

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Koincidence antifungální a cytostatické aktivity
u derivátů koruskanonu A a analog přírodních laktonů**

Hradec Králové, 2010

Mgr. Lucie Tichotová

„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.“

Za odborné vedení a pomoc během celého studia a při vypracování této práce děkuji svému školiteli prof. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D.

Poděkování patří celému kolektivu naší pracovní skupiny, jmenovitě doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za měření NMR spekter, Mgr. O. Krenkovi, Mgr. E. Matoušové, Mgr. P. Šenelovi, Ph.D., Mgr. I. Šnajdrovi, Ph.D. a PharmDr. M. Špulákovi, Ph.D. za příjemné pracovní prostředí, cenné rady a udržování pozitivní nálady. Děkuji J. Mikuškovi za pomoc při syntézách.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Ivanu Votrubovi, DrSc. za jeho odborné rady v oblasti biologického hodnocení a za významnou pomoc při stanovení cytostatické aktivity, prof. RNDr. B. Melicharovi, Ph.D. za poskytnutí zázemí pro hodnocení cytostatické aktivity a doc. PharmDr. M. Nobilisovi, CSc. za pomoc při HPLC analýzách, dále S. Kopecké a N. Mazánkové za péči o buněčné linie a I. Dufkové za stanovení antifungální a antibakteriální aktivity.

Můj dík patří také pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie I. Vencovské a D. Cardové za měření IČ spekter a teplot tání a I. Astapenkové za pomoc při administrativní činnosti.

Za pomoc a rady při řešení administrativních záležitostí grantového úkolu děkuji Ing. M. Tmějové z Vědeckého oddělení.

Poděkování za finanční podporu patří grantovým agenturám (Grantová agentura Univerzity Karlovy – 98908/2008/B-CH/FaF, Grantová agentura ČR – 203/07/1302), grantu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV-2010-261-001).

Za všestrannou podporu děkuji svým rodičům.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Mgr. Lucie Tichotová

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

Název disertační práce: Koincidence antifungální a cytostatické aktivity u derivátů koruskanonu A a analogů přírodních laktonů

Tato disertační práce byla zaměřena na syntézu nových analogů přírodní antifungální látky, koruskanonu A, a jejich biologické hodnocení. Za tímto účelem byla vyvinuta katalytická verze Knoevenagelovy kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s aldehydy. Připravené deriváty byly hodnoceny z hlediska antifungální a cytostatické aktivity. Bylo zjištěno, že u většiny látek je antifungální aktivita provázena cytostatickým efektem vůči buněčné linii CCRF-CEM. Podrobnější zkoumání těchto arylidenanalogů vedlo ke zjištění, že za podmínek *in vitro* testování dochází k jejich rozkladu vodou. Proto byly následně syntetizovány stabilní deriváty odvozené od maleinimidu pomocí Mitsunobuovy reakce. Také u těchto látek se nepodařilo separovat antifungální a antiproliferační efekt. Významný je antifungální účinek *N*-2-indanylmaleinimidu proti kmenu *A. fumigatus*, zatímco *N*-benzylderivát vykazuje významný antiproliferační efekt vůči linii HT-29 ($IC_{50} = 0.6 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Dále byla hodnocena cytostatická aktivita analogů různých přírodních laktonů na relativně rezistentní linii HT-29. Některé šestičlenné laktony svou aktivitou předčily používaná antineoplastika a mohly by se stát předlohou pro vývoj protinádorových léčiv.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: Mgr. Lucie Tichotová

Supervisor: Prof. Milan Pour

Title of Doctoral Thesis: Coincidence of antifungal and cytostatic activity of coruscanone A derivatives and analogues of natural lactones

This Thesis was focused on the synthesis and biological evaluation of novel analogues of a natural antifungal compound, coruscanone A. For this purpose, a catalytic version of Knoevenagel condensation of cyclopent-4-ene-1,3-dione with aldehydes was developed. Evaluation of antifungal and cytostatic activity of the new derivatives revealed that antifungal activity of many compounds is accompanied by a cytostatic effect against certain tumour cell lines (CCRF-CEM). Subsequent examination of these arylidene analogues uncovered their decomposition in water medium under the conditions of *in vitro* testing. Therefore, stable analogues based on maleinimide were prepared by the Mitsunobu reaction. In these compounds, antifungal and antiproliferative effects occur simultaneously as well. *N*-2-indanylmaleinimide displayed the highest antifungal activity against *A. fumigatus*, while *N*-benzylmaleinimide had an excellent effect against HT-29 cells ($IC_{50} = 0.6 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Furthermore, cytostatic activity of various analogues of natural lactones was evaluated against the resistant colorectal carcinoma cell line HT-29. Since the *in vitro* activity of some 6-membered lactones exceeded that of clinically used antineoplastics, their structures could be used as potential leads in anticancer drug development.

OBSAH

ABSTRAKT.....	1
OBSAH.....	3
1. ÚVOD.....	6
1.1. Současně používaná antimykotika a perspektivní látky ve vývoji.....	7
1.1.1. Polyeny	7
1.1.2. Flucytosin.....	9
1.1.3. Azolová antimykotika.....	10
1.1.4. Echinokandiny a pneumokandiny.....	12
1.1.5. Allylaminová antimykotika	16
1.1.6. Griseofulvin	16
1.1.7. Nikkomyciny.....	16
1.1.8. Sordariny.....	17
1.1.9. Iko fungipen.....	17
1.1.10. Kationické peptidy.....	18
1.1.11. Další látky potenciálně využitelné v léčbě mykotických infekcí.....	18
1.2. Přírodní látky jako předlohy pro vývoj nových antimykotik	20
1.2.1. Příklady dalších antifungálně účinných látek přírodního původu	20
1.2.2. Inkrustoporin a jeho antifungálně účinná analoga	21
1.2.3. Koruskanon A a jeho strukturní modifikace.....	24
1.3. Antifungální versus cytostatická aktivita	26
2. CÍL PRÁCE.....	28
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM.....	30
3.1. Syntéza derivátů koruskanonu A se substituovaným fenylem na cyklopentendionovém kruhu a hodnocení jejich biologické aktivity	30
3.2. Možnosti syntézy jednoduchých analog 2-(3-fenylprop-2-enyliden)cyklopent-4-en-1,3-dionu	34

3.2.1.	Pokus o přípravu 2-[(2 <i>E</i>)- 3-fenyl-1-methoxyprop-2-enyliden]cyklopent-4-en-1,3-dionu.....	34
3.2.2.	Kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s karbonylovými sloučeninami	35
3.2.3.	Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s cinnamaldehydem – optimalizace podmínek.....	36
3.3.	Syntéza dalších derivátů koruskanonu A a hodnocení jejich antifungální a cytostatické účinnosti.....	40
3.3.1.	Syntéza a antifungální aktivita 2-benzylidencyklopent-4-en-1,3-dionu	40
3.3.2.	Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s <i>p</i> -substituovanými cinnamaldehydy a biologické hodnocení získaných derivátů	41
3.3.3.	Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu se substituovanými benzaldehydy a biologické hodnocení připravených derivátů	44
3.3.4.	Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s jinými typy aldehydů a biologická aktivita připravených látek.....	47
3.3.5.	Další strukturní modifikace aktivních derivátů koruskanonu A	50
3.4.	Knoevenagelova kondenzace dalších dionů s aldehydy a biologické hodnocení produktů	55
3.5.	Syntéza <i>N</i> -substituovaných maleinimidů a jejich biologické hodnocení.....	61
3.6.	Další biologická hodnocení.....	69
3.6.1.	Impedanční test: analýza buněčné proliferace v reálném čase	69
3.6.2.	Test indukce kaspas	73
3.6.3.	Sledování vlivu vybraných látek na buněčnou linii CCRF-CEM pomocí průtokové cytometrie.....	75
3.6.4.	Výsledky annexinového testu a jejich ověření.....	77
3.6.5.	Stabilitní analytická studie vybraných derivátů.....	82
3.6.6.	Srovnání biologických aktivit derivátu 11 a jeho rozkladných produktů	86
3.6.7.	Cytostatická aktivita specificky substituovaných pentenolidů	88
4.	ZÁVĚR.....	93
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	95

5.1.	Obecné experimentální postupy	95
5.2.	Syntéza	96
5.3.	Použité experimentální postupy při biologickém hodnocení	119
5.3.1.	Hodnocení antifungální aktivity	119
5.3.2.	Hodnocení antibakteriální aktivity.....	120
5.3.3.	Hodnocení cytostatické aktivity.....	121
5.3.4.	Analýza buněčné proliferace v reálném čase (xCELLigence test)	121
5.3.5.	Měření aktivity kaspas 3/7 a vyhodnocení buněčné viability	122
5.3.6.	Průtoková cytometrie	122
5.3.7.	Použité postupy při vyhodnocení stability látek za podmínek antifungálního testování <i>in vitro</i> pomocí HPLC-PDA.....	123
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	124
7.	LITERATURA	126

1. ÚVOD

Mykóza je onemocnění vyvolané houbami, plísněmi a kvasinkami. Mykózy se dělí na lokální a systémové^{*1,2}. Incidence a závažnost systémových mykotických infekcí se v posledních desetiletích významně zvyšuje. Příčinami jsou vedle zlepšení diagnostických postupů především pokroky v lékařské péči, které umožňují přežívání nemocných se závažnými a život ohrožujícími chorobami. Agresivní terapeutické přístupy k základním onemocněním vedou ke zvýšení počtu imunosuprimovaných jedinců v populaci. Vedle nemocných na jednotkách intenzivní péče a po transplantaci solidních orgánů jsou nejvíce ohroženi pacienti s nádorovými chorobami a zvláště s hematologickými malignitami^{3,4,5,6,7,8}. Mortalita a morbidita systémových mykóz je vysoká a jejich diagnóza i vlastní léčba je často obtížná^{9,10}. Nejběžnější patogeny způsobující většinu systémových mykóz jsou druhy *Candida*, *Aspergillus* a *Cryptococcus*. Narůstá ovšem počet infekcí způsobených dalšími kmeny hub jako *Fusarium*, *Scedosporium*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Acremonium* a zygomycety (*Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*). Tito méně běžní původci závažných onemocnění jsou často málo citliví nebo rezistentní k současně používaným léčivům^{5,6,7,10,11,12,13,14}. Vzhledem k tomu, že mykotické infekce jsou způsobené eukaryotickými organismy, jejich terapie je obtížnější než léčba bakteriálních infekcí¹⁵.

V posledních letech bylo dosaženo značného pokroku v léčbě systémových mykóz. Přispělo k tomu správnější používání běžných antimykotik ve spojení s moderními diagnostickými metodami, objasnění mechanismů vzniku rezistence některých druhů a v neposlední řadě zavedení nových látek do terapie^{16,17,18}. Potřeba vývoje nových antimykotik přesto neustále narůstá v důsledku rostoucího výskytu život ohrožujících systémových infekcí a vzhledem k časté rezistenci na dosud používaná antimykotika^{2,19,20}. Cílem je získat látky s nižší toxicitou, lepší farmakokinetikou, rozšířeným spektrem účinku a minimálním sklonem ke vzniku rezistence. Proto jsou důležité nejen modifikace známých struktur či obměny používaných lékových forem, ale především hledání nových látek s novým mechanismem účinku a také nové přístupy k terapii^{4,5,21}.

* Lokální mykózy patří mezi poměrně častá onemocnění napadající kůži a sliznice. Systémové infekce jsou vzácné, ale mnohdy život ohrožující, houby mohou napadat téměř kterýkoli orgán a vést k jeho významnému poškození.

1.1. Současně používaná antimykotika a perspektivní látky ve vývoji

Antifungální látky jsou sloučeniny inhibující růst patogenních hub nebo způsobující jejich uhynutí. Antimykotika jsou léčiva používaná k terapii mykóz. Podle mechanismu účinku se antimykotika dělí na specifická a nespecifická, podle způsobu aplikace na lokální a systémová. Mechanismus účinku specifických antimykotik je založen na rozdílech mezi fungální a lidskou buňkou. Za primární cíl působení antifungálních látek lze považovat buněčnou stěnu hub kvůli jejímu odlišnému složení (obsah chitinu). Protože v současnosti neexistuje žádný klinicky využívaný inhibitor syntézy chitinu, vývoji takových látek je věnováno značné úsilí¹⁵. Většina látek používaných v klinické praxi tak zasahuje do syntézy ergosterolu, který je důležitou součástí cytoplasmatické membrány hub a kvasinek²². V současné době jsou používány především tři hlavní skupiny léčiv, a to polyeny, azoly a allylaminy. Dále existují látky strukturně různorodé, které netvoří jednotnou skupinu léčiv, jako je flucytosin a griseofulvin. Řada nových látek jako nikkomyciny, sordariny a další je neustále ve vývoji¹⁵. Antifungálně účinné komplexy kovů jsou také v poslední době předmětem zájmu mnoha výzkumů^{15,23}.

Léčba život ohrožujících infekcí někdy vyžaduje podání kombinace různých antifungálních látek za účelem zvýšení účinnosti léčby synergickým efektem. V takovém případě je důležité také pořadí podávaných léčiv²⁴.

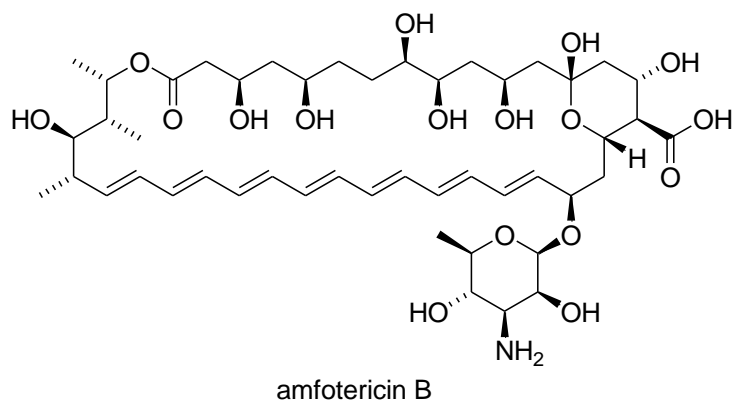
K lokální aplikaci se používají polyeny nystatin a natamycin, celá řada azolových antimykotik (klotrimazol, ekonazol, oxikonazol, sulkonazol, bifonazol, izokonazol), allylaminy naftifin a terbinafin, morfolinový derivát amorolfín a ciklopirox^{6,22,25}.

V následujícím oddílu bude pojednáno především o systémově podávaných antimykotických látkách, které slouží k terapii závažných systémových mykóz.

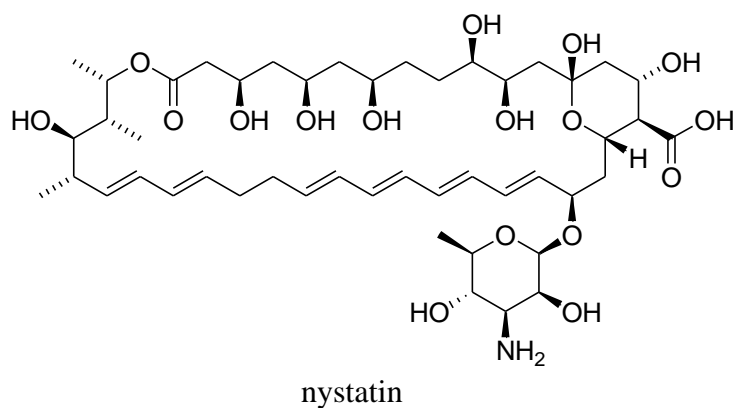
1.1.1. Polyeny

Amfotericin B je polyenové antibiotikum izolované ze *Streptomyces nodosus*. Jeho molekulu tvoří makrolidový skelet s konjugovanými dvojnými vazbami v jedné části cyklu a řadou hydroxylových skupin v části druhé. Ke skeletu je glykosidicky vázána molekula mykosaminu. Mechanismus fungicidního účinku amfotericinu B spočívá ve vazbě na ergosterol buněčné membrány hub s následným rozrušením její integrity.

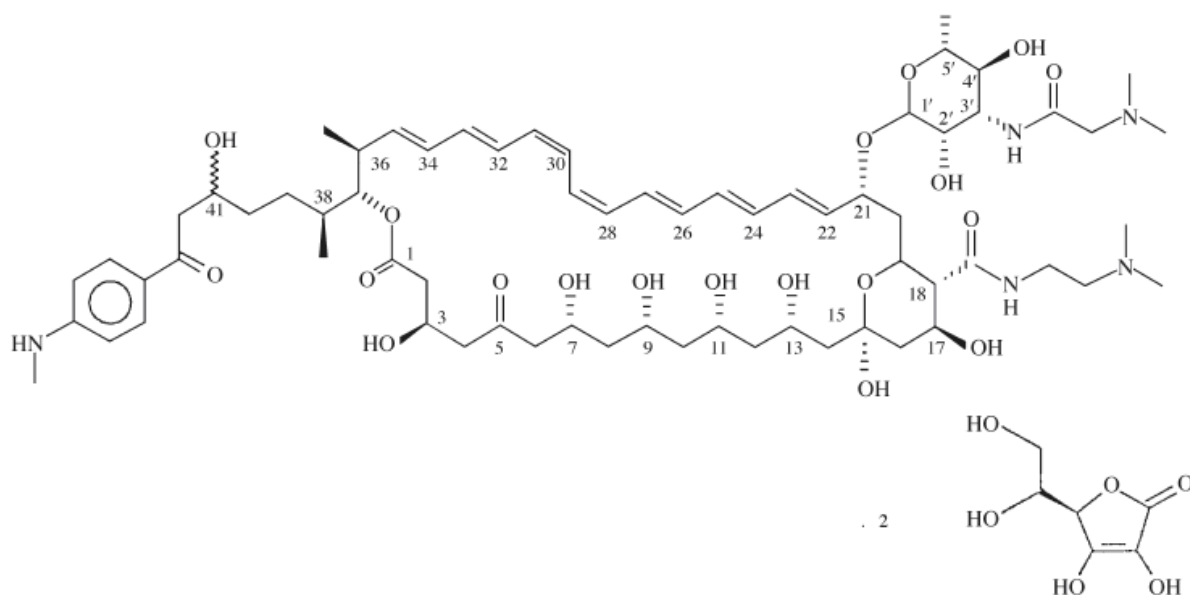
Spektrum jeho účinku je velmi široké, nevýhodné jsou však jeho farmakokinetické vlastnosti. Je prakticky nerozpustný ve vodě, po perorálním podání se nevstřebává a proto jej lze podat pouze parenterálně. Toxicita amfotericinu B souvisí s vysokou vazbou na membránové struktury (cholesterol), nejzávažnějším projevem je nefrotoxicita s následnou elektrolytovou dysbalancí^{1,22,26}. Přesto je amfotericin B lékem volby u většiny život ohrožujících mykotických infekcí. Vhodnou úpravou lékové formy bylo dosaženo poklesu jeho toxicity a v případě některých infekcí byla zvýšena účinnost. Na trhu je například řada léčivých přípravků obsahujících amfotericin B na lipidovém nosiči. V současnosti jsou v praxi používány přípravky AmBisome[®] (amfotericin B inkorporovaný do liposomů), Abelcet[®] (komplex amfotericinu B s fosfolipidy) a Amphocil[®] (komplex amfotericinu B s cholesterol-sulfátem)^{1,21,22,26}.



Úspěchy při používání liposomálních preparátů amfotericinu B se staly inspirací pro vývoj analogických přípravků strukturně podobného polyenu nystatinu^{6,27}. **Nystatin** (podobně jako natamycin) se vzhledem k vysoké toxicitě používá pouze lokálně, inkorporací jeho molekul do liposomů (přípravek Nyotran[®]) byly minimalizovány jeho toxické vlastnosti při zachování vysoké terapeutické účinnosti^{31,28,29}.



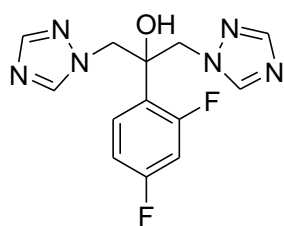
SPK-843 je nové polyenové antimykotikum rozpustné ve vodě. Tento heptaen je sůl (diaskorbát) derivátu partricinu A, SPA-S-752, produkovaného mutantním kmenem *Streptomyces aureofaciens*. Účinnost látky byla zkoumána na myším modelu plicní aspergilózy. SPK-843 vykazuje menší nefrotoxicitu a srovnatelnou nebo lepší aktivitu než amfotericin B i jeho lipozomální forma, je také účinnější než mikafungin (viz str. 13).³⁰ V současné době probíhají klinické studie této látky.



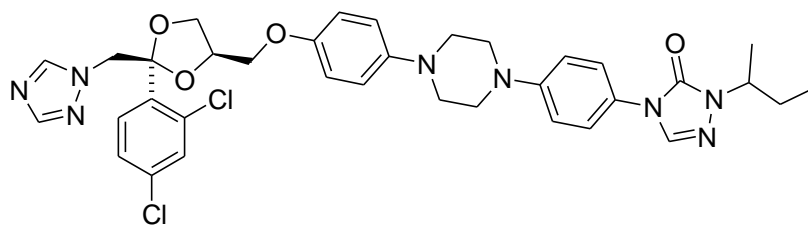
SPK-843

1.1.2. Flucytosin

Flucytosin (5-fluorcytosin) je fluorovaná pyrimidinová báze patřící mezi anti-metabolity. Je aktivně transportován do houbové buňky, kde je deaminován na vlastní účinnou látku, 5-fluoruracil, jejíž metabolity interagují se syntézou RNA a tím inhibují syntézu důležitých proteinů. V menší míře inhibuje flucytosin syntézu DNA i přímo, jako antagonistu cytosinu. Nežádoucí účinky (trombocytopenie, leukopenie) plynou z přeměny flucytosinu na toxický 5-fluoruracil, která probíhá zřejmě vlivem střevní mikroflóry. Nutnost intracelulární deaminace flucytosinu je příčinou úzkého spektra jeho účinku, blokáda této konverze vede k vysokému výskytu sekundární rezistence. Proto se podává výhradně v kombinaci s jinými antimykotiky. Významný je synergismus s amfotericinem B, tato kombinace se využívá při léčbě kryptokokové meningitidy a trichosporonózy^{1,26,31}.

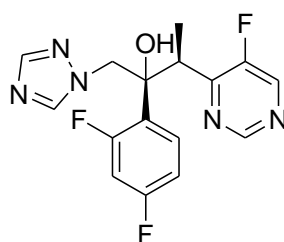


flukonazol

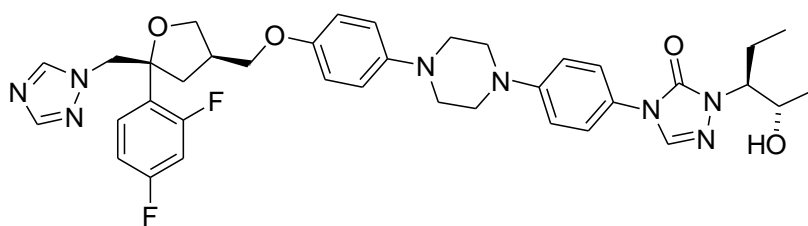


itrakonazol

Oba triazolové deriváty byly po svém zavedení široce využívány v terapii, což vedlo ke zjištění řady klinicky důležitých omezení a vzniku rezistence^{19,35}. Proto neustále probíhá vývoj nových azolových analog. Takzvaná „druhá generace“ triazolů zahrnuje řadu nových zástupců s lepší účinností a zvýšenou aktivitou vůči rezistentním patogenům^{19,35}. **Vorikonazol** (derivát flukonazolu) byl uveden na trh v roce 2002 jako lék proti akutní aspergilóze a kandidóze a proti méně obvyklým, ale závažným infekcím způsobeným patogeny *Scedosporium* a *Fusarium*^{5,27,36,37,38}. Vorikonazol je dostupný v orální i intravenózní formě a vyznačuje se výbornou biodostupností (proniká také do centrálního nervového systému)^{37,39}. Nežádoucí účinky provázející léčbu vorikonazolem jsou mírné reverzibilní zvýšení transaminas, poruchy vidění, nauzea a vyrážka^{39,40,41}. **Posakonazol** (analog itrakonazolu) byl zaveden do praxe (2005) k profylaxi a léčení systémových aspergilóz a kandidóz a je charakterizován velmi dobrou snášenlivostí a menším počtem lékových interakcí ve srovnání s ostatními triazolovými antimykotiky^{5,6,27,42}. Posakonazol je dostupný jen v orální formě^{43,44}. Látka je rovněž účinná proti mukormykóze, smrtelné infekci vyvolané zygomycetami⁴⁵. Je jediným antimykotikem, kromě amfotericinu B, využitelným v léčbě zygomykóz⁴⁶.



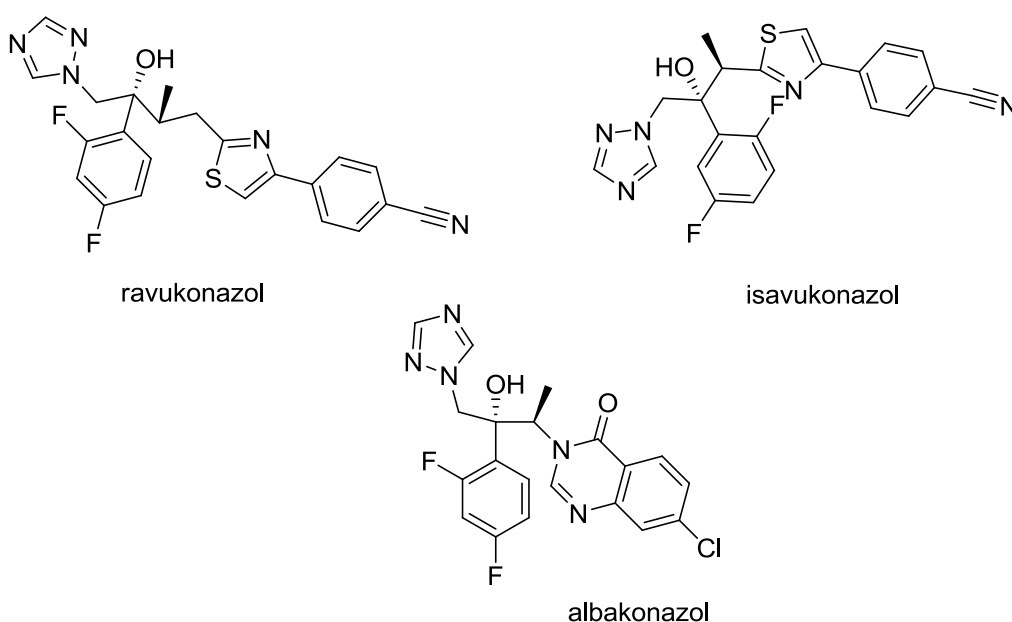
vorikonazol



posakonazol

Další zástupci azolových antimykotik jsou či byly předmětem různých klinických studií. **Ravukonazol** je *in vitro* vysoce aktivní proti řadě patogenů (*Candida*, *C. neoformans*, *Aspergillus*), včetně kmenu *C. albicans* rezistentního na flukonazol⁴⁷. Ve fázi II klinických studií byla porovnávána jeho účinnost s flukonazolem vůči esofageální kandidóze^{16,48}, studie byla v roce 2004 přerušena¹⁶. **Isavukonazol**

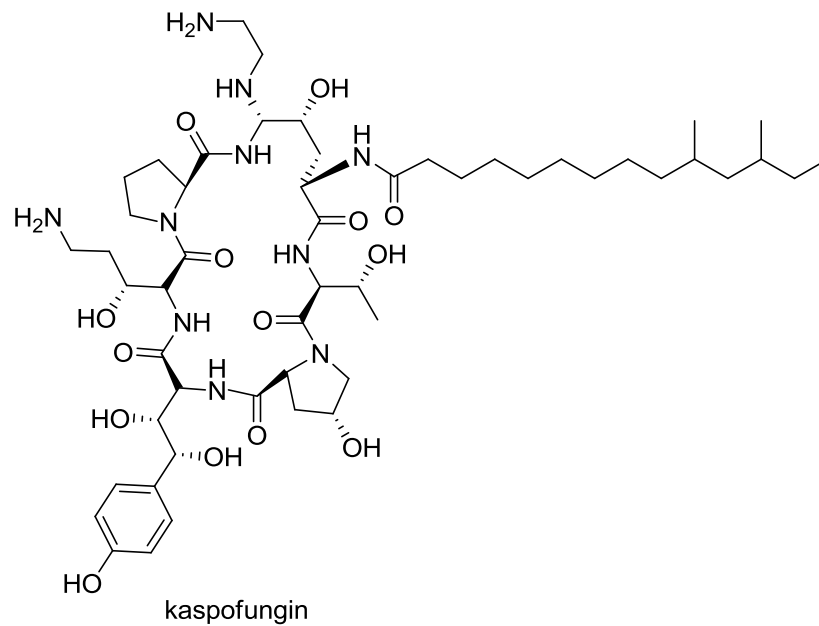
je v konečné fázi klinických studií zabývající se jeho účinností v léčbě systémových kandidóz, aspergilóz a infekcí způsobených patogeny třídy *Zygomycetes*^{48,49,50}. **Albakonazol** je další azolový derivát nacházející se v terminální fázi několika klinických studií. Z nich je například patrné, že účinnost albakonazolu v léčbě kandidózní vulvovaginitidy je ve srovnání s flukonazolem vyšší^{16,48}. Nízká toxicita albakonazolu pozorovaná po jeho podání myším a psům byla předběžně potvrzena také studií na lidech¹⁹. Profil toxicity těchto nových azolových antimykotik je podobný ostatním azolům^{16,19,51}.



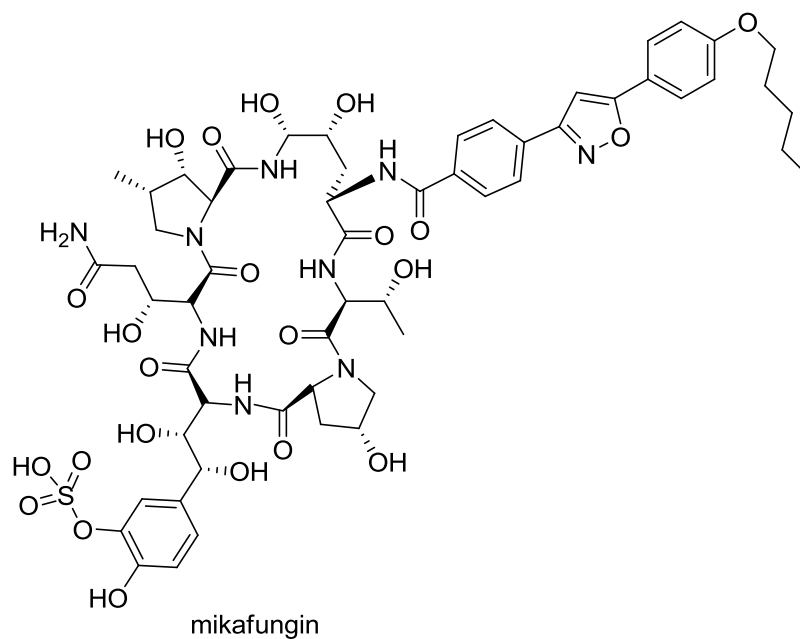
1.1.4. Echinokandiny a pneumokandiny

Echinokandiny jsou amfifilní lipopeptidy získané chemickou modifikací cyklopentaminu, který je tvořen fermentací některých kmenů hub (*Aspergillus nidulans*, *Zalerion arboricola*, *Coeloma empetri*)^{4,6,27}. Mechanismus účinku je odlišný od polyenů i azolů, spočívá v inhibici fungální β -1,3-glukansyntetasy, což vede k depleci glukanu v buněčné stěně, její osmotické nestabilitě a lýze houbové buňky^{1,5,6,26,52}. Účinek echinokandinů na plísně (*Aspergillus*) je fungistatický, fungicidně působí jen na kvasinky (*Candida*)^{1,31}. Cílový enzym, jež echinokandiny zasahují, není přítomen v savčích buňkách. Toxicita těchto látek je proto minimální^{31,53}. *C. neoformans* je vůči echinokandinům rezistentní⁴⁶.

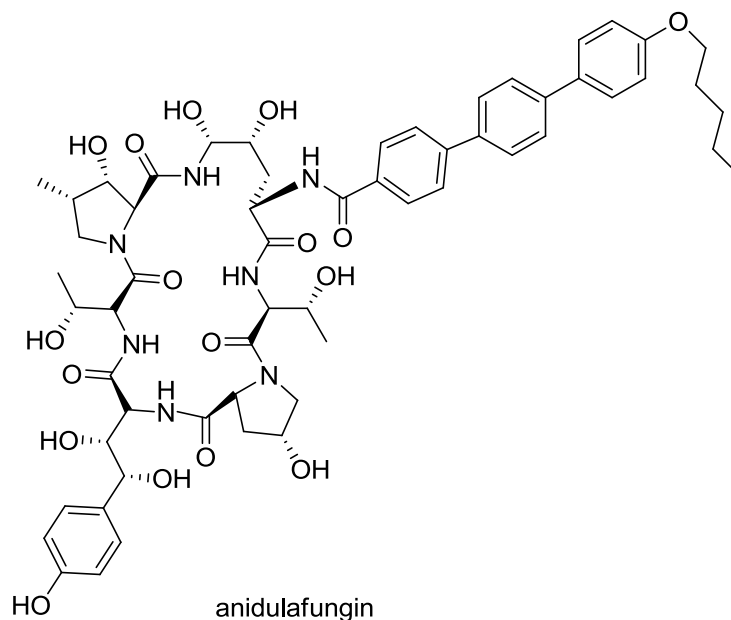
Kasprofungin, zavedený na trh v roce 2001 pro léčbu invazivních aspergilóz rezistentních vůči amfotericinu B a infekcí vyvolaných patogeny druhu *Candida*^{54,55}, je též *in vitro* účinný na patogeny *Pneumocystis carinii*, *Histoplasma capsulatum* a *Blastomyces dermatitidis*. Řada klinických experimentů ukázala, že hodnoty MIC (minimální inhibiční koncentrace) kasprofunginu určené na základě *in vitro* pokusů nekorelují s výsledky v léčbě (za podmínek *in vivo* experimentů je hodnota MIC vyšší)^{46,56}.



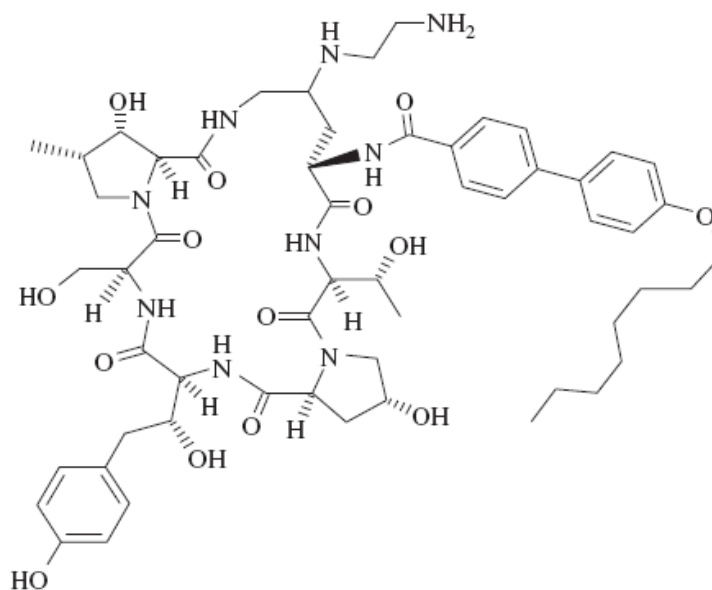
Mikafungin byl zaveden v roce 2005 jako léčivo pro profylaxi a léčení systémových infekcí způsobených druhu *Candida*^{46,57}. Jeho široké spektrum aktivity zahrnuje také patogenní druhy *Aspergillus*^{58,59}. Mikafungin je dobře snášen, ve srovnání s kasprofunginem vykazuje méně lékových interakcí^{46,60}.



Anidulafungin byl uveden do praxe v roce 2006 pro léčbu esofageální a systémové kandidózy^{46,61}. Má nejdelsí biologický poločas z používaných echinokandinů⁶². Vykazuje solidní *in vitro* aktivitu proti druhu *Aspergillus* (je účinnější než amfotericin B)⁴⁶.

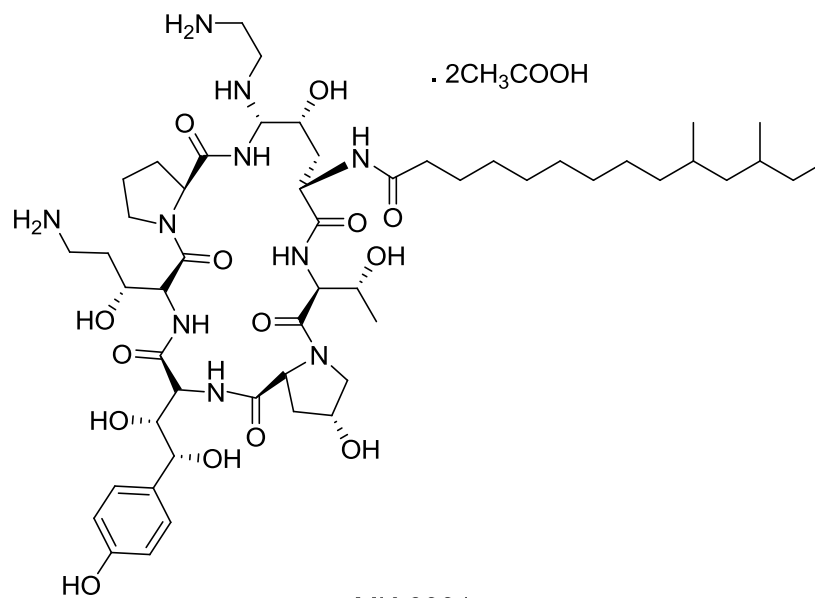


Posledním zástupcem je **aminokandin**, který je předmětem klinických studií^{2,19}. V *in vitro* pokusech s klinickými izoláty *C. glabrata* vykazuje aminokandin vyšší účinnost než kaspofungin⁶³, je účinný také proti druhu *Aspergillus* a mohl by se tak stát významným přírůstkem skupiny léčiv proti invazivním mykózám⁶⁴.



aminokandin

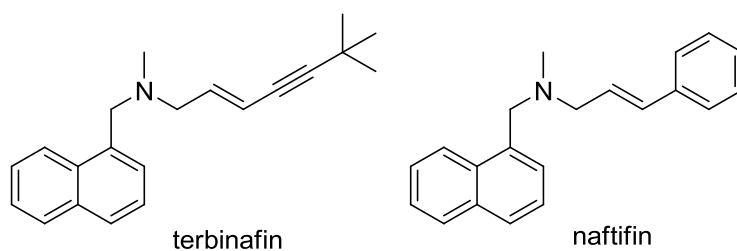
Pneumokandiny jsou cyklické hexapeptidy. Chemicky se jedná o polosyntetická analoga echinokandinů, inhibující β -1,3-glukansyntetasu. Jak naznačuje jejich název, jsou účinné nejen proti druhům *Candida* a *Aspergillus*, ale i proti *Pneumocystis carinii*^{31,53}. Jediný zástupce, **MK-0991**, vykazuje výbornou účinnost proti aspergilóze, kandidóze a histoplazmóze zvířat³¹.



MK-0991

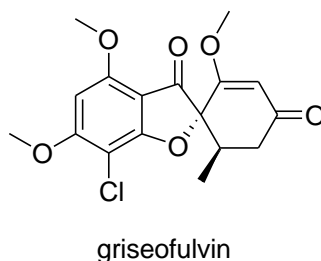
1.1.5. Allylaminová antimykotika

Jedná se o syntetické fungicidní látky, které blokují biosyntézu ergosterolu inhibicí skvalenepoxidasy. Používají se dva zástupci, **naftifin** pro lokální léčbu kožních infekcí způsobených dermatofyty a **terbinafin** podávaný systémově i lokálně při léčbě mykotických infekcí kůže či nehtů. Terbinafin působí fungicidně na širokou škálu patogenních hub a potencuje účinek triazolových antimykotik^{22,26,65}.



1.1.6. Griseofulvin

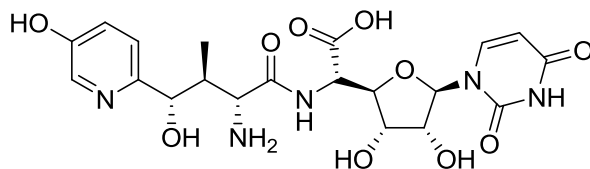
Jedná se o spirocyklické antibiotikum produkované mikromycetou *Penicillium griseofulvum*. Jeho spektrum účinku zahrnuje pouze dermatofyty, mechanismus spočívá v destrukci mitotického vřeténka v buňkách, čímž zabraňuje jejich dělení^{22,26}. V současnosti není v České republice registrován žádný léčivý přípravek s touto účinnou látkou.



1.1.7. Nikkomyciny

Tyto látky zasahují, podobně jako echinokandiny, do tvorby buněčné stěny hub. Jedná se o kompetitivní inhibitory enzymu chitinsyntetasy, zodpovědného za tvorbu chitinu (lineární polymer tvořený z β -1,4 propojených jednotek *N*-acetylglukosaminu), který je nezbytnou součástí buněčné stěny hub^{4,27,31}. **Nikkomycin Z** je zástupce, u kterého byla prokázána antifungální aktivita *in vitro* a *in vivo* proti dimorfním houbám,

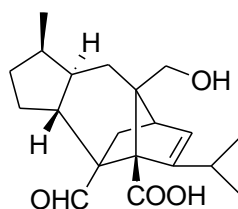
Candida immitis a *Blastomyces dermatitidis*, ale je pouze průměrně aktivní proti *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*^{27,31,53}. Synergismus účinku byl pozorován v kombinaci s azoly (flukonazol, itrakonazol) v *in vitro* pokusech^{27,31}.



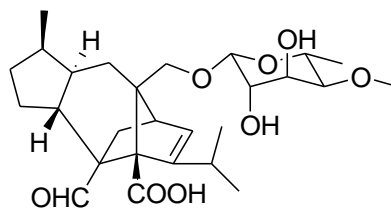
nikkomycin Z

1.1.8. Sordariny

Sordariny jsou nadějnou skupinou antifungálních látek s novým mechanismem účinku, který spočívá v inhibici syntézy proteinů v buňkách hub^{31,65}. Strukturálním základem sordarinů je tetracyklický diterpen sordaricin⁴. Ve stádiu vývoje se nachází řada derivátů s různými obměnami glykosidické části sordarinu, které jsou účinné *in vivo* proti druhům *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* a *Pneumocystis*^{65,66}. V kombinaci s amfotericinem, itrakonazolem nebo vorikonazolem byl pozorován synergický účinek proti *Scedosporium apiospermum*^{31,65}.



sordaricin

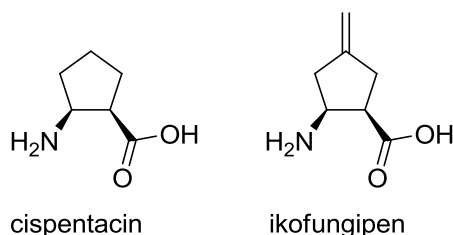


sordarin

1.1.9. Ikofungipen

Ikofungipen je derivát antifungálně aktivní β -aminokyseliny cispentacinu, jejímž mechanismem účinku je inhibice isoleucyl-tRNA syntetasy a z ní vyplývající inhibice syntézy proteinů⁶⁷. Ikofungipen je aktivní *in vitro* a *in vivo* proti kvasinkám a má příznivý farmakokinetický profil (dostupnost po perorálním podání, aktivní transport do buněk citlivých kmenů). Ačkoliv je spektrum účinku omezeno pouze na infekce vyvolané

kmeny druhu *Candida*, látka je nadějí na rozšíření spektra antimykotik používaných při léčbě těchto invazivních kandidóz^{6,68}.



1.1.10. Kationické peptidy

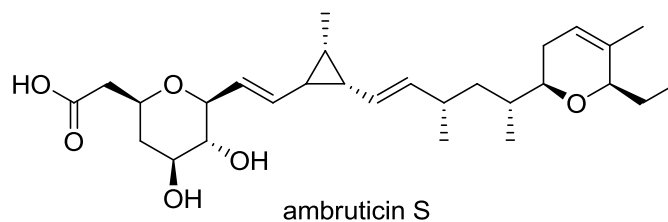
Kationické peptidy, ať přírodní nebo syntetické, jsou látky vázající se na ergosterol nebo cholesterol buněčných membrán hub, což vede k lýze buňky^{31,53}. Existuje celá řada těchto peptidů aktivních proti *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *C. neoformans* a *Fusarium* sp.^{31,65}. Jde například o **dermaseptin**, **indolicin**, **defenziny**, **cekropiny** a **histatiny**^{53,65}. Z asi 50 histatinů vykazuje nejvyšší aktivitu proti *C. albicans* **histatin 5**⁶⁹. Fungicidní účinek proti *C. neoformans* vykazuje syntetický **dolastatin 10**, který působí na intracelulární tubulin³¹. Dalším zástupcem je **katelicidin**, jehož účinek zahrnuje *C. albicans* a *C. neoformans*, látka je ale neaktivní vůči vláknitým houbám⁷⁰.

1.1.11. Další látky potenciálně využitelné v léčbě mykotických infekcí

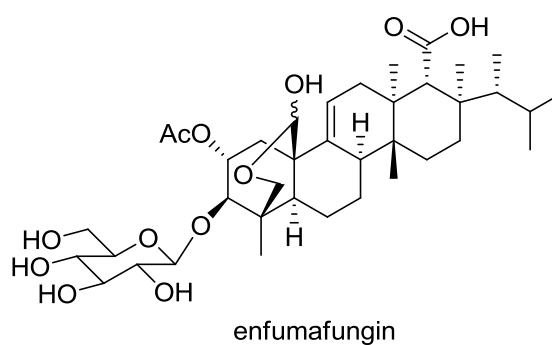
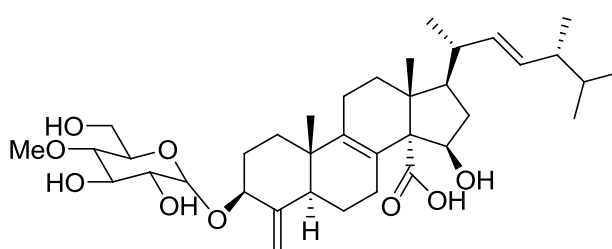
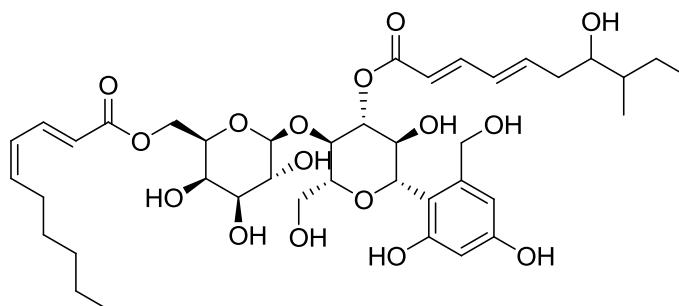
Arylamidin **T-2307** je předmětem preklinických *in vitro* a *in vivo* studií, které naznačují jeho potenciál v léčbě kandidóz, kryptokokóz a aspergilóz. Mechanismus účinku nebyl dosud objasněn, ale je pravděpodobně spojen s funkcí mitochondrií ve fungálních buňkách^{68,71}.

Pyridobenzimidazol **75-4590** je specifický inhibitor β -1,6-glukansyntetasy. Vykazuje *in vitro* aktivitu proti druhu *Candida*^{68,72}.

Ambruticiny jsou antifungálně aktivní látky, jejichž struktura obsahuje jednu cyklopropylovou a dvě pyranové jednotky. Jejich mechanismem účinku je interference s osmoregulačním systémem. Efektivita analog ambruticinu např. **KOSN-2079** byla prokázána na myším modelu kokcidiomykózy a aspergilózy^{68,73}.



Disacharid **korynekandin** vykazuje *in vitro* dobrou aktivitu proti *C.albicans* (MIC 0.98 $\mu\text{g/ml}$)⁷⁴. Patří do skupiny látek inhibujících syntézu glukanu. Další dva zástupci se stejným mechanismem účinku jsou látky se steroidní strukturou. **Askosterosid** je velmi dobře účinný *in vitro* a *in vivo* proti některým kmenům *Candida* (MIC 0.03 – 64 $\mu\text{g/ml}$)^{74,75}. **Enfumafungin** se *in vitro* aktivitou proti *Candida* sp. vyrovná kaspofunginu, proti *Aspergillus fumigatus* je dokonce významně aktivnější (0.03 $\mu\text{g/ml}$)^{52,76}.



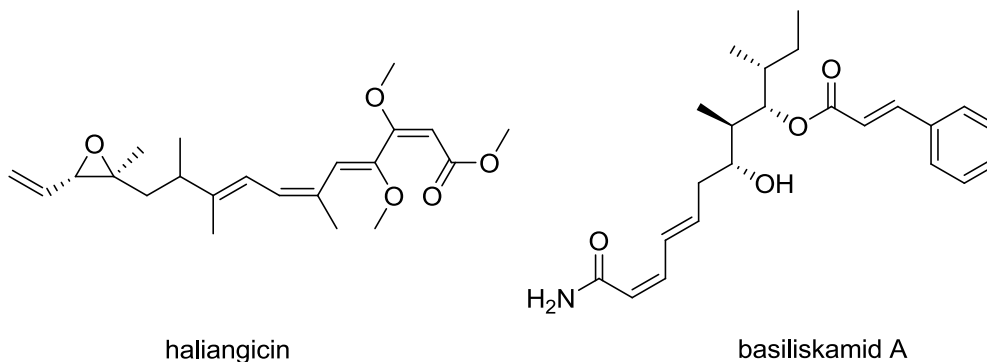
1.2. Přírodní látky jako předlohy pro vývoj nových antimykotik

Příroda je unikátním zdrojem různých biologicky aktivních molekul, jejichž struktura byla optimalizována v průběhu evoluce. Ačkoli význam biosyntézy některých nízkomolekulárních přírodních látek není vždy zcela jasný, zdá se, že mnoho těchto struktur získalo schopnost selektivní vazby na proteiny se strategickými funkcemi pro živé organismy. Každá látka schopná selektivně se vázat a následně aktivovat či inhibovat tyto klíčové proteiny nebo významné enzymatické dráhy je potenciálním léčivem. Přírodní látky mají různé vlastnosti, funkce a účinky, díky nimž se stávají prototypy nových léčiv⁷⁷. Téměř všechny antifungální látky uvedené v kapitole 1.1. jsou přírodního původu, včetně amfotericinu B, „zlatého standardu“ spektra antifungálních látek⁷⁸.

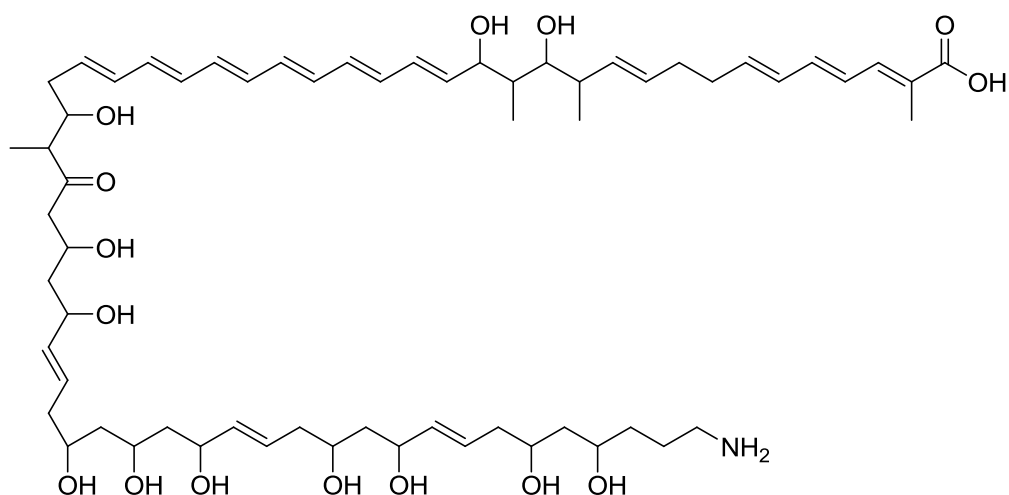
1.2.1. Příklady dalších antifungálně účinných látek přírodního původu

Haliangicin je látka izolovaná z myxobakterie *Haliangium luteum*. Je aktivní proti vláknitým houbám (MIC 6.3 - 12.5 µg/ml), působí jako specifický inhibitor elektronového transportu v dýchacím řetězci⁷⁹.

Basiliskamid A je antifungálně aktivní metabolit izolovaný z *Bacillus* PNG-276. Vykazuje antifungální aktivitu proti *Candida albicans* srovnatelnou s amfotericinem B, jeho cytotoxicita je ve srovnání s tímto léčivem nižší⁸⁰.

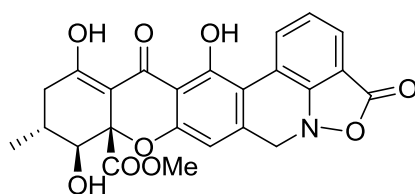


Mediomyciny A, B a klethramycin byly izolovány ze *Streptomyces mediocidius*. Strukturně je lze zařadit mezi polyeny. Mediomycin B má zajímavou antifungální aktivitu proti druhu *Candida*, která je *in vitro* srovnatelná s amfotericinem B⁸¹.



mediomycin B

Parnafungin A, B, C, D byly izolovány z nových kmenů hub MF 7022 a MF 7023 (*Cosmopora* sp.). Jejich struktura obsahuje isoxazolidinon a xanthonový kruh. Tyto látky mají unikátní mechanismus účinku, který spočívá v inhibici štěpení a polyadenylace mRNA hub, spektrum jejich účinku zahrnuje druhy *Candida*, *Cryptococcus* a *Aspergillus*. V *in vivo* pokusech nevykazují pozorovatelnou toxicitu. Isoxazolidinonový kruh je zodpovědný za antifungální aktivitu (MIC 0.03-32 µg/ml), která se po jeho otevření ztratí. Další výzkum těchto látek a jejich analog by mohl vést k vývoji antifungálních látek zasahujících fungální buňky na úrovni RNA^{15,82}.

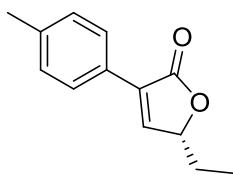


parnafungin A

1.2.2. Inkrustoporin a jeho antifungálně účinná analoga

Butenolid s antifungálními účinky, nazvaný inkrustoporin, byl izolován v roce 1995 z basidiomycety *Incrustoporia carneola*. Molekula inkrustoporinu obsahuje pětičlenný furanonový kruh s endocyklickou dvojnou vazbou konjugovanou s karbonylovou skupinou, aromatický substituent (*p*-tolyl) v poloze 3 a v poloze 5 ethylový zbytek. Inkrustoporin byl testován *in vitro* na antifungální, antibakteriální a cytotoxickou aktivitu.

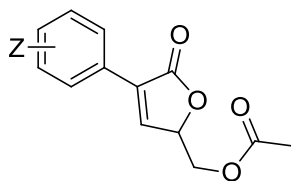
Výsledky biologického hodnocení prokázaly určitou antifungální aktivitu proti rostlinným patogenům a slabý cytotoxický účinek^{83,84}.



(-)-inkrustoporin

Naše skupina provedla v předchozích letech rozsáhlé syntetické studie na molekule inkrustoporinu s cílem připravit deriváty aktivní proti lidským patogenům a zjistit podrobnější vztahy mezi jejich strukturou a antifungálním účinkem. Dospěli jsme k 3,5-disubstituovaným furanonům, konkrétně 3-(halogenfenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onům **1a** a **1b**, jejichž *in vitro* aktivita je srovnatelná se standardy používaných antimykotik (Tabulka 1)^{85,86,87,88}. V případě derivátu **1a** byla zjištěna také průměrná aktivita⁸⁹ proti buňkám lidské akutní lymfoblastické leukémie (CCRF-CEM T lymfoblastové buňky) : $IC_{50} = 4.8 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tabulka 1. Porovnání *in vitro* antifungální aktivity (IC_{80} [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]) 3-(halogenfenyl)-5-acetyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onů **1a**, **1b** a flukonazolu a aktivity (IC_{95} [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]) amfotericinu B (hodnoty MIC byly stanoveny po 48 hod)



1a: Z = 4-Br
1b: Z = 3,4-Cl₂

	<i>Candida albicans</i> ATCC44859	<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> 231
1a	1.95	3.91
1b	3.91	7.81
FLU	2	>50
AmB	0.06	0.23

Dalším zkoumáním látek s acetoxymethylem v poloze 5 furanonového kruhu jsme zjistili, že za podmínek *in vitro* testování dochází k eliminaci esterové skupiny (Schéma 1). Estery **1a** a **1b** jsou jen prekurzory, vlastní účinné látky jsou butenolidy **2a** a **2b** vzniklé eliminací⁹⁰. Aktivity uvedené v tabulce 1 odpovídají antifungální aktivitě těchto butenolidů. Strukturní podobnost získaných γ -methylenlaktonů **2a** a **2b** s antifungálně aktivním sekundárním metabolitem protoanemoninem je zřejmá⁹¹.

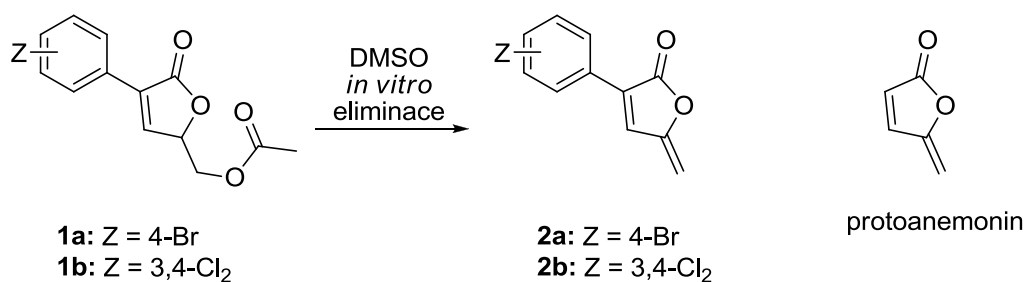


Schéma 1

Zjištění, že furanon **2a** je antifungálně vysoce účinná látka, vedlo k přípravě 5-alkylidenderivátů a studiu jejich antifungálního účinku (Schéma 2)⁹². Ze získaných výsledků bylo zřejmé, že další substituce exocyklické dvojně vazby látky **2a** vedla k antifungálně neaktivním látkám, pouze u alkoholu (R = CH₂OH) byla aktivita zachována⁹⁰. Zájem o tyto γ -alkylidenbutenolidy nás přivedl ke strukturně podobnému 2-alkylidencyklopent-4-en-1,3-dionu, koruskanonu A (viz dále).

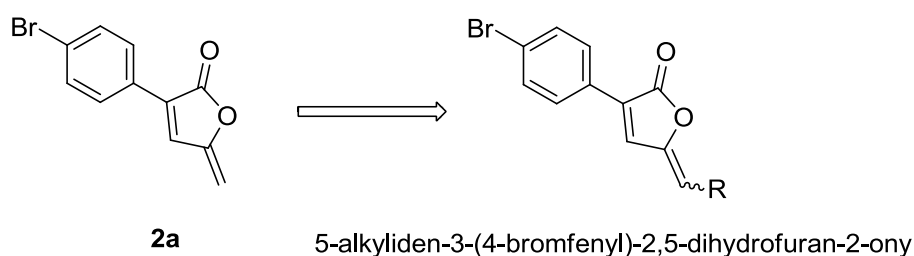


Schéma 2

Možnost převést námi syntetizované γ -alkylidenbutenolidy bazicky katalyzovaným přesmykem na deriváty cyklopent-4-en-1,3-dionu podobné koruskanonu A, naznačuje možnou souvislost mezi mechanismy účinku obou typů látek (Schéma 3).

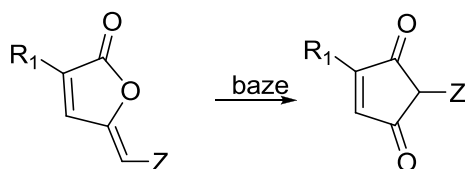
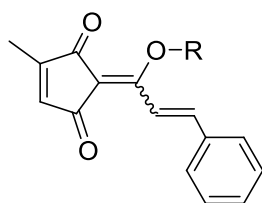


Schéma 3

1.2.3. Koruskanon A a jeho strukturní modifikace

V roce 2004 byly z peruánské rostliny *Piper coruscans* izolovány dva cyklopentendionové deriváty, koruskanon A a B⁹³. Molekula koruskanonu A je tvořena 4-methyl-2-methoxymethylencyklopent-4-en-1,3-dionovým skeletem, k jehož methylen v poloze 2 je kromě methoxylylu připojen i styrylový postranní řetězec. Exocyklická dvojná vazba v poloze 2 cyklopentendionového kruhu umožňuje koexistenci dvou izomerů v roztoku. Koruskanon A vykazuje antifungální aktivitu proti patogenům *C. albicans* a *C. neoformans* srovnatelnou *in vitro* s amfotericinem B a flukonazolem. Proti bakteriálnímu kmenu *S. aureus* byla zjištěna nulová účinnost. Dále tato molekula vykazuje cytostatickou aktivitu na buňkách *Vero* (kontinuální buněčná linie savčího původu). Demetylovaný 4-methyl-2-(3-fenyl-1-hydroxyprop-2-enyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion, koruskanon B, není antifungálně účinný^{93,94}.



koruskanon A: R = Me
koruskanon B: R = H

Pracovní skupina A. M. Clark rozdělila molekulu koruskanonu A na tři strukturní části, jejichž obměnami se intenzivně zabývala (Schéma 4). První částí je cyklopentendionový kruh s methylem v poloze 4. Byla provedena záměna methylu v poloze 4 objemnějším fenylem. Následovala syntéza symetrických derivátů se dvěma methylovými skupinami v polohách 4 a 5 cyklopentendionu. Závěrem těchto obměn bylo tvrzení, že methylový substituent na cyklopentendionovém kruhu je pro antifungální aktivitu nepostradatelný, jelikož ostatní deriváty byly neaktivní⁹⁴.

Další strukturní částí koruskanonu A nabízející se k obměně je enolická methoxyskupina. Její podstatná role pro antifungální účinnost koruskanonu A je zřejmá, neboť demetylovaný prekurzor (koruskanon B) není antifungálně aktivní⁹³. Proto byla tato enolická hydroxyskupina ethylována a acylována a u řady derivátů ponechána bez substituce za současné strukturní obměny jiné části molekuly. Téměř všechny deriváty s volnou hydroxyskupinou byly neaktivní, různě *O*-substituované deriváty byly

neaktivní nebo méně aktivní než koruskanon A (*O*-ethyl, *O*-acetyl). *O*-methyl tak zůstal optimální funkční skupinou pro antifungální účinnost molekuly⁹⁴.

Třetí skupina strukturních modifikací se týkala styrylového postranního řetězce. Substituce koncového fenylu v *p*-poloze vedla k látkám s aktivitou jen o něco menší než vykazuje koruskanon A. Sloučeniny mající pětičlenný heteroaromatický cyklus (furan, thiofen) místo benzenového kruhu také vykazovaly významné antifungální účinky, v případě kmenu *A. fumigatus* dokonce vyšší než koruskanon A. Pokud byla styrylová část zcela nahrazena fenylovou nebo methylovou skupinou, aktivita významně poklesla (náhrada fenylem) nebo úplně vymizela (náhrada methylem). Tato zjištění vedla k závěru, že pro antifungální efekt molekuly je důležitý styrylový postranní řetězec nebo analogické funkční seskupení⁹⁴.

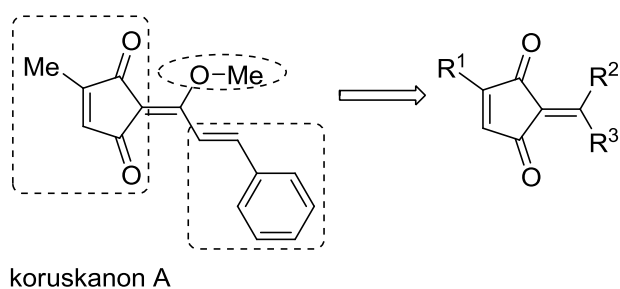
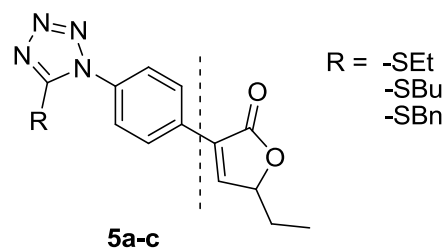


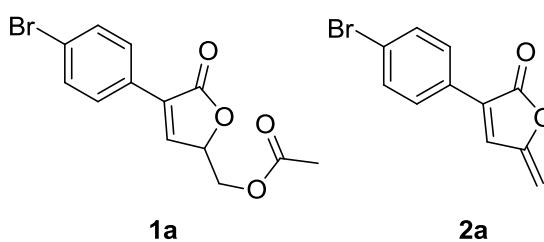
Schéma 4

Poslední modifikací byla syntéza strukturně blízkého analoga 2-methoxy-5-methyl-3-styryl-1,4-benzochinonu. Také tento derivát byl neaktivní, ačkoli je známo, že některé 1,4-benzochinony mají dobrou antifungální aktivitu⁹⁵.

Je zajímavé, že koruskanonu A se podobají další přírodní látky se význačnými biologickými účinky. Jedná se methyllinderon a methyllucidon, látky izolované z extraktu plodů *Lindera erythrocarpa* Makino (Lauraceae), používané v tradiční medicíně pro řadu příznivých účinků (analgetické, digestivní, diuretické, antibakteriální)⁹⁶. Methyllinderon je mírný inhibitor lidského enzymu chymasy (serinová proteasa skladovaná v sekrečních granulech žírných buněk, řada studií poukazuje na její souvislost s kardiovaskulárními onemocněními)⁹⁷. Methyllucidon, izolovaný jako směs *cis*-/*trans*- izomerů, se od molekuly koruskanonu A liší pouhou přítomností methoxyskupiny místo methylu na cyklopentendionovém kruhu. Tato látka indukuje apoptózu buněk lidského kolorektálního karcinomu a inhibuje enzym farnesyl-proteintransferasu (FPT), její



Řada derivátů obsahujících butenolidový kruh (**1a**, **2a**) vykazuje určitou cytostatickou aktivitu a lze ji očekávat také u nových derivátů koruskanonu A.

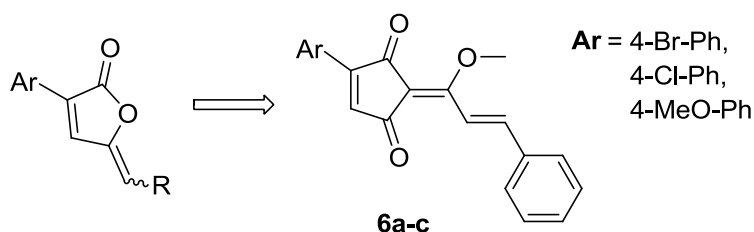


Je patrné, že řada přírodních struktur vykazuje antifungální aktivitu, která je zpravidla provázena dalšími účinky. V této práci jsme se zaměřili na koruskanon A, jehož molekula obsahuje dvojnou vazbu konjugovanou s karbonylem, stejně jako struktura dalších butenolidů.

2. CÍL PRÁCE

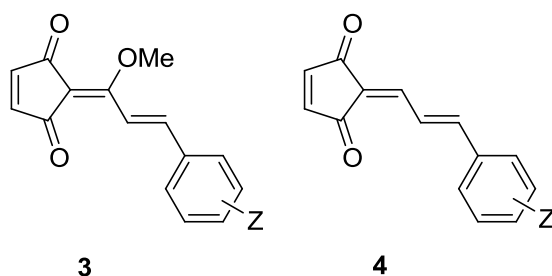
1. Syntéza a studium biologické aktivity analog koruskanonu A s arylem na cyklopentendionovém kruhu.

Na základě analogie s antifungálně aktivními 3-haloaryl-5-alkyliden-2,5-dihydrofuran-2-ony jsme se rozhodli pro syntézu a biologické hodnocení derivátů koruskanonu A, u nichž je methylový substituent v poloze 4 cyklopentendionového kruhu nahrazen *p*-substituovaným fenylem (**6a-c**).

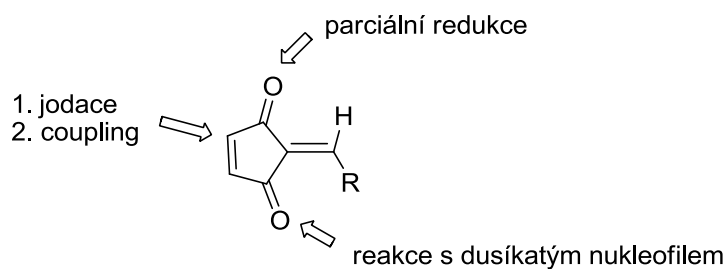


2. Syntéza a biologické hodnocení dalších analog koruskanonu A.

Jednoduchá analoga typu **3** a **4** ($Z = H$) jsou účinnými inhibitory lidské chymasy (vide supra), jejich antifungální ani cytostatická aktivita nebyla dosud zkoumána.



Skelet koruskanonu naznačuje i možnosti dalších syntetických obměn.



3. Stanovení cytostatické aktivity připravených derivátů koruskanonu A a dalších látek s butenolidovým nebo pentenolidovým seskupením vycházejících z molekuly inkrustoporinu, zkoumání vztahu mezi strukturou a cytostatickou aktivitou a možností oddělení antifungálního a cytostatického účinku.

Pro tento účel jsme rozšířili sérii buněčných linií, na které běžné testování provádíme (myší lymfocytické leukémie L1210, lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie CCRF-CEM, lidská promyeloidní leukémie HL-60, karcinom děložního čípku HeLa S3) o relativně rezistentní linii nádorových buněk HT-29 (lidský kolorektální karcinom) a pro srovnání jsme látky též testovali na citlivějších buňkách kolorektálního karcinomu (buněčná linie Colo 201). Látky se selektivním cytostatickým účinkem a látky efektivní vůči rezistentním buňkám linie HT-29 by se mohly stát modelovou předlohou pro vývoj antineoplastik. Takové nadějně struktury lze z hlediska cytostatického účinku dále zkoumat, jednou z možností je např. analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie, která naznačí, zda látka pouze inhibuje buněčnou proliferaci anebo vyvolává buněčnou smrt (navozením apoptosy nebo nekrosy).

3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

3.1. Syntéza derivátů koruskanonu A se substituovaným fenylem na cyklopentendionovém kruhu a hodnocení jejich biologické aktivity

Inspirováni strukturou antifungálně aktivního 5-methylen-3-(4-bromfenyl)-2,5-dihydrofuran-2-onu **2a** jsme se zaměřili na syntézu derivátů s *p*-substituovaným fenylem v poloze 4 cyklopentendionového kruhu (Schéma 5).

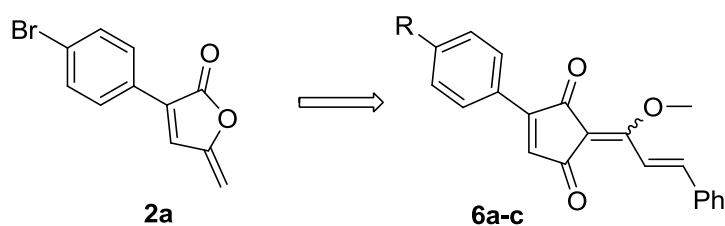


Schéma 5

Při syntéze těchto látek jsme vycházeli z metody použité při syntéze koruskanonu A a B¹⁰⁰. Sled reakcí začíná Wittigovou kondenzací anhydridů **7a-c** s fosforanem **8** připraveným z příslušného α -methylketonu v tříkrokové sekvenci. Klíčovým krokem je bazicky katalyzovaný přesmyk vzniklých γ -alkylidenbutenolidů **9a-c** vedoucí k derivátům cyklopent-4-en-1,3-dionu **10a-c**, jejichž methyloací získáme požadované produkty **6a-c** (Schéma 6)⁹⁴.

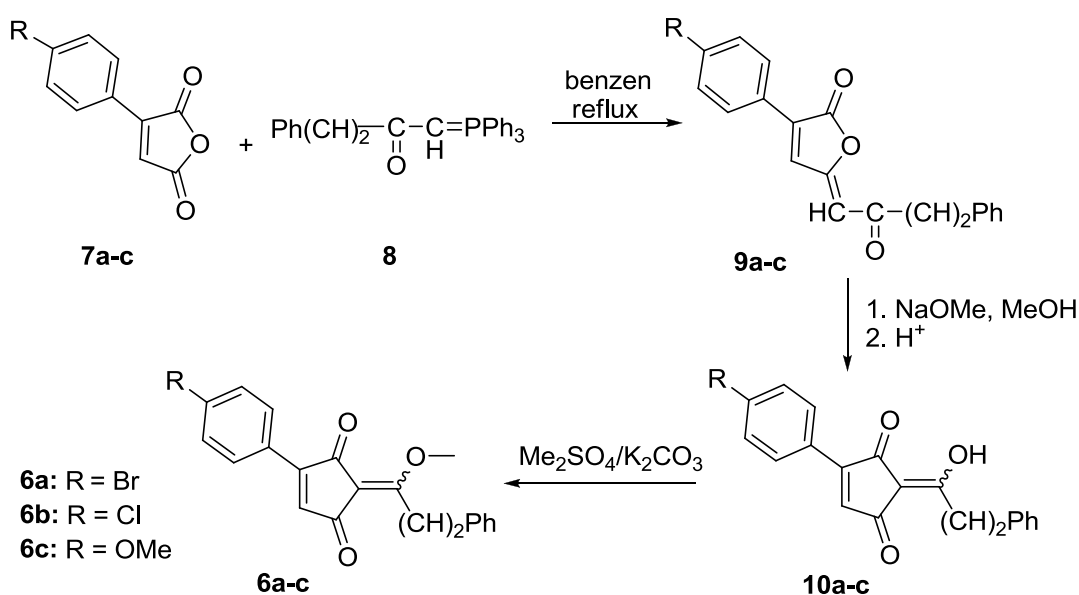


Schéma 6

Wittigova kondenzace anhydridů **7a-c** s fosforanem **8** pak poskytuje⁹⁴ regio- a stereoselektivně (*E*)- γ -alkylidenbutenolidy **9a-c** ve výtěžcích kolem 50 % (Schéma 9). V ¹H NMR spektrech získaných produktů byla patrná přítomnost vodíků na dvojných vazbách (singlet 6.52-6.60 ppm, dublety 7.69 a 6.93 ppm).

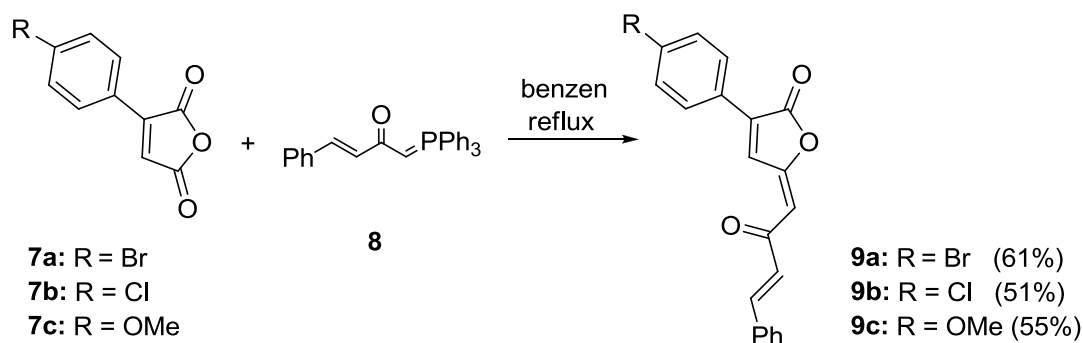


Schéma 9

Připravené (*E*)- γ -alkylidenbutenolidy **9a-c** byly bazicky katalyzovaným přesmykem převedeny na příslušné 2-alkylidencyklopent-4-en-1,3-diony **10a-c**, které byly bez charakterizace dále methylovány na volné hydroxylové skupině (Schéma 10). Výtěžky přesmyku i následné methylace se pohybovaly kolem 50 %. Takto byly připraveny tři deriváty koruskanonu A (**6a-c**), u nichž je methyl v poloze 4 cyklopentendionového kruhu nahrazen substituovaným fenylem. Látky byly získány jako směs izomerů na dvojně vazbě *E/Z* v přibližném poměru 1:1, jak bylo patrné ze dvou signálů skupiny -OMe (4.26 a 4.27 ppm) o téměř stejné intenzitě.

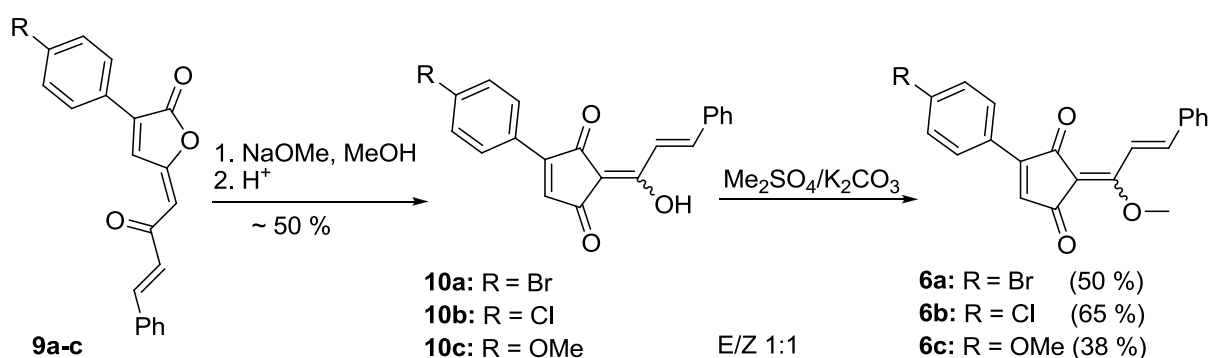


Schéma 10

Získané deriváty byly hodnoceny z hlediska antifungální a cytostatické aktivity. Koruskanon A byl také připraven, aby mohl být otestován za stejných podmínek

jako deriváty **6a-c**. Z výsledků (Tabulka 2, Tabulka 3) vyplynulo, že náhrada methylu na nenasyčeném dionovém kruhu za *p*-substituovaný fenyl vede ke ztrátě antifungální aktivity, zatímco cytostatická zůstává zachována. Deriváty působí cytostaticky také na relativně rezistentní buňky linie HT-29, hodnoty IC₅₀ se pohybují kolem 4 μmol.l⁻¹. Vůči ostatním testovaným liniím jsou IC₅₀ v rozmezí 2-11 μmol.l⁻¹, podobně jako IC₅₀ koruskanonu A.

Tabulka 2. Antifungální aktivita látek **6a-c** v porovnání s koruskanonem A (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
6a	24h	>250	NT ^m	NT	NT	>250	>250	>250	NT	>250	>250	>250	>250
	48h	>250	NT	NT	NT	>250	>250	>250	NT	>250	>250	>250	>250
6b	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
6c	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
KorAⁿ	24h	0.98	NT	NT	NT	125	3.91	125	NT	0.98	31.25	31.25	3.91
	48h	3.1	NT	NT	NT	250	7.81	125	NT	7.81	250	250	7.81

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitaniae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách), ^mNT = nebylo testováno, ⁿkoruskanon A

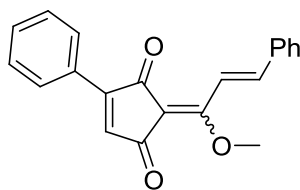
Tabulka 3. Cytostatická aktivita derivátů **6a-c** a koruskanonu A (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

Látka	L1210 ^a	HL60 ^b	HeLa S3 ^c	CCRF-CEM ^d	HT-29 ^e
6a	2.4 ± 0.14	11.4 ± 0.68	6.5 ± 0.5	4.0 ± 0.24	NT ^f
6b	5.12 ± 0.50	6.69 ± 0.42	1.79 ± 0.19	2.84 ± 0.04	4.38 ± 0.94
6c	4.9 ± 0.22	1.99 ± 0.27	3.75 ± 0.3	3.8 ± 0.23	4.59 ± 0.99
KorA^g	3.8 ± 0.23	4.5 ± 0.27	5.0 ± 0.31	3.6 ± 0.22	NT

^aL1210 (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^bHL-60 (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^cHeLa S3 (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^dCCRF-CEM (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^eHT-29 (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^fNT = nebylo testováno, ^gkoruskanon A

Skupina Alice M. Clark pracující souběžně s námi na syntéze derivátů koruskanonu A připravila derivát **6d** s fenylem namísto methylu a podrobila

jej biologickému hodnocení. Derivát nevykazoval antifungální aktivitu, měl pouze cytostatické účinky. Lze tedy učinit závěr, že substituce metylu fenylem (ať substituovaným či nesubstituovaným) vede ke ztrátě antifungální aktivity. Výsledky antifungálního hodnocení derivátů **6a-c** a **6d** jsou porovnatelné, kolektiv A. M. Clark použil pro *in vitro* testování kmen *Candida albicans* ATCC 90028, který je součástí námi testovaného souboru kmenů kvasinek a vláknitých hub.



6d

3.2. Možnosti syntézy jednoduchých analog 2-(3-fenylprop-2-enyliden)-cyklopent-4-en-1,3-dionu

3.2.1. Pokus o přípravu 2-[(2E)-3-fenyl-1-methoxyprop-2-enyliden]cyklopent-4-en-1,3-dionu

Pro přípravu derivátu **3** jsme zvolili metodu syntézy koruskanonu A, kterou jsme úspěšně prakticky uplatnili při syntéze derivátů **6a-c**. Wittigova kondenzace maleinanhydridu s (3E)-(trifenylfosfonio)-4-fenyl-2-oxobut-3-enylidem neproběhla, reakční směs po obvyklém zpracování neposkytla očekávaný butenolid. Ani zahřívání reakční směsi 72 hod nevedlo k produktu (Schéma 11). Pokusy o přípravu ylidu s jinými bázemi vedly ke směsi neidentifikovatelných produktů.

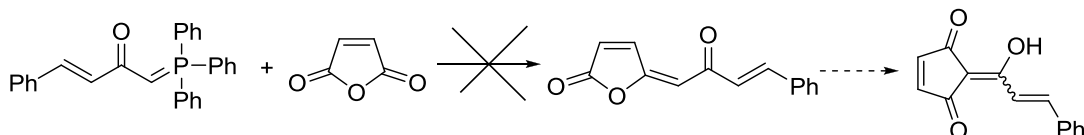


Schéma 11

3.2.2. Kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s karbonylovými sloučeninami

Při syntéze derivátů typu **4** jsme se nejprve pokusili o popsanou⁹⁷ kondenzaci cyklopent-4-en-1,3-dionu s cinnamaldehydem v přítomnosti nadbytku (20 ekv.) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (Schéma 12). Tato jednokroková syntéza měla poskytnout produkt v 50 % výtěžku. Opakovanými pokusy jsme získali produkt ve velice nízkém výtěžku (maximálně 10 %), výchozí aldehyd z velké části nezreagoval.

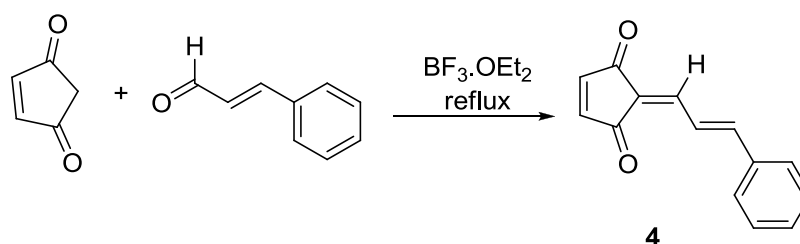


Schéma 12

Zajímalo nás, zda reakce proběhne také s ketonem, který je obecně méně reaktivní než aldehyd. Pokusili jsme se proto o kondenzaci cyklopent-4-en-1,3-dionu s benzylidenacetone a s acetonem (Schéma 13), NMR analýza potvrdila, že reakce s ketony neproběhla.

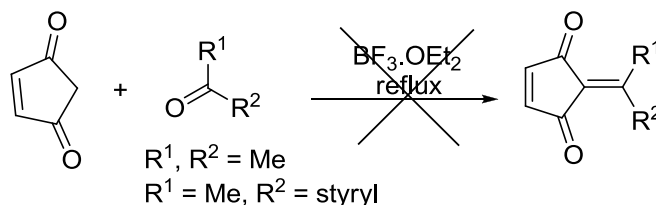


Schéma 13

Rozhodli jsme se tedy zaměnit Lewisovu kyselinu za bázi a pokusit se o kondenzaci s ketonem i alkylation jednoduchým alkylačním činidlem. Předpokládali jsme odtržení kyselého vodíku cyklopent-4-en-1,3-dionu aktivovaného dvěma karbonyly pomocí báze za vzniku karbaniontu, který by (jakožto nukleofil) atakoval použitý elektrofil. Přehled pokusů o kondenzaci cyklopent-4-en-1,3-dionu shrnuje tabulka 4. Deprotonace cyklopent-4-en-1,3-dionu působením MeONa a následná reakce jak s acetonem, tak s MeI vedly k neidentifikovatelným směsím produktů, reakce s MeI nebyla úspěšná ani působením K_2CO_3 v DMF . Dospěli jsme k závěru, že bazické prostředí není

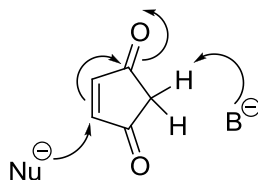
pro reakce cyklopent-4-en-1,3-dionu vhodné, což se shodovalo s údaji v literatuře⁹⁷. Důvodem je pravděpodobně přítomnost elektrondeficitní dvojně vazby konjugované s karbonylovými skupinami, která snadno podléhá Michaelově adici.

Tabulka 4. Neúspěšné pokusy o kondenzaci cyklopent-4-en-1,3-dionu

Reagent	Katalyzátor	Rozpouštědlo	Podmínky
Aceton	BF ₃ .OEt ₂	-	reflux
Aceton	MeONa	MeOH/THF	rt
Methyljodid	MeONa	MeOH/THF	rt
Methyljodid	K ₂ CO ₃	DMF	rt

3.2.3. Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s cinnamaldehydem – optimalizace podmínek

Běžně se při Knoevenagelových kondenzacích používají bazické katalyzátory, např. piperidin^{103,104,105} a pyridin^{106,107} nebo aminokyseliny¹⁰⁸, např. *L*-prolin^{109,110}, které generují karbanion působením na C-kyselinu. V případě cyklopent-4-en-1,3-dionu nelze bazický katalyzátor použít (vide supra). Báze může nejen způsobit deprotonizaci, ale také se jako nukleofil adovat na elektrofilní dvojnou vazbu za vzniku enolátu, který může podléhat následným kondenzačním reakcím (Obrázek 1). Důsledkem použití bází je tak řada vedlejších reakcí a extrémně nízké výtěžky⁹⁷. Podobně použití *p*-toluensulfonové kyseliny jako katalyzátoru u cyklopent-4-en-1,3-dionu vede ke směsi produktů^{97,111}.



Obrázek 1

Jediný v literatuře popsáný případ kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s cinnamaldehydem používá jako katalyzátor Lewisovu kyselinu BF₃.OEt₂^{97,112}. Činidlo je používáno ve velkém nadbytku (20 ekv.), tj. spíše jako rozpouštědlo. Reakce

je tak ekonomicky nevýhodná a nešetrná k životnímu prostředí, a nadto poskytuje nízké výtěžky (viz výše). Proto jsme se rozhodli provést systematický screening účinnosti jiných Lewisových kyselin v zamýšlené kondenzační reakci s cílem dosažení katalytického procesu. Výsledky shrnuje tabulka 5, ze které je patrné, že použitím ekvimolárního množství triflátu měďnatého $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ jsme dosáhli zvýšení výtěžku reakce na 53 %, použití $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ vedlo k výtěžku 60 %.

Další experimenty ukázaly, že snížení množství Lewisovy kyseliny na 0.3 ekv. a použití aldehydu v nadbytku rovněž poskytlo uspokojivé výtěžky (56 % pro $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ a 64 % pro $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$) (Schéma 14). Mimo jiné jsme pro reakci zkusili kationtové Lewisovy kyseliny (**A** a **B**) založené na bismutu a antimonu¹¹³.

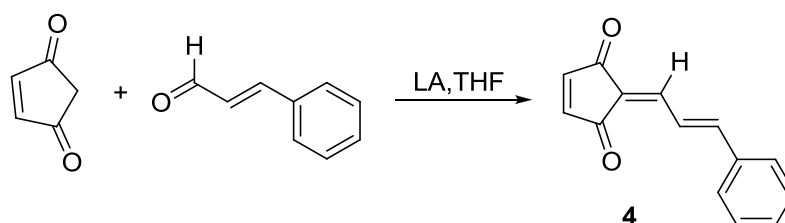
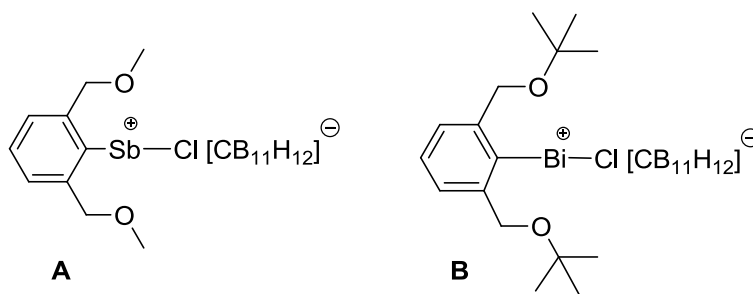


Schéma 14

Tabulka 5. Optimalizace podmínek kondenzační reakce (Schéma 14)

Lewisova kyselina	Množství LA (ekv.)	Množství aldehydu (ekv.)	Výtěžek (%)
$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	20	1	10
$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	1	1	5
$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$	1	1	53
$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$	0.4	1	53
$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$	1	3	57
$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$	0.5	3	57
$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$	0.3	3	56
Et_2AlCl	1	1	0
$(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$	1	1	60
$(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$	1	3	65
$(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$	0.5	3	64
$(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$	0.4	3	64
$(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$	0.3	3	64
$(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$	0.2	3	57
$(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$	0.05	3	21
A	0.3	3	5
B	0.3	3	6



Dále jsme se pokusili o optimalizaci rozpouštědla. Z výsledků v tabulce 6 je patrné, že optimálním rozpouštědlem byl původně použitý THF.

Tabulka 6. Vliv rozpouštědla na výtěžek reakce cyklopent-4-en-1,3-dionu s cinnamaldehydem (Schéma 14) za katalýzy 0.4 ekvivalentu (*i*-PrO)₄Ti

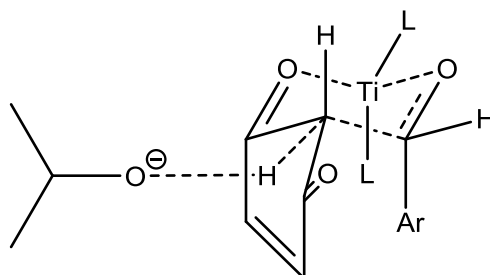
Rozpouštědlo	Výtěžek (%)
Hexan	9
Dichlormethan	18
Toluen	50
Tetrahydrofuran	64
Dioxan/tetrahydrofuran*	58

* optimální směs pro rozpuštění cyklopent-4-en-1,3-dionu

Posledním pokusem o zvýšení výtěžku reakce bylo její provedení v mikrovlnném reaktoru, které ale rovněž nevedlo ke zvýšení výtěžku (20 %).

Možný mechanismus reakce

Sledování roztoku ekvimolárního množství cyklopent-4-en-1,3-dionu a (*i*-PrO)₄Ti v d₈ – THF pomocí NMR ukázalo, že nedochází ke změně chemických posunů diketonu. Je tak pravděpodobné, že úloha Lewisovy kyseliny spočívá v aktivaci aldehydu a koordinaci obou reakčních partnerů, jak je ukázáno v navrženém tranzitním stavu na obrázku 2.



Obrázek 2

Lze předpokládat, že karbonylový kyslík aldehydu se naváže do koordinační sféry titanu a následně dojde ke koordinaci cyklopent-4-en-1,3-dionu za vzniku šestičlenného tranzitního stavu podobného židličkové konformaci cyklohexanu. Působením uvolněného isopropoxidového iontu zároveň dochází k deprotonaci methylenové skupiny diketonu. Výsledkem je nukleofilní adice na aldehyd následovaná rychlou eliminací. Vzhledem k tomu, že při použití cyklopentan-1,3-dionu tato reakce neprobíhá (kapitola 3.4, strana 57), je možné se domnívat, že navržený tranzitní stav je stabilizován interakcemi typu π - π stacking mezi orbitaly dvojné vazby a aromatického kruhu.

Produkt **4** byl podroben testování na antifungální aktivitu (Tabulka 7). Jeho účinek vůči *C. albicans* je srovnatelný s aktivitou koruskanonu A, vůči kmenům *C. krusei* a *C. glabrata* je derivát **4** dokonce účinnější než předloková molekula koruskanonu A.

Tabulka 7. Antifungální aktivita připraveného derivátu **4** v porovnání s koruskanonem A (IC₈₀ [$\mu\text{mol.l}^{-1}$])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
4	24h	1.95	15.62	3.9	3.9	15.62	7.81	15.62	7.81	7.81	31.25	>125	7.81
	48h	1.95	15.62	7.81	7.81	15.62	15.62	31.25	15.62	15.62	31.25	>125	62.5
KorA^m	24h	0.98	NT ⁿ	NT	NT	125	3.91	125	NT	0.98	31.25	31.25	3.91
	48h	3.91	NT	NT	NT	250	7.81	125	NT	7.81	250	250	7.81

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitaniae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách), ^mkoruskanon A, ⁿNT = nebylo testováno

Vzhledem k zajímavé aktivitě derivátu **4** jsme se rozhodli pokračovat v syntéze podobných látek.

3.3. Syntéza dalších derivátů koruskanonu A a hodnocení jejich antifungální a cytostatické účinnosti

3.3.1. Syntéza a antifungální aktivita 2-benzylidencyklopent-4-en-1,3-dionu

Vyvinutá metoda kondenzace byla použita při reakci cyklopent-4-en-1,3-dionu s benzaldehydem (Schéma 15). Za katalýzy $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ byl dion **11** získán ve výtěžku 43 %. Reakci jsme zopakovali také s $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$ s výtěžkem 39 %. V ^1H NMR spektru produktu **11** je patrný singlet vodíku dvojně vazby (7.63 ppm). Látka **11** představuje jednoduchý derivát koruskanonu A, u něhož je styrylový postranní řetězec nahrazen fenylem.

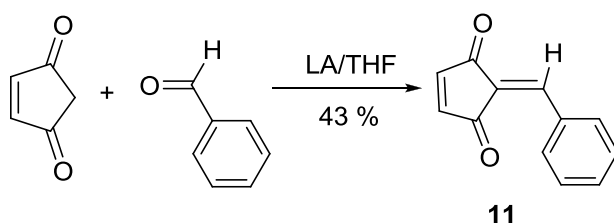


Schéma 15

Dion **11** byl podroben biologickému hodnocení a jeho aktivita byla porovnána s aktivitou dionu **4**, koruskanonu A a používaných léčiv. Z tabulky 8 je zřejmé, že oba nové analogy jsou antifungálně účinné, jejich aktivita vůči některým kmenům (*C. krusei*, *C. glabrata*) je dokonce vyšší než aktivita koruskanonu A. Derivát **11** je účinnější vůči některým druhům *Candida* a *A. fumigatus*.

Náhrada enolické methoxyskupiny za vodík a současné odstranění methylového substituentu z cyklopentendionového kruhu koruskanonu A vedoucí k derivátu **4** tak má jen malý vliv na antifungální účinnost této látky, jejíž aktivita je srovnatelná s koruskanonem A. Zmíněné strukturní modifikace dokonce umožňují zkrácení styrylového postranního řetězce o dva uhlíky při zachování antifungální účinnosti získaného derivátu **11**. Závěry o nepostradatelnosti některých strukturních částí molekuly koruskanonu A uvedené v literatuře⁹⁴ je tak nutné korigovat.

Tabulka 8. Antifungální aktivita připravených derivátů **4** a **11** v porovnání s koruskanonem A, flukonazolem (IC₈₀ [μmol.l⁻¹]) a amfotericinem B (IC₉₅ [μmol.l⁻¹])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
4	24h	1.95	15.62	3.9	3.9	15.62	7.81	15.62	7.81	7.81	31.25	>125	7.81
	48h	1.95	15.62	7.81	7.81	15.62	15.62	31.25	15.62	15.62	31.25	>125	62.5
11	24h	1.95	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	7.81	7.81	1.95	15.62	250	1.95
	48h	1.95	7.81	3.9	3.9	7.81	3.9	7.81	15.62	3.9	31.25	250	3.9
KorA^m	24h	0.98	NT ⁿ	NT	NT	125	3.91	125	NT	0.98	31.25	31.25	3.91
	48h	3.91	NT	NT	NT	250	7.1	125	NT	7.81	250	250	7.81
AmB^o	24h	0.03	0.07	0.03	0.14	0.14	0.09	0.03	0.14	1.08	0.18	1.08	1.08
	48h	0.06	0.14	0.14	0.14	0.18	0.11	0.09	0.27	1.08	0.23	2.16	1.08
FLU^p	24h	1	0.8	6.5	>50	>50	3	22	3.3	4	>50	>50	17
	48h	2	3.3	13	>50	>50	5	>50	3.3	9	>50	>50	26

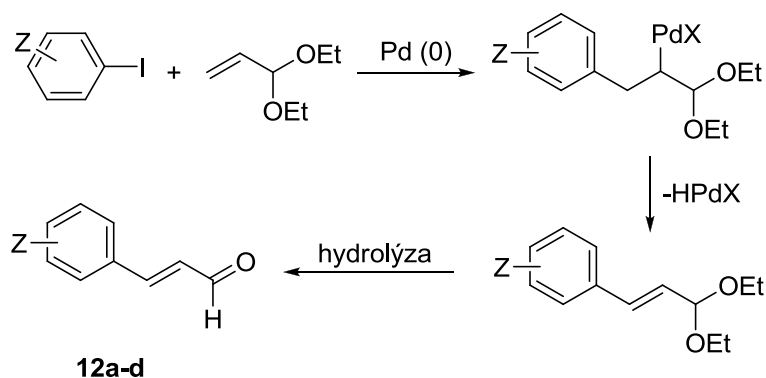
^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitaniae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách), ^mkoruskanon A, ⁿNT = nebylo testováno, ^oamfotericin B, ^pflukonazol

Zajímavý antifungální účinek derivátů **4** a **11** ve srovnání s neaktivními deriváty se substituovaným fenylem na dvojně vazbě cyklopentendionového kruhu **6a-c** nás přivedl k myšlence, že aktivní látky by mohly interagovat s ergosterolem buněčných membrán hub. Ergosterol má ve své molekule dienové uspořádání a reaguje s dienofily mechanismem Diels-Alderovy reakce^{114,115} za vzniku šestičlenného kruhu, což mění prostorové uspořádání molekuly a mohlo by vést ke vzniku pórů v membráně. Vzhledem k přítomnosti dvou karbonylových skupin cyklopentendionového kruhu derivátů **4**, **11** je dvojná vazba silně elektrondeficitní a mohla by tedy reagovat (jakožto dienofil) s ergosterolem. Je přitom zřejmé, že další substituce této dvojně vazby objemnými substituenty (viz látky **6a-c**) by tomuto procesu bránila. Tento předpoklad se ale nepodařilo potvrdit, neboť látka **11** nereagovala s ergosterolem ani v přítomnosti Et₂AlCl.

3.3.2. Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s *p*-substituovanými cinnamaldehydy a biologické hodnocení získaných derivátů

Na základě získaných výsledků jsme se rozhodli připravit sérii derivátů se substitucí na benzenovém kruhu a zjistit tak vliv této substituce na antifungální aktivitu.

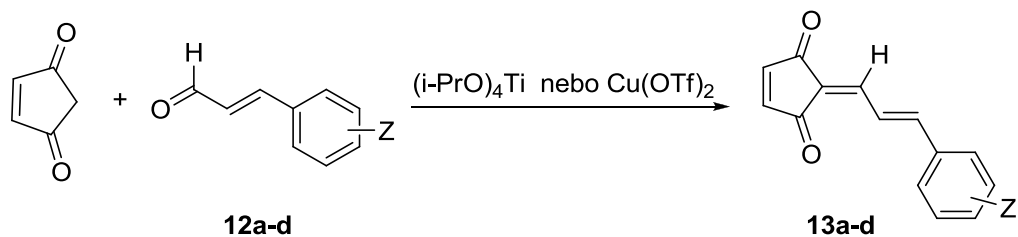
Cinnamaldehydy substituované funkčními skupinami s pozitivními i negativními elektronovými efekty jsme připravili Heckovou reakcí¹¹⁶ 3,3-diethoxypropenu s *p*-substituovanými aryljodidy. Vzniklé acetaly byly ihned bez izolace hydrolyzovány na příslušné aldehydy (Schéma 16). Připravili jsme čtyři *p*-substituované skořicové aldehydy **12a-d**, jejichž identitu jsme potvrdili na základě signálu aldehydického vodíku v ¹H NMR spektru ($\delta \approx 9.7$ ppm). NMR spektra se shodovala s údaji uvedenými v literatuře¹¹⁶.



Látka	Z	Výtěžek
12a	4-OCH ₃	70 %
12b	4-CH ₃	58 %
12c	4-Cl	61 %
12d	4-NO ₂	47 %

Schéma 16

Kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s *p*-substituovanými cinnamaldehydy **12a-c** za katalýzy (*i*-PrO)₄Ti vedly k alkyldionům **13a-c**. Produkty byly získány v nižších výtěžcích, proto jsme reakce provedli také s Cu(OTf)₂ a prodloužili reakční dobu, ale bez úspěchu (Schéma 17). Nitroderivát **13d** se nepodařilo připravit ani při použití vyššího množství Lewisovy kyseliny. Vzhledem k tomu, že látky byly syntetizovány za účelem hodnocení biologické aktivity, spokojili jsme se s takto nízkými výtěžky kondenzace. Připravené látky byly charakterizovány pomocí NMR spekter. V ¹H NMR spektrech bylo patrné vymizení signálu aldehydického vodíku (9.7 ppm), u látky **13a** byl zachován singlet vodíků methoxyskupiny (3.86 ppm) a podobně u derivátu **13b** singlet vodíků methylu (2.4 ppm). Zřetelné jsou signály vodíků dvojných vazeb, typický je dublet dubletů (~ 8.1 ppm).



Látka	Z	(<i>i</i> -PrO) ₄ Ti Výtěžek	Cu(OTf) ₂ Výtěžek
13a	4-OMe	21 %	13 %
13b	4-Me	36 %	27 %
13c	4-Cl	30 %	21 %
13d	4-NO ₂	0 %	0 %

Schéma 17

Z hodnocení antifungální aktivity (Tabulka 9) je zřejmé, že účinek derivátů **13a** a **13c** je téměř zanedbatelný. Derivát **13b** vykazuje aktivitu vůči některým kmenům testovaného souboru hub. Zajímavá je účinnost vůči kmenu *C. albicans*, MIC = 3.9 μmol.l⁻¹, která je srovnatelná s aktivitou derivátu **4**. Závěrem lze říci, že *p*-substituce fenylu styrylové části molekuly **4** substituenty s různými elektronovými vlastnostmi vede ke snížení nebo vymizení antifungální aktivity. Pouze v případě substituce methylem je antifungální aktivita zachována, je ovšem nižší než aktivita nesubstituované látky **4**.

Tabulka 9. Antifungální aktivita připravených derivátů **13a-c** v porovnání s nesubstituovanou látkou **4** (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
4	24h	1.95	15.62	3.9	3.9	15.62	7.81	15.62	7.81	7.81	31.25	>125	7.81
	48h	1.95	15.62	7.81	7.81	15.62	15.62	31.25	15.62	15.62	31.25	>125	62.5
13a	24h	125	250	250	250	250	250	250	250	250	250	>500	250
	48h	250	250	250	250	250	250	250	250	500	250	>500	500
13b	24h	3.9	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	31.25	7.81	31.25	62.5	>125	125
	48h	7.81	7.81	31.25	15.62	15.62	7.81	31.25	15.62	>125	>125	>125	>125
13c	24h	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	>250	62.5
	48h	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	125	125	>250	250

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitanae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách)

U připravených látek bylo dále provedeno testování jejich cytostatické aktivity na nádorových buněčných liniích. Cytostatická aktivita testovaných látek je vyjádřena jako hodnota IC_{50} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$). Z tabulky 10 je zřejmé, že antifungální aktivita látky **4** je provázena selektivním cytostatickým účinkem vůči leukemickým buňkám linie CCRF-CEM. Podobně antifungálně aktivní derivát s *p*-methylovou substitucí benzenového kruhu **13b** vykazuje mírný cytostatický účinek vůči jediné linii buněk, a to vůči buňkám karcinomu děložního čípku HeLa S3. Deriváty **13a** a **13c** nejsou antifungálně ani cytostaticky aktivní.

Tabulka 10. Cytostatická aktivita derivátů **4** a **13a-c** v porovnání s aktivitou koruskanonu A (IC_{50} [$\mu\text{mol.l}^{-1}$])

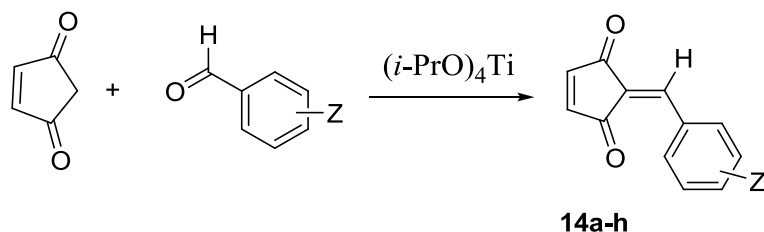
Látka	<i>L1210</i> ^a	<i>HL 60</i> ^b	<i>HeLa S3</i> ^c	<i>CCRF-CEM</i> ^d	<i>HT-29</i> ^e	<i>Colo 201</i> ^f
4	NA ^g	NA	NA	4.4 ± 0.2	NA	NA
13a	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13b	NA	NA	7.3 ± 0.2	NA	NA	NA
13c	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KorA ^h	3.8 ± 0.2	4.5 ± 0.3	NT ⁱ	3.6 ± 0.2	NT	NT

^a*L1210* (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^b*HL-60* (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^c*HeLa S3* (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^d*CCRF-CEM* (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^e*HT-29* (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^f*Colo 201* (ECACC 87091201) – karcinom tlustého střeva, ^gNA = neaktivní, ^hkoruskanon A, ⁱNT = nebylo testováno

3.3.3. Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu se substituovanými benzaldehydy a biologické hodnocení připravených derivátů

Vzhledem k solidní antifungální aktivitě připraveného 2-benzylidencyklopent-4-en-1,3-dionu **11** jsme se rozhodli také v tomto případě prozkoumat vliv substituce na fenylovém kruhu na antifungální aktivitu. Byla provedena série reakcí s komerčně dostupnými *p*-substituovanými benzaldehydy. Opět jsme zvolili substituenty s různými elektronovými efekty a také přesunuli substituent z *p*- do *m*- polohy a připravili sérii sedmi derivátů **14a-g** (Schéma 18) za katalýzy $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$. Při kondenzaci s 4-*N,N*-dimethylaminobenzaldehydem bylo dosaženo nízkého výtěžku (10 %), a to i s $\text{Cu}(\text{OTf})_2$. Kondenzace s *p*-nitrobenzaldehydem byla neúspěšná při použití obou katalyzátorů. Připravené látky byly charakterizovány pomocí kompletní série spekter.

V ^1H NMR spektrech se objevil singlet vodíků dvojné vazby (7.49-7.63 ppm), v případě látek s *p*-substitucí byl dobře zřetelný AA'BB' systém. V ^{13}C NMR spektrech byly dva signály karbonylových uhlíků v oblasti vysokých hodnot ppm (~ 193 ppm).



Látka	Z	Výtěžek
14a	4-OMe	31 %
14b	4-Me	49 %
14c	4-Cl	49 %
14d	4-F	25 %
14e	4-Br	57 %
14f	3-Br	31 %
14g	4-N(Me) ₂	10 %
14h	4-NO ₂	0 %

Schéma 18

Antifungální aktivita připravených derivátů **14a-f** byla vyhodnocena ve srovnání s nesubstituovaným 2-benzylidencyklopent-4-en-1,3-dionem **11** (Tabulka 11). Obecně lze říci, že *para* substituce antifungální účinnost snižuje a přesun substituentu do polohy *meta* způsobí její další pokles. Aktivita vůči kmenu *C. albicans* v případě methyl- a methoxyderivátů poklesla jen mírně, v případě substituce halogeny je dosaženo hodnoty MIC = 7.81 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. *N,N*-dimethylaminoderivát **14g** je mírně aktivní vůči kmenům *C. krusei*, *C. parapsilosis* a *C. lusitaniae*. Zajímavý je také jeho účinek na *A. fumigatus*, který je srovnatelný s účinností nesubstituované předlohy **11**. Deriváty **11** a **14g** tak svou aktivitou vůči *A. fumigatus* předčí molekulu koruskanonu A, účinek je významný především z důvodu neúčinnosti mnoha používaných antimykotik (např. flukonazolu) vůči tomuto kmenu vláknitých hub.

Tabulka 11. Antifungální aktivita derivátů **14a-f** v porovnání s látkou **11** (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
11	24h	1.95	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	7.81	7.81	1.95	15.62	250	1.95
	48h	1.95	7.81	3.9	3.9	7.81	3.9	7.81	15.62	3.9	31.25	250	3.9
14a	24h	3.9	7.81	7.81	3.9	3.9	7.81	7.81	7.81	7.81	15.62	>250	3.9
	48h	7.81	7.81	15.62	3.9	7.81	7.81	7.81	31.25	31.25	31.25	>250	7.81
14b	24h	3.9	3.9	15.62	7.81	15.62	7.81	15.62	15.62	15.62	31.25	>250	125
	48h	7.81	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	62.5	125	>250	>250
14c	24h	7.81	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	62.5	31.25	31.25	62.5	>125	125
	48h	31.25	31.25	31.25	31.25	62.5	31.25	62.5	31.25	62.5	62.5	>125	>125
14d	24h	7.81	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	31.25	15.62	31.25	31.25	>125	15.62
	48h	15.62	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	62.5	62.5	>125	15.62
14e	24h	7.81	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	31.25	>125	15.62
	48h	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	31.25	>125	15.62
14f	24h	15.62	15.62	31.25	15.62	31.25	31.25	31.25	31.25	32.5	125	>125	15.62
	48h	31.25	31.2	62.5	31.25	31.25	62.5	62.5	31.25	125	125	>125	15.62
14g	24h	31.25	31.25	3.9	7.81	7.81	62.5	62.5	7.81	7.81	15.62	>125	0.98
	48h	31.25	62.5	7.81	7.81	7.81	>125	>125	31.25	15.62	31.25	>125	0.98

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/1, ^h*C. lusitaniae* 2446/1, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách)

Tabulka 12 ukazuje výsledky hodnocení cytostatické aktivity připravených látek. Je patrné, že antifungální aktivita *p*-substituovaných benzyldenderivátů **14a-g** i nesubstituované látky **11** je doprovázena cytostatickým účinkem vůči linii leukemických buněk CCRF-CEM. Tento účinek naznačuje selektivitu antiproliferačního působení, růst ostatních buněčných linií je neovlivněn. Pouze u derivátů **14e** a **14g** je cytostatický efekt rozšířen ještě vůči další z testovaných linií.

Tabulka 12. Cytostatická aktivita derivátů **11** a **14a-g** (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

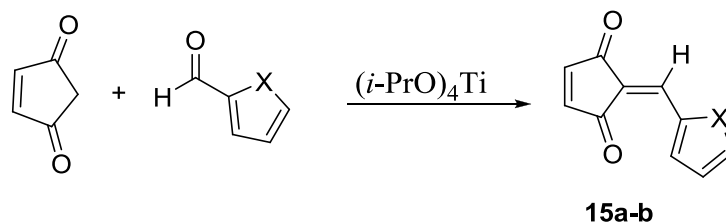
Látka	<i>LI210</i> ^a	<i>HL 60</i> ^b	<i>HeLa S3</i> ^c	<i>CCRF-CEM</i> ^d	<i>HT-29</i> ^e	<i>Colo 201</i> ^f
11	NA ^g	NA	11.1 ± 0.9	2.6 ± 0.2	NA	NA
14a	NA	NA	NA	3.8 ± 0.2	NA	NA
14b	NA	NA	NA	2.7 ± 0.2	NA	NA
14c	NA	NA	NA	6.1 ± 0.4	NA	NA
14d	NA	NA	NA	1.6 ± 0.1	NA	NA
14e	NA	NA	4.9 ± 0.8	1.8 ± 0.3	NA	NA
14f	NA	NA	NA	7.5 ± 0.5	NA	NA
14g	NA	NA	NA	4.3 ± 0.1	NA	1.3 ± 0.1

^a*LI210* (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^b*HL-60* (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^c*HeLa S3* (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^d*CCRF-CEM* (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^e*HT-29* (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^f*Colo 201* (ECACC 87091201) – karcinom tlustého střeva, ^gneaktivní

3.3.4. Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s jinými typy aldehydů a biologická aktivita připravených látek

Deriváty připravené kondenzací cyklopent-4-en-1,3-dionu s benzaldehydy se dále odchyľují od přírodní předlohy koruskanonu A. Zkrácení styrylového řetězce koruskanonu A za současného odstranění enolické methoxyskupiny a methylu na cyklopentendionovém kruhu přesto vede k antifungálně aktivním látkám. Proto jsme se pokusili o přípravu derivátů s jiným postranním řetězcem.

Nejprve jsme provedli Knoevenagelovu kondenzaci cyklopent-4-en-1,3-dionu s heterocyklickými aldehydy, které jsou analogické benzaldehydu. Reakce s furan-2-karbaldehydem a thiofen-2-karbaldehydem poskytly dobré výtěžky produktů **15a** a **15b** (Schéma 19). V případě kondenzace s furan-2-karbaldehydem došlo ke kvantitativní přeměně výchozích látek na produkt **15a**, který po zpracování reakční směsi nebylo třeba čistit sloupcovou chromatografií, pouhá rekrystalizace byla dostačující. V ¹H NMR spektru derivátů **15a** a **15b** byl opět dobře patrný singlet vodíku na dvojně vazbě (7.73 a 7.48 ppm).



Látka	X	Výtěžek
15a	O	70 %
15b	S	45 %

Schéma 19

Pokusy o kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s furan-3-karbaldehydem byly neúspěšné jak při použití $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ tak $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (Schéma 20).

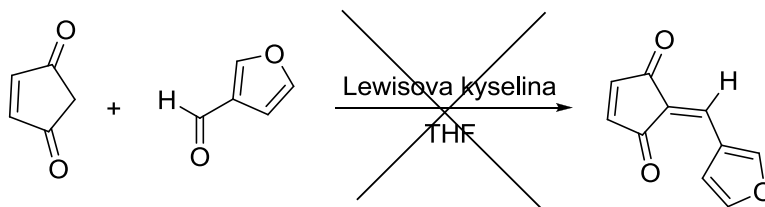


Schéma 20

Podobně kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s pyridin-2-karbaldehydem neproběhla. Dále jsme se pokusili cyklopent-4-en-1,3-dionu kondenzovat s pyridin-3-karbaldehydem a pyridin-4-karbaldehydem, abychom zjistili vliv polohy aldehydické skupiny pyridinu na reaktivitu. Obě kondenzace probíhaly obtížněji, reakční směs bylo třeba zahřát. Reakce s pyridin-3-karbaldehydem vedla ke vzniku určitého množství produktu, který měl ovšem stejný R_f jako výchozí aldehyd, látky od sebe nebylo možné pomocí sloupcové chromatografie oddělit. NMR analýza získané směsi potvrdila přítomnost aldehydu i produktu. Stejný byl i výsledek reakce s pyridin-4-karbaldehydem.

Dále jsme cyklopent-4-en-1,3-dionu podrobili kondenzaci s naftalen-2-karbaldehydem (Schéma 21) s výtěžkem 22 %. V ^1H NMR spektru se objevil signál vodíku dvojně vazby (8.73 ppm).

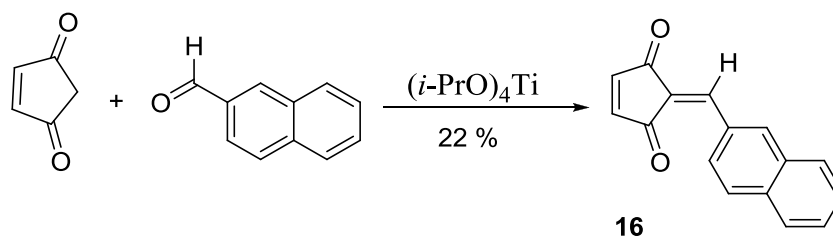


Schéma 21

Naším dalším cílem byla příprava derivátů, u nichž by byl aromatický postranní řetězec nahrazen alifatickým. Pro tento účel jsme zvolili jednoduchý propionaldehyd. Reakci jsme opakovaně prováděli za katalýzy $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ a $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$ v THF i v toluenu, ale bez úspěchu. Kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s isobutanalem ani při zahřívání a použití vyššího množství katalyzátoru neproběhla. Závěrem lze tedy konstatovat, že tento typ reakce s alifatickými aldehydy neprobíhá (Schéma 22).

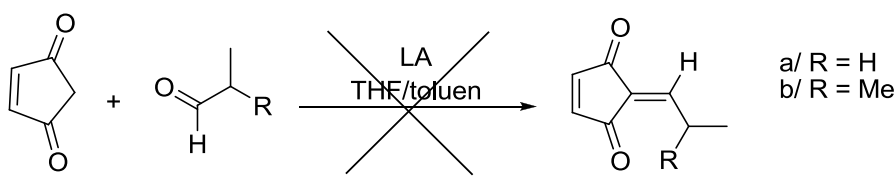


Schéma 22

Připravené deriváty **15a**, **15b** a **16** byly otestovány na souboru patogenních kmenů hub (Tabulka 13). Deriváty s heterocyklickým zbytkem **15a**, **15b** jsou mírně antifungálně účinné, jejich aktivita je srovnatelná s 2-(*p*-halogenbenzyliden)cyclopent-4-en-1,3-diony **14c-e**. Substituce 2-naftylem aktivitu snižuje, zajímavá je pouze aktivita vůči *A. fumigatus*, která se objevila u všech 3 derivátů a její hodnota je opět vyšší než aktivita koruskanonu A.

Mírný antifungální účinek derivátů s heterocyklem v postranním řetězci namísto benzylu **15a** a **15b** je opět provázen cytostatickou aktivitou vůči liniím nádorových buněk. Deriváty **15a** a **16** inhibují proliferaci nejen leukemických buněk CCRF-CEM, ale působení zahrnuje také buňky HeLa S3 a v případě látky **16** relativně citlivé buňky kolorektálního karcinomu Colo 201 (Tabulka 14).

Tabulka 13. Antifungální aktivita derivátů **15a**, **15b** a **16** v porovnání s koruskanonem A (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
15a	24h	7.81	15.62	15.62	7.81	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	250	7.81
	48h	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	31.25	31.25	>500	7.81
15b	24h	7.81	15.62	15.62	7.81	7.81	15.62	7.81	15.62	15.62	15.62	500	15.62
	48h	7.81	15.62	15.62	15.62	7.81	15.62	15.62	15.62	31.25	15.62	>500	15.62
16	24h	15.62	15.62	15.62	15.62	31.25	31.25	31.25	15.62	15.62	15.62	125	7.81
	48h	15.62	15.62	15.62	31.25	31.25	31.25	31.25	15.62	62.5	31.25	>125	15.62
KorA^m	24h	0.98	NT ⁿ	NT	NT	125	3.91	125	NT	0.98	31.25	31.25	3.91
	48h	3.91	NT	NT	NT	250	7.81	125	NT	7.81	250	250	7.81

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitaniae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách), ^mkoruskanon A, ⁿnebylo testováno

Tabulka 14. Cytostatická aktivita derivátů **15a**, **15b** a **16** (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

Látka	LI210 ^a	HL 60 ^b	HeLa S3 ^c	CCRF-CEM ^d	HT-29 ^e	Colo 201 ^f
15a	NA ^g	NA	5.4 ± 0.7	2.5 ± 0.3	NA	NA
15b	NA	NA	NA	4.2 ± 0.2	NA	NA
16	NA	NA	13.5 ± 1.1	3.7 ± 0.1	NA	2.4 ± 0.2

^aLI210 (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^bHL-60 (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^cHeLa S3 (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^dCCRF-CEM (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^eHT-29 (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^fColo 201 (ECACC 87091201) - karcinom tlustého střeva, ^gneaktivní

3.3.5. Další strukturní modifikace aktivních derivátů koruskanonu A

U vybraných derivátů s nejvyšší antifungální aktivitou **4**, **11** jsme zkoumali další možné obměny jejich struktur.

3.3.5.1. Pokus o substituci dvojné vazby cyklopentendionového kruhu

Jako první se nabízela arylace dvojné vazby cyklopentendionového kruhu v poloze 4 nebo 5 pomocí α-jodace s následným couplingem. Jodace cyklopent-4-en-1,3-dionu nebyla úspěšná, stejně jako jodace derivátu **4** (Schéma 23).

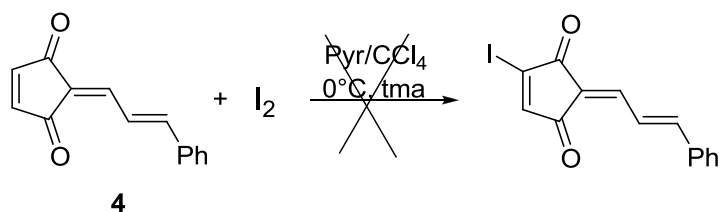


Schéma 23

Řešením by mohla být Heckova reakce umožňující substituci cyklopentendionového kruhu v poloze 4 nebo 5 (substituovaným) fenylem (Schéma 24).

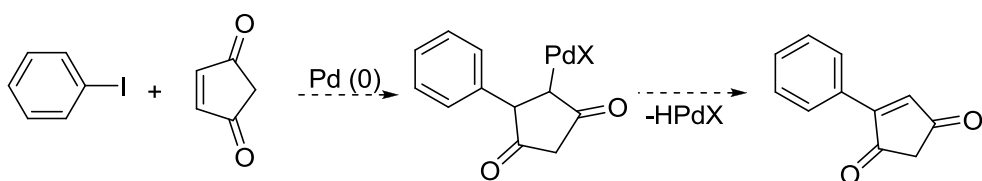


Schéma 24

Použili jsme stejné podmínky Heckovy reakce jako při syntéze *p*-substituovaných cinnamaldehydů¹¹⁶. K roztoku jodbenzenu v DMF jsme přidali cyklopent-4-en-1,3-dion, KCl, K₂CO₃, Bu₄NOAc a Pd(OAc)₂ a reakční směs jsme zahřívali na 90 °C. Dle TLC bylo patrné, že došlo k rozkladu výchozí látky. Důvodem je zřejmě přítomnost bazických solí, jejichž použití je při reakci nutné. Tento problém jsme chtěli obejít použitím cyklopent-4-en-1,3-diolu jako výchozí látky pro Heckovu reakci. Hydroxylové skupiny namísto karbonylových zcela mění elektronové vlastnosti dvojné vazby a po její substituci by ji bylo možné převést zpět na oxidační stupeň karbonylu (Schéma 25).

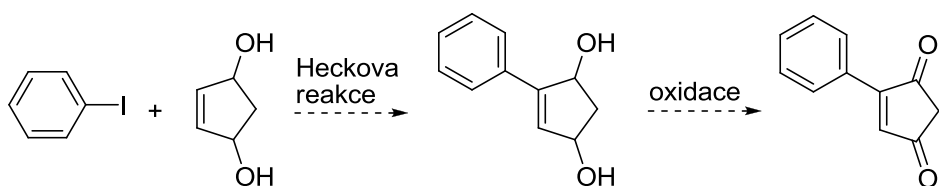


Schéma 25

Heckovu reakci cyklopent-4-en-1,3-diolu s jodbenzenem jsme provedli za výše uvedených podmínek¹¹⁶ a izolovali produkt. V ¹³C NMR spektru chyběl signál uhlíků sekundárních alkoholických skupin, objevilo se fenylové jádro a enonové seskupení. V ¹H NMR spektru byl patrný signál vodíku trisubstituované dvojné vazby

(triplet 6.57 ppm) a v ^{13}C NMR spektru signál karbonylového uhlíku (209.3 ppm). Hmotnostní spektrum v kombinaci s 2D experimentem potvrdilo strukturu produktu **17a** (Schéma 26). NMR spektra se shodovala s údaji v literatuře¹¹⁷. Heckovou reakcí cyklopent-4-en-1,3-diolu s jodbenzenem jsme tak získali 3-fenylcyklopent-2-enon ve výtěžku 35 %. Vznik látky **17a** lze vysvětlit na základě známého mechanismu Heckovy reakce. Po adici η^1 -komplexu paladia vzniklého oxidativní adicí aryljodidu na katalyzátor dochází ke vzniku nového komplexu a β -hydridové eliminaci. Vzniklý diol podléhá rychlému přesmyku enolformy na oxoformu, eliminaci vody a migraci dvojné vazby do termodynamicky stabilnější polohy.

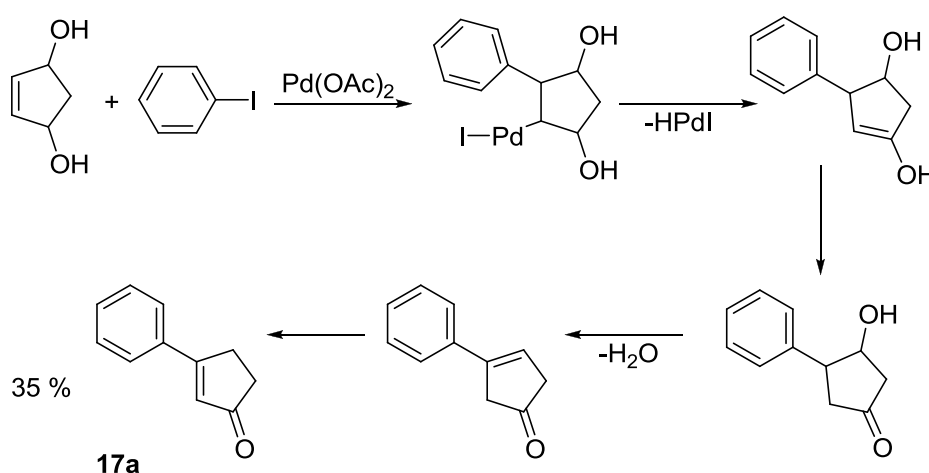
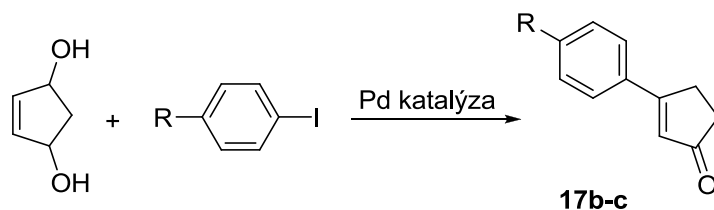


Schéma 26

Poté jsme provedli Heckovu reakci cyklopent-4-en-1,3-diolu s jodtoluenem a jodanisolem a získali příslušné produkty **17b** a **17c** (Schéma 27). V ^1H NMR spektrech byly dobře viditelné AA'BB' systémy *p*-substituovaných fenylů, a signál vodíku dvojné vazby (6.52 a 6.46 ppm). V ^{13}C NMR spektrech byly signály karbonylových uhlíků (174.0 a 209.2 ppm).



Látka	R	Výtěžek
17b	CH ₃	29 %
17c	OCH ₃	31 %

Schéma 27

Získané výsledky jsou v souladu s údaji v literatuře¹¹⁸ o průběhu Heckových reakcí allylových alkoholů, které poskytují karbonylové sloučeniny (Schéma 28).

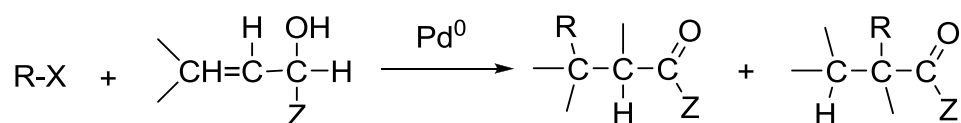


Schéma 28

Připravené deriváty cyklopent-2-enonu **17a-c** jsme připravili v množství dostatečném pro jejich biologické hodnocení, proto jsme tyto neplánované struktury zařadili mezi testované látky. Látky **17a-c** jsou antifungálně neaktivní (Tabulka 15). Cytostatický účinek nebyl pozorován na žádné z testovaných buněčných kultur.

Tabulka 15. Antifungální aktivita derivátů **17a-c** (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
17a	24h	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
17b	24h	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
17c	24h	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitaniae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách)

3.3.5.2. Pokusy o modifikaci karbonylové skupiny cyklopentendionového kruhu

Mimo výše uvedené reakce jsme se pokusili o transformaci karbonylů na jiné funkční skupiny. Nejprve jsme zkoumali proveditelnost adice anilinu na karbonyl látek **4** a **11**. Reakce vedla ke vzniku nedělitelné směsi mnoha látek, přičemž nejvyšší množství tvořily nezreagované výchozí látky (Schéma 29). Tuto modifikaci karbonylové skupiny jsme tedy opustili.

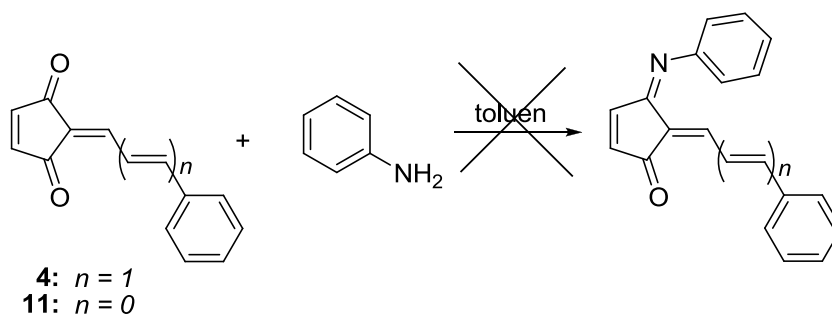


Schéma 29

Další možností obměny karbonylové skupiny je její redukce. Parciální redukce pouze jedné karbonylové skupiny cyklopent-4-en-1,3-dionu byla popsána v literatuře¹¹⁹. Jedná se o modifikovanou verzi Lucheho redukce¹²⁰. Redukce ovšem proběhla na obou karbonylových skupinách, jejichž signál v ¹³C NMR spektru chyběl. Izolovaný produkt byl směsí diastereomerů diolu **4d** (Schéma 30), která byla získána ve výtěžku 36 %.

Redukce derivátu **11** opět proběhla neselektivně a sloupcovou chromatografií jsme oddělili diol **11d** od směsi neredukované (**11**) a monoredukované formy **11m** (Schéma 30). Monoredukovaný derivát byl navíc směsí *E/Z* izomerů. Vzhledem k nejednoznačnému průběhu této reakce a nemožnosti oddělit monoredukovaný produkt od výchozí látky jsme se těmito obměnami přestali zabývat.

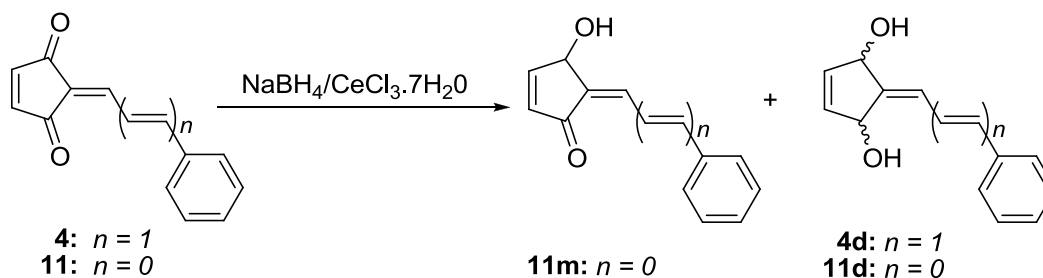
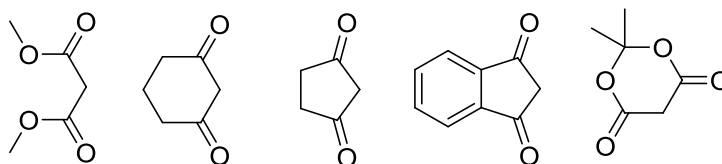


Schéma 30

Pokusy o modifikaci derivátů zajímavých z hlediska antifungální aktivity nebyly úspěšné. Navržené reakce zpravidla poskytovaly směsi mnoha látek, které často nebylo možné od sebe oddělit. Získané směsi tedy nebyly podrobeny biologickému hodnocení.

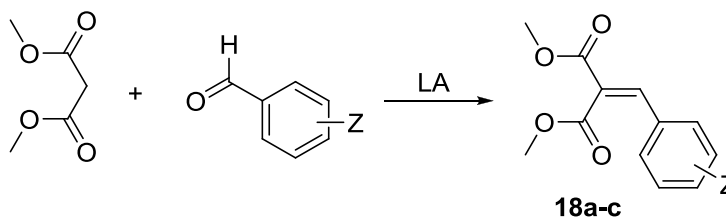
3.4. Knoevenagelova kondenzace dalších dionů s aldehydy a biologické hodnocení produktů

V další fázi práce jsme se rozhodli pro záměnu cyklopent-4-en-1,3-dionového kruhu a použili jsme vyvinutou metodu pro kondenzace dalších látek obsahujících v molekule 1,3-dionové resp. 1,3-diesterové seskupení s aldehydy. Zvolili jsme několik komerčně dostupných výchozích látek (Obrázek 3) a provedli jejich kondenzace s benzaldehydem a cinnamaldehydem. Tyto aldehydy jsme pro další reakce zvolili z důvodu nejvyšší antifungální aktivity látek **4** a **11**, získaných jejich kondenzací s cyklopent-4-en-1,3-dionem.



Obrázek 3

Dle optimalizovaných podmínek jsme provedli Knoevenagelovu kondenzaci dimethyl-malonátu s několika benzaldehydy (Schéma 31). Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo reakcí s benzaldehydem (**18a**), a to v přítomnosti $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ jako katalyzátoru. Výtěžky produktů **18b** a **18c** byly velice nízké (do 10 %), v jejich ^1H NMR spektrech byl patrný signál vodíku dvojné vazby (7.69 a 7.74 ppm). NMR spektra látky **18a** se shodovala s údaji uvedenými v literatuře¹²¹, popsané výtěžky se pohybovaly v rozmezí 91 - 95 %¹²². Pro látku **18b** literatura uvádí 77 – 90 %^{122,123}.



Látka	Z	$(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ Výtěžek	$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$ Výtěžek
18a	4-H	39 %	48 %
18b	4-Me	8 %	9 %
18c	4-Br	5 %	8 %

Schéma 31

Další pokus jsme provedli s furan-3-karbaldehydem (Schéma 32), reakci jsme katalyzovali $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$ a poté $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$. V tomto případě jsme dosáhli vyššího výtěžku produktu **18d** (14 %) za použití $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ oproti 7 % výtěžku při použití $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$. ^{13}C NMR spektrum je shodné s literaturou¹²⁴, popsáný výtěžek je 90 %.

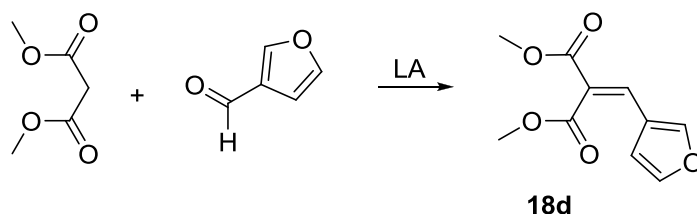


Schéma 32

Dále jsme za katalýzy $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ provedli kondenzaci dimethyl-malonátu s cinnamaldehydem (Schéma 33). Z reakční směsi byl izolován pomocí sloupcové chromatografie domnělý produkt v nízkém výtěžku. NMR analýza ukázala, že se pravděpodobně jednalo o nedělitelnou směs dvou izomerů **18e** a **18f** s výchozím dimethyl-malonátem. Téměř shodný R_f těchto tří látek bránil jejich separaci.

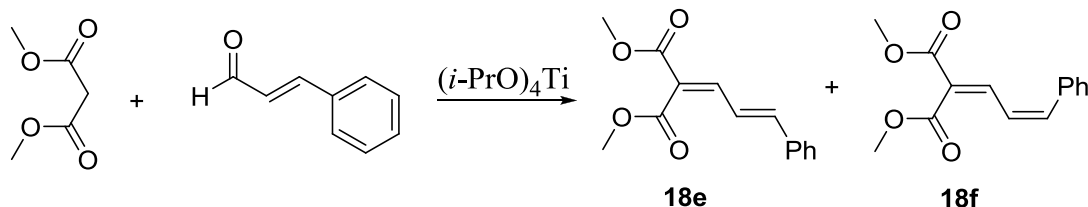


Schéma 33

Závěrem lze konstatovat, že Knoevenagelova kondenzace katalyzovaná $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$ a $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ je pro dimethyl-malonát nevhodná. Pro analogické reakce dimethyl-malonátu s karbonylovými sloučeninami lze použít bazický piperidin, dosažené výtěžky jsou vyšší (77 - 95 %) ^{125,126}. Zajímavá je kondenzace s furan-3-karbaldehydem, která poskytuje produkt ve výtěžku 90 % za katalýzy triflátem ytterbitým¹²⁴.

Produkt kondenzace s nesubstituovaným benzaldehydem **18a** jsme zařadili do série látek testovaných z hlediska antifungální aktivity. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 16 na konci této kapitoly.

Kondenzace cyklopentan-1,3-dionu s benzaldehydem a cinnamaldehydem neproběhla za námi vyvinutých podmínek ani při použití piperidinu.

Kondenzace cyklohexan-1,3-dionu s cinnamaldehydem poskytla za katalýzy $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ produkt **19** ve výtěžku 37 % (Schéma 34). ^{13}C NMR spektrum produktu se shodovalo s údaji uvedenými v literatuře¹¹⁰. Reakce s benzaldehydem byla provedena za stejných podmínek, přesto jsme opakovaně izolovali nedělitelnou směs produktů. Látka **19** byla hodnocena z hlediska antifungální aktivity. Vzhledem k tomu, že produkt **19** byl neaktivní (Tabulka 16), přestali jsme se kondenzacemi cyklohexan-1,3-dionu s aldehydy zabývat.

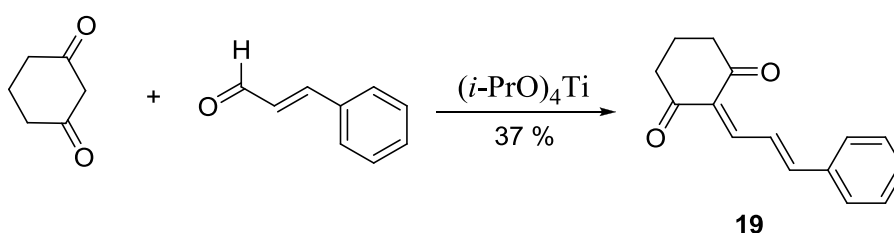


Schéma 34

Opět se ukázalo, že pro Knoevenagelovy kondenzace cyklohexan-1,3-dionu s aldehydy je bazická katalýza vhodnější. Při využití *L*-prolinu byl produkt **19** získán ve výtěžku 93 %¹¹⁰.

Indan-1,3-dion je látka citlivá na světlo, proto jsme jeho kondenzace s aldehydy prováděli za nepřístupu světla. Reakce s oběma aldehydy proběhly bez problémů za katalýzy $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$. Produkty **20a** a **20b** byly získány v uspokojivých výtěžcích (Schéma 35), přesto se pro kondenzace indan-1,3-dionu nabízí klasická možnost využití piperidinu jako katalyzátoru^{127,128}. V případě kondenzace s cinnamaldehydem jsme použitím Lewisovy kyseliny dosáhli malého zvýšení výtěžku ve srovnání s výtěžkem reakce katalyzované piperidinem (60 %)¹¹¹. ^{13}C NMR spektrum látky **20a** se shodovalo s údaji v literatuře¹²⁹. V ^1H NMR spektru látky **20b** byly dobře rozlišitelné dva signály vodíků dvojných vazeb (dublet dubletů 8.43 ppm, dublet 7.32 ppm), signál třetího vodíku dvojných vazeb byl překryt signály aromatických vodíků.

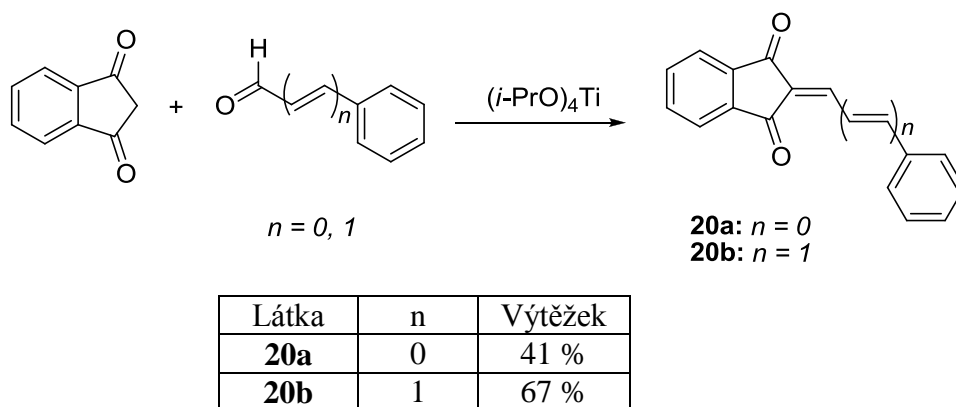


Schéma 35

Knoevenagelovy kondenzace Meldrumovy kyseliny s aldehydy lze obecně katalyzovat bázemi za současného odstraňování vody z reakce a použití nadbytku aldehydu, aby se předešlo tvorbě bis-aduktu Michaelovou adicí Meldrumovy kyseliny na methylenovou část další molekuly¹³⁰. Toto klasické provedení bylo překonáno provedením reakce bez katalyzátoru ve vodě při zahřátí na 75 °C¹³¹. Kondenzace Meldrumovy kyseliny s cinnamaldehydem za katalýzy $(i\text{-PrO})_4\text{Ti}$ v suchém THF vedla k produktu **21** ve výtěžku 79 % (Schéma 36). Ač byl výtěžek reakce poměrně vysoký, nepodařilo se překonat výtěžky kondenzací dosažených za jiných podmínek, např. kondenzace bez katalyzátoru ve vodě poskytuje produkt **21** ve výtěžku 96 %^{131,110}. ¹³C NMR spektrum látky **21** se shodovalo s údaji v literatuře¹³².

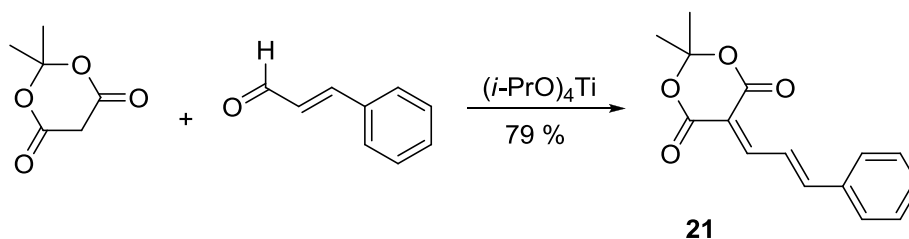


Schéma 36

Za stejných podmínek jsme se pokusili o kondenzaci Meldrumovy kyseliny s benzaldehydem. Průběh reakce jsme sledovali pomocí TLC, bylo zřejmé, že při reakci dochází k přeměně výchozích látek. Sloupcovou chromatografií jsme získali dále nedělitelnou směs produktů. Pravděpodobně se jednalo o směs výchozího aldehydu a produktu kondenzace s produktem Michaelovy adice Meldrumovy kyseliny na vzniklý alkyldenderivát (Schéma 37). Tento problém je široce diskutován v literatuře¹³³.

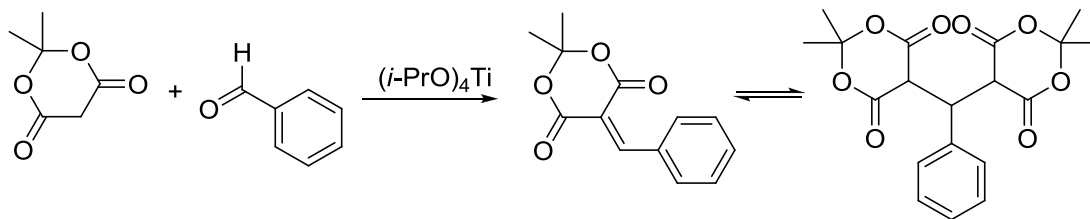


Schéma 37

Deriváty připravené katalytickou verzí Knoevenagelovy kondenzace aldehydů s látkami typu 1,3-diketonů byly využity pro biologické hodnocení jejich aktivity. Z tabulky 16 je zřejmé, že se jedná o látky se zanedbatelnou antifungální aktivitou nebo látky zcela neaktivní.

Tabulka 16. Antifungální aktivita derivátů **18a**, **19**, **20a**, **20b** a **21** v porovnání s koruskanonem A (IC_{80} [$\mu\text{mol.l}^{-1}$])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
18a	24h	31.25	125	250	250	250	250	125	250	250	62.5	62.5	31.25
	48h	62.5	250	500	500	500	250	250	250	500	125	125	125
19	24h	125	250	250	125	250	250	250	500	250	500	>500	31.25
	48h	250	500	500	500	500	>500	>500	500	500	>500	>500	125
20a	24h	125	125	>125	>125	125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	62.5
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	125
20b	24h	125	>125	>125	>125	>125	>125	125	>125	>125	125	>125	15.62
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	62.5
21	24h	31.25	31.25	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	125	62.5	250	>500	15.62
	48h	125	125	62.5	125	250	125	250	250	125	500	>500	31.25
KorA^m	24h	0.98	NT ⁿ	NT	NT	125	3.91	125	NT	0.98	31.25	31.25	3.91
	48h	3.91	NT	NT	NT	250	7.81	125	NT	7.81	250	250	7.81

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/1, ^h*C. lusitaniae* 2446/1, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách), ^mkoruskanon A, ⁿnebylo testováno

Tabulka 17 shrnuje výsledky hodnocení cytostatické aktivity. 2-(3-Fenylprop-2-enyliden)derivát cyklohexan-1,3-dionu **19** a indan-1,3-dionu **20b** působí selektivně cytostaticky na linii CCRF-CEM. Benzylidenderivát indan-1,3-dionu **20a** nevykazuje cytostatický efekt. Látky **18a** a **21** jsou cytostatické vůči většině testovaných buněčných linií. Významné je působení derivátu **21** na buňky kolorektálního karcinomu, látka působí nejen na citlivou kulturu Colo 201, ale i na relativně rezistentní linii HT-29.

Tabulka 17. Cytostatická aktivita derivátů **18a**, **19**, **20a**, **20b** a **21** (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

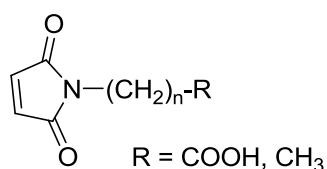
Látka	<i>L1210</i> ^a	<i>HL 60</i> ^b	<i>HeLa S3</i> ^c	<i>CCRF-CEM</i> ^d	<i>HT-29</i> ^e	<i>Colo 201</i> ^f
18a	8.7 ± 0.1	6.8 ± 0.5	5.3 ± 0.3	2.6 ± 0.1	NA ^g	NA
19	NA	NA	NA	8.4 ± 0.5	NA	NA
20a	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20b	NA	NA	NA	10.8 ± 1.4	NA	NA
21	10.9 ± 0.4	NA	6.3 ± 0.5	1.4 ± 0.1	5.7 ± 0.3	3.7 ± 0.2

^a*L1210* (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^b*HL-60* (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^c*HeLa S3* (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^d*CCRF-CEM* (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^e*HT-29* (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^f*Colo 201* (ECACC 87091201) – karcinom tlustého střeva, ^gneaktivní

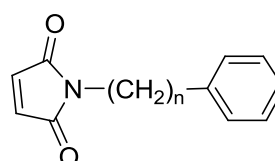
Metoda Knoevenagelovy kondenzace za katalýzy Lewisovou kyselinou vyvinutá pro reakce cyklopent-4-en-1,3-dionu s aldehydy je obecně nevhodná pro kondenzace dalších látek typu 1,3-diketonu s karbonylovými sloučeninami. Je-li možné kondenzaci provádět za bazické katalýzy, je tato metoda vhodnější, neboť zpravidla poskytuje vyšší výtěžky produktů. Pouze v případě substrátů citlivých na bazické podmínky najde uplatnění reakce katalyzovaná Lewisovou kyselinou. Také je zřejmé, že ve většině případů dochází ke kondenzaci 1,3-diketonu snadněji s cinnamaldehydem. Reakce s benzaldehydem byly často neproveditelné nebo vedly k nedělitelné směsi produktů.

3.5. Syntéza *N*-substituovaných maleinimidů a jejich biologické hodnocení

Vzhledem k výsledkům stabilitní studie látek s 2-alkyliden-1,3-dioxoseskupením (kapitola 3.6.5.) jsme se rozhodli pro přípravu derivátů stabilnějších ve vodném prostředí a náhradu alkylidenového řetězce v poloze 2 alkylovým. Jako nejjednodušší řešení se jevila příprava série *N*-substituovaných maleinimidů. Řada *N*-substituovaných maleinimidů má zajímavé biologické účinky. *N*-karboxyalkylmaleinimidy a některé *N*-alkylmaleinimidy jsou inhibitory prostaglandin-endoperoxid syntetasy (PGH), zodpovědné za první dva kroky biosyntézy prostaglandinu¹³⁴. Je také známo, že *N*-fenyl- a *N*-fenylalkylmaleinimidy mají antifungální účinek vůči kmenům *Candida* (Obrázek 4). Za tento účinek zodpovídá maleinimidový kruh, jehož otevření vede ke ztrátě antifungální aktivity. Možnost chemické hydrolýzy maleinimidového kruhu ve vodném prostředí je zřejmá (i když za fyziologických podmínek málo pravděpodobná), proto byla provedena stabilitní studie. UV spektra maleinimidů ve vodném médiu používaném při testování antifungální aktivity byla měřena v čase od 2 do 72 hod od přípravy roztoku. Bylo prokázáno, že k hydrolýze maleinimidového kruhu nedochází¹³⁵. Od *N*-substituovaných maleinimidů jsme tedy předem očekávali antifungální účinek, zajímal nás vliv různé *N*-substituce na tuto aktivitu a také účinnost vůči ostatním kmenům hub z námi testovaného souboru.



Inhibice syntézy prostaglandinů



Antifungální efekt vůči kmenu *Candida*

Obrázek 4

Pokusy o přímou *N*-alkylaci maleinimidu alkylhalogenidem v DMF se nezdařily (Schéma 38). V literatuře byly nalezeny pouze metody přípravy stříbrných a měďných solí maleinimidu, které umožňují alkylaci pomocí alkylbromidů^{136,137}. Omezení plynoucí ze stability těchto solí a použitelnost jen pro přípravu derivátů s jednoduchým alkylovým řetězcem podnítilo hledání dalších metod. Efektivní způsob *N*-alkylace maleinimidů

je založen na aplikaci Mitsunobuovy reakce^{138,139}. Alternativní možnost přípravy *N*-substituovaných maleinimidů představuje reakce maleinanhydridu s příslušným aminem za přídavku ledové kyseliny octové, vzniklý meziproduct je následně cyklizován¹³⁴.

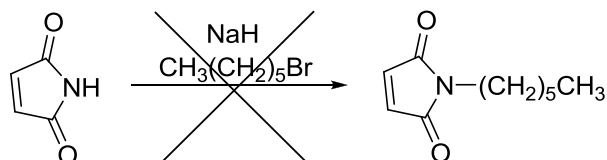
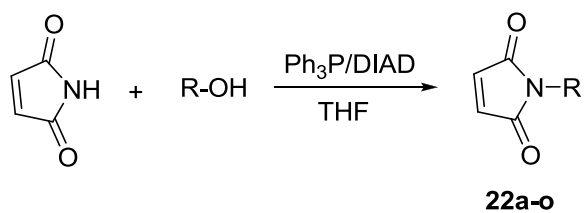


Schéma 38

Zvolili jsme *N*-alkylaci maleinimidu za podmínek Mitsunobuovy reakce, ve které je hydroxylová skupina převedena na dobrou odstupující skupinu reakcí s *in situ* generovaným ylidem (z trifenylfosfinu a dialkylazodikarboxylátu - DIAD nebo DEAD). Alkylace jsme prováděli způsobem optimalizovaným po podrobném zkoumání průběhu reakce za různých podmínek¹³⁹. Reakce byla úspěšně použita při syntéze mnoha *N*-alkylmaleinimidů^{140,141}.

Popsaným způsobem jsme připravili sérii *N*-substituovaných maleinimidů ve výtěžcích 30 - 77 % (Schéma 39). Dusík pětičlenného maleinimidového cyklu byl substituován různými alkyly, alkenyly, cykloalkyly, benzylem, 2-fenylethylem a 2-indanylem. V ¹H NMR spektrech byl zřejmý signál vodíků dvojné vazby maleinimidového kruhu, který se pohyboval v rozmezí 6.61-6.71 ppm, ve většině případů se jednalo o singlet. U derivátů **22a-e** a **22i** byl patrný signál methylenové skupiny navázané na atom dusíku (triplet, 3.47-3.53 ppm). NMR spektra známých derivátů se shodovala s údaji v literatuře^{138,139,142,143}.



Látka	R	Výtěžek
22a	-(CH ₂) ₄ CH ₃	57 %
22b	-(CH ₂) ₅ CH ₃	77 %
22c	-(CH ₂) ₇ CH ₃	63 %
22d	-(CH ₂) ₉ CH ₃	35 %
22e	-(CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂	48 %
22f	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH} \\ \\ (\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \end{array}$	30 %
22g	$\begin{array}{c} \text{=CH}_2 \\ \\ -\text{CH} \\ \\ (\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \end{array}$	48 %
22h	$\begin{array}{c} \text{=CH}_2 \\ \\ -(\text{CH}_2)_8 \end{array}$	42 %
22i		50 %
22j		35 %
22k		45 %
22l		67 %
22m		49 %
22n		68 %
22o		36 %

Schéma 39

Antifungální aktivita připravených derivátů je shrnuta v tabulce 18. Aktivita látek byla porovnána s aktivitou komerčně dostupného *N*-methylmaleinimidu **22**, a s aktivitami koruskanonu A a používaných léčiv. Nejvyšší účinek vůči kmenu *C. albicans* vykazují *N*-cyklooktyl-, *N*-3-oktyl- a *N*-2-cyklohexylethylderiváty (**22k**, **22f**, **22l**), jejich aktivita je srovnatelná s nejúčinnějšími deriváty koruskanonu A (**4**, **11**) a s koruskanonem samotným. Zajímavý je účinek *N*-substituovaných maleinimidů na kmen *Aspergillus*

fumigatus, většina derivátů vykazuje mírný účinek ($MIC = 7.81 \mu\text{mol.l}^{-1}$), kterým ovšem převyšují aktivitu koruskanonu A. Nejaktivnější vůči tomuto relativně rezistentnímu kmenu je *N*-2-indanylderivát **22o** ($MIC = 3.9 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

V řadě *N*-alkylderivátů je vidět, že antifungální aktivita vůči *C. albicans* s délkou alkylového řetězce roste. V případě substituce šestiuhlíkatým až desetiuhlíkatým alkylem je dosaženo téměř stejné aktivity derivátů. Rozvětvení alkylového substituentu na konci řetězce (**22e**) vede k poklesu aktivity. Rozvětvení alkylového řetězce v místě vazby na dusík zvyšuje aktivitu získaného derivátu (**22f**, **22g**). Zavedení dvojné vazby do alkylového řetězce nemá na aktivitu velký vliv, nasycené i nenasycené deriváty mají téměř shodnou aktivitu. Pokud jde o aktivitu vůči *A. fumigatus*, nejlepších výsledků bylo dosaženo s *N*-pentyl- (**22a**) a *N*-hexyl- (**22b**) derivátem, prodlužování či zkracování řetězce je nežádoucí.

Z látek substituovaných cyklickým alkylem dosahuje nejvyšší aktivity vůči *C. albicans* *N*-cyklooktylderivát **22k**, vůči *A. fumigatus* je stejně aktivní látka s pětiuhlíkatým cyklem na dusíku maleinimidu **22i**. Aktivita *N*-fenylethylmaleinimidu **22m** a *N*-benzylmaleinimidu **22n** vůči *C. albicans* je stejná. Potvrdilo se tak tvrzení, že aktivita *N*-fenylalkylmaleinimidů nezávisí na délce alkylového řetězce mezi atomem dusíku a benzenovým kruhem¹³⁵. Náhrada aromatického kruhu derivátu **22m** za nasycený cyklohexan vedoucí k látce **22l** má příznivý vliv na antifungální aktivitu a vede k jejímu zvýšení.

Tabulka 18. Antifungální aktivita látek **22** a **22a-o** v porovnání s koruskanonem A, flukonazolem (IC₈₀ [μmol.l⁻¹]) a amfotericinem B (IC₉₅ [μmol.l⁻¹])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
22	24h	62.5	62.5	7.81	15.62	15.62	125	125	15.62	62.5	62.5	250	7.81
	48h	125	62.5	15.62	31.25	62.5	125	500	15.62	62.5	250	500	15.62
22a	24h	15.62	15.62	7.81	3.9	7.81	62.5	7.81	7.81	0.98	7.81	>500	1.95
	48h	62.5	62.5	15.62	7.81	7.81	62.5	31.25	15.62	1.95	31.25	>500	3.9
22b	24h	3.9	7.81	7.81	3.9	3.9	31.25	7.81	7.81	0.98	7.81	>500	1.95
	48h	31.25	31.25	15.62	7.81	7.81	62.5	15.62	7.81	1.95	15.62	>500	3.9
22c	24h	7.81	15.62	7.81	7.81	7.81	31.25	7.81	7.81	3.9	15.62	125	1.95
	48h	15.62	15.62	31.25	15.62	15.62	62.5	15.62	15.62	7.81	31.25	500	7.81
22d	24h	3.9	7.81	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	1.95	15.62	31.25	0.98
	48h	7.81	15.62	7.81	7.81	7.81	31.25	3.9	15.62	3.9	62.5	62.5	3.9
22e	24h	31.25	31.25	7.81	3.9	7.81	62.5	15.62	15.62	7.81	31.25	>500	3.9
	48h	31.25	62.5	31.25	7.81	15.62	62.5	31.25	31.25	31.25	62.5	>500	3.9
22f	24h	1.95	3.9	15.62	3.9	3.9	31.25	15.62	15.62	0.98	15.62	>500	3.9
	48h	7.81	15.62	31.25	7.81	7.81	250	125	125	3.9	62.5	>500	3.9
22g	24h	3.9	7.81	15.62	3.9	3.9	62.5	3.9	15.62	1.95	15.62	>500	3.9
	48h	15.62	15.62	31.25	7.81	7.81	125	15.62	31.25	3.9	125	>500	3.9
22h	24h	3.9	7.81	3.9	3.9	3.9	15.62	15.62	3.9	3.9	31.25	62.5	0.98
	48h	15.62	15.62	7.8	7.81	3.9	15.62	31.25	31.25	3.9	31.25	125	0.98
22i	24h	7.81	15.62	3.9	31.25	0.98	1.95	3.9	3.9	1.95	7.81	>500	3.9
	48h	15.62	31.25	7.81	31.25	1.95	7.81	7.81	3.9	7.81	62.5	>500	3.9
22j	24h	31.25	15.62	7.81	3.9	7.81	31.25	7.81	15.62	7.81	15.62	>500	1.98
	48h	125	62.5	31.25	7.81	15.62	62.5	31.25	31.25	31.25	31.25	>500	3.9
22k	24h	1.95	7.81	3.9	15.62	0.98	1.95	1.95	3.9	1.95	7.81	500	1.95
	48h	15.62	15.62	7.81	31.25	1.95	7.81	7.81	7.81	3.9	15.62	>500	7.81
22l	24h	1.95	3.9	3.9	31.25	1.95	1.95	3.9	3.9	1.95	7.81	500	3.9
	48h	7.81	15.62	15.62	31.25	3.9	7.81	7.81	7.81	3.9	31.25	>500	3.9
22m	24h	7.81	31.25	7.81	7.81	7.81	31.25	15.62	15.62	3.9	31.25	250	3.9
	48h	15.62	62.5	15.62	15.62	15.62	125	62.5	15.62	15.62	31.25	500	7.81
22n	24h	7.81	62.5	62.5	7.81	7.81	3.9	31.25	15.62	31.25	15.62	>500	1.95
	48h	7.81	62.5	125	7.81	7.81	7.81	31.25	31.25	31.25	125	>500	1.95
22o	24h	3.9	7.81	3.9	31.25	0.98	1.95	3.9	3.9	0.98	3.9	500	1.95
	48h	15.62	15.62	7.81	125	1.95	7.81	7.81	3.9	3.9	15.62	>500	1.95
KorA^m	24h	0.98	NT ⁿ	NT	NT	125	3.91	125	NT	0.98	31.25	31.25	3.91
	48h	3.91	NT	NT	NT	250	7.81	125	NT	7.81	250	250	7.81
AmB^o	24h	0.03	0.07	0.03	0.14	0.14	0.09	0.03	0.14	1.08	0.18	1.08	1.08
	48h	0.06	0.14	0.14	0.14	0.18	0.11	0.09	0.27	1.08	0.23	2.16	1.08
FLU^p	24h	1	0.8	6.5	>50	>50	3	22	3.3	4	>50	>50	17
	48h	2	3.3	13	>50	>50	5	>50	3.3	9	>50	>50	26

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitanae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách), ^mkoruskanon A, ⁿnebylo testováno, ^oamfotericin B, ^pflukonazol

Látky byly podrobeny testování na antibakteriální aktivitu. Většina látek je vůči testovaným kmenům neaktivní (Tabulka 19). Pouze v případě *N*-(dec-9-enyl)- **22h** a *N*-decylmaleinimidu **22d** jsme zjistili zajímavý účinek na bakteriální kmen *S. aureus*. Aktivita derivátu **22d** proti tomuto kmenu je srovnatelná s bacitracinem.

Tabulka 19. Antibakteriální aktivita derivátů **22**, **22a-o** v porovnání se standardy používaných antibiotik (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	Čas	SA1 ^a	SA2 ^b	SE ^c	EF ^d	EC ^e	KP ^f	KPE ^g	PA ^h
22	24 h	250	250	500	>500	62.5	500	500	31.25
	48 h	500	500	500	>500	250	500	500	62.5
22a	24 h	250	500	250	500	>500	>500	>500	125
	48 h	500	>500	500	>500	>500	>500	>500	250
22b	24 h	125	250	62.5	500	>500	>500	>500	125
	48 h	500	500	250	>500	>500	>500	>500	250
22c	24 h	125	250	125	125	>500	>500	>500	>500
	48 h	125	250	250	125	>500	>500	>500	>500
22d	24 h	7.81	15.62	15.62	15.62	>500	>500	>500	>500
	48 h	15.62	15.62	15.62	15.62	>500	>500	>500	>500
22e	24 h	500	500	250	500	>500	>500	>500	>500
	48 h	500	>500	250	>500	>500	>500	>500	>500
22f	24 h	250	500	125	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
22g	24 h	250	500	125	500	>500	>500	>500	500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
22h	24 h	15.62	62.5	15.62	31.25	>500	>500	>500	>500
	48 h	62.5	125	62.5	62.5	>500	>500	>500	>500
22i	24 h	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	48 h	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
22j	24 h	500	500	250	500	500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
22k	24 h	125	125	62.5	250	>500	>500	>500	>500
	48 h	500	500	250	500	>500	>500	>500	>500
22l	24 h	125	125	62.5	250	>500	>500	>500	>500
	48 h	250	500	125	500	>500	>500	>500	>500
22m	24 h	250	500	250	500	>500	>500	>500	>500
	48 h	500	500	500	500	>500	>500	>500	>500
22n	24 h	250	500	125	500	500	>500	>500	>500
	48 h	500	>500	500	500	>500	>500	>500	>500
22o	24 h	62.5	125	62.5	250	>500	>500	>500	>500
	48 h	500	500	250	500	>500	>500	>500	>500

Pokračování tabulky 19. Antibakteriální aktivita používaných antibiotik (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	Čas	SA1 ^a	SA2 ^b	SE ^c	EF ^d	EC ^e	KP ^f	KPE ^g	PA ^h
Neom ⁱ	24 h	1.95	3.9	7.81	125	1.95	0.98	1.95	7.81
	48 h	3.9	7.81	15.62	125	1.95	0.98	1.95	15.62
Bac ^j	24 h	7.81	7.81	15.62	31.25	>500	>500	>500	>500
	48 h	15.62	31.25	31.25	62.5	>500	>500	>500	>500
Phen ^k	24 h	0.12	62.5	125	3.9	250	500	>500	>500
	48 h	0.12	125	250	7.81	500	500	>500	>500
Cipr ^l	24 h	0.24	250	250	0.98	0.12	0.12	250	0.12
	48 h	0.49	500	250	0.98	0.12	0.12	250	0.49

^a*Staphylococcus aureus* CCM 4516/0,8 ^b*S. aureus* meticilin rezistentní H 5996/08, ^c*S. epidermidis* H 6966/08, ^d*Enterococcus* sp. J 14365/08, ^e*Escherichia coli* CCM4517, ^f*Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, ^g*K. pneumoniae* ESBL pozitivní J 14368/08, ^h*Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961, ⁱNeomycin, ^jBacitracin, ^kPhenoxymethyl penicilin, ^lCiprofloxacin

V tabulce 20 jsou shrnuty výsledky hodnocení cytostatické aktivity *N*-substituovaných maleinimidů **22**, **22a-o**. *N*-oktyl- (**22c**) a *N*-decyl- (**22d**) maleinimidy jsou výjimečné, jedná se o cytostaticky neaktivní látky. Jejich mírný antifungální efekt vůči *C. albicans* (MIC = 7.81 a 3.9 μmol.l⁻¹) je tedy separován od cytostatického působení. Nelze ale opomenout aktivitu *N*-decylderivátu **22d** vůči bakteriálnímu kmenu *S. aureus*. Všechny ostatní deriváty mají antiproliferační efekt na leukemické buňky CCRF-CEM, v některých případech je působení rozšířeno na buňky kolorektálního karcinomu Colo 201 a někdy na i relativně rezistentní linii HT-29. Působení na buňky HT-29 je významné a deriváty **22e, j, m, n, o** by se mohly stát předmětem dalšího výzkumu z hlediska vývoje antineoplastik. Obzvláště významný je účinek *N*-benzylmaleinimidu **22n**, jehož IC₅₀ je nižší než 1 μmol.l⁻¹

Tabulka 20. Cytostatická aktivita *N*-substituovaných maleinimidů (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

Látka	<i>L1210</i> ^a	<i>HL 60</i> ^b	<i>HeLa S3</i> ^c	<i>CCRF-CEM</i> ^d	<i>HT-29</i> ^e	<i>Colo 201</i> ^f
22	NA ^g	NA	NA	4.41 ± 0.28	2.89 ± 0.17	0.64 ± 0.05
22a	NA	NA	NA	1.73 ± 0.21	NA	1.45 ± 0.1
22b	NA	NA	NA	8.23 ± 0.85	NA	2.02 ± 0.12
22c	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22d	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22e	NA	NA	NA	3.47 ± 0.31	3.44 ± 0.21	2.19 ± 0.13
22f	NA	NA	NA	2.14 ± 0.20	NA	2.36 ± 0.14
22g	NA	NA	NA	2.08 ± 0.088	NA	1.19 ± 0.07
22h	NA	NA	NA	6.73 ± 0.30	NA	NA
22i	NA	NA	NA	4.23 ± 0.43	NA	0.55 ± 0.03
22j	NA	NA	NA	3.29 ± 0.16	3.99 ± 0.24	2.04 ± 0.12
22k	NA	NA	NA	2.61 ± 0.15	NA	2.02 ± 0.12
22l	NA	NA	NA	1.47 ± 0.064	NA	1.16 ± 0.07
22m	NA	NA	NA	3.26 ± 0.32	4.33 ± 0.26	0.58 ± 0.04
22n	NA	NA	NA	6.63 ± 0.48	0.60 ± 0.04	0.67 ± 0.04
22o	NA	NA	NA	4.81 ± 0.83	2.75 ± 0.17	1.91 ± 0.11
KorA ^h	3.8 ± 0.2	4.5 ± 0.3	NT ⁱ	3.6 ± 0.2	NT	NT

^a*L1210* (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^b*HL-60* (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^c*HeLa S3* (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^d*CCRF-CEM* (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^e*HT-29* (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^f*Colo 201* (ECACC 87091201) – karcinom tlustého střeva, ^gneaktivní, ^hkoruskanon A, ⁱnetestováno

Z těchto výsledků je zřejmé, že v případě *N*-substituovaných maleinimidů nelze antifungální a cytostatický účinek oddělit, podobný závěr byl učiněn z výsledků biologického hodnocení derivátů cyklopent-4-en-1,3-dionu. Nutno ovšem podotknout, že antifungální efekt koruskanonu A je také spojen s cytostatickým účinkem vůči testovaným nádorovým buňkám.

3.6. Další biologická hodnocení

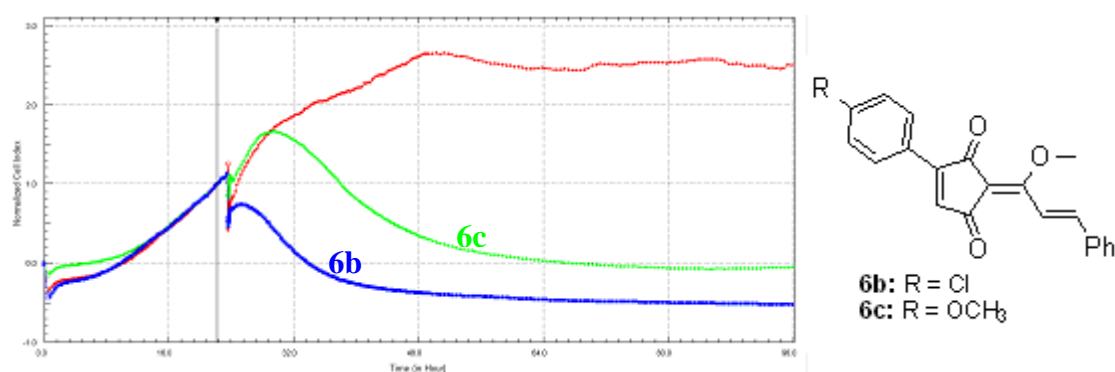
3.6.1. Impedanční test: analýza buněčné proliferace v reálném čase

Téměř všechny připravené látky byly podrobeny impedančnímu testu (na přístroji xCELLigence), který umožňuje sledování buněk (dynamické procesy v buněčné populaci, např. buněčná adheze či proliferace) v reálném čase zcela neinvazivně, bez použití jakéhokoliv barvení či značení buněk. Jedná se o metodu sloužící k odhadu možného mechanismu účinku testovaných nízkomolekulárních látek.

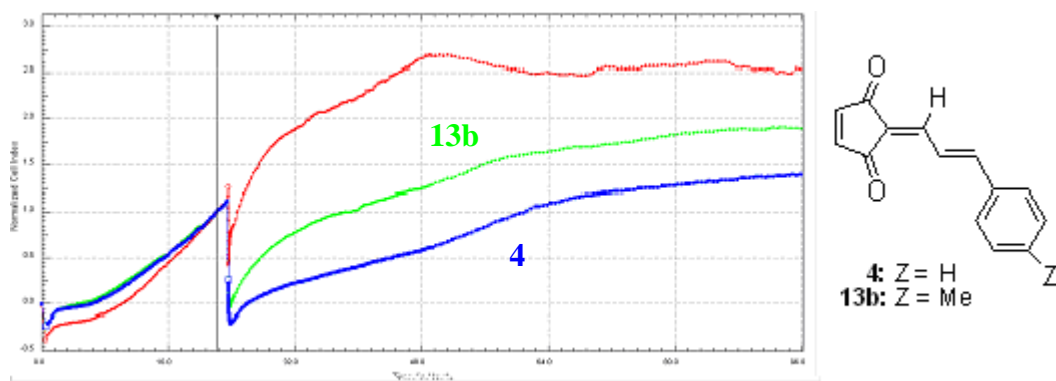
Podstata experimentu spočívá v kontinuálním monitorování buněk přisedlých na dno kultivačních jamek speciální destičky (E-plate), kde každá jamka má na svém dně zlaté mikroelektrody. Princip detekce je založený na měření impedance (elektrického odporu) na dně kultivační jamky. Čím silněji buňky adherují nebo čím více buněk je přisedlých na dně jamky, tím vyšší je naměřená impedance. Míra impedance je vyjádřena v bezrozměrných jednotkách tzv. buněčného indexu. Přístroj lze využít také pro sledování viability buněk, cytotoxického účinku látek na buňky a aktivace buněčných receptorů. Přidání látky (v průběhu růstu buněk za stálého monitorování přístrojem), která ovlivňuje stav buňky, se projeví jako změna časového průběhu měřené impedance. Užitečnost této metody byla prokázána otestováním knihovny nízkomolekulárních látek se známým mechanismem účinku (např. fenothiazin, hydrokortizon, kolchicin, kamptotecin, emetin). Testované látky byly rozděleny do skupin dle pozorovaného efektu na buněčnou proliferaci a bylo zřejmé, že látky se stejným mechanismem účinku mají stejný vliv na proliferaci buněk (stejný tvar křivky)¹⁴⁴.

Tato analýza buněčné proliferace v reálném čase byla provedena na adherující buněčné linii HEK293 (lidské embryonální ledvinové buňky). Buňky byly kultivovány a v průběhu jejich růstu byly za stálého monitorování přidány testované látky v koncentraci 10 μ M. Přístroj zaznamenal odezvu buněk na tento stimul měřením impedance. Výstupem byly křivky, z jejichž tvarů je možné usuzovat kinetiku působení látek příp. potenciální mechanismus jejich účinku (cytostatický, antimitotický, poškození DNA, vliv na buněčné receptory). Ze souboru 113 testovaných látek (41 derivátů koruskanonu A) vykazovalo 6 derivátů cyklopent-4-en-1,3-dionu a 3 *N*-substituované maleinimidy zajímavou bioaktivitu. Křivky testovaných látek byly porovnány s křivkami otestovaných známých látek s prokázaným mechanismem účinku.

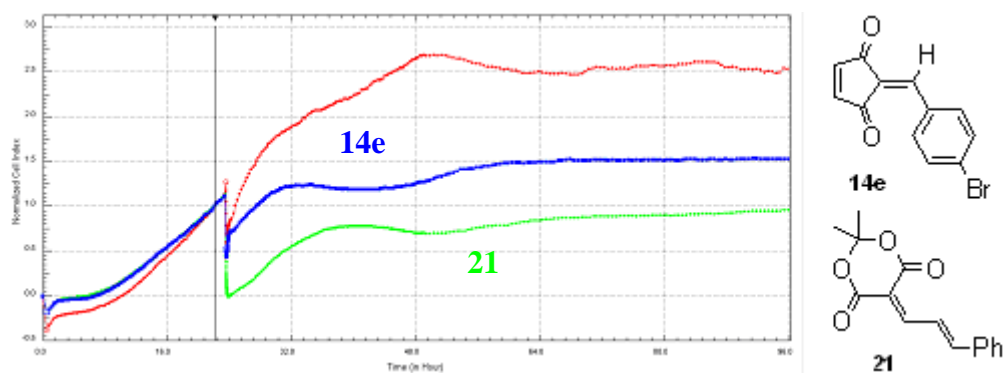
Na obrázku 5, obrázku 6 a obrázku 7 jsou vidět křivky znázorňující buněčný index naměřený v čase v porovnání s kontrolou (červená křivka). Přidání látek vyznačuje černá čára se šipkou (v čase 22.4 hod). Obrázek 8 ukazuje vliv známých látek s určitým mechanismem účinku na buněčnou proliferaci v čase. Je zřejmé, že strukturně podobné deriváty koruskanonu A **6b** a **6c** (liší se pouze *p*-substitucí fenylu na cyklopent-4-en-1,3-dionovém kruhu) ovlivňují buňky stejným způsobem. Pravděpodobným mechanismem účinku by mohlo být poškození DNA (Obrázek 8, růžová křivka, ze známých látek se takto profiloval např. kamptotecin¹⁴⁴). Látky **4** a **13b** jsou opět strukturně blízké deriváty získané kondenzací s cinnamaldehydy (**13b** je *p*-methylanalog látky **4**), svým působením na proliferaci buněk se nejvíce podobají látkám s cytostatickým účinkem (Obrázek 8, zelená křivka). Látky opravdu tento efekt na jednu buněčnou linii mají (**4** vůči leukemickým buňkám CCRF-CEM, **13b** vůči linii karcinomu děložního čípku Hela S3, viz tabulka 10 v kapitole 3.3.2.), ostatní deriváty tohoto typu (**13a**, **13c**) jsou zcela neaktivní. Dále se zajímavě profilovaly látky **14e** a **21**. Z obrázku 7 je zřejmé, že látky způsobily nejprve mírný pokles růstu buněk a po následném mírném vzrůstu jejich proliferace stagnovala. Takový efekt se podobá jednak cytostatickým látkám, ale dalo by se spekulovat také o antimitotickém účinku (Obrázek 8, žlutá křivka, takto se profiloval např. kolchicin – látka destabilizující mikrotubuly tzn. inhibující polymeraci tubulinu, ale také paklitaxel, který stabilizuje mikrotubuly a tím brání jejich depolymeraci¹⁴⁴).



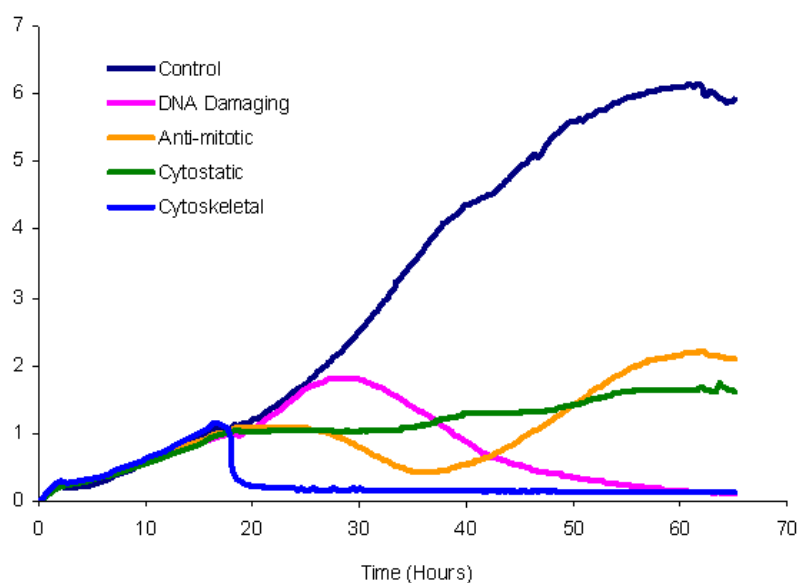
Obrázek 5. Proliferace buněk HEK293 po přidání látek **6b** a **6c** v porovnání s kontrolou (červená křivka)



Obrázek 6. Proliferace buněk HEK293 po přidání látek **4** a **13b** v porovnání s kontrolou (červená křivka)

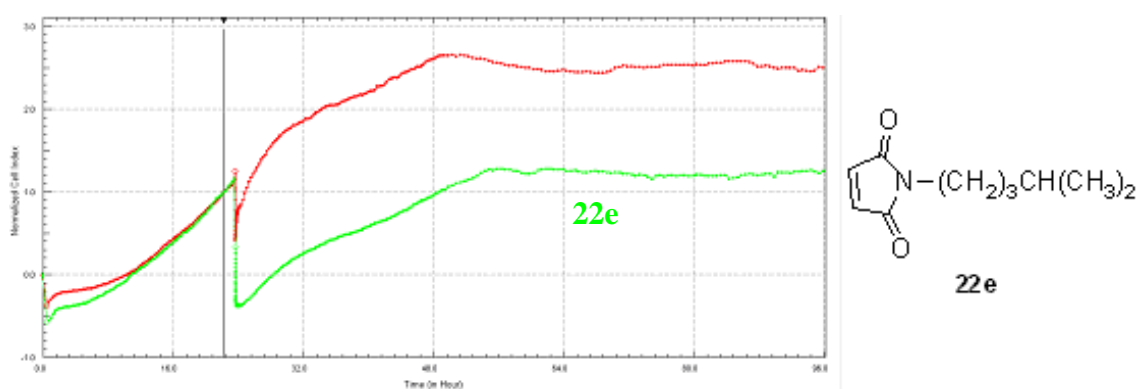


Obrázek 7. Proliferace buněk HEK293 po přidání látek **14e** a **21** v porovnání s kontrolou (červená křivka)

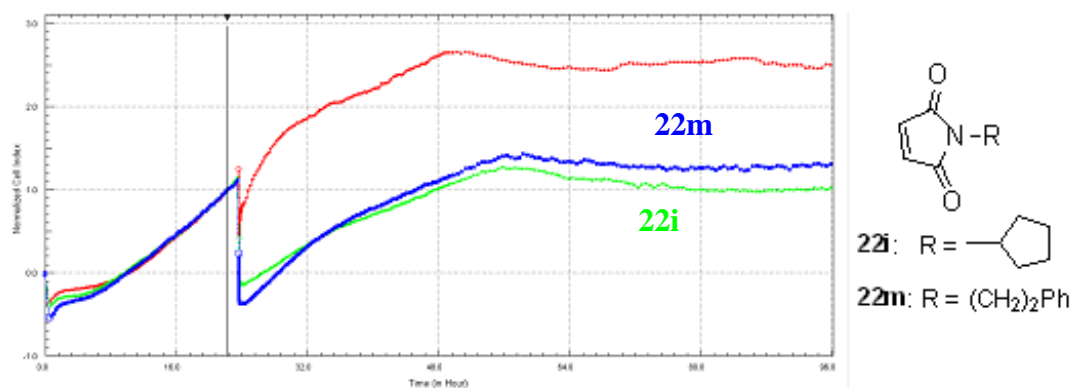


Obrázek 8. Buněčná proliferace po přidání látek se známým mechanismem účinku

Obrázek 9 a obrázek 10 ukazují vliv derivátů maleinimidu na proliferaci buněk HEK293. Ze všech otestovaných látek se profilovaly deriváty **22e**, **22i** a **22m**. Je patrné, že látky působí takovým způsobem, že pouze zpomalují proliferaci buněk. Tvar křivky je v porovnání s kontrolou (červená křivka) téměř nezměněn, jen množství buněk je nižší. Tento efekt jsme nepovažovali za významný. Mezi tímto výsledkem a antifungální (Tabulka 18) či cytostatickou aktivitou (Tabulka 20) látek nebyly nalezeny žádné korelace (tyto tři deriváty mají antiproliferační efekt, stejně tak ale další *N*-substituované maleinimidy, které se v impedančním testu neprofilovaly).



Obrázek 9. Proliferace buněk HEK293 po přidání derivátu **22e** v porovnání s kontrolou (červená křivka)



Obrázek 10. Proliferace buněk HEK293 po přidání *N*-substituovaných maleinimidů **22i** a **22m** v porovnání s kontrolou (červená křivka)

3.6.2. Test indukce kaspas

Výše uvedené výsledky impedančního testu ve spojení s výsledky testování cytostatické aktivity nás přivedly k myšlence, že některé látky by mohly v buňkách indukovat apoptosu (programovaná buněčná smrt). Vlastní proces apoptosy nastává proteolysou intracelulárních bílkovin pro buňku životně důležitých (proteiny cytoskeletu a jádra). Enzymy, které tuto proteolysu katalyzují (nebo aktivují jiné efektorové molekuly), se nazývají kaspasy. Kaspasy se nalézají v cytosolu v inaktivní formě, až dosud jich bylo identifikováno 14. Klasifikují se dle funkce na iniciační (kaspasa 8, 9 a 10), které převádí různé vnější signály na proteolytickou aktivitu (aktivace této dvoukrokové kaskády), a efektorové (kaspasa 3, 6 a 7), které katalyzují vlastní štěpení proteinů během apoptosy (po aktivaci iniciačními kaspasami)^{145,146}.

Pro potvrzení či vyvrácení možnosti, že některé látky vyvolávají apoptosu, byla zvolena metoda sledující aktivitu nejvýznamnějších efektorových kaspas 3 a 7 (Caspase-Glo[®] 3/7 Assay systém). Jedná se o jednoduchou a vysoce citlivou luminiscenční metodu umožňující provedení v 96 jamkové destičce. Test obsahuje proluminiscenční substrát kaspasy 3/7 a odpovídající termostabilní luciferasu v pufru. Buňky jsou 4 hodiny inkubovány s roztokem testované látky a poté je přidán tento reagent. Pomocí kaspas 3/7 je uvolněn substrát pro luciferasu (amino-luciferin) a vzniká luminiscence, která je měřena. Luminiscence je tedy úměrná aktivitě kaspas¹⁴⁷.

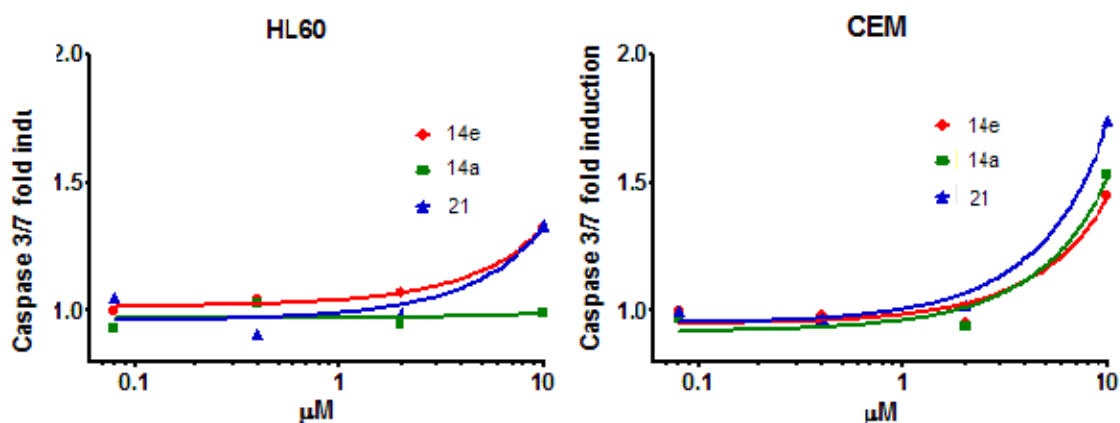
Testu na indukci kaspas byly podrobeny výše uvedené látky, které se profilyovaly v xCELLigence testu zajímavými křivkami. Rovněž jsme zohlednili strukturní podobnost dalších derivátů a fakt, že většina látek vykazovala cytostatický účinek vůči některé z testovaných buněčných linií. Celkem tedy bylo otestováno 16 látek (**6b**, **6c**, **4**, **11**, **13a-c**, **14a-f**, **15a-b**, **21**), a to na buněčných liniích, jejichž proliferaci látky nejčastěji inhibovaly tj. CCRF-CEM a HL-60. Současně byla vyhodnocena cytostatická aktivita testovaných látek (CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay) fluorimetrickou metodou založenou na schopnosti viabilních buněk konvertovat redoxní barvivo resazurin na fluorescenční resorufin.

Většina látek nevyvolala apoptosu buněk, indukce kaspas 3/7 nebyla pozorována (s výjimkou látek **14a**, **14e** a **21**, vide infra). Tyto látky nepůsobily ani cytostaticky (což nás překvapilo, neboť z tabulky 10, tabulky 12 a tabulky 14 je vidět, že látky působí cytostaticky na jednu nebo více z testovaných linií). Tento rozdílný výsledek jsme

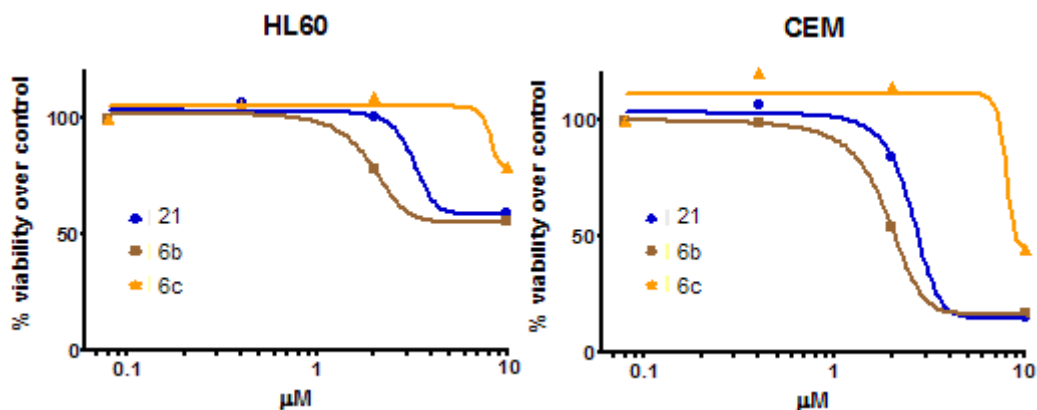
si vysvětlili jako různou citlivost buněk (oba testy byly provedeny metodou založenou na schopnosti viabilních buněk redukovat určité barvivo, ale na různých pracovištích). Ačkoliv je zdroj buněčné linie stejný, v průběhu kultivace mohou vznikat odchylky.

Obrázek 11 znázorňuje naměřenou indukci kaspas vyvolanou látkami **14e** a **21** u obou buněčných linií a látkou **14a** specificky jen u linie CCRF-CEM. Zajímavé je, že v daném rozsahu koncentrací vykazovala antiproliferační efekt pouze látka **21** (Obrázek 12), $IC_{50} = 3.2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pro buňky HL-60 a $2.6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pro CCRF-CEM. Látky **14a**, **14e** cytostatický efekt neprokázaly, ačkoli je zřejmé, že v buňkách indukují apoptosu. Opět jsme tento výsledek považovali za zkreslený, tabulka 12 na straně 47 ukazuje, že obě látky působí cytostaticky vůči linii CCRF-CEM. Naopak látky **6b** a **6c** (Obrázek 12) prokázaly cytostatický účinek vůči testovaným liniím (hodnoty IC_{50} se jen nepatrně liší od hodnot získaných pomocí XTT testu – viz tabulka 3 na straně 33), ale apoptosu v buňkách nespouštějí.

Tyto výsledky korelují s křivkami z xCELLigence testu, kde se deriváty **6b**, **6c** a **14e** a **21** profilyovaly jako 2 skupiny látek s různým mechanismem účinku. Látky **14e** a **21** tedy indukují apoptosu, nutno ovšem podotknout, že naměřená indukce (1.5-krát) je velice nízká. Proto jsme považovali za nutné tuto záležitost dále prozkoumat a ověřit indukci apoptosu ještě jinou metodou. Byl tedy proveden další test (annexinový test – viz kapitola 3.6.4) založený na jiném znaku probíhající apoptozy.



Obrázek 11. Test apoptozy měřením indukce kaspas 3/7



Obrázek 12. Test na viabilitu buněk linie HL-60 a CCRF-CEM po působení derivátů **6b**, **6c** a **21**

3.6.3. Sledování vlivu vybraných látek na buněčnou linii CCRF-CEM pomocí průtokové cytometrie

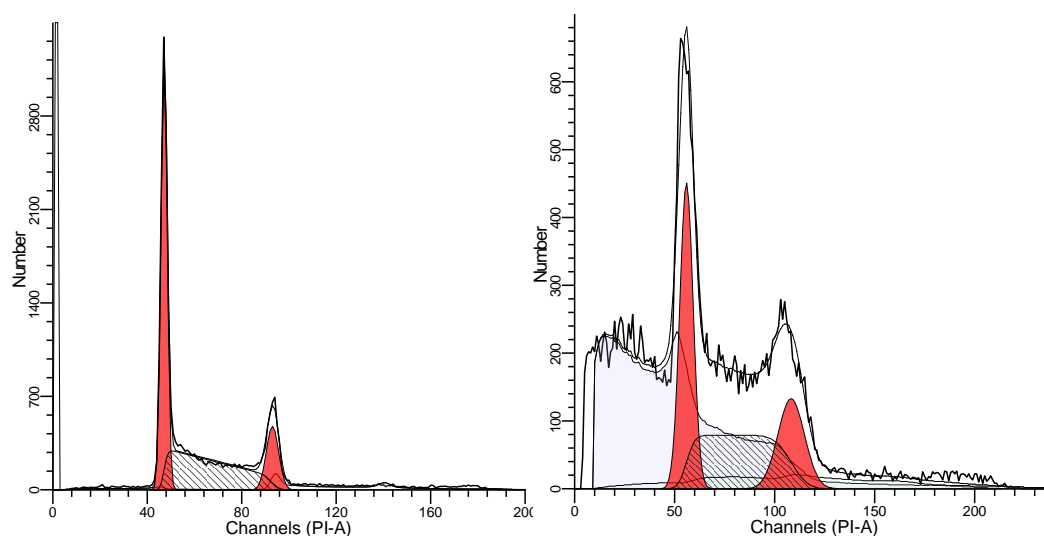
Vzhledem k tomu, že jsme u řady derivátů cyklopent-4-en-1,3-dionu pozorovali podobný selektivní antiproliferační efekt (Tabulka 10, Tabulka 12, Tabulka 14) vůči linii CCRF-CEM, rozhodli jsme se pro vyšetření vlivu těchto látek na buňky pomocí průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie je technika pro rychlé měření jednotlivých částic nebo buněk, které procházejí snímacím místem. Analýza obsahu DNA (buněčného cyklu) využívá fluorescenční barvu, jež se váže specificky na DNA a jejíž fluorescence je po navázání DNA zvýšena. Měření obsahu DNA v jednotlivých buňkách poskytuje statický pohled na buněčný cyklus.

Mezi testované látky jsme pro srovnání zařadili derivát koruskanonu A, který vykazoval cytostatický účinek vůči všem testovaným buněčným liniím (**6c**) a antineoplastické léčivo etoposid. Výsledky analýzy buněčného cyklu CCRF-CEM linie po expozici látkami **6c**, **14a-f** a **15b** v uvedených koncentracích shrnuje tabulka 21 (látky byly testovány při koncentraci rovné hodnotě IC_{50} , výjimkou je látka **14a**, která byla hodnocena při vyšší koncentraci - 13.5 μM - z důvodu jejího vysrážení z připraveného roztoku). Obrázek 13 je ukázkou působení látky **14b** na buněčný cyklus linie CCRF-CEM ve srovnání s kontrolou. Další testované deriváty měly podobný efekt.

Tabulka 21. Analýza buněčného cyklu linie CCRF-CEM (relativní změny)

Látka, koncentrace	G_1/G_{1c}^*	S_t/S_c^*	$G_2/M_t/G_2/M_c^*$
14a , 13.5 μM	0.66	1.49	0.91
14b , 2.8 μM	0.73	1.5	0.25
14c , 2.8 μM	0.63	1.37	1.20
14d , 2 μM	0.61	1.35	1.28
14e , 1.8 μM	0.49	1.46	1.36
14f , 7.5 μM	0.76	2.34	0.30
15b , 4 μM	0.93	1.60	0.65
6c , 2.8 μM	0.84	1.17	1.03
Etoposid, 20 μM	0.95	0.94	1.67

*c...kontrolní buňky, t...buňky v přítomnosti testované látky



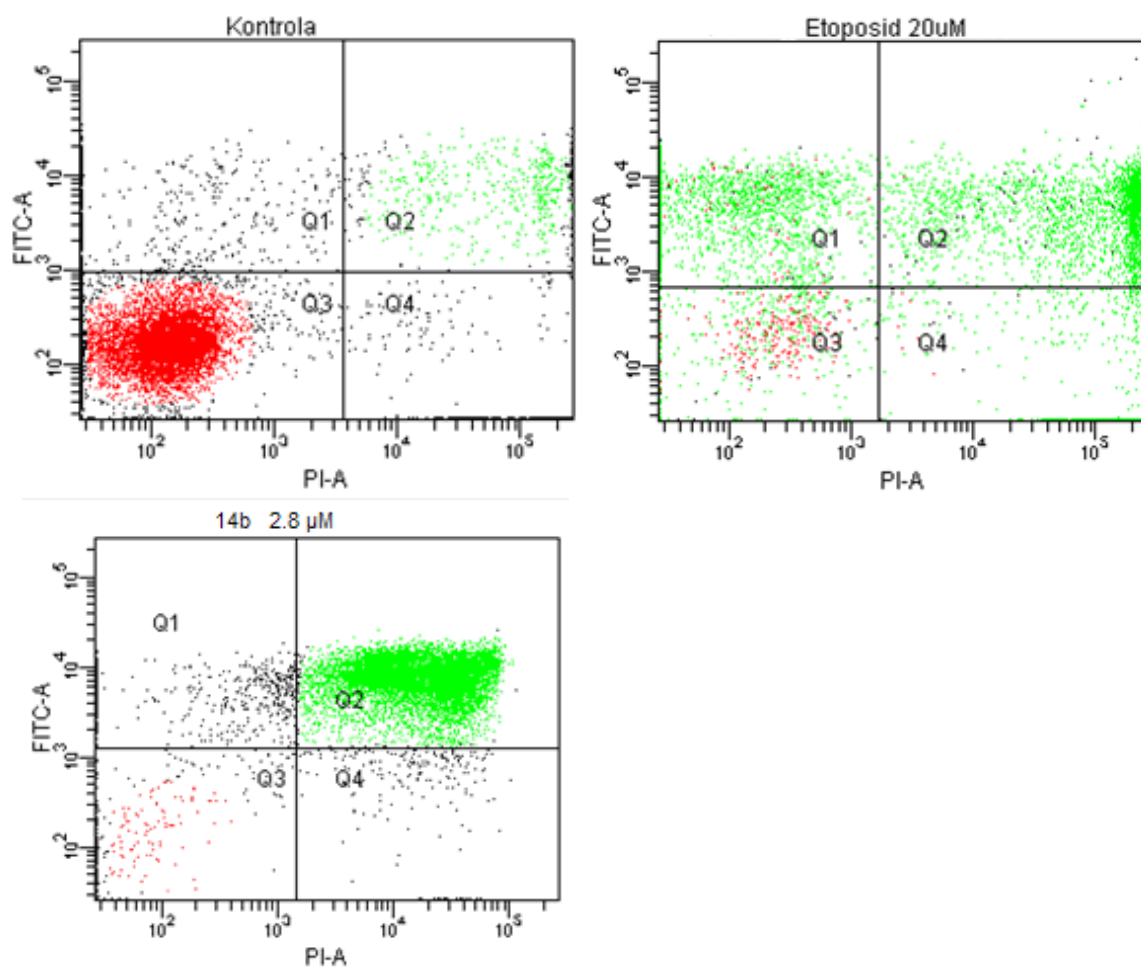
Obrázek 13. Porovnání profilu buněčného cyklu CCRF-CEM buněk u kontrolního vzorku (vlevo) a po působení látky **14b** (2.8 μM , vpravo)

Z tabulky 21 je zřejmé, že etoposid téměř neovlivnil G_1 a S fázi cyklu, zato množství buněk v G_2/M fázi vzrostlo více než 1.5-krát. Takový efekt na buněčný cyklus neměla žádná z testovaných látek. U všech benzyldenderivátů (**14a-f**) byla pozorována blokáda fáze G_1 doprovázená akumulací buněk v S fázi, množství buněk v G_2/M fázi bylo ve srovnání s kontrolou různě změněné. V případě látek **14b** a **14f** došlo k vymizení buněk v G_2/M fázi, látky **14b-d** působily naopak. Látka **6c** G_2/M fázi téměř neovlivnila.

Ve všech případech (také u cytotoxického etoposidu) byla pozorována přítomnost velkého množství buněčných zbytků (Obrázek 13 - šedá barva) a tento výrazný zásah do buněčného cyklu naznačoval, že látky indukují buněčnou smrt. Buněčná smrt probíhá dvěma hlavními cestami, a to nekrosou nebo apoptosou. Proces apoptosy je z hlediska využitelnosti látek v praxi výhodnější, látky indukující apoptosu lze využít v terapii nádorových onemocnění. Jedním ze znaků probíhající apoptosy je změna plasmatické membrány (externalizace fosfatidylserinu), kterou lze detekovat pomocí specificky se vázajícího proteinu, annexinu V. Rozhodli jsme se provést annexinový test a určit tak, zda látky s uvedeným významným vlivem na průběh buněčného cyklu navozují apoptosu či nekrosu. Současně jsme tímto chtěli ověřit výsledky získané metodou měření indukce kaspas, které ukázaly, že látky **14a**, **14e** a **21** indukují apoptosu (Obrázek 11).

3.6.4. Výsledky annexinového testu a jejich ověření

Pokusy byly provedeny při koncentracích IC_{50} , etoposid byl testován při 20 μ M. Vazba annexinu V na buněčnou membránu ukázala, že působení látek **14a-f**, **15b** a **16** navozuje nekrosu. Působení všech testovaných látek bylo stejné, pro ilustraci je přiložen histogram - Obrázek 14. Vlevo dole je názorně vidět, že se buňky při koncentraci IC_{50} látky **14b** nacházejí ve stavu nekrosy, tj. ve Q2, zatímco časná apoptosa (Q1) nebyla detekována. Bylo ovšem velice překvapivé, že v Q3 chyběly zdravé buňky. Při koncentraci IC_{50} by mělo být v kvadrantu Q3 50 % viabilních buněk. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny pomocí XTT testu, který je založen na schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat žlutou tetrazoliovou sůl XTT za vzniku oranžového formazanového barviva. K redukci dochází v mitochondriích viabilních buněk, proto byla jejich absence závažnější. Nabízely se dvě možnosti vysvětlení. Za předpokladu, že by testované látky působily jako redukční agens, by zmíněnou redukcí XTT způsobovaly právě ony a při hodnotě IC_{50} by žádné viabilní buňky nemusely být přítomné. V takovém případě by ovšem stanovené hodnoty IC_{50} byly irelevantní. Dále je možné, že ačkoliv buňka zaniká nekrosou, mitochondrie zůstávají intaktní, což na histogramu nelze pozorovat. Tak by při hodnotě IC_{50} probíhala redukce v nativních mitochondriích, zatímco integrita buněk by byla porušena, jak je z histogramů patrné.



Obrázek 14. Vazba annexinu V: detekce apoptických/nekrotických buněk u kontrolního vzorku (vlevo) a buněk vystavených působení cytotoxického etoposidu (20 μ M, vpravo) a látky **14b** (2.8 μ M, vlevo dole)

To, že deriváty podrobené annexinovému testu působí jako redukční činidla jsme nepovažovali za příliš pravděpodobné. Proto jsme se začali zabývat možností rozkladu testovaných derivátů. Nabízela se hydrolýza na výchozí cyklopent-4-en-1,3-dion a aldehyd, který by redukcí XTT mohl způsobit a zkreslit takto výsledky hodnocení cytostatické aktivity. Rozhodli jsme se tedy provést analytickou studii, která by ověřila stabilitu vybrané látky za podmínek *in vitro* testování.

Současně jsme považovali za nutné vysvětlit rozdíl ve výsledcích (indukce kaspas versus annexinový test) týkajících se látek **14a** a **14e**. Již bylo řečeno, že pozorovaná indukce kaspas 1.5-krát je velice nízká. Použitý test je vysoce citlivý a taková indukce je zcela zanedbatelná (nepatrnou apoptosu v tomto rozsahu lze vidět i při měření kontrolních vzorků). Při relevantní indukci apoptosu by test na indukci kaspas vykazoval

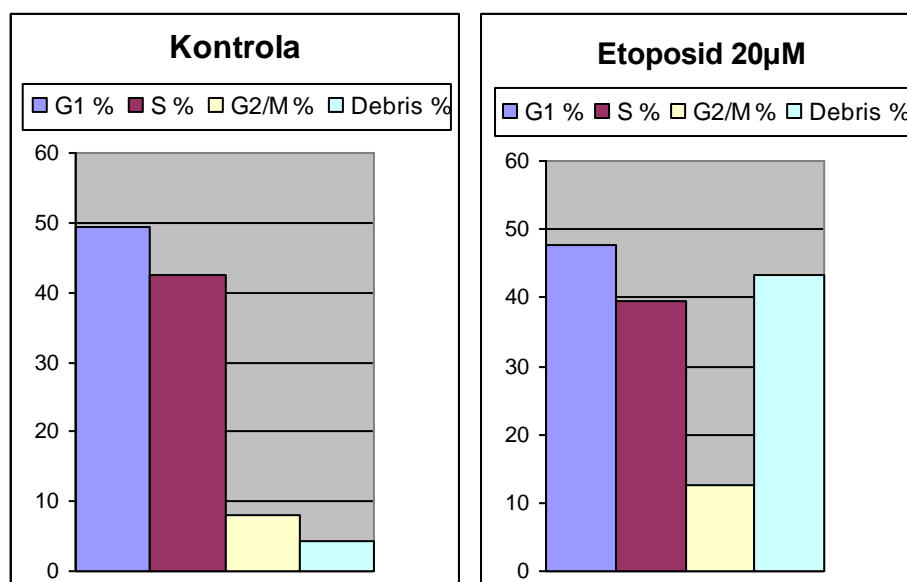
řádovou změnu. Je pravděpodobné, že z tohoto důvodu annexin V test výsledky nepotvrdil.

Přesto bylo pro jistotu provedeno nové stanovení hodnot IC_{50} (opakované testy byly prováděny na nové buněčné linii CCRF-CEM) a následně byla u obou sloučenin opakována analýza buněčného cyklu a test na apoptosu/nekrosu v závislosti na koncentraci. Tabulka 22 ukazuje, že nová linie je významně citlivější na testované látky.

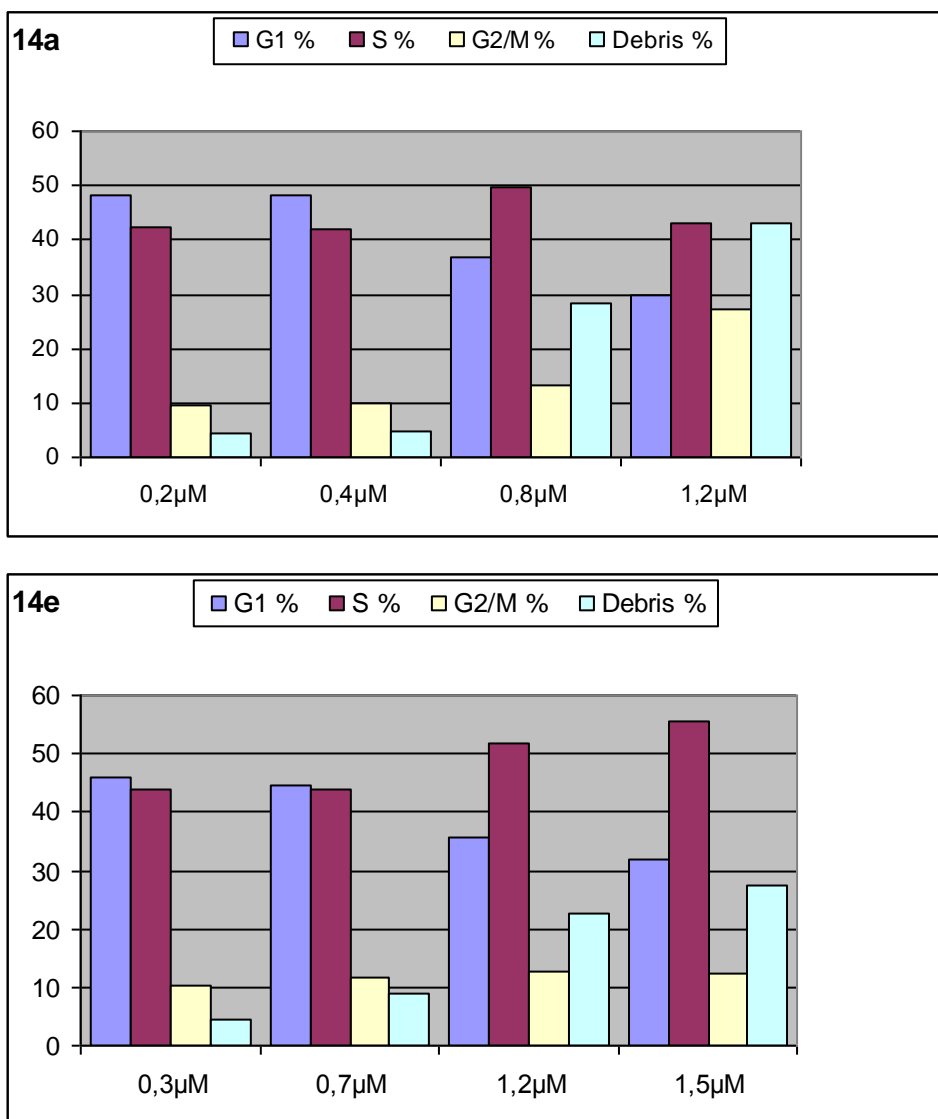
Tabulka 22. Cytostatická aktivita látek **14a**, **14e** na linii CCRF-CEM

Shrnutí IC_{50} (μM)	původní hodnota (XTT)	nová hodnota (XTT)
14a	3.8	0.4
14e	1.8	0.7

Obrázek 15 ukazuje kontrolní analýzu buněčného cyklu u zdravých buněk a u buněk ovlivněných léčivem. Obrázek 16 pak graficky znázorňuje ovlivnění buněčného cyklu rostoucí koncentrací látek. Je zřejmé, že počáteční nízké koncentrace (0.2 a $0.3 \mu mol.l^{-1}$) látek **14a** a **14e** nemají na průběh buněčného cyklu významný vliv (výsledky srovnatelné s kontrolou). S rostoucí koncentrací se zvyšuje množství buněčných debris i celkový vliv na buněčný cyklus.

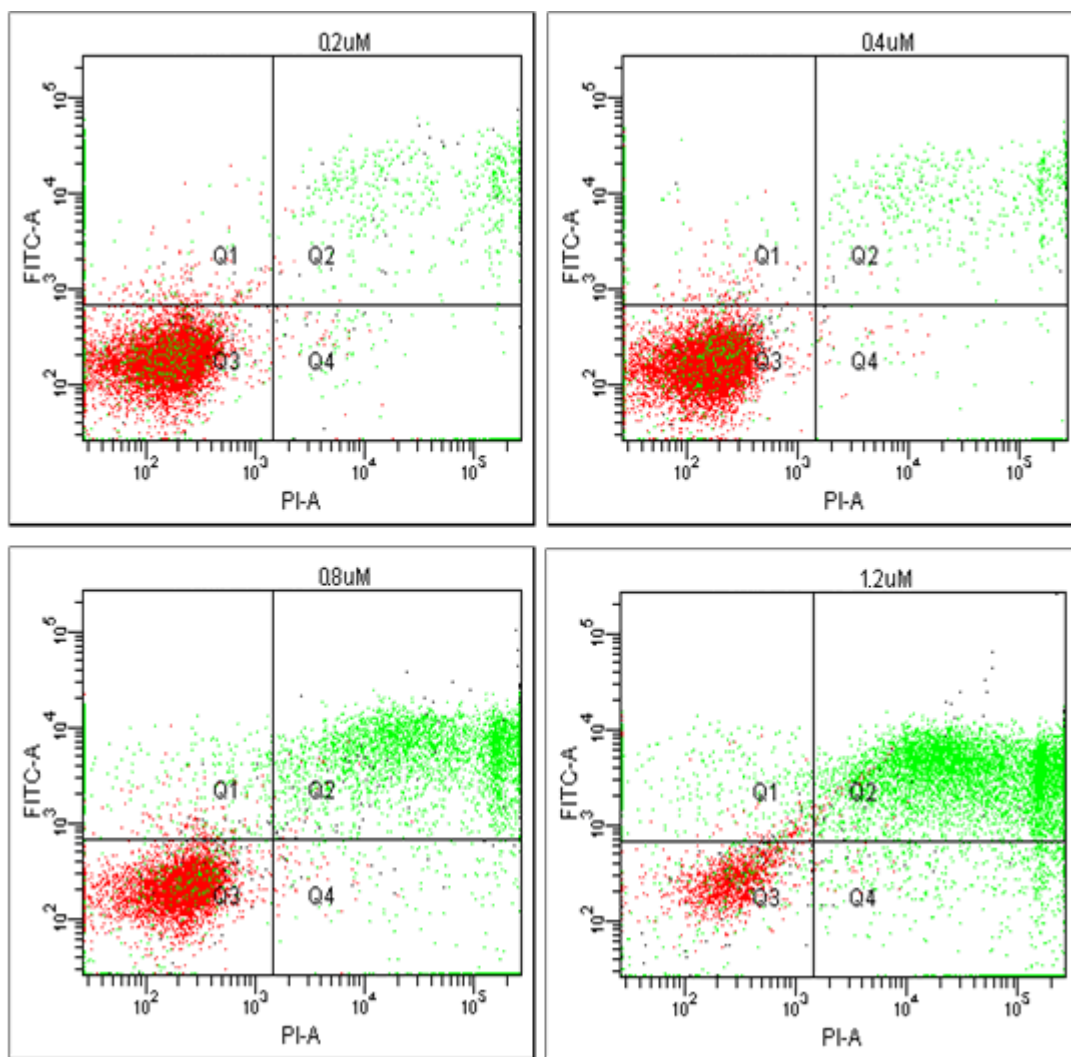


Obrázek 15. Analýza buněčného cyklu : kontrolní buňky (vlevo) a buňky po aplikaci léčiva etoposidu (vpravo)



Obrázek 16. Analýza buněčného cyklu po aplikaci látek **14a** a **14e** o různých koncentracích

Obrázek 17 znázorňuje výsledky annexin V testu po aplikaci různých koncentrací látky **14a** na buňky CCRF-CEM. Výsledky pro látku **14e** (testovanou při stejných koncentracích jako byla prováděna analýza buněčného cyklu: 0.3, 0.7, 1.2, 1.5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) jsou v podstatě shodné. K úplné destrukci buněčného cyklu látkou **14a** dochází při koncentraci odpovídající hodnotě $3 \times \text{IC}_{50}$ (1.2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). V koncentračním rozsahu 0.2 – 1.2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ lze na příslušných histogramech pozorovat převážně postupný nárůst nekrosy (kvadrant Q2). Počet apoptotických buněk je zcela zanedbatelný.



Obrázek 17. Annexin V test: detekce apoptických/nekrotických buněk vystavených působení látky **14a** (koncentrační závislost: 0.2 – 1.2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$)

Závěrem lze říci, že ani opakovaná měření neprokázala, že by látky navozovaly apoptosu. Látky s vysokou pravděpodobností nepronikají do buněk, ale působí zvnějšku na buněčnou membránu, kterou následně poškodí. Tento typ buněčného poškození je charakteristický pro nekrotickou buněčnou smrt.

3.6.5. Stabilitní analytická studie vybraných derivátů

Vzhledem k podezření možného rozkladu látek, jsme provedli simulaci podmínek *in vitro* testování (viz experimentální část) a připravili roztok antifungálně aktivního derivátu **11**. Jedná se o krystalickou látku stabilní v chloroformu, acetonitrilu a DMSO (potvrzeno NMR experimenty).

Z výsledků HPLC analýzy bylo zjištěno, že v kultivačním médiu dochází ihned k rozkladu látky **11** na výchozí cyklopent-4-en-1,3-dion a benzaldehyd (Schéma 40). Během 48 hodin došlo ke kvantitativní přeměně a v roztoku byly přítomny pouze rozkladné produkty (Tabulka 23, Obrázek 18). Domnívali jsme se, že k rozkladu látky **11** dochází vlivem vody (kultivační médium má vodný charakter), která způsobí hydrolyzu. Nejprve jsme ověřili stabilitu látky v DMSO, protože se toto rozpouštědlo používá k přípravě roztoků na testování. Roztok látky v DMSO analyzovaný za 24 hod se nezměnil, látka je v DMSO opravdu stabilní. Poté byla k roztoku přidána UHQ voda a po několika hodinách byl tento roztok o koncentraci 10 μM analyzován, rozklad vodou byl potvrzen.

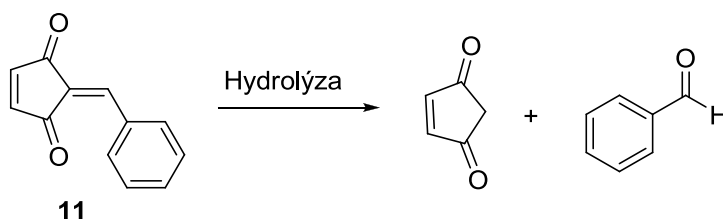
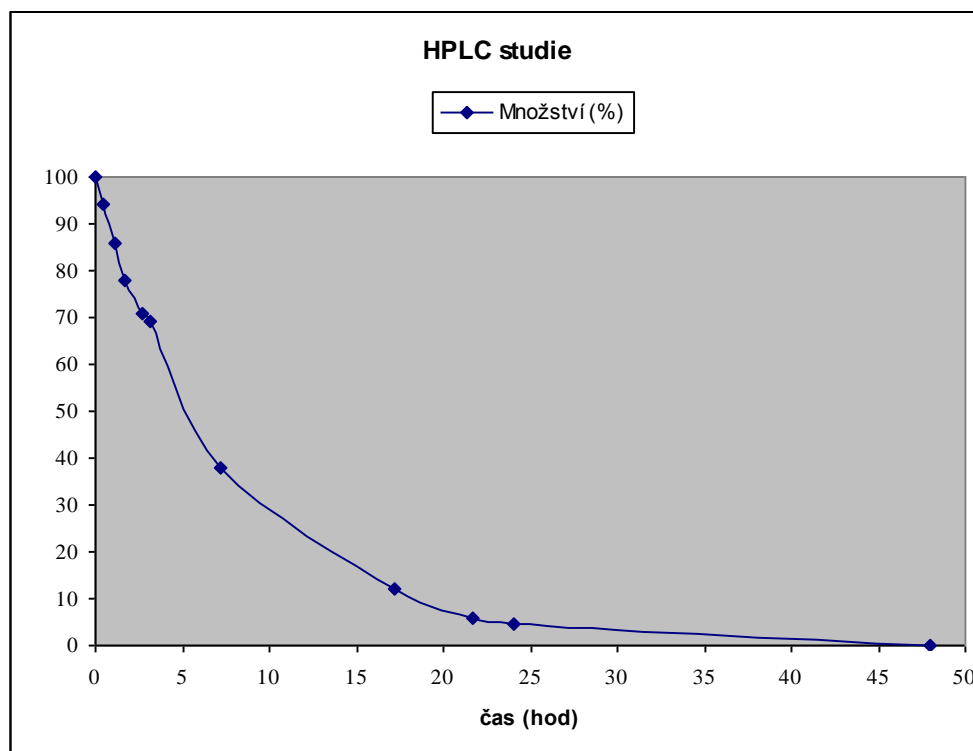


Schéma 40

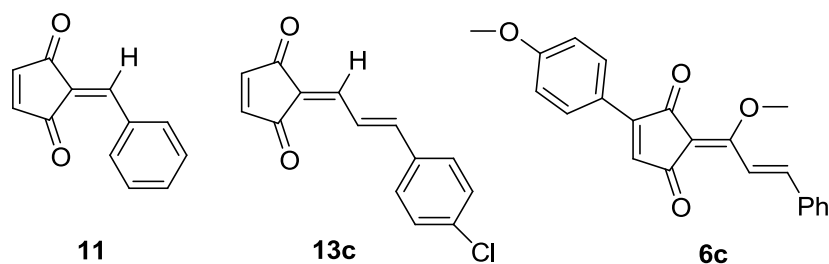
Tabulka 23. Výsledky HPLC studie látky **11** v čase 0 - 48 hod

Čas (hod)	Množství (%)
0	100
0.5	94
1.15	86
1.65	78
2.65	71
3.15	69
7.15	38
17.15	12
21.65	6
24	4.5
48	0



Obrázek 18. Grafické znázornění rozkladu látky **11** v čase získané HPLC analýzou

Zjištění o nestabilitě derivátu **11** nás překvapilo a rozhodli jsme se tedy ověřit stabilitu dalších derivátů za podmínek *in vitro* testování. Látka **11** byla antifungálně aktivním zástupcem derivátů benzaldehydu. Dále jsme se rozhodli pro studii stability derivátu cinnamaldehydu **13c**, který nevykazoval antifungální aktivitu, a derivátu koruskanonu A s methoxyarylovou substitucí cyklopentendionového kruhu **6c** (Obrázek 19). Poslední derivát byl antifungálně neúčinný, ale cytostaticky aktivní. Předpokládali jsme, že pokud k rozkladu bude docházet, pak podobným způsobem jako bylo prokázáno u látky **11**, tedy že dojde k hydrolyze látky **13c** na cyklopent-4-en-1,3-dion a cinnamaldehyd a látka **6c** by se mohla rozložit na 4-(*p*-methoxyfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dion a methylester skořicové kyseliny.



Obrázek 19

Očekávané rozkladné produkty derivátu **6c** bylo nutné připravit. Z předchozí práce jsme věděli, že substituovat cyklopent-4-en-1,3-dion v poloze 4 nelze (pokoušeli jsme se o jodaci a Heckovu reakci, ovšem bez úspěchu). Připravili jsme tedy alespoň methylester kyseliny skořicové **26** jednoduchou esterifikací kyseliny pomocí kyselé pryskyřice Dowexu 50 v methanolu (Schéma 41).

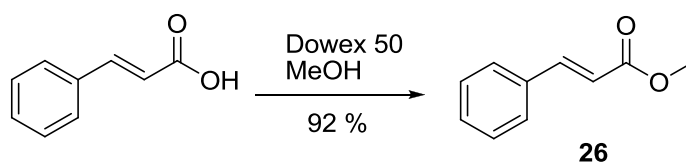
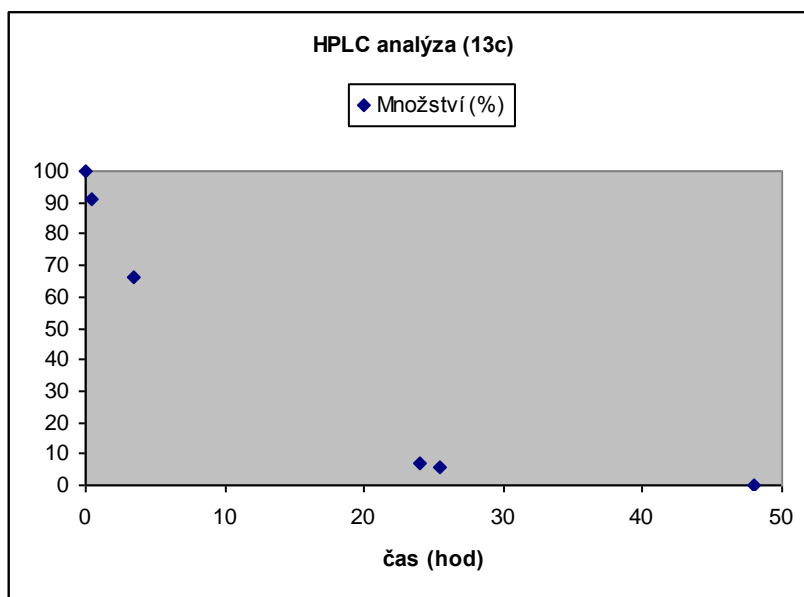


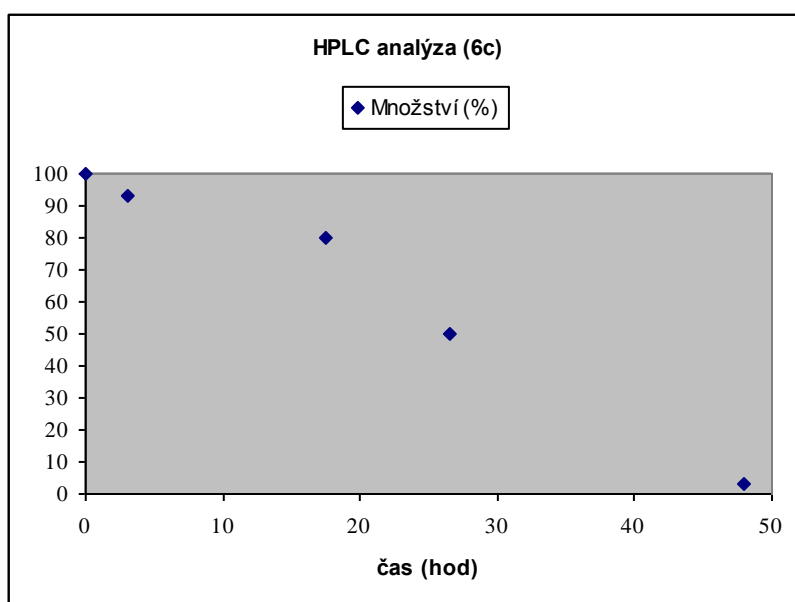
Schéma 41

Opět jsme simulovali podmínky *in vitro* testování. Připravili jsme roztoky derivátů **6c** a **13c** v DMSO a po naředění kultivačním médiem jsme analyzovali odebírané vzorky v průběhu 48 hod. Po první analýze (provedena 0.5 hod po přidání kultivačního média) vzorku látky **13c** bylo zřejmé, že také dochází k jejímu rozkladu. Ihned jsme tedy provedli analýzu roztoků této látky v DMSO a ve vodě. Látka je v DMSO stabilní, měření proběhlo za 24 hod. K rozkladu dochází vlivem vody, po 17 hod v roztoku s UHQ vodou došlo k rozkladu 49 % látky. Obrázek 20 graficky znázorňuje průběh HPLC analýzy, odběry již nebyly tak časté, protože cílem bylo pouze zjištění, zda se látka v kultivačním médiu rozkládá či nikoliv. Po 24 hod je přítomno jen 7 % výchozího množství látky, za 48 hod je látka kompletně rozložena. Rozklad neproběhl mechanismem retroaldolové reakce, neboť ani *p*-chlorcinnamaldehyd ani cyklopent-4-en-1,3-dion nebyly v roztoku pozorovány.



Obrázek 20. HPLC analýza rozkladu látky **13c** za podmínek *in vitro* testování

Podobně obrázek 21 ukazuje, že osud derivátu **6c** je za podmínek *in vitro* testování stejný, látka se vlivem vody rozložila. Po 48 hod byly v roztoku prakticky pouze stopy látky **6c**. Pozorovaný rozpad neprobíhal tak rychle jako u předchozích derivátů. Roztok v DMSO byl po 24 hod stabilní, roztok v UHQ vodě analyzovaný po 17.5 hod obsahoval 80 % látky. Očekávaný rozkladný produkt (methylester kyseliny skořicové) nevznikal.



Obrázek 21. HPLC analýza rozkladu látky **6c** za podmínek *in vitro* testování

Závěrem lze říci, že připravené deriváty koruskanonu A, včetně jednoduchých látek odvozených od cyklopent-4-en-1,3-dionu, jsou látky, které se rozkládají vlivem vodného prostředí, tedy specificky za podmínek testování ať už antifungální či cytostatické aktivity. Možnost podobného osudu *N*-substituovaných maleinimidů byla vyřešena již v literatuře¹³⁵. Látky jsou ve vodném prostředí stabilní a hydrolyzují až za bazických podmínek.

3.6.6. Srovnání biologických aktivit derivátu **11** a jeho rozkladných produktů

Vzhledem k vodou podmíněnému rozkladu látky **11** na výchozí reagenty jsme se rozhodli provést nové hodnocení biologických aktivit nejen látky **11**, ale i cyklopent-4-en-1,3-dionu a benzaldehydu.

Jelikož první odečítání hodnot MIC je prováděno po 24 hodinách, kdy, z hlediska stability, bylo již 95.5 % látky **11** přeměněno na cyklopent-4-en-1,3-dion a benzaldehyd, domnívali jsme se, že za *in vitro* antifungální aktivitu zodpovídá jeden z rozkladných produktů. Proto bylo provedeno nové hodnocení antifungální aktivity, ve kterém byla porovnána účinnost látky **11**, cyklopent-4-en-1,3-dionu a benzaldehydu. V tabulce 24 jsou uvedeny získané výsledky. Je zřejmé, že benzaldehyd je látka antifungálně neaktivní, zatímco látka **11** i přes svou nestabilitu vykazuje efekt vůči všem testovaným kmenům hub (aktivita látky **11** byla nižší než při prvním hodnocení – viz tabulka 8, avšak v akceptovatelném rozmezí ± 2 ředění; pro srovnání jsou původní hodnoty uvedeny pod označením **11a**). Cyklopent-4-en-1,3-dion vykazoval slabší efekt na všechny hodnocené kmeny kvasinek, zvláště *C. albicans*, v porovnání s látkou **11**. Za povšimnutí také stojí fakt, že u taxonomicky odlišného druhu *Absidia corymbifera* (řád Mucorales) byl výsledný efekt opačný, tzn. látka **11** měla nižší aktivitu než cyklopent-4-en-1,3-dion. Z výsledků lze odvodit, že *in vitro* antifungální aktivita látky **11** se projevila, vzhledem k její nestabilitě ve velmi krátké periodě po přidání do vodného roztoku RPMI 1640 média a jeho inokulaci. Není známo nakolik se, později, na tomto efektu podílel svou aktivitou cyklopent-4-en-1,3-dion. Zároveň by tento fenomén u látky **11** mohl vysvětlit rozdíly mezi výsledky měření MIC u dvou na sobě nezávislých pokusů (**11a** a **11**). Tyto by mohly vyplývat z případného časového rozdílu mezi naředěním látky v RPMI 1640 médiu a jeho inokulací testovaným kmenem.

Tabulka 24. Hodnocení antifungální aktivity látky **11** a jejích rozkladných produktů (**BA** – benzaldehyd, **CP** – cyklopent-4-en-1,3-dion) (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TA ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
11	24h	7.81	15.62	7.81	15.62	15.62	62.5	15.62	7.81	7.81	62.5	>250	7.81
	48h	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	125	15.62	15.62	15.62	125	>250	7.81
BA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24h	125	125	31.25	31.25	31.25	125	62.5	31.25	125	>125	125	31.25
	48h	>125	>125	62.5	62.5	62.5	>125	62.5	31.25	125	>125	125	31.25
11a	24h	1.95	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	7.81	7.81	1.95	15.62	250	1.95
	48h	1.95	7.81	3.9	3.9	7.81	3.9	7.81	15.62	3.9	31.25	250	3.9

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitaniae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách)

Dále byla hodnocena cytostatická aktivita těchto látek. Tabulka 25 shrnuje výsledky, nově byla do testu zařazena lidská jaterní nádorová linie HepG2. Pod označením **11a** jsou uvedeny výsledky původního hodnocení (viz tabulka 12). Benzaldehyd (**BA**) je zcela neaktivní, zatímco cyklopent-4-en-1,3-dion má aktivitu podobnou jako derivát **11**, který se v průběhu testování relativně rychle rozkládá. Opět není možné říci, nakolik je za aktivitu derivátu **11** zodpovědný cyklopent-4-en-1,3-dion. Tento závěr je podobný jako v případě antifungálního hodnocení.

Tabulka 25. Cytostatická aktivita derivátu **11** a jeho rozkladných produktů (**BA** – benzaldehyd, **CP** – cyklopent-4-en-1,3-dion) (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

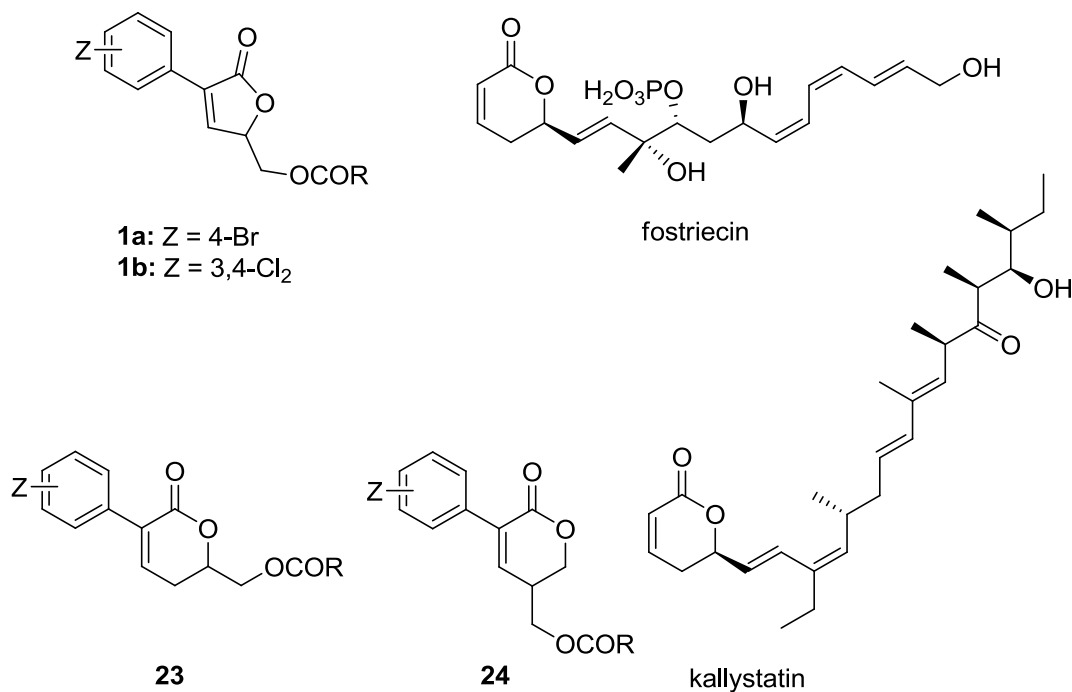
Látka	HepG2 ^a	HL 60 ^b	HeLa S3 ^c	CCRF-CEM ^d
11	NA ^e	11.2 ± 0.9	9.1 ± 1.2	5.7 ± 0.6
BA	NA	NA	NA	NA
CP	NA	11.6 ± 0.8	7.5 ± 0.7	3.0 ± 0.1
11a	NT ^f	>10	11.1 ± 0.9	2.6 ± 0.2

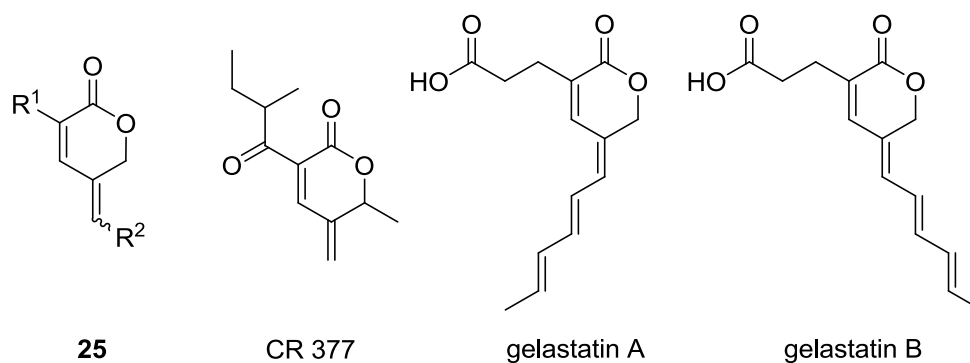
^aHepG2 (ATCC HB-8065) – lidský hepatocelulární karcinom, ^bHL-60 (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^cHeLa S3 (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^dCCRF-CEM (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^eneaktivní, ^fnetestováno

3.6.7. Cytostatická aktivita specificky substituovaných pentenolidů

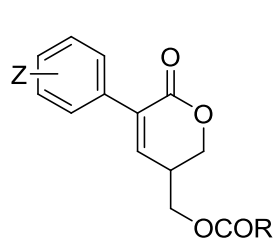
V úvodní kapitole 1.2.2. byl nastíněn vývoj práce naší skupiny od molekuly inkrustoporinu k antifungálně aktivním (3-(halogenfenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onům **1a**, **b**). Dalším cílem práce kolegů bylo rozšíření butenolidového kruhu na pentenolidový. V přírodě se vyskytující pentenolidy, t.j. 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ony, vykazují velmi zajímavé biologické vlastnosti, jako jsou cytostatická, antifungální a antimikrobiální aktivita^{148,149}. Nejvýznamnějšími zástupci jsou 6-substituované pyranony s antineoplastickou aktivitou, fostriecin¹⁵⁰ a kallystatin A¹⁵¹.

Připravené pentenolidy **23** s acyloxymethylovou substitucí v poloze 6 pyranonového kruhu kompletně ztratily antifungální aktivitu a nevykazovaly ani žádný cytostatický efekt¹⁵². Proto byl následně acyloxymethyl substituent přesunut do polohy 5 a byly syntetizovány 3,5-disubstituované pyranony **24**¹⁵³. Obdobné alkylden-pentenolidy **25** mají své zástupce v přírodě, představiteli jsou biologicky aktivní látky CR 377 (látka s antifungálními vlastnostmi)¹⁵⁴ a gelastatiny A, B¹⁵⁵ (látky s vysokou aktivitou proti gelatinase A, která se účastní zánětlivých a degenerativních procesů zahrnujících např. revmatoidní artritidu, pronikání nádorových buněk do tkáně a metastázování¹⁵⁶).





Byla připravena série derivátů **24a-j**, už Schiller zjistil¹⁵³, že antifungálně jsou tyto pyranony neúčinné, proto jsme se dále zabývali jejich cytostatickou aktivitou.



- 24a** : Z = H, R = Me
- 24b** : Z = H, R = fenyl
- 24c** : Z = 3-Cl, R = Me
- 24d** : Z = 3-Cl, R = fenyl
- 24e** : Z = 4-Cl, R = Me
- 24f** : Z = 4-Cl, R = fenyl
- 24g** : Z = 3,4- diCl, R = Me
- 24h** : Z = 3,4- diCl, R = fenyl
- 24i** : Z = OCH₃, R = Me
- 24j** : Z = OCH₃, R = fenyl

Většina testovaných látek nevykazovala signifikantní inhibiční aktivitu, pouze látka **24f** vykazovala určitou aktivitu proti linii buněk CCRF-CEM a rezistentním buňkám linie HT-29. Látky **24g** a **24h** vykazaly aktivitu proti všem testovaným buněčným liniím (Tabulka 26)¹⁵⁷. Tento cytostatický efekt není provázen antifungální aktivitou, což svědčí o selektivní toxicitě.

Tabulka 26. Cytostatická aktivita šestičlenných laktonů **24f-h** (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

Látka	<i>L1210</i> ^a	<i>HL-60</i> ^b	<i>HeLa S3</i> ^c	<i>CCRF-CEM</i> ^d	<i>HT-29</i> ^e
24f	NA ^f	NA	NA	7.1 ± 0.50	2.9 ± 0.18
24g	7.3 ± 0.42	7.3 ± 0.44	6.8 ± 0.41	3.6 ± 0.26	2.5 ± 0.15
24h	5.9 ± 0.35	6.1 ± 0.36	6.7 ± 0.40	4.5 ± 0.27	NT ^g

^a*L1210* (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^b*HL-60* (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^c*HeLa S3* (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^d*CCRF-CEM* (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^e*HT-29* (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^fneaktivní, ^gnetestováno

Cytostatický efekt látky **24f** vůči dvěma z pěti testovaných linií možná naznačuje selektivitu účinku této látky. Obzvláště významný je účinek vůči linii relativně rezistentních buněk HT-29, z tabulky 27 je zřejmé, že látky **24f** a **24g** svou aktivitou předčí v praxi používané antineoplastické látky – oxaliplatinu a irinotekan, což je předurčuje k dalšímu vývoji a zkoumání z hlediska protirakovinné terapie¹⁵⁸.

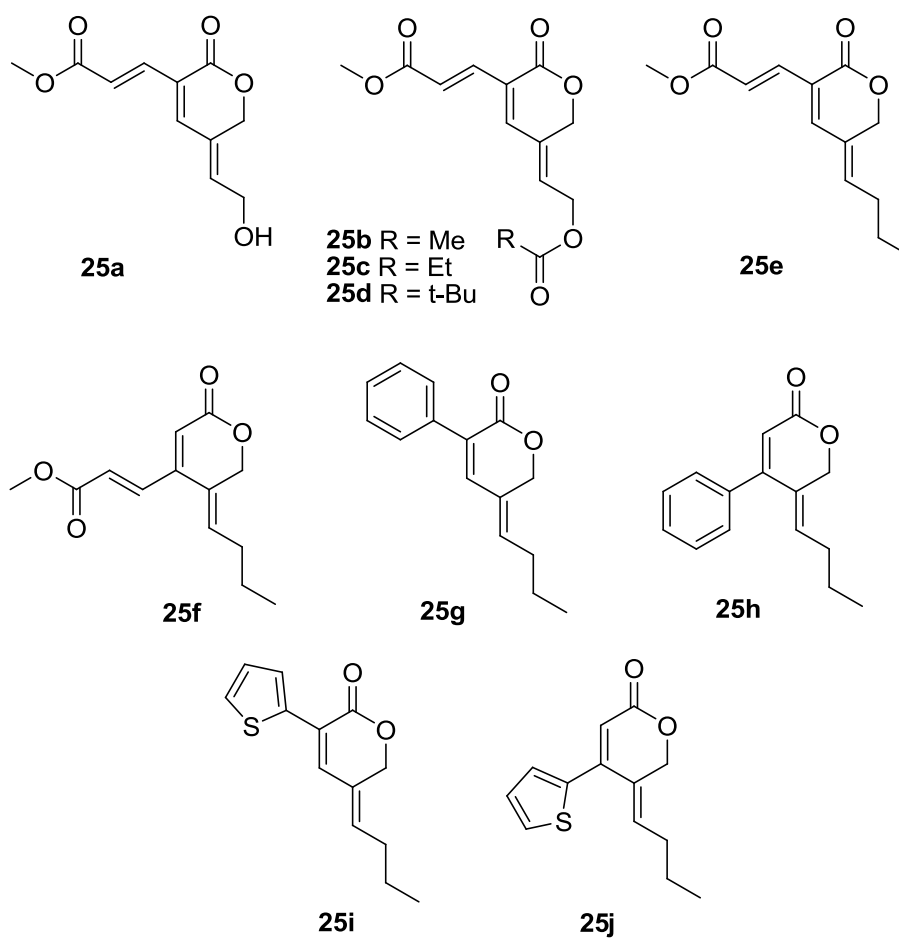
Tabulka 27. Porovnání cytostatické aktivity derivátů **24f**, **24g** se standardy léčiv na linii HT-29 (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

Látka	24f	24g	OxPt ^a	Irt ^b
HT-29	2.93 ± 0.18	2.45 ± 0.15	NA ^c	4.73 ± 0.28

^aoxaliplatina, ^birinotekan, ^cneaktivní

Následovala syntéza¹⁵⁹ derivátu **25a**, jehož volná allylová hydroxylová skupina v poloze 5 pyranonového kruhu byla příčinou značné nestability této látky (rozklad po několika týdnech skladování při -20 °C). Proto byla tato funkce esterifikována, získané estery **25b-d** prokázaly větší stabilitu¹⁵⁹. Látky byly biologicky hodnoceny, v případě derivátu **25a** bylo testování provedeno co nejdříve po jeho syntéze. Cytostatická aktivita esterů oproti původní látce s volným hydroxylem sice poklesla (Tabulka 28), ale tento pokles nebyl tak významný, takže jsme pokračovali přípravou dalších derivátů. Estery **25b-d** mají opět zanedbatelný antifungální účinek. Významná je především rostoucí aktivita proti rezistentní linii karcinomu tlustého střeva HT-29.

Při syntéze derivátu s prodlouženým alkyldenovým řetězcem v poloze 5 **25e** byl jako vedlejší produkt připraven derivát **25f** s methakrylátovým zbytkem v poloze 4. Z tabulky 28 je patrné výrazné zvýšení cytostatické aktivity této látky oproti látce **25e**, aktivita proti všem testovaným buněčným liniím byla menší než 1 μmol.l⁻¹. Methakrylátový zbytek byl rovněž nahrazen aromatickými substituenty, z tabulky je zřejmé, že tato substituce vedla k neaktivním látkám **25g**, **25h** a **25j**, pouze látka **25i** vykazovala cytostatický účinek vůči všem testovaným liniím buněk. Derivát **25e** překvapivě vykazoval nejen cytostatickou, ale také antifungální aktivitu (Tabulka 29). Zajímavé je především zjištění, že přesun methakrylátového substituentu do β polohy vede ke zvýšení cytostatické aktivity (IC₅₀ < 1 μmol.l⁻¹) derivátu **25f** (Tabulka 28).



Tabulka 28. Cytostatická aktivita derivátů **25a-j** (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

Látka	<i>L1210</i> ^a	<i>HL-60</i> ^b	<i>HeLa S3</i> ^c	<i>CCRF-CEM</i> ^d	<i>HT-29</i> ^e
25a	NA ^f	NA	3.5 ± 0.5	1.8 ± 0.2	NT ^g
25b	NA	NA	8.7 ± 0.2	3.8 ± 0.1	7.0 ± 1.0
25c	NA	NA	5.2 ± 0.3	3.2 ± 0.2	5.5 ± 1.0
25d	6.8 ± 0.2	NA	6.2 ± 0.4	6.5 ± 0.2	2.0 ± 0.3
25e	0.65 ± 0.1	1.01 ± 0.2	0.39 ± 0.2	0.39 ± 0.2	4.14 ± 0.4
25f	0.23 ± 0.1	0.18 ± 0.1	0.24 ± 0.1	0.12 ± 0.1	0.83 ± 0.6
25g	NA	NA	NA	NA	NA
25h	NA	NA	NA	NA	NA
25i	4.24 ± 0.3	7.08 ± 0.5	4.68 ± 0.3	3.02 ± 0.2	3.07 ± 0.4
25j	NA	NA	NA	NA	NA

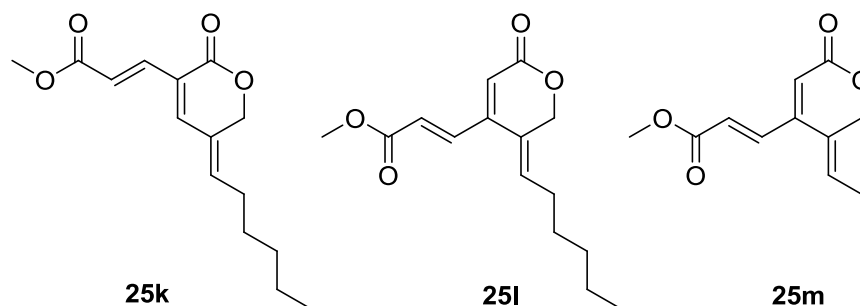
^a*L1210* (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^b*HL-60* (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^c*HeLa S3* (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^d*CCRF-CEM* (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^e*HT-29* (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^fneaktivní, ^gnetestováno

Tabulka 29. Antifungální aktivita látky **25e** (IC₈₀ [μmol.l⁻¹])

	Čas	CA1 ^a	CA2 ^b	CP ^c	CK1 ^d	CK2 ^e	CT ^f	CG ^g	CL ^h	TB ⁱ	AF ^j	AC ^k	TM ^l
25e	24h	7.81	31.25	15.62	15.62	15.62	62.5	62.5	15.62	62.5	7.81	125	7.81
	48h	15.62	62.5	15.62	31.25	31.25	62.5	125	15.62	125	31.25	500	7.81

^a*Candida albicans* ATCC44859, ^b*C. albicans* ATCC90028, ^c*C. parapsilosis* ATCC22019, ^d*C. krusei* ATCC 6258, ^e*C. krusei* E28, ^f*C. tropicalis* 156, ^g*C. glabrata* 20/I, ^h*C. lusitaniae* 2446/I, ⁱ*Trichosporon asahii* 1188, ^j*Aspergillus fumigatus* 231, ^k*Absidia corymbifera* 272, ^l*Trichophyton mentagrophytes* 445 (hodnoty MIC pro TM odečítány po 72 a 120 hodinách)

Dále nás zajímal vliv délky alkyldenového řetězce na cytostatickou aktivitu, proto byly připraveny deriváty **25k-m**. Z tabulky 30 je patrné, že cytostatická aktivita se u derivátu **25k** s prodloužením řetězce o dva uhlíky poněkud snížila, ale nutno podotknout, že aktivita vůči líní HT-29 je významná. V případě látky s methakrylátovým substituentem v poloze 4 **25l** aktivita paradoxně zcela vymizela. Derivát **25f** tak představuje látku aktivní proti všem testovaným liniím se substitucí v poloze 4, derivát **25m** vykazuje aktivitu pouze vůči buňkám kolorektálního karcinomu HT-29.



Tabulka 30. Cytostatická aktivita derivátů **25k-m** (IC₅₀ [μmol.l⁻¹])

Látka	L1210 ^a	HL-60 ^b	HeLa S3 ^c	CCRF-CEM ^d	HT-29 ^e
25k	9.6 ± 0.2	9.8 ± 0.3	3.1 ± 0.3	1.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3
25l	NA ^f	NA	NA	NA	NA
25m	NT ^g	NT	NT	NA	6.55

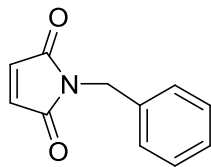
^aL1210 (ATCC CCL 219) - myší lymfocytická leukémie, ^bHL-60 (ATCC CCL 240) - buňky lidské promyeloidní leukémie, ^cHeLa S3 (ATCC CCL 2.2) - karcinom děložního čípku, ^dCCRF-CEM (ATCC CCL 219) - lidská akutní T lymfoblastoidní leukémie, ^eHT-29 (ATCC HTB 38) - kolorektální karcinom, ^fneaktivní, ^gnetestováno

4. ZÁVĚR

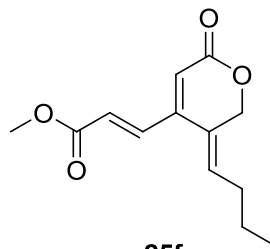
V rámci této práce byla vyvinuta katalytická verze Knoevenagelovy kondenzace cyklopentendionu zprostředkovaná $Ti(i\text{-PrO})_4$ a následně využita při syntéze nových analog koruskanonu A. Zkoumáním vztahů mezi strukturou a antifungální a cytostatickou aktivitou těchto látek bylo zjištěno, že jejich antifungální efekt je provázen selektivním cytostatickým účinkem vůči linii leukemických nádorových buněk CCRF-CEM, případně vůči buňkám karcinomu děložního čípku HeLaS3. Provedenými strukturálními obměnami nebylo možné tyto efekty oddělit resp. jeden z nich potlačit. Zároveň bylo zjištěno, že Knoevenagelovy adukty podléhají za podmínek *in vitro* testování rozkladu. Aktivita 2-benzylidencyklopent-4-en-1,3-dionu byla porovnána s aktivitami rozkladných produktů. Benzaldehyd je látka antifungálně neaktivní, cyklopent-4-en-1,3-dion vykazoval slabší efekt na všechny hodnocené kmeny kvasinek v porovnání s touto látkou. Z výsledků lze odvodit, že *in vitro* antifungální aktivita látky 2-benzylidencyklopent-4-en-1,3-dionu se projevila ve velmi krátké periodě po přidání do vodného roztoku média a jeho inokulaci. Není zřejmé nakolik se, později, na tomto efektu podílel svou aktivitou cyklopent-4-en-1,3-dion. Proti nádorovým liniím je benzaldehyd zcela neaktivní, zatímco cyklopent-4-en-1,3-dion má aktivitu podobnou jako 2-benzylidenderivát.

Dále proto byla připravena série analogických substituovaných maleinimidů, u kterých jsme předpokládali odolnost vůči hydrolýze za podmínek testování. Antifungální aktivita těchto stabilních derivátů je opět provázena antiproliferačním efektem. Za zmínku stojí antifungální účinek *N*-2-indanylmaleinimidu proti kmenu *A. fumigatus*, z hlediska cytostatické účinnosti je významný efekt *N*-benzylmaleinimidu vůči relativně rezistentní linii HT-29.

U většiny studovaných šestičlenných laktonů byla prokázána pouze cytostatická účinnost, látky jsou antifungálně neaktivní. Za obzvláště významný považujeme účinek některých derivátů vůči relativně rezistentním buňkám kolorektálního karcinomu HT-29. Tyto látky by se mohly stát předmětem dalšího výzkumu z hlediska vývoje antineoplastických léčiv, svou aktivitou předčí antineoplastikum irinotekan.



22n



25f

HT-29: $IC_{50} = 600 \text{ nmol.l}^{-1}$

$IC_{50} = 830 \text{ nmol.l}^{-1}$

Je rovněž pozoruhodné, že některé látky s cytostatickým účinkem vůči určitým z testovaných nádorových linií se nijak neprofilovaly v impedančním testu (xCELLigence) provedeném na zdravých buňkách (lidské embryonální ledvinové buňky).

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Obecné experimentální postupy

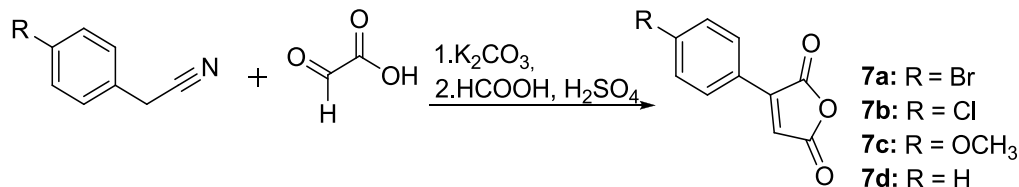
Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. THF byl před použitím predestilován z benzofenon ketylu, CH_2Cl_2 byl destilován z CaH_2 v čas potřeby. DMF, MeOH a EtOH byly vysušeny opakovaným stáním nad čerstvě aktivovanými molekulovými síty typu 3A.

Teploty tání všech látek byly měřeny na Koflerově bloku nebo na přístroji Buchi B-545 a nebyly korigovány. Měření IČ spekter všech látek bylo provedeno na přístroji NICOLET 6700 FT-IR. Hmotnostní spektra látek byla měřena na hmotnostním spektrometru MAGNUM FINNIGAN MAT s nízkou rozlišovací schopností (LRMS) a hmotnostním spektrometru Finnigan LCQ Advantage s iontovým záchytem (HRMS). Ionizace vzorků probíhala buď metodou elektronové ionizace (EI) nebo metodou ionizace elektrosprejem (ESI). Elementární analýza byla provedena na přístroji CHNS-OCE FISIONS EA 1110. NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$, $\text{THF}-d_8$ při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro ^1H a při 75 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v parts per million (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, td: triplet dubletů, m: multiplet), interakční konstanty (Hz). Všechna přiřazení byla provedena na základě gHSQC, gHMBC a gCOSY experimentů. V případě směsí diastereomerů jsou oba popsány jako A a B.

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F254 (Merck) s detekcí pod UV lampou nebo s pomocí detekčního činidla $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 g), $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ (4 g), konc. H_2SO_4 (10 ml), H_2O (200 ml) a následného zahřátí. Silikagel 60 (230-240 mesh) pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen od firmy E. Merck.

5.2. Syntéza

Obecný postup syntézy anhydridů kyseliny fenylmaleinové



Fenylacetonitril (0.05 mol) a kyselina glyoxalová (5.55 g, 0.075 mol) byly rozpuštěny ve 100 ml MeOH. Do vzniklého roztoku byl přidán uhličitan draselný (17.28 g, 0.127 mol). Směs byla míchána za laboratorní teploty 5 hodin, poté byla vzniklá sraženina zfiltrována, promyta dichlormethanem (250 ml) a následně suspendována v 500 ml destilované vody a ponechána míchat přes noc. Pevný podíl byl zfiltrován, vysušen na vzduchu a poté rozpuštěn v 100 ml směsi 88 % mravenčí a koncentrované sírové kyseliny (85:15). Vzniklý roztok byl zahříván pod zpětným chladičem 3 hodiny, poté byl nalit do ledové vody a vzniklá krystalická látka byla zfiltrována, promyta na filtru vodou a vysušena na vzduchu.

Anhydrid kyseliny 4-bromfenylmaleinové (7a)

Výtěžek: 72 %, nažloutlá krystalická látka; ¹H NMR spektrum látky se shodovalo s údaji v literatuře¹⁰¹.

Anhydrid kyseliny 4-chlorfenylmaleinové (7b)

Výtěžek: 68 %, nažloutlá krystalická látka; ¹H NMR spektrum látky se shodovalo s údaji v literatuře¹⁰¹.

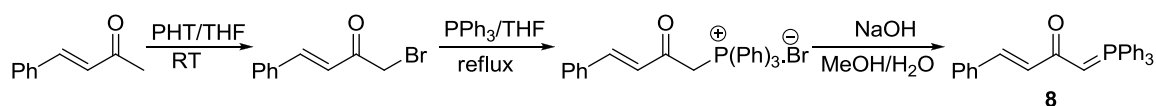
Anhydrid kyseliny 4-methoxyfenylmaleinové (7c)

Výtěžek: 62 %, nažloutlá krystalická látka; ¹H NMR spektrum látky se shodovalo s údaji v literatuře¹⁰².

Anhydrid kyseliny fenylmaleinové (7d)

Výtěžek: 48 %, bílá krystalická látka; $^1\text{H NMR}$ spektrum látky se shodovalo s údaji v literatuře¹⁰².

Příprava Wittigova činidla



Do roztoku 4-fenylbut-3-en-2-onu (6.85 g, 46.85 mmol) v suchém THF (110 ml) byl přidán roztok pyrrolidon hydrotribromidu (30.26 g, 60.96 mmol) v suchém THF (160 ml). Reakční směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce byl nadbytek pyrrolidon hydrotribromidu odfiltrován. Filtrát byl vakuově odpařen do sucha a získaný zbytek poté rozpuštěn v etheru, vytřepán s 5 % roztokem NaCl. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na_2SO_4 a rozpouštědla odpařena. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan - hexan : ethyl-acetát 6 : 1). **1-Brom-4-fenylbut-3-en-2-on** byl získán ve výtěžku 78 %, tyto bezbarvé krystaly byly použity v následující reakci.

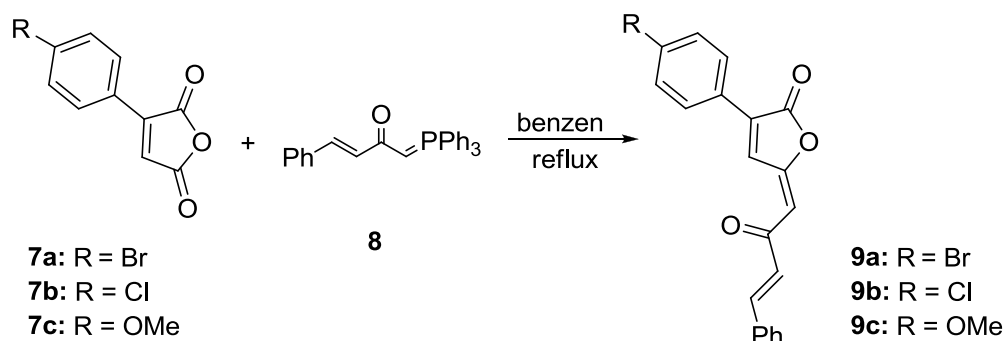
K roztoku 1-bromo-4-fenylbut-3-en-2-onu (8.195 g, 36.55 mmol) v suchém THF (45 ml) byl přidán trifenyfosfin (36.55 mmol) a směs byla míchána přes noc. Vzniklá trifenyfosfoniová sůl byla odfiltrována, promyta tetrahydrofuranem a následně vysušena pod vakuem. **(E)-4-Fenyl-2-oxobut-3-enyltrifenyfosfonium bromid** byl získán ve výtěžku 82%, jedná se o bílou krystalickou látku.

K suspenzi trifenyfosfoniové soli (8.1 g, 16.7 mmol) ve vodě (100 ml) a methanolu (100 ml) byl přidán roztok hydroxidu sodného (1.3 g) ve vodě (15 ml). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Po odpaření MeOH byla suspenze extrahována chloroformem. Organická fáze byla vytřepána s 5 % roztokem chloridu sodného a vysušena bezvodým Na_2SO_4 . Rozpouštědla byla odpařena a zbytek byl rekrystalizován z etheru. Krystaly byly vysušeny ve vakuu.

(E)-(Trifenyfosfonio)-4-fenyl-2-oxobut-3-enylid (8)

Výtěžek: 90%, žlutá krystalická látka, NMR spektra se shodovala s literaturou⁹³.

Obecný postup syntézy E- γ -alkylidenbutenolidů



Suspenze anhydridu **7a-c** (6.77 mmol) v benzenu (10 ml) byla přidána do zahřátého roztoku fosforanu **8** (5.64 mmol) v benzenu (25 ml) pod atmosférou argonu. Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 6 hodin. Pomocí TLC bylo monitorováno spotřebování výchozího fosforanu a reakční směs byla ochlazená. Vzniklé krystaly butenolidu byly odfiltrovány a opláchnuty ethyl-acetátem.

4-[(1E,3E)-4-Fenyl-2-oxobut-3-enyliden]-2-(4-bromfenyl)but-2-en-4-olid (9a**)**

Výtěžek: 61 %, žlutá krystalická látka; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.60 (1H, s, H4), 7.93-7.88 (2H, m, AA'BB', H2', H6'), 7.69 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, CH), 7.65-7.58 (4H, m, H3', H5', H2'', H6''), 7.46-7.41 (3H, m, H3'', H4'', H5''), 6.93 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, CH), 6.60 (1H, s, CH); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 188.3, 166.9, 158.5, 144.3, 134.4, 134.2, 133.6, 132.3, 131.1, 129.3, 129.1, 128.7, 127.5, 127.5, 125.7, 107.5; **IR**: (KBr) ν_{max} 1073, 1098, 1264, 1407, 1598, 1653, 1770, 3032 3062, 3081, 3099 cm^{-1} .

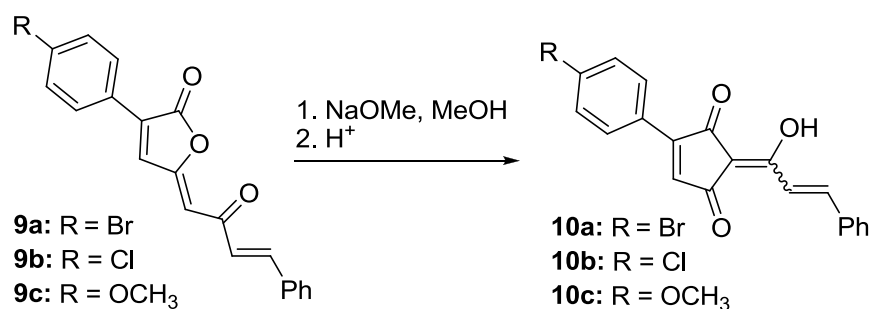
4-[(1E,3E)-4-Fenyl-2-oxobut-3-enyliden]-2-(4-chlorfenyl)-but-2-en-4-olid (9b**)**

Výtěžek: 51%, žlutá krystalická látka.

4-[(1E,3E)-4-Fenyl-2-oxobut-3-enyliden]-2-(4-methoxyfenyl)-but-2-en-4-olid (9c**)**

Výtěžek: 55 %, žlutá krystalická látka; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.45 (1H, s, H4), 8.06-7.96 (2H, m, AA'BB'), 7.73-7.56 (3H, m, CH, H2'', H6''), 7.48-7.37 (3H, m, H3'', H4'', H5''), 7.02-6.87 (3H, m, AA'BB', H3', H5', CH), 6.52 (1H, s, CH), 3.87 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 188.5, 167.5, 161.9, 159.2, 143.8, 135.1, 134.3, 130.9, 130.6, 129.7, 129.1, 128.6, 127.7, 121.3, 114.5, 106.3, 55.4.

Bazicky katalyzovaný přesmyk (*E*)- γ -alkylidenbutenolidů



K roztoku butenolidu (3.25 mmol) v suchém methanolu (25 ml) byl přidán roztok methanolátu sodného (32.66 mmol) v methanolu (10 ml). Vzniklý oranžový roztok byl míchán za laboratorní teploty 3-6 hodin (monitorován pomocí TLC) a poté nalit do ledové vody (60 ml) a okyselen na pH 1.0 přidáváním 2 M HCl. Produkt byl odfiltrován, překrystalizován ve směsi ethyl-acetát/hexan a bez charakterizace ihned použit do další reakce.

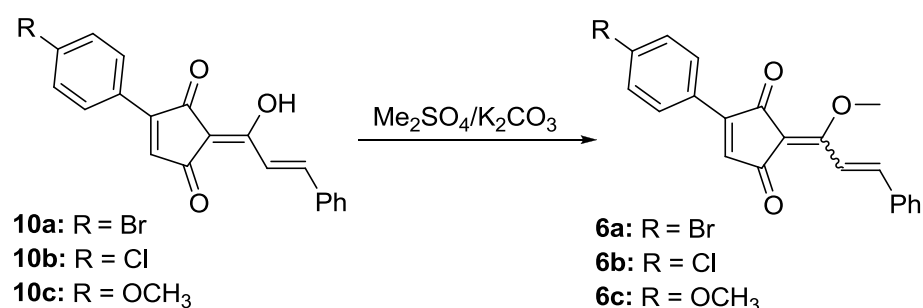
Výtěžky: 54 – 61 %, žluté krystaly.

2-[(*E*)-1-Hydroxy-3-fenylprop-2-enyliden]-4-(4-bromfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dion (10a)

2-[(*E*)-1-Hydroxy-3-fenylprop-2-enyliden]-4-(4-chlorfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dion (10b)

2-[(*E*)-1-Hydroxy-3-fenylprop-2-enyliden]-4-(4-methoxyfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dion (10c)

O-methylace



K roztoku **10a-c** (2 mmol) v suchém acetonu (50 ml) byl přidán uhličitán draselný (3.2 g) pod atmosférou argonu. Po 5 minutovém zahřívání pod zpětným chladičem byl

k tmavě žlutému roztoku přidán Me_2SO_4 (2.4 ml) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 30 minut. Po ochlazení byl odfiltrován K_2CO_3 a filtrát odpařen do sucha. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan – hexan : ethyl-acetát 95 : 5) a následnou krystalizací ve směsi hexan/ethyl-acetát.

2-[(2E)-3-Fenyl-1-methoxyprop-2-enyliden]-4-(4-bromfenyl)cyklopent-4-en-1,3-dion (6a)

Výtěžek: 50 %, žlutá krystalická látka; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) A+B δ 8.04 (1H, d, $J = 2.19$ Hz, H5) (A), 7.98 (1H, d, $J = 2.48$ Hz, H5) (B), 7.87-7.78 (2H, m, H2', H6') (A+B), 7.74-7.55 (5H, m, CH, H3', H5', H2'', H6'') (A+B), 7.46-7.37 (3H, m, H3'', H4'', H5'') (A+B), 7.13 (1H, s, CH) (A), 7.11 (1H, s, CH) (B), 4.27 (3H, s, OCH_3) (A), 4.26 (3H, s, OCH_3) (B); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) A+B δ 190.9, 151.6, 151.4, 143.7, 143.5, 138.3, 138.0, 135.3, 132.6, 132.1, 132.1, 131.0, 130.8, 130.6, 130.5, 130.4, 130.2, 129.3, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 125.7, 125.5, 121.2, 121.0, 76.6, 65.0, 64.9, 29.7; **IR**: (KBr) ν_{max} 1062, 1312, 1444, 1489, 1558, 1578, 1594, 1615, 1667, 2924, 2951, 3061, 3081 cm^{-1} .

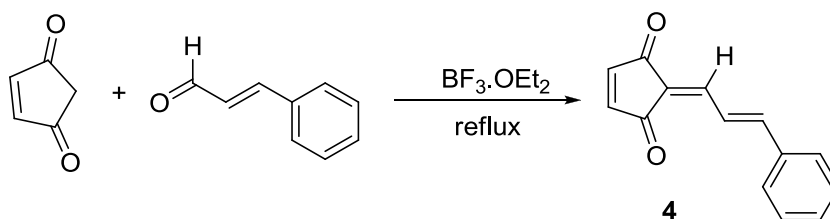
2-[(2E)-3-Fenyl-1-methoxyprop-2-enyliden]-4-(4-chlorfenyl)cyklopent-4-en-1,3-dion (6b)

Výtěžek: 65 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 164-165 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) A+B δ 8.01 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H5) (A), 7.99 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H5) (B), 7.93-7.85 (2H, m, H2', H6') (A+B), 7.73-7.62 (3H, m, H3', H5', CH) (A+B), 7.49-7.37 (5H, m, H2'', H3'', H4'', H5'', H6'') (A+B), 7.11 (1H, s, CH) (A), 7.09 (1H, s, CH) (B), 4.27 (3H, s, OCH_3) (A), 4.26 (3H, s, OCH_3) (B); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) A+B: δ 193.8, 193.2, 191.1, 191.0, 170.5, 170.4, 151.5, 151.3, 143.6, 143.4, 138.3, 138.0, 137.1, 137.0, 135.9, 130.6, 130.5, 130.3, 130.2, 129.7, 129.1, 129.0, 129.0, 128.7, 128.6, 128.3, 121.2, 121.0, 109.6, 109.3, 76.6, 76.3, 65.0, 64.8; **IR**: (KBr) ν_{max} 1314, 1442, 1554, 1615, 1665, 3058 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 350.1 $[\text{M}]^+$ (23), 332.0 (7), 305.0 (9), 255.1 (5), 228.1 (7), 211.0 (9), 185.1 (100), 158.1 (10), 128.1 (28); **C, H, N**: pro $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClO}_3$ vypočteno: C, 71.90; H, 4.31; nalezeno: C, 72.05; H, 4.38.

2-[(2E)-3-Fenyl-1-methoxyprop-2-enyliden]-4-(4-methoxyfenyl)cyklopent-4-en-1,3-dion (6c)

Výtěžek: 38 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 146 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ A+B 8.07 (1H, d, *J* = 3.3 Hz, H5) (A), 8.02 (1H, d, *J* = 3.3 Hz, H5) (B), 8.01-7.93 (2H, m, AA'BB', H2', H6') (A+B), 7.71-7.59 (3H, m, H2'', H6'', CH) (A+B), 7.47-7.34 (3H, m, H3'', H4'', H5'') (A+B), 7.06 (1H, s, CH) (A), 7.04 (1H, s, CH) (B), 7.02-6.94 (2H, m, AA'BB', H3', H5') (A+B), 4.25 (3H, s, OCH₃) (A), 4.24 (3H, s, OCH₃) (B), 3.87 (3H, s, OCH₃) (A+B); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) A+B: δ 194.5, 193.5, 191.9, 191.3, 169.4, 169.3, 161.9, 161.8, 158.9, 152.4, 152.2, 142.9, 142.7, 136.4, 136.0, 135.4, 130.9, 130.8, 130.3, 130.3, 128.9, 128.6, 128.5, 122.4, 122.4, 121.4, 121.2, 114.3, 110.5, 110.2, 100.1, 85.1, 64.9, 64.6, 55.4; IR: (KBr) ν_{max} 1183, 1265, 1308, 1509, 1547, 1612, 1663, 2850, 2925, 3080 cm⁻¹; LRMS (EI): *m/z* (relativní intenzita) 346.1 [M]⁺ (37), 328.1 (7), 317.1 (9), 287.0 (14), 259.0 (7), 229.1 (9), 211.0 (9), 185.1 (100), 155.1 (7), 132.1 (38); C, H, N: pro C₂₂H₁₈O₄ vypočteno: C, 76.29; H, 5.24; nalezeno: C, 75.99; H, 5.49.

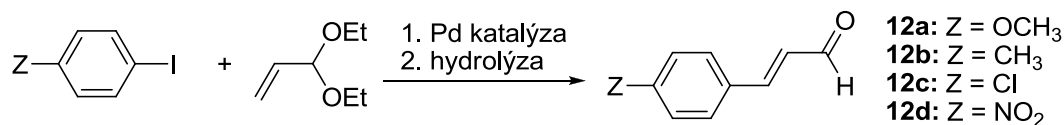
2-[(2E)-3-Fenylprop-2-enyliden]cyklopent-4-en-1,3-dion (4)⁹⁷



K cyklopent-4-en-1,3-dionu (0.52 g, 5.39 mmol) v nadbytku Lewisovy kyseliny BF₃·OEt₂ (13.66 ml, 0.108 mol) byl přidán cinnamaldehyd (0.68 ml, 5.39 mmol) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, po 4 hodinách byl patrný vznik produktu, výchozí látky ještě nebyly spotřebovány. Reakce byla míchána přes noc. Po zředění ethyl-acetátem byla reakční směs vytřepána s 5 % vodným roztokem uhličitanu sodného. Získaná směs nezreagovaného výchozího aldehydu s produktem byla dělena sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan – hexan : ethyl-acetát 93 : 7) a produkt byl následně krystalizován ve směsi hexan/ethyl-acetát.

Výtěžek: 7 %, spektra viz modifikovaná příprava na straně 104.

Obecný postup syntézy *p*-substituovaných skořicových aldehydů



K roztoku *p*-substituovaného aryljodidu (0.5 mmol) v 2.0 ml DMF byl za míchání přidán 3,3-diethoxypropen (0.229 ml, 1.5 mmol), Bu₄NOAc (0.302 g, 1.0 mmol), uhličitán draselný (0.104 g, 0.75 mmol), chlorid draselný (0.037 g, 0.5 mmol), a octan palladnatý (0.003 g, 0.015 mmol). Reakční směs byla míchána 1.5 hodiny při 90 °C. Po ochlazení byl pomalu přidán 2 M roztok kyseliny chlorovodíkové a směs byla míchána 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla reakční směs zředěna etherem a vytřepána s vodou. Organická fáze byla vysušena nad bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno. Surový produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan – hexan : ethyl-acetát 90 : 10) a následně krystalizován ve směsi hexan/ethyl-acetát.

***p*-Methoxycinnamaldehyd (12a)**

Výtěžek: 70 %, světle žlutá krystalická látka, t.t.: 56-57 °C, literatura¹⁶⁰ uvádí 58.5-59.8 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 9.65 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, CHO), 7.55-7.49 (2H, m, AA', BB', H₂, H₆), 7.42 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, CH), 6.97-6.91 (2H, m, AA'BB', H₃, H₅), 6.61 (1H, dd, *J*₁ = 7.7 Hz, *J*₂ = 15.9 Hz, CH), 3.86 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 193.7, 162.2, 152.7, 130.3, 126.8, 126.5, 114.5, 55.4.

***p*-Methylcinnamaldehyd (12b)**

Výtěžek: 58 %, světle žlutá krystalická látka, t.t.: 42-43 °C, literatura¹⁶¹ uvádí 40-42 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 9.68 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, CHO), 7.5-7.41 (3H, m, AA'BB'překrytý, H₂, H₆, ArCH), 7.27-7.21 (2H, m, AA'BB', H₃, H₅), 6.68 (1H, dd, *J*₁ = 7.7 Hz, *J*₂ = 15.9 Hz, CHCHO), 2.4 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 193.8, 152.9, 142.0, 131.3, 129.8, 128.5, 127.7, 21.6.

***p*-Chlorcinnamaldehyd (12c)**

Výtěžek: 61 %, bílá krystalická látka, t.t.: 62-63 °C, literatura¹⁶² uvádí 61-63 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 9.7 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, CHO), 7.53-7.38 (5H, m, H₂, H₃,

H5, H6, CH), 6.7 (1H, dd, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 15.9$ Hz, CHCHO); ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ 193.4, 151.1, 137.3, 132.5, 129.6, 129.4, 128.9.

***p*-Nitrocinnamaldehyd (12d)**

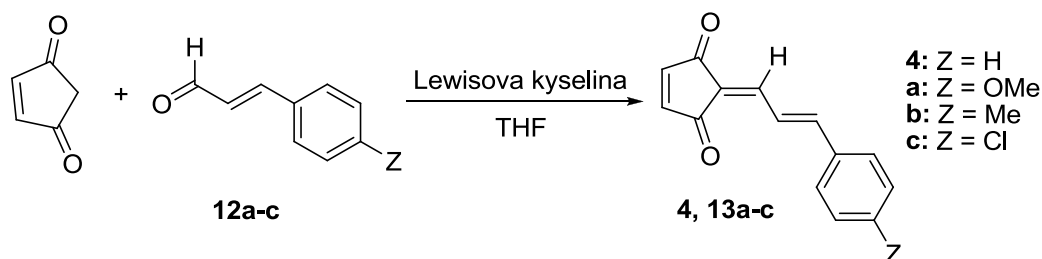
Výtěžek: 47 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 139-140 °C, (literatura¹⁶⁰ uvádí 137-138.2 °C; ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ 9.77 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, CHO), 8.33-8.24 (2H, m, AA', BB', H2, H6), 7.78-7.69 (2H, m, AA'BB', H3, H5), 7.54 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, ArCH), 6.81 (1H, dd, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 16.2$ Hz, CHCHO); ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ 192.8, 148.9, 139.9, 131.7, 129.0, 124.3.

Obecný postup Knoevenagelovy kondenzace aldehydů s diony

K roztoku aldehydu (6 mmol) v suchém THF (3 ml) byla přidána Lewisova kyselina - (*i*-PrO)₄Ti případně (CF₃SO₃)₂Cu (0.6 mmol) a směs byla míchána 30 minut pod atmosférou argonu. Poté byl přidán cyklopent-4-en-1,3-dion (0.192 g, 2 mmol) v pevné podobě. Reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Úbytek výchozího cyklopent-4-en-1,3-dionu byl pozorován pomocí TLC za současného přibývání produktu, který byl na chromatografické desce dobře detekovatelný i ve viditelné oblasti světelného spektra. Reakční směs byla zředěna ethyl-acetátem a třikrát vytřepána s 5 % roztokem uhličitanu draselného. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno. Produkt byl získán pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (gradientová eluce, hexan – hexan : ethyl-acetát 93 : 7) a následně krystalizován ve směsi hexan/ethyl-acetát.

V některých případech docházelo při vytřepávání reakční směsi s roztokem uhličitanu draselného ke vzniku sraženiny, která zpracování komplikovala. V takových případech byla reakční směs přímo odpařena do sucha a dělena sloupcovou chromatografií.

Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s cinnamaldehydy



2-[(2E)-3-Fenylprop-2-enyliden]cyklopent-4-en-1,3-dion (4)

Výtěžek: 64 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 165 °C, literatura¹¹¹ uvádí 192-196 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (1H, dd, $J_1 = 11.8$ Hz, $J_2 = 15.7$ Hz, CH), 7.67-7.58 (2H, m, H2', H6'), 7.45-7.33 (4H, m, CH, H3', H4', H5'), 7.29-7.19 (3H, m, CH, H4, H5); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 193.9, 193.7, 150.4, 148.1, 146.2, 141.7, 135.4, 130.7, 129.0, 128.5, 123.8, 122.8; IR: (KBr) ν_{\max} 1201, 1625, 1677, 3062, 3077 cm⁻¹; LRMS (EI): m/z (relativní intenzita) 210.1 [M]⁺ (100), 181.1 (58), 153.0 (62), 128.0 (82), 115.0 (10), 102.1 (28); C, H, N: pro C₁₄H₁₀O₂ vypočteno: C, 79.98; H, 4.79; nalezeno: C, 79.67; H, 5.02.

2-[(2E)-3-(4-Methoxyfenyl)prop-2-enyliden]cyklopent-4-en-1,3-dion (13a)

Výtěžek: 21 %, světle oranžová krystalická látka, t.t.: 216 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (1H, dd, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 15.4$ Hz, CH), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.36 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, CH), 7.28-7.15 (3H, m, CH, H4, H5), 6.98-6.88 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.86 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 194.2, 194.0, 161.9, 150.6, 147.8, 145.8, 142.4, 130.4, 130.3, 128.3, 120.8, 114.5, 55.4; IR: (KBr) ν_{\max} 1175, 1255, 1511, 1588, 1607, 1684, 1705, 2853, 2923, 2956, 3056 cm⁻¹; LRMS (ESI): m/z (relativní intenzita) 241.2 [M+H]⁺ (100), 218.0 (12), 233.0 (9), 185.0 (7), 1652.5 (5), 150.7 (5), 141.9 (5), 116.9 (2), 102.1 (4); C, H, N: pro C₁₅H₁₂O₃ vypočteno: C, 74.99; H, 5.03; nalezeno: C, 75.12; H, 5.12.

2-[(2E)-3-(4-Methylfenyl)prop-2-enyliden]cyklopent-4-en-1,3-dion (13b)

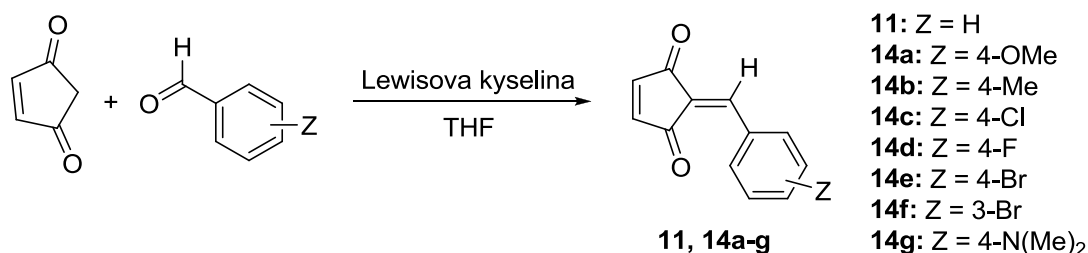
Výtěžek: 36 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 180-181 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (1H, dd, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 15.5$ Hz, CH), 7.55-7.5 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.37 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, CH), 7.27-7.17 (5H, m, CH, H4, H5, H3', H5'), 2.39 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 193.8, 150.7, 147.9, 146.0, 142.1, 141.5, 132.7,

129.8, 128.6, 123.2, 121.9, 21.6; **IR:** (KBr) ν_{\max} 1172, 1600, 1622, 1674, 3054 cm^{-1} ; **LRMS (EI):** m/z (relativní intenzita) 224.1 $[\text{M}]^+$ (100), 195.1 (18), 181.1 (52), 152.1 (21), 141.1 (38), 115.1 (25); **C, H, N:** pro $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2$ vypočteno: C, 80.34; H, 5.39; nalezeno: C, 80.32; H, 5.48.

2-[(2E)-3-(4-Chlorfenyl)prop-2-enyliden]cyklopent-4-en-1,3-dion (13c)

Výtěžek: 30 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 172-173 °C; **^1H NMR:** (300 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (1H, dd, $J_1=12.0$ Hz, $J_2=15.5$ Hz, CH), 7.59-7.51 (2H, m, H2',H6'), 7.42-7.13 (6H, m, CH, H4, H5, H3',H5', CH); **^{13}C NMR:** (75 MHz, CDCl_3) δ 193.9, 193.5, 148.5, 148.2, 146.3, 141.1, 136.6, 133.9, 129.6, 129.3, 124.2, 123.2; **IR:** (KBr) ν_{\max} 1199, 1317, 1491, 1587, 1616, 1686, 1706, 3061 cm^{-1} ; **LRMS (EI):** m/z (relativní intenzita) 244.0 $[\text{M}]^+$ (100), 209.1 (75), 181.1 (80), 162.0 (34), 152.1 (56), 127.1 (45); **C, H, N:** pro $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClO}_2$ vypočteno : C, 68.72; H, 3.71; nalezeno C, 68.87; H, 3.88.

Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s benzaldehydy



2-Benzylidencyklopent-4-en-1,3-dion (11)

Výtěžek: 43 %, nažloutlá krystalická látka, t.t.: 144-145 °C¹¹²; **^1H NMR:** (300 MHz, CDCl_3) δ 8.34-8.25 (2H, m, H2',H6'), 7.63 (1H, s, CH), 7.57-7.45 (3H, m, H3',H4',H5'), 7.35-7.26 (2H, m, H4, H5); **^{13}C NMR:** (75 MHz, CDCl_3) δ 193.9, 192.3, 149.3, 145.2, 144.0, 133.7, 132.9, 132.5, 128.8, 125.0; **IR:** (KBr) ν_{\max} 1170, 1593, 1620, 1682, 1732, 3070 cm^{-1} ; **LRMS (EI):** m/z (relativní intenzita) 184.1 $[\text{M}]^+$ (100), 155.0 (8), 128.1 (32), 102.1 (75), 76.0 (24); **C, H, N:** pro $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2$ vypočteno: C, 78.25; H, 4.38; nalezeno: C, 77.89; H, 4.73.

2-(4-Methoxybenzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (14a)

Výtěžek: 31 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 166 °C¹¹¹; **^1H NMR:** (300 MHz, CDCl_3) δ 8.39-8.34 (2H, m, AA', BB', H2',H6'), 7.57 (1H, s, CH), 7.28-7.18 (2H, m, H4, H5),

7.02-6.96 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.90 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 194.8, 193.2, 163.9, 148.9, 144.9, 144.0, 136.9, 126.0, 122.6, 114.6, 55.8; IR: (KBr) ν_{max} 1172, 1278, 1515, 1559, 1588, 1679, 3078 cm⁻¹; LRMS (ESI): *m/z* (relativní intenzita) 215.2 [M+H]⁺ (11), 187.1 (14), 159.1 (7), 131.1 (5), 109.0 (100); C, H, N: pro C₁₃H₁₀O₃ vypočteno: C, 72.89; H, 4.71; nalezeno: C, 73.06; H, 4.89.

2-(4-Methylbenzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (14b)

Výtěžek: 49 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 144-145 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.25-8.20 (2H, m, H2', H6'), 7.6 (1H, s, CH), 7.31-7.23 (4H, m, H4, H5, H3', H5'), 2.43 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 194.2, 192.6, 149.1, 145.0, 144.2, 144.1, 134.0, 130.0, 129.6, 124.0, 21.9; IR: (KBr) ν_{max} 1175, 1379, 1599, 1617, 1677, 3070 cm⁻¹; LRMS (ESI): *m/z* (relativní intenzita) 199.1 [M+H]⁺ (5), 181.2 (52), 171.3 (66), 153.2 (100), 143.3 (30), 129.3 (32), 71.4 (38); C, H, N: pro C₁₃H₁₀O₂ vypočteno: C, 78.77; H, 5.09; nalezeno: C, 79.13; H, 5.30.

2-(4-Chlorbenzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (14c)

Výtěžek: 49 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 156-157 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.29-8.23 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.56 (1H, s, CH), 7.48-7.42 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.36-7.28 (2H, m, H4, H5); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 193.5, 192.3, 149.4, 145.5, 142.3, 139.2, 134.9, 140.0, 129.1, 125.3; IR: (KBr) ν_{max} 1178, 1585, 1616, 1678, 3067 cm⁻¹; LRMS (ESI): *m/z* (relativní intenzita) 219.1 [M+H]⁺ (5), 191.2 (17), 184.2 (100), 163.2 (7), 149.3 (1), 128.3 (1); C, H, N: pro C₁₂H₇ClO₂ vypočteno: C, 65.92; H, 3.23; nalezeno: C, 65.96; H, 3.39.

2-(4-Fluorbenzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (14d)

Výtěžek: 25 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 184-185 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.4-8.34 (2H, m, H2', H6'), 7.58 (1H, s, CH), 7.35-7.25 (2H, m, H4, H5), 7.2-7.12 (2H, m, H3', H5'); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 193.8, 192.5, 165.4 (d, *J* = 256.9 Hz), 149.2, 145.3, 142.6, 136.5 (d, *J* = 9.4 Hz), 129.0 (d, *J* = 3.2 Hz), 124.5, 116.1 (d, *J* = 21.7); IR: (KBr) ν_{max} 1171, 1515, 1597, 1620, 1682, 3062, 3077 cm⁻¹; LRMS (ESI): *m/z* (relativní intenzita) 203.2 [M+H]⁺ (23), 185.3 (3), 175.2 (100), 147.2 (79), 133.3 (7), 127.3 (3); C, H, N: pro C₁₂H₇FO₂ vypočteno: C, 71.29; H, 3.49; nalezeno: C, 71.10; H, 3.51.

2-(4-Brombenzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (14e)

Výtěžek: 57 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 180-181 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.2-8.15 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.65-7.59 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.54 (1H, s, CH), 7.36-7.28 (2H, m, H4, H5); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 193.5, 192.3, 149.5, 145.5, 142.4, 135.0, 132.1, 131.4, 128.0, 125.5; **IR**: (KBr) ν_{max} 1175, 1581, 1619, 1679 cm^{-1} ; **LRMS (ESI)**: m/z (relativní intenzita) 263.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (11), 246.1 (1), 236.1 (4), 185.1 (100), 156.1 (2), 136.1 (4); **C, H, N**: pro $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{BrO}_2$ vypočteno: C, 54.78; H, 2.68; nalezeno: C, 54.73; H, 2.78.

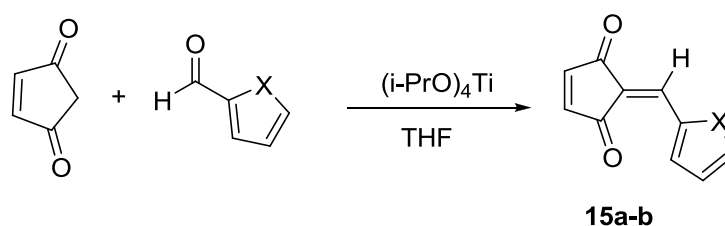
2-(3-Brombenzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (14f)

Výtěžek: 31 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 124-125 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.48 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H2'), 8.2 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H4'), 7.67-7.63 (1H, m, H6'), 7.53 (1H, s, CH), 7.4-7.29 (3H, m, H5', H4, H5); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 193.3, 192.0, 149.6, 145.7, 142.0, 135.9, 135.5, 134.3, 132.0, 130.2, 126.2, 122.7; **IR**: (KBr) ν_{max} 1180, 1369, 1620, 1682, 1729, 1756, 3066 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 262.0 $[\text{M}]^+$ (42), 208.0 (8), 183.0 (100), 127.1 (22), 101.0 (18); **C, H, N**: pro $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{BrO}_2$ vypočteno: C, 54.78; H, 2.68; nalezeno: C, 54.98; H, 2.76.

2-(4-(*N,N*-Dimethylamino)benzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (14g)

Výtěžek: 10 %, tmavě oranžová krystalická látka, t.t.: 113.2 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.37-8.27 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.49 (1H, s, CH), 7.14-7.05 (2H, m, H4, H5), 6.76-6.66 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 3.11 (6H, s, NCH_3); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 195.6, 193.6, 153.5, 147.5, 144.4, 143.4, 137.2, 121.1, 118.8, 111.3, 40.0; **IR**: (ATR) ν_{max} 811, 844, 1049, 1167, 1372, 1522, 1558, 1660, 2908, 3074 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 227.1 $[\text{M}]^+$ (100), 210.1 (1), 198.1 (6), 183.1 (6), 170.1 (7), 155.1 (3), 144.1 (11), 128.1 (8), 115.1 (4), 101.0 (5), 77.0 (4), 55.0 (3); **HRMS (EI)**: Vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ 227.0946, nalezeno 227.0940; **C, H, N**: pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ vypočteno : C, 73.99; H, 5.77; N, 6.16; nalezeno C, 73.82; H, 5.88; N, 5.94.

Knoevenagelova kondenzace cyklopent-4-en-1,3-dionu s heterocyklickými aldehydy



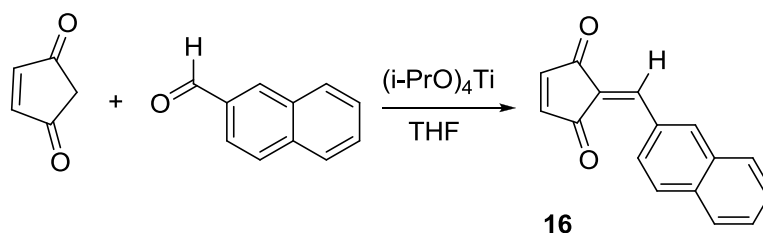
2-(Furan-2-ylmetylen)cyklopent-4-en-1,3-dion (15a)

Výtěžek: 70 %, oranžová krystalická látka, t.t.: 147 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.32 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H3'), 7.73-7.71 (1H, m, H4'), 7.48 (1H, s, CH), 7.27-7.19 (2H, m, H4, H5), 6.68-6.65 (1H, m, H5'); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 193.7, 192.3, 150.6, 148.5, 148.5, 145.3, 126.7, 123.7, 120.6, 114.3; IR: (KBr) ν_{max} 1170, 1226, 1353, 1468, 1616, 1681 cm⁻¹; LRMS (EI): *m/z* (relativní intenzita) 174.0 [M]⁺ (100), 146.0 (6), 120.0 (20), 92.0 (13); C, H, N: pro C₁₀H₆O₃ vypočteno: C, 68.97; H, 3.47; nalezeno: C, 69.36; H, 3.60.

2-(Thiofen-2-ylmetylen)cyklopent-4-en-1,3-dion (15b)

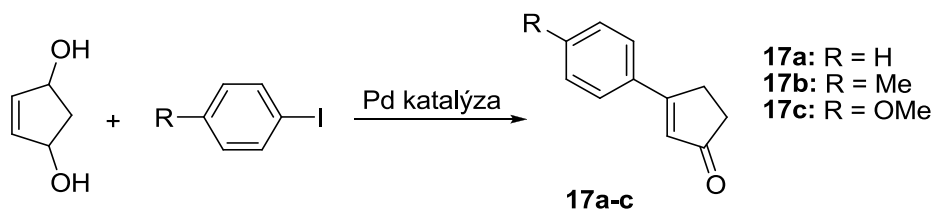
Výtěžek: 45 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 165-166 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H5'), 7.81-7.78 (1H, m, H3'), 7.73 (1H, s, CH), 7.28-7.24 (1H, m, H4'), 7.22-7.18 (2H, m, H4, H5); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 193.9, 192.7, 148.2, 145.2, 140.8, 137.3, 136.6, 133.4, 128.5, 120.7; IR: (KBr) ν_{max} 1186, 1320, 1417, 1603, 1678, 1730, 3062, 3112 cm⁻¹; LRMS (EI): *m/z* (relativní intenzita) 190.0 [M]⁺ (100), 162.0 (5), 134.0 (53), 108.0 (38), 82.0 (10); C, H, N: pro C₁₀H₆O₂S vypočteno: C, 63.14; H, 3.18; S, 16.86; nalezeno: C, 62.98; H, 3.17; S, 16.45.

2-(Naftalen-2-ylmetylen)cyklopent-4-en-1,3-dion (16)



Výtěžek: 22 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 190.3 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.73 (1H, s, CH), 8.47 (1H, dd, $J_1 = 1.8$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz, Ar), 8.0-7.82 (3H, m, Ar), 7.77 (1H, s, H1'), 7.63-7.50 (2H, m, Ar), 7.36-7.26 (2H, m, H4, H5); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 194.0, 192.5, 149.2, 145.2, 144.1, 136.3, 135.3, 132.9, 130.3, 129.6, 128.8, 128.4, 127.7, 126.7, 124.9; **IR**: (ATR) ν_{max} 1053, 1171, 1605, 1677, 2922, 3070 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 234.1 $[\text{M}]^+$ (100), 205.1 (7), 178.1 (19), 152.1 (48), 126.1 (7), 117.0 (4), 103.0 (2), 89.0 (5), 76.0 (15), 63.0 (7); **HRMS (EI)**: Vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_2$ 234.0681, nalezeno 234.0684; **C, H, N**: pro $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_2$ vypočteno : C, 82.04; H, 4.30; nalezeno C, 81.82; H, 4.41.

Obecný postup syntézy 3-fenylcyklopent-2-enonů Heckovou reakcí



K roztoku *p*-substituovaného aryljodidu (0.5 mmol) v 2 ml suchého DMF byl v atmosféře argonu za míchání přidán cyklopent-4-en-1,3-diol (0.15 g, 1.5 mmol), Bu_4NOAc (0.302 g, 1.0 mmol), uhličitan draselný (0.104 g, 0.75 mmol), chlorid draselný (0.037 g, 0.5 mmol) a octan palladnatý (0.003 g, 0.015 mmol). Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 90 °C 3 hodiny. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs zředěna etherem a vytřepána s vodou. Organická fáze byla vysušena nad bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno. Surový produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan – hexan : ethyl-acetát 90 : 10) a následně krystalizován ve směsi hexan/ethyl-acetát.

3-Fenylcyklopent-2-enon (17a)¹¹⁷

Výtěžek: 35 %, bílá krystalická látka, t.t.: 79.2 °C, literatura¹⁶³ uvádí 80-81 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.69-7.60 (2H, m, H2', H6'), 7.49-7.41 (3H, m, H3', H4', H5'), 6.57 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H2), 3.08-3.0 (2H, m, H5), 2.62-2.53 (2H, m, H4); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 209.3, 173.9, 134.0, 131.2, 128.9, 127.4, 126.8, 35.2, 28.6; **IR**: (ATR) ν_{max} 1192, 1272, 1446, 1591, 1668, 1677, 2924, 2954, 3057, 3075 cm^{-1} ;

LRMS (EI): m/z (relativní intenzita) 158.1 [M]⁺ (100), 129.1 (61), 115.1 (30), 102.0 (21); **C, H, N:** pro $C_{11}H_{10}O$ vypočteno: C, 83.51; H, 6.37; nalezeno: C, 83.75; H, 6.62.

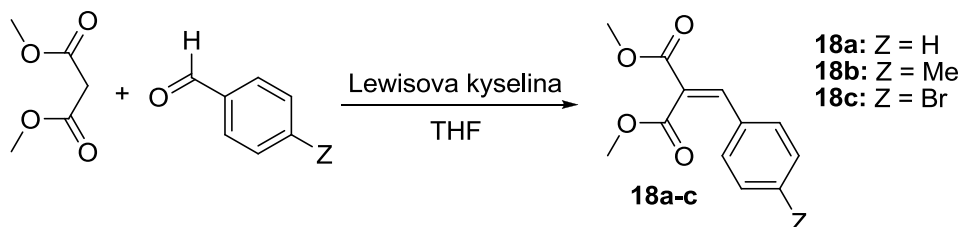
3-(4-Methylfenyl)cyklopent-2-enon (17b)

Výtěžek: 29 %, bílá krystalická látka, t.t.: 99.1 °C¹⁶⁴; **¹H NMR:** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.58-7.51 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 7.28-7.21 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 6.52 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H2), 3.08-2.95 (2H, m, H5), 2.62-2.50 (2H, m, H4), 2.4 (3H, s, CH_3); **¹³C NMR:** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 174.0, 141.8, 131.3, 129.6, 126.8, 126.6, 35.2, 28.5, 21.5; **IR:** (ATR) ν_{max} 1193, 1594, 1671, 2917, 2957, 3027 cm^{-1} ; **LRMS (EI):** m/z (relativní intenzita) 172.1 [M]⁺ (92), 157.1 (100), 143.1 (15), 129.1 (47), 115.1 (33); **C, H, N:** pro $C_{12}H_{12}O$ vypočteno: C, 83.69; H, 7.02; nalezeno: C, 83.65; H, 7.22.

3-(4-Methoxyfenyl)cyklopent-2-enon (17c)¹¹⁷

Výtěžek: 31 %, oranžovo-růžová krystalická látka, t.t.: 138.7 °C, literatura¹⁶⁵ uvádí 140-141 °C; **¹H NMR:** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.64-7.58 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 6.98-6.92 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 6.46 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H2), 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.05-2.94 (2H, m, H5), 2.6-2.51 (2H, m, H4); **¹³C NMR:** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 209.2, 173.6, 162.0, 128.6, 126.7, 125.4, 114.2, 55.4, 35.2, 28.5; **IR:** (ATR) ν_{max} 1192, 1594, 1663, 2919, 2960, 3060 cm^{-1} ; **LRMS (EI):** m/z (relativní intenzita) 188.1 [M]⁺ (100), 172.1 (5), 157.1 (42), 145.1 (22), 132.1 (14), 115.1 (19); **C, H, N:** pro $C_{12}H_{12}O_2$ vypočteno: C, 76.57; H, 6.43; nalezeno: C, 76.48; H, 6.89.

Knoevenagelova kondenzace dalších diionů s aldehydy



Dimethyl-benzylidenmalonát (18a)¹²¹

Výtěžek: 48 %, bílá krystalická látka, t.t.: 41.8 °C; **¹³C NMR:** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 167.1, 164.5, 143.0, 132.7, 130.7, 129.4, 128.9, 125.4, 52.7; **IR:** (KBr) ν_{max} 1203, 1223, 1272, 1433, 1622, 1723, 2950, 3033 cm^{-1} ; **LRMS (ESI):** m/z (relativní intenzita) 221.1

$[M+H]^+$ (100), 189.3 (39), 121.4 (5); **C, H, N:** pro $C_{12}H_{12}O_4$ vypočteno: C, 65.45; H, 5.49; nalezeno: C, 65.68; H, 5.77.

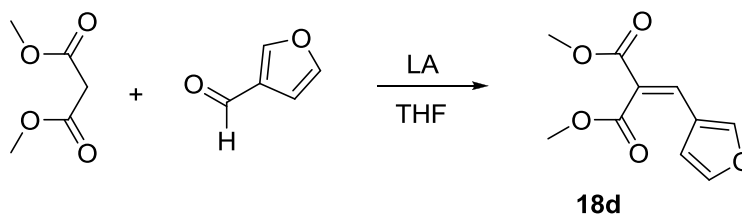
Dimethyl-2-(4-methylbenzyliden)malonát (18b)¹²³

Výtěžek: 9 %, bílá krystalická látka, t.t.: 50-51 °C; **¹H NMR:** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 (1H, s, CH), 7.35-7.29 (2H, m, AA'BB', H2', H6'), 7.22-7.15 (2H, m AA'BB', H3', H5'), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 2.37 (3H, s, CH₃); **¹³C NMR:** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.1, 143.4, 141.8, 130.4, 130.1, 129.9, 124.8, 54.1, 53.04, 53.0, 21.9.

Dimethyl-2-(4-brombenzyliden)malonát (18c)

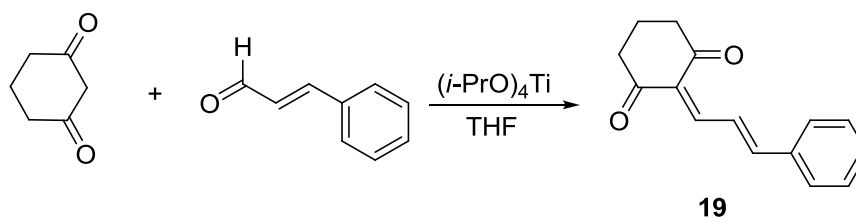
Výtěžek: 8 %, žlutá olejovitá kapalina; **¹H NMR:** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69 (1H, s, CH), 7.55-7.49 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.31-7.25 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃); **¹³C NMR:** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.8, 164.3, 141.6, 132.2, 131.7, 130.7, 126.1, 125.2, 52.8.

Dimethyl-2-(furan-3-ylmetylen)malonát (18d)¹²⁴



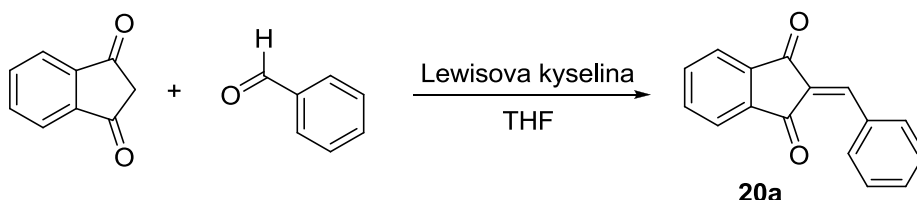
Výtěžek: 14 %; **¹³C NMR:** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 167.0, 164.6, 146.9, 144.6, 133.4, 123.5, 120.1, 108.7, 52.7, 52.5.

2-[(2E)-3-Fenylprop-2-enyliden]cyklohexan-1,3-dion (19)¹¹⁰



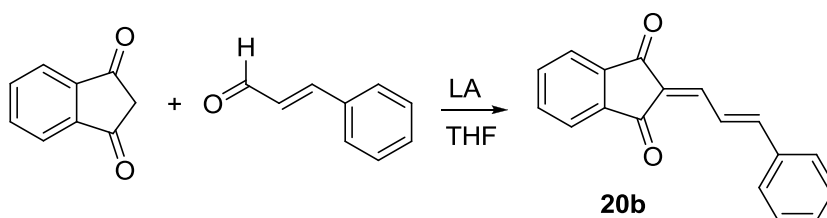
Výtěžek: 37 %, oranžová krystalická látka, t.t.: 110.1 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (1H, dd, $J_1 = 11.9$ Hz, $J_2 = 15.5$ Hz, CH), 7.81 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, CH), 7.65-7.57 (2H, m, H2', H6'), 7.44-7.29 (4H, m, H3', H4', H5', CH), 2.69-2.60 (4H, m, H4, H6), 2.09-1.97 (2H, m, H5); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 199.2, 198.1, 153.4, 151.8, 135.6, 130.9, 130.5, 129.0, 128.7, 125.6, 40.3, 38.7, 18.1; **IR**: (ATR) ν_{max} 1159, 1271, 1368, 1540, 1570, 1647, 1653, 2924, 2949 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 226.1 $[\text{M}]^+$ (100), 198.1 (12), 170.1 (49), 155.1 (12), 149.1 (21), 141.1 (28), 128.1 (32), 115.1 (5); **C, H, N**: pro $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_2$ vypočteno: C, 79.62; H, 6.24; nalezeno: C, 79.25; H, 6.62.

2-Benzyliden-1H-inden-1,3(2H)-dion (20a)¹²⁹



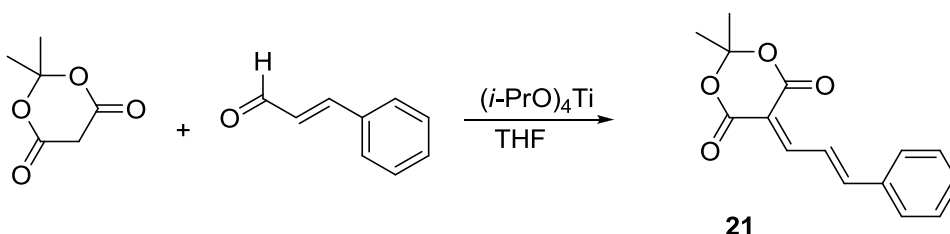
Výtěžek: 41 %, nažloutlá krystalická látka, t.t.: 152.3 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.49-8.41 (2H, m, H5, H6), 8.04-7.97 (2H, m, H4, H7), 7.90 (1H, s, CH), 7.84-7.77 (2H, m, H2', H6'), 7.58-7.47 (3H, m, H3', H5', H6'); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 190.2, 189.0, 146.9, 142.5, 140.0, 135.4, 135.2, 134.1, 133.2, 133.0, 129.1, 128.8, 123.33, 123.29; **IR**: (ATR) ν_{max} 1202, 1348, 1567, 1585, 1621, 1682, 1726, 2924, 3065 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 234.1 $[\text{M}]^+$ 205.1 (10), 176.1 (13), 151.1 (5), 129.0 (4), 104.0 (9); **C, H, N**: pro $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_2$ vypočteno: C, 82.04; H, 4.30; nalezeno: C, 81.75; H, 4.50.

2-[(2E)-3-Fenylprop-2-enyliden]-1H-inden-1,3(2H)-dion (20b)



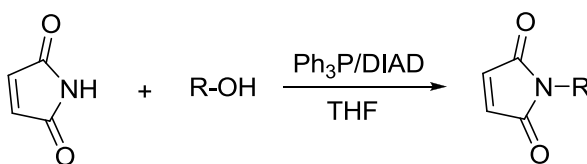
Výtěžek: 67 %, oranžová krystalická látka, t.t.: 153.2 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.43 (1H, dd, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 15.6$ Hz, CH), 7.99-7.91 (2H, m, H5, H6), 7.82-7.73 (2H, m, H4, H7), 7.7-7.58 (3H, m, H2', H6', CH), 7.46-7.37 (3H, m, H3', H4', H5'), 7.32 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, CH); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 190.5, 190.0, 151.1, 144.6, 142.1, 140.8, 135.5, 135.1, 135.0, 130.9, 129.0, 128.7, 127.9, 123.6, 123.1, 122.9; **IR**: (ATR) ν_{max} 683, 735, 988, 1173, 1558, 1681, 1716 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 260.1 $[\text{M}]^+$ (100), 231.1 (75), 215.1 (18), 202.1 (48), 183.0 (7), 155.0 (9), 127.1 (11), 104.0 (15); **C, H, N**: pro $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_2$ vypočteno: C, 83.06; H, 4.65; nalezeno: C, 82.81; H, 4.74.

2,2-Dimethyl-5-[(2E)-3-fenylprop-2-enyliden]-1,3-dioxan-4,6-dion (21)¹³²



Výtěžek: 79 %, žlutá krystalická látka, t.t.: 104.3 °C; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 8.37-8.14 (2H, m, CH), 7.7-7.61 (2H, m, H2', H6'), 7.47-7.37 (4H, m, H3', H4', H5', CH), 1.76 (6H, s, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 162.9, 160.7, 157.9, 154.3, 134.9, 131.7, 129.2, 129.1, 124.5, 111.4, 104.7, 27.6; **IR**: (ATR) ν_{max} 1168, 1202, 1284, 1373, 1541, 1560, 1702, 1706 cm^{-1} ; **LRMS (ESI)**: m/z (relativní intenzita) 281.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (3), 203.1 (25), 158.1 (26), 130.1 (100), 116.1 (5); **C, H, N**: pro $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ vypočteno: C, 69.76; H, 5.46; nalezeno: C, 70.11; H, 5.79.

Obecný postup syntézy N-substituovaných maleinimidů - Mitsunobuova reakce



Trifenylfosfin (0.525 g, 2 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (15 ml) v atmosféře argonu. Roztok byl ochlazen na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl pomalu přikapáván DIAD (0.4 ml, 2 mmol) 3-5 minut, vzniklá žlutá reakční směs byla míchána 5 minut a poté byl pomalu během 1-2 minut přikapáván alkohol (3 mmol) a směs byla opět 5 minut míchána. Následně byl přidán maleinimid (0.194 g, 2 mmol) v pevném stavu a suspenze byla 10 minut míchána při $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Baňka s reakční směsí byla vyjmuta z chladicí lázně a míchání pokračovalo přes noc za laboratorní teploty. TLC prokázalo spotřebování výchozího maleinimidu, vznik redukovaného DIADH₂ a oxidaci trifenylfosfinu na trifenylfosfinoxid. Z reakční směsi bylo odpařeno rozpouštědlo a surová směs byla dělena sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, hexan – hexan : ethylacetát 98 : 2).

***N*-Pentylmaleinimid (22a)**

Výtěžek: 57 %, bezbarvá olejovitá kapalina; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (2H, s, H3, H4), 3.49 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, NCH₂), 1.66-1.50 (2H, m, CH₂), 1.39-1.17 (4H, m, CH₂), 0.87 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₃); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.1, 134.0, 37.9, 28.8, 28.2, 22.2, 13.9; IR: (ATR) ν_{max} 1113, 1365, 1407, 1442, 1698, 2872, 2932 cm⁻¹; LRMS (EI): *m/z* (relativní intenzita) 167.1 [M]⁺ (32), 139.1 (6), 124.1 (8), 110.0 (100), 99.0 (21), 82.0 (15), 69.1 (8), 54.0 (16); HRMS (EI): pro C₉H₁₃NO₂ vypočteno: 167.0946, nalezeno: 167.0952.

***N*-Hexylmaleinimid (22b)¹⁴²**

Výtěžek: 77 %, nahnědlá krystalická/olejovitá látka, t.t.: 30.1 °C, literatura¹⁶⁶ uvádí 32.5 °C; ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.9, 134.0, 37.9, 31.3, 28.5, 26.4, 22.5, 14.0; IR: (ATR) ν_{max} 1366, 1407, 1442, 1699, 2859, 2930 cm⁻¹; LRMS (EI): *m/z* (relativní intenzita) 181.1 [M]⁺ (38), 152.1 (4), 138.1 (10), 124.1 (18), 110.0 (100), 99.0 (30), 82.0 (18), 69.1 (5), 55.1 (22); HRMS (EI): pro C₁₀H₁₅NO₂ vypočteno: 181.1103, nalezeno: 181.1109; C, H, N: pro C₁₀H₁₅NO₂ vypočteno: C, 66.27; H, 8.34; N, 7.73; nalezeno: C, 66.63; H, 8.39; N, 7.38.

***N*-Oktylmaleinimid (22c)**

Výtěžek: 63 %, bílá krystalická látka, t.t.: 39.3 °C, literatura¹³⁴ uvádí 36-38 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (2H, s, H3, H4), 3.50 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, NCH₂), 1.63-1.47 (2H, m, CH₂), 1.37-1.17 (10H, m, CH₂), 0.87 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃);

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 134.0, 37.9, 31.7, 29.1, 29.0, 28.5, 26.7, 22.6, 14.0; **IR:** (ATR) ν_{\max} 1124, 1368, 1404, 1446, 1697, 2852, 2916, 3077 cm⁻¹; **LRMS (EI):** *m/z* (relativní intenzita) 209.1 [M]⁺ (70), 180.1 (3), 152.1 (8), 138.1 (12), 124.1 (16), 110.0 (100), 99.0 (38), 82.0 (16), 69.1 (29); **HRMS (EI):** pro C₁₂H₁₉NO₂ vypočteno: 209.1416, nalezeno: 209.1424; **C, H, N:** pro C₁₂H₁₉NO₂ vypočteno: C, 68.87; H, 9.15; N, 6.69; nalezeno: C, 68.97; H, 9.63; N, 6.63.

***N*-Decylmaleinimid (22d)**

Výtěžek: 35 %, bílá krystalická látka, t.t.: 48.7 °C¹³⁴; **¹H NMR:** (300 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (2H, s, H3, H4), 3.50 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, NCH₂), 1.64-1.50 (2H, m, CH₂), 1.35-1.16 (14H, m, CH₂), 0.87 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₃); **¹³C NMR:** (75 MHz, CDCl₃) δ 170.9, 134.0, 37.9, 31.8, 29.47, 29.45, 29.3, 29.1, 28.5, 26.7, 22.6, 14.1; **IR:** (ATR) ν_{\max} 1369, 1403, 1446, 1697, 2849, 2916, 3076, 3099 cm⁻¹; **LRMS: (ESI):** *m/z* (relativní intenzita) 238.2 [M+H]⁺ (1), 233.2 (3), 228.1 (10), 214.1 (6), 193.0 (8), 173.1 (11), 159.1 (28), 150.1 (4), 133.1 (7), 117.2 (100), 103.1 (6), 88.1 (37); **C, H, N:** pro C₁₄H₂₃NO₂ vypočteno: C, 70.85; H, 9.77; N, 5.90; nalezeno: C, 71.29; H, 10.26; N, 5.87.

***N*-(3-Oktyl)maleinimid (22e)**

Výtěžek: 30 %, nažloutlá olejovitá kapalina; **¹H NMR:** (300 MHz, CDCl₃) δ 6.63 (2H, s, H3, H4), 3.95-3.84 (1H, m, NCH), 2.01-1.82 (2H, m, CH₂), 1.73-1.52 (2H, m, CH₂), 1.33-1.06 (6H, m, CH₂), 0.88-0.76 (6H, m, CH₃); **¹³C NMR:** (75 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 133.7, 53.8, 32.1, 31.4, 26.2, 25.5, 22.5, 13.9, 11.0; **IR:** (ATR) ν_{\max} 1368, 1404, 1700, 2860, 2930, 2961 cm⁻¹; **LRMS (ESI):** *m/z* (relativní intenzita) 210.1 [M+H]⁺ (100), 192.1 (2), 182.1 (1), 166.0 (7).

***N*-(4-Methylpentyl)maleinimid (22f)**

Výtěžek: 48 %, bílá krystalická látka, t.t.: 39.9 °C; **¹H NMR:** (300 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (2H, s, H3, H4), 3.47 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, NCH₂), 1.64-1.43 (3H, m, CH₂ + CH), 1.25-1.03 (2H, m, CH₂), 0.84 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₃); **¹³C NMR:** (75 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 134.0, 38.1, 35.7, 27.6, 26.4, 22.4; **IR:** (ATR) ν_{\max} 1123, 1405, 1445, 1692, 2954, 3087 cm⁻¹; **LRMS (EI):** *m/z* (relativní intenzita) 181.1 [M]⁺ (30), 166.1 (6), 138.1 (12), 110.0 (100), 99.0 (49), 82.0 (24), 69.1 (12), 55.1 (23); **HRMS (EI):** pro C₁₀H₁₅NO₂

vypočteno: 181.1103, nalezeno: 181.1102; **C, H, N:** pro C₁₀H₁₅NO₂ vypočteno: C, 66.27; H, 8.34; N, 7.73; nalezeno: C, 65.86; H, 8.69; N, 7.52.

***N*-(Okt-1-en-3-yl)maleinimid (22g)**

Výtěžek: 48 %, žlutá olejovitá kapalina; **¹H NMR:** (300 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (2H, s, H3, H4), 6.13-6.01 (1H, m, CH), 5.18-5.10 (2H, m, CH₂), 4.56-4.45 (1H, m, NCH), 2.01-1.69 (2H, m, CH₂), 1.33-1.10 (6H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, CH₃); **¹³C NMR:** (75 MHz, CDCl₃) δ 170.6, 135.8, 133.9, 117.1, 54.0, 31.9, 31.2, 26.0, 22.4, 13.9; **IR:** (ATR) *v*_{max} 1382, 1396, 1701, 2860, 2927 cm⁻¹; **LRMS (EI):** *m/z* (relativní intenzita) 207.1 [M]⁺ (6), 192.1 (1), 179.1 (2), 164.1 (3), 136.0 (100), 123.0 (3), 108.0 (6), 82.0 (8), 67.1 (4); **HRMS (EI):** pro C₁₂H₁₇NO₂ vypočteno: 207.1259, nalezeno: 207.1267.

***N*-(Dec-9-enyl)maleinimid (22h)**

Výtěžek: 42 %, bílá krystalická látka, t.t.: 37.8 °C; **¹H NMR:** (300 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (2H, s, H3, H4), 5.87-5.71 (1H, m, CH), 5.03-4.87 (2H, m, CH₂), 3.49 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, NCH₂), 2.07-1.97 (2H, m, CH₂), 1.66-1.48 (2H, m, CH₂), 1.42-1.17 (10H, m, CH₂); **¹³C NMR:** (75 MHz, CDCl₃) δ 170.9, 139.1, 134.0, 114.1, 37.9, 33.7, 29.3, 29.02, 28.96, 28.8, 28.5, 26.7; **IR:** (ATR) *v*_{max} 1365, 1402, 1445, 1697, 2851, 2919, 3078, 3087 cm⁻¹; **LRMS (ESI):** *m/z* (relativní intenzita) 236.2 [M+H]⁺ (1), 228.1 (4), 214.1 (3), 202.2 (1), 192.2 (5), 172.1 (100), 155.2 (1), 140.1 (1), 131.2 (1), 117.2 (1); **HRMS (ESI):** pro C₁₄H₂₂NO₂ vypočteno: 236.1645, nalezeno: 236.1646; **C, H, N:** pro C₁₄H₂₁NO₂ vypočteno: C, 71.46; H, 8.99; N, 5.95; nalezeno: C, 71.43; H, 9.22; N, 5.79.

***N*-Cyklopentylmaleinimid (22i)**

Výtěžek: 50 %, bílá krystalická látka, t.t.: 51.7 °C; **¹H NMR:** (300 MHz, CDCl₃) δ 6.63 (2H, s, H3, H4), 4.47-4.34 (1H, m, NCH), 2.02-1.76 (5H, m, CH₂), 1.65-1.49 (3H, m, CH₂); **¹³C NMR:** (75 MHz, CDCl₃) δ 170.9, 134.0, 50.9, 29.4, 24.8; **IR:** (ATR) *v*_{max} 1374, 1400, 1692, 2874, 2967, 3093 cm⁻¹; **LRMS (EI):** *m/z* (relativní intenzita) 165.1 [M]⁺ (30), 136.0 (17), 123.0 (6), 110.0 (5), 99.0 (100), 82.0 (14), 67.1 (38); **HRMS (EI):** pro C₉H₁₁NO₂ vypočteno: 165.0790, nalezeno: 165.0794; **C, H, N:** pro C₉H₁₁NO₂ vypočteno: C, 65.44; H, 6.71; N, 8.48; nalezeno: C, 65.74; H, 7.14; N, 8.22.

***N*-Cyklohexylmaleinimid (22j)¹⁴³**

Výtěžek: 35 %, bílá krystalická látka, t.t.: 90.3 °C, literatura¹⁶⁷ uvádí 87-89 °C; ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.9, 133.9, 50.8, 29.9, 25.9, 25.0; IR: (ATR) ν_{max} 1177, 1370, 1402, 1702, 2858, 2930, 3090 cm⁻¹; LRMS (EI): *m/z* (relativní intenzita) 213.1 [M]⁺ (10), 152.1 (4), 138.1 (10), 124.1 (18), 110.0 (100), 99.0 (30), 82.0 (18), 69.1 (5), 55.1 (22); HRMS (EI): pro C₁₀H₁₃NO₂ vypočteno: 213.0790, nalezeno: 213.0792; C, H, N: pro C₁₀H₁₃NO₂ vypočteno: C, 67.02; H, 7.31; N, 7.82; nalezeno: C, 66.65; H, 7.71; N, 7.43.

***N*-Cyklooktylmaleinimid (22k)**

Výtěžek: 45 %, bílá krystalická látka, t.t.: 71.9 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 6.61 (2H, s, H3, H4), 4.23-4.10 (1H, m, NCH), 2.26-2.07 (2H, m, CH₂), 1.89-1.43 (12H, m, CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 133.8, 51.5, 31.6, 26.3, 25.8, 25.0; IR: (ATR) ν_{max} 1161, 1257, 1371, 1515, 1699, 2855, 2927, 3088 cm⁻¹; LRMS (EI): *m/z* (relativní intenzita) 207.1 [M]⁺ (86), 192.1 (2), 179.1 (3), 164.1 (2), 136.0 (100), 123.0 (45), 109.1 (52), 99.0 (72), 81.1 (15), 67.1 (28); HRMS (EI): pro C₁₂H₁₇NO₂ vypočteno: 207.1259, nalezeno: 207.1257; C, H, N: pro C₁₂H₁₇NO₂ vypočteno: C, 69.54; H, 8.27; N, 6.76; nalezeno: C, 69.97; H, 8.71; N, 6.67.

***N*-(2-Cyklohexylethyl)maleinimid (22l)**

Výtěžek: 67 %, bílá krystalická látka, t.t.: 53.3 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (2H, s, H3, H4), 3.53 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, NCH₂), 1.81-1.56 (5H, m, CH₂), 1.52-1.38 (2H, m, CH₂), 1.33-1.05 (4H, m, CH₂), 1.0-0.78 (2H, m, CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 134.0, 35.9, 35.8, 35.2, 32.9, 26.4, 26.1; IR: (ATR) ν_{max} 1129, 1376, 1410, 1697, 2850, 2917, 3100 cm⁻¹; LRMS (EI): *m/z* (relativní intenzita) 207.1 [M]⁺ (68), 179.1 (6), 136.1 (3), 111.0 (10), 109.1 (52), 99.0 (100), 82.0 (18), 67.1 (48), 55.1 (42); HRMS (EI): pro C₁₂H₁₇NO₂ vypočteno: 207.1259, nalezeno: 207.1251; C, H, N: pro C₁₂H₁₇NO₂ vypočteno: C, 69.54; H, 8.27; N, 6.76; nalezeno: C, 69.64; H, 8.77; N, 6.67.

***N*-Fenylethylmaleinimid (22m)¹³⁸**

Výtěžek: 49 %, bílá krystalická látka, t.t.: 84.5 °C, literatura¹⁶⁸ uvádí 80-82 °C; ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 137.8, 134.0, 128.8, 128.5, 126.7, 39.1, 34.5; IR:

(ATR) ν_{\max} 1134, 1353, 1406, 1677, 1686, 2854, 2934 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 201.1 $[\text{M}]^+$ (72), 172.1 (1), 128.1 (1), 110.0 (75), 104.1 (100), 91.0 (78), 82.0 (16), 77.0 (6), 65.0 (21); **HRMS (EI)**: pro $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ vypočteno: 201.0790, nalezeno: 201.0789; **C, H, N**: pro $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ vypočteno: C, 71.63; H, 5.51; N, 6.96; nalezeno: C, 71.71; H, 5.87; N, 6.84.

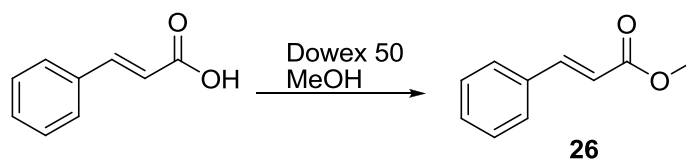
***N*-Benzylmaleinimid (22n)**¹³⁹

Výtěžek: 68 %, bílá krystalická látka, t.t.: 69.6 °C, literatura¹⁶⁹ uvádí 70°C; **¹H NMR**: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.23 (5H, m, Ar), 6.71-6.70 (2H, m, H3, H4), 4.67 (2H, s, CH_2); **¹³C NMR**: (75 MHz, CDCl_3) δ 170.4, 136.1, 134.2, 128.7, 128.4, 127.8, 41.4; **IR**: (ATR) ν_{\max} 1135, 1309, 1400, 1435, 1686, 1695, 2946, 3090 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 187.1 $[\text{M}]^+$ (100), 169.1 (10), 159.1 (11), 130.1 (28), 115.1 (5), 106.1 (45), 91.1 (17), 78.0 (11), 65.0 (12); **HRMS (EI)**: pro $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_2$ vypočteno: 187.0633, nalezeno: 187.0634; **C, H, N**: pro $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_2$ vypočteno: C, 70.58; H, 4.85; N, 7.48; nalezeno: C, 70.67; H, 5.11; N, 7.56.

***N*-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-2-yl)maleinimid (22o)**

Výtěžek: 36 %, bílá krystalická látka, t.t.: 143.4 °C; **¹H NMR**: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.23-7.15 (4H, m, Ar), 6.7 (2H, s, H3, H4), 5.02-4.89 (1H, m, NCH), 3.50 (2H, dd, $J_1 = 9.6$ Hz, $J_2 = 15.1$ Hz, CH_2), 3.10 (2H, dd, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 15.1$ Hz, CH_2); **¹³C NMR**: (75 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 140.6, 134.1, 126.7, 124.3, 49.9, 35.9; **IR**: (ATR) ν_{\max} 1149, 1380, 1406, 1697, 2860, 2931, 3088 cm^{-1} ; **LRMS (EI)**: m/z (relativní intenzita) 213.1 $[\text{M}]^+$ (10), 182.1 (1), 156.1 (1), 130.1 (2), 116.1 (100), 103.1 (4), 89.0 (3), 77.0 (4); **HRMS (EI)**: pro $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ vypočteno: 213.0790, nalezeno 213.0792; **C, H, N**: pro $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ vypočteno: C, 73.23; H, 5.20; N, 6.57; nalezeno: C, 72.93; H, 5.61; N, 6.33.

Methylester kyseliny skořicové (26)



Skořicová kyselina (6.7 mmol) byla rozpuštěna v MeOH (8 ml) a do roztoku byl přidán Dowex 50 (0.72 g). Reakční směs byla míchána 3 hodin za laboratorní teploty a poté byl Dowex odfiltrován a promyt EtOAc. Rozpouštědla byla vakuově odpařena a získaný produkt byl krystalizován ve směsi hexan/ethyl-acetát.

Výtežek: 92 %, průhledná krystalická látka; $^1\text{H NMR}$ shodné s literaturou¹⁷⁰.

5.3. Použité experimentální postupy při biologickém hodnocení

5.3.1. Hodnocení antifungální aktivity

U připravených látek byla hodnocena *in vitro* antifungální aktivita vůči humánně patogenním houbám mikrodiluční bujónovou metodou (National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard, NCCLS document M27-A, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085, 1997). 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 lusitaniae* 2446/I, *Trichosporon asahii* 1188) a vláknitých hub (*Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, *Trichophyton mentagrophytes* 445) získaných z depozitu Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické Fakulty UK v Hradci Králové. 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 médium sloužilo RPMI 1640 (Sevapharma, Praha) medium obohacené L-glutaminem pufrované pomocí 0.165 M morfolinpropansulfonové kyseliny (Serva) a 10 N NaOH na pH 7.0. Jamky mikrodilučních testovacích destiček obsahovaly 100 μl RPMI 1640 média s klesající koncentrací testovaných látek (od 500 do 0.48 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a 100 μl suspenze inokula. Výsledná koncentrace inokula v RPMI 1640 médiu byla $5 \times 10^3 \pm 0.2 \text{ cfu.ml}^{-1}$.

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 a byly stanoveny dvakrát a duplicitně. Odchyly od tabelovaných hodnot MIC nebyly vyšší než jedno ředění použité při testování.

5.3.2. Hodnocení antibakteriální aktivity

U vybraných látek byla hodnocena *in vitro* antibakteriální aktivita vůči humánně patogenním bakteriím mikrodiluční bujónovou metodou (Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard – Seventh Edition, CSLI document M07-A7, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, 19087-1898, 2006). 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 depozitu Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické Fakulty UK v Hradci Králové. Uvedené ATCC kmeny sloužily také jako kontrola kvality. Všechny kultury byly před testováním kultivovány na Mueller-Hintonově dextrózovém agaru. DMSO (100 %) byl použit pro rozpouštění všech testovaných látek; jeho výsledná koncentrace nepřekročila 2 %. Jako testovací médium sloužil Mueller-Hintonův bujón (MH, HiMedia, Čadarsky-Envitek, Czech Republic) pufrovaný na pH 7.4 (± 0.2). Jamky mikrodilučních testovacích destiček obsahovaly 200 μ l Mueller-Hintonova média s klesající koncentrací testovaných látek (od 500 do 0.48 μ mol.l⁻¹) a 10 μ l 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 36 °C a MIC byly vizuálně odečteny po 24 a 48 hodinách. Minimální inhibiční koncentrace byly definovány jako 80 % inhibice růstu kontroly a byly stanoveny dvakrát a duplicitně. Odchyly od tabelovaných hodnot MIC nebyly vyšší než jedno ředění použité při testování.

5.3.3. Hodnocení cytostatické aktivity

Cytostatická aktivita byla částečně stanovena Dr. I. Votrubou (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha) a na 3 liniích jsem stanovení prováděla ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (laboratoř prof. B. Melichara). Inhibice buněčného růstu byla hodnocena na buněčné linii myší lymfocytické leukémie L 1210 (ATCC CCL 219), na buňkách lidské akutní T-lymfoblastoidní leukémie CCRF-CEM (ATCC CCL 119), na buňkách lidské promyeloidní leukémie HL-60 (ATCC CCL 240), na buněčné linii karcinomu děložního čípku HeLa S3 (ATCC CCL 2.2), na buňkách kolorektálního adenokarcinomu HT-29 (ATCC HTB 38), na buňkách karcinomu tlustého střeva Colo 201 (ECACC 87091201) a na lidských jaterních buňkách HepG2 (ATCC HB-8065). Buněčné linie L1210, CCRF-CEM a HL-60 byly kultivovány v RPMI 1640 médiu s telecím plodovým sérem na 24 jamkových destičkách s tkáňovou kulturou a buněčný nárůst byl odečítán po 72 hodinách od aplikace testovaných látek. HeLa S3 buňky byly očkovány do misek s RPMI 1640-HEPES médiem s telecím plodovým sérem a hodnocení probíhalo 48 hodin po aplikaci testovaných látek. Buněčný růst byl kvantifikován s použitím XTT standardního spektrofotometrického testu¹⁷¹. Buněčné linie HT-29 a Colo 201 byly kultivovány v RPMI 1640 médiu s telecím plodovým sérem na 96 jamkových destičkách a buněčná proliferace byla vyhodnocena po 72 hodinách od aplikace testovaných látek pomocí MTT a WST spektrofotometrického testu. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnota IC₅₀ (μmol.l⁻¹).

5.3.4. Analýza buněčné proliferace v reálném čase (xCELLigence test)

Připravené látky byly podrobeny impedančnímu testu na lidských embryonálních ledvinových buňkách HEK293 (ATCC CRL-1573). Buňky byly kultivovány za standardních podmínek v DMEM médiu s telecím plodovým sérem na 96 jamkových destičkách (E-plate 96). Po 22.4 hodinách byly přidány roztoky látek o koncentraci 10 μM. Impedance byla měřena v průběhu celého pokusu (od počátku kultivace buněk) pomocí přístroje Real-Time Cell Analyzer (RTCA) SP. Buněčná proliferace byla takto sledována 96 hodin. Míra impedance je vyjádřena v bezrozměrných jednotkách tzv. buněčného indexu.

5.3.5. Měření aktivity kaspas 3/7 a vyhodnocení buněčné viability

Pro hodnocení aktivity efektorových kaspas 3 a 7 byl použit test Caspase-Glo[®] 3/7 Assay (Promega). Systém obsahuje proluminiscenční substrát kaspasy 3/7 se sekvencí DEVD (sekvence aminokyselin Asp-Glu-Val-Asp) a odpovídající termostabilní luciferasu v pufru optimalizovaném pro aktivitu kaspasy 3/7 a luciferasy a lýzu buněk. Vyhodnocení buněčné viability bylo provedeno pomocí CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay (Promega). Test obsahuje tmavě modré barvivo resazurin k indikaci metabolické aktivity (tedy viability) buněk. Redukcí resazurinu viabilními buňkami vzniká resorufin, který je růžový a emituje fluorescenci při 590 nm. Mrtvé buňky rychle ztrácejí metabolickou kapacitu a tudíž negenerují fluorescenční signál. Měření bylo provedeno standardně dle pokynů výrobce. Buňky CCRF-CEM (ATCC CCL 119) a HL-60 (ATCC CCL 240) byly 4 hodiny inkubovány s roztoky testovaných látek na 96 jamkových destičkách a poté byl přidán modrý reagent. Po 1 hodině inkubace byla měřena fluorescence. Podobně byly buněčné kultury 4 hodiny inkubovány s roztoky testovaných látek a poté byl přidán test na aktivitu kaspas. Odštěpením DEVD sekvence pomocí kaspas 3/7 byl uvolněn aminoluciferin, substrát pro luciferasu a došlo k produkci světla. Po 1 hodině inkubace byla změřena luminiscence. Měřená luminiscence je úměrná aktivitě kaspas.

5.3.6. Průtoková cytometrie

Vliv testovaných látek na průběh buněčného cyklu a viabilitu u buněčné linie CCRF-CEM byl vyšetřen průtokovou cytometrií na přístroji BD FACSAria. Látka byla přidána do média 24 hodin po inokulaci v koncentraci odpovídající hodnotě IC₅₀ a buňky byly inkubovány 72 hodin (37 °C, 5% CO₂). Průběh buněčného cyklu byl sledován po značení propidiumjodidem v ethanolem fixovaných buňkách, z kterých byla RNA odstraněna působením RNasy A. Apoptosa/nekrosa byla vyhodnocena v buňkách značených annexinem V-FITC a propidiumjodidem (Annexin V-FITC apoptosis kit, Clontech Laboratories, Inc.) dle pokynů výrobce.

5.3.7. Použité postupy při vyhodnocení stability látek za podmínek antifungálního testování *in vitro* pomocí HPLC-PDA

Rutinní chromatografické analýzy byly provedeny s použitím chromatografu Thermo Electron. Chromatografický systém se skládal z odplynovače mobilní fáze (SCM1000 solvent degasser), kvaternárního gradientového čerpadla (P4000 quaternary gradient pump), autosampleru AS 3000 se 100 μ l dávkovací vzorkovou smyčkou, UV6000LP photodiode-array detektoru, SN4000 systémového kontroleru a data stanice s nainstalovaným analytickým softwarem ChromQuest 4 (Thermo Electron, San Jose, CA, USA).

Chromatografická kolona 250 \times 4.6 mm obsahující LiChrospher 60 RP-selectB, 5 μ m s předkolonou 4mm \times 4mm byla při prvním stanovení stability látky **11** promývána isokratickou mobilní fází obsahující acetonitril a UHQ vodu (3:7, v/v) s průtokem 1 ml.min⁻¹. Za těchto podmínek měly jednotlivé analyty následující retenční časy: **11** (t_R = 24.8 min), degradační produkty cyklopent-4-en-1,3-dion (t_R = 3.3 min) a benzaldehyd (t_R = 9.8 min).

Při další analýze látek **13c** a **6c** byla chromatografická kolona promývána gradientovou mobilní fází obsahující acetonitril a UHQ vodu (3:7 až 8:2, v/v) s průtokem 1 ml.min⁻¹. Gradientová eluce byla zahájena isokratickým promýváním mobilní fází acetonitril-voda (3:7, v/v) po dobu 5 minut, následoval lineární gradient k mobilní fází acetonitril-voda (8:2, v/v) během 5 minut, dále isokratické promývání touto fází (8:2, v/v, 5 minut). Poté opět lineární gradient k mobilní fází acetonitril-voda (3:7, v/v, 5 minut) a ekvilibrace na počáteční isokratický stav (25.-30. minuta). Sledované látky měly za těchto podmínek následující retenční časy: **13c** (t_R = 16.0 min), **6c** (t_R = 17.8 min). Všechny látky byly snímány skenem (195 nm – 380 nm) pro spektrální kontrolu identity každého jednotlivého píku.

Byly připraveny 10 mM roztoky testovaných látek **11** (2.2 mg, 1.194 ml), cyklopent-4-en-1,3-dionu (0.96 mg, 1.0 ml), benzaldehydu (1.2 mg, 1.13 ml), **13c** (2.3 mg, 0.94 ml), chlorcinnamaldehydu (1.4 mg, 0.84 ml), **6c** (2.1 mg, 0.606 ml) a methylesteru kyseliny skořicové **26** (1.8 mg, 1.11 ml) v DMSO. 30 μ l vzniklého roztoku bylo přidáno do 2.97 ml kultivačního média RPMI 1640. V různých časových intervalech (0 - 48 hodin) byly odebírány vzorky a po zředění mobilní fází na koncentraci 10 μ M (300 μ l roztoku do 2.7 ml mobilní fáze) analyzovány a porovnány se standardy.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AmB	amfotericin B
B	báze
Bu	butyl
BuLi	butyllithium
Bn	benzyl
DEAD	diethylazodikarboxylát
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Ekv.	ekvivalent
Et	ethyl
EtOAc	ethyl-acetát
FLU	flukonazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
IC	inhibiční koncentrace
IR	infračervená spektroskopie
<i>i</i> -Pr	isopropyl
KorA	koruskanon A
LA	Lewisova kyselina
LRMS	hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením
Me	methyl
MeO	methoxy
MeOH	methanol
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
Nu	nukleofil
Ph	fenyl
PHT	2-pyrrolidon hydrotribromid
pyr	pyridin

R _f	retenční faktor
RNA	ribonukleová kyselina
RT	laboratorní teplota
<i>t</i> -Bu	terciární butyl
Tf	triflát
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
t _R	retenční čas
UHQ	ultra high quality

7. LITERATURA

- ¹ Rozsypal, H. *Klin. Farmakol. Farm.* **2008**, 22, 40
- ² Di Santo, R. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2008**, 18, 275-292
- ³ Enoch, D. A., Ludlam, H. A., Brown, N. M. *J. Med. Microbiol.* **2006**, 55, 809-818
- ⁴ Lóránd, T., Kocsis, B. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* **2007**, 7, 900-911
- ⁵ Lai, C.-C., Tan, C.-K., Huang, Y.-T., Shao, P.-L., Hsueh, P.-R. *J. Infect. Chemother.* **2008**, 14, 77-85
- ⁶ Carillo-Munoz, A. J., Quindos, Q., Lopez-Ribot, J. L. *Curr. Med. Chem.–Anti-Infect. Agents* **2004**, 3, 297-323
- ⁷ Arendrup, M. C., Fuursted, K., Gahrn-Hansen, B. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, 43, 4434-4440
- ⁸ Mayer, J., Ráčil, Z. *Interní Med.* **2008**, 10, 167-171
- ⁹ Ellis, M. *Mol. Immunol.* **2002**, 38, 947-957
- ¹⁰ Pfaller, M. A., Diekema, D. J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, 20, 133-163
- ¹¹ Behr, J.-B. *Curr. Med. Chem.–Anti-Infect. Agents* **2003**, 2, 173-189
- ¹² Lass-Flörl, C., Griff, K., Mayr, A. *Brit. J. Haematol.* **2005**, 131, 201-207
- ¹³ Segal, B. H., Walsh, T. J. *Am. J. Resp. Crit. Care* **2006**, 173, 707-717
- ¹⁴ Roden, M. M., Zaoutis, T. E., Buchanan, W. L. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, 41, 634-635
- ¹⁵ Sudhir, P. V., Ranjan, D. S., Ganpat, A. N. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2010**, 20, 137-143
- ¹⁶ Girmenia, C. *Expert Opin. Inv. Drug* **2009**, 18, 1279-1295
- ¹⁷ Kanafani, Z. A. Perfect, J. R. *Clin. Infect Dis.* **2006**, 46, 120-128
- ¹⁸ Perlin, D. S. *Drug Resist. Update* **2007**, 10, 121-130
- ¹⁹ Paqualotto, A. C., Denning, D. W. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2008**, 61, Suppl.1, i19-30
- ²⁰ Bastert, J., Schaller, M., Kortringand, H. C., Evans, E. G. V. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2001**, 17, 81-91
- ²¹ Fromtling, R. A. *Drug Today* **2002**, 38, 829-846
- ²² Katzung, B., G. Basic & Clinical Pharmacology, 9.vydání, *Lange Medical Books/McGraw-Hill* **2004**, kapitola 48
- ²³ Belaid, S., Landreau, A., Djebbar, S. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 63-69
- ²⁴ Boogaerts, M., Winston, D. J., Bow, E. J. *Ann. Intern. Med.* **2001**, 135, 412-422
- ²⁵ Gupta, A. K., Cooper, E. A., Mentegro-Gei, F. *Dermatol. Clin.* **2003**, 21, 537-542
- ²⁶ Rang, H. P., Dale, M. M. Pharmacology, 6. vydání, *Churchill Livingstone/Elsevier*, **2007**, 692-697
- ²⁷ Mathew, B. P., Nath, M. *ChemMedChem* **2009**, 4, 310-323
- ²⁸ Quindos, G., Carrillo-Munoz, A. J., Ruesga, M. T., Alonso-Vargas, R., Miranda, Y., Tur-Tur, C., Rubio, M., Wallace, T. L., Cossum, P. A., Martin-Mazuelos, E. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **2000**, 19, 645-648
- ²⁹ Offner, F., Krcmery, V., Boogaerts, M., Doyen, C., Engelhard, D., Ribaud, P., Cordonnier, C., Pauw, B., Durrant, S., Marie, J.-P., Moreau, P., Guiot, H., Samonis, G., Sylvester, R., Herbrecht, R. *Antimicrob. Agents Ch.* **2004**, 48, 4808-4812
- ³⁰ Kakeya, H., Miyazaki, Y., Senda, H., Kobayashi, T., Seki, M., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Yamamoto, Y., Tashiro, T., Kohno, S. *Antimicrob. Agents Ch.* **2008**, 52, 1868-1870
- ³¹ Andriole, V. T. *J. Antimicrob. Chemoth.* **1999**, 44, 151-162
- ³² Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K. A., Rex, J. H., Cohen, S. H. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, 37, 415-425
- ³³ Charlier, C., Hart, E., Lefort, A. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2006**, 57, 383-410
- ³⁴ Maertens, J., Boogaerts, M. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2005**, 56, Suppl 1, i33-38

-
- ³⁵ Zonios, D. I., Bennett, J. E. *Semin. Resp. Crit. Care* **2008**, *29*, 198-210
- ³⁶ Wingard, J. R., Herbrecht, J., Mauskopf, J., Schlamm, H. T., Marciniak, A., Roberts, C. S. *Transpl. Infect. Dis.* **2007**, *9*, 182-188
- ³⁷ Espinel-Ingroff, A., Boyle, K., Sheehan, D. *Mycopathologia* **2001**, *150*, 101-115
- ³⁸ Garcia-Effron, G., Dilger, A., Alcazar-Fuoli, L. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 1200-1206
- ³⁹ Theuretzbacher, U., Ihle, F., Derendorf, H. *Clin. Pharmacokinet.* **2006**, *45*, 649-663
- ⁴⁰ Scott, L. J., Simpson, D. *Drugs* **2007**, *67*, 269-298
- ⁴¹ Potoski, B. A., Brown, J. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 1273-1275
- ⁴² Wexler, D., Courtney, R., Richards, W. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 645-653
- ⁴³ Nagappan, V., Deresinski, S. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 1610-1617
- ⁴⁴ Raad, I., Graybill, J. R., Bustamante, A. B. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 1726-1734
- ⁴⁵ Kok, J., Gilroy, N., Halliday, C., Lee, O. C., Novakovic, D., Kevin, P., Chen, S. *J. Infection* **2007**, *55*, e33-e36
- ⁴⁶ Petrikos, G., Skiada, A. *Inter. J. Antimicrob. Agents* **2007**, *30*, 108-117
- ⁴⁷ Pfaller, M. A., Messer S. A., Hollis, R. J. *Antimicrob. Agents Ch.* **2002**, *46*, 1723-1727
- ⁴⁸ Pasqualotto, A. C., Thiele, K. O., Goldani, L. Z. *Curr. Opin. Investig. D.* **2010**, *11*, 165-74
- ⁴⁹ Guinea, J., Pelaez, T., Recio, S., Torres-Narbona, M., Bouza, E. *Antimicrob. Agents Ch.* **2008**, *52*, 1396-1400
- ⁵⁰ Seifert, H., Aurbach, U., Stefanik, D., Cornely, O. *Antimicrob. Agents Ch.* **2007**, *51*, 1818-1821
- ⁵¹ Schmitt-Hoffmann, A., Roos, B., Maares, J. *Antimicrob. Agents Ch.* **2006**, *50*, 286-293
- ⁵² Onishi, J., Meinz, M., Thopson, J. *Antimicrob. Agents Ch.* **2000**, *44*, 368-377
- ⁵³ Groll, A. H., Piscitelli, S. C., Walsh, T. J. *Adv. Pharmacol.* **1998**, *44*, 343-501
- ⁵⁴ Oakley, K. L., Moore, C. B., Denning, D. W. *Antimicrob. Agents Ch.* **1998**, *42*, 2726-2730
- ⁵⁵ Barchiesi, F., Schimizzi, A. M., Fothergill, A. W. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1999**, *18*, 302-304
- ⁵⁶ Kartsonis, N., Killar, J., Mixson, L. *Antimicrob. Agents Ch.* **2005**, *49*, 3616-3623
- ⁵⁷ Van Burik, J.-A. H. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2005**, *18*, 479-483
- ⁵⁸ Denning, D. W., Marr, K. A., Lau, W. M., Facklam, D. P., Ratanatharathorn, V., Becker, C., Ullmann, A. J., Seibel, N. L., Flynn, P. M., Van Burik, J.-A. H., Buell, D. N., Patterson, T. F. *J. Infection.* **2006**, *53*, 337-349
- ⁵⁹ Ota, S., Tanaka, J., Kahata, K. *Inter. J. Hematol.* **2004**, *79*, 390-393
- ⁶⁰ Hebert, M. F., Townsend, R. W., Austin, S. J. *Clin. Pharmacol.* **2005**, *45*, 954-960
- ⁶¹ Kauffman, C. A. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 483-488
- ⁶² Dowell, J. A., Knebel, W., Ludden, T. J. *Clin. Pharmacol.* **2004**, *44*, 590-598
- ⁶³ Brzankalski, G. E., Najvar, L. K., Wiederhold, N. P., Bocanegra, R., Fothergill, A. W., Rinaldi, Patterson, T. F., Graybill, J. R. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2008**, *62*, 1094-1100
- ⁶⁴ Isham, N., Ghannoum, M. A. *J. Clin. Microb.* **2006**, *44*, 4342-4344
- ⁶⁵ Andriole, V. T. *Inter. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 317-321
- ⁶⁶ Martinez, A., Regadera, J., Jimenez, E., Santos, I., Gargallo-Viola, D. *Antimicrob. Agents Ch.* **2001**, *45*, 1008-1013
- ⁶⁷ Hasenoehrl, A., Galić, T., Ergović, G., Maršić, N., Skerlev, M., Mittendorf, J., Geshke, U., Schmidt, A., Schoenfeld, W. *Antimicrob Agents Ch.* **2006**, *50*, 3011-3018
- ⁶⁸ Espinel-Ingroll, A. *Rev. Iberoam. Micol.* **2009**, *26*, 15-22

-
- ⁶⁹ Jang, W. S., Li, X. S., Sun, J. N., Edgerton, M. *Antimicrob Agents Ch.* **2008**, *52*, 497-504
- ⁷⁰ Benincasa, M., Scocchi, M., Pacor, S., Tossi, A., Nobili, D., Basaglia, G., Busetti, M., Gennaro, R. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2006**, *58*, 950-959
- ⁷¹ Mitsuyama, J., Nomura, N., Hasimoto, K., Yamada, E., Nishikawa, H., Kaeriyama, M., Kimura, A., Todo, Y., Narita, H. *Antimicrob Agents Ch.* **2008**, *52*, 1318-1324
- ⁷² Kitamura, A., Someya, K., Hata, M., Nakajima, R., Takemura, M. *Antimicrob Agents Ch.* **2009**, *53*, 670-677
- ⁷³ Shubitz, L. F., Galgiani, J. N., Tian, Z. Q., Zhong, Z., Timmermans, P., Katz, L. *Antimicrob Agents Ch.* **2006**, *50*, 3467-3469
- ⁷⁴ Schwarz, R. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2001**, *11*, 1761-1772
- ⁷⁵ Gorman, J. A., Chang, L. P., Clark, J. J. *Antibiot.* **1996**, *49*, 547-552
- ⁷⁶ Pelaez, F., Cabello, A., Platas, G. *Syst. Appl. Microbiol.* **2000**, *23*, 333-343
- ⁷⁷ Young S. Ch., Kai-Da W., Malcolm A. S. Moore, Ting-Chao Ch., Danishefsky S. J., *Drug Future* **2005**, *30*, 737-738
- ⁷⁸ Wong-Beringer, A., Kriengkauykiat, J. *Pharmacotherapy* **2003**, *23*, 1441-1462
- ⁷⁹ Fudou, R., Iizuka, T., Sato, S., Ando, T., Shimba, N., Yamanaka, S. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 149-153
- ⁸⁰ Barsby, T., Kelly, M. T., Andersen, R. J. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1447-1451
- ⁸¹ Cai, P., Kong, F., Fink, P., Ruppen, E. M., Williamson, T., Kieko, T. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 215-219
- ⁸² Parish, C. A., Smith, S. K., Calati, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7060-7066
- ⁸³ Zapf, S., Anke, T., Sterner, O. *Acta Chem. Scand.* **1995**, *49*, 233-234
- ⁸⁴ Yajima, A., Mori, K. *Liebigs Ann.* **1996**, *7*, 1091-1093
- ⁸⁵ Pour, M., Špulák, M., Balšánek, V., Kuneš, J., Buchta, V., Waisser, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1893-1895
- ⁸⁶ Pour, M., Špulák, M., Buchta, V., Kubanová, P., Vopršalová, M., Sól, V., Fáková, H., Koudelka, P., Pourová, H., Schiller, R. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2701-2706
- ⁸⁷ Pour, M., Špulák, M., Balšánek, V., Kuneš, J., Buchta, V. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2843-2866
- ⁸⁸ Buchta, V., Pour, M., Kubanová, P., Silva, L., Votruba, I., Vopršalová, M., Schiller, R., Fáková, H., Špulák, M. *Antimicrob. Agents Ch.* **2004**, *48*, 873-878
- ⁸⁹ Tichotová, L. Diplomová práce. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2006**
- ⁹⁰ Šenel, P., Tichotová, L., Votruba, I., Buchta, V., Špulák, M., Kuneš, J., Nobilis, M., Krenk, O., Pour, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1988-2000
- ⁹¹ Martín, M. L., Román, L. S., Domínguez, A. *Planta Med.* **1990**, *56*, 66-69
- ⁹² Šenel, P. Disertační práce. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2009**
- ⁹³ Li, X.-C., Ferreira, D., Jacob, M. R., Zhang, Q., Khan, S. I., ElSohly, H. N., Nagle, G. D., Smillie, T. J., Khan, I. A., Walker, L. A., Clark, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6872-6873
- ⁹⁴ Babu, K. S., Li, X.-C., Ferreira, D., Jacob, M. R., Zhang, Q., Khan, S. I., Clark A. M. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7877-7886
- ⁹⁵ Suzuki, Y., Kono, Y., Inoue, T., Sakurai, A. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 997-1001
- ⁹⁶ Oh, H.-M., Choi, S.-K., Lee, J. M., Lee, S.-K., Kim, H.-Y., Han, D. Ch., Kim, H.-M., Son, K.-H., Kwon, B.-M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6182-6187
- ⁹⁷ Aoyama, Y., Konoike, T., Kanda, A., Naya, N., Nakajima, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1695-1697

-
- ⁹⁸ Choi, Y. H., Kwon, S. Y., Kim, J. H., Beak, N. I., Choi, G. J., Cho, K. Y., Lee, B. M. *Han'guk Nonghua Hakhoechi* **2003**, *46*, 151
- ⁹⁹ Balšánek, V., Tichotová, L., Kuneš, J., Špulák, M., Pour, M., Votruba, I., Buchta, V. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2009**, *74*, 1161-1178
- ¹⁰⁰ Clemo, N. G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 1448-1453
- ¹⁰¹ Dean, W. D., Blum, D. M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7916-7917
- ¹⁰² Kishorebabu, N., Periasam, M. *Tetr. Lett.* **2006**, *47*, *13*, 2107-2109
- ¹⁰³ Knoevenagel E., *Chem. Ber.* **1896**, *29*, 172-174
- ¹⁰⁴ Šepac, D. et al. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1159-1167
- ¹⁰⁵ Goudreau, N. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2690-2700
- ¹⁰⁶ Doebner, O. *Chem. Ber* **1902**, *35*, 1147-1148
- ¹⁰⁷ Jacob K., Sigalov M., Khodorkovsky V. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *11*, 2047-2055
- ¹⁰⁸ Prout, F. S. *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 928-933
- ¹⁰⁹ Ramachary, D. B., Anebousevly, K., Chowdari, N. S., Barbas, C. F., *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5838-5849
- ¹¹⁰ Paporì, G., Babulal D. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 897-900
- ¹¹¹ Inayama, S., Mamoto, K., Tetsuichi, S., Hirose, T. *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 433-436
- ¹¹² DePuy, C. H., Wells P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2909-2913
- ¹¹³ Dostál, L., Novák, P., Jambor, R., Růžicka, A., Císařová, I., Jirásko, R., Holeček, J. *Organometallics* **2007**, *26*, 2911-2917
- ¹¹⁴ Kumar, N., Kiuchi, M., Tallarico, J. A., Schreiber, S. L. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2535-2538
- ¹¹⁵ Yang, B., Miller, P. A., Mollmann, U., Miller, M. J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2828-2831
- ¹¹⁶ Battistuzzi, G., Cacchi, S., Fabrizi G. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 777-780
- ¹¹⁷ Odedra, A., Datta, S., Liu, R.-S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3289-3292
- ¹¹⁸ Heck, R. F. *Org. React.* **1982**, *27*, 345-390
- ¹¹⁹ Khanapure, S. P., Najafi, N., Manna, S., Yang J.-J., Rokach, J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7548-7551
- ¹²⁰ Luche, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2226-2227
- ¹²¹ Liu, J.Y., Jang, Y.J., Lin, W.-W., Liu, J.-T., Yao, Ch.-F. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4030-4038
- ¹²² Zhou, Z.-L., Huang, Y.-Z., Shi, L.-L. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6821-6830
- ¹²³ Rappoport, Z., Gazit, A. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4107-4111
- ¹²⁴ Nilson, M. G., Funk, R. L. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3833-3836
- ¹²⁵ Yadav, V. K., Kapoor, K. K. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8573-8584
- ¹²⁶ Liao, Y., Huang, Y.-Z. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5897-5900
- ¹²⁷ Yu, X. Y., Finn, J., Jill, J. M., Wang, Z. G., Keith, D., Silverman, J., Oliver, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1339-1342
- ¹²⁸ Babu, A. R. S., Raghunathan, R. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8010-8016
- ¹²⁹ Li, Z., Li, H., Guo, X., Cao, L., Yu, R., Li, H., Pan, S. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 803-805
- ¹³⁰ Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5897-5905
- ¹³¹ Bigi, F., Carloni, S., Ferrari, L., Raimondo, M., Mazzacani, A., Sartori, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5203-5205
- ¹³² Frost, Ch. G., Hartley, B. C. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3599-3602
- ¹³³ Dumas, A. M., Seed, A., Zorzitto, A. K., Fillion, E. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7072-7074
- ¹³⁴ Kalgutkar, A. S., Crews, B. C., Marnett, L. J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1692-1703
- ¹³⁵ Sortino, M., Filho, V. C., Correa, R., Zacchino, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 560-568

-
- ¹³⁶ Schwartz, A. L., Lerner, L. M., *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 21-23
- ¹³⁷ Yoon, U. C., Cho, S. J., Lee, Y.-J., Mancheno, M. J., Mariano, P. S. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2353-2360
- ¹³⁸ Walker, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 665-668
- ¹³⁹ Walker, M. A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5352-5355
- ¹⁴⁰ Martinez, A., Alonso, M., Castro, A., Dorronsoro, I., Gelpí, J. L., Luque, F. J., Pérez, C., Moreno, F. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7103-7112
- ¹⁴¹ Farha, O. K., Julius, R. L., Hawthorne, M. F. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2619-2622
- ¹⁴² Cheronis, J. C., Whalley, E. T., Allen, L. G., Loy, S. D., Elder, M. W. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 348-355
- ¹⁴³ Hsieh, J.-Ch., Cheng, Ch.-H. *Chem. Commun.* **2005**, *36*, 4554-4556
- ¹⁴⁴ Abassi, Y. A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., Kirstein, S. L., Gaylord, M. R., Feinstein, S. C., Wang, X., Xu, X. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 712-723
- ¹⁴⁵ Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin H., Pedersen, I. M. *Mol. Cell.* **2003**, *11*, 529-541
- ¹⁴⁶ Kaufmann, S. H., Lee, S.-H., Meng, X. W., Loegering, D. A., Kottke, T. J., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Samejima, K., Earnshaw, W. C. *Methods* **2008**, *44*, 262-272
- ¹⁴⁷ Ren, Y. G. et al. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 5064-5074
- ¹⁴⁸ Collett, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **1998**, *75*, 181
- ¹⁴⁹ Dickinson, J. M. *Nat. Prod. Reports* **1993**, *10*, 71-98
- ¹⁵⁰ Review: Lewy D. S., Gauss C.-M., Soenen D. R., Boger D. L. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 2005-2032
- ¹⁵¹ Dias L. C., Meira P. R. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4762-4773
- ¹⁵² Šnajdr, I., Pavlík, J., Schiller, R., Kuneš, J., Pour, M. *Collect. Czech Chem. Commun.* **2007**, *72*, 1472-1498
- ¹⁵³ Schiller, R. Disertační práce. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2004**
- ¹⁵⁴ Brady, S. F., Clardy, J. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1447-1448
- ¹⁵⁵ Lee, H.-J., Chung, M.-C., Lee, C.-H., Yun, B.-S., Chun, H.-K., Kho, Y.-H. *J. Antibiot* **1997**, *50*, 357-359
- ¹⁵⁶ Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., Liotta, L. A. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1993**, *9*, 541-573
- ¹⁵⁷ Pavlík, J. Disertační práce. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2008**
- ¹⁵⁸ Schiller, R., Tichotová, L., Pavlík, J., Buchta, V., Melichar, B., Votruba, I., Kuneš, J. Špulák, M., Pour, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7358-7360
- ¹⁵⁹ Šnajdr, I. Disertační práce. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2009**
- ¹⁶⁰ Artuso, E., Barbero, M., Degani, I., Dughera, S., Fochi, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3146-3157
- ¹⁶¹ Meyers, A. I. et al. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 36-56
- ¹⁶² Olsen, D. K., Torian, B. E., Morgan, C. D., Braun, L. L. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4049-4052
- ¹⁶³ Greifenstein, L. G., Lambert, J. B., Nienhuis, R. J., Drucker, G. E., Pagani, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7753-7761
- ¹⁶⁴ Cho, Ch. S., Motofusa, S.-I., Ohe, K., Uemura S., Shim, S. Ch. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 883-888.
- ¹⁶⁵ Wilds, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 286-290
- ¹⁶⁶ Gonzalez R. et al. *Anales de Quimica* **1977**, *73*, 139-141

-
- ¹⁶⁷ Mayer, Ch. D., Kehrel, M., Bracher, F. *Org. Prep. Proced. Int.* **2008**, *40*, 574-579
- ¹⁶⁸ Pal, B., Pradhan, P. K., Jisankar, P., Giri, V. S. *Synthesis* **2003**, *10*, 1549-1552
- ¹⁶⁹ Butler, R. N., Coyne, A. G., Moloney, E. M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3501-3503
- ¹⁷⁰ Lee, E. Y., Park, J., Kim, Y., Lee, J. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *18*, 2943-2946
- ¹⁷¹ Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 936-942