

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ORGANICKÉ A ANORGANICKÉ
CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

SYNTÉZA POTENCIÁLNÍCH METABOLITŮ ANTIFUNGÁLNÍ
LÁTKY LNO 18-22

Za ochotu, všestrannou a obětavou pomoc, cenné rady a připomínky při vypracování této diplomové práce děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., prof. RNDr. Milanu Pourovi, PhD. a Mgr. Petru Šenelovi.

OBSAH

OBSAH	3
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	5
1. ÚVOD	6
1.1. Antifungální látky.....	6
1.1.1. Antifungální látky pro systémovou terapii.....	6
1.1.2. Terapie lokálních mykóz.....	11
1.1.3. Nejnovější poznatky v oblasti antimykotik	13
1.2. Izolace a biologická aktivita (-)incrustoporinu.....	14
1.3. Návrh přípravy derivátů (-)incrustoporinu.....	15
2. CÍL PRÁCE	17
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM	18
3.1. Syntéza 3-(4-hydroxyfenyl)- 5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onu.....	18
3.1.1. Esterifikace výchozí látky	18
3.1.2. Alkylace a hydrolýza.....	18
3.1.3. Cyklizace	19
3.1.4. Zavedení dvojné vazby	20
3.2. Esterifikace PSM1.....	22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1. Použité experimentální postupy.....	23
4.2. 3-(4-methoxyfenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on.....	24
4.2.1. Methylester 4-methoxyfenyloctové kyseliny	24
4.2.2. Methylester 2-(4-methoxyfenyl)pent-4-enové kyseliny	24
4.2.3. Kyselina 2-(4-methoxyfenyl)pent-4-enová.....	26
4.2.4. 3-(4-methoxyfenyl)-5-hydroxymethyltetrahydrofuran-2-on.....	26
4.2.5. 3-(4-methoxyfenyl)-5- <i>terc.</i> butyldimethylsilyloxy- methyltetrahydro-furan-2-on.....	28
4.2.6. 3-(4-methoxyfenyl)-5- <i>terc.</i> butyldimethylsilyloxymethyl-3-fenylselenyl - tetrahydrofuran-2-on.....	29
4.2.7. 3-(4-methoxyfenyl)-5- <i>terc.</i> butyldimethylsilyloxymethyl- 2,5-dihydrofuran-2-on.....	30

4.2.8.3-(4-hydroxyfenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on	31
4.3. 3-(4-hydroxyfenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on (PSM2) a 3-(4-acetyloxyfenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on (PSM3)	32
5. ZÁVĚR.....	34
LITERATURA.....	35

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DMF	dimethylformamid
EtOAc	ethylacetát
LDA	diizopropylamid lithný
MCPBA	<i>m</i> -chlorperoxobenzoová kyselina
PE	petrolether
PhSeCl	fenylselenenylchlorid
TBSCl	<i>tert.</i> butyldimethylsilylchlorid
THF	tetrahydrofuran

1. ÚVOD

1.1. Antifungální látky

Antifungální látky (antimykotika) specificky působí na houbové organismy (kvasinky a vláknité houby). Z přibližně sto tisíc známých kvasinek a hub je pro člověka patogenních asi tři sta druhů. Škodlivý efekt těchto patogenů spočívá jednak v přímém napadení živé tkáně, dále v produkci mykotoxinů a rovněž v jejich nepřímém působení, např. vyvoláním alergie. Látky s protihoubovým působením mohou být původu:

- a) syntetického (např. azolové deriváty, allylaminové deriváty a flucytosin)
- b) polosyntetického (např. echinokandinové deriváty)
- c) přírodního (např. polyenová antibiotika a griseofulvin)¹

Antimykotika můžeme rozdělit

- a) podle účinku, a to na fungistatická, inhibující růst patogenních hub, nebo fungicidní, způsobující jejich uhynutí
- b) podle způsobu aplikace na systémová a lokální
- c) podle mechanismu účinku na specifická a nespecifická

Mechanismus účinku specifických antimykotik je založen na metabolických, cytologických a transportních rozdílech mezi buňkou hostitele a parazita. Problémem ale je, že buňky hostitele i buňky hub jsou eukaryotické a tudíž mají do značné míry shodnou strukturu i metabolismus.² Proto je spektrum látek, které lze využít zejména pro systémové použití, poměrně úzké.

1.1.1. Antifungální látky pro systémovou terapii

Systémové mykózy představují v současnosti stále rostoucí klinický problém. Během minulých let se incidence a závažnost zdatelně zvýšila.^{2,3,4,5,6} Jako hlavní příčiny jsou uváděny nárůst pacientů s narušenou funkcí imunitního systému v důsledku transplantací, onemocnění AIDS, protinádorové chemoterapie či špatné výživy. Dalšími příčinami jsou používání

širokospektrých antimikrobiálních látek, profylaktická léčba mykóz a také některé invazivní chirurgické metody (používání katetrů atd.).

Mezi nejčastější druhy mykóz patří zejména kandidóza, vyvolaná rodem *Candida*, nejčastěji *C. albicans*, ale i non-*albicans* druhy: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*; kryptokokóza způsobená rodem *Cryptococcus neoformans*; aspergilóza způsobená rodem *Aspegillus sp.* a penicilóza vyvolaná druhem *Penicillium marneffeii*.

V následujících kapitolách budou podrobněji probrána léčiva, která jsou v současné době nejčastěji používaná pro systémovou terapii mykóz a která se od sebe liší farmakologickými vlastnostmi, mechanismem účinku, spektrem účinku a mírou toxicity.

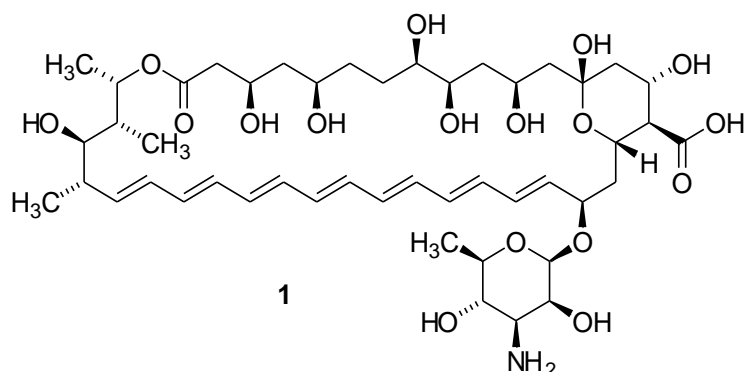
1.1.1.1. Amfotericin B

Amfotericin B (1) je polyenové antibiotikum, jehož strukturu tvoří makrolidový skelet s konjugovanými dvojnými vazbami na jedné části a s celou řadou hydroxylových skupin na druhé části cyklu. Tato látka byla izolována v roce 1956 ze *Streptomyces nodosus* a do klinické praxe uvedena v šedesátých letech.²

Mechanismus účinku amfotericinu B spočívá ve vazbě na ergosterol v membránách hub, čímž dochází ke vzniku pórů a k následnému irreverzibilnímu poškození buňky v důsledku úniku důležitých molekul a iontů. Z tohoto důvodu amfotericin B působí převážně fungicidně. Spektrum jeho účinku je velmi široké a k vývoji rezistence dochází při dlouhodobé terapii v menší míře než u jiných antimykotik.

Bohužel má amfotericin B velmi nevýhodné farmakologické vlastnosti. Nevstřebává se po perorálním podání, je prakticky nerozpustný ve vodě, a proto se podává pouze v pomalých infúzích ve formě koloidní suspenze s deoxycholovou kyselinou či se sulfátovaným cholesterolem, které plní funkci solubilizátorů.¹ Další nevýhodou je vysoká nefrotoxicita způsobená schopností amfotericinu B vázat se na cholesterol v membránách živočišných buněk.

Přes tyto negativní vlastnosti stále zůstává lékem volby u všech život ohrožujících mykóz.²

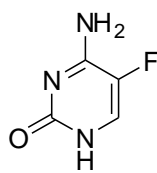


1.1.1.2. Flucytosin

Flucytosin (2) neboli 5-fluorocytosin byl původně vyvíjen jako antineoplastikum.² Jeho mechanismus účinku spočívá v deaminaci na 5-fluorouracil uvnitř buňky patogenu a konverzi na další antimetabolity, které inhibují svou inkorporací do RNA tvorbu nukleových kyselin. Humánní buňka není schopna uskutečnit tuto enzymatickou konverzi.

Spektrum účinku není příliš široké, snadno dochází ke vzniku rezistence, a to v důsledku ztráty schopnosti konverze na 5-fluorouracil. Proto se podává výhradně v kombinaci s jinými antimykotiky. Největší uplatnění má kombinace s amfotericinem B při léčbě kryptokokové meningitidy.²

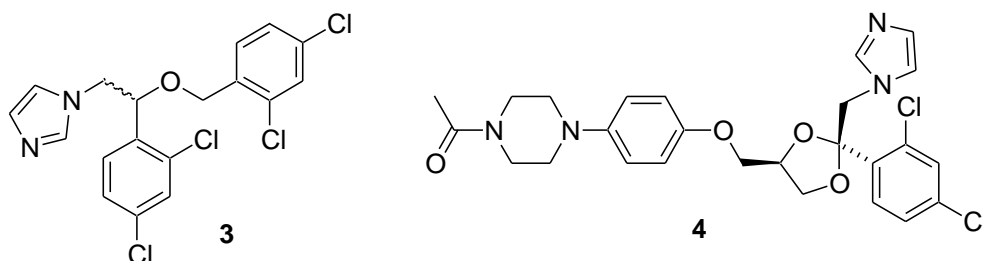
Nežádoucí účinky (trombocytopenie, leukopenie) lze přičíst konverzi na toxický 5-fluorouracil, zřejmě vlivem střevní mikroflóry.² Toxické projevy mohou rovněž nastat při projevech nefrotoxicity současně podávaného amfotericinu B, které vedou ke kumulaci flucytosinu v organismu.



1.1.1.3. Antifungální azoly

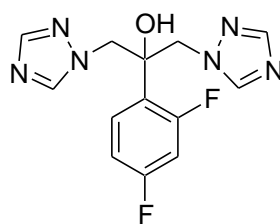
Prvními azolovými antimykotiky vhodnými k systémovému podání byly deriváty imidazolu, které byly do klinické praxe zavedeny v 70. letech. Jedná se především o mikonazol (**3**) a ketokonazol (**4**). Mechanismus účinku všech azolových derivátů spočívá v inhibici cytochrom P450 dependentní lanosterol-14- α -demetylasy, která vede ke snížení syntézy ergosterolu. Antifungální azoly částečně interagují i s lidským cytochromálním enzymovým systémem. Z této jejich vlastnosti vyplývají problémy. Ať už nežádoucí projevy, spojené se syntézou steroidních hormonů (gynekomastie) při dlouhodobém podávání, nebo ovlivnění metabolismu současně podávaných léčiv.

Oba imidazolové deriváty jsou méně toxické než amfotericin B a vyznačují se poměrně širokým spektrem účinku (tj. dermatofyty, kandidy). V dnešní době jsou určeny k terapii závažných systémových mykóz nereagujících na jinou terapii.



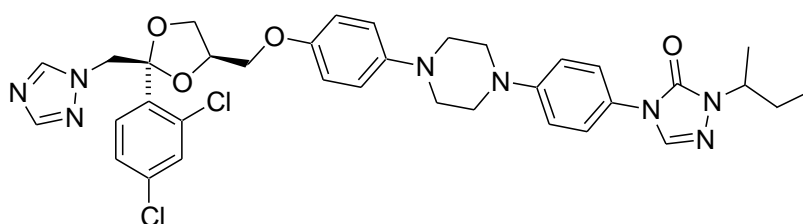
Na konci 80. let dochází k nástupu triazolových derivátů.

Flukonazol (**5**) se vyznačuje nejvýhodnějšími farmakokinetickými parametry ze všech používaných antimykotik. Je ve vodě dobře rozpustný, po perorálním podání se prakticky úplně vstřebává, má dlouhý biologický poločas (kolem 30 hodin), může být tedy podáván v jediné denní dávce a proniká hematoencefalickou bariérou.⁷ Je využitelný pro terapii zejména systémových kandidóz a kryptokokových infekcí, včetně meningitidy.



5

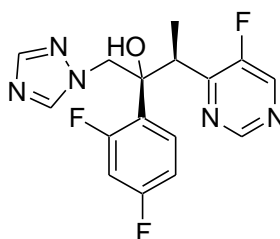
Itrakonazol (6) má oproti flukonazolu širší spektrum účinku, zahrnující i aspergilózy, avšak má horší farmakokinetické vlastnosti.



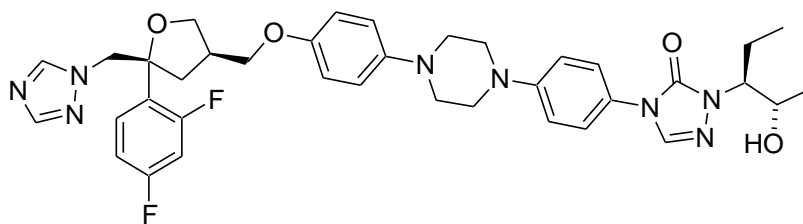
6

Oba deriváty jsou minimálně toxické, a proto mají v terapii systémových mykotických infekcích významnou roli, ačkoli se problémem stává rezistence na triazolové deriváty, která se objevila v souvislosti se širokým používáním triazolů.^{2,3,4,5} Nejčastěji je zmiňována rezistence některých kmenů *C. albicans* na flukonazol u AIDS pacientů s orofaryngeální kandidózou.⁵

V současné době probíhá intenzivní vývoj nových triazolových derivátů. Nově byly do praxe uvedeny flukonazolu strukturně podobný vorikonazol (7) a itrakonazolu podobný posakonazol (8). Oba deriváty mají široké spektrum účinku zahrnujícím i aspergily.^{3,4,7,8,9,10} Posakonazol má rovněž vysokou trypanocidní aktivitu i na kmeny *Trypanosoma cruzi*, rezistentní na nitrofurany a nitroimidazoly.¹¹



7



8

1.1.2. Terapie lokálních mykóz

Pro doplnění systémové terapie lze v klinické praxi často použít lokální terapii shodným nebo i zcela jiným antimykotikem. Lokální terapií se rozumí i místní působení lokálních antimykotik v gastrointestinálním traktu. Speciálním problémem je terapie onychomykóz, pro kterou je použitelné pouze antimykotikum, které proniká nehtovou ploténkou.⁷

Nejčastějšími původci lokálních mykóz jsou keratofilní dermatofyty (*Epidermophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*), které postihují zejména pokožku, nehty a vlasy a *Candida albicans*, která je častou příčinou recidivujících infekcí sliznic, kůže i vnitřních orgánů.

1.1.2.1 Lokální antimykotika se specifickým mechanismem účinku

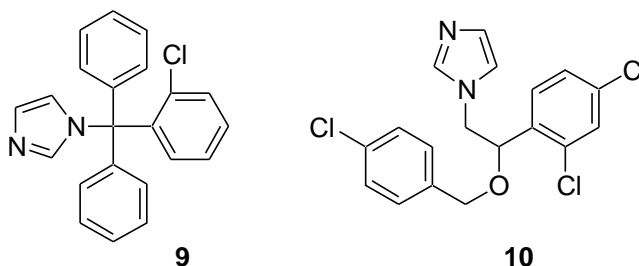
K terapii lokálních mykóz se používají polyenová antimykotika, jejichž struktura a mechanismus účinku jsou blízké amfotericinu B.

Natamycin je polyenový makrolid, který je účinný při vaginální a orální kandidóze. Po perorálním podání se nevstřebá z gastrointestinálního traktu, kvůli své toxicitě se parenterálně nepodává.

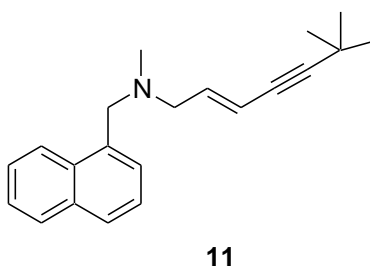
Nystatin je účinný na lokální terapii infekcí způsobených *C. albicans*, proti dermatofytům je neúčinný. Nystatin, stejně jako natamycin, se používá na terapii vaginálních a gastrointestinálních infekcí, po perorálním podání se prakticky nevstřebá a je příliš toxický pro parenterální podání.

Antifungální imidazoly tvoří poměrně početnou skupinu lokálních antimykotik. Klotrimazol (9), ekonazol (10), oxikonazol, bifonazol a ikonazol

mají široké antifungální spektrum, zahrnující dermatofyty (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*) a kvasinky, včetně *C. albicans*². Jejich použití je v dermatologických a gynekologických indikacích. Z důvodu vysoké toxicity a významné biotransformace v organismu, které vedou k nedosažení účinných koncentrací v tkáních, nemohou být použity systémově.



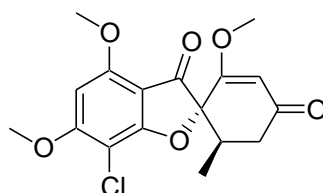
Terbinafin (**11**) je allylaminový derivát, který je možné použít pro systémovou i lokální terapii dermatofytóz. Jeho mechanismus účinku souvisí s bloádou syntézy ergosterolu v důsledku inhibice skvalen epoxidasy. Působí fungicidně na dermatofyty, kvasinky, dimorfní houby a mikromycety. Perorálně podávaným terbinafinem se léčí onychomykózy a kožní infekce nereagující na místní léčbu, rozsáhlé a chronické stavy².



Griseofulvin (**12**) je antibiotikum izolované z *Penicillium griseofulvum* v roce 1939, které bylo uvedeno do klinického používání pro léčbu dermatofytóz v roce 1957². Spektrum účinku zahrnuje dermatofyty, včetně rodů *Epidermophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*. Mechanismus účinku spočívá v destrukci mitotického vřeténka v buňkách parazita. Griseofulvin je ve vodě velmi obtížně rozpustný, lépe se absorbuje v mikronizované a ultramikronizované formě^{2,7}. Absorbovaný griseofulvin má afinitu k infikované

kůži a ukládá se v ní vázaný na keratin. Tím se keratin stává rezistentní k růstu hub a nově rostoucí nehty nebo vlasy jsou již zbaveny infekce.

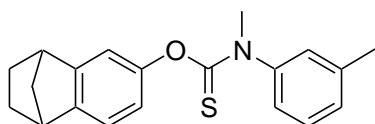
Griseofulvin je indikován u těžkých dermatofytóz postihujících kůži, nehty nebo vlasy, zvláště, jsou-li vyvolány rodem *Trichophyton rubrum*, které špatně odpovídají na jiné terapeutické zásahy.



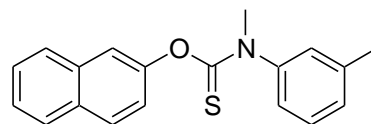
12

Thiokarbamáty představují další skupinu syntetických lokálních antimykotik, jejichž mechanismem účinku je inhibice skvalen epoxidasy, podobně jako u allylaminů.

Tolciclát (13) a tolnaftát (14), jejichž spektrum účinku zahrnuje dermatofyty *Epidermophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*, nejsou účinné proti kandidám, používají se k léčbě kožních dermatofytóz.



13



14

1.1.3. Nejnovější poznatky v oblasti antimykotik

Nové strukturní typy antimykotik jsou získávány hlavně screeningem, kdy jsou látky (izolované z biolog. materiálu, nově syntetizované či již známé a popsané, používané v jiných indikacích) podrobeny testování *in vitro* pro zjištění případné antimykotické účinnosti. Perspektivní molekuly jsou dále synteticky obměňovány s cílem vytvořit strukturu s optimálními farmakologickými vlastnostmi a minimální toxicitou.

Echinokandiny a pneumokandiny jsou jednou z velmi perspektivních skupin antimykotik, jsou to inhibitory β -1,3-glukan synthasy, čímž dochází k blokáde syntézy polysacharidu, který je u některých hub důležitou součástí jejich buněčných stěn. První látkou byl cilofungin⁵, jehož spektrum účinku bylo poměrně úzké. Semisyntetický cyklický lipopeptid získaný z *Glarea lozoyensis*, kaspofungin^{4,12}, vykazuje výhodnější vlastnosti. Tento echinokandin je aktivní *in vivo* vůči kandidózám a aspergilózám.

Další skupinou jsou aureobasidiny, u nichž fungicidní účinek je založen na inhibici inositol-P-ceramid synthasy. V současnosti je z této skupiny nejvíce studován basifungin⁵, cyklický depsipeptid s poměrně širokospektrou *in vivo* účinností, jehož spektrum ale nezahrnuje aspergily.

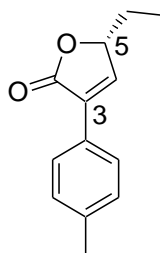
Glykosidická antibiotika ze skupiny sordarinů inhibují translaci nukleových kyselin a taktéž působí fungicidně. Jejich spektrum nezahrnuje aspergily⁶.

1.2. Izolace a biologická aktivita (-)incrustoporinu

V roce 1995 byla publikována v odborné literatuře¹³ studie popisující novou látku, která vykazovala antifungální aktivitu vůči některým druhům rostlinných patogenů a slabý cytotoxický efekt. Tato látka, izolovaná z basidiomycety *Incrustoporia carneola*, byla nazvána incrustoporin. Její struktura byla navržena pomocí spektrálních metod a poté byly syntetizovány oba její enantiomery. Polarimetrickým měřením bylo zjištěno, že přírodní levotočivý izomer má konfiguraci R¹⁴. Jedná se o poměrně jednoduchou strukturu, kde základním strukturním rysem je pětičlenný laktonový kruh s dvojnou vazbou v konjugaci s karbonylovou skupinou, methylfenylový substituent v poloze 3 a ethyl v poloze 5 furanového skeletu.

Incrustoporin *in vitro* testech vykazoval zejména antimykotickou aktivitu a ačkoli testy byly provedeny pouze proti rostlinným patogenům, dalo se předpokládat, že bude aktivní i proti humánním patogenům (podobně jako griseofulvin¹⁵). Z tohoto důvodu je dlouhodobým cílem našeho výzkumu

hledat vztahy mezi strukturou a antimykotickou aktivitou v této skupině sloučenin.

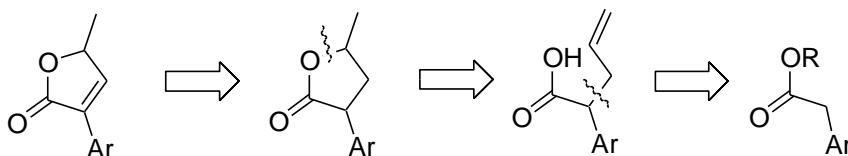


(-) inkrustoporin

1.3. Návrh přípravy derivátů (-)incrustoporinu

Struktura molekuly inkrustoporinu je vhodným cílem pro řadu syntetických obměn a je tedy možné připravit mnoho derivátů. V první fázi jsme vycházeli ze struktury přírodního inkrustoporinu, kde jsme pro zjednodušení syntézy nahradili ethylovou skupinu v poloze 5 za skupinu methylovou a chiralitu přírodní látky jsme zanedbali. Pozornost jsme zaměřili na substituci benzenového jádra různými skupinami s rozdílnými elektronovými vlastnostmi a lipofilitou¹⁶.

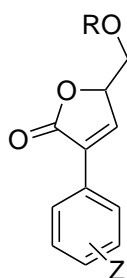
Návrh syntézy pak vyplynul z retrosyntetického rozboru. Prvním stupněm je vznik nasyceného laktonu odstraněním dvojné vazby. V další fázi následuje rozpojení vazby -O-C- za vzniku 2-arylpent-4-enové kyseliny a konečně v posledním stupni odstraněním allylové skupiny dojdeme k esteru aryloctové kyseliny, jakožto výchozí sloučenině pro syntetický směr.



V opačném směru je tedy zřejmé, že prvním krokem bude allylace příslušné aryloctové kyseliny přes enolát jejího esteru, následovaná hydrolýzou esteru. Vzniklá 2-aryl-pent-4-enová kyselina poskytuje cyklizací nasycený

lakton, ve kterém je v posledním kroku zavedena dvojná vazba do konjugace s karbonylovou funkcí. V této fázi výzkumu bylo zjištěno, že nejvyšší antimykotickou aktivitu vykazují deriváty, u kterých je fenyl v poloze 3 substituován halogeny¹⁶.

Ve druhé fázi výzkumu byla u neaktivnějších derivátů z první fáze nahrazena methylová skupina v poloze 5 skupinou hydroxymethylovou, s cílem zvýšit polaritu látky a vytvořit možnost dalších obměn struktury. Například tvorbou acylderivátů¹⁷.



Acylací vzniklého alkoholu jsme obdrželi sloučeninu, která byla svou aktivitou srovnatelná s amfotericinem B. Další možnosti obměn skýtá i samotný laktonový kruh.

Při syntetických obměnách molekuly incrustoporinu bylo zjištěno, že pro aktivitu je nezbytná přítomnost dvojně vazby konjugované s karbonylovou skupinou. Aktivitu zvyšuje substituce fenylového jádra v poloze 3 halogenem. Náhrada arylu za heteroaryl antifungální aktivitu snižuje.

2. CÍL PRÁCE

V minulých letech byla připravena řada látek s potenciální antimykotickou aktivitou odvozených od struktury incrustoporinu. V průběhu testování biologické aktivity látky s označením LNO-18 (3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on)) byly v hodnoceném vzorku zjištěny metabolity této látky s předpokládanou strukturou 3-(4-acetylfenyl)-5-acetylmethyl-2,5-dihydrofuran-2-on (PSM3) a 3-(4-hydroxyfenyl)-5-acetylmethyl-2,5-dihydrofuran-2-on (PSM2).

Cílem mé diplomové práce byla jejich syntéza sloužící k ověření předpokládané struktury.

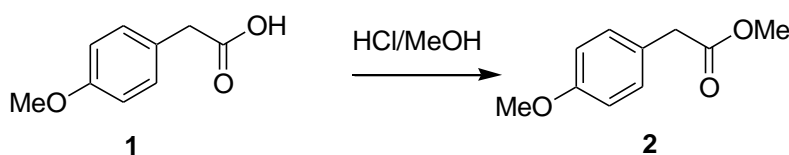
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

3.1. Syntéza 3-(4-hydroxyfenyl)- 5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onu

3.1.1. Esterifikace výchozí látky

Jako výchozí látku jsme použili komerčně dostupnou 4-methoxyfenyloctovou kyselinu (**1**), u níž bylo potřeba ochránit karboxylovou funkci esterifikací.

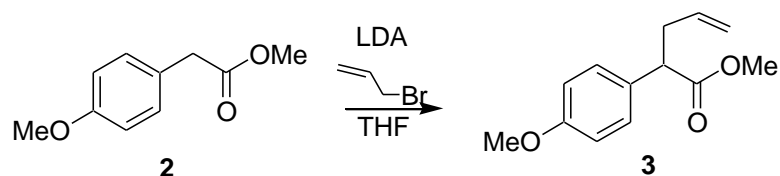
Reakci jsme provedli rozpuštěním kyseliny (**1**) v methanolu za přidání ekvivalentního množství Dowexu 50. Reakční směs jsme intenzivně míchali za laboratorní teploty 24 hodin a poté jsme Dowex odfiltrovali. Výtěžek reakce byl kvantitativní a po přečištění sloupcovou chromatografií na silikagelu byl použit bez charakterizace do další reakce.



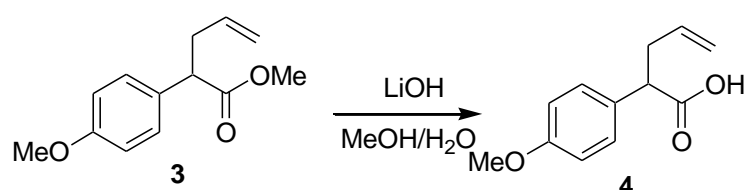
3.1.2. Allylace a hydrolýza

V dalším kroku syntézy došlo nejdříve k deprotonaci methylesteru (**2**) pomocí LDA, jenž byl připraven těsně před použitím reakcí butyllithia a diisopropylaminu. Vzniklý enolát esteru jsme okamžitě podrobili allylaci v α poloze přidáním ekvivalentního množství allylbromidu za vzniku methylesteru 2-(4-methoxyfenyl)pent-4-enové kyseliny (**3**). Celá reakce probíhala v atmosféře argonu za absolutního nepřístupu vzdušné vlhkosti.

Totožnost produktu jsme ověřili pomocí ¹H NMR spektra.

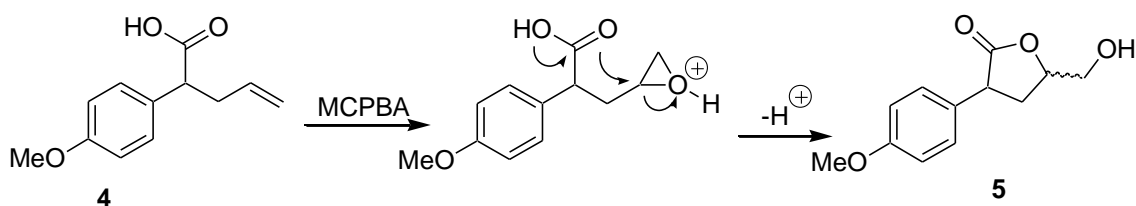


Pro získání odpovídající kyseliny (**4**) jsme provedli hydrolýzu esteru působením hydroxidu lithného ve směsi methanol – voda za laboratorní teploty. Produkt byl následně po odpaření methanolu zředěn vodou, okyselen na pH 1 a vytřepán do ethylacetátu. Výtěžek byl kvantitativní.



3.1.3. Cyklizace

V dalším kroku jsme potřebovali provést cyklizaci 2-(4-methoxyfenyl)pent-4-enové kyseliny (**4**) na lakton se současným zavedením hydroxymethylové skupiny do polohy 5 nasyceného furanového skeletu. Toho jsme docílili působením MCPBA v chloroformu za varu. Reakcí peroxokyseliny s dvojnou vazbou allylové skupiny dochází ke vzniku epoxidu a následné intramolekulární reakci s karboxylovou skupinou za vzniku nasyceného laktonu s hydroxymethylovým substituentem v poloze 5, jehož struktura byla po vyčištění spektrálně potvrzena. Z ¹H a ¹³C NMR spekter vymizely signály uhlíků a vodíků dvojně vazby allylového řetězce a objevily se signály uhlíků a vodíků dvou diastereomerních nasycených laktonů.



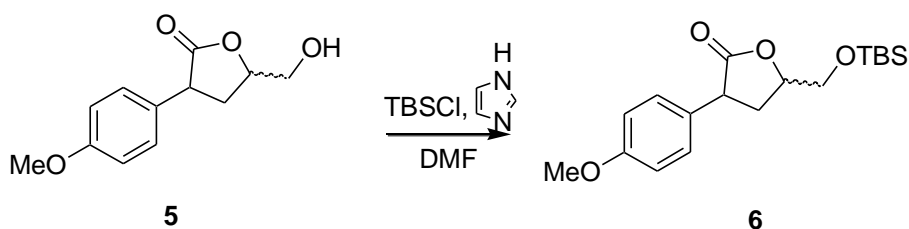
3.1.4. Zavedení dvojné vazby

3.1.4.1. Chránění hydroxylové skupiny

Před zavedením dvojné vazby jsme museli nejprve ochránit primární hydroxylovou skupinu, protože vodík této skupiny by se stal terčem působení silné báze v dalším reakčním kroku. K ochránění hydroxyskupiny jsme použili *tert.*butyldimethylsilylchlorid.

Reakcí křemíku s hydroxymethylskupinou laktonu, v přítomnosti imidazolu jako báze odstraňující vznikající chlorovodík, vznikl 3-(4-methoxyfenyl)-5-*tert.*butyldimethylsilyloxymethyltetrahydrofuran-2-on (**6**).

Po vyčištění jsme produkty charakterizovali pomocí ^1H NMR spekter, ve kterých se objevily 2 singlety vodíků methylových skupin vázaných na křemíkový atom, jejichž signál byl 0,11 a 0,10 ppm a také singlet odpovídající třem methylovým skupinám *tert.*butylu (0,92 ppm).

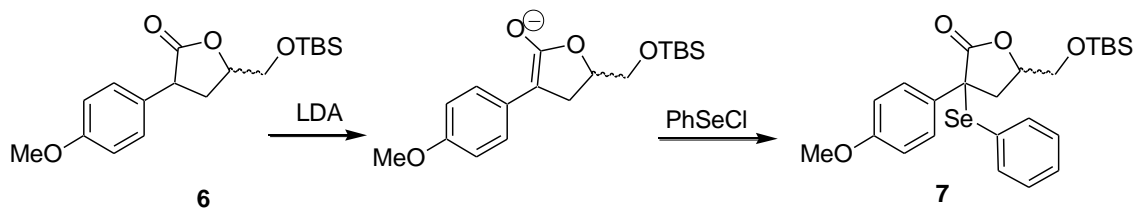


3.1.4.2. Zavedení dvojné vazby

Zavedení dvojné vazby, které bylo poslední fází syntézy požadovaného laktonu s hydroxymethylovým substituentem, spočívalo ve vytvoření enolátu v poloze α ke karbonylu, který reagoval s vhodným elektrofilem, schopným následné eliminace za vzniku dvojné vazby.

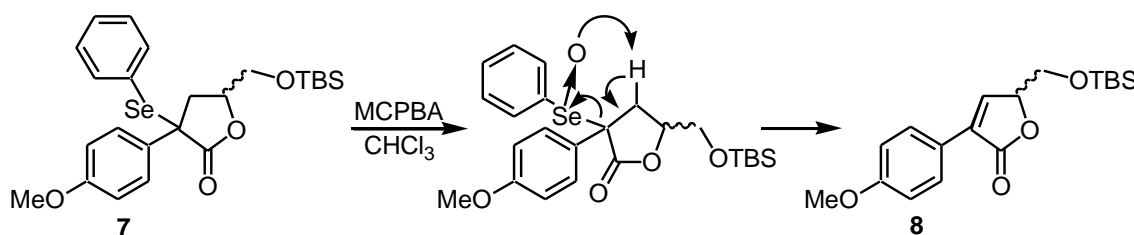
Ke tvorbě enolátu, stejně jako při allylaci, jsme použili LDA. Po jeho vzniku jsme přidali po kapkách nasycený lakton s ochráněnou hydroxymethylovou skupinou v poloze 5 furanonového skeletu (**6**), rozpuštěný v bezvodém THF, a jako elektrofilní činidlo jsme přidali fenylselenenylchlorid. Izolovaný nasycený lakton (**7**) s fenylselenenylovým substituentem v poloze 3

jsme vzhledem k jeho nízké stabilitě po přečištění pomocí sloupcové chromatografie použili bez charakterizace do další reakce.



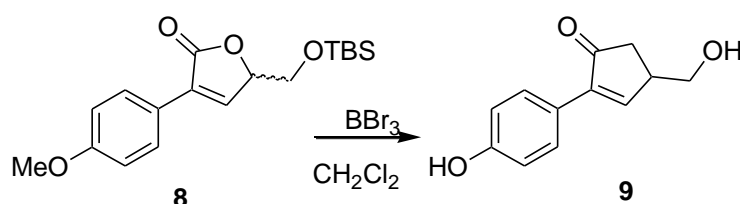
Oxidací selenidu (7) působením MCPBA a spontánní syn-eliminací vzniklého selenoxidu vznikl požadovaný produkt (8).

V NMR spektrech objevily signály uhlíků a vodíků typické pro substituovaný nenasycený pětičlenný laktonový kruh. Jednalo se zejména o signály dvojné vazby (^1H : d 7,61 ppm; ^{13}C : 146,97 a 131,50 ppm).



3.1.4.3. Odstranění chránících skupin

Chránící *tert.*butyldimethylsilylovou a methylovou skupinu jsme odstranili hydrolýzou za použití bromidu boritého v dichlormethanu. Získali jsme tak 3-(4-hydroxyfenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on (9), sloučeninu označenou **PSM1**, jejíž strukturu jsme potvrdili pomocí NMR spekter. V ^{13}C a ^1H NMR spektrech vymizely signály methylů chránících skupin.



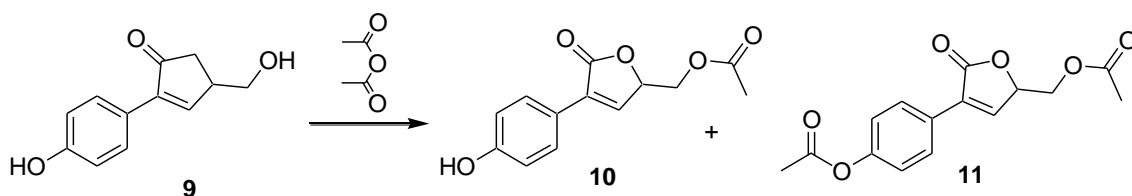
3.2. Esterifikace PSM1

PSM1 (**9**) jsme podrobili reakci s acetanhydridem.

Acetanhydrid reaguje s hydroxymethylovou skupinou v poloze 5 nenasyceného laktonu a také s hydroxyskupinou v poloze 4 fenylového jádra.

Esterifikaci jsme prováděli při 0 °C v prostředí dichlormethanu. Jako bazi odstraňující vznikající chlorovodík a posunující rovnováhu reakce jsme použili pyridin.

Produkty PSM2 (**10**) a PSM3 (**11**) jsme po vyčištění charakterizovali a spektrálně potvrdili jejich strukturu.



4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité experimentální postupy

Výchozí látka (4-methoxyfenyloctová kyselina) byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich a použita bez čištění. THF byl před použitím predestilován z benzofenon ketylu. Diisopropylamin byl predestilován pod argonem z tetrahydridohlinitanu lithného a uchováván nad molekulovými sítý.

Teploty tání všech látek byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. Měření IČ spekter všech látek bylo provedeno na přístroji NICOLET IMPACT 400 v 0,25 ml CDCl_3 nebo CHCl_3 s 15 mg vzorku, popř. v tabletách 400 mg KBr s 0,7 mg vzorku. Hmotnostní spektra látek byla měřena na hmotnostním spektrometru MAGNUM FINNIGAN MAT s nízkou rozlišovací schopností (LRMS) a hmotnostním spektrometru Finnigan LCQ Advantage s iontovým záchytem (MS). NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl_3 nebo $(\text{CD}_3)_2\text{OD}$ při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY - Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro ^1H a při 75 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v *parts per million* (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, qd: kvartet dubletů, dd: dublet dubletů, m: multiplet,), interakční konstanty (Hz) a přiřazení (v některých případech).

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

Meziprodukty a hlavní produkt syntéz byly čištěny sloupcovou chromatografií na Silicagelu 60 (Merck).

Ověření předpokládané struktury bylo provedeno doc. Nobilisem a spolupracovníky na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

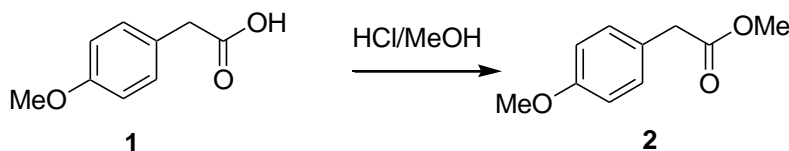
4.2. 3-(4-methoxyfenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on

4.2.1. Methylester 4-methoxyfenyloctové kyseliny

Sumární vzorec: C₁₀H₁₂O₃

Molekulová hmotnost: 180,14

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

4-methoxyfenyloctovou kyselinu (2,1514 g; 12,95 mmol) jsem rozpustila v methanolu (23 ml) a do roztoku přidala Dowex 50 (1,88 g). Reakční směs jsem nechala míchat 48 h za laboratorní teploty a poté jsem ji zfiltrovala přes fritu. Po promytí Dowexu 50 EtOAc jsem rozpouštědla odpařila a produkt přečistila chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze PE: EtOAc 8:2

Teoretický výtěžek: 2,73 g

Praktický výtěžek: kvantitativní

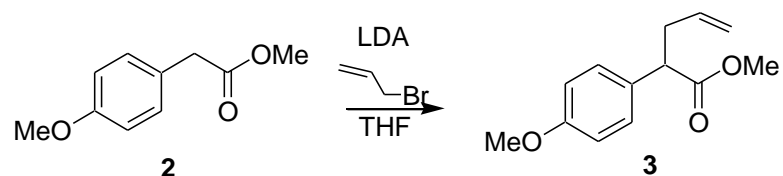
Charakteristika: nažloutlá olejovitá kapalina

4.2.2. Methylester 2-(4-methoxyfenyl)pent-4-enové kyseliny

Sumární vzorec: C₁₃H₁₆O₃

Molekulová hmotnost: 220

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Vyžíhanou vychladlou Schlenkovu baňku jsem ponechala v atmosféře argonu, do níž jsem přidala bezvodý THF (100 ml), reakční směs jsem ochladila na -10°C a poté jsem přidala 1,5 M roztok LDA v THF (10, 35 ml; 15,52 mmol). Po ochlazení na -60°C a za stálého míchání jsem po 10 minutách po kapkách přidala substrát (2) (2,54 g; 23,95 mmol) rozpuštěný v THF. Po 30 minutách při -60°C jsem přidala allylbromid (1,38 ml; 14,81 mmol) a směs pomalu za stálého míchání, ohřála na laboratorní teplotu během 1 hodiny. Reakční směs jsem vytřepala mezi nasycený roztok NH_4Cl a EtOAc. Po vysušení organické fáze a odpaření rozpouštědla jsem vzniklý ester (3) přečistila sloupcovou chromatografií s použitím mobilní fáze PE: EtOAc 9:1.

Teoretický výtěžek: 3,10 g

Praktický výtěžek: 2,85 g (92 %)

Charakteristika: bezbarvá olejovitá kapalina

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26 – 7.20 (2H, m, AA'BB'), 6.88 – 6.83 (2H, m, AA'BB'), 5.79 – 5.64 (1H, m, H4), 5.11 – 4.97 (2H, m, H5), 3.79 (3H, s, $-\text{OCH}_3$ Ar), 3.65 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.60 (1H, dd, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz, H2), 2.86 – 2.73 (1H, m, H3a), 2.55 – 2.43 (1H, m, H3b)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 173.93, 158.63, 135.19, 130.46, 128.79, 116.81, 113.90, 55.23, 51.96, 50.53, 37.68

IR (CDCl_3) ν_{max} 1438, 1512, 1584, 1611, 1641, 1731, 2838, 2959, 3004 cm^{-1}

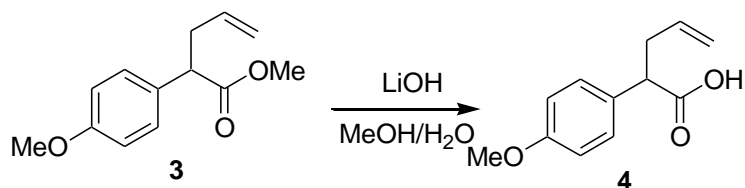
LRMS 221 ($\text{M}^+ + \text{H}$, 4) 180 (9), 179 (100) 161 (17), 151 (35), 135 (4), 115 (5), 91 (6), 77 (3), 63 (3), 51 (4)

4.2.3. Kyselina 2-(4-methoxyfenyl)pent-4-enová

Sumární vzorec: C₁₂H₁₄O₃

Molekulová hmotnost: 206

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Ester (3) jsem rozpustila ve směsi methanol : voda 3:1 (30 ml) a k roztoku jsem přidala 53,5% LiOH. nH₂O (0,8218 g). Hydrolýza probíhala za laboratorní teploty 24 hodin. Poté jsem odpařila methanol, směs zředila vodou a okyselila 20% HCl na pH 1. Po přidání 5 g NaCl jsem produkt 3x vytřepala do EtOAc a následně jsem odpařila rozpouštědlo.

Teoretický výtěžek: 2,66 g

Praktický výtěžek: kvantitativní

Charakteristika: bílá krystalická látka, t.t. 79 – 81 °C

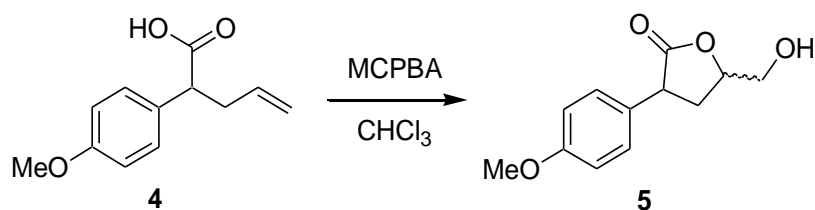
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.27 – 7.21 (2H, m, AA'BB'), 6.89 – 6.83 (2H, m, AA'BB'), 5.79 – 5.64 (1H, m, H4), 5.12 – 4.98 (2H, m, H5), 3.79 (3H, s, -OCH₃ Ar), 3.59 (1H, t, J₁ = 7.7 Hz, H2), 2.86 – 2.73 (1H, m, H3a), 2.56 – 2.44 (1H, m, H3b)

4.2.4. 3-(4-methoxyfenyl)-5-hydroxymethyltetrahydrofuran-2-on

Sumární vzorec: C₁₂H₁₄O₄

Molekulová hmotnost: 222

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Kyselinu (**4**) (2,46 g; 11 mmol) jsem rozpustila v CHCl_3 (35 ml) a do roztoku jsem přidala 74% MCPBA (3,55 g; 15,14 mmol). Reakční směs jsem zahřívala k varu pod zpětným chladičem 2,5 hodiny, poté směs zředila EtOAc a roztok vytřepala NaHCO_3 . Organickou fází jsem vysušila, odpařila rozpouštědla a následně vzniklý lakton (**5**) přečistila na sloupci gradientovou elucí PE: ether: CH_3COOH 90:10:1 do vymytí MCPBA a poté PE: ether 8:2 až čistý ether.

Teoretický výtěžek: 2,65 g

Praktický výtěžek: 1,47 g (55%)

Charakteristika: bezbarvá olejovitá kapalina

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ A: 7.24 – 7.18 (2H, m, AA'BB'), 6.91 – 6.85 (2H, m, AA'BB'), 4.73– 4.65 (1H, m, H5), 4.04 – 3.96 (1H, m overlapped, H3), 3.99 – 3.83 (1H, m overlapped, H6a), 3.78 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.71 – 3.63 (1H, m overlapped, H6b), 2.68 – 2.53 (1H, m overlapped, H4a), 2.45 – 2.25 (1H, m overlapped, H4b)
B: 7.21 – 7.14 (2H, m, AA'BB'), 6.91 – 6.85 (2H, m, AA'BB'), 4.64– 4.54 (1H, m, H5), 3.99 – 3.83 (1H, m overlapped, H3), 3.99 – 3.83 (1H, m overlapped, H6a), 3.78 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.71 – 3.63 (1H, m overlapped, H6b), 2.68 – 2.53 (1H, m overlapped, H4a), 2.45 – 2.25 (1H, m overlapped, H4b)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ A: 178.50, 158.84, 129.14, 128.39, 114.27, 78.73, 64.14, 55.22, 45.13, 32.70

B: 177.52, 158.93, 129.45, 128.75, 114.17, 78.65, 63.13, 55.22, 46.17, 32.25

IR (CDCl_3) ν_{max} 1252, 1299, 1339, 1456, 1464, 1515, 1614, 1770, 2839, 2937, 2957 cm^{-1}

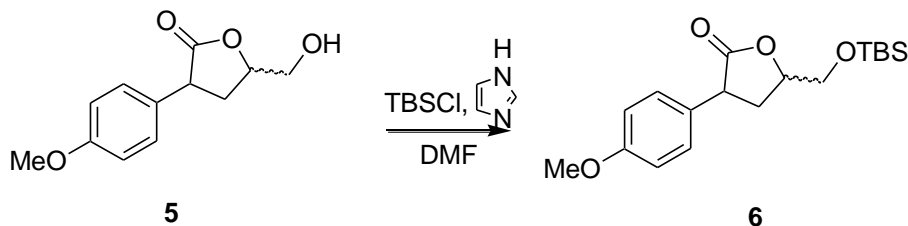
LRMS 222 (M^+ , 100) 204 (2), 192 (2), 177 (10), 163 (12), 159 (12), 147 (47), 134 (15), 119 (8), 115 (9), 105 (7), 103 (7), 91 (15), 77 (4), 65 (5), 51 (5)

4.2.5. 3-(4-methoxyfenyl)-5-*terc*.butyldimethylsilyloxy-methyltetrahydrofuran-2-on

Sumární vzorec: C₁₈H₂₈O₄Si

Molekulová hmotnost: 336,47

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Lakton (**5**) (0,465 g; 6,60 mmol) jsem rozpustila v DMF (5 ml), přidala TBSCl (0,64 g; 9,40 mmol) a imidazol (0,3 g; 9,42 mmol) a směs ponechala za stálého míchání při laboratorní teplotě 24 h. Poté jsem směs vytřepala mezi EtOAc a 5% roztok HCl nasycený NaCl a po vysušení organické fáze a odpaření rozpouštědel jsem produkt (**6**) přečistila sloupcovou chromatografií s PE jako mobilní fází.

Teoretický výtěžek: 2,21 g

Praktický výtěžek: 0,8 g (37%)

Charakteristika: bezbarvá krystalická látka, t.t. 45 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ A: 7.22 - 7.15 (2H, m, AA'BB'), 6.92 - 6.85 (2H, m, AA'BB'), 4.69 - 4.62 (1H, m, H5), 4.00 (1H, t, J = 9.6 Hz, H3), 3.94 (1H, dd, J₁ = 3.1 Hz, J₂ = 11.3 Hz, H6a), 3.79 (3H, s, -OCH₃), 3.75 (1H, dd, J₁ = 2.8 Hz, J₂ = 11.3 Hz, H6b), 2.79 - 2.61 (1H, m, H4a), 2.48 - 2.36 (1H, m, H4b), 0.92 (9H, s, *t*Bu), 0.11 (3H, s, SiMe), 0.10 (3H, s, SiMe)

B: 7.24 - 7.18 (2H, m, AA'BB'), 6.92 - 6.86 (2H, m, AA'BB'), 4.59- 4.50 (1H, m, H5), 3.95 (1H, dd, J₁ = 3.7 Hz, J₂ = 11.4 Hz, H6a), 3.84 (1H, dd overlapped, J₁ = 9.3 Hz, J₂ = 12.4 Hz, H3), 3.80 (3H, s overlapped, -OCH₃), 3.78 (1H, dd overlapped, J₁ = 3.9 Hz, J₂ = 11.4 Hz, H6b), 3.71 - 3.63 (1H, m overlapped, H6b),

2.66 – 2.55 (1H, m, H4a), 2.43 – 2.30 (1H, m, H4b), 0.91 (9H, s, *t*Bu), 0.10 (6H, s, SiMe₂)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ A: 177.89, 158.85, 129.82, 128.87, 114.27, 77.83, 65.06, 55.26, 45.14, 33.30, 25.79, 18.21, -5.52, -5.61

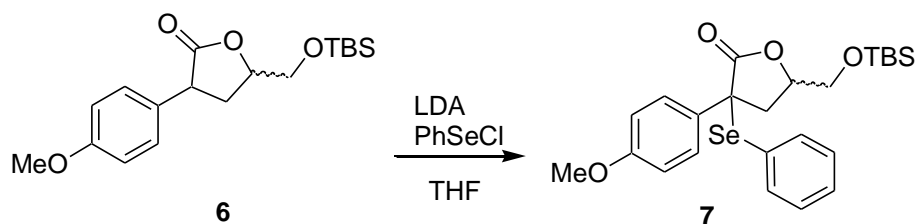
B: 177.10, 158.96, 128.95, 114.23, 78.09, 63.59, 55.27, 46.18, 32.85, 25.81, 18.30, -5.32, -5.44

4.2.6. 3-(4-methoxyfenyl)-5-*terc*.butyldimethylsilyloxymethyl-3-fenylselenyl-tetrahydrofuran-2-on

Sumární vzorec: C₂₄H₃₂O₄SeSi

Molekulová hmotnost: 491,52

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Do vyžíhané Schlenkovy nádoby v atmosféře argonu jsem vpravila LDA (0,35 ml; 3,45 mmol) v THF (5ml) při 0°C. Po ochlazení na -60°C jsem po 10 minutách přidala roztok látky (6) (0,8 g; 2,37 mmol) v THF (2 ml). Po 30 minutách při -50°C jsem přidala PhSeCl (0,596 g; 3,11 mmol) v bezvodém THF (1 ml) a směs ponechala za stálého míchání ohřát na laboratorní teplotu po dobu 2 h. Reakční směs jsem poté vytřepala mezi nasycený roztok NH₄Cl a EtOAc. Po vysušení organické fáze a odpaření rozpouštědla jsem produkt (7) rychle přečistila na sloupci silikagelu mob. fází PE: ether (95:5) a bez charakterizace jsem ho použila do další reakce.

Teoretický výtěžek: 1,17 g

Praktický výtěžek: 1,14 g (97 %)

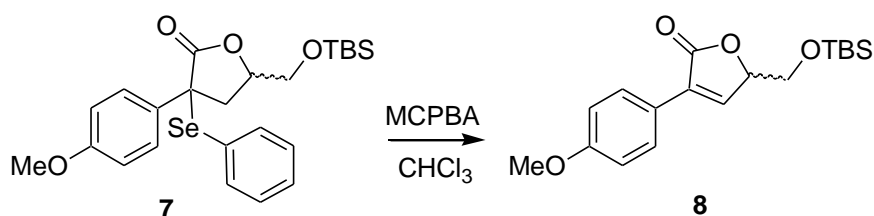
Charakteristika: nažloutlá olejovitá kapalina

4.2.7. 3-(4-methoxyfenyl)-5-*terc*.butyldimethylsilyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on

Sumární vzorec: C₁₈H₂₆O₄Si

Molekulová hmotnost: 334,47

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Lakton (**7**) (1,14 g; 2,37 mmol) jsem rozpustila v CHCl₃ (10 ml), k roztoku přidala 57% MCPBA (1,44g; 4,74 mmol) a směs míchala za laboratorní teploty po dobu 24 h. Reakční směs jsem poté 3x vytřepala 5% NaHCO₃. Po vysušení organické fáze jsem odpařila rozpouštědla a produkt (**8**) přečistila sloupcovou chromatografií s použitím PE jako mobilní fáze.

Teoretický výtěžek: 0,77 g

Praktický výtěžek: 0,1 g (13%)

Charakteristika: žlutá krystalická látka, t.t. 64 - 66 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.85 - 7.78 (2H, m, AA'BB'), 7.45 (1H, d, J = 1.9 Hz, H4), 6.96 - 6.90 (2H, m, AA'BB'), 5.09 (1H, td, J₁ = 1.9 Hz, J₂ = 5.1 Hz, H5), 3.96 (1H, dd, J₁ = 5.1 Hz, J₂ = 10.7 Hz, H6a), 3.84 (3H, s overlapped, -OCH₃), 3.83 (1H, dd overlapped, J₁ = 5.1 Hz, J₂ = 10.7 Hz, H6b), 0.87 (9H, s, *t*Bu), 0.08 (3H, s, SiMe), 0.07 (3H, s, SiMe)

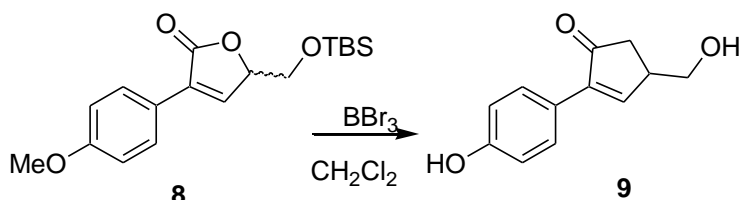
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.86, 160.38, 143.51, 131.98, 128.43, 122.19, 114.01, 80.50, 63.50, 55.31, 25.72, 18.19, -5.44, -5.49

4.2.8.3-(4-hydroxyfenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on

Sumární vzorec: C₁₂H₁₂O₄

Molekulová hmotnost: 220,07

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Lakton (**8**) (0,1 g; 0,3 mmol) jsem rozpustila v CH₂Cl₂ a po kapkách jsem přidala roztok BBr₃ (1,97 mmol) v CH₂Cl₂. Reakční směs jsem míchala při -50 °C 50 minut a poté jsem ji nechala ohřát na laboratorní teplotu a míchala další hodinu. Reakci jsem zastavila přidávkem vody. Směs jsem zředila EtOAc a vytřepala nasyceným vodným roztokem NaCl. Produkt (**9**) jsem vysušila pomocí Na₂SO₄, odpařila rozpouštědla a přečistila sloupcovou chromatografií mobilní fází PE:EtOAc 4:6

Teoretický výtěžek: 0,067 g

Praktický výtěžek: 0,058 g (87%)

Charakteristika: bílá krystalická látka, t.t. 116 - 117 °C

¹H NMR: (300 MHz, CD₃OD) δ 7.78-7.71 (2H, m AA', BB', H2', H6'), 7.60 (1H, d, J=1.9 Hz, H4), 6.84-6.77 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 5.12-5.07 (1H, m, H5), 3.90 (1H, dd, J=12.4 Hz, J=3.8 Hz, OCH₂), 3.73 (1H, dd, ²⁸³J=12.4 Hz, J=4.9 Hz, OCH₂)

¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 174.4, 159.7, 145.0, 133.0, 129.5, 122.4, 116.3, 83.2, 63.0

IR (KBr) ν_{max} 3331 (m), 1723 (s)

MS (EI) : m/z 206 M⁺, 189, 188, 175, 147, 131, 119, 118

4.3. 3-(4-hydroxyfenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on (PSM2) a 3-(4-acetyloxyfenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on (PSM3)

Sumární vzorce:



Molekulové hmotnosti:

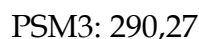
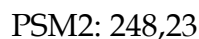
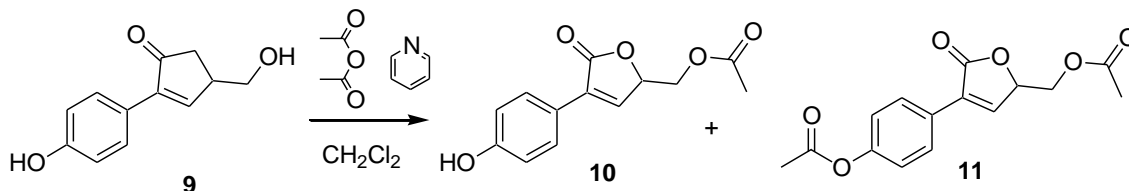


Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Lakton (9) (0,058 g; 0,56 mmol) jsem rozpustila v CH₂Cl₂ a po kapkách jsem při 0 °C přidala acetanhydrid (0,027 ml; 0,28 mmol) a pyridin (0,045 ml; 0,56 mmol) v CH₂Cl₂ (10 ml). Poté, co veškerá výchozí látka zreagovala (zjištěno pomocí TLC), jsem odpařila rozpouštědla, zředila pomocí EtOAc a vytřepala nasyceným vodným roztokem NaCl. Produkt jsem vysušila pomocí Na₂SO₄, odpařila rozpouštědla a přečistila sloupcovou chromatografií mobilní fází PE:EtOAc 6:4.

Teoretický výtěžek: 0,0705 g

Praktický výtěžek: 0,06 g (85%)

Charakteristika: bezbarvá olejovitá látka

PSM2:

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.95-7.85 (2H, m AA', BB', H2', H6'), 7.48 (1H, d, J=1.9 Hz, H4), 7.20-7.10 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 5.30-5.18 (1H, m, H5), 4.46-4.30 (2H, m, OCH₂), 2.32 (3H, s, CH₃)

PSM3:

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.82-7.72 (2H, m AA', BB', H2', H6'), 7.38 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H4), 6.90-6.81(2H, m, AA', BB', H3', H5'), 5.30-5.18 (1H, m, H5), 4.46-4.30 (2H, m, OCH₂), 2.31 (3H, s, CH₃), 2.06 (3H, s, CH₃)

5. ZÁVĚR

Byly nasyntetizovány látky PSM2 (**10**) (3-(4-hydroxyfenyl)-5-acetylmethyl-2,5-dihydrofuran-2-on) a PSM3 (**11**) (3-(4-acetylfenyl)-5-acetylmethyl-2,5-dihydrofuran-2-on), které potvrdily strukturu metabolitů nacházejících se v moči pokusných zvířat po intraperitoneálním podání potencionálního antimykotika LNO- 18 (3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on)).

LITERATURA

1. Farmaceutická chemie 4, Hartl J. a kol. **2006**, 35 - 48
2. Katzung B., Basic & Clinical Pharmacology, G.,Ed., Appleton & Lange, Stamford, **1998**, 780-785
3. Fromtling R.A. *Drug News & Perspectives* **1997**, 10, 170-178
4. Graybill J.R. *Clinical Infections Diseases* **1996**, 22 (Suppl 2), S 112-118
5. Di Domenico B. *Current Opinion in Microbiology* **1997**, 2, 509-515
6. Perfect J.R., Schell W.A. *Clinical Infectious Diseases* **1996**, 22 (Suppl 2), S 112-118
7. Remedia Compendium, 2. vyd., Ed. Suchopár J., Panax, Praha, **1997**, 259-263, 522-527
8. Cacciapuoti A., Loebengerg D., Corcoran E., Menzel F. Jr., Moss E. L. Jr., Norris C., Michalski M., Raynor K., Halpern J., Mendrick C., Arnold B., Antonacci B., Parmegiani R., Yarosh-Tomaine T., Miller G. H., Hare R. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 2017-2022
9. Patterson T.F., *J.Chemother.* **1999**, 11, 504-512
10. Manavathu E. K., Cutright J., Chandrasekar P.H. *J .Clin. Microbiol.* **1999**, 37, 558-561
11. Molina J., Martins-Filho O., Brener Z. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 150-155
12. Abruzzo G. K., Gill C. J., Flattery A. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 2310- 2318
13. Zapf S., Anke T., Sterner O., *Acta Chem. Scand.* **1995**, 49, 233- 234
14. Yajima A., Mori K. *Liebigs Ann.* **1996**, 1091- 1093
15. De Carli L., Larizza L. *Mutation Res.* **1998**, 195, 91-126
16. Pour M., Špulák M., Balšánek V., Kuneš J., Buchta V., Waisser K., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **2000**, 10, 1893- 1895
17. Pour M., Špulák M., Buchta V., Kubanová P., Fáková H., Koudelka P. Pourová H., Schiller R., Vopršalová M., Wsól V. *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 2701-2706