV<sup>(26)</sup> (lymphadenopathy-associated virus - Montagnier). Po zjištění, že se jedná o stejné původce, byl roku 1986 přijat jednotný název *human immunodeficiency virus* – HIV.<sup>(27)</sup>

Virus HIV patří mezi retroviry, neboť jeho genetická informace je uchovávána ve formě RNA,<sup>(28)</sup> která je při napadení buňky převedena do formy hostitelské DNA procesem známým jako reverzní transkripce.<sup>(29)</sup> Taxonomicky lze virus zařadit rodem též mezi tzv. lentiviry,<sup>(30)</sup> neboť – jak napovídá část názvu *lente*, lat. pomalý – má velmi dlouhou inkubační dobu.<sup>(31)</sup> HIV má dva hlavní subtypy – HIV-1 a HIV-2, přičemž HIV-2 je průběhem i symptomaticky mírnější a nemocní se dožívají vyššího věku.<sup>(32)</sup> Napadáním buněk imunitního systému způsobuje syndrom získané imunitní nedostatečnosti (Acquired Immune Deficiency Syndrome - AIDS).<sup>(28)</sup>

Mezi lidmi se přenáší téměř výhradně krví, virus se však též vyskytuje ve spermatu, preejakulátu, poševní tekutině a mateřském mléku.<sup>(33) (34)</sup>

Onemocnění HIV se považuje za tzv. zoonózu, neboť může být přenášeno lidmi i některými zvířaty. Jako nejpravděpodobnější původní zdroj nemoci se jeví primáti žijící na území jižního Kamerunu, u nichž se poprvé rozvinula nemoc SIV (simian immunodeficiency virus – virus imunitní nedostatečnosti opic), která zmutovala do divoké formy HIV-1.<sup>(35)</sup>

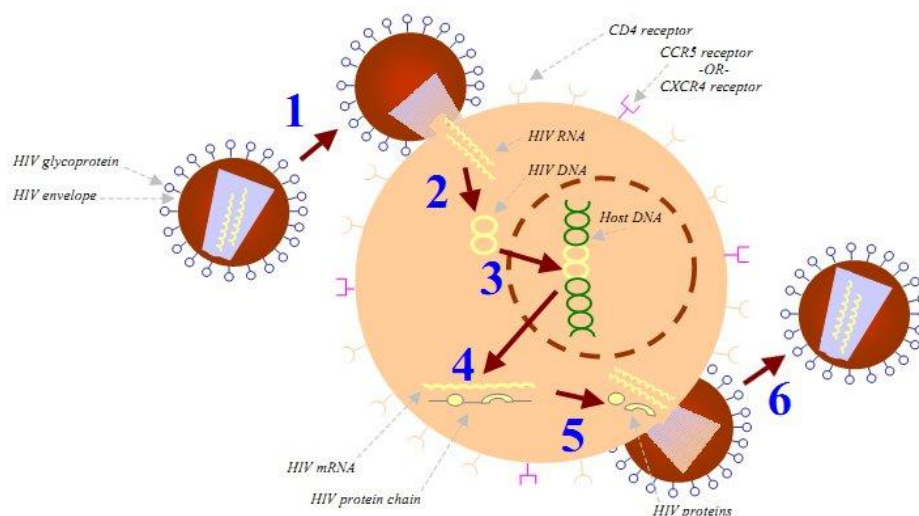
V dnešní době je boji proti HIV věnována velická pozornost vládních organizací i vědecké společnosti.<sup>(36)</sup>

### 3.1.1. Životní cyklus

Po úspěšném vniknutí do organismu HIV napadá buňky imunitního systému a CNS s CD4 receptory antigenů – primárně CD4<sup>+</sup> T-pomocné lymfocyty, sekundárně makrofágy (dendritické buňky, monocyty aj.) a gliové buňky.<sup>(37)</sup> Virus se na CD4 receptor váže pomocí ligandu gp120 ukotveného na povrchu fosfolipidové membrány pomocí integrálního gp41 (viz obr. 3.1.1-1-1).<sup>(38)</sup> Kromě toho se virus váže na chemokinové receptory  $\alpha$  - CXCR-4 a  $\beta$  - CCR-5.<sup>(39) (40)</sup>

Řady virů napadajících CD4 pozitivní buňky na  $\alpha$ -chemokinovém receptoru se označují X4,<sup>(41)</sup> řady napadající  $\beta$ -chemokinové receptory jsou označovány R5.<sup>(42)</sup> Řady schopné cílit na oba receptory se označují X4R5.<sup>(43)</sup> Průběh nemoci u lidí nakažených HIV řady R5 je mírnější, u lidí nakažených řadou X4 dochází k rychlejšímu poklesu počtu CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů.<sup>(44)</sup> V průběhu nemoci však i u řad R5 dochází k postupnému získání schopnosti vázat se i na  $\beta$ -chemokinové receptory CXCR-4.

Nejprve se gp120 váže na receptor CD4, což způsobí konformační změnu obalu viru a odhalení vazebných míst gp120 pro chemokinové receptory po jejichž navázání integrální gp41 pronikne cytoplasmatickou membránou buňky a způsobí fúzi virového obalu s plasmalemou a uvolnění kapsidy do cytosolu.<sup>(45) (46)</sup> Během transportu dojde k přepisu virové RNA na ss cDNA enzymem reverzní transkriptasou, který má také funkci DNA-dependentní DNA polymerasy sloužící k doplnění komplementárního řetězce k nově syntetizované molekule ss cDNA (viz obr. 3.1.1-1-2).<sup>(47)</sup> Řetězec je posléze začleněn do genetické informace hostitelské buňky virovou integrasou (viz obr. 3.1.1-1-3).<sup>(48)</sup>



**Obr. 3.1.1-1.** Diagram průběhu životního cyklu HIV od napadení buňky po vytvoření nové virové částice. Převzato s úpravami s laskavým dovolením z materiálů AIDSinfo, The HIV Life Cycle.<sup>(49)</sup>

Transkripce genetické informace viru je mimo jiné podmíněna přítomností faktoru NF- $\kappa$ B, který je přítomen ve zvýšené míře, pokud buňka bojuje s infekcí, <sup>(50)</sup> což působí jako obranný mechanismus viru, který zahájí lytický cyklus primárně v buňkách, u kterých hrozí odhalení.

Po dokončení transkripce je RNA viru obratem rozdělena mechanismy hostitelské buňky na fragmenty mRNA proteinů Rev (Regulator of Virion Expression), který zajišťuje přesun celistvé genetické informace viru mimo jádro bez rozdělení, <sup>(51)</sup> Tat (Trans-Activator of Transcription), jenž podporuje přepis genetické informace viru v hostitelské DNA <sup>(52)</sup> podobně jako např. TATA-boxy a Nef (Negative Regulatory Factor), působící jako stresor podmiňující přetrvávající stav infekce a udržující hladiny faktoru NF- $\kappa$ B potřebné k replikaci viru. <sup>(53) (54)</sup>

Pomocný protein Rev se posléze váže na RRE (Rev response element) na pozici 7709-8063 přepsané mRNA <sup>(55)</sup>, čímž umožní její opuštění jádra a kompletní translaci (viz obr. 3.1.1-1-4). Kompletní sekvence mRNA je sestříhána na geny Env (Envelope), jehož překladem vzniká gp160, prekurzor gp120 a gp41 <sup>(56)</sup> a Gag-Pol (Group-specific antigen - Polymerase proteins), který tvoří prekurzor Pr55Gag, jenž je dále štěpen virovou proteasou <sup>(5)</sup> (viz obr. 1-1,2) a další nezbytné proteiny nutné k dokončení životního cyklu viru.

Jelikož mRNA transportovaná díky Rev z jádra je kompletní genetickou informací viru, po navázání na proteiny kódované genem Gag (p24, p17 aj.) a další kompletaci vzniká životaschopná jednotka viru, která opouští buňku. (viz obr. 3.1.1-1-5,6). <sup>(57)</sup>

Stále větší nedostatek CD4<sup>+</sup> T-pomocných lymfocytů z důvodu nástupu lytického cyklu viru, zvýšené pravděpodobnosti apoptózy napadené buňky, příp. zničení CD8<sup>+</sup> cytotoxickými lymfocyty <sup>(58)</sup>, označovaný jako CD4<sup>+</sup> T-lymfocytopenie, <sup>(59)</sup> způsobuje postupný rozvrat systému specifické imunitní odpovědi organismu a rozvoj oportunních infekcí. <sup>(60) (61)</sup>

### 3.1.2. Stávající léčiva

Stávající léčiva užívaná v boji proti HIV mohou z dlouhodobého hlediska prodloužit a zkvalitnit život nakažených a v některých případech i velmi přiblížit délku života nakažených délce života zdravých lidí. <sup>(62)</sup> Žádné z používaných virostatických léčiv nedokáže nakažené plně vyléčit, může pouze zpomalit průběh nemoci, či přispět k potlačení doprovodných symptomů. Jejich přehled, dělení do jednotlivých kategorií a popis mechanismu účinku je shrnut v příloze 3.

### **3.1.2.1. Inhibitory vstupu**

Tato léčiva cílí na prostředky vniknutí do buňky, kterých virus využívá (viz obr. 3.1.1-1-1). V současnosti používaná léčiva jsou dvě – Enfuvirtid, který cílí na gp41 HIV, čímž mu účinně brání v narušení cytoplazmatické membrány potenciální hostitelské buňky, <sup>(63)</sup> a Maraviroc, jenž se váže na chemokinový receptor CCR5 CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů a blokuje tak vazbu na virový gp120. <sup>(64) (65)</sup>

Maraviroc se však neváže na receptor CXCR4, tudíž je u virových řad X4 neúčinný. Vhodnost zahájení léčby Maraviroce se proto určuje na základě testu. <sup>(66)</sup>

### **3.1.2.2. Inhibitory reverzní transkriptasy**

Cílem inhibitorů reverzní transkriptasy (RTI) je narušení syntézy řetězce DNA použitého k integraci do genetického materiálu buňky (viz obr. 3.1.1-1-2). Dělí se na analogy nukleosidů a nukleotidů (NRTI/NtRTI) a neanalogické inhibitory reverzní transkriptasy (NNRTI). <sup>(67) (68)</sup>

NRTI/NtRTI jsou kompetitivními inhibitory, které soutěží o místo svých standardních protějšků – volných intracelulárních nukleotidů a nukleosidů. Na rozdíl od nich však např. postrádají 3'-hydroxylovou skupinu, čímž brání vzniku 5'-3' fosfodiesterové vazby mezi jednotlivými bázemi a zastavují další syntézu řetězce DNA. <sup>(69)</sup>

Existují čtyři druhy NRTI analogicky k počtu nukleosidů vyskytujících se v DNA. Cytidinové analogy jsou v současné medicíně používány tři - Emtricitabin <sup>(70)</sup>, Lamivudin <sup>(71)</sup> a Zalcitabin <sup>(72)</sup>. Thymidinové analogy jsou dva - Zidovudin <sup>(73)</sup> a Stavudin <sup>(74)</sup>. Další nukleosidy mají každý jednoho analogického zástupce – Abacavir <sup>(75)</sup> (guanosin) a Didanosin <sup>(76)</sup> (adenosin).

Klinicky ověřený analog nukleotidů je v době tvoření této práce v klinické praxi používán jen jeden – český Tenofovir, analog adeninu, dílo prof. Antonína Holého a jeho týmu na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.. <sup>(77) (78)</sup>

Neanalogické inhibitory reverzní transkriptasy (NNRTI) jsou oproti analogům nukleotidů (NRTI/NtRTI) nekompetitivními alosterickými inhibitory. Váží se mimo aktivní místo na oblast podjednotky p66, čímž vyvolávají konformační změnu (alosterický efekt) vedoucí k inaktivaci reverzní transkriptasy. <sup>(79) (80)</sup>

Mezi tyto účinné látky se řadí Efavirenz <sup>(81)</sup>, Nevirapin <sup>(82)</sup>, Delavirdin <sup>(83)</sup> a dva diarylpyrimidiny – Etravirin <sup>(84)</sup> a Rilpivirin <sup>(85)</sup>. Poslední dvě jmenované látky vykazují vysokou účinnost i u NNRTI rezistentních kmenů HIV díky vysoké „pružnosti“ vlastní molekulové struktury. <sup>(84) (86)</sup>

### **3.1.2.3. Inhibitory integrasy**

Integrasový inhibitor v současné době používaný v klinické praxi je jeden – Raltegravir. <sup>(87)</sup> <sup>(88)</sup> Mechanismus účinku tkví v inhibici klíčového enzymu nutného pro úspěšnou reprodukci viru – integrasy. Bez toho enzymu se není reverzní transkriptasou připravený úsek DNA schopen začlenit do genetického materiálu buňky a replikační cyklus se zastavuje (viz obr. 3.1.1-1-3).

### **3.1.2.4. Inhibitory proteasy**

Tyto látky cílí na virovou proteasu nutnou k rozštěpení prekurzorového polypeptidu Pr55Gag a získání klíčových jednotek p24, které tvoří virovou kapsidu, a dalších pomocných jednotek - p17, p7, p6 (viz obr. 1-1).

První úředně schválenou účinnou látkou v této kategorii a v pořadí 6. léčivem v boji proti HIV se stal r. 1995 Saquinavir. <sup>(13)</sup> Nedlouho potom se v březnu následujícího roku do této kategorie zařadil nejprve Ritonavir a posléze Indinavir. <sup>(14)</sup>

Původní nadšení z vysoké účinnosti léčby <sup>(89)</sup> <sup>(90)</sup> <sup>(91)</sup> však brzy vystřídalo zklamání. <sup>(92)</sup> HIV-1 PR má vysoký potenciál k mutaci <sup>(93)</sup> a navíc PI musí čelit jaterním enzymům, čímž se snižuje jejich biologická dostupnost. <sup>(94)</sup>

První problém byl vyřešen zavedením kombinované léčby dle metodiky HAART. <sup>(6)</sup> Pacientovi je podávána kombinace dvou NRTI/NtRTI a jeden NNRTI, inhibitor vstupu, PI, nebo inhibitor integrasy.

Řešením druhého problému se stal Ritonavir, který se při současném podávání s jiným PI zabraňuje jeho rozkladu kompetitivní inhibicí isoformy 3A4 komplexu jaterního enzymu Cytochromu P450 (zkr. CYP3A4) a zvyšuje tak jeho biologickou dostupnost. <sup>(8)</sup> To je důvodem, proč se u metodiky HAART uvádí jako optimální 3-4 druhy léčiv.

Dalšími látkami v této kategorii, které našly využití v klinické praxi, jsou Amprenavir <sup>(95)</sup> <sup>2</sup>, Fosamprenavir <sup>(96)</sup>, Tipranavir <sup>(97)</sup>, Lopinavir <sup>(98)</sup>, Darunavir <sup>(99)</sup>, Atazanavir <sup>(100)</sup> a Nelfinavir <sup>(101)</sup>.

---

<sup>2</sup> Amprenavir je dnes již stažen z trhu, r. 2003 byl nahrazen svým prekurzorem, fosamprenavirem.

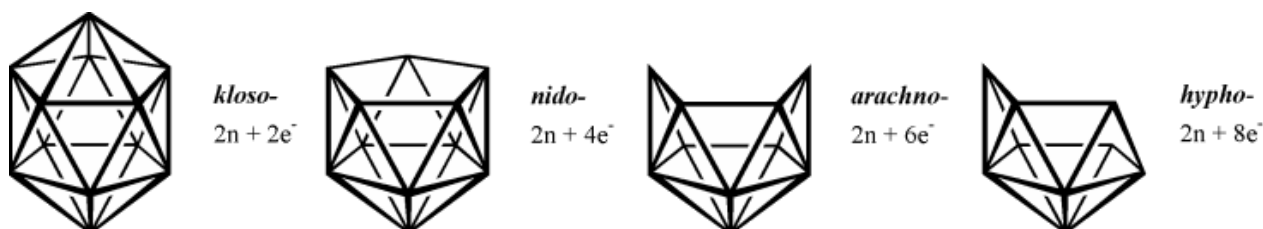


## 3.2. Borany

Atomy boru mají na rozdíl od atomů uhlíku tři valenční elektrony na p orbitalu. Díky této tzv. elektronové deficienci mají přirozenou tendenci vytvářet trojrozměrné molekulární struktury, které nazýváme klastry.<sup>(102)</sup> Chybějící valenční elektrony jsou delokalizovány ve struktuře klastru, který je tak tvořen výhradně trojúhelníky a vytváří tak více, či méně úplné mnohostěny.<sup>(103)</sup>

Pro jejich popis bylo IUPAC zavedeno samostatné názvosloví specifické pro borany a odvozené metallaborany a karborany na základě počtu atomů a volných elektronových párů.<sup>(102)</sup> Pro označení jednotlivých variant geometrií boranových klastrů (viz obr. 3.2-1) se používá názvů *kloso*, *nido*, *arachno* a *hypho* s klesajícím počtem atomů v molekule a klesající stabilitou<sup>(104)</sup>. *Kloso* borany tvoří uzavřené klece s delokalizovaným dvojmocným nábojem a ostatní varianty z něj formálně vychází. *Nido* borany přichází oproti odpovídajícím *kloso* skeletům o jeden atom boru, *arachno* o dva a *hypho* o tři a více. Další varianty *hyperkloso* a *pseudokloso* tvoří deformované dvanáctistěny.<sup>(105)</sup> Předponou *conjuncto* se označují klastry spojené podobně jako kondenzované aromatické uhlovodíky a předponou *komo* se značí spojení skrze jeden atom. Pro potřeby této práce je relevantní zejména varianta *kloso* a *komo*. Důležitým faktem je, že základní dvacetistěnný boranový klastr není elektricky neutrální, neboť má o jeden elektronový pár navíc. S každým chybějícím atomem přichází do struktury boranu další elektronový pár (viz obr. 3.2-1).<sup>(102)</sup>

Boranové klastry nabízí široké možnosti úprav odbouráváním nebo nahrazováním BH jednotek heteroatomy uhlíku (karborany), příp. kovů (metallaborany).<sup>(106)(107)</sup> Další možností derivatizace boranů je exoskeletální substituce hydridických atomů vodíku na povrchu skeletu různými ligandy. V případě substituce aniontů ligandy s nevazebnými elektronovými páry mohou vznikat zwitterionty, které mění náboj molekuly v závislosti na pH prostředí, podobně např. jako aminokyseliny. Je-li však nahrazen hydridický atom vodíku na atomu boru některého z aniontů některým z O a/nebo N heterocyklů, vznikají zpravidla velmi reaktivní kruhové zwitterionty, které se vlivem bazického prostředí štěpí a alkylují okolní nukleofily. Tyto atributy lze pozorovat u molekuly 8-dioxan-COSANu (viz obr. 4.1-1).



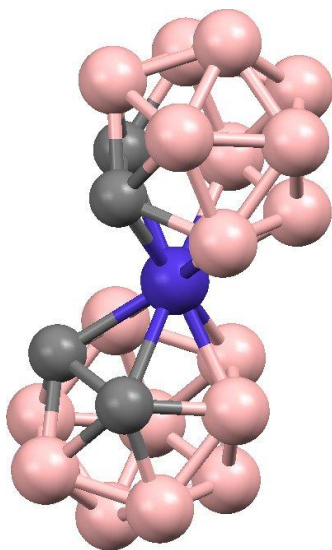
**Obr. 3.2-1.** Názvy boranových klastrů v závislosti na jejich geometrii dle Wadeova pravidla. Převzato s laskavým dovolením z disertační práce V. Šícha; Substituční deriváty metallakboranů a karboranů s potenciálně zajímavými biologickými vlastnostmi, 2012

### 3.2.1. COSAN - Cobaltacarborane Sandwich Anion

Ačkoli není v oblasti organických syntéz obecně znám a používán, COSAN – celým názvem 1,2-*kloso*-dikarbaundekahydridoundekabor)-*komo*-3,3'-kobalt(III)-(1,2-*kloso*-dikarbaundekahydridoundekabor)-(-1)-át, zkráceně kobalt bis-(dikarbolid)ový anion - získal triviální označení podobně jako další látky připravené na ÚACh z nutnosti zkrátit jeho dlouhý systematický název. Sumární vzorec COSANového aniontu je  $[B_{18}C_4CoH_{22}]^-$ , nejčastěji se s ním v laboratoři setkáváme ve formě cesné soli. Syntézu této látky poprvé popsali M. F. Hawthorne již v roce 1965.<sup>(11)</sup> V současnosti se jedná o komerčně dostupnou látku.<sup>(108)</sup> Mateřský klastr se chová jako silně hydrofobní aniont, cesná sůl je za laboratorní teploty dobře rozpustná v organických rozpouštědlech a nerozpustná ve vodě. Sodná sůl COSANu je ve vodě dobře rozpustná (2 mmol/dm<sup>3</sup>), v pevném stavu se jedná vždy o polyhydrát, který obsahuje proměnlivé množství molekul vody v závislosti na konkrétních experimentálních podmínkách. Jedná se o sůl superkyseliny, pro kterou je charakteristické, že je ve vodném roztoku zcela disociována. Úplná disociace na anionty a kationty včetně výborné rozpustnosti látky ve vodné a zároveň organické fázi (např. diethylether) umožňuje snadnou a efektivní výměnu kationtů a extrakci sole příslušného kationtu do organické fáze.

Jelikož se COSAN skládá ze dvou *kloso* karboranových klastrů (viz obr. 3.2.1-1) – geometricky je tvořen dvěma plně uzavřenými dvacetistěny – je mimořádně odolný vůči teplu a ionizujícímu záření a reaguje velmi neochotně.<sup>(108)</sup>

Kromě toho, že je základním substrátem pro syntézu karboranových inhibitorů HIV-1 proteasy, používá se také pro izolaci radionuklidů <sup>137</sup>Cs a <sup>90</sup>Sr z vyhořelého jaderného paliva,<sup>(109)</sup> pocházejícího z konvenčních štěpných jaderných reaktorů. Použitím derivátů COSANu lze objem velmi nebezpečného jaderného odpadu podstatně zmenšit a v budoucnu snad i hodnotně využít jako zdroj energie.



**Obr. 3.2.1-1.** Na snímku COSANu pořízeném metodou rentgenové krystalografie je vidět dvojitá ikosaedrická struktura koordinčně propojená centrálním atomem kobaltu v oxidačním čísle III. Za zmínku stojí dokonale symetrická struktura navzdory substituci dvou atomů boru uhlíkovými atomy způsobená tím, že bor se v této molekule vyskytuje v hybridizačním stavu  $sp^3$  stejně jako uhlík. Kvůli přehlednosti nejsou zobrazeny hydridické vodíky vázané ke každému atomu klastru kromě centrálního kobaltu a triethylamonný kation. Krystalografická data<sup>(110)</sup> byla zpracována v programu Jmol v. 13.0.10.

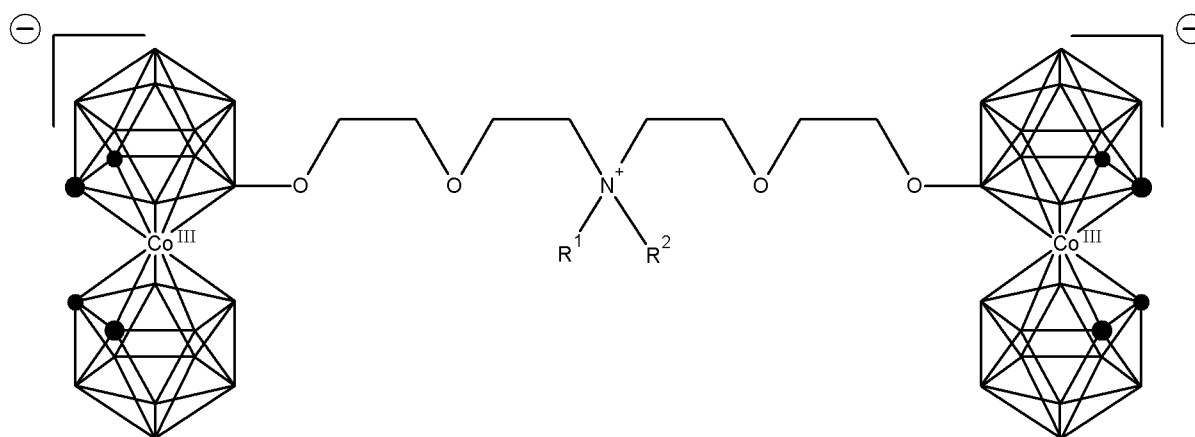
Velmi aktuálně se deriváty COSANu ukázaly být účinné jako selektivní cytostatika pro léčbu některých druhů rakoviny. Vývoj tohoto druhu patentovaných léčiv se nyní nachází ve fázi preklinických zkoušek. V tomto případě budou deriváty COSANu sloužit jako inhibitory isoenzymu karbonické anhydrasy IX, <sup>(111)</sup> která je buňkami syntetizována s výhodou právě v silně metabolizujících nádorových buňkách. Principiálně inhibicí tohoto transmembránového enzymu dochází k hypoxii nádorové buňky, která nemůže v dostatečném množství převádět překotným katabolismem vznikající CO<sub>2</sub> na hydrogenuhlíčitany rozpustné ve vodě a naopak. <sup>(112)</sup>

### 3.2.2. Metallakarboranové inhibitory HIV-1 proteasy

Jak je popsáno v oddíle 3.1.2.4, HIV-1 PR se stala atraktivním cílem pro vývoj nových virostatických léčiv. Před osmi lety se podařilo objevit inhibiční potenciál u metallakarboranových sloučenin s unikátním způsobem vazby na proteasu. <sup>(10)</sup>

Díky své jedinečné struktuře by se mohly v blízké době právě tyto látky stát klíčovými v boji proti rezistentním kmenům HIV. <sup>(113)</sup>

Protože tyto původní metallakarboranové inhibitory necílí přímo na aktivní centrum enzymu tvořené Asp25 a Asp25', ale na klapky a hydrofobní kapsy enzymu, nemusí mít peptidomimetické vlastnosti, které ze stávajících PI činí atraktivní cíl jaterních enzymů, čímž je snižována jejich biologická dostupnost. <sup>(8) (94)</sup> Další dobrou zprávou je nízká toxicita metallakarboranových sloučenin zjištěna při testech na myších. <sup>(114)</sup>



**Obr. 3.2.2-1.** Schematický vzorec metallakarboranového inhibitoru HIV-1 PR, konkrétně dimeru 8-dioxan-COSANu. Černé kroužky představují atomy uhlíku s terminálními protony (C-H) a všechny neoznačené vrcholy v rámci *kloso*-karboranového skeletu zastupují B-H skupiny, kromě atomu boru na pozici 8, na který je vázán příslušný ligand.

PI zkoumané a syntetizované v rámci této práce tvoří dvě jednotky COSANu spojené organickým řetězcem s centrální aminoskupinou, což jim propůjčuje unikátní vlastnosti zwitterion-aniontu (viz obr. 3.2.2-1). Nejčastějším spojovacím řetězcem používaným v syntéze je 1,4-dioxan, dále např. furan, pyrrol a pyridin. Obzvláště derivát s 1,4-dioxanovým kruhem je velice univerzálním, velmi reaktivním činidlem, které již za velmi mírných podmínek (25°C) a zpravidla ve vysokém výtěžku alkyluje prakticky veškeré předložené nukleofily, někdy s dopomocí deprotonujícího činidla. Objevitelem tohoto zwitterionu a několika metod jeho přípravy byl doc. Dr. Ing. Jaromír Plešek, CSc., nestor Ústavu anorganické chemie Akademie věd ČR.

Centrální aminoskupina nabízí široké možnosti substituce různými skupinami, které dále upravují vlastnosti a biologickou aktivitu látky.

Vzhledem k materiálním požadavkům syntézy metallakarboranových inhibitorů HIV-1 PR je třeba funkčním parametrům výsledné látky věnovat maximální pozornost. Toho lze dosáhnout výběrem vhodného substituentu a spojovacího řetězce.

Jako vhodný spojovací řetězec se ukázal být otevřený kruh 1,4-dioxanu. Výsledná "šířka" molekuly (vzdálenost distálních C atomů) - 1917,6 pm - při jeho použití odpovídá rozmezí vzdáleností komplementárních aminokyselinových zbytků na obou dimerech (viz tab. 3.2.2-1).

V průběhu let bylo publikováno množství těchto látek s různými druhy substituentů a jim odpovídajícím vlastnostem.<sup>(103) (113) (115)</sup> Na základě studia jejich struktur a srovnání s jejich výslednou účinností lze vytyčit směr, kterým by se práce měla ubírat.

		$d_{\text{Asp25}}$	$d_s$	$d_v$	$d_{\text{komp}}$
Kapsy	Pro81 <sub>(4)</sub>	1389,5 pm	1532,6 pm	1207,7 pm	1887,1 pm
	Val82 <sub>(5)</sub>	1078,2 pm	1269,3 pm	816,6 pm	1943,5 pm
	Ile84 <sub>(6)</sub>	630,6 pm	919 pm	442,8 pm	1610,6 pm
Klapky	Ile47 <sub>(2)</sub>	1531,6 pm	1609,8 pm	1324 pm	1831,3 pm
	Gly48 <sub>(3)</sub>	1483,4 pm	1485,5 pm	1356 pm	1213,3 pm
	Ile54 <sub>(1)</sub>	1787,6 pm	1876,7 pm	1722,3 pm	1491,1 pm

**Tab. 3.2.2-1.** Vzdálenosti vazebných zbytků od aktivního Asp25 na stejné podjednotce ( $d_{\text{Asp25}}$ ), středu spojnice aktivních Asp25 ( $d_s$ ), vertikální vzdálenost od středu spojnice ( $d_v$ ) a komplementárních protějšků ( $d_{\text{komp}}$ ) v pm. Vzdálenosti jsou měřeny od geometrických středů jednotlivých aminokyselinových zbytků. Zdroj RDS dat: (116) Vertikální vzdálenost je vypočítána jako  $d_v^2 = d_s^2 - 1/4 d_{\text{komp}}^2$ . Čísla pod jednotlivými zbytky odpovídají označení v příloze 4.

Dle parametrů předchozích látek lze ustanovit požadavky na substituent: (1) Molekula musí nést amino-skupinu, která bude sloužit k vazbě na elektrofilní konec spojovacího řetězce. (2) Molekula substituentu by měla být polárního charakteru. (3) Distální část molekuly by měla být schopna tvořit vodíkové můstky – přítomnost hydroxy/oxo-skupiny. (4) Délka řetězce substituentu by měla být dostačující pro vznik vodíkové vazby, uvažujeme-li, že aminoskupina vázající se na spojující řetězec leží v průsečíku vertikální osy a transversální roviny procházející místy vazby COSANové jednotky na HIV-1 PR tzn. vazebnými aminokyselinovými zbytky.

Zde je nutné připustit určitou míru tolerance, protože COSANové jednotky se často váží asymetricky a na několika místech.<sup>(113)</sup> Zároveň nelze plně postihnout stereochemické uspořádání spojovacího řetězce kvůli rotaci okolo jednoduchých vazeb. Poloha amino-skupiny substituentu je proto spíše orientační.

Navíc je třeba uvážit, že k hydrolyze polypeptidů HIV-1 PR používá jako prostředníka vodu.<sup>(117)</sup> Toto zohledňujeme dvojnásobným připočtením vzdálenosti 276 pm (vzdálenost mezi O atomy vody v roztoku). V intervalu vertikálních vzdáleností 442,8 pm – 1722,3 pm tedy musí ležet vzdálenost amino-skupiny a kyslíku hydroxy/oxo-skupiny + 552 pm.

Abychom ověřili všechny tyto předpoklady, je třeba zvolit vhodnou řadu substituentů. Byl vybrán jeden z katecholaminů a jeho tři biologické prekurzory s různým stupněm hydroxylace fenylového kruhu – dopamin, D-fenylalanin a jeho L-methylester a L-tyrosin, se vzdáleností amino-skupiny od O atomu přibližně 667,3 pm<sup>3</sup>.<sup>(118)</sup> Tato skupina byla vybrána zejména z důvodu vysoké afinity HIV-1 PR k dipeptidům Phe-Pro a Tyr-Pro.<sup>(119)</sup> Jako další byla zařazena do série pyrimidinová nukleová báze thymin. Takto budeme moci ověřit jednotlivé předpoklady: (1) Stabilita a účinnost molekuly by měla být nižší v případě vazby na N atom vázaný v heterocyklu. (2) Stupeň hydroxylace a polarita molekuly by měly mít pozitivní vliv na účinnost. (3) Množství hydroxylových vazeb na fenylovém kruhu resp. oxo-skupin na pyrimidinovém kruhu zvyšuje možnost vzniku vodíkových můstků a zvyšuje účinnost. (4) Thymin bez alifatického řetězce by měl být kvůli větší vzdálenosti k aktivním Asp25 méně účinný. (5) Můžeme pozorovat vliv negativního indukčního efektu karboxylové skupiny na stabilitu a účinnost derivátů.

---

<sup>3</sup> Vzdálenost 667,3 pm je mezi amino-skupinou a kyslíkem hydroxylové skupiny u tyrosinu. Ostatní zmíněné látky mohou mít vzdálenosti mírně odlišné vlivem esterifikace / absence karboxylové skupiny.

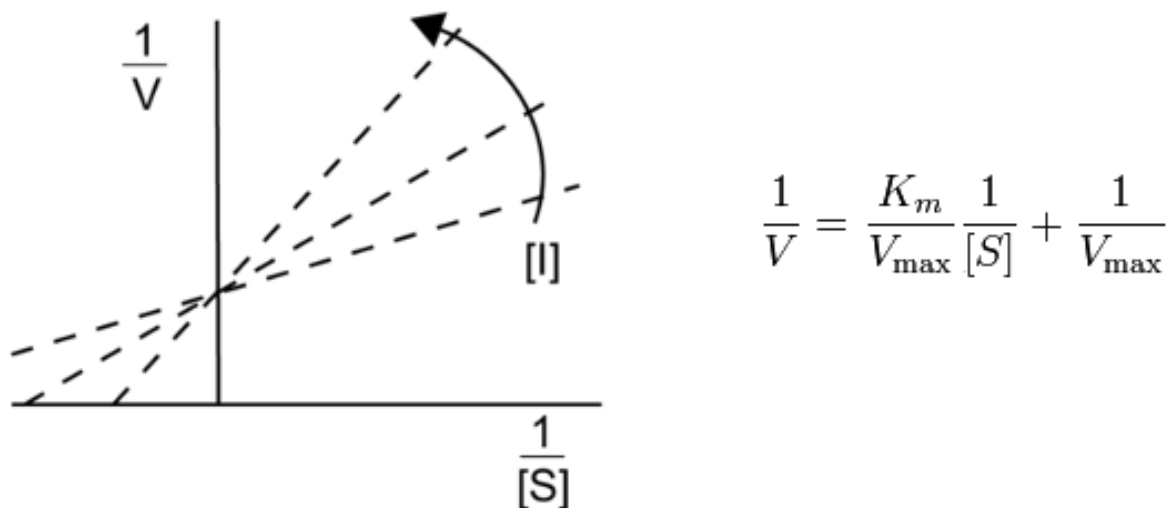
### 3.3.Kompetitivní inhibice

Kompetitivní inhibice je jev, ke kterému dochází, když enzym přijme molekulu inhibitoru místo molekuly substrátu, čímž dočasně zamezí svému dalšímu katalytickému vlivu. Vzniklý komplex enzym-inhibitor se po určité době rozpadá a může po vazbě se substrátem dát vzniknout dalším molekulám produktu. Řadí se mezi zvrtné, reverzibilní inhibice, neboť nedochází ke vzniku trvalé kovalentní vazby mezi inhibitorem a enzymem. Díky tomu reverzibilní inhibitory vykazují nižší toxicitu v organismu při náhodném napadení necílového enzymu.<sup>(120)</sup>

Nevýhodou kompetitivní inhibice je fakt, že zvyšující se koncentrace substrátu zvyšuje pravděpodobnost vzniku komplexu enzym-substrát v neprospěch komplexu enzym-inhibitor. Jelikož při inhibici lze očekávat stálý růst koncentrace nezpracovaného substrátu, je třeba vyšších koncentrací inhibitoru nebo výrazně vyšší afinity k enzymu k dosažení požadovaného efektu.

Hodnota limitní rychlosti  $V_{MAX}$  zůstává v průběhu inhibice konstantní. Hodnota Michaelsovy konstanty  $K_m$  vlivem kompetitivního inhibitoru roste.<sup>(121)</sup>

Lineweaver-Burkovým grafem průběhu kompetitivní inhibice je přímka zvyšující svůj sklon bez posunutí (viz obr. 3.3-1), oproti nekompetitivní nebo smíšené inhibici, u kterých k posunutí dochází<sup>(122)</sup>.



**Obr. 3.3-1.** Lineweaver-Burkův graf kompetitivní inhibice. S rozvojem výpočetní techniky byl postupně nahrazován nelineární regresní analýzou<sup>(123)</sup> a dnes se využívá převážně k demonstračním účelům kvůli vysoké chybovosti. Je patrný zvyšující se sklon linie grafu s růstem koncentrace inhibitoru  $[I]$ . K posunutí přímky nedochází, neboť parametr  $V_{MAX}^{-1}$  je konstantní. Proměnná  $V$  značí okamžitou rychlost reakce a  $[S]$  značí koncentraci substrátu. Převzato s úpravami z Wikimedia Commons<sup>(124)</sup>.

## 4. Experimentální část

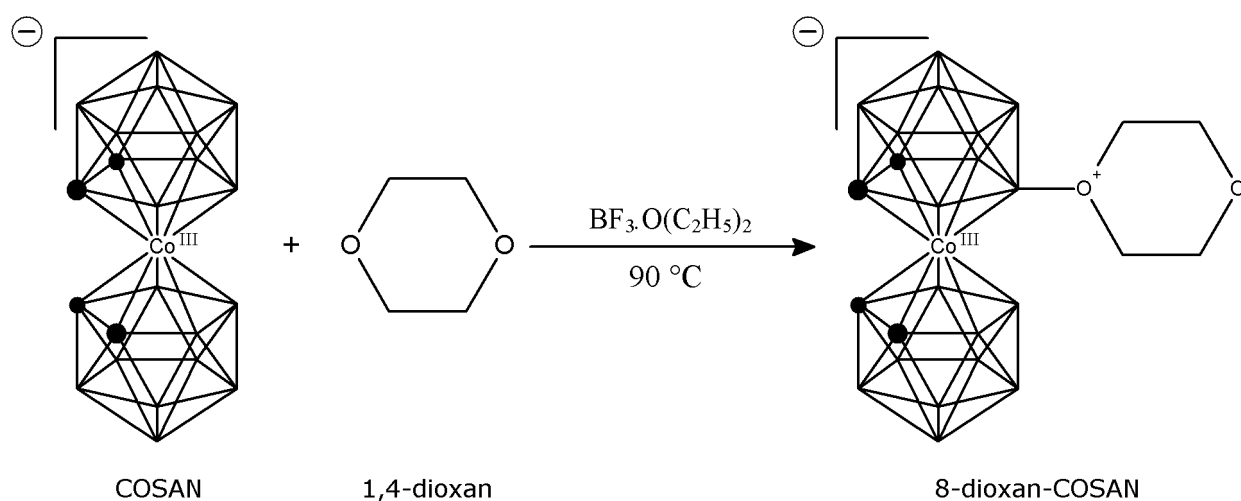
### 4.1. 8-dioxan-COSAN

Základním stavebním kamenem navržených metallakarboranových inhibitorů HIV-1 PR je 8-dioxan-COSAN, jehož příprava byla popsána s využitím několika odlišných postupů.<sup>(125) (126)</sup> Byl získán reakcí COSANu a 1,4-dioxanu v prostředí  $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  za zvýšené teploty (viz schéma 4.1-1). Reakce probíhá mechanismem elektrofilem indukované nukleofilní substituce (EINS), kdy je elektrofilním činidlem přednostně napaden hydridický vodík na pozici 8, který má největší elektronovou hustotu vlivem dvou C atomů na pozici 1 a 2, které mají oproti B o jeden elektron navíc.<sup>(127)</sup> Deprotonovaný B na pozici 8 je poté napaden nukleofilem – v tomto případě 1,4-dioxanem.

Syntéza musí probíhat bezvodých podmínkách, neboť jakékoli nukleofilní činidlo by v průběhu reakce způsobilo otevření dioxanového kruhu a vznik nežádoucích vedlejších produktů. Všechny reakce byly proto prováděny ve vakuu nebo v inertním plynu jak popsal Schriver<sup>(128)</sup>, ačkoliv některé operace, jako například sloupcová preparativní chromatografie a krystalizace byly prováděny na vzduchu.

8-dioxan-COSAN se chová jako tzv. zwitterion, podobně jako např. aminokyseliny, neboť disponuje kladným nábojem proximálního kyslíkového atomu i záporným nábojem karboranového klastru.<sup>(129)</sup>

Do zábrusové baňky bylo umístěno množství COSANu stechiometricky odpovídající množství požadovaného produktu, bereme-li v potaz 70% výtěžek reakce.



**Schéma 4.1-1.** Reakční schéma syntézy 8-dioxan-COSANu. Reakce probíhá úspěšně jen s velkým přebytkem 1,4-dioxanu a za přítomnosti  $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  jako elektrofilního iniciátoru.

Byla sestavena jednoduchá aparatura sestávající z baňky s navázkou COSANu, septa pro bezpečné přidávání kapalných reaktantů a kohoutu, kterým byla řízena evakuace a plnění inertním plynem. Poté byla umístěna do olejové lázně s magnetickým míchadlem. Nejprve byla provedena úplná evakuace aparatury (2 hodiny pod vysokým vakuem – 0,1 Torr), která poté byla naplněna inertním plynem. Do reakční baňky byl přidán 1,4-dioxan v desetinásobném množství oproti COSANu a  $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  v trojnásobném množství oproti COSANu (vztaženo na hmotnost).

Za stálého míchání byla směs ohřívána na teplotu  $90^\circ\text{C}$  a při této teplotě byla udržována po dobu 2 hodin. Ohřev byl posléze zastaven, vychladlá směs byla odpařena za sníženého tlaku. Surový produkt byl smíchán s 30% roztokem ethanolu ve vodě, v němž je zwitterion nerozpustný, ale do kterého přechází případné nečistoty, vedlejší produkty a nezreagované látky.

Směs byla rozpuštěna v minimu DCM, roztok byl nanesen na sloupec silikagelu a byla provedena kapalinová chromatografie. Jako eluent byl použit DCM se vzrůstajícím podílem ACN. Frakce produktu identifikovaná pomocí NMR a TLC ( $R_f = 0,73$  – eluent DCM;  $R_f = 0,84$  - aniontová směs chloroform + ACN 2:1) byla vysušena a dle potřeby dále chromatograficky oddělována.

Výsledný produkt byl poté krystalizován v prostředí DCM, převrstveného hexanem v uzavřené zábrusové baňce. První krystaly se objevují během 24 hodin. Výsledný produkt tvoří oranžové krystaly.

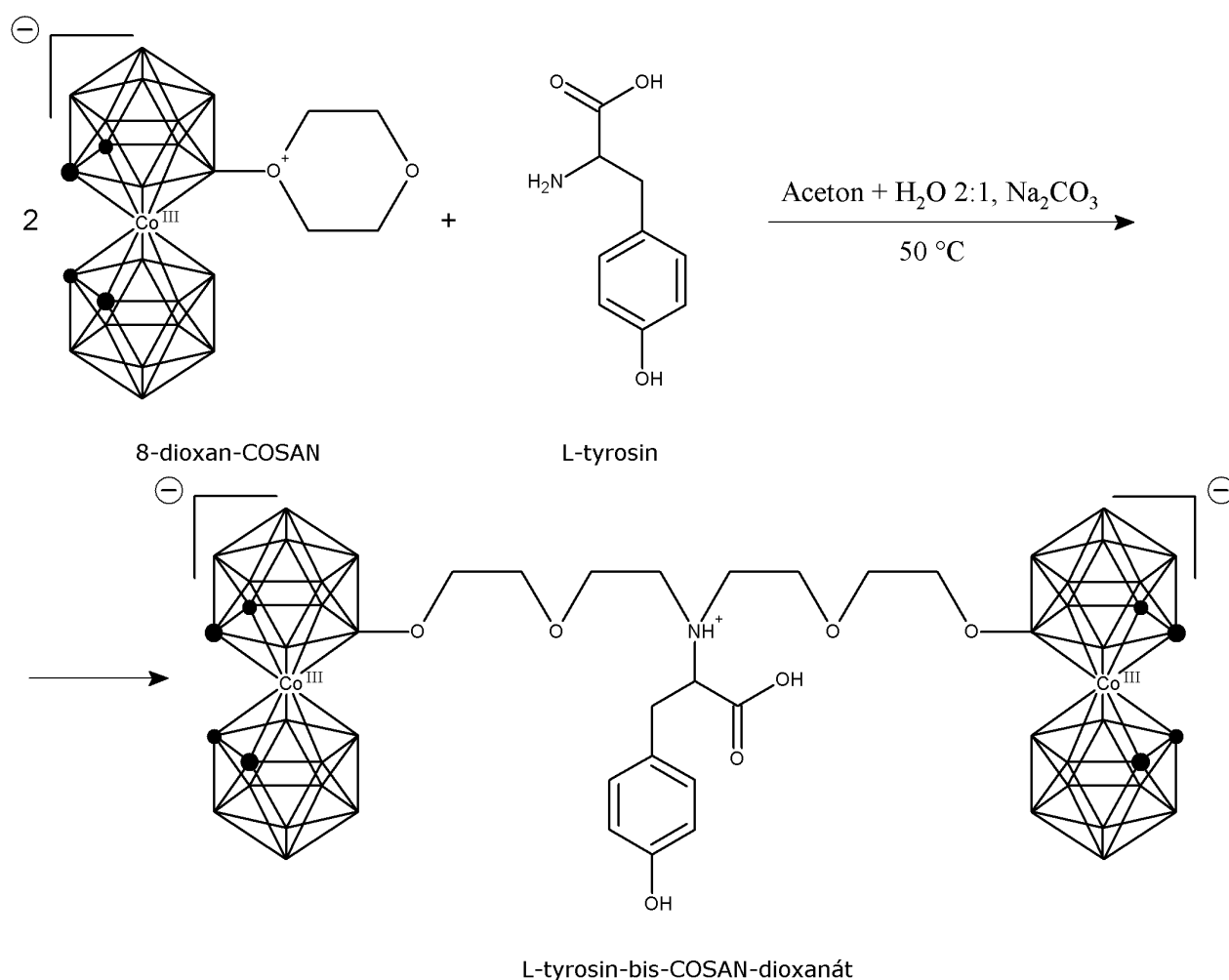
Není doporučeno skladovat produkt příliš dlouhou dobu ve formě roztoku, neboť 8-dioxan-COSAN je díky kladnému náboji na proximálním kyslíku velmi reaktivní a snadno podléhá vlivu nukleofilních činidel.



## 4.2. L-Tyrosin-bis-COSAN-dioxanát

L-tyrosin (Y, Tyr) je neesenciální glukogenní i ketogenní aminokyselina, která se běžně účastní metabolismu.<sup>(120)</sup> Vzhledem k tomu, že tyrosin je polární aminokyselina, která by mohla mít potenciálně vysokou afinitu k polárním Asp25 zbytkům v aktivním místě HIV-1 PR, byl vybrán jako první k prozkoumání možnosti syntézy karboranového derivátu.<sup>(119)</sup>

Prvním zdrojem obav se stala karboxylová skupina L-tyrosinu, která by se mohla přednostně vázat na kladně nabitý konec otevřeného dioxanového kruhu 8-dioxan-COSANu. Tato obava se ukázala jako jen částečně pravdivá, neboť změna polarity molekuly způsobená obsazením karboxy-skupiny byla snadno chromatograficky zachytitelná.



**Schéma 4.2-1.** Reakční schéma syntézy L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanátu. Reakce probíhá při teplotě 50°C v ultrazvuku. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> slouží k deprotonizaci aminoskupiny tyrosinu, která se tak stává silnějším nukleofilem a zároveň působí jako vhodný adsorbent pro zachycení nežádoucího trimeru.

Dalším možným problémem se mohla stát *para*-hydroxylová skupina na fenylovém kruhu, která by se také mohla stát cílem elektrofilního konce otevřeného dioxanového kruhu. Předchozí výzkum potvrdil, že hydroxylová skupina je napadána jen velmi neochotně a za podmínky, že ostatní nukleofilní skupiny jsou chráněny. <sup>(130)</sup> Hydroxy-deriváty však tvořily jen stopové množství vedlejších produktů a hydroxylovou skupinu nebylo nutné dodatečně chránit.

Pro syntézu bylo použito několik druhů rozpouštědel, z nichž některá však zapříčiňovala vznik nežádoucích produktů. Jako vhodné rozpouštědlo byla zvolena směs aceton-voda 2:1.

Klíčem k úspěšné syntéze dimeru bylo použití stechiometrického množství reaktantů (viz schéma 4.2-1). Reakci je potřeba provádět v inertním plynu při teplotě 50°C za přítomnosti Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Reakce probíhá ve dvou krocích: (1) Směs reaktantů byla rozpuštěna ve vodě (suspenze – 8-dioxan-COSAN je ve vodě nerozpustný) a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> deprotonoval aminoskupinu L-tyrosinu. (2) Do směsi bylo převedeno dvojnásobné množství acetonu oproti objemu přidané vody, díky kterému se rozpustil 8-dioxan-COSAN a byla zahájena samotná reakce.

Reakce nejlépe probíhala v ultrazvukové lázni, nikoli v elektrické míchačce s magnetickým míchátkem uvnitř, neboť během kavitací dochází k lepšímu promísení pevných částic a zvýšení jejich styčného povrchu. V průběhu reakce se vysráží shluk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na kterém je z většiny adsorbovaný nežádoucí trimer, tedy molekula obsahující tři 8-dioxan-COSANové podjednotky. Toto lze ověřit rozdrčením krystalků, promytím ACN a provedením MS ESI ( $mz^{-1} = 471,45$  (100%, M<sup>3-</sup>)). Zbytkové soli a vedlejší produkty rozpustné ve vodě jsou odstraněny extrakcí mezi Et<sub>2</sub>O a 3M roztok HCl.

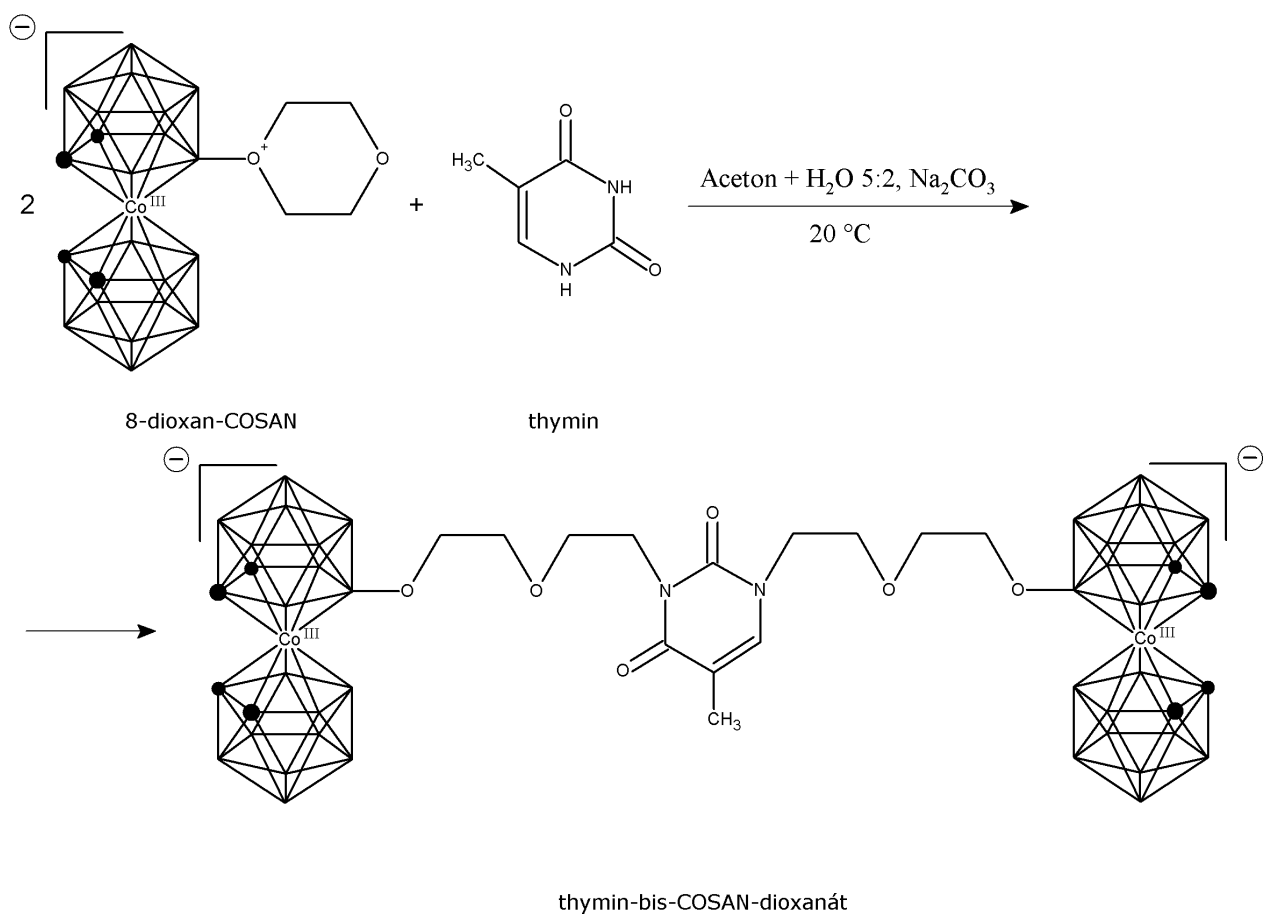
Separace produktu byla provedena několikastupňovou kapalinovou chromatografií. Jako eluent byl použit DCM se vzrůstajícím podílem ACN. Ke konci byl použit k oddělení posledních frakcí též methanol, max. do 25% objemového podílu. Každá frakce (5 frakcí na prvním sloupci) byla analyzována a podle obsahu cílového dimeru (MS – viz příloha 5) dle potřeby znovu chromatograficky oddělována.

Výsledný produkt byl dále rafinován krystalizací. Látka byla rozpuštěna v DCM, převedena do zábrusové baňky vhodné pro krystalizaci, převrstvena dvojnásobným množstvím hexanu a hermeticky uzavřena. První krystaly se objevují za přibližně 48 hodin, podle stupně čistoty a podmínek krystalizace. Bohužel se nejednalo o monokrystaly vhodné pro RDS analýzu, proto pro stanovení struktury látky byla použita spektrální data získaná metodou nukleární magnetické rezonance (NMR) a metodou hmotnostní spektrometrie.

### 4.3. Thymin-bis-COSAN-dioxanát

Thymin je vedle cytosinu a uracilu jednou z pyrimidinových nukleových bází, které se v buňkách používají k uchování genetické informace. Thymin je specifický tím, že vytváří právě dva vodíkové můstky s komplementárním adeninem.<sup>(120)</sup> Tato vlastnost se stala určující pro výběr thyminového derivátu do série testovaných látek, neboť aktivní místo HIV-1 PR tvoří právě dva symetricky postavené zbytky Asp25, ke kterým by oxo-skupiny na pyrimidinovém kruhu thyminu mohly vykazovat vysokou afinitu.

Oxo-skupiny thyminu však také mají další vlastnosti, které případnou syntézu mohou komplikovat. Podobně jako u chinonu může působením redukčních činidel dojít k adici vodíku a vzniklé hydroxylové skupiny by se mohly stát atraktivním cílem pozitivního konce otevřeného dioxanového kruhu 8-dioxan-COSANu.



**Schéma 4.3-1.** Reakční schéma syntézy thymin-bis-COSAN-dioxanátu. Tvar a uspořádání skupin výsledné molekuly je pouze orientační. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> slouží k deprotonizaci heterocyklických atomů dusíku. Thyminová báze se tak stává silnějším nukleofilem.

V průběhu pokusu muselo několikrát dojít k dalšímu ředění kvůli problémům s rozpustností obou reaktantů. Výsledný poměr aceton-voda pro vytvoření prostředí vhodného pro reakci byl 5:2.

Klíčovým aspektem pro úspěšnost syntézy byla přesnost navážek obou látek v poměru dle stechiometrie reakce (viz schéma 4.3-1), v prostředí inertního plynu, při laboratorní teplotě a za přítomnosti  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Doba trvání reakce se v závislosti na koncentraci roztoku pohybuje mezi 6 až 8 hodinami, během nichž je třeba reakční směs nepřetržitě míchat.

Následujícím krokem byla několikastupňová extrakce ve směsi  $\text{Et}_2\text{O}$  a 3M HCl, kterou byl oddělen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a další ve vodě rozpustné vedlejší produkty. Výsledný roztok produktů reakce v etheru byl odpařen a rozpuštěn v minimu DCM.

Separace produktu byla provedena sloupcovou kapalinovou chromatografií. Jako eluent byl použit DCM se vzrůstajícím podílem ACN. Použití alkoholů je třeba se vyhnout kvůli citlivé povaze oxo-skupin na pyrimidinovém kruhu thyminu.

Každá frakce (první sloupec - 6 frakcí) byla analyzována a podle obsahu cílového dimeru (MS – viz příloha 6) byla dle potřeby dále chromatograficky oddělována.

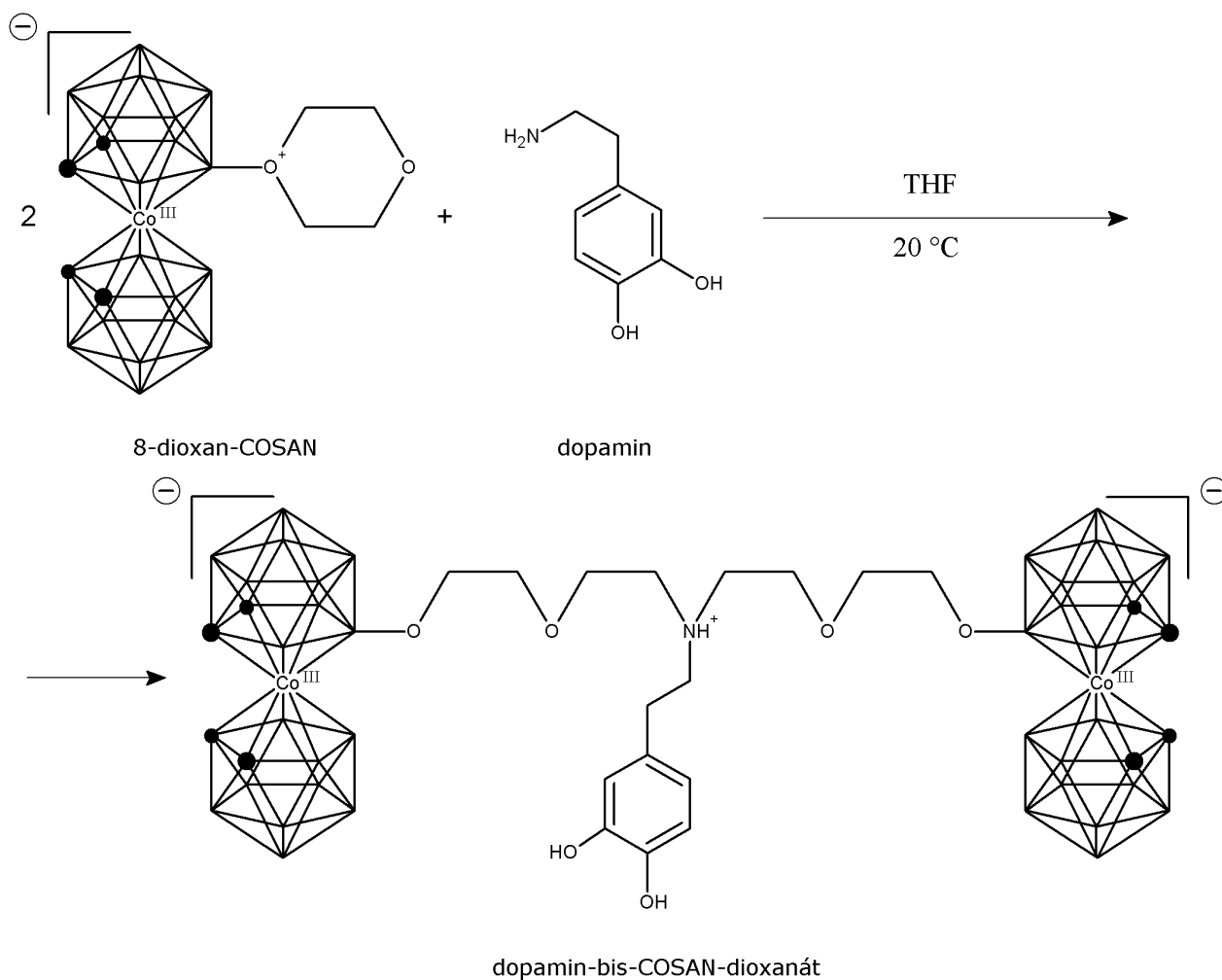
Výsledný produkt byl nakonec rafinován krystalizací. Směs byla rozpuštěna v DCM, převedena do zábrusové baňky vhodné pro krystalizaci, převrstvena dvojnásobným množstvím hexanu a uzavřena. První krystaly oranžové barvy se objevují během 48 hodin.

Výsledný produkt byl posléze analyzován pomocí NMR spektroskopie pro konečné ověření struktury.

#### 4.4. Dopamin-bis-COSAN-diofanát

Dopamin působí v mozku obratlovců jako neurotransmitter a neurohormon stimulující centra odměny. Patří do skupiny katecholaminů a v lidském těle je syntetizován hydroxylací a dekarboxylací aminokyseliny L-tyrosinu přes meziprodukt L-DOPA. Není toxický, při přímém podání ovlivňuje pouze autonomní nervovou soustavu (hypertenze, tachykardie), neproniká hematoencefalickou bariérou.<sup>(120)</sup>

Tento neurotransmitter se stal předmětem zkoumání kvůli možnosti srovnání afinity jeho dvou hydroxylových skupin v polohách *para* a *meta*, ke dvěma Asp25 zbytkům HIV-1 PR oproti jedné hydroxylové skupině aminokyseliny L-tyrosinu. Dalším pozitivním faktorem byla nepřítomnost karboxylové skupiny, která by mohla destabilizovat molekulu L-tyrosin-bis-COSAN-diofanátu vlivem záporného indukčního efektu a výsledně snižovat její účinnost.



**Schéma 4.4-1.** Reakční schéma syntézy dopamin-bis-COSAN-diofanátu. Reakce byla prováděna v bezvodém prostředí tetrahydrofuranu (THF) kvůli obtížnému vysušování dopaminu.

Použitý dopamin (Sigma H8502) je dodáván ve formě hydrochloridu, kvůli čemuž musel být předem upraven do podoby volné báze. Prvotní postup – rozpuštění ve vodném roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – se ukázal být neproveditelným, neboť dopamin rozpuštěný ve vodě bylo třeba vysušit, což ani v podtlaku nebylo možné bez přesáhnutí teploty  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . Toto způsobuje opticky patrný rozklad dopaminu.

Alternativou bylo důkladné vysušení obou látek a jejich oddělené rozpuštění v THF v prostředí inertního plynu. Do baňky s dopaminem byl přidán hydrid sodný v nadbytku, kterým byl roztok neutralizován a aminoskupina deprotonizována. Převedením roztoku 8-dioxan-COSANu do roztoku dopaminu jako volné báze byla zahájena reakce, která za laboratorní teploty trvá 2 hodiny.

Reakční směs sestávala z cílového dimeru a pestré škály vedlejších produktů, mezi nimiž byly ve stopách přítomny i deriváty napojené přes hydroxy-skupinu. Prvním krokem k oddělení výsledného derivátu byla extrakce mezi  $\text{Et}_2\text{O}$  a 3M HCl. Po oddělené vodné vrstvy a odpaření etheru byla pevná reakční směs rozpuštěna ve vodě s pár kapkami methanolu, aby mohl být surový produkt sražen chloridem cesným na dobře definovanou cesnou sůl. Tuto část syntézy bylo třeba urychlit kvůli degradativním účinkům methanolu na výslednou látku.

Následovala izolace čisté látky metodou několikastupňové kapalinové chromatografie. Jako eluent byl použit DCM se vzrůstajícím podílem ACN. Jednotlivé frakce (první sloupec - 5 frakcí) bylo třeba identifikovat a určit obsah cílové látky pomocí MS ESI (MS – viz příloha 7) a dle potřeby je dále chromatograficky oddělovat.

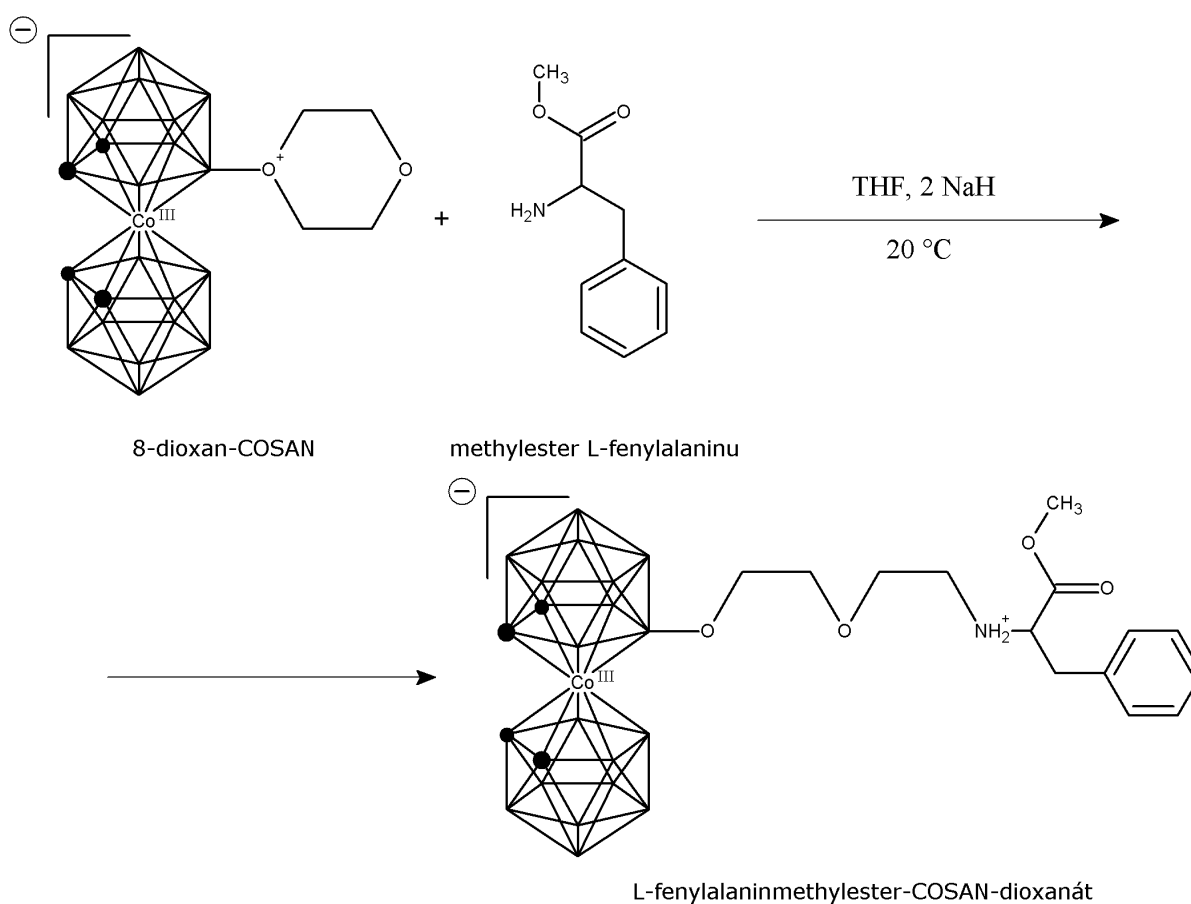
Výsledný produkt byl dále rafinován krystalizací. Směs byla rozpuštěna v DCM, převedena do zábrusové baňky vhodné pro krystalizaci a převrstvena dvojnásobným množstvím hexanu. Krystalizace je velmi zdoluhavá, bez naočkování krystalu z předchozích syntéz trvá několik dní.

Výsledný produkt byl posléze analyzován pomocí NMR spektroskopie pro konečné ověření struktury.

#### 4.5. L-fenylalaninmethylester-COSAN-dioxanát

Methylester L-2-amino-3-fenylpropanové kyseliny, se v průmyslu používá zejména k výrobě sladidla aspartamu. <sup>(131)</sup> V neesterifikované formě je L-fenylalanin (Phe, F) esenciální glukogenní i ketogenní aminokyselinou. V lidském těle je prekurzorem mnohých neurotransmiterů, ať už přímo, či 4-hydroxyací přes L-tyrosin.

Přestože nemá polární hydroxy-skupinu na svém fenylovém kruhu, byl vybrán do série jako kontrolní vzorek pro určení jejího vlivu na účinnost derivátu. Esterifikovaná forma aminokyseliny měla dopomoci k stabilizaci terciární aminoskupiny a usnadnění reakce. <sup>4</sup> Výsledkem měla být stabilnější molekulová struktura, což by po potvrzení mohlo mít vliv na budoucí návrhy substituentů.



**Schéma 4.5-1.** Schéma syntézy L-fenylalaninmethylester-COSAN-dioxanátu. Reakce probíhá bez katalyzátoru za laboratorní teploty v prostředí THF. Jako neutralizační a deprotonizační činidlo je použit NaH ve dvou ekvivalentním nadbytku.

<sup>4</sup> Obdobná publikovaná reakce probíhá s hydroxylovou funkční skupinou chráněnou esterifikací. <sup>(120)</sup>

Syntéza derivátu methylesteru fenylalaninu se projevila jako problémová. Reakce proběhla v bezvodém prostředí THF. Před započítím syntézy bylo odděleně vysušeno stechiometricky odpovídající množství reaktantů (viz schéma 4.5-1), které bylo v průběhu reakce uchovááno v inertním prostředí dusíku.

Methylester fenylalaninu ve formě hydrochloridu byl nejprve neutralizován a deprotonizován přidáním NaH v nadbytku. Poté byl převeden vysušený 8-dioxan-COSAN do reakční baňky s roztokem methylesteru fenylalaninu a NaH a byla započata reakce, která za stálého míchání při laboratorní teplotě probíhala 16 hodin.

Po vysušení reakční směsi byla provedena extrakce mezi Et<sub>2</sub>O a 3M roztok HCl, kterou byl oddělen nezreagovaný methylester fenylalaninu a vedlejší produkty rozpustné ve vodě, zejména NaCl. Roztok etheru posléze vysušen a rozpouštěn v minimu DCM.

Dalším krokem byla několikastupňová sloupcová kapalinová chromatografie. Jako eluent byl použit DCM se vzrůstajícím podílem ACN. Jednotlivé frakce (6 frakcí na prvním sloupci) bylo třeba identifikovat a určit výskyt cílové látky pomocí MS ESI (MS – viz příloha 8) a dle potřeby je dále chromatograficky oddělovat.

Výsledný produkt byl dále čištěn krystalizací. Látka byla rozpuštěna v DCM, převedena do zábrusové baňky vhodné pro krystalizaci, převrstvena dvojnásobným množstvím hexanu a hermeticky uzavřena. První krystaly se objevují za dobu cca 48 hodin, podle stupně čistoty a podmínek krystalizace.

Výsledný produkt bylo třeba posléze analyzovat použitím NMR pro konečné ověření struktury.

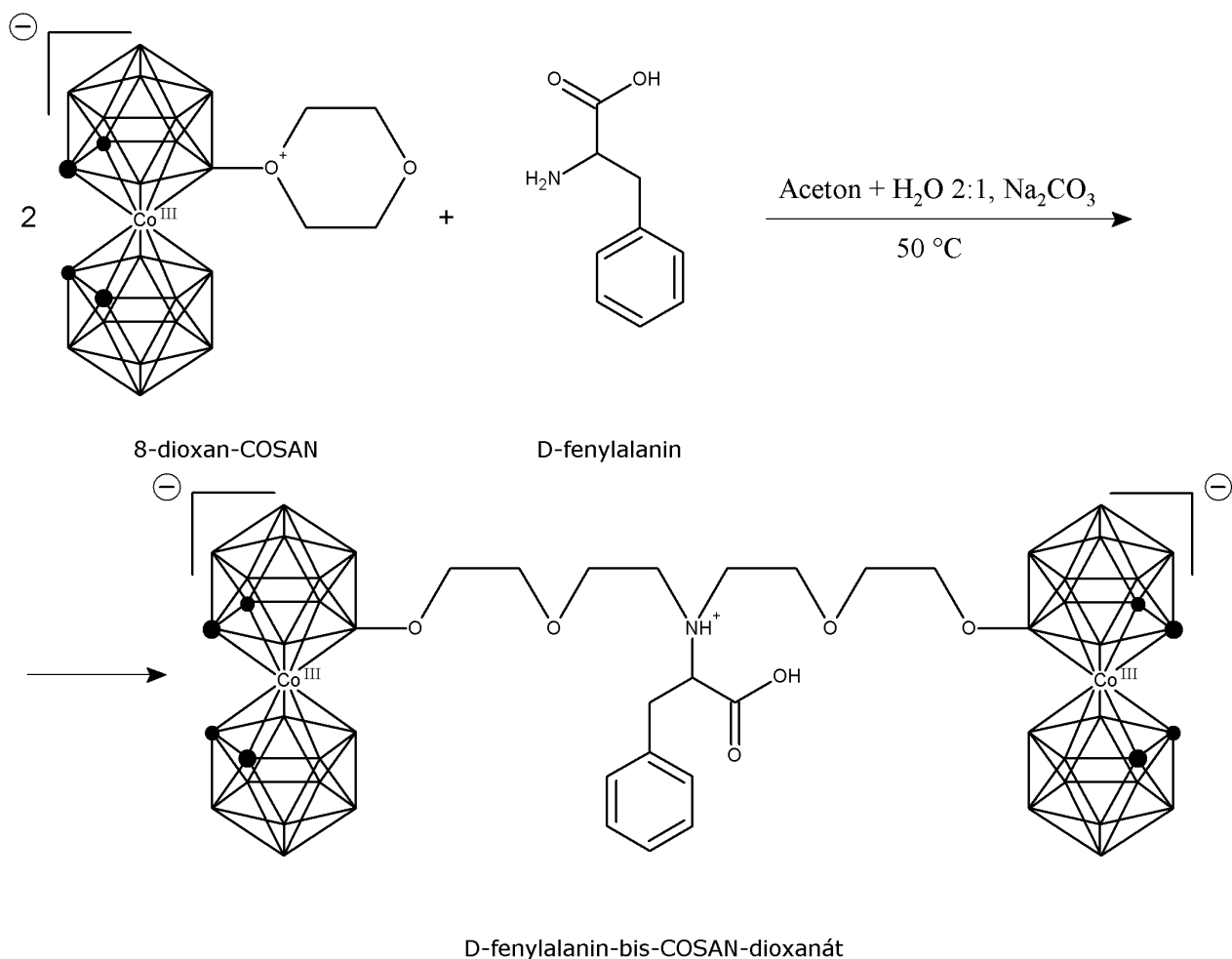


#### 4.6. D-Fenylalanin-bis-COSAN-dioxanát

D-fenylalaninový derivát byl syntetizován jako poslední z řady. Atypický enantiomer byl zvolen z důvodu prozkoumání vlivu pravotočivé optické izomerie substituentu na vlastnosti výsledné látky.

Z předchozích postupů syntézy byl zvolen jako nejvhodnější koncept deprotonizace pomocí jednoho molárního ekvivalentu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (vztaženo k fenylalaninu) v prostředí aceton-voda (2:1).

Reakce probíhá dvoustupňově: (1) Směs reaktantů byla rozpuštěna ve vodě (suspenze – 8-dioxan-COSAN je ve vodě nerozpustný) a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  deprotonizuje amioskupinu fenylalaninu. (2) Do směsi bylo převedeno dvojnásobné množství acetonu oproti vodě a rozpuštěním 8-dioxan-COSANu byla zahájena reakce.



**Schéma 4.6-1.** Reakční schéma syntézy D-fenylalanin-bis-COSAN-dioxanátu. Reakce probíhá za teploty 50°C v ultrazvuku po dobu jedné hodiny za vzniku hydratovaného 8-dioxan-COSANu a produktu.

Tato reakce probíhá při 50°C za stálého míchání ve vysokém výtěžku. Míchání je vhodné zajistit ultrazvukem, neboť pak odpadají problémy s rozpustností. Shluk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nelze použít jako adsorbent, protože fenylalanin oproti L-tyrosinu postrádá 4-hydroxylovou skupinu, díky které je molekula méně polární. Reakce probíhala jednu hodinu, během níž bylo třeba při použití ultrazvuku kontrolovat teplotu směsi, která se působením kavitací a přídatného ohřevu zahřívá.

Reakční směs byla odpařena a několikrát extrahována mezi Et<sub>2</sub>O a 3M roztok HCl kvůli odstranění vedlejších produktů a zbytkových anorganických solí rozpustných ve vodě.

Připravená reakční směs v etheru byla poté odpařena a rozpuštěna v minimu DCM. Byla provedena kapalinová sloupcová chromatografie. Jako eluent byl použit DCM se vzrůstajícím podílem ACN.

Jednotlivé frakce (3 frakce, jeden sloupec) byly identifikovány. Poslední frakce obsahovala čistý cílový dimer fenylalaninového derivátu (MS – viz příloha 9).

Produkt byl dále přečištěn krystalizací. Výsledná látka byla rozpuštěna v DCM, převedena do vhodné zábrusové baňky, převrstvena dvojnásobným množstvím hexanu a uzavřena. Krystalizace probíhala minimálně 48 hodin v závislosti na podmínkách. Výsledný produkt tvoří oranžová pevná látka.

Výsledný produkt je třeba posléze analyzovat použitím nukleární magnetické rezonance (NMR) pro konečné ověření struktury.

## 4.7. Metody strukturní analýzy

### 4.7.1. NMR spektroskopie

NMR (nukleární magnetická rezonance) je kvantitativní instrumentální metoda založená na interakci magnetického momentu jader s nenulovým spinem v homogenním magnetickém poli s elektromagnetickým zářením. V magnetických polích o intenzitách jednotek až desítek Tesla přísluší magneticky aktivním jádrům rezonanční frekvence v oblasti radiových vln. Protože elektronový obal stíní jádro od vnějšího magnetického pole, projeví se chemické poměry v molekule spektrem rezonančních frekvencí pro různě vázaná jádra. Rozdíly těchto frekvencí oproti referenční frekvenci měřeného izotopu se nazývají chemickým posunem; jsou typicky v řádu miliontin referenční frekvence a jejich poměr k této frekvenci nezávisí na intenzitě magnetického pole, proto se vyjadřují v jednotkách ppm (parts per milion).

Každá molekula má charakteristické spektrum chemických posunů, které závisí na použitém rozpouštědle a někdy také na teplotě měření, ale ne na spektrometru. Moderní spektrometry používají měření s tzv. Fourierovou matematickou transformací. Vzorek je vystaven krátkému pulsu radiových vln o referenční frekvenci. Energie pulsu daná součinem výkonu a jeho délky vychýlí magnetizaci vzorku ze směru magnetického pole. Parametry pulzu je vhodné nastavit přesně na výchylku 90°. Dlouhé pulzy, tzv. měkké, jsou selektivní, krátké intenzivní pulzy, tzv. tvrdé, působí na jádra v širokém rozsahu rezonančních frekvencí. Po vybuzení vzorku tvrdým pulzem je měřena jeho odezva, vyhasínání excitace, neboli FID (free induction decay). Po matematickém zpracování naměřených dat Fourierovou transformací získáme spektrum vzorku. Tato technika je rychlejší a přesnější než klasické měření absorbce různých frekvencí ve vzorku. Kromě toho umožnila na základě kvantové teorie vyvinout řadu složitějších pulsních sekvencí, které po příslušném matematickém zpracování poskytují vícerozměrná a jiná pokročilá spektra.

Pro NMR měření se standardně používají deuterovaná rozpouštědla. Hlavním důvodem je odstranit z  $^1\text{H}$  spekter dominantní signál protonů rozpouštědla. Zároveň se deuterované rozpouštědlo využívá pro tzv. Lock přístroje. Přístroje jsou vybaveny zvláštní cívkou pro neustálé měření odezvy deuteria ( $^2\text{D}$ ) a pomocí vyrovnávacích magnetických cívek neustále upravují intenzitu magnetického pole tak, aby rezonanční frekvence deuteria v rozpouštědle byla konstantní. Toto zaručuje stálost magnetického pole a spolehlivost naměřených rezonančních frekvencí. Správné nastavení několika dalších sad vyrovnávacích cívek, tzv. Shimming, zaručuje homogenitu magnetického pole v objemu měřeného vzorku.

Měření byla prováděna v ÚACh na NMR přístroji Varian Mercury 400 Plus se supravodivým magnetem chlazeným kapalným heliem, vytvářejícím homogenní magnetické pole o intenzitě 10 Tesla (pro zajímavost, magnetické pole Země má intenzitu zhruba 300 000 x menší). Výstupní data byla zpracována v programu VNMRJ v2.6. Zkoumané látky byly těsně před měřením rozpuštěny

v deuterovaném acetonitrilu ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ). Jako referenční standard (0 ppm) pro detekci signálů jader  $^{11}\text{B}$  byl použit  $\text{BF}_3\cdot\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ , pro detekci  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$   $\text{Me}_4\text{Si}$ .

Informace o struktuře látek byly získány především z NMR spekter jader  $^{11}\text{B}$ , dále  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ . Měření jader  $^{11}\text{B}$  probíhalo při frekvenci 128 MHz, jádra  $^1\text{H}$  při 400 MHz a  $^{13}\text{C}$  při 100 MHz. Experimenty při nichž byla získávána data o chemickém posunu jader  $^{11}\text{B}$  a  $^1\text{H}$  trvaly pár minut, na rozdíl od velmi málo citlivých jader  $^{13}\text{C}$ , jejichž měření zabralo řádově několik hodin. Citlivost jádra boru  $^{11}\text{B}$  při měření NMR je krom jiného způsobena i vyšším zastoupením izotopu  $^{11}\text{B}$  (80,1%) v přirozené směsi oproti  $^{13}\text{C}$  (1,1%).

Pro vyhodnocování výsledků byla použita měření  $^{11}\text{B}$ ,  $^{11}\text{B} \{^1\text{H}\}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H} \{^{11}\text{B}\}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{11}\text{B}$ - $^{13}\text{C}$  2D COSY (correlation spectroscopy – korelační spektroskopie). Složené závorky slouží k označení tzv. dekaplinku, tedy experimentu který slouží k zobrazení spektra se selektivně potlačenými interakcemi s daným druhem atomu.

Mezi nejdůležitější signály, které byly sledovány pro ověření struktury syntetizovaných látek patří hlavně  $^{11}\text{B}$  signál značící exoskeletární substituci za hydridický vodík na pozici 8, který se nemění ani s  $^1\text{H}$  dekaplinkem a zůstává jako singlet (př.:  $\delta_{\text{B}}/\text{ppm}$ : 24,34 singlet (1B, B-O), viz příloha 10). V  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrech, vyjma thyminového derivátu, jsou charakteristické odezvy jader různě substituovaných fenylových kruhů (př.:  $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ : 7-6 dublety a  $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ : 135-125). Počet, intenzita a tvar signálů je odvozen od stupně symetrie v závislosti na poloze substituentu benzenového jádra - viz přílohy 11,12,14 a 15. Např. nejsymetričtější je odezva dvou dubletů u derivátu tyrosinu, substituovaného výhodně v *para*-polohách (viz příloha 11). Situace se mírně komplikuje v případě fenylalanin obsahujících derivátů, kdy je ve spektru vidět dva dublety intenzity 2 v překryvu s jedním dubletem intenzity 1 (viz přílohy 12 a 15). Nejméně symetrické rozložení signálů  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  benzenového kruhu je patrné u derivátu s dopaminem, tedy v pozicích 1,3 a 4 různými funkčními skupinami substituovaným benzenovým jádrem. V tomto případě dochází k rozštěpení na 4 signály intenzit 1:2:1:2 a rozšíření oblasti výskytu od 8,5-6,0 ppm pro  $^1\text{H}$  a 145-115 ppm pro  $^{13}\text{C}$  (viz příloha 14).

V případě  $^{13}\text{C}$  NMR spekter derivátů fenylalaninu a tyrosinu jsou společnými znaky přítomnost singletu  $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ : 135-128 karboxylové funkční skupiny, v  $^1\text{H}$  spektrech výskyt tripletu chirálního atomu uhlíku CH při  $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ : 4,23. Thyminový derivát se výše popisovanému vymyká v  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech, protože neobsahuje benzenové jádro ani řetězec, ale pouze rigidní heterocyklus. Pozice signálů OH a NH skupin jsou fluktuující a pro každou látku a měření výrazně odlišná.

V příloze 10 je popsáno vzorové přiřazení signálů NMR spekter  $^{11}\text{B}$ ,  $^{11}\text{B} \{^1\text{H}\}$  a  $^1\text{H} \{^{11}\text{B}\}$  do struktury 8-dioxan-COSANu.

#### 4.7.2. Hmotnostní spektrometrie

Stanovení čistoty cílové látky a její molární hmotnosti bylo prováděno hmotnostním spektrometrem LCQ Fleet Ion Trap (Thermo Fisher Scientific) kombinovaným s vysokoúčinným kapalinovým chromatografem (HPLC Finnigan Surveyor). Spektrometrická data byla zpracována v programu Qual Browser 2.0.7 SP1; Thermo Fisher Scientific, Inc.: 1998-2007.

K ionizaci studovaných metalakarboranových látek se na oddělení syntéz ÚACh běžně používají dva typy sond – ESI (Electrospray Ionization) a APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). V případě stanovení molekulových hmotností metalakarboranových aniontů je výhodnější použít ESI sondu, zatímco v případě ionizace neutrálních boranů nebo jejich zwitteriontů k ionizaci zpravidla dochází lépe v režimu APCI. Zajímavostí je, že karborany a metalakarborany tvoří natolik stálé sloučeniny, že ani při použití drsnějších ionizačních podmínek zpravidla nedochází k fragmentaci těchto molekul, jak je tomu zvykem v případě analýz mnoha organických látek.

Zkoumané vzorky byly před injekcí do systému rozpuštěny a zředěny v ACN na výslednou koncentraci přibližně  $100 \text{ ng.ml}^{-1}$ . Měření bylo prováděno při napětí zdroje 5,47 kV, napětí válcových čoček -119,75 V, napětí na kapiláře -31,95 V, teplotě kapiláry 160 °C a průtoku plynu 6 p.d.u. (sheath gas). Vzorky byly dávkovány kontinuální infuzí při průtoku  $5 \mu\text{L.min}^{-1}$ .

Během měření byl sledován pouze výskyt aniontů. Jejich molární hmotnost si odpovídala pouze v případě monoaniontů, u vícenásobných aniontů je třeba zohlednit, že nezávislá proměnná na grafu je poměrem molární hmotnosti a náboje  $mz^{-1}$ , nikoli pouze molární hmotností. Výsledná zobrazená hodnota bude proto u dianiontu poloviční, u trianiontu třetinová atd.

Jelikož závislou proměnnou na grafu je *relativní* četnost výskytu určitého iontu a každá látka se při ionizaci chová trochu jinak, nelze podle integrálu jednotlivých píků určit kvantitativní podíl dané látky ve směsi. Lze však tímto způsobem určit přibližnou čistotu vzorku. Pro ověření struktury látky je *vždy* třeba provést měření NMR vhodných atomů účastnících se diskutované vazby nebo získat údaje o struktuře látky z vypěstovaného monokrystalu.

Molární hmotnost iontů karboranových sloučenin odečtená z grafu MS podléhá určitým pravidlům. Signál jedné látky netvoří jeden pík, ale celé spektrum, neboť bor se na Zemi vyskytuje ve formě dvou izotopů -  $^{10}\text{B}$ (19,9%) a  $^{11}\text{B}$ (80,1%). Spektrum měřené látky (viz příloha 5-7,9) – v případě obsahu dvou COSANových podjednotek – tedy teoreticky vykazuje  $C'_{36}(2) = 37$  píků, neboť COSAN má 18 atomů boru (násobeno počtem podjednotek). Reálně lze pozorovat 11-14 píků v závislosti na stabilitě základní

čáry. V této práci je jako vypovídající hodnota používána molekulová hmotnost s nejvyšším relativním zastoupením, která odpovídá izotopickému rozložení boru.

V průběhu měření také často dochází ke tvorbě poměrně stálých komplexů s atomy alkalických kovů, zejména sodíku. Je tomu tak zejména u těch metalakarboranů, které obsahují v molekule dva a více atomů kyslíku, ke kterým se atomy alkalických kovů ochotně koordinují.

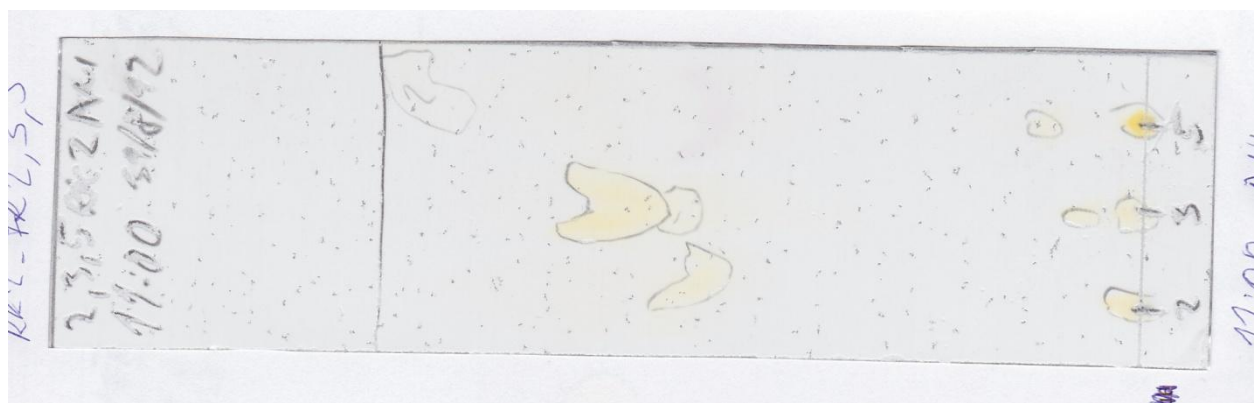
#### 4.7.3. Tenkovrstevná chromatografie

Tenkovrstevná chromatografie (TLC) jako analytická metoda umožňuje rozlišit jednotlivé složky zkoumaného vzorku podle různé schopnosti těchto látek vzlínat v prostředí stacionární fáze (silikagel spojený škrobem, celulóza aj.) spolu s mobilní fází (organické rozpouštědlo).

Pro každou izolovanou látku lze za daných podmínek stanovit tzv. retenční faktor  $R_f$ , pro jehož popis platí, že látky setrvávající na startu mají  $R_f = 0$  a  $R_f = 1$  mají látky jdoucí s čelem soustavy (viz obr. 4.6.3-1). Dle počtu frakcí lze určit přibližný podíl látky ve směsi a také jak se bude směs chovat při sloupcové chromatografii. V závislosti na použitém eluentu  $R_f$  také napovídá o polaritě zkoumané látky.

K chromatografické analýze byly využity destičky Silufol (Kavalier) a  $NH_2 F_{2545}$  (Merck). Látky byly většinou velmi dobře viditelné jako oranžové skvrny. Výjimkou byla TLC  $\alpha$ -aminokyselin, která musela být prováděna na destičkách PEI Cellulose (Sigma-Aldrich) a jednotlivé skvrny zviditelňovány aplikací 1% ninhydrinu v acetonu a zahřátím.

Jako mobilní fáze – eluent – byl nejčastěji používán DCM nebo tzv. aniontová směs chloroform + ACN 2:1. V případě TLC  $\alpha$ -aminokyselin byla jako eluent použita směs butanol + kyselina octová + voda připravené v objemovém poměru 4:1:5. <sup>(120)</sup>



**Obr. 4.7.3-1.** Příklad TLC chromatogramu zn. Silufol se vzorky 3 frakcí prvního chromatografického dělení reakční směsi (L-tyrosinový derivát). Jako eluent byla použita aniontová směs chloroform + ACN 2:1.

#### 4.8. Použité chemikálie a laboratorní materiál

Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel MERCK 60 (0.040-0.063 mm) v normální fázi pro kolonovou chromatografii (230-400 mesh ASTM) a rozpouštědla uvedená spolu s použitými chemikáliemi v tab. 4.8-1. Rozpouštědla byla před použitím v reakcích zbavována zbytkové vody pomocí molekulových sít s velikostí pórů 0,4 nm, č. 8471.2, výr. Carl Roth. Jako inertní plyn byl použit dusík, čistota 99.999%, Messer.

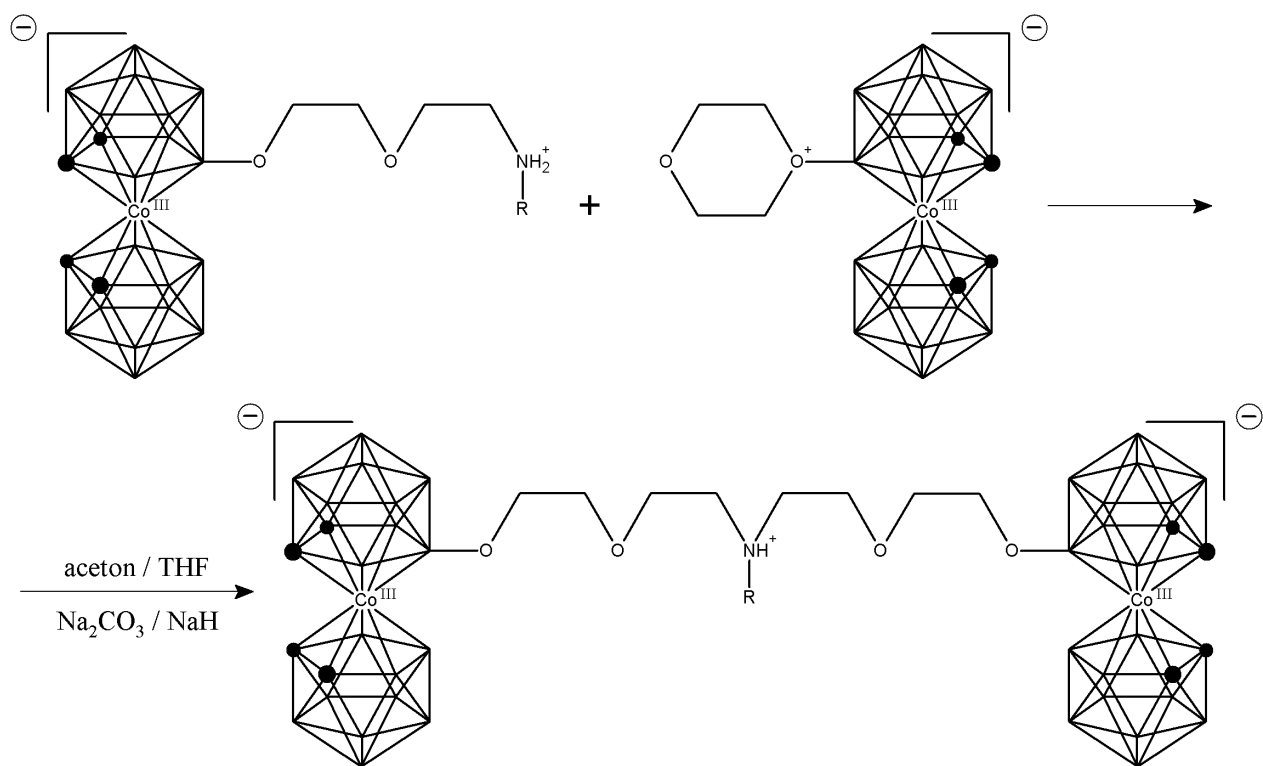
Vzorky byly před analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie čištěny pomocí hydrofobního membránového filtru PTFE pro MS, velikost póru 0,45 µm, výr. Membrane Solutions.

Označení chemikálie	Kód výr.	Čistota	Výrobce	Poznámka
Acetonitril p.a.	-	99,7%	Lach-Ner	reakce
Acetonitril, HPLC grade	-	≥99,9%	Chem-Lab	hmotnostní spektrometrie
Acetonitrile-d3	233323	99,96%	Sigma-Aldrich	NMR spektroskopie
Dichlormethan p.a.	-	99,97%	Lach-Ner	
Methanol p.a.	-	99,94%	Lach-Ner	
Diethylether p.a.	-	99,95%	Lach-Ner	
Aceton p.a.	-	99,5%	Lach-Ner	
Hexan p.a.	-	99,17%	Lach-Ner	
Chloroform p.a.	-	99,9%	Lach-Ner	
Tetrahydrofuran p.a.	-	99,94%	Lach-Ner	
1,4-dioxan p.a.	-	99,8%	Lach-Ner	
Kobalt bis(1,2-dikarbolid) cesná sůl	-	≥99%	Katchem	
Fluorid boritý diethyletherát	10089790	≥95%	Fluka	nyní 15719 Sigma-Aldrich
L-fenylalaninmethylester	P1720	98%	Sigma-Aldrich	
L-tyrosin	T3754	≥98%	Sigma-Aldrich	
Dopamin hydrochlorid	H8502	≥98%	Sigma-Aldrich	
Thymin	T0376	≥99%	Sigma-Aldrich	
Uhličitan sodný bezvodý p.a.	-	≥99%	Lach-Ner	
Chlorid cesný	C3139	≥99,5%	Sigma-Aldrich	
Methyltrifenylfosfonium bromid	130079	≥98%	Sigma-Aldrich	
Hydrid sodný	223441	≥95%	Sigma-Aldrich	

**Tab. 4.8-1.** Seznam použitých chemikálií.

## 5. Výsledky

Bylo připraveno pět nových substituovaných metallakarboranových derivátů s motivem dvou kobalt bis(dikarbolidových) jednotek vzájemně propojených diethylenglykolovým řetězcem se zabudovanou funkční skupinou katecholaminu, jeho prekurzoru, nebo nukleové báze v centru molekuly. Čtyři látky (viz schéma 5-3-1,2,4,5) byly připraveny dle upraveného Pleškova syntetického konceptu (viz schéma 5-1) vazbou centrálního substituentu přes jednu terciární aminoskupinu.<sup>(10)</sup> Thyminový derivát (viz schéma 5-2-3) byl připraven analogicky, ale připojením přes dvě terciární aminoskupiny zabudované v pyrimidinovém kruhu. Výchozí látka 8-dioxan-COSAN byla připravena za přítomnosti aktivátoru  $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  mechanismem EINS.



**Schéma 5-1.** Schéma reakce dle upraveného Pleškova syntetického konceptu, při které vznikají deriváty s motivem dvou kobalt bis (dikarbolidových) jednotek vzájemně propojených diethylenglykolovým řetězcem. Původní koncept uvažuje prostředí monoglymu (1,2-dimethoxyethan) a 2 molů NaH.



**(1) L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanát (GB-268)** - bis-[8-(-5-pentoxy-1-oxy)-(1',2'-kloso-dikarbaundeka hydridoundekaboran)-komo-3,3'-kobalt-(1,2-kloso-dikarbadekahydridoundekaboran)-]-N,N-(-2-amino-3-(4-hydroxyfenyl)-1-propan-(3-)-át trisodný hexahydrát

Výtěžek: 27 mg (2,2%), TLC: (DCM)  $R_f = 0$ ; (ANI)  $R_f = 0,85$ , NMR:  $\delta_B$ /ppm: 23.82 singlet (1B, B-O),  $\delta_H$ /ppm: 7.10, 6.78 dublet (4H, p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>),  $\delta_C$ /ppm: 131.72 singlet (1C, COOH) (viz příloha 11); MS ESI:  $mz^{-1} = 500,58$  (M<sup>2-</sup>, 100%), vypočteno: 500,36;  $mz^{-1} = 1001,83$  (H+M<sup>-</sup>, 18%), vypočteno: 1001,73;  $mz^{-1} = 1023,83$  (Na+M<sup>-</sup>, 32%), vypočteno: 1023,71 (viz příloha 5)

**(2) D-fenylalanin-bis-COSAN-dioxanát (GB-267)** - bis-[8-(-5-pentoxy-1-oxy)-(1',2'-kloso-dikarba undekahydridoundekaboran)-komo-3,3'-kobalt-(1,2-kloso-dikarbadekahydridoundekaboran)-]-N,N-(-2-amino-3-fenyl-1-propan)-(3-)-át trisodný hexahydrát

Výtěžek: 77 mg (32,1%), TLC: (DCM)  $R_f = 0$ ; (ANI)  $R_f = 0,51$ , NMR:  $\delta_B$ /ppm: 24.27-23.61 mírně rozštěpený singlet (1B, B-O),  $\delta_H$ /ppm: 7.31-7.24 překrývající se dublety intenzit 2:1:2 (5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>),  $\delta_C$ /ppm: 135.06 singlet (1C, COOH) (viz příloha 12); MS ESI:  $mz^{-1} = 985,92$  (H+M<sup>-</sup>, 100%), vypočteno: 985,73 (viz příloha 9)

**(3) Thymin-bis-COSAN-dioxanát (GB-254)** - bis-[8-(-5-pentoxy-1-oxy)-(1',2'-kloso-dikarbaundeka hydridoundekaboran)-komo-3,3'-kobalt-(1,2-kloso-dikarbadekahydridoundekabor)-]-N,N'-(5-methyl-1,3-diazabenzen-2,4-dion)-(2-)-át, didraselný

Výtěžek: 5 mg (4,3%), TLC: (DCM)  $R_f = 0$ ; (ANI)  $R_f = 0,13$ , NMR:  $\delta_B$ /ppm: 24.20-23.70 mírně rozštěpený singlet (1B, B-O);  $\delta_H$ /ppm: 7.40 singlet (1H, NH), 3.92 singlet (1H, CH), 2.38 singlet (3H, CH<sub>3</sub>),  $\delta_C$ /ppm: 165.26 (1C, NCON), 153.15 (1C, C<sub>kvarterni</sub>), 141.86 (1C, NCO), 73.03 (1C, CH=C), 13.16 (1C, CH<sub>3</sub>) (viz příloha 13); MS ESI:  $mz^{-1} = 473,42$  (M<sup>2-</sup>, 100%), vypočteno: 472,84 (viz příloha 6)

Byl izolován též monomer thymin-COSAN-dioxanát: TLC: (DCM)  $R_f = 0$ ; (ANI)  $R_f = 0,06$ , MS ESI:  $mz^{-1} = 536,48$  (M<sup>2-</sup>, 100%), vypočteno: 536,36

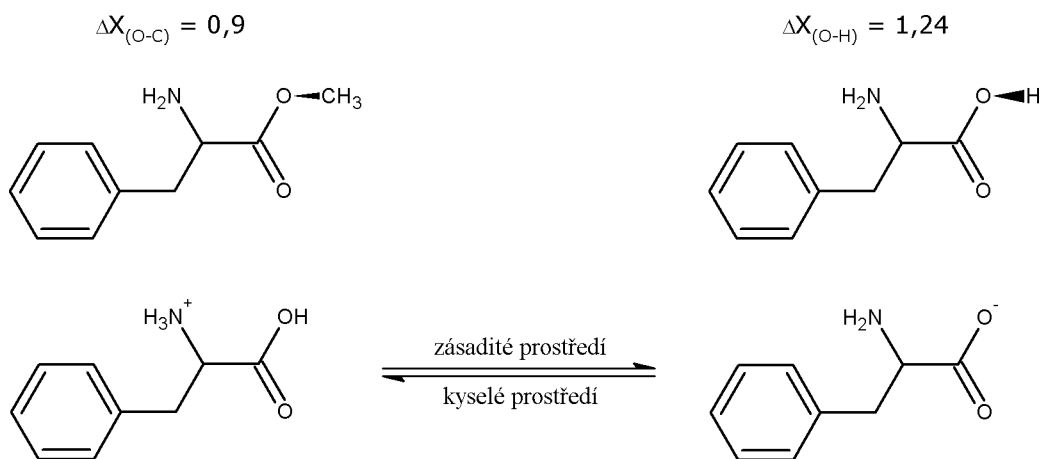
**(4) Dopamin-bis-COSAN-dioxanát (GB-261)** - bis-[8-(-5-pentoxy-1-oxy)-(1',2'-kloso-dikarbaundekahydridoundekaboran)-komo-3,3'-kobalt-(1,2-kloso-dikarbadekahydridoundekabor)-]-N,N-(-4-(2-aminoethyl)-benzen-1,2-diol)-(1-)-át, draselný

Výtěžek: 46 mg (7,5%), TLC: (DCM)  $R_f = 0$ ; (ANI)  $R_f = 0,15$ , NMR:  $\delta_B$ /ppm: 23.92 singlet (1B, B-O);  $\delta_H$ /ppm: 7.22-7.02 multiplet (3H, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 3.87 multiplet (2H, CH<sub>2</sub>N), 3.27 triplet (2H, CH<sub>2</sub>) (viz příloha 14); MS ESI:  $mz^{-1} = 974,74$  (H+M<sup>-</sup>, 100%), vypočteno 973,73 (viz příloha 7)

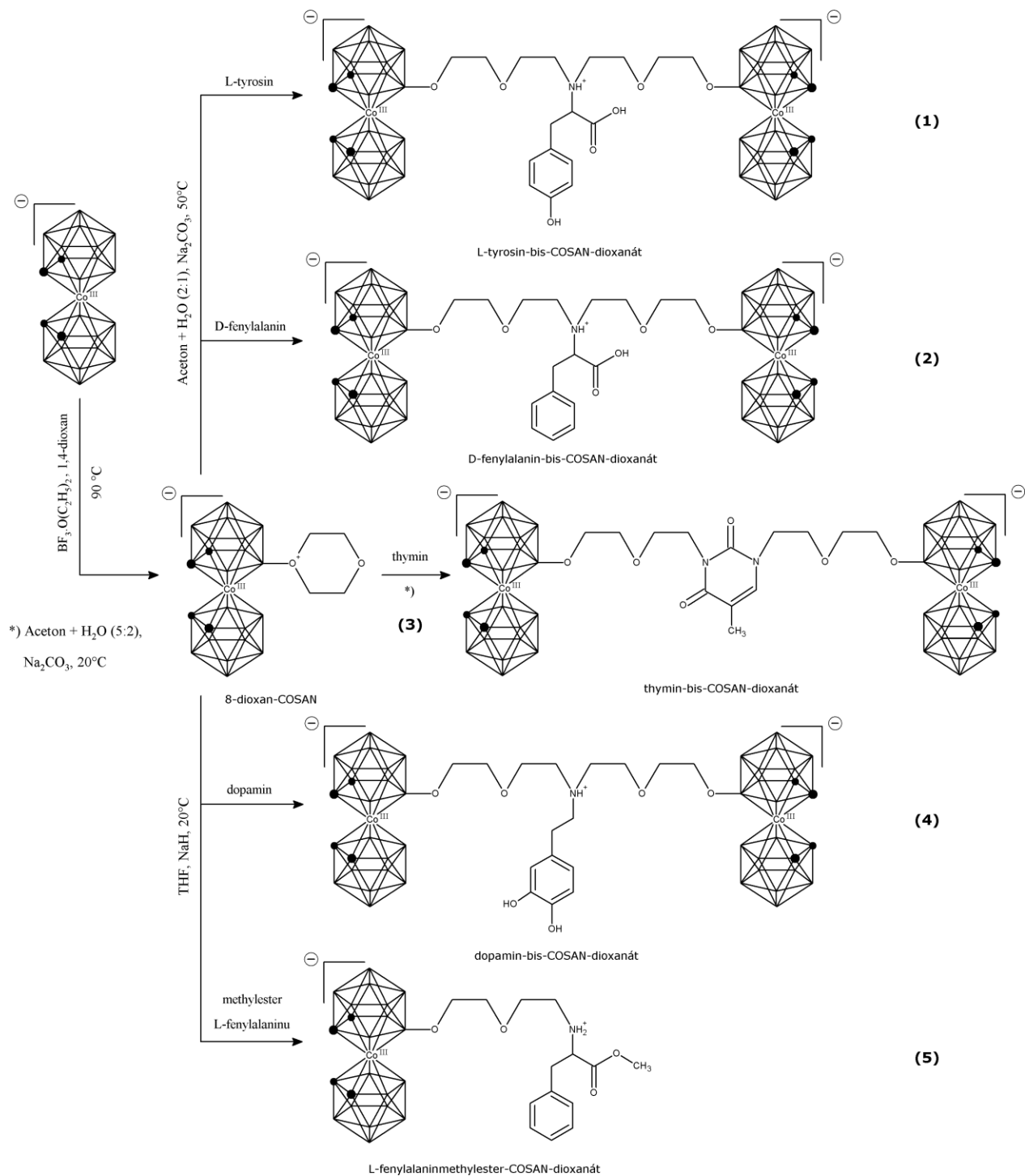
**(5) L-fenylalaninmethylester-COSAN-dioxanát (GB-269)** - [8-(5-pentoxy-1-oxy)-(1',2'-kloso-dikarba undekahydridoundekaboran)-komo-3,3'-kobalt-(1,2-kloso-dikarbadekahydridoundekabor)]-N-(2-amino-3-fenyl-1-methoxy-propan-(1-)-át, sodný dihydrát

Výtěžek: 21 mg (7,1%), TLC: (DCM)  $R_f = 0$ ; (ANI)  $R_f = 0,38$ , NMR:  $\delta_B$ /ppm: 24.23 singlet (1B, B-O);  $\delta_H$ /ppm: 7.38-7.28 překrývající se dublety intenzit 2:1:2 (5H,  $C_6H_5$ ); 4.30 triplet (2H,  $CH_2$ ), 3.39 kvartet (1H,  $CHN$ ), 1.10 singlet (3H,  $CH_3O$ );  $\delta_C$ /ppm: 130.36 singlet (1C,  $COO$ ) (viz příloha 15); MS ESI:  $mz^{-1} = 575,56$  ( $M^+$ , 100%), vypočteno 575,40 (viz příloha 8)

Nepodařilo se nalézt syntetickou cestu k vytvoření derivátu methylesteru fenylalaninu s motivem *dvou* kobalt bis (dikarbolidových) jednotek svázaných přes terciární aminoskupinu i přes použití silnějšího deprotonizačního činidla NaH. Důvodem je (a) sterická zábrana vazby druhé podjednotky vlivem přidaného methylu (b) elektronový pár, který by na hydroxylovém kyslíku karboxy-skupiny po deprotonizaci zůstal, je po esterifikaci sdílen s methylem. Příčinou zřejmě je, že elektronegativnější atom kyslíku odebírá elektrony ze zbytku molekuly – i z aminoskupiny, která tak může být jenom sekundární (viz schéma 5-2).



**Schéma 5-2.** Srovnání fenylalaninu a jeho methylesteru z hlediska polaroty vazby mezi kyslíkem a methylem resp. vodíkem. Vyšší rozdíl elektronegativity u vodíku zapříčiňuje zvýšenou polaritu vazby. Vodíkový kation se tak může v zásaditém prostředí odštěpit a přenechat elektron kyslíku, čímž sníží negativní indukční efekt hydroxylového kyslíku na zbytek molekuly. Toto pevně kovalentně vázaná alifatická skupina methylu neumožňuje.



**Schéma 5-3.** Přehledné schéma syntézy jednotlivých derivátů připravených v rámci této práce rozlišující prostředí (THF / aceton + voda, teplota). Nezahrnuje dílčí kroky jednotlivých syntéz.

## 5.1. Výsledky inhibice HIV-1 PR

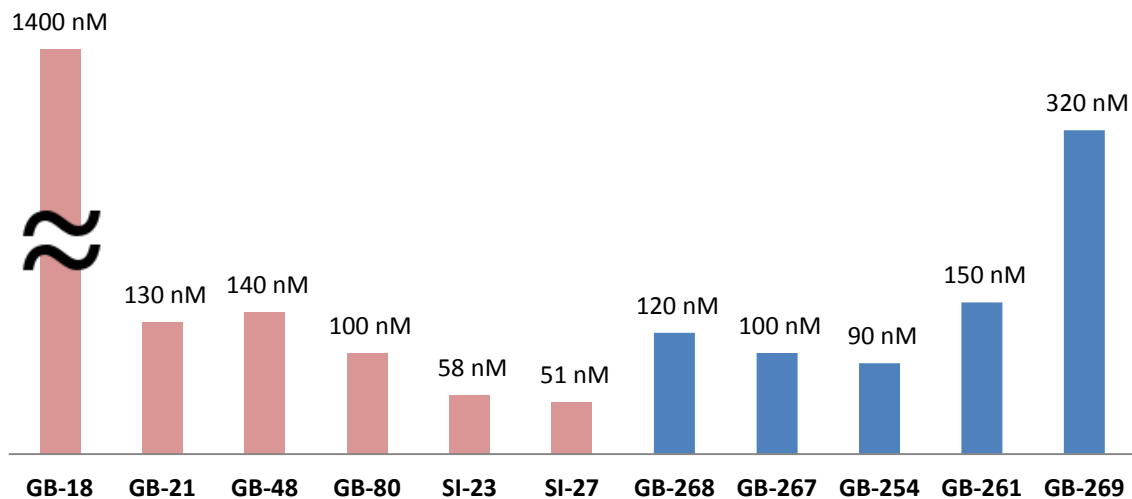
Vybrané látky byly převedeny na draselné, nebo sodné soli, kvůli využitelné rozpustnosti ve vodném prostředí vhodném pro testy na izolované HIV-1 PR. Látky byly předány k spektrofotometrickému studiu inhibice štěpení chromogenního substrátu izolovanou rekombinantní wild-type HIV-1 PR *in vitro* a určení inhibičních konstant  $IC_{50}$ . Testy byly provedeny na oddělení biochemie patogenních proteas ÚChB AV ČR, vedeném doc. RNDr. Janem Konvalinkou, CSc. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.1-1.

Studium inhibice HIV-1 PR probíhalo typicky v prostředí 1 ml 0,1 M roztoku octanu sodného jako pufru (pH 4,7), 0,3 M NaCl a 4 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Koncentrace substrátu – oligopeptidu LysAlaArgValNle\*NphGluAlaNle-NH<sub>2</sub>, kde hvězdička značí místo štěpení - se blížila  $K_m$  HIV-1 PR. Bylo přidáno 8 – 10 pmol wild-type HIV-1 PR a roztok zkoumané látky v DMSO (dimethylsulfoxid) s proměnnou koncentrací. Koncentrace HIV-1 PR zůstávala v průběhu experimentu konstantní. Podíl DMSO nepřekračoval 2,5% objemu.

Hydrolyza substrátu byla sledována jako pokles absorbance při vlnové délce 305 nm. Spektrofotometrické šetření bylo provedeno s použitím přístroje UNICAM UV500 (Thermo Spectronic). Získaná data byla zpracována použitím Williams-Morrisonovy rovnice pro reverzibilní kompetitivní inhibici.

Kód	Název aniontu	Sumární vzorec	$M_m$	$IC_{50}$
<b>GB-268</b>	L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanát <i>diCOSDIOX-L-tyrosin</i>	<b>(1)</b> Na <sub>3</sub> [B <sub>36</sub> Co <sub>2</sub> C <sub>25</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>7</sub> ] . 6 H <sub>2</sub> O	1176,74	120 nM
<b>GB-267</b>	D-fenylalanin-bis-COSAN-dioxanát <i>diCOSDIOX-D-fenylalanin</i>	<b>(2)</b> Na <sub>3</sub> [B <sub>36</sub> Co <sub>2</sub> C <sub>25</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>6</sub> ] . 6 H <sub>2</sub> O	1160,74	100 nM
<b>GB-254</b>	thymín-bis-COSAN-dioxanát <i>diCOSDIOX-thymín</i>	<b>(3)</b> K[B <sub>36</sub> Co <sub>2</sub> C <sub>21</sub> H <sub>61</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ]	984,65	90 nM
<b>GB-261</b>	dopamin-bis-COSAN-dioxanát <i>diCOSDIOX-dopamin</i>	<b>(4)</b> K[B <sub>36</sub> Co <sub>2</sub> C <sub>24</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>6</sub> ]	1011,69	150 nM
<b>GB-269</b>	L-fenylalaninmethylester-COSAN-dioxanát <i>COSDIOX-L-fenylalanin methylester</i>	<b>(5)</b> Na[B <sub>18</sub> CoC <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> H <sub>40</sub> ] . 2 H <sub>2</sub> O	636,43	320 nM

**Tab. 5.1-1.** Výsledky spektrofotometrického zkoumání inhibice štěpení chromogenního substrátu izolovanou rekombinantní wild-type HIV-1 PR. Čísla v druhém sloupci napravo odpovídají označení ve schématu 5-3. Hodnoty  $IC_{50}$  jsou uváděny s přesností  $\pm 10$  nM.

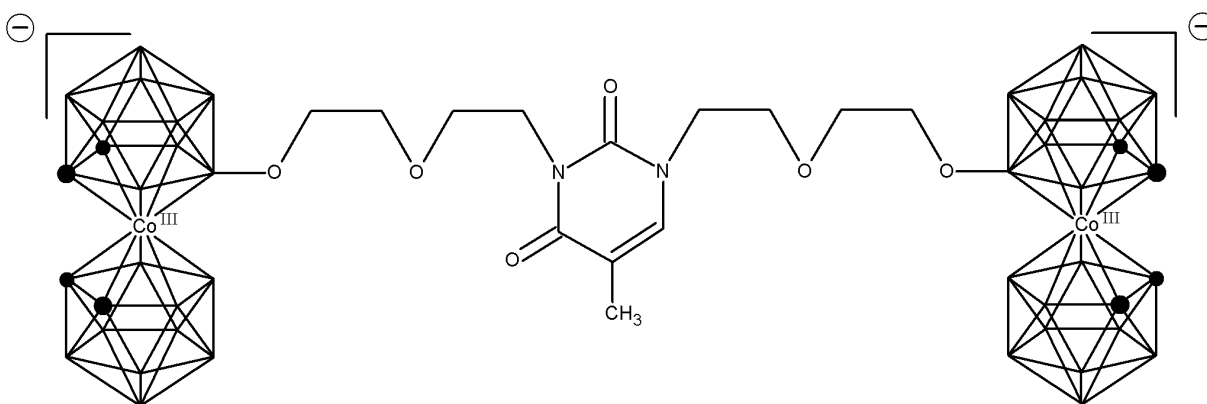


Inhibitor	IC <sub>50</sub> [nM]	K <sub>i</sub> [nM]
saquinavir	-	0,04 ± 0,01
indinavir	-	0,12 ± 0,02
nelfinavir	-	0,07 ± 0,01
lopinavir	-	0,018 ± 0,009
amprenavir	-	0,18 ± 0,02
atazanavir	-	0,024 ± 0,005
GB-18	1400	66 ± 30
GB-21	130	20 ± 5
GB-48	140	2,2 ± 1,2
GB-80	100	4,9 ± 2,1
SI-23	58	-
SI-27	51	-
GB-268	(1) 120	-
GB-267	(2) 100	-
GB-254	(3) 90	-
GB-261	(4) 150	-
GB-269	(5) 320	-

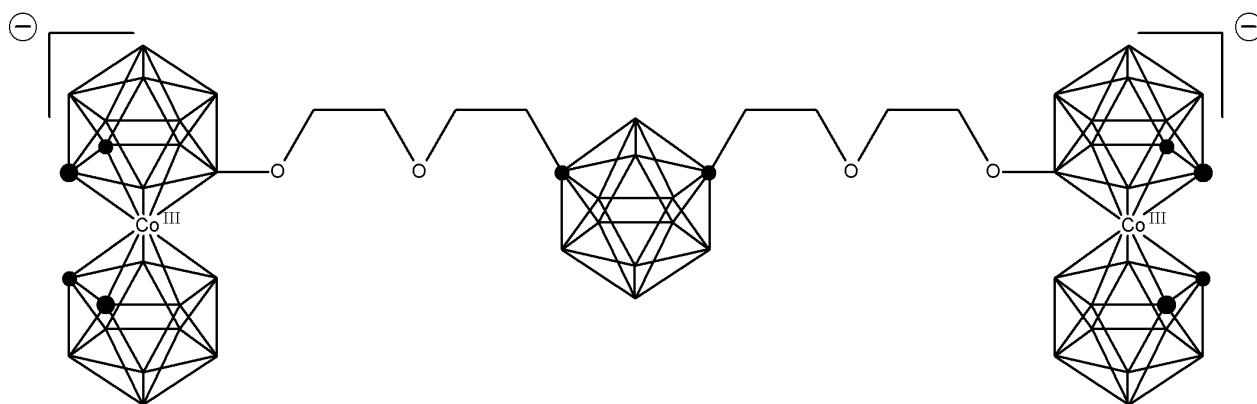
**Tab. 5.1-2.** Srovnání naměřených hodnot IC<sub>50</sub> s publikovanými metallakarbonovými PI ve formě tabulky a grafu. Publikované inhibitory, u kterých byl určen K<sub>i</sub>, jsou srovnány s vybranými PI používanými v klinické praxi. Zdroj dat: (10), (103)

## 6. Závěr a diskuze

Jako částečně úspěšná se ukázala predikce parametrů jednotlivých centrálních funkčních skupin z hlediska polarity. Karboranový derivát thyminu se dvěma oxo-skupinami se ukázal být podobně účinným jako jeho analog SI-27 se zabudovaným C<sub>2</sub>C<sub>4</sub> substituovaným 1,7-*kloso*-dikarbadodekaboranem (viz schéma 6-1).<sup>(103)</sup> Analog měl oproti syntetizovanému thymin-bis-COSAN-dioxanu o 39 nM nižší hodnotu IC<sub>50</sub>, což můžeme vysvětlit absencí alifatického methylu a vyšším nábojem centrálního karboranového klastru, který tak má vyšší afinitu k HIV-1 PR.



thymin-bis-COSAN-dioxanát (90 nM.ml<sup>-1</sup>)

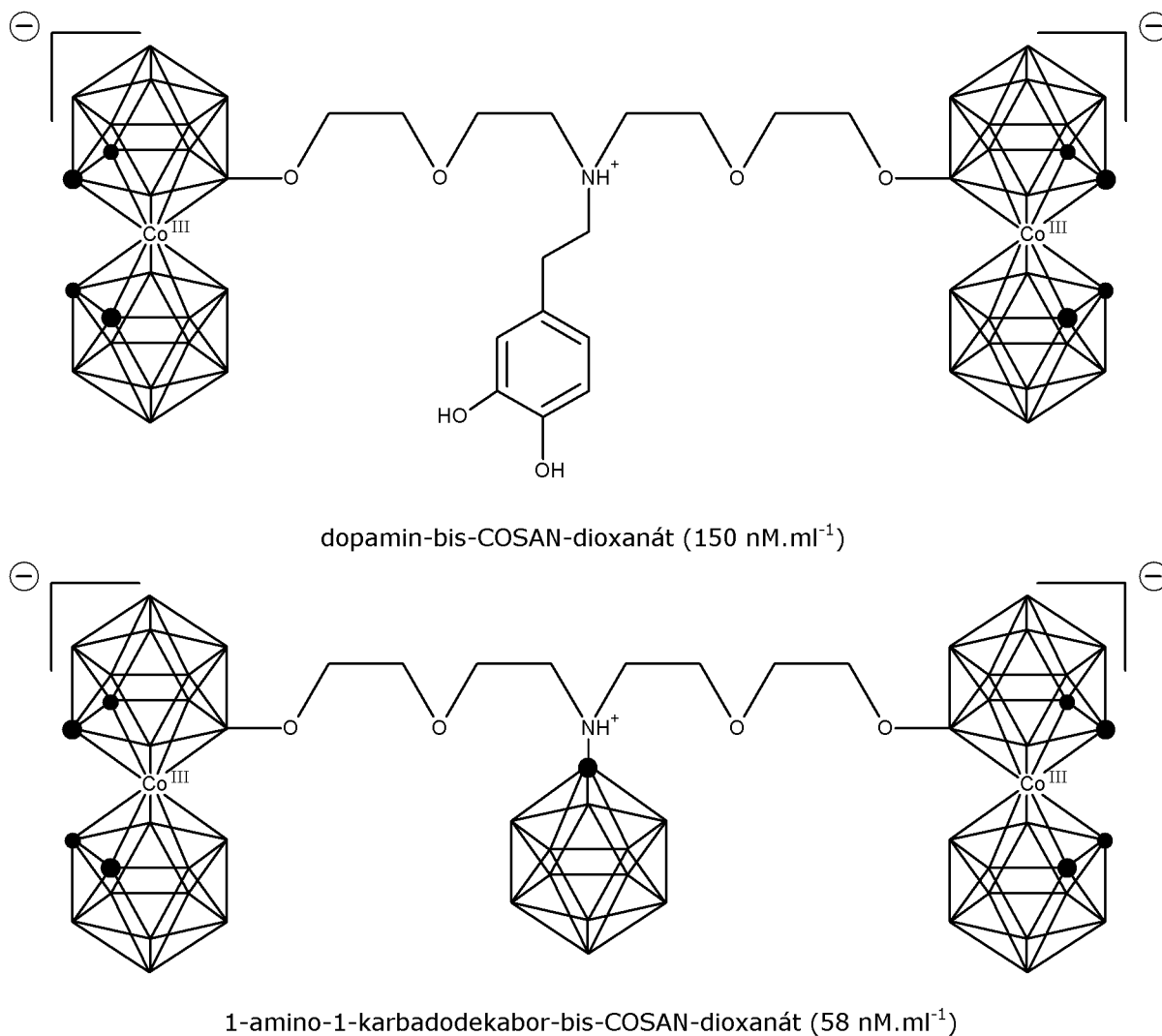


1,7-dikarbadodekabor-bis-COSAN-dioxanát (51 nM.ml<sup>-1</sup>)

**Schéma 6-1.** Porovnání hybridního derivátu thymin-bis-COSAN-dioxanátu (GB-254, 3) a abiotického 1,7-dikarbadodekabor-bis-COSAN-dioxanátu (SI-27). Srovnáno v tabulce 5.1-2.

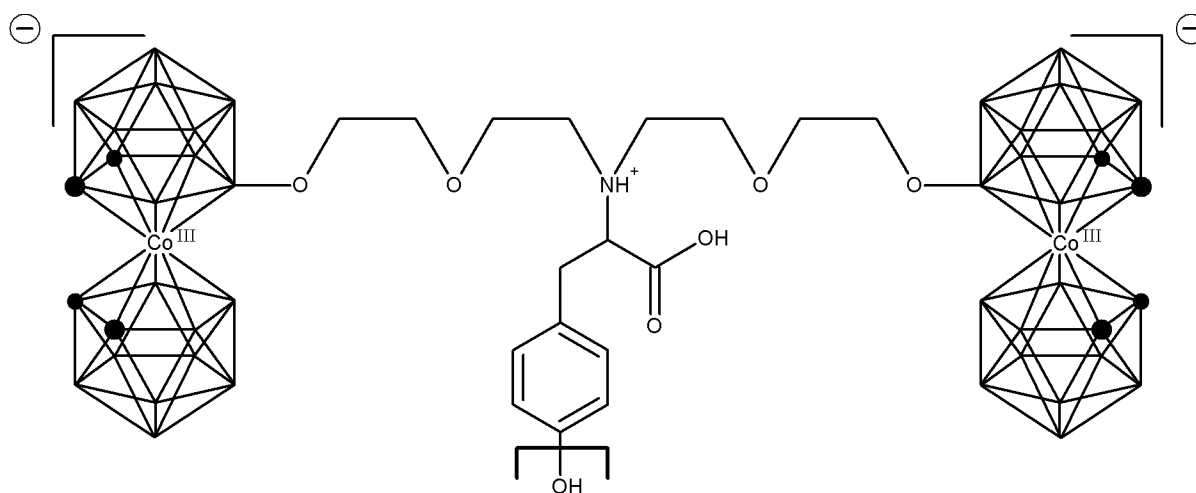
Naopak zklamáním byla nízká účinnost dopaminového derivátu, přestože jsou hydroxy-skupiny považovány za klíčové k vytváření vodíkových vazeb k aktivnímu centru enzymu.<sup>(132)</sup>

V případě dopamin-bis-COSAN-dioxanátu byla očekávána podobná účinnost jako u abiotického derivátu SI-23 1-amino-1-*kloso*-karbadodekabor-bis-COSAN-dioxanátu (viz schéma 6-2). Zde však byl  $\Delta IC_{50} = 92 \text{ nM}$ , což může být vysvětleno delším alifatickým řetězcem, který se oproti předpokladům v oddíle 3.2.2 ukázal být spíše faktorem negativně ovlivňujícím schopnost inhibovat HIV-1 PR.



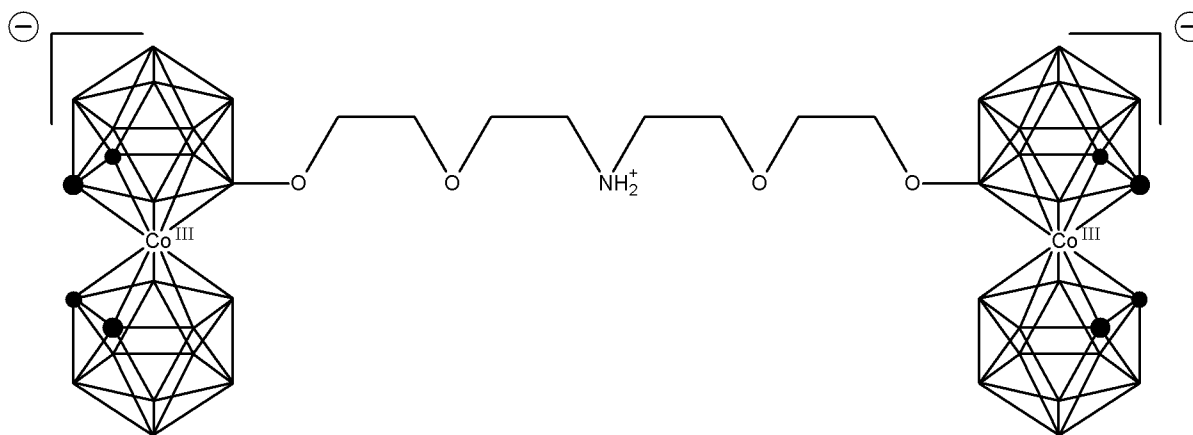
**Schéma 6-2.** Porovnání hybridního derivátu dopamin-bis-COSAN-dioxanátu (GB-261, 4) a abiotického 1-amino-1-karbadodekabor-bis-COSAN-dioxanátu (SI-23). Srovnáno v tabulce 5.1-2.

*Para*-hydroxylová skupina na benzenovém kruhu L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanátu se ukázala být oproti D-fenylalaninovému derivátu negativním faktorem, neuvažujeme-li možný vliv optické izomerie. Oba deriváty však oproti očekávání měly obdobné hodnoty  $IC_{50}$  jako již publikovaný abiotický derivát GB-80 tvořený dvěma jednotkami 8-dioxan-COSANu spojenými pouhou sekundární aminoskupinou (viz schéma 6-3). L-tyrosinový derivát vykazoval dokonce  $IC_{50}$  o 20nM vyšší. Celkově se tak substituce centrální aminoskupiny zvolenými organickými molekulami ukázala být spíše kontraproduktivní.



D-fenylalanin-bis-COSAN-dioxanát ( $100 \text{ nM} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

[ L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanát ( $120 \text{ nM} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) ]

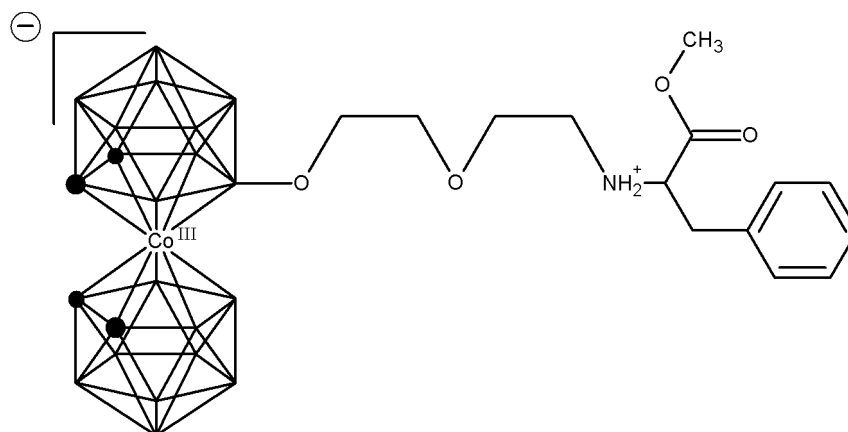


amin-bis-COSAN-dioxanát ( $100 \text{ nM} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

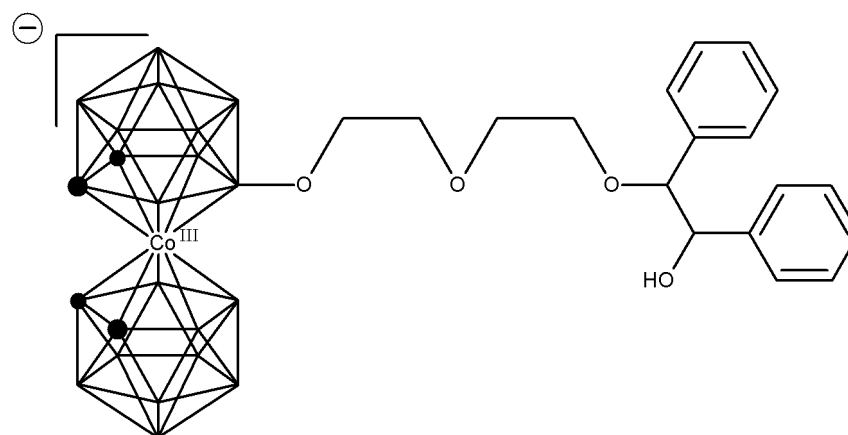
**Schéma 6-3.** Porovnání hybridních derivátů D-fenylalanin-bis-COSAN-dioxanátu (GB-267, 2) a L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanátu (GB-268, 1) a abiotického derivátu amino-bis-COSAN-dioxanátu (GB-268). Srovnáno v tabulce 5.1-2.



Samostatnou kapitolou je derivát methylesteru L-fenylalaninu, který byl zařazen do výsledků, ačkoli se jedná o pouhý monomer. Funkčně, ne však účinností ( $\Delta IC_{50} = 190 \text{ nM}$ ) lze L-fenylalaninmethylester-bis-COSAN-diofanát připodobnit k abiotickému derivátu GB-21 – 1,2-difenylethan-1,2-diol-COSAN-diofanátu (viz schéma 6-5). Zde je rozdíl velmi výrazný, neboť derivát GB-21 např. postrádá karboxylovou skupinu, je vázáný jako alkoholát a nikoli přes amino-skupinu, disponuje dvěma benzenovými kruhy a další.



L-fenylalaninmethylester-COSAN-diofanát ( $320 \text{ nM} \cdot \text{ml}^{-1}$ )



1,2-difenylethan-1,2-diol-COSAN-diofanát ( $130 \text{ nM} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

**Schéma 6-4.** Porovnání hybridního derivátu L-fenylalaninmethylester-COSAN-diofanátu (GB-269, 5) a analogického abiotického derivátu 1,2-difenylethan-1,2-diol-COSAN-diofanátu (GB-21). Srovnáno v tabulce 5.1-2.

Předpoklady shrnuté v části 3.2.2. se ukázaly být z velké části nepravdivé. (1) Derivát s centrální skupinou thyminu byl i přes vazbu přes dva heterocyklické atomy dusíku účinnější než ostatní připravené metallakarboranové PI. (2) Deriváty se zabudovanou polární centrální skupinou obecně nevykazovaly nižší hodnoty  $IC_{50}$  než deriváty s nepolární centrální skupinou. Toto lze pozorovat např. u L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanátu v porovnání s fenylalaninovým derivátem. Výjimkou byl thyminový derivát se dvěma zabudovanými oxo-skupinami. (3) Stupeň hydroxylace se neukázal být pozitivním faktorem pro účinnost syntetizovaného PI. Dopaminový derivát vykazoval vyšší hodnoty  $IC_{50}$  než L-tyrosinový derivát. L-tyrosinový derivát vykazoval vyšší hodnoty  $IC_{50}$  než fenylalaninový derivát. (4) Absence alifatického řetězce se neukázala jako negativní faktor z hlediska účinnosti inhibitoru. Thyminový derivát měl nižší hodnoty  $IC_{50}$  než ostatní připravené metallakarboranové PI.

Celkově nízké procentuální výtěžky (průměrný výtěžek 10,6%) lze zdůvodnit absencí ochrany jednotlivých nukleofilních funkčních skupin substituovaných molekul v průběhu syntéz a zvýšenými požadavky na čistotu látek k provedení biochemických testů. Během purifikace produktů bohužel také dochází k velkým ztrátám, zejména při chromatografických izolacích.

Syntetizované metallakarboranové inhibitory HIV-1 PR vykazovaly uspokojivé hodnoty  $IC_{50}$  ve srovnání s ostatními PI syntetizovanými na ÚACh, stále však nedosáhly hodnot  $IC_{50}$  klinicky používaných PI, mezi nimiž jsou stále rozdíly několika řádů (viz tabulka 5.1-2). To co však metallakarboranové inhibitory ztrácí v hrubé účinnosti, vynahrazují svými velmi pozitivními vlastnostmi ovlivňujícími jejich biologickou dostupnost.

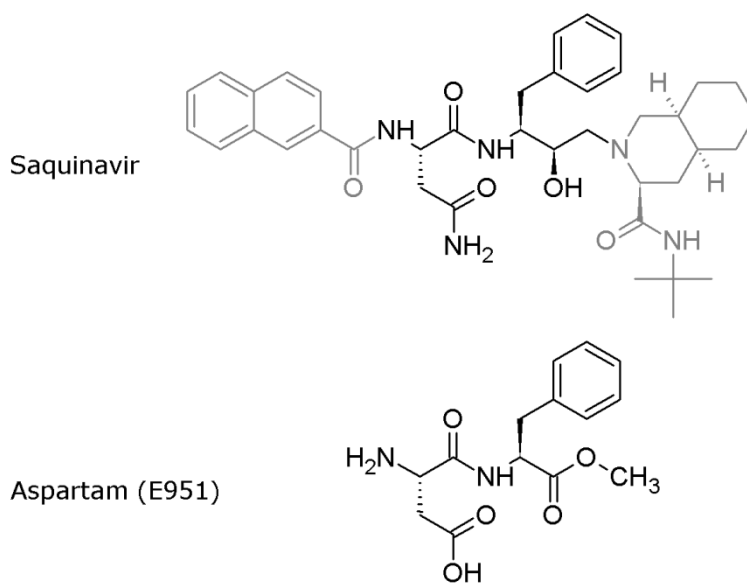
Největším problémem dnešního terapeutického konceptu léčby AIDS HAART je zejména ustanovení virových rezervoárů<sup>(133)</sup>, v nichž pak virus přečkává dobu léčby v lyzogenním cyklu, dokud není obnoven lytický cyklus např. zvýšením hladin NF- $\kappa$ B<sup>(50)</sup>. Tyto rezervoáry jsou místa obsahující buňky s receptory kompatibilními např. s virovým ligandem gp120. Jsou to zejména paměťové T-lymfocyty s kompatibilními receptory v mízních uzlinách<sup>(133)</sup> a mikroglie s  $\beta$ -chemokinovými receptory CCR5 v cerebrospinální oblasti,<sup>(134)</sup> dále pak např. buňky kostní dřeně, genitální oblast u mužů a sliny.<sup>(135)</sup>

Mikroglie v oblasti CNS jsou chráněny hematoencefalickou bariérou, přes kterou pronikají stávající inhibitory velmi nesnadno,<sup>(136)</sup> ne tak jako dnes již klinicky používané BNCT agens založené na karboranových klastrech<sup>(115)</sup> podobně jako inhibitory HIV-1 PR syntetizované v rámci této práce. Toto nám dává potenciální možnost eradikace virionů i uvnitř cerebrospinálního rezervoáru.

Metallakarboranové deriváty byly v minulosti podrobeny důkladnému výzkumu v oblasti neutronové záchytové terapie (NCT) nádorových onemocnění. Při použití  $^{10}\text{B}$  klastrů při syntéze inhibitorů HIV-1 PR

by bylo možno podobný koncept aplikovat i na lymfatické rezervoáry infekce. Dosah záření a oxidativního stresu produkovaného rozpadem  $^{10}\text{B} + n^0 \rightarrow ^7\text{Li} + \alpha + \text{E}$  je 4-9  $\mu\text{m}$ <sup>(137)</sup> a velikost paměťových T-lymfocytů v mízních uzlinách je 8-10  $\mu\text{m}$ <sup>(138)</sup>, což by nám dávalo možnost selektivně ničit napadené buňky nedosažitelné standardní terapií. Otázkou zůstává, zda by bylo možné vystavit pacienta přibližně 450 *radičním terapiím* k ozáření každé lymfatické uzliny. Relevantní výzkum léčby HIV pomocí BNCT není v dnešní době dostupný a pravděpodobně neexistuje.

Poznatky získané z průběhu jednotlivých syntéz budou využity k návrhu a realizaci syntézy složitějších molekul PI. Tyto molekuly by měly nést dipeptidickou centrální skupinu Phe-Pro, nebo Tyr-Pro.<sup>(119)</sup> Problémem je však vysoká cena dipeptidů, vyplývající ze složitosti jejich přípravy.<sup>(139)</sup> Řešením je využití alternativního zdroje isosterů hydroxyethylaminu, průmyslově nejrozšířenějšího dipeptidu využívaného v potravinářství – aspartamu (E951). Aspartam je stericky velmi podobný centrální skupině saquinaviru (viz schéma 6-5). Toto bude předmětem další práce.



**Schéma 6-5.** Srovnání sterické podobnosti molekuly aspartamu s centrální skupinou PI Saquinaviru.

## 7. Seznam použitých zkratk

HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti	AIDS	syndrom získaného selhání imunity
COSAN	cobaltacarborane sandwich anion kobaltokarboranový sendvičový anion	HAART	highly active antiretroviral therapy vysoce aktivní antiretrovirální terapie
HIV-1 PR	HIV-1 proteasa	NMR	nukleární magnetická rezonance
Nef	negative regulatory factor negativní regulační faktor	TLC	tenkovrstevná chromatografie
Gag	group-specific antigen skupinově specifický antigen	DCM	dichlormethan
Pol	polymerase proteins, polymerasové proteiny	ACN	acetonitril
Env	envelope, obal	THF	tetrahydrofuran
Rev	regulator of virion expression regulátor exprese virionu	ss cDNA	single strand complementary DNA jednořetězcová komplementární DNA
NNRTI	ne-nukleosidový inhibitor reverzní transkriptasy	CNS	centrální nervová soustava
NRTI / NtRTI	nukleosidový / nukleotidový inhibitor reverzní transkriptasy	p.d.u.	procedure defined unit <sup>(140)</sup> jednotka definovaná pro zařízení
CDC	Centers for Disease Control and Prevention Centrum pro kontrolu nemocí a prevenci	IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
PTFE	polytetrafluoroethylen, teflon	MS ESI	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
COSY	korelační spektroskopie	ANI	aniontová směs chloroform + ACN 2:1
FID	free induction decay	RDS	rentgenová difrakční spektroskopie
		BNCT	borová neutronová záchyťová terapie
		ASTM	standard velikosti částic <sup>(141)</sup>
		CYP3A4	isoforma 3A4 komplexu enzymu Cytochromu P450
		ppm	parts per million, části z milionu

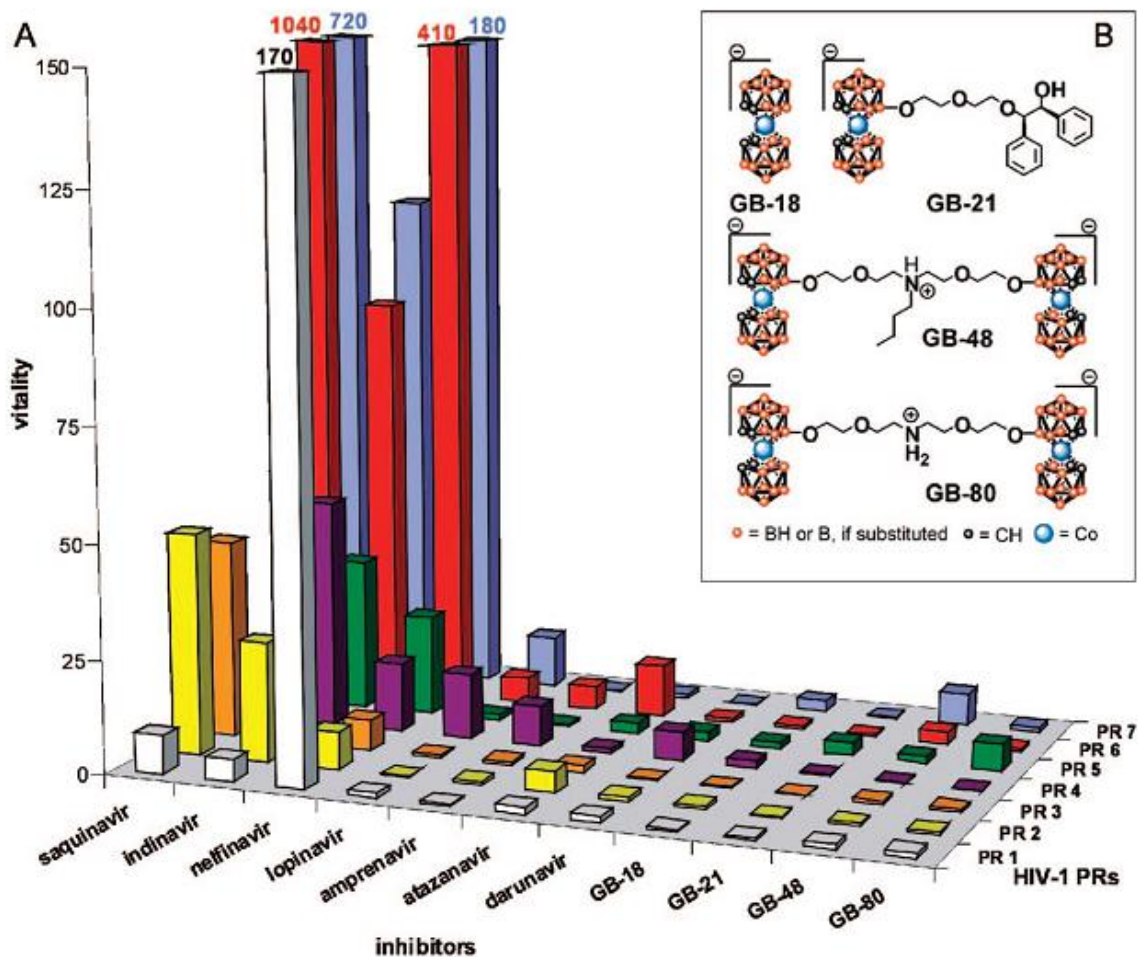
Karboranové klastry nemají ve strukturních vzorcích z praktických důvodů zobrazeny atomy boru a atomy uhlíku jsou vyznačeny kuličkou. Ke každému atomu klastru kromě centrálního atomu kobaltu je vázán hydridický vodík a na pozici 8 je na jeho místo připojován ligand.

V tomto textu se vyskytují označení aminokyselinových zbytků pomocí zkratk (viz tab. 7-1). Pokud není uvedeno jinak, pak označení ve tvaru AxB (např. V32I) znamená bodovou mutaci na pozici x za změny aminokyselinového zbytku A v řetězci na B. Označení zbytku má tvar AbcX (např. Ile47), kde Abc je třípísmenná zkratka a X označuje pozici zbytku.

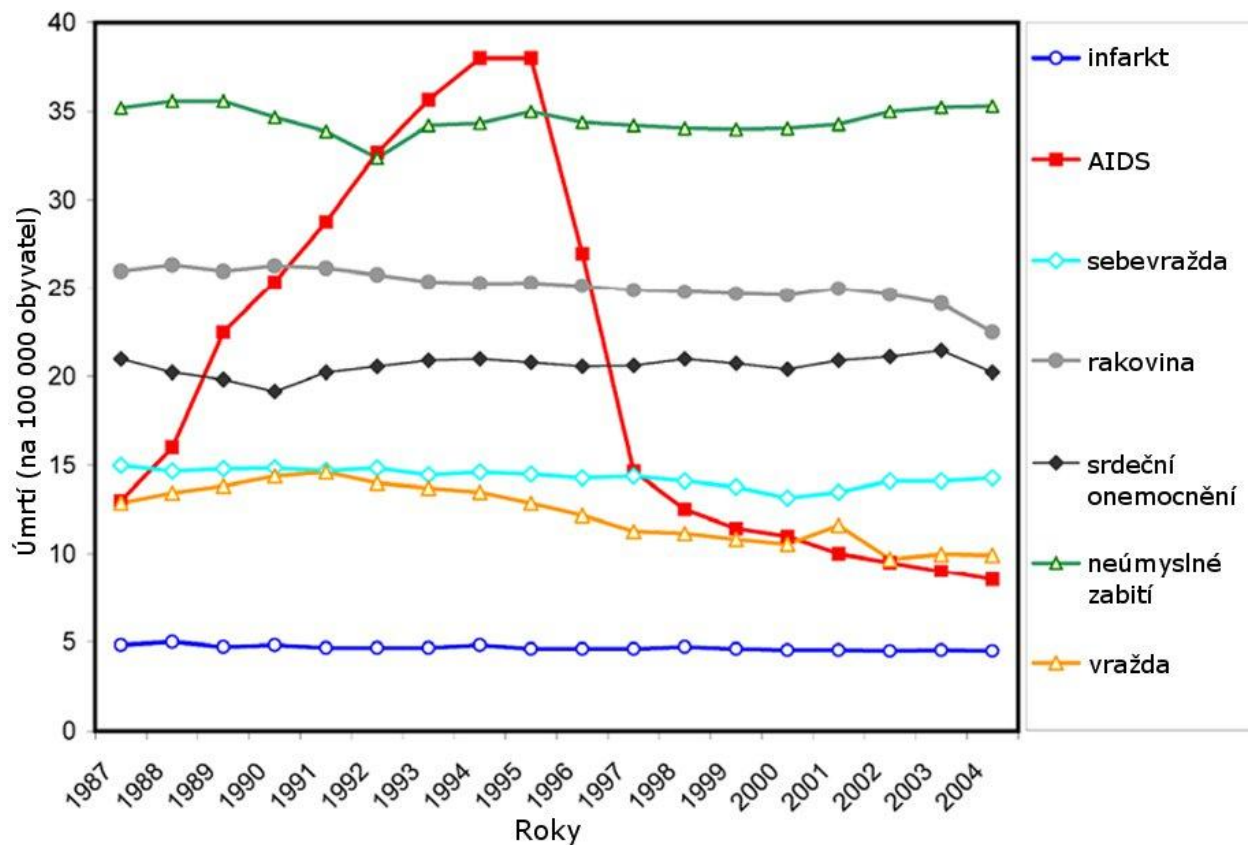
Ala	A	alanin	Gly	G	glycin	Pro	P	prolin
Arg	R	arginin	His	H	histidin	Ser	S	serin
Asn	N	asparagin	Ile	I	isoleucin	Thr	T	threonin
Asp	D	kyselina asparagová	Leu	L	leucin	Trp	W	tryptofan
Cys	C	cystein	Lys	K	lysin	Tyr	Y	tyrosin
Gln	Q	glutamin	Met	M	methionin	Val	V	valin
Glu	E	kyselina glutamová	Phe	F	fenylalanin	Sec	U	selenocystein
Nle	-	norleucin	Nph	-	para-nitrofenylalanin			

**Tab. 7-1.** Seznam 21 lidských proteinogenních aminokyselin s odpovídajícími zkratkami.<sup>(120)</sup> Přirozeně se nevyskytující Nle a Nph byly použity při biochemických studiích

## 8. Přílohy



**Příloha 1.** Srovnání hodnot vitality sedmi klinických inhibitorů a čtyř metallakarboranových inhibitorů. GB-18 je samotný COSAN, jeho vazba na molekulu enzymu je znázorněna na obr. 1-2. Vitalita je definována jako  $v = (K_i k_{cat} / K_m)_{MUT} / (K_i k_{cat} / K_m)_{WT}$ , kde index MUT označuje soubor hodnot  $K_i$ ,  $k_{cat}$  a  $K_m$  pro daný inhibitor a *zmutovanou* variantu proteinu a index WT označuje tzv. wild-type variantu proteinu bez mutací. Mutace: PR1: D30N/N88D; PR2: M46I/A71V/V82T/I84V; PR3: A71V/V82T/I84V; PR4: V32I/I47A; PR5: L10I/I15V/E35D/N37S/R41K/I62V/L63P/A71V/G73S/L90M; PR6: L10I/L24I/L33F/M46L/I54V/L63P/A71V/V82A/I84V; PR7: L10F/L19I/K20R/L33F/E35D/M36I/R41K/F53L/E54V/L63P/H69K/A71V/T74P/I84V/L89M/L90M/I93L; Převezato s laskavým dovolením z práce Petr Cígler, Milan Kožíšek, Pavlína Řezáčová et al.; From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: Metallacarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease; 15395 – Table 1., PNAS, October 25, 2005, vol. 102, no. 43

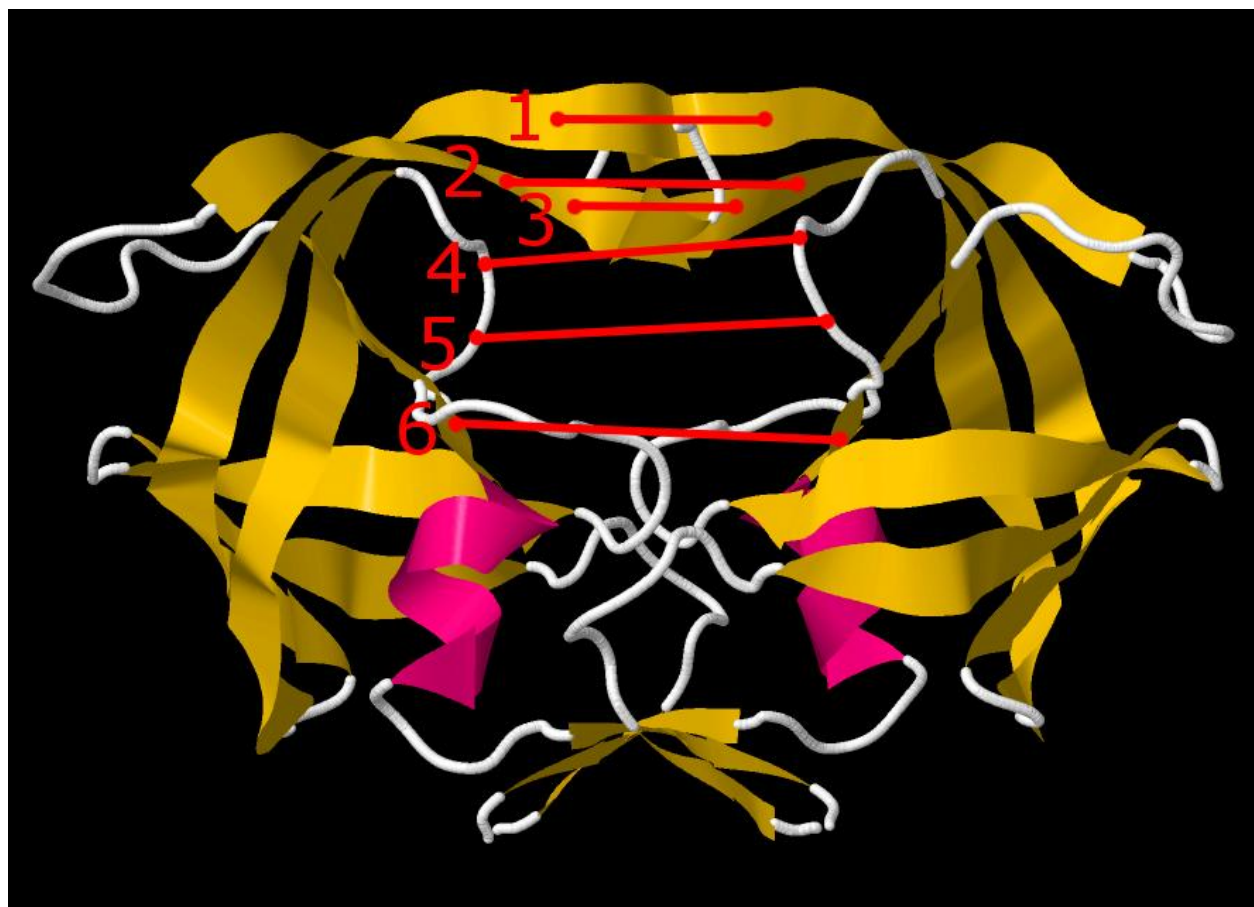


**Příloha 2.** Mortalita a dle příčin pro lidi mezi lety 25 až 44 v USA dle národních statistik natality a mortality CDC. Převzato s úpravami z práce Jana Pokorná, Ladislav Machala, Pavlína Řezáčová, et al. Current and Novel Inhibitors of HIV Protease, 1, Viruses, 2009

Kategorie	Název léčiva	Mechanismus působení	
Inhibitory vstupu	enfuvirtid	gp41 nepronikne plazmalemou	
	maraviroc	blokace gp120 vazbou na CCR5	
Inhibitory reverzní transkriptasy	NRTI	emtricitabin	analog cytidinu
		lamivudin	
		zalcitabin	
		didanosin	analog adenosinu
		abacavir	analog guanosinu
		zidovudin	analog thymidinu
		stavudin	
		tenofovir	analog adeninu
	NNRTI	efavirenz	vazba na hydrofobní kavitu podjednotky p66 reverzní transkriptasy
		nevirapin	
		delavirdin	
		etravirin	
		rilpivirin	
Inhibitory integrasy	raltegravir	inhibice virové integrasy	
Inhibitory proteasy	amprenavir	inhibice virové proteasy	
	tipranavir		
	indinavir		
	saquinavir		
	lopinavir		
	fosamprenavir		
	ritonavir		
	darunavir		
	atazanavir		
	nelfinavir		

**Příloha 3.** Přehled 27 důležitých účinných látek v boji proti HIV používaných v klinické praxi <sup>5</sup>, jejich dělení do jednotlivých kategorií a popisu mechanismu účinku.

<sup>5</sup> Jedná se o účinné látky schválené americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v době psaní této práce (53).

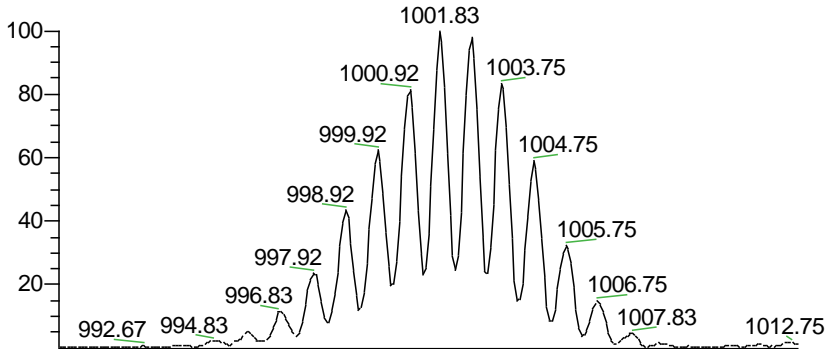


**Příloha 4.** Označení pozic (mód geometrický střed zbytku) jednotlivých odpovídajících aminokyselinových zbytků, na které je vázána COSANová podjednotka inhibitoru. 1 - Ile54-154, 2 - Ile47-147, 3 - Gly48-148, 4 - Pro81-181, 5 - Val82-182, 6 - Ile84-184. Krystalografická data získána z databáze Proteopedia.org<sup>(116)</sup>, zpracováno v programu Jmol v. 13.0.10<sup>6</sup>.

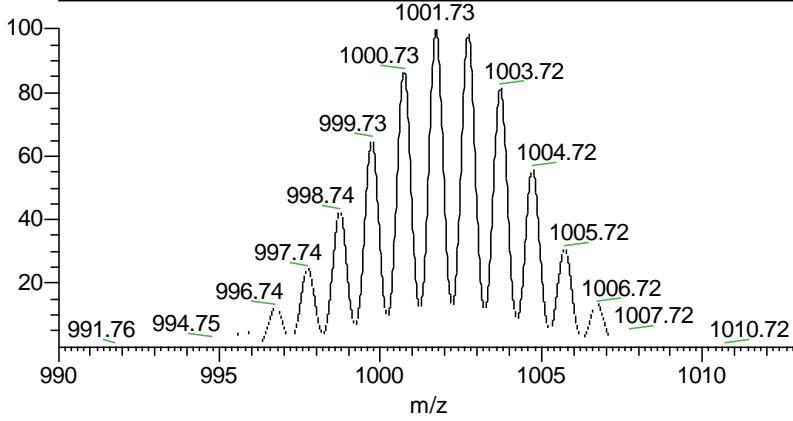
---

<sup>6</sup> Krystalografická data byla upravena, původně zachycuje vazbu HIV-1 Pr na saquinavir a nejedná se o wild-type nýbrž o mutant V82A.

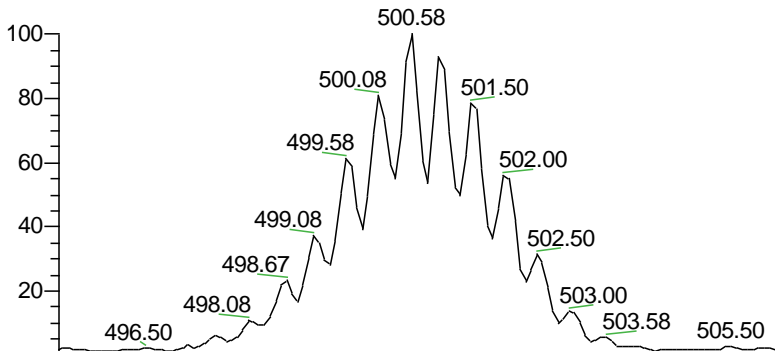




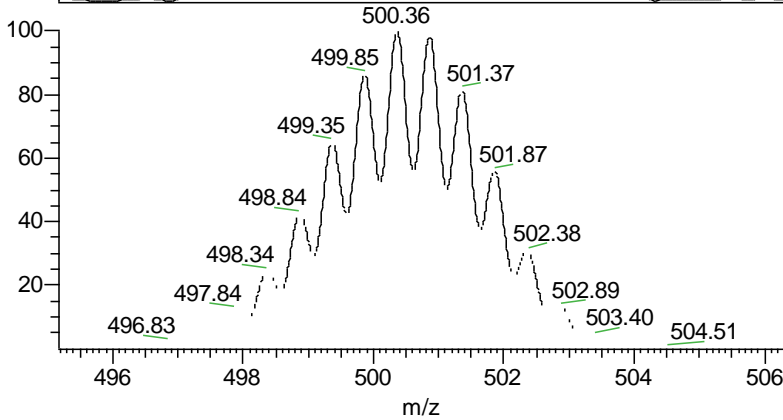
NL:  
7.47E3  
ESI\_RK2\_RC\_FR2\_13030  
4130450#1-26 RT:  
0.00-0.31 AV: 26 T: ITMS -  
p ESI Full ms  
[50.00-2000.00]



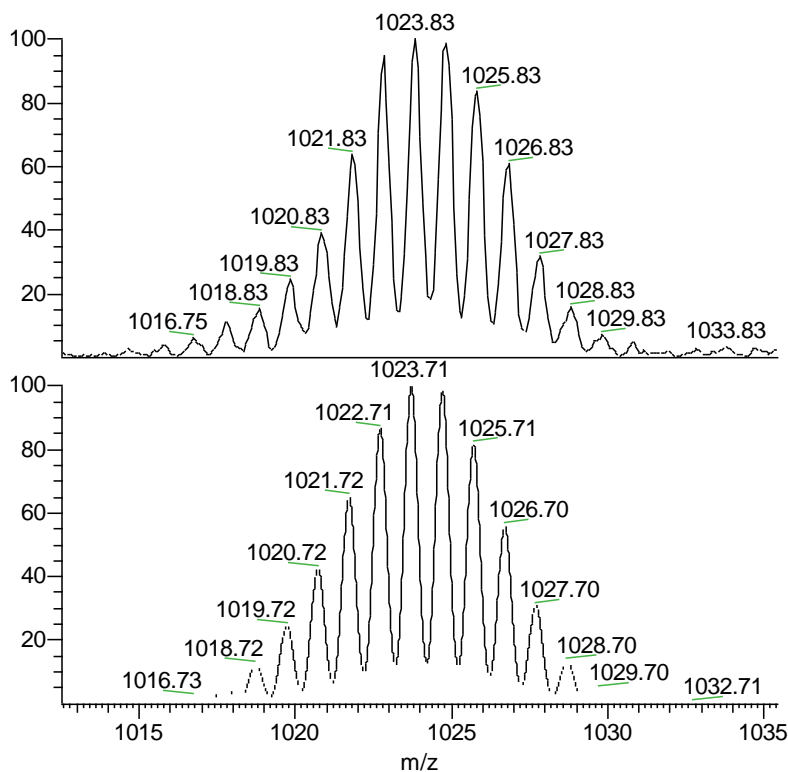
NL:  
3.74E3  
B<sub>36</sub>Co<sub>2</sub>C<sub>25</sub>NO<sub>7</sub>H<sub>68</sub>:  
B<sub>36</sub>Co<sub>2</sub>C<sub>25</sub>N<sub>1</sub>O<sub>7</sub>H<sub>68</sub>  
p (gss, s /p:40) Chrg 1  
R: 0.5 Da @FWHM



NL:  
1.33E4  
ESI\_RK\_RK2Fr2\_Nnorm\_13  
0207130650#1-26 RT:  
0.00-0.31 AV: 26 T: ITMS -  
p ESI Full ms  
[50.00-2000.00]



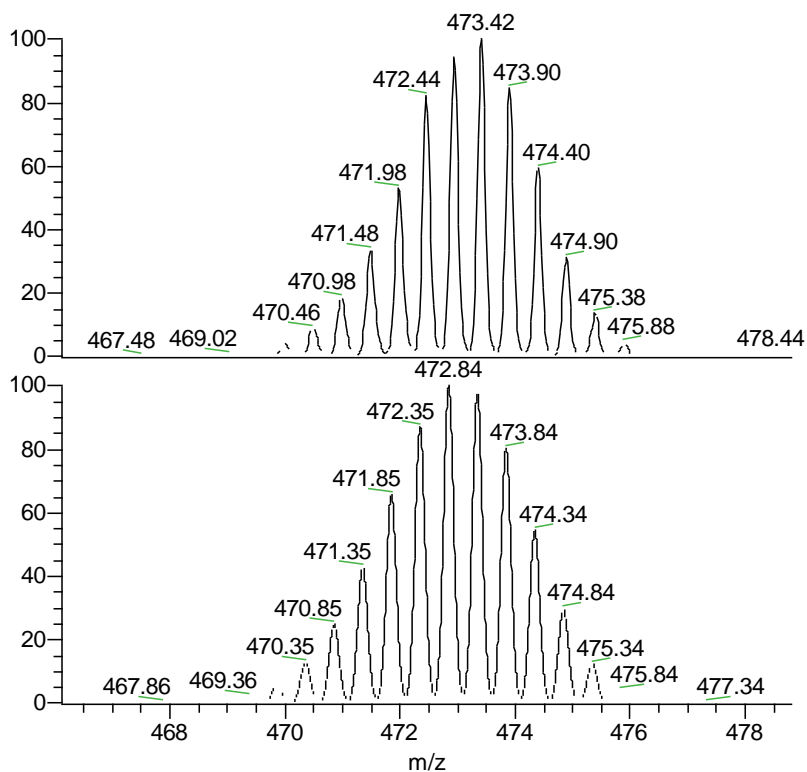
NL:  
3.79E3  
B<sub>36</sub>Co<sub>2</sub>C<sub>25</sub>NO<sub>7</sub>H<sub>67</sub>:  
B<sub>36</sub>Co<sub>2</sub>C<sub>25</sub>N<sub>1</sub>O<sub>7</sub>H<sub>67</sub>  
p (gss, s /p:40) Chrg 2  
R: 0.37 Da @FWHM



NL:  
2.48E3  
ESI\_RK\_RK2Fr2\_Nnorm\_13  
0207130650#1-26 RT:  
0.00-0.31 AV: 26 T: ITMS - p  
ESI Full ms [50.00-2000.00]

NL:  
3.74E3  
B<sub>36</sub> C<sub>2</sub> C<sub>25</sub> NO<sub>7</sub> H<sub>67</sub> Na:  
B<sub>36</sub> C<sub>2</sub> C<sub>25</sub> N<sub>1</sub> O<sub>7</sub> H<sub>67</sub> Na<sub>1</sub>  
p (gss, s /p:40) Chrg 1  
R: 0.5 Da @FWHM

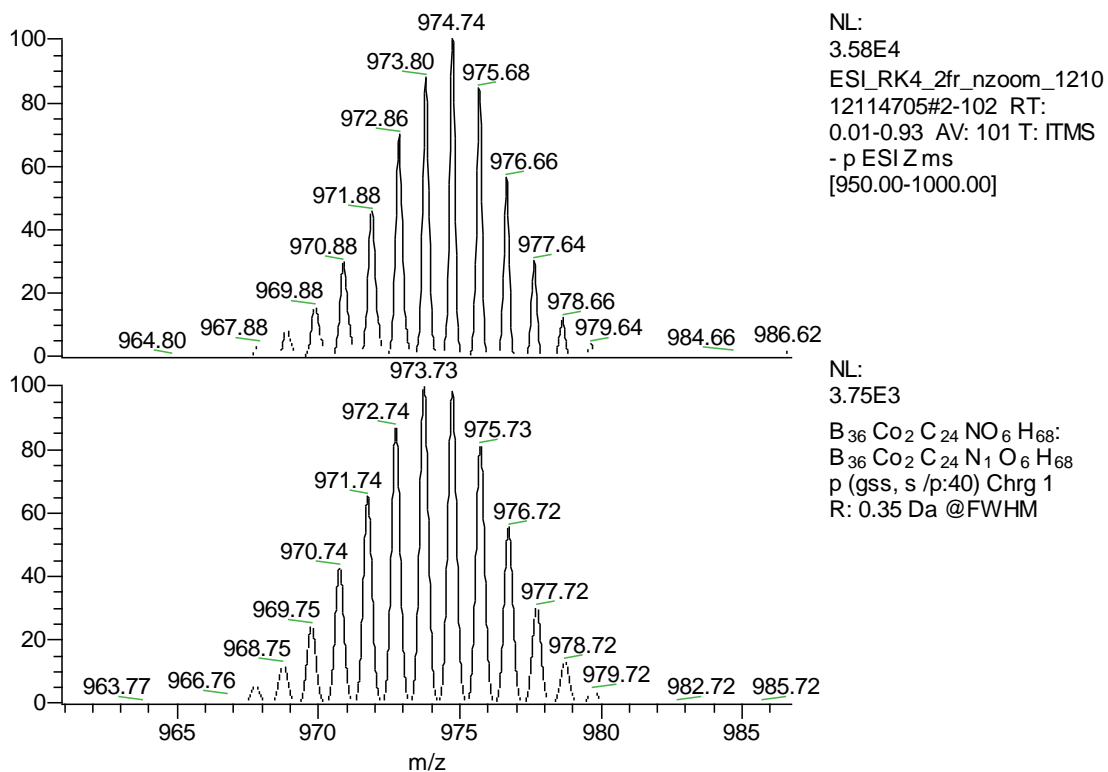
**Příloha 5.** Hmotnostní spektrum L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanátu. První spektrum náleží dianiontu, druhé spektrum náleží monoaniontu vázaným s vodíkovým kationtem a poslední náleží monoaniontu vázaným se sodným kationtem.



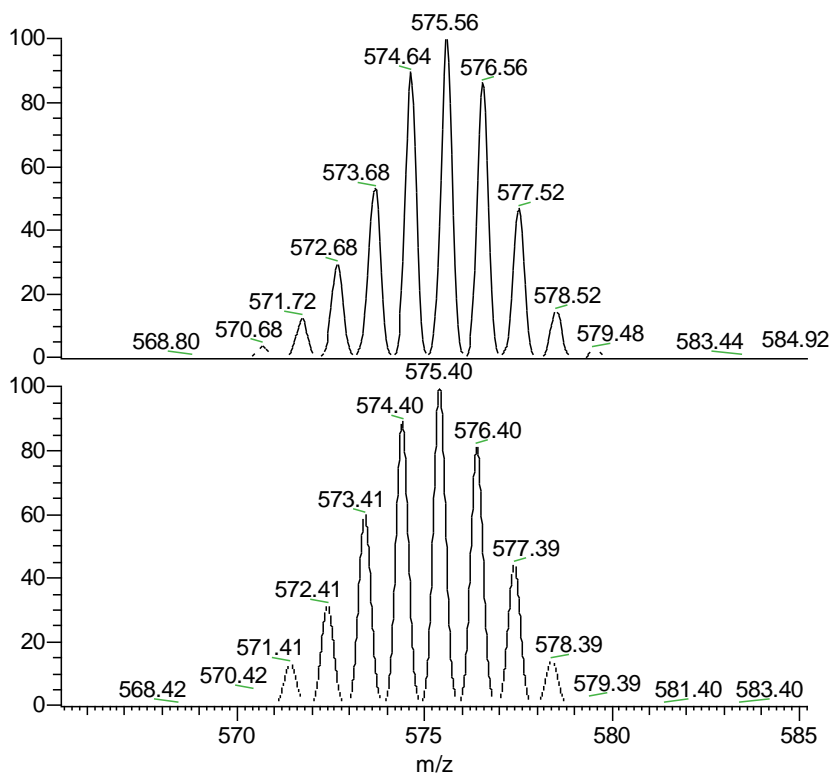
NL:  
 3.31E4  
 ESI\_RK3\_3fr\_thymin\_12080  
 7142531#2-132 RT:  
 0.01-1.01 AV: 131 T: ITMS  
 - p ESI Z ms  
 [460.00-485.00]

NL:  
 3.76E3  
 $B_{36}CO_2C_{21}N_2O_6H_{62}$ :  
 $B_{36}CO_2C_{21}N_2O_6H_{62}$   
 p (gss, s /p:40) Chrg 2  
 R: 0.2 Da @FWHM

**Příloha 6.** Třetí chromatografická frakce reakční směsi thymin-bis-COSAN-dioxanátu. Spektrum náleží dianiontu. Výraznější odchylka  $\Delta m z^{-1} = 0,58$  naměřené hodnoty od vypočtené je způsobena nepřesností měření.



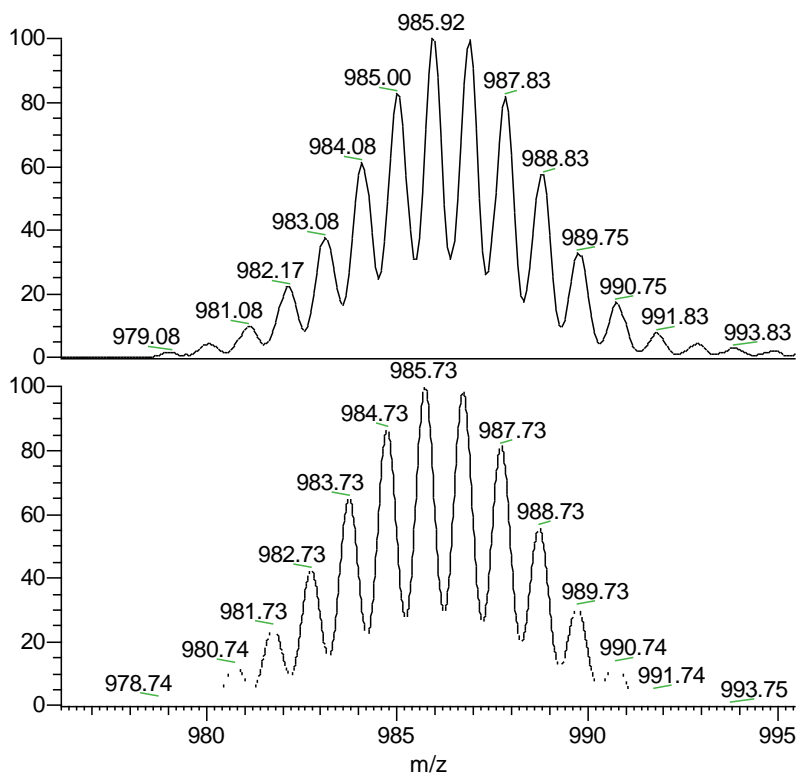
**Příloha 7.** Druhá chromatografická frakce reakční směsi dopamin-bis-COSAN-dioxanátu. Spektrum náleží monoaniontu vázanému s vodíkovým kationtem.



NL:  
8.36E3  
ESI\_JS\_Si-  
RK5B\_Nenh\_1302251004  
04#1 RT: 0.00 AV: 1 T:  
ITMS - p ESI E Full ms  
[50.00-2000.00]

NL:  
5.30E3  
B<sub>18</sub> CoC<sub>17</sub> NO<sub>4</sub> H<sub>39</sub>:  
B<sub>18</sub> C<sub>01</sub> C<sub>17</sub> N<sub>1</sub> O<sub>4</sub> H<sub>39</sub>  
p (gss, s /p:40) Chrg 1  
R: 0.37 Da @FWHM

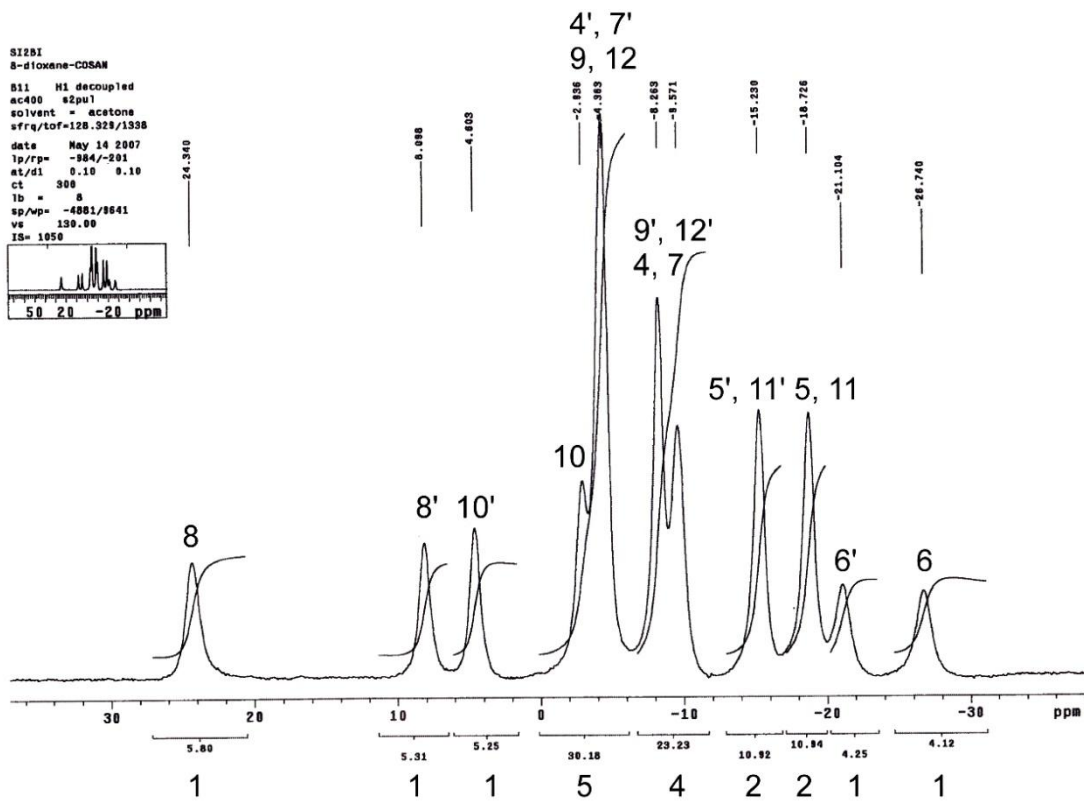
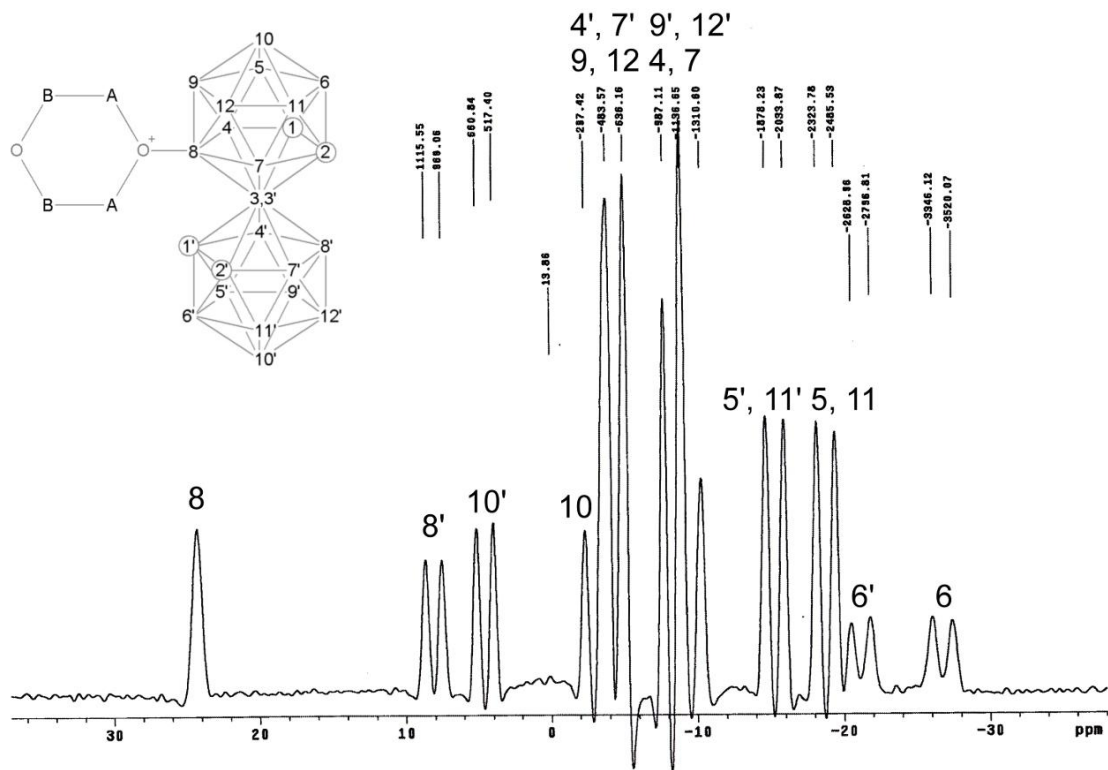
**Příloha 8.** Čtvrtá chromatografická frakce reakční směsi fenylalaninmethylesteru-COSAN-dioxanátu. Spektrum náleží monoaniontu.

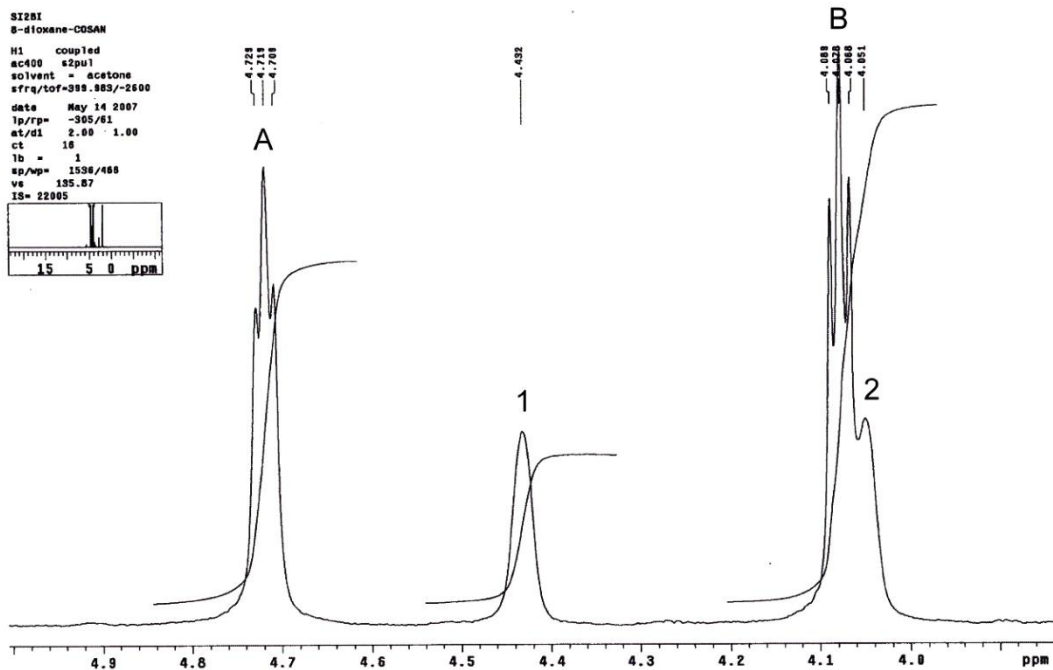


NL:  
 1.90E4  
 ESI\_RK6\_RC\_Nnorm\_1303  
 08131730#1-19 RT:  
 0.00-0.22 AV: 19 T: ITMS -  
 p ESI Full ms  
 [50.00-2000.00]

NL:  
 3.75E3  
 $B_{36} C_{25} N_1 O_6 H_{68}$   
 $B_{36} C_{25} N_1 O_6 H_{68}$   
 p (gss, s /p:40) Chrg 1  
 R: 0.6 Da @FWHM

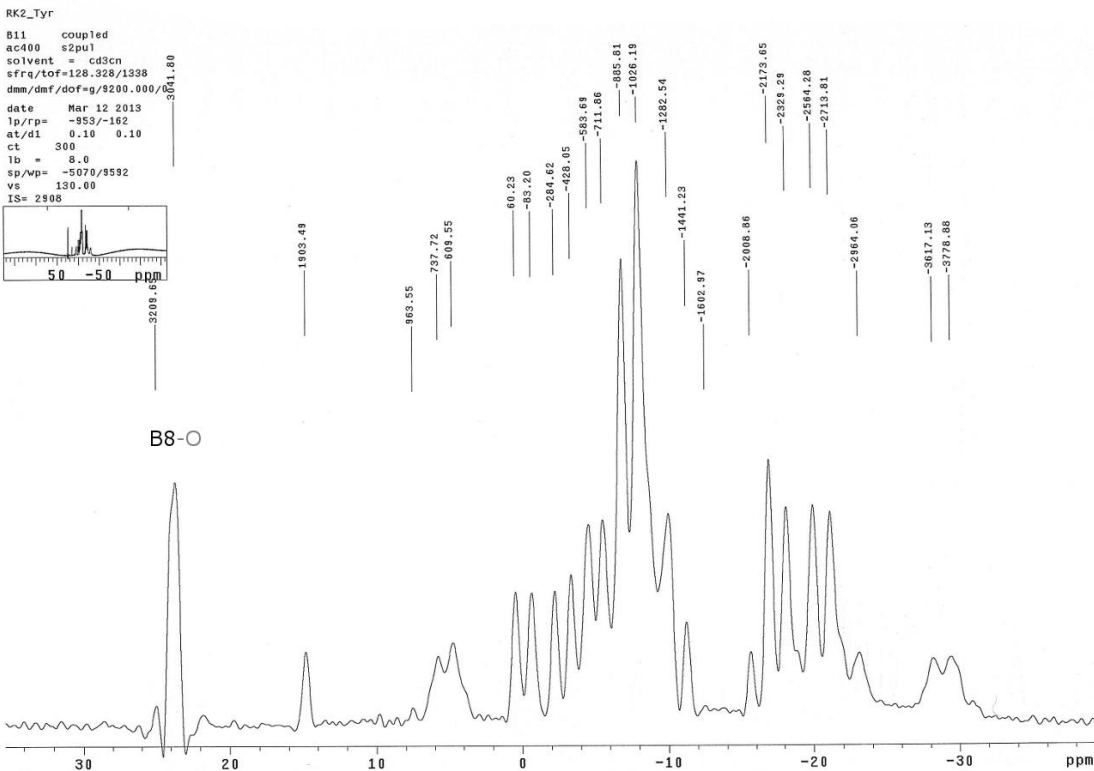
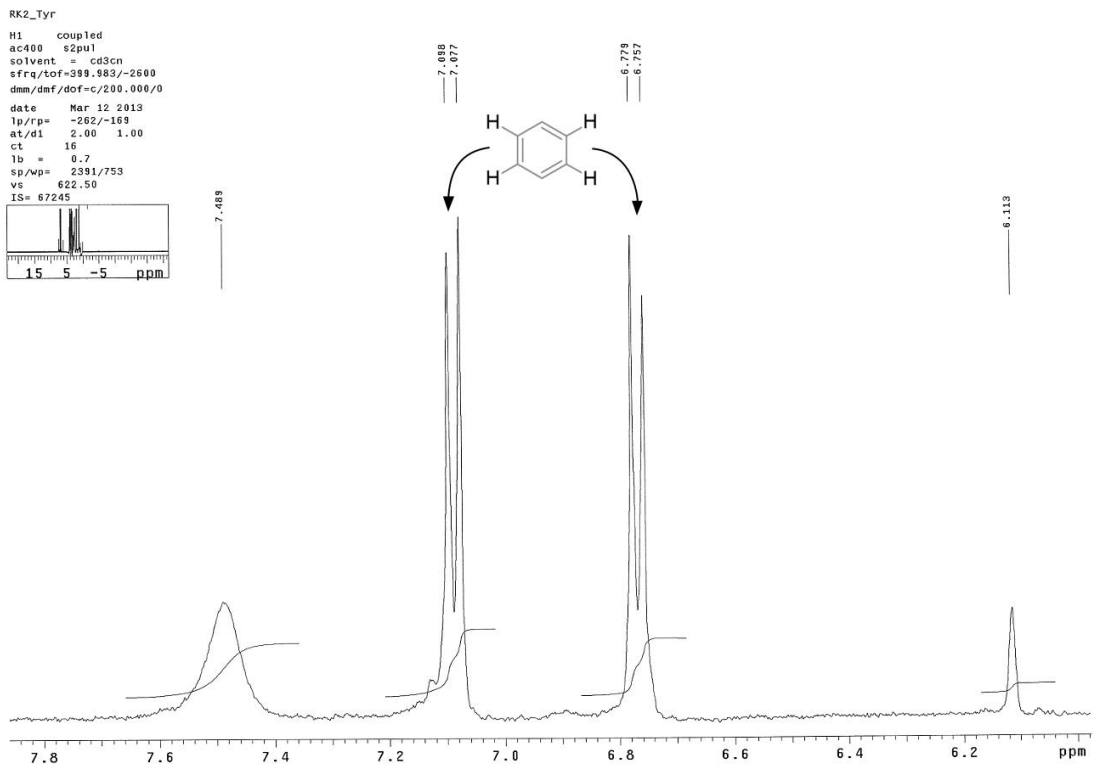
**Příloha 9.** Druhá chromatografická frakce reakční směsi fenylalanin-bis-COSAN-dioxanátu. Spektrum náleží monoaniontu vázanému s vodíkovým kationtem.





**Příloha 10.** Ukázka přiřazení signálů  $^1\text{H}$  a  $^{11}\text{B}$  NMR k jednotlivým atomům v molekule 8-dioxan-COSANu. První spektrum –  $^{11}\text{B}$ , druhé –  $^{11}\text{B} \{^1\text{H}\}$ , třetí –  $^1\text{H} \{^{11}\text{B}\}$ . U druhého spektra jsou vypočítány integrály ploch jednotlivých signálů a s jejich pomocí jsou určeny *oměry* počtů jednotlivých atomů. Celkem je zde 18n atomů boru. Hodnotu n je třeba dále dedukovat s pomocí MS. Lze pozorovat vliv symetrie na uspořádání signálů např. u třetího spektra, kde dochází ke splynutí u A a B, což jsou atomy vodíku na stále uzavřeném dioxanovém kruhu.

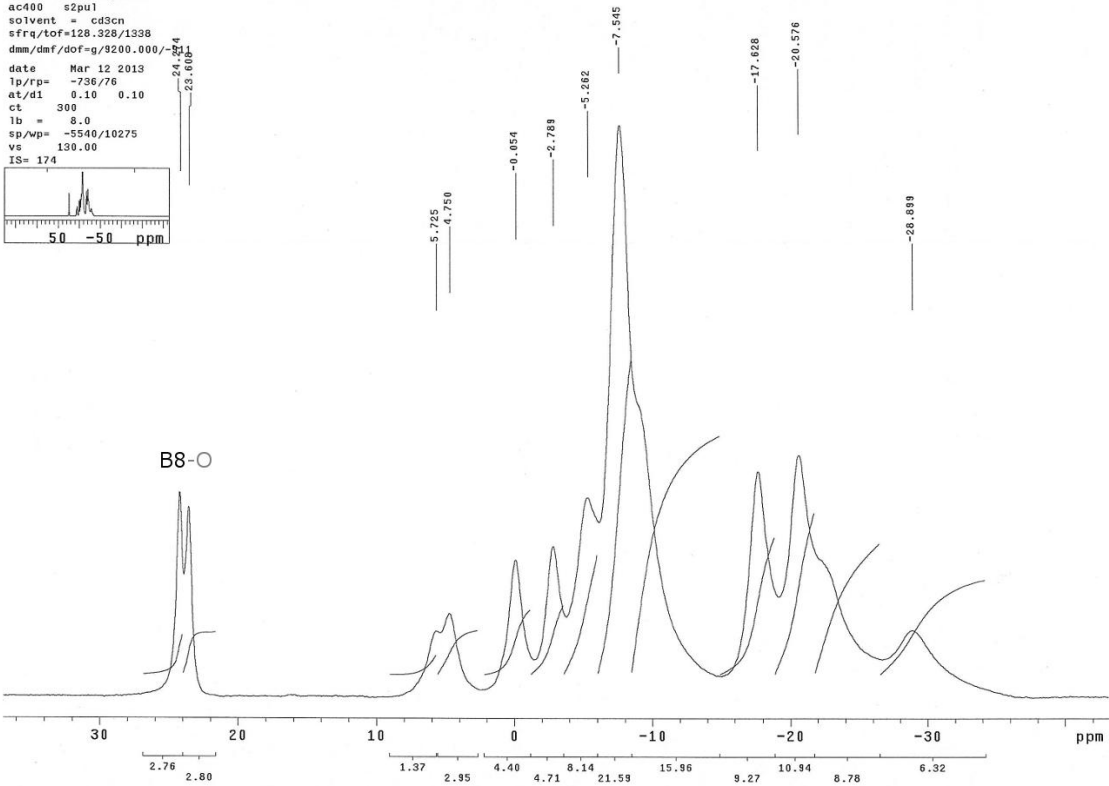
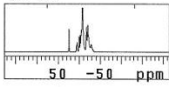




Příloha 11. Vybraná NMR spektra  $^1\text{H}$  a  $^{11}\text{B}$  L-tyrosin-bis-COSAN-dioxanátu.

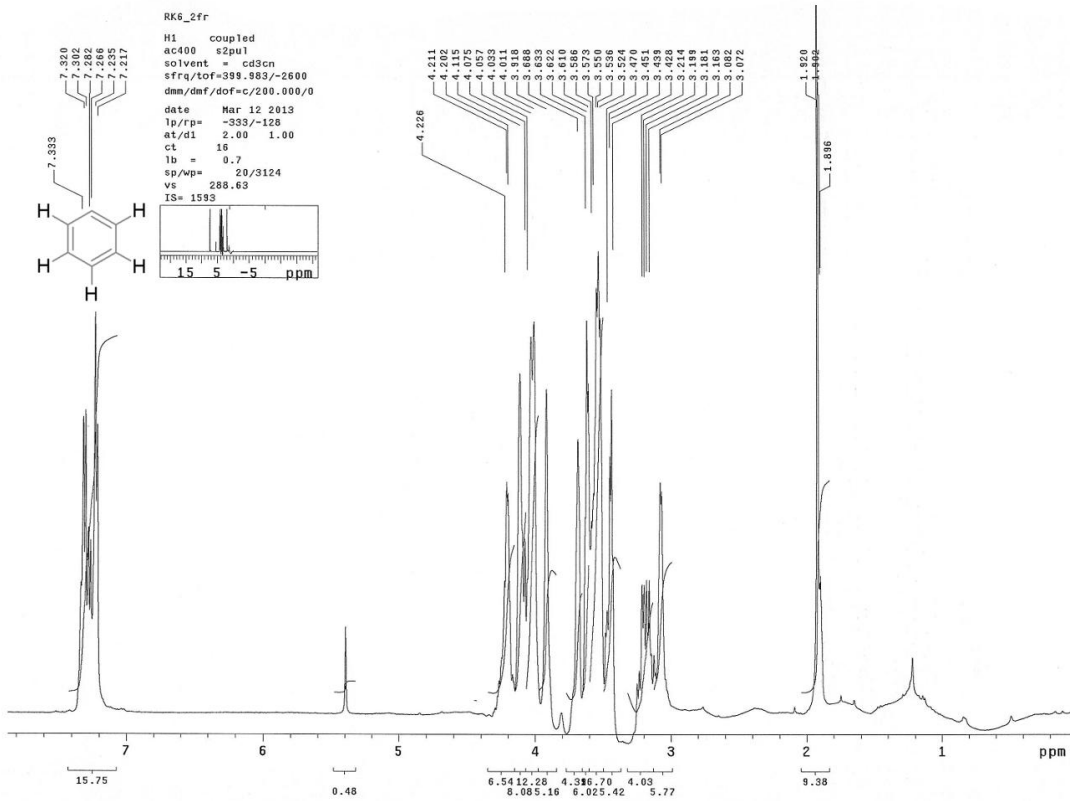
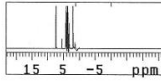
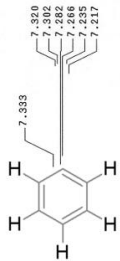
RK6\_2fr

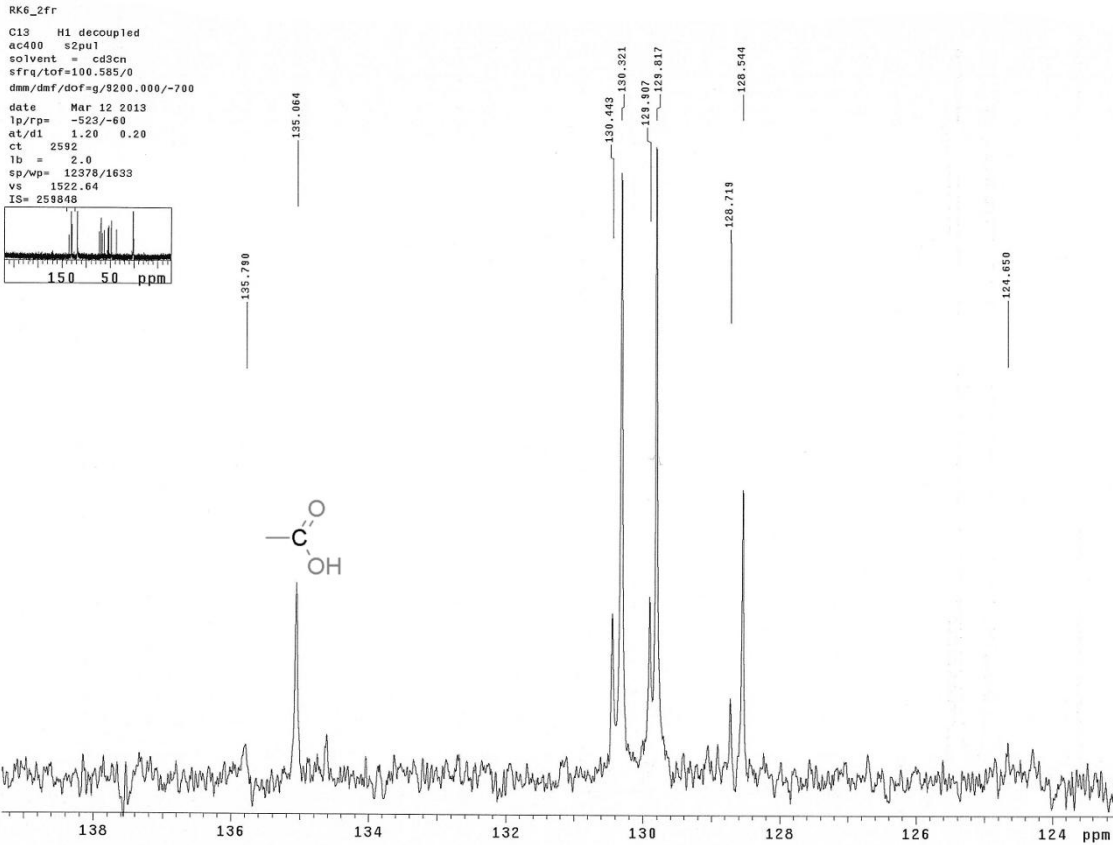
B11 H1 decoupled  
ac400 s2pu1  
solvent = cd3cn  
sfrq/tof=128.328/1338  
dmm/dmf/dof=g/9200.000/-24.544  
date Mar 12 2013  
lp/rp= -736/76  
at/d1 0.10 0.10  
ct 300  
lb = 8.0  
sp/wp= -5540/10275  
vs 130.00  
IS= 174



RK6\_2fr

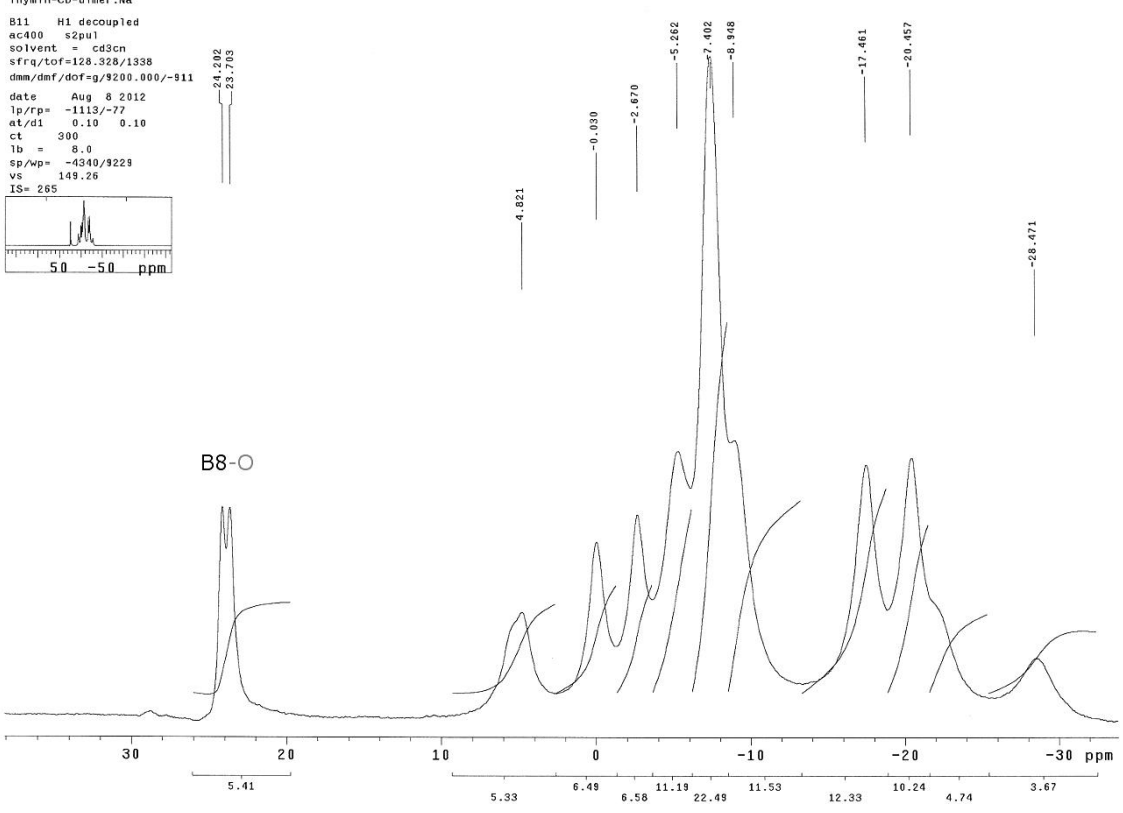
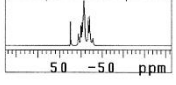
H1 coupled  
ac400 s2pu1  
solvent = cd3cn  
sfrq/tof=399.983/-2600  
dmm/dmf/dof=c/200.000/0  
date Mar 12 2013  
lp/rp= -333/-128  
at/d1 2.00 1.00  
ct 16  
lb = 0.7  
sp/wp= 20/3124  
vs 288.63  
IS= 1593





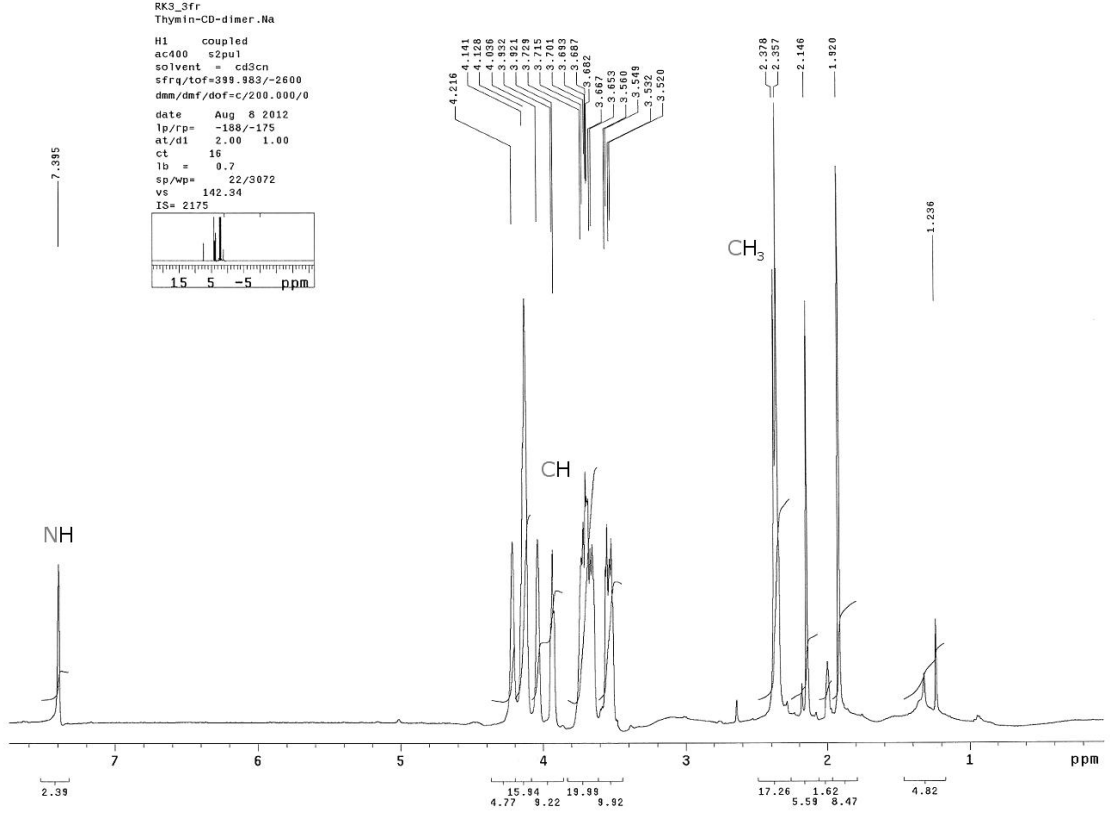
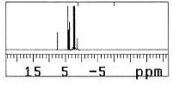
**Příloha 12.** Vybraná NMR spektra  $^{11}\text{B}$   $\{^1\text{H}\}$ ,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  D-fenylalanin-bis-COSAN-dioxanátu.

RK3\_3fr  
 Thymin-CD-dimer.Na  
 B11 H1 decoupled  
 ac400 s2pul  
 solvent = cd3cn  
 sfrq/tof=128.328/1338  
 dmm/dmf/dof=g/9200.000/-911  
 date Aug 8 2012  
 lb/rp= -1113/-77  
 at/d1 0.10 0.10  
 ct 300  
 lb = 8.0  
 sp/wp= -4340/9229  
 vs 149.26  
 IS= 265



B8-O

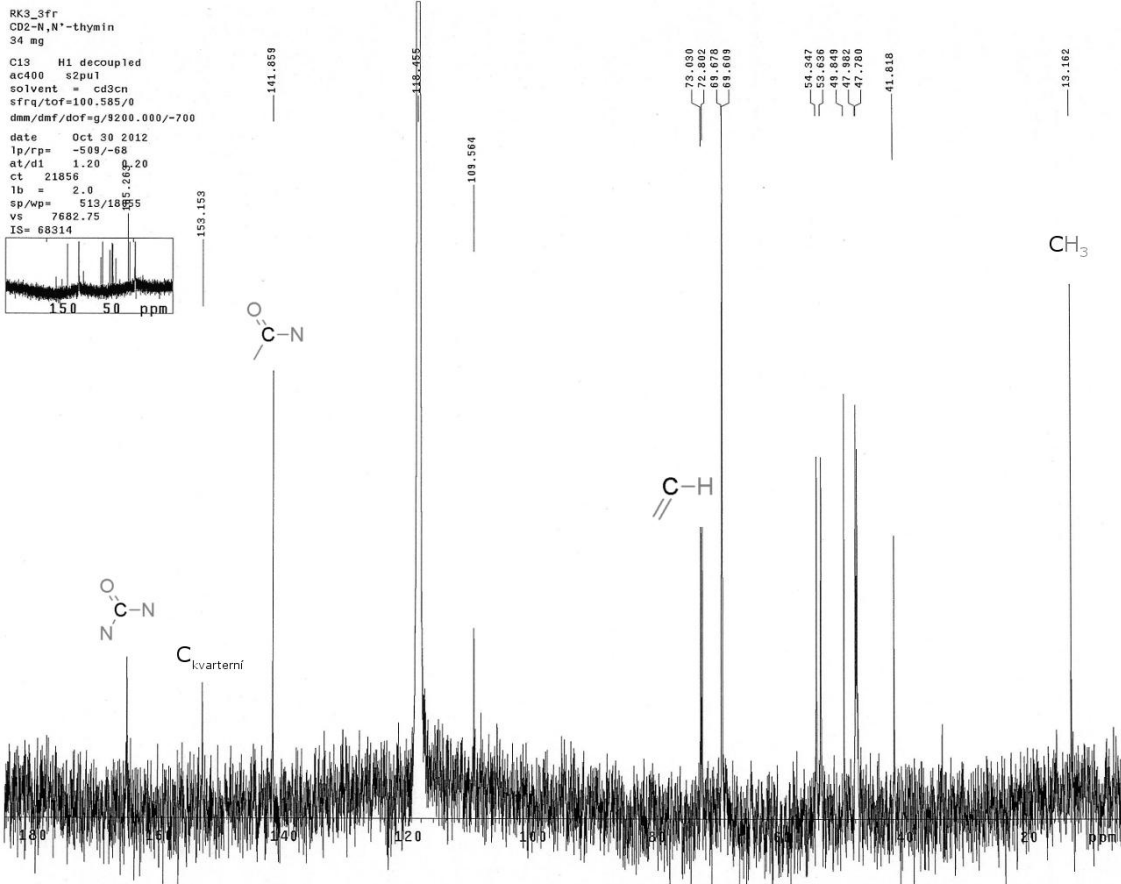
RK3\_3fr  
 Thymin-CD-dimer.Na  
 H1 coupled  
 ac400 s2pul  
 solvent = cd3cn  
 sfrq/tof=399.883/-2600  
 dmm/dmf/dof=c/200.000/0  
 date Aug 8 2012  
 lb/rp= -198/-175  
 at/d1 2.00 1.00  
 ct 16  
 lb = 0.7  
 sp/wp= 22/3072  
 vs 142.34  
 IS= 2175



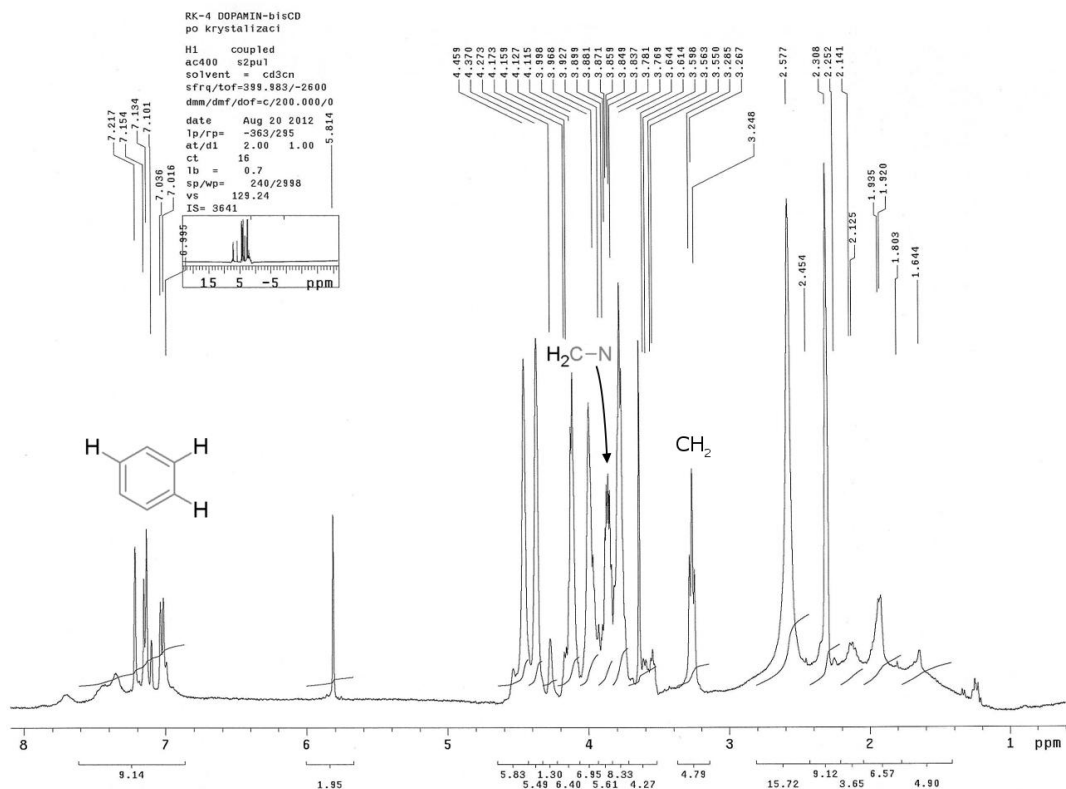
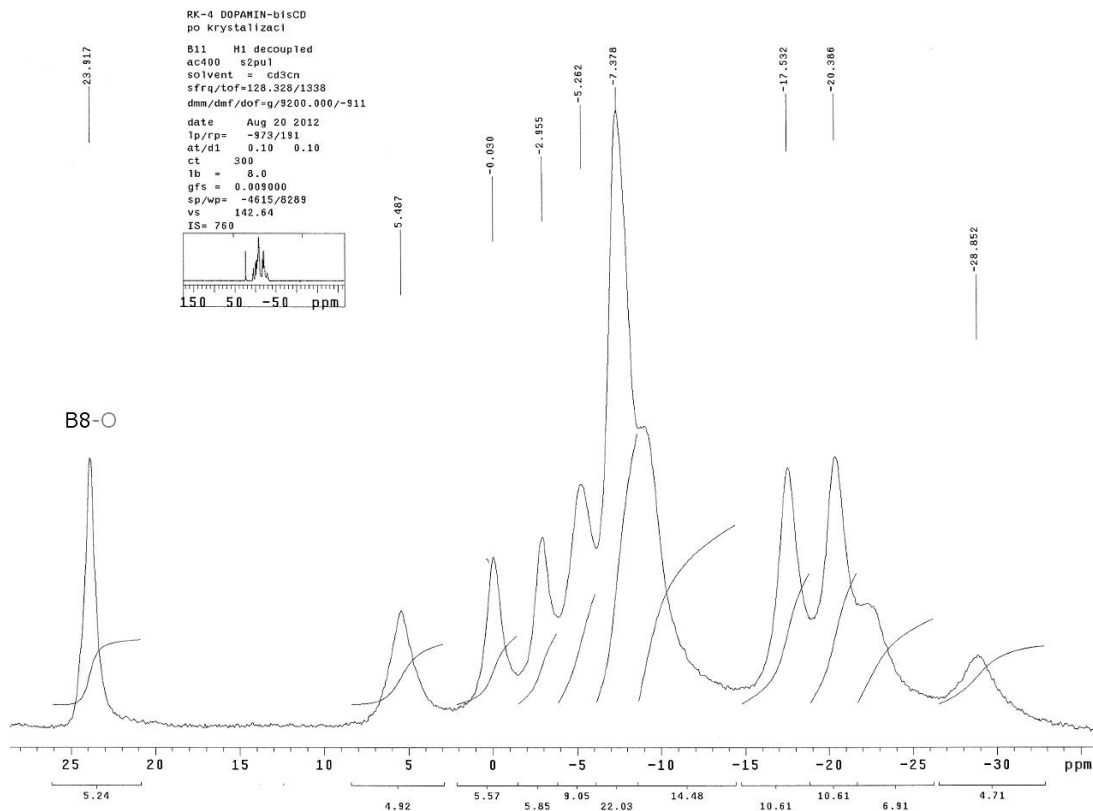
NH

CH

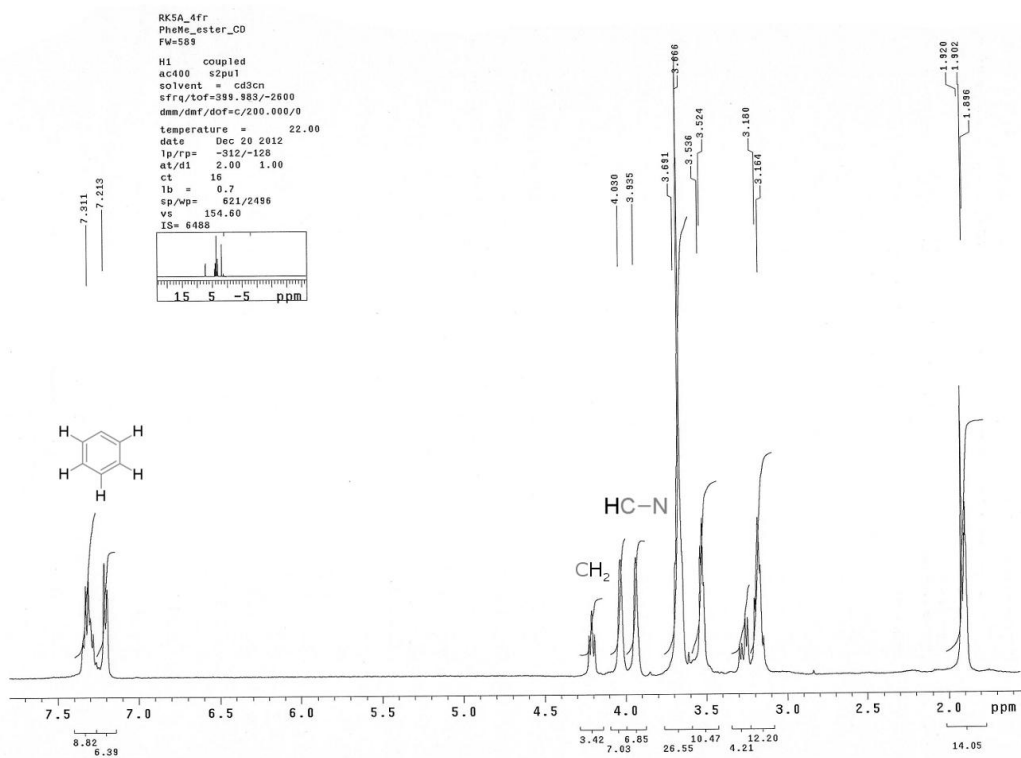
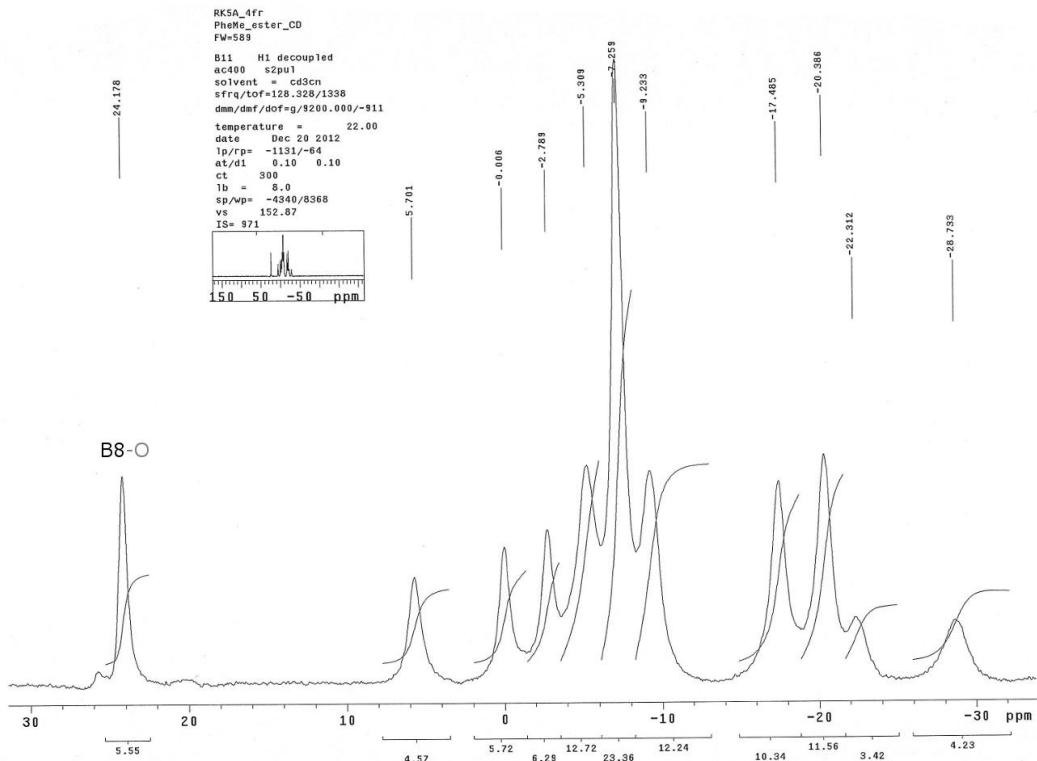
CH<sub>3</sub>



**Příloha 13.** Vybraná NMR spektra  $^{11}\text{B}$  { $^1\text{H}$ },  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } thymín-bis-COSAN-dioxanátu.



Příloha 14. Vybraná NMR spektra  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a  $^1\text{H}$  dopamin-bis-COSAN-dioxanátu.



Příloha 15. Vybraná NMR spektra  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  a  $^1\text{H}$  L-fenylalaninmethylester-COSAN-dioxanátu.

## 9. Reference

1. **FDA.** Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. *U.S. Food and Drug Administration*. [Online] 18. 12 2012. [Citace: 17. 1 2013.] <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>.
2. **Wolfgang Göbring, Surendra Gokbale, Hans Hilpert, Felix Roessler et al.** Synthesis of the HIV-Proteinase Inhibitor Saquinavir: A Challenge for Process Research. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 1996. Sv. 50, 11.
3. **Jana Pokorná, Ladislav Machala, Pavlína Řezáčová, Jan Konvalinka.** Current and Novel Inhibitors of HIV Protease. *Viruses*. 2009. Sv. 1, 1209-1239. doi:10.3390/v1031209.
4. **Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnick EM, Sigal IS.** Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. July 1988. Sv. 85, 13, stránky 4686-90. PMID: 3290901.
5. **Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA.** Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989. Sv. 86, 15. PMID: 2788277.
6. **Wensing AM, van Maarseveen NM, Nijhuis M.** Fifteen years of HIV Protease, Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Res*. 2010. Sv. 85, 1. PMID: 19853627.
7. **JS, James.** Protease inhibitors: drug resistance and cross resistance overview. *AIDS Treatment News*. 1995. Sv. 235. PMID: 11363046.
8. **Zeldin RK, Petruschke RA.** Pharmacological and therapeutic properties of ritonavir-boosted protease inhibitor therapy in HIV-infected patients. *AIDS*. 2004. Sv. 53, 1. PMID: 14657084.
9. **Robert K. Zeldin, Richard A. Petruschke.** Pharmacological and therapeutic properties of ritonavir-boosted protease inhibitor therapy in HIV-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004. 53(4-9). DOI: 10.1093/jac/dkh029.
10. **Cígler P, Kozísek M, Rezáčová P, Brynda J, Otwinowski Z, Pokorná J, Plešek J, Grüner B, Dolecková-Maresová L, Mása M, Sedláček J, Bodem J, Kräusslich HG, Král V, Konvalinka J.** From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: metallacarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. Sv. 102, 43. PMID: 16227435.
11. **M. Frederick Hawthorne, Donald C. Young, Patrick A. Wegner.** Carbametallic Boron Hydride Derivatives. I. Apparent Analogs of Ferrocene and Ferricinium Ion. *Journal of American Chemical Society*. 1965. Sv. 87, 8. doi: 10.1021/ja01086a053.



12. **Petr Cígler, Milan Kožíšek , Pavlína Řezáčová a kol.** From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: Metallocarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease. *PNAS*. 2005. Sv. 102, 43, 15394 –15399.
13. **JS, James.** Saquinavir (Invirase): first protease inhibitor approved--reimbursement, information hotline numbers. *AIDS Treatment News*. 1995. Sv. 237. PMID: 11363073.
14. **Grinde B, Jonassen TO.** The HIV proteinase - a target for antiviral agents. *Tidsskrift for den Norske lægeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny række*. 1996. Sv. 116, 24. PMID: 8975409.
15. **Olawale Ajose, Siddharth Mookerjee, Edward J. Mills, Andrew Boulle, Nathan Ford.** Treatment outcomes of patients on second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: a systematic review and meta-analysis. *AIDS*. 2012. Sv. 26. doi: 10.1097/QAD.0b013e328351f5b2.
16. **Wlodawer, A.** Rational approach to AIDS drug design through structural biology. *Annual Review of Medicine*. 2002. Sv. 53, 595-614. doi: 10.1146/annurev.med.53.052901.131947.
17. **Ann C. Collier, Robert W. Coombs, David A. Schoenfeld et al.** Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection with Saquinavir, Zidovudine, and Zalcitabine. *New England Journal of Medicine*. 1996. Sv. 334, 1011-1018. doi: 10.1056/NEJM199604183341602.
18. **MS, Gottlieb.** Pneumocystis Pneumonia --- Los Angeles. *Am J Public Health*. 2006. Sv. 96, (6)980-981. doi:10.2105/AJPH.96.6.980. PMC 1470612. PMID 16714472.
19. **Friedman-Kien, A. E.** Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1981. Sv. 5, 4. doi:10.1016/S0190-9622(81)80010-2. PMID 7287964.
20. **Hymes KB, Cheung T, Greene JB, et al.** Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. *Lancet*. 1981. Sv. 2, (8247) 598–600. doi:10.1016/S0140-6736(81)92740-9. PMID 6116083.
21. **Centers for Disease Control.** Persistent, generalized lymphadenopathy among homosexual males. *MMWR Morb Mortal Wkly*. 1982. Sv. Rep. 31, (19) 249–251. PMID 6808340.
22. **Altman, L. K.** New homosexual disorder worries health officials. *The New York Times*. 1982.
23. **Cohen, Jon.** Making Headway Under Hellacious Circumstances. *Science*. 2006. Sv. 313.
24. **Centers for Disease Control.** Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)—United States. *MMWR Morb Mortal Wkly*. 1982. Sv. 31, (37) 507-8; 513-514. PMID 6815471.
25. **RC Gallo, PS Sarin, EP Gelmann, M Robert-Guroff, E Richardson, VS Kalyanaraman, D Mann, GD Sidhu, RE Stahl, S Zolla-Pazner, J Leibowitch, M Popovic.** Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983. Sv. 220, (4599) 865–867. PMID 6601823.
26. **Montagnier, L. et al.** Human T-cell Leukemia Viruses. New York : Cold Spring Harbor, 1984. (363–379).

27. **Gallo, Robert C., Montagnier, Luc.** The Discovery of HIV as the Cause of AIDS. *New England Journal of Medicine*. 2003. Sv. 349, 24 (2283-5). doi: 10.1056/NEJMp038194.
28. **RA, Weiss.** How does HIV cause AIDS? *Science*. 1993. Sv. 260, (5112) 1273–9. PMID 8493571.
29. **Rodgers DW, Gamblin SJ, Harris BA, Ray S, Culp JS, Hellmig B, Woolf DJ, Debouck C, Harrison SC.** The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. Sv. 92, (4) 1222–1226.
30. **Beard BC, Dickerson D, Beebe K, Gooch C, Fletcher J, Okbinoglu T, Miller DG, Jacobs MA, Kaul R, Kiem HP, Trobridge GD.** Comparison of HIV-derived lentiviral and MLV-based gammaretroviral vector integration sites in primate repopulating cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007. Sv. 15, (7) 1356-65. PMID: 17440443.
31. **Federico, Maurizio.** From Lentiviruses to Lentivirus Vectors. *Lentivirus Gene Engineering Protocols*. New York : Humana Press, 2003.
32. **Whittle H, Morris J, Todd J, Corrah T, Sabally S, Bangali J, Ngom PT, Rolfe M, Wilkins A.** HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. *AIDS*. 1994. Sv. 8, 11. PMID:7848600.
33. **Mastro, Timothy D., de Vincenzi, Isabelle.** Probabilities of sexual HIV-1 transmission. *AIDS*. 1996. Sv. 10.
34. **World Health Organization.** HIV transmission through breastfeeding. ISBN: 9789241596596.
35. **Gao F, Bailes E, Robertson DL, et al.** Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999. Sv. 397, (6718) 436–41. PMID 9989410.
36. The Millennium Development Goals Report 2011. New York : UN, 2011. ISBN 978-92-1-101244-6.
37. **Cunningham AL, Donaghy H, Harman AN, Kim M, Turville SG.** Manipulation of dendritic cell function by viruses. *Curr Opin Microbiol*. 2010. Sv. 13, (4) 524-9. PMID: 20598938.
38. **Pancera M, Majeed S, Ban YE, Chen L, Huang CC, Kong L, Kwon YD, Stuckey J, .** Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Sv. 107, (3) 1166-71. doi: 10.1073/pnas.0911004107.
39. **Wilen CB, Wang J, Tilton JC, Miller JC, Kim KA, et al.** Engineering HIV-Resistant Human CD4+ T Cells with CXCR4-Specific Zinc-Finger Nucleases. *PLoS Pathog*. 2011. Sv. 7, 4. doi:10.1371/journal.ppat.1002020.
40. **Alexandra Trkola, Tatjana Dragic, James Arthos, James M. Binley, William C. Olson.** CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature*. 1996. Sv. 384, (6605) 184-187. doi:10.1038/384184a0.

41. **Mercedes Bermejo, Juan Martín-Serrano et al.** Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains. *European Journal of Immunology*. 1998. Sv. 28, (10) 3192-3204. 10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3192::AID-IMMU3192>3.0.CO;2-E.
42. **Tatsuyoshi Kawamura, Forrest O. Gulden, Makoto Sugaya, David T. McNamara et al.** R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *PNAS*. 2003. Sv. 100, (14) 8401-6. doi:10.1073/pnas.1432450100.
43. **Mary E. Klotman, Aprille Rapista, Natalia Teleshova et al.** Neisseria gonorrhoeae-Induced Human Defensins 5 and 6 Increase HIV Infectivity: Role in Enhanced Transmission. *Journal of Immunology*. 2008. Sv. 180, (9) 6176-6185.
44. **Laura Waters, Sundhiya Mandalia, Paul Randell, Adrian Wildfire, Brian Gazzard, Graeme Moyle.** The Impact of HIV Tropism on Decreases in CD4 Cell Count, Clinical Progression, and Subsequent Response to a First Antiretroviral Therapy Regimen. *Clinical Infectious Diseases*. 2008. Sv. 46, 10. doi: 10.1086/587660.
45. **Richard Wyatt, Joseph Sodroski.** The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science*. 1998. Sv. 280, (5371) 1884-1888. DOI:10.1126/science.280.5371.1884.
46. **Chan DC, Kim PS.** HIV entry and its inhibition. *Cell*. 1998. Sv. 93, (5) 681-4. PMID: 9630213.
47. **Huifang Huang, Rajiv Chopra, Gregory L. Verdine, Stephen C. Harrison.** Structure of a Covalently Trapped Catalytic Complex of HIV-1 Reverse Transcriptase: Implications for Drug Resistance. *Science*. 1998. Sv. 282, (5394) 1669-1675. DOI:10.1126/science.282.5394.1669.
48. **Yong-Hui Zhenga, Nika Lovsina, B. Matija Peterlin.** Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunology Letters*. 2005. Sv. 97, (2) 225-234. PMID 15752562.
49. **AIDSinfo.** The HIV Life Cycle. [Online] AIDSinfo, a service of the U.S. Department of Health and Human Services (HHS). [http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/HIVLifeCycle\\_FS\\_en.pdf](http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/HIVLifeCycle_FS_en.pdf).
50. *Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kB pathway.* **John Hiscott, Hakju Kwon, Pierre Génin.** 2, místo neznámé : The American Society for Clinical Investigation, 2001, Sv. 107. doi:10.1172/JCI11918.
51. **Pollard, V W a Malim, M H.** The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology*. 1998. Sv. 52, 0066-4227. doi: 10.1146/annurev.micro.52.1.491.
52. **Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B.** The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*. místo neznámé : Université de Montpellier. Sv. 13, 3. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x.
53. **Marcey D, Somple M, Silva N.** HIV-1 Nef Protein. *The Online Macromolecular Museum Exhibits*. místo neznámé : California Lutheran University, 2007.
54. **Das SR, Jameel S.** Biology of the HIV Nef protein. *The Indian journal of medical research*. 2005. Sv. 121, 4. PMID 15817946.

55. **Jason Fernandes, Bhargavi Jayaraman, Alan Frankel.** The HIV-1 Rev response element. *RNA Biology*. 2012. Sv. 9, 1. doi: 10.4161/rna.9.1.18178.
56. **Hirofumi Akari, Tomoharu Fukumori, Akio Adachi.** Cell-Dependent Requirement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Cytoplasmic Tail for Env Incorporation into Virions. *Journal of Virology*. 2000. Sv. 74, 10. doi: 10.1128/JVI.74.10.4891-4893.2000.
57. **Harrison GP, Lever AM.** The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *Journal of virology*. 1992. Sv. 66, 7. PMID: 1602537.
58. **M L Gougeon, H Lecoeur, A Dulioust, M G Enouf, M Crouvoiser, C Goujard, T Debord, L Montagnier.** Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *Journal of Immunology*. 1996. (156) 3509-20.
59. **Vincent Soriano, Javier Garcia-Samaniego, Rafael Rodríguez-Rosado, Juan González, José Pedreira.** Hepatitis C and HIV infection: biological, clinical, and therapeutic implications. *Journal of Hepatology*. 1999. Sv. 31, (1) 119-123. doi:10.1016/S0168-8278(99)80387-0.
60. **A. D. Kelleher, A. Carr, J. Zaunders, D. A. Cooper.** Alterations in the Immune Response of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Subjects Treated with an HIV-Specific Protease Inhibitor, Ritonavir. *Journal of Infectious Diseases*. 1996. Sv. 173, (2) 321-329. doi: 10.1093/infdis/173.2.321.
61. **Andrew J. McMichael, Persephone Borrow, Georgia D. Tomaras, Nilu Goonetilleke, Barton F. Haynes.** The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*. 2010. Sv. 10, (1) 11-23. doi: 10.1038/nri2674.
62. **van Sighem, Ard, a další, a další.** Life expectancy of recently diagnosed asymptomatic HIV-infected patients approaches that of uninfected individuals. *AIDS*. 2010. Sv. 24, 10. doi: 10.1097/QAD.0b013e32833a3946.
63. **Greenberg ML, Cammack N.** Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004. Sv. 54, 2. PMID: 15231762.
64. **Gerd Fätkenheuer, Anton L Pozniak, Margaret A Johnson, Andreas Plettenberg, Schlomo Staszewski, Andy I M Hoepelman, Michael S Saag, Frank D Goebel, Jürgen K Rockstroh, Bruce J Dezube, Tim M Jenkins, Christine Medhurst, John F Sullivan et al.** Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nature Medicine*. 2005. Sv. 11, 11. doi: 10.1038/nm1319.
65. **Patrick Dorr, Mike Westby, Susan Dobbs, Paul Griffin, Becky Irvine, Malcolm Macartney, Julie Mori, Graham Rickett, Caroline Smith-Burchnell, Carolyn Napier, Rob Webster, Duncan Armour, David Price, Blanda Stammen, Anthony Wood, Manos Perros.** Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human

Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. Sv. 49, 11. doi: 10.1128/AAC.49.11.4721-4732.2005.

66. **Priscilla Biswas, Giuseppe Tambussi, Adriano Lazzarin**. Access denied? The status of co-receptor inhibition to counter HIV entry. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2007. Sv. 8, 7. doi:10.1517/14656566.8.7.923.

67. **De Clercq, E**. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral research*. místo neznámé : Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, 1998. Sv. 38, 3. PMID:9754886.

68. **Carpenter, Charles C. J., a další, a další**. Antiretroviral therapy for hiv infection in 1998: Updated recommendations of the international aids society–usa panel. *JAMA*. 1998. Sv. 280, 1. doi: 10.1001/jama.280.1.78.

69. **Robert F Randoa, Nghe Nguyen-Bab**. Development of novel nucleoside analogues for use against drug resistant strains of HIV-1. *Drug Discovery Today*. 2000. Sv. 5, 10. doi: 10.1016/S1359-6446(00)01558-0.

70. **Bang LM, Scott LJ**. Emtricitabine: An Antiretroviral Agent for HIV infection. *Drugs*. místo neznámé : Adis International, 2003. Sv. 63, 22. <http://www.ingentaconnect.com/content/adis/dgs/2003/00000063/00000022/art00003>.

71. **Perry CM, Faulds D**. Lamivudine. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*. místo neznámé : Adis International, 1997. Sv. 53, 4. PMID:9098665.

72. **Devineni D, Gallo JM**. Zalcitabine. Clinical pharmacokinetics and efficacy. *Clinical Pharmacokinetics*. 1995. Sv. 28, 5. PMID:7614775.

73. **Langtry HD, Campoli-Richards DM**. Zidovudine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1989. Sv. 37, 4. PMID:2661194.

74. **Lea AP, Faulds D**. Stavudine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical potential in HIV infection. *Drugs*. místo neznámé : Adis International, 1996. Sv. 51, 5. PMID:8861550.

75. **Hervey PS, Perry CM**. Abacavir: A Review of its Clinical Potential in Patients with HIV Infection. *Drugs*. místo neznámé : Adis International, 2000. Sv. 60, 2. <http://www.ingentaconnect.com/content/adis/dgs/2000/00000060/00000002/art00015>.

76. **Perry CM, Balfour JA**. Didanosine. An update on its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV disease. *Drugs*. místo neznámé : Adis International , 1996. Sv. 52, 6. PMID:8957161.

77. **Kearney BP, Flaherty JF, Shah J.** Tenofovir Disoproxil Fumarate: Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*. místo neznámé : Adis International, 2004. Sv. 43, 9. <http://www.ingentaconnect.com/content/adis/cpk/2004/00000043/00000009/art00003>.
78. **Chapman T, McGavin J, Noble S.** Tenofovir disoproxil fumarate. *Drugs*. místo neznámé : Adis International, 2003. Sv. 63, 15. PMID:12887265.
79. **Seckler JM, Barkley MD, Wintrobe PL.** Allosteric suppression of HIV-1 reverse transcriptase structural dynamics upon inhibitor binding. *Biophysical journal*. 2011. Sv. 100, 1. doi: 10.1016/j.bpj.2010.11.004.
80. **A. Ivetac, J. A. McCammon.** Elucidating the inhibition mechanism of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors through multicopy molecular dynamics simulations. *Journal of molecular biology*. 2009. Sv. 388, 3. doi: 10.1016/j.jmb.2009.03.037.
81. **BG, Gazzard.** Efavirenz in the management of HIV infection. *International Journal of Clinical Practice*. 1999. Sv. 53, 1. PMID:10344069.
82. **Mayuso Kuno, Supa Hannongbua, Keiji Morokuma.** Theoretical investigation on nevirapine and HIV-1 reverse transcriptase binding site interaction, based on ONIOM method. *Chemical Physics Letters*. 2003. Sv. 380. doi: 10.1016/j.cplett.2003.09.030.
83. **Scott LJ, Perry CM.** Delavirdine: a review of its use in HIV infection. *Drugs*. místo neznámé : Adis International, 2000. Sv. 60, 6. PMID: 11152019.
84. **Daryl S. Schiller, Manal Youssef-Bessler.** Etravirine: A second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) active against NNRTI-resistant strains of HIV. *Clinical Therapeutics*. 2009. Sv. 31, 4. doi: 10.1016/j.clinthera.2009.04.020.
85. **Ripamonti D, Maggiolo F.** Rilpivirine, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Current opinion in investigational drugs*. 2008. Sv. 9, 8. PMID: 18666038.
86. **Das K, Clark AD Jr, Lewi PJ, Heeres J, De Jonge MR, Koymans LM, Vinkers HM, Daeyaert F, Ludovici DW, Kukla MJ, De Corte B, Kavash RW, Ho CY, Ye H, Lichtenstein MA, Andries K, Pauwels R, De Béthune MP, Boyer PL, Clark P, Hughes SH, Janssen PA, Arnold E.** Roles of conformational and positional adaptability in structure-based design of TMC125-R165335 (etravirine) and related non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that are highly potent and effective against wild-type and drug-resistant HIV variants. *Journal of medicinal chemistry*. 2004. Sv. 47, 10. PMID: 15115397.
87. **Vincenzo Summa, Alessia Petrocchi, Fabio Bonelli, Benedetta Crescenzi, Monica Donghi, Marco Ferrara, Fabrizio Fiore, Cristina Gardelli, Odalys Gonzalez Paz, Daria J. Hazuda, Philip Jones, Olaf Kinzel, Ralph Laufer et al.** Discovery of Raltegravir, a Potent, Selective Orally Bioavailable HIV-Integrase Inhibitor for the Treatment of HIV-AIDS Infection. *Journal of medicinal chemistry*. 2008. Sv. 51, 18. doi: 10.1021/jm800245z.

88. **Cocohoba J, Dong BJ.** Raltegravir: the first HIV integrase inhibitor. *Clinical Therapeutics*. 2008. Sv. 30, 10. PMID:19014832.
89. **Sternberg, S.** AIDS optimism high despite therapy cost. *Science News*. 1996. Sv. 150, 2.
90. **J, Levin.** New protease drug shows early promise. *BETA*. 1995. Sv. 27. PMID: 11362887.
91. **E, Vazquez.** Saquinavir plus ritonavir reduce viral load by 99.9 percent. *Positively aware*. 1996. Sv. 7, 6. PMID: 11363983.
92. **Gerd Fätkenheuer, Albert Theisen, Jürgen Rockstroh, Tanja Grabow et al.** Virological treatment failure of protease inhibitor therapy in an unselected cohort of HIV-infected patients. *AIDS*. 1997. Sv. 11, 14.
93. **M B Vasudevachari, Y M Zhang, H Imamichi, T Imamichi, J Falloon, N P Salzman.** Emergence of protease inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients and rapid screening procedure for their detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996. Sv. 40, 11. PMID: 8913459.
94. **Vincent J. Wachter, Jeffrey A. Silverman, Yuanchao Zhang, Leslie Z. Benet.** Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998. Sv. 87, 11. doi: 10.1021/js980082d.
95. **JC Adkins, D Faulds.** Amprenavir. *Drugs*. 1998. Sv. 55, 6.
96. **Corbett AH, Kashuba AD.** Fosamprenavir. Vertex Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2000. Sv. 3, 3. PMID:12054084.
97. **Turner, Steve R., a další, a další.** Tipranavir (PNU-140690): A Potent, Orally Bioavailable Nonpeptidic HIV Protease Inhibitor of the 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrone Sulfonamide Class. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998. Sv. 41, 18. doi: 10.1021/jm9802158.
98. **Cvetkovic RS, Goa KL.** Lopinavir/Ritonavir: A Review of its Use in the Management of HIV Infection. *Drugs*. 2003. Sv. 63, 8.
99. **Back D, Sekar V, Hoetelmans RM.** Darunavir: pharmacokinetics and drug interactions. *Antiviral Therapy*. 2008. Sv. 13, 1. PMID:18389894.
100. **Becker, Stephen.** Atazanavir: improving the HIV protease inhibitor class. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2003. Sv. 1, 3. doi: 10.1586/14787210.1.3.403.
101. **Perry CM, Benfield P.** Nelfinavir. *Drugs*. 1997. Sv. 54, 1. PMID:9211082.
102. **Casanova, J.** *The borane, carborane, and carbocation continuum*. místo neznámé : Wiley-Interscience, 1998. ISBN: 978-0471180753.

103. **Šícha, V.** Substituční deriváty metalakboranů a karboranů s potenciálně zajímavými biologickými vlastnostmi. 2012.
104. **Wulfsberg, Gary.** *Inorganic Chemistry*. Middle Tennessee State University : University Science Books, 2000.
105. **Rhona M Garrioch, Georgina M Rosair, Alan J Welch.** Closo and semipseudocloso forms of the same carbametallaborane: synthesis and spectroscopic and crystallographic characterisation of 1-CCPh-2-Ph-3-( $\eta$ -L)-3,1,2-RhC<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>9</sub> (L=C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> and C<sub>5</sub>Me<sub>5</sub>): Part 25. Steric effects in heteroboranes. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2000. Sv. 614-615. ISSN 0022-328X, 10.1016/S0022-328X(00)00572-6. .
106. **Vernon R. Miller, Richard Weiss, Russell N. Grimes.** Polyhedral cobaltaboranes. Versatile replacement of borane(1) groups by ( $\eta$ -5-cyclopentadienyl)cobalt units in boron hydride frameworks. Borane-metal cluster hybrid molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 1977. Sv. 99, (17) 5646-5651.
107. **Plešek, Jaromír.** Potential applications of the boron cluster compounds. *Chemical Reviews* . 1992. Sv. 92, (2) 269-278.
108. **Čásenský, Bohuslav.** COSANs- solvent extraction reagents for the separation of radionuclides from waste solutions. *Katchem spol. s r.o.* [Online] 3. 6 2012. [Citace: 17. 1 2013.] <http://www.katchem.cz/cosany-en.php>.
109. **Plesek, Jaromir, a další, a další.** *Method for preferential retention of cesium cations and their separation from other inorganic cations.* 08/371,698 / 5,540,843 USA, 12. 1 1995.
110. **Jaromír Plešek, Stanislav Heřmánek, Andreas Franken, Ivana Čísařová, Christiane Nachtigal.** Dimethyl sulfate induced nucleophilic substitution of the [bis(1,2-dicarbollido)-3-cobaltate(1-)] ion. Syntheses, properties and structures of its 8,8 $\zeta$ -m-sulfato, 8-phenyl, and 8-dioxane derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1997. Sv. 62, 1. doi:10.1135/cccc19970047.
111. **Jiří Brynda, Pavel Mader, Jana Pokorná, Milan Kožíšek, Petr Cígler, Václav Šícha.** Boron Cluster Derivatives as Inhibitors of Important Therapeutical Targets: HIV-1 Protease and Carbonic Anhydrase IX. <http://www.xray.cz/xray/csca/kol2012/abst/brynda.htm>.
112. **Daniela Vullo, Marco Franchi, Enzo Gallori et al.** Carbonic Anhydrase Inhibitors: Inhibition of the Tumor-Associated Isozyme IX with Aromatic and Heterocyclic Sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2003. Sv. 13. doi: 10.1016/S0960-894X(03)00091-X.
113. **Kožíšek M, Cígler P, Lepsík M, Fanfrlík J, Rezáčová P, Brynda J, Pokorná J, Plešek J, Grüner B, Grantz Sasková K, Václavíková J, Král V, Konvalinka J.** Inorganic polyhedral metallacarborane inhibitors of HIV protease: a new approach to overcoming antiviral resistance. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008. Sv. 51, 15. PMID: 18598016.
114. **Spryshkova, R. A., a další, a další.** Toxicity of functional derivatives of polyhedral carboranes. *Медицинская радиология*. 1981. Sv. 26, 6. PMID: 7266291.



115. **Sivaev, Igor B., Bregadze, Vladimir V.** Polyhedral Boranes for Medical Applications: Current Status and Perspectives. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2009. Sv. 2009, 11. doi: 10.1002/ejic.200900003.
116. **Eran Hodis, David Canner, Eric Martz, Michal Harel, Joel L. Sussman et al.** HIV-1 protease - Proteopedia; Life in 3D. *Proteopedia*. [Online] 10. 4 2011. [Citace: 16. 1 2013.] [http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/HIV-1\\_protease](http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/HIV-1_protease).
117. **Jaskólski M, Tomasselli AG, Sawyer TK, Staples DG, Heinrikson RL, Schneider J, Kent SB, Wlodawer A.** Structure at 2.5-Å resolution of chemically synthesized human immunodeficiency virus type 1 protease complexed with a hydroxyethylene-based inhibitor. *Biochemistry*. 1991. Sv. 30, 6. PMID: 1993177.
118. COD - Crystallography Open Database. [Online] [Citace: 21. 1 2013.] <http://www.crystallography.net/>.
119. **Michael L. Moore, William M. Bryana, Stephen A. Fakhourya, Victoria W. Magaarda, William F. Huffmana, Brian D. Dayton, Thomas D. Meek, Lawrence Hyland, Geoffrey B. Dreyer, Brian W. Metcalf, James E. Strickler, Joselina G. Gorniak, Christine Debouck.** Peptide substrates and inhibitors of the HIV-1 protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989. Sv. 152, 2. doi: 10.1016/0006-291X(89)90008-9.
120. **Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell.** *Harperova biochemie*, 23. vydání. East Norwalk : Appleton & Lange, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
121. **Segel, Irwin H.** *Biochemical Calculations (2nd Edition)*. ISBN: 0471774219.
122. **Price, N C.** The determination of Km values from lineweaver-burk plots. *Biochemical Education*. 1985. Sv. 13, 2 (1879-1468). doi: 10.1016/0307-4412(85)90016-0.
123. **Leatherbarrow, Robin J.** Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *Trends in Biochemical Sciences*. 1990. Sv. 15, 12(455-458). ISSN 0968-0004, 10.1016/0968-0004(90)90295-M..
124. Inhibition diagrams. *Wikimedia Commons*. [Online] 16. 9 2006. [Citace: 2. 2 2013.] [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inhibition\\_diagrams.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inhibition_diagrams.png).
125. **Plešek, J., a další, a další.** Dimethyl sulfate induced nucleophilic substitution of the [bis(1,2-dicarbollido)-3-cobalt(1-)]ate ion. Syntheses, properties and structures of its 8,8'-mu-sulfato, 8-phenyl and 8-dioxane derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1997. Sv. 62, 1. ISSN: 0010-0765.
126. **Teixidor, F., a další, a další.** Chameleonic capacity of [3,3'-Co(1,2-C2B9H11)(2)](-) in coordination. Generation of the highly uncommon s(thioether)-Na bond. *Organometallics*. 2003. Sv. 22, 17. doi: 10.1021/om030135o.

127. **Michael Bühl, Drahomír Hnyk, Jan Macháček.** Computational Study of Structures and Properties of Metallaboranes: Cobalt Bis(dicarbollide). *Chemistry - A European Journal*. 2005. Sv. 11, 14. DOI: 10.1002/chem.200401202.
128. **Shriver, D.F. a Drezdon, M.A.** *Manipulation of Air Sensitive Compounds*. New York : Wiley-Interscience, 1986. ISBN: 978-0471867739.
129. **A. D. McNaught, A. Wilkinson.** *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. místo neznámé : IUPAC, 1997. ISBN 0-9678550-9-8 doi: doi:10.1351/goldbook.
130. **A. V. Prikaznov, Yu. N. Las'kova, A. A. Semioshkin, I. B. Sivaev, A. V. Kisin, V. I. Bregadze.** Synthesis of boron-containing tyrosine derivatives based on the closo-decaborate and closo-dodecaborate anions. *Russian Chemical Bulletin*. 2011. Sv. 60, 12. doi: 10.1007/s11172-011-0392-4.
131. **Stegink, Lewis D. a Filer, L.J.** *Aspartame: physiology and biochemistry*. New York : Dekker, M., 1984. ISBN: 08-247-72067.
132. **Liu F. L., Kovalevsky A. Y., Tie Y. F. et al.** Effect of Flap Mutations on Structure of HIV-1 Protease and Inhibition by Saquinavir and Darunavir. *Journal of Molecular Biology*. 2008. Sv. 381, 1. PMID: PMC2754059.
133. **Finzi, D., Hermankova, M., Pierson et al.** Identification of a reservoir of HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997. Sv. 278. PMID: 9360927.
134. **Ghorpade A, Xia MQ, Hyman BT, Persidsky Y, Nukuna A, Bock P, Che M, Limoges J, Gendelman HE, Mackay CR.** Role of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 in human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes and microglia. *Journal of Virology*. 1998. Sv. 72, 4. PMID: 9525662.
135. **Liuzzi G, Chirianni A, Clementi M, Bagnarelli P, Valenza A, Cataldo PT, Piazza M.** Analysis of HIV-1 load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS*. 1996. Sv. 10, 14. PMID: 8970677.
136. **I. C. Anthony, S. N. Ramage, F. W. Carnie, P. Simmonds, J. E. Bell.** Influence of HAART on HIV-Related CNS Disease and Neuroinflammation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2005. Sv. 64, 6. PMID: 15977645.
137. **Hisham M Mehanna, K K Ang, et al.** *Head and neck cancer recurrence : evidence-based, multidisciplinary management*. Stuttgart : Thieme, 2012. ISBN: 9783131473912.
138. **Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman.** *Cellular and molecular immunology*. 2003. ISBN: 0-7216-0008-5.
139. Phe-Pro | Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich*. [Online] [Citace: 15. 3 2013.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6258?lang=en&region=CZ>.

140. **International Union of Pure and Applied Chemistry.** Properties and units in the clinical laboratory sciences i. syntax and semantic rules. [Online] 1995. [Citace: 22. 2 2013.]  
<http://media.iupac.org/publications/labinfo/English/Documents/syntax%20and%20semantic.pdf>.
141. ASTM Mesh Size | EMD Milipore USA. *EMD Milipore.* [Online] EMD Milipore KGaA. [Citace: 2013. 3 22.] [http://www.emdmillipore.com/chemicals/astm-mesh-size/c\\_ef6b.s1ORRsAAAEpRSE71kFM](http://www.emdmillipore.com/chemicals/astm-mesh-size/c_ef6b.s1ORRsAAAEpRSE71kFM).
142. **Gerald L. Mandell, John E. Bennett.** Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases (7th ed.). 2010. ISBN 978-0-443-06839-3.
143. **Hardinger, Steve.** Mass Spectrometry. *Organic Chemistry at UCLA.* [Online] Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, 23. 8 2006. [Citace: 3. 2 2013.]  
[http://www.chem.ucla.edu/harding/notes/notes\\_14C\\_MS.pdf](http://www.chem.ucla.edu/harding/notes/notes_14C_MS.pdf).
144. **RC Stevens, TN Kakuda, R Bertz, H Mo, A Molla, R Rode, D Kempf.** *Inhibitory Quotient of Protease Inhibitors Using a Standardized Determination of IC50.* Abbot Park : 4th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy, 2003.  
<http://medadvocates.org/resources/conferences/4thPharmWkshp/StevensIQHandout.pdf>.