

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a anorganické chemie



**4'-alkylsalicylanilidy s nerozvětveným alkylovým řetězcem  
a jim odpovídající deriváty benzoxazindionů**

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Petra Husáková

Za odborné vedení a kritické připomínky děkuji prof. RNDr. Karlu Waisserovi, DrSc. a Mgr. Josefu Matykovi. Za měření NMR spekter děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Csc. Za měření IČ spekter děkuji Ivě Venkovské. Za elementární analýzy děkuji pracovníkům UOChB AV ČR v Praze. Za měření antimikrobní aktivity vděčím MUDr. Jarmile Kaustové ze Zdravotního ústavu v Ostravě.

## OBSAH

### ÚVOD

<b>CÍL PRÁCE</b>	5
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	7
3.1 MECHANISMY ÚČINKU ANTITUBERKULOTIK	8
3.2 INHIBICE DVOUKOMPONENTOVÉHO SYSTÉMU- NOVÝ MECHANISMUS ÚČINKU ANTIBAKTERIÁLNÍCH LÁTEK	11
<b>4 METODICKÁ ČÁST</b>	13
4.1 MOŽNOSTI PŘÍPRAVY 4'-ALKYL-SALICYLANILIDŮ	14
4.2 MOŽNOSTI PŘÍPRAVY 3-(4'-ALKYLFENYL)-2H-1,3-BENZOXAZIN- -2,4(3H)-DIONŮ	15
4.3 VÝBĚR METODY	18
<b>5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	19
5.1 POSTUP PŘÍPRAVY 4'-ALKYL-SALICYLANILIDŮ	20
5.2 POSTUP PŘÍPRAVY 3-(4-ALKYLFENYL)-2H-1,3-BENZOXAZIN- -2,4(3H)-DIONŮ	20
5.3 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI LÁTEK	20
5.4 HODNOCENÍ ANTIMIKROBNÍHO TESTOVÁNÍ	21
5.5 SYNTÉZA DERIVÁTŮ 4'-ALKYL-SALICYLANILIDU	22
5-brom-4'-butylsalicylanilid (T 5535)	22
4-chlor-4'-butylsalicylanilid (T 5537)	22
5-chlor-4'-butylsalicylanilid (T 5538)	23
3,5-dibrom-4'-butylsalicylanilid (T 5546)	23
4-chlor-4'-ethylsalicylanilid (T 5724)	24
5-chlor-4'-ethylsalicylanilid (T 5725)	24
3,5-dibrom-4'-ethylsalicylanilid (T 5727)	25
5.6 SYNTÉZA DERIVÁTŮ 3-(4-ALKYLFENYL)-2H-1,3-BENZOXAZIN- -2,4(3H)-DIONU	26
6-brom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5574)	26
6,8-dibrom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5575)	26
7-chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5576)	27
6-chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5578)	27
7-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5735)	28

6-chlor-3-(4 -ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5736)	28
6,8-dibrom-3-(4 -ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5738)	29
<b>6 VÝSLEDKY</b>	<b>30</b>
6.1 PŘEHLED PŘIPRAVENÝCH LÁTEK	31
6.2 TEPLoty TÁNÍ	32
6.3 INFRAČERVENÁ SPEKTRA	33
6.4 ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA	34
6.5 VODÍKOVÁ SPEKTRA <sup>1</sup> H NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE	35
6.6 UHLÍKOVÁ SPEKTRA <sup>13</sup> C NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE	38
6.7 HODNOCENÍ ANTIMIKROBNÍ ÚČINNOSTI	40
<b>7 DISKUSE</b>	<b>42</b>
<b>8 ZÁVĚR</b>	<b>44</b>
<b>9 PŘÍLOHY</b>	
<b>LITERATURA</b>	

## **1 ÚVOD**



## Tuberkulóza

Tuberkulóza je celosvětově rozšířená choroba, která je příčinou úmrtí přibližně 3 milionů lidí ročně. Světová zdravotnická organizace vyhlásila v roce 1993 tuberkulózu za nemoc ohrožující zdraví lidí po celém světě.<sup>1</sup> Ačkoliv je původce tuberkulózy znám a k dispozici je jak ochranné očkování, tak účinná léčba, zachovala si tuberkulóza do současnosti všechny znaky nebezpečné a občas i obtížně léčitelné nemoci.

Původce nemoci objevil v roce 1882 německý lékař Robert Koch.<sup>2</sup> Zjistil, že nemoc způsobují bakterie rodu *Mycobacterium*. U savců způsobují tuberkulózu čtyři příbuzné druhy mykobakterií: *Mycobacterium tuberculosis* (původce tuberkulózy u člověka), *Mycobacterium bovis* (postihující hovězí dobytek), *Mycobacterium microti* (původce tuberkulózy hrabošů) a *Mycobacterium africanum*. Koch zjistil, že mykobakteria jsou nepohyblivé rovné nebo slabě zahnuté nesporeující tyčky, které pro svou silnou komplexní buněčnou stěnu bohatou na voskové lipidy, složené z netypicky větvených kyselin, mají hydrofóbní vlastnosti. Jejich důležitým znakem je acidorezistence způsobená právě lipidovým charakterem buněčné stěny. Ta způsobuje, že se mykobakteria nebarví běžným Gramovým barvivem.

Jméno rodu, *Mycobacterium* (houbová bakterie), bylo určeno podle toho, že rostou na povrchu tekuté půdy v povlaku podobnému plísni. Pro laboratorní diagnostiku se proto využívají obohacené tekuté půdy, zejména Löwenstein-Jensenova půda. Na běžných kultivačních půdách rostou mykobakteria velmi pomalu - 3 a více týdnů. Z tohoto důvodu jsou obtížným klinickým materiálem. Tyto obligatorní patogeny dokážou přežít v mléce nebo jiných látkách organického původu. Laboratorní diagnostika je založena na průkazu mykobakterií mikroskopickým a kultivačním vyšetřením. Vyšetřovaným materiálem je sputum, případně bronchoalveolární laváž, bronchoskopický výtěr, laryngeální výtěr nebo odběr tkáně. Mikroskopie se provádí po Zahl-Neelsenově barvení, kultivace pak probíhá na již zmíněné Löwenstein-Jensenově půdě.

Vlastní onemocnění je projevem imunitní odpovědi na proniklá mykobakteria. Obranná reakce destruuje tkáň a patologické projevy jsou dané pozdějším průběhem onemocnění, jeho primární nebo postprimární formou. Při primární tuberkulóze se ložisko nachází v alveolárních makrofázích, makrofágy roznáší krví a lymfou mykobakteria do uzlin, orgánů a tkání. Klony T-lymfocytů vytvoří granulom kolem ložiska infekce a ten je pak nahrazen jizvou, později kalcifikující. Imunitními mechanismy však nejsou zničena všechna mykobakteria, některá perzistují, jsou vylučována do sputa a mohou po reaktivaci vyvolat

postprimární formu. Projevy mohou být různé, od meningitidy nebo pleuritidy po postižení ledvin, páteře nebo jiných kostí a kloubů.

Postprimární tuberkulóza se může objevit po měsících, letech nebo i desetiletích. Reaktivace probíhá většinou spontánně, častěji se však objevuje při jiném onemocnění nebo jiných okolnostech vedoucích k poklesu imunity. K nejčastější reaktivaci dochází u osob starých, u pacientů po transplantaci a u osob HIV pozitivních. Při této fázi jsou přítomny klasické příznaky tuberkulózy, tj. horečka a kachektizace. Vznikající léze, které postihují především bronchy a plíce, nakonec zničí většinu tkáně. V plicích tak vzniká prostředí vhodné pro množení mykobakterií a pacient s takto zničenou plicní tkání velice špatně dýchá.

Běžným terapeutickým zákrokem u nemocných tuberkulózou býval léčebný pneumotorax nebo chirurgické odstranění přilehlé žaberní části hrudní stěny - torakoplastika, které se dnes již neprovádí.

Tuberkulóza byla nemocí všech společenských vrstev, přesto právě ti nejchudší bývali postižení nejvíce. Výskyt nemoci ovlivňovalo několik faktorů. Vysoká cena léčby, nedostatek potravy a sociální prostředí. V přelidněných a vlhkých chudinských koloniích se mezi imunitně slabým obyvatelstvem tato nemoc rychle a snadno šířila. V období válek a s tím i spojeného strádání a hladomoru se výskyt tuberkulózy zvyšoval. Často bývaly také epidemie tuberkulózy spojeny s výskytem jiných smrtelných nemocí, jakými byla cholera, mor nebo pravé neštovice. Všechny tyto nemoci byly neléčitelné a umíraly na ně tisíce lidí.

Tuberkulóza se stala smrtelnou také pro několik českých osobností, například básník Jiří Wolker nebo K. H. Borovský. Ještě známější jména spojená s touto nemocí jsou pak Fryderik Chopin či rakouská císařovna Alžběta, zvaná Sisi.

Největší nárůst tuberkulózy proběhl v 18. a 19. století, v době migrace obyvatelstva z venkova za prací do měst a dovozu levných pracovních sil ze zahraničí, což hodně výskytu tohoto onemocnění napomohlo.

Tato nemoc byla dlouhou řadu let velkou neznámou. Po objevení původce doktorem Kochem a po dalším závratném objevu, kterým bylo očkování, se předpokládalo, že toto onemocnění ze světa zmizí. Očkování proti tuberkulóze bylo zavedeno pro děti jako povinné, v ČR se očkuje více než 50 let. V současnosti je používána bezpečná vakcína dánského původu z oslabeného kmene *Mycobacterium bovis* (BCG vakcína) s minimálními postvakcinačními účinky. Toto očkování chrání před onemocněním 80 % dětí a u dospělých zabraňuje vzniku nejtěžších forem tuberkulózy. Pokud byl člověk v minulosti proti tuberkulóze očkovan, může přesto později tuberkulózou onemocnět. Onemocnění pak ale probíhá mírnější formou a při správné léčbě neohrožuje pacienta na životě. Díky pravidelné



vakcinaci tuberkulóza z vyspělých zemí téměř vymizela, v současné době se však do nich vrací. V chudých rozvojových zemích je i dnes toto onemocnění stále velkým problémem s poměrně velkým počtem nemocných.

K infekci dochází většinou cestou respirační, ale nákaza může proběhnout i alimentárně. Zdrojem nákazy bývá nemocný člověk i zvíře a takového jedince je nutné izolovat a léčit. Ne každý po kontaktu s nemocným sám onemocní, ale může se stát nosičem bez známek onemocnění. Stačí ovšem oslabení obranyschopnosti organismu a nemoc může propuknout.

V posledních letech jsou hranice států otevřené a do naší země přichází mnoho přistěhovalců, většinou z bývalého Sovětského svazu nebo zemí třetího světa. Bohužel vlivem této migrace se tuberkulóza začíná opět rozšiřovat. Velkým problémem zůstává špatná léčitelnost pro stále větší rezistenci mykobakteriálních kmenů na dosavadní antibiotickou léčbu. Navíc je velmi těžké pacienty z řad uprchlíků sledovat a následně izolovat a dostatečně účinně léčit. Většinou je nutné, aby pacient podstoupil náročnou a dlouhou léčbu v plicním sanatoriu. Nejúčinnějším léčebným režimem je šestiměsíční přímo kontrolovaná léčba. Během ní se po dobu 2 měsíců podávají kombinace antituberkulotik : izoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol, v následující fázi pak kombinace izoniazid a rifampicin. Ani tato léčba na některé kmeny vůbec nezabírá. Zejména v posledních letech, kdy se začaly objevovat případy infekcí způsobených potenciálně patogenními kmeny, jako je *Mycobacterium kansasii* nebo *Mycobacterium avium* , *Mycobacterium intracellulare*. Tyto bakterie způsobují tuberkulózní onemocnění zejména u nemocných AIDS.

V roce 2002 byl celkový počet případů tuberkulózy plic pod 12 onemocnění na 100 000 obyvatel a počet definitivních tuberkulózy plic pod 7 onemocnění na 100 000 obyvatel<sup>3</sup>.

V roce 2003 bylo v České republice zjištěno 1162 nových případů tuberkulózy, z nichž bylo 942 případů plicní tuberkulózy.<sup>4</sup> U dvou nemocných byly zjištěny multirezistentní kmeny. Výskyt rezistentních kmenů byl významně častější u cizinců – 25 % nemocných s plicní tuberkulózou vylučovalo mykobakteria rezistentní alespoň na jedno antituberkulotikum. Nejvýraznější byla rezistence na izoniazid. Rezistence *M. tuberculosis* na antituberkulotika byla častější u dříve léčených plicních tuberkulóz.<sup>5</sup>

Multirezistentní tuberkulóza (MDR TB) je definována jako onemocnění vyvolané kmenem *Mycobacterium tuberculosis* rezistentním minimálně na kombinaci antituberkulotik izoniazid a rifampicin. Jedná se o případy specifického onemocnění, kde selhává kauzální antituberkulózní terapie, což s sebou přináší riziko šíření původce nákazy v populaci.

Nejčastějším typem multirezistence v letech 1999-2001 byla současná rezistence na 4 ze základních antituberkulotik (izoniazid, rifampicin, etambutol a streptomycin), která byla potvrzena u 48,2 % MDR kmenů. Jako nejnadějnější účinné farmakopreparáty byly označeny isepamicin (Isepacin), clofazimin (Lampren), capreomycin (Capastat) a amikacin (Amikin, Amikozit, Miacin).<sup>6</sup>

V roce 2005 bylo hlášeno do Registru tuberkulózy celkem 1007 nových tuberkulóz všech forem a lokalizací. Z nich bylo 838 tuberkulóz plic, definitivních případů tuberkulózy plic 586 a mikroskopicky pozitivních 326 případů. Celkový počet případů tuberkulózy všech forem a lokalizací poprvé v České republice poklesl pod 10/100 000 obyvatel. Česká republika patří zatím do skupiny evropských zemí s příznivou situací a její účinnou kontrolou.<sup>7</sup>

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem práce bylo připravit řadu halogenovaných alkylsalicylanilidů s lineárním řetězcem alkylu vázaným v poloze 4' a řadu od nich odvozených 3-(4 -alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů, s předpokládaným mechanismem účinku odlišným od používaných léčiv. Jedná se o inhibitory dvoukomponentového regulačního systému bakterií. Tyto nové látky by mohly být použity jako potenciální antituberkulotická léčiva. Snahou bylo do molekuly zavést takové substituenty, které by účinnost vzniklé látky přiblížily účinnosti nepoužívanější látky – izoniazidu. Syntetizovaným látkám byly zjištěny fyzikálně-chemické vlastnosti, potvrzena struktura a byly zaslány k hodnocení antimykobakteriální aktivity. Studie je jednou z mozaiek, které vedou k zakončení výzkumu salicylanilidů a jim odpovídajících 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů.

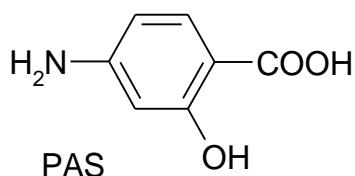
### **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1 Mechanismy účinku antituberkulotik

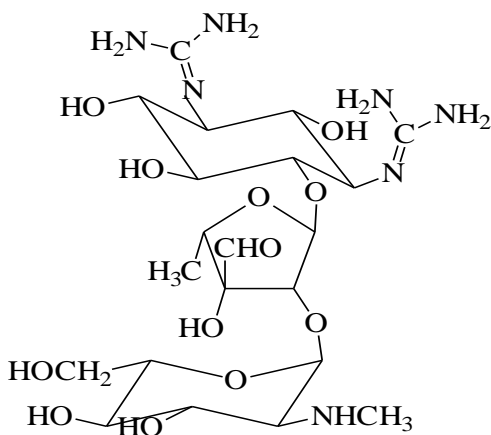
Léčiva, která se dnes používají k léčbě tuberkulózy představují různorodou skupinu léčiv s rozdílnými mechanismy účinku. Právě pro nesteroidové mechanismy působení, velkou toxicitu a často se vyvíjející rezistenci, je ve světě snaha o vývoj nových účinných látek s odlišným mechanismem zasahujícím bakteriální buňku. Zdá se, že novým možným mechanismem by mohla být inhibice transdukčního regulačního bakteriálního systému.

Při vývoji dosavadních léčiv se vycházelo z obměny struktury látek, které již byly používány při léčbě bakteriálních infekcí. Takto byly například objeveny sloučeniny jako je PAS, streptomycin, izoniazid, pyrazinamid, cykloserin, ethionamid, prothionamid, etambutol či rifampicin. Většina z těchto látek byla připravena až po druhé světové válce. Pro svůj efekt na inhibici mykobakterií byly tyto látky WHO vyřazeny jen pro použití k léčbě tuberkulózy.

Jako první přípravky proti tuberkulóze vznikla dvě nová léčiva, PAS a streptomycin. PAS je strukturální analog kyseliny para-aminobenzoové, v současnosti se již k léčbě tuberkulózy nepoužívá.<sup>8</sup>

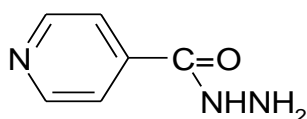


Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum, jehož mechanismus působení spočívá v inhibici syntézy proteinů vazbou na podjednotku 30S. Z klinického hlediska jde o antituberkulotikum 1.řady pro léčbu tuberkulózy. Vedlejším účinkem mohou být dermatitidy a postižení sluchového nervu.

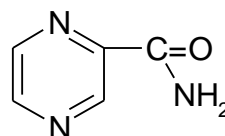


Po roce 1952 byl již farmaceutický výzkum směřován k hledání nových antituberkulotik. V této době bylo objeveno a zavedeno do praxe mnoho účinných látek používaných dodnes.

Izoniazid, hydrazid kyseliny isonikotinové působí selektivně baktericidně na extra- a intracelulární aktivně rostoucí *Mycobacterium tuberculosis*, u neaktivních forem bakteriostaticky. Výsledným efektem je inhibice syntézy mykolových kyselin. Je výrazně hepatotoxický a neurotoxický. Klinicky se používá k léčbě všech jak plicních, tak mimoplicních forem tuberkulózy.



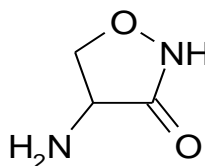
izoniazid



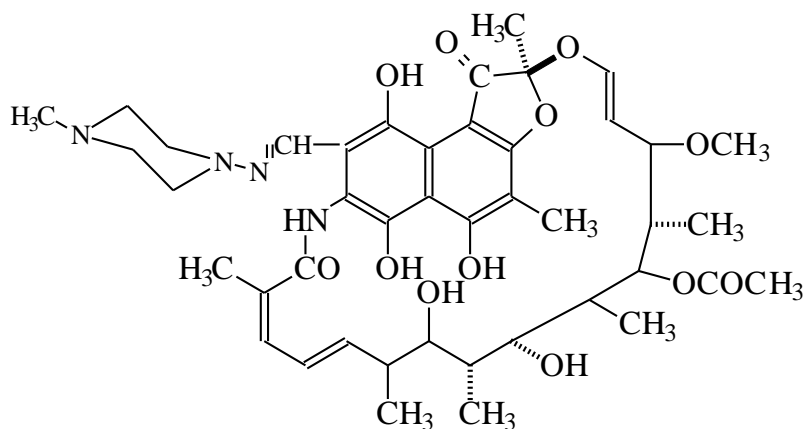
pyrazinamid

Pyrazinamid má od izoniazidu výrazně vyšší toxicitu. Při používání je popisován i výskyt dny, porfyrií, horečky, kožních reakcí a jiných nežádoucích účinků. Používá se jen u akutní tuberkulózy, selhala-li již předchozí léčba. Mechanismus účinku je podobný izoniazidu. S izoniazidem však nemá zkříženou rezistenci.

Cykloserin je širokospektré antibiotikum, jehož mechanismus spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny, působí jako analog D-alaninu. Je výrazně neurotoxický. Používá se jen u kmenů s prokázanou citlivostí k cykloserinu, selhala-li primární léčba.

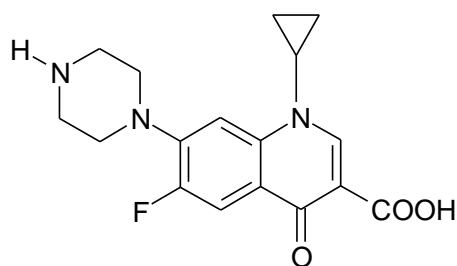


Rifampicin, polosyntetické úzkospektré antibiotikum inhibuje syntézu bakteriální RNA blokadou RNA-polymerázy. Rychle se vyvíjí rezistence.

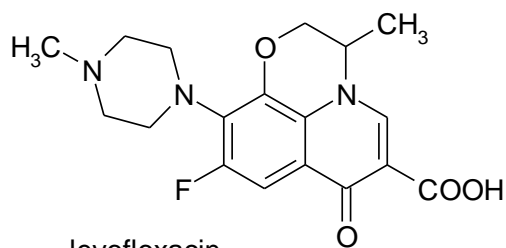


Ethambutol inhibuje syntézu metabolitů mykobakterií, poškozují mykobakteriální metabolismus. Má výrazné nežádoucí účinky. Používá se zejména v kombinaci s izoniazidem a streptomycinem.

Z řady chinolonových preparátů se používají ciprofloxacin a levofloxacin. Mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriální DNA-gyrázy. Tyto látky ale nejsou považovány za antituberkulotika, používají se především k léčbě systémových onemocnění.



ciprofloxacin



levofloxacin

V posledních letech, kdy přibývá výskyt onemocnění způsobených multirezistentními kmeny mykobakterií, běžná léčba již nestačí. Vzrůstá tedy zájem o taková léčiva, která mají jiný mechanismus působení, než léčiva dosavadní.



## 3.2 Inhibice dvoukomponentového systému – nový mechanismus účinku antibakteriálních látek

V nemocničních zařízeních se během posledních let výrazně zvýšil nárůst rezistentních kmenů enterokoků a některých kmenů *Stafylococcus aureus*<sup>10</sup>, (hlavně methicilin-rezistentních zlatých stafylokoků (MRSA) a vankomycin-rezistentních enterokoků (VREF)). Tento stav vyvolalo nadměrné užívání obou léčiv. Pacienti byli často zbytečně dávkováni silnými a širokospektrými antibiotiky, zejména vankomycinem, který tvořil základ efektivní širokospektré terapie. Zvyšující se výskyt multirezistentních kmenů G+ bakterií dal podnět ke studii bakteriálního regulačního systému. Snahou bylo zjistit, jakým způsobem si bakterie vytvářejí rezistenci proti léčivům a jak tomu následně zabránit.

V bakteriálních buňkách byl identifikován dvoukomponentový regulační systém (TCS)<sup>9,10</sup>, který bakterie používají k vnímání změn v okolí. Obsahuje informaci pro podporu homeostázy bakteriální buňky, podílí se na odpovědi na stimuly z vnějšího i vnitřního prostředí a expresi virulenčních determinant. Právě tento systém je zodpovědný například za multirezistenci enterokoků vůči vankomycinu. V jednoduchých podmínkách se TCS skládá z citlivých proteinů, histidin-proteinkinázy a DNA vázajícího proteinu, který tvoří regulátor odpovědi. Aktivace nebo represe genové transkripce je dosaženo prostřednictvím přenosu fosfátu z ATP na zbytek asparagové kyseliny na regulátoru odpovědi přes vysokoergní fosfohistidinový intermediát příbuzné kinázy. Proteiny v systému se liší sekvencí aminokyselin, zejména v oblasti kódující autofosforylační a fosfotransferovou funkci.

Přes 100 takovýchto transdukčních systémů bylo identifikováno u tak důležitých nosokomiálních patogenů jako je například *S. aureus*, *E. faecium*, *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Jednoduché inhibitory TCS mohou interagovat s více TCS systémy bakterií, tím se snižuje potenciální chromosomální rezistence. Takovéto inhibitory, kontrolující expresi specifických virulenčních faktorů, by mohly být použity jako doplňková terapie v kombinaci s tradičními antibakteriálními léčivy.

Dvoukomponentový transdukční regulační systém (TCS) je přirozený pro bakteriální buňky v růstu a hraje klíčovou roli v regulaci replikace DNA a buněčného cyklu. Podobné proteiny byly identifikovány také u kvasinek a hub, u vyšších eukaryotů však ne. Proto se stal tento systém terčem chemoterapeutických zásahů. Při studii byl použit jako model TSC systém KinA/Spo0F z *Bacillus subtilis* a jako inhibitory byly zkoušeny chlorované

salicylanilidy. Testované sloučeniny byly inkubovány s histidin-proteinkinásou (KinA) a regulátorem odpovědi (Spo0F) za přítomnosti ATP v TRIS pufru. Fosforylované produkty byly separovány elektroforézou, kvantifikovány a intenzita KinA pásů byla převedena na procenta inhibice jako inhibiční koncentrace.

Cílem inhibitorů dvoukomponentového regulačního systému je zásah do energetického metabolismu bakteriální buňky - ovlivnění oxidativní fosforylace. V roce 1998 bylo zjištěno, že inhibitory tohoto dvoukomponentového systému jsou salicylanilidy, které jsou známé tím, že ovlivňují oxidativní fosforylaci vybitím „proton-hnací síly“ potřebné k syntéze ATP. Salicylanilidové inhibitory byly při studii účinné proti gram-pozitivním bakteriím, dobře působily i proti MRSA i VREF. Jelikož se TCS nachází ve všech bakteriálních buňkách, je možné předpokládat, že by mohly salicylanilidy účinkovat i proti mykobakteriím, i když permeabilita vnější membrány gram-negativních bakterií představovala u některých sloučenin problém. Při testování látek proti modelovému systému KinA/Spo0F bylo zjištěno, že účinnost salicylanilidů je závislá na elektronakceptorových vlastnostech substituentu na salicyloylovém kruhu a na hydrofobicitě anilínové části. Hydrofobní substituenty účinnost inhibitorů zvyšují, ale hydrofobicita není určujícím faktorem inhibiční aktivity.<sup>9,10</sup>

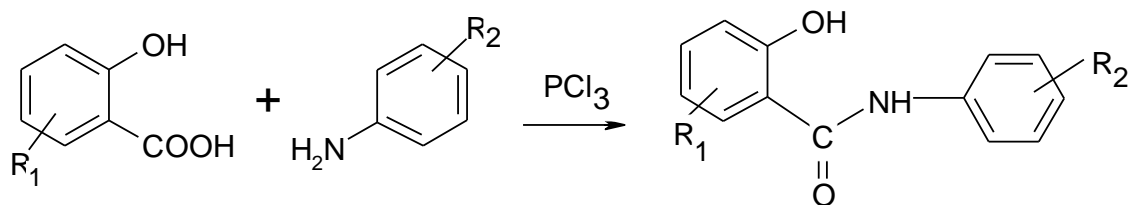
Na základě podobnosti se tedy QSAR studie soustředila na již definované molekuly, které by mohly mít inhibiční efekt na TCS bakterií. Podobné účinky jako salicylanilidy mají také 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony.<sup>11</sup> Aktivitou se podobají odpovídajícím salicylanilidům a také vztahy mezi strukturou a aktivitou jsou u obou skupin podobné.<sup>12</sup>

Na základě uvedených závěrů o mechanismech inhibice dvoukomponentového regulačního systému bakterií byl vytyčen cíl práce, který je mozaikou v celkových výzkumných studiích katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK.

## **4 METODICKÁ ČÁST**

## 4.1 Možnosti přípravy 4'-alkylsalicylanilidů

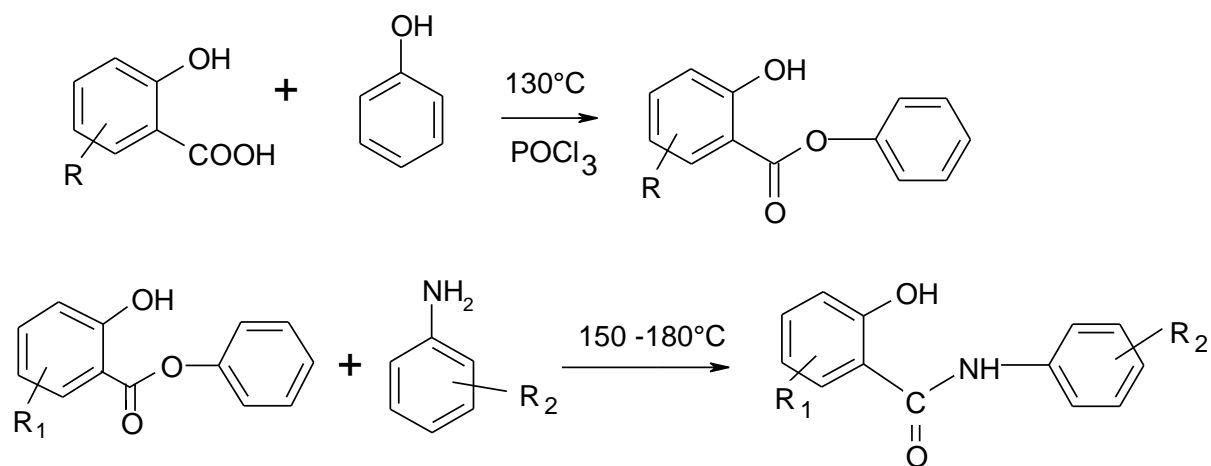
Salicylanilidy získáme reakcí substituované kyseliny salicylové s příslušným substituovaným anilinem v prostředí chlorbenzenu za přítomnosti chloridu fosforitého:<sup>13</sup>



(schéma 1)

Stejná reakce může probíhat v prostředí pyridinu.

Jinou možností přípravy je tavení fenylesteru kyseliny salicylové příslušným anilinem při 150-180 °C. Tato reakce nevyžaduje přítomnost rozpouštědla ani chloridu fosforitého. Je podmíněna pouze esterifikací kyseliny. Při reakci se uvolňuje fenol, který je nutné vymývat vodou.<sup>15</sup>



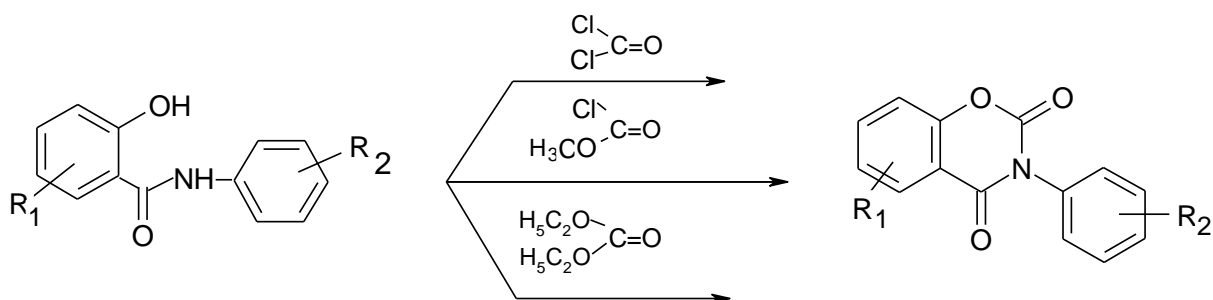
(schéma 2)

V naší laboratoři se používá první způsob přípravy. Je totiž osvědčený a s dobrou výtěžností.

## 4.2 Možnosti přípravy 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin- -2,4(3H)-dionů

Při přípravě je možné vycházet ze syntetizovaných salicylanilidů nebo přímo z kyseliny salicylové.

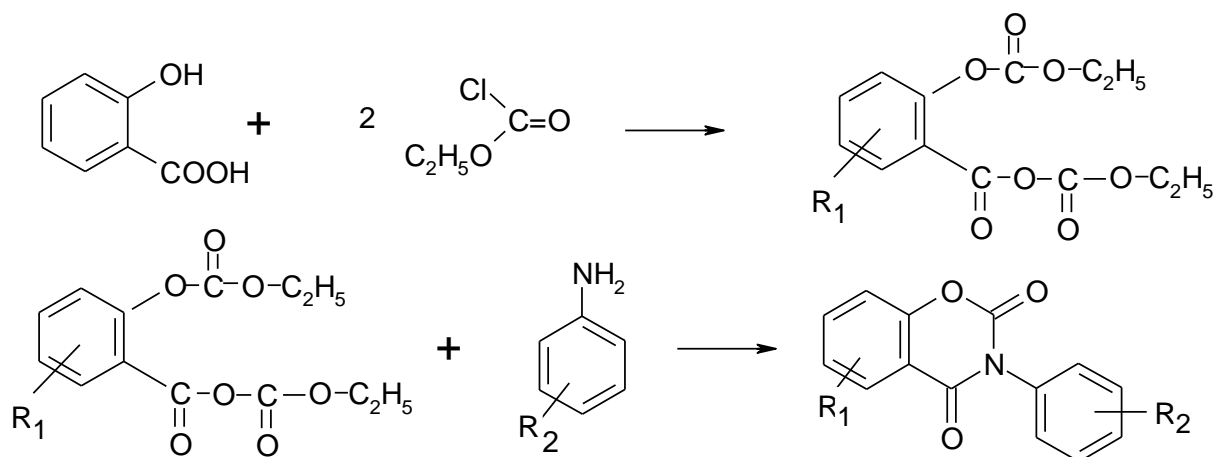
Příprava z příslušných salicylanilidů reakcí s mírným nadbytkem fosgenu, methylchloroformiatu nebo diethylkarbonatu probíhá podle následující rovnice :<sup>14</sup>



Reakce probíhají v přítomnosti látek schopných vázat kyselý vodík, tj. v přítomnosti triethylaminu, tributylaminu, pyridinu, N-methyl-piperidinu při bodu varu rozpouštědla (benzen, toluen, pyridin, tetrahydrofuran).

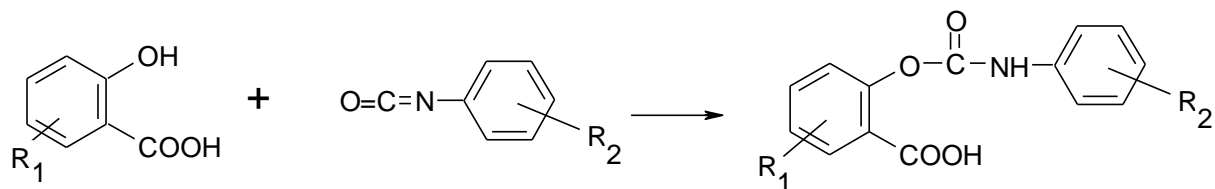
Další postupy vycházejí z kyseliny salicylové : <sup>16</sup>

Reakcí kyseliny s molárním množstvím substituovaného anilinu a dvojnásobným množstvím ethylchloroformiátu. Triethylamin, který se přidává do reakční směsi, váže uvolňující se chlorovodík. Reakce se provádí v inertních rozpouštědlech (toluen, tetrahydrofuran).



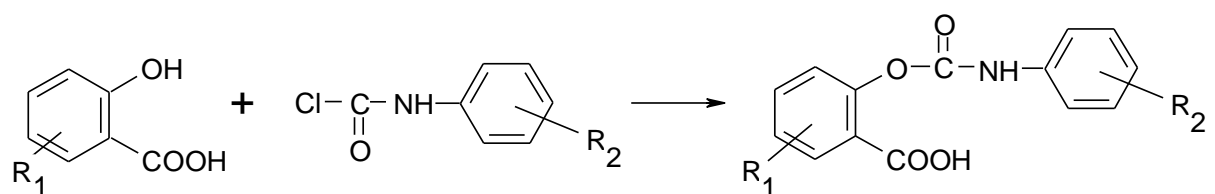
(schéma 4)

Jinou možností může být reakce ekvimolárního množství kyseliny salicylové s fenyloisokyanatem v organickém rozpouštědle (toluen, benzen, chloroform, dioxin) při 50-100 °C. Při reakci vzniká o-O-fenyl-karbamoyl-karboxylová kyselina :



(schéma 5)

Vychází-li se z N-fenyl-karbamoyl chloridu, je nutné do reakční směsi přidat látky schopné neutralizovat vznikající chlorovodík (triethylamin, pyridin, uhličitán sodný).



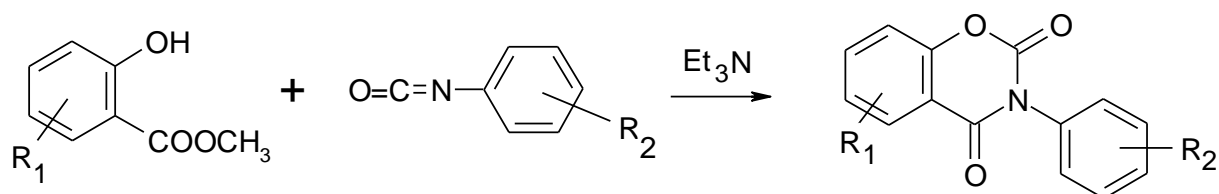
(schéma 6)

Uzavření kruhu vznikající o-O-fenyl-karbamoyl-benzoové kyseliny probíhá při teplotě 100 – 200 °C v prostředí tetralinu nebo dekalinu za vzniku 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionu. Jinou možností je použití jako rozpouštědel takových látek, které jsou schopné odštěpit z kyseliny o-O-fenyl-karbamoyl-benzoové vodu. Například chlorid thionylu nebo chlorid fosforitý. Telota reakce je v rozmezí 80 -100 °C.



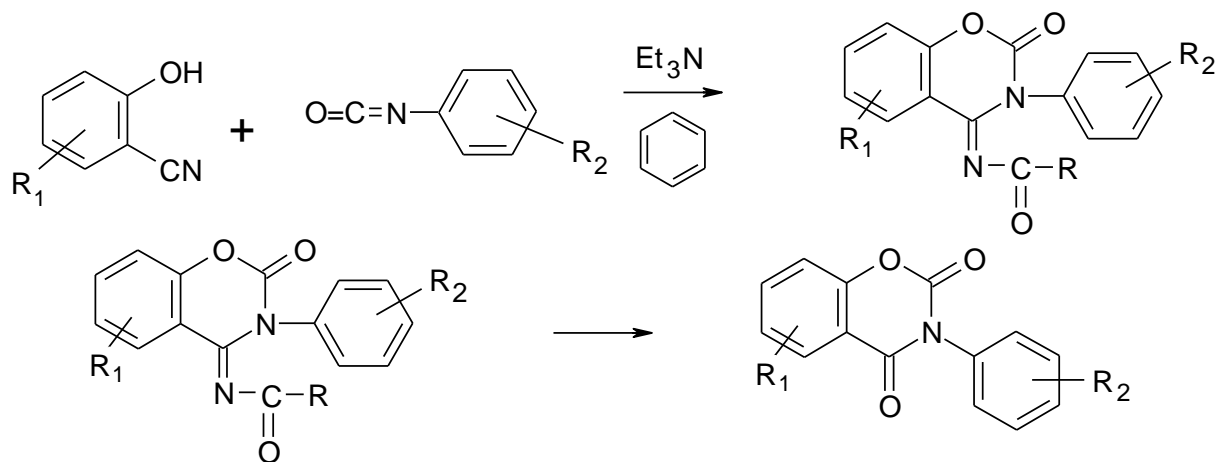
(schéma 7)

3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-diony je možné připravit i reakcí methylesteru kyseliny salicylové s fenyloksyanátem za přítomnosti triethylaminu:



(schéma 8)

Použije-li se jako výchozí látka 2-hydroxybenzonitril, získáme reakcí fenyloksyanátu v prostředí benzenu za přítomnosti triethylaminu a následnou hydrolýzou produktu požadovaný cyklický derivát také.<sup>17</sup>



(schéma 9)

### 4.3 Výběr metody

Pro syntézu salicylanilidů byla použita metoda, při které reaguje substituovaná kyselina salicylová se substituovaným anilinem (kapitola 4.1, schéma 1). V naší laboratoři je totiž tento způsob přípravy osvědčený a s dobrou výtěžností. Jako rozpouštědlo byl užit toluen, protože s ním již byly dobré zkušenosti při předchozích syntézách.

Pro přípravu 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů byla zvolena metoda se salicylanilidem, který reaguje v prostředí suchého pyridinu s methylchloroformiátem (kapitola 4.2, schéma 3). I s touto metodou byly již na pracovišti zkušenosti.



## **5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 5.1 Postup přípravy 4'-alkyl-salicylanilidů

Výchozí látky byly substituovaná kyselina salicylová (0,02 mol) a substituovaný anilin (0,02 mol). Kyselina byla rozpuštěna ve 100 ml toluenu, byl přidán anilín a chlorid fosforitý (0,01 mol). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem k varu 3 hodiny. Poté byl toluen odpařen na rotační vakuové odparce a produkty byly rekrystalizovány v 96 % ethanolu. Výtěžek reakce byl 52-79 %.

## 5.2 Postup přípravy 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Výchozí látkou byl příslušný 4'-alkyl-halogensalicylanilid (40 mmol). Tento byl rozpuštěn ve 20 ml suchého pyridinu a směs byla postavena do ledové lázně. Za stálého míchání a chlazení na ledové lázni byl do směsi opatrně přikapáván methylechloroformiát (48 mmol). Po 10 minutách byla ledová lázeň odstraněna a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Po ukončení zahřívání byla reakční směs ponechána stát 20 hodin. Poté byla směs převedena do 50 ml roztoku 5 % kyseliny chlorovodíkové. Proběhlo vysrážení surového produktu. Sraženina byla odfiltrována a převedena do 40 ml roztoku 5 % hydroxidu sodného. Znovu byla odfiltrována a produkt byl rekrystalizován v 96 % ethanolu. Výtěžek reakce byl 55-65 %.

## 5.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti látek

Látky byly vysušeny v sušící pistolí nad oxidem fosforečným při tlaku 2,4 kPa .

Teploty tání byly měřeny na Kofflerově bloku. Jsou uvedeny ve stupních Celsia v příložených tabulkách.

Uhlíková spektra  $^{13}\text{C}$  a vodíková spektra  $^1\text{H}$  nukleární magnetické rezonance byla změřena na přístroji VARIAN MERCURY- VX BB 300 . Uhlíková spektra byla měřena při frekvenci 75 MHz, vodíková spektra při 300 MHz. Látky byly pro analýzu rozpuštěny

v D<sub>6</sub>-dimetylsulfoxidu. Hodnoty chemických posunů  $\delta$  uvedené v ppm, jsou vztaženy k tetrametylsilanu, který představuje nepřímý standard. Signál rozpouštědla měl hodnotu 7,26 pro <sup>1</sup>H a 77,0 pro <sup>13</sup>C spektra.

Elementární analýza byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

Infračervená spektra byla měřena v tabletách z bromidu draselného nebo po rozpuštění v chloroformu na přístroji NICOLET IMPACT 400. Hodnoty vlnočtů  $\nu(\text{C}=\text{O})$  infračervených spekter jsou uvedeny v jednotkách  $\text{cm}^{-1}$  v příložených tabulkách.

K ověření čistoty syntetizovaných látek byla použita tenkovrstevná chromatografie na silufolových deskách s fluorescenčním indikátorem SILUFOL UV 254 + 366. Použita byla vyvíjecí soustava cyklohexan/acetone v poměru 3:1.

## 5.4 Hodnocení antimikrobního testování

Syntetizované látky byly testovány proti kulturám *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80 a *Mycobacterium avium* My CNCTC 330/80, kmenům z České národní kolekce typových kultur (Czech national collection of type cultures). Pro testování byl použit ještě kmen *Mycobacterium kansasii* 6 509/96 izolovaný od pacienta z okresu Karviná. Testované látky byly rozpuštěny v dimetylsulfoxidu a naředěny na koncentrace od 2 do 1000  $\mu\text{mol}$ . Stanovení hodnot minimálních inhibičních koncentrací bylo provedeno v Petriho miskách po inkubaci při 37°C v Šulově mediu. Mykobakteriální kmeny byly naředěny na koncentrace v rozmezí  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$ . Testování bylo provedeno ve Zdravotním ústavu v Ostravě.

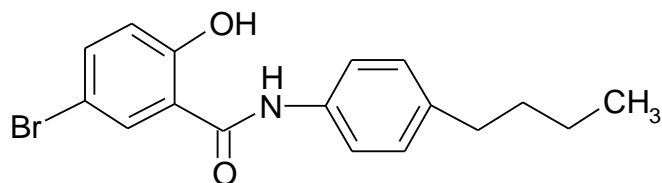
## 5.5 Syntéza derivátů 4'-alkylsalicylanilidů

Syntetizovali jsme několik derivátů salicylanilidu. Jako alkyly byly vybrány lineární řetězce ethyl a butyl. Pro zavedení halogenových substituentů byly zvoleny 4-chlor-, 5-chlor-, 5-brom- a 3,5-dibromsalicylové kyseliny.

### **5-brom-4'-butylsalicylanilid (T 5535)**

Sumární vzorec :C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>2</sub>

M<sub>r</sub> : 348,24



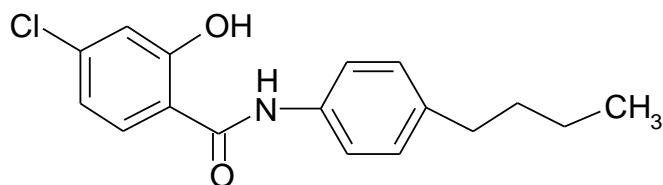
Použité chemikálie :kyselina 5-bromsalicylová (0,02 mol)  
4-butylanilin (0,02 mol)  
chlorid fosforitý (0,01 mol)  
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 189-190 °C .

### **4-chlor-4'-butylsalicylanilid (T 5537)**

Sumární vzorec :C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>2</sub>

M<sub>r</sub> : 303,79



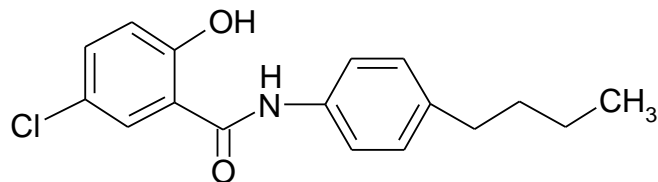
Použité chemikálie :kyselina 4-chlorsalicylová (0,02 mol)  
4-butylanilin (0,02 mol)  
chlorid fosforitý (0,01 mol)  
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 167-168 °C .

### 5-chlor-4'-butylsalicylanilid (T 5538)

Sumární vzorec :C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>2</sub>

M<sub>r</sub> : 303,79



Použité chemikálie :kyselina 5-chlorsalicylová (0,02 mol)

4-butylanilin (0,02 mol)

chlorid fosforitý (0,01 mol)

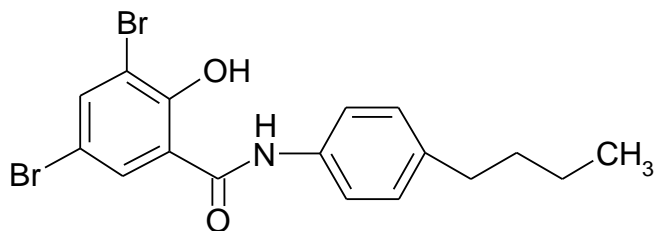
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 162-163 °C.

### 3,5-dibrom-4'-butylsalicylanilid (T 5546)

Sumární vzorec :C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

M<sub>r</sub> : 427,14



Použité chemikálie :kyselina 3,5-dibromsalicylová (0,02 mol)

4-butylanilin (0,02 mol)

chlorid fosforitý (0,01 mol)

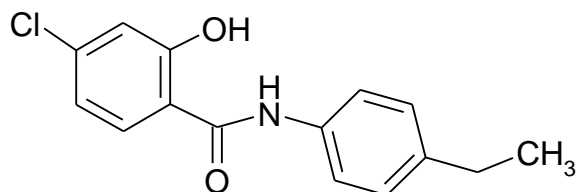
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 119 °C.

### **4-chlor-4'-ethylsalicylanilid (T 5724)**

Sumární vzorec :  $C_{15}H_{14}ClNO_2$

$M_r$  : 275,74



Použité chemikálie : kyselina 4-chlorsalicylová (0,02 mol)

4-ethylanilin (0,02 mol)

chlorid fosforitý (0,01 mol)

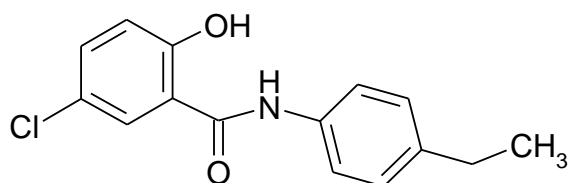
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 198-200 °C .

### **5-chlor- 4'-ethylsalicylanilid (T 5725)**

Sumární vzorec :  $C_{15}H_{14}ClNO_2$

$M_r$  : 275,74



Použité chemikálie : kyselina 5-chlorsalicylová (0,02 mol)

4-ethylanilin (0,02 mol)

chlorid fosforitý (0,01 mol)

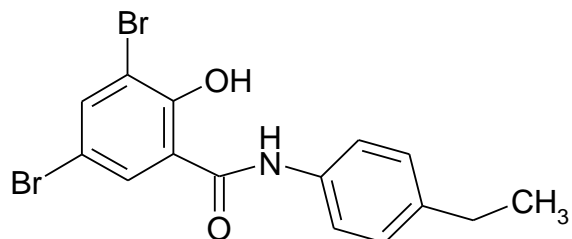
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 198-201 °C.

### 3,5-dibrom-4'-ethylsalicylanilid (T 5727)

Sumární vzorec :C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

M<sub>r</sub> : 399,08



Použité chemikálie :kyselina 3,5-dibromsalicylová (0,02 mol)

4-ethylanilin (0,02 mol)

chlorid fosforitý (0,01 mol)

toluen (100 ml)

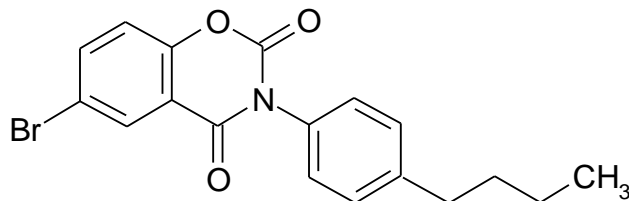
Bílá krystalická látka, teplota tání 128-132 °C .

## 5.6 Syntéza derivátů 3-(4 -alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu

### **6-brom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5574)**

Sumární vzorec :C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub> : 374,24



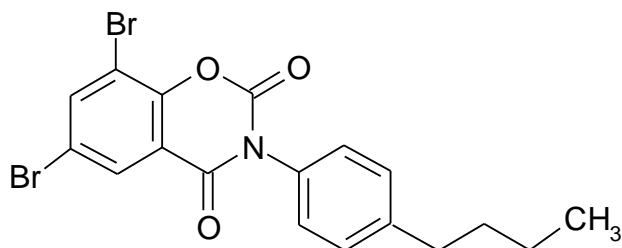
Použité chemikálie: 5-brom-4'-butylsalicylanilid (40 mmol)  
suchý pyridin (20 ml)  
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)  
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 194-195 °C.

### **6,8-dibrom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5575)**

Sumární vzorec :C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub> : 453,13



Použité chemikálie: 3,5-dibrom-4'-butylsalicylanilid (40 mmol)  
suchý pyridin (20 ml)  
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)  
ethanol 96 %

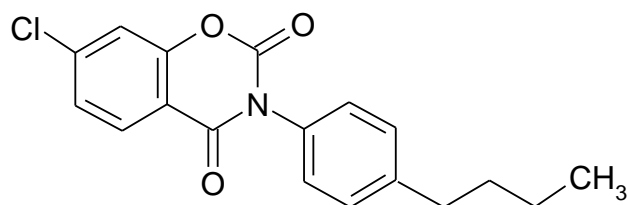
Bílá krystalická látka, teplota tání 168-169 °C.



**7-chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5576)**

Sumární vzorec :C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub> : 329,79



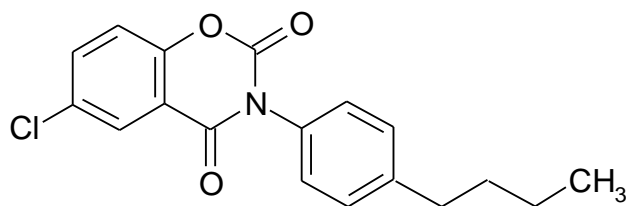
Použité chemikálie: 4-chlor-4'-butylsalicylanilid (40 mmol)  
suchý pyridin (20 ml)  
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)  
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 161-162 °C.

**6-chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5578)**

Sumární vzorec :C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub> : 329,79



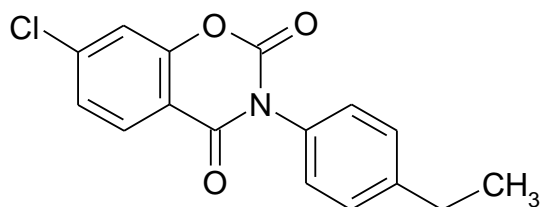
Použité chemikálie: 5-chlor-4'-butylsalicylanilid (40 mmol)  
suchý pyridin (20ml)  
metylester kyseliny chlormravenčí (48mmol)  
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 189-190 °C.

**7-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5735)**

Sumární vzorec :  $C_{16}H_{12}ClNO_3$

$M_r$  : 301,73



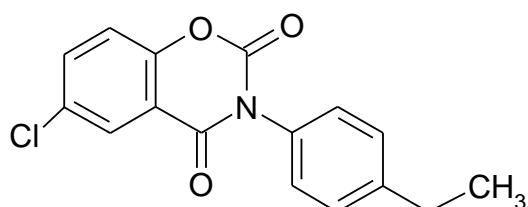
Použité chemikálie: 4-chlor-4'-ethylsalicylanilid ( 40 mmol)  
suchý pyridin (20ml)  
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)  
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 185-189 °C.

**6-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5736)**

Sumární vzorec :  $C_{16}H_{12}ClNO_3$

$M_r$  : 301,73



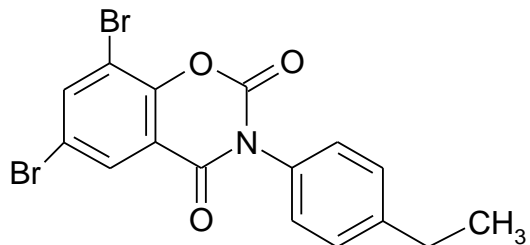
Použité chemikálie: 5-chlor-4'-ethylsalicylanilid (40 mmol)  
suchý pyridin (20ml)  
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)  
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 230-233 °C.

**6,8-dibrom-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5738)**

Sumární vzorec :C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>

M<sub>r</sub> : 425,08



Použité chemikálie: 3,5-dibrom-4'-ethylsalicylanilid (40 mmol)  
suchý pyridin (20ml)  
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)  
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 250-253 °C.

## **6 VÝSLEDKY**

## 6.1 PŘEHLED PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

Tab. 1: Přehled připravených 4'-alkylsalicylanilidů

Číslo	Substituent na salicyloylové části	Substituent na anilinové části	Sumární vzorec
T 5535	5-Br	4'-butyl	$C_{17}H_{18}BrNO_2$
T 5537	4-Cl	4'-butyl	$C_{17}H_{18}ClNO_2$
T 5538	5-Cl	4'-butyl	$C_{17}H_{18}ClNO_2$
T 5546	3,5-diBr	4'-butyl	$C_{17}H_{17}Br_2NO_2$
T 5724	4-Cl	4'-ethyl	$C_{15}H_{14}ClNO_2$
T 5725	5-Cl	4'-ethyl	$C_{15}H_{14}ClNO_2$
T 5727	3,5-diBr	4'-ethyl	$C_{15}H_{13}Br_2NO_2$

Tab. 2 : Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3- benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Číslo	Substituent na salicyloylové části	Substituent na anilinové části	Sumární vzorec
T 5574	6-Br	4-butyl	$C_{18}H_{16}BrNO_3$
T 5575	6,8-diBr	4-butyl	$C_{18}H_{15}Br_2NO_3$
T 5576	7-Cl	4-butyl	$C_{18}H_{16}BrNO_3$
T 5578	6-Cl	4-butyl	$C_{18}H_{16}ClNO_3$
T 5735	7-Cl	4-ethyl	$C_{16}H_{12}ClNO_3$
T 5736	6-Cl	4-ethyl	$C_{16}H_{12}ClNO_3$
T 5738	6,8-diBr	4-ethyl	$C_{16}H_{11}Br_2NO_3$

## 6.2 TEPLoty TÁNÍ

Teploty tání syntetizovaných látek byly zjištěny na Kofflerově bloku. V následujících tabulkách jsou uvedeny ve stupních Celsia.

*Tab. 3 : Teploty tání 4'-alkylsalicylanilidů*

<b>Látka</b>	<b>T 5535</b>	<b>T 5537</b>	<b>T 5538</b>	<b>T 5546</b>
<b>t.t. (°C)</b>	189-190	167-168	162-163	119

<b>Látka</b>	<b>T 5724</b>	<b>T 5725</b>	<b>T 5727</b>
<b>t.t. (°C)</b>	198-200	198-201	128-132

*Tab. 5 : Teploty tání 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů*

<b>Látka</b>	<b>T 5574</b>	<b>T 5575</b>	<b>T 5576</b>	<b>T 5578</b>
<b>t.t. (°C)</b>	194-195	168-169	161-162	189-190

<b>Látka</b>	<b>T 5735</b>	<b>T 5736</b>	<b>T 5738</b>
<b>t.t. (°C)</b>	185-189	230-233	250-253

### 6.3 INFRAČERVENÁ SPEKTRA

Následující tabulky uvádějí hodnoty vybraných vlnočtů  $\nu$  (C=O) zjištěných z infračervených spekter.

*Tab. 5 : Hodnoty vlnočtů infračervených spekter 4'-alkylsalicylanilidů*

Látka	T 5535	T 5537	T 5538	T 5546
Hodnota vlnočtu ( $\text{cm}^{-1}$ )	1630	1618	1628	1648

Látka	T 5724	T 5725	T 5727
Hodnota vlnočtu ( $\text{cm}^{-1}$ )	1622	1621	1648

*Tab. 6 : Hodnoty vlnočtů infračervených spekter 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů*

Látka	T 5574	T 5575	T 5576	T 5578
Hodnoty vlnočtů ( $\text{cm}^{-1}$ )	1770	1774	1776	1771
	1702	1701	1708	1705

Látka	T 5735	T 5736	T 5738
Hodnoty vlnočtů ( $\text{cm}^{-1}$ )	1776	1770	1781
	1708	1705	1704

## 6.4 ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA

V následujících tabulkách jsou uvedeny vypočtené a naměřené hodnoty procentuálního zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku v připravených látkách.

*Tab. 7: CHN analýza 4'-alkylsalicylanilidů*

<b>Látka</b>	<b>C % vypočtené/naměřené</b>	<b>H % vypočtené/naměřené</b>	<b>N % vypočtené/naměřené</b>
<b>T 5535</b>	58,48 / 58,63	5,13 / 5,21	3,85 / 4,02
<b>T 5537</b>	67,51 / 67,21	6,18 / 5,97	4,34 / 4,61
<b>T 5538</b>	67,05 / 67,21	5,95 / 5,97	4,38 / 4,61
<b>T 5546</b>	47,46 / 47,80	3,91 / 4,01	3,12 / 3,28
<b>T 5724</b>	65,34 / 65,41	5,12 / 4,90	5,08 / 4,74
<b>T 5725</b>	65,34 / 65,24	5,12 / 4,95	5,08 / 4,75
<b>T 2727</b>	45,15 / 45,26	3,28 / 3,18	3,51 / 3,23

*Tab. 8 : CHN analýza 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů*

<b>Látka</b>	<b>C % vypočtené/naměřené</b>	<b>H % vypočtené/naměřené</b>	<b>N % vypočtené/naměřené</b>
<b>T 5574</b>	57,77 / 57,28	4,31 / 4,17	4,31 / 4,18
<b>T 5575</b>	59,71 / 59,35	5,01 / 4,92	3,17 / 3,48
<b>T 5576</b>	65,56 / 65,46	4,89 / 4,85	4,25 / 4,04
<b>T 5578</b>	65,59 / 65,38	4,89 / 4,88	4,25 / 4,05
<b>T 5735</b>	63,69 / 63,59	4,01 / 3,95	4,46 / 4,36
<b>T 5736</b>	63,69 / 63,62	4,01 / 3,95	4,64 / 4,44
<b>T 5738</b>	45,21 / 45,17	2,61 / 2,53	3,30 / 3,11



## 6.5 VODÍKOVÁ SPEKTRA $^1\text{H}$ NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE

Následující tabulky uvádějí hodnoty signálů chemicky ekvivalentních vodíků z interpretovaných NMR spekter ve formě chemických posunů  $\delta$ . V tabulce je uveden typ signálu (s- singlet, bs- široký singlet, d- dublet, dd- dublet dubletu, m- multiplet), dále počet vodíků, kterým signál přísluší a poloha prvku v molekule. U štěpených signálů je uvedena interakční konstanta  $J$  v Hz. Spektra jsou měřena při 300 MHz.

Tab. 9 :  $^1\text{H}$  NMR spektra 4'-alkylsalicylanilidů

Látka	NMR, $\delta$
<b>T 5535</b>	$^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 11.97 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 8.09 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H6), 7.63-7.52 (3H, m, H4, H2', H6'), 7.22-7.14 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.95 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.54 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.61-1.45 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.36-1.21 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.88 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>3</sub> ).
<b>T 5537</b>	$^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 12.19 (1H, bs, NH), 10.31 (1H, s, OH), 7.95 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.61-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.21-7.12 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.03 (1H, d overlapped, $J=1.7$ Hz, H3), 7.02 (1H, dd overlapped, $J=8.5$ Hz, $J=1.7$ Hz, H5), 2.54 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.60-1.46 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.36-1.20 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.88 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>3</sub> ).
<b>T 5538</b>	$^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 11.93 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 7.97 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.61-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.22-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.54 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.60-1.45 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.36-1.21 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.88 (3H, t, $J=7.4$ Hz, CH <sub>3</sub> ).
<b>T 5546</b>	$^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 10.59 (1H, s, OH), 8.30 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H6), 8.00 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H4), 7.59-7.51 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.55 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.60-1.47 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.36-1.22 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.88 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>3</sub> ).

*<sup>1</sup>H NMR spektra 4'-alkylsalicylanilidů*

Látka	NMR, $\delta$
T 5724	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz) $\delta$ 12.22 (1H, bs, NH), 10.31 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H6), 7.62-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.22-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-6.99 (2H, m, H3, H5), 2.57 (2H, q, $J=7.5$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.16 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>3</sub> )
T 5725	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz) $\delta$ 11.95 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.63-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.58 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.16 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH <sub>3</sub> )
T 5727	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz) $\delta$ 10.60 (1H, bs, OH), 8.30 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H6), 7.99 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H4), 7.61-7.53 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.59 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.17 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH <sub>3</sub> )

Tab. 10 : *<sup>1</sup>H NMR spektra 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů*

Látka	NMR, $\delta$
T 5574	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 8.06-8.00 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=0.6$ Hz, H8), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.67-1.51 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.43-1.26 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.92 (3H, t, $J=7.4$ Hz, CH <sub>3</sub> );
T 5575	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 8.43 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H5), 8.05 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H7), 7.36-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.66-1.52 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.42-1.26 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.92 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH <sub>3</sub> );
T 5576	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 7.97 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5), 7.76 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.52 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.67-1.52 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.42-1.25 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>3</sub> ).
T 5578	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 7.96-7.87 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.36-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.64 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.67-1.53 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.43-1.26 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH <sub>3</sub> ).

*<sup>1</sup>H NMR spektra 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů*

Látka	NMR, $\delta$
<b>T 5735</b>	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 7.98 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5), 7.75 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6), 7.37-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH <sub>3</sub> )
<b>T 5736</b>	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 7.96-7.86 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=0.6$ Hz, H8), 7.38-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.7$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.22 (3H, t, $J=7.7$ Hz, CH <sub>3</sub> )
<b>T 5738</b>	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO) $\delta$ 8.42 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.05 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H7), 7.38-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH <sub>3</sub> )

## 6.6 UHLÍKOVÁ SPEKTRA $^{13}\text{C}$ NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE

Hodnoty signálů chemických posunů  $\delta$  uhlíků z interpretovaných NMR spekter jsou uvedeny v následujících tabulkách. Spektra jsou měřena při 75 MHz .

*Tab. 11:  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 4'-alkylsalicylanilidů*

Látka	NMR, $\delta$
<b>T 5535</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 165.2, 157.8, 138.6, 136.1, 135.8, 131.3, 128.7, 121.1, 120.0, 119.7, 110.3, 34.5, 33.4, 21.9, 14.0.
<b>T 5537</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 165.7, 159.4, 138.6, 137.6, 135.8, 130.9, 128.7, 121.2, 119.4, 117.1, 117.0, 34.5, 33.4, 21.9, 14.0
<b>T 5538</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 165.2, 157.3, 138.7, 135.8, 133.3, 128.7, 128.5, 122.9, 121.1, 119.5, 119.3, 34.5, 33.4, 21.9, 14.0.
<b>T 5546</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 166.8, 156.8, 139.4, 138.8, 135.1, 129.8, 128.7, 122.1, 118.3, 112.5, 110.0, 34.5, 33.3, 21.9, 14.0.
<b>T 5724</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz) $\delta$ 165.7, 159.4, 140.0, 137.6, 135.8, 130.9, 128.2, 121.2, 119.4, 117.0, 27.8, 15.9
<b>T 5725</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz) $\delta$ 165.2, 157.3, 140.1, 135.8, 133.3, 128.4, 128.2, 122.9, 121.2, 119.4, 119.3, 27.8, 15.9
<b>T 5727</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz) $\delta$ 166.8, 156.9, 140.9, 138.8, 135.0, 129.8, 128.2, 122.2, 118.3, 112.5, 110.0, 27.9, 15.8

Tab. 12 :  $^1\text{H}$  NMR spektra 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)dionů

Látka	NMR, $\delta$
<b>T 5574</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 160.0, 152.0, 147.5, 143.3, 138.9, 132.8, 129.5, 129.1, 128.4, 119.2, 117.1, 117.0, 34.7, 33.3, 22.0, 14.0
<b>T 5575</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 159.5, 149.2, 146.9, 143.5, 140.8, 132.6, 129.2, 129.1, 128.3, 118.2, 117.2, 110.8, 34.7, 33.2, 22.0, 14.0
<b>T 5576</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 160.3, 153.3, 147.6, 143.3, 140.5, 132.8, 129.2, 129.1, 128.4, 125.8, 116.8, 114.2, 34.7, 33.3, 22.0, 14.0
<b>T 5578</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 160.0, 151.5, 147.5, 143.3, 136.1, 132.7, 129.4, 129.1, 128.4, 126.5, 119.0, 116.7, 34.7, 33.3, 22.0, 14.0
<b>T 5735</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 160.3, 153.3, 147.6, 144.6, 140.5, 132.8, 129.2, 128.6, 128.5, 125.8, 116.8, 114.2, 28.1, 15.7
<b>T 5736</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 160.0, 151.5, 147.5, 144.7, 136.1, 132.8, 129.4, 128.6, 128.4, 126.5, 118.9, 116.7, 28.1, 15.7
<b>T 5738</b>	$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO) $\delta$ 159.5, 149.2, 146.9, 144.8, 140.8, 132.6, 129.1, 128.7, 128.3, 118.2, 117.2, 110.8, 28.1, 15.7

## 6.7 HODNOCENÍ ANTIMIKROBNÍ ÚČINNOSTI

Antimykobakteriální účinnost byla zjišťována pomocí mykobakteriálních kmenů zaslaných z Národního Institutu zdraví v Praze. Byly užity kmeny *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* My CNCTC 330/80 a jeden klinický izolát *Mycobacterium kansasii* 6 509/96 od pacienta z Karviné. Pro použití bylo nutné sloučeniny rozpustit v DMSO. Měření bylo prováděno s roztoky o koncentracích 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31, 16, 8, 4, 2  $\mu\text{mol/l}$ . MIC byly stanoveny po inkubaci v Šulově půdě při 37 °C za 14 a 21 dní. Hodnoty vyhodnocené z třikrát opakovaného měření minimálních inhibičních koncentrací byly porovnávány s izoniazidem jako standardem, jehož minimální inhibiční koncentrace byla 2  $\mu\text{mol/l}$ .

Tab. 13 : MIC 4'-alkylsalicylanilidů

Látka	MIC [ $\mu\text{mol}$ ]			
	Inkubační doba 14 / 21 dní			
	<i>M.tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
<b>T 5535</b>	8/8	8/8	8/16	8/8
<b>T 5537</b>	4/4	8/8	8/8	8/8
<b>T 5538</b>	4/4	8/8	8/8	4/8
<b>T 5546</b>	16/32	32/32	62.5/62.5	32/32
<b>T 5724</b>	8/8	8/16	16/16	16/16
<b>T 5725</b>	8/8	8/8	n/n	16/16
<b>T 5727</b>	8/8	16/16	16/32	16/16
<b>INH</b>	<b>2/1</b>	<b>&gt;250/&gt;250</b>	<b>&gt;250/&gt;250</b>	<b>4/8</b>

Tab. 14 : MIC 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Látka	MIC [ μmol] Inkubační doba 14 / 21 dní			
	<i>M.tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
<b>T 5574</b>	4/4	8/8	8/8	8/8
<b>T 5575</b>	32/32	62.5/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
<b>T 5576</b>	8/8	8/16	16/16	8/16
<b>T 5578</b>	16/16	8/8	16/16	8/16
<b>T 5735</b>	8/8	16/16	8/16	16/16
<b>T 5736</b>	8/16	16/16	16,32	16/16
<b>T 5738</b>	32/32	62,5/62,5	62,5/125	62,5/62,5
<b>INH</b>	<b>1/2</b>	<b>250/250</b>	<b>250/250</b>	<b>8/8</b>

## **7 DISKUSE**



Bylo syntetizováno sedm 4'-alkylsalicylanilidů a sedm od nich odvozených 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů.

Rozmezí teplot tání připravených sloučenin se pohybovalo od 0 do 4°C. Čistota látek byla kontrolována pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu (Silufol od firmy Kavalier-Votice).

V infračervených spektrech vykazovaly připravené sloučeniny absorpční pásy v rozmezí 1615-1650  $\text{cm}^{-1}$ , které jsou charakteristické pro amidovou C=O skupinu salicylanilidů. 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony vykazovali absorpční maxima dvou C=O skupin v rozmezí hodnot 1767-1770  $\text{cm}^{-1}$  a 1696-1716  $\text{cm}^{-1}$ . Dvě absorpční maxima v této oblasti jsou charakteristické pro 1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony.

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra všech sloučenin souhlasila s předpokládanou strukturou. Všechny struktury byly ve shodě s elementární analýzou. Rozdíl naměřených a vypočítaných hodnot se v elementární analýze pohyboval v rozpětí  $\pm 0,5\%$ .

Většina monohalogenovaných sloučenin vykazovala vyšší aktivitu než sloučeniny dihalogenované. Nejvyšší účinnost vykazovaly látky: 4-chlor-4'-butylsalicylanilid, 5-chlor-4'-butylsalicylanilid, 6-brom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion. Nebyla zjištěna korelace, že by antimykobakteriální účinnost benzoxazinu odpovídala antimykobakteriální účinnosti salicylanilidu, od kterého byl odvozen. Žádná ze syntetizovaných látek nebyla proti *M.tuberculosis* účinnější než izoniazid. Proti potenciálně patogenním kmenům *M.kansasii* CNCTC My 235/80 a *M.avium* My CNCTC 330/80 byla většina látek účinnější než izoniazid.

Domníváme se, že mechanismus účinku spočívá v inhibici dvoukomponentového systému mykobakterií. Na to ukazuje i inhibice tvorby ATP prokázané prof. Mikou.<sup>18</sup>

## **8 ZÁVĚR**

Byly syntetizovány tyto látky:

4-chlor-4'-butyl-salicylanilid

5-chlor-4'-butyl-salicylanilid

5-brom-4'-butyl-salicylanilid

3,5-dibrom-4'-butyl-salicylanilid

4-chlor-4'-ethyl-salicylanilid

5-chlor-4'-ethyl-salicylanilid

3,5-dibrom-4'-ethyl-salicylanilid

7-chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

6-chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

6-brom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

6,8-dibrom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

7-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

6-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

6,8-dibrom-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

U syntetizovaných látek byly zjištěny fyzikálně-chemické vlastnosti, potvrzena struktura a byly zaslány k hodnocení antimikrobní aktivity.



## Literatura

- 1 Článek ze Zdravotního ústavu: MUDr. Marta Havelková, CSc., vedoucí Odborné skupiny mykobakteriálních infekcí a Národní referenční laboratoře pro mykobakterie SZÚ
- 2 Greenwood D., Slack R.C., Peutheerer J.F. a kol.: Lékařská mikrobiologie (Grada, 1999), Praha, str.215-220
- 3 Krejbich F., Trnka L., Mazánková V.: Hodnocení situace tuberkulózy v České republice v roce 2002, Čas. Lék. Čes., 142, (2003), 746-750
- 4 Havelková M., Hynčicová-Zemanová I., Příkazský V., Šlosárek M.: Multirezistentní tuberkulóza v České republice (1999-2001), Čas. Lék. Čes. 142, (2003), 356-364
- 5 Homolka J., Krejbich F., Havelková M.: Rezistence kmenů Mycobacterium tuberculosis na antituberkulotika v České republice v roce 2003, Čas. Lék. Čes., 143, (2004), 836-839
- 6 Homolka J., Krejbich F., Holub J.: Tuberkulóza v České republice v roce 2005, Čas. Lék. Čes., 145, (2006), 738-742
- 7 Homolka J., Krejbich F., Mazánková V.: Tuberkulóza v České republice v roce 2003, Čas. Lék. Čes., 143, (2004), 594-597
- 8 Lincová D., Fagheli H.: Základní a aplikovaná farmakologie (Galén, 2002), Praha, str.461-463
- 9 Hlasta D.J., Demers J.P., Foleno B.D., et al.: Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: Pharmacophore identification based on the screening hit closantel, Bioorg. Med. Chem. Letters 8, (1998), 1923-1928

- 10 Macielag M.J., Demers J.P., Fraga-Spano S.A., Hlasta D.J., et al. : Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria, *J. Med. Chem.*, 41, (1998), 2939-2945
- 11 Waisser K., Dražková K., Holý P., Palát K. Jr., Kaustová J.: Correlation of antimycobacterial activity of substituted salicylanilides and 3-aryl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones, *Folia Pharm. Univ. Carrol.* 29-30, (2003), 17-20
- 12 Waisser K., Bureš O., Holý P.: Pokroky ve vývoji nových abtiterkulotik ze skupiny orthokondenzovaných heterocyklických sloučenin - Část 3. Látky obsahující v šestičlenném kruhu více druhů heteroatomů (Advances in the development of new antituberculous from the group of ortho-condensed heterocyclic compounds. Parts 3. Compounds containing more hetero atoms in the six-membered ring.) *Česk. Slov. Farm.*, 50, (2001), 268-277
- 13 Waisser K., Hladůvková J., Kuneš J., Kubicová L., Klimešová V., Karajannis P., Kaustová J.: Synthesis and antimycobacterial activity of salicylanilides substituted in position 5, *Chem. Pap.* 55, (2001), 121-129
- 14 Wagner G., Singer D., Weuffen W.: Studies on 2-hydroxythiobenzamide and 2-hydroxythiobenzanilide.1. Synthesis of the compounds. (Untersuchungen über 2-Hydroxythiobenzamide und 2-Hydroxythiobenzanilide.1. Mitteilung: Synthese der Verbindungen), *Pharmazie* 21, (1966), 161-166
- 15 Daidone G., Maggio B., Schillaci D.: Salicylanilide and its heterocyclic analogues. A comparative study of their antimicrobial activity, *Pharmazie*, 45, (1990), 441-442
- 16 Haaspacher K.: N-substituted 2H-1,3-benzoxazine-2,4-(3H)-diones, *Chem. Abstr.* 69, (1968), 19169h
- 17 Petridou-Fischer J., Papadopoulos E.P.: Reaction of 2-hydroxybenzotrile with isocyanates, *J. Heterocycl. Chem.*, 20, (1983), 1159-1167

- 18 Waisser K., Matyk J., Divišová H., Husáková P., Kuneš J., Klimešová V., Möllmann U., Dahse H., Miko M.: The oriented development of antitubercotics: Salicylanilides, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 339, (2006), 616-620