

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

KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE



RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Deriváty benzodiazinů jako látky s potenciální bronchodilatační
aktivitou**

Hradec Králové, 2011

Mgr. Jaroslava Šašková

Chtěla bych poděkovat panu PharmDr. Marcelu Špulákovi, PhD., svému školiteli, za pomoc při práci v laboratoři a rovněž při vypracovávání rigorózní práce, dále pak panu prof. RNDr. Milanu Pourovi, PhD., že jsem se mohla věnovat organické chemii v jeho pracovní skupině a panu doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi za analýzu NMR nasyntetizovaných látek.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala PharmDr. Petru Šenelovi, PhD, Mgr. Lucii Tichotové, PhD. a Mgr. Elišce Matoušové, kteří mi vždy ochotně pomohli a vytvořili příjemné pracovní prostředí.

Mé díky patří také paní PharmDr. Marii Vopršalové, CSc., paní PharmDr. Janě Pourové, PhD. a jejich pracovní skupině za provedení biologického hodnocení mých derivátů.

Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem a že jsem ji vypracovala samostatně. Literatura a další zdroje, z nichž jsem při psaní své práce vycházela, je zaznamenána v seznamu použité literatury a v práci je řádně ocitována.

Mgr. Jaroslava Šašková

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: **Mgr. Jaroslava Šašková**

Konzultant: **PharmDr. Marcel Špulák, PhD.**

Název rigorózní práce: **Deriváty benzodiazinů jako látky s potenciální
bronchodilatační aktivitou**

V této rigorózní práci jsme se zabývali syntézou derivátů benzodiazinů, konkrétně chinazolinu a chinoxalinu. Navázali jsme tím na přípravu derivátů chinazolinu strukturálně odvozených od alkaloidů vasicinu a vasicinonu, obsažených v keři *Adhatoda vasica*. Původní deriváty byly testovány z hlediska svých účinků na izolovanou tracheu potkana a především u dvou z nich, 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu a 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu, byla zjištěna vysoká bronchodilatační aktivita. Tyto látky se proto staly výchozím bodem pro další syntézy.

První skupinu připravených látek tvořily deriváty 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu, připravené oxidačními reakcemi. Podařilo se nám oxidovat atom dusíku v piperidinovém skeletu postranního řetězce. Dvoukrokovou syntézou byl připraven i derivát chinazolin-1-oxidu.

Pokusy o oxidaci atomu síry v molekule 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu nevedly ke vzniku nových derivátů, i při použití mírných oxidačních podmínek došlo k oxidativní desulfuraci za vzniku chinazolin-4-olu.

Posledními připravenými deriváty byla chinoxalinová analoga úspěšných chinazolinových předloh.

Celkem bylo syntetizováno a z hlediska bronchodilatační aktivity testováno 5 látek, avšak bronchodilatační účinky ani jedné z připravených sloučenin nepřevýšily aktivitu 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: **Mgr. Jaroslava Šašková**

Consultant: **PharmDr. Marcel Špulák, PhD.**

Title of Thesis: **Benzodiazine derivatives as compounds with potential bronchodilatory activity**

This thesis describes the synthesis of various benzodiazines, in this case derived from quinazoline and quinoxaline. We followed a synthesis of quinazoline derivatives structurally analogous to vasicine and vasicinone, alkaloids isolated from a plant *Adhatoda vasica*. The original derivatives were tested by the common *in vitro* model of isolated rat trachea. Two compounds, 4-[3-(piperidine-1-yl)propyloxy]quinazoline and 4-[3-(piperidine-1-yl)propylsulfanyl]quinazoline, showed promising bronchodilatory activities. Therefore, we selected these molecules as model structures for our further syntheses.

The first group of compounds was synthesized by oxidation of 4-[3-(piperidine-1-yl)propyloxy]quinazoline. We oxidated a nitrogen atom in the piperidine side chain of the parent molecule and we succeeded to create, in two steps, derivative based on quinazoline-1-oxide.

Attempts to oxidize a sulphur atom in 4-[3-(piperidine-1-yl)propylsulfanyl]quinazoline were due to oxidative desulfuration unsuccessful, the only isolated product of these reactions was quinazoline-4-ol.

The last group of prepared derivatives contained quinoxaline analogues of two above-mentioned bronchodilatory active quinazolines.

In summary, we synthesized five compounds which were submitted for an evaluation of their bronchodilatory activity. None of the tested compounds displayed higher bronchodilatory effect than parent 4-[3-(piperidine-1-yl)propylsulfanyl]quinazoline.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK..... | 7 |
| 1. ÚVOD..... | 8 |
| 1.1. Astma bronchiale, jeho klasifikace a cíl léčby..... | 8 |
| 1.2. Terapie astmatu..... | 8 |
| 1.2.1. Preventivní antiastmatika..... | 9 |
| 1.2.2. Úlevová antiastmatika..... | 13 |
| 1.3. Syntetické modifikace alkaloidů (-)vasicinu a (-)vasicinonu..... | 15 |
| 1.3.1. Adhatoda vasica..... | 15 |
| 1.3.2. Alkaloidy (-)vasicin a (-)vasicinon a jejich syntetické obměny..... | 17 |
| 1.4. Bronchodilatační aktivita benzodiazinů..... | 19 |
| 1.4.1. Deriváty chinazolinu..... | 19 |
| 1.4.2. Deriváty chinoxalinu..... | 20 |
| 1.4.3. Deriváty ftalazinu..... | 20 |
| 1.4.4. Deriváty cinnolinu..... | 21 |
| 1.5. Bronchodilatační aktivita (-)vasicinu a (-)vasicinonu a jejich syntetických derivátů připravených na FaF UK v Hradci Králové..... | 21 |
| 2. CÍL PRÁCE..... | 25 |
| 3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM..... | 26 |
| 3.1. Syntéza derivátů odvozených od 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu..... | 26 |
| 3.1.1. Oxidace 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu..... | 26 |
| 3.1.2. Příprava 4-hydroxychinazolin-1-oxidu..... | 26 |
| 3.2. Syntéza derivátů odvozených od 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl] chinazolinu..... | 28 |
| 3.2.1. Přímá oxidace 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu..... | 28 |
| 3.3. Syntéza derivátů chinoxalinu..... | 28 |
| 3.3.1. Syntéza 2-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinoxalinu..... | 29 |
| 3.3.2. Syntéza 2-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinoxalinu..... | 29 |
| 3.4. Hodnocení bronchodilatační aktivity připravených látek..... | 29 |
| 4. ZÁVĚR..... | 31 |
| 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1. Obecné experimentální postupy..... | 33 |
| 5.2. Experimentální postupy použité při biologickém hodnocení..... | 33 |
| 5.2.1. Metodika izolované průdušnice..... | 33 |
| 5.2.2. Zpracování výsledků biologického hodnocení..... | 34 |
| 5.3. Syntéza derivátů odvozených od 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu. 35 | 35 |
| 5.3.1. 1-[3-(Chinazolin-4-yloxy)propyl]piperidin-1-oxid..... | 35 |
| 5.3.2. 4-Hydroxychinazolin-1-oxid..... | 35 |
| 5.3.3. 4-[3-(Piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolin-1-oxid..... | 36 |
| 5.4. Syntéza derivátů chinoxalinu..... | 37 |
| 5.4.1. 2-[3-(Piperidin-1-yl)propyloxy]chinoxalin..... | 37 |
| 5.4.2. Chinoxalin-2-thiol..... | 37 |
| 5.4.3. 2-[3-(Piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinoxalin..... | 38 |
| 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 39 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|------------------|--|
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| ED ₅₀ | koncentrace látky vyvolávající polovinu maximální odpovědi |
| EtOAc | ethyl-acetát |
| IC | inhibiční koncentrace |
| IR | infračervená spektroskopie |
| LCMS | hmotnostní spektroskopie s nízkým rozlišením |
| <i>m</i> CPBA | kyselina 3-chlorperoxobenzoová |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| OLA | obtížně léčitelné astma |
| SEM | směrodatná odchylka |

1. ÚVOD

V rámci své diplomové práce jsem se zabývala syntézou derivátů strukturálně vycházejících z přírodních alkaloidů (-)vasicinu a (-)vasicinonu. U připravených látek byla, stejně jako u jejich přírodní předlohy, hodnocena jejich bronchodilatační aktivita.

Vzhledem k tomu, že dva z připravených derivátů vykazovaly slibnou bronchodilatační aktivitu, rozhodli jsme se v tomto směru výzkumu pokračovat a připravit nové látky, které by dále rozšířily naše poznatky o vztahu struktura - biologická aktivita.

1.1. Astma bronchiale, jeho klasifikace a cíl léčby

Astma bronchiale je definováno jako závažné chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, ovlivněné mnoha biologickými faktory.¹ Následkem chronického zánětu dochází k hyperreaktivitě průdušek, která se u pacienta projevuje opakovanými epizodami pískotů při dýchání, dušnosti, tlaku na hrudi a kašlem, častým především v noci a k ránu. Kromě zmíněných obtíží se objevuje bronchiální obstrukce, která je však reverzibilní a odeznívá buď spontánně nebo po podání léčiv.¹ Prevalence astmatu se celosvětově pohybuje mezi 1–18 %.² V České republice je počet astmatiků o něco nižší, přibližně 8 % u dospělé populace a 12–15 % u dětí.³

Podle příčiny a způsobu vzniku onemocnění můžeme astma rozdělit na „alergické“ a „nealergické“⁴, z hlediska závažnosti klinických projevů před léčbou pak do čtyř stupňů. Toto rozdělení na astma intermitentní a perzistující – lehké, středně těžké a těžké – je podkladem pro sestavení dlouhodobého léčebného plánu.⁵

V současnosti si v léčbě astmatu klademe za cíl dosažení a dlouhodobé udržení stavu zvaného „astma pod kontrolou“.⁶

1.2. Terapie astmatu

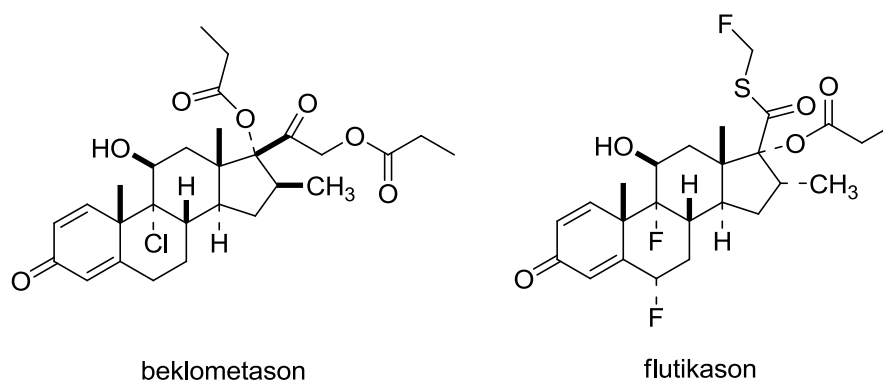
V terapii astmatu rozlišujeme v současné době dva přístupy, volené podle zdravotního stavu pacienta. U akutních exacerbací jsou podávána tzv. úlevová (záchranná) antiastmatika, pro stabilizaci pacienta, předcházení exacerbacím a k navození a udržení stavu „kontrolovaného astmatu“ jsou užívána antiastmatika preventivní, tlumící zánětlivé procesy

v oblasti dýchacích cest, určená k dlouhodobé udržovací léčbě zpravidla u pacientů s persistujícím astmatem.⁷

1.2.1. Preventivní antiastmatika

Preventivní antiastmatika jsou léčiva určená k předcházení akutním exacerbacím a k tlumení zánětlivých podnětů v dýchacích cestách. V důsledku celoživotního charakteru astmatu jsou užívány dlouhodobě a každodenně.⁶ V terapii jsou nejčastěji užívány protizánětlivě působící látky, léčiva s dlouhodobým bronchodilatačním účinkem nebo vakcíny speciálně připravené pro konkrétního pacienta.

Inhalační kortikosteroidy (IKS) - *beklometason, budesonid, ciklesonid, flutikason, mometason* (Obr. 1) - jsou v současnosti nejvíce užívaná protizánětlivá antiastmatika.⁸



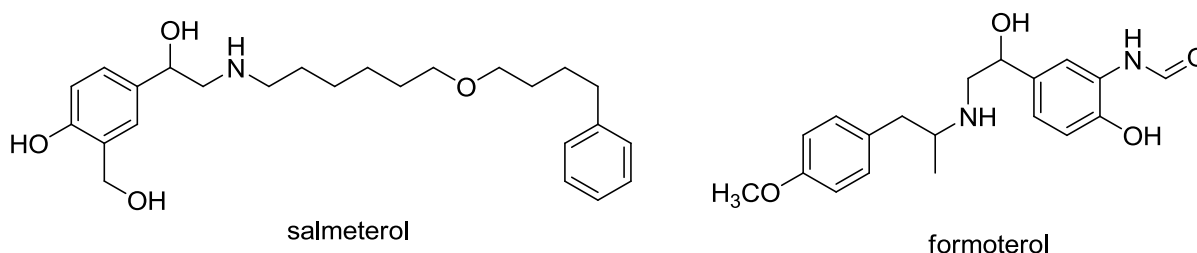
Obr. 1

Mechanismus jejich účinku spočívá v tlumení vzniku mediátorů zánětu.⁷ IKS mají, na rozdíl od systémových kortikoidů, méně nežádoucích účinků (chraptot, orofaryngeální kandidóza či příležitostný kašel vzniklý podrážděním dýchacích cest při inhalaci), kterým lze předcházet např. výplachem úst vodou po každé inhalaci nebo použitím inhalačního nástavce. Systémové nežádoucí účinky se u IKS téměř nevyskytují, výjimečně se mohou objevit při podávání vysokých dávek.⁸

Dlouhodobě účinkující β_2 -mimetika (LABA = long-acting β_2 agonists) – *salmeterol, formoterol, klenbuterol, prokaterol* (Obr. 2) – jsou adrenergní agonisté schopní dilatovat

hladkou svalovinu dýchacích cest a jejichž účinek přetrvává nejméně 12 hodin. Pacientovi mohou být podány inhalačně nebo perorálně.

Mechanismus účinku je dán interakcí s β_2 -receptory v dýchacích cestách, dochází k relaxaci hladké svaloviny bronchů a trachey, zvětšení průsvitu dýchacích cest, zlepšení mukociliární clearance a snížení vaskulární permeability. Navíc mohou dlouhodobě podávaná LABA vykazovat i mírný protizánětlivý účinek.⁹



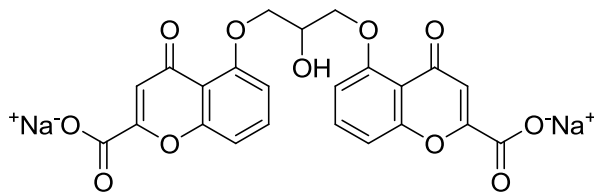
Obr. 2

V současnosti se upřednostňuje inhalační podání LABA (formoterol, salmeterol) před perorálně podávanými (klenbuterol, prokaterol) z důvodu nižších nežádoucích účinků při inhalačním podání. Tyto nežádoucí účinky souvisí s aktivací sympatiku, patří sem tremor, palpitace, tachykardie a periferní vazodilatace. Vysoké dávky mohou vést k hypokalémii (hlavně při současném podávání kortikosteroidů, teofylinu nebo diuretik).¹⁰

Vzhledem k popsáným případům náhlého úmrtí pacientů užívajících pouze salmeterol, je v současnosti doporučováno upřednostnění fixních kombinací LABA s IKS podávaných společně v jednom inhalátoru, před podáním samotných LABA.¹¹

Fixní kombinace LABA a IKS - dostupné na českém trhu jsou: *budesonid/formoterol*, *beclometason/formoterol* a *flutikason/salmeterol*. Výhoda kombinace tkví především v příznivém vlivu IKS na působení β_2 -mimetik zvyšováním exprese β_2 -receptorů¹² a v usnadnění vzniku aktivního komplexu kortikosteroid-receptor působením LABA. Zároveň dochází ke snížení počtu molekul kortikosteroidu nutných pro dosažení stejného účinku jako při použití samotného IKS bez přidání LABA.¹³ Při podání fixní kombinace postačí podávání nižších dávek jednotlivých složek, než by bylo nutné při jejich samostatné aplikaci.

Látky stabilizující žírné buňky - *nedokromil (inhalační podání), ketotifen (perorální a oční podání)* (Obr. 3) – jsou látky, které stabilizují membránu žírných buněk a tím brání vyplavení zánětlivých mediátorů, potlačují kašel a snižují bronchokonstrikci po větší fyzické zátěži, po inhalaci studeného nebo zplodinami znečištěného vzduchu. Nemají však bronchodilatační účinky. Proto jsou používány pouze preventivně v udržovací léčbě lehkého a středně těžkého perzistujícího astmatu. Nástup účinku se dostavuje až po několika týdnech léčby.¹⁴

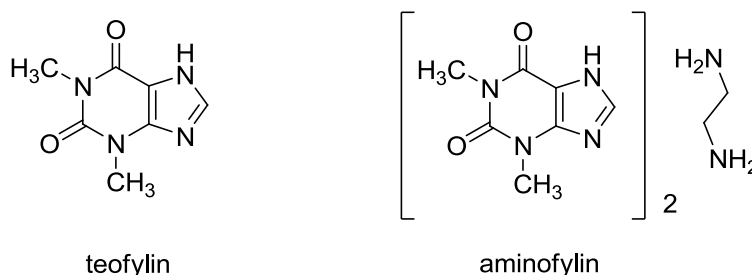


nedokromil

Obr. 3

Nežádoucí účinky jsou pouze mírné, objevit se může únava, závratě, bolesti hlavy nebo např. otok a bolest kloubů. Inhalačně podávané kromony mohou vyvolat kašel podrážděním dýchacích cest nebo mohou být dokonce příčinou bronchospasmu.¹⁴

Retardované methylxantiny – *teofylin, aminofylin* (Obr. 4) – jsou bronchodilatačně působící látky s extra-pulmonálními a protizánětlivými účinky.⁹ Dnes se nepoužívají příliš často, význam má pouze podání pacientům s obtížně léčitelným astmatem (OLA), kde jsou předepisovány jako doplňkové léčivo.¹⁵ V monoterapii jsou podávány preventivně jen u pacientů s lehkým perzistujícím astmatem.⁹



teofylin

aminofylin

Obr. 4

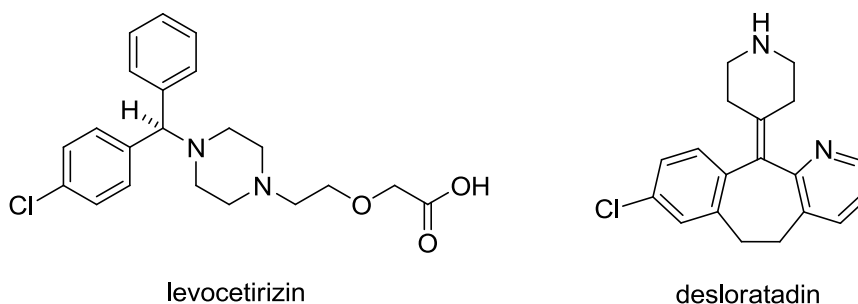
Methylxantiny jsou látky schopné nespecificky inhibovat izoenzymy fosfodiesterázy, tím nedochází k přeměně cAMP a cGMP na AMP a GMP, v buňkách hladké svaloviny

dýchacích cest se hromadí cAMP a cGMP, jejichž nadbytek vede k bronchodilataci. Dalším mechanismem účinku je kompetitivně antagonistické působení methylxantinů na adenosinových receptorech. Methylxantiny zde brání vazbě adenosinu na jeho tyto receptory a ten pak nemůže vazbou na svůj receptor navodit u astmatiků bronchokonstrikci a uvolnění zánětlivých působků z mastocytů.¹⁵

Nežádoucí účinky teofylinu jsou bohužel poměrně závažné. Kromě bolestí hlavy, nauzey, neklidu, poruch spánku, či gastroezofageálního refluxu, se mohou vyskytnout i srdeční arytmie.¹⁴ Vzhledem k jeho úzké terapeutické šíři je potřeba před výjimečným podáním teofylinu nutno monitorovat jeho hladinu v krvi.¹⁶

Antihistaminika II. generace – *desloratadin, levocetirizin, rupatadin* (Obr. 5) – jsou antagonisté histaminových H1 receptorů. Navázání molekul antihistaminika na tyto receptory snižuje alergickou reakci organismu.⁷ Jejich role v léčbě astmatu není zcela objasněna, ale u alergické rýmy, která má až v 50% souvislost se vznikem astmatu, byl prokázáno jejich trvalé příznivé působení.¹⁷

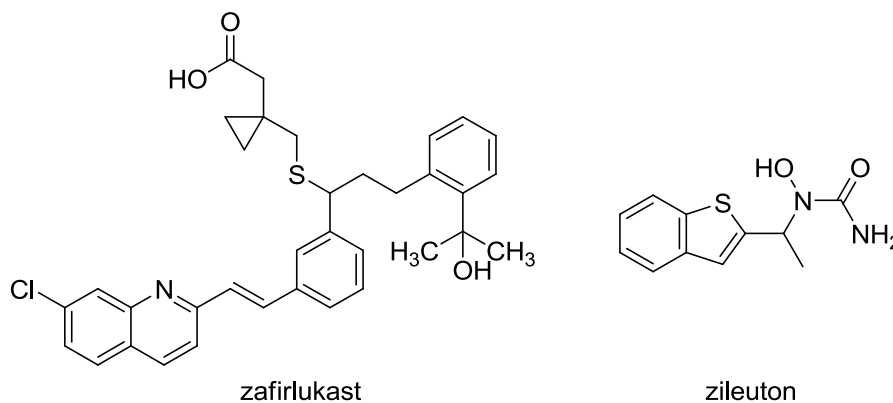
Tato léčiva jsou často užívána pacienty s diagnostikovaným sezónním pylovým astmatem.¹⁸ Nežádoucí účinky druhé generace jsou ve srovnání s první generací menší, stále se však může vyskytnout ospalost, únava, nebo také bolest hlavy.¹⁴



Obr. 5

Antileukotrieny – *montelukast, zafirlukast, zileuton* (Obr. 6) – mají dva poněkud odlišné mechanismy účinku. Zafirlukast a montelukast působí jako kompetitivní antagonisté leukotrienů na jejich receptorech. Zileuton naopak inhibuje enzym 5-lipoxygenázu, která zodpovídá za tvorbu leukotrienů.¹⁴ Nejčastěji jsou používány k léčbě tzv. aspirin-senzitivního astmatu, u ponámahového astmatu¹⁹ nebo případně též u astmatu vzniklého z alergické

rýmy.²⁰ Antileukotrieny nemívají příliš závažné nežádoucí účinky, objevit se mohou bolesti hlavy, nauzea, dyspepsie, malátnost, vyrážka a svědění.¹⁵



Obr. 6

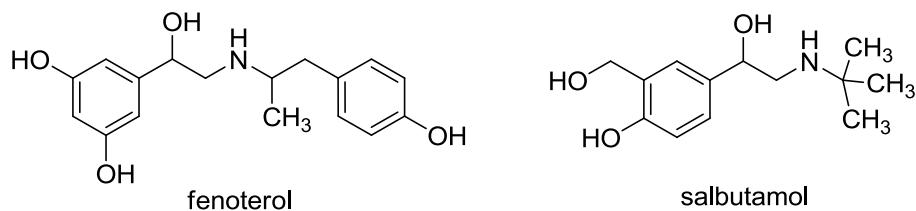
Omalizumab – je rekombinantní monoklonální protilátka, která indukuje snížení sekrece IgE a kromě toho redukuje počet B-lymfocytů.²¹ Omalizumab je lékem využívaným především pro těžké případy pacientů s OLA, u kterých selhává léčba pomocí IKS nebo inhalačních LABA a u astmatiků s prokázaným alergickým astmatem zprostředkovaným IgE.²² Nežádoucí účinky jsou jen mírné, lokální kožní reakce v místě vpichu, bolesti hlavy nebo snížená odolnost pacienta vůči infekcím.²¹

Specifická alergenová imunoterapie (SIT) – je způsob specifické léčby astmatu vyvolaného u konkrétního pacienta známým alergenem. Mechanismus účinku spočívá ovlivnění vývoje specifické imunologické přecitlivělosti pacienta vůči konkrétnímu alergenu. Pacient je senzitivován vůči danému alergenu, podávanému v postupně se zvyšujících koncentracích v injekční nebo sublinguální lékové formě. Vlivem senzitivace se u pacienta navodí imunologická tolerance, která vede v průběhu léčby i po jejím ukončení ke snížení nebo dokonce vymizení obtíží spojených s vystavením pacienta danému alergenu. Metoda SIT je však použitelná pouze u pacientů s alergickou reakcí zprostředkovanou IgE.²³

1.2.2. Úlevová antiastmatika

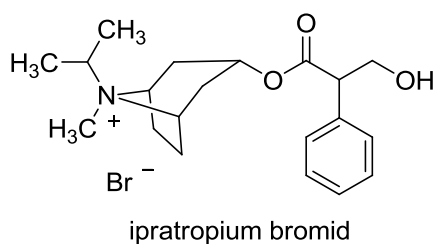
Úlevová antiastmatika jsou léčiva, která rychle uvolní bronchokonstrikci, a tím brání dalšímu rozvoji exacerbace astmatu.

Inhalační a perorální β_2 -mimetika s krátkodobým účinkem (SABA) – např. *salbutamol*, *terbutalin*, *fenoterol* (Obr. 7) – se používají při akutním astmatickém záchvatu jako úlevová (záchranná) léčiva. Mechanismus jejich účinku i nežádoucí účinky jsou velmi podobné LABA. Zatímco však dlouhodobě působící β_2 -mimetika mohou ovlivňovat zánětlivé procesy v průduškách, SABA tuto schopnost nemají. Od LABA je pak odlišuje i doba působení, trvající u SABA zpravidla jen 4-6 hodin. Nástup účinku je rychlý, ke zlepšení stavu pacienta dochází do několika minut.¹⁴



Obr. 7

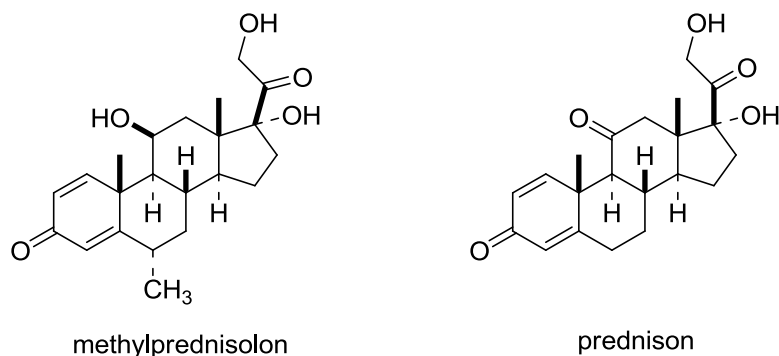
Inhalační anticholinergika (SAMA = short-acting muscarinic antagonists) – *ipratropium bromid* (Obr. 8) – jsou bronchodilatačně působící léčiva tlumící účinek acetylcholinu uvolňovaného z cholinergních nervových zakončení v dýchacích cestách. Po inhalaci zabraňují též reflexnímu stažení dýchacích cest vyvolanému vdechnutím inhalovaných částic.¹⁴ Na rozdíl od SABA je jejich bronchodilatační působení slabší a účinek nastupuje později. Ani tyto látky nemají vliv na vznik zánětu. Předepisovány jsou především pacientům, u nichž léčba pomocí SABA není z nějakého důvodu možná.²⁴



Obr. 8

Nežádoucí účinky jsou způsobeny inhibicí parasymptických receptorů umístěných mimo dýchací cesty. Nejčastěji se jedná o pocit sucha a hořkosti v ústech. Zvážení rizika komplikací je nutné i při užívání vysokých dávek u nemocných s benigní hyperplazií prostaty nebo s obstrukcí hrdla močového měchýře.¹⁴

Systémové kortikosteroidy (SKS) – *methylprednisolon*, *prednison*, *triamcinolon* (Obr. 9) – jsou v úlevové terapii podávány vždy jen krátkodobě, proto se jejich nežádoucí účinky příliš nemanifestují. Podávány jsou perorálně nebo injekčně.⁹



Obr. 9

Methylxantiny s krátkodobým účinkem – *teofylin*, *aminofylin* – jsou již dnes v záchranné léčbě astmatu považovány za zastaralé.⁶ Pacientovi jsou aplikovány buď per os nebo injekčně a je nutný monitoring jejich hladiny v krvi.¹⁶

Léčiva používaná v záchranné i preventivní léčbě mohou díky svým nežádoucím účinkům či způsobu podání negativně ovlivňovat život pacienta. I to je jeden z důvodů hledání nových, účinnějších látek nebo nových lékových forem, jejichž nežádoucí účinky jsou ve srovnání s dostupnými léčivy nižší. Jednou z možných cest výzkumu nových antiastmatik je i syntéza léčiv, jejichž struktura vychází z bronchodilatačně či antiflogisticky účinných přírodních látek.

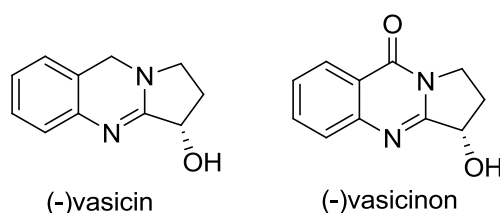
1.3. Syntetické modifikace alkaloidů (-)vasicinu a (-)vasicinonu

1.3.1. Adhatoda vasica

Adhatoda vasica Nees (syn. *Justicia adhatoda* L., *Adhatoda zeylanica* Med., česky *Nesměna cévnatá*) z čeledi Acanthaceae je zelený keř rostoucí především v Indii, na Srí Lance a v Malajsii.²⁵ V tradiční ájurvédské medicíně je užívána v terapii nemocí dýchacích cest již téměř 2000 let.²⁶ Pro své léčivé účinky byla *A. vasica* začleněna do manuálu WHO *The Use of*

Traditional Medicine in Primary Health Care jako rostlina určená k terapii kašle, astmatu a hemoroidů.

Za expektorační a antispastické účinky drogy jsou zodpovědné především chinazolinové alkaloidy (-)vasicin, obsažený v listech, kořeni a květech²⁵ a později objevený (-)vasicinon, izolovaný z listů (Obr. 10).²⁶ V listech můžeme kromě vasicinu a vasicinonu najít ještě další obsahové látky (alkaloidy vasicinol, adhatodin, adhatonin, adhavašinon, anisotin, atd.). Kořeny rovněž obsahují některé z alkaloidů, sacharidy, steroidy a terpeny, v květech byl zaznamenán výskyt flavonoidů a triterpenů.²⁷



Obr. 10

Kromě účinků definovaných v manuálu WHO *The Use of Traditional Medicine in Primary Health Care*, má alkaloid vasicin ještě uterotonický účinek, který se podobá oxytocinu.²⁸ V roce 1980 byla *J. adhatoda* zahrnuta Světovou zdravotnickou organizací do projektu regulace fertility *The Special Programme of Research in Human Reproduction*. I přes toto zařazení nebyl doposud uterotonický účinek vasicinonu podávaného per os spolehlivě prokázán žádnou relevantní humánní studií.

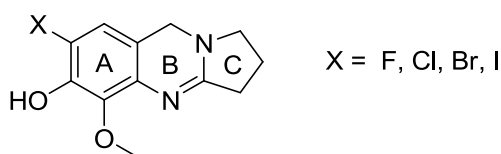
Z listů *A. vasica* byla izolována silice s přímými bronchodilatačními a tokolytickými účinky.²⁸ Rostlinný extrakt působí antitusicky, antiastmaticky a snižuje alergickou reakci.²⁹ Prokázán byl i účinek antiflogistický³⁰ a antiulcerózní³¹. Antioxidační působení stejně jako snížení mutagenních účinků kadmia bylo pozorováno u lihového extraktu z drogy.²⁷ V literatuře je popisováno i hypoglykemické působení rostliny.²⁷ Anthelmintická aktivita byla zaznamenána u extraktu z listů.³²

Vzhledem k výše uvedeným pozitivním účinkům vasicinu a vasicinonu na respirační onemocnění byly tyto látky použity jako strukturální předloha pro přípravu jejich syntetických obměn a následně i nových látek odvozených od skeletu těchto alkaloidů. Obdobně jako původní přírodní alkaloidy byly i tyto látky podrobeny testování na bronchodilatační aktivitu.³³

1.3.2. Alkaloidy (-)vasicin a (-)vasicinon a jejich syntetické obměny

První úspěšná syntéza racemického vasicinu, spolu s přípravou jeho jednoduchých derivátů byla publikována na konci padesátých let minulého století.^{34,35}

K účinnějším derivátům vasicinu (Obr. 11) vedla trisubstituce kruhu A zároveň s odstraněním hydroxylové skupiny z kruhu C.³⁶

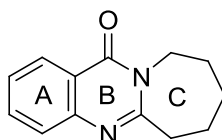


7-halogen-5-methoxy-1,2,3,9-tetrahydropyrrolo[2,1-*b*]chinazolin-6-ol

Obr. 11

Stejně jako vasicin, i druhý nejvýznamnější alkaloid rostliny *A. vasica*, vasicinon, byl podroben pokusům o totální syntézu.^{37,38} Zájem se následně soustředil především na modifikaci kruhu C vasicinonu.

Zajímavou bronchodilatační aktivitu vykazuje látka označovaná jako RLX (Obr. 12), kde je kruh C rozšířen na sedmičlenný a stejně jako v předchozím případě zde hydroxylová skupina není přítomna.³⁹ RLX v dávce 10 a 20 mg/kg brání degranulaci žírných buněk a uvolnění histaminu z tkání a tlumí aktivitu fosfodiesterázy a lipoxygenázy v plicích. Mechanismus jeho účinku je sice nejasný, byl však vysloven názor, že by mohl působit obdobně jako kromoglykan sodný a aminofylin.³⁹

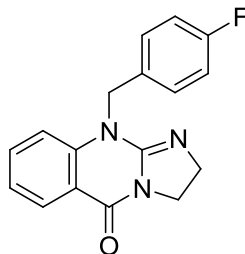


RLX

Obr. 12

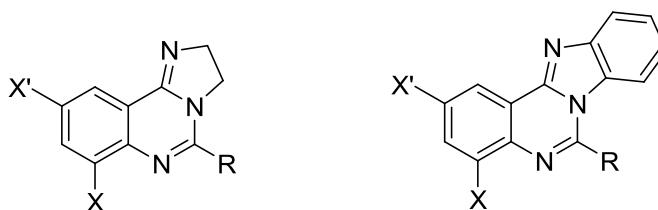
Rozšíření kruhu až na devítičlenný nevedlo k přípravě významněji aktivnějších derivátů.⁴⁰ Dobrých bronchodilatačních účinků bylo dosaženo u látek připravených z původní molekuly RLX substitucí na kruhu A jednou nebo více alkoxy skupinami,^{41,42} např. 2,3-dimethoxyderivát RLX, který vykázal vyšší bronchodilatační aktivitu než teofylin, aminofylin i samotný RLX.⁴¹

K úspěšným látkám vedla i substituce jednoho z uhlíků v kruhu C za heteroatom dusíku. Vzniklé deriváty 2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]chinazolin-5(10*H*)-onu, zejména 10-(4-fluorbenzyl)-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]chinazolin-5(10*H*)-on (Obr. 13) vykazovaly slibnou bronchodilatační aktivitu (v tomto případě 10x účinnější ve srovnání s teofylinem).⁴³



Obr. 13

Mezi podobně účinné deriváty můžeme zařadit substituované dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazoliny a benzimidazo[1,2-*c*]chinazoliny.^{44,45,46} Pro aktivitu je nezbytně nutná přítomnost alkylu, resp. elektrondeficitního arylu v poloze 6 heterocyklu (Obr. 14).

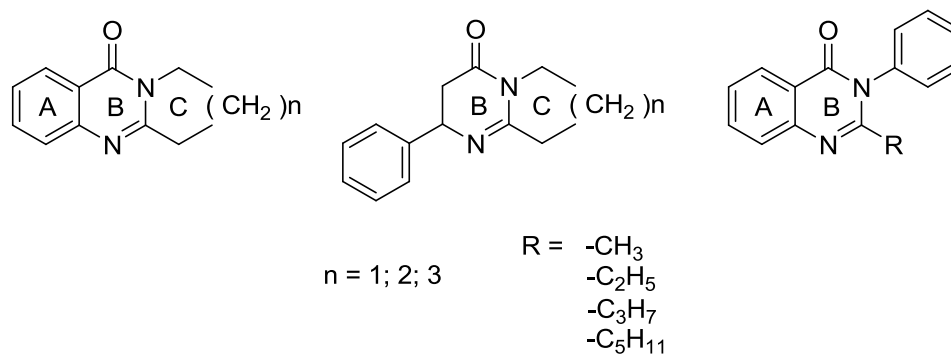


R = alkyl, aryl

X, X' = H, Br, I

Obr. 14

Byla zkoumána i nutnost přítomnosti kruhu A, popř. C.⁴⁷ První skupina připravených sloučenin zahrnovala látky nejpodobnější původní struktuře vasicinonu, neboť měly zachovány všechny tři kruhy A, B i C. Kruh C obsahoval vždy 5 až 7 uhlíků a u některých derivátů byl kruh A dále substituován. Druhá skupina derivátů neobsahovala kruh A, zatímco kruh B měl v poloze 2 navázán aryl. Poslední skupinu syntetizovaných látek tvořily deriváty bez přítomnosti kruhu C s alkylem v poloze 2 a s arylem v poloze 3 vzniklého skeletu (Obr. 15).



Obr. 15

U všech produktů bylo provedeno hodnocení jejich bronchodilatační účinnosti na izolovanou tracheu potkana kontrahovanou působením histaminu či acetylcholinu. Jako srovnávací standard byl použit etofylin.

Z derivátů první skupiny se jako nejúčinnější ukázaly být látky se sedmičlenným kruhem C, které byly schopny dilatovat bronchospasmus navozený jak přidavkem histaminu, tak i acetylcholinu. Naopak deriváty druhé skupiny prokázaly jen velmi slabou, nebo vůbec žádnou aktivitu, byl tedy vysloven závěr, že přítomnost kruhu A je pro bronchodilatační účinek nezbytná. Látky třetí skupiny uvolňovaly jen histaminem navozený bronchospasmus. Jako nejvhodnější se ukázaly deriváty substituované kratším alifatickým řetězcem v poloze 2 (methyl, ethyl) a zároveň nesubstituovaným fenylem v poloze 3.⁴⁷

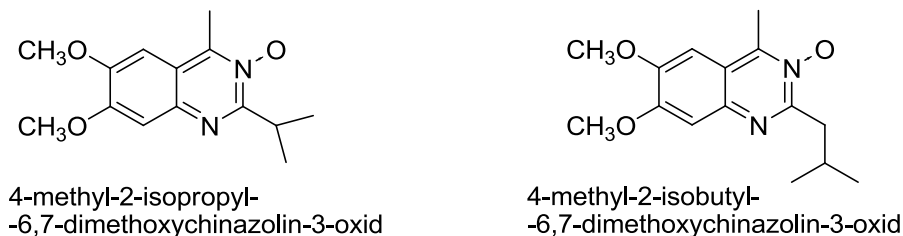
1.4. Bronchodilatační aktivita benzodiazinů

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, přítomnost kruhu C u přírodních předloh alkaloidů (-)vasicinu a (-)vasicinonu nemusí být pro jejich bronchodilatační účinek esenciální. Jeho odstraněním vzniknuvší chinazolinový skelet také vykazuje určitou bronchodilatační aktivitu,^{47,48} proto jsme se v naší práci zaměřili i na jiné benzodiaziny.

1.4.1. Deriváty chinazolinu

Kromě skupiny derivátů v kapitole 1.3.2. byly publikovány bronchodilatačně aktivní 2,4-dialkyl-6,7-dimethoxychinazolin-3-oxidy. Posléze byly testovány i účinky těchto látek na centrální nervový a kardiovaskulární systém.⁴⁹

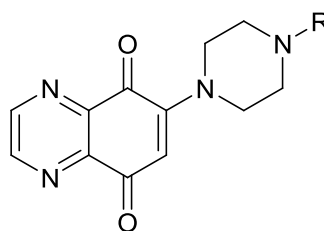
Jako nejaktivnější a nejvhodnější se ukázaly 4-methyl-2-isopropyl-6,7-dimethoxychinazolin-3-oxid a 4-methyl-2-isobutyl-6,7-dimethoxychinazolin-3-oxid (Obr. 16), které dobře dilatovaly hladkou svalovinu bronchů a zároveň se u nich neprojevovaly žádné výraznější kardiovaskulární nežádoucí účinky. Jistou nevýhodou bylo jejich lehce sedativní působení.⁴⁹



Obr.16

1.4.2. Deriváty chinoxalinu

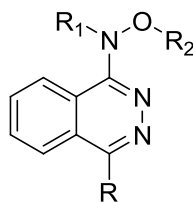
Několik derivátů chinoxalin-1,4-dionu s potenciálním antiastmatickým působením bylo patentováno v roce 1987 (Obr. 17). Těžištěm této práce však byly především deriváty chinolinu. K biologické aktivitě všech těchto látek nutno dodat, že jejich účinek spočíval v inhibici lipoxygenázové aktivity a tím vedl ke snížení leukotrienu LtB4 a kyseliny 5-hydroxyeikosatetraenové 5-HETE. Zmíněné látky neměly bronchodilatační účinky.⁵⁰



Obr. 17

1.4.3. Deriváty ftalazinu

V roce 1967 byly připraveny deriváty 1-aminofthalazinu (Obr. 18). U syntetizovaných látek byla následně testována a prokázána biologická aktivita, konkrétně antipyretické, protizánětlivé, hypotenzní a také bronchodilatační účinky.⁵¹



Obr. 18

1.4.4. Deriváty cinnolinu

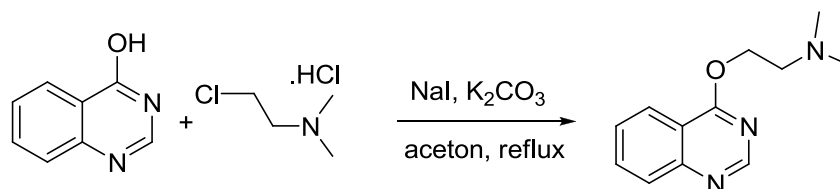
Deriváty obsahující cinnolinový skelet, které by vykazovaly bronchodilatační aktivitu, nebyly prozatím v literatuře popsány.

1.5. Bronchodilatační aktivita (-)vasicinu, (-)vasicinonu a jejich syntetických derivátů připravených na FaF UK v Hradci Králové

Ethanolický extrakt obsahových látek rostliny *A. vasica* byl připraven na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie a poté byl spolu s izolovanými alkaloidy (-)vasicinem a (-)vasicinonem testován na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Dalším krokem byla příprava⁴⁸ syntetického (-)vasicinonu na Katedře organické a anorganické chemie a jeho biologické hodnocení.³³

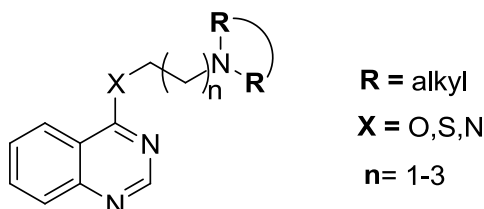
Následně byla syntetizována první řada derivátů vasicinonu vycházející z molekuly 4-hydroxychinazolinu,⁴⁸ z něhož byly jednoduchými alkylačními reakcemi připraveny látky s postranním řetězcem tvořeným alkylem, příp. s kyselou nebo bazickou funkcí v tomto řetězci. Všechny látky byly testovány na svou bronchodilatační aktivitu, dále byl pro srovnání hodnocen i výchozí chinazolin-4-ol.

Nejúspěšnější látkou první řady se stal 4-(*N,N*-dimethylaminoethoxy)chinazolin, který byl připraven alkylací chinazolin-4-olu hydrochloridem *N,N*-dimethyl-*N*-(2-chlorethyl)aminu v bazickém prostředí (Schema 1).



Schema 1

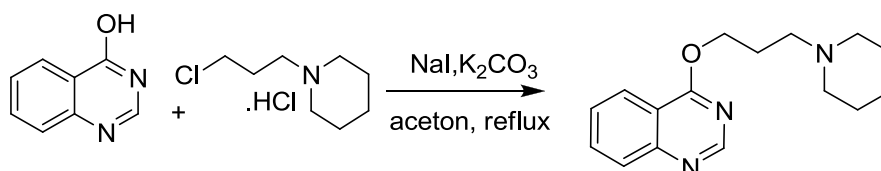
Druhá řada derivátů vycházela z výše zmíněné sloučeniny.⁴⁸ Vzniklé deriváty obsahovaly chinazolinové jádro s atomem dusíku, kyslíku nebo síry navázaných do polohy 4. Na tyto heteroatomy byl připojen dvou až tříuhlíkatý řetězec nesoucí bazické centrum (Obr. 19).



Obr. 19

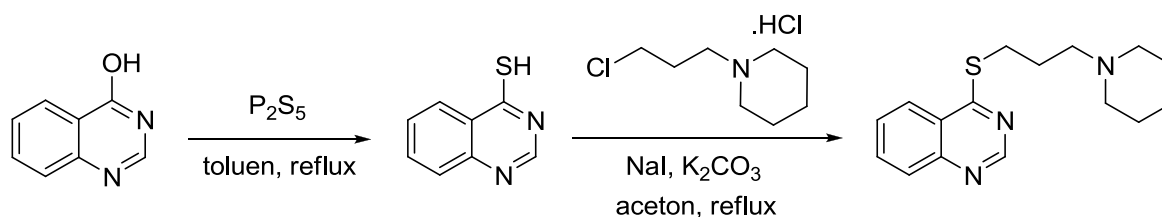
I druhá řada derivátů byla podrobena biologickému hodnocení. Většina připravených látek měla vyšší bronchodilatační aktivitu než teofylin, používaný jako standard, nejlepších výsledků bylo dosaženo u derivátů tvořených chinazolinovým jádrem spojeným v poloze 4 přes heteroatom síry nebo kyslíku tříuhlíkatým řetězcem nesoucím bazické centrum.

Bronchodilatační aktivita derivátu obsahujícího kyslík, 4-[3-(piperidin-1-yl)-propyloxy]chinazolinu, připraveného jednoduchou alkylací chinazolin-4-olu v bazickém prostředí (Schema 2), byla ve srovnání s teofylinem 17x vyšší.



Schema 2

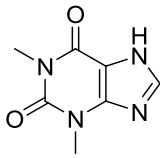
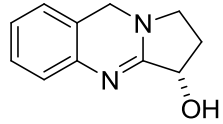
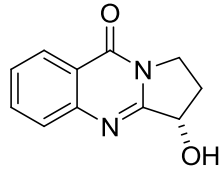
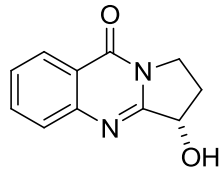
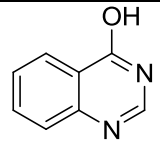
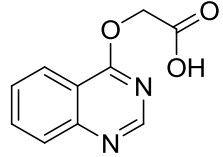
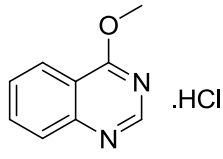
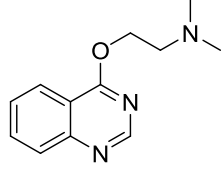
U derivátu s atomem síry v postranním řetězci, 4-[3-(piperidin-1-yl)-propylsulfanyl]chinazolinu, který byl připraven (Schema 3) přes chinazolin-4-thiol a následně byl alkylován za obdobných reakčních podmínek jako jeho kyslíkatý analog, byla prokázána aktivita dokonce 136x vyšší než u teofylinu.⁴⁸

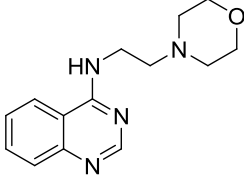
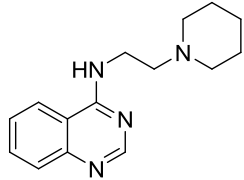
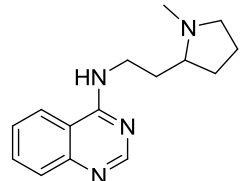
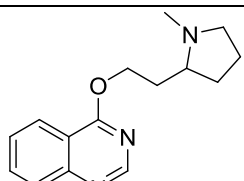
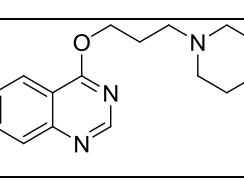
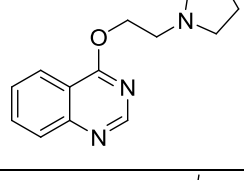
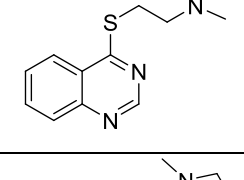
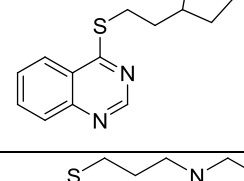
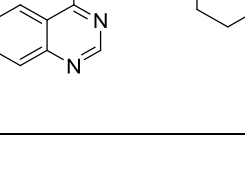


Schema 3

Aktivity všech látek jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1).

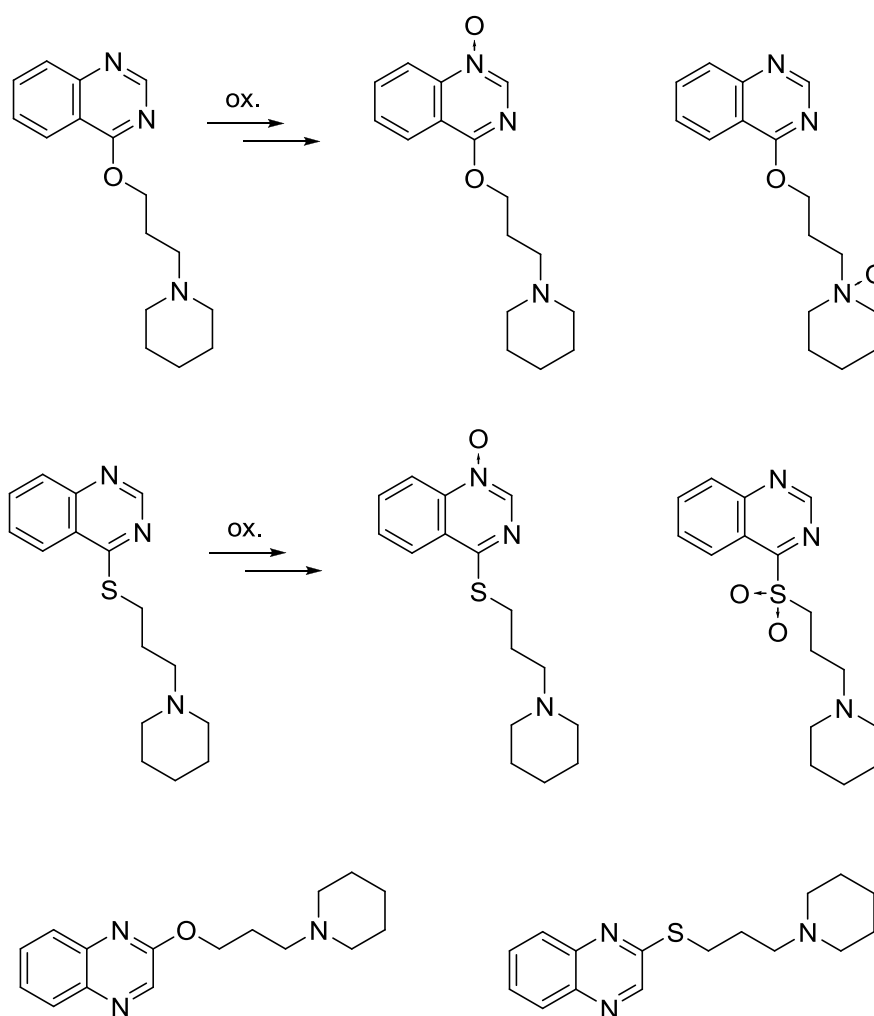
Tab. 1 Hodnoty bronchodilatační aktivity látek testovaných na FaF (ED₅₀)

| Název | Vzorec | Mr | ED ₅₀ (μmol/l) |
|--|---|--------|---------------------------|
| Teofylin (standard) |  | 180,16 | 500 |
| Extrakt z rostliny <i>Adhatoda vasica</i> | - | - | 218 |
| (-)-Vasicin přírodní |  | 188,23 | 323 |
| (-)-Vasicinon přírodní |  | 202,21 | 1300 |
| (-)-Vasicinon syntetický |  | 202,21 | 1037,5 |
| Chinazolin-4-ol |  | 146,15 | 1742 |
| Kyselina (chinazolin-4-yloxy)octová |  | 204,18 | neaktivní |
| 4-Methoxychinazolin hydrochlorid |  | 196,63 | 519 |
| 4-Dimethylamino- ethoxychinazolin |  | 217,27 | 440 |

| | | | |
|---|---|--------|------|
| <i>N</i> -[2-(Morfolin-4-yl)ethyl]- -chinazolin-4-amin |  | 258,32 | 1699 |
| <i>N</i> -[2-(Piperidin-1-yl)ethyl]- -chinazolin-4-amin |  | 256,35 | 186 |
| <i>N</i> -[2-(1-Methylpyrrolidin- -2-yl)ethyl]chinazolin- -4-amin |  | 256,35 | 102 |
| 4-[2-(1-Methylpyrrolidin- -2-yl)ethoxy]chinazolin |  | 257,33 | 149 |
| 4-[3-(Piperidin-1-yl)- -propyloxy]chinazolin |  | 271,36 | 28 |
| 4-[2-(Pyrrolidin-1-yl)- -ethoxy]chinazolin |  | 243,30 | 598 |
| 4-(Dimethylaminoethyl- -sulfanyl)chinazolin |  | 233,33 | 54 |
| 4-[2-(1-Methylpyrrolidin- -2-yl)ethylsulfanyl] chinazolin |  | 273,40 | 69 |
| 4-[3-(Piperidin-1-yl) -propylsulfanyl] chinazolin |  | 287,42 | 3,65 |

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé rigorózní práce byla příprava derivátů odvozených od dvou prozatím bronchodilatačně nejaktivnějších chinazolinů (4-[3-(piperidin-1-yl)-propyloxy]chinazolin a 4-[3-(piperidin-1-yl)-propylsulfanyl]chinazolin). V první fázi jsme se zaměřili na syntézu *N*-oxidů, resp. *S*-oxidů uvedených látek (Obr. 20), dále jsme se pokusili o přípravu chinoxalinových analog, u kterých by byl piperidinpropylový fragment vázán do polohy 2 výsledného benzodiazinu. U syntetizovaných látek byla hodnocena jejich bronchodilatační aktivita.



Obr. 20

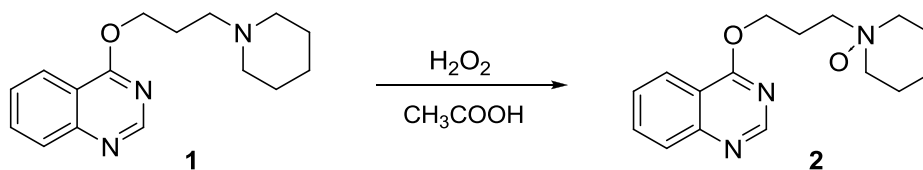
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

Na základě bronchodilatační aktivity derivátů chinazolinu s bazickým postranním řetězcem navázaným přes heteroatom kyslíku nebo síry jsme se rozhodli použít dvě nejlépeší molekuly, 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolin a 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolin,⁴⁸ jako výchozí látky pro syntézu nových a potenciálně účinnějších molekul.

3.1. Syntéza derivátů odvozených od 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu

3.1.1. Oxidace 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu

Prvním reakcí byla oxidace výchozího 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu (**1**) pomocí peroxidu vodíku (1 ekv.) v koncentrované kyselině octové při teplotě lázně 100°C po dobu 8 hodin, kdy veškerá výchozí látka již zreagovala (Schema 4). Jediný izolovaný produkt byl 1-[3-(chinazolin-4-yloxy)propyl]piperidin-1-oxid (**2**), reakce ovšem poskytovala pouze velmi malé výtěžky (méně než 20%), a to i při opakování experimentu. Následně jsme se rozhodli pro změnu reakčních podmínek – *m*CPBA v chloroformu. Nicméně ke zvýšení výtěžku nedošlo ani po 10 hodinách za varu. Vzniklý produkt byl charakterizován pomocí NMR a MS spektroskopie, které potvrdily vznik *N*-oxidu na piperidinovém kruhu a nikoli na heteroaromatickém skeletu.



Schema 4

3.1.2. Příprava 4-hydroxychinazolin-1-oxidu

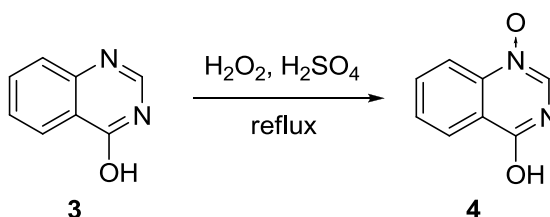
Po zjištění, že oxidace 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu pomocí činidel uvedených kapitole 3.1.1 nevede k tvorbě mono-, příp. di-*N*-oxidu na chinazolinovém skeletu, a že dosud známé přípravy podobných chinazolinů vycházejí především z cyklizačních reakcí příslušných prekurzorů,^{52,53} jsme se rozhodli syntézu modifikovat. Prvním krokem by byla oxidace chinazolin-4-olu i s rizikem nižšího výtěžku a případně vzniklý *N*-oxid by byl

následně alkylován na kyslíku hydroxylové skupiny aktivním piperidinpropylovým fragmentem.

Nejprve jsme podrobili chinazolin-4-ol (**3**) reakci s *m*CPBA v chloroformu. Tato syntéza nevedla ani po 20 hodinách za varu k tvorbě žádaného produktu. Ze směsi byla izolována pouze výchozí látka, nezreagovaná *m*CPBA a 3-chlorbenzoová kyselina.

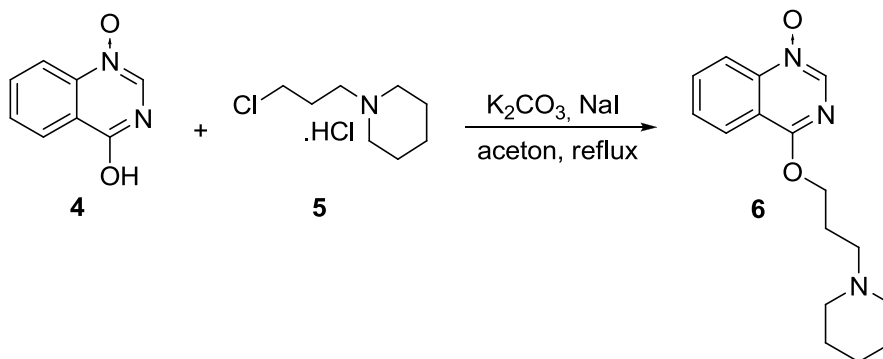
Proto jsme zvolili prostředí peroxidu vodíku v koncentrované kyselině octové. Po neúspěchu při použití jednoho molárního ekvivalentu peroxidu vodíku jsme postupně zvyšovali jeho množství až na 4 molární ekvivalenty. Ani to však nevedlo k žádanému výsledku.

Nakonec jsme se rozhodli pro drastičtější reakční podmínky tj. peroxid vodíku v koncentrované kyselině sírové (Schema 5). Po šestihodinovém zahřívání reakční směsi a jejím následném ochlazení došlo ke krystalizaci produktu s výtěžkem 75 %. Pomocí NMR a MS experimentů jsme zjistili, že se jedná o 4-hydroxychinazolin-1-oxid. K tvorbě di-*N*-oxidu tedy nedošlo ani při použití tak silného oxidačního prostředí.



Schema 5

Vzniklý 4-hydroxychinazolin-1-oxid (**4**) jsme alkylovali hydrochloridem 1-(3-chlorpropyl)piperidinu (**5**) v prostředí jodidu sodného, uhličitanu draselného a acetonu za varu reakční směsi po dobu 24 hodin s 86 % výtěžkem (Schema 6). Produkt byl charakterizován pomocí NMR a MS spekter.



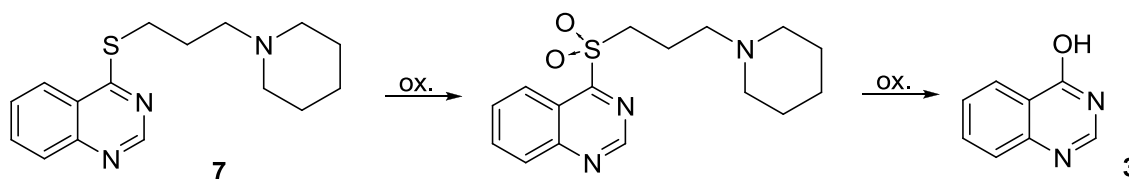
Schema 6

3.2. Syntéza derivátů odvozených od 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu

3.2.1. Přímá oxidace 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu

Při přípravě *S*-oxidů odvozených od 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu (**7**) jsme se nejprve pokusili o přímou oxidaci výchozí látky pomocí peroxidu vodíku v kyselině octové. I přes velmi mírné podmínky (1 ekvivalent peroxidu, teplota 0°C) se nám nepodařilo izolovat požadovaný sulfoxid či sulfon, v reakční směsi byl přítomen pouze výchozí materiál a chinazolin-4-ol, což je zřejmý produkt oxidativní desulfurace vznikajícího sulfonu. (Schema 7)

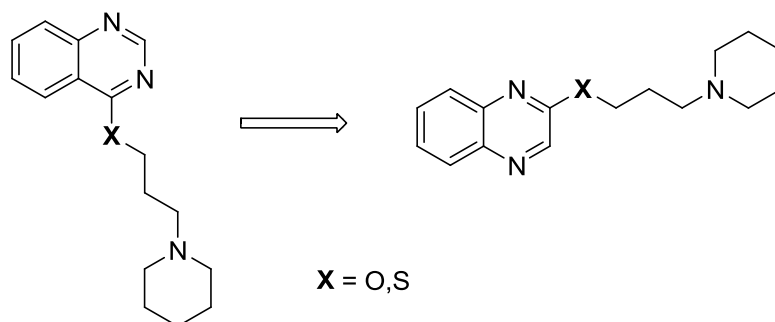
Ke stejnému výsledku jsme dospěli i při oxidaci 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu s *m*CPBA v chloroformu, rovněž za velmi mírných podmínek (1 ekvivalent MCPBA, teplota 0°C). I zde zřejmě došlo k oxidaci na atomu síry až na sulfon a následně k odštěpení celého postranního řetězce.



Schema 7

3.3. Syntéza derivátů chinoxalinu

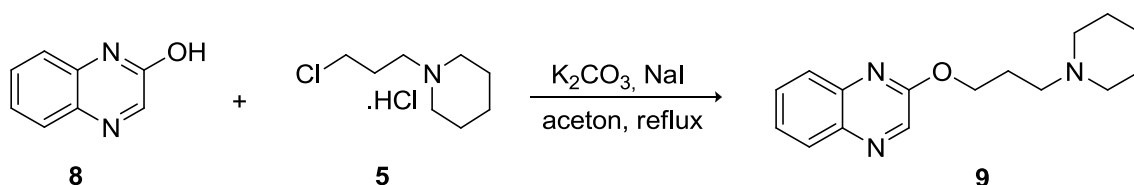
V této části projektu jsme se rozhodli zhodnotit vliv přítomnosti chinazolinového jádra na bronchodilatační aktivitu a nahradit jej chinoxalinovým skeletem. (Schema 8)



Schema 8

3.3.1. Syntéza 2-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinoxalinu

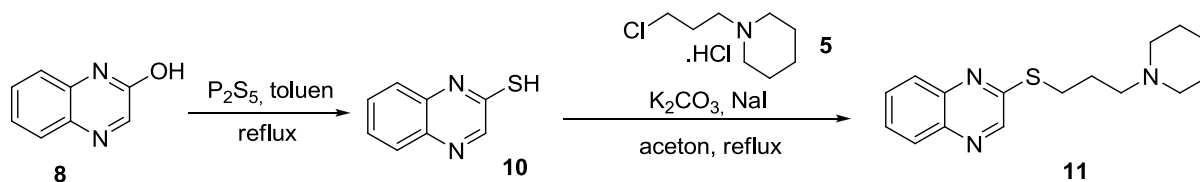
Příprava 2-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinoxalinu vycházela z chinoxalin-2-olu a hydrochloridu 1-(3-chlorpropyl)piperidinu (**5**) za identických reakčních podmínek jako v kapitole 3.1.2. (Schema 9). Reakce proběhla s výtěžkem 79% a produkt byl charakterizován NMR a MS spektry.



Schema 9

3.3.2. Syntéza 2-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinoxalinu

Při syntéze 2-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinoxalinu jsme nejprve připravili chinoxalin-2-thiol z chinoxalin-2-olu (**8**) reakcí se sulfidem fosforečným v toluenu s 65 % výtěžkem. Vzniklý meziprodukt (**10**) byl po přečištění sloupcovou chromatografií a charakterizaci podroben alkylační reakci s hydrochloridem 1-(3-chlorpropyl)piperidinu (**5**) (Schema 10). Výtěžek reakce činil 72%.

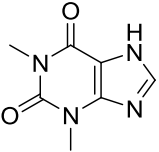
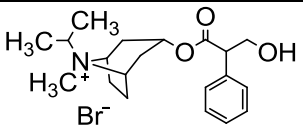
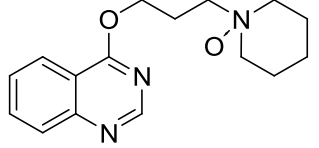
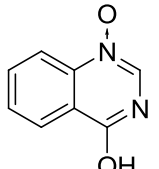
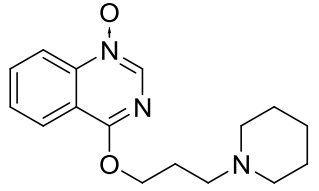
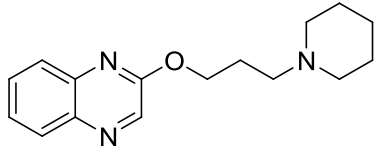
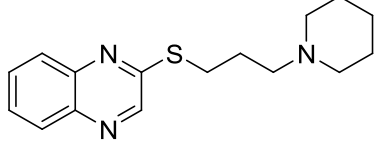


Schema 10

3.4. Hodnocení bronchodilatační aktivity připravených látek

Všechny námi připravené deriváty byly podrobeny hodnocení bronchodilatačních účinků na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové metodou izolované trachey potkana. Jako srovnávací standard byl použit teofylin a ipratropium bromid. Výsledné hodnoty aktivit jsou uvedeny v tabulce Tab. 2.

Tab. 2: Hodnoty bronchodilatační aktivity připravených látek (ED₅₀)

| Název | Vzorec | Mr | ED ₅₀ (μmol/l) |
|--|--|--------|---------------------------|
| Teofylin |  | 180,16 | 500 |
| Ipratropium bromid |  | 412,36 | 0,0015 |
| 1-[3-(Chinazolin-4-yloxy)propyl]piperidin-1-oxid |  | 287,36 | 600,6 |
| 4-Hydroxychinazolin-1-oxid |  | 162,15 | 1313 |
| 4-[3-(Piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolin-1-oxid |  | 287,36 | 45,3 |
| 2-[3-(Piperidin-1-yl)propyloxy]chinoxalin |  | 271,36 | 47,9 |
| 2-[3-(Piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinoxalin |  | 287,42 | 6,4 |

4. ZÁVĚR

V této rigorózní práci jsme navázali na syntézu dvou námi připravených nejuspěšnějších bronchodilatačně aktivních molekul - 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]-chinazolinu a 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu.

Nejprve jsme se pokusili připravit jejich *N*-, resp. *S*-oxidy. V prvním případě se nám podařilo reakcí s peroxidem vodíku v koncentrované kyselině octové zoxidovat dusík piperidinu v postranním řetězci. Vzniklý produkt, 1-[3-(chinazolin-4-yloxy)propyl]-piperidin-1-oxid, překvapivě vykázal znatelné snížení bronchodilatační aktivity (600,6 $\mu\text{mol/l}$ oproti 28,0 $\mu\text{mol/l}$ u výchozí látky).

Při *S*-oxidaci 4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinazolinu pravděpodobně došlo, i za použití mírných reakčních podmínek, k oxidativní desulfuraci vznikajícího sulfonu a výsledným produktem byl chinazolin-4-ol.

Syntéza dalšího derivátu, 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolin-1-oxidu, proběhla ve dvou krocích. Původní molekula chinazolin-4-olu byla oxidována silným oxidačním činidlem (peroxidem vodíku v koncentrované kyselině sírové) na 4-hydroxychinazolin-1-oxid, který byl rovněž testován na hladké svalovině trachey. Tento meziprodukt prokázal poněkud vyšší aktivitu (1313 $\mu\text{mol/l}$) než původní výchozí látka, tj. chinazolin-4-ol (1742 $\mu\text{mol/l}$ viz. Tab. 1). Alkylační reakcí hydroxychinazolin-1-oxidu byl připraven 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolin-1-oxid. Jeho aktivita (45,3 $\mu\text{mol/l}$) byla ve srovnání s předlohou strukturou 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu podobná (28,0 $\mu\text{mol/l}$, viz. Tab.1), nicméně ji nepředčila.

Chinoxalinový analog 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu byl připraven alkylací chinoxalin-2-olu. Výsledný produkt, 2-[3-(piperidin-1-yl)-propyloxy]chinoxalin, vykázal také obdobnou bronchodilatační aktivitu (ED_{50} 47,9 $\mu\text{mol/l}$), srovnatelnou s 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinem (28,0 $\mu\text{mol/l}$).

Poslední připravený a testovaný derivát, 2-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]-chinoxalin, byl připraven ve dvou krocích. Nejprve byl z chinoxalin-4-olu za pomoci sulfidu fosforečného připraven chinoxalin-4-thiol a následnou alkylací byl připraven výsledný produkt se slibnou bronchodilatační aktivitou (6,4 $\mu\text{mol/l}$), která se téměř vyrovnala aktivitě své předlohou struktury (3,65 $\mu\text{mol/l}$, Tab. 1).

Na základě zjištěných hodnot bronchodilatační aktivity vyplývá, že oxidace chinazolinového skeletu na *N*-oxid nevedla k účinnějším derivátům; oxidace dusíku

piperidinu měla za následek dramatický pokles aktivity. Podobně záměna chinazolinu za chinoxalin nevedla k výrazněji aktivnějším sloučeninám.

Všechny v této práci připravené látky nesoucí piperidinový postranní řetězec nebyly zatím v literatuře popsány.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Obecné experimentální postupy

Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. Teploty tání všech látek byly měřeny 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. Elementární analýza byla provedena na přístroji CHNS-OCE FISIONS EA 1110. NMR spektra byla měřena v roztocích DMSO- d_6 , CD₃OD a CDCl₃ při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro ¹H a při 75 MHz pro ¹³C. 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, t: triplet, m: multiplet, bs: široký singlet), interakční konstanty (Hz). Všechna přiřazení byla provedena na základě 1D experimentů. 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. Silikagel 60 (230-240 mesh) pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen od firmy E. Merck.

5.2. Experimentální postupy použité při biologickém hodnocení

5.2.1. Metodika izolované průdušnice

Při hodnocení bronchodilatační účinnosti syntetizovaných látek byla použita modifikovaná *in vitro* metodika podle Castilly a de Beera.³³ Testování bylo prováděno na izolované trachee samců potkana kmene Wistar. Trachea byla vyjmuta z těla potkana a přenesena do Schullerovy nádoby naplněné Krebs-Henseleitovým živným roztokem (pH 7,8) o složení (mM): NaCl 116,3; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0 a glukóza 11,1. Poté byla upevněna pomocí ligatur jedním koncem k fritě zásobující živný roztok pneumoxidem a druhým na izotonický převodník spojený s registračním zařízením (zapisovačem).

Kalibrace aparatury byla provedena pomocí dvou závaží o hmotnosti 1 a 2 g. Preparát byl zatížen na 2 g. Stabilizace trvala 30 min, v průběhu této doby byla prováděna každých 10 min výměna živného roztoku. Po 30 min bylo zatížení sníženo na 1 g. Preparát byl připraven k testování po stabilizaci křivky záznamu ve fázi plató.

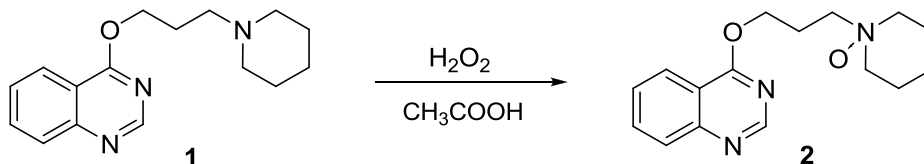
Pro dosažení kontrakce trachey byl do lázně naplněné živným roztokem byl přidán karbachol o koncentraci 10^{-5} M. Poté, co došlo k maximální kontrakci trachey, byla ponechána po dobu 10 min možnosti vlastní relaxace. Následným přidavkem další dávky karbacholu (10^{-5} M) byla trachea opět kontrahována. Poté byly přidávány kumulativní dávky vodného roztoku testovaných látek v jejich vzrůstajících koncentracích tak, že k jejich podávání došlo vždy až po stabilizované odpovědi hladkého svalstva průdušnice na předcházející koncentraci. Na konci experimentu byl přidán teofylin v koncentraci 3×10^{-3} M. Tím došlo k úplné relaxaci hladkého svalstva. Relaxace navozená jednotlivými dávkami testovaných látek byla porovnávána s touto maximální relaxací způsobenou teofylinem. Výsledek byl vyjádřen v procentech. Teofylin je zde v roli pozitivní kontroly (koncentrace 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; $2,5 \times 10^{-4}$; 5×10^{-4} ; $7,5 \times 10^{-4}$ a 10^{-3} M).

5.2.2. Zpracování výsledků biologického hodnocení

Získané hodnoty byly zadány do programu GraphPad Prism 5. Na osu X byl nanesen logaritmus koncentrace testované látky, na osu Y relaxace tkáně v procentech. Metodou nelineární regrese byla získána DRC křivka a odečtena hodnota ED_{50} (koncentrace látky vyvolávající polovinu maximální odpovědi). Výsledky jsou vyjádřeny jako $ED_{50} \pm SEM$ pro každou testovanou látku. $ED_{50} \pm SEM$ pro teofylin, používaný jako standard, je $500 \pm 43 \mu\text{mol/l}$.³³

5.3. Syntéza derivátů odvozených od 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu

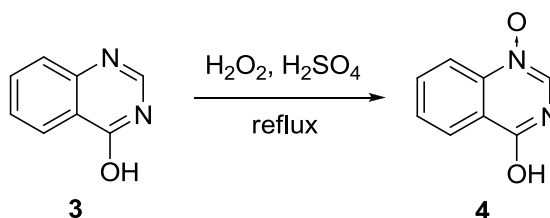
5.3.1. 1-[3-(Chinazolin-4-yloxy)propyl]piperidin-1-oxid (2)



K 4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolinu (**1**) (271,36 mg; 1,0 mmol) byl přidán peroxid vodíku (1,0 mmol) a koncentrovaná kyselina octová (11 ml), výsledná směs byla zahřívána při teplotě 100 °C po dobu 8 hodin. Po ochlazení byla reakční směs rozdělena mezi EtOAc (50 ml) a nasycený vodný roztok NaCl (50 ml). Organická vrstva byla vysušena (Na₂SO₄), rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a produkt reakce byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s použitím mobilní fáze EtOAc – EtOAc:MeOH (1:1) – MeOH.

Výtěžek: 20%. **Charakteristika:** žlutá krystalická látka, t.t. 129-132 °C, **¹H NMR:** (300 MHz, CD₃OD) δ 8.38 (1H, s, H2), 8.19-8.16 (1H, m, Ar), 7.80-7.75 (1H, m, Ar), 7.64-7.61 (1H, m, Ar), 7.55-7.47 (1H, m, Ar), 4.16 (2H, t, *J*=7.1 Hz, OCH₂), 3.39-3.18 (6H, m, 3xNCH₂), 2.41-2.27 (2H, m, CH₂), 2.21-2.05 (2H, m, CH₂), 1.76-1.28 (4H, m, 2xCH₂); **¹³C NMR:** (75 MHz, CD₃OD) δ 162.6, 149.0, 148.9, 135.7, 128.5, 127.9, 127.3, 122.9, 67.9, 65.9, 45.6, 23.5, 22.9, 21.9; **IR:** 1036, 1108, 1156, 1225, 1261, 1294, 1324, 1376, 1474, 1611, 1668, 2942 cm⁻¹; **LRMS:** *m/z* (relativní intenzita) 288.2 [M+H]⁺ (100), 259.4 (3), 201.1 (1), 158.4 (2), 143.3 (1), 129.2 (2).

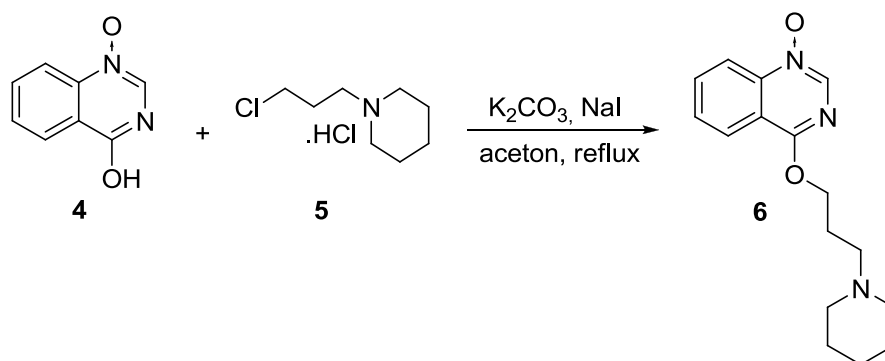
5.3.2. 4-Hydroxychinazolin-1-oxid (4)⁵⁴



Směs chinazolin-4-olu (**3**) (1,46 g; 10,0 mmol), peroxidu vodíku (30%, 11ml) a koncentrované kyseliny sírové (6 ml) byla zahřívána po dobu 8 hodin při teplotě 100 °C. Po ochlazení reakční směsi došlo k vykristalizování produktu, ten byl promyt vodou a následně vysušen.

Výtěžek: 75%. **Charakteristika:** bílá krystalická látka, t.t. 239-243 °C, t.t. v literatuře 228 °C⁵⁴; **¹H NMR:** (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.58 (1H, bs, OH), 8.98 (1H, s, H2), 8.18-8.15 (1H, m, Ar), 7.99-7.92 (1H, m, Ar), 7.78-7.72 (1H, m, Ar), 7.70-7.63 (1H, m, Ar); **¹³C NMR:** (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159.7, 148.9, 140.9, 136.2, 128.9, 126.9, 122.2, 121.5; **IR:** 1031, 1064, 1201, 1297, 1447, 1576, 1588, 1666, 1715, 2909, 3038, 3084 cm⁻¹; **LRMS:** *m/z* (relativní intenzita) 163.1 [M+H]⁺ (1), 147.1 (100), 130.1 (3), 120.3 (2), 92.2 (2).

5.3.3. 4-[3-(Piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolin-1-oxid (6)

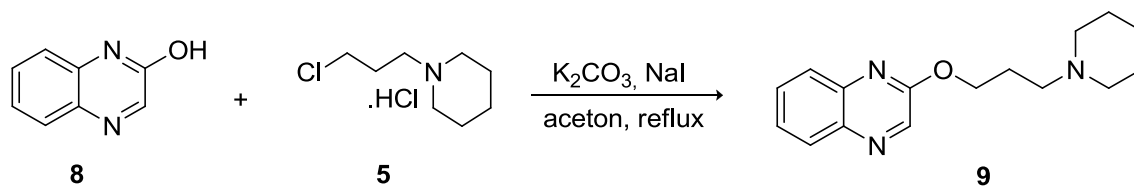


Směs 4-hydroxychinazolin-1-oxidu (4) (162,2 mg, 1,0 mmol), hydrochloridu 1-(3-chlorpropyl)piperidinu (5) (0,218 g, 1,1 mmol), bezvodého uhličitanu draselného (0,691 g, 5,0 mmol) a jodidu sodného (15,0 mg, 0,1 mmol) ve 20 ml acetonu byla zahřívána za varu po dobu 24 hodin. Po ochlazení byla reakční směs rozdělena mezi EtOAc (20 ml) a nasycený vodný roztok NaCl (20 ml). Organická vrstva byla vysušena (Na₂SO₄), rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a produkt reakce byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s použitím mobilní fáze EtOAc/MeOH 1:1.

Výtěžek: 86%. **Charakteristika:** nažloutlá amorfnní látka; **¹H NMR:** (300 MHz, CD₃OD) δ 8.37 (1H, s, H2), 8.23-8.20 (1H, m, Ar), 7.83-7.78 (1H, m, Ar), 7.65-7.62 (1H, m, Ar), 7.57-7.51 (1H, m, Ar), 4.11 (2H, t, *J*=7.0 Hz, OCH₂), 2.48-2.40 (6H, m, 3xNCH₂), 2.08-1.97 (2H, m, CH₂), 1.60-1.39 (6H, m, 3xCH₂); **¹³C NMR:** (75 MHz, CD₃OD) δ 161.6, 148.2, 147.9, 134.5, 127.4, 126.7, 126.2, 121.8, 55.6, 54.1, 45.4, 25.3, 23.9; **IR:** 1120, 1161, 1273, 1324, 1369, 1469, 1611, 1668, 2759, 2811, 2929 cm⁻¹; **LRMS:** *m/z* (relativní intenzita) 288.2 [M+H]⁺ (3), 272.3 (100), 223.5 (1), 207.1 (1), 187.3 (6), 142.2 (1), 126.1 (3).

5.4. Syntéza derivátů chinoxalinu

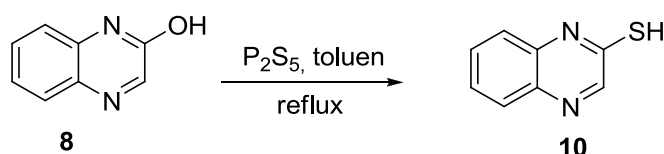
5.4.1. 2-[3-(Piperidin-1-yl)propyloxy]chinoxalin (**9**)



Směs chinoxalin-2-olu (**8**) (292,3 mg, 2,0 mmol), hydrochloridu 1-(3-chlorpropyl)-piperidinu (**5**) (0,436 g, 2,2 mmol), jodidu sodného (30,0 mg, 0,2 mmol) a bezvodého uhličitanu draselného (1,382 g, 10,0 mmol) ve 30 ml acetonu byla zahřívána při teplotě lázně 70 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení byla reakční směs rozdělena mezi EtOAc (20 ml) a nasycený vodný roztok NaCl (20 ml). Organická vrstva byla vysušena (Na_2SO_4), rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a produkt reakce byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s použitím EtOAc jako mobilní fáze.

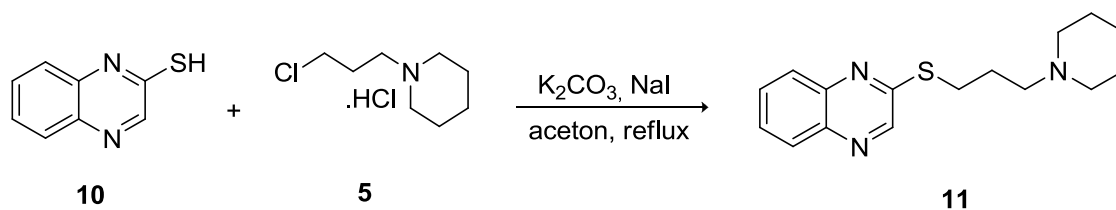
Výtěžek: 79%. **Charakteristika:** žlutá amorfni látka; **$^1\text{H NMR}$:** (300 MHz, CD_3OD) δ 8.19 (1H, s, H3), 7.85-7.82 (1H, m, Ar), 7.67-7.62 (2H, m, Ar), 7.41-7.37 (1H, m, Ar), 4.26 (2H, t, $J=7.0$ Hz, OCH_2), 2.50-2.38 (6H, m, $3\times\text{NCH}_2$), 2.00-1.88 (2H, m, CH_2), 1.63-1.40 (6H, m, $3\times\text{CH}_2$); **$^{13}\text{C NMR}$:** (75 MHz, CD_3OD) δ 156.7, 150.7, 134.9, 133.6, 132.6, 131.3, 125.1, 115.8, 57.1, 55.4, 41.5, 26.5, 25.3, 25.1; **IR:** 1039, 1071, 1124, 1157, 1309, 1464, 1588, 1603, 1658, 2806, 2851, 2933 cm^{-1} ; **LRMS:** m/z (relativní intenzita) 272.3 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (100), 207.3 (1), 187.2 (3), 163.1 (1), 126.3 (2).

5.4.2. Chinoxalin-2-thiol (**10**)^{55,56}



Směs chinoxalin-2-olu (**8**) (1,462 g, 10,0 mmol) a sulfidu fosforečného (2,223 g, 10,0 mmol) v toluenu (50 ml) byla refluxována po dobu 12 hodin. Po ochlazení byla reakční směs rozdělena mezi EtOAc (50 ml) a vodu (50 ml). Organická vrstva byla vysušena (Na_2SO_4), rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a produkt reakce byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s použitím mobilní fáze hexan/EtOAc (1:1).

Výtěžek: 65%. **Charakteristika:** žlutá krystalická látka, t.t. 198-201 °C, t.t. v literatuře 204-206 °C⁵⁵; NMR spektra byla shodná s údaji v literatuře.⁵⁶

5.4.3. 2-[3-(Piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinoxalin (**11**)

Směs chinoxalin-2-thiolu (**10**) (0,487 g, 3,0 mmol), hydrochloridu 1-(3-chlorpropyl)piperidinu (**5**) (0,654 g, 3,3 mmol), jodidu sodného (45,0 mg, 0,3 mmol) a bezvodého uhličitanu draselného (2,073g, 15,0 mmol) v 50 ml acetonu byla zahřívána při teplotě lázně 70 °C po dobu 28 hodin. Po ochlazení byla reakční směs rozdělena mezi EtOAc (30 ml) a nasycený vodný roztok NaCl (30 ml). Organická vrstva byla vysušena (Na_2SO_4), rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a produkt reakce byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s použitím EtOAc jako mobilní fáze.

Výtěžek: 72%. **Charakteristika:** žlutá amorfni látka; **$^1\text{H NMR}$:** (300 MHz, CDCl_3) δ 8.57 (1H, s, H3), 7.99-7.95 (1H, m, Ar), 7.91-7.86 (1H, m, Ar), 7.70-7.58 (2H, m, Ar), 3.35 (2H, t, $J=7.1$ Hz, OCH_2), 2.51-2.32 (6H, m, $3 \times \text{NCH}_2$), 2.03-1.95 (2H, m, CH_2), 1.62-1.38 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$); **$^{13}\text{C NMR}$:** (75 MHz, CDCl_3) δ 156.2, 144.9, 142.7, 139.7, 130.0, 129.2, 127.8, 127.7, 58.1, 54.5, 27.6, 26.3, 25.8, 24.3; **IR:** 1088, 1095, 1157, 1249, 1425, 1443, 1542, 1574, 2716, 2930 cm^{-1} ; **LRMS:** m/z (relativní intenzita) 288.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 272.3 (24), 226.7 (1), 203.1 (1), 187.2 (2), 158.2 (1), 126.2 (9), 98.3 (3).

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Salajka, F.; Kašák, V.; Krčmová, Konštacký, S. Astma bronchiale - Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře novelizace 2008, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, **2008**.
2. Kašák, V. *Zdravotnické noviny, Příloha Lékařské listy*, **2010**, 1, 6-9.
3. Feketeová, E. *Alergie-Časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*, **2008**, 10(2), 149-151.
4. Salajka, F.; Konštacký, S.; Kašák, V.; Dindoš, J. Astma bronchiale - Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře 2005, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, **2005**.
5. Bártů, V. *Zdravotnické noviny, Příloha Lékařské listy*, **2010**, 16, 24-26.
6. Bystroň J. *Interní medicína pro praxi*, Solen, **2009**, 11 (3), 106-110.
7. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling M. *Farmakologie a toxikologie*, Grada Publishing a.s., **2004**, 161-165.
8. Marek, J. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, 3. vydání, Praha, **2004**, 163-164.
9. Kašák, V. Astma bronchiale, Maxdorf, **2005**, 76-99.
10. Fendrich, Z.; Hrdina, R.; Klimtová, I. *Farmakologie pro farmaceuty*, Praha, Karolinum, **2002**, 108-121.
11. Salpeter, S. R.; Buckley, N. S.; Ormiston, T. M. *Ann Intern Med.*, **2006**, 144 (12), 904-912.
12. Kašák, V. *Farmakoterapie*, **2007**, 1, 41-53.
13. Kašák, V. *Remedia*; **2002**, 4, 214-218.
14. Lincová, D.; Farghali, H. a kol. *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha, **2002**, 331-340.
15. Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed, The McGraw-Hill Companies, Inc, New York, **2001**, 743-743.
16. Gut, J. *Pediatric pro praxi*, **2005**, 5, 259-260.
17. Bousquet, J.; Van Cauwenberge, P.; Khaltsev, N. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2001**, 108 (5 suppl.), 147-334.
18. Kopřiva, F. *Praktické lékařství*, **2007**, 3; 108-116.
19. O'Byrne, P. M.; Israel, E.; Drazen, J. M. *Ann Intern Med.*, **1997**, 127 (6), 472-480.

20. Price, D. B.; Swern, A.; Tozzi, C. A. *Analysis from the COMPACT trial. Allergy*, **2006**, *61* (6), 737-742.
21. Krčmová, I. *Remedia*, **2006**, *16*, 438-442.
22. Belliveau, P. P. *Med.Gen.Med*, **2005**, *7* (1), 27.
23. Pipet, A.; Botturi, K.; Pinot, D. *Respir Med*, **2009**, *103*(6), 800-812.
24. Kašák, V.; Pohunek, P. *Remedia*, **2004**, *14*, 419-423.
25. Gupta, O. P.; Sharma, M. L.; Ghatak, B. J. R.; Atal, C. K. *Indian J. of Med. Research*, **1977**, *66*(4), 680-91.
26. Mehta, D. R.; Naravane, J. S.; Desai, R. M. *J. Org. Chem.*, **1963**, *28*, 445-8.
27. Sayeed, A.; Madhukar, G.; Maksood, A.; Mhaveer, S. M.; Tanwir, A.; Shahid H. A. *Natural Product Radiance*, **2009**, *8* (5), 549-554.
28. Claeson, U. P.; Malmfors, T.; Wikman, G. *J. Ethnopharmacol*, **2000**, *72* (1-2), 1-20.
29. Dorsch, W.; Wagner, H. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol.*, **1991**, *94* (1-4), 262-265.
30. Wagner, H. *Planta Med*, **1989**, *55* (3), 235-241.
31. Shrivastava, N.; Shrivastava, A.; Banerjee, A. *J. Herb. Pharmacother*, **2006**, *6* (2), 43-49.
32. Yadav, A. K.; Tangpu, V. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, *119* (2); 322-324.
33. Kottová M. Disertační práce, UK v Praze, Faf v Hradci Králové, **2009**.
34. Southwick, P. L.; Casanova, J., Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 1168-73.
35. Southwick, P. L.; Cremer, S. E. *J. of Org. Chem.*, **1959**, *24*, 753-5.
36. Ojo, B.; Findsen, L. A.; Igarashi N. *Drug Des Discov*. **1996**, *14*(1); 1-14.
37. Mhaske, S. B.; Argade, N. P. *J Org. Chem*. **2001**, *66*(26), 9038-9040.
38. Ziaee, V.; Jalalizadeh, H.; Iranshahi, M.; Shafiee, A.; *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering* **2004**, *23*(2), 33-36.
39. Johri, R. K.; Zutshi, U. *Indian J. Physiol Pharmacol*. **2000**, *44*(1), 75-81.
40. Jahng, K. C.; Kim, S. I.; Kim, D. H.; Seo, C. S.; Son, J. K.; Lee, S. H.; Lee, E. S.; Jahng, Y. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2008**, *56*(4), 607-609.
41. Jindal, D. P.; Bhatti, R. S.; Ahlawat, S. *Eur J Med Chem*. **2002**, *37*(5), 419-25.
42. Zabeer, A.; Bhagat, A.; Gupta, O. P. et al. *Eur J Med Chem*. **2006**, *41*(3), 429-34.
43. Hardtmann, G. E.; Koletar, G.; Pfister, O. R. *J. Med. Chem*. **1975**, *18*(5), 447-453.
44. Rao, A. R.; Bahekar, R. H. *Indian Journal of Chemistry*. **1999**, *38*(B); 434-439.
45. Bahekar, R. H.; Rao, A. R. *Arzneimittelforschung* **2000**, *50*(8), 712-6.
46. Bahekar, R. H.; Rao, A. R. *Arzneimittelforschung* **2001**; *51*(4), 284-92.

47. Mahindroo, N.; Ahmed, Z.; Bhagat, A.; Bedi, K. L.; Khajuria, R. K.; Kapoor, V. K.; Dhar, K. L. *Medicinal Chemistry Research*, **2006**, *14*(6), 347-368.
48. Šašková, J. Diplomová práce, UK v Praze, Faf v Hradci Králové, **2010**.
49. Combs, D. W.; Rampulla, M. S.; Russell, R. K. *Drug Des. Deliv.* **1990**, *6*(4), 241-54.
50. Medwid, J. B.; Torley, L. W. *US 4692449 A 19870908*, **1987**.
51. Parsons, D. G.; Turner, A. F. *Brit. GB 1094044 19671206*, **1967**.
52. Mikiciuk-Olasik, E.; Blaszczyk-Swiatkiewicz, K.; Zurek, E.; Krajewska, U.; Rozalski, M.; Kruszynski, R.; Bartczak, T. J. *Archiv der Pharmazie* **2004**, *337*(5), 239-246.
53. Coskun, N.; Cetin, M. *Tetrahedron*, **2007**, *63*(14), 2966-2972.
54. Hayashi, H. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1964**, *12*, 43-63.
55. Cuiban, F.; Ionescu, M.; Bala, H.; Sterescu, M. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **1963**, 356-62.
56. Iijima, C.; Kyo, T. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1989**, *37*(3), 618-620.