

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

**KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**PŘÍPRAVA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA  
3,4,5 – TRISUBSTITUOVANÝCH FURANONŮ**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2011**

**Ondřej KOTEK**

Za vedení, trpělivost, všestrannou pomoc a rady při vypracování diplomové práce děkuji Mgr. P. Šenelovi, PhD, PharmDr. M. Špulákovi, PhD, prof. RNDr. M. Pourovi, PhD., Mgr. Jiřímu Kratochvílovi. Dále děkuji doc. PharmDr. J. Kunešovi, Csc. za potvrzení struktur. A v neposlední řadě Mgr. M. Vejsově a Idě Dufkové za stanovení antifungální a antibakteriální aktivity.

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

.....

Ondřej Kotek

## **ABSTRAKT**

V rámci této diplomové práce byla připravena série několika 3,4,5-trisubstituovaných 2,5-dihydrofuran-2-onů odvozených od struktury 3-(4-halofenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on. Připravené látky byly podrobeny testům na antifungální, antibakteriální a cytostatickou aktivitu. Nejvýznamnější byla antibakteriální aktivita 4-fenylderivátů, která byla zároveň doprovázena aktivitou cytostatickou.

## **ABSTRACT**

Within the framework of this Thesis, a series of several 3,4,5-trisubstituted 2,5-dihydrofuran-2-ones derived from the structure of 3-(halophenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-one was prepared, and the compounds were evaluated for antifungal, antibacterial and cytostatic activity. The presence of phenyl at C4 led to a significant antibacterial effect, which was accompanied by cytostatic activity.

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| <b>ABSTRAKT</b> .....  | 4  |
| PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK.....   | 6  |
| <b>1. ÚVOD</b> .....   | 7  |
| 1.1. Přehled systémově používaných antifungálních látek.....                           | 7  |
| 1.2. Hledání nových struktur.....  | 10 |
| 1.3. Inkrustoporin a jeho analoga.....   | 11 |
| <b>2. CÍL PRÁCE</b> .....  | 15 |
| <b>3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM</b> .....  | 16 |
| 3.1. Syntéza 4-substituovaných 5-acyloxymethyl-3-halofenyl-2,5-dihydrofuran-2-onů..... | 16 |
| 3.1.1. Tvorba esterů bromfenyloctové kyseliny.....                                     | 17 |
| 3.1.2. Cyklizace esterů bromfenyloctové kyseliny.....                                  | 17 |
| 3.1.3. Zavedení hydroxymethylové skupiny.....  | 18 |
| 3.1.4. Acetylace hydroxylové skupiny.....  | 20 |
| 3.2. Biologická aktivita .....   | 22 |
| 3.2.1. Antibakteriální aktivita .....  | 22 |
| 3.2.2. Antifungální aktivita .....   | 26 |
| 3.2.3. Cytostatická aktivita .....   | 28 |
| <b>4. ZÁVĚR</b> .....  | 30 |
| <b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....  | 31 |
| 5.1. Obecné experimentální postupy .....   | 31 |
| 5.2. Použité experimentální postupy při biologickém hodnocení.....                     | 31 |
| 5.2.1. Hodnocení antifungální aktivity .....   | 31 |
| 5.2.2. Hodnocení antibakteriální aktivity .....  | 32 |
| 5.2.3. Hodnocení cytostatické aktivity .....   | 33 |
| 5.3. Syntéza .....   | 34 |
| <b>6. LITERATURA</b> .....   | 46 |

## PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

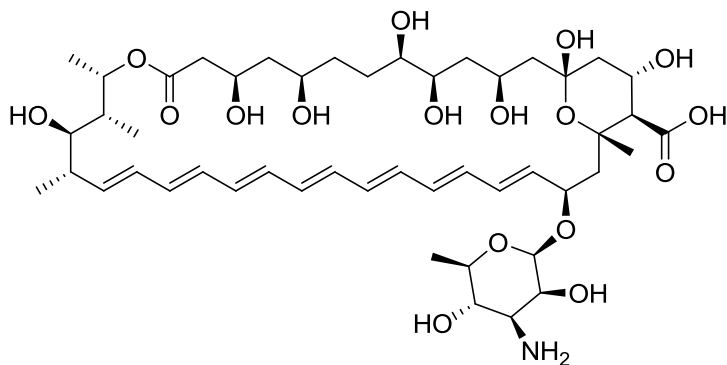
|       |  |
|-------|--|
| Ac    | acetyl                                       |
| DMSO  | dimethylsulfoxid                             |
| IC    | inhibiční koncentrace                        |
| IR    | infračervená spektroskopie                   |
| LDA   | diisopropylamid lithný                       |
| LRMS  | hmotnostní spektroskopie s nízkým rozlišením |
| MIC   | minimální inhibiční koncentrace              |
| $M_r$ | relativní molekulová hmotnost                |
| NMR   | nukleární magnetická rezonance               |
| Ph    | fenyl  |
| Pyr   | pyridin                                      |
| $R_f$ | retenční faktor                              |
| SA    | <i>Staphylococcus aureus</i>                 |
| SE    | <i>Staphylococcus epidermidis</i>            |
| TEA   | triethylamin                                 |
| THF   | tetrahydrofuran                              |
| TLC   | tenkovrstvá chromatografie                   |

# 1. ÚVOD

## 1.1. Přehled systémově používaných antifungálních látek

Systémová mykotická onemocnění jsou problémem, se kterým se setkáváme stále častěji, zejména u hospitalizovaných pacientů. Zvýšená morbidita a mortalita mykotických infekcí je zapříčiněna zvyšující se náchylností k těmto patogenům. Jedná se zejména o pacienty léčené imunosupresivy, cytostatiky, širokospektrými antibiotiky a léky potlačujícími infekci HIV.<sup>1,2,3,4</sup>

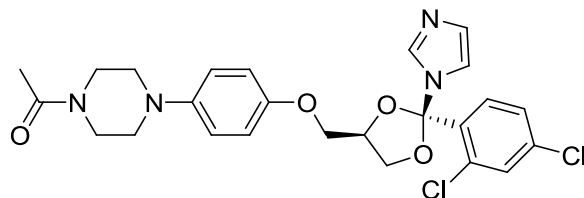
Jednou ze skupin klasických antimykotik používaných v terapii je skupina látek souhrnně označovaná jako polyeny<sup>5</sup>. Ze struktury je pro tato antimykotika specifická skupina konjugovaných dvojných vazeb. Mechanismem jejich účinku je vytvořením pórů v membráně hub vazbou na ergosterol, jehož důsledkem je iontový rozvrat a následná smrt buňky. Systémově se však používá jen Amfotericin B. Natamycin a nystatin se kvůli své toxicitě používají pouze lokálně.<sup>5,6</sup>



Obr. 1 Amfotericin B

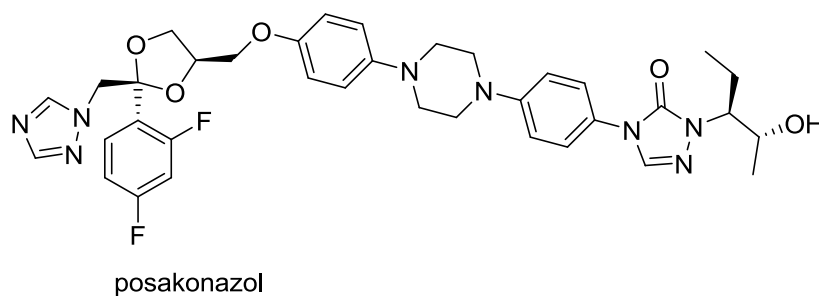
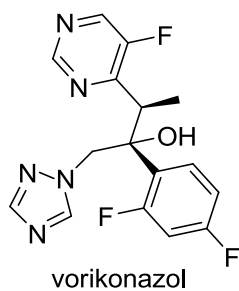
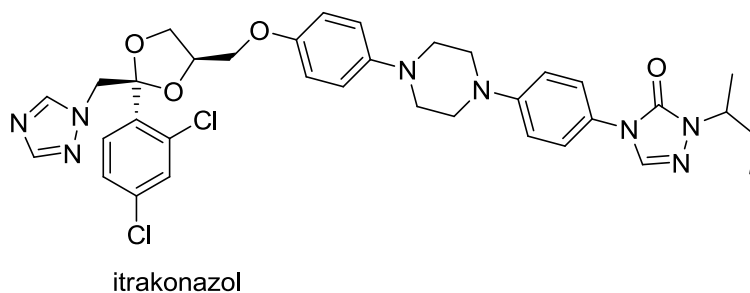
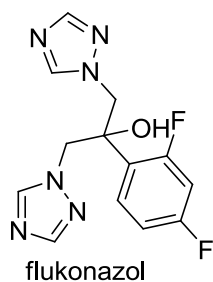
Další skupinou systémových antimykotik jsou azoly, které se dělí na starší diazoly a novější triazoly<sup>5</sup>. Mechanismem jejich účinku je inhibice cytochrom P450 - dependentní lanosterol-14 $\alpha$ -demethylasy, což vede ke snížení produkce ergosterolu, který je nezbytnou součástí buněčných membrán hub. Nežádoucí účinky těchto látek spočívají v inhibici lidských cytochromálních enzymů.<sup>5</sup> V současné době se ze

skupiny diazolů používá zejména ketokonazol a mikonazol. Ostatní je možné kvůli nežádoucím účinkům podat jen lokálně.



Obr. 2 Ketokonazol

Novější podskupinou azolových antimykotik jsou triazoly. Tyto látky mají dobrou farmakokinetiku, téměř kompletně se vstřebávají, proto jsou vhodné pro perorální systémové užití.<sup>5</sup> Vzhledem k jejich širokému používání na ně však brzy vznikla rezistence. Příkladem těchto antimykotik je flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol a ravukonazol. Vzhledem k rychlému rozvoji rezistence jsou struktury azolů dále obměňovány. Dalšími azolovými antimykotiky, které jsou nyní ve stádiu klinických studií jsou ravukonazol, isavukonazol, albakonazol.<sup>7,8</sup>



Obr. 3 Přehled azolových antimykotik



Tabulka 1. Porovnání *in vitro* antifungální aktivity ( $IC_{80}$  [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]) flukonazolu a aktivity ( $IC_{95}$  [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]) amfotericinu B (hodnoty MIC stanoveny po 48 h)<sup>6,12</sup>

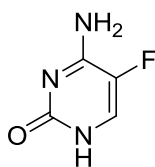
|            | CA1 <sup>a</sup> | CK2 <sup>b</sup> | CT <sup>c</sup> | CG <sup>d</sup> | TB <sup>e</sup> | AF <sup>f</sup> | AC <sup>g</sup> |
|------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>FLU</b> | 2                | >50              | 5               | >50             | 9               | >50             | >50             |
| <b>AmB</b> | 0,06             | 0,18             | 0,11            | 0,09            | 1,80            | 0,23            | 2,16            |

<sup>a</sup>*Candida albicans* ATCC 44859, <sup>b</sup>*C. krusei* E28, <sup>c</sup>*C. tropicalis* 1 56, <sup>d</sup>*C. glabrata* 20/1, <sup>e</sup>*Trichosporon beigeli* 1188, <sup>f</sup>*Aspergillus fumigatus* 231, <sup>g</sup>*Absidia corymbifera* 272

Z Tab. 1 vyplývá, že účinkem je o několik řádů biologicky aktivnější amfotericin B, ale zejména kvůli farmakokinetice a nežádoucím účinkům je výhodnější používat azolová antimykotika.<sup>5</sup>

Poslední skupinou antifungálních látek se systémovým použitím jsou echinokandiny. Strukturou se jedná o cyklické hexapeptidy s postranním lipofilním řetězcem. Získávají se polosynteticky fermentací některých fungálních kmenů (*Aspergillus nidulans*, *Zalerion arboricola*, *Coeloma empetri*, *Glarea lozoyensis*).<sup>9,10,11</sup> Mechanismem jejich účinku je inhibice syntézy  $\beta$ -1,3-glukanu, důležité součásti buněčné stěny.<sup>11</sup> Účinkují fungistaticky i fungicidně. Tyto látky jsou lidským organismem dobře snášeny, metabolizují je jiným než cytochromovým systémem a navíc napadají struktury, které lidský organismus postrádá.

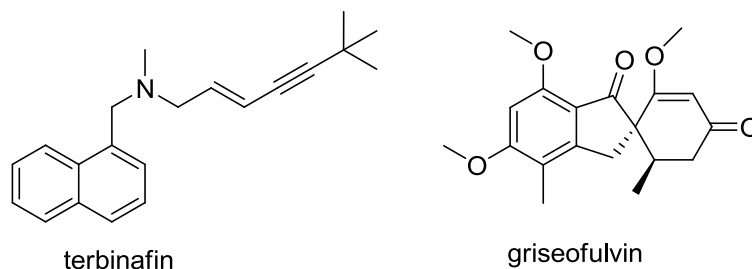
Dalším antimykotikem pro systémové užití je flucytosin. Jde o látku, která se v houbové buňce přemění na 5-fluorouracil a následně na jeho fosfát. Takto vzniká falešný metabolit, který se zabuduje do struktury nově vznikající nukleové kyseliny. Vzniká na něj však velmi snadno rezistence, proto se užívá vždy v kombinaci s jinými antimykotiky.<sup>5</sup>



Obr. 4 Fluorouracil

Terbinafin je také syntetické antimykotikum, které zasahuje do syntézy ergosterolu inhibicí skvalenepoxidázy.<sup>5</sup> Griseofulvin se dnes již příliš nepoužívá. Působí jen na

dermatofyty a to mechanismem destrukce dělicího vřeténka čímž je znemožněno dělení buněk.<sup>5</sup>



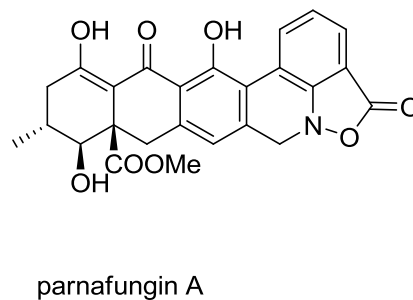
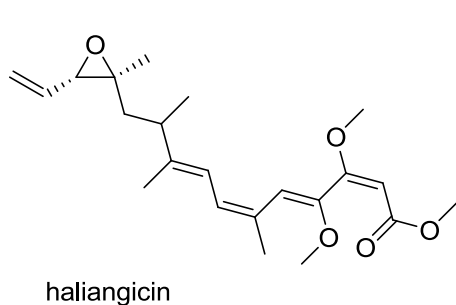
Obr. 5. Terbinafin a griseofulvin

## 1.2. Hledání nových struktur

V současné době jsou antimykotika používána ve velké míře a to nejen v nemocniční léčbě mykóz, ale také jako následná péče po jiných nemocech (zhoubné nádory, transplantace), jejichž terapie s sebou přináší oslabení imunitního systému s nutností následného nasazení léčby antibiotiky či antimykotiky. Jak bylo řečeno výše, azolová antimykotika představují dnes standardní léčbu mykóz, ale problémem však zůstává narůstající rezistence patogenů. Obměnou jejich struktury<sup>10</sup> lze rezistenci potlačit, nicméně pouze dočasně, protože se v zásadě jedná o tytéž struktury s týmž mechanismem účinku. Je tedy nutné hledat nové skupiny antimykotik, které budou mít vysokou aktivitu a pokud možno nový mechanismus účinku.

Nepochybnou možností je v tomto směru hledání nových potenciálně aktivních substancí mezi přírodními látkami<sup>13</sup>.

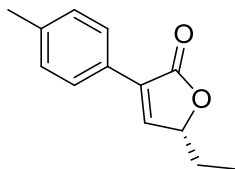
Jednou z mnoha takto účinných látek je např. haliangicin, látka izolovaná z myxobakterie *Heliangnium luteum*. Mechanismem účinku je inhibice elektronového transportu v dýchacím řetězci.<sup>14</sup> Basiliskamid A je další antifungálně aktivní látkou<sup>15</sup>, která vykazuje srovnatelnou antifungální aktivitu s amfotericinem B, přičemž jeho cytotoxicita je nižší. Další skupinou látek jsou například parnafunginy A-D. Zajímavý je jejich mechanismus účinku, který se zcela liší od předchozích látek. Způsobují štěpení a následnou polyadenylaci mRNA hub, nevykazují však toxicitu.<sup>15</sup>



Obr. 6 Haliangicin a parnafungin A

### 1.3. Inkrustoporin a jeho analoga

V návaznosti na předchozí kapitolu je jednou ze zajímavých látek i (-)inkrustoporin, který má ve své molekule furanonové uskupení. Tato látka byla izolovaná z bazidiomycety *Incrustoporia carneola*<sup>16</sup> a naše pracovní skupina se zabývá jejími obměnami.



Obr. 7 (-)-inkrustoporin

(-)-Inkrustoporin vykazuje nejen zajímavou *in vitro* biologickou aktivitu proti patogenním houbám parazitujícím na rostlinách<sup>17</sup>, ale navíc vykazuje i slabou cytostatickou aktivitu. Z hlediska struktury je (-)inkrustoporin látka s endocyklickou dvojnou vazbou, která je v konjugaci s karbonylovou skupinou, dále má aromatické jádro v poloze 3 a centrum chiralit v poloze 5 furanonového kruhu.<sup>6</sup> Svou biologickou aktivitou se (-)inkrustoporin stává zajímavou předlohou látkou pro syntézu nových potenciálních antimykotik.

V předchozích letech bylo v naší pracovní skupině připraveno mnoho syntetických látek, jejichž předlohou strukturou je právě výše zmíněný furanon.

Při syntéze nových potenciálních antimykotik tak byly nejprve provedeny obměny fenylového jádra v poloze 3 furanonu. Tyto substituce se týkaly zavádění různých skupin do různých poloh jádra nebo výměny fenylu za jiný aromát<sup>3</sup>. V další fázi se změny týkaly substituentů v poloze 5 furanonu. Poloha 4 však dosud zůstávala volná a proto se právě zde naskýtá možnost další syntetické obměny těchto látek. Geneze tohoto vývoje je uvedena ve schématu 1.

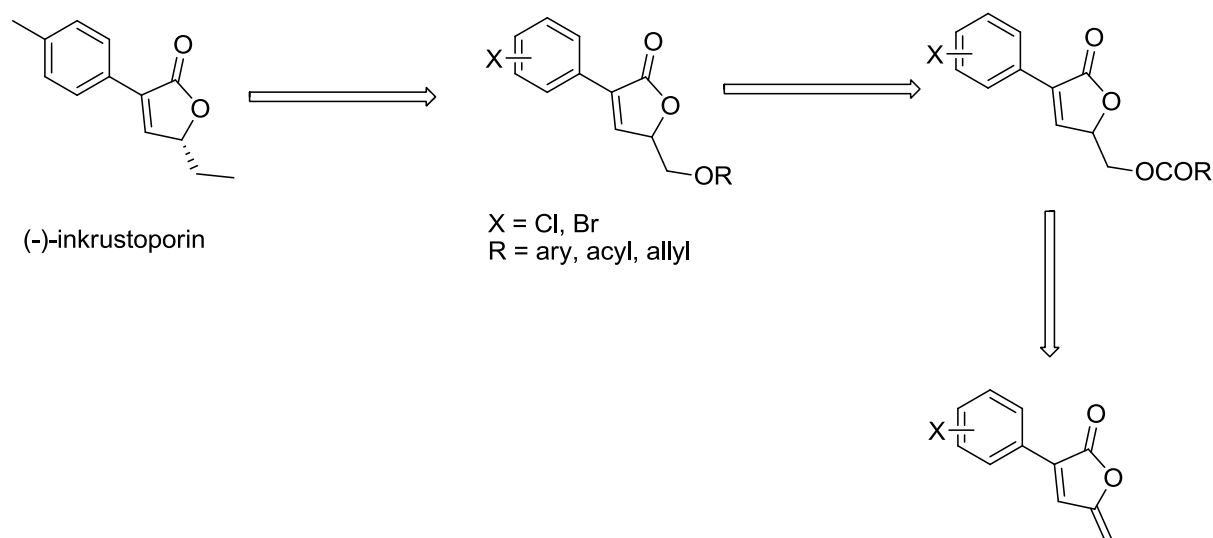


Schéma 1. Vývoj analog inkrustoporinu

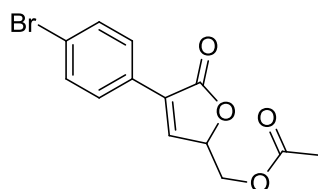
Na základě hodnocení biologických aktivit *in vitro* bylo zjištěno, že pro účinek je nejvýhodnější dvojná vazba v konjugaci s karbonylovou skupinou, fenylové jádro substituované halogenem a substituce acyloxymethylovou skupinou v poloze 5 (viz Tab. 2.<sup>15</sup> MIC některých syntetických analog je (např. furanon **1**, Obr. 8) při *in vitro* testování srovnatelná s používanými antimykotiky.<sup>6</sup>

Tabulka 2. Porovnání *in vitro* antifungální aktivity ( $IC_{80}$  [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]) látky **1** a flukonazolu a aktivity ( $IC_{95}$  [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]) amfotericinu B (hodnoty MIC stanoveny po 48 h)

|            | CA1 <sup>a</sup> | CK2 <sup>b</sup> | CT <sup>c</sup> | CG <sup>d</sup> | TB <sup>e</sup> | AF <sup>f</sup> | AC <sup>g</sup> |
|------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>1</b>   | 1,95             | 7,81             | 7,81            | 1,95            | 7,81            | 3,91            | 15,63           |
| <b>FLU</b> | 2                | >50              | 5               | >50             | 9               | >50             | >50             |
| <b>AmB</b> | 0,06             | 0,18             | 0,11            | 0,09            | 1,80            | 0,23            | 2,16            |

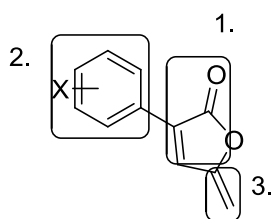
<sup>a</sup>*Candida albicans* ATCC 44859, <sup>b</sup>*C. krusei* E28, <sup>c</sup>*C. tropicalis* 156, <sup>d</sup>*C. glabrata* 20/1,

<sup>e</sup>*Trichosporon beigelii* 1188, <sup>f</sup>*Aspergillus fumigatus* 231, <sup>g</sup>*Absidia corymbifera* 272



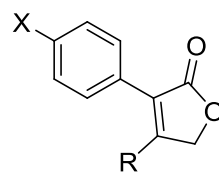
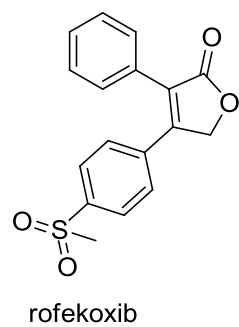
Obr. 8 Furanon 1<sup>6</sup>

U tohoto typu látek bylo později zjištěno, že za podmínek *in vitro* testování dochází k eliminaci acyloxymethylové skupiny a vytvoření exocyklické dvojné vazby. Látka s exocyklickou dvojnou vazbou pak byla zodpovědná za antifungální účinek.<sup>6</sup>



Obr. 9 Důležitá místa pro aktivitu

Dosud však nebyly připraveny látky substituované právě v poloze 4 furanonového kruhu. Je zajímavé, že deriváty substituované v poloze 4, jsou velmi podobné struktuře nesteroidního antiflogistika rofekoxibu.<sup>5,6,19</sup> Mechanismus účinku těchto látek spočívá v selektivní inhibici cyklooxygenázy 2. Jejich zavedením se proto výrazně snížilo riziko gastrointestinálních onemocnění, která jsou důsledkem použití, běžně dostupných antiflogistik, neboť tyto látky neselektivně blokují také cyklooxygenázu 1, jež vytváří prostaglandiny s protektivním účinkem na žaludeční sliznici. Rofekoxib však byl stažen z trhu z důvodu zvýšení rizika kardiovaskulárních onemocnění.<sup>5</sup>



Obr. 10 Rofekoxib × 4-substituované deriváty

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

1. Syntéza analog substituovaných oproti předlohovým strukturám navíc v poloze 4.

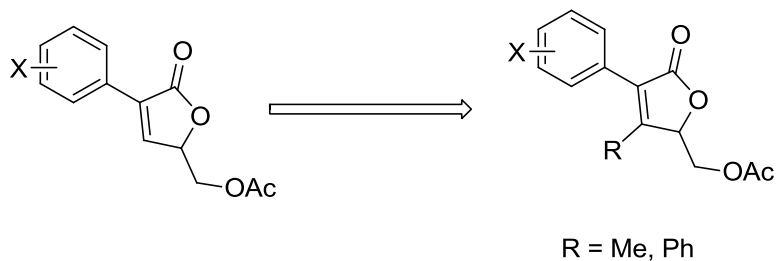


Schéma 2. – Substituce v poloze 4

2. Zjistit vliv této substituce na jejich *in vitro* biologickou aktivitu.
3. Zjistit, zda tyto látky podléhají *in vitro* eliminační reakci, jako je tomu u 3,5 – disubstituovaných derivátů.

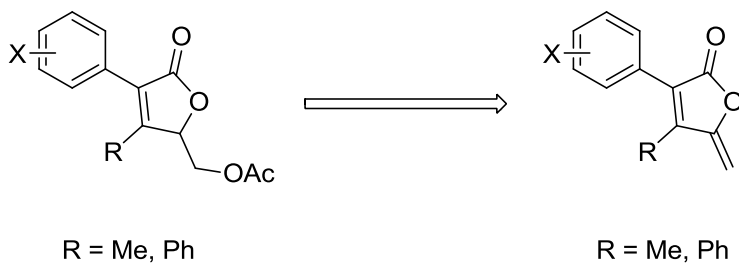


Schéma 3. – Eliminační reakce

### 3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

#### 3.1. Syntéza 4-substituovaných 5-acyloxymethyl-3-halofenyl-2,5-dihydrofuran-2-onů

Syntézu požadovaných látek lze realizovat ve čtyřech krocích. První fází je vznik esteru bromfenyloctové kyseliny nukleofilní substitucí. Vzniklý ester je poté podroben intramolekulární cyklizační reakci za vzniku furanonu, do kterého je v dalším kroku zavedena hydroxymethylová skupina (vzhledem k přítomnosti dvou volných vodíků na C5 furanonu bylo reálné nebezpečí dvojité hydroxymethylace.) Poslední operací je acetylace hydroxylové skupiny. Jako substituent v poloze 3 jsme zvolili 4-bromfenyl, neboť příslušný derivát se v předchozích studiích<sup>18,20,21,22,23,25</sup> jevil jako nejaktivnější (viz Tab. 2, str. 12)

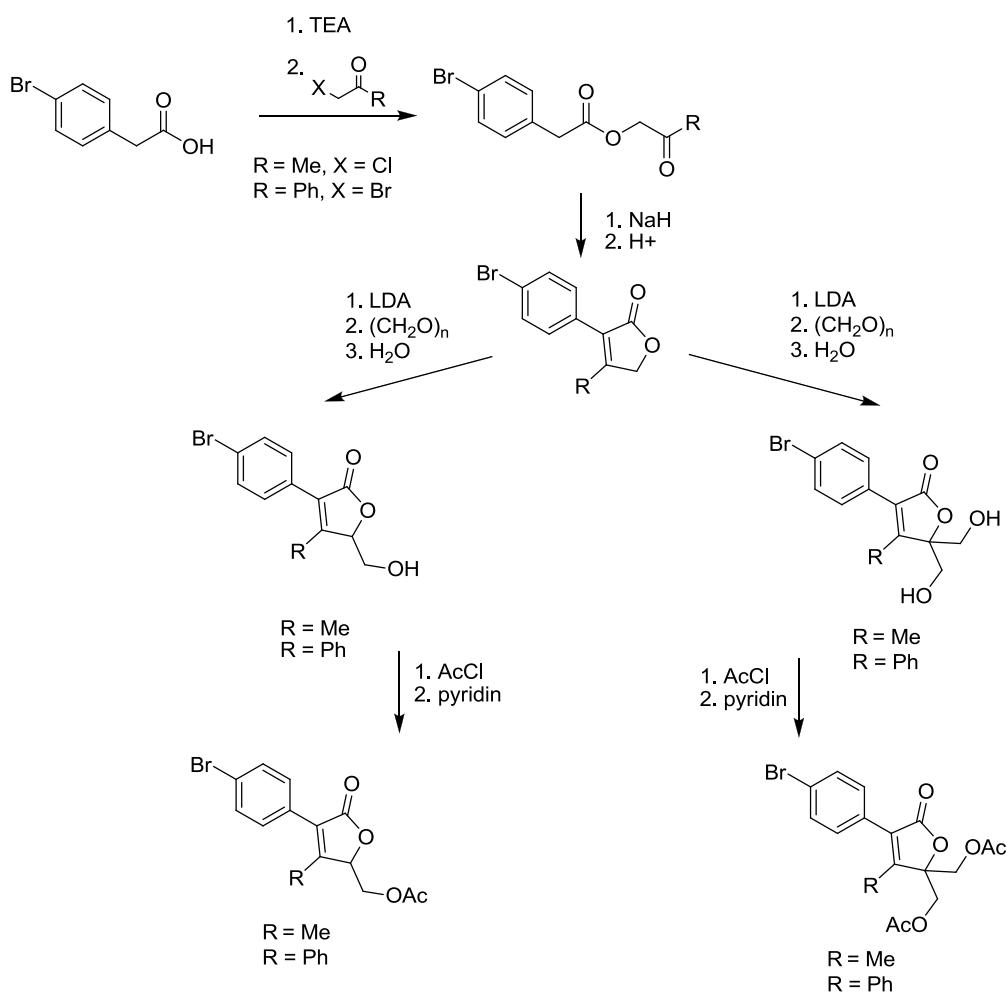


Schéma 4. Návrh syntézy 4 – substituovaných látek



### 3.1.1. Tvorba esterů bromfenyloctové kyseliny

Reakce je založena na esterifikaci komerčně dostupné bromfenyloctové kyseliny s příslušnými  $\alpha$ -halogenketony.<sup>6</sup> Reakce probíhá v bezvodém tetrahydrofuranu jako rozpouštědle pod atmosférou argonu za přídavku  $\text{Et}_3\text{N}$  jako báze.

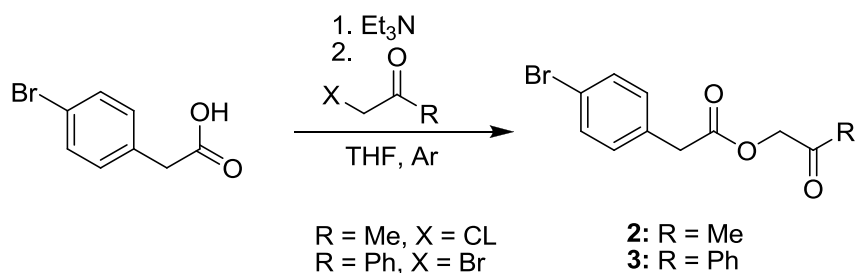


Schéma 5. Tvorba esterů bromfenyloctové kyseliny

Tabulka 3. Výtěžky esterifikace

| Produkt  | R  | X  | Výtěžek (%) |
|----------|----|----|-------------|
| <b>2</b> | Me | Cl | 83          |
| <b>3</b> | Ph | Br | 85          |

Jak je patrné z Tab. 3, produkty kondenzační reakce vznikaly ve vysokém výtěžku. Jejich identita byla zřejmá z NMR spekter, ve kterých se objevily signály methylenové skupiny ( $-\text{CH}_2-$  při 4.66 ppm pro ester **2** a 5.36 ppm pro ester **3**).

### 3.1.2. Cyklizace esterů bromfenyloctové kyseliny

Cyklizační reakce<sup>21</sup> je založena na deprotonizaci uhlíku v poloze  $\alpha$  vzhledem k esterové skupině hydridem sodným a následném nukleofilním ataku vzniklého karbaniontu na karbonyl. Okyselením roztokem kyseliny chlorovodíkové a eliminací vody vzniknou příslušné laktony.

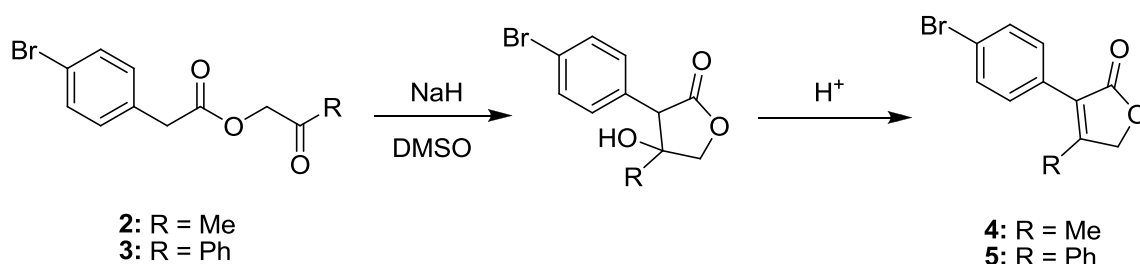


Schéma 6. Cyklizace oxoesterů na 3,4-disubstituovaný furanon

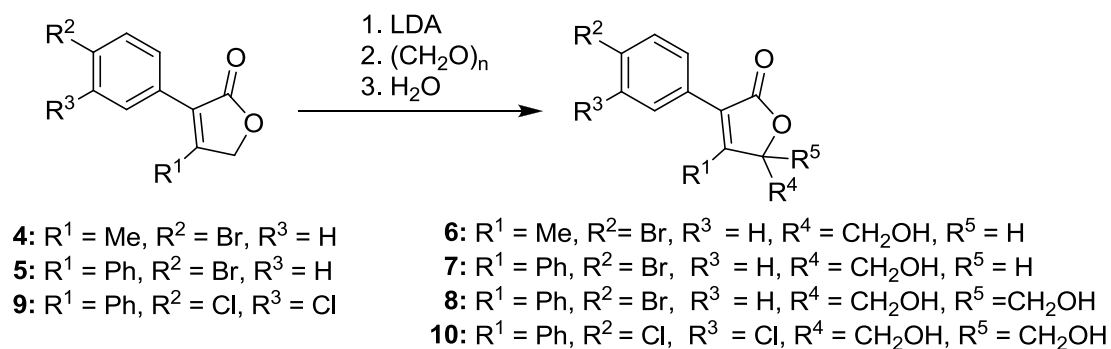
Reakce probíhá v prostředí bezvodého DMSO v atmosféře argonu.<sup>6,12,25</sup> Identifikace těchto laktonů byla provedena <sup>13</sup>C NMR spektry, která obsahovala jediný signál karbonylové skupiny s píkem charakteristickým pro pětičlenný nenasycený lakton (172.9 ppm pro lakton **4** a 173.0 ppm pro lakton **5**).

Tabulka 4. Výtěžky cyklizační reakce

| Výchozí látka | R  | Produkt  | Výtěžek (%) |
|---------------|----|----------|-------------|
| <b>2</b>      | Me | <b>4</b> | 55          |
| <b>3</b>      | Ph | <b>5</b> | 88          |

### 3.1.3. Zavedení hydroxymethylové skupiny

Zavádění hydroxymethylové skupiny probíhá působením paraformaldehydu po předchozí deprotonaci uhlíku C5 furanonového kruhu. K roztoku výchozí látky, který je ochlazen na -70 °C nebo -80 °C se postupně přidává LDA a paraformaldehyd. V závislosti na použitých podmínkách vznikaly směsi mono- a bis(hydroxymethyl) derivátů v různých poměrech.



### Schéma 7. Hydroxymethylace do polohy 5

Reakce s výchozí látkou **5** (Tab. 5) byla prováděna při -70 °C i -80 °C. Je patrné, že při nižší teplotě byla reakce selektivnější. Reakce výchozí látky **4** byla provedena při -70 °C s 0,5 ekvivalentu paraformaldehydu s cílem připravit oba možné produkty pro biologické testování v jedné reakci. Vzniklo však pouze 23 % monohydroxymethylderivátu **6** spolu s nedělitelnou směsí dalších látek. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 5. Látka **9** byla již dříve připravena v rámci disertační práce Mgr. P. Šenela, Ph.D..<sup>6</sup>

Tabulka 5. Zavádění hydroxymethylové skupiny

| Výchozí látka | Teplota (°C) | Množství (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> mol. ekv. | Produkt      | Mono (%)  | Bis (%)   | Výchozí látka (g) |
|---------------|--------------|---|--------------|-----------|-----------|-------------------|
| <b>4</b>      | -70          | 0,5   | <b>6</b>     | <b>23</b> | -----     | 1,010             |
| <b>5</b>      | -80          | 0,5   | <b>7</b>     | <b>63</b> | -----     | 0,550             |
| <b>5</b>      | -70          | 0,5   | <b>7 a 8</b> | <b>29</b> | <b>18</b> | 0,415             |
| <b>9</b>      | -80          | 1,0   | <b>10</b>    | -----     | <b>76</b> | 1,010             |

Struktura látek byla prokázána <sup>1</sup>H NMR spektry, ve kterých se objevil signál primární alkoholické skupiny v rozmezí 4.21-4.51 ppm. Tyto meziprodukty byly testovány na *in vitro* biologickou aktivitu proti některým patogenním houbám, bakteriím a u některých byla testována také cytostatická aktivita.

### 3.1.4. Acetylace hydroxylové skupiny

Reakce probíhá v bezvodém dichlormethanu v atmosféře argonu. Do roztoku výchozí látky se nejprve přidá pyridin jako báze a poté acetylchlorid. Tím získáme požadované acetylderiváty.

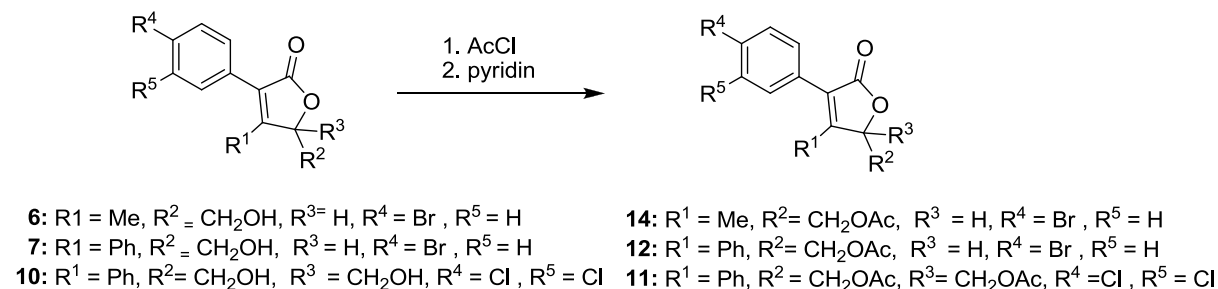
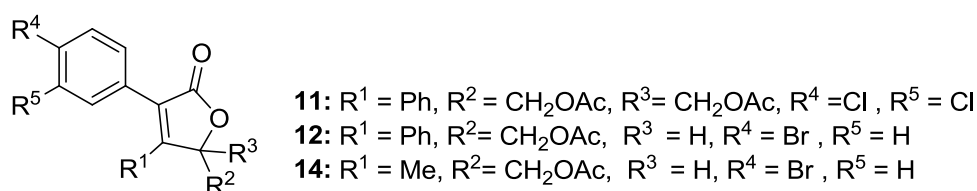


Schéma 8. Acetylace 5-hydroxymethylderivátů

Tabulka 6 – Výtěžky a produkty acetylace

| Výchozí látka | produkt   | Výtěžek (%) |
|---------------|-----------|-------------|
| <b>6</b>      | <b>14</b> | 64          |
| <b>7</b>      | <b>12</b> | 87          |
| <b>10</b>     | <b>11</b> | 54          |



Obr. 11. Struktury furanonů **11**, **12** a **14**

Při syntéze z látky **10** mohly v principu vzniknout dva produkty, mono- nebo bis-substituovaný (**11**) acetylderivát, vznikal však pouze bis-substituovaný. Z furanonu **7** mohl acetylací vzniknout pouze jediný ester, ale <sup>1</sup>H NMR spektra prokázala konverzi na další látku (**13**). Nejprve jsme se domnívali, že nový produkt vznikl působením

DMSO používaného při  $^1\text{H}$  NMR spektroskopii, ale pomocí TLC jsme prokázali, že i látka, která se s rozpouštědlem do styku nedostala, byla částečně přeměněná na jiný produkt. Acetylderivát **12** po několika dnech částečně podlehl eliminační reakci za vzniku derivátu s exocyklickou dvojnou vazbou (**13**), jejíž identita byla zřejmá z přítomnosti olefinických signálů při 4.92 a 5.37 ppm v  $^1\text{H}$  NMR spektru.

Provedli jsme proto jednoduchý experiment, při kterém jsme chtěli zjistit, zda existuje vztah mezi typem rozpouštědla a jeho vlivem na průběh eliminační reakce.

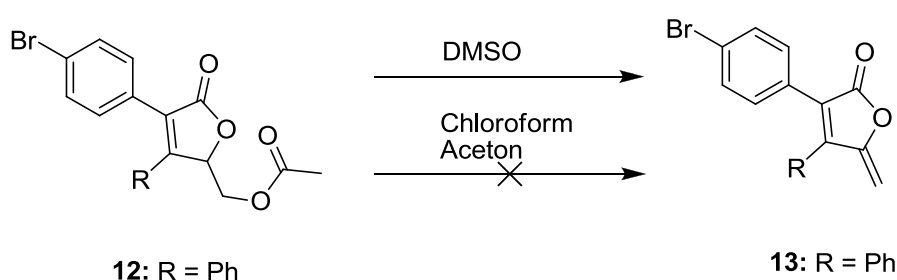


Schéma 9. Vliv rozpouštědla na eliminační reakci

Tabulka 7. Vliv rozpouštědla na eliminační reakci

| Látka     | Rozpouštědlo | Doba  | % eliminace |
|-----------|--------------|-------|-------------|
| <b>12</b> | chloroform   | 3 dny | 0           |
| <b>12</b> | aceton       | 2 dny | 0           |
| <b>12</b> | DMSO         | 4 dny | 100         |

Z výsledků v Tab. 7 vyplývá, že rozpouštědlo má zásadní vliv na průběh vzniku dvojné vazby. V acetonu a chloroformu nedochází k žádným změnám, kdežto v DMSO probíhá úplná eliminace kyseliny octové. Toto zjištění je velice důležité, neboť testy biologické aktivity probíhají právě v tomto rozpouštědle. Výsledky by tedy měly být v principu totožné pro oba furanony (**12**, **13**). Z rozdílných výsledků

některých testů (viz tab. 9, 12) ale vyplývá, že za podmínek biologických hodnocení k eliminaci nemuselo dojít kvantitativně.

Podobně proběhla také reakce s esterem **14**, kdy po třech dnech v DMSO byla  $^1\text{H}$  NMR spektroskopii prokázána existence exocyklické dvojné vazby.

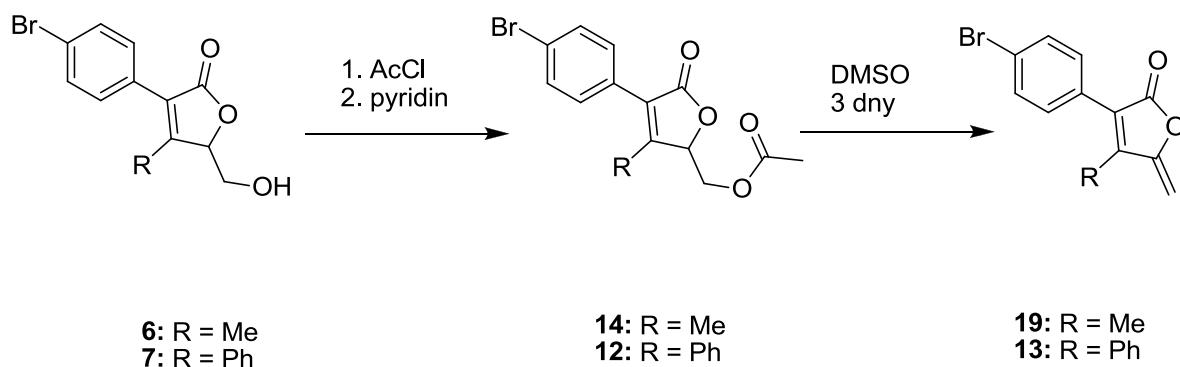


Schéma 10. Příprava esterů **12** a **14** a následná eliminační reakce

Od konečných produktů jsme očekávali vyšší *in vitro* biologickou aktivitu, než u jejich předstupňů. Byla testována antimykotická, antibakteriální a u některých struktur také cytostatická aktivita.

## 3.2. Biologická aktivita

V rámci diplomové práce byly prováděny testy *in vitro* biologické aktivity proti bakteriím a patogenním houbám. U některých struktur byla navíc testována také cytostatická aktivita.

### 3.2.1. Antibakteriální aktivita

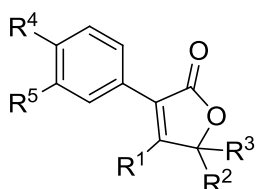
#### 3.2.1.1. Antibakteriální aktivita hydroxymethylderivátů

Tyto struktury nevykazují antibakteriální aktivitu proti testovaným bakteriálním kmenům při použitých koncentracích připravené látky.

Tabulka 8. Antibakteriální aktivita furanonů **6**, **7** a **9** (IC<sub>80</sub> [μmol.l<sup>-1</sup>])

|           |     | SA <sup>a</sup> | MRSA <sup>b</sup> | SE <sup>c</sup> | EF <sup>d</sup> | EC <sup>e</sup> | KP <sup>f</sup> | KP-E <sup>g</sup> | PA <sup>h</sup> |
|-----------|-----|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| <b>6</b>  | 24h | >500            | >500              | >500            | >500            | >500            | >500            | >500              | >500            |
|           | 48h | >500            | >500              | >500            | >500            | >500            | >500            | >500              | >500            |
| <b>7</b>  | 24h | >125            | >125              | >125            | >125            | >125            | >125            | >125              | >125            |
|           | 48h | >125            | >125              | >125            | >125            | >125            | >125            | >125              | >125            |
| <b>10</b> | 24h | >125            | >125              | >125            | >125            | >125            | >125            | >125              | >125            |
|           | 48h | >125            | >125              | >125            | >125            | >125            | >125            | >125              | >125            |

<sup>a</sup>*Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 <sup>b</sup>*S. aureus* meticilin rezistentní H 5996/08 <sup>c</sup>*S. epidermidis* H 6966/08  
<sup>d</sup>*Enterococcus* sp. J 14365/08 <sup>e</sup>*Escherichia coli* CCM 4517 <sup>f</sup>*Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 <sup>g</sup>*K. pneumoniae*  
ESBL pozitivní J 14368/08 <sup>h</sup>*Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961



**6:** R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**7:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**10:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>4</sup> = Cl, R<sup>5</sup> = Cl

Obr. 12. Struktury furanonů **6**, **7** a **10**

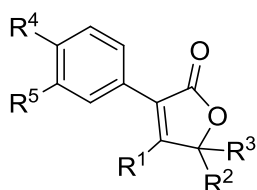
### 3.2.1.2. Antibakteriální aktivita acetylovaných derivátů

Z výsledků v Tab. 9 a 10 plyne, že deriváty substituované v poloze 4, vykazují určitou antibakteriální aktivitu, která je nejvýraznější u **12** a **13** proti *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Na *in vitro* antibakteriální biologickou aktivitu má také výrazný vliv substituce na fenylovém jádře v poloze 3. Pro porovnání jsou uvedeny i aktivity analogických furanonů **8** a **16**, připravených dříve v rámci disertační práce Mgr. Šenela, Ph.D.<sup>6</sup>

Tabulka 9. Srovnání antibakteriální aktivity látek **11**, **12**, **13** a **14**  
(IC<sub>80</sub> [μmol.l<sup>-1</sup>])

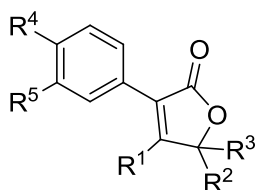
|           |     | SA <sup>a</sup> | MRSA <sup>b</sup> | SE <sup>c</sup> | EF <sup>d</sup> | EC <sup>e</sup> | KP <sup>f</sup> | KP-E <sup>g</sup> | PA <sup>h</sup> |
|-----------|-----|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| <b>11</b> | 24h | >500            | >500              | >500            | >500            | >500            | >500            | >500              | >500            |
|           | 48h | >500            | >500              | >500            | >500            | >500            | >500            | >500              | >500            |
| <b>12</b> | 24h | <b>3,9</b>      | <b>7,81</b>       | <b>0,98</b>     | <b>7,81</b>     | >500            | >500            | >500              | >500            |
|           | 48h | <b>7,81</b>     | <b>15,62</b>      | <b>3,9</b>      | <b>31,25</b>    | >500            | >500            | >500              | >500            |
| <b>13</b> | 24h | <b>7,81</b>     | <b>7,81</b>       | <b>3,9</b>      | <b>15,62</b>    | >500            | >500            | >500              | >500            |
|           | 48h | <b>7,81</b>     | <b>15,62</b>      | <b>3,9</b>      | <b>31,25</b>    | >500            | >500            | >500              | >500            |
| <b>14</b> | 24h | <b>62,5</b>     | <b>62,5</b>       | <b>31,25</b>    | >500            | >500            | >500            | >500              | >500            |
|           | 48h | <b>125</b>      | <b>125</b>        | <b>62,5</b>     | >500            | >500            | >500            | >500              | >500            |

<sup>a</sup>*Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 <sup>b</sup>*S. aureus* meticilin rezistentní H 5996/08 <sup>c</sup>*S. epidermidis* H 6966/08  
<sup>d</sup>*Enterococcus* sp. J 14365/08 <sup>e</sup>*Escherichia coli* CCM 4517 <sup>f</sup>*Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 <sup>g</sup>*K. pneumoniae*  
*ESBL pozitivní* J 14368/08 <sup>h</sup>*Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961



- 11:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>4</sup> = Cl, R<sup>5</sup> = Cl  
**12:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**13:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup>+ R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**14:** R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H

Obr. 13. Struktury furanonů **11**, **12**, **13** a **14**



- 8:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**16:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H

Obr. 14 – Struktury furanonů **8**<sup>6</sup> a **16**<sup>6</sup>



Tabulka 10. Antibakteriální aktivita **8**<sup>6</sup> a **16**<sup>6</sup> (IC<sub>80</sub> [μmol.l<sup>-1</sup>])

|           |     | SA <sup>a</sup> | MRSA <sup>b</sup> | SE <sup>c</sup> | EF <sup>d</sup> | EC <sup>e</sup> | KP <sup>f</sup> | KP-E <sup>g</sup> | PA <sup>h</sup> |
|-----------|-----|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| <b>8</b>  | 24h | <b>15,62</b>    | <b>31,25</b>      | <b>15,62</b>    | <b>62,5</b>     | >500            | >500            | >500              | >500            |
|           | 48h | <b>31,25</b>    | <b>31,25</b>      | <b>15,62</b>    | <b>62,5</b>     | >500            | >500            | >500              | >500            |
| <b>16</b> | 24h | <b>3,9</b>      | <b>31,25</b>      | >500            | >500            | >500            | >500            | >500              | >500            |
|           | 48h | <b>3,9</b>      | <b>31,25</b>      | >500            | >500            | >500            | >500            | >500              | >500            |

<sup>a</sup>*Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 <sup>b</sup>*S. aureus* meticilin rezistentní H 5996/08 <sup>c</sup>*S. epidermidis* H 6966/08  
<sup>d</sup>*Enterococcus* sp. J 14365/08 <sup>e</sup>*Escherichia coli* CCM 4517 <sup>f</sup>*Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 <sup>g</sup>*K. pneumoniae*  
ESBL pozitivní J 14368/08 <sup>h</sup>*Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961

Tabulka 11. Srovnání antibakteriální aktivity látek užívaných v terapii  
(IC<sub>80</sub> [μmol.l<sup>-1</sup>])

|             |     | SA <sup>a</sup> | MRSA <sup>b</sup> | SE <sup>c</sup> | EF <sup>d</sup> | EC <sup>e</sup> | KP <sup>f</sup> | KP-E <sup>g</sup> | PA <sup>h</sup> |
|-------------|-----|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| <b>Neom</b> | 24h | <b>3,9</b>      | <b>0,89</b>       | <b>3,9</b>      | <b>250</b>      | <b>0,98</b>     | <b>0,98</b>     | <b>0,98</b>       | <b>7,81</b>     |
|             | 48h | <b>3,9</b>      | <b>0,98</b>       | <b>7,81</b>     | <b>250</b>      | <b>0,98</b>     | <b>0,98</b>     | <b>0,98</b>       | <b>15,62</b>    |
| <b>Bac</b>  | 24h | <b>15,62</b>    | <b>15,62</b>      | <b>15,62</b>    | <b>31,25</b>    | >500            | >500            | >500              | >500            |
|             | 48h | <b>31,25</b>    | <b>31,25</b>      | <b>31,25</b>    | <b>31,25</b>    | >500            | >500            | >500              | >500            |
| <b>Pen</b>  | 24h | <b>0,24</b>     | <b>125</b>        | <b>31,25</b>    | <b>7,81</b>     | <b>125</b>      | <b>250</b>      | >500              | >500            |
|             | 48h | <b>0,24</b>     | <b>125</b>        | <b>125</b>      | <b>15,62</b>    | <b>125</b>      | <b>500</b>      | >500              | >500            |
| <b>Cipr</b> | 24h | <b>0,98</b>     | <b>500</b>        | <b>250</b>      | <b>0,98</b>     | <b>0,06</b>     | <b>0,12</b>     | >500              | <b>3,9</b>      |
|             | 48h | <b>0,98</b>     | <b>500</b>        | <b>250</b>      | <b>0,98</b>     | <b>0,06</b>     | <b>0,12</b>     | >500              | <b>7,81</b>     |
| <b>Phen</b> | 24h | <b>0,24</b>     | <b>250</b>        | <b>62,5</b>     | <b>7,81</b>     | >500            | >500            | >500              | >500            |
|             | 48h | <b>0,24</b>     | <b>500</b>        | <b>250</b>      | <b>7,81</b>     | >500            | >500            | >500              | >500            |

<sup>a</sup>*Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 <sup>b</sup>*S. aureus* meticilin rezistentní H 5996/08 <sup>c</sup>*S. epidermidis* H 6966/08  
<sup>d</sup>*Enterococcus* sp. J 14365/08 <sup>e</sup>*Escherichia coli* CCM 4517 <sup>f</sup>*Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 <sup>g</sup>*K. pneumoniae*  
ESBL pozitivní J 14368/08 <sup>h</sup>*Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961

**Neom = Neomycini sulfas, Bac = Bacitracin zinc., Pen = Penicilin G, Cipr = Ciprofloxacin HCC,**  
**Phen = Phenoxymethyl penicilin**

Výrazná *in vitro* antibakteriální aktivita proti několika kmenům, která je v jednom případě při submikromolární koncentraci, patrná u látek **12** a **13**, zejména proti *Staphylococcus epidermidis*. Zdá se, že nepatrně vyšší aktivitu vykazuje látka **12**, která v kultivačním médiu částečně podléhá eliminaci na furanon **13**. Proti *Staphylococcus epidermidis* účinek obou látek výrazně převyšuje inhibiční aktivitu látek připravených Šenelem.<sup>6</sup>

### 3.2.2. Antifungální aktivita

#### 3.2.2.1. Antifungální aktivita hydroxymethylderivátů

Tyto látky vykazují velmi nízkou *in vitro* antimykotickou aktivitu proti několika fungálním kmenům. Pro slabý účinek je nutné fenylové jádro v poloze 4 laktonového kruhu. Přítomnost methylu v poloze 4 furanonu **6** je příčinou úplné ztráty i tak velmi slabého antimykotického účinku těchto látek.

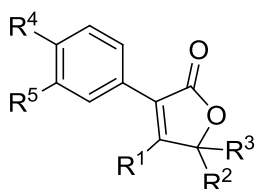
Tabulka 12. Antifungální aktivita **6**, **7** a **9** (IC<sub>80</sub> [μmol.l<sup>-1</sup>])

|          |     | CA1 <sup>a</sup> | CA2 <sup>b</sup> | CP <sup>c</sup> | CK1 <sup>d</sup> | CK2 <sup>e</sup> | CT <sup>f</sup> | CG <sup>g</sup> | CL <sup>h</sup> | TB <sup>i</sup> | AF <sup>j</sup> | AC <sup>k</sup> | TM <sup>l</sup> |
|----------|-----|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>6</b> | 24h | >500             | >500             | >500            | >500             | >500             | >500            | >500            | >500            | >500            | >500            | >500            | >500            |
|          | 48h | >500             | >500             | >500            | >500             | >500             | >500            | >500            | >500            | >500            | >500            | >500            | >500            |
| <b>7</b> | 24h | >125             | >125             | >125            | >125             | >125             | >125            | >125            | >125            | <b>31,25</b>    | >125            | >125            | <b>31,25</b>    |
|          | 48h | >125             | >125             | >125            | >125             | >125             | >125            | >125            | >125            | <b>62,5</b>     | >125            | >125            | <b>62,5</b>     |
| <b>9</b> | 24h | >125             | >125             | >125            | >125             | >125             | >125            | >125            | >125            | <b>125</b>      | >125            | >125            | >125            |
|          | 48h | >125             | >125             | >125            | >125             | >125             | >125            | >125            | >125            | >125            | >125            | >125            | >125            |

<sup>a</sup>*Candida albicans* ATCC 44859 <sup>b</sup>*C. albicans* ATCC 90028 <sup>c</sup>*C. parapsilosis* ATCC 22019 <sup>d</sup>*C. krusei* ATCC 6258

<sup>e</sup>*C. krusei* E28 <sup>f</sup>*C. tropicalis* 156 <sup>g</sup>*C. glabrata* 20/l <sup>h</sup>*C. lusitanae* 2446/l <sup>i</sup>*Trichosporon ascii* 1188

<sup>j</sup>*Aspergillus fumigatus* 231 <sup>k</sup>*Absidia corymbifera* 272 <sup>l</sup>*Trichophyton mentagrophytes* 445



- 6:** R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**7:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**10:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>4</sup> = Cl, R<sup>5</sup> = Cl

Obr. 15. Struktury furanonů **6**, **7** a **10**

### 3.2.2.2. Antifungální aktivita acetylovaných derivátů

Od těchto látek jsme očekávali vyšší *in vitro* biologickou aktivitu, než jaká byla u jejich prekurzorů. Předpokladem je jejich vyšší lipofilita a tím lepší penetrace do buněk.

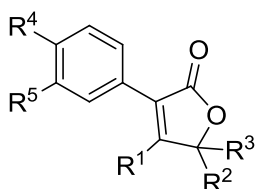
Tabulka 13. Antifungální aktivita **11**, **12**, **13** a **14** (IC<sub>80</sub> [μmol.l<sup>-1</sup>])

|           |     | CA1 <sup>a</sup> | CA2 <sup>b</sup> | CP <sup>c</sup> | CK1 <sup>d</sup> | CK2 <sup>e</sup> | CT <sup>f</sup> | CG <sup>g</sup> | CL <sup>h</sup> | TB <sup>i</sup> | AF <sup>j</sup> | AC <sup>k</sup> | TM <sup>l</sup> |
|-----------|-----|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>11</b> | 24h | >500             | >500             | >500            | >500             | >500             | >500            | >500            | >500            | <b>125</b>      | >500            | >500            | <b>125</b>      |
|           | 48h | >500             | >500             | >500            | >500             | >500             | >500            | >500            | >500            | <b>125</b>      | >500            | >500            | <b>250</b>      |
| <b>12</b> | 24h | <b>15,62</b>     | >500             | >500            | >500             | >500             | >500            | >500            | >500            | <b>7,81</b>     | >500            | <b>7,81</b>     | <b>7,81</b>     |
|           | 48h | <b>250</b>       | >500             | >500            | >500             | >500             | >500            | >500            | >500            | <b>125</b>      | >500            | <b>31,25</b>    | <b>7,81</b>     |
| <b>13</b> | 24h | <b>31,25</b>     | >500             | >500            | >500             | >500             | >500            | >500            | >500            | <b>250</b>      | >500            | >500            | <b>7,81</b>     |
|           | 48h | <b>250</b>       | >500             | >500            | >500             | >500             | >500            | >500            | >500            | >500            | >500            | >500            | <b>7,81</b>     |
| <b>14</b> | 24h | <b>3,9</b>       | <b>62,5</b>      | <b>62,5</b>     | <b>62,5</b>      | <b>62,5</b>      | <b>62,5</b>     | <b>31,25</b>    | <b>15,62</b>    | <b>7,81</b>     | <b>31,25</b>    | <b>15,62</b>    | <b>7,81</b>     |
|           | 48h | <b>15,62</b>     | <b>62,5</b>      | <b>62,5</b>     | <b>125</b>       | <b>125</b>       | <b>125</b>      | <b>62,5</b>     | <b>31,25</b>    | <b>31,25</b>    | <b>31,25</b>    | <b>15,62</b>    | <b>31,25</b>    |

<sup>a</sup>*Candida albicans* ATCC 44859 <sup>b</sup>*C. albicans* ATCC 90028 <sup>c</sup>*C. parapsilosis* ATCC 22019 <sup>d</sup>*C. krusei* ATCC 6258

<sup>e</sup>*C. krusei* E28 <sup>f</sup>*C. tropicalis* 156 <sup>g</sup>*C. glabrata* 20/l <sup>h</sup>*C. lusitaniae* 2446/l <sup>i</sup>*Trichosporon aspii* 1188

<sup>j</sup>*Aspergillus fumigatus* 231 <sup>k</sup>*Absidia corymbifera* 272 <sup>l</sup>*Trichophyton mentagrophyte* s445



**11:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>4</sup> = Cl, R<sup>5</sup> = Cl

**12:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H

**13:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> + R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H

**14:** R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H

Obr. 16. Struktury acetylderivátů **11**, **12**, **13** a **14**

Antimykotická aktivita většiny látek je zanedbatelná. Výjimkou z této skupiny látek je sloučenina **14**, kde je *in vitro* aktivita několikanásobně vyšší než u ostatních látek, přesto je aktivita nižší než u v současné době používaných antimykotik (viz Tab. 3).<sup>7,8,12,13,14,15,16</sup>

Tabulka 14. Porovnání *in vitro* antifungální aktivity (IC<sub>80</sub> [μmol.l<sup>-1</sup>]) látky **14**, flukonazolu a aktivity (IC<sub>95</sub> [μmol.l<sup>-1</sup>]) amfotericinu B (hodnoty MIC stanoveny po 48 h)<sup>6,12</sup>

|            | CA1 <sup>a</sup> | CK2 <sup>b</sup> | CT <sup>c</sup> | CG <sup>d</sup> | TB <sup>e</sup> | AF <sup>f</sup> | AC <sup>g</sup> |
|------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>FLU</b> | 2                | >50              | 5               | >50             | 9               | >50             | >50             |
| <b>AmB</b> | 0,06             | 0,18             | 0,11            | 0,09            | 1,80            | 0,23            | 2,16            |
| <b>14</b>  | 15,62            | 62,5             | 125             | 62,5            | 31,25           | 31,25           | 15,62           |

<sup>a</sup>*Candida albicans* ATCC 44859, <sup>b</sup>*C. krusei* E28, <sup>c</sup>*C. tropicalis* 156, <sup>d</sup>*C. glabrata* 20/1,

<sup>e</sup>*Trichosporon beigeli* 1188, <sup>f</sup>*Aspergillus fumigatus* 231, <sup>g</sup>*Absidia corymbifera* 272

### 3.2.3 Cytostatická aktivita

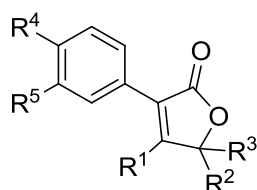
U některých námi připravených látek bylo také provedeno stanovení cytostatické aktivity, konkrétně u furanonů **7**, **12**, **13** a **14**. Buněčné linie na kterých byly naše látky testovány jsou buňky lidské promyeloidní leukémie, buňky karcinomu děložního čípku, buněčné linie lidské akutní T-lymfoblastoidní leukémie<sup>3</sup> a buňky lidského hepatomu.<sup>20</sup> Některé z těchto sloučenin vykazovaly cytostatickou aktivitu proti některým buněčným liniím. Z výsledků je patrné, že nejvyšší cytostatickou aktivitu vykazuje látka **14**. Všechny struktury jsou však aktivní zejména proti buňkám

lymfoblastoidní leukémie, kde jsou koncentrace  $IC_{50}$ , ve srovnání s ostatními buněčnými liniemi, přibližně poloviční.

Tabulka 15. Cytostatická aktivita **7**, **12**, **13** a **14** ( $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ])

|           | <i>HL-60</i> <sup>a</sup> | <i>HeLa S3</i> <sup>b</sup> | <i>CCRF-CEM</i> <sup>c</sup> | <i>HepG2</i> <sup>d</sup> |
|-----------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| <b>7</b>  | neaktivní                 | neaktivní                   | neaktivní                    | neaktivní                 |
| <b>12</b> | 5,35 ± 0,20               | 2,78 ± 0,22                 | 2,05 ± 0,11                  | neaktivní                 |
| <b>13</b> | 5,13 ± 0,27               | 5,68 ± 0,66                 | 2,55 ± 0,25                  | neaktivní                 |
| <b>14</b> | 2,62 ± 0,16               | 1,83 ± 0,15                 | 1,63 ± 0,039                 | 9,9 ± 0,3                 |

<sup>a</sup>promyeloidní leukémie *HL-60* (ATCC CCL 240), <sup>b</sup>buňky karcinomu děložního čípku *HeLa S3* (ATCC CCL 2.2), <sup>c</sup>buněčné linie lidské akutní T lymfoblastoidní leukémie *CCRF-CEM* (ATCC CCL 219), <sup>d</sup>buňky lidského hepatomu *HepG2*



- 7:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**12:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**13:** R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> + R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H  
**14:** R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OAc, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Br, R<sup>5</sup> = H

Obr. 17. Struktury furanonů **7**, **12**, **13** a **14**

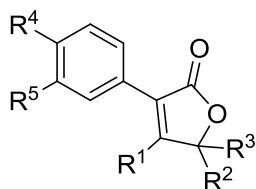
## 4. ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem připravil některá syntetická analoga inkrustoporinu, substituovaná v poloze 4. Hlavním krokem přípravy byla cyklizace oxoesterů bromfenyloctové kyseliny v bazickém prostředí. Látky byly podrobeny testům na antibakteriální, antifungální a cytostatickou aktivitu.

Vliv substituce v poloze 4 na biologickou aktivitu záleží na typu substituentu. Je patrné, že přítomnost fenylu v poloze 4 furanonu vede k jistému účinku antibakteriálnímu, který je provázen cytostatickým.

Zjistili jsme, že naše cílové struktury, stejně jako předlokové látky, také podléhají v kultivačním médiu eliminační reakci. Z připravených látek byly testovány jak acetylované struktury, tak i deriváty u kterých již proběhla eliminační reakce za vzniku exocyklické dvojné vazby.

Získané výsledky ukazují, že antibakteriální aktivita je doprovázena jistým cytostatickým účinkem, což může být známkou obecné buněčné toxicity.



**11:**  $R^1 = \text{Ph}$ ,  $R^2 = \text{CH}_2\text{OAc}$ ,  $R^3 = \text{CH}_2\text{OAc}$ ,  $R^4 = \text{Cl}$ ,  $R^5 = \text{Cl}$

**12:**  $R^1 = \text{Ph}$ ,  $R^2 = \text{CH}_2\text{OAc}$ ,  $R^3 = \text{H}$ ,  $R^4 = \text{Br}$ ,  $R^5 = \text{H}$

**13:**  $R^1 = \text{Ph}$ ,  $R^2 + R^3 = \text{CH}_2$ ,  $R^4 = \text{Br}$ ,  $R^5 = \text{H}$

**14:**  $R^1 = \text{Me}$ ,  $R^2 = \text{CH}_2\text{OAc}$ ,  $R^3 = \text{H}$ ,  $R^4 = \text{Br}$ ,  $R^5 = \text{H}$

**19:**  $R^1 = \text{Me}$ ,  $R^2 + R^3 = \text{CH}_2$ ,  $R^4 = \text{Br}$ ,  $R^5 = \text{H}$

Obr. 18. Struktury výsledných látek

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Obecné experimentální postupy

Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a před použitím nijak neupraveny. THF byl před použitím predestilován z benzofenon ketylu se sodíkem,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  byl destilován z  $\text{CaH}_2$  v čas potřeby.

Teploty tání všech látek byly měřeny na přístroji Buchi B-545 nebo na Koflerově bloku a nebyly korigovány. Měření IČ spekter všech látek bylo provedeno na přístroji NICOLET 6700 FT-IR. Hmotnostní spektra látek byla měřena na hmotnostním spektrometru FINNIGAN LTQ XL. NMR spektra byla měřena v roztocích  $\text{CDCl}_3$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , DMSO-*d*6 při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro  $^1\text{H}$  a při 75 MHz pro  $^{13}\text{C}$ . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty  $\delta$  v parts per million (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, td: triplet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet), interakční konstanty (Hz).

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F254 (Merck) s detekcí pod UV lampou nebo 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.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (200 ml) a následného zahřátí. Silikagel 60 (230-240 mesh) pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen od firmy E. Merck.

### 5.2. Použité experimentální postupy při biologickém hodnocení

#### 5.2.1. Hodnocení antifungální aktivity

U připravených látek se hodnotila *in vitro* antifungální aktivita vůči patogenním houbám parazitujícím na člověku mikrodiluční bujónovou metodou<sup>26,27</sup>. Testovací

soubor kmenů jsou zástupci běžných původců infekčních onemocnění a byl tvořen čtyřmi kmeny kvasinek z American Type Culture Collection (*Candida albicans* ATCC 44859, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258) a osmi klinickými izoláty kvasinek (*Candida krusei* E28, *Candida tropicalis* 156, *Candida glabrata* 20/1, *Candida lusitanae* 2446/1, *Trichosporon beigeli* 1188) a vláknitých hub (*Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, *Trichophyton mentagrophytes* 445) získaných z depozitu Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. 3 z uvedených ATCC kmenů (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258) sloužily také jako kontrola kvality. Na Sabouraudově dextrózovém agaru byly kultivovány všechny kultury před testováním. Pro rozpouštění všech testovaných látek byl použit DMSO (100 %); jeho výsledná koncentrace nepřekročila 2 %. Jako testovací medium sloužilo RPMI 1640 (Sevapharma, Praha) medium obohacené L-glutaminem pufované pomocí 0.165 M morfolinpropansulfonové kyseliny (Serva) a 10 M NaOH na pH 7.0. Jamky mikrodilučních testovacích destiček obsahovaly 200  $\mu$ l RPMI 1640 media s klesající koncentrací testovaných látek (od 2000 do 0.488  $\mu$ mol.l<sup>-1</sup>) a 10  $\mu$ l suspenze inokula. Výsledná koncentrace inokula v RPMI 1640 mediu byla  $5 \times 10^3 \pm 0.2$  cfu.ml<sup>-1</sup>. Destičky byly inkubovány při 35°C a MIC byly vizuálně odečteny po 24 a 48 hodinách. Hodnoty MIC pro *T. mentagrophytes* byly odečteny po 72 a 120 hodinách. Minimální inhibiční koncentrace byly definovány jako 80 % inhibice růstu kontroly a byly stanoveny dvakrát a duplicitně. Odchyly od tabelovaných hodnot MIC nebyly vyšší než jedno ředění použité při testování.

### 5.2.2. Hodnocení antibakteriální aktivity

U vybraných látek byla hodnocena *in vitro* antibakteriální aktivita vůči patogenním bakteriím člověka mikrodiluční bujónovou metodou<sup>28</sup>. Testovací soubor kmenů jsou zástupci běžných původců infekčních onemocnění a byl tvořen třemi kmeny mikroorganismů z American Type Culture Collection (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) a pěti klinickými izoláty (*Staphylococcus aureus* MRSA HK5996/08, *Staphylococcus epidermidis* HK6966/08, *Enterococcus* sp. HK14365/08, *Klebsiella pneumoniae*



HK11750/08, *Klebsiella pneumoniae* ESBL HK14368/08) získaných z depozitu Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Uvedené ATCC kmeny sloužily také jako kontrola kvality. Před testováním byly všechny kultury kultivovány na Mueller-Hintonově agaru. Pro rozpouštění všech testovaných látek byl použit DMSO (100 %); jeho výsledná koncentrace nepřekročila 2 %. Jako testovací medium sloužil Mueller-Hintonův bujón (MH, HiMedia, Čadarsky-Envitek, Czech Republic) pufovaný na pH 7.4 ( $\pm 0.2$ ). Jamky mikrodilučních testovacích destiček obsahovaly 200  $\mu\text{l}$  Mueller-Hintonova media s klesající koncentrací testovaných látek (od 2000 do 0.488  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a 10  $\mu\text{l}$  suspenze inokula. Výsledná koncentrace inokula ve sterilní vodě dosáhla hodnoty 0.5 McFarlandovy stupnice ( $1.5 \times 10^8 \text{ cfu.ml}^{-1}$ ). Destičky byly inkubovány při 37°C a MIC byly vizuálně odečteny po 24 a 48 hodinách. Minimální inhibiční koncentrace byly definovány jako 95 % inhibice růstu kontroly a byly stanoveny dvakrát a duplicitně. Odchyly od tabelovaných hodnot MIC nebyly vyšší než jedno ředění použité při testování.

### 5.2.3. Hodnocení cytostatické aktivity

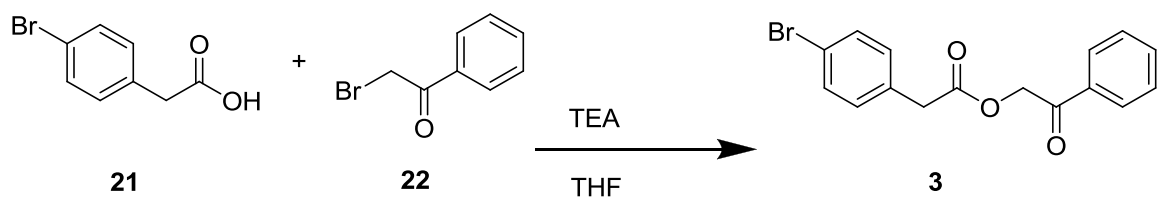
Cytostatická aktivita byla stanovena Dr. I. Votrubou (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha). Inhibice buněčného růstu byla hodnocena na buněčných liniích myší lymfocytické leukémie L 1210 (ATCC CCL219), na buňkách lidské akutní T-lymfoblastoidní leukémie CCRF-CEM (ATCC CCL 119), na buňkách lidské promyeloidní leukémie HL-60 (ATCC CCL 240) a na lidských buněčných liniích karcinomu děložního čípku HeLa S3 (ATCC CCL 2.2). Buněčné linie L1210, CCRF CEM a HL-60 byly kultivovány v RPMI 1640 mediu s telecím plodovým sérem na 24 jamkových destičkách s tkáňovou kulturou a buněčný nárůst byl odečítán po 72 hodinách od aplikace testovaných látek. HeLa S3 buňky byly očkované do misek s RPMI 1640-HEPES mediem s telecím plodovým sérem a hodnocení probíhalo 48 hodin po aplikaci testovaných látek. Buněčný růst byl kvantifikován s použitím XTT standardního spektrofotometrického testu. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnota  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

### 5.3. Syntéza

#### Příprava 2-fenyl-2-oxoethyl-2-(4-bromfenyl)acetátu (3)

Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub>: 333.18



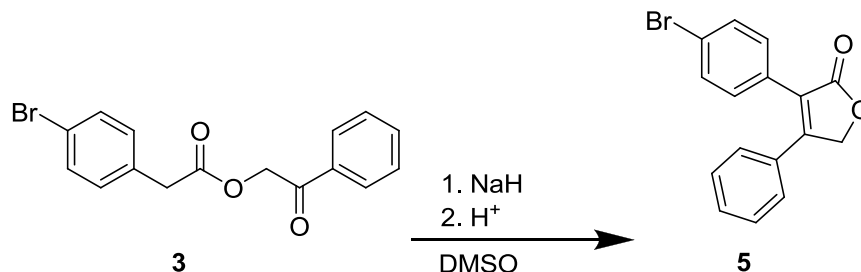
Kyselina 4-bromfenyloctová (**21**) (11.63 mmol) byla rozpuštěna ve 40 ml bezvodého tetrahydrofuranu v atmosféře argonu. K roztoku byl přidán 2-brom-1-fenylethanon (**22**) (12.00 mmol) a triethylamin (11.83 mmol). Směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a zahřívala se po dobu 20 minut, posléze byla reakce zpracována extrakcí mezi 5 % vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu gradientovou elucí za použití mobilní fáze hexan/ethyl-acetát v poměru 98:2 - 9:1.

Výtěžek: 73.1%; bezbarvá olejovitá látka; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.93-7.85 (2H, m, Ar), 7.65-7.57 (1H, m, Ar), 7.52-7.42 (4H, m, Ar), 7.25-7.20 (2H, m, Ar), 5.36 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 3.78 (2H, s, CH<sub>2</sub>). Charakterizace odpovídá literatuře.<sup>6</sup>

### Příprava 3-(4-bromfenyl)-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (5)

Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>2</sub>

M<sub>r</sub>: 315.16



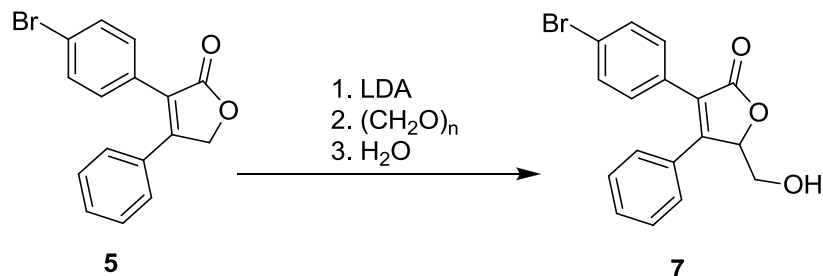
Do suspenze hydridu sodného (9.65 mmol) v 34 ml bezvodého DMSO byl kanylou přenesen roztok esteru **3** (9.19 mmol) v 17 ml bezvodého DMSO pod atmosférou argonu. Po 60 minutách byla reakce ukončena přidáním 3M HCl do pH přibližně 1. Reakční směs byla poté vytřepána mezi 5 % vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Po oddělení se organická fáze vysušila bezvodým síranem sodným. Ze vzniklého roztoku byla odpařena rozpouštědla a vznikla olejovitá kapalina, která po zředění hexanem vykrytalizovala.

Výtěžek: 88%; nažloutlá krystalická látka, t.t.: 111.0 °C; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.55-7.28 (9H, m, Ar), 5.16 (2H, s, OCH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0, 156.7, 132.0, 130.9, 130.8, 130.5, 129.2, 129.0, 127.4, 125.0, 123.2, 70.7. Charakterizace odpovídá literatuře.<sup>6</sup>

### Příprava 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (7)

Sumární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub>: 345.19



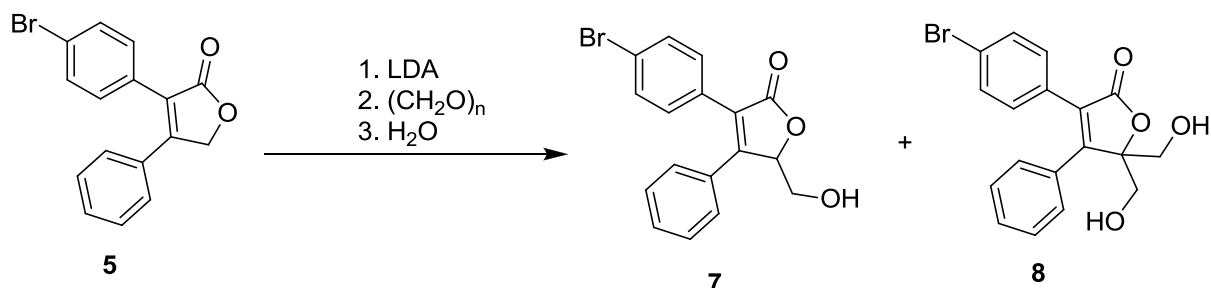
Furanon **5** (3.17 mmol) byl rozpuštěn v 16 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Reakční směs se následně chladila na -80 °C v atmosféře argonu. Při této teplotě byl přidán roztok LDA (1.5M, THF komplex v cyklohexanu, 3.33 mmol). Po třiceti minutách byl přidán paraformaldehyd (odpovídá 1.59 mmol formaldehydu). Následně se reakční směs pozvolna 2 hodiny ohřívala na laboratorní teplotu a poté byla přidána voda. Po přidání vody reakční směs změnila barvu na černou. Reakční směs byla vytřepána mezi nasycený vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu gradientovou elucí, mobilní fází byla směs hexan/ethyl-acetát v poměru 9:1 - 7:3.

Výtěžek: 63%; bílá krystalická látka, t.t. 122.2 °C; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, aceton-d<sub>6</sub>) δ 7.57-7.49 (2H, m, Ar), 7.47-7.37 (5H, m, Ar), 7.35-7.29 (2H, m, Ar), 5.66 (1H, dd, J<sub>1</sub>=2.61 Hz, J<sub>2</sub>=3.71 Hz, H5), 4.21 (1H, dd, J<sub>1</sub>=5.5 Hz, J<sub>2</sub>=6.6 Hz, OH), 4.03-3.95 (1H, m, OCH<sub>2</sub>), 3.71-3.60 (1H, m, OCH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, aceton-d<sub>6</sub>) δ 172.3, 159.9, 132.2, 132.0, 130.8, 130.7, 129.8, 129.1, 127.3, 122.9, 83.8, 61.5; IR: (ATR) ν<sub>max</sub> 1040, 1071, 1096, 1186, 1230, 1337, 1359, 1393, 1447, 1484, 1573, 1639, 1737, 2919, 3407 cm<sup>-1</sup>; LRMS (TOF-EI): m/z (relativní intenzita) 346.0 [M]<sup>+</sup> (30), 316.0 (40), 314.0 (32), 259.0 (42), 257.0 (44), 256.0 (14), 235.1 (14), 207.1 (12), 179.1 (36), 178.1 (100), 176.1 (36), 152.1 (10), 151.1 (14), 150.0 (8); HRMS (TOF-EI): m/z vypočteno pro C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>3</sub> 344.0048, nalezeno 344.0057.

## Příprava 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (7) se změnou podmínek

Sumární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub>: 345.19



Furanon **5** (3.17 mmol) byl rozpuštěn v 16 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Reakční směs se ochladila na -70 °C v atmosféře argonu. Při této teplotě byl přidán roztok LDA (1.5M, THF komplex v cyklohexanu, 3,33 mmol). Po 30 minutách míchání byl přidán paraformaldehyd (odpovídá 1.59 mmol formaldehydu). Následně se směs další dvě hodiny míchala a během této doby se pozvolna ohřívala. Při 0 °C se přidala voda a došlo ke změně barvy reakční směsi na černou. Reakční směs byla vytřepána mezi nasycený vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu gradientovou elucí, mobilní fází byla směs hexan/ethyl-acetát v poměru 9:1 - 7:3. Zpět bylo získáno 42 % výchozí látky.

Tabulka výtěžků:

|          |      |
|----------|------|
| <b>7</b> | 29 % |
| <b>8</b> | 18 % |

**7:**

Charakterizace viz str. 35.

**8:**

<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 7.49-7.36 (7H, m, Ar), 7.33-7.27 (2H, m, Ar), 4.46 (2H, t, *J*=5.7 Hz, OH), 3.93 (2H, dd, *J*<sub>1</sub>=12.2, *J*<sub>2</sub>=5.7 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.75 (2H, dd, *J*<sub>1</sub>=12.2, *J*<sub>2</sub>=5.7 Hz, OCH<sub>2</sub>). Charakterizace odpovídá literatuře.<sup>6</sup>

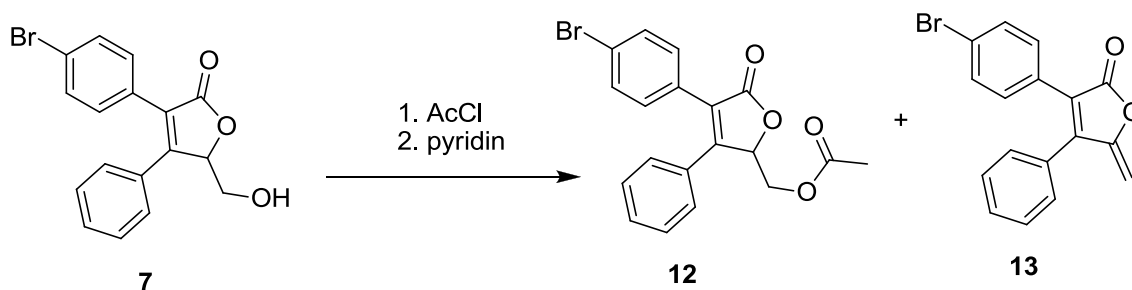
### Příprava

**3-(4-bromfenyl)-5-acetoxymethyl-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (12) a**

**3-(4-bromfenyl)-4-fenyl-5-methyliden-2,5-dihydrofuran-2-onu (13)**

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>4</sub> (**12**) ; C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>2</sub> (**13**)

M<sub>r</sub>: 387.22 (**12**) ; 327.17 (**13**)



Furanon **7** (1.13 mmol) byl rozpuštěn v 15 ml bezvodého dichlormethanu. Ke směsi byl přidán pyridin (1.47 mmol) a směs byla ochlazena na 0 °C. Poté byl přidán acetylchlorid (1.47 mmol). Po 10 minutách bylo chlazení ukončeno a reakční směs se ohřívala na pokojovou teplotu. Reakce byla ukončena po 30 minutách, protože se již veškerá výchozí látka přeměnila (zjištěno pomocí tenkovrstvé chromatografie). Vzniklá směs se 3× vytřepala mezi nasycený vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze hexan/ethyl-acetát v poměru 9:1.

Výtěžek: 87%

Stáním po dobu 3 dní došlo k částečné eliminaci a vzniklé produkty se od sebe oddělily pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu gradientovou elucí, jako mobilní fáze byla použita směs hexan/ethylacetát v poměru 95:5 - 1:1. Směs látek **12** a **13** vznikla v poměru 2,4:1.

### 3-(4-Bromfenyl)-5-acetoxymethyl-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-on (12)

Výtěžek: 70.4 %; nažloutlá amorfní látka;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  7.59-7.52 (2H, m, Ar), 7.49-7.39 (5H, m, Ar), 7.37-7.30 (2H, m, Ar), 5.93 (1H, dd,  $J_1=2.75$  Hz,  $J_2=5.22$  Hz, H5), 4.46 (1H, dd,  $J_1=2.75$  Hz,  $J_2=12.36$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 4.10 (1H, dd,  $J_1=5.22$  Hz,  $J_2=12.36$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 1.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  171.8, 170.4, 158.9, 132.4, 132.1, 131.6, 131.2, 130.4, 129.9, 129.0, 127.4, 123.2, 80.3, 63.4, 20.4; **IR**: (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  1037, 1069, 1086, 1109, 1153, 1168, 1230, 1247, 1339, 1375, 1396, 1444, 1457, 1483, 1586, 1650, 1739, 2924  $\text{cm}^{-1}$ .

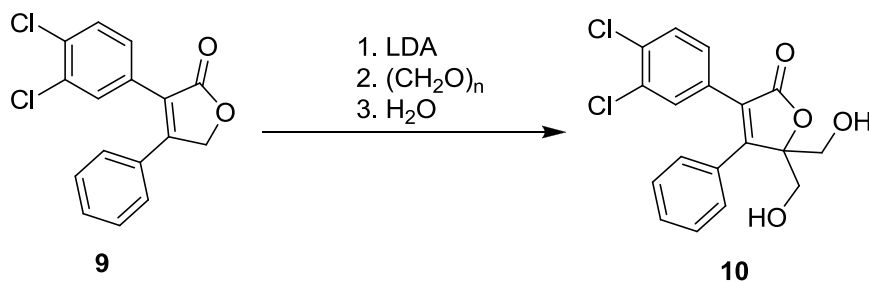
### 3-(4-Bromfenyl)-4-fenyl-5-methyliden-2,5-dihydrofuran-2-on (13)

Výtěžek: 29.6 %; nažloutlá krystalická látka, t.t. 140-142 °C;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.51-7.37 (5H, m, Ar), 7.34-7.27 (4H, m, Ar), 5.37 (1H, d,  $J=2.8$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4.92 (1H, d,  $J=2.8$  Hz, CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168.1, 154.8, 148.8, 131.6, 130.8, 129.9, 129.9, 129.1, 128.8, 127.8, 126.1, 123.6, 98.0; **IR**: (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  1073, 1104, 1143, 1185, 1196, 1289, 1363, 1385, 1401, 1446, 1481, 1583, 1611, 1626, 1639, 1754, 1801, 2919  $\text{cm}^{-1}$ ; **LRMS** (TOF-EI):  $m/z$  (relativní intenzita) 328,0 [M]<sup>+</sup> (80), 326,0 [M]<sup>+</sup> (73), 300,0 (30), 298,0 (32), 272,0 (20), 270,0 (21), 258,0 (53), 256,0 (54), 219,1 (23), 191,1 (100), 189,1 (31), 176,1 (77), 151,1 (29); **HRMS**: (TOF-EI):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>2</sub> 325.9942, nalezeno 325.9941.

### Příprava 3-(3,4-dichlorfenyl)-5,5-bis(hydroxymethyl)-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (10)

Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

M<sub>r</sub>: 365.21



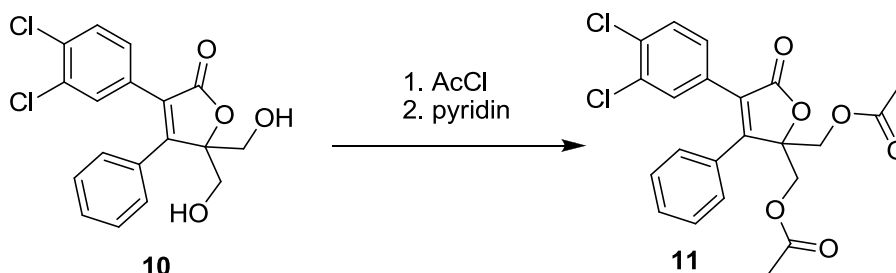
Furanon **9** (3.3 mmol) byl rozpuštěn v 16.5 ml bezvodého tetrahydrofuranu pod atmosférou argonu. Reakční směs se poté chladila na -80 °C. Při této teplotě byl přidán roztok LDA (1.5M, THF komplex v cyklohexanu, 3.47 mmol). Po 30 minutách míchání byl přidán paraformaldehyd (odpovídá 3.3 mmol formaldehydu). Následně se směs další dvě hodiny míchala a během této doby se pozvolna ohřívala na laboratorní teplotu. Reakce byla ukončena přidáním vody a v reakční směsi došlo ke změně barvy na černou. Reakční směs byla vytřepána mezi nasycený vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena. Vznikla olejovitá kapalina, která se po zahřátí v ethyl-acetátu rozpustila a po pozvolném ochlazení se v roztoku vytvořily krystaly.

Výtěžek: 76%; bílá krystalická látka, t.t. 159.9 °C; **<sup>1</sup>H NMR:** (300 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) δ 7.61-7.57 (1H, m, Ar), 7.52-7.38 (6H, m, Ar), 7.30-7.24 (1H, m, Ar), 4.51 (2H, bs, OH), 3.93 (2H, d, *J*=12.1Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.77 (2H, d, *J*=12.1Hz, OCH<sub>2</sub>); **<sup>13</sup>C NMR:** (75 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) δ 171.5, 163.3, 133.0, 132.4, 132.3, 131.8, 131.5, 131.0, 130.1, 129.9, 129.7, 128.7, 128.3, 93.7, 61.8; **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub> 1027, 1079, 1095, 1111, 1132, 1145, 1184, 1206, 1258, 1296, 1350, 1378, 1409, 1441, 1454, 1471, 1548, 16531738, 2936, 3369 cm<sup>-1</sup>; **LRMS** (TOF-EI): *m/z* (relativní intenzita) 364.0 [M]<sup>+</sup> (2), 318.0 (51), 316.0 (100), 290.0 (22), 288.0 (45), 248.0 (18), 246.0 (32), 227.0 (7), 225.0 (34), 212.0 (24), 176.1 (46); **HRMS** (TOF-EI): *m/z* vypočteno pro C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 364.0269, nalezeno 364.0260.

### Příprava 3-(3,4-dichlorfenyl)-5,5-bis(acetoxymethyl)-4-fenyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (**11**)

Sumární vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

*M*<sub>r</sub>:449.28





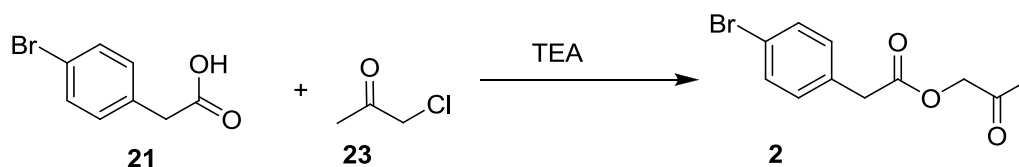
Diol **10** (1.0 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu v atmosféře argonu. Ke směsi byl přidán pyridin (1.0 mmol) a acetylchlorid (1.01 mmol) a směs byla chlazená v ledové lázni. Po 10 minutách bylo chlazení ukončeno a reakční směs se ohřívala na pokojovou teplotu. Reakce byla ukončena po 30 minutách, protože se již veškerá výchozí látka přeměnila (zjištěno pomocí tenkovrstvé chromatografie). Na vakuové odparce byl odpařen dichlormethan. Vzniklá směs byla vytřepána mezi 5 % vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu gradientovou elucí za použití mobilní fáze hexan/ethyl-acetát v poměru 9:1 - 7:3.

Výtěžek: 54%; bezbarvá amorfnní látka;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.59-7.55 (1H, m, Ar), 7.49-7.42 (3H, m, Ar), 7.33-7.28 (1H, m, Ar), 7.21-7.09 (3H, m, Ar), 4.57 (2H, d,  $J=12.1$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 4.28 (2H, d,  $J=12.1$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 2.05 (6H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.9, 169.6, 159.1, 133.4, 132.7, 130.9, 130.5, 130.3, 130.2, 129.7, 128.8, 128.7, 128.2, 127.4, 86.3, 62.6, 20.5; **IR**: (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  1011, 1032, 1136, 1183, 1214, 1379, 1443, 1471, 1552, 1746, 2954  $\text{cm}^{-1}$ .

### Příprava 2-oxopropyl-2-(4-bromfenyl)acetátu (2)

Sumární vzorec:  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrO}_3$

$M_r$ : 271.11



Kyselina 4-bromfenyloctová (**21**) (23.25 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml bezvodého tetrahydrofuranu v atmosféře argonu. Do reakční směsi byl přidán triethylamin (23.66 mmol). Po 30 minutách byl přidán chloraceton (**23**) (25.12 mmol) a směs byla

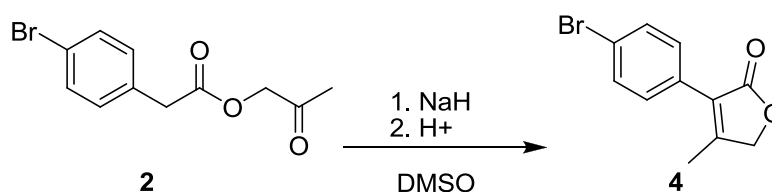
zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 26 hodin. Reakční směs se následně zfiltrovala a rozpouštědla byla odpařena. Produktem byla olejovitá kapalina. Surový produkt se přečistil pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu, mobilní fázi byla směs hexan/ethyl-acetát v poměru 8:2.

Výtěžek: 83.83%; žlutá olejovitá kapalina;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.49-7.41 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.22-7.14 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 4.66 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 3.70 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 2.11 (3H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201.0, 170.3, 132.3, 131.7, 131.1, 121.3, 68.6, 40.1, 26.0. Charakterizace odpovídá literatuře.<sup>6</sup>

### Příprava 3-(4-bromfenyl)-4-methyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (4)

Sumární vzorec:  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{BrO}_2$

$M_r$ : 253.09



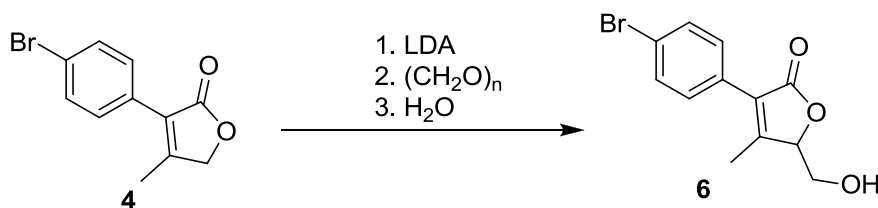
Do suspenze hydridu sodného (20.48 mmol) ve 100 ml bezvodého DMSO byl kanylou přenesen roztok esteru **2** (19.49 mmol) v 56 ml bezvodého DMSO v atmosféře argonu. Po 60 minutách byla reakce ukončena přidáním 3M HCl do pH přibližně 1. Reakční směs změnila barvu z černé na žlutou. Poté byla směs 3× vytřepána mezi 5 % vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická fáze byla následně vysušena bezvodým síranem sodným. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu gradientovou elucí za použití mobilní fáze hexan/ethyl-acetát v poměru 95:5 - 9:1.

Výtěžek: 55.22%; bílá krystalická látka, t.t.: 97.5 °C;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.60-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.41-7.35 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 4.79 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 2.21 (3H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.9, 158.1, 131.7, 130.4, 128.7, 125.8, 122.7, 72.5, 13.4. Charakterizace odpovídá literatuře.<sup>6</sup>

### Příprava 3-(4-bromfenyl)-5-hydroxymethyl-4-methyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (6)

Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub>: 283.12



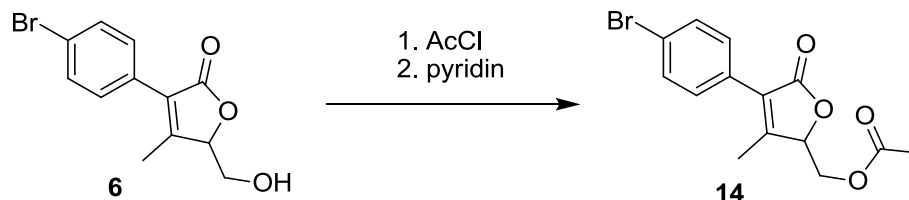
Furanon **4** (4.0 mmol) byl rozpuštěn v 20 ml suchého tetrahydrofuranu a roztok poté ochlazen na -70 °C v atmosféře argonu. Při této teplotě byl přidán roztok LDA (1.5 M, THF komplex v cyklohexanu, 4.2 mmol). Po 30 minutách míchání byl přidán paraformaldehyd (odpovídá 2.0 mmol formaldehydu). Následně se směs dvě hodiny míchala a pozvolna ohřívala. Při 0 °C byla přidána voda a došlo ke změně barvy reakční směsi na oranžovou. Reakční směs byla vytřepána mezi nasycený vodný roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu gradientovou elucí za použití mobilní fáze hexan/ethyl-acetát v poměru 9:1 - ethyl-acetát.

Výtěžek: 23 %; bílá krystalická látka, t.t. 119-120.5 °C; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, aceton-d<sub>6</sub>) δ 7.67-7.58 (2H, m, Ar), 7.52-7.44 (2H, m, Ar), 5.04-5.00 (1H, m, H5), 4.22 (1H, t, J=6.04, OH), 4.09-3.99 (1H, m, OCH<sub>2</sub>), 3.98-3.87 (1H, m, OCH<sub>2</sub>), 2.23 (3H, d, J=0.83, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, aceton-d<sub>6</sub>) δ 172.5, 160.9, 132.2, 131.7, 130.8, 127.0, 122.6, 84.8, 61.3, 13.3; IR: (ATR) ν<sub>max</sub> 1037, 1060, 1072, 1086, 1108, 1152, 1182, 1213, 1290, 1335, 1383, 1398, 1438, 1458, 1485, 1591, 1649, 1730, 1737, 2932, 3402 cm<sup>-1</sup>; LRMS (TOF-EI): m/z (relativní intenzita) 284.0 [M]<sup>+</sup> (37), 282.0 [M]<sup>+</sup> (35), 254.0 (67), 252.0 (70), 225.0 (19), 223.0 (18), 197.0 (37), 195.0 (45), 173.1 (27), 145.1 (24), 117.1 (35), 116.1 (100), 115.1 (97); HRMS (TOF-EI): m/z vypočteno pro C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>3</sub> 281.9892, nalezeno 281.9894.

### Příprava 3-(4-bromfenyl)-5-acetoxymethyl-4-methyl-2,5-dihydrofuran-2-onu (14)

Sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>4</sub>

M<sub>r</sub>: 325.15



Furanon **6** (0.77 mmol) byl rozpuštěn v 15 ml bezvodého dichlormethanu. Ke směsi byl přidán pyridin (1.00 mmol) a reakční směs byla ochlazena na 0 °C. Poté byl do směsi vpraven acetylchlorid (1.00 mmol) a reakce probíhala 30 minut za stálého chlazení na teplotu 0 °C. Pak byla reakce ukončena, protože veškerá výchozí látka se již přeměnila (zjištěno pomocí tenkovrstvé chromatografie). Odpařil se dichlormethan a vzniklý meziprodukt se 3× vytřepal mezi nasycený roztok chloridu sodného a ethyl-acetát. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu gradientovou elucí za použití mobilní fáze hexan/ethyl-acetát v poměru 7:3.

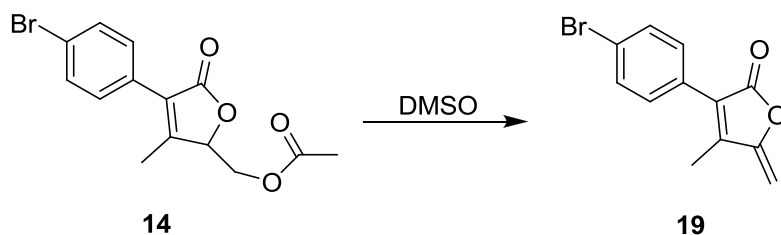
Výtěžek: 63.5 %; bílá olejovitá látka; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, aceton-d<sub>6</sub>) δ 7.68-7.62 (2H, m, Ar), 7.52-7.44 (2H, m, Ar), 5.29-5.23 (1H, m, H5), 4.55 (1H, dd, J<sub>1</sub>=3.02 Hz, J<sub>2</sub>=12.36 Hz, OCH), 4.44 (1H, dd, J<sub>1</sub>=4.40 Hz, J<sub>2</sub>=12.36 Hz, OCH), 2.25 (3H, d, J<sub>1</sub>=0.83 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.99 (3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, aceton-d<sub>6</sub>) δ 171.9, 170.6, 159.7, 132.3, 131.7, 130.4, 127.4, 122.9, 81.6, 62.6, 20.4, 13.3; IR: (ATR) ν<sub>max</sub> 1070, 1105, 1143, 1213, 1329, 1365, 1382, 1437, 1487, 1589, 1663, 1740, 2925 cm<sup>-1</sup>.

### 3-(4-Bromfenyl)-4-methyl-5-methyliden-2,5-dihydrofuran-2-on (19)

Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>BrO<sub>2</sub>

M<sub>r</sub>: 265.10

Furanon **19** vznikl z acetylovaného furanonového derivátu **14** eliminací acetátu v DMSO.



<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.74-7.65 (2H, m, Ar), 7.56-7.47 (2H, m, Ar), 5.36 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 2.26 (3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168.1, 155.0, 148.3, 131.8, 131.2, 128.7, 125.9, 122.6, 96.4, 11.1.

## 6. LITERATURA

1. Richardson, Malcolm D; Changing patterns and trends in systemic fungal infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2005**, 56(Suppl. 1), i5-i11
2. Kale, Pramodini; Johnson, Leonard B; Second-generation azole antifungal agents, *Drugs of Today*, **2005**, 41(2), 91
3. Spellberg, Brad J.; Filler, Scott G.; Edwards, John E., Jr.; Current treatment strategies for disseminated candidiasis, *Clinical Infectious Diseases*, **2006**, 42(2), 244
4. Oppenheim, Beryl A.; Herbrecht, Raoul; Kusne, Shimon; The safety and efficacy of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of invasive mycoses, *Clinical Infectious Diseases*, **1995**, 21(5), 1145
5. Lincová, D.; Farghali, H.; *Základní a aplikovaná farmakologie*, ed. 2; Galén, **2007**
6. Šenel, P.; *Disertační práce*; UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2009**
7. Tichotová, L.; *Disertační práce*; UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2011**
8. Garcia-Effron, Guillermo; Dilger, Amanda; Alcazar-Fuoli, Laura; Park, Steven; Mellado, Emilia; Perlin, David S.; Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*; *Journal of Clinical Microbiology*, **2008**, 46(4), 1200
9. Carillo-Munoz, A., J.; Quindos, Q., Lopez-Ribot, J., L.; Current developments in anti-fungal agents; *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2004**, 3, 297
10. Lóránd, T.; Kocsis, B.; Recent advances in antifungal agents, *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*; **2007**, 7, 900
11. Mathew, B., P.; Nath, M.; Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses; *ChemMedChem*, **2009**, 4, 310
12. Šenel, P.; *Autoreferát disertační práce*; UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2009**
13. Ostrosky-Zeichner, Luis; Casadevall, Arturo; Galgiani, John N.; Odds, Frank C.; Rex, John H; An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2010**, 9(9), 719

14. Fudou, Ryosuke; Iizuka, Takashi; Yamanaka, Shigeru; Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. Part 1. Fermentation and biological characteristics; *Journal of Antibiotics*, **2001**, 54(2), 149
15. Barsby Todd; Kelly Michael T; Andersen Raymond J; Tupuseleiamides and basiliskamides, new acyl dipeptides and antifungal polyketides produced in culture by a *Bacillus laterosporus* isolate obtained from a tropical marine habitat, *Journal of natural products*, **2002**, 65(10), 1447
16. Zapf, S.; Anke, T.; Sterner, O.; Incrustoporin, a new antibiotic from *Incrustoporia carneola* (Bres.) Ryv. (Basidiomycetes); *Acta Chem. Scand.*, 49(3), **1995**, 233
17. Pour, M.; Gibberellins, antheridiogens and incrustoporins: a personal account of syntheses of small, highly functionalized molecules; *Chem. listy* 97(11), **2003**, 1061
18. Buchta, V.; Pour, M.; Kubanová, P.; Silva, L.; Votruba, I.; Vopršalová, M.; Schiller, R.; Fáková, H.; Špulák, M.; In vitro activities of 3-(halogenatedphenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-ones against common and emerging yeasts and molds; *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(3), **2004**, 873
19. Šenel, P.; Diplomová práce, UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2005**
20. Pour, M.; Špulák, M.; Balšánek, V.; Kuneš, J.; Buchta, V.; Waisser, K.; 3-Phenyl-5-methyl-2*H*,5*H*-furan-2-ones: tuning antifungal activity by varying substituents on the phenyl ring; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10(16), **2000**, 1893
21. Pour, M.; Špulák, M.; Buchta, V.; Kubanová, P.; Vopršalová, M.; Wsól, V.; Fáková, H.; Koudelka, P.; Pourová, H.; Schiller, R.; 3-Phenyl-5-acyloxymethyl-2*H*,5*H*-furan-2-ones: Synthesis and Biological Activity of a Novel Group of Potential Antifungal Drugs; *J. Med. Chem.*, 44(17), **2001**, 2701
22. Pour, M.; Špulák, M.; Balšánek, V.; Kuneš, J.; Buchta, V.; 3-Phenyl-5-methyl-2*H*,5*H*-furan-2-ones: tuning antifungal activity by varying substituents on the phenyl ring; *Bioorg. Med. Chem.*, 11, **2003**, 2843
23. Matoušová, E.; Diplomová práce; UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2007**
24. Šnajdr, I.; Pavlík, J.; Schiller, R.; Kuneš, J.; Pour, M.; Pentenolide analogs of antifungal butenolides: strategies towards 3,6-disubstituted pyranones and

unexpected loss of biological effect; Collect. Czech. Chem. Commun., 72(11), **2007**, 1472

25. Uddin, M., J.; Rao, P., N., P.; Knaus, E., E.; Design and synthesis of novel rofecoxib analogs as potential cyclooxygenase (COX-2) inhibitors: Replacement of the methylsulfonyl pharmacophore by a sulfonylazide bioisostere; J. Heterocyclic Chem. **2003**, 40, 861

26. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard; Document M27-A3; Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, **2008**.

27. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved standard; Document M38-A2; Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, **2008**.

28. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard – Seventh Edition; Document M07-A7; Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, **2006**.