

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

**KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**SYNTÉZA ANTHELMINTICKY  
AKTIVNÍCH KYANBENZAMIDŮ**

Hradec Králové, 2012

Lucie Flídrová

Za všestrannou pomoc, cenné rady a připomínky při vypracování této práce děkuji svému školiteli PharmDr. Marcelu Špulákovi, PhD. a Mgr. Elišce Matoušové, PhD., dále doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za provedení NMR analýz a za spolupráci při syntézách a vytvoření příjemného pracovního prostředí prof. RNDr. Milanu Pourovi, PhD. a Mgr. Ondřeji Krenkovi.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Lucie Flídrová

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Lucie Flídrová

Konzultant: PharmDr. Marcel Špulák, PhD.

Název diplomové práce: Syntéza anthelminticky aktivních kyanbenzamidů

Cílem této diplomové práce byla příprava čtyř z nejaktivnějších kyanobenzamidů, zástupců nové perspektivní skupiny anthelmintik (aminoacetonitrily – AADs).

Syntéza prvních tří látek byla provedena pomocí alkylace příslušného fenolu s chloracetonem následované Streckerovou reakcí vzniklého ketonu a poté acylací aminu substituovaným benzoylchloridem.

Pro čtvrtý derivát musela být vyvinuta alternativní syntéza. Jako substrát pro Streckerovu reakci byl použit THP-ochráněný hydroxyaceton, poté následovala acylace substituovaným benzoylchloridem a sekvence byla zakončena nukleofilní aromatickou substitucí na příslušném fluorbenzenu.

Všechny deriváty byly připraveny v dobrých výtěžcích. V současné době jsou testovány na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové na vztah mezi enzymy metabolizujícími léčiva (DME) a vývojem rezistence.

## **ABSTRACT**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: Lucie Flídrová

Consultant: PharmDr. Marcel Špulák, PhD.

Title of Thesis: Synthesis of cyanobenzamide derivatives with anthelmintic activity

The goal of this work was to prepare four of the most active known cyanobenzamides from the new promising anthelmintic group (aminoacetonitriles – AADs).

Synthesis of first three compounds was carried out by alkylation of the corresponding phenol with chloroacetone followed by the Strecker reaction of ketone and acylation of the amine with substituted benzoylchloride.

For the fourth derivative, alternative synthesis was established. THP-protected hydroxyacetone was used as a substrate for the Strecker reaction, which was followed by the acylation with substituted benzoylchloride. Finally aromatic nucleophilic substitution of activated fluorobenzene yielded the targeted compound.

All prepared derivatives were synthesized in good yields. Compounds are currently being tested at the Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové to explore the relationship between drug metabolizing enzymes (DME) and drug resistance.

# OBSAH

OBSAH.....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	6
1. ÚVOD.....	7
1.1. Anthelmintika .....	7
1.2. Anthelmintika proti nematodózám .....	8
1.3. Problém rezistence u anthelmintik .....	13
1.4. Mechanismy vzniku rezistence .....	15
1.5. Faktory ovlivňující vznik rezistence .....	16
1.6. Rezistence a její následky .....	17
1.7. Deriváty aminoacetonitrilu - AADs .....	18
2. CÍL PRÁCE.....	19
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM.....	20
3.1. Metoda A .....	20
3.2. Metoda B .....	22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	26
4.1. Použité experimentální postupy .....	26
4.2. Příprava <i>N</i> -[2-kyan-1-(2-trifluormethylfenoxy)propan-2-yl]-4-trifluormethoxybenzamidu ...	26
4.3. Příprava <i>N</i> -[1-(2-brom-4,5-difluorfenoxi)-2-kyanpropan-2-yl]-4-trifluormethoxybenzamidu	29
4.4. Příprava <i>N</i> -[1-(2,5-dichlorfenoxi)-2-kyanpropan-2-yl]-4-(trifluormethoxy)benzamidu .....	31
4.5. Příprava <i>N</i> -[1-(2-trifluormethyl-5-kyanfenoxi)-2-kyanpropan-2-yl]-4-(trifluormethyl- sulfanyl)benzamidu .....	33
5. ZÁVĚR.....	37
6. LITERATURA.....	38

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DHP	3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyran
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
MDR	zkřížená rezistence
MS	hmotnostní spektroskopie
nACh	nikotinové receptory pro acetylcholin
NMR	nukleární magnetická rezonance
PgP	P-glykoprotein
PPTS	pyridinium- <i>p</i> -toluensulfonát
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl

# 1. ÚVOD

## 1. 1. Anthelmintika

Anthelmintika jsou léčiva určená k terapii helmintóz, tj. nález lidského a zvířecího organismu mnohobuněčnými živočichy – červy. Červy můžeme rozdělit do tří skupin: *cestoda* (ploší červi = tasemnice), *nematoda* (oblí červi = hlístice) a *trematoda* (motolice). Ve vyspělých státech helmintózy u lidí postupně ubývají, anthelmintika se proto používají především ve veterinárním lékařství.<sup>1,2</sup>

Anthelmintika se klasifikují podle jejich vlivu na parazity – vermicida (způsobují smrt červů) a vermifuga (nejprve vyvolají paralýzu, pak následuje vypuzení parazita z těla infikovaného hostitele). Podle typu parazita se anthelmintika dělí na anticestodika, antinematodika a antitrematodika.<sup>3</sup>

Anticestodika jsou léky používané proti tasemnicím. Tasemnice jsou hermafroditní, segmentovaní červi - mají komplexní životní cyklus, který vyžaduje vývoj v jednom nebo i ve více mezihostitelích. V případě tasemnice bezbranné (*Taenia saginata*) a tasemnice dvoučlenné (*Taenia solium*), které se u nás vyskytují nejvíce, je definitivním hostitelem člověk, přičemž dospělý červ žije ve střevě. Nositeli jejich larválních stádií jsou zvířata (hovězí dobytek a prasata). Škulovec široký (*Diphyllobothrium latum*) se vyskytuje především ve skandinávských zemích, naopak tasemnice dětská či trpasličí (*Hymenolepis nana*) se vyskytuje převážně v tropických oblastech.<sup>1</sup>

Antinematodika se používají k léčení nález způsobených hlísticemi - jsou to cylindriční nesegmentovaní červi zašpičatělí na obou koncích. K infekci dochází po požití vajíček nebo tkání mezihostitele, která obsahují larvální stádia hlístic. Je známo velké množství nematod zvláště v tropických a subtropických oblastech - např. vlasovec mizní (*Wuchereria bancrofti*), který je zodpovědný za nemoc elefantiázu nebo *Onchocerca volvulus*, jehož larvy (mikrofilárie) u člověka napadají oko a způsobují tzv. říční slepotu. Některé hlístice se vyskytují i u nás – roup dětský (*Enterobius vermicularis*), škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*), zřídka i svalovec stočený (*Trichinella spiralis*).<sup>1</sup> Malí přežvýkavci jsou nejčastěji infikováni těmito parazity: vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta* a *Trichostrongylus colubriformis*. Hlístice čeledi *Strongylidae* způsobují velice často nákazu koní.<sup>4,5,6</sup>

Poslední skupinou jsou antitrematodika. Ta slouží k léčbě infekcí způsobených motolicemi, což jsou ploší nesegmentovaní červi, kteří se vyskytují v subtropických

a tropických oblastech. Nejdůležitější jsou schistosomózy způsobené krevničkami *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* a *Schistoma japonicum*.<sup>10</sup>

Odhaduje se, že 1,3 - 2 miliardy lidí (zejména v rozvojových zemích) trpí střevní infekcí způsobenou červy. Ačkoliv mortalita je nízká, mohou tyto infekce přispět k celkové morbiditě. Schistozómy i střevní parazité způsobují anémii, zpomalení růstu, malnutrici a snížení psychické a fyzické výkonnosti. Onchocerkóza může být doprovázena úporným svěděním, kožními defekty a snížením obranyschopnosti.<sup>5</sup>

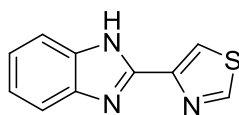
## 1.2. Anthelmintika proti nematodózám

Vzhledem k zaměření této diplomové práce je v následující kapitole uveden pouze přehled jednotlivých skupin antinematodik, jež se běžně používají v klinické praxi.

### 1.2.1. Benzimidazoly

Jsou to sloučeniny, u kterých je součástí aromatického heterocyklu amidinová nebo guanidinová skupina. Mechanismus účinku těchto látek je založen na inhibici syntézy  $\beta$ -tubulinu (strukturální jednotka nezbytná pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů). Tím narušují transport a metabolismus glukózy. Důsledkem je energetické vyčerpání, ztráta pohyblivosti parazitů a jejich pozvolné odumření. Afinita benzimidazolů k parazitárnímu  $\beta$ -tubulinu je mnohonásobně vyšší než k  $\beta$ -tubulinu ošetřovaných zvířat, proto mají jen minimální nežádoucí účinky.<sup>7,8</sup>

Za první širokospektré anthelmintikum se považuje tiabendazol. Účinek je krátkodobý, protože je rychle metabolizován na 5-hydroxytiabendazol a ve formě glukuronátu se vylučuje močí – charakteristický je zápach „po chřestu“. Nyní se využívá jako antivykotikum ve veterinární medicíně.<sup>2,7,8</sup>

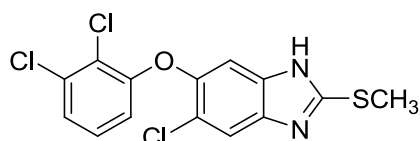


tiabendazol

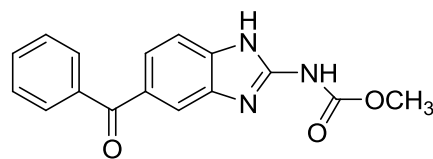
Novější látky jsou substituovány v poloze 5 benzimidazolového jádra. Patří sem triklabendazol, mebendazol, fenbendazol a albendazol, který jako jediný účinkuje proti všem vývojovým stádiím hlíst (tj. vajíčkům, larvám i dospělým červům). Fenbendazol



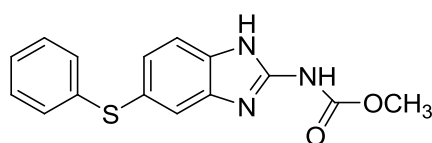
je veterinárně specifické antinematodikum, ostatní látky našly uplatnění i v humánní medicíně.<sup>2,7</sup>



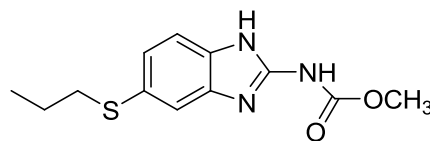
triklabendazol



mebendazol



fenbendazol



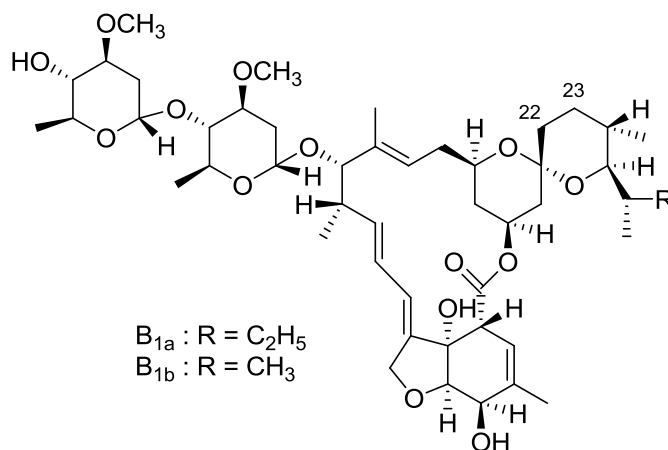
albendazol

Benzimidazoly dále vykazují anticestodní a antitrepatodní aktivitu. Z důvodu dosud neověřených informací o jejich toxicitě je vhodné omezit jejich užívání v době březosti (hlavně 1. trimestr).<sup>8</sup>

### 1.2.2. Makrocyclické laktony

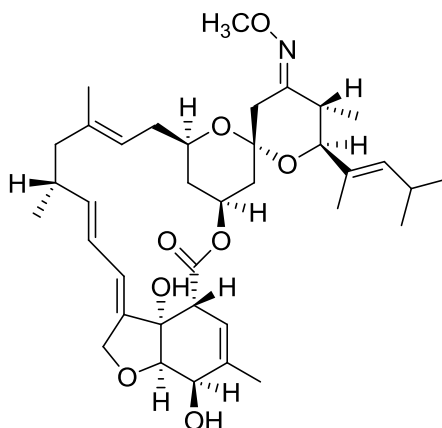
Jsou to léčiva biosyntetického původu, která se dělí se na avermektiny a milbemyciny. Tyto sloučeniny jsou toxické pro ryby a vodní živočichy, opatrnosti je třeba u kólií, šeltí, jezevčků a příbuzných plemen.

Mezi avermektinová anthelmintika patří ivermektin. Toto antibiotikum je směsí 22,23-dihydroderivátů avermektinu B<sub>1a</sub> (90%) a B<sub>1b</sub> (10%) a bylo izolováno z půdní aktinomycety *Streptomyces avermitilis*. Látka zvyšuje vyplavování a následnou vazbu kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné na její receptor komplexu chloridového kanálu postsynaptických neuronálních membrán, což má za následek paralýzu červů a jejich vyhladovění. Ve veterinárním lékařství se používá také jako insekticidum proti různým ektoparazitózám, v humánní medicíně je obzvláště účinný proti *Onchocerca volvulus*. Nežádoucí účinky jsou obvykle mírné – nejčastěji bolest těla doprovázená bolestí hlavy, otoky končetin, svědění a bolesti svalů.<sup>1,2,7,8,9</sup>



ivermektin

Milbemyciny jsou fermentační produkty kmene *Streptomyces cyanogriseus*. Vykazují stejné spektrum i mechanismus účinku jako avermektiny. V terapii střevních infekcí se ve veterinární praxi používá moxidektin. Je značně lipofilní, a proto je nezbytné přesně dodržet dávkování. Podobně jako u ivermektinu není dosud dostupné specifické antidotum v případě předávkování.<sup>3,7,10</sup>

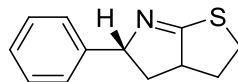


moxidektin

### 1.2.3. Imidazothiazoly

Tato skupina anthelmintik má výhradně antinematodní účinky. Působí proti dospělým formám parazitů i larválním stádiím, ovicidní účinky však nemají. Mechanismus spočívá v selektivní inhibici fumarát reduktázy (mitochondriální enzym), který reguluje anaerobní metabolismus červů. Rovněž vedou k zablokování neuromuskulární aktivity a následné svalové kontrakci. Používá se v humánní i veterinární medicíně.

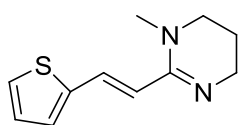
Jediným zástupcem této skupiny je levamizol (levotočivý izomer tetramizolu). Ten nezabíjí hlístice bezprostředně, ale jsou nejprve paralyzovány a pak snadno vyloučeny, protože lék zvyšuje intestinální motilitu. Levamizol může být využit i jako imunomodulátor.<sup>7</sup>



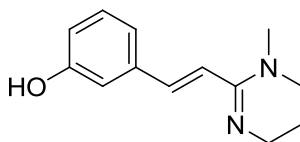
levamisol

#### 1.2.4. Tetrahydropyrimidiny

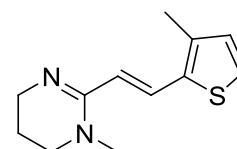
U těchto látek je amidinová skupina součástí tetrahydropyrimidinového jádra. Nejdůležitější je pyrantel (použití u zvířat i u lidí), méně často se používají oxantel a morantel (pouze ve veterinární medicíně).



pyrantel



oxantel

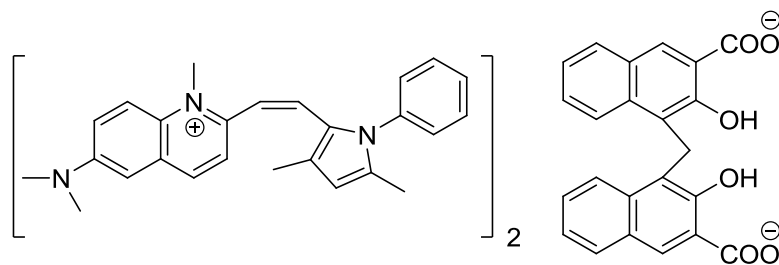


morantel

Pyrantel se používá ve formě embonátu (sůl se substituovanou kyselinou methylen-bis-naftoovou) a působí proti nezralým a dospělým formám citlivých helmintů ve střevě, nezasahuje však migrující stádia v tkáních. Působí na acetylcholinových receptorech svalových buněk nematod – výsledným efektem je spastická paralýza vnímavých nematod, která jsou vypuzena peristaltikou ze střeva v živém stavu. Přestože se léčivo po podání špatně vstřebává, mohou se objevit nežádoucí účinky jako bolest hlavy, závratě, zažívací potíže a ospalost. Pyrantel není vhodný pro těhotné ženy a pro děti ve věku nižším než jeden rok.<sup>1,2,7</sup>

#### 1.2.5. Pyrvinium-embonát

Pyrvinium-embonát je barvivo, které není významně absorbováno ze střeva. Léčivo je vysoce účinné pouze v léčbě lidských enterobióz. Podává se v jediné dávce, která se znovu opakuje po 6 až 8 týdnech, aby byli ovlivněni i hlísti, kteří se vylíhli až po podání první dávky z vajíček (pyrvinium-embonát není ovicidní). Nežádoucí účinky jsou obvykle zanedbatelné, zahrnují mírné abdominální potíže nebo vyrážku. Doporučuje se současné léčení ostatních členů domácnosti. Látka barví stolici jasně červeně.<sup>1,2</sup>

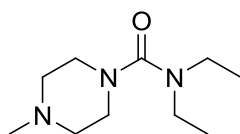


pyrvinium-embonát

### 1.2.6. Piperazin a diethylkarbamazin

Piperazin účinkuje paralyticky na svalovinu hlíst, který je potom peristaltickou aktivitou odstraněn z lidského organismu. Je účinný v léčbě askariózy (nákazy vyvolané škrkavkami) a enterobiózy (infekce způsobená roupem dětským), ale nemá žádný účinek na larvální stádia škrkavky. Piperazin je dobře tolerován, kromě gastrointestinálních poruch se může vyskytnout vyrážka nebo vzácně neurologické symptomy. U pacientů s latentní epilepsií byla pozorována exacerbace epilepsie.<sup>1</sup> Piperazin se nejčastěji používá ve formě solí s organickými kyselinami (piperazin-citrát a piperazin-adipát), které zpomalují resorpci z trávicího traktu.<sup>2</sup>

Diethylkarbamazin je piperazinový derivát, který je vysoce účinný nejen proti mikrofiláriím, ale také proti některým dospělým hlístům. Mechanismus účinku není zcela jasný. Diethylkarbamazin způsobuje vyplavení enzymů z eosinofilů, které pozměňují povrch hlístů i mikrofilárií, ty pak snadněji podléhají fagocytóze. Uplatnění našel pouze v humánní medicíně.<sup>1</sup>



diethylkarbamazin

### 1.3. Problém rezistence u anthelmintik

Anthelmintická rezistence je definována jako vrozená snížená citlivost parazitů k účinku léku. Tento jev zahrnuje dva biologicky odlišné, ale ne vždy rozeznatelné procesy:

- 1) Vyšší výskyt parazitů tolerujících léky
- 2) Existence populací náchylných parazitů, kteří mohou podlehnout mutacím (možná indukované působením léčiv)<sup>4,5</sup>

Četnější podávání stejného léčiva nebo léčiv se shodným mechanismem účinku vede k rozvoji rezistence u parazitů, kteří přežili předcházející terapie. V současné době se mnohem častěji vyskytují případy zkřížené rezistence (MDR), kdy se rezistence objevuje po současném podávání různých léčiv s odlišným mechanismem účinku.<sup>4,5</sup>

Rezistence je nejčastěji vyjádřena jako redukce, což je procentuální úbytek parazitů po expozici léčivem.<sup>4,5</sup>

#### 1.3.1. Obecné mechanismy vzniku rezistence

Léková rezistence může vzniknout několika způsoby:

- A) Změnou molekulárního receptoru – molekula léčiva nemůže dále efektivně interagovat s receptorem
- B) Modifikací metabolismu, který inaktivuje nebo odstraní léčivo
- C) Změnou distribuce léku v cílovém organismu s následným znemožněním přístupu léčiva na místo účinku
- D) Amplifikací cílových genů vedoucí k nedostatečné účinnosti léčiva<sup>4</sup>

#### 1.3.2. Vývoj rezistence u anthelmintik

První zprávy o rezistenci pocházejí z přelomu 50. a 60. let, kdy se prvně vyskytla u ovcí napadených parazitem *Haemonchus contortus* a později u koní infikovanými cyathostominy po podání tiabendazolu.<sup>6</sup> Od poloviny 70. let byla u koz a ovcí běžně rozšířená rezistence k benzimidazolům. Stejná situace se opakovala v 70. a 80. letech po podání imidazothiazolů, tetrahydropyrimidinů a makrocyclických laktonů. Na začátku 90. let se poprvé objevila zkřížená rezistence, která je v současnosti dokumentovaná po celém světě u všech veterinárně významných parazitů.<sup>6</sup>

### 1.3.3. Výskyt anthelmintické rezistence ve světě

#### 1) *Evropa*

Zprávy ukazují, že rezistence narůstá ve všech státech s výjimkou Portugalska (zde výskyt rezistence nebyl zkoumán) a Řecka (málo frekventované používání anthelmintik). Rezistence je hlavně spojena s benzimidazoly. Léky ovlivňující acetylcholinové receptory jsou zatím účinné, ačkoliv v Dánsku a Německu byly zaznamenány případy rezistence u prasat. Z Dánska a Skotska pocházejí zprávy o rezistenci prasat na ivermektin.<sup>11,12</sup>

#### 2) *Afrika*

V řadě zemí afrického kontinentu byly zaznamenány případy rezistence ke všem širokospektrým anthelmintikům. Z finančních důvodů byly výzkumy prováděny pouze v Keni (polovina z 42 vyšetřovaných farem vykazovala rezistenci nejméně k jedné anthelmintické skupině) a v Jižní Africe (zde byly popsány první případy rezistence na všechny hlavní anthelmintika).<sup>11,12</sup>

#### 3) *Austrálie a Nový Zéland*

V tropických oblastech Austrálie byla zjištěna rezistence k benzimidazolům, levamizolu a pyrantelu na přibližně 80 % farem, kombinace selhávala v polovině případů. Rezistence k makrocyclickým laktonům se zatím vyskytla jen na několika farmách, ale počet případů stoupá. U koz je mnohem větším problémem MDR (benzimidazoly + makrocyclické laktony + pyrantel/levamizol). Situace na Novém Zélandu není tak vážná, přesto se na asi 65 % farem objevila rezistence zejména k benzimidazolům.<sup>11,12</sup>

#### 4) *Jihovýchodní Asie a Jižní Pacifik*

Tropické a subtropické klima vyžaduje intenzivní užívání anthelmintik u dobytka – s tím je spojená vyšší pravděpodobnost výskytu rezistence. MDR na Fidži (benzimidazoly + levamizol) postihla třetinu farem, pozdější studie v Malajsii naznačila nárůst rezistence k benzimidazolům.<sup>11,12</sup>

#### 5) *Severní Amerika*

Zde je menší výskyt chovu přežvýkavců, přesto byly případy rezistence u ovcí spatřeny v Luisianě a na Floridě u všech typů anthelmintik.<sup>11,12</sup>

#### 6) *Jižní Amerika*

Na tomto kontinentu je nejvyšší a nejrozšířenější výskyt rezistence na celém světě. Ve všech zemích byla detekována zkřížená rezistence na ivermektin, mající za následek úplné vyčerpání všech léků a situace pro farmáře je kritická.<sup>11,12</sup>

## 1.4. Mechanismy vzniku rezistence u jednotlivých skupin anthelmintik

Mohutný nárůst nových případů rezistence po celém světě vyžaduje získávání nových poznatků a rozvoji nových molekulárních a genetických metod k rozšíření znalostí o tomto problému. Zde jsou popsány dosud známé informace ohledně rezistence k jednotlivým skupinám anthelmintik.

### 1.4.1. Benzimidazoly

Zatím nejsou k dispozici zprávy o rezistenci benzimidazolů u lidských parazitů, zatímco v případě veterinárních nematod byly provedeny rozsáhlé studie na *Haemonchus contortus*. Nejvíce prostudovaným faktorem ovlivňujícím rezistenci je mutace v kodonu 200 u  $\beta$  tubulinu izotypu 1 (kde fenylalanin byl nahrazen tyrosinem). Později byly navíc nalezeny další mutace u  $\beta$  tubulinu izotypu 1 a  $\beta$  tubulinu izotypu 2 v kodonu 167 (opět náhrada fenylalaninu za tyrosin), které rovněž přispívají k rezistenci na benzimidazoly. U rezistentních kmenů *Haemonchus contortus* se také vyskytla delece  $\beta$  tubulinu izotypu 2. Mutace v kodonu 167 a současná nepřítomnost v kodonu 200 byla prozkoumána u cyathostominů u koní. Polymorfismus v kodonu 167 byl také patrný i u rezistentních kmenů *Teladorsagia circumcincta*, ale chyběl u *Trichostrongylus colubriformis*. Kromě změn v genech přispívá k rezistenci u trichostrongylidů také aktivita P-glykoproteinu. Navíc studie ukázaly, že náhrada fenylalaninu v kodonu 200 je nezbytná pro výskyt rezistence u *Haemonchus contortus*, naopak u *Teladorsagia circumcincta* je zásadní mutace v kodonu 167.<sup>4,5</sup>

Odlišná je situace u triklabendazolu, který vykazuje úzké spektrum účinku. Zde rezistence není spojená s mutacemi v  $\beta$  tubulinu (tyrosin přítomný v kodonu 200 se vyskytuje u rezistentních i náchylných populací červů). Rezistentní kmeny jsou schopné rychleji metabolizovat účinnou formu triklabendazol-sulfoxid (inhibuje buněčné dělení a zpomaluje pohyb střevních sekretů) na relativně neúčinný sulfon.<sup>4,5</sup>

### 1.4.2. Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Levamisol je nejpoužívanější anthelmintikum ovlivňující nikotinové receptory pro acetylcholin. Nematoda rezistentní k levamisolu vykazují rezistenci k pyrantelu a morantelu. Rezistence u *Caenorhabditis elegans* je výsledkem absence levamisolových receptorů, které jsou součástí neuromuskulární synapse společně s receptory pro nikotin. Přesto metody pro rozlišení fyziologických a farmakologických parametrů u levamisol

rezistentních a senzitivních kmenů zatím nejsou k dispozici. Nematoda mají mnoho nAch, takže je obtížné nalézt jakýkoliv polymorfismus spojený s rezistencí. U *Trichostrongylus colubriformis* za rezistenci odpovídá jeden pohlavně vázaný gen, zatímco *Haemonchus contortus* je jich pravděpodobně několik. Pro přesnou definici rezistence těchto léčiv je potřeba podrobně prozkoumat nAch u jednotlivých parazitů.<sup>4,5</sup>

### 1.4.3. Makrocyclické laktony

Tyto léky ovlivňují intestinální parazity pomocí otevření chloridových kanálů (a následnému influxu chloridových aniontů do buňky – tento jev zajišťuje inhibiční působení GABA), ovlivněnými  $\alpha$  podjednotkou glutamátém řízených iontových kanálů ve svalech hltanu a somatických svalech. Ty regulují reprodukci, pohyb a výživu červů.<sup>4,5</sup>

Rezistence je způsobena mutacemi v genech kódujících tento transportní systém. Rohrer<sup>13</sup> porovnal ivermektin rezistentní a senzitivní kmeny a objevil, že rezistence není spojena se záměnou vazebného místa v glutamátém řízeném chloridovém receptoru. Blackhall<sup>14</sup> zjistil, že jedna alela  $\alpha$  podjednotky genu je spojena s rezistencí. Dokonce se objevují návrhy, že Pgp hraje roli v rezistenci, neboť dochází k extrémnímu vypuzení léku z těla červa.<sup>4,5</sup>

## 1.5. Faktory ovlivňující vznik rezistence

1) *Vysoká frekvence aplikace anthelmintika* přispívá k rychlejšímu vzniku a šíření rezistence: dvě až tři léčby ročně stačí k rozvoji rezistence u některých červů u dobytka. Vytvoření lékové rezistence rovněž usnadňuje několikaleté podávání stejného léku (nebo léku s totožným mechanismem účinku) v krátkých časových intervalech.<sup>5</sup>

2) *Volba vhodného léku* – pokud je užíván jediný lék, je účinný obvykle v prvním roce podávání, pak dochází ke vzniku rezistence. Omezení tvorby rezistence je dosaženo každoroční rotací anthelmintik nebo jejich kombinací – používají se dvě a více léčiv s rozdílným mechanismem účinku.<sup>5</sup>

3) *Časování a účinnost léčiv* – profylaktické podávání u zvířat přispívá k rozšíření rezistence. Ačkoliv nejsou žádná data z experimentálních studií dosud k dispozici, počítačové modely předpovídají, že rozvoj rezistence je zpomalen, pokud 20 % stáda zůstane neléčeno. To sníží výskyt červů přenášejících rezistentní alely. Pravidelné stěhování stád po dokončení léčby na jiné pastviny v období sucha se běžně provádí kvůli omezení vzniku náhlé infekce.<sup>5</sup>



4) *Poddávkování* je všeobecně považováno za významný faktor rozvoje rezistence, protože umožňuje přežít heterozygotním jedincům (přenáší rezistentní gen) a tak napomoci vytvoření nové rezistentní populace. Nižší dávky léčiv sice redukují náklady na léčbu (přestože cena tvoří minoritní podíl při plánování léčebných programů), ale nezabrání vzniku rezistence. Dávky některých v praxi používaných léčiv (např. ivermektin – 150 µg/kg, mebendazol 500 µg/kg, albendazol 200 - 400 mg/kg) jsou dle současných kritérií považovány za neléčebné. Poddávkování u lidí se často vyskytuje v rozvojových zemích, kde se běžně používají poloviční (někdy i menší) dávky a velmi často se na trhu nachází falšovaná nebo prošlá léčiva.<sup>5</sup>

5) *Biologie parazitů* – parazité se vyznačují krátkou délkou života a vysokou reprodukční schopností, takže se během krátké doby zvyšuje počet parazitů, kteří jsou rezistentní k léčbě.<sup>4</sup>

6) *Genetika parazitů* – rezistentní alely mohou být dominantní (např. u makrocyclických laktonů). Za rezistenci odpovídá různý počet genů (jeden nebo několik) – čím větší změna v genech, tím rychleji rezistence vzniká.<sup>4</sup>

## 1.6. Rezistence a její následky

Před 20 lety považovalo mnoho vědců rezistenci červů u dobytka za bezvýznamný jev. Vysoká prevalence rezistence intestinálních nematod u ovcí, koz a koní (často přes 50 %) byla zaznamenána ve všech oblastech světa, o něco méně závažná je rezistence u dobytka, přestože výskyt stále stoupá. Rezistence ohrožuje zdraví zvířat i produktivitu, celkově dochází ke snížení užitkovosti zvířat. V některých oblastech Paraguaye a Jižní Afriky jsou červi rezistentní ke všem širokospektrým anthelmintikům a farmáři začínají opouštět chov ovcí kvůli nepřekonatelným problémům s rezistencí.<sup>5</sup>

Výzkumníci v oboru veterinárních léčiv vydali varování před rapidním nárůstem rezistence u lidských červů (u hlístic a motolic; u tasemnic zatím rezistence nebyla zaznamenána). Proto musí být přísně dodržováno správné používání léčiv: tj. dávky, délka léčby a výběr léku. Navíc v případě lidských patogenů je obtížné prokázat, zda snížení účinku léku bylo způsobené rezistencí nebo ostatními faktory, jelikož nejsou k dispozici validní testy.<sup>4,6</sup>

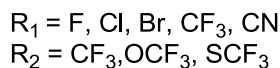
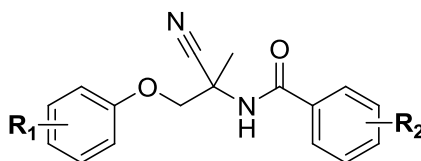
Pro terapii lidských helmintóz je nyní na trhu jen malé množství anthelmintik, která jsou bezpečná a zároveň účinná. Od zavedení makrocyclických laktonů v roce 1981 byly na trh uvedeny oxindolový alkaloid paraherquamid a cyklodepsidy reprezentované

emodepsidem. Tato látka byla izolována z houby *Mycelia sterilla* a využití našla jen v terapii helmintóz u koček (působí proti larválním i dospělým formám parazitů).<sup>6,15,16,17</sup>

### 1.7. Deriváty aminoacetonitrilu – AADs

Z důvodů uvedených v předchozích kapitolách je stále potřeba hledat nové potenciální skupiny anthelmintik. Jednou z perspektivních skupin anthelmintik jsou AADs – deriváty aminoacetonitrilu, jejichž přípravou jsem se zabývala v rámci této diplomové práce.

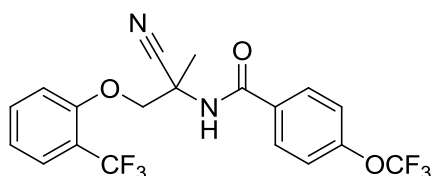
Jedná se o novou skupinu látek<sup>15,16,18,19</sup> především s výrazným nematocidním efektem. Tyto sloučeniny (obecný vzorec nejúčinnějších derivátů je zobrazen na Obr. 1) způsobují nadměrnou kontrakci svalových buněk parazita vedoucí k paralýze, selhání krevního oběhu a následně k smrti. Mechanismus účinku je založen na schopnosti ovlivnění podjednotky nikotinového receptoru pro acetylcholin.<sup>15,16</sup> V současné době je nejaktivnější z derivátů této skupiny - monepantel (**4**, AAD 1566) již registrován jako roztok pro orální podání při léčbě rezistentních nematóz u ovcí (ZOLVIX<sup>®</sup>, Novartis Animal Health).<sup>20</sup>



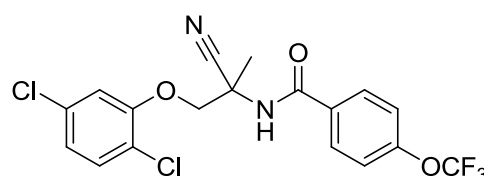
Obr. 1

## 2. CÍL PRÁCE

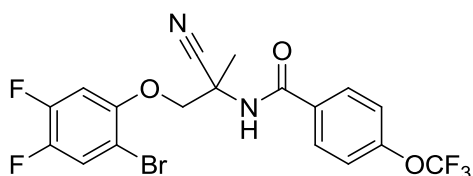
Cílem mé diplomové práce byla syntéza anthelminticky aktivních látek, jejichž strukturní základ tvoří aminoacetonitril (AADs). Mým úkolem bylo připravit čtyři vybrané zástupce této skupiny:



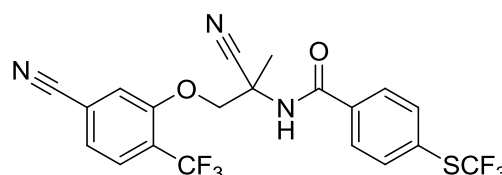
**1** (AAD 970)



**2** (AAD 1154)



**3** (AAD 1336)



**4** (AAD 1566, monepantel)

Připravené látky budou použity pro další výzkum metabolismu těchto sloučenin na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Cílem je nalézt vztah mezi DME parazitů (enzymy metabolizující léčiva) a vývojem rezistence. Pro studium budou použiti následující parazité: vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*, *Nematoda*), tasemnice krysí (*Hymenolepsis diminuta*, *Cestoda*) a motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*, *Trematoda*).

Všechny deriváty budou syntetizovány jako racemické směsi, jejich dělení na enantiomery bude probíhat pomocí HPLC na koloně s chirální náplní.

### 3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

#### 3.1. Metoda A

První tři požadované molekuly anthelmintik byly připraveny v souladu s publikovanou původní tříkrokovou syntézou.<sup>15,19</sup> Z retrosyntetického rozboru (Schéma 1) je patrné, že jako výchozí látky slouží komerčně dostupné substituované fenoly.

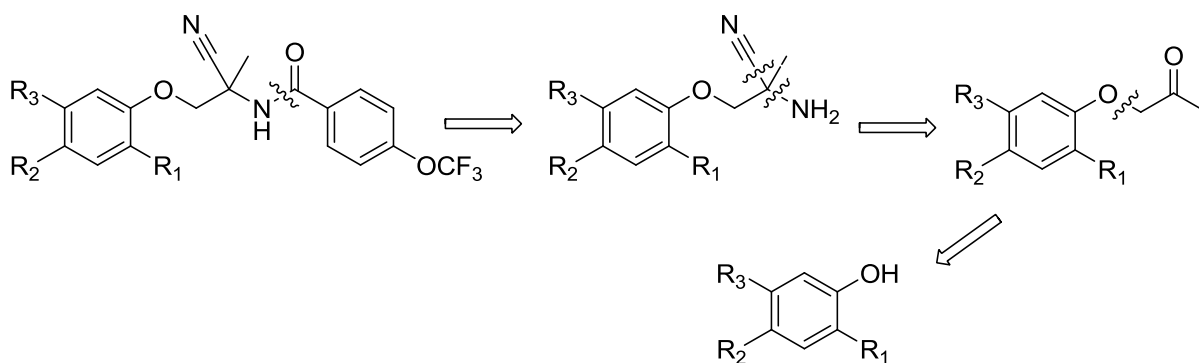
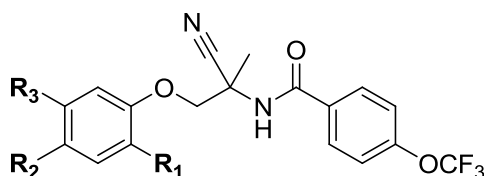


Schéma 1

Přehled syntetizovaných sloučenin dle výše zmíněného postupu je uveden v Tabulce 1:



Tabulka 1:

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>1</b>	CF <sub>3</sub>	H	H
<b>2</b>	Cl	H	Cl
<b>3</b>	Br	F	F

První syntetický krok (Schéma 2) zahrnoval reakci chloracetonu se substituovanými fenoly (**5-7**), které byly in situ pomocí uhličitanu draselného převedeny na příslušné fenoláty pro umožnění nukleofilní substituce (Williamsonova syntéza). Zároveň byl do reakční směsi přidán jodid draselný (0,02 ekv.) pro urychlení substituce (Finkelsteinova reakce).

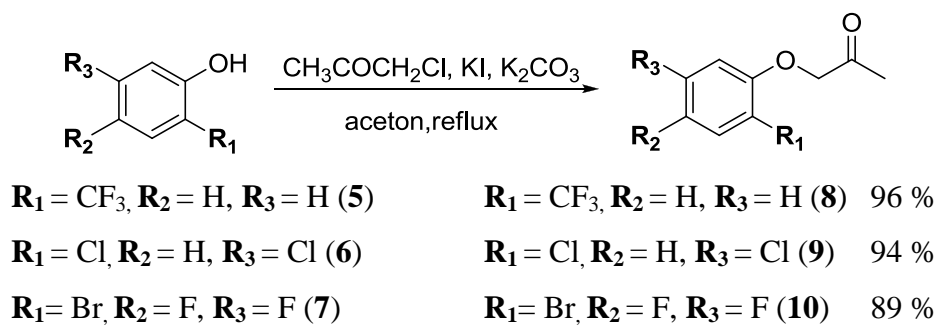


Schéma 2

Po izolaci látek (**8-10**) pomocí sloupcové chromatografie byla potvrzena jejich totožnost pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie – ve spektrech přibyly signály singletů methylenové a methylové skupiny v sousedství karbonylové skupiny (4.58 ppm a 2.37 ppm u látky **8**; 4.55 ppm a 2.35 ppm u látky **9**; 4.53 ppm a 2.37 ppm u látky **10**). Syntéza všech tří derivátů proběhla s vysokými výtěžky (89 – 96 %).

Vzniklé ethery (**8-10**) byly posléze podrobeny Streckerově reakci (Schéma 3). Jedná se o nukleofilní adici amoniaku na karbonylovou skupinu, přičemž meziproduktem je imin, který je následně atakován kyanidovým aniontem.

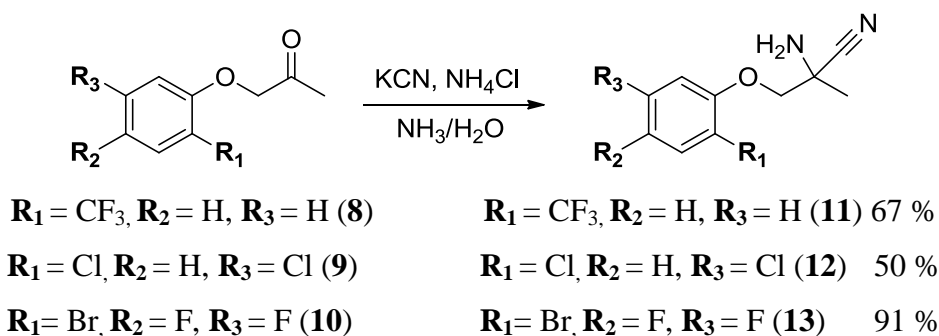


Schéma 3

Po separaci produktů (**11-13**) pomocí sloupcové chromatografie byla jejich totožnost ověřena pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie – ve spektrech se objevily dva dublety diastereotopických vodíků (4.10 a 3.91 ppm u látky **11**, 4.39 a 4.20 ppm u látky **12**, 4.07 a 3.90 ppm u látky **13**) a navíc broad singlet patřící aminoskupině (2.25 ppm u látky **11**, 2.44 ppm u látky **12** a 2.62 ppm u látky **13**). Produkty byly izolovány ve výtěžcích 50-91 %.

Aminonitrily (**11-13**) byly převedeny na amidy reakcí s chloridem kyseliny 4-trifluormethoxybenzoové (1,2 ekv.) za využití *N,N*-diisopropylethylaminu (1,4 ekv.)

a katalytického množství 4-(dimethylamino)pyridinu v prostředí dichlormethanu (Schéma 4). Všechny látky (**1-3**) byly po sloupcové chromatografii izolovány ve vynikajících výtěžcích 82-98 % a byly charakterizovány  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR a MS spektroskopii.

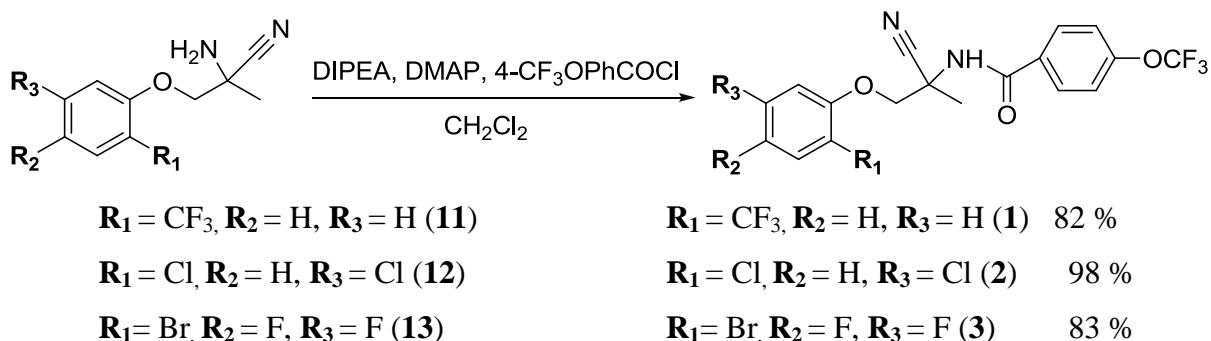


Schéma 4

Oproti původním molekulám přibyly ve spektrech signály *para* substituovaného aromatického jádra, navíc se v  $^1\text{H}$  NMR vytvořil singlet amidické skupiny (6.64 ppm u látky **1**, 6.72 ppm u látky **2** a 6.60 ppm u látky **3**).

### 3.2. Metoda B

Syntéza poslední látky (**4**) vycházela z hydroxyacetonu, který měl být dle publikované předlohy<sup>15,19</sup> přeměněn třístupňovou syntézou na finální produkt (Schéma 5).

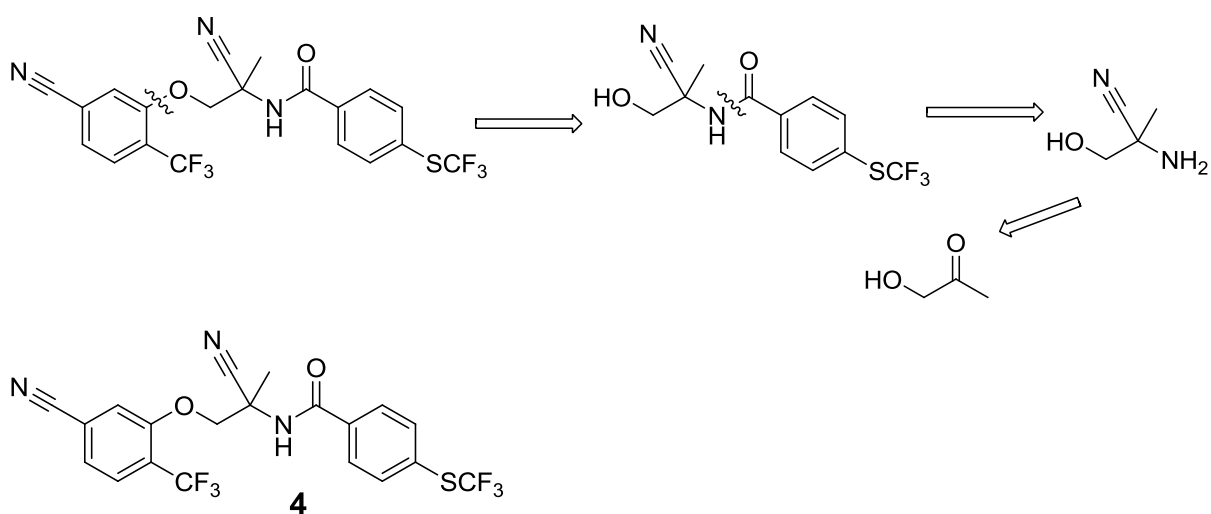


Schéma 5

V souladu s předchozí syntézou (kapitola 3.1.) byl výchozí hydroxyaceton podroben Streckerově reakci (Schéma 6). Produkt (**14**) se ovšem nepodařilo ani po opakování reakce izolovat.

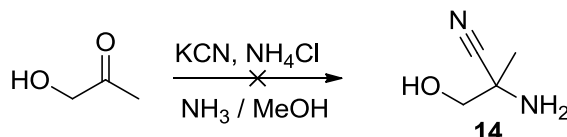


Schéma 6

Hydroxyl výchozí látky byl proto nejprve ochráněn jako THP ether reakcí s 3,4-dihydro-2*H*-pyranem v dichlormethanu za přidání katalytického množství pyridinium-*p*-toluensulfonátu (Schéma 7). Produkt (**15**) této reakce (79 % výtěžek) byl po rychlé separaci na silikagelovém sloupci použit bez charakterizace do následující reakce.

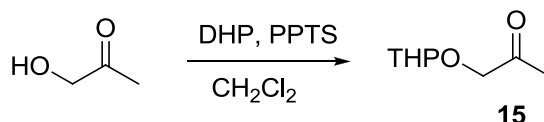


Schéma 7

V následujícím kroku byl opět proveden pokus o Streckerovu syntézu (Schéma 8). V tomto případě se již podařilo získat požadovaný produkt (**16**) v dobrém výtěžku (70 %), jehož totožnost potvrdila  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra. Přítomností dvou chirálních center v molekule vznikla směs diastereomerů v poměru 1:1, což bylo v obou NMR spektrech dobře patrné.

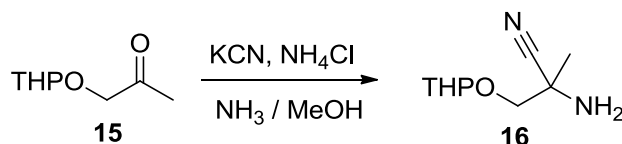


Schéma 8

Další stupeň syntézy spočíval v reakci aminonitrilu (**16**) s chloridem kyseliny 4-(trifluormethylsulfanyl)benzoové (1,2 ekv.) za přítomnosti *N,N*-diisopropylethylaminu (1,4 ekv.) a katalytického množství 4-(dimethylamino)pyridinu v prostředí dichlormethanu (Schéma 9). Výtěžek tohoto kroku syntézy byl po přečištění na sloupci silikagelu 67 %.

V  $^1\text{H}$  NMR spektrech přibyly signály *para* substituovaného aromatického jádra (7.91-7.82 a 7.75-7.70 ppm).

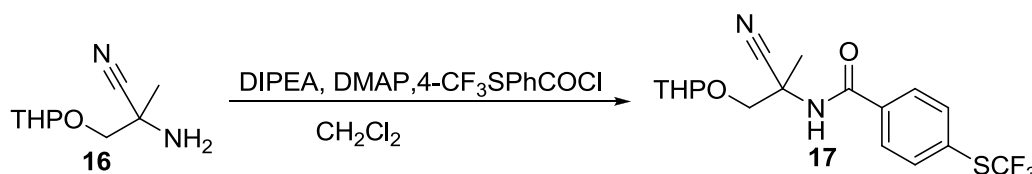


Schéma 9

Poté bylo potřeba odstranit THP chránící skupinu, nejprve pomocí kyselé pryskyřice DOWEX50<sup>®</sup> v prostředí methanolu. Reakce probíhala po dobu 20 hodin za laboratorní teploty. Za těchto podmínek vznikal produkt v poměrně nízkém výtěžku (29 %) za současného vymizení výchozí látky (monitorováno dle TLC), proto byly zvoleny mírnější reakční podmínky – PPTS v prostředí methanolu (Schéma 10). Požadovaný produkt (**18**) byl po separaci na sloupci silikagelu získán ve výborném výtěžku (97 %). Z NMR spekter vymizely veškeré signály chránící THP skupiny.

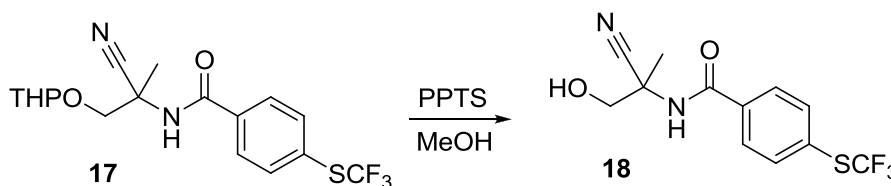
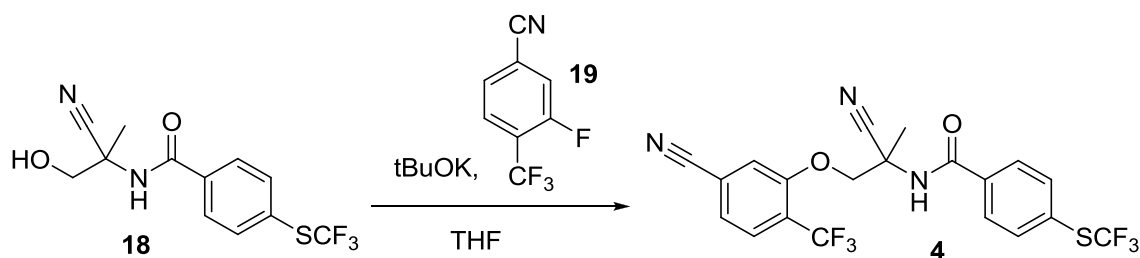


Schéma 10

Závěrečná nukleofilní aromatická substituce představovala reakci výchozího nitrilu (**18**), převedeného v bezvodém THF za přítomnosti *t*BuOK (1,1 ekv.) na alkoholát se substituovaným fluorbenzenem (1 ekv.) (**19**) (Schéma 11). Pro zdárný průběh tohoto typu reakce je nezbytná „aktivace“ fluorbenzenu substituenty se záporným mezomerním a indukčním efektem (v tomto případě trifluormethylová skupina v *o*-poloze a nitril v *m*-poloze).





V prvním pokusu bylo na TLC z reakční směsi patrné, že velká část výchozí látky nezreagovala. Proto bylo přidáno další množství *t*BuOK (0,5 ekv.), ale i po dvouhodinovém zahřívání reakční směsi bylo získáno pouze 13 % požadovaného produktu (**4**).

Při opakování tohoto pokusu s nadbytkem *t*BuOK (2 ekv.) a zahříváním reakční směsi po dobu 12 hodin nebyl produkt vůbec izolován - mohlo to být způsobeno tím, že *t*BuOK, který jsme použili, nebyl zřejmě úplně suchý – in situ vznikající hydroxid jako méně objemná báze by mohl interagovat i s jinými skupinami. Proto byl nejprve *t*BuOK přesublimován a v této formě pak použit (1,1 ekv.) do dalšího pokusu, kde po zahřívání reakční směsi na 50 °C po dobu čtyř hodin byl požadovaný produkt izolován ve výtěžku 24 %. Při použití komerčně dostupného *t*BuOK (1,1 ekv.) v roztoku (1 M roztok v THF) činil výtěžek reakce 27 % a nepodařilo se ho již dále zvýšit.

V <sup>1</sup>H NMR spektru se nacházely multiplety aromatických jader (7.81-7.72, 7.45-7.40 a 7.29-7.23 ppm), dále singlet amidické skupiny 6.73 ppm, dva dublety odpovídající diastereotopickým vodíkům (4.68 a 4.46 ppm) a singlet methylové skupiny (1.99 ppm).

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Použité experimentální postupy

Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. Tetrahydrofuran byl před použitím predestilován z benzofenon ketylu.

Teploty tání všech látek byly měřeny na Koflerově bloku nebo na přístroji Buchi B-545 a nebyly korigovány. NMR spektra všech látek byla změřena v roztocích  $\text{CDCl}_3$ , popř.  $\text{DMSO-}d_6$  při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro  $^1\text{H}$  a při 75 MHz pro  $^{13}\text{C}$  nebo na přístroji VARIAN VNMR S500 (500 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ). Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty  $\delta$  v parts per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla ( $\text{CDCl}_3$ : 7.26 pro  $^1\text{H}$  a 77.00 pro  $^{13}\text{C}$ ;  $\text{DMSO-}d_6$ : 2.49 pro  $^1\text{H}$  a 39.70 pro  $^{13}\text{C}$ ). Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, bs: broad singlet, d: dublet, q: kvartet, m: multiplet), interakční konstanty (Hz) a přiřazení. Hmotnostní spektra všech látek byla měřena na hmotnostním spektrometru AGILENT 500 metodou APCI s nízkou rozlišovací schopností.

Průběh reakce a čistota výsledných produktu byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminiových TLC deskách Silica gel 60  $\text{F}_{254}$  (Merck) s detekcí pod UV lampou a 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.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (200 ml) a následného zahřátí. Silikagel 60 (0.040-0.063 mm) pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen od firmy E. Merck.

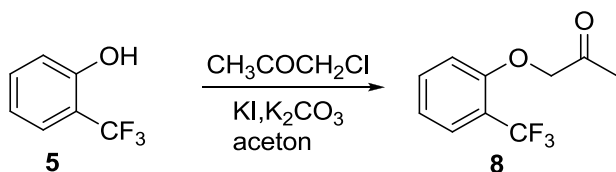
### 4.2. Příprava *N*-[2-kyan-1-(2-trifluormethylfenoxy)propan-2-yl]-4-trifluor-methoxybenzamidu (1)

#### 4.2.1. 2-(Trifluormethyl)fenoxyaceton (8)

Sumární vzorec:  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{F}_3\text{O}_2$

Molekulová hmotnost: 218,17

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

K suspenzi 2-trifluormethylfenolu (**5**) (334,3 mg; 2,00 mmol), jodidu draselného (6,6 mg; 0,04 mmol) a uhličitanu draselného (304,1 mg; 2,20 mmol) v acetonu (2 ml) byl přidán chloraceton (0,2 ml; 2,4 mmol) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 65 °C po dobu 8 hodin. Poté byla směs přefiltrována přes fritu, sraženina byla promyta acetonem a rozpouštědlo z filtrátu odpařeno. Surový produkt byl zředěn EtOAc (20 ml) a vytřepán s nasyceným roztokem NaCl (20 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a rozpouštědlo odpařeno. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi hexan:EtOAc (9:1) jako eluentu.

Výtěžek: 419 mg (96 %)

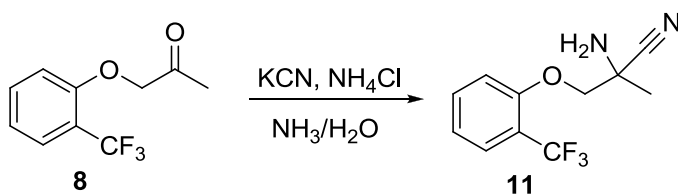
Charakteristika: žlutá olejovitá kapalina; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.64-7.60 (1H, m, Ar), 7.58-7.49 (1H, m, Ar), 7.14-7.07 (1H, m, Ar), 6.85-6.81 (1H, m, Ar), 4.58 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 2.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

#### 4.2.2. 2-Amino-2-methyl-3-(2-trifluormethylfenoxy)propanitril (**11**)

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 244,21

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Směs 2-(trifluormethylfenoxy)acetonu (**8**) (418,6 mg; 1,92 mmol), kyanidu draselného (149,9 mg; 2,30 mmol) a chloridu amonného (153,9 mg; 2,88 mmol) v hydroxidu amonném (25 %; 2 ml) byla míchána 14 hodin za laboratorní teploty. Poté byla směs zředěna EtOAc (20 ml) a vytřepána nasyceným roztokem NaCl (20 ml). Organická vrstva byla vysušena

bezdodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a po odpaření rozpouštědla byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi hexan:EtOAc (7:3) jako eluentu.

Výtěžek: 316 mg (67 %)

Charakteristika: nažloutlá olejovitá kapalina; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82-7.78 (1H, m, Ar), 7.59-7.54 (1H, m, Ar), 7.27-7.23 (1H, m, Ar), 7.12-7.08 (1H, m, Ar), 7.09-7.05 (1H, m, Ar), 4.13 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, CH<sub>2</sub>a), 3.91 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, CH<sub>2</sub>b), 2.25 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 1.60 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

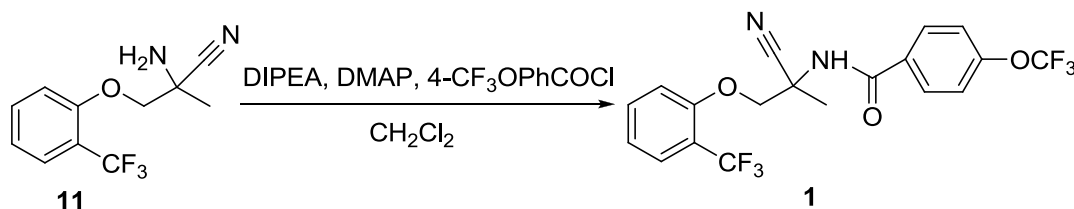
#### 4.2.3. *N*-[2-Kyan-1-(2-trifluormethylfenoxy)propan-2-yl]-4-(trifluormethoxy)benzamid

(1)

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>F<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 432,22

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Ke směsi 2-amino-2-methyl-3-(2-trifluormethylfenoxy)propannitrilu (**11**) (300,0 mg; 1,23 mmol), DIPEA (0,3 ml; 1,7 mmol) a DMAP (7,5 mg; 0,06 mmol) v dichlormethanu (3 ml) byl při 0 °C pomalu přikapáván 4-trifluormethoxybenzoylchlorid (0,2 ml; 1,5 mmol). Reakční směs byla nejprve míchána půl hodiny při teplotě 0-5 °C a poté při laboratorní teplotě po dobu 20 hodin. Následně byla směs zředěna EtOAc (20 ml) a vytřepána nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub>. Organická vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a po odpaření rozpouštědla byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi hexan:EtOAc (7:3) jako eluentu.

Výtěžek: 437 mg (82 %)

Charakteristika: žlutá krystalická látka, t.t. 147.9 °C, t.t. v literatuře<sup>15</sup> 152-3 °C; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82-7.78 (2H, m, Ar), 7.27-7.23 (1H, m, Ar), 7.11-7.07 (1H, m, Ar), 7.05-7.02 (1H, m, Ar), 6.64 (1H, s, NH), 4.64 (1H, d, *J* = 9.0, CH<sub>2</sub>a), 4.34 (1H, d, *J* = 9.0, CH<sub>2</sub>b), 1.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.8, 155.0, 152.1, 133.7, 131.1, 129.1, 127.3 (q, *J* = 5.1 Hz), 125.3, 121.8, 120.6, 117.9, 113.1, 70.5, 50.3, 22.5;

**LRMS** (APCI):  $m/z$  (relativní intenzita) 433.5  $[M+H]^+$  (100), 382.7 (13), 348.3 (7), 283.4 (24), 234.7 (8), 130.2 (16).

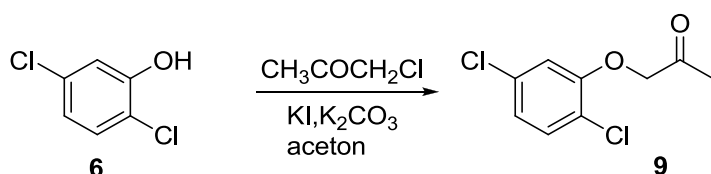
### 4.3. Příprava *N*-[1-(2,5-dichlorfenoxy)-2-kyanpropan-2-yl]-4-(trifluor-methoxy)benzamidů (2)

#### 4.3.1. 2-(2,5-Dichlorfenoxy)aceton (9)

Sumární vzorec:  $C_9H_8Cl_2O_2$

Molekulová hmotnost: 205,04

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz 4.2.1.

2,5-Dichlorfenol (6) (665,3 mg; 4,00 mmol); jodid draselný (13,3 mg; 0,08 mmol); uhličitan draselný (608,12 mg; 4,40 mmol); aceton (8 ml).

Výtěžek: 770,3 mg (94 %)

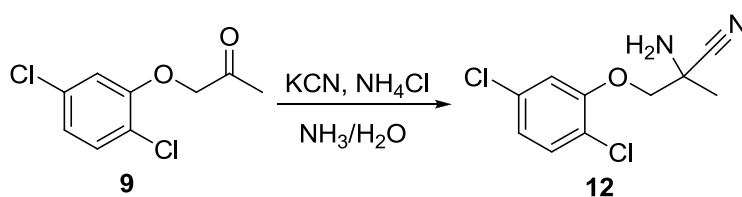
Charakteristika: žlutá olejovitá kapalina;  $^1H$  NMR: (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.34-7.30 (1H, m, Ar), 6.91-6.85 (1H, m, Ar), 6.78-6.76 (1H, m, Ar), 4.55 (2H, s,  $CH_2$ ), 2.35 (3H, s,  $CH_3$ ).

#### 4.3.2. 2-Amino-3-(2,5-dichlorfenoxy)propannitril (12)

Sumární vzorec:  $C_{10}H_{10}Cl_2N_2O$

Molekulová hmotnost: 245,11

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz 4.2.2.

2-(2,5-Dichlorfenoxy)aceton (**9**) (740,0 mg; 3,61 mmol); kyanid draselný (282,0 mg; 4,33 mmol); chlorid amonný (289,6 mg; 5,42 mmol); hydroxid amonný (25 %; 4 ml)

Výtěžek: 446 mg (50 %)

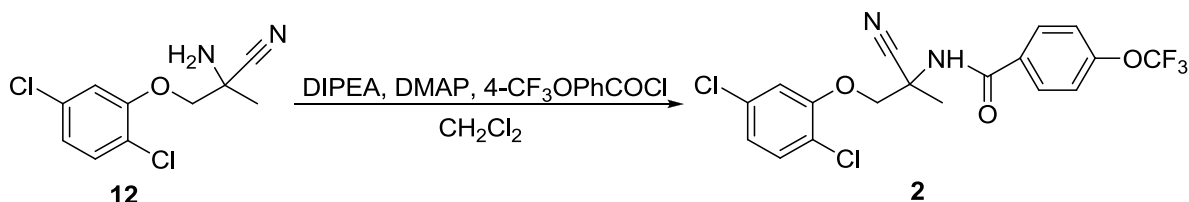
Charakteristika: nažloutlá olejovitá kapalina,  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.62-7.58 (1H, m, Ar), 7.26-7.19 (2H, m, Ar), 4.38 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{a}$ ), 4.19 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{b}$ ), 2.44 (2H, bs,  $\text{NH}_2$ ), 1.89 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

#### 4.3.3. *N*-[1-(2,5-Dichlorfenoxy)-2-kyanopropan-2-yl]-4-(trifluormethoxy)benzamid (**2**)

Sumární vzorec:  $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$

Molekulová hmotnost: 347,04

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz 4.2.3.

2-Amino-3-(2,5-dichlorfenoxy)propannitril (**12**) (405,6 mg; 1,65 mmol); DIPEA (0,4 ml; 2,3 mmol); a DMAP (10,1 mg; 0,08 mmol);  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 ml); 4-trifluormethoxybenzoylchlorid (0,3 ml; 2,0 mmol)

Výtěžek: 564 mg (98 %)

Charakteristika: žlutá krystalická látka, t.t. 127 °C, t.t. v literatuře<sup>15</sup> 128-130 °C;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.84-7.80 (1H, m, Ar), 7.29-7.22 (2H, m, Ar), 6.99-6.95 (1H, m, Ar), 6.72 (1H, s, NH), 4.54 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{a}$ ), 4.36 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{b}$ ), 1.99 (3H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.9, 153.3, 152.1, 133.5, 131.1, 131.0, 129.2, 123.3, 121.8, 120.7, 117.9, 115.5, 71.6, 50.5, 22.6; **LRMS** (APCI):  $m/z$  (relativní intenzita) 433.2 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (100), 406.2 (61), 365.3 (3), 244.0 (2), 219.1 (2), 189.2 (3).

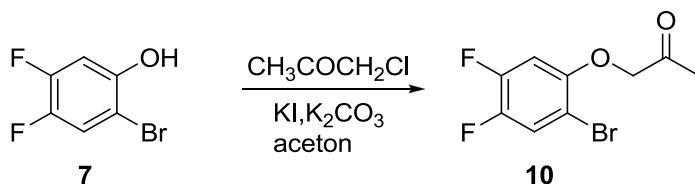
#### 4.4. Příprava *N*-[1-(2-brom-4,5-difluorfenoxy)-2-kyanpropan-2-yl]-4-trifluormethoxybenzamidu (3)

##### 4.4.1. 2-(2-Brom-4,5-difluorfenoxy)aceton (10)

Sumární vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>BrF<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 263,96

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz 4.2.1.

2-Brom-4,5-difluorfenol (7) (0,2 ml; 2,0 mmol); jodid draselný (6,6 mg; 0,04 mmol); uhličitan draselný (304,1 mg; 2,20 mmol); aceton (2 ml).

Výtěžek: 467 mg (89 %)

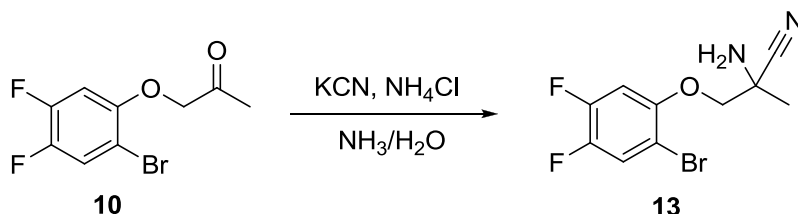
Charakteristika: žlutá olejovitá kapalina; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.47-7.41 (1H, m, Ar), 6.66-6.61 (1H, m, Ar), 4.53 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 2.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

##### 4.4.2. 2-Amino-2-methyl-3-(2-brom-4,5-difluorfenoxy)propannitril (13)

Sumární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 291,09

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz 4.2.2.

2-(2-Brom-4,5-difluorfenoxy)aceton (10) (467 mg; 1,77 mmol); kyanid draselný (138,3 mg; 2,12 mmol); chlorid amonný (142 mg; 2,65 mmol); hydroxid amonný (25 %; 2 ml).

Výtěžek: 469 mg (91 %)

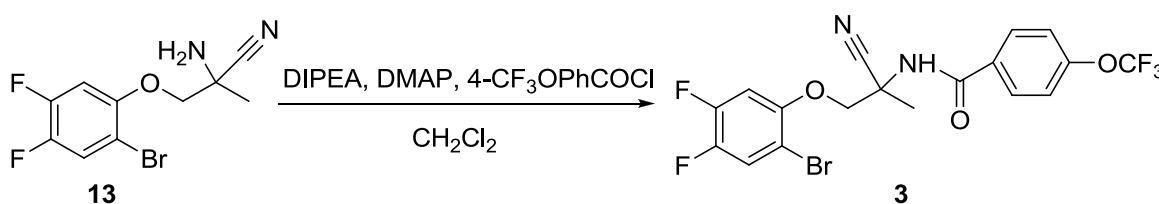
Charakteristika: nažloutlá olejovitá kapalina,  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.45-7.39 (1H, m, Ar), 6.79-6.72 (1H, m, Ar), 4.05 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{a}$ ), 3.89 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{b}$ ), 2.62 (2H, bs,  $\text{NH}_2$ ), 1.63 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

#### 4.4.3. *N*-[1-(2-Brom-4,5-difluorfenoxy)-2-kyanpropan-2-yl]-4-(trifluormethoxy)-benzamid (**3**)

Sumární vzorec:  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{BrF}_5\text{N}_2\text{O}_2$

Molekulová hmotnost: 478,19

Schéma přípravy:



Postup přípravy: viz 4.2.3.

2-Amino-2-methyl-3-(2-brom-4,5-difluorfenoxy)propanitril (**13**) (443,1 mg; 1,52 mmol); DIPEA (0,4 ml; 2,1 mmol); DMAP (9,3 mg; 0,08 mmol);  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 ml); 4-trifluormethoxybenzoylchlorid (0,3 ml; 1,8 mmol).

Výtěžek: 601 mg (83 %)

Charakteristika: žlutá amorfnní látka, t.t. v literatuře<sup>15</sup> 84-86 °C;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.87-7.82 (2H, m, Ar), 7.42-7.38 (1H, m, Ar), 7.34-7.28 (1H, m, Ar), 6.87-6.82 (1H, m, Ar), 6.60 (1H, s, NH), 4.49 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{a}$ ), 4.34 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{b}$ ), 2.01 (3H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.9, 152.2, 150.2, 147.9, 131.1, 129.2, 121.7, 121.5, 120.7, 118.0, 104.8, 104.5, 72.1, 50.5, 22.6; **LRMS** (APCI):  $m/z$  (relativní intenzita) 479.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100), 452.1 (35), 433.1 (3), 406.0 (2), 316.2 (2), 219.0 (2).



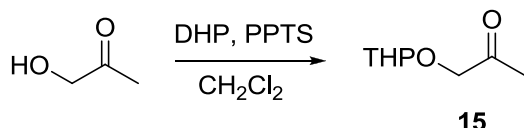
#### 4.5. Příprava *N*-[1-(2-trifluormethyl-5-kyanfenoxy)-2-kyanpropan-2-yl]-4-(trifluormethylsulfanyl)benzamidu (4)

##### 4.5.1. 1-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)aceton (15)

Sumární vzorec: C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 158,2

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Ke směsi hydroxyacetonu (3,8 ml; 50,0 mmol) v 80 ml dichlormethanu byl přidán PPTS (300 mg, 50,0 mmol) a DHP (4,7 ml, 50,0 mmol). Za stálého míchání probíhala reakce za laboratorní teploty po dobu 16 hodin. Poté byla reakční směs zředěna EtOAc (20 ml), vytřepána s 5% vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (30 ml), organická vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a po odpaření rozpouštědla byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi hexan:EtOAc (9:1) jako mobilní fáze. Produkt byl bez charakterizace použit do následující reakce.

Výtěžek: 7,3 mg (79 %)

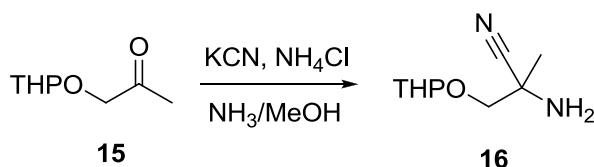
Charakteristika: žlutá olejovitá kapalina

##### 4.5.2. 2-Amino-2-methyl-3-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)propannitril (16)

Sumární vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 184,24

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Ochráněný hydroxyaceton (**15**) (7,3 g; 46,1 mmol) byl rozpuštěn ve směsi amoniaku v methanolu (25%, 60 ml). Poté byl přidán kyanid draselný (3,61 g; 55,4 mmol) a chlorid amonný (3,7 g; 69,2 mmol). Směs byla míchána 14 hodin za laboratorní teploty. Vzniklý produkt byl zředěn EtOAc a vytřepán nasyceným roztokem NaCl, organická vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědel byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi hexan:EtOAc (8:2) jako mobilní fáze.

Výtěžek: 5,947 g (70 %)

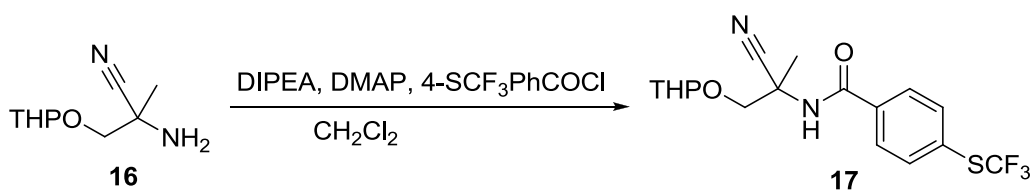
Charakteristika: nažloutlá olejovitá kapalina; <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (směs diastereomerů 1:1) 4.77-4.70 (1H, m, OCH), 3.91-3.78 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3.80 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, OCH<sub>2</sub>a), 3.62 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, OCH<sub>2</sub>a), 3.59-3.49 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3.48 (1H, d, *J* = 9.8, OCH<sub>2</sub>b), 3.24 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, OCH<sub>2</sub>b), 2.05 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 1.95-1.48 (6H, m, 3xCH<sub>2</sub>), 1.48 (1H, s, CH<sub>3</sub>a), 1.47 (1H, s, CH<sub>3</sub>b); <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 123.5, 123.4, 98.9, 98.3, 73.4, 73.0, 62.1, 61.6, 50.2, 49.9, 30.1, 30.0, 25.2, 25.2, 24.2, 24.1, 18.9, 18.5.

#### 4.5.3. *N*-[2-Kyan-3-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)propan-2-yl]-4-(trifluormethyl-sulfanyl)benzamid (**17**)

Sumární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>SF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 387,40

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Výchozí aminonitril (**16**) (1,238 g; 6,7 mmol) byl rozpuštěn v 16 ml dichlormethanu, poté byl přidán DIPEA (1,6 ml; 9,4 mmol) a DMAP (40,9 mg; 0,34 mmol). Po zchlazení na 0 °C byl pomalu přikapán 4-(trifluormethylsulfanyl)benzoylchlorid (2 g; 8,1 mmol). Reakční směs byla míchána nejprve půl hodiny při teplotě 0-5°C a následně při laboratorní teplotě po dobu 20 hodin. Poté byla zředěna EtOAc (30 ml) a vytřepána nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (30 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a po odpaření

rozpouštědla byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi hexan:EtOAc (8:2) jako mobilní fáze.

Výtěžek: 1,748 g (67 %)

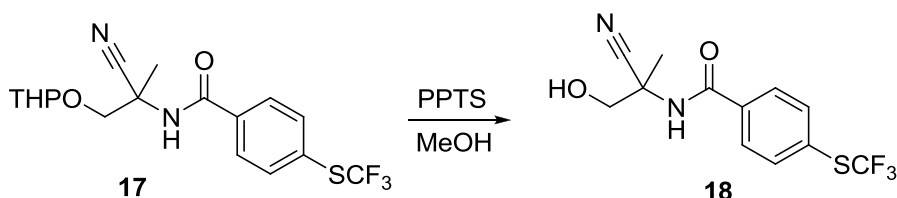
Charakteristika: světle žlutá krystalická látka;  $^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (směs diastereomerů 1:1) 7.95 (1H, bs, NH), 7.91-7.82 (2H, m, Ar), 7.75-7.70 (2H, m, Ar), 4.63-4.57 (1H, m, OCH), 4.10 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{a}$ ), 4.05-3.98 (3H, m,  $\text{OCH}_2 + \text{OCH}_2\text{a}$ ), 3.81 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{b}$ ), 3.62 (1H, m,  $\text{OCH}_2\text{b}$ ), 1.95-1.50 (6H, m,  $3\times\text{CH}_2 + \text{CH}_3\text{a} + \text{CH}_3\text{b}$ ).

#### 4.5.4. *N*-(1-Hydroxy-2-kyanpropan-2-yl)-4-(trifluormethylsulfanyl)benzamid (18)

Sumární vzorec:  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{SF}_3\text{N}_2\text{O}_2$

Molekulová hmotnost: 303,28

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Výchozí amid (**17**) (1,748 g; 4,51 mmol) se rozpustil v 31 ml methanolu a poté byl přidán PPTS (73 mg). Za stálého míchání probíhala reakce při laboratorní teplotě 16 hodin. Směs byla zředěna EtOAc (10 ml), vytřepána mezi 5% vodný roztok  $\text{NaHCO}_3$  (30 ml) a EtOAc (40 ml), organická vrstva byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a po odpaření rozpouštědla byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi hexan:EtOAc (7:3) jako mobilní fáze.

Výtěžek: 1,37 g (97 %)

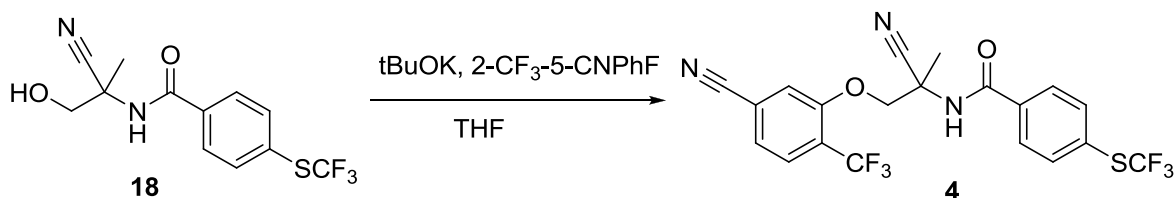
Charakteristika: světle žlutá olejovitá kapalina;  $^1\text{H NMR}$ : (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.86-7.81 (2H, m, Ar), 7.76-7.71 (2H, m, Ar), 6.73 (1H, bs, NH), 4.05 (1H, d,  $J = 11.5$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{a}$ ), 3.88 (1H, d,  $J = 11.5$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{b}$ ), 1.79 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

#### 4.5.5 *N*-[1-(2-Trifluormethyl-5-kyanfenoxy)-2-kyanpropan-2-yl]-4-(trifluormethyl-sulfanyl)benzamid (**4**)

Sumární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>SF<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 472,38

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Ke směsi *t*BuOK (1 M roztok v THF; 2,9 ml; 2,9 mmol) a výchozího amidu (**18**) (788 mg; 2,60 mmol) v 21 ml bezvodého THF byl během půl hodiny při laboratorní teplotě přidán 3-fluor-4-(trifluormethyl)benzonitril (491,3 mg; 2,60 mmol). Reakční směs byla nejprve za stálého míchání zahřívána na 50 °C po dobu 4 hodin a poté míchána za laboratorní teploty po dobu 16 hodin. Výsledný produkt byl po zředění EtOAc (10 ml) vytřepán nasyceným roztokem NaCl (20 ml) a organická vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědel byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím směsi hexan:EtOAc (9:1) jako mobilní fáze.

Výtěžek: 338 mg (27 %)

Charakteristika: bílá krystalická látka, t.t. 68,5°C, t.t. v literatuře<sup>19</sup> 69-73°C, <sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.81-7.72 (5H, m, Ar), 7.45-7.40 (1H, m, Ar), 7.29-7.23 (1H, m, Ar), 6.73 (1H, s, NH), 4.71 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, CH<sub>2</sub>a), 4.48 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, CH<sub>2</sub>b), 1.99 (3H, s, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR: (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.1, 155.3, 136.0, 134.6, 129.6, 129.2 (q, *J* = 308.2 Hz), 128.4 (q, *J* = 4.9 Hz), 128.0, 125.5, 123.2 (q, *J* = 32.0 Hz), 122.5 (q, *J* = 272.9 Hz), 117.5, 116.9, 116.2, 70.3, 50.3, 22.6; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 474.2 [M+H]<sup>+</sup> (100), 447.1 (35), 403.2 (2), 298.3 (3), 260.1 (5), 205.2 (3).

## 5. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly připraveny čtyři látky z nové skupiny anthelmintik – derivátů aminoacetonitrilu (AADs). Syntéza prvních tří látek (**1-3**) probíhala dle původní publikace<sup>15</sup> ve vysokých výtěžcích, avšak při přípravě derivátu **4**, jehož syntéza je zmíněna<sup>19</sup> pouze ve zkrácené formě, došlo k dílčím úpravám reakčního schématu. Výchozí hydroxyaceton byl převeden na THP ether, který byl před posledním krokem syntézy odstraněn.

Všechny finální produkty (**1-4**) byly charakterizovány pomocí NMR a MS spekter, jež se shodovala s údaji v příslušném literárním zdroji.<sup>15,19</sup>

Látky byly předány na Katedru biochemických věd Farmaceutické fakulty UK, kde bude probíhat testování na interakci s enzymy metabolizujícími léčiva (DME).

## 6. LITERATURA

1. Lincová, D.; Fargali, H. a kol. Základní a aplikovaná farmakologie, 2. vydání, Nakladatelství Galen, Praha, **2002**, 493-497.
2. Hartl, J. a kol. Farmaceutická chemie IV., Nakladatelství Karolinum, Praha, **2006**, *1*, 156-164.
3. Suchopár, J. a kol. Remedia compendium 4.vydání, Panax Co, spol. s.r.o., **2009**, 457-464, ISBN 978-80-902806-4-9.
4. Wolstenholme, A. J.; Faiweather, I.; Richard, R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Gangster, N. C. *Trends in Parasitology*, **2004**, *20*, 469-476.
5. Geerts, S.; Gryseels, B. *Clinical Microbiology Reviews*, **2000**, *13*, 207-222.
6. Kaplan, R. M. *Trends in Parasitology*, **2004**, *20*, 477-480.
7. Ducháček, L.; Lamka, J. Veterinární vadamecum pro farmaceuty, Nakladatelství Karolinum, Praha, **2006**, 18-28.
8. Ducháček, L.; Lamka, J. Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Nakladatelství Karolinum, Praha, **2006**, 61-68.
9. Awadzi, K.; Boakye, D.A.; Edwards, G.; Opoku, N.O.; Attah, S.K.; Osei-Atweneboana, M.Y.; Lazdings-Held, J.K.; Ardrey, A.E.; Addy, E.T.; Quartey, B.T.; Ahmed, K.; Boatin, B.A.; Soumbey-Alley, E.W. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **2004**, *98*, 231-249.
10. Český lékopis 2009 2.díl, Grada Publishing a.s., Praha, **2009**, str. 2658.
11. Walter, P.J. *Vet. Parasitol.*, **1997**, *72*, 391-412.
12. Sutherland, I.A.; Shaw, J.; Shaw, J.R. *Vet. Parasitol.*, **2010**, *171*, 300-304.
13. Rohrer, S.P.; Birzin E.T.; Eary C.H.; Schaffer J.M., Shoop W.L. *J. Parazitol.*, **1994**, *80*, 437-497.
14. Blackhall W.J.; Pouliot J.F; Prichard R.K.; Beech R.N. *Exp.Parasitol.*, **1998**, *90*, 42-48.
15. Kaminsky, R.; Ducray, P.; Jung, M.; Clover, R.; Rufener, L.; Bouvier, J.; Schorderet Werber, S.; Wenger, A.; Wieland-Berghausen, S.; Goebel, T.; Gauvry, N.; Pautrat, F.; Skripsky, T.; Froelich, O.; Komoni-Oka, C.; Westlund, B.; Sluder, A.; Mäsler, P. *Nature*, **2008**, *452*, 176-180.
16. Kaminsky, R.; Gauvry, N.; Schorderet Werber, S.; Skripsky, T.; Bouvier, J.; Wenger, A.; Schroeder, F.; Desaulles, Y.; Hotz, R.; Goebel, T.; Hosking, B.C.; Pautrat, F.; Wieland-Berghausen, S.; Ducray, P. *Parasitol. Res.*, **2008**, *103*, 931-939.

17. Besier, B. *Trends in Parasitology*, **2006**, 23, 21-24.
18. Ducray, P.; Bouvier, J.; WO 02/049641, **2002**; *Chem.Abstr.*, **2002**, 137, 52407.
19. Ducray, P; Gauvry, N.; Pautrat, F.; Goebel, T.; Fruechtel, J.; Desaulles, Y.; Schorderet Weber, S.; Bouvier, J.; Wagner, T.; Froelich, O.; Kaminsky, R. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **2008**, 18, 2935-2938.
20. European Medicines Agency – Monepantel: Souhrn údajů o přípravku.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/veterinary/000154/WC500068907.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000154/WC500068907.pdf) (accessed 5.12.2011).