



Original Article

Evaluation of Protein Kinase C Inhibition of some benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine Derivatives

Tran Thi Van Anh¹, Ha Thanh Hoa¹, Pham Quoc Tuan¹,
Ngo Thi Sau², Do Mai Huong², Nguyen Van Thang³,
Tran Van Thao⁴, Nguyen Thanh Hai⁵, Dao Viet Hung^{1,6,*}

¹*Phu Tho College of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong, Gia Cam, Viet Tri, Phu Tho, Vietnam*

²*Department of Pharmacy - National Hospital of Obstetrics and Gynecology,
43 Trang Thi, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam*

³*Tan Trao University, Km 6 Trung Mon, Yen Son, Tuyen Quang, Vietnam*

⁴*Golden Dragon Pharmaceutical Co., Ltd, 165 Cau Giay, Dich Vong, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

⁵*VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

⁶*Université de Nantes, F-44000, Nantes, France*

Received 18 February 2023

Revised 28 February 2023; Accepted 10 March 2023

Abstract: Treatment of fungal infections is very difficult because of the limited therapeutic arsenal and the emergence of resistance to the two major antifungal classes: azoles and echinocandins. Consequently, finding new targets and new therapeutic strategies is a priority. The protein kinase Pkc1 of *Candida albicans* (CaPkc1), one of the key proteins involved in MAPK pathways, is described as a regulator of cell wall integrity during growth, morphogenesis, and response to cell wall stress. Therefore, the discovery of CaPkc1 inhibitory molecules can open up new and promising prospects in the development of new antifungal drugs that inhibit CaPkc1. In this study, we evaluated the CaPkc1 inhibitory activity of three benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine derivatives at three different concentrations of 50 μ M, 100 μ M, and 150 μ M. A concentration of 100 μ M was optimal for CaPkc1 inhibitory activity with all three benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine derivatives.

Keywords: Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine, CaPkc1, *Candida albicans*, antifungal activity.

* Corresponding author.

E-mail address: daoviethung@live.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4493>

Đánh giá khả năng ức chế Protein kinase C của một số dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin

Trần Thị Vân Anh¹, Hà Thanh Hòa¹, Phạm Quốc Tuấn¹,
Ngô Thị Sáu², Đỗ Mai Hương², Nguyễn Văn Thắng³,
Trần Văn Thảo⁴, Nguyễn Thanh Hải⁵, Đào Việt Hưng^{1,6,*}

¹Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, 2201 Hùng Vương, Gia Cẩm, Việt Trì, Phú Thọ, Việt Nam

²Bệnh viện Phụ Sản trung ương, 43 Tràng Thi, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Tân Trào, Km 6 Trung Môn, Yên Sơn, Tuyên Quang, Việt Nam

⁴Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Dược phẩm Rồng Vàng,
165 Cầu Giấy, Dịch Vọng, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁵Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁶Trường Đại học Nantes, FR-44000, Nantes, Pháp

Nhận ngày 18 tháng 02 năm 20232

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 02 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 3 năm 2023

Tóm tắt: Hiện nay việc điều trị nhiễm nấm gặp nhiều khó khăn vì số lượng thuốc điều trị nấm hạn chế, thêm vào đó là sự kháng thuốc của nấm với hai nhóm thuốc chống nấm chính: azole và echinocandin. Do đó, việc tìm kiếm các mục tiêu mới và chiến lược điều trị mới là ưu tiên hàng đầu hiện nay. Protein kinase Pkc1 của *Candida albicans* (CaPkc1) đóng vai trò quan trọng trong hiện tượng kháng thuốc hoặc dung nạp thuốc chống nấm. Enzym này liên quan đến tính toàn vẹn của thành tế bào trong quá trình phát triển cũng như sự hình thành và đáp ứng lực căng thành tế bào nấm. Do đó, việc phát hiện ra các phân tử ức chế CaPkc1 có thể mở ra những triển vọng mới và đầy hứa hẹn trong việc phát triển các chất chống nấm mới hướng ức chế CaPkc1. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá hoạt tính ức chế CaPkc1 của ba dẫn xuất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine tổng hợp ở ba nồng độ khác nhau tương ứng 50 μ M, 100 μ M và 150 μ M. Ở nồng độ 100 μ M là tối ưu cho hoạt tính ức chế CaPkc1 với cả ba dẫn xuất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine tổng hợp.

Từ khóa: Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin, CaPkc1, *Candida albicans*, hoạt tính kháng nấm.

1. Mở đầu

Nhiễm nấm hoặc nhiễm trùng nấm chủ yếu do ba tác nhân gây bệnh chính là *Candida*, *Aspergillus* và *Cryptococcus* [1]. Trong đó, bệnh nấm *Candida* là một loại bệnh phổ biến thường gặp hiện nay [2]. Có 5 nhóm thuốc chính được sử dụng trong điều trị nấm bao gồm: Polyen,

fluoropyrimidin, azol, allylamin và echinocandin [3]. Các thuốc trên tác động theo ba cơ chế: Ức chế sự sinh tổng hợp ergosterol của màng nấm (nhóm polyen và azol) [4], ngăn cản quá trình tổng hợp ADN và ARN trong nấm (nhóm fluoropyrimidin) [5] và làm rối loạn quá trình hình thành thành tế bào nấm (nhóm

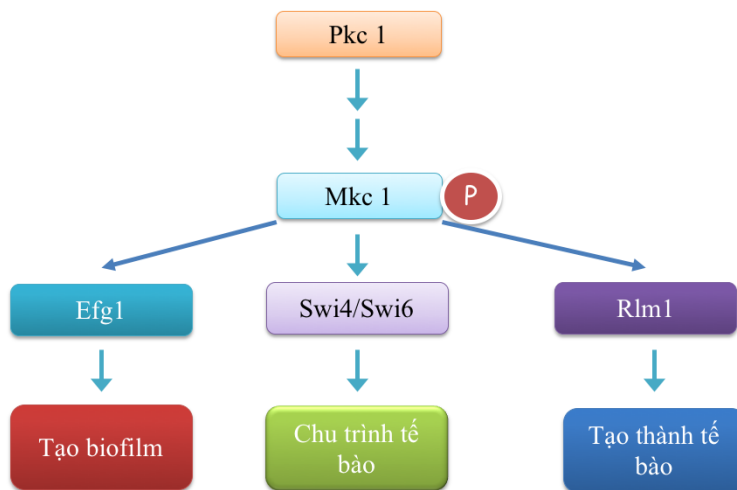
* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: daoviethung@live.com

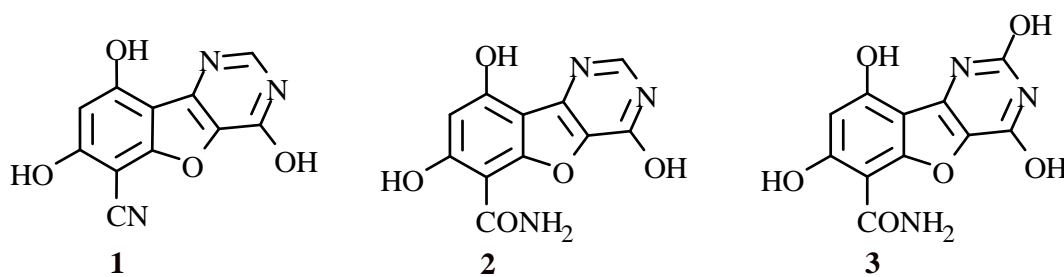
<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4493>

echinocandin) [6]. Tuy nhiên việc điều trị nhiễm trùng nấm gặp nhiều khó khăn vì số lượng thuốc điều trị nấm hạn chế, thêm vào đó là sự kháng thuốc của nấm với hai nhóm thuốc chống nấm chính là azole và echinocandin [7]. Do đó, việc tìm kiếm các mục tiêu mới và các phác đồ mới điều trị nấm đang được các nhà khoa học rất quan tâm. Trong số các loài *Candida* gây bệnh trên người như *Candida albicans* (*C. albicans*), *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. Tropicalis*, *C. krusei*; *C. albicans* được biết đến là tác nhân gây bệnh nấm cơ hội phổ biến nhất trên toàn thế giới [8]. Ở *C. albicans*, protein kinase C

(*CaPkc1*) đóng vai trò chính trong cơ chế kháng thuốc hoặc dung nạp thuốc chống nấm (Hình 1) [9]. Trong môi trường bất lợi cho sự sống của tế bào nấm, *Pkc1* sẽ kích hoạt quá trình phosphoryl hóa *Mkc1*. Sau đó, *Mkc1* kích hoạt các yếu tố phiên mã *Efg1*, *Swi4/Swi6* và *Rlm1* – các yếu tố đóng vai trò quan trọng trong sự ức chế hoặc kháng thuốc chống nấm của *C. albicans* thông qua sự tạo biofilm, qua chu trình tế bào hoặc quá trình tạo thành tế bào nấm. Do đó việc tìm ra các phân tử có tác dụng ức chế *CaPkc1* có thể mở ra triển vọng mới, đây hứa hẹn trong phát triển các thuốc mới điều trị nấm hướng ức chế *CaPkc1* [10].



Hình 1. Con đường Pkc1 ở *C. albicans*.



Hình 2. Cấu trúc của ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin tổng hợp.

Với mục đích sàng lọc và phát hiện các hợp chất kháng nấm tiềm năng, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá tác dụng ức chế *CaPkc1* của ba hợp chất có cấu trúc benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin (Hình 2) đã được tổng hợp

(quy trình tổng hợp ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin không trình bày trong nghiên cứu này) với mong muốn tìm kiếm các chất ức chế *CaPkc1*.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

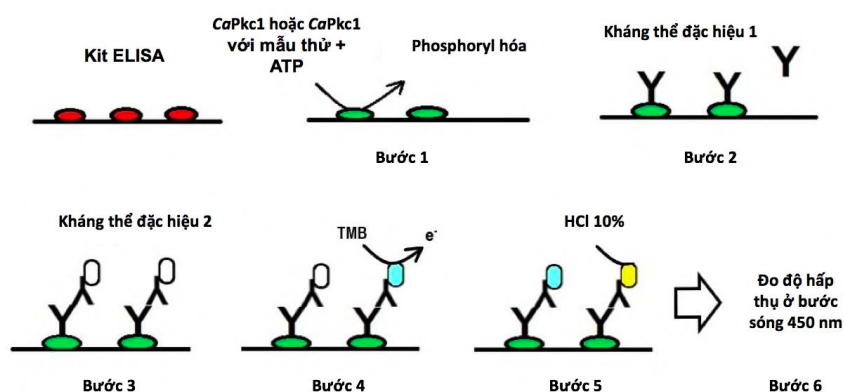
2.1. Dung môi, hóa chất, dụng cụ

Chất thử nghiệm là ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin đã được tổng hợp và tinh chế với độ tinh khiết trên 98%. Các hóa chất, dung môi được mua từ các nhà cung cấp (công ty hóa chất Aldrich, Merck, Acros) với độ tinh khiết trên 98% và sử dụng không qua tinh chế. Sắc ký lớp mỏng (SKLM) thực hiện trên bản mỏng silica gel 60_{F254} (Merck) và quan sát dưới đèn UV, bước sóng 254 nm. Nhiệt độ nóng chảy được đo bằng máy Electrothermal digital IA9300. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi trên máy Bruker Avance 400 với TMS làm chất chuẩn nội. Phổ khối được đo trên máy Waters

Acquity UPLC ZQ 2000 với kỹ thuật ion hóa phun điện tử (ESI). Dung dịch *CaPkc1* được nhóm nghiên cứu chiết xuất từ chủng nấm men *C. albicans*. Bộ kit: “PKC kinase activity”, các hóa chất, dung môi của phương pháp thử được mua từ nhà cung cấp Enzo Life Sciences. Nồi hấp tiệt trùng Hirayama, tủ âm Shellab, máy vortex Labnet, tủ cấy vô trùng, máy đo quang Gene Quant.

2.2. Phương pháp tổng hợp hoá học

Quy trình tổng hợp ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin bằng các phản ứng hóa học thông thường như: aminocarbonyl hóa trực tiếp, iodo-hóa, cyanid hóa, *O*-alkyl hóa, phản ứng đóng vòng, tách loại nhóm bảo vệ.



Hình 3. Tóm tắt quy trình thử nghiệm đo sự ức chế hoạt động của *CaPkc1*.

2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế *CaPkc1*

Sự ức chế hoạt động của *CaPkc1* được đo bằng cách sử dụng bộ kit: “PKC kinase activity” của Enzo Life Sciences. Bộ dụng cụ này dựa trên nguyên tắc của xét nghiệm ELISA sử dụng một peptid tổng hợp làm chất nền và một kháng thể đa dòng nhận biết dạng phosphoryl hóa chất nền được hấp phụ vào bề mặt của các giếng của phiến [11]. Quy trình bao gồm 6 bước và các thí nghiệm được tiến hành độc lập 3 lần. Các mẫu được thử nghiệm bao gồm dung dịch *CaPkc1* của *C. albicans* và hỗn hợp dung dịch *CaPkc1* với mẫu thử được cho vào trong các giếng của phiến. ATP sau đó được thêm vào để bắt đầu

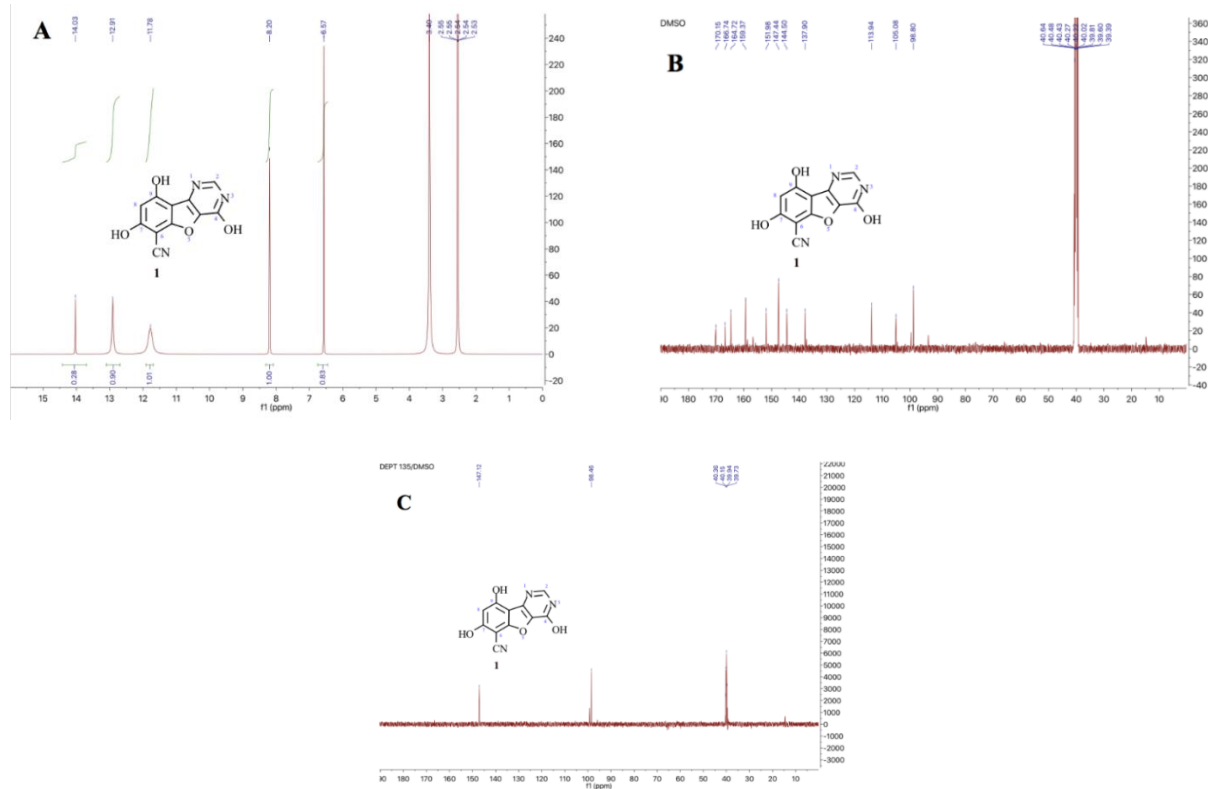
phản ứng phosphoryl hóa và phiên được ủ trong 90 phút ở 30 °C (Hình 3 - bước 1). Khi phản ứng phosphoryl hóa hoàn tất, các giếng được rửa với ethanol 95%, loại bỏ ethanol (sử dụng micropipet để hút bỏ ethanol), thêm vào kháng thể đặc hiệu cho chất nền đã được phosphoryl hóa và ủ phiên ở nhiệt độ phòng trong 60 phút (Hình 3 - bước 2). Sau quá trình ủ, các giếng được rửa với ethanol 95% 3 lần, loại bỏ ethanol (sử dụng micropipet để hút bỏ ethanol). Cho kháng thể thứ cấp HRP (horseradish peroxidase) vào và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (Hình 3 - bước 3). Khi kết thúc phản ứng, các giếng được rửa với ethanol 95% để loại bỏ tất cả các kháng thể thứ cấp (sử dụng micropipet để hút bỏ ethanol). Chất nền TMB (3,3',5,5'

tetramethylbenzidin) được thêm vào và màu xanh lam quan sát được tỷ lệ thuận với hoạt động phosphoryl hoá của protein kinase có mặt (Hình 3 - bước 4). Sự hiện diện của chất ức chế hoạt động của kinase dẫn đến việc giếng không bị nhiễm màu. Thêm dung dịch acid (HCl 10%) để

dừng phản ứng của TMB với HRP và thực hiện phép đo độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm (Hình 3 - bước 5 và bước 6). Kết quả được biểu thị bằng tỷ số giữa độ hấp thụ thu được đối với các mẫu khi có mặt hợp chất thử nghiệm với độ hấp thụ thu được đối với dung dịch *CaPkc1* của *C. albicans*.

Bảng 1. Bảng dữ liệu của hợp chất 1

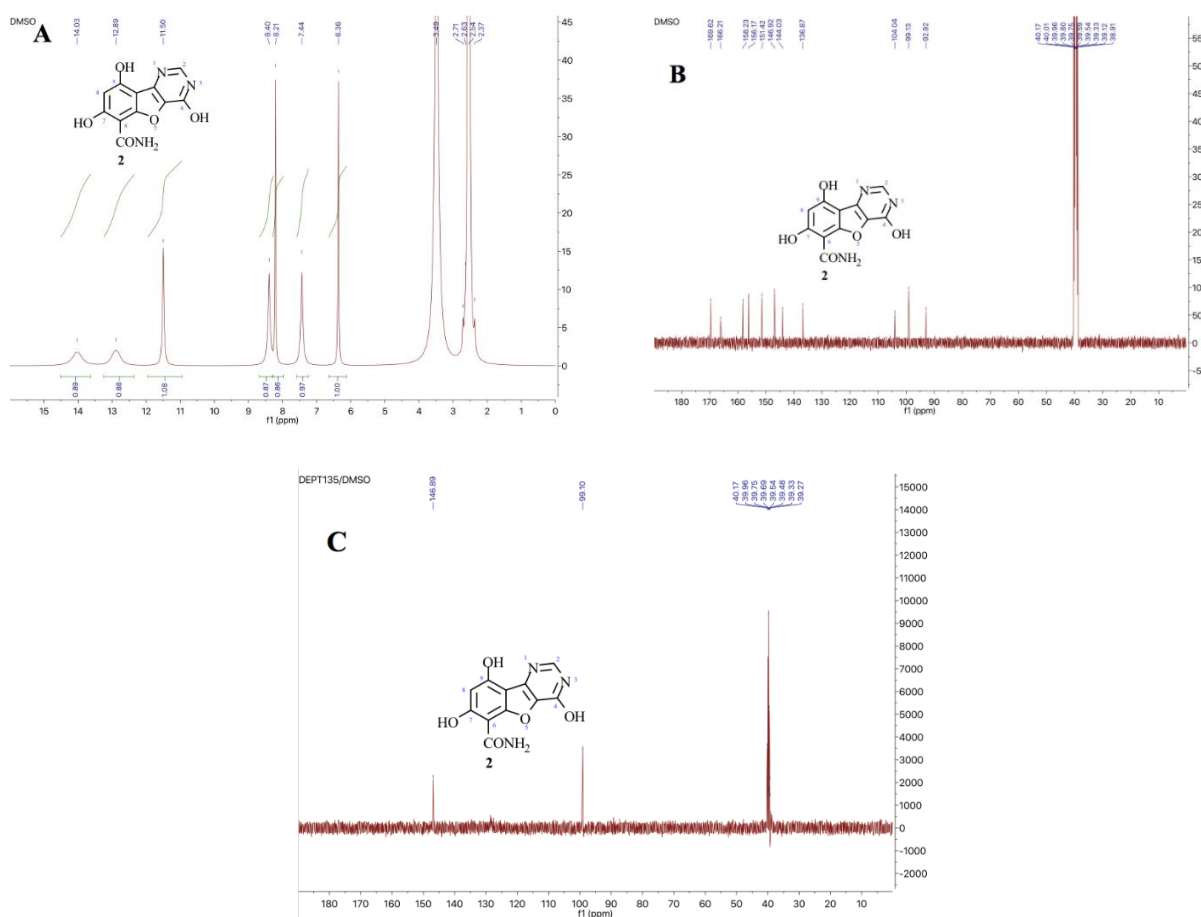
Công thức phân tử	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	SKLM (R _f) (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1)	MS (g.mol ⁻¹)	MS (ESI), m/z (%)	¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	¹³ C-NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)
C ₁₁ H ₅ N ₃ O ₄	335-336	0,46	243,16	244,1	14,03 (s, 1H, OH)	170,1 (C=O)
					12,91 (s, 1H, OH)	166,7 (C ₄)
					11,78 (s, 1H, OH)	164,7 (C ₇)
					8,20 (s, 1H, H ₂)	159,3 (C ₉)
					6,57 (s, 1H, H ₈)	151,9 (C)
					-	147,4 (CH ₂)
					-	144,5 (C)
					-	137,9 (C)
					-	113,9 (CN)
					-	105,0 (C)
-	98,8 (CH ₈)					



Hình 4. Phổ ¹H-NMR (A), ¹³C-NMR (B, C) của hợp chất 1.

Bảng 2. Bảng dữ liệu của hợp chất 2

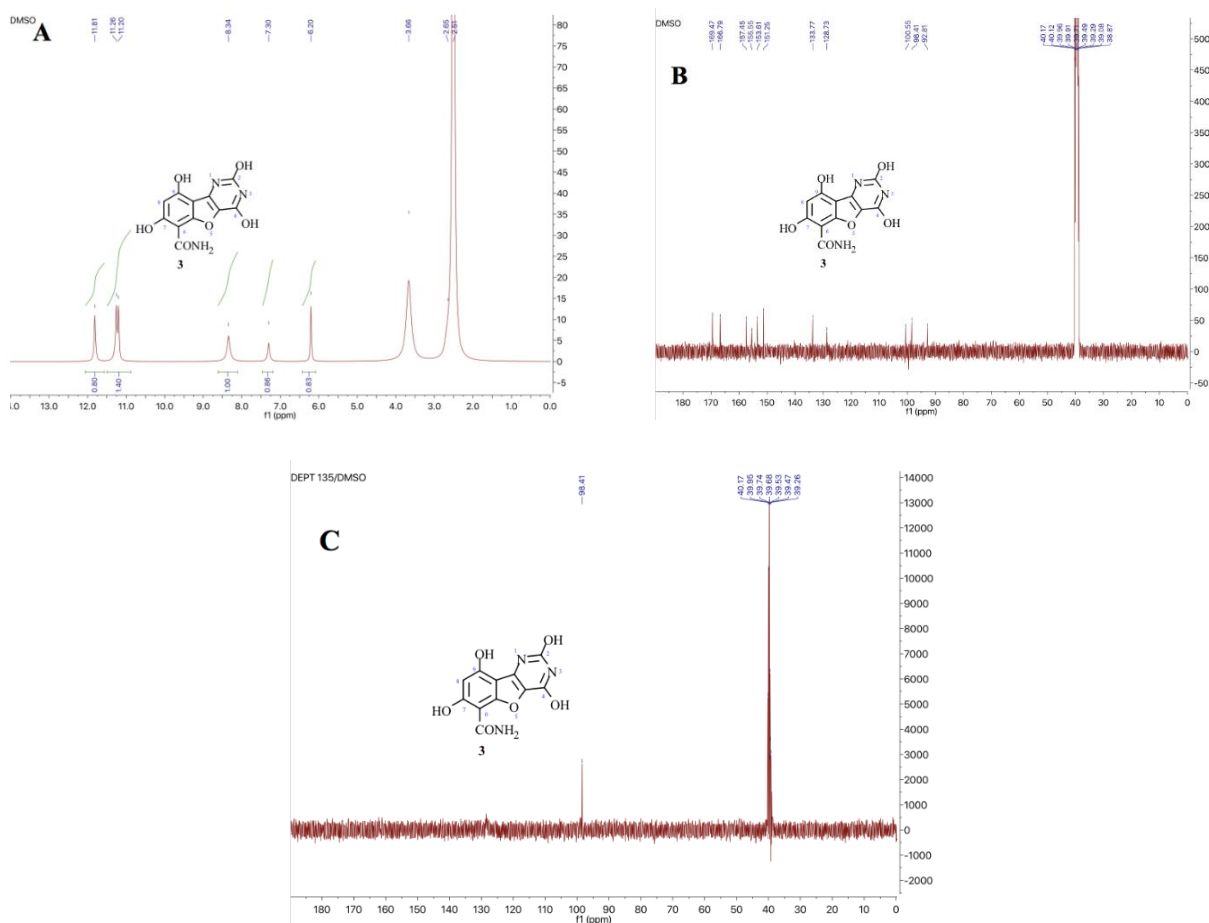
Công thức phân tử	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	SKLM (R _f) (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1)	MS (g.mol ⁻¹)	MS (ESI), m/z (%)	¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	¹³ C-NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)
C ₁₁ H ₇ N ₃ O ₄	396-397	0,42	261,19	262,0	14,03 (s, 1H, OH)	169,6 (C=O)
					12,89 (s, 1H, OH)	166,2 (C ₄)
					11,50 (s, 1H, OH)	158,2 (C ₇)
					8,40 (s, 1H, CONH ₂)	156,1 (C ₉)
					8,21 (s, 1H, H ₂)	151,4 (C)
					7,44 (s, 1H, CONH ₂)	146,9 (CH ₂)
					6,36 (s, 1H, H ₈)	144,0 (C)
					-	136,8 (C)
					-	104,0 (C)
-	99,1 (C ₈ H)					
-	92,9 (C)					



Hình 5. Phổ ¹H-NMR (A), ¹³C-NMR (B, C) của hợp chất 2.

Bảng 3. Bảng dữ liệu của hợp chất 3

Công thức phân tử	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	SKLM (R _f) (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1)	MS (g.mol ⁻¹)	MS (ESI), m/z (%)	¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	¹³ C-NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)
C ₁₁ H ₇ N ₃ O ₆	174-175	0,13	277,1	278,1	11,81 (s, 1H, OH)	169,4 (C=O)
					11,26 (s, 1H, OH)	166,7 (C ₉)
					11,20 (s, 1H, OH)	157,4 (C ₄)
					8,34 (s, 1H, OH)	155,5 (C ₇)
					7,30 (s, 2H, CONH ₂)	153,6 (C)
					6,20 (s, 1H, H ₈)	151,2 (C ₂)
					-	133,7 (C)
					-	128,7 (C)
					-	100,5 (C ₆)
-	98,9 (C ₈)					
-	92,8 (C)					

Hình 6. Phổ ¹H-NMR (A), ¹³C-NMR (B, C) của hợp chất 3.

3. Thực nghiệm và kết quả

3.1. Tổng hợp ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin

Quy trình tổng hợp ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin chúng tôi không trình bày trong nghiên cứu này. Độ tinh khiết của ba hợp chất được khẳng định bằng các phương pháp nhiệt độ nóng chảy, SKLM và cấu trúc của

ba hợp chất được khẳng định bằng phương pháp ¹H-NMR, ¹³C-NMR và MS đều cho thấy phù hợp với công thức dự đoán (Bảng 1, 2, 3 và Hình 4, 5, 6).

3.2. Đánh giá hoạt tính ức chế CaPkc1

Kết quả thử tác dụng ức chế CaPkc1 của ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin tổng hợp được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Khả năng ức chế hoạt động CaPkc1 của ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin

Chất	Nồng độ thử (μM)	% ức chế *	% chưa bị ức chế
1	50	42,05 ± 0,08	57,95 ± 0,08
	100	56,08 ± 0,05	43,92 ± 0,05
	150	57,46 ± 0,14	42,54 ± 0,14
2	50	65,08 ± 0,15	34,92 ± 0,15
	100	87,29 ± 0,13	12,71 ± 0,13
	150	89,31 ± 0,08	10,69 ± 0,08
3	50	61,69 ± 0,11	38,31 ± 0,11
	100	72,15 ± 0,09	27,85 ± 0,09
	150	74,23 ± 0,14	25,77 ± 0,14

Ghi chú: * là trung bình của ba lần thí nghiệm độc lập và nằm trong phạm vi ± 15% SD.

4. Bàn luận

Các chất tổng hợp được tinh chế bằng sắc ký cột hoặc kết tinh lại; kết quả chấm sắc ký lớp mỏng của các chất khảo sát trên ba hệ dung môi khác nhau (100% EA, 100% CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH = 9/1) đều cho một vết gọn, rõ; nhiệt độ nóng chảy của các chất đều có khoảng dao động từ 1 đến 2 độ, điều này chứng tỏ các chất tổng hợp được đều tinh khiết. Trên phổ ¹H-NMR của các chất thấy xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của vòng benzen, vòng pyrimidin, vòng furan và nhóm amin, nhóm hydroxy. Phổ MS của các chất đều cho pic giả phân tử m/z [M+H]⁺. Như vậy qua dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và phổ MS cho phép xác định cấu trúc của ba chất tổng hợp là đúng. Kết quả trình bày ở Bảng 4 cho thấy ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin có tác dụng ức chế hoạt động của CaPkc1 tuyến tính theo nồng độ chất thử. Khi nồng độ chất thử tăng lên, phần trăm ức chế tăng lên tương ứng. Cả ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin đều cho thấy khi

tăng nồng độ chất thử từ 50 μM lên 100 μM, tác dụng ức chế tăng lên đáng kể 14,03% với chất **1**, 22,21% với chất **2**, và 10,46% với chất **3**; trong khi đó khi tăng nồng độ chất thử từ 100 μM lên 150 μM thì khả năng ức chế hoạt động của CaPkc1 chỉ tăng lên 1,38%, 2,02% và 2,08% đối với chất **1**, **2**, **3** tương ứng. Như vậy, trong ba nồng độ thử nghiệm, 100 μM là nồng độ ức chế tối ưu với cả ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin (phần trăm ức chế lần lượt là 56,08%, 87,29 và 72,15%). Kết quả ở bảng 4 cũng cho thấy hợp chất **2** có hoạt tính ức chế CaPkc1 tốt hơn so với 2 hợp chất còn lại ở cả ba nồng độ thử nghiệm là 50 μM, 100 μM và 150 μM. Điều này cho thấy hợp chất **2** có tiềm năng trở thành chất mới tác dụng chọn lọc trên tế bào nấm. Bên cạnh đó, hợp chất **2** và **3** có hoạt tính ức chế CaPkc1 tốt hơn so với hợp chất **1**, điều này có thể do ở vị trí số 6 trong cấu trúc có thêm nhóm carboxamid tạo liên kết hydro, giúp tăng khả năng liên kết của 2 hợp chất **2** và **3** vào trung tâm liên kết với CaPkc1 so với nhóm carbonitril

ở vị trí số 6 của hợp chất **1** (không tạo liên kết hydro) dẫn đến tăng khả năng ức chế *CaPkc1* của 2 hợp chất số **2** và **3**. Kết quả này tạo tiền đề cho nhóm nghiên cứu tiếp tục tập trung tìm kiếm phát triển các chất chống nấm mới hướng ức chế *CaPkc1* thuộc dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin để có thể tìm ra các chất có khả năng chống nấm tốt hơn, đồng thời giảm sự kháng thuốc của các loại nấm.

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hoạt tính ức chế *CaPkc1* của ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin ở ba nồng độ khác nhau 50 μ M, 100 μ M và 150 μ M. Nồng độ 100 μ M là tối ưu cho hoạt tính ức chế *CaPkc1* với cả ba dẫn chất benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin. Hợp chất **2** có hoạt tính ức chế *CaPkc1* tốt hơn so với 2 hợp chất còn lại ở cả ba nồng độ thử nghiệm.

Lời cảm ơn

Đề tài được hoàn thành nhờ một phần kinh phí từ Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ và sự góp ý về chuyên môn của Giáo sư Pascal Marchand, và Phó Giáo sư Isabelle Ourliac-Garnier - Đại học Nantes - Pháp.

Tài liệu tham khảo

- [1] C. Firacative, Invasive Fungal Disease in Humans: Are We Aware of the Real Impact? Mem. Inst., Oswaldo Cruz., Vol. 115, 2020, <https://doi.org/10.1590/0074-02760200430>.
- [2] E. Seyoum, A. Bitew, A. Mihret, Distribution of *Candida Albicans* and Non-*Albicans Candida* Species Isolated in Different Clinical Samples and Their in Vitro Antifungal Suscetibility Profile in Ethiopia, BMC Infect. Dis., Vol. 20, No. 1, 2020, pp. 231, <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4883-5>.
- [3] K. T. Mazu, A. B. Bricker, H. F. Rozas, Y. S. Ablordeppey, The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview, Mini Rev. Med. Chem., Vol. 16, No. 7, 2016, pp. 55-578, <https://doi.org/10.2174%2F1389557516666160118112103>.
- [4] R. Surarit, M. G. Shepherd, The Effects of Azole and Polyene Antifungals on the Plasma Membrane Enzymes of *Candida Albicans*, J. Med. Vet. Mycol., Vol. 25, No. 6, 1987, pp. 403-413, <https://doi.org/10.1080/02681218780000491>.
- [5] C. F. Thorn, S. Marsh, M. W. Carrillo, H. L. McLeod, T. E. Klein, R. B. Altman, PharmGKB Summary: Fluoropyrimidine Pathways, Pharmacogenet, Genomics, Vol. 21, No. 4, 2011, pp. 237-242, <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833c6107>.
- [6] M. I. Morris, M. Villmann, Echinocandins in the Management of Invasive Fungal Infections, Part 2, Am. J. Health-Syst, Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm., Vol. 63, No. 19, 2006, pp. 1813-1820, <https://doi.org/10.2146/ajhp050464.p2>.
- [7] K. E. Pristov, M. A. Ghannoum, Resistance of *Candida* to Azoles and Echinocandins Worldwide, Clin. Microbiol. Infect., Vol. 25, No. 7, 2019, pp. 792-798, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>.
- [8] M. Taei, M. Chadehanipour, R. Mohammadi, An Alarming Rise of Non-*Albicans Candida* Species and Uncommon Yeasts in the Clinical Samples; a Combination of Various Molecular Techniques for Identification of Etiologic Agents, BMC Res. Notes, Vol. 12, No. 1, 2019, pp. 779, <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4811-1>.
- [9] S. L. LaFayette, C. Collins, A. K. Zaas, W. A. Schell, M. B. Quiroz, A. A. L. Gunatilaka, J. R. Perfect, L. E. Cowen, PKC Signaling Regulates Drug Resistance of the Fungal Pathogen *Candida Albicans* Via Circuitry Comprised of Mkc1, Calcineurin, and Hsp90, PLOS Pathog, Vol. 6, No. 8, 2010, pp. e1001069, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001069>.
- [10] D. V. Hung, I. Garnier, M. A. Bazin, C. Jacquot, B. Baratte, S. Ruchaud, S. Bach, O. Grovel, P. L. Pape, P. Marchand, Benzofuro[3,2-*d*]Pyrimidines Inspired from Cercosporamide *Ca Pkc1* Inhibitor: Synthesis and Evaluation of Fluconazole Susceptibility Restoration, Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 28, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.05.044>.
- [11] S. Sakamoto, W. Putalun, S. Vimolmangkang, W. Phoolcharoen, Y. Shoyama, H. Tanaka, S. Morimoto, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantitative/Qualitative Analysis of Plant Secondary Metabolites. J. Nat Med., Vol. 72, No. 1, 2018, pp. 32-42, <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>.