UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza nových derivátů kombretastatinu

HRADEC KRÁLOVÉ 2014 ZBYNĚK BRŮŽA

Poděkování za pomoc při realizaci mé diplomové práce patří mému školiteli prof. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D. Za cenné rady při syntéze děkuji Mgr. Jiřímu Kratochvílovi a PharmDr. Marcelovi Špulákovi, Ph.D. Při ověřování struktur patří poděkování za rychle poskytnuté výsledky doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Zdeňku Novákovi a za vytváření příjemného pracovního prostředí Mgr. Zuzaně Ranii Hruškové a Mgr. Pavlovi Horkému. Za stanovení antibakteriálních a antifungálních aktivit děkuji Mgr. Vejsové, Ing. Křivčíkové a Idě Dufkové.

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.

Zbyněk Brůža

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK……..…..…..... 8

1. ÚVOD…….…… 9

1.1 Cytoskelet a jeho funkce…….....…… 9

1.2 Kombretastatiny v přírodě……9

1.3 Mechanismus účinku kombretastatinu……..... 11

1.4 Analoga kombretastatinu……...12

1.5 Hledání nových syntetických přístupů ke tvorbě diaryldihydrofuranů……. 15

2. CÍL PRÁCE……... 17

3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM…… 18

3.1 Syntéza 3,4-diaryl-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onů……. 18

3.1.1 Nitrace…… 19

3.1.2 Bromace 3-nitro-4-methoxyacetofenonu……19

3.1.3 Tvorba esteru…… 20

3.1.4 Cyklizace…… 21

3.1.5 Hydroxymethylace …… 22

3.1.6 Pokus o redukci ……. 23

3.2 Vývoj alternativní syntézy derivátů kombretastatinů……23

3.2.1 Návrh syntézy……23

3.2.2 Příprava prekurzorů…… 24

3.2.2.1 Hydrostannylace……..24

3.2.2.2 Acetylace…… 24

3.2.3 Cross-couplingové reakce katalyzované palladiovou černí……...24

3.2.4 Cyklizace…… 26

3.2.5 Heckova reakce…….. 27

3.3 Biologické aktivity…… 29

3.3.1 Antifungální aktivita……...29

3.3.2 Antibakteriální aktivita……...30

3.3.3 Souhrn……31

4. ZÁVĚR……... 32

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST…… 33

5.1 Obecné experimentální postupy…… 33

5.2 Hodnocení aktivit…….. 33

5.2.1. Hodnocení antifungální aktivity…… 33

5.2.2. Hodnocení antibakteriální aktivity…… 34

5.3 Provedení syntézy……..35

5.3.1 Syntéza 3,4-diaryl-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onů …….. 35

5.3.1.1 Příprava 1-(4-methoxy-3-nitrofenyl)ethanonu…… 35

5.3.1.2 Příprava 2-brom-1-(4-methoxy-3-nitrofenyl)ethanonu……... 36

5.3.1.3 Příprava 2,2-dibrom-1-(4-methoxy-3-nitrofenyl)ethanonu s 2 ekv. PHT……... 37

5.3.1.4 Příprava 2-brom-1-(4-methoxy-3-nitrofenyl)ethanonu s 0,95 ekv. PHT…… 37

5.3.1.5 Příprava 2-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2-oxoethyl-2-(4-methoxyfenyl)acetátu s TEA…….... 38

5.3.1.6 Příprava 2-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2-oxoethyl-2-(4-methoxyfenyl)acetátu s K_2CO_3……..... 39

5.3.1.7 Příprava 2-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2-oxoethyl-2-(3,4,5-trimethoxyfenyl) acetátu…….....…… 39

5.3.1.8 Příprava 3-(4-methoxyfenyl)-4-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu s NaH……..... 40

5.3.1.9 Příprava 3-(4-methoxyfenyl)-4-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu s DBU…….. 41

5.3.1.10 Příprava 3-(4-methoxyfenyl)-4-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onu…….. 42

5.3.2 Vývoj alternativní syntézy kombretastatinů……...43

5.3.2.1 Příprava (*E*)-2-(tributylstannyl)but-2-en-1,4-diolu……. 43

5.3.2.2 Příprava *N*-(4-jodfenyl)acetamidu……...43

5.3.2.3 Příprava (*Z*)-2-(4-methoxyfenyl)but-2-en-1,4-diolu s LiCl…… 44

5.3.2.4. Příprava (*Z*)-*N*-[4-(1,4-dihydroxybut-2-en-2-yl)fenyl]acetamidu……..45

5.3.2.5 Příprava (*Z*)-*N*-[4-(1,4-dihydroxybut-2-en-2yl)fenyl]acetamidu s LiCl……. 46

5.3.2.6 Příprava 3-(4-methoxyfenyl)-2,5-dihydrofuranu…… 46

6. LITERATURA…….. 48

ABSTRAKT:

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Zbyněk Brůža

Konzultant: Prof. RNDr. Milan Pour, Ph.D.

Název diplomové práce: Syntéza nových derivátů kombretastatinu

Cílem mé diplomové práce bylo syntetizovat nové deriváty kombretastatinu a zabývat se jejich dalšími syntetickými úpravami, které by mohly vést k vylepšení či zachování jejich biologické aktivity a zároveň ke změně farmakokinetických parametrů. Byly syntetizovány dvě látky typu 3,4-diaryl-2,5-dihydrofuran-2-onů. Reakční postup zahrnoval známou sekvenci reakcí, která vychází z α-halogenovaných acetofenonů, jenž jsou převedeny na estery fenyloctových kyselin a intramolekulární cyklizací pak vzniká α,β-diarylbutenolid. Dvě finální látky byly zaslány na testování antibakteriální, antifungální a cytotoxické aktivity.

Kvůli komplikacím při cyklizaci esterů jsme přešli k vývoji nového syntetického přístupu pomocí Pd-katalyzovaných cross-couplingů vhodně substituovaných benzenových jader s heterocykly jako spojovacím článkem.

ABSTRACT:

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: Zbyněk Brůža

Consultant: Prof.RNDr. Milan Pour, Ph.D.

Title of Thesis: Synthesis of new derivatives of combretastatin

The aim of this work was the synthesis of novel structural analogues of combretastatin, including further structural modifications. Synthetic modifications might improve biological activity as well as pharmacokinetics of the compounds. Two 3,4-diaryl-2,5-dihydrofuran-2-ones were synthesized. The sequence comprises well-known reactions starting from α-halogenated acetophenones, which are converted to esters of phenylacetic acids. The esters are then cyclized to the final 2,5-dihydrofuran-2-ones analogues under basic conditions. The title compounds were screened for their antibacterial, antifungal and cytotoxic activity.

Because of the difficulties especially in the cyclization step, we have tried to develop an alternative synthetic procedure based on Pd-catalysed cross-coupling reactions of different aryl halides with heterocycles as bridging structural fragments.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DEAD	diethyl-azodikarboxylát
DIAD	diisopropyl-azodikarboxylát
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
GTP	guanosintrifosfát
IC_{50}	koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu proti kontrole
IČ	infračervená spektroskopie
LDA	lithium-diisopropylamid
MHB	Müller-Hintonův bujón
NMR	nukleární magnetická rezonance
PHT	pyridinium tribromid
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
t.t.	teplota tání

1. ÚVOD

1.1 Cytoskelet a jeho funkce

Cytoskelet je cytoplazmatická vláknitá struktura typická pro všechny eukaryotické buňky a nezbytná pro jejich přežití a reprodukci.[1]

Vlákna se dělí do tří skupin. První skupinou jsou nejsilnější mikrotubuly tvořené spirálovitě polymerizovaným heterodimerem bílkovin α- a β-tubulinu stabilizovaným molekulou GTP, který tvoří dutou trubici. Druhá skupina zahrnuje intermediární filamenta, která jsou tvořena bílkovinami specifickými pro různé typy buněk. Třetí skupinu představují nejslabší mikrofilamenta tvořená aktinem.[1]

Cytoskelet spoluurčuje celkový tvar buňky (podle fyziologické funkce). Tvaruje jak vlastní tělo buňky, tak typické výběžky jako je axon neuronu nebo klky enterocytů. Složky cytoskeletu rovněž poskytují opěrnou soustavu umožňující některým jednobuněčným eukaryontům aktivní pohyb pomocí bičíků nebo cilií. Nezbytnou součástí je pro zachování vnitřní organizace buňky v průběhu celého buněčného cyklu. Např. speciální asociované proteiny (tzv. „molekulové motory“) využívají cytoskelet jako transportní infrastrukturu pro přesun organel v rámci buňky nebo exkreci metabolitů.[1]

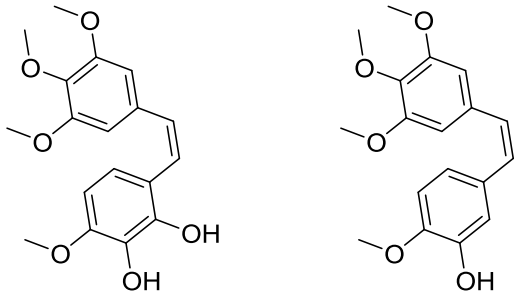
Klíčovou roli hraje cytoskelet při správném rozdělení buněčného materiálu v průběhu mitózy. To zahrnuje jak systém organel a genetický materiál, tak rozdělení samotné buňky na buňky dceřiné. Při mitóze se ze dvou centromer, které slouží jako polymerizační centrum pro mikrotubuly, začne tvořit mitotické vřeténko. Pomocí něj se mezi vznikající dceřiné buňky rozdělí organely a obě sady chromosomů. Při dělení samotné buňky se dále vytváří cytoskeletální prstenec, který mateřskou buňku postupně rozdělí a ukončí tak vlastní mitózu.[1]

Narušení jakékoli funkce tubulárního systému, zejména mitotické, má pro buňku fatální následky. V praxi se toho využívá při terapii nádorových onemocnění a dnes již méně i při terapii dny kolchicinem.

1.2 Kombretastatiny v přírodě

Drogy z jihoafrických stromů čeledi *Combretaceae* jsou po tisíciletí používány v léčitelství místních kmenů jako terapeutika proti širokému spektru nemocí zahrnující onemocnění srdce, infekce červy, lepru, rakovinu a další. První zájem o tyto látky z pohledu západní medicíny

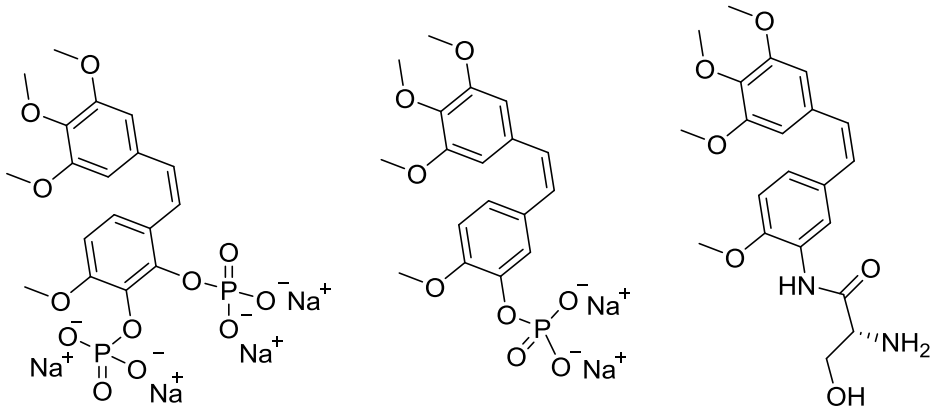
nastal při zjištění, že extrakty z druhu *Combretum Caffrum* vykazují aktivitu proti buněčným liniím leukémie (P-388).[2] Při dalším výzkumu bylo zjištěno, že extrakty obsahují několik typů aktivních látek. Ty byly rozděleny podle chemické struktury do čtyř skupin: na deriváty *cis*-stilbenu, diarylethylenu, chinonu a na makrocyklické laktony.[3]



1 **2**

Zástupci z *cis*-stilbenové řady CA1 (**1**) a CA4 (**2**) vykazovaly největší protinádorovou účinnost. Mezi jejich hlavní nevýhody z hlediska farmakoterapie patří malá rozpustnost ve vodě a s tím související nízká biologická dostupnost a dále nestabilita konfigurace na dvojné vazbě. Vlivem tepla, světla nebo pouhým skladováním totiž přecházejí na stabilnější, avšak neúčinnou *trans* konfiguraci.[3]

Problém solubility byl částečně vyřešen převedením na fosfáty (CA1P (**3**), CA4P (**4**)). Tyto látky pak byly testovány v preklinických studiích a v letech 2011 až 2014 byla obdobná látka ombrabulin (**5**) [4,5] schválena EMA jako orphan-drug pro terapii nádorů měkkých tkání.



3 **4** **5**

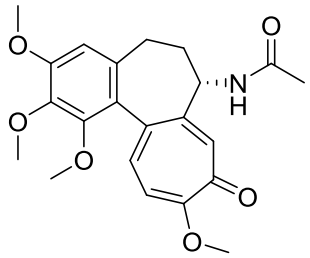
Během těchto studií se zjistilo, že CA4P dokáže efektivně zastavit krevní zásobení nádoru poškozením tvaru cévních buněk. Následné vyhladovění maligních buněk způsobí odumření nádoru. Problémem je skutečnost, že kombretastatiny takto účinkují hlavně na buňky uvnitř nádoru, protože povrchové buňky mají lepší přístup k živinám. To vedlo k pokusům

o kombinaci kombretastatinu s další chemoterapií (cisplatina, fluorouracil a další). Tento terapeutický režim má výhodu v tom, že tradiční léčba účinkuje nejlépe na vnější nejrychleji se dělící buňky (které jsou také kombretastatiny zasaženy nejméně). Existoval proto reálný předpoklad, že klasická chemoterapie usmrtí buňky ve vnějších vrstvách nádoru a kombretastatiny znemožní zvýšení krevního zásobení ve vnitřních vrstvách.[3]

CA1P se při preklinických studiích ukázal jako ještě efektivnější než CA4P díky aktivitě vůči buňkám ve vnějších vrstvách nádoru, která je vysvětlována metabolizací na cytotoxický *o*-chinon.[3]

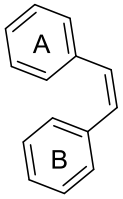
1.3 Mechanismus účinku kombretastatinu

Kombretastatiny patří do skupiny látek interagujících s mikrotubuly. Jejich efekt spočívá v inhibici polymerizace mikrotubulů stejně jako tomu je v případě kolchicinu (**6**), se kterým sdílejí vazebné místo, nebo *Vinca* alkaloidů. Odlišný mechanismus mají taxany, které se váží na již polymerizované mikrotubuly, stabilizují je a znemožňují jejich depolymerizaci.[3]

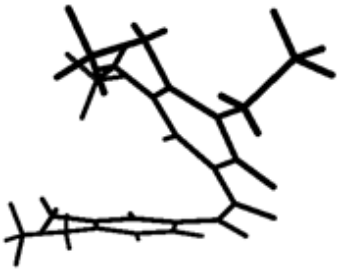


6

Cis-stilbenová řada kombretastatinů, jejímiž deriváty se zabýváme, obsahuje základní strukturní prvky, kterými jsou dvě různě substituovaná benzenová jádra (označovaná jako **A** a **B**, **Obr. 1**) spojená nenasyceným dvouuhlíkatým můstkem. Pro účinek je nezbytná *cis* konfigurace dvojné vazby, protože prostorové uspořádání substituovaných aromatických kruhů je komplementární k vazebnému místu na tubulinu. Je také zajímavé, že ačkoli je základní struktura tvořena systémem konjugovaných dvojných vazeb a dalo by se předpokládat planární uspořádání, ve skutečnosti benzenová jádra mezi sebou svírají úhel 50-60° (**Obr. 2**). Vychýlení z osy je zapříčiněno sterickými interakcemi mezi oběma prostorově blízkými jádry.[3]



Obr. 1



Obr. 2

V terapii nádorů kombretastatiny vystupují jako VTA (vascular-targeting agents neboli cévy zasahující sloučeniny). Inhibicí tvorby mikrotubulů totiž narušují fyziologický tvar cévních buněk, které se tímto zakulatí a zamezí se tak toku krve k nádoru. Vykazují také efekt proti angiogenezi - tvorbě nových cév, kterou intenzivně stimuluje rostoucí nádor. U kombretastatinů je také zajímavé, že vykazují určitou selektivitu k mladším cévám, jako jsou právě cévy, jejichž tvorbu nádor vyvolává. Selektivita se vysvětluje mírně odlišným typem tubulinů těchto buněk.[3]

1.4 Analoga kombretastatinu

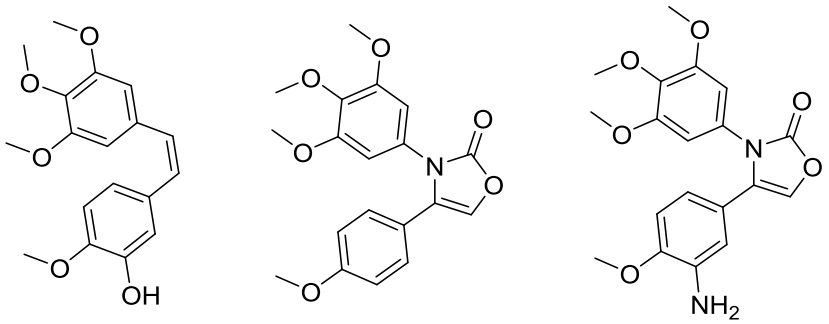
Při zkoumání vlivu substituce benzenových jader na biologickou aktivitu je možné z rešerše na toto téma v literatuře dovodit, že jádro **A** je nejvýhodnější ponechat 3,4,5-trimethoxy- nebo obdobně lipofilně substituované. Jádro **B** je možné obměnit, ale nejúčinnější z hlediska prostorového uspořádání zůstává přírodní pozice substituentů v polohách 3 a 4. Na pozici 4 je nejvýhodnější ponechat původní methoxyskupinu, ale 3-hydroxyskupina (kobretastatin CA4 (**2**), viz výše) může být pro zvýšení aktivity nahrazena nitroskupinou nebo ještě lépe aminoskupinou. Aminoskupina má i další výhody, ať už možnost převedení na amoniovou sůl pro zlepšení rozpustnosti nebo tvorbu konjugátů, např. s přírodními aminokyselinami (viz. ombrabulin (**5**)). U některých látek byla testována i záměna jednoho z benzenových jader za benzylový substituent.

Pro zajištění stability aktivní *cis* konformace ethendiylového můstku se tento začleňuje do heterocyklického kruhu. Kromě rigidizace struktury v tomto klíčovém místě má heterocyklický analog tu výhodu, že poskytuje prostor pro rozličnou derivatizaci ovlivňující další vlastnosti molekuly jako je rozpustnost, pK_A nebo poskytuje vazebné místo pro konjugaci s jinými aktivními molekulami. Mezi heterocykly, které byly testovány,

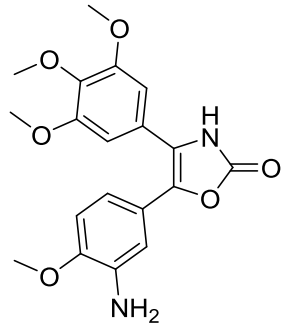
patří 2,3-dihydrooxazol-2-on (**7**, **8**, **9**), 2,5-dihydrofuran-2-on (**11**), tetrazol (**10**, **12**), triazol (**13**) a další. Testovány však byly i některé acyklické deriváty (**14**).

	IC_{50} (nM)				
Buněčné linie	**B16**	**HCT 166**	**MCF-7**	**A549**	**PC-3**
CA-4 (**2**)[6]	1,0	0,9	2,7	2,1	2,7
Kolchicin (**6**)[8]	NT	NT	7,2	NT	NT
7[6]	7,9	11,0	10,5	19,9	7,5
8[6]	1,1	3,2	1,8	4,3	2,5
9[6]	2,4	3,7	4,9	3,8	2,1
10[7]	NT	NT	1,9	2,8	0,5
11[8]	NT	NT	3,36	NT	5,32
12[9]	NT	NT	2,8 ± 0,9	7,4 ± 2,2	NT
13[10]	1600	NT	NT	NT	NT
14[10]	2900	NT	NT	NT	NT

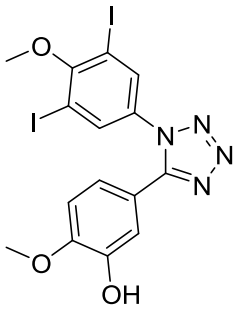
Tab. 1. Srovnání hodnot IC_{50} vybraných kombretastatinových derivátů na linie rakovinných buněk. **B16** – myší melanom, **HCT 166 –** lidská rakovina tlustého střeva, **MCF-7 –** lidský nádor prsu, **A549 –** plicní adenokarcinom, **PC-3** – nádory prostaty; **NT**-netestováno



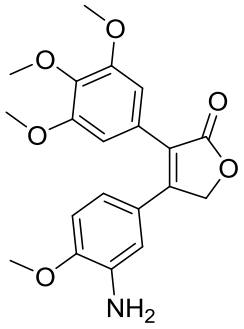
2 **7** **8**



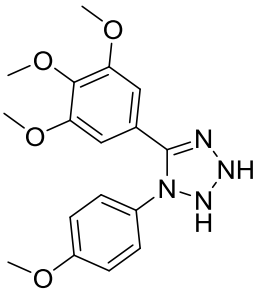
9



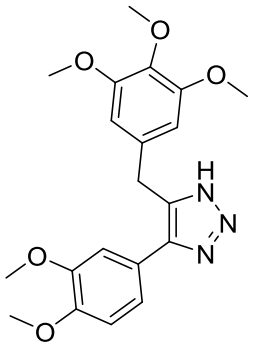
10



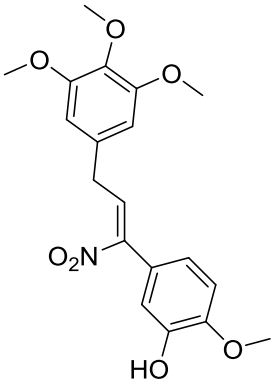
11



12



13



14

Tab. 1. fakticky podporuje výše uvedené závěry. Jádro **A** má u nejúčinnějších derivátů substituci shodnou s přírodními kombretastatiny s výjimkou záměny methoxyskupin v pozicích 3 a 5 u látky **10** za halogeny, kde je aktivita srovnatelná. Na kruhu **B** dochází u některých látek k obměně substituentu v poloze 3. Je zajímavé sledovat u látek jinak shodné struktury, že absence substituentu v poloze 3 jádra **B** (**7**) vede k poklesu aktivity o 1 řád. Naproti tomu látky s rozdílnými heterocyklickými kruhy se shodnou substitucí kruhů **A** a **B** (**8**, **9** a **11**) vykazují proti buněčné linii **MCF-7** řádově stejnou aktivitu a zdá se tedy, že vlastní charakter heterocyklu nehraje v biologickém účinku významnější roli.

U látek **13** a **14**, kde byl spojovací můstek prodloužen na tříuhlíkatý, respektive u heterocyklického derivátu došlo k výměně fenylu za benzyl, se účinnost snižuje řádově 1000×. U látky **14** je to způsobeno pravděpodobně změnou základního kombretastatinového uspořádání, které se tak nemůže správně navázat na heterodimer tubulinů. U heterocyklického analogu **13** je účinnost vyšší (podobnost s kombretastatiny je větší), ale stále není srovnatelná se základním *cis*-stilbenovým uspořádáním.

1.5 Hledání nových syntetických přístupů ke tvorbě diaryldihydrofuranů

Komplexy nulmocného palladia se vyznačují svojí mimořádnou reaktivitou a schopností katalyzovat vznik vazeb, jejichž tvorba je pomocí konvenčních syntetických postupů velmi obtížná nebo dokonce nemožná (zejména vazby $C(sp^2)$-$C(sp^2)$ nebo $C(sp^2)$-C(sp)). Mechanismus těchto reakcí je zkoumán již více než 40 let a obecně ho lze zjednodušit do podoby znázorněné na **Schématu 1**. Zahrnuje dekoordinaci ligandů či *in situ* redukci na Pd^0 (v závislosti na typu prekurzoru), které pak vstupuje do katalytického cyklu a podléhá nejprve oxidativní adici (reakcí zpravidla s aryl či alkenylhalogenidem nebo triflátem), poté transmetalaci (s příslušným organokovem, zpravidla na bázi hořčíku, zinku, cínu, mědi, křemíku či boru) a nakonec reduktivní eliminaci, která regeneruje katalyzátor a zároveň poskytuje požadovaný produkt.[11]

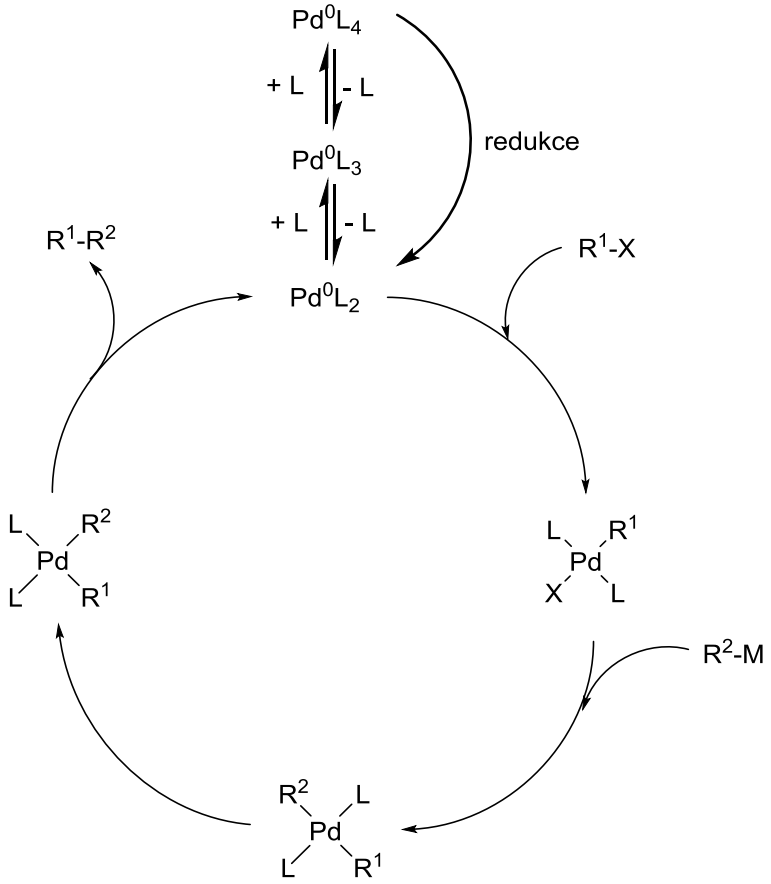
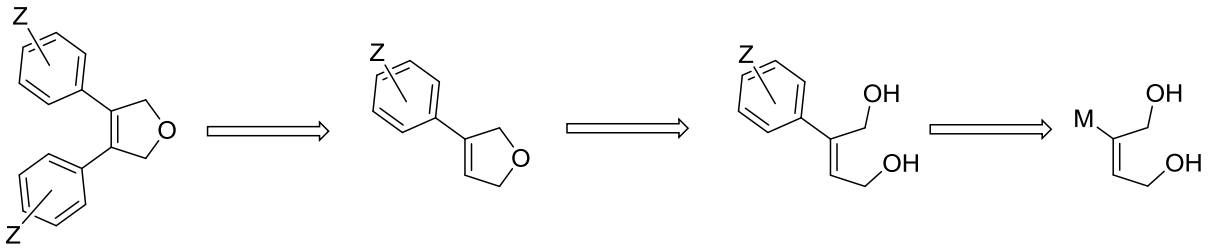


Schéma 1

V souvislosti s bádáním naší výzkumné skupiny v této oblasti se nedávno podařilo odhalit schopnost palladiové černi vystupovat jako katalyzátor v některých cross-couplingových reakcích. Protože se jedná o mnohem levnější variantu klasické

homogenní palladiové katalýzy, která navíc nevyžaduje přítomnost specifických organických ligandů (mohou významně znesnadňovat purifikaci produktů), rozhodli jsme se pokusit se o její aplikaci na alternativní postup syntézy 3,4-diaryl-2,5-dihydrofuranů jakožto derivátů kombretastatinu. Retrosyntetický rozbor je znázorněn na **Obr. 3** a zahrnuje dvě rozpojení $C(sp^2)$-$C(sp^2)$ vazeb a dehydrataci diolu.

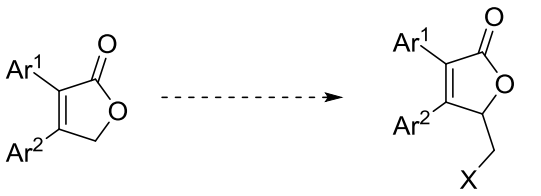


Obr. 3

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo:

1. Syntetizovat vybrané 2,5-dihydrofuran-2-ony s různými substituenty (podobající se přírodním kombretastatinům), u kterých bylo možné na základě literární rešerše předpokládat antineoplastickou aktivitu a tyto látky posléze modifikovat polárními skupinami, které by mohly zlepšit farmakokinetické parametry těchto derivátů.



X= -OH, -NH_2

2. Testovat biologickou aktivitu připravených derivátů.

3. Vyvinout novou alternativní syntézu diarylfuranonů založenou na cross-couplingových reakcích katalyzovaných komplexy palladia.

3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

3.1 Syntéza 3,4-diaryl-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onů

Obecný návrh syntézy shrnuje **Schéma 2**. Výchozí látkou je 4-methoxyacetofenon, který je podroben nitraci v pozici 3 a následně bromaci na α-uhlíku. Vzniklý bromketon je substituován vhodným fenylacetátem za vzniku esteru, který je cyklizován a dehydratován za vzniku nenasyceného pětičetného laktonu. Ten je poté hydroxymethylován v pozici 5.

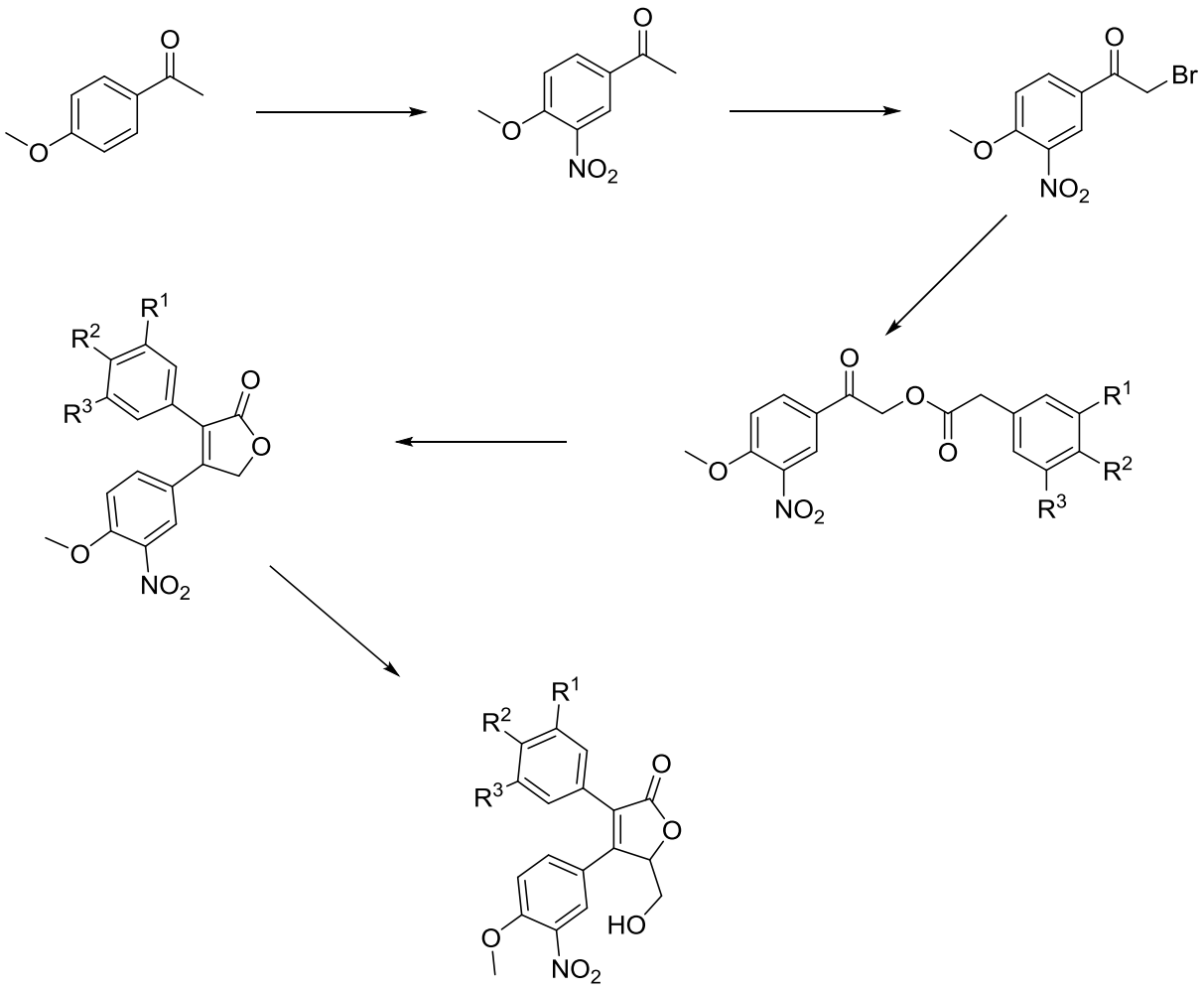
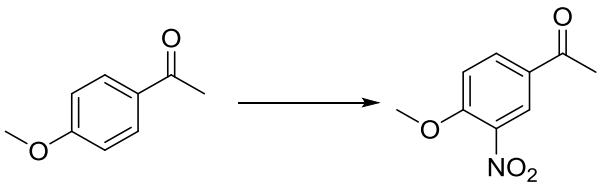


Schéma 2

3.1.1 Nitrace



15

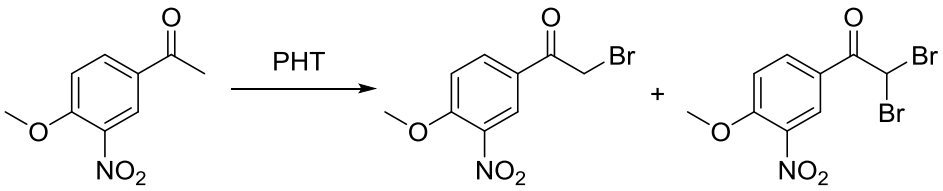
Nitrace výchozí látky 4-methoxyacetofenonu probíhá mechanismem S_EAr.

Jako první jsme použili klasické podmínky pomocí nitrační směsi (HNO_3/H_2SO_4). Reakce však neprobíhala selektivně a obsahovala směs nedělitelných produktů.

Jako mírnější alternativu jsme proto použili nitraci, kde jako činidlo vystupuje *in situ* generovaný acetylnitrát. Reakce probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je příprava činidla, které vzniká reakcí mezi HNO_3 a Ac_2O (ten v reakci vystupuje zároveň jako rozpouštědlo). Ve druhém kroku (vlastní nitraci) se do směsi pomalu vpraví výchozí látka. [12]

Výtěžek reakce byl při 2 hodinách reakčního času 90%. Důkazem vzniku produktu **15** je změna štěpení signálů aromatických vodíků, kdy se původní dva dublety 4´-methoxy-acetofenonu změnily na tři samostatné signály s posunem 8.48 – 8.38, 8.17 a 7.16 ppm.

3.1.2 Bromace 3-nitro-4-methoxyacetofenonu



15 **16** **17**

Bromace acetofenonů probíhá reakcí s bromačním činidlem v kyselém prostředí, za vzniku bromketonu. Jako nukleofil zde vystupuje enolforma ketonu. Aryl(alkyl)fenony nesubstituované v pozici 3 nitro skupinou podléhají této reakci až po delší době (48 hodin).[13] Vlivem substituce se reakční čas ke vzniku monobromovaného produktu **16** zkrátil na 20 minut, ale komplikací byl vznik dibromovaného produktu **17**, který snižuje výtěžek a ztěžuje izolaci žádaného produktu. Pokusili jsme se také cíleně připravit produkt **17**, což se nám sice podařilo, ale izolace látky **17** byla komplikována vznikem 4-brombutanolu, rozkladného produktu THF,

který je od produktu velice obtížně oddělitelný. Lepším přístupem je proto využití CH_2Cl_2 jako rozpouštědla. Výsledky shrnuje Tab. 2.

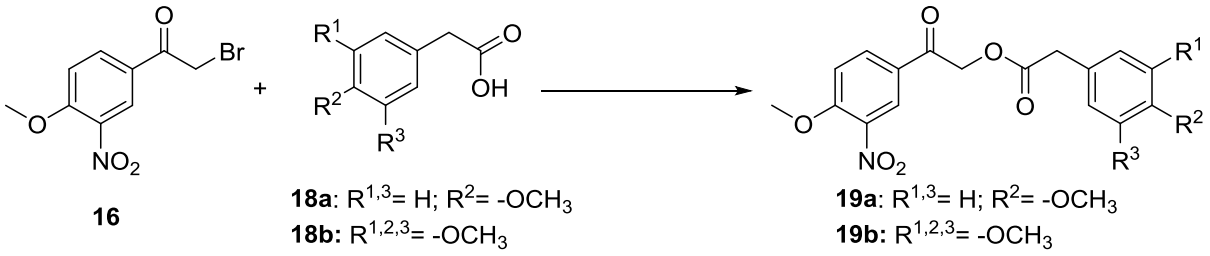
Látka	PHT (ekv.)	Rozpouštědlo	Čas (hod)	Výtěžek (%)
16	1,2	THF	0,33	74
16	0,95	CH_2Cl_2	3,5	81
17	2	THF	2	80

Tab. 2. Výsledky bromace

Na NMR spektrech je patrná změna posunu signálů methylové skupiny z původních 2.60 ppm na 4.40 ppm u monobromovaného produktu **16** a 6.65 ppm u produktu **17**.

3.1.3 Tvorba esteru

V dalším kroku se připraví ester z ketonu **16** pomocí nukleofilní substituce s *in situ* generovanou solí příslušné fenyloctové kyseliny (**20a, 20b**).



Reakci jsme provedli dvěma způsoby. V prvním jsme pomocí TEA deprotonovali kyselinu **18a** v THF. Ta pak následně reagovala s bromketonem **16** za vzniku esteru. Výtěžky však byly nízké. Druhým postupem bylo rozpuštění fenyloctových kyselin v acetonu s přídavkem K_2CO_3. Ten následně vytvoří draselnou sůl a reakce probíhá obdobně. Reakční časy sice byly poměrně dlouhé, ale v obou případech se podařilo dosáhnout uspokojivých výtěžků. Stejně jsme poté postupovali s použitím kyseliny **18b**.[13,14]

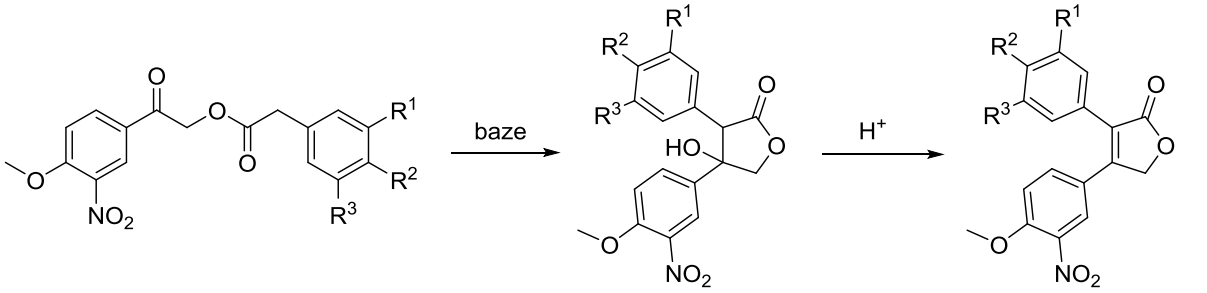
Látka	Baze	Čas (hod)	Výtěžek (%)
19a	TEA	3	39
19a	K_2CO_3	96	92
19b	K_2CO_3	120	79

Tab. 3. Výsledky tvorby esteru

Důkazem vzniku produktu **19a** je přítomnost singletů v oblastech 5.26 ppm pro skupinu $ArCOCH_2O$- a 3.74 ppm $ArCH_2CO$- potvrzující vznik esterové vazby. Obdobně pro produktu **19b** to byl vznik nových singletů v oblastech 5.30 ppm a 3.74 ppm.

3.1.4 Cyklizace

Tvorba nenasyceného pětičetného cyklu probíhá ve dvou krocích.[13,14] V prvním se pomocí vhodné baze odštěpí kyselý vodík z α-uhlíku původní kyseliny. Takto vzniklý enolát reaguje s oxoskupinou původního acetofenonu za vzniku pětičetného nasyceného kruhu s hydroxyskupinou v poloze 4. Ta následně vlivem kyselého prostředí při zpracování dehydratuje za vzniku dvojné vazby.



19a: $R^{1,3}$=H; R^2= -OCH_3
19b: $R^{1,2,3}$= -OCH_3

20a: $R^{1,3}$=H; R^2= -OCH_3
20b: $R^{1,2,3}$= -OCH_3

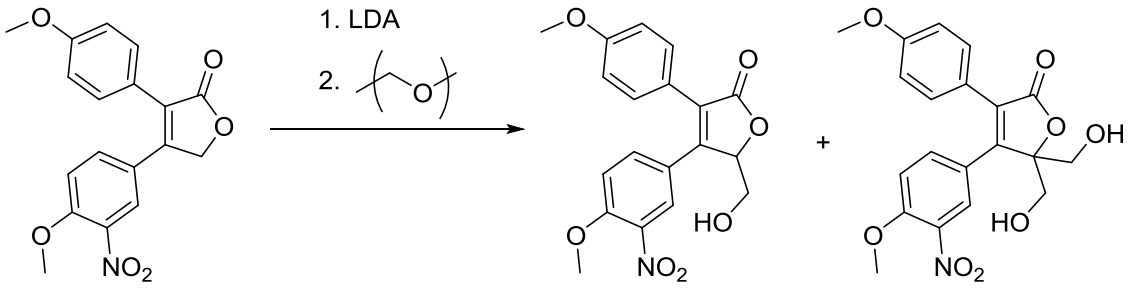
Stejným způsobem jsme se pokusili cyklizovat i ester **19b**. Ze studia NMR spekter reakčních směsí vyplynulo, že žádaný produkt vzniká (nově vzniklý singlet s posunem 5.19 ppm odpovídající $–CH_2O$-), ale jen ve stopovém množství a nebylo možné jej izolovat.[13,14]

Látka	Baze	Čas (hod)	Výtěžek (%)
20a	NaH	1	20
20a	DBU	1	23
20b	NaH	2	stopa
20b	DBU	22	stopa

Tab. 4. Výsledky cyklizace

Vznik nenasyceného laktonového kruhu látky **20a** potvrzuje změna posunu signálu skupiny $–OCH_2-$ z 5.26 na 5.14 ppm a vymizení singletu skupiny $ArCH_2CO-$.

3.1.5 Hydroxymethylace



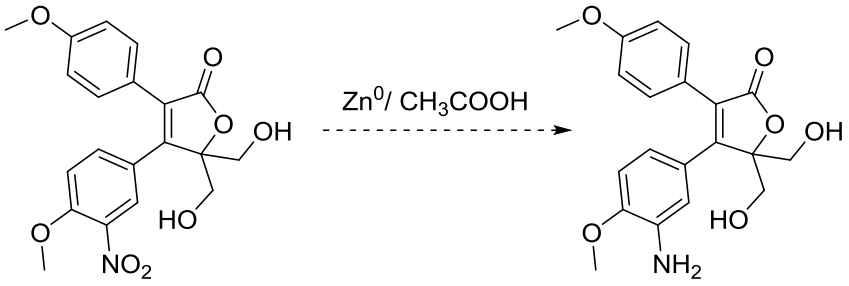
20a **21a** **22a**

Ke zvýšení hydrofility a tím i biodostupnosti jsme se pokusili o hydroxymethylaci laktonového kruhu na pozici 5. Reakce je založena na tvorbě konjugovaného enolátu v pozici γ a jeho reakci s vhodným elektrofilem (v tomto případě paraformaldehyd). Žádaný produkt se ale nepodařilo získat, protože reakce probíhala do druhého stupně a izolovali jsme tak bis(hydroxymethyl)furanonový derivát **22a** s výtěžkem 20 %. [13,14] Ze zbytku reakční směsi se nepodařilo další látky izolovat.

Z NMR spektra produktu **22a** jsou patrné signály dvou hydroxymethylových skupin v oblastech 3.87 – 3.81 ppm a 3.74 – 3.69 ppm.

3.1.6 Pokus o redukci

Redukce se provádí kovových zinkem jako redukčním činidlem v prostředí kyseliny octové. TLC sice naznačovala vymizení výchozí látky, ale reakce poskytla jen nedělitelnou směs mnoha produktů. Vzhledem k malému množství výchozí látky jsme nebyli schopni proces dále optimalizovat.



22a **23a**

3.2 Vývoj alternativní syntézy derivátů kombretastatinu

3.2.1 Návrh syntézy

V souladu s rozborem na **Obr. 3** na straně 16 jsme měli v úmyslu připravit tributylstannyldiol, který by byl podroben Stilleho couplingu. Vzniklý produkt by byl cyklizován na derivát 2,5-dihydrofuranu a Heckova reakce v posledním kroku by vedla k připojení druhého arylového fragmentu. Postup znázorňuje **Schéma 3.**

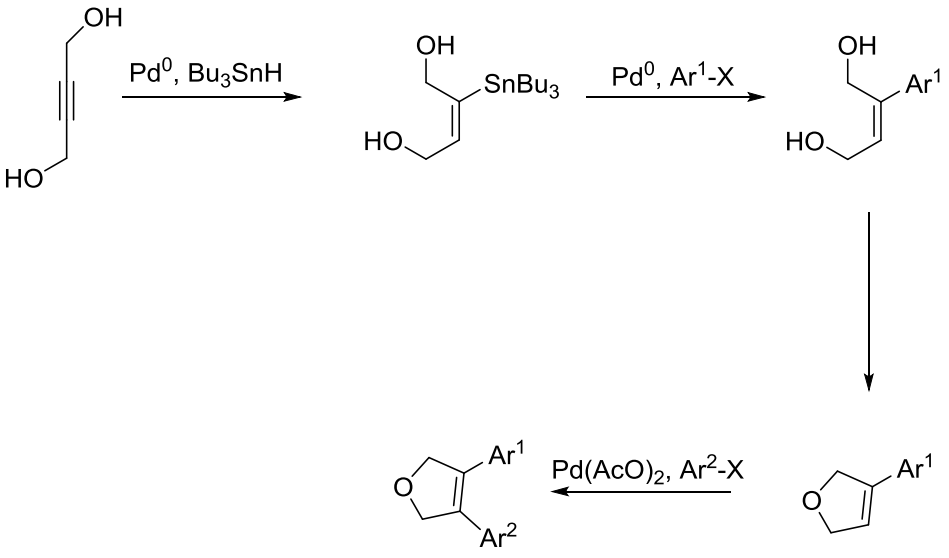
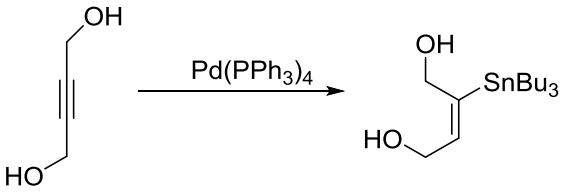


Schéma 3

3.2.2 Příprava prekurzorů

3.2.2.1 Hydrostannylace

Reakce byla prováděna za použití známých podmínek, které byly v minulosti aplikovány na derivatizaci jednoduchých 2-alkyn-1-olů.[15] Mechanismus nebyl dosud uspokojivě vysvětlen, ale předpokládá se inzerce atomu palladia do vazby vodík-cín. Tento komplex se posléze koordinuje k trojné vazbě a dochází k tvorbě produktu formální adice Bu_3SnH na trojnou vazbu. Jedná se o stereospecifickou *syn*-adici.

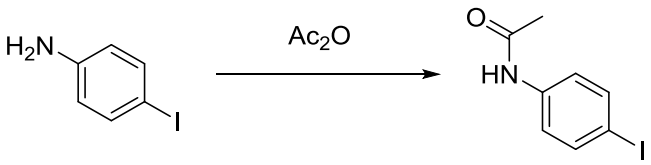


24

Výtěžek reakce byl po 20 minutách 71 %. Důkazem produktu jsou signály butylových zbytků a vzniklý dublet vinylového vodíku s posunem 5.79 ppm.

3.2.2.2 Acetylace

Příprava dalšího couplingového partnera, 4'-jodacetanilidu, probíhala za osvědčených podmínek pomocí acetanhydridu v CH_2Cl_2 s TEA jako bazí.



25

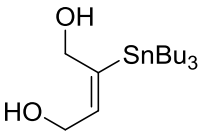
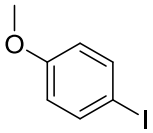
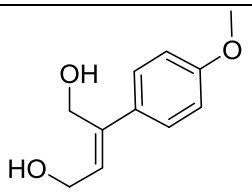
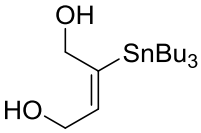
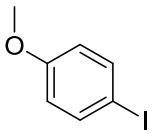
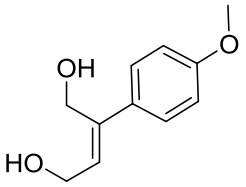
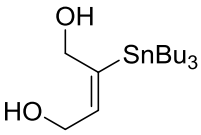
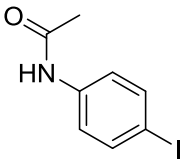
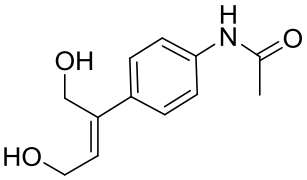
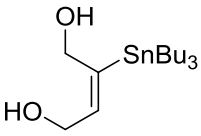
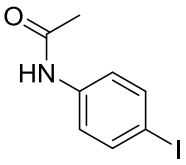
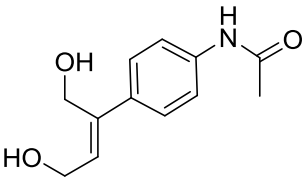
Výtěžek reakce byl po 14 hodinách 78 %. Důkazem vzniku produktu **25** je signál vodíků acetylové skupiny v oblasti 2.18 ppm.

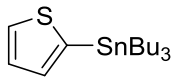
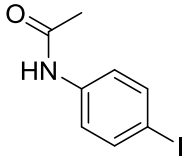
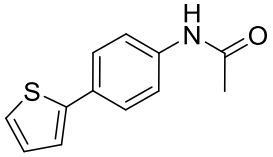
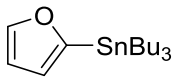
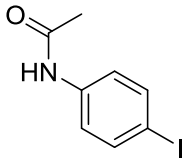
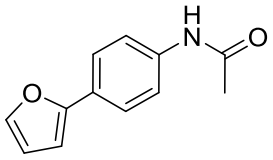
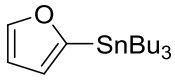
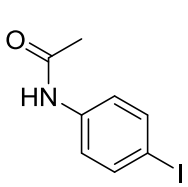
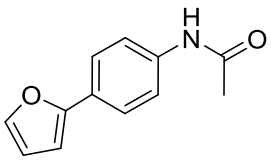
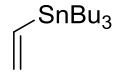
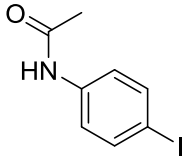
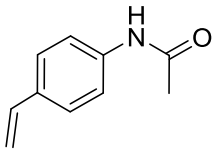
3.2.3 Cross-couplingové reakce katalyzované palladiovou černí

U těchto reakcí předpokládáme mechanismus podobný výše uvedenému (**Schéma 1**). V této části výzkumu jsme při testování reaktivity vycházeli ze dvou základních požadavků.

Nejprve jsme připravili či zakoupili takové prekurzory pro reakci samotnou, které by reflektovaly strukturu předlohových kombretastatinů (byť s jistým stupněm zjednodušení) (**26** a **27**). Některé další pokusy pak sloužily i k prozkoumání substrátové specifity navrhovaného syntetického protokolu (**28, 29** a **30**).

Jako aditivum byl ve většině případů testován chlorid lithný. Z rešerše v literatuře totiž plyne, že je schopen vytvářet s palladiem komplexy typu Li_XPdCl_X, které vykazují vyšší reaktivitu vůči substrátům. [17]

Couplingový partner 1	Couplingový partner 2	Pomocná látka	Čas (hod)	Výtěžek (%)	Produkt
		-	19	-	 **26**
		LiCl	28	34	 **26**
		-	22,5	32	 **27**
		LiCl	28	25	 **27**

Couplingový partner 1	Couplingový partner 2	Pomocná látka	Čas (hod)	Výtěžek (%)	Produkt
		-	20	-	 **28**
		-	20	-	 **29**
		LiCl	21	-	 **29**
		LiCl	24	-	 **30**

Tab. 5. Výsledky couplingů

Z výsledků v Tab. 5. je jasné, že s navrhovanými syntézami jsme zatím nedosáhli výraznějších úspěchů ve vývoji této nové cesty. Navzdory nízkým výtěžkům jsme se pokusili pokračovat v syntéze s látkami **26** a **27** dále, abychom zjistili další potenciál navrhovaného přístupu.

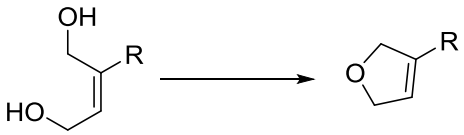
Vzniklé produkty **26** a **27** dokazuje vymizení signálů butylových vodíků a přítomnost signálů aromatických vodíků odpovídajících štěpením substituci v pozici 4.

3.2.4 Cyklizace

Navzdory zdánlivé jednoduchosti cyklizace vzhledem k termodynamické stabilitě vznikajícího pětičetného kruhu byla cyklizace but-2-en-1,4-diolu v kyselém prostředí neúspěšná. Přešli jsme tedy k cyklizacím za Mitsunobuových podmínek. Cyklizace

2-tributylstannylbut-2-en-1,4-diolu byla zcela neúspěšná, což si vysvětlujeme labilitou vazby uhlík(sp^2)-cín.

U reakcí s arylbutendioly se nám již podařilo při použití činidla DIAD dosáhnout alespoň částečných úspěchů. Výtěžek byl však přesto nízký.



Látka	R	Činidlo	Čas (hod)	Výtěžek (%)
31	4-(*N*-acetylamino)fenyl	H^+	48	-
32	tributylstannyl	DEAD	1,5	-
33	4-methoxyfenyl	DIAD	72	30

Tab. 6. Výsledky cyklizace

Důkazem pro vznik produktu **33** je změna posunu a štěpení signálů vodíků skupin -CH_2O-

3.2.5 Heckova reakce

Heckova reakce probíhá odlišným mechanismem než je tomu u klasických cross-couplingových reakcí. Oxidativní adice probíhá obdobně, ale vzniklý komplex se koordinuje ke dvojné vazbě a dochází k její (zpravidla regioselektivní) karbopalladaci. Následná struktura pak podléhá stereospecifické *syn*-eliminaci, čímž se regeneruje dvojná vazba (viz. **Schéma 4**).[18]

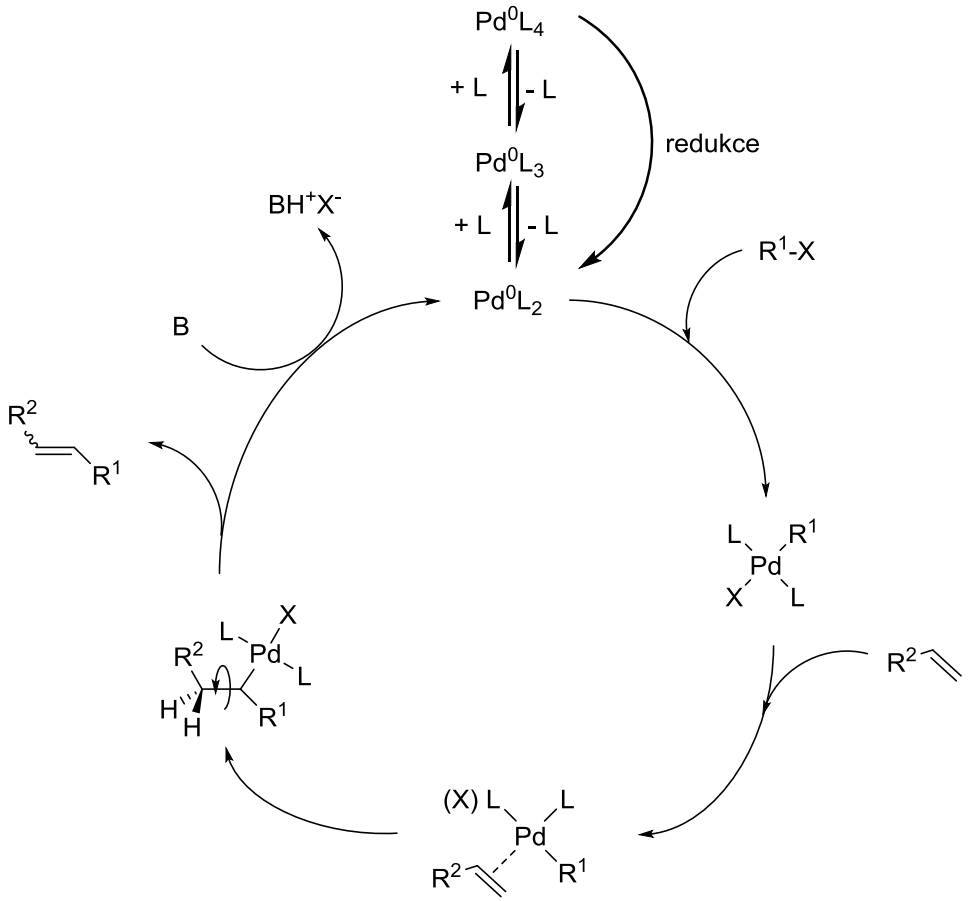
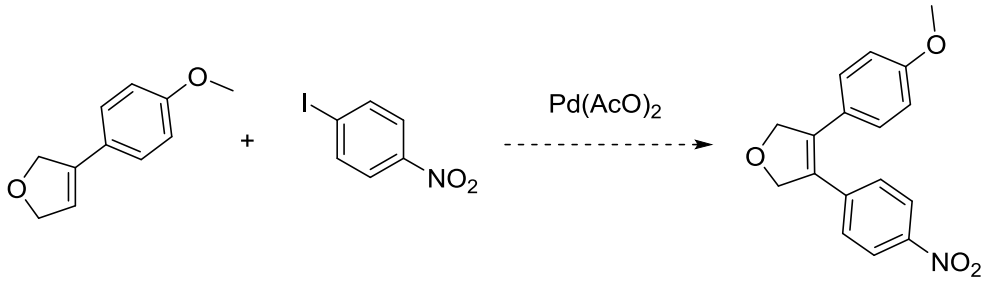


Schéma 4

V našem případě by sice dvojná vazba vznikala v nežádoucí pozici dihydrofuranového kruhu, ale předpokládali jsme pozdější snadnou izomerizaci za zvýšené teploty nebo prostřednictvím acidobazických činidel.



33 **34**

Jako reakčního partnera jsme vybrali pro úvodní pokus 1-jod-4-nitrobenzen, který je velmi reaktivním substrátem pro oxidativní adici. Produkt **34** se nám však přesto nepodařilo získat a kvůli nízkým výtěžkům látky **33** jsme se nemohli pokusit o optimalizaci.

3.3 Biologické aktivity

3.3.1 Antifungální aktivita

Hodnocení antifungální aktivity látky **20a** na vybrané kmeny hub, látka se vysrážela v mediu RPMI.

Kmen	Čas (hod)	IC_{50} (μmnol)	IC_{80} (μmol)
Candida albicans ATCC 44859	24	NT	>125
	48	NT	>125
Candida albicans ATCC 90028	24	NT	>125
	48	NT	>125
Candida parapsilosis ATCC 22019	24	NT	>125
	48	NT	>125
Candida krusei ATCC 6258	24	NT	>125
	48	NT	>125
Candida krusei E28	24	NT	>125
	48	NT	>125
Candida tropicalis 156	24	NT	>125
	48	NT	>125
Candida glabrata 20/I	24	NT	>125
	48	NT	>125
Candida lusitaniae 2446/I	24	NT	>125
	48	NT	>125
Trichosporon asahii 1188	24	NT	>125
	48	NT	>125
Aspergillus fumigatus 231	24	>125	NT
	48	>125	NT

Kmen	Čas (hod)	IC_{50} (μmnol)	IC_{80} (μmol)
Absidia corymbifera 272	24	>125	NT
	48	>125	NT
Trichophyton mentagrophytes 445	72	>125	NT
	120	>125	NT

Tab. 7. Antifungální aktivita látky **20a**

3.3.2 Antibakteriální aktivita

Hodnocení antibakteriální aktivity látky **20a** na vybrané kmeny, látka se vysrážela v mediu MHB.

Kmen	Čas (hod)	IC_{95} (μmol)
Staphylococcus aureus ATCC 6538	24	>125
	48	>125
Staphylococcus aureus HK5996/08 meticilin-rezistentní	24	>125
	48	>125
Staphylococcus epidermidis HK6966/08	24	>125
	48	>125
Enterococcus sp. HK14365/08	24	>125
	48	>125
Escherichia coli ATCC 8739	24	>125
	48	>125
Klebsiella pneumoniae HK11750/08	24	>125
	48	>125

Kmen	Čas (hod)	IC_{95} (μmol)
Klebsiella pneumoniae HK14368/08	24	>125
	48	>125
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	24	>125
	48	>125

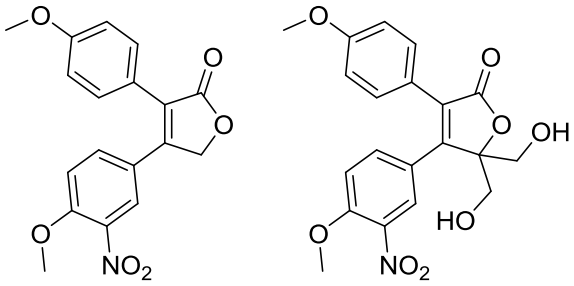
Tab. 8. Antibakteriální aktivita látky **20a**

3.3.3 Souhrn

Z výsledků vyplývá, že testovaný furanon je prakticky neúčinný. Malá účinnost může být způsobená omezenou rozpustností látky **20a** v mediu.

4. ZÁVĚR

1. Podařilo se nám syntetizovat dva deriváty kombretastatinu **20a** a **22a**. Komplikací pro syntézu dalších derivátů představuje cyklizace na finální lakton. Látky byly podrobeny testům na antibakteriální, antifungální a cytotoxickou aktivitu. Částečné výsledky jsme doposud získali jen pro látku **20a**, která se ukázala jako antibakteriálně a antifungálně neúčinná.



20a **22a**

2. Alternativním přístupem k syntéze založeným na couplingových reakcích se nám zatím nepodařilo získat finální struktury. Protože cyklizace na 2-aryl-2,5-dihydrofuran neprobíhala optimálně, nebylo dost výchozí látky pro optimalizaci Heckovy reakce. V rámci vývoje byla testována i substrátová specifita couplingových reakcí katalyzovaných palladiovou černí. Při těchto pokusech se ukázalo, že aryljodidy s elektrondonorní substitucí jsou při daných podmínkách velmi málo reaktivní.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Obecné experimentální postupy

Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez dalšího čištění. THF byl před použitím předestilován ze sodíku a benzofenonu, dichlormethan byl v čas potřeby destilován z CaH_2.

NMR spektra látek byla změřena v roztocích $CDCl_3$ či deuterovaného acetonu při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při frekvenci 300 MHz pro ^1H a při 75 MHz pro ^{13}C nebo na přístroji VARIAN VNMR S500 (při frekvenci 500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C). Chemické posuny byly uvedeny jako hodnoty δ v ppm a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla ($CDCl_3$: 7.26 pro ^1H a 77.00 pro ^{13}C). Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, m: multiplet), interakční konstanty (Hz) a všechna přiřazení, jsou-li uvedena.

Měření IČ spekter bylo provedeno na přístroji NICOLET 6700 FT-IR.

Pro kontrolu nad průběhem reakcí byla použita tenkovrstvá chromatografie na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F254 (Merck) s detekcí pod UV lampou a s pomocí detekčního činidla $Ce(SO_4)_2$. $4H_2O$ (2 g), $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ (4 g), konc. H_2SO_4 (10 ml), H_2O (200 ml) a následného zahřátí. Silikagel 60 (0.040-0.063 mm) pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen od firmy E. Merck.

5.2 Hodnocení aktivit

Antibakteriální a antifungální aktivitu stanovovaly Mgr.Vejsová, Ing.Křivčíková a Ida Dufková z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové UK v Praze.

5.2.1. Hodnocení antifungální aktivity

U připravených látek byla hodnocena *in vitro* antifungální aktivita vůči humánně patogenním houbám mikrodiluční bujónovou metodou.[18,19] Testovací soubor kmenů zahrnoval zástupce 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/I, *Candida lusitanie* 2446/I, *Trichosporon beigelii* 1188) a vláknitých hub (*Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, *Trichophyton mentagrophytes* 445) získaných z depozitáře Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové UK v Praze. Tři z uvedených ATCC kmenů (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258) sloužily také jako kontrola kvality. Všechny kultury byly před testováním kultivovány na Sabouraudově dextrózovém agaru. DMSO (100 %) byl použit pro rozpouštění všech testovaných látek, jeho výsledná koncentrace nepřekročila 2 %. Jako testovací medium sloužilo RPMI 1640 (Sevapharma, Praha) medium obohacené L-glutaminem pufrované pomocí 0,165 M morfolinpropansulfonové kyseliny (Serva) a 10 M NaOH na pH 7,0. Jamky mikrodilučních testovacích destiček obsahovaly 200 µl RPMI 1640 media s klesající koncentrací testovaných látek (od 2000 do 0,488 µmol.l^{-1}) a 10 µl suspenze inokula. Výsledná koncentrace inokula v RPMI 1640 mediu byla 5×10^3 ±0,2 cfu.ml^{-1}. 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 u kvasinek a jako 50 % inhibice růstu kontroly u vláknitých hub a byly stanoveny dvakrát a duplicitně. Odchylky 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 humánně patogenním bakteriím mikrodiluční bujónovou metodou.[20] Testovací soubor kmenů zahrnoval zástupce 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 depozitáře Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové UK v Praze. Uvedené ATCC kmeny sloužily také jako kontrola kvality. Všechny kultury byly před testováním kultivovány na Müller-Hintonově agaru. DMSO

(100 %) byl použit pro rozpouštění všech testovaných látek, jeho výsledná koncentrace nepřekročila 2 %. Jako testovací medium sloužil Müller-Hintonův bujón (MH, HiMedia, Čadersky-Envitek, Česká republika) pufrovaný na pH 7,4 (±0,2). Jamky mikrodilučních testovacích destiček obsahovaly 200 µl Müller-Hintonova media s klesající koncentrací testovaných látek (od 2000 do 0,488 µmol.l^{-1}) a 10 µl suspenze inokula. Výsledná koncentrace inokula ve sterilní vodě dosáhla hodnoty 0,5 McFarlandovy stupnice (1,5 × 10^{8} 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. Odchylky od tabelovaných hodnot MIC nebyly vyšší než jedno ředění použité při testování.

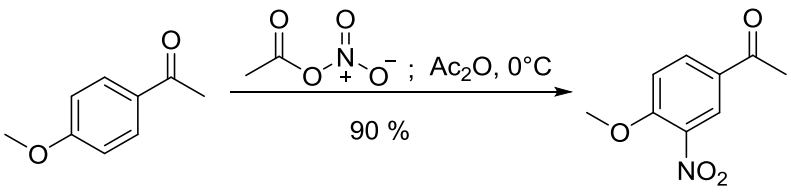
5.3 Provedení syntézy

5.3.1 Syntéza 3,4-diaryl-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onů

5.3.1.1 Příprava 1-(4-methoxy-3-nitrofenyl)ethanonu

Sumární vzorec: $C_9H_9NO_4$

Relativní molekulová hmotnost: 195,17



15

Do vyžíhané a argonem naplněné baňky (100 ml) se za chlazení v rozmezí -25°C až -20°C přenese Ac_2O (698,6 mmol; 66 ml) a HNO_3 (99,8 mmol; 6,91 ml) a směs se ponechá 10 minut míchat. Reakční směs se posléze ohřeje na -5°C a opatrně se přikapává 4´-methoxyacetofenon (49,9 mmol; 7,5 g) rozpuštěný v 2 ml chloroformu. Reakce se nechá míchat do té doby, dokud v celém objemu baňky reakční směs neztuhne (cca 2 hodiny). Poté se směs extrahuje mezi nasycený vodný roztok Na_2CO_3 (50 ml) a aceton (50 ml). Organická vrstva byla vysušena síranem sodným a rozpouštědla odpařena. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 85 : 15 → 1 : 1).

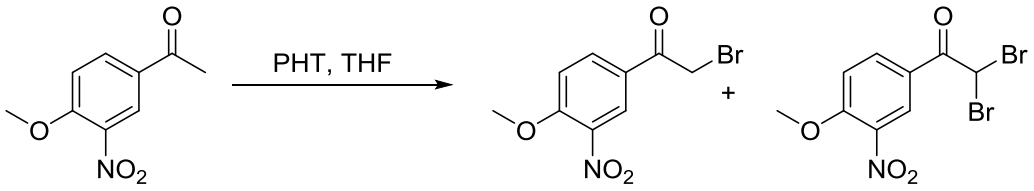
Výtěžek: 90 %, amorfní bílá látka, t.t. v literatuře[21] 97-99°C, **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.48 – 8.38 (m, 1H, ArH), 8.17 (ddd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 2.2 Hz, J_3 = 0.7 Hz, 1H, ArH), 7.16

(d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 4.04 (s, 3H, OCH_3), 2.60 (d, *J* = 0.7 Hz, 3H, $COCH_3$); **^{13}C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 194.78, 156.20, 139.23, 133.99, 129.58, 126.24, 113.28, 56.90, 26.34; **IČ** (ATR) ν_{max} 828, 1023, 1288, 1348, 1531, 1610, 1684, 2960, 3016 cm^{-1}.

5.3.1.2 Příprava 2-brom-1-(4-methoxy-3-nitrofenyl)ethanonu

Sumární vzorec: $C_9H_8BrNO_4$

Relativní molekulová hmotnost: 274,07



15 **16** (74 %) **17** (8 %)

Ke ketonu **15** (3,6 mmol; 0,703 g) rozpuštěnému ve 20 ml THF se přidá PHT (4,32 mmol; 1,536 g) v jedné dávce. Reakce se ponechá 20 minut míchat za laboratorní teploty. Reakční směs se poté přefiltruje přes vatu a THF se odpaří. Zbytek po odpaření se zředí etherem (20 ml) a extrahuje se nasyceným vodným roztokem NaCl v objemovém poměru 1:2. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 100 : 0 → 90 : 10).

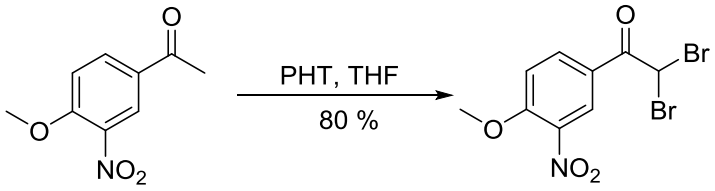
Výtěžek: 74 % **16**, světle žlutá amorfní látka, t.t. v literatuře[22] 95-96°C, **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.46 (d, 1H, ArH), 8.21 (dd, 1H, ArH), 7.20 (d, 1H, ArH), 4.40 (s, 2H, COCHBr), 4.07 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 188.45, 156.70, 139.40, 134.79, 126.78, 126.22, 113.55, 57.00, 29.78.

Výtěžek: 8 % **17**, světle žlutá amorfní látka, **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.61 (s, 1H, ArH), 8.41 – 8.35 (m, 1H, ArH), 7.24 – 7.16 (m, 1H, ArH), 6.56 (s, 1H, $COCHBr_2$), 4.06 (s, 3H, OCH_3); **^{13}C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 183.19, 157.00, 139.75, 135.83, 127.79, 122.84, 113.52, 57.09, 38.69.

5.3.1.3 Příprava 2,2-dibrom-1-(4-methoxy-3-nitrofenyl)ethanonu s 2 ekv. PHT

Sumární vzorec: $C_9H_7Br_2NO_4$

Relativní molekulová hmotnost: 352,97



15 **17**

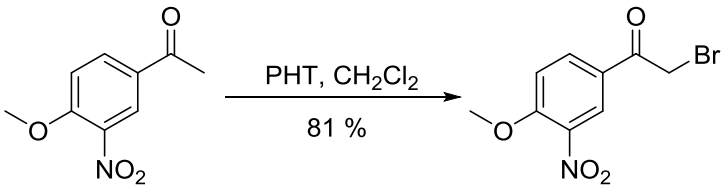
Ke ketonu **15** (5 mmol; 0,975 g) rozpuštěnému v 22 ml THF se přidá PHT (10 mmol; 3,553 g). Reakce se ponechá 2 hodiny míchat za laboratorní teploty. Reakční směs se poté přefiltruje přes vatu a THF se odpaří. Zbytek po odpaření se zředí etherem (20 ml) a extrahuje se nasyceným vodným roztokem NaCl v objemovém poměru 1:2. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 9 : 1→ 7 : 3).

Výtěžek: 80 %

5.3.1.4 Příprava 2-brom-1-(4-methoxy-3-nitrofenyl)ethanonu s 0,95 ekv. PHT

Sumární vzorec: $C_9H_8BrNO_4$

Relativní molekulová hmotnost: 274,07



15 **16**

Ke ketonu **15** (1,5 mmol; 0,293 g) rozpuštěnému v 10 ml CH_2Cl_2 se za míchání přidá PHT (1,425 mmol; 0,506 g). Reakce se ponechá 3,5 hodiny míchat za laboratorní teploty. Reakční směs se poté přefiltruje přes vatu a CH_2Cl_2 se odpaří. Zbytek po odpaření se zředí etherem

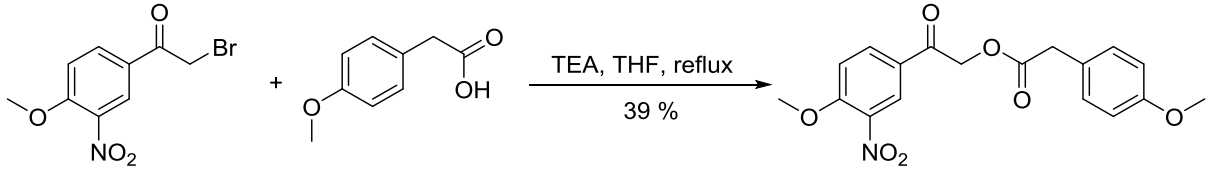
(10 ml) a extrahuje se nasyceným vodným roztokem NaCl v objemovém poměru 1:2. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (hexan : ethyl-acetát = 9 : 1).

Výtěžek: 81 %

5.3.1.5 Příprava 2-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2-oxoethyl-2-(4-methoxyfenyl)acetátu s TEA

Sumární vzorec: $C_{18}H_{17}NO_7$

Relativní molekulová hmotnost: 359,33



16 **18a** **19a**

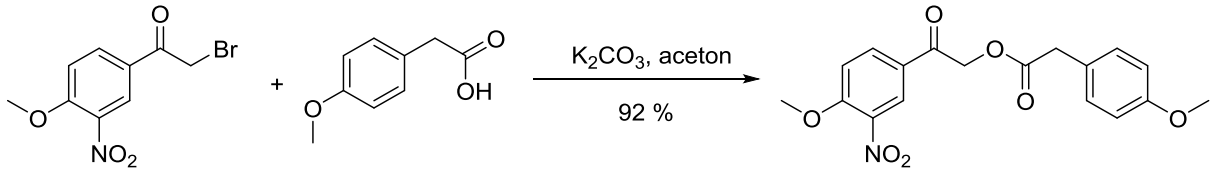
Pod atmosférou argonu se rozpustí keton **16** (7,04 mmol; 1,935 g) v 21 ml bezvodého THF. Poté se přidá kyselina **18a** (7 mmol; 1,163 g) a TEA (7 mmol; 1 ml). Reakce se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 4 hodin. Reakční směs byla poté extrahována nasyceným vodným roztokem $NaHCO_3$ (30 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a rozpouštědla odpařena. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 85 : 15 → 7 : 3).

Výtěžek: 39 %, žlutá amorfní látka, **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.36 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.07 (dd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.28 – 7.19 (m, 2H, ArH), 7.14 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH, 6.90 – 6.81 (m, 2H, ArH), 5.26 (s, 2H, $COCH_2O$), 4.03 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 2H, $PhCH_2CO$); **^{13}C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 189.42, 171.22, 158.77, 156.65, 139.30, 133.68, 130.35, 126.51, 125.68, 125.33, 114.00, 113.55, 65.99, 56.93, 55.21, 39.89; **IČ** (ATR) ν_{max} 827, 1030, 1154, 1170, 1255, 1347, 1424, 1517, 1531, 1613, 1688, 1700, 1738, 1752, 2936, 3077 cm^{-1}.

5.3.1.6 Příprava 2-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2-oxoethyl-2-(4-methoxyfenyl) acetátu s K_2CO_3

Sumární vzorec: $C_{18}H_{17}NO_7$

Relativní molekulová hmotnost: 359,33



16 **18a** **19a**

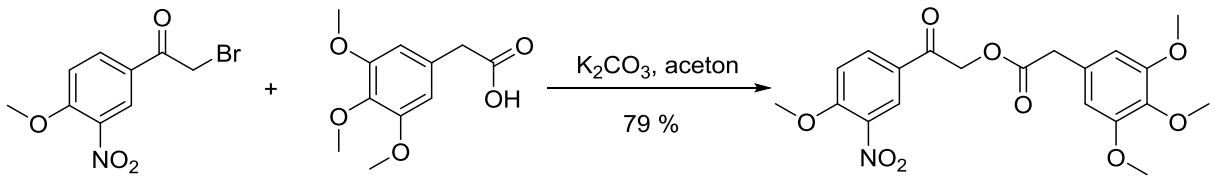
Do 20 ml acetonu se přidá K_2CO_3 (14 mmol; 2,483 g) a nechá se 10 minut míchat. Poté se ve stejné baňce rozpustí kyselina **18a** (3,08 mmol; 0,522 g) a znovu se ponechá 10 minut míchat. Po přidání ketonu **16** (2,8 mmol; 0,783 g) se reakce ponechá 120 hodin reagovat za laboratorní teploty. Reakce se extrahuje nasyceným vodným roztokem NH_4Cl (40 ml), vysuší se bezvodým síranem sodným, přefiltruje se a rozpouštědla se odpaří. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 8 : 2 → čistý ethyl-acetát).

Výtěžek: 92 %

5.3.1.7 Příprava 2-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2-oxoethyl-2-(3,4,5-trimethoxyfenyl) acetátu

Sumární vzorec: $C_{20}H_{21}NO_9$

Relativní molekulová hmotnost: 419,38



16 **18b** **19b**

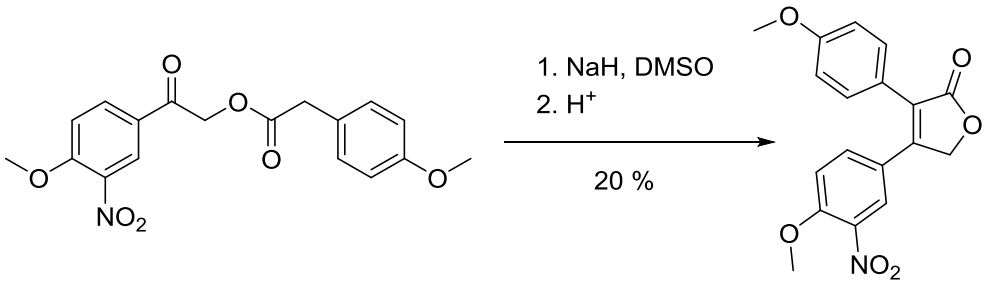
Do 10 ml acetonu se přidá K_2CO_3 (5,6 mmol; 0,854 g) a nechá se 10 minut míchat. Poté se přidá kyselina **18b** (1,23 mmol; 0,288 g) a znovu se ponechá 10 minut míchat. Po přidání ketonu **16** do reakční směsi (1,12 mmol; 0,188 g) se reakce míchá 72 hodin za laboratorní teploty. Reakční směs se extrahuje nasyceným vodným roztokem NH_4Cl (20 ml), vysuší se bezvodým síranem sodným, přefiltruje se a rozpouštědla se odpaří. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 8 : 2 → čistý ethyl-acetát).

Výtěžek: 79 %, žlutá amorfní látka, t.t. v literatuře[22] 114-115°C, **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.39 (d, J = 2,2 Hz, 1H, ArH), 8.07 (dd, J_1 = 8,8 Hz, J_2 = 2,2 Hz, 1H, ArH), 7.15 (d, J = 8,9 Hz, 1H, ArH), 6.57 (s, 2H, ArH), 5.30 (s, 2H, $COCH_2O$), 4.05 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 2H, $PhCH_2CO$); **^{13}C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 189.22, 170.88, 156.72, 153.23, 139.34, 137.06, 133.66, 128.84, 126.67, 126.28, 113.58, 106.28, 66.06, 60.94, 56.99, 56.20, 41.01; **IČ** (ATR) ν_{max} 861, 1015, 1076, 1128, 1240, 1290, 1506, 1538, 1582, 1614, 1705, 1750, 2942, 3011 cm^{-1}.

5.3.1.8 Příprava 3-(4-methoxyfenyl)-4-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu s NaH

Sumární vzorec: $C_{18}H_{15}NO_6$

Relativní molekulová hmotnost: 341,31



19a **20a**

Ve vyžíhané a argonem naplněné baňce se NaH (2,74 mmol; 0,06 g) suspenduje v 15 ml bezvodého DMSO. Ve druhé baňce se stejným způsobem rozpustí ester **19a** (2,62 mmol; 0,942 g) v 15 ml DMSO pod argonem a pomocí kanyly se přenese do první baňky. Reakce se ponechá 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté se reakční směs nalije do baňky s destilovanou vodou (50 ml) a okyselí se 3M HCl na pH 1, kdy se barva reakční směsi změní z tmavě modré až černé

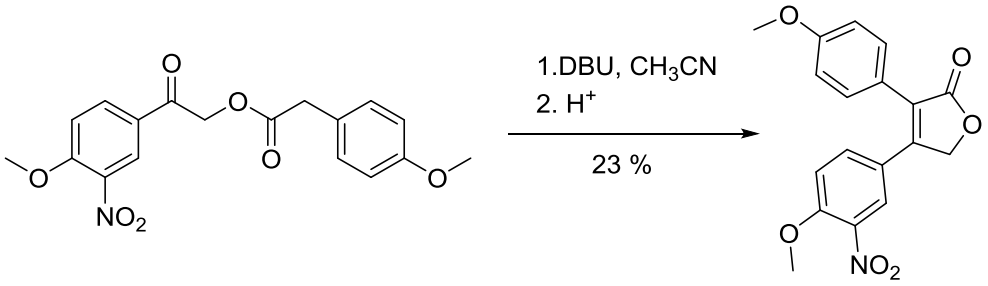
na žlutou. Směs se poté extrahuje mezi nasycený vodný roztok NaCl (60 ml) a ethyl-acetát (30 ml). Organická fáze je vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a rozpouštědla odpařena. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 9 : 1 → 75 : 25).

Výtěžek: 20 %, nažloutlá amorfní látka, **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.53 (dd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.40 – 7.31 (m, 2H, ArH), 7.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 6.97 – 6.89 (m, 2H, ArH), 5.14 (s, 2H, OCH_2), 3.98 (s, 3H, OCH_3), 3.83 (s, 3H, OCH_3); **^{13}C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 173.12, 160.26, 154.01, 151.41, 139.65, 133.23, 130.46, 126.42, 124.43, 123.39, 121.50, 114.44, 113.98, 70.05, 56.73, 55.28; **IČ** (ATR) ν_{max} 821, 837, 1017, 1028, 1155, 1252, 1279, 1297, 1348, 1515, 1530, 1609, 1618, 1749, 2928, 2959, 3012 cm^{-1}.

5.3.1.9 Příprava 3-(4-methoxyfenyl)-4-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu s DBU

Sumární vzorec: $C_{18}H_{15}NO_6$

Relativní molekulová hmotnost: 341,31



19a **20a**

Ve vyžíhané, argonem naplněné baňce se rozpustí ester **19a** (0,834 mmol; 300 mg) v 7 ml bezvodého acetonitrilu a teplota reakce se upraví na 0°C. Poté se po kapkách přidá DBU (1,25 mmol; 0,191 ml). Po 1 hodině míchání při laboratorní teplotě se reakce zahřeje na 50°C a po 72 hodinách při této teplotě se reakce nalije do baňky s destilovanou vodou (50 ml) a okyselí se 5% roztokem HCl do změny barvy reakční směsi z tmavě modré na žlutou. Reakce se extrahuje mezi ethyl-acetát (30 ml) a nasycený vodný roztok NaCl (60 ml), organická fáze se vysuší bezvodým síranem sodným a rozpouštědla se odpaří. Čistý produkt byl získán

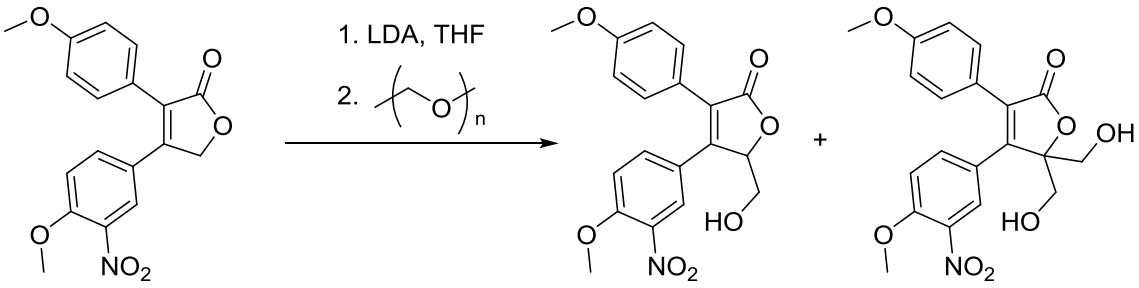
sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 9 : 1 → 75 : 25).

Výtěžek: 23 %

5.3.1.10 Příprava 3-(4-methoxyfenyl)-4-(4-methoxy-3-nitrofenyl)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onu

Sumární vzorec: $C_{20}H_{19}NO_8$

Relativní molekulová hmotnost: 401,37



20a **21a** (0 %) **22a** (20 %)

Lakton **20a** (0,492 mmnol, 0,168 g) se rozpustí v 2,5 ml bezvodéhoo THF pod atmosférou argonu, reakce se ochladí na -80°C a přidá se LDA (0,516 mmol; 0,344ml). Po ohřátí na 0°C se přidá paraformaldehyd (0,492 mmol; 0,027 g). Reakce se ponechá míchat po dobu 90 minut. Poté se reakční směs přefiltruje a THF se odpaří. Zbytek po odpaření se zředí ethyl-acetátem (20 ml) a organická fáze se dvakrát extrahuje s 5% vodným roztokem NaCl (40 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a rozpouštědla odpařena. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 7 : 3 → 3 : 7). Lakton **21a** se nám nepodařilo získat, místo něj jsme izolovali lakton **22a**.

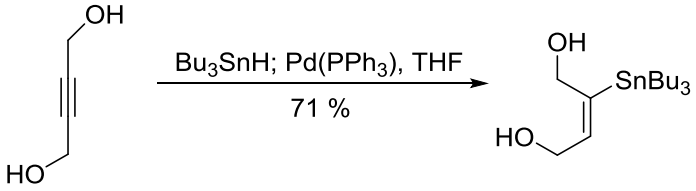
Výtěžek: 20 %, žlutá amorfní látka, **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.51 (dd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.28 – 7.22 (m, 2H, ArH), 6.77 – 6.71 (m, 2H, ArH), 4.42 (m, 2H, 2×OH), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.87 – 3.81 (m, 2H, 2×CHOH), 3.74 – 3.69 (m, 2H, 2×CHOH), 3.68 (s, 3H, OCH_3); **^{13}C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 171.29, 160.08, 156.09, 152.94, 140.28, 134.69, 130.72, 130.68, 125.36, 125.23, 122.51, 114.78, 113.75, 92.44, 61.48, 56.51, 54.86.

5.3.2 Vývoj alternativní syntézy kombretastatinů

5.3.2.1 Příprava (*E*)-2-(tributylstannyl)but-2-en-1,4-diolu

Sumární vzorec: $C_{16}H_{34}0_2Sn$

Relativní molekulová hmotnost: 377,15



24

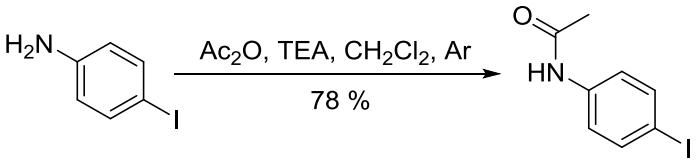
Ve vyžíhané a argonem naplněné baňce (50 ml) se v 20 ml bezvodého THF rozpustí but-2-yn-1,4-diol (10,0 mmol; 0,861 g). Za chlazení studenou vodní lázní se přidá $Pd(PPh_3)_4$ (0,01 mmol; 0,116 g). Poté se přikape tributylstannan (10,5 mmol; 2,83 ml). Reakční směs se po 20 minutách bez zpracování přenese na sloupec silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethylacetát = 85 : 15 → 1 : 1).

Výtěžek: 71 %, žlutá, skladováním tmavnoucí olejovitá kapalina, **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.79 (tt, J_1 = 5.9 Hz, J_2 = 2.1 Hz, 1H, vinylový CH), 4.42 – 4.32 (m, 2H, CH_2OH), 4.22 – 4.17 (m, 2H, CH_2OH), 1.78 (bs, 2H, 2×OH), 1.58 – 1.41 (m, 6H, 3×CH_2), 1.31 (m, 6H, 3×CH_2), 1.00 – 0.84 (m, 15H, 3×CH_2 + 3×CH_3); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 149.32, 138.02, 63.56, 59.83, 29.12, 27.36, 13.68, 10.04.

5.3.2.2 Příprava *N*-(4-jodfenyl)acetamidu

Sumární vzorec: C_8H_8INO

Relativní molekulová hmotnost: 261,06



25

Ve 20 ml bezvodého CH_2Cl_2 se pod atmosférou argonu rozpustí bezvodý acetanhydrid (16 mmol; 1,51 ml) a TEA (16 mmol; 2,23 ml). Poté se do reakce přidá 4-jodanilin (10 mmol;

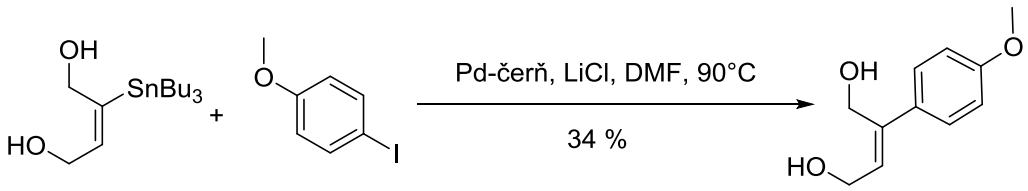
2,190 g) a nechá se míchat 14 hodin. Z reakční směsi se nejdříve odpaří CH_2Cl_2, zbytek reakční směsi se zředí etherem (20 ml) a třikrát se extrahuje 1,5 M vodným roztokem HCl (30 ml), vodné fáze se znovu extrahují s etherem (20 ml) a organické fáze se spojí. Poté se spojené organické fáze extrahují nasyceným vodným roztokem $NaHCO_3$ (50 ml) a následně s nasyceným vodným roztokem $Na_2S_2O_3$ (50 ml). Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 7 : 3 → 1 : 1).

Výtěžek: 78 %, nahnědlá amorfní látka, t.t. v literatuře[23] 185-186°C, **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.63 – 7.57 (m, 2H, ArH), 7.32 – 7.27 (m, 2H, ArH), 2.18 (s, 3H, $COCH_3$); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 168.27, 137.91, 137.60, 121.614, 87.44, 24.64; **IČ** (ATR) ν_{max} 830, 1308, 1371, 1483, 1529, 1580, 1598, 1665, 3045, 3287 cm^{-1}.

5.3.2.3 Příprava (*Z*)-2-(4-methoxyfenyl)but-2-en-1,4-diolu s LiCl

Sumární vzorec: $C_{11}H_{14}O_3$

Relativní molekulová hmotnost: 194,23



24 **26**

4-Jodanisol (5,71 mmol; 2,156 g) a diol **24** (8,565 mmol; 2,006 g) se pod argonem rozpustí v 12 ml bezvodého DMF. Poté se přidá LiCl (17,13 mmol; 0,723 g) a palladiová čerň (0,10 mmol; 0,012 g). Reakce se zahřívá na olejové lázni při teplotě 90°C po dobu 28 hodin. Reakční směs se zředí ethyl-acetátem (20 ml), extrahuje se nasyceným vodným roztokem NH_4Cl (40 ml) a vodná fáze se reextrahuje ethyl-acetátem (20 ml). Spojené organické fáze se extrahují třikrát 4% vodným roztokem NaF (30 ml) za vzniku sraženiny, která se odstraní filtrací. Organické fáze se spojí a rozpouštědla odpaří. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 3 : 7 → čistý ethyl-acetát).

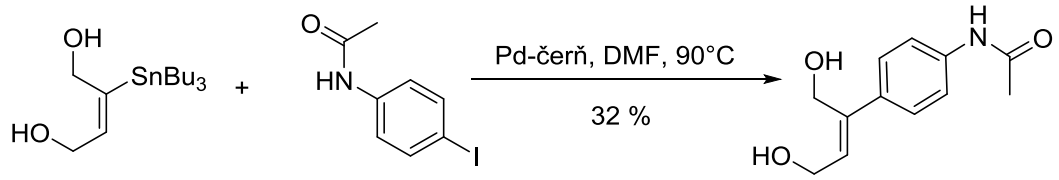
Výtěžek: 34 %, světle žlutá amorfní látka, t.t v literatuře[24] není uvedena, **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.41 – 7.35 (m, 2H, ArH), 6.89 – 6.84 (m, 2H, ArH), 6.03 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H,

vinylový CH), 4.53 (s, 2H, CH_2OH), 4.34 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2OH), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 2.58 (bs, 1H, OH), 2.53 (bs, 1H, OH); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 159.28, 142.14, 132.71, 128.05, 127.49, 113.91, 60.11, 58.83, 55.28; **IČ** (ATR) ν_{max} 870, 1029, 1050, 1188, 1247, 1292, 1558, 1632, 2958, 3036, 3278 cm^{-1}.

5.3.2.4. Příprava (*Z*)-*N*-[4-(1,4-dihydroxybut-2-en-2-yl)fenyl]acetamidu

Sumární vzorec: $C_{12}H_{15}NO_3$

Relativní molekulová hmotnost: 221,25



24 **25** **27**

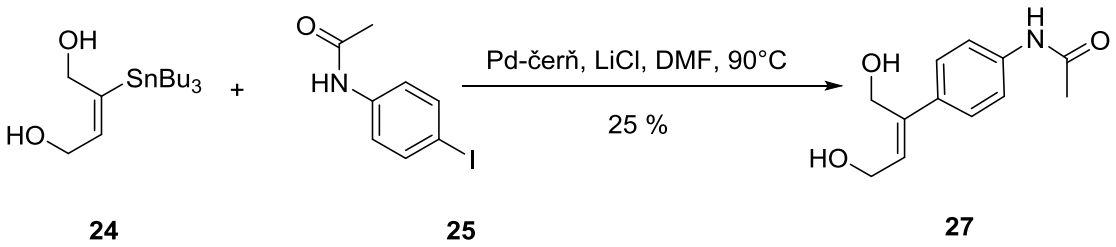
Acetamid **25** (1 mmol; 0,261 g) a diol **24** (1,5 mmol; 0,565 g) se rozpustí v 1,5 ml DMF. Poté se přidá palladiová čerň (0,02 mmol; 0,002 g). Reakce se zahřívá na olejové lázni při teplotě 90°C po dobu 17 hodin. Reakční směs se zředí ethyl-acetátem (10 ml) a extrahuje se nasyceným vodným roztokem NH_4Cl (20 ml), vodná fáze se opět extrahuje ethyl-acetátem (10 ml). Spojené organické fáze se extrahují třikrát 4% vodným roztokem NaF (20 ml) za vzniku sraženiny, která se odstraní filtrací a vodné fáze se opět extrahují ethyl-acetátem (10 ml). Organické fáze se spojí a rozpouštědla odpaří. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 1 : 1 → ethyl-acetát : metanol = 95 : 5).

Výtěžek: 32 %, světle žlutá amorfní látka, **^{1}H NMR** (500 MHz, aceton) δ 9.11 (s, 1H, NH), 7.63 – 7.54 (m, 2H, ArH), 7.45 – 7.38 (m, 2H, ArH), 5.98 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, vinylový CH), 4.47 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH_2OH), 4.34 (dd, J_1 = 6.4 Hz, J_2 = 5.2 Hz, 2H, CH_2OH), 3.78 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H, 2×OH), 2.06 (s, 3H, $COCH_3$); **^{13}C NMR** (126 MHz, aceton) δ 168.67, 141.06, 139.49, 137.14, 130.79, 127.40, 119.60, 59.82, 59.17, 24.22; **IČ** (ATR) ν_{max} 864, 997, 1034, 1371, 1541, 1600, 1654, 2957, 3036, 3179 cm^{-1}.

5.3.2.5 Příprava (*Z*)-*N*-[4-(1,4-dihydroxybut-2-en-2yl)fenyl]acetamidu s LiCl

Sumární vzorec: $C_{12}H_{15}NO_3$

Relativní molekulová hmotnost: 221,25



24 **25** **27**

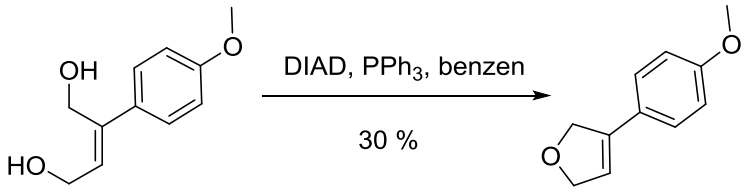
Acetamid **25** (1 mmol; 0,261 g) a diol **24** (1,8 mmol; 0,68 g) se pod argonem rozpustí v 12 ml bezvodého DMF. Poté se přidá bezvodý LiCl (5 mmol; 0,21 g) a palladiová čerň (0,02 mmol; 0,002 g). Reakce se zahřívá na olejové lázni při teplotě 90°C po dobu 28 hodin. Reakční směs se zředí ethyl-acetátem (10 ml) a extrahuje se nasyceným vodným roztokem NH_4Cl (20 ml), vodná fáze se opět extrahuje ethyl-acetátem (10 ml). Spojené organické fáze se extrahují třikrát 4% vodným roztokem NaF (20 ml) za vzniku sraženiny, která je odstraněna filtrací a vodné fáze se opět extrahují ethyl-acetátem (10ml). Organické fáze se spojí a rozpouštědla odpaří. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 1 : 1→ ethyl-acetát : metanol = 9 : 1).

Výtěžek: 25 %

5.3.2.6 Příprava 3-(4-methoxyfenyl)-2,5-dihydrofuranu

Sumární vzorec: $C_{11}H_{12}0_2$

Relativní molekulová hmotnost: 176,21



26 **33**

Reakce probíhá ve vyžíhaných baňkách pod atmosférou argonu. V první baňce se rozpustí DIAD (3,75 mmol; 0,88 ml) a PPh_3 (4,1 mmol; 1,096 g) v 3 ml bezvodého benzenu. Ve druhé baňce se rozpustí diol **26** (1,19 mmol; 0,232 g) v 10,5 ml bezvodého benzenu. Poté se obsah

první baňky přenese pomocí kanyly do druhé a reakční směs se zahřívá při 60°C po dobu 72 hodin a poté se bez zpracování přenese na sloupec silikagelu (gradientová eluce, hexan : ethyl-acetát = 95 : 5 → 75 : 25).

Výtěžek: 30 %, bílá amorfní látka, t.t v literatuře[25] není uvedena, **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.30 – 7.24 (m, 2H, ArH), 6.91 – 6.85 (m, 2H, ArH), 6.11 – 6.05 (m, 1H, vinylový CH), 5.01 – 4.94 (m, 2H, OCH_2), 4.86 – 4.80 (m, 2H, OCH_2), 3.82 (s, 3H, OCH_3); **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 159.35, 137.85, 126.97, 125.28, 118.22, 113.99, 76.77, 75.42, 55.27.

6. LITERATURA

1 Nečas, O. a kol., Obecná biologie pro lékařské fakulty, 3. přepracované vydání, H&H Vyšehradská, Jinočany, Česká republika, **2003**, kapitola E, 218-239, ISBN 80-86022-46-3.

2 Wall, M.E. et al., Plant antitumor agents, 3 Chapter:. A convenient separation of tannins from other plant constituens, *J. Pharm. Sci.*, **1969**, 58, 839, ISSN: 1347-8613.

3 Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. Anticancer agent from natural products; CRC Press, Taylor & Francis Group; Boca Raton, USA, **2005**, Ch. 3, 23-47, ISBN: 0-8493-1863-7.

4 European Medicines Agency http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/orphans/2011/04/human_orphan_000912.jsp&mid=WC0b01ac058001d12b, 7.5.2014.

5 Stránky Evropské komise, sekce veřejného zdraví http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/o853.htm, 7.5.2014.

6 Nguyen-Hai Nam; Yong Kim; Young-Jae You; Dong-Ho Hong; Hwan-Mook Kim and Byung-Zun Ahn, Combretoxazolones: Synthesis, Cytotoxicity and Antitumor Activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2001**, 11, 3073-3076, ISSN: 0960-894X.

7 Beale, T. M.; Allwood, D. M.; Bender, A.; Bond, P. J.; Brenton, J. D.; Charnock-Jones, D.; Stephen; L.; Steven V.; Myers, R. M.; Shearman, J. W.; Temple, Jill; et all. A-Ring Dihalogenation Increases the Cellular Activity of Combretastatin-Templated Tetrazoles, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 3(3), 177-181, ISSN: 1948-5875.

8 Lichun, S.; Vasilevich, N. I.; Fuselier, J. A. and Coy, D. H. Abilities of 3,4.Diarylfuran-2-ones Analogs of Combretastatin A-4 to Inhibit Both Proliferation of Tumor Cell Lines and Growth of Relevant Tumors in Nude Mice, *Anticancer reasearch* **2004**, 24, 179-186, ISSN: 1791-7530.

9 Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Salvador, M. K.; et all. Synthesis and Evaluation of 1,5-Disubstituted Tetrazoles as Rigid Analogues of Combretastatin A-4 with Potent Antiproliferative anf Antitumor Activity, *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 475-488, ISSN: 1520-4804.

10 Núria, M. B.; Chabot, G. G.; Quentin, L.; Scherman, D.; Bourg, S.; Dauzonne, D. *In vitro* and *in vivo* biological evaluation of new 4,5-disubstituted 1,2,3-triazoles as *cis*-

constrained analogs of combretastatin A4, *European journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 54, 22-32, ISSN: 0223-5234.

11 Negishi, E.-i.; et al., Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis, Vol 1, John Wiley and Sons, Inc., USA, **2002**, III.2.19, 943-973, ISBN 0-471-31506-0.

12 Bordwell F. G.; Garbish E. W. Jr. Nitrations with Acetyl Nitrate I. The Nature of Nitrating Agent and the Mechanism of reaction with simple Alkenes, *J. Org. Chem* ,**1959**, 82, 3588-3598, ISSN: 0022-3263.

13 Šenel, P. *Disertační práce* Studium vztahů struktura-antifugální aktivita u substituovaných butenolidů; UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2009**.

14 Horký, P. *Diplomová práce* Nové deriváty kombretastatinu, UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2013**.

15 Ensley, H. E.; Buescher, R. R.; Lee, K., Reaction of Organotin Hydrides with Acetylenic Alcohols *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 404-408, ISSN: 0022-3263.

16 Negishi, E.-i.; et al. Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis, Vol 1, John Wiley and Sons, Inc., USA, **2002**, IV.2.1.1, 1133-1179, ISBN 0-471-31506-0.

17 Negishi, E.-i.; Takahashi, T.; Akiyoshi, K. 'Bis(triphenylphosphine)palladium:' its generation, characterization, and reactions*; J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 1338-1339.

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

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

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

21 Aridoss, G.; Laali, K. K. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8088 – 8094, ISSN: 0022-3263.

22 Beltrami, L.; Busacca, S.; Genazzani, A. A.; Imovilli, D.; Massarotti, A.; Miglio, G.; Pagliai, F.; Pirali, T.; Sorba, G.; Tron, G. C.; Verotta, L. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 5372 – 5376, ISSN: 1520-4804.

23 Jin, J.; Lu, Ping; Mei, Y.; Wang, Y.; Wen, Q. *Eur. J. Org. Chem*, **2013**, 19, 4032 – 4036, ISSN: 1099-0690.

24 Imai, N.; Koyata, N.; Nagai, T.; Kawasaki, M.; Kirihara, M.; Noguchi, T. *Chem. Lett*., **2009**, *38*, 892 – 893, ISSN: 0366-7022.

25 Chang, M.-Y.; Lin, C.-Y.; Pai, C.-L. *Heterocycles*, **2006**, *68*, 1941 – 1948, ISSN: 0385-5414.