

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra anorganické a organické chemie



Nové skupiny potenciálních antituberkulotik

DISERTAČNÍ PRÁCE

Hradec Králové 2008

Mgr. Jan Adamec

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Inorganic and Organic Chemistry



The new groups of potential antituberculotics

PhD. Thesis

Hradec Králové 2008

Mgr. Jan Adamec

Poděkování

Za všestrannou a obětavou pomoc, za cenné rady a odborné vedení, které mi během studia poskytoval, děkuji prof. RNDr. Karlu Waisserovi, DrSc.

Současně bych chtěl poděkovat Ivě Vencovské za měření IČ spekter, Petru Jančárkovi za měření NMR spekter, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a prof. RNDr. Milanu Pourovi, PhD. za měření a interpretaci NMR spekter, doc. RNDr. Věře Klimešové, CSc. za poskytnutí 4-benzylsulfanyl derivátů pyridinu při syntéze hybridních molekul, MUDr. Jarmile Kaustové a kol. z Oddělení pro diagnostiku mykobakterií Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě za antimykobakteriální hodnocení, doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc. a kol. z Katedry lékařských a biologických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (FaF UK HK) za antimykotické hodnocení, a kolektivu zaměstnanců a studentů z Katedry anorganické a organické chemie FaF UK HK za všestrannou pomoc.

Dále bych chtěl poděkovat prof. Dr. Rainerovi Beckertovi, Dr. Dieteru Weißovi PhD. a kol. z Institutu organické a makromolekulární chemie Friedrich-Schiller-Universität v Jeně (Německo) za umožnění 9 měsíční zahraniční stáže, kde jsem syntetizoval a testoval hybridní molekuly, Dr. Ute Möllmann z Hans-Knöll-Institutu v Jeně za testování antibakteriální aktivity a také Dr. H.-M. Dahse za hodnocení cytotoxické a antiproliferativní aktivity.

Tato práce byla součástí výzkumu Katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK řešeného v rámci výzkumného záměru MSM 111 600 001 a MSM 002 162 0822, výzkumných grantů FRVŠ 965/G6/2004 a FRVŠ 42/G6/2005 a Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 436. Za finanční pomoc patří poděkování také projektu Erasmus-Socrates, který se podílel na hrazení výdajů spojených s pobytem na Friedrich-Schiller-Universität v Jeně.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne

podpis

Obsah

| | |
|---|----|
| Obsah | 7 |
| Seznam použitých zkratk a symbolů | 9 |
| Přehled sloučenin | 11 |
| 1. Úvod..... | 15 |
| 2. Cíl práce | 17 |
| 3. Teoretická část | 19 |
| 3.1 Tuberkulóza..... | 19 |
| 3.1.1 Specifita mykobakteriálních kmenů..... | 19 |
| 3.1.2 Strategie léčby tuberkulózy a současná antituberkulotika | 20 |
| 3.1.3 Nové přístupy k léčbě tuberkulózy | 25 |
| 3.2 Mykotická onemocnění | 26 |
| 3.2.1 Antimykotika | 26 |
| 3.2.1.1 Látky interagující s membránovým ergosterolem..... | 26 |
| 3.2.1.2 Látky inhibující biosyntézu ergosterolu..... | 27 |
| 3.2.1.3 Látky inhibující syntézu nukleových kyselin..... | 28 |
| 3.2.1.4 Látky působící na buněčnou stěnu hub | 29 |
| 3.2.1.5 Látky určené pro lokální použití | 29 |
| 3.2.2 Nové mechanismy účinku antifungálních látek | 30 |
| 3.3 Kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou (QSAR) | 30 |
| 3.3.1 Hanschova metoda | 31 |
| 3.3.2 Free-Wilsonova metoda | 31 |
| 3.3.2.1 Řešení podle Free-Wilsona | 31 |
| 3.3.2.2 Řešení podle Fujity a Bana | 32 |
| 3.3.3 Kombinace Hanschovy a Free-Wilsonovy metody..... | 32 |
| 3.3.4 Další přístupy k řešení vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou..... | 32 |
| 4. Metodická část | 33 |
| 4.1 Syntéza | 33 |
| 4.1.1 Možnosti přípravy tetrazolů a jejich derivátů | 33 |
| 4.1.1.1 Příprava 1-alkyl resp. 1-aryltetrazolyl-5-thiolů..... | 33 |
| 4.1.1.2 Příprava 1-alkyl resp. 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolů | 35 |
| 4.1.1.3 Příprava 1-aryl-5-(benzylsulfoxy)tetrazolů..... | 36 |
| 4.1.2 Možnosti přípravy hybridních molekul estronu | 36 |
| 4.1.2.1 Příprava pyridiniových solí hybridních molekul..... | 37 |
| 4.1.2.2 Příprava hybridních molekul tetrazolu a estronu | 38 |
| 4.2 Metody biologického testování | 38 |
| 4.2.1 Testování antibakteriální a antimykobakteriální aktivity..... | 39 |
| 4.2.2 Testování antimykotické aktivity | 40 |
| 4.2.3 Testování cytotoxické a antiproliferativní aktivity | 41 |
| 4.3 Použité metody QSAR | 42 |
| 4.3.1 QSAR u antimykobakteriální aktivity..... | 42 |
| 4.3.2 QSAR u antimykotické aktivity | 43 |
| 5. Experimentální část..... | 45 |
| 5.1 Chemikálie a přístrojové vybavení..... | 45 |
| 5.2 Obecný postup přípravy 5-alkylsulfanyl-1-aryltetrazolů | 46 |
| 5.2.1 Příprava derivátů 1-fenylisothiokyanátu | 46 |
| 5.2.2 Příprava derivátů 1-fenyltetrazolyl-5-thiolu | 46 |
| 5.2.3 Příprava derivátů 5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazolu | 47 |
| 5.3 Postup přípravy 1-fenyl-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfoxy]tetrazolu | 60 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.4 | Obecný postup přípravy hybridních molekul estronu..... | 61 |
| 5.4.1 | Příprava 3-(ω -Bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu (S01)..... | 61 |
| 5.4.2 | Příprava pyridiniových a chinoliniových solí hybridních molekul estronu ... | 62 |
| 5.4.3 | Příprava hybridních molekul od derivátů tetrazolu S05-S08..... | 65 |
| 6. | Výsledky s komentářem..... | 69 |
| 6.1 | Antibakteriální a antimykobakteriální aktivita připravených látek..... | 69 |
| 6.1.1 | Antimykobakteriální aktivita derivátů tetrazolu | 69 |
| 6.1.2 | Antibakteriální a antimykobakteriální aktivita hybridních molekul | 73 |
| 6.2 | Antimykotická aktivita připravených látek..... | 76 |
| 6.2.1 | Antimykotická aktivita 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů..... | 76 |
| 6.2.2 | Antimykotická aktivita hybridních molekul estronu | 80 |
| 6.3 | Antiproliferativní a cytotoxická aktivita | 81 |
| 6.4 | Shrnutí..... | 82 |
| 7. | Závěr | 83 |
| 8. | Souhrn | 85 |
| 9. | Summary | 87 |
| 10. | Literatura..... | 89 |
| 11. | Přílohy..... | 95 |

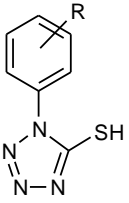
Seznam použitých zkratek a symbolů

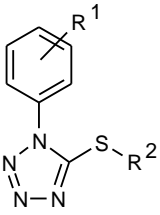
| | |
|--------------|---|
| AIDS | syndrom získaného selháním imunity |
| AMP | amfotericin B |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CFU | jednotka (bakterie) vytvářející kolonie (Colony forming Unit) |
| CIP | ciprofloxacin |
| CPB | <i>N</i> -cetylpyridinium bromid |
| CNCTC | Česká národní sbírka kmenových kultur (Czech National Collection of Type Cultures) |
| ČR | Česká Republika |
| DMF | dimethylformamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| EMB | ethambutol |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léků (Food and Drug Administration, USA) |
| FLU | flukonazol |
| FSU | Friedrich-Schiller- Universität |
| HBSS | Hank's balanced salt Solution, Hanksův balancovaný solný roztok, médium pro kultury savčích tkání |
| HeLa | HeLa buňky |
| HEPES | pufr, [4-(2-hydroxyethyl)-piperazin]-ethan sulfonová kyselina |
| HKI | Hans-Knöll-Institut |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| IR | infračervená spektroskopie |
| INH | isoniazid (hydrazid kyseliny isonikotinové) |
| MHB | Mueller-Hintonův bujón (Mueller-Hinton broth) |
| Mr | molekulová hmotnost |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| MOPS | morfolinpropansulfonová kyselina |
| MRSA | multirezistentní kmen <i>Staphylococcus aureus</i> (multiresistant <i>Staphylococcus aureus</i>) |
| NCCLS | národní výbor pro klinické standardy (National Committee for Clinical Laboratory Standards) |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| PZA | pyrazinamid |
| QSAR | kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou (Quantitative Structure-Activity Relationships) |
| RMP | rifampicin |
| RPMI | buněčné kultivační médium |
| SDA | Sabouraudův dextrózový agar |
| STM | streptomycin |
| TBAB | tetrabutylammonium bromid |
| TBC | tuberkulóza |
| TEA | triethylamin |
| THF | tetrahydrofuran |

| | |
|-------------|---|
| TLC | tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography) |
| TMS | tetramethylsilan |
| t.t. | teplota tání |
| t.v. | teplota varu |
| WHO | Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation) |

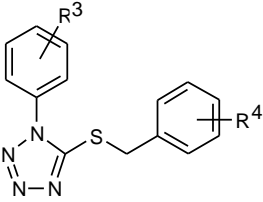
Přehled sloučenin

Tab.1 Přehled syntetizovaných popř. testovaných sloučenin.

| Tetrazoly | | |
|---|---|--|
| Deriváty 1-fenyltetrazolyl-5- thiolu |  | |
| | R | |
| A 03 | 4-Br | 1-(4-bromfenyl)tetrazolyl-5-thiol |
| A 04 | 4-OCH ₃ | 1-(4-methoxyfenyl)tetrazolyl-5-thiol |
| A 05 | 4-CH ₃ | 1-(4-methylfenyl)tetrazolyl-5-thiol |
| A 06 | H | 1-fenyltetrazolyl-5-thiol |
| A 07 | 4-Cl | 1-(4-chlorfenyl)tetrazolyl-5-thiol |
| A 08 | 3,4-Cl ₂ | 1-(3,4-dichlorfenyl)tetrazolyl-5-thiol |

| | | | |
|---|--|-----------------------------------|--|
| Deriváty 1-fenyl-5- (alkylsulfanyl)tetrazolů |  | | |
| | R¹ | R² | |
| T 960* | H | iso-C ₃ H ₇ | 1-fenyl-5-(isopropylsulfanyl)tetrazol |
| T 1077* | 2-OCH ₃ | C ₂ H ₅ | 1-(2-methoxyfenyl)-5-(ethylsulfanyl)tetrazol |
| T 1082* | 3-OCH ₃ | C ₂ H ₅ | 1-(3-methoxyfenyl)-5-(ethylsulfanyl)tetrazol |
| T 1088* | 4-OCH ₃ | C ₂ H ₅ | 1-(4-methoxyfenyl)-5-(ethylsulfanyl)tetrazol |
| T 1089* | 4-OCH ₃ | C ₃ H ₇ | 1-(4-methoxyfenyl)-5-(propylsulfanyl)tetrazol |
| T 1090* | 4-OCH ₃ | iso-C ₃ H ₇ | 1-(4-methoxyfenyl)-5-(isopropylsulfanyl)tetrazol |
| T 1092* | 4-OCH ₃ | 5-allyl | 1-(4-methoxyfenyl)-5-(allylsulfanyl)tetrazol |
| T 1093* | 3-Cl | C ₂ H ₅ | 1-(3-chlorfenyl)-5-(ethylsulfanyl)tetrazol |
| T 1094* | 3-Cl | C ₃ H ₇ | 1-(3-chlorfenyl)-5-(propylsulfanyl)tetrazol |
| T 1099* | 4-Cl | C ₂ H ₅ | 1-(4-chlorfenyl)-5-(ethylsulfanyl)tetrazol |
| T 1101* | 4-Cl | iso-C ₃ H ₇ | 1-(4-chlorfenyl)-5-(isopropylsulfanyl)tetrazol |
| T 1103* | 4-Cl | 5-allyl | 1-(4-chlorfenyl)-5-(allylsulfanyl)tetrazol |

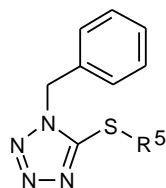
1-fenyl-5- (benzylsulfanyl)tetrazoly

| | | | |
|---|---|----------------------|---|
| 1-fenyl-5- (benzylsulfanyl)tetrazoly |  | | |
| | R³ | R⁴ | |
| T 3701 | H | 4-Cl | 1-fenyl-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |

| | | | |
|--------|---------------------|--------------------|---|
| T 3702 | H | 4-NO ₂ | 1-fenyl-5-[(4-nitrobenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3703 | H | 4-CF ₃ | 1-fenyl-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3704 | H | 4-OCH ₃ | 1-fenyl-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3705 | 4-Cl | 4-Cl | 1-(4-chlorfenyl)-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3707 | 4-Cl | 4-CF ₃ | 1-(4-chlorfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3708 | 4-Cl | 4-OCH ₃ | 1-(4-chlorfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3709 | 4-Cl | 3-OCH ₃ | 1-(4-chlorfenyl)-5-[(3-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3710 | 3,4-Cl ₂ | 4-Cl | 1-(3,4-dichlorfenyl)-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3712 | 3,4-Cl ₂ | 4-CF ₃ | 1-(3,4-dichlorfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3713 | 3,4-Cl ₂ | 4-OCH ₃ | 1-(3,4-dichlorfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3714 | 4-CH ₃ | 4-Cl | 1-(4-methylfenyl)-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3716 | 4-CH ₃ | 4-CF ₃ | 1-(4-methylfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3717 | 4-CH ₃ | 4-OCH ₃ | 1-(4-methylfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3718 | 4-OCH ₃ | 4-Cl | 1-(4-methoxyfenyl)-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3720 | 4-OCH ₃ | 4-CF ₃ | 1-(4-methoxyfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3721 | 4-OCH ₃ | 4-OCH ₃ | 1-(4-methoxyfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3722 | H | H | 1-fenyl-5-(benzylsulfanyl)tetrazol |
| T 3723 | 4-Cl | H | 1-(4-chlorfenyl)-5-(benzylsulfanyl)tetrazol |
| T 3724 | 3,4-Cl ₂ | H | 1-(3,4-dichlorfenyl)-5-(benzylsulfanyl)tetrazol |
| T 3725 | 4-CH ₃ | H | 1-(4-methylfenyl)-5-(benzylsulfanyl)tetrazol |
| T 3726 | 4-OCH ₃ | H | 1-(4-methoxyfenyl)-5-(benzylsulfanyl)tetrazol |
| T 3727 | H | 4-CH ₃ | 1-fenyl-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3728 | 4-Cl | 4-CH ₃ | 1-(4-chlorfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3729 | 3,4-Cl ₂ | 4-CH ₃ | 1-(3,4-dichlorfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3730 | 4-CH ₃ | 4-CH ₃ | 1-(4-methylfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3731 | 4-OCH ₃ | 4-CH ₃ | 1-(4-methoxyfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3735 | 4-Br | H | 1-(4-bromfenyl)-5-(benzylsulfanyl)tetrazol |
| T 3736 | 4-Br | 4-Cl | 1-(4-bromfenyl)-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3737 | 4-Br | 4-CF ₃ | 1-(4-bromfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3738 | 4-Br | 4-OCH ₃ | 1-(4-bromfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3739 | 4-Br | 4-CH ₃ | 1-(4-bromfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol |

| | | | |
|--------|---------------------|------|--|
| T 3740 | 4-Br | 4-F | 1-(4-bromfenyl)-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3741 | H | 4-F | 1-fenyl-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3742 | 4-Cl | 4-F | 1-(4-chlorfenyl)-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3743 | 3,4-Cl ₂ | 4-F | 1-(3,4-dichlorfenyl)-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3744 | 4-CH ₃ | 4-F | 1-(4-methylfenyl)-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3745 | 4-OCH ₃ | 4-F | 1-(4-methoxyfenyl)-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |
| T 3746 | 4-Cl | 3-Cl | 1-(4-chlorfenyl)-5-[(3-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol |

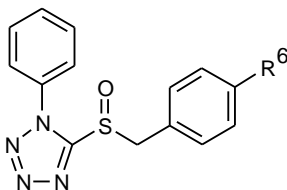
1-benzyl-5-(alkylsulfanyl)tetrazoly



R⁵

| | | |
|---------|-----------------------------------|--|
| T 3732* | C ₂ H ₅ | 1-benzyl-5-(ethylsulfanyl)tetrazol |
| T 3733* | iso-C ₃ H ₇ | 1-benzyl-5-(isopropylsulfanyl)tetrazol |
| T 3734* | benzyl | 1-benzyl-5-(benzylsulfanyl)tetrazol |

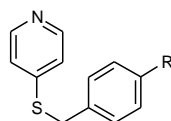
Sulfoxyderivát tetrazolu



R⁶

| | | |
|--------|-----------------|---|
| T 3753 | CF ₃ | 1-fenyl-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfoxy]tetrazol |
|--------|-----------------|---|

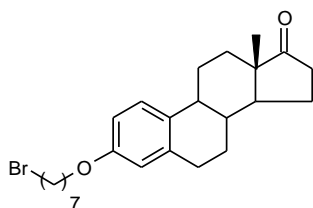
Deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridinu



R

| | | |
|----------|-----------------|-------------------------------------|
| T 3120** | H | 4-(benzylsulfanyl)pyridin |
| T 3125** | Cl | 4-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]pyridin |
| T 3126** | CH ₃ | 4-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]pyridin |

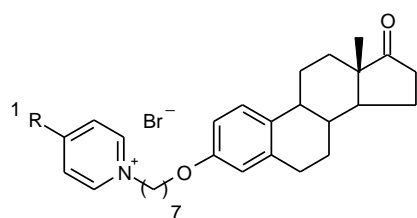
Hybridní molekuly



S01

3-(ω-Bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on

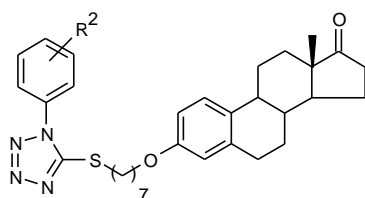
**Pyridiniové soli
hybridních molekul**



R¹

| | | |
|-----|------------------------|--|
| S02 | benzylsulfanyl | 4-Benzylsulfanyl-1-[(17-Oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid |
| S03 | H | 1-[(17-Oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid |
| S04 | 4-chlorbenzylsulfanyl | 4-(4-Chlorbenzylsulfanyl)-1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid |
| S10 | 4-methylbenzylsulfanyl | 4-(4-Methylbenzylsulfanyl)-1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid |

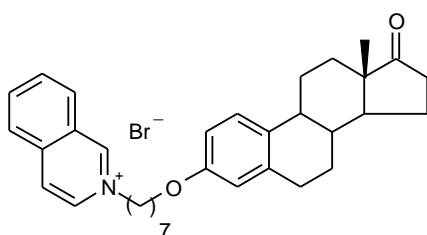
**Hybridní molekuly
tetrazolu**



R²

| | | |
|-----|---------------------|--|
| S05 | 4-CH ₃ | 3-(7'-[1-(4-Methylfenyl)-5-tetrazolylthio]heptyloxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on |
| S06 | H | 3-(7'-[1-Fenyl-5-tetrazolylthio]heptyloxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on |
| S07 | 4-Cl | 3-(7'-[1-(4-Chlorfenyl)-5-tetrazolylthio]heptyloxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on |
| S08 | 3,4-Cl ₂ | 3-(7'-[1-(3,4-Dichlorfenyl)-5-tetrazolylthio]heptyloxy)-estra-1,3,5(10)-trien--17-on |

**Chinoliniová sůl
hybridní molekuly**



| | | |
|-----|--|--|
| S13 | | 1-[(17-Oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-quinolinium bromid |
|-----|--|--|

* látky dříve připravené doc. Jiřím Kunešem (Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta UK), zahrnuté do aktuálního testování biologické aktivity a sledování vztahů mezi strukturou a účinkem

** látky dříve připravené Ing. Janou Klimešovou (Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta UK), použité jako meziprodukty syntézy hybridních molekul

1. Úvod

Tuberkulóza se vrací v nové, mnohem smrtelnější podobě. Obyvatelstvo je v současné době touto chorobou ohroženo nejvíc od druhé světové války. Upozorňují na to odborníci Světové zdravotnické organizace a dalších zdravotnických agentur.¹

Pro znázornění vážnosti současné situace se uvádí, že např. ve střední Asii tuberkulózou každý rok onemocní řádově milion lidí. Stále více mykobakteriálních kmenů je přitom odolných vůči hlavním používaným lékům. Odolnost nových kmenů choroby tak vytváří velmi složitou a nebezpečnou situaci.

Jedním z faktorů, které se na zvýšení výskytu tuberkulózy podílí je migrace obyvatelstva z východní Evropy a střední Asie, která zvyšuje riziko šíření kmenů odolných vůči lékům. Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí, zdravotnické agentury i nevládní organizace proto vyzývají evropské vlády, aby zintenzívnily úsilí v boji proti tuberkulóze.

2. Cíl práce

Pracovní skupina prof. Waissera a doc. Klimešové na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy se již řadu let zabývá výzkumem nových antimykobakteriálně účinných látek. Byly zde nalezeny některé nové farmakofory antimykobakteriální aktivity, jakým je například alkylsulfanyl skupina vázaná na elektronově deficitním atomu uhlíku v heterocyklech² (např. u látek ze skupiny 5-alkylsulfanyltetrazolů^{2,3,4} nebo 4-alkylsulfanylpyridinů⁵).

Tato práce navazuje na výzkum J. Kuneše,⁶ který se zabýval syntézou a biologickým hodnocením skupiny derivátů 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolu. Tyto látky jsou v rámci současné studie rozšířeny o deriváty 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazolu a jedním z cílů je objasnit vliv záměny alkylsulfanylskupiny za benzylsulfanylskupinu na případnou biologickou aktivitu.

V nedávné době byla dále pozorována antibakteriální a antiproliferativní aktivita u látek typu ω -pyridiniumalkyletherů steroidních fenolů.⁷ Tohoto poznatku využívá spolupracující pracoviště (Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) v Německu. V rámci stáže na tomto pracovišti byly připraveny hybridní sloučeniny obsahující na steroidním jádře na kyslíku vázaný polymethylenový můstek nesoucí různé heterocyklické skupiny. Výběr heterocyklů inkorporovaných do struktury těchto hybridních sloučenin vycházel z látek dříve připravených na našem pracovišti, které samy o sobě vykazovaly slibnou antimykobakteriální aktivitu s cílem zjistit, zda navázáním na steroidní skelet dojde ke zvýšení biologické aktivity.

U připravených látek se zjišťuje především antimykobakteriální aktivita. U derivátů připravených v rámci stáže v Jeně byla hodnocena navíc také aktivita proti vybraným bakteriálním kmenům (Leibnitz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans – Knöll – Institut, Beteiligung FSU Jena, Institut für Mikrobiologie). Před několika lety se navíc zjistilo, že některé sloučeniny s antimykobakteriální aktivitou mají srovnatelně dobrou aktivitu antifungální.^{8,9,10} Cílem práce je tedy též při studiu antimykobakteriální aktivity připravených látek stanovení antifungální aktivity proti některým kvasinkám a vláknitým houbám.

Posledním cílem je pak shrnutí získaných výsledků ve formě vyjádření vztahů mezi strukturou a účinkem u studovaných látek, a to jak obecně, tak i formou výpočtů (QSAR).

3. Teoretická část

3.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza je celosvětově rozšířené onemocnění postihující všechny věkové kategorie a zasahující všechny orgány, především pak plíce. Původcem jsou bakterie rodu *Mycobacterium*. Choroba se přenáší kapénkovou infekcí a její výskyt je spojen velmi často se špatnými sociálními a hygienickými podmínkami. Specifickou skupinu ohrožených tvoří lidé s defekty imunity, zejména ve spojení s AIDS.¹¹

Předpoklad úplné eradikace tuberkulózy v průmyslově vyspělé části světa na konci 20. století se bohužel nepotvrdil. Stav výskytu je nepříznivě ovlivněn rezistencí mykobakteriálních kmenů na současná antituberkulotika, sníženou přirozenou obranyschopností obyvatelstva spojenou hlavně se vzestupem infekcí HIV, změnou socioekonomických podmínek, zvýšenou migrací lidí s vyšší incidencí tuberkulózy a také administrativními změnami v dohledu nad tímto onemocněním.

V roce 1986 bylo zrušeno hromadné očkování proti tuberkulóze novorozenců ve východních a středních Čechách, od roku 1989 také v bývalém Jihočeském kraji. Celkem do konce roku 1993 nebylo očkováno kolem 200 000 novorozenců. Výsledky z tohoto období dopadly špatně a došlo k nárůstu tuberkulózy u dětí, jedno dítě dokonce na nepoznanou tuberkulózu zemřelo. Proto od počátku roku 1994 bylo znovu zavedeno povinné očkování novorozenců v ČR.

Z tohoto důvodu je stále velmi aktuální výzkum nových antituberkulotik.

3.1.1 Specifita mykobakteriálních kmenů

Bakterie rodu *Mycobacterium* patří mezi gram-pozitivní nepohyblivé pleiomorfnní tyčinky. Tuberkulózu u člověka způsobují pouze některé kmeny zařazené do komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (patří sem: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microtii*). Ostatní mykobakteria jsou pak řazena mezi tzv. netuberkulózní kmeny. Onemocnění ptáků způsobuje komplex *M. avium* (zahrnující kmeny: *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. silvaticum* a *M. intracellulare*). Mikroorganismy z tohoto komplexu jeví nízkou patogenitu. Onemocnění v lidské populaci jsou vzácná, avšak zpravidla končí fatálně. Posledním komplexem je *M. fortuitum*. Samostatně pak stojí druh *M. leprae*, původce lepry u člověka.¹²

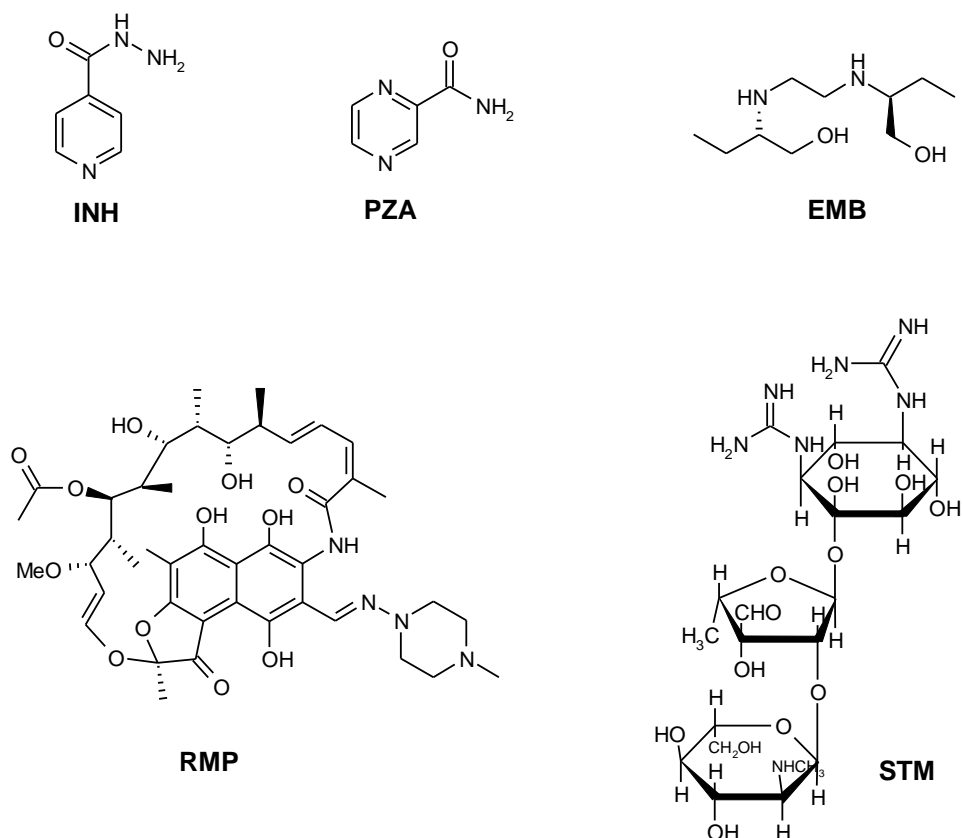
Jednou z charakteristických vlastností tohoto patogena je unikátní stavba mykobakteriální buněčné stěny, jejíž složky se významným způsobem podílejí na virulenci. Na rozdíl od buněčné stěny jiných gram-negativních a gram-positivních bakterií se mykobakteriální buněčná stěna vyznačuje vysokým obsahem lipidů, které jí dodávají extrémní hydrofobicitu. Ta je způsobena vrstvou mykolových kyselin, které jsou zpravidla vázány na lipopolysacharidy poutané na peptidoglykan. Dále velká část lipidů se nachází ve formě lipoproteinů. Lipidy mykobakterií obsahují vázané různé rozvětvené kyseliny, to znamená, že ani příslušné vosky a tuky nemají běžnou strukturu. Vyznačují se vysokou molekulovou hmotností. Tuky mají místo glycerolu, jako alkoholickou složku disacharid trehalosu.¹³ Vysoká lipofilita buněčné stěny mykobakterií se zdá být jednou z příčin, proč proti tuberkulóze nepůsobí běžná antibakteriální chemoterapeutika. Na druhou stranu řada specifických antituberkulotik zasahuje právě na úrovni inhibice syntézy mykolových kyselin.¹⁴

Léčba tuberkulózy je dále často ztížena přítomností tzv. "spících bacilů" (dormant forms), které jsou metabolicky inaktivní a díky tomu na ně nepůsobí žádná chemoterapeutika. Tyto bakterie mohou v hostiteli přežívat roky po vyléčení a způsobovat závažné recidivy.

3.1.2 Strategie léčby tuberkulózy a současná antituberkulotika

Tuberkulóza je léčitelná pomocí dostupných antituberkulotik, léčba je však v každém případě dlouhodobá (délka podávání se uvádí 4-12 měsíců) a pro pacienta značně zatěžující. U většiny z používaných léčiv je jejich podávání spojeno s nezanedbatelnou toxicitou a nezřídka vede k rozvoji rezistence. V současnosti se setkáváme i s tzv. multirezistentními kmeny mykobakterií. Z tohoto důvodu je při léčbě tuberkulózy používána vždy buď troj- nebo čtyřkombinace antituberkulotik.

Mezi léčiva 1. volby patří izoniazid (INH), rifampicin (RMP), pyrazinamid (PZA), streptomycin (STM) a ethambutol (EMB), obr. 1.¹⁵



Obr. 1. Struktury antituberkulotik 1. volby.

V případě, že dojde k rozvoji rezistence a léčba selhává, případně se u pacienta projeví příznaky intolerance k jednomu nebo více léčivům 1. volby, přicházejí na řadu léčiva druhé linie, mezi něž se řadí: ethionamid, cykloserin, aminoglykosidy (kanamycin, amikacin, kapreomycin), tetracykliny, fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin), thioacetazon nebo kyselina para-aminosalicylová (PAS). Obecně jsou však tato léčiva buď méně účinná nebo vykazují závažnější vedlejší účinky.

Stručná charakteristika některých používaných antituberkulotik a mechanismus jejich účinku jsou shrnuty v tabulce 2.^{15,16}

Tab. 2. Příklady používaných antituberkulotik.

| látka | MIC (µg/ml) | mechanismus účinku | nežádoucí účinky | způsob podání |
|------------|-------------|-------------------------------------|--|---------------|
| izoniazid | 0,01-0,20 | inhibice syntézy mykolových kyselin | neurotoxická, hepatotoxická | p.o. |
| rifampicin | 0,05-0,50 | inhibice syntézy RNA | vzestup jaterních aminotransferáz, zažívací potíže, poškození krevetvorby, ledvin, CNS | p.o. |

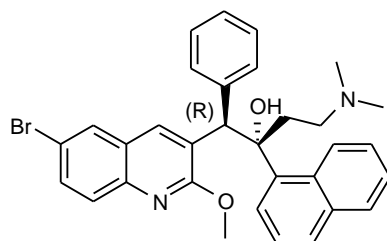
| | | | | |
|-----------------|----------------------|---|---------------------------------|------|
| pyrazinamid | 20-100 (pH 5,5-6) | inhibice energ. metabolismu na membránách | hepatotoxicita, hyperurikémie | p.o. |
| ethambutol | 1-5 | inhibice syntézy arabinogalaktanu do b. stěny | poškození očního nervu (vzácně) | p.o. |
| streptomycin | 2-8 | inhibice proteosyntézy | ototoxicita, nefrotoxicita | i.m. |
| kanamycin | 1-8 | inhibice proteosyntézy | ototoxicita, nefrotoxicita | i.m. |
| kapreomycin | 4 | inhibice proteosyntézy | ototoxicita, nefrotoxicita | i.m. |
| fluorochinolony | 0,2-4,0 | inhibice syntézy DNA | | |
| ethionamid | 0,6-2,5 | inhibice syntézy mykologických kyselin | zažívací potíže, neurotoxicita | p.o. |
| PAS | 1-8 | inhibice syntézy kyseliny listové | | |

MIC - minimální inhibiční koncentrace

Vzrůstající hrozba vzniku nových multirezistentních kmenů vede k vývoji nových skupin antituberkulotik zejména s novými mechanismy účinku. Následující látky patří mezi nové molekuly se slibným antituberkulotickým účinkem.

Diarylchinolin

Deriváty diarylchinolinu zkoumali Andries a kol.¹⁷ Mezi připravenými látkami byl nejúčinnější derivát R207910, označovaný jako látka J (obr. 2)



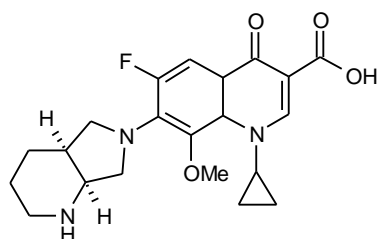
Obr. 2. Derivát diarylchinolinu R207910, látka J.

Jeho vysoká aktivita (MIC 0,03 $\mu\text{g/ml}$ pro *M. tuberculosis*) a také účinnost proti multirezistentním kmenům jej řadí mezi nejslibnější léčiva. Tato látka působí na základě nového mechanismu účinku - inhibice mykobakteriální F1F0 ATP syntetázy.

Nevykazuje zatím závažnější nežádoucí účinky a v současnosti je v klinickém hodnocení.

Nové fluorochinolony

Mezi nové deriváty ze skupiny fluorochinolonů patří moxifloxacin (obr. 3) a gatifloxacin.^{18,19,20} Tyto látky vykazují delší poločas a také vyšší aktivitu proti *M. tuberculosis* než původní ofloxacin, který se běžně používá jako jedno z léčiv druhé volby. Studie na myších prokázaly, že kombinace moxifloxacinu s PZA a RMP byla efektivnější než standardní kombinace INH + PZA + RMP a mohla by vést ke zkrácení léčby tuberkulózy. Obě zmíněné látky jsou v klinickém hodnocení.

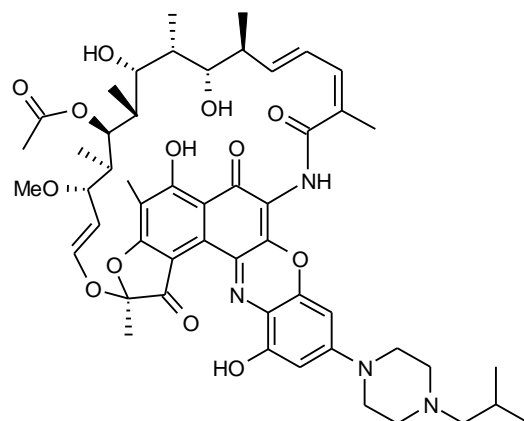


Obr. 3. Moxifloxacin

Deriváty rifampicinu

Nové deriváty rifampicinu (rifapentin, rifabutin a rifalazil), byly připraveny s cílem zvýšit antimykobakteriální aktivitu a dále prodloužit jejich poločas. Rifapentin byl v roce 1998 schválen FDA (Food and Drug Administration) pro léčbu tuberkulózy a zdá se být bezpečným a dobře tolerovaným léčivem s možností podávání jednou týdně.¹⁵

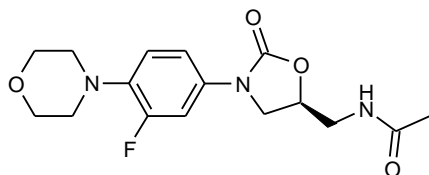
Rifalazil (označovaný jako benzoxazinorifamycin nebo také látka KRM1648, obr. 4) má poměrně dlouhý poločas a vykazuje vysokou aktivitu proti širokému spektru intracelulárních bakterií (kromě *M. tuberculosis* a *M. avium* také *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* a *Helicobacter pylori*).²¹ Nevýhodou je zkřížená rezistence s rifampicinem.²² Ve vyšších dávkách způsobuje chřipkové symptomy a poruchy krevního obrazu.²³



Obr. 4. Rifalazil (KRM1648)

Oxazolidinony

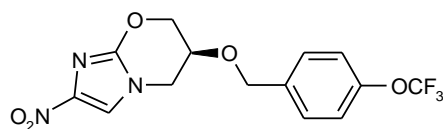
Oxazolidinony představují novou skupinu látek účinných proti celé řadě gram-pozitivních bakterií včetně *M. tuberculosis*. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici proteosyntézy vazbou na rRNA v 50S podjednotce ribozómu.²⁴ Do této skupiny látek patří linezolid (obr. 5), který by schválen FDA pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními gram-pozitivními bakteriemi. V terapii multirezistentní tuberkulózy se linezolid používá v kombinaci s dalšími léčivy. Jeho dlouhodobé podávání však může způsobovat anémii a periferní neuropatii.



Obr.5. Linezolid.

Nitroimidazopyran PA-824

Derivát 5-nitroimidazolu označovaný jako PA-824 (obr. 6) je vysoce aktivní proti *M. tuberculosis* a to i proti multirezistentním kmenům. Samotná látka je proléčivem, které je převedeno na aktivní formu pomocí bakteriálních enzymů F420-dependentní glukózo-6-fosfát dehydrogenázy a nitroreduktázy. Aktivní forma léčiva pak inhibuje syntézu mykolových kyselin a bakteriální proteosyntézu.²⁵

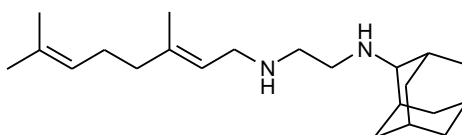


Obr. 6. Nitroimidazopyran PA-824

Další nová antituberkulotika

Jako potenciální nová antituberkulotika se objevují také léčiva používaná pro léčbu jiných onemocnění, jako například antifungální azoly, fenothiaziny (chlorpromazin, thioridazin) nebo klofazimin.^{15,26,27}

Nový analog ethambutolu, látka SQ109 (obr. 7), vykazuje asi desetkrát lepší aktivitu proti *M. tuberculosis* ve srovnání s původním ethambutolem. Uvažuje se také o tom, že nové deriváty ethambutolu účinkují na základě jiného mechanismu účinku než je tomu u předlokové látky.²⁸



Obr. 7. Analog ethambutolu SQ109.

3.1.3 Nové přístupy k léčbě tuberkulózy

Pro vývoj nových léčiv proti tuberkulóze se v dnešní době používají také poznatky z oblasti podrobné patogeneze choroby. Například je známo, že ztekucení nekrotických ložisek je klíčovým bodem při šíření choroby kapénkovou infekcí. Zastavení tohoto procesu by tedy mělo vést k tomu, že bakterie přítomné v ložisku by nebyly vykašlávány a mohlo by se tím omezit nebo úplně zastavit šíření nemoci.¹⁵

Díky znalosti mykobakteriálního genomu a díky moderním nástrojům genetiky a molekulární biologie je možné navrhovat nové cíle zásahu potenciálních antituberkulotik. Současná léčiva se zaměřují především na inhibici syntézy DNA, RNA, buněčné stěny nebo inhibici energetického metabolismu (viz. tab. 1). Mezi nové cíle patří například geny zapojené do různých metabolických drah identifikované jako tzv. esenciální geny (tzn. geny, jejichž "vypojení" vede k zastavení růstu).

3.2 Mykotická onemocnění

Houbové infekce (mykózy) jsou charakterizovány kolonizací a následnou proliferací houby ve tkáních nebo v tělních tekutinách hostitele, které mají za následek jeho poškození. Mykózy se dají dělit podle různých kritérií. Základní dělení rozlišuje infekce lokalizované a systémové (diseminované, generalizované). Podle anatomické lokalizace se popisují mykózy povrchové (kdy je zasažena pouze nejsvrchnější vrstva kůže, stratum corneum a kutikula vlasů), kožní (dermatomykózy, postihující keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly a nehtové lůžko a valy), podkožní (obvykle podmíněné traumatickou inokulací mykotického agens) a systémové (hluboké, viscerální, orgánové, u těch je nebezpečí přechodu do septického stavu a to zvláště u imunoalterovaných pacientů).¹¹

U pacientů s oslabenou imunitou způsobují nejčastější houbové nákazy houby rodu *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* a další oportunní houby.²⁹

Léčba systémových mykóz představuje vždy závažný terapeutický problém. Narozdíl od bakterií patří houby mezi eukaryota. Podobnost s hostitelskými buňkami, tj. nedostatek odlišných struktur jako cílů zásahu, je jednou z hlavních překážek při vývoji nových selektivně působících antifungálních látek s nízkou toxicitou u člověka.^{11,30,31} Jedním ze základních využívaných rozdílů je přítomnost ergosterolu v buněčné membráně hub, narozdíl od savčích membrán, které obsahují cholesterol.

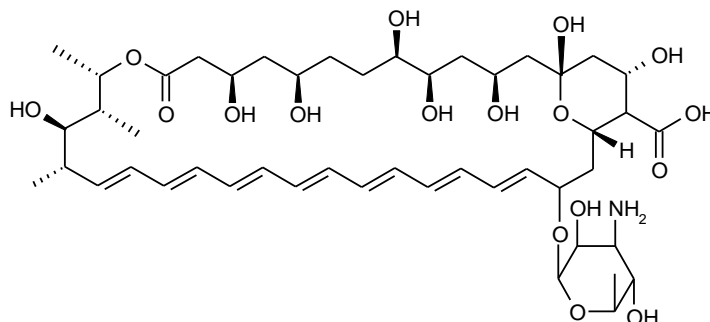
3.2.1 Antimykotika

Z důvodů zmíněných výše, tedy podobnosti buňky parazita a hostitele, je v současné době spektrum používaných antifungálních látek poměrně úzké. Cílem zásahu na molekulární úrovni je především již zmíněný ergosterol (složka houbové buněčné membrány, která zajišťuje její optimální fluiditu, asymetrii a integritu), méně často pak nukleové kyseliny a buněčná stěna hub. Nové mechanismy účinky jsou popisovány u nových skupin léčiv.

3.2.1.1 Látky interagující s membránovým ergosterolem

Polyenová antimykotika obsahují makrolidový kruh o 26-28 uhlících se systémem konjugovaných dvojných vazeb, laktonovou funkční skupinou a několika hydroxyly. Nejpoužívanějším zástupcem je amfotericin B (obr. 8), který se váže na membránový ergosterol a tím vytváří v membráně hub póry, jimiž z buňky uniká

cytoplazmatický obsah, což vede k buněčné smrti.³² Bohužel je poměrně dost toxický, protože nedokáže dokonale rozlišit ergosterol od cholesterolu přítomného v savčích membránách. Z nežádoucích účinků jsou nejzávažnější nefrotoxicita a neurotoxicita. Toxicita amfotericinu B může být snížena jeho podáváním v lékových formách založených na lipozomech nebo ve formě koloidní disperze jeho komplexu s cholesteryl-sulfátem.³³

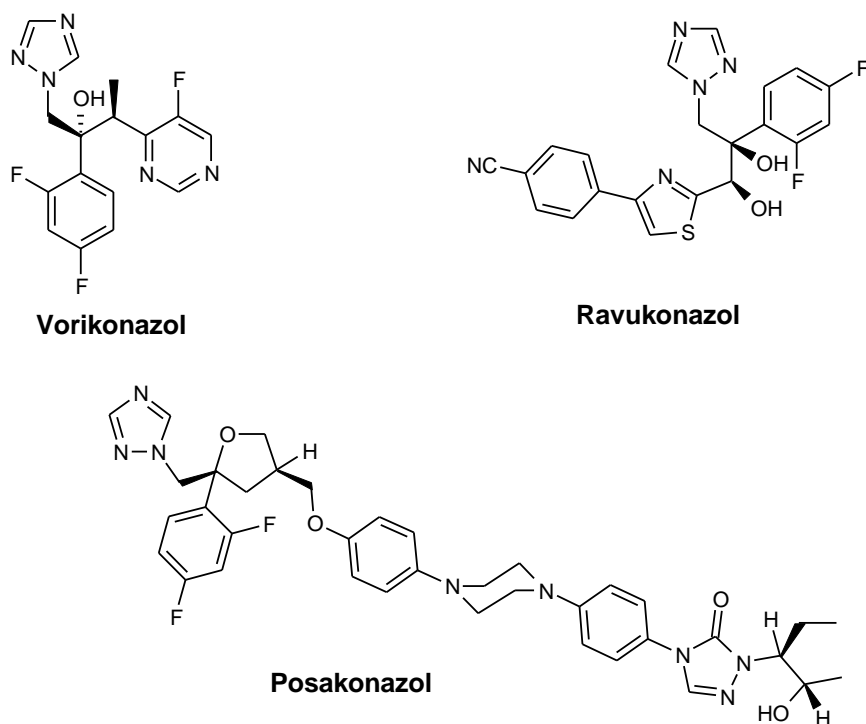


Obr. 8. Amfotericin B.

Dalšími polyenovými antimykotiky jsou nystatin, natamycin a pimaricin které mají velmi podobný mechanismus účinku jako amfotericin B.

3.2.1.2 Látky inhibující biosyntézu ergosterolu

Azolová antimykotika zahrnují skupinu derivátů imidazolu (ketokonazol, mikonazol) a triazolu (starší látky: flukonazol a itrakonazol, novější: vorikonazol, ravukonazol, posakonazol a albakonazol, obr. 9). Starší imidazolové deriváty inhibovaly několik membránově vázaných enzymů a biosyntézu membránových lipidů. Novější deriváty triazolu vykazují účinek specifitější, a to inhibici lanosterol-14- α -demethylázy mikrozomálního systému P-450.³⁴ Systémově se používají ketokonazol a mikonazol, které se prakticky nemetabolizují a proto dosahují vysokých koncentrací ve tkáních, málo však pronikají do CNS na rozdíl od flukonazolu nebo itrakonazolu, které do CNS pronikají dobře. Ostatní deriváty (ekonazol, klotrimazol, izokonazol) se používají jen místně, protože po biotransformaci nedosáhnou dostatečně vysokých plazmatických hladin použitelných k systémovému účinku. Mají dobrou toleranci a relativně malé nežádoucí účinky.



Obr. 9. Vybraná novější azolová antimykotika.

Allylaminová antimykotika (terbinafin a naftifin) inhibují biosyntézu ergosterolu na úrovni skvalen-epoxidázy. Mají poměrně široké spektrum účinku a podávají se při léčbě onychomykóz a dermatomykóz.³⁵

Tolnaftát a **tolciklát** jsou odvozeny od kyseliny thiokarbamové a rovněž inhibují skvalen-epoxidázu. Mají úzké spektrum účinku na některé dermatofyty a aplikují se pouze topicky.

3.2.1.3 Látky inhibující syntézu nukleových kyselin

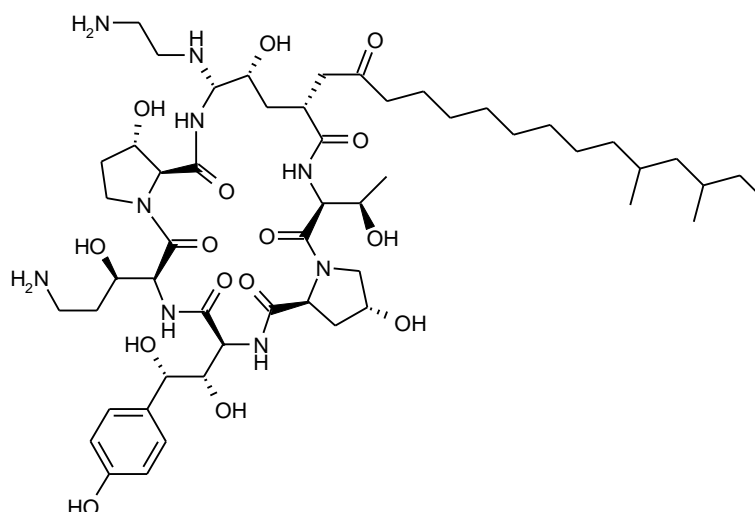
Flucytosin je pyrimidinový antimetabolit. Po vstupu do houbové buňky dochází k jeho deaminaci na 5-fluorouracil, fosforylaci a inkorporaci do RNA. Tím je narušena jak syntéza RNA tak proteosyntéza.³² Flucytosin má poměrně široké spektrum a používá se u generalizovaných kandidóz a kryptokokóz.

Mezi nové látky, které jsou v současnosti v různých fázích klinického hodnocení patří například **yatakemycin**³⁶ (působící na základě alkylace DNA) nebo **icofungipen**³⁷ (látka BAY 10-8888, inhibuje isoleucyl-tRNA syntetázu).

3.2.1.4 Látky působící na buněčnou stěnu hub

Buněčná stěna je třetím důležitým cílem zásahu antifungálních látek. U hub obsahuje mannoproteiny, chitin, alfa- a beta-glukany a její složení je unikátní, což poskytuje možnost selektivnějšího působení léčiva ve srovnání s léčivy s jinými mechanismy účinku.

Echinokandiny^{29,38} tvoří poměrně novou skupinu antimykotik, které působí na základě inhibice syntézy beta-glukanu. Vykazují jak účinek fungistatický, kdy je růst potlačen inhibicí tvorby buněčné stěny, tak i fungicidní, kdy změna integrity buněčné stěny snižuje její mechanickou odolnost. Nevýhodou je špatná dostupnost po perorálním podání, musí být tedy podávány intravenózně. Do této skupiny patří caspofungin (obr. 10), micafungin a anidulafungin.^{39,40,41}



Obr. 10. Caspofungin.

Nikkomyliny⁴² naproti tomu inhibují chitin syntetázu. Jejich nevýhodou je poměrně úzké spektrum, jejich účinek je omezen na buňky s vysokým obsahem chitinu.

3.2.1.5 Látky určené pro lokální použití

Ciklopiroxolamin je N-hydroxypyridonový derivát soli aminoethanolu inhibující proteosyntézu. Výhodou je široké spektrum a nízká toxicita. S výhodou je používán při smíšených houbových a bakteriálních infekcích.

Zvláštním případem je **griseofulvin**, derivát benzofuranu, který se podává perorálně, je však specificky vychytáván do keratinizované tkáně, kde se kumuluje.

Působí jako mitotický jed, tzn. interferuje s mikrotubulárními proteiny a zabraňuje tak buněčnému dělení. Používá se převážně u onychomykóz.¹¹

3.2.2 Nové mechanismy účinku antifungálních látek

Jedním z nových cílů zásahu antimykotik je N-myristoylace (jedna z post-translačních modifikací některých fungálních proteinů), která se zdá být nutná pro přežití např. *C. albicans* nebo *Cryptococcus neoformans*.²⁹ Tímto mechanismem nejspíše účinkují popisované deriváty **aminobenzothiazolu**⁴³ nebo **benzofuranu**.⁴⁴

Do biosyntézy sfingolipidů zasahují další skupiny antimykotik. Patří sem např. **aureobasidiny** (basifungin, aureobasidin), které inhibují inositol-fosforylceramid syntetázu, **fuminisiny** a **australifungin**, které inhibují ceramid syntetázu nebo **sfingofunginy** a **viridofunginy** inhibující palmitoyltransferázu.²⁹

Další novou skupinou jsou **sordariny**, které blokují selektivně fungální (ne však savčí) translační elongační faktor 2, protein účastnící se proteosyntézy. Výhodou je poměrně široké spektrum a také specifita účinku.²⁹

3.3 Kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou (QSAR)

Kvantitativní hodnocení vztahů mezi strukturou studovaných chemických sloučenin a biologickou aktivitou (QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships) se provádí, pokud biologická aktivita představuje určitou kvantitativní odezvu.⁴⁵ Na našem pracovišti je nejčastěji používána metoda regresní analýzy.

Základem takové QSAR analýzy v sérii n strukturálně podobných látek je řešení regresní rovnice. Metoda hledá parametry a_i statistického modelu (rovnice 1), ve kterém je biologická aktivita y funkcí nezávisle proměnných x_j (viz dále).

$$y_i = a_0 + a_1x_{1i} + a_2x_{2i} + \dots + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, n \quad (1)$$

Regresní koeficienty a_i (a_0, a_1, a_2, \dots), se získají výpočtem tak, aby se minimalizovala hodnota koeficientu ε_i . Hodnocení je dále doplněno statistickým rozbořem (r - koeficient vícenásobné korelace, s - směrodatná odchylka, F - hodnota Fisher-Snedecorova testu, n - počet látek v analyzované skupině).

Podle druhu proměnných x se metody QSAR založené na regresní analýze dělí na metodu Hanschovu a Free-Wilsonovu.

3.3.1 Hanschova metoda

Hanschova metoda⁴⁶ používá za parametry x fyzikálně-chemické a fyzikální vlastnosti studovaných látek. Patří sem jednak hydrofobní parametry (např. log P), dále elektronové a sterické parametry. Hydrofobní parametr se může v rovnici vyskytnout také v druhé mocnině. Hanschovu rovnici (2) lze dále také doplnit indikátorovými proměnnými (viz dále) pro vystižení určitých strukturních rozdílů v hodnocené sérii látek.

$$y = a_0 + a_1 (\text{hydrofobní p.})^2 + a_2 (\text{hydrofobní p.}) + a_3 (\text{elektronový p.}) + a_4 (\text{sterický p.}) \quad (2)$$

3.3.2 Free-Wilsonova metoda

Free-Wilsonova⁴⁷ metoda (rovnice 3) je metoda pouze statistická. Je založena na předpokladu, že součet parciálních příspěvků jednotlivých substituentů na biologickou aktivitu sledované struktury je roven 0. Pro statisticky významný výsledek musí v molekule být minimálně dvě obměňovaná místa a proměnné x musí být na sobě nezávislé. Jako nezávisle proměnné metoda uvažuje přítomnost (vyjádřeno hodnotou **1**) nebo nepřítomnost (vyjádřeno hodnotou **0**) určitého substrukturálního fragmentu. Jedná se o regresní analýzu, a proto výpočet musí být doplněn statistickým hodnocením.⁴⁸ K odstranění vzájemné závislosti proměnných existují dva přístupy řešení (viz kapitoly 3.3.2.1 a 3.3.2.2).

$$y_i = a_0 + \sum_{j=1}^p \sum_{k_j=1}^{q_j} a_{jk_j} x_{ijk_j} + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, n \quad (3)$$

3.3.2.1 Řešení podle Free-Wilsona

Tento přístup zavádí tzv. symetrické rovnice (4).⁴⁷

$$\sum_{i=1}^n \sum_{k_j=1}^{q_j} a_{jk_j} x_{ijk_j} = 0 \quad j = 1, \dots, p \quad (4)$$

Jejich řešení pak předpokládá, že součet příspěvků jednotlivých substituentů k aktivitě je pro každé obměňované místo nulový. Pomocí symetrických rovnic se jeden substituent nahradí kombinací ostatních substituentů a systém rovnic se stane řešitelným. K řešení se používá jakýkoli program pro vícenásobnou regresní analýzu⁴⁹ (např.: MULTIREG)

3.3.2.2 Řešení podle Fujity a Bana⁵⁰

V tomto přístupu se místo zavádění symetrických rovnic vynechává po sestavení matice jeden sloupec (nejčastěji vodík) pro každé obměňované místo. Takto odpovídá vynechanému substituentu na konkrétním obměňovaném místě hodnota 0 a příspěvky ostatních substituentů na biologickou aktivitu se již vztahují vůči této nulové hodnotě. Záporná hodnota příspěvku naznačuje zvýšení aktivity zatímco kladná hodnota snížení aktivity oproti vynechanému substituentu.⁴⁹

3.3.3 Kombinace Hanschovy a Free-Wilsonovy metody

V případě, že se určitý substrukturální fragment (zpravidla substituent) v řešené skupině látek nevyskytuje, nelze Free-Wilsonovou metodou získat údaj o jeho aktivitě. Toto lze řešit kombinací s nějakou jinou metodou (např. přístupem podle Hansche nebo Toplisse^{51,52}). V tom případě bereme vypočtené příspěvky vlivu jednotlivých molekulových fragmentů na aktivitu jako data biologické aktivity a ty se korelují s fyzikálními a fyzikálně-chemickými parametry.

Další možností je zavedení tzv. **indikátorové proměnné**.⁴⁹ Část proměnných popisuje fyzikální vlastnosti látek a část přítomnost nebo nepřítomnost určitého substrukturálního fragmentu (indikátorová proměnná).

3.3.4 Další přístupy k řešení vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou

Kromě výše uvedených metod, které pracují pomocí zavádění regresních rovnic existují i další přístupy.¹⁴ Patří mezi ně skupina tzv. empirických metod (tzv. Fibonacciho optimalizace, optimalizace pomocí simplexů a optimalizace na základě Toplissových schémat).

Dále je možno využít chemometrie (faktorová analýza, metoda hlavní komponenty, metody tzv. pattern recognition) nebo operace logiky.

4. Metodická část

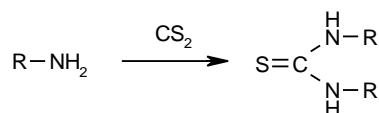
4.1 Syntéza

V rámci této práce byly připraveny následující skupiny látek: deriváty 1-aryltetrazolyl-5-thiolu, 1-aryl-5-(alkylsulfanyl)tetrazolu, 1-fenyl-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfoxy]tetrazol, 3-(ω -bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on, pyridiniové a chinoliniové soli hybridních molekul estronu a hybridní molekuly tetrazolu a estronu.

4.1.1 Možnosti přípravy tetrazolů a jejich derivátů

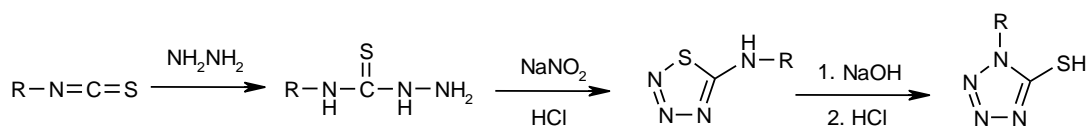
4.1.1.1 Příprava 1-alkyl resp. 1-aryltetrazolyl-5-thiolů

Syntéza podle Liebera⁵³ (obr. 11) vychází z reakce odpovídajícího aminu se sirouhlíkem, čímž vzniká 1,3-dialkyl- respektive 1,3-diaryl-2-thiomočovina, která slouží k přípravě isothiokyanatu.



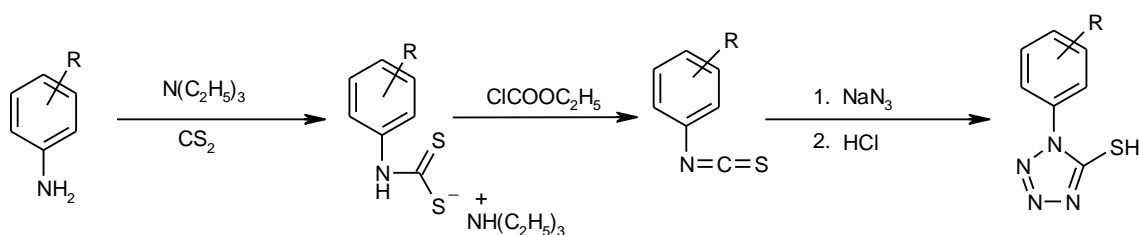
Obr. 11. Syntéza 1,3-dialkyl resp. diaryl-2-thiomočoviny dle Liebera

Chattawayova metoda,⁵⁴ je založená na destilaci substituované thiomočoviny s vodní parou v prostředí kyseliny sírové. Dalším způsobem je přístup Wernerův⁵⁵ (obr. 12) což je zahřívání substituované thiomočoviny s acetanhydridem pod zpětným chladičem. Isothiokyanat poté reakcí s hydrazinem poskytuje příslušný thiosemikarbazid, který reaguje s dusitanem sodným v kyselém prostředí za vzniku 5-alkylaminothiatriazolu, resp. 5-arylaminothiatriazolu. Poslední fází syntézy je pak zahřívání substituovaného thiatriazolu s hydroxidem sodným pod zpětným chladičem. Po okyselení kyselinou chlorovodíkovou vzniká příslušný 1-alkyl- resp. 1-aryltetrazolyl-5-thiol. Nevýhodou této syntézy je časová náročnost a nízká výtěžnost.



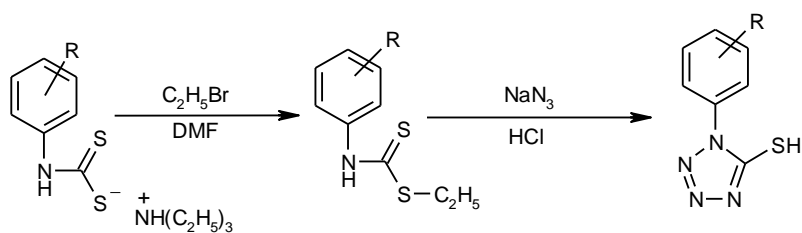
Obr. 12. Syntéza 1-alkyl resp. 1-aryltetrazolyl-5-thiolů (Wernerův přístup)

Jako optimální způsob syntézy (obr. 13) se osvědčil postup, kde v první fázi reaguje příslušný amin se sirouhlíkem a triethylaminem v bezvodém prostředí za vzniku triethylammoniové soli odpovídající dithiokarbamové kyseliny (metoda podle Hodgkinse a Reewese⁵⁶). Ve druhém stupni syntézy tato sůl reakcí s ethylchlorformiátem přechází na příslušný isothiokyanat. Výsledný 1-alkyl- resp. 1-aryltetrazolyl-5-thiol pak vzniká reakcí isothiokyanátu s azidem sodným a následným okyselením. Jedná se o metodu Altlandovu.⁵⁷ Použití tohoto způsobu přípravy alkyl-(aryl)isothiokyanátu bylo ověřeno dříve v diplomových pracích⁵⁸ na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty University Karlovy. Předpokladem pro úspěšný průběh reakce je dostatečná bazicita aminu, aby mohla proběhnout reakce se sirouhlíkem a triethylaminem.

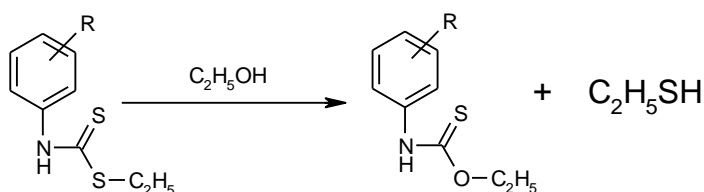


Obr. 13. Syntéza 1-alkyl resp. 1-aryltetrazolyl-5-thiolů (metoda dle Hodgkinse a Reewese, metoda Altlandova)

Další možností syntézy 1-alkyl resp. 1-aryltetrazolyl-5-thiolů je opět příprava triethylammoniové soli dithiokarbamové kyseliny podle Hodgkinse⁵⁶ (viz předch.), kde ale v dalším stupni reakcí s ethylbromidem v prostředí suchého dimethylformamidu (DMF) vzniká ethylester dithiokarbamové kyseliny (obr. 14). Ten pak reaguje s azidem sodným za vzniku odpovídajícího tetrazolyl-5-thiolu po okyselení. Nevýhodou tohoto postupu je nebezpečí konkurenční reakce - reesterifikace, ke které dochází v ethanolickém prostředí (obr. 15). Z ethylesteru dithiokarbamové kyseliny vzniká v tomto případě ethylester thiokarbamové kyseliny a tetrazolový kruh se tak neuzavírá.⁵⁸



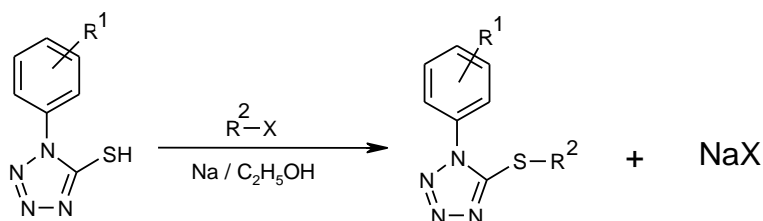
Obr. 14. Syntéza 1-aryltetrazolyl-5-thiolů



Obr. 15. Konkurenční reakce (reesterifikace)

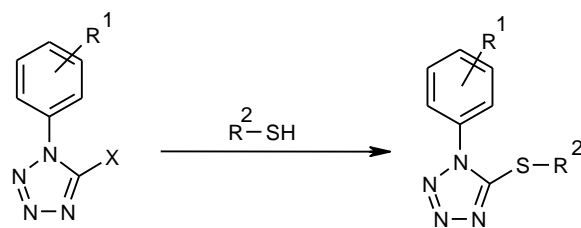
4.1.1.2 Příprava 1-alkyl resp. 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolů

Existuje opět několik způsobů přípravy. Jedním z nich je alkylace sodné soli příslušného tetrazolylthiolu vznikajícího jeho rozpuštěním v alkoholátu sodném^{59,60} alkyhalogenidem (obr. 16).



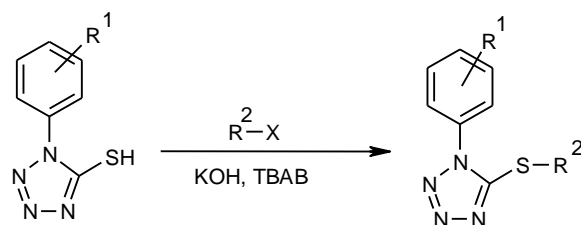
Obr. 16. Příprava 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolů (alkylace sodné soli tetrazolylthiolu alkyhalogenidem)

Dále je možné použít k přípravě 5-alkylsulfanylderivátů reakce příslušného 5-halogenderivátu tetrazolu s alkythiolem, resp. alkythiolátem⁶¹, (obr. 17).



Obr. 17. Příprava 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolů (reakce 5-halogenderivátu tetrazolu s alkylthiolem, resp. alkylthiolátem)

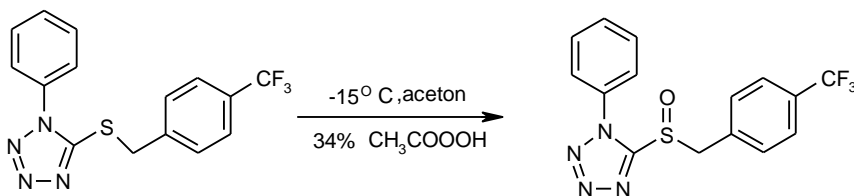
Optimální metodou se ukázal být postup přípravy 1-alkyl resp. 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolů, kde 1-alkyl resp. 1-aryltetrazolyl-5-thiol reagoval s alkylhalogenidem za přítomnosti katalyzátorů fázového přenosu. Jako katalyzátor fázového přenosu se uplatnil tetrabutylammonium-bromid (TBAB, obr. 18).



Obr. 18. Alkylace tetrazolů za použití katalyzátoru fázového přenosu

4.1.1.3 Příprava 1-aryl-5-(benzylsulfoxy)tetrazolů

Oxidací 34% peroxooctovou kyselinou lze z 1-aryl-5-(benzylsulfanyl)tetrazolů připravit příslušné 1-aryl-5-(benzylsulfoxy)tetrazoly (obr. 19). Podmínkou reakce je zachování reakčních teploty -15°C z důvodu, aby nedocházelo ke vzniku sulfonů.⁶²

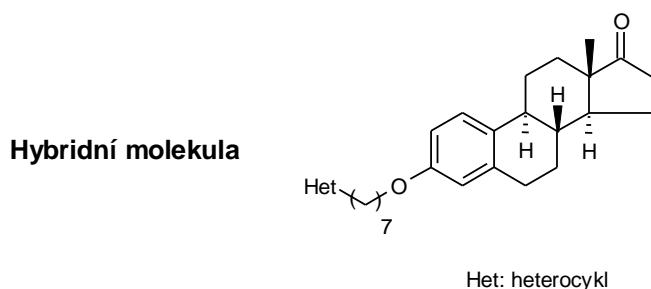


Obr. 19. Oxidace peroxooctovou kyselinou

4.1.2 Možnosti přípravy hybridních molekul estronu

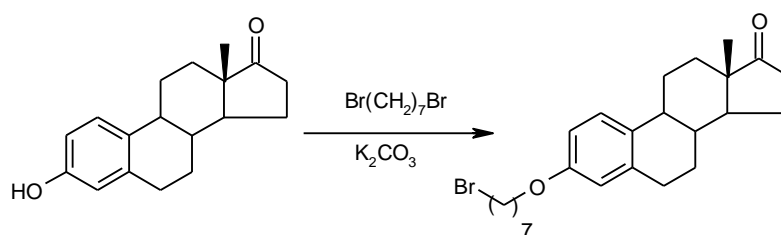
Hybridní molekuly se skládají ze steroidní jednotky, kterou je v našem případě estron (3-hydroxy-estra-1,3,5(10)-trien-17-on), a různých heterocyklických sloučenin

(jmenovitě: pyridin, benzylsulfanyl deriváty pyridinu nebo deriváty 1-fenyltetrazolyl-5-thiolu) navázaných heptylovým mostem (obr. 20).



Obr. 20. Obecná struktura hybridní molekuly

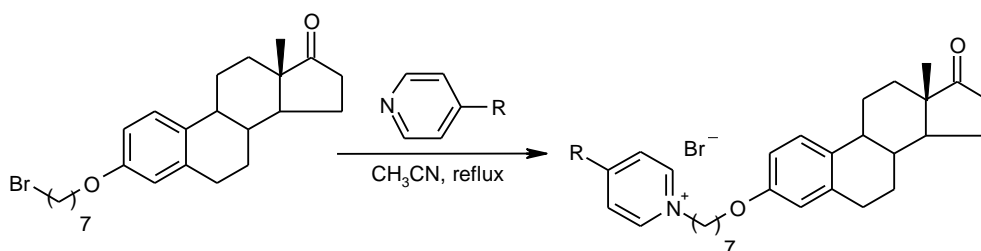
Při přípravě těchto hybridních molekul se vycházelo z komerčně dostupného estronu (3-hydroxy-estra-1,3,5(10)-trien-17-on), který reagoval s ω, ω' -dibromheptanem v přítomnosti uhličitanu draselného za vzniku intermediátu 3-(ω -bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu klíčového pro následující syntézu hybridních molekul (obr. 21).



Obr. 21. Příprava 3-(ω -bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu z estronu.

4.1.2.1 Příprava pyridiniových solí hybridních molekul

Reakcí 3-(ω -bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu s pyridinem, nebo benzylsulfanyl deriváty pyridinu v acetonitrilu za varu vznikají odpovídající ω -pyridiniové soli heptyleteru 3-hydroxy-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu (obr. 22). Analogickým způsobem jsou připravovány také soli odvozené od chinolinu.

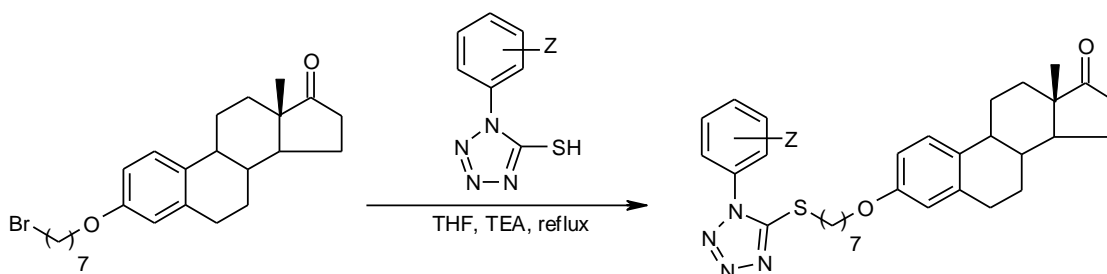


Obr. 22. Příprava pyridiniových solí hybridních molekul.

Reakce 4-benzylsulfanylpýridinu a 3-(ω -bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu byla také prováděna v autoklávu (3 atm, 100 °C) s použitím methanolu jako rozpouštědla. Reakci za těchto podmínek se nepodařilo provést.

4.1.2.2 Příprava hybridních molekul tetrazolu a estronu

Reakce 3-(ω -bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu s deriváty 1-fenyltetrazolyl-5-thiolu v bezvodém THF a v bezvodém TEA za varu poskytuje odpovídající deriváty 3-[7'-(1-fenyl-5-tetrazolylthio)heptyloxy]-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu (obr. 23). Použití TEA s ethanolátem sodným bylo neúspěšné, vznikalo velmi mnoho vedlejších produktů.



Obr. 23. Příprava derivátů tetrazolu od hybridních molekul.

4.2 Metody biologického testování

V rámci biologického testování syntetizovaných látek byla zjišťována jejich aktivita antibakteriální, antimykobakteriální, antifungální a u některých sloučenin také antiproliferativní a cytotoxická.

Antimykobakteriální aktivitu stanovoval Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Oddělení pro studium Mykobakterií (pracovníci pod vedením MUDr. Jarmily Kaustové) a také Hans-Knöll-Institut (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und

Infektionsbiologie, Hans Knöll Institut, Beutenberg-Str. 11a, D-07745 Jena, Německo, HKI) pod vedením Dr. Ute Möllmann.

Antimykotická aktivita byla hodnocena na Katedře lékařských a biologických věd Farmaceutické fakulty UK (doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.).

V HKI se rovněž zjišťovala vedle antimykobakteriální také antibakteriální, antiproliferativní a cytotoxická aktivita některých připravených látek.

4.2.1 Testování antibakteriální a antimykobakteriální aktivity

K testování byly použity kmeny z České sbírky mikroorganismů, (CNCTC - Česká národní sbírka typových kultur, Národní institut zdraví, Praha). Testování antimykobakteriální aktivity *in vitro* bylo provedeno na kmenech *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC (My 331/88), *M. avium* CNCTC (My 330/88) a *M. kansasii* CNCTC (My 235/80). Dále byl použit také jeden kmen izolovaný od pacienta z bývalého okresu Karviná (*M. kansasii* CNCTC - kmen 6509/96). Kmen izolovaný od pacienta byl použit z toho důvodu, protože se zjistilo, že sbírkový kmen *M. kansasii* má poměrně vysokou rezistenci proti INH ve srovnání s kmeny, které jsou izolovány u pacientů v ČR. Kmen *M. kansasii* CNCTC (6509/96) má citlivost na INH odpovídající citlivosti kmenů izolovaných v ČR.

Ke kultivacím mykobakterií byla použita polosyntetická tekutá Šulova půda s nativní bílkovinou (Sevapharma, Praha). Každý kmen byl současně naočkován na Lowenstein-Jensenovu půdu pro kontrolu sterility. Preparáty byly ředěny v DMSO, INH (používaný jako standard) ve sterilní vodě. Byly testovány koncentrace v rozsahu od 1 do 1000 $\mu\text{mol/l}$, u INH od 0,5 do 250 $\mu\text{mol/l}$. Hodnocení testů bylo provedeno po 7, 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C. Aktivita pak byla vyjádřena jako MIC (minimální inhibiční koncentrace, tedy nejnižší koncentrace schopná zastavit růst mikroba).

Testování na antibakteriální a antimykobakteriální aktivitu bylo také provedeno v HKI v Německu. Antibakteriální a antimykobakteriální aktivita studovaných sloučenin se zjišťovala *in vitro* proti následujícím kmenům: *Staphylococcus aureus* (SG 511), *S. aureus* (MRSA 994/93), *S. aureus* (MRSA 134/94), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Enterococcus faecalis* (1528), *Mycobacterium smegmatis* (SG 987), *M. aurum* (SB 66), *M. vaccae* (10670) a *M. fortuitum* Borstel. Testované látky byly ředěny v DMSO. Aktivita byla stanovována jako MIC v $\mu\text{g/ml}$ podle protokolů NCCLS⁶³ s použitím mikrodiluční bujónové metody. Baktérie byly pěstovány přes noc při 37 °C v

Mueller-Hintonově médiu (MHB, Difco). 50 µl roztoku testované látky o koncentraci 400 µg/ml bylo postupně ředěno na polovinu MHB médiem. Kultivační jamky pak byly naočkovány 50 µl bakteriální suspenze tak, aby konečná koncentrace byla 5×10^5 CFU/ml. Mikrotitrační destičky byly inkubovány při 37 °C 24 hodin a hodnoty MIC v µg/ml byly odečítány pomocí přístroje Nepheloscán Ascent 1.4 automatic plate reader (Lab-systems, Vantaa, Finsko) jako nejnižší koncentrace testované látky, při které nedošlo k viditelnému růstu bakterií.

4.2.2 Testování antimykotické aktivity

Antimykotické hodnocení látek bylo provedeno na Katedře lékařských a biologických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové in vitro na kmenech: *Candida albicans* (ATCC 44859), *Candida tropicalis* (156), *Candida krusei* (E28), *Candida glabrata* (20/I), *Trichosporon asahii*^{*}, *Trichophyton mentagrophytes* (445), *Aspergillus fumigatus* (231) a *Absidia corymbifera* (272).

Před testováním byly preparáty rozpuštěny v DMSO tak, aby konečná koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřesáhla 1 % složení výsledného roztoku. Byly testovány koncentrace v rozsahu od 0,49 do 250 µmol/l za předpokladu, že preparáty byly rozpustné v DMSO a nedošlo k jejich vysrážení v RPMI médiu. Všechny roztoky byly připraveny bezprostředně před testováním. Ke zjištění antifungální aktivity připravených látek byla používána mikrodiluční bujónová metoda na destičkách M27-A (NCCLS 1997).⁶⁴ Zahrnuty byly i klinické izoláty z biologického materiálu pacientů s podezřením nebo s prokázanou mykózou. Fungální izoláty byly skladovány ve "Skim Milk" médiu (Becton Dickinson) po dobu 6 až 10 měsíců před použitím při -40 °C. K testování byl každý izolát přednostně naočkován na Sabouraudův dextrózový agar (SDA, Difco) k zajištění optimálních růstových podmínek a čistoty.

Izoláty kvasinek byly kultivovány po dobu 1 až 4 dnů, izoláty plísni 4 až 14 dní na SDA při pokojové teplotě. Suspenze kvasinek a konidií byly připraveny ve sterilní vodě obohacené o 0,01% Tween 80. Každá suspenze kvasinek a plísni byla rozředěna v poměru 1:50 v RPMI 1640 médiu k získání konečného inokula, které bylo v rozmezí $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$ CFU/ml a $0,5 \times 10^4$ - 5×10^4 CFU/ml. Rozměr inokula byl stanoven

* původní druh *Trichosporon beigeli* se rozpadl na několik druhů na základě molekulárně-biologických zkoumání; většina druhů, které kolonizují, nebo parazitují člověka byla přeřazena do druhu *asahii*; testovaný kmen se původně označoval *Trichosporon beigeli* (1188)

mikroskopicky za použití Bürkerovy mřížky. Odečítání bylo vizuální, od 540 nm fotometrické.

Jako zásobní roztok každého preparátu bylo použito médium RPMI 1640 s L-glutaminem, bez Na₂CO₃ (Sevapharma, Praha) pufované na pH 7,0±0,1 0,165M morfolinpropansulfonovou kyselinou (MOPS, Sigma). Délka inkubace byla 24 - 48 hodin (u kmene *Trichosporon mentagrophytes* 48 - 72 hodin) při teplotě 35 °C ve vlhké atmosféře. Způsob inkubace byl statický, ve tmě. MIC se stanovovala jako IC₈₀ (80% inhibice kontroly). Kontrolní vzorek bez testované látky a vzorek pro kontrolu kvality kmenů byl také zahrnut (*C.krusei* ATCC 6254, *C. parapsilosis* ATCC 22019).⁶⁴

4.2.3 Testování cytotoxické a antiproliferativní aktivity

Antiproliferativní a cytotoxická aktivita byla zjišťována v HKI v Jeně (Německo). Zkoumané sloučeniny byly testovány proti buněčným liniím K-562 a L-929 na antiproliferativní účinek a na HeLa buňkách na cytotoxický efekt.⁶⁵

Použité buňky suspendovaných buněčných linií K-562 (DSM ACC 10) a přichycených L-929 (DSM ACC 2) byly kultivovány v RPMI médiu (GIBCO BRL 42402-016) obohaceném o 100 U/ml sodné soli penicilinu-G, 100 µg/ml streptomycin sulfátu (GIBCO-BRL 15140-114), 10% teplem inaktivované zárodečné hovězí sérum (GIBCO-BRL 10500-064) a L-glutamin (GIBCO-BRL250030-024) při 37 °C v kultivačních lahvích (NUNC 156 340).

HeLa buňky (DSM ACC 57) byly kultivovány v RPMI 1640 kultivačním médiu (GIBCO-BRL 21875-034) obohaceném o 100 U/ml sodné soli penicilinu-G, 100 µg/ml streptomycin sulfátu (GIBCO-BRL 15140-114), 10% teplem inaktivované zárodečné hovězí sérum (GIBCO-BRL 10500-064) a 10 mg/l neesenciálních aminokyselin (GIBCO-BRL 11140-035) při 37 °C v kultivačních lahvích (NUNC 156 340).

Adherentní L-929 a HeLa buňky byly odebrány v logaritmické růstové fázi po trypsinizaci za použití 0,25% roztoku trypsinu v HBSS obsahujícího 0,038% EDTA (GIBCO-BRL 25200-056).

Pro každé testování antiproliferativní aktivity bylo přibližně 10 000 buněk linie L-929 a K-562 naočkováno s 0,1 ml kultivačního média RPMI 1640 (GIBCO-BRL 21875-034), obsahujícím 10% teplem inaktivované zárodečné hovězího sérum (GIBCO-BRL 10500-064), 100 U/ml sodné soli penicilinu-G, 100 µg/ml streptomycin

sulfátu (GIBCO-BRL 15140-114), ale bez HEPES, v 96-jamkových mikrodestičkách. Buňky byly inkubovány s 10 koncentracemi studovaných sloučenin.

Pro cytotoxické testování bylo přibližně 10 000 HeLa buněk naočkováno s 0,1 ml kultivačního média RPMI 1640 v 96-jamkových mikrodestičkách. Roztoky sloučenin odpovídajících koncentrací byly opatrně nanесeny na monovrstvu HeLa buněk, které byly předem inkubovány po dobu 48 hodin bez testovaných látek.

Adherentní L-929 a HeLa buňky byly naočkovány do mikrodestiček (NUNC 167 008) a suspendované buňky K-562 byly naočkovány do mikrodestiček (NUNC 163 320).

Buňky řady L-929, K-562 a HeLa byly inkubovány po dobu 72 hodin při 37 °C v humidní atmosféře a v atmosféře 5% CO₂.

Výsledné suspenze kultury K-562 na mikrodestičkách byly vyhodnocovány pomocí elektronického buněčného analyzátoru systému CASY 1 (SCHÄRFE, Reutlingen, Německo) pracujícího s velikostí štěrbin 150 μm. K vyhodnocení dat byl použit software CASYSTAT (SCHÄRFE), který umožňuje grafické zpracování naměřených parametrů. Obsah 0,2 ml každé jamky v mikrodestičce byl naředěn v poměru 1:50 s roztokem CASYTON (NaCl, 7,93 g/l; Na₂EDTA, 0,38 g/l; KCl, 0,4 g/l; NaH₂PO₄ · H₂O, 0,22 g/l; NaH₂PO₄ · 2 H₂O, 2,45 g/l; NaF, 0,3 g/l; SCHÄRFE). Hodnoty GI₅₀ (koncentrace, která inhibuje růst buněk na 50%) získaných z křivek závislosti dávky na odpovědi byly vypočítány pomocí systému CASYSTAT. Hodnoty GI₅₀ byly definovány jako koncentrace získaná vynesením 50% hodnoty sledované odpovědi na křivku závislosti odpovědi na koncentraci.

Monovrstvy adherentních L-929 a HeLa buněk byly fixovány pomocí glutaraldehydu a obarveny 0,05% roztokem methylenové modři po dobu 15 minut a poté opatrně promyty 0,2 ml 0,33N HCl. Optické hustoty odpovídající aktivitě byly měřeny při 630 nm na přístroji DYNATECH MR 7000. Srovnávání rozdílných hodnot bylo provedeno s využitím programu Microsoft EXCEL.

4.3 Použité metody QSAR

4.3.1 QSAR u antimykobakteriální aktivity

QSAR analýza antimykobakteriální aktivity byla provedena u 22 látek ze skupiny 1-fenyl-5-(alkylsulfanyl)tetrazolů, která zahrnovala jak několik derivátů s

jednoduchým alkylem na síře, tak několik benzylových derivátů.⁶⁶ Při výpočtu byl použit přístup podle Hansche, jako vstupní data pro výpočet QSAR analýzy byly použity následující parametry.

Biologická data

Jako vstupní data y byly použity hodnoty log MIC ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u kmenů *M. tuberculosis*, *M. avium* a u dvou kmenů *M. kansasii*. po 14 dnech inkubace.

QSAR parametry

Lipofilita: log P — logaritmus rozdělovacího koeficientu vypočítaného pomocí ChemDraw Ultra 6.0 software (CambridgeSoft, USA).

Indikátorové proměnné I byly použity pro postižení přítomnosti, či nepřítomnosti benzylové skupiny vázané na síru u derivátů 1-fenyl-5-alkylsulfanyltetrazolů.

4.3.2 QSAR u antimykotické aktivity

QSAR analýza antimykotické aktivity byla provedena u 19 látek ze skupiny 1-fenyl-5-(benzylsulfanyl)tetrazolů.¹⁰ Při výpočtu byla použita kombinace přístupu podle Hansche a Free-Wilsona. Jako vstupní data pro výpočet QSAR analýzy byly použity následující parametry.

Biologická data

Jako vstupní data y byly použity hodnoty log MIC ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u kmene *Trichophyton mentagrophytes* 445 po 72 hodinách inkubace.

QSAR parametry

Lipofilita: log P — logaritmus rozdělovacího koeficientu vypočítaného pomocí ChemDraw Ultra 6.0 software (CambridgeSoft, USA) v jednoduchém a kvadratickém tvaru.

5. Experimentální část

5.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Chemikálie použité při syntéze byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, silikagel pro sloupcovou chromatografii (40/100) od firmy Lachema. Některé testované látky byly připraveny dříve na našem pracovišti (T 960, T 1077, T 1082, T 1088, T 1089, T 1090, T 1092, T 1093, T 1094, T 1099, T 1101, T 1103, T 3732, T 3733, T 3734, T 3120, T 3125, T 3126). Tyto deriváty tetrazolu připravil doc. Kuneš.⁶ Před odesláním na antimykobakteriální testování jsem je přečistil sloupcovou chromatografií, jako mobilní fáze byla použita směs petrolether - ethyl-acetát 9:1. Deriváty pyridinu připravila ing. Jana Klimešová.

Teploty tání připravovaných látek byly měřeny na Kofflerově bloku a nejsou korigovány. Vzorčky na analýzu a na antimykobakteriální testy byly sušeny nad P₄O₁₀ při teplotě 61 °C a při tlaku 530 Pa po dobu 24 hodin.

Elementární analýza byla provedena na přístroji CHNS-O CE (Fisons EA 1110, Milano) a výsledky se pohybují v rozmezí ± 0,4 % vypočtených hodnot.

Měření IČ spekter bylo provedeno na přístroji NICOLET IMPACT 400 v chloroformu, nebo v KBr peletách.

Hmotnostní spektra některých látek byla naměřena na přístroji FINNIGAN MAT SAQ 710.

NMR spektra 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazolů byla měřena v roztoku deuteriochloroformu CDCl₃-*d*, nebo v roztoku hexadeuteriodimethylsulfoxidu DMSO-*d*₆ při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN-MERCURY-VxBB 300 pracujícím při 300 MHz pro ¹H a při 75 MHz pro ¹³C. Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty δ v ppm a byly nepřímo vztaženy k TMS (tetramethylsilanu) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7,26 pro ¹H a 77,00 pro ¹³C při použití CDCl₃-*d* jako rozpouštědla, nebo 2,49 pro ¹H a 39,7 pro ¹³C při použití DMSO-*d*₆ jako rozpouštědla). ¹H NMR spektra 5-alkylsulfanyl-1-aryltetrazolů byla naměřena v roztoku CDCl₃-*d* při laboratorní teplotě na spektrometru TESLA BS 497 operujícím při frekvenci 100 MHz. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v parts per million (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7,26 pro ¹H).

NMR spektra hybridních molekul byla měřena v roztoku CDCl_3-d při laboratorní teplotě na přístroji BRUKER DRX-400 pracujícím při 250, nebo 400 MHz pro ^1H a při 63, nebo 100 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty δ v ppm a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7,26 pro ^1H a 77,00 pro ^{13}C).

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byly kontrolovány pomocí TLC (silikagelové desky s fluorescenčním indikátorem Silufol UV 254 + 366, Kavalier, Votice, ČR). Směs petrolether/ethyl-acetát ($\varphi_r = 9:1$), nebo petrolether/ether ($\varphi_r = 9:1$) byla použita při sloupcové chromatografii jako mobilní fáze.

5.2 Obecný postup přípravy 5-alkylsulfanyl-1-aryltetrazolů

5.2.1 Příprava derivátů 1-fenylisothiokyanátu

0,082 mol příslušného derivátu anilinu bylo rozpuštěno v bezvodém etheru (25 ml), k roztoku bylo přidáno 12 ml (0,087 mol) TEA a směs byla ochlazená na 0 °C. Poté bylo za intenzivního míchání a chlazení opatrně přikapáno 0,087 mol CS_2 tak, aby teplota nepřestoupila 5 °C. Reakční směs byla ponechána 3 dny při teplotě kolem 5 °C (uchována v lednici). Pak byla vyloučená sůl odfiltrována, promyta čerstvě vysušeným diethyletherem a dosušena volně na vzduchu.

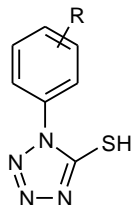
0,033 mol triethylammoniové soli 4-methylfenyldithiokarbamové kyseliny bylo rozpuštěno v bezvodém chloroformu (50 ml), k tomuto roztoku bylo přidáno 0,04 mol TEA a za intenzivního míchání a chlazení pomalu přikapáno 0,034 mol ethylesteru kyseliny chlormravenčí tak, aby teplota nepřesáhla 0 °C. Vznikl bezbarvý roztok, který byl míchán ještě 15 minut při teplotě 0 °C a pak ponechán 1 hodinu, aby se ohřál na laboratorní teplotu. Poté byl promyt 150 ml 3M kyseliny chlorovodíkové, několikrát 150 ml vody a vysušen bezvodým síranem sodným. Chloroform byl vakuově oddestilován a vzniklý isothiokyanat byl okamžitě použit do další reakce. Při syntéze 4-chlor, 3,4-dichlor a 4-methoxy derivátů se postupovalo stejně.

5.2.2 Příprava derivátů 1-fenyltetrazolyl-5-thiolu

Směs 50 ml vody, 0,028 mol 4-methylfenylisothiokyanatu a 0,055 mol azidu sodného byla za stálého míchání zahřívána 8 hodin pod zpětným chladičem, pak ochlazená a extrahována 2x 100 ml diethyletheru. Po ochlazení ledem a okyselení

vodné vrstvy konc. kyselinou chlorovodíkovou vypadla sraženina, která byla odfiltrována a promyta vodou. Produkt byl překrystalizován z vodného ethanolu. Při syntéze 4-chlor, 3,4-dichlor a 4-methoxy derivátů se postupovalo stejně.

1-fenyltetrazolyl-5-thioly



(A03) R: 4-Br; t.t.: 170 °C; Mr.: 257,11; bílé krystaly

(A04) R: 4-OCH₃; t.t.: 148-151 °C; Mr.: 208,24 bílé krystaly

(A05) R: 4-CH₃; t.t.: 162-164 °C (lit.:⁶⁷ 155-156 °C); Mr.: 192,24; bílé krystaly

(A06) R: H; t.t.: 145-151 °C (lit.:⁶⁸ 154-155 °C); Mr.: 178,22; bílé krystaly

(A07) R: 4-Cl; t.t.: 174-176 °C; Mr.: 212,66; bílé krystaly

(A08) R: 3,4-Cl₂; t.t.: 143-146 °C; Mr.: 208,24; bílé krystaly

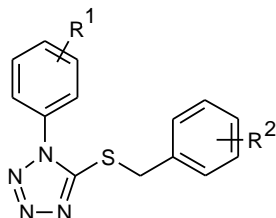
5.2.3 Příprava derivátů 5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazolu

5 mmol příslušného 1-aryltetrazolyl-5-thiolu byl rozpuštěn v 20 ml toluenu. Po rozpuštění bylo přidáno 0,37 ml (5 mmol) benzylchloridu a 15 ml 1,1M roztoku hydroxidu draselného. Pak bylo přidáno 200 mg (0,6 mmol) TBABr (katalyzátor fázového přenosu). Směs byla intenzivně míchána a zahřívána pod zpětným chladičem 4,5 – 33 hodin, kontrola průběhu reakce byla prováděna pomocí TLC (toluen/aceton, $\varphi_r = 10:1$). Po ochlazení byla směs několikrát promyta vodou, toluenová vrstva byla oddělena a vysušena bezvodým síranem sodným. Nakonec byl toluen vakuově odpařen a produkt přečištěn krystalizací z vodného ethanolu, popř. sloupcovou chromatografií na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs petrolether/ethyl-acetát ($\varphi_r=9:1$), nebo petrolether/diethylether (9:1).

1-fenyl-5-(4-nitrobenzylsulfanyl)tetrazol byl připraven nukleofilní substitucí. K 4,5 ml ethanolátu sodného (připraveného in situ) bylo přidáno 6 ml DMF a 1 g (5,6 mmol) 1-fenyltetrazolyl-5-thiolu. Po rozpuštění bylo přidáno 1,44 g činidla 4-nitrobenzylchloridu (8,4 mmol) a směs byla intenzivně míchána a zahřívána pod zpětným chladičem 16 hodin. Po ochlazení byla směs převedena do vody a vytřepána ethyl-acetátem. Z ethyl-acetátové vrstvy byly odstraněny zásadité nečistoty vytřepáním

s 5 % HCl, následně se vytřepávalo vodou a 5 % NaHCO₃. Ethyl-acetátová vrstva byla oddělena a vysušena bezvodým síranem sodným. Nakonec byl ethyl-acetát vakuově odpařen a produkt přečištěn krystalizací z vodného ethanolu.

5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazoly



5-Benzylsulfanyl-1-fenyltetrazol (T 3722)

R¹ = H; R² = H

Bílé krystaly. Výtěžek 41 %; t.t. 67–70 °C (lit. [69] 70–71 °C). IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1500, 1598. C₁₄H₁₂N₄S (M_r = 268,34). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,55 – 7,49 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 7,45 - 7,39 (m, 2H, H2'', H6''), 7,36 – 7,28 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 4,63 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153,8, 135,2, 133,5, 130,1, 129,7, 129,2, 129,0, 128,8, 128,1, 123,7, 37,6.

1-Fenyl- 5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3741)

R¹ = H; R² = 4-F

Bílé krystaly. Výtěžek 78 %; t.t. 91–93 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1500, 1510, 1599. C₁₄H₁₁FN₄S (M_r = 286,33). w_i(vypočteno): 58,73 % C, 3,87 % H, 6,64 % F, 19,57 % N, 11,20 % S; w_i(nalezeno): 55,71 % C, 3,80 % H, 6,64 % F, 19,41 % N, 11,21 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,56 – 7,47 (m, 5H, H2, H3, H4, H5, H6), 7,45 – 7,37 (m, 2H, H2', H6'), 7,04 – 6,95 (m, 2H, H3', H5'), 4,59 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 162,4 (d, J = 247,4 Hz), 153,6, 133,4, 131,1 (d, J = 3,4 Hz), 131,0 (d, J = 8,3 Hz), 130,1, 129,7, 123,7, 115,7 (d, J = 21,7 Hz), 36,7.

5-(4-Chlorbenzyl)sulfanyl-1-fenyltetrazol (T 3701)

R¹ = H; R² = 4-Cl

Bílé krystaly. Výtěžek 29 %; t.t. 97–99 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1500, 1598. C₁₄H₁₁ClN₄S (M_r = 302,78). w_i(vypočteno): 55,54 % C, 3,66

% H, 11,71 % Cl, 18,50 % N, 10,59 % S; w_i (nalezeno): 55,87 % C, 3,72 % H, 18,56 % N, 10,46 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,59 – 7,48 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 7,40 – 7,32 (m AA', BB', 2H, H3'', H5''), 7,30 – 7,22 (m AA', BB', 2H, H2'', H6''), 4,58 (s, 2H, SCH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 134,0, 133,9, 133,4, 130,6, 130,2, 130,1, 129,8, 128,9, 123,7, 36,7.

1-Fenyl-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3727)

$\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = 4\text{-CH}_3$

Bílé krystaly. Výtěžek 58 %; t.t. 59,5–61,5 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1500, 1598. $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}$ ($M_r = 282,36$). w_i (vypočteno): 63,81 % C, 5,00 % H, 19,84 % N, 11,36 % S; w_i (nalezeno): 63,73 % C, 4,95 % H, 19,90 % N, 11,33% S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,55 – 7,49 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 7,35 – 7,28 (m AA', BB', 2H, H2'', H6''), 7,17 – 7,09 (m AA', BB', 2H, H3'', H5''), 4,60 (s, 2H, SCH_2), 2,33 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 154,0, 138,1, 133,6, 132,1, 130,0, 129,7, 129,5, 129,1, 123,8, 37,4, 21,1.

1-Fenyl-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3703)

$\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = 4\text{-CF}_3$

Bílé krystaly. Výtěžek 84 %; t.t. 92–93 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1501, 1598, 1615. $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_4\text{S}$ ($M_r = 336,34$). w_i (vypočteno): 53,57 % C, 3,30 % H, 16,95 % F, 16,66 % N, 9,53 % S; w_i (nalezeno): 53,36 % C, 3,36 % H, 16,60 % F, 16,73 % N, 9,49 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,58 – 7,56 (bs, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,55 – 7,49 (m, 5H, H2, H3, H4, H5, H6), 4,64 (s, 2H, SCH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153,3, 139,6, 133,4, 130,2, 129,9 (q, $J = 32,6$ Hz), 129,8, 129,6, 126,5 (q, $J = 272,6$ Hz), 125,7 (q, $J = 3,7$ Hz), 123,7, 36,7.

1-Fenyl-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3704)

$\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = 4\text{-OCH}_3$

Bezbarvá olejovitá látka. Lit. [60] uvádí bílá krystalická látka, t.t. 51–53 °C. Výtěžek 49 %. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1500, 1513, 1610. $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}$ ($M_r = 298,37$). w_i (vypočteno): 60,38 % C, 4,73 % H, 18,78 % N, 10,75 % S; w_i (nalezeno): 60,06 % C, 4,64 % H, 18,51 % N, 10,66 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,55 – 7,49 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 7,38 – 7,32 (m, AA', BB', 2H,

H2'', H6''), 6,87 – 6,81 (m, AA', BB', 2H, H3'', H5''), 4,59 (s, 2H, SCH₂), 3,78 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 159,4, 154,0, 133,6, 130,5, 130,0, 129,7, 127,0, 123,7, 114,2, 55,3, 37,2.

1-Fenyl-5-[(4-nitrobenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3702)

R¹ = H; R² = 4-NO₂

Světle nažloutlé krystaly. Výtěžek 22 %; t.t. 155-157 °C (lit. [70] 157–158 °C). IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1499, 1523, 1597, 1608. C₁₄H₁₁N₅O₂S (M_r = 313,3). w_i(vypočteno): 53,67 % C, 3,54 % H, 22,35 % N, 10,23 % S; w_i(nalezeno): 53,61 % C, 3,66 % H, 21,99 % N, 10,48 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8,17 (d, 2H, , J = 8,7 Hz, H3', H5'), 7,65 (d, 2H, , J = 8,9 Hz, H2', H6'), 7,57 – 7,48 (m, 5H, H1, H2, H3, H4, H5), 4,67 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153,0, 147,5, 143,1, 133,3, 130,3, 130,2, 129,9, 123,9, 123,7, 36,3.

5-Benzylsulfanyl-1-(4-chlorfenyl)tetrazol (T 3723)

R¹ = 4-Cl; R² = H

Bílé krystaly. Výtěžek 76 %; t.t. 68,5–70 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1498, 1602. C₁₄H₁₁ClN₄S (M_r = 302,7). w_i(vypočteno): 55,54 % C, 3,66 % H, 11,71 % Cl, 18,50 % N, 10,59 % S; w_i(nalezeno): 55,61 % C, 3,61 % H, 18,43 % N, 10,50 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,51 – 7,47 (m, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,44 – 7,38 (m, 2H, H2'', H6''), 7,37 – 7,29 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 4,63 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 136,2, 135,1, 130,0, 129,2, 128,9, 128,3, 125,0, 122,7, 118,5, 37,8.

1-(4-Chlorfenyl)-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3742)

R¹ = 4-Cl; R² = 4-F

Bílé krystaly. Výtěžek 76 %; t.t. 100–102 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1498, 1511, 1601. C₁₄H₁₀ClFN₄S (M_r = 320,77). w_i(vypočteno): 52,42 % C, 3,14 % H, 11,05 % Cl, 5,92 % F, 17,47 % N, 10,00 % S; w_i(nalezeno): 52,14 % C, 3,05 % H, 11,15 % Cl, 5,62 % F, 17,28 % N, 10,12 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,53 – 7,36 (m, 6H, H2, H3, H5, H6, H2', H6'), 7,04 – 6,94 (m, 2H, H3', H5'), 4,60 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 162,4 (d, J = 247,7 Hz), 153,6, 136,2, 131,9, 131,0, 131,0 (d, J = 8,3 Hz), 130,0, 124,9, 115,7 (d, J = 21,7 Hz), 36,8.

5-(4-Chlorbenzyl)sulfanyl-1-(4-chlorfenyl)tetrazol (T 3705)



Bílé krystaly. Výtěžek 48 %; t.t. 112–114 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1497, 1598. C₁₄H₁₀Cl₂N₄S (M_r = 337,2). w_i(vypočteno): 49,86 % C, 2,99 % H, 21,03 % Cl, 16,61 % N, 9,51 % S; w_i(nalezeno): 49,86 % C, 2,98 % H, 16,54 % N, 21,22 % Cl. ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 7,49 – 7,38 (m, 6H, H2', H3', H5', H6', H3'', H5''), 7,25 – 7,18 (m, 2H, H2'', H6''), 4,95 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 138,7, 133,9, 133,2, 130,1, 129,8, 129,1, 127,8, 117,9, 113,2, 51,6.

5-(3-Chlorbenzyl)sulfanyl-1-(4-chlorfenyl)tetrazol (T 3746)



Bílé krystaly. Výtěžek 61 %; t.t. 100–102 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1493, 1575, 1599, 1618. C₁₄H₁₀Cl₂N₄S (M_r = 337,2). w_i(vypočteno): 49,86 % C, 2,99 % H, 21,03 % Cl, 16,61 % N, 9,51 % S; w_i(nalezeno): 49,93 % C, 2,78 % H, 21,25 % Cl, 16,34 % N, 9,73 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,54 – 7,45 (m, 4H, H1, H2, H3, H4), 7,42 – 7,40 (m, 1H), 7,34 – 7,21 (m, 3H), 4,58 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153,5, 137,2, 136,3, 134,5, 131,9, 130,0, 129,2, 129,2, 128,4, 127,4, 125,0, 36,9.

1-(4-Chlorfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3728)



Bílé krystaly. Výtěžek 42 %; t.t. 99–102 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1498, 1615. C₁₅H₁₃ClN₄S (M_r = 316,8). w_i(vypočteno): 56,87 % C, 4,14 % H, 11,19 % Cl, 17,68 % N, 10,12 % S; w_i(nalezeno): 57,12 % C, 4,13 % H, 17,38 % N, 11,19 % Cl. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,53 – 7,44 (m, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,33 – 7,27 (m AA', BB', 2H, H2'', H6''), 7,16 – 7,10 (m AA', BB', 2H, H3'', H5''), 4,60 (s, 2H, SCH₂), 2,33 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 154,0, 138,2, 136,1, 132,0, 131,9, 129,9, 129,5, 129,1, 125,0, 37,6, 21,1.

1-(4-Chlorfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3707)



Bílé krystaly. Výtěžek 77 %; t.t. 74–75 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1498, 1619. C₁₅H₁₀ClF₃N₄S (M_r = 370,78). w_i(vypočteno): 48,59 % C,

2,72 % H, 9,56 % Cl, 15,37 % F, 15,11 % N, 8,65 % S; w_i (nalezeno): 48,25 % C, 2,63 % H, 9,50 % Cl, 14,91 % N, 8,82 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,57 (bs, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,55 – 7,49 (m, AA', BB', 2H, H2', H6'), 7,49 – 7,44 (m, AA', BB', 2H, H3', H5'), 4,65 (s, 2H, SCH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153,4, 139,4, 136,3, 131,8, 130,1, 129,9 (q, J = 33,0 Hz), 129,6, 125,9 (q, J = 275,2 Hz), 125,8 (q, J = 3,7 Hz), 125,0, 36,8.

1-(4-Chlorfenyl)-5-[(3-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3709)

$\text{R}^1 = 4\text{-Cl}$; $\text{R}^2 = 3\text{-OCH}_3$

Bílé krystaly. Výtěžek 13 %; t.t. 49–51 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1497, 1586, 1601. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{OS}$ ($M_r = 332,81$). w_i (vypočteno): 54,13 % C, 3,94 % H, 10,65 % Cl, 16,83 % N, 9,63 % S; w_i (nalezeno): 54,20 % C, 3,90 % H, 10,86 % Cl, 16,48 % N, 9,60 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,53 – 7,43 (m, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,24 (t, 1H, J = 8,11 Hz, H5''), 7,00 – 6,93 (m, 2H, H2'', H6''), 6,83 (ddd, 1H, J = 8,11 Hz, J = 2,48 Hz, J = 0,83 Hz, H5''), 4,59 (s, 2H, SCH_2), 3,78 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159,8, 153,9, 136,4, 136,1, 132,0, 130,0, 129,9, 125,0, 121,4, 114,6, 113,8, 55,2, 37,7.

1-(4-Chlorfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3708)

$\text{R}^1 = 4\text{-Cl}$; $\text{R}^2 = 4\text{-OCH}_3$

Bílé krystaly. Výtěžek 72 %; t.t. 49–51,5 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1499, 1611. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{OS}$ ($M_r = 332,81$). w_i (vypočteno): 54,13 % C, 3,94 % H, 10,65 % Cl, 16,83 % N, 9,63 % S; w_i (nalezeno): 53,93 % C, 3,82 % H, 10,43 % Cl, 16,63 % N, 9,74 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,53 – 7,44 (m, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,37 – 7,30 (m, AA', BB', 2H, H2'', H6''), 6,88 – 6,80 (m, AA', BB', 2H, H3'', H5''), 4,59 (s, 2H, CH_2), 3,79 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159,5, 154,0, 136,1, 132,0, 130,5, 130,0, 126,9, 125,0, 114,2, 55,3, 37,4.

5-Benzylsulfanyl-1-(4-bromfenyl)tetrazol (T 3735)

$\text{R}^1 = 4\text{-Br}$; $\text{R}^2 = \text{H}$

Bílé krystaly. Výtěžek 92 %; t.t. 93,5–94 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1495. $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrN}_4\text{S}$ ($M_r = 347,23$). w_i (vypočteno): 48,43 % C, 3,19 % H, 23,01 % Br, 16,14 % N, 9,23 % S; w_i (nalezeno): 48,62 % C, 3,49 % H, 22,80 % Br, 16,31 % N, 9,05 % S. ^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 7,87 – 7,79 (m, AA', BB', 2H,

H2, H6), 7,58 – 7,52 (m, AA', BB', 2H, H3, H5), 7,44 – 7,37 (m, 2H, H2', H6'), 7,35 – 7,23 (m, 3H, H3', H4', H5'), 4,58 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 154,2, 136,3, 133,2, 132,4, 129,3, 128,8, 128,0, 126,8, 124,0, 37,0.

1-(4-Bromfenyl)-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3740)

R¹ = 4-Br; R² = 4-F

Bílé krystaly. Výtěžek 51 %; t.t. 104–106 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1494, 1510, 1601. C₁₄H₁₀BrFN₄S (M_r = 365,22). w_i(vypočteno): 46,04 % C, 2,76 % H, 21,88 % Br, 15,34 % N, 8,78 % S; w_i(nalezeno): 45,92 % C, 2,69 % H, 21,99 % Br, 15,03 % N, 8,73 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,70 – 7,63 (m, AA', BB', 2H, H2, H6), 7,45 – 7,36 (m, 4H, H3, H5, H2', H6'), 7,04 – 6,95 (m, 2H, H3', H5'), 4,59 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 162,4 (d, J = 247,7 Hz), 153,6, 133,0, 132,4, 131,0, 131,0, (d, J = 8,3 Hz), 125,1, 124,1, 115,7 (d, J = 21,7 Hz), 36,8.

1-(4-Bromfenyl)-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3736)

R¹ = 4-Br; R² = 4-Cl

Bílé krystaly. Výtěžek 87 %; t.t. 124–125 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1492, 1595. C₁₄H₁₀BrClN₄S (M_r = 381,68). w_i(vypočteno): 44,06 % C, 2,64 % H, 14,68 % N, 8,40 % S; w_i(nalezeno): 43,96 % C, 2,59 % H, 14,37 % N, 8,32 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,70 – 7,64 (m, AA', BB', 2H, H2, H6), 7,44 – 7,34 (m, 4H, H3, H5, H2', H6'), 7,32 – 7,26 (m, AA', BB', 2H, H3', H5'), 4,58 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 153,5, 134,2, 133,8, 133,0, 132,4, 130,6, 129,0, 125,2, 124,3, 36,9.

1-(4-Bromfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3739)

R¹ = 4-Br; R² = 4-CH₃

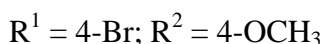
Bílé krystaly. Výtěžek 76 %; t.t. 113–114 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1492, 1519. C₁₅H₁₃BrN₄S (M_r = 361,26). w_i(vypočteno): 49,87 % C, 3,63 % H, 22,12 % Br, 15,51 % N, 8,88 % S; w_i(nalezeno): 50,14 % C, 3,61 % H, 22,18 % Br, 15,19 % N, 8,81 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,68 – 7,62 (m, AA, BB', 2H, H2, H6), 7,44 – 7,38 (m, AA', BB', 2H, H3, H5), 7,33 – 7,27 (m, AA', BB', 2H, H2', H6'), 7,16 – 7,09 (m, AA', BB', 2H, H3', H5'), 4,60 (s, 2H, SCH₂), 2,33 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153,9, 138,2, 132,9, 132,5, 131,9, 129,5, 129,1, 125,2, 124,1, 37,6, 21,1.

1-(4-Bromfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3737)



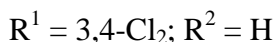
Bílé krystaly. Výtěžek 92 %; t.t. 95–97 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1495, 1589, 1618. C₁₅H₁₀BrF₃N₄S (M_r = 415,23). w_i(vypočteno): 43,39 % C, 2,43 % H, 19,24 % Br, 13,73 % F, 13,49 % N, 7,72 % S; w_i(nalezeno): 43,70 % C, 2,43 % H, 19,16 % Br, 13,38 % F, 13,19 % N, 7,54 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,70 – 7,64 (m, AA', BB', 2H, H₂, H₆), 7,57 (bs, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 7,43 – 7,37 (m, AA', BB', 2H, H₃, H₅), 4,64 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153,3, 139,4, 133,0, 132,3, 130,3 (q, J = 33,0 Hz), 129,6, 125,7 (q, J = 3,8 Hz), 125,4 (q, J = 274,4 Hz), 125,1, 124,3, 36,8.

1-(4-Bromfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3738)

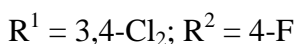


Bílé krystaly. Výtěžek 70 %; t.t. 46–46,5 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1494, 1513, 1586, 1612. C₁₅H₁₃BrN₄OS (M_r = 377,26). w_i(vypočteno): 47,75 % C, 3,47 % H, 21,18 % Br, 14,85 % N, 8,50 % S; w_i(nalezeno): 47,88 % C, 3,43 % H, 20,86 % Br, 14,55 % N, 8,28 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,68 – 7,63 (m, AA', BB', 2H, H₃, H₅), 7,44 – 7,30 (m, AA', BB', 4H, H₂, H₆, H₂', H₆'), 6,87 – 6,81 (m, AA', BB', 2H, H₃', H₅'), 4,58 (s, 2H, SCH₂), 3,78 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 159,5, 153,9, 132,9, 132,5, 130,5, 126,8, 125,2, 124,1, 114,2, 55,3, 37,4.

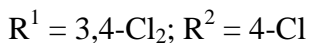
5-Benzylsulfanyl-1-(3,4-dichlorfenyl)tetrazol (T 3724)



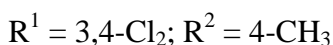
Bílé krystaly. Výtěžek 52 %; t.t. 49–51 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1483, 1496, 1574, 1593. C₁₄H₁₀Cl₂N₄S (M_r = 337,23). w_i(vypočteno): 49,86 % C, 2,99 % H, 16,61 % N, 9,51 % S; w_i(nalezeno): 50,00 % C, 2,91 % H, 16,31 % N, 9,29 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,66 (d, 1H, J = 2,47 Hz, H₂'), 7,61 (d, 1H, J = 8,52 Hz, H₅'), 7,45 – 7,28 (m, 6H, H₆', H₂'', H₃'', H₄'', H₅'', H₆''), 4,63 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 153,9, 134,9, 134,6, 134,0, 132,6, 131,4, 129,2, 128,9, 128,3, 125,6, 122,7, 37,9.

1-(3,4-Dichlorfenyl)-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3743)

Bílé krystaly. Výtěžek 80 %; t.t. 76–77,5 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1483, 1511, 1574, 1601. C₁₄H₉Cl₂FN₄S (M_r = 355,22). w_i(vypočteno): 47,34 % C, 2,55 % H, 19,96 % Cl, 15,77 % N, 9,03 % S; w_i(nalezeno): 47,57 % C, 2,60 % H, 19,81 % Cl, 15,58 % N, 8,76 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,67 (d, 1H, J = 2,5 Hz, H₂), 7,62 (d, 1H, J = 8,5 Hz, H₅), 7,44 – 7,37 (3H, m, H₆, H₂', H₆'), 7,05 – 6,96 (m, 2H, H₃', H₅'), 4,60 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 162,5 (d, J = 247,9 Hz), 153,7, 134,7, 134,1, 132,5, 131,5, 131,0 (d, J = 8,3 Hz), 130,8 (d, J = 3,4 Hz), 125,5, 122,7, 115,8 (d, J = 21,7 Hz), 37,0.

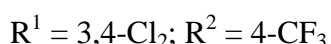
1-(3,4-Dichlorfenyl)-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3710)

Bílé krystaly. Výtěžek 40 %; t.t. 88–90,5 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1483, 1491, 1574, 1596. C₁₄H₉Cl₃N₄S (M_r = 371,67). w_i(vypočteno): 45,24 % C, 2,44 % H, 28,62 % Cl, 15,07 % N, 8,63 % S; w_i(nalezeno): 45,34 % C, 2,39 % H, 28,37 % Cl, 14,75 % N, 8,72 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (d, 1H, J = 2,47 Hz, H₂'), 7,62 (d, 1H, J = 8,51 Hz, H₅'), 7,41 (dd, 1H, J = 8,51 Hz, J = 2,47 Hz, H₆'), 7,40 – 7,34 (m AA', BB', 2H, H₃'', H₅''), 7,32 – 7,27 (m AA', BB', 2H, H₂'', H₆''), 4,59 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 153,6, 134,7, 134,3, 134,1, 133,6, 132,5, 131,5, 130,6, 129,0, 125,5, 122,7, 37,0.

1-(3,4-Dichlorfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3729)

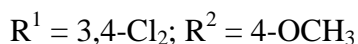
Světle žluté krystaly. Výtěžek 71 %; t.t. 87,5–89 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1483, 1515, 1574, 1592, 1615. C₁₅H₁₂Cl₂N₄S (M_r = 351,26). w_i(vypočteno): 51,29 % C, 3,44 % H, 20,19 % Cl, 15,95 % N, 9,13 % S; w_i(nalezeno): 51,38 % C, 3,32 % H, 20,01 % Cl, 15,64 % N, 8,78 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,65 (d, 1H, J = 2,47 Hz, H₂'), 7,60 (d, 1H, J = 8,52 Hz, H₅'), 7,41 (dd, 1H, J = 8,52 Hz, J = 2,48 Hz, H₆'), 7,32 – 7,27 (m AA', BB', 2H, H₂'', H₆''), 7,17 – 7,10 (m AA', BB', 2H, H₃'', H₅''), 4,60 (s, 2H, SCH₂), 2,33 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 154,0, 138,3, 134,5, 134,0, 132,6, 131,8, 131,4, 129,5, 129,1, 125,5, 122,7, 37,7, 21,1.

1-(3,4-Dichlorfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3712)



Bílé krystaly. Výtěžek 12 %; t.t. 80–82 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1481, 1508, 1567, 1594, 1617. C₁₅H₉Cl₂F₃N₄S (M_r = 405,23) w_i(vypočteno): 44,46 % C, 2,24 % H, 13,83 % N; w_i(nalezeno): 44,58 % C, 2,21 % H, 13,62 % N. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (d, 1H, J=2,28 Hz, H2'), 7,64 – 7,55 (m AA', BB', 5H, H6', H2'', H3'', H5'', H6''), 7,40 (dd, 1H, J=8,50 Hz, J=2,55 Hz, H5'), 4,66 (s, 2H, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 153,4, 139,3, 134,8, 134,1, 131,5, 129,6, 125,76 (dd, J=7,44 Hz, J=4,00 Hz), 125,5, 122,7, 36,9.

1-(3,4-Dichlorfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3713)



Bílé krystaly. Výtěžek 42 %; t.t. 73–75 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1482, 1513, 1574, 1586, 1592, 1610. C₁₅H₁₂Cl₂N₄OS (M_r = 367,25) w_i(vypočteno): 49,06 % C, 3,29 % H, 19,31 % Cl, 15,26 % N, 8,73 % S; w_i(nalezeno): 49,19 % C, 3,23 % H, 19,26 % Cl, 14,92 % N, 8,44 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (d, 1H, J=2,43 Hz, H2'), 7,60 (d, JH, J=8,66, H6'), 7,44 – 7,38 (m AA', BB', 1H, H5'), 7,38 - 7,28 (m AA', BB', 2H, H2'', H6''), 6,88 - 6,81 (m AA', BB', 2H, H3'', H5'') 4,60 (s, 2H, SCH₂), 3,79 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159,6, 134,6, 134,0, 131,4, 130,5, 125,6, 122,7, 114,2, 55,3, 37,6.

5-Benzylsulfanyl-1-(4-methylfenyl)tetrazol (T 3725)



Bílé jehlicovité krystaly. Výtěžek 68 %; t.t. 75–77 °C (lit. [3] 75 °C). IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1515, 1603. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,44 – 7,27 (m AA', BB', 9H, H2', H3', H5', H6', H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 4,61 (s, 2H, SCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 153,8, 140,5, 135,2, 130,2, 129,2, 128,8, 128,1, 123,6, 37,5, 21,2.

5-(4-Fluorbenzyl)sulfanyl-1-(4-methylfenyl)tetrazol (T 3744)



Bílé krystaly. Výtěžek 85 %; t.t. 79–80,5 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1511, 1555, 1566, 1601. C₁₅H₁₃FN₄S (M_r = 300,36). w_i(vypočteno): 59,98

% C, 4.36 % H, 18,65 % N, 10,68 % S; w_i (nalezeno): 60,01 % C, 4,27 % H, 18,64 % N, 10,52 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,44 – 7,29 (m, 6H, H₂, H₃, H₅, H₆, H₂', H₆'), 7,04 – 6,95 (m, 2H, H₃', H₅'), 4,58 (s, 2H, SCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 162,4 (d, J = 247,4 Hz), 153,6, 140,6, 131,2 (d, J = 3,4 Hz), 131,0, 131,0 (d, J = 8,3 Hz), 130,3, 123,6, 115,7, (d, J = 21,7 Hz), 36,7, 21,2.

5-(4-Chlorbenzyl)sulfanyl-1-(4-methylfenyl)tetrazol (T 3714)

$\text{R}^1 = 4\text{-CH}_3$; $\text{R}^2 = 4\text{-Cl}$

Bílé krystaly. Výtěžek 59 %; t.t. 101–104 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1515, 1598. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{S}$ ($M_r = 316,8$). w_i (vypočteno): 56,87 % C, 4,14 % H, 11,19 % Cl, 17,68 % N, 10,12 % S; w_i (nalezeno): 56,71 % C, 4,04 % H, 17,56 % N, 11,20 % Cl, 9,95 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,40 – 7,25 (m, 8H, H₂', H₃', H₅', H₆', H₂'', H₃'', H₅'', H₆''), 4,56 (s, 2H, SCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153,5, 140,6, 134,0, 134,0, 130,9, 130,6, 130,3, 128,9, 123,6, 36,7, 21,2.

5-(4-Methylbenzyl)sulfanyl-1-(4-methylfenyl)tetrazol (T 3730)

$\text{R}^1 = 4\text{-CH}_3$; $\text{R}^2 = 4\text{-CH}_3$

Bílé krystaly. Výtěžek 22 %; t.t. 33–34 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1515, 1615. $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$ ($M_r = 296,40$). w_i (vypočteno): 64,84 % C, 5,44 % H, 18,90 % N, 10,82 % S; w_i (nalezeno): 64,82% C, 5,39 % H, 18,71 % N, 10,84 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,42 – 7,36 (m, 2H, H₂', H₆'), 7,34 – 7,28 (m, 4H, H₃', H₅', H₂'', H₆''), 7,15 – 7,10 (m, 2H, H₃'', H₅''), 4,58 (s, 2H, SCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,32 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153,9, 140,4, 138,0, 132,1, 130,2, 129,5, 129,3, 129,1, 123,6, 37,4, 21,2, 21,1.

1-(4-Methylfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3716)

$\text{R}^1 = 4\text{-CH}_3$; $\text{R}^2 = 4\text{-CF}_3$

Bílé krystaly. Výtěžek 90 %; t.t. 98,5–100 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1498, 1516, 1586, 1617, 1637, 1654. $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{S}$ ($M_r = 350,36$). w_i (vypočteno): 54,85 % C, 3,74 % H, 15,99 % N, 9,15 % S; w_i (nalezeno): 54,56 % C, 3,61 % H, 15,88 % N, 9,47 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,57 (bs, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 7,41 – 7,30 (m, 4H, H₂, H₃, H₅, H₆), 4,63 (s, 2H, SCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153,3, 140,7, 139,7, 130,9, 130,3, 130,3 (q, $J = 29,5$ Hz), 129,6, 125,8 (q, $J = 272,3$ Hz), 125,7 (q, $J = 4,0$ Hz), 123,6, 36,6, 21,2.

1-(4-Methylfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3717)

$\text{R}^1 = 4\text{-CH}_3$; $\text{R}^2 = 4\text{-OCH}_3$

Bílé krystaly. Výtěžek 56 %; t.t. 36,5–38 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1514, 1547, 1567, 1585, 1611. $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$ ($M_r = 312,40$). w_i (vypočteno): 61,52 % C, 5,16 % H, 17,93 % N, 10,26 % S; w_i (nalezeno): 61,33 % C, 5,05 % H, 17,74 % N, 10,15 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,42 – 7,27 (m, 6H, H_2' , H_3' , H_5' , H_6' , H_2'' , H_6''), 6,87 – 6,80 (m, 2H, H_3'' , H_5''), 4,57 (s, 2H, SCH_2), 3,78 (s, 3H, OCH_3), 2,42 (s, 3H, CH_3) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159,9, 153,9, 140,4, 131,0, 130,5, 130,2, 127,1, 123,6, 114,1, 55,2, 37,2, 21,2.

5-Benzylsulfanyl-1-(4-methoxyfenyl)tetrazol (T 3726)

$\text{R}^1 = 4\text{-OCH}_3$; $\text{R}^2 = \text{H}$

Bílé krystaly. Výtěžek 64 %; t.t. 42–44 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1497, 1516, 1547, 1563, 1590, 1609. $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}$ ($M_r = 298,37$). w_i (vypočteno): 60,38 % C, 4,73 % H, 18,78 % N, 10,75 % S; w_i (nalezeno): 60,05 % C, 4,65 % H, 18,58 % N, 10,50 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,44 – 7,27 (m, 7H, H_2' , H_6' , H_2'' , H_3'' , H_4'' , H_5'' , H_6''), 7,04 – 6,97 (m, 2H, H_3'' , H_5''), 4,60 (s, 2H, SCH_2), 3,86 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 160,7, 154,0, 135,3, 129,2, 128,8, 128,2, 126,2, 125,5, 114,8, 55,6, 37,5.

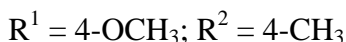
5-(4-Fluorbenzyl)sulfanyl-1-(4-methoxyfenyl)tetrazol (T 3745)

$\text{R}^1 = 4\text{-OCH}_3$; $\text{R}^2 = 4\text{-F}$

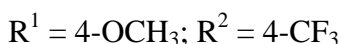
Bílé krystaly. Výtěžek 97 %; t.t. 79–83 °C. IR (CHCl_3): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm^{-1} : 1491, 1515, 1540, 1570, 1591, 1609. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{OS}$ ($M_r = 316,35$). w_i (vypočteno): 56,95 % C, 4,14 % H, 6,01 % F, 17,71 % N, 10,14 % S; w_i (nalezeno): 56,83 % C, 4,02 % H, 5,79 % F, 17,47 % N, 10,29 % S. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,43 – 7,35 (m, 4H, H_2 , H_6 , H_2' , H_6'), 7,03 – 6,94 (m, 4H, H_3 , H_5 , H_3' , H_5'), 4,55 (s, 2H, SCH_2), 3,85 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 162,4 (d, $J = 247,4$ Hz), 160,7, 153,8, 131,2 (d, $J = 3,5$ Hz), 130,9 (d, $J = 8,3$ Hz), 126,1, 125,4, 115,6 (d, $J = 21,4$ Hz), 114,8, 55,6, 36,6.

5-(4-Chlorbenzyl)sulfanyl-1-(4-methoxyfenyl)tetrazol (T 3718)

Bílé krystaly. Výtěžek 29 %; t.t. 72–74 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1516, 1609. C₁₅H₁₃ClN₄OS (M_r = 332,81). w_i(vypočteno): 54,13 % C, 3,94 % H, 10,65 % Cl, 16,83 % N, 4,81 % O, 9,63 % S; w_i(nalezeno): 54,25 % C, 3,96 % H, 16,67 % N, 9,36 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,42 – 7,32 (m, 4H, H2', H6', H3'', H5''), 7,30 – 7,24 (m, 2H, H2'', H6''), 7,04 – 6,97 (m, 2H, H3', H5'), 4,54 (s, 2H, SCH₂), 3,85 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 160,7, 153,6, 134,0, 134,0, 130,5, 128,9, 126,1, 125,4, 114,8, 55,6, 36,6.

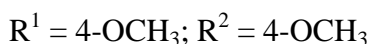
1-(4-Methoxyfenyl)-5-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3731)

Bílé krystaly. Výtěžek 52 %; t.t. 60–62 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1487, 1516, 1547, 1563, 1590, 1609. C₁₆H₁₆N₄OS (M_r = 312,40). w_i(vypočteno): 61,52 % C, 5,16 % H, 17,93 % N, 10,26 % S; w_i(nalezeno): 61,49 % C, 5,36 % H, 17,87 % N, 10,27 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,43 – 7,36 (m AA', BB', 2H, H2', H6'), 7,33 – 7,27 (m AA', BB', 2H, H2'', H6''), 7,16 – 7,09 (m AA', BB', 2H, H3'', H5''), 7,03 – 6,97 (m AA', BB', 2H, H3', H5'), 4,57 (s, 2H, SCH₂), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 3,32 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 160,6, 154,1, 138,0, 132,1, 129,4, 129,1, 126,2, 125,4, 114,7, 55,6, 37,3, 21,1.

1-(4-Methoxyfenyl)-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3720)

Bílé krystaly. Výtěžek 59 %; t.t. 65–66 °C. IR (KBr): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1467, 1518, 1540, 1590, 1608, 1616. C₁₆H₁₃F₃N₄OS (M_r = 366,36). w_i(vypočteno): 52,45 % C, 3,58 % H, 15,29 % N, 15,56 % F, 8,75 % S; w_i(nalezeno): 52,27 % C, 3,51 % H, 15,14 % N, 15,81 % F, 8,97 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,55 (s, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,41 – 7,35 (m, 2H, fenyl), 7,03 – 6,97 (m, 2H, fenyl), 4,61 (s, 2H, SCH₂), 3,85 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 160,8, 153,4, 139,7, 130,4, 129,9, 129,5, 126,0, 125,7, 125,7, 125,6, 125,6, 125,4, 114,8, 55,6, 36,6.

1-(4-Methoxyfenyl)-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]tetrazol (T 3721)



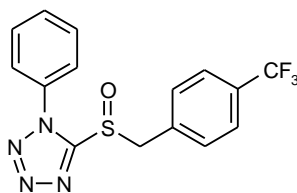
Světle nažloutlé krystaly. Výtěžek 65 %; t.t. 60,5–62,5 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1464, 1515, 1587, 1611. C₁₆H₁₆N₄O₂S (M_r = 328,40). w_i(vypočteno): 58,52 % C, 4,91 % H, 17,06 % N, 9,76 % S; w_i(nalezeno): 58,51 % C, 4,86 % H, 16,87 % N, 9,63 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.43 – 7.37 (m, AA, BB, 2H, H₂, H₆), 7.36 – 7.30 (m, AA, BB, 2H, H₂, H₆), 7.03 – 6.97 (m, AA, BB, 2H, H₃, H₅), 6.87 – 6.80 (m, AA, BB, 2H, H₃, H₅), 4.56 (s, 2H, SCH₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 160.6, 159.4, 154.1, 130.5, 127.1, 126.2, 125.5, 114.7, 114.1, 55.6, 55.2, 37.1.

5.3 Postup přípravy

1-fenyl-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfoxy]tetrazolu

1-fenyl-5-(4-trifluormethylbenzyl)sulfanyltetrazol (0,6 g, 1,8 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (10 ml), ochlazen na -15 °C a byla k němu přidána 34% peroxooctová kyselina (10 ml). Reakční směs byla ponechána po dobu 24 hodin při této teplotě. Poté byl přidán chloroform (15 ml) a směs byla míchána 0,5 hodiny při 18 °C. Poté byla 3x promyta 15 ml 10% roztoku hydroxidu sodného, několikrát 20 ml vody a vysušena bezvodým síranem sodným. Nakonec byl chloroform vakuově oddestilován.

1-fenyl-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfoxy]tetrazol



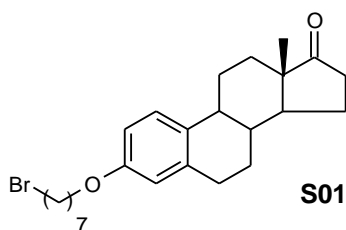
1-fenyl-5-[(4-trifluormethylbenzyl)sulfoxy]tetrazol (T 3753)

Bílé krystaly. Výtěžek 18 %; t.t. 87–90 °C. IR (CHCl₃): ν (C-C vibrace fenylového kruhu) cm⁻¹: 1498, 1595, 1618. C₁₅H₁₁F₃N₄OS (M_r = 352,34). w_i(vypočteno): 51,13 % C, 3,15 % H, 16,18 % F, 15,90 % N, 9,10 % S; w_i(nalezeno): 51,31 % C, 3,36 % H, 15,93 % F, 15,80 % N, 9,23 % S. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,62 – 7,42 (m, 5H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆), 7,37 - 7,22 (m, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 4,83 (2H, dd, J = 13,0 Hz, J = 31,3 Hz, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 155.5, 132,5, 131,6, 131,2, 131,0, 130,2, 130,0, 129,7, 126,0, 126,0, 125,9, 125,9, 125,4, 124,8, 59,3.

5.4 Obecný postup přípravy hybridních molekul estronu

5.4.1 Příprava 3-(ω -Bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu (S01)

Estron (1 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém acetonu (10 ml) s přidavkem čerstvě předsušeného uhličitanu draselného (2 mmol). Ke směsi byl přidán ω,ω' -dibromheptan (4 mmol) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem do vymizení výchozích látek (17 h, sledováno pomocí TLC). Po ochlazení na laboratorní teplotu byl uhličitan draselný odfiltrován a promyt acetonem. Filtrát byl vakuově zahuštěn a vzniklý olejovitý surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (jako mobilní fáze byla použita směs n-heptan/ethyl-acetát $\varphi_r=9:1$) a následnou krystalizací z methanolu.

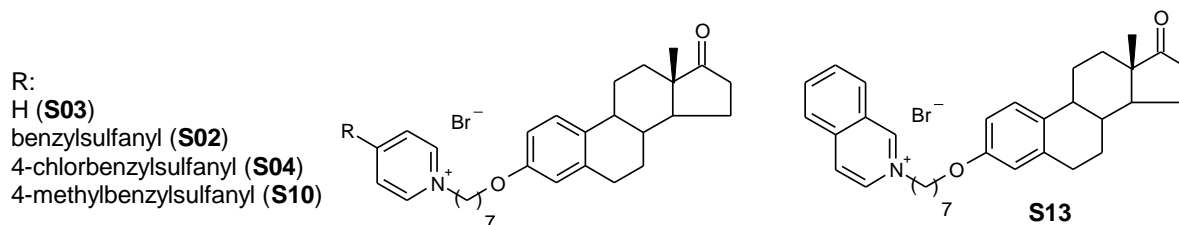


3-(ω -Bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (S01)

Bílé krystaly. Výtěžek: 75 %. t.t. 72-74 °C (MeOH); IR (DIAMAND) ν_{\max} (CO) 1734 cm^{-1} . $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{BrO}_2$ (Mr = 447,46). w_i (vypočteno): 67,11 % C; 7,88 % H; 17,86 % Br; w_i (nalezeno): 67,32 % C; 8,10 % H; 17,66 % Br. ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 0,83 (s, 3H, 18-H), 1,18-2,41 (m, 23H, 3xCH, 10xCH₂), 2,81 (m, 2H, 6-H), 3,33 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, 7'-H), 3,85 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, 1'-H), 6,56 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, 4-H), 6,63 (dd, 1H, $J = 2,9$ Hz, $J = 8,5$ Hz, 2-H), 7,11 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, 1-H). ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 220,8, 157,1, 137,7, 131,9, 126,3, 114,5, 112,1, 67,7, 50,4, 48,0, 44,0, 38,4, 35,9, 33,9, 32,7, 31,6, 30,3, 29,6, 29,2, 28,5, 28,1, 26,6, 25,9, 21,6, 13,8. LMR MS (EI +Q1MS LMR UP LR): 446 (M^+ , 62), 361 (4), 348 (1), 322 (2), 283 (2), 270 (54), 242 (9), 226 (9), 213 (17), 199 (7), 185 (52), 172 (32), 146 (46), 133 (25), 115 (20), 97 (29), 91 (16), 81 (10), 69 (15), 55 (100), 41 (48), 30 (2).

5.4.2 Příprava pyridiniových a chinoliniových solí hybridních molekul estronu

Směs prekurzoru S01 (0,2 mmol) s pyridinem, příslušným benzylsulfanylderivátem pyridinu nebo chinolinem (0,6 mmol) v bezvodém acetonitrilu (10 ml) byla zahřívána pod zpětným chladičem do vymizení výchozích látek (24-29 h, sledováno pomocí TLC). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs vakuově zahuštěna, vyloučená sraženina byla odfiltrována, několikrát promyta ledovým n-heptanem a vakuově vysušena. Látka S03 byla navíc přečištěna krystalizací z methanolu.



1-[(17-Oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid (S03)

R: H

Světle nažloutlé krystaly. Výtěžek: 90 %. Reakční doba: 24 h; t.t. 140-142 °C (MeOH); IR (DIAMAND) ν_{\max} (CO) 1727 cm^{-1} . $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{NO}_2\text{Br}$ ($M_r = 526,56$). w_i (vypočteno): 68,43 % C; 7,66 % H; 2,66 % N; 15,17 % Br. w_i (nalezeno): 68,71 % C; 7,88 % H; 2,47 % N; 15,38 % Br. ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (s, 3H, 18-H), 1,40-2,53 (m, 23H, 3xCH, 10xCH₂), 2,83-2,90 (m, 2H, 6-H), 3,88 (t, 2H, J = 6,3 Hz, -CH₂-O-), 5,02 (t, 2H, J = 7,4 Hz, -CH₂-N-), 6,60 (d, 1H, J = 2,9 Hz, 4-H), 6,66 (dd, 1H, J = 2,9 Hz, J = 8,5 Hz, 2-H), 7,16 (d, 1H, J = 8,6 Hz, 1-H), 8,11 (dd, 2H, J = 6,6 Hz, J = 7,5 Hz, 3'-H_{Py}, 5'-H_{Py}), 8,45-8,53 (m, 1H, 4'-H_{Py}), 9,50 (d, 2H, J = 5,6 Hz, 2'-H_{Py}, 6'-H_{Py}). ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 220,8, 157,0, 145,1, 145,1, 145,1, 137,7, 131,9, 128,4, 128,4, 128,1, 126,3, 114,5, 112,1, 67,6, 62,0, 50,4, 48,0, 44,0, 38,4, 35,8, 31,9, 31,6, 29,6, 29,1, 28,7, 26,5, 25,9, 25,8, 21,5, 13,8. LMR MS (CI +Q1MS LMR UP LR): 527 ($M^+ + H$, 15), 447 (58), 446 (18), 368 (7), 270 (10), 130 (8), 80 (100).

4-Benzylsulfanyl-1-[(17-Oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid (S02)

R: Benzylsulfanyl

Šedé krystaly. Výtěžek: 55 %. Reakční doba: 24 h; t.t 135-137 °C; IR (DIAMAND) ν_{\max} (CO) 1736 cm^{-1} . $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{NO}_2\text{SBr}$ (Mr = 648,75) w_i (vypočteno): 68,50 % C, 7,15 % H, 2,16 % N, 4,94 % S, 12,32 % Br. w_i (nalezeno): 68,56 % C, 6,80 % H, 2,38 % N, 5,31 % S, 12,02 % Br. ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (s, 3H, 18-H), 1,38-2,54 (m, 23H, 3xCH, 10xCH₂), 2,85-2,88 (m, 2H, 6-H), 3,88 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz, -CH₂-N-), 4,41 (s, 2H, -CH₂-S-), 4,74 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, -CH₂-O-), 6,61 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, 4-H), 6,69 (dd, 1H, $J = 2,9$ Hz, $J = 8,6$ Hz, 2-H), 7,16 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,30-7,44 (m, 5H, H_{Bn}), 7,75 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, 3'-H_{Py}, 5'-H_{Py}), 9,04 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz, 2'-H_{Py}, 6'-H_{Py}). ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 220,9, 163,0, 157,0, 149,2, 149,0, 142,7, 137,7, 135,5, 132,7, 131,9, 128,9, 128,8, 128,7, 128,6, 126,3, 123,0, 114,5, 112,1, 67,6, 60,4, 50,4, 48,0, 44,0, 38,4, 36,4, 35,9, 35,7, 31,6, 31,5, 29,6, 29,1, 28,7, 26,5, 25,9, 25,8, 21,6, 13,9. ESI +VE +HMR BSCAN (LIN) UP PROF NRM: 568.3 (100).

4-(4-Chlorbenzylsulfanyl)-1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid (S04)

R: 4-Chlorbenzylsulfanyl

Nažloutlé krystaly. Výtěžek: 82 %. Reakční doba: 24 h. t.t. 126-129 °C; IR (DIAMAND) ν_{\max} (CO) 1736 cm^{-1} . $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{ClNO}_2\text{SBr}$ (Mr = 683,19). w_i (vypočteno): 65,05 % C, 6,64 % H, 5,19 % Cl, 2,05 % N, 4,69 % S, 11,70 % Br. w_i (nalezeno): 64,92 % C, 6,71 % H, 5,29 % Cl, 2,32 % N, 4,53 % S, 11,65 % Br. ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (s, 3H, 18-H), 1,31-2,54 (m, 23H, 3xCH, 10xCH₂), 2,82-2,89 (m, 2H, 6-H), 3,87 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, -CH₂-N-), 4,42 (s, 2H, -CH₂-S-), 4,71 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, -CH₂-O-), 6,60 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, 4-H), 6,66 (dd, 1H, $J = 2,7$ Hz, $J = 8,5$ Hz, 2-H), 7,15 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, 1-H), 7,28-7,41 (m, 4H, H_{Bn}), 7,80 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz, 3'-H_{Py}, 5'-H_{Py}), 9,02 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz, 2'-H_{Py}, 6'-H_{Py}). ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 220,9, 162,6, 157,0, 149,3, 142,7, 137,7, 134,5, 134,1, 132,0, 131,5, 130,4, 130,0, 129,4, 129,0, 126,3, 123,2, 114,5, 112,1, 67,6, 60,5, 50,4, 48,0, 44,0, 38,3, 35,9, 35,7, 35,0, 31,6, 31,5, 29,6, 29,1, 28,7, 26,5, 26,0, 25,8, 21,6, 13,9. FAB +Q1MS LMR UP PROF: 603 (40), 600 (5), 547 (6), 505 (7), 480 (10), 479 (16), 447 (10), 420 (8), 398 (12), 360 (10), 348 (14), 334 (17), 332 (30), 307 (100), 289 (75), 276 (29), 262 (33), 249 (38), 238 (42), 236 (93), 202 (27).

4-(4-Methylbenzylsulfanyl)-1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid (S10)

R: 4-Methylbenzylsulfanyl

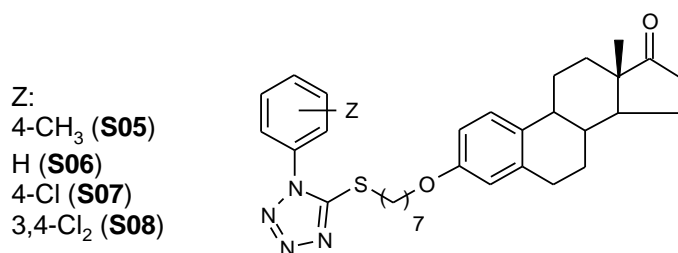
Bílé krystaly. Výtěžek: 42 %. Reakční doba: 26 h. t.t. 108-111 °C; IR (KBr) ν_{\max} (CO) 1737 cm^{-1} . $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{NO}_2\text{SBr}$ (Mr = 662,78). w_i (vypočteno): 68,87 % C, 7,30 % H, 2,11 % N, 4,84 % S, 12,06 % Br. w_i (nalezeno): 69,01 % C, 7,12 % H, 2,45 % N, 5,19 % S, 11,98 % Br. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (s, 3H, 18-H), 1,34-2,53 (m, 26H, 3xCH, 10xCH₂, 1xCH₃-Bn), 2,84-2,90 (m, 2H, 6-H), 3,88 (t, 2H, J = 6,4 Hz, -CH₂-N-), 4,36 (s, 2H, -CH₂-S-), 4,73 (t, 2H, J = 7,3 Hz, -CH₂-O-), 6,61 (d, 1H, J = 2,5 Hz, 4-H), 6,66 (dd, 1H, J = 2,8 Hz, J = 8,5 Hz, 2-H), 7,15 (d, 1H, J = 7,7 Hz, 1-H), 7,24-7,30 (m, 4H, H_{Bn}), 7,73 (d, 2H, J = 7,0 Hz, 3'-H_{Py}, 5'-H_{Py}), 9,03 (d, 2H, J = 7,0 Hz, 2'-H_{Py}, 6'-H_{Py}). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 220,9, 163,2, 157,0, 142,7, 138,5, 137,7, 131,9, 129,9, 129,9, 129,6, 129,5, 129,5, 128,8, 128,6, 126,3, 123,0, 114,6, 112,2, 67,7, 60,4, 50,4, 48,0, 44,0, 38,4, 36,3, 35,9, 35,5, 31,6, 31,5, 29,6, 29,1, 28,7, 26,6, 26,0, 25,8, 21,6, 21,1, 13,9. ESI +VE +HMR BSCAN (LIN) UP PROF NRM: 582.3.

1-[(17-Oxo-estra-1,3,5(10)-triene-3-yloxy)-heptyl]-quinolinium bromide (S13)

Našedlá polotuhá látka. Výtěžek 63 %. Reakční doba: 29 h. t.t. <20 °C; IR (KBr) ν_{\max} (CO) 1730 cm^{-1} . $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{NO}_2\text{Br}$ (Mr = 576,62). w_i (vypočteno): 70,82 % C, 7,34 % H, 2,43 % N, 13,86 % Br. w_i (nalezeno): 70,69 % C, 7,11 % H, 2,36 % N, 13,99 % Br. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (s, 3H, 18-H), 1,19-2,55 (m, 23H, 3xCH, 10xCH₂), 2,83-2,91 (m, 2H, 6-H), 3,84-3,95 (m, 2H, -CH₂-O-), 5,02 (t, 2H, J = 7,4 Hz, -CH₂-N-), 5,41 (t, 2H, J = 7,6 Hz, -CH₂-N-), 6,58-6,73 (m, 2H, 2-H, 4-H), 7,16 (dd, 1H, J = 4,6 Hz, J = 8,4 Hz, 1-H), 7,40 (dd, 1H, J = 4,2 Hz, J = 8,5 Hz, H_{Qu}), 7,50-7,60 (m, 1H, H_{Qu}), 8,08-8,24 (m, 3H, H_{Qu}), 7,82 (dd, 1H, J = 1,6 Hz, J = 8,3 Hz, H_{Qu}), 8,91 (dd, 1H, J = 1,5 Hz, J = 4,2 Hz, H_{Qu}). ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 220,9, 157,0, 146,8, 137,7, 135,9, 131,9, 129,5, 127,8, 126,6, 126,3, 122,7, 121,1, 118,2, 114,5, 112,1, 67,7, 50,4, 48,0, 44,0, 38,4, 35,9, 33,9, 32,7, 31,6, 30,9, 30,3, 29,6, 29,2, 29,1, 28,8, 28,5, 28,1, 26,5, 13,8. FAB +Q1MS-LMR UP PROF: 496 (100), 448 (25), 410 (12), 307 (13), 291 (22), 270 (16), 226 (24), 219 (20).

5.4.3 Příprava hybridních molekul od derivátů tetrazolu S05-S08

Směs prekursoru S01 (0,5 mmol) a příslušného derivátu 1-fenyltetrazolyl-5-thiolu (0,75 mmol) v bezvodém THF (6 ml) s přídavkem bezvodého TEA (0,75 mmol) byla zahřívána pod zpětným chladičem do vymizení výchozích látek (18-21 h, sledováno pomocí TLC). Roztok byl poté vakuově zahuštěn a olejovitý surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (jako mobilní fáze byla použita směs n-heptan/aceton $\varphi_{\text{r}}=9:1$).



3-(7'-[1-(4-Methylfenyl)-5-tetrazolylthio]heptyloxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (S05)

Z: 4-CH₃

Žluté krystaly. Výtěžek 95 %. Reakční doba: 21 h. t.t. 61-63 °C. IR (DIAMAND) ν_{max} (CO) 1736 cm⁻¹. C₃₃H₄₂N₄O₂S (Mr = 558,79). w_i(vypočteno): 70,93 % C; 7,58 % H; 10,03 % N; 5,74 % S. w_i(nalezeno): 71,05 % C; 7,43 % H; 9,90 % N; 5,72 % S. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (s, 3H, 18-H), 1,24-2,56 (m, 26H, 3xCH, 10xCH₂, 1xCH₃-Ph), 2,85-2,93 (m, 2H, 6-H), 3,38 (t, 2H, J = 7,4 Hz, -CH₂-S-), 3,91 (t, 2H, J = 6,6 Hz, -CH₂-O-), 6,63 (d, 1H, J = 2,7 Hz, 4-H), 6,70 (dd, 1H, J = 2,8 Hz, J = 8,5 Hz, 2-H), 7,18 (d, 1H, J = 8,4 Hz, 1-H), 7,35 (d, 2H, J = 8,3 Hz, 3'-H_{Ph}, 5'-H_{Ph}), 7,41-7,47 (m, 2H, 2'-H_{Ph}, 6'-H_{Ph}). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 220,9, 157,0, 154,4, 140,4, 137,7, 131,9, 131,2, 130,3, 130,3, 126,3, 123,7, 123,7, 114,5, 112,1, 67,7, 50,4, 48,0, 44,0, 38,4, 35,8, 33,2, 31,6, 29,6, 29,2, 29,0, 28,7, 28,5, 26,5, 25,9, 25,9, 21,6, 21,3, 13,8.

3-(7'-[1-Fenyl-5-tetrazolylthio]heptyloxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (S06)

Z: H

Bílé krystaly. Výtěžek 90 %. Reakční doba: 19 h. t.t. 70,5-72,5 °C. IR (DIAMAND) ν_{max} (CO) 1731 cm⁻¹. C₃₂H₄₀N₄O₂S (Mr = 544,77). w_i(vypočteno): 70,55 % C; 7,40 % H; 10,28 % N; 5,89 % S. w_i(nalezeno): 70,79 % C; 7,44 % H; 10,04 % N; 5,69 % S. ¹H

NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (s, 3H, 18-H), 1,25-2,54 (m, 23H, 3xCH, 10xCH₂), 2,86-2,91 (m, 2H, 6-H), 3,40 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, -CH₂-S-), 3,92 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz, -CH₂-O-), 6,63 (d, 1H, *J* = 2,7 Hz, 4-H), 6,70 (dd, 1H, *J* = 2,9 Hz, *J* = 8,6 Hz, 2-H), 7,18 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, 1-H), 7,51-7,60 (m, 5H, H_{Ph}). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 220,8, 157,1, 154,5, 137,7, 131,9, 130,1, 129,8, 129,8, 126,3, 123,9, 123,9, 114,6, 112,1, 67,8, 50,5, 48,0, 44,0, 38,4, 35,9, 33,3, 31,9, 31,6, 29,7, 29,2, 29,0, 28,8, 28,6, 26,6, 25,9, 25,9, 21,6, 13,9.

3-(7'-[1-(4-Chlorfenyl)-5-tetrazolythio]heptyloxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (S07)

Z: 4-Cl

Světle žluté krystaly. Výtěžek: 91 %. Reakční doba 15 h. t.t. 69-71,5 °C. IR (DIAMAND) ν_{\max} (CO) 1738 cm⁻¹. C₃₂H₃₉ClN₄O₂S (Mr = 579,21). w_i(vypočteno): 66,36 % C; 6,79 % H; 9,67 % N; 6,12 % Cl; 5,54 % S. w_i(nalezeno): 66,76 % C; 6,76 % H; 9,37 % N; 5,96 % Cl; 5,17 % S. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (s, 3H, 18-H), 1,28-2,53 (m, 23H, 3xCH, 10xCH₂), 2,86-2,89 (m, 2H, 6-H), 3,40 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, -CH₂-S-), 3,92 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz, -CH₂-O-), 6,63 (d, 1H, *J* = 2,7 Hz, 4-H), 6,70 (dd, 1H, *J* = 2,9 Hz, *J* = 8,6 Hz, 2-H), 7,18 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, 1-H), 7,50-7,59 (m, 4H, H_{Ph}). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 220,8, 157,1, 154,5, 137,7, 136,2, 131,9, 130,0, 130,0, 126,3, 125,1, 125,1, 114,6, 112,1, 67,7, 50,5, 48,0, 44,0, 38,4, 35,9, 33,5, 31,9, 31,6, 29,7, 29,2, 29,0, 28,7, 28,5, 26,6, 26,0, 25,9, 22,7, 13,9.

3-(7'-[1-(3,4-Dichlorfenyl)-5-tetrazolythio]heptyloxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (S08)

Z: 3,4-Cl₂

Bílé krystaly. Výtěžek: 97 %. Reakční doba: 16 h. t.t. 108-110 °C. IR (KBr) ν_{\max} (CO) 1739 cm⁻¹. C₃₂H₃₈Cl₂N₄O₂S (Mr = 613,66). w_i(vypočteno): 62,63 % C; 6,24 % H; 9,13 % N; 11,55 % Cl; 5,23 % S. w_i(nalezeno): 62,66 % C; 6,23 % H; 9,23 % N; 11,69 % Cl; 4,91 % S. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (s, 3H, 18-H), 1,24-2,54 (m, 23H, 3xCH, 10xCH₂), 2,86-2,91 (m, 2H, 6-H), 3,42 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, -CH₂-S-), 3,92 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz, -CH₂-O-), 6,63 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, 4-H), 6,69 (dd, 1H, *J* = 2,6 Hz, *J* = 8,6 Hz, 2-H), 7,18 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz, 1-H), 7,48 (dd, 1H, *J* = 2,5 Hz, *J* = 8,6 Hz, 5'-H_{Ph}), 7,64 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz, 6'-H_{Ph}), 7,76 (d, 1H, *J* = 2,5 Hz, 2'-H_{Ph}). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 220,8, 157,1, 154,6, 137,7, 134,6, 134,1, 132,8, 131,9, 131,5, 126,3,

125,6, 122,8, 114,6, 112,1, 67,7, 50,5, 48,0, 44,0, 38,4, 35,9, 33,6, 31,9, 31,6, 29,7,
29,2, 29,0, 28,7, 28,5, 26,6, 25,9, 25,9, 13,9.

6. Výsledky s komentářem

6.1 Antibakteriální a antimykobakteriální aktivita připravených látek

6.1.1 Antimykobakteriální aktivita derivátů tetrazolu

V rámci studie tetrazolů byla do souboru sledovaných látek zahrnuta i série derivátů 1-fenyl- popř. 1-benzyl-5-alkylsulfanyltetrazolů (T 960, T 1077, T 1082, T 1088, T 1089, T 1090, T 1092, T 1093, T 1094, T 1099, T 1101, T 1103, T 3732, T 3733, T 3734, struktury viz tab. 1), které dříve připravil doc. Jiří Kuneš. Tyto látky byly přečištěny pomocí sloupcové chromatografie a znovu otestovány na antimykobakteriální aktivitu (doc. Kuneš tyto sloučeniny nechával testovat na jiných mykobakteriálních kmenech).

Deriváty 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazolu vykazovaly v porovnání s deriváty 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolů (kde alkylem byl ethyl, propyl, iso-propyl nebo allyl) obecně významně lepší antimykobakteriální aktivitu.⁶⁶ Tato aktivita byla stanovena *in vitro* na kmenech *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC (My 331/88), *M. kansasii* CNCTC (My 235/80), *M. kansasii* CNCTC (6509/96 klinický izolát) a *M. avium* CNCTC (My 330/88) po 14 dnech inkubace (viz tab. 3).

Tab. 3. Antimykobakteriální aktivita připravených derivátů tetrazolu. MIC v $\mu\text{mol/l}$.

| kód látky | M. tbc My 331/88 | M. avium My 330/88 | M. kansasii My 235/80 | M. kansasii klinický izolát 6509/96 |
|--------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|---|
| | 14/21 dní | 14/21 dní | 7/14/21 dní | 7/14/21 dní |
| T 960 | 250/500 | 500/500 | 125/250/500 | 125/250/n |
| T 1077 | 500/n | n/n | 500/n/n | 500/n/n |
| T 1082 | 250/500 | 250/500 | 250/500/1000 | 125/250/500 |
| T 1088 | n/n | n/n | n/n/n | n/n/n |
| T 1089 | 125/125 | 250/n | 62,5/n/n | 62,5/125/n |
| T 1090 | 250/n | n/n | 125/250/n | 125/250/n |
| T 1092 | n/n | 125/n | 62,5/n/n | n/n/n |
| T 1093 | 125/250 | 125/250 | 62,5/125/250 | 62,5/250/250 |
| T 1094 | 125/125 | 125/125 | 62,5/125/250 | 62,5/125/125 |
| T 1099 | 125/n | n/n | 125/250/n | 125/250/250 |
| T 1101 | n/n | 250/n | 125/n/n | 62,5/125/250 |
| T 1103 | n/n | 125/n | 62,5/n/n | 62,5/n/n |
| T 3732 | 500/500 | 500/1000 | 500/1000/1000 | 250/1000/1000 |

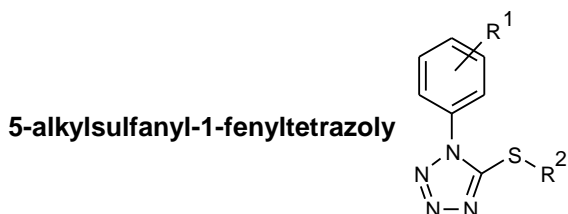
| | | | | |
|------------|-----------|-----------|----------------|---------------|
| T 3733 | 250/250 | 250/500 | 250/500/n | 125/500/500 |
| T 3734 | 62,5/125 | 125/n | 62,5/62,5/125 | 62,5/125/125 |
| T 3701 | n/n | n/n | 32/n/n | 16/32/n |
| T 3702 | n/n | n/n | n/n/n | n/n/n |
| T 3703 | n/n | n/n | n/n/n | 62,5/62,5/n |
| T 3705 | n/n | n/>250 | n/n/n | 62,5/n/n |
| T 3707 | n/n | n/n | n/n/n | 32/125/n |
| T 3708 | 32/62,5 | 62,5/125 | 16/32/62,5 | 16/32/32 |
| T 3709 | 62,5/125 | 62,5/62,5 | 32/32/62,5 | 32/32/62,5 |
| T 3710 | n/n | n/n | 32/62,5/n | 32/125/n |
| T 3712 | 500/n | 500/500 | 125/500/n | 32/62,5/125 |
| T 3713 | 500/n | 250/500 | 16/32/62,5 | 16/32/62,5 |
| T 3714 | n/n | n/n | n/n/n | n/n/n |
| T 3716 | n/n | n/>1000 | n/n/n | n/n/n |
| T 3717 | 32/62,5 | 32/62,5 | 32/32/62,5 | 16/32/32 |
| T 3718 | 62,5/n | n/n | 16/32/n | 16/32/n |
| T 3720 | 62,5/n | 32/n | 16/32/62,5 | 16/32/62,5 |
| T 3721 | 32/32 | 62,5/125 | 16/32/62,5 | 16/32/32 |
| T 3722 | 16/62,5 | 32/125 | 16/32/125 | 16/32/125 |
| T 3723 | 16/n | 62,5/n | 16/32/n | 16/16/n |
| T 3724 | 16/32 | 62,5/125 | 32/32/62,5 | 16/32/62,5 |
| T 3725 | 32/125 | 62,5/n | 16/32/250 | 16/32/250 |
| T 3726 | 32/62,5 | 62,5/125 | 16/32/125 | 16/32/62,5 |
| T 3727 | 62,5/125 | 62,5/250 | 16/62,5/125 | 16/16/125 |
| T 3728 | n/n | n/n | n/n/n | n/n/n |
| T 3729 | n/n | n/n | 32/32/n | 62,5/125/n |
| T 3730 | 125/250 | 32/62,5 | 62,5/125/n | 32/62,5/62,5 |
| T 3731 | 62,5/62,5 | 62,5/125 | 62,5/62,5/125 | 62,5/125/500 |
| T 3735 | n/n | n/n | n/n/n | 62,5/n/n |
| T 3736 | n/n | n/n | n/n/n | n/n/n |
| T 3737 | n/n | n/n | n/n/n | 62,5/n/n |
| T 3738 | 62,5/n | 32/125 | 8/8/16 | 32/32/32 |
| T 3739 | n/n | n/n | n/n/n | n/n/n |
| T 3740 | n/n | n/n | 62,5/n/n | 62,5/n/n |
| T 3741 | n/n | n/n | n/n/n | 32/n/n |
| T 3742 | n/n | n/n | n/n/n | 62,5/n/n |
| T 3743 | 62,5/n | n/n | 125/n/n | 62,5/n/n |
| T 3744 | n/n | 125/n | 62,5/125/n | 32/62,5/n |
| T 3745 | 125/125 | n/n | 62,5/125/n | 62,5/62,5/125 |
| T 3746 | n/n | n/n | n/n/n | n/n/n |
| T 3753 | 32/62,5 | 125/125 | 32/62,5/125 | 32/62,5/125 |
| INH | 0,5/0,5 | >250/>250 | >250/>250/>250 | 4/4/8 |

n - netestováno z důvodu nízké rozpustnosti

Testováno: Státní zdravotní ústav Ostrava, Oddělení pro diagnostiku Mykobakterií, Laboratoř pro *Mycobacterium kansasii*. V tabulce jsou uvedeny hodnoty MIC v $\mu\text{mol/l}$ připravených derivátů tetrazolu proti hodnoceným mykobakteriálním kmenům. Kódy látek jsou vysvětleny v tab.1 na str. 11-14.

Toto tvrzení bylo podpořeno také QSAR analýzou za použití Hanschovy metody (rovnice 5-8).⁶⁶ Jako hydrofobní parametr zde byl použit $\log P$ v lineárním i kvadratickém tvaru. Dále byla použita indikátorová proměnná I , která udávala přítomnost či nepřítomnost benzylové skupiny vázané na síře. Hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu byla vypočítána pomocí programu ChemDraw Ultra 6.0 (CambridgeSoft, USA) a je uvedena v tabulce 4. Všechny regresní výpočty provedl program Multireg H (Klemera; Microsoft Excel). Pouze u kmene *M. avium* výsledná regresní rovnice nebyla statisticky významná.

Tab. 4. Hodnoty $\log P$ připravených antimykobakteriálních 5-alkylsulfanyl-1-fenyltetrazolů. Hodnoty odpovídajících biologických aktivit jsou uvedeny v tabulce 3.



| kód | R ¹ | R ² | log P |
|--------|--------------------|---|-------|
| T 960 | H | (CH ₃) ₂ CH | 3,47 |
| T 1077 | 2-OCH ₃ | C ₂ H ₅ | 3,03 |
| T 1082 | 3-OCH ₃ | C ₂ H ₅ | 3,03 |
| T 1088 | 4-OCH ₃ | C ₂ H ₅ | 3,03 |
| T 1089 | 4-OCH ₃ | C ₃ H ₇ | 3,51 |
| T 1090 | 4-OCH ₃ | (CH ₃) ₂ CH | 3,35 |
| T 1092 | 4-OCH ₃ | CH ₂ =CH-CH ₂ | 3,38 |
| T 1093 | 3-Cl | C ₂ H ₅ | 3,71 |
| T 1094 | 3-Cl | C ₃ H ₇ | 4,20 |
| T 1099 | 4-Cl | C ₂ H ₅ | 3,71 |
| T 1101 | 4-Cl | (CH ₃) ₂ CH | 4,03 |
| T 1103 | 4-Cl | CH ₂ =CH-CH ₂ | 4,07 |
| T 3722 | H | C ₆ H ₅ CH ₂ | 4,55 |
| T 3701 | H | 4-ClC ₆ H ₄ CH ₂ | 5,11 |
| T 3727 | H | 4-CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂ | 5,04 |
| T 3723 | 4-Cl | C ₆ H ₅ CH ₂ | 5,11 |
| T 3705 | 4-Cl | 4-ClC ₆ H ₄ CH ₂ | 5,67 |
| T 3728 | 4-Cl | 4-CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂ | 5,59 |
| T 3725 | 4-CH ₃ | C ₆ H ₅ CH ₂ | 5,04 |
| T 3714 | 4-CH ₃ | 4-ClC ₆ H ₄ CH ₂ | 5,59 |
| T 3730 | 4-CH ₃ | 4-CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂ | 5,52 |
| T 3731 | 4-OCH ₃ | 4-ClC ₆ H ₄ CH ₂ | 4,98 |

Co se týče antimykobakteriální aktivity u kmene *M. tuberculosis* CNCTC (My 331/88, po 14 dnech inkubace) v sérii derivátů 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazolů, nejlepší

výsledky vykazovaly deriváty nesubstituované na benzylovém kruhu. Jakákoliv substituce zde snižovala aktivitu. Při obměnách na fenylovém kruhu byl pozorován nárůst aktivity s rostoucími elektron-akceptorovými vlastnostmi substituentů.⁷¹ Limitujícím faktorem této teorie je, že se bohužel nepodařilo otestovat větší množství lipofilnějších derivátů z důvodu jejich špatné rozpustnosti ve vodě během vlastního testování.

Skupina 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů vykazovala také antimykobakteriální aktivitu proti potenciálně patogenním kmenům (*M. kansasii* a *M. avium*). Nejvyšší antimykobakteriální aktivita z této řady byla nalezena u 1-(4-bromfenyl)-5-(4-methoxybenzyl)sulfanyltetrazolu (**T 3738**) a to zejména proti INH-rezistentnímu kmenu *M. kansasii* CNCTC (My 235/80).⁷² Zdá se, že substituce methoxy skupinou na benzylovém kruhu 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů je nadějná, což může být vysvětleno snížením lipofily molekuly a tím i ovlivnění jejích biologických vlastností.

M.tuberculosis 331/88 (Inkubace 14 dní):

$$\log \text{MIC} = 0,435 (\pm 0,116)(\log P)^2 - 3,563 (\pm 0,949) \log P - 0,895 (\pm 0,287)I + 9,374 (\pm 1,926) \quad (5)$$

$$r = 0,918, \quad s = 0,203 \quad F = 29,25 \quad n = 14 \quad \log P_{\text{opt}} = 4,095$$

M. kansasii 235/80 (Inkubace 14 dní)

$$\log \text{MIC} = 0,398 (\pm 0,083)(\log P)^2 - 3,397 (\pm 0,699) \log P - 0,729 (\pm 0,192)I + 9,350 (\pm 1,457) \quad (6)$$

$$r = 0,964, \quad s = 0,133 \quad F = 59,27 \quad n = 12 \quad \log P_{\text{opt}} = 4,268$$

M. kansasii 6509/96 (Inkubace 14 dní)

$$\log \text{MIC} = 0,189 (\pm 0,102)(\log P)^2 - 1,643 (\pm 0,844) \log P - 0,810 (\pm 0,226)I + 5,735 (\pm 1,746) \quad (7)$$

$$r = 0,946, \quad s = 0,168 \quad F = 51,09 \quad n = 15 \quad \log P_{\text{opt}} = 4,357$$

M. avium 330/88 (Inkubace 14 dní)

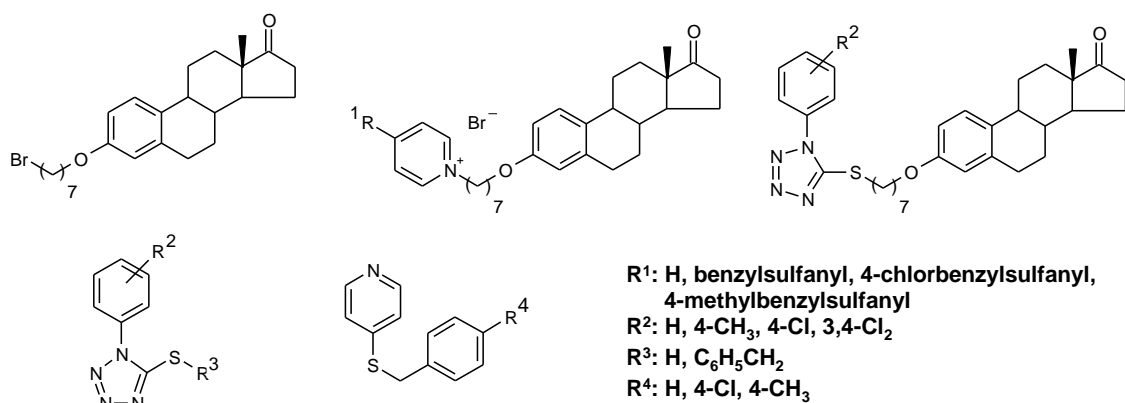
$$\log \text{MIC} = 0,045 (\pm 0,129)(\log P)^2 - 0,519 (\pm 1,057) \log P - 0,426 (\pm 0,281)I + 3,582 (\pm 2,171) \quad (8)$$

$$r = 0,861, \quad s = 0,213 \quad F = 14,37 \quad n = 13 \quad \log P_{\text{opt}} = 5,767$$

6.1.2 Antibakteriální a antimykobakteriální aktivita hybridních molekul

Hybridní molekuly připravené v rámci této práce představují strukturu, která je kombinací steroidního jádra (konkrétně 3-hydroxy-estra-1,3,5(10)-trien-3-on, estron) a různých heterocyklických sloučenin vázaných alkylovým mostem. Kombinace steroidní jednotky, u které se předpokládá možná interakce s buněčnými membránami, a dalších antimikrobiálně účinných složek molekuly může celkově zvýšit biologickou aktivitu.⁷ V předešlých studiích bylo popsáno, že alkylsulfanyl skupina vázaná na elektron deficitním uhlíku heterocyklického systému představuje farmakofor zodpovědný za významnou antibakteriální aktivitu.^{5,66,71,72,73,74}

ω -Pyridiniumalkylethery steroidních fenolů vykazují také významnou biologickou aktivitu. Proto byla snaha připravit nové hybridní molekuly, kde je pyridin nahrazen jiným heterocyklem, který sám o sobě vykazuje také určitou biologickou aktivitu. Hybridní molekuly byly připraveny také ve formě svých amonium-bromidových solí. Aktivita sledovaných hybridních molekul byla dále srovnávána s aktivitou vlastních heterocyklických prekurzorů. Připravené pyridiniové soli hybridních molekul (viz. obr. 24) a hybridní deriváty 1-fenyltetrazolyl-5-thiolu byly otestovány *in vitro* na antibakteriální, antimykobakteriální, antifungální, antiproliferativní a cytotoxickou aktivitu. Aktivita byla hodnocena dále u jednotlivých "prekurzorů" hybridní molekuly, tzn. jak u samotné použité steroidní sloučeniny (3-(ω -bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu) tak i u heterocyklických derivátů 1-fenyltetrazolyl-5-thiolu a 4-benzylsulfanylpyridinu. Cílem bylo v tomto případě zjistit, která část molekuly přispívá k aktivitě.



Obr. 24. Hybridní molekuly estronu a jejich prekurzory hodnocené na antimykobakteriální aktivitu.

V zájmu srovnání aktivity různých derivátů tetrazolu, byly zahrnuty do testování také dříve připravené deriváty 5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazolu.^{66,71,72} Všechny testované 1-fenyltetrazoly měly stejné substituenty na fenylovém kruhu.

Antibakteriální aktivita některých studovaných sloučenin byla testována *in vitro* proti následujícím kmenům: *Staphylococcus aureus* (SG 511), *S. aureus* (MRSA 994/93), *S. aureus* (MRSA 134/94), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Enterococcus faecalis* (1528), *Mycobacterium smegmatis* (SG 987), *M. aurum* (SB 66), *M. vaccae* (10670), *M. fortuitum* Borstel. Antibakteriální aktivity jsou vyjádřeny v tabulce 5.

Tab. 5. *In vitro* antibakteriální aktivita pyridiniových solí estronu a jejich prekurzorů. MIC (µg/ml).

| Kód látky | Kmeny | | | | | | | | |
|------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX |
| S02 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 0,4 | 6,25 | 1,56 | 3,12 | 1,56 | 6,25 |
| S03 | 3,12 | 6,25 | 25 | 0,8 | 12,5 | 3,12 | 6,25 | 3,12 | 6,25 |
| S04 | 3,12 | 3,12 | 6,25 | 0,8 | 1,56 | 6,25 | 3,12 | 1,56 | 6,25 |
| S10 | 1,56 | 3,12 | 3,12 | 0,8 | 3,12 | 6,25 | 3,12 | 1,56 | 6,25 |
| T 3120 | 100 | 100 | >100 | 100 | 100 | 100 | 25 | 50 | 50 |
| T 3125 | 50 | 100 | >100 | 50 | 100 | 25 | 12,5 | 25 | 12,5 |
| T 3126 | 50 | 100 | 100 | 100 | 100 | 50 | 25 | 25 | 12,5 |
| CPB | 0,8 | 1,56 | 3,12 | 0,4 | 1,56 | 6,25 | 6,25 | 1,56 | 12,5 |
| DMSO/MeOH | >100 | >100 | >100 | >100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CIP | 0,2 | >100 | 25 | 12,5 | 0,8 | 0,78 | 0,1 | 0,78 | 0,4 |

Testováno: Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung, Jena, Německo

Hodnoceno na kmenech: **I:** *Staphylococcus aureus* (SG 511); **II:** *S. aureus* (MRSA 994/93); **III:** *S. aureus* (MRSA 134/94); **IV:** *Micrococcus luteus* (ATCC 10240); **V:** *Enterococcus faecalis* (1528); **VI:** *Mycobacterium smegmatis* (SG 987); **VII:** *M. aurum* (SB 66); **VIII:** *M. vaccae* (10670); **IX:** *M. fortuitum* Borstel.

Antimykobakteriální aktivita byla studována také proti tuberkulózním a netuberkulózním mykobakteriálním kmenům: *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80, *M. avium* CNCTC My 330/88, a proti klinickému izolátu *M. kansasii* 6509/96. Výsledky prezentovány v tabulce 6.

Tab. 6. *In vitro* antimykobakteriální aktivita hybridních molekul estronu a jejich prekurzorů, MIC ($\mu\text{mol/l}$).

| | M.tbc My 331/88 | M.avium My 330/88 | M.kansasii My 235/80 | M. kansasii klinický izolát 6509/96 |
|---------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|--|
| | 14/21 dní | 14/21 dní | 7/14/21 dní | 7/14/21 dní |
| S01 | 32/n | 16/32 | 62,5/n/n | 62,5/62,5/n |
| S03 | 16/32 | 32/32 | 16/32/32 | 16/32/32 |
| S02 | 4/8 | 2/2 | 8/8/8 | 8/8/16 |
| S04 | 16/16/ | 8/8 | 16/16/16 | 16/16/16 |
| S10 | 4/8 | 8/8 | 16/16/16 | 16/16/16 |
| S05 | 500/>500 | >500/n | n/>500/>500 | n/n/n |
| S06 | >500/>500 | n/n | n/>500/>500 | n/n/>500 |
| S07 | n/n | n/n | n/n/n | n/n/n |
| S08 | n/>500 | n/n | n/>500/>500 | n/n/>500 |
| A05 | 500/>500 | 500/>500 | 500/>500/>500 | 500/500/>500 |
| A06 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500/>500 | >500/>500/>500 |
| A07 | 500/>500 | >500/>500 | 500/>500/>500 | 250/500/>500 |
| A08 | 250/250 | >500/>500 | 500/500/500 | 250/500/500 |
| T 3725 | 32/125 | 62,5/n | 16/32/250 | 16/32/250 |
| T 3722 | 16/62,5 | 32/125 | 16/32/125 | 16/32/125 |
| T 3723 | 16/n | 62,5/n | 16/32/n | 16/16/n |
| T 3724 | 16/32 | 62,5/125 | 8/16/32 | 16/32/62,5 |
| T 3120 | 125/125 | 125/125 | 62,5/125/125 | 62,5/125/125 |
| T 3725 | 32/62,5 | 62,5/62,5 | 32/62,5/62,5 | 32/62,5/62,5 |
| T 3726 | 62,5/62,5 | 62,5/125 | 32/62,5/125 | 32/62,5/125 |
| INH | 0,5/1 | >250/>250 | >250/>250/>250 | 4/4/8 |

n - netestováno z důvodu nízké rozpustnosti

Testováno: Státní zdravotní ústav Ostrava, Oddělení pro diagnostiku Mykobakterií, Laboratoř pro *Mycobacterium kansasii*.

Antibakteriální stanovení ukázalo, že připravené sloučeniny mají většinou pouze mírnou, nebo nepatrnou aktivitu, zatímco mykobakteriální kmeny byly k hodnoceným sloučeninám více citlivé. Nejaktivnějšími látkami z připravených hybridních molekul byly pyridiniové soli. Tyto hybridní molekuly vykazovaly významnou aktivitu ve srovnání s hybridními molekulami tetrazolu, které nevykazovaly téměř žádnou aktivitu. Antibakteriální a antimykobakteriální aktivita je pravděpodobně závislá na přítomnosti náboje na dusíkovém atomu v molekule.

Porovnání antimykobakteriální aktivity pyridiniových solí estronu s deriváty heterocyklů a s ω -bromheptyletherem estronu potvrzuje hypotézu, že steroidní část má podíl na růstu aktivity. Hydrofobní steroidní jednotka patrně napomáhá interakci s buněčnými membránami, což může vést ke zvýšení koncentrace účinné látky uvnitř

bakteriální buňky. Je ale velmi důležité, jakým způsobem je spojena steroidní jednotka s heterocyklickou částí (viz rozdílné aktivity hybridních molekul pyridiniových solí a tetrazolu).

Ve skupině srovnávaných derivátů tetrazolu vykazovaly nejlepší aktivitu 5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazoly. Naproti tomu 1-fenyltetrazolyl-5-thioly a hybridní molekuly tetrazolů byly prakticky neaktivní. Účinnost 5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazolů odpovídala hypotéze, že alkylsulfanyl skupina vázaná na elektron-deficitním atomu uhlíku představuje farmakofor zodpovědný za antimykobakteriální aktivitu.^{2,5}

Dříve bylo zjištěno, že antibakteriální aktivita hybridních molekul souvisí také s délkou alkylového řetězce spojujícího steroidní jednotku s atomem dusíku na heterocyklu u pyridiniových solí.⁷ Antibakteriální aktivita 1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromidu byla v rozmezí hodnot, které zauímají deriváty ze stejné homologní řady se spojujícím alkylovým řetězcem o délce 6 a 8 uhlíkových atomů, které byly dříve připraveny. Tento závěr dobře koresponduje s teorií o vztahu délky alkylového řetězce a antibakteriální aktivity hybridních molekul.

6.2 Antimykotická aktivita připravených látek

Bylo publikováno, že některé antimykobakteriálně účinné sloučeniny mohou být také aktivní antifungálně.^{9,10} Proto byly připravené hybridní molekuly (pyridinium a tetrazolylsulfanyl alkylethery estronu) společně s 5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazoly a s prekurzorem 3-(ω -Bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onem otestovány na svou antifungální aktivitu.

6.2.1 Antimykotická aktivita 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů

Antimykotická aktivita připravených 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů hodnocená na různých kmenech kvasinek a vláknitých hub je shrnuta v tabulce 7.

Testování 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů proběhlo na kmenech *Candida albicans* (ATCC 4489), *C. tropicalis* (156), *C. krusei* (E28), *C. glabrata* (20/I), *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus* (231), *Absidia corymbifera* (272) a *Trichophyton mentagrophytes* (445). Aktivita proti těmto osmi houbovým kmenům byla nevýznamná s výjimkou kmene *Trichophyton mentagrophytes* a *Aspergillus fumigatus*.

Tab. 7. *In vitro* antifungální aktivita 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů. MIC (μmol/l).

| Kmeny doba (hodin) | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------------|-----------|--------------------|
| | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 72/120 |
| T 3701 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | 62,50/62,50 |
| T 3703 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3704 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,50/>250 | >250/>250 | 31,25/62,50 |
| T 3705 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 |
| T 3707 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3708 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3709 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,50/125 | >250/>250 | >250/>250 |
| T 3710 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,50/125 | >250/>250 | >250/>250 |
| T 3713 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3714 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,50/125 | >250/>250 | 250/>250 |
| T 3716 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3717 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,50/62,5 |
| T 3718 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | 15,63/31,25 |
| T 3720 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3721 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,5/62,5 |
| T 3722 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 31,25/62,50 |
| T 3723 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,50/62,50 | >250/>250 | 31,25/62,50 |
| T 3724 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 250/>250 | >250/>250 | 125/125 |
| T 3725 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,50/250 | >250/>250 | 31,25/62,50 |
| T 3726 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 31,25/62,50 |
| T 3727 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | 62,50/>250 | >250/>250 | 31,25/62,50 |
| T 3728 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 |

| | | | | | | | | |
|---------------|-----------|-----------|--------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| T 3729 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 |
| T 3730 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 |
| T 3731 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 | >250/>250 |
| T 3735 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3736 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3737 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3738 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3739 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3740 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3741 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3742 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3743 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3744 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| T 3745 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| FLU | 0,81/1,63 | 1,63/>250 | 52,24/104,48 | 13,06/52,24 | 3,26/6,53 | >250/>250 | >250/>250 | 26,12/52,24 |
| AMP | 0,02/0,07 | 0,07/0,07 | 0,14/0,14 | 0,04/0,14 | 1,08/2,16 | 0,27/0,14 | 1,08/2,16 | 1,08/1,08 |

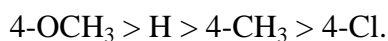
Hodnoceno na kmenech: **I:** *Candida albicans* (ATCC 4489); **II:** *C. tropicalis* (156); **III:** *C. krusei* (E28); **IV:** *C. glabrata* (20/I); **V:** *Trichosporon asahii*; **VI:** *Aspergillus fumigatus* (231); **VII:** *Absidia corymbifera* (272); **VIII:** *Trichophyton mentagrophytes* (445).

Vztah mezi strukturou a antifungální aktivitou u kmene *T. mentagrophytes* byl počítán za použití Free-Wilsonovy metody (efekt substituentů na biologickou aktivitu), která byla dále kombinována s přístupem podle Hansche (parametry $\log P$ a $\log P^2$). Příznivý efekt substituentů na fenylovém kruhu na antifungální aktivitu byl zjištěn v následujícím pořadí:



Hodnoty pro methyl a chlor vázaných v poloze 4 na aromatickém kruhu v poloze 1 tetrazolu byly velmi podobné.

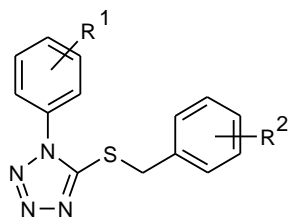
Na benzylovém kruhu bylo ovlivnění aktivity substituenty v následujícím pořadí:



Optimální hodnota $\log P$ byla u srovnávané skupiny 2,79. Vyšší lipofilita uvedených derivátů 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů patrně snižovala antifungální aktivitu.

Přehled látek zahrnutých do uvedených QSAR výpočtů a jejich $\log P$ jsou uvedeny v tabulce 8, příspěvky k aktivitě pro jednotlivé fragmenty (substituenty) v tabulce 9.

Tab. 8. Hodnoty $\log P$ připravených 5-alkylsulfanyl-1-fenyltetrazolů. Hodnoty odpovídajících biologických aktivit jsou uvedeny v tabulce 7.



| kód | R ¹ | R ² | log P | kód | R ¹ | R ² | log P |
|--------|---------------------|--------------------|-------|--------|---------------------|--------------------|-------|
| T 3722 | H | H | 4,55 | T 3729 | 3,4-Cl ₂ | 4-CH ₃ | 6,15 |
| T 3701 | H | 4-Cl | 5,11 | T 3725 | 4-CH ₃ | H | 5,04 |
| T 3727 | H | 4-CH ₃ | 5,04 | T 3714 | 4-CH ₃ | 4-Cl | 5,59 |
| T 3704 | H | 4-OCH ₃ | 4,42 | T 3730 | 4-CH ₃ | 4-CH ₃ | 5,52 |
| T 3723 | 4-Cl | H | 5,11 | T 3717 | 4-CH ₃ | 4-OCH ₃ | 4,91 |
| T 3705 | 4-Cl | 4-Cl | 5,67 | T 3726 | 4-OCH ₃ | H | 4,42 |
| T 3728 | 4-Cl | 4-CH ₃ | 5,59 | T 3718 | 4-OCH ₃ | 4-Cl | 5,34 |
| T 3708 | 4-Cl | 4-OCH ₃ | 4,98 | T 3731 | 4-OCH ₃ | 4-CH ₃ | 4,98 |
| T 3724 | 3,4-Cl ₂ | H | 5,67 | T 3721 | 4-OCH ₃ | 4-OCH ₃ | 4,30 |
| T 3710 | 3,4-Cl ₂ | 4-Cl | 6,22 | | | | |

Tab. 9. Příspěvky aktivity jednotlivých substituentů získané kombinací Free-Wilsonovy a Hanschovy analýzy.

| Fragment | $\Delta \log \text{MIC}$ ($\mu\text{mol/l}$) |
|-----------------------------|--|
| R¹ | |
| H | 0 |
| 4-Cl nebo 4-CH ₃ | 1,61 ($\pm 0,109$) |
| 3,4-Cl ₂ | 3,743 ($\pm 0,221$) |
| 4-OCH ₃ | -0,053 ($\pm 0,036$) |
| R² | |
| H | 0 |
| 4-Cl | 2,214 ($\pm 0,113$) |
| 4-CH ₃ | 1,411 ($\pm 0,111$) |
| 4-OCH ₃ | -0,314 ($\pm 0,046$) |
| μ_0 | 15,68 ($\pm 0,753$) |
| $(\log P)^2$ | 0,061 ($\pm 0,013$) |
| $(\log P)$ | -3,402 ($\pm 0,043$) |
| r | 0,975 |
| s | 0,431 |
| F | 75,01 |
| n | 13 |

6.2.2 Antimykotická aktivita hybridních molekul estronu

Antifungální aktivita sloučenin 3-(ω -bromoheptoxy)-estra-1,3,5(10)-trien-17-onu, hybridních pyridiniových solí i derivátů tetrazolu (benzylsulfanyl derivátů i hybridních molekul) byla testována také na kmenech: *Candida albicans* (ATCC 44859), *C. tropicalis* (156), *C. krusei* (E28), *C. glabrata* (20/I), *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus* (231), *Absidia corymbifera* (272) a *Trichophyton mentagrophytes* (445). Výsledky jsou prezentovány v tab. 10. Významnou antifungální aktivitu vykazovaly opět pouze hybridní molekuly nesoucí náboj. Hybridní molekuly tetrazolu byly inaktivní a 5-benzyl-1-fenyltetrazoly byly pouze nepatrně aktivní proti kmenu *Trichophyton mentagrophytes*. Toto zjištění (vztah mezi biologickou aktivitou a nábojem na molekule) bylo shodné s tím, jaké bylo nalezeno i u antibakteriální aktivity.

Tab.10. Antimykotická aktivita hybridních molekul estronu.

| Kmeny doba (hodin) | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
|--------------------------|------------------|-------------|--------------|-------------|------------------|------------------|-------------|-------------|
| | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 72/120 |
| S01 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 | >125/>125 |
| S02 | 3,91/3,91 | 15,63/15,63 | 7,81/7,81 | 15,63/15,63 | 3,91/7,81 | 15,63/31,25 | 31,25/31,25 | 7,81/7,81 |
| S03 | 3,91/3,91 | 15,63/15,63 | 15,63/31,25 | 7,81/15,63 | 3,91/7,81 | 3,91/62,5 | >250/>250 | 31,25/62,5 |
| S04 | 7,81/7,81 | 15,63/15,63 | 7,81/15,63 | 15,63/15,63 | 7,81/7,81 | 15,63/31,25 | 62,50/62,50 | 7,81/15,63 |
| S05 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| S06 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| S07 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| S08 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 | >500/>500 |
| S10 | n/ 3,91 | n/7,81 | n/7,81 | n/7,81 | n/7,81 | n/7,81 | n/15,63 | n/7,81 |
| FLU | 0,81/1,63 | 1,63/>250 | 52,24/104,48 | 13,06/52,24 | 3,26/6,53 | >250/>250 | >250/>250 | 26,12/52,24 |
| AMP | 0,02/0,07 | 0,07/0,07 | 0,14/0,14 | 0,04/0,14 | 1,08/2,16 | 0,27/0,14 | 1,08/2,16 | 1,08/1,08 |

I: *Candida albicans* (ATCC 44859), II: *C. tropicalis* (156), III: *C. krusei* (E28), IV: *C. glabrata* (20/I), V: *Trichosporon asahii*, VI: *Aspergillus fumigatus* (231), VII: *Absidia corymbifera* (272), VIII: *Trichophyton mentagrophytes* (445). FLU: flukonazol, AMP: amfotericin B
n : netestováno

6.3 Antiproliferativní a cytotoxická aktivita

V rámci studie byla sledována též antiproliferativní a cytotoxická aktivita. Antiproliferativní a cytotoxická aktivita podobných látek byla totiž pozorována dříve.⁷ Hybridní molekuly i jejich "prekurzory" byly testovány proti buněčným liniím K-562 a L-929 na jejich antiproliferativní účinky (GI₅₀: koncentrace, která inhibuje buněčný růst na 50%), a proti HeLa buňkám pro jejich cytotoxický efekt (CC₅₀ a CC₁₀), viz tab. 11.

Tab. 11. Antiproliferativní a cytotoxická aktivita připravených látek.

| | Antiproliferativní aktivita | | Cytotoxicita |
|---------------|---|---|--|
| | L-929 ^a GI ₅₀ [*] | K-562 ^b GI ₅₀ [*] | HeLa ^c CC ₅₀ (CC ₁₀) [*] |
| S01 | 49,9 | 13,1 | >50 (16,3) |
| S03 | 16,7 | 5,3 | 17,5 (5,1) |
| S02 | 4,0 | 2,3 | 3,1 (1,2) |
| S04 | 2,8 | 1,0 | 4,1 (1,9) |
| S10 | 3,5 | 3,0 | 1,9 (1,0) |
| S05 | >50 | >50 | >50 (28,7) |
| S06 | >50 | >50 | >50 (20,3) |
| S07 | >50 | >50 | >50 (50,0) |
| S08 | >50 | >50 | >50 (50,0) |
| A05 | >50 | 42,8 | >50 (33,0) |
| A06 | >50 | >50 | >50 (40,0) |
| A07 | >50 | 42,6 | 48,9 (26,4) |
| A08 | 33,4 | 31 | 33,3 (18,1) |
| T 3725 | 12,5 | 24,3 | 19,7 (4,0) |
| T 3722 | 22,5 | 36,1 | 41,6 (8,7) |

| | | | |
|---------------|------|------|-------------|
| T 3723 | 16,7 | >50 | 50 (5,0) |
| T 3724 | 19,1 | >50 | 48,6 (9,9) |
| T 3120 | 34,3 | >50 | 23,6 (14,0) |
| T 3125 | 21,2 | 19,8 | 16,3 (8,6) |
| T 3126 | 24,3 | 37,5 | 21,4 (13,3) |
| INH | - | >50 | >50 (50) |

Testováno: Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung, Jena, Německo

^a myší fibroblasty

^b buněčná linie odvozená od lidské léukémie

^c buněčné linie odvozené od lidského cervikálního karcinomu

* µg/ml

6.4 Shrnutí

Z nalezených vztahů mezi strukturou a aktivitou připravených látek vyplývá, že pro zvýšení antimykobakteriální aktivity by bylo dobré optimalizovat lipofilitu tetrazolů. Méně lipofilní deriváty totiž obecně představují perspektivnější molekuly. Dále by bylo vhodné syntetizovat další příslušné sulfoxidy, které by mohly mít vhodnější hydrofilní vlastnosti, popř. další molekuly s methoxy skupinou i v jiných polohách na molekule.

Co se týče hybridních molekul, přítomnost náboje v molekule byla velmi důležitá u všech studovaných sloučenin i biologických aktivit. Nejlepší aktivitu z připravených skupin vykazovaly pyridiniové soli estronu. Porovnáním antibakteriální, antimykobakteriální, antiproliferativní a cytotoxické aktivity tří různých skupin derivátů tetrazolu (tzn. hybridních molekul estronu, 1-fenyltetrazolyl-5-thiolů, a 5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazolů) se stejnými substituenty vykazovaly 5-benzylsulfanyl-1-fenyltetrazoly nejlepší účinek.

7. Závěr

V rámci dizertace bylo připraveno 56 sloučenin, z toho 48 originálních, v literatuře nepopsaných. 78 sloučenin bylo odesláno na různé biologické testování. Látky byly charakterizovány pomocí spektrálních metod (IČ, ^1H NMR a ^{13}C NMR), pevné látky dále pomocí teploty tání a některé elementární analýzou a hmotnostní spektroskopií.

Studované látky byly otestovány *in vitro* na antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivitu. U některých sloučenin byla také sledována antiproliferativní a cytotoxická aktivita.

Ve studiu dalších derivátů 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů (hlavně s methoxy skupinou pro možné využití k elektrooxidacím) a 1-fenyl-5-benzylsulfoxytetrazolů (mají možná optimálnější lipofilitu ve vztahu ke své biologické aktivitě) pokračují kolegové z pracovní skupiny prof. Waissera. Kolegové také využívají výsledků k dalším QSAR výpočtům.

8. Souhrn

Tato práce se zabývá syntézou a biologickým testováním derivátů 1-aryl-5-(benzylsulfanyl)tetrazolu a hybridních molekul estronu.

Na našem pracovišti byly dříve nalezeny některé nové farmakofory antimykobakteriální aktivity, jakým je například alkylsulfanyl skupina vázaná na elektronově deficitním atomu uhlíku v heterocyklech. U řady antimykobakteriálně účinných látek byla zjištěna také aktivita antimykotická.

Tato práce je rozčleněna do tří tématických celků. První z nich se zabývá srovnáním antimykobakteriální aktivity skupiny derivátů 1-aryl-5-(alkylsulfanyl)tetrazolu (kde alkylem je ethyl, propyl, iso-propyl nebo allyl) a 1-aryl-5-(benzylsulfanyl)tetrazolu. Benzylové deriváty vykazovaly významně lepší aktivitu, což bylo potvrzeno QSAR analýzou. V samotné skupině benzylových derivátů se ukázalo, že substituce na benzylovém jádře vede ke snížení aktivity.

Druhým studovaným tématem byla antimykotická aktivita připravených 1-aryl-5-(benzylsulfanyl)tetrazolů hodnocená na osmi klinicky významných fungálních kmenech. Významná aktivita zde byla pozorována pouze u kmene *Trichophyton mentagrophytes*, pro který byla také provedena QSAR analýza. Ve studované skupině dochází s rostoucí lipofilitou k poklesu antimykotické aktivity.

Ve třetí části byly syntetizovány hybridní sloučeniny obsahující na steroidním jádře na kyslíku vázaný polymethylenový můstek nesoucí různé heterocyklické skupiny (vybrané deriváty tetrazolu a benzylsulfanylderiváty pyridinu). Výběr heterocyklů vycházel z látek dříve připravených na našem pracovišti, které samy o sobě vykazovaly slibnou antimykobakteriální aktivitu s cílem zjistit, zda navázáním na steroidní skelet dojde ke zvýšení biologické aktivity. Tyto látky byly hodnoceny jak proti mykobakteriím, tak i proti dalším bakteriálním agens, dále byla sledována i jejich antiproliferativní a cytotoxická aktivita. Pro biologickou aktivitu se ukázal být nezbytný náboj na sloučenině (u pyridiniových solí hybridních molekul).

9. Summary

This work is focused on the synthesis and biological evaluation of the derivatives of 1-aryl-5-(benzylsulphonyl)tetrazole and group of hybrid molecules of estrone.

It has been found before that alkylsulphonyl group bound to an electron deficient carbon of heterocyclic system represents a pharmacophore responsible for a significant antimycobacterial activity. It has been reported that some antimycobacterial compounds are often antifungal as well.

The study is subdivided into three parts. The first one compares the antimycobacterial activity of a group of derivatives of 1-aryl-5-(alkylsulphonyl)tetrazole derivatives (where ethyl, propyl, iso-propyl or allyl stands for the alkyl) and 1-aryl-5-(benzylsulphonyl)tetrazole. The benzyl derivatives exhibited significantly better activity, which was further confirmed by the QSAR analysis. Concerning the group of benzyl derivatives, it was observed that, substitution on the benzyl moiety leads to lower activity.

The second studied subject was the antifungal activity of the prepared 1-aryl-5-(benzylsulphonyl)tetrazoles evaluated on eight clinically important fungal strains. The activity was negligible with the exception of *Trichophyton mentagrophytes*. By means of QSAR analysis, it was found out in the studied group that the increase in the lipophilicity causes the decrease of the activity.

In the third part a group of hybrid molecules containing steroid unit linked by a polymethylene bridge to various heterocyclic moieties (selected tetrazole derivatives and benzylsulphonyl derivatives of pyridine) was studied. The selection of heterocycles resulted from the previously prepared compounds that exhibited promising activity by themselves. The aim was to find out whether their connection to a steroidal unit leads to biological activity enhancement. These compounds were evaluated against several mycobacterial and other bacterial strains and their antiproliferative and cytotoxic activity was also investigated. Charge on the molecule seemed to be necessary for any of the studied activities (as in the pyridinium salts of hybrid molecules).

10. Literatura

1. Raviglione M.C.: The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis*, **2003**, 83, 4-14.
2. Klimešová V.; Kočí J.; Zahajská L.: Pokroky ve vývoji nových antimykobakteriálních látek, alkylsulfanyl skupina - farmakofor antimykobakteriální aktivity. *Čes. a Slov. Farm.* **2002**, 51, 26-36.
3. Waisser K.; Klimešová V.; Odlerová Ž.: The alkyl group bound an the elektron-deficient atom of carbon as the paharmacofore od antituberculotics activity. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **1995**, 18, 31-34.
4. Waisser K.; Kuneš J.; Hrabálek A.; Macháček M.; Odlerová Ž.: New groups of potential antituberculotics: 5-alkylthio-1-aryltetrazoles. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, 61, 791-798.
5. Klimešová V.; Svoboda M.; Waisser K.; Pour M.; Kaustová J.: Synthesis and antimicrobial activity of new 4-(benzylsulfanyl)pyridine derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1999**, 64, 417-434.
6. Kuneš J.: Protituberkulózní deriváty benzothiazolu a tetrazolu. Dizertační práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové **1992**.
7. Lange C.; Holzhey N.; Schönecker B.; Beckert R.; Möllmann U.; Dahse H.-M.: ω -Pyridiniumalkylethers of steroidal phenols: new compounds with potent antibacterial and antiproliferative activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3357-3362.
8. Waisser K.; Hladůvková J.; Hrabálek A.; Klimešová V.; Kubicová L.; Kuneš J.; Macháček M.; Palát K. jr.; Sova J.; Vinšová J.; Buchta V.; Jílek P.; Odlerová Ž.: New pharmacophores of antimycobacterial and antimycotical activity. In: Postepy nauk farmaceutycznych (red. Pachecka J., Szewczyński J.), Polske towarzystwo farmaceutyczne, Warszawa **1996**.
9. Waisser K.; Hladůvková J.; Hrabálek A.; Klimešová V.; Kubicová L.; Kuneš J.; Macháček M.; Palát K. jr.; Vinšová J.; Buchta V.; Jílek P.; Odlerová Ž.: New pharmacophores of antimycobacterial and antimycotical activity. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **1998**, 21,22., 69-81.
10. Adamec J.; Waisser K.; Silva L.; Buchta V.: Antifungal activity of 1-phenyl-5-benzylsulphanyltetrazoles. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2005**, 33, 13-17.
11. Buchta V.; Jílek P.; Horáček J.; Horák V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, 1. vyd. Karolinum, Praha **1998**.
12. Macela A. a kol.: Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií, I. vyd. Grada Publishing, a.s., Praha **2006**, 155-158.
13. Melichar B. a kol.: Chemická léčiva, 3.vydání, Avicenum, Praha **1987**, 770-781.
14. Waisser K.; Palát K. jr.: Bioorganická chemie, 2. přeprac. vydání, Karolinum Praha **2001**, 155-158.

-
15. Zhang Y.; Post-Martens K.; Denkin S.: New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discovery Today*. **2006**, 11, 21-27.
16. Homolka J.; Votava V.: Tuberkulóza, Karolinum, Praha **2003**.
17. Andries K. ; Verhasselt P.; Guillemont J.; Göhlmann H.W.H.; Neefs J.-M.; Winkler H.; Van Gestel J.; Timmerman P.; Zhu M.; Lee E.; Williams P.; de Chaffoy D.; Huitric E.; Hoffner S.; Cambau E.; Truffot-Pernot C.; Lounis N.; Jarlier V.: A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2005**, 307, 223-227.
18. Nuermberger E.L.; Yoshimatsu T.; Tyagi S.; O'Brien R.J.; Vernon A.N.; Chaisson R.E.; Bishai W.R.; Grosset J.H.: Moxifloxacin-containing regimen greatly reduces time to culture conversion in murine tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, 169, 421-426.
19. Nuermberger E.L.; Yoshimatsu T.; Tyagi S.; Williams K.; Rosenthal I.; O'Brien R.J.; Vernon A.A.; Chaisson R.E.; Bishai W.R.; Grosset J.H.: Moxifloxacin-containing regimens of reduced duration produce a stable cure in murine tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, 170, 1131-1134.
20. Valerio G.; Bracciale P.; Manisco V.; Quitadamo M.; Legari G.; Bellanova S.: Long-term tolerance and effectiveness of moxifloxacin therapy for tuberculosis: preliminary results. *J. Chemother.* **2003**, 15, 66-70.
21. Rothstein D.M.; Hartman A.D; Cynamon M.H.; Eisenstein B.I.: Development potential of rifalazil. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, 12, 255-271.
22. Park Y.K.; Kim B.J.; Ryu S.: Cross-resistance between rifampicin and KRM-1648 is associated with specific *rpoB* alleles in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2002**, 6, 166-170.
23. Dietze R.; Teixeira L.; Rocha L.M.C.; Palaci M.; Johnson J.L.; Wells C.; Rose L.; Eisenach K.; Ellner J.J.: Safety and bactericidal activity of rifalazil in patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 1972-1976.
24. Barrett J.: Linezolid Pharmacia Corp. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2000**, 1, 181-187.
25. Stover C.K.; Warrener P.; Van Devanter D.R. et al.: A small molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* **2000**, 405, 962-969.
26. Waisser K.; Beckert R.; Šlosárek M.; Janota J.; Faust R.: Modification of the structure of clofazimin. *Fol. Pharm. Univ. Carol.* **1999**, 24, 41-47.
27. Waisser K.; Odlerová Z.; Beckert R.; Mayer R.: Beziehungen zwischen chemischer struktur und antimykobakterieller wirkung insbesondere gegen atypische stämme III: Oxalamidine, eine neue Gruppe von potentiellen Antituberkulotika. *Pharmazie* **1989**, 44, 234-235.

-
28. Jia L.; Tomaszewski J.E.; Hanrahan C.; Coward L.; Noker P.; Gorman G.; Nikonenko B.; Protopopova M.: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, 144, 80-87.
29. Carillo-Muñoz A.J.; Giusiano G.; Ezkurra P.A.; Quindós G.: Antifungal agents: Mode of action in yeast cell. *Rev. Esp. Quimioterap.* **2006**, 19, 130-139.
30. Hynie S.: Speciální farmakologie Díl VII Protinádorová a protiinfekční chemoterapeutika 1.vyd. Karolinum, Praha **1999**, 202-208
31. Katzung B.G. a kol.: Základní a klinická farmakologie 1.vyd. H&H, Jinočany **1995**, 404, 701-708
32. Ghannoum M.A.; Rice L.: Antifungal agents. Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Review* **1999**, 12, 501-517.
33. Lemke A.; Kiderlen A.F.; Kayser O.: Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 151-162.
34. Carillo-Muñoz A.J.; Quindós G.; López-Ribot J.L.: Current developments in antifungal agents. *Curr. Med. Chem. Anti Infective Agents* **2004**, 3,0297-323.
35. Leber R.; Fuchsbichler S.; Kloboucnikova V. et al.: Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 3890-3900.
36. Igarashi Y.; Futamata K.; Fujita T. et al.: Yatakemycin, a novel antifungal antibiotic produced by *Streptomyces spp.* TP-A0356. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2003**, 56, 107-113.
37. Yeates C.: Icofungipen (PLIVA). *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2005**, 6, 838-844.
38. Herbrecht R.; Nivoix Y.; Fohrer C.; Natarajan-Amé S.; Letscher-Bru V.: Management of systemic fungal infections: alternatives to itraconazole. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2005**, 56, Suppl. S1, i39-i48.
39. Vicente M.F.; Basilio A.; Cabello A.; Peláez F.: Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, 9, 15-32.
40. Jarvis B.; Figgitt D.P.; Scott L.J.: Micafungin. *Drugs* **2004**, 64, 969-982.
41. Vázquez J.A.: Anidulafungin: A new echinocandin with a novel profile. *Clin. Ther.* **2005**, 27, 657-673.
42. Ruiz-Herrera J.; San-Blas G.: Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2003**, 3, 77-91.
43. Bujdakova H.; Kuchta T.; Sidoova E.; Gvozdjakova A.: Anti-Candida activity of four antifungal benzothiazoles. *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, 112, 329-333.

-
44. Kawasaki K.; Masubuchi M.; Morikami K.: Design and synthesis of novel benzofurans as a new class of antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. Part 3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 87-91.
45. Kuchař M.; Rejholec V.: Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou, Academia, Praha **1987**.
46. Hansch C.; Fujita T.: ρ - σ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1616-1626.
47. Free S.M.; Wilson J.W.: A mathematical contribution to structure-activity studies. *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 395-399.
48. Kuchař M.; Rejholec V.: Kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou, Academia, Praha **1980**.
49. Waisser K.; Palát K. jr.: Bioorganická chemie, 2. přeprac. vydání, Karolinum Praha **2001**, 247-274.
50. Fujita T.; Ban T.: Structure-activity relation. 3. Structure-activity study of phenethylamines as substrates of biosynthetic enzymes of sympathetic transmitters. *J. Med. Chem.* **1971**, 14, 148 - 152.
51. Topliss J.G.: Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 1006-1011.
52. Topliss J.G.: A manual method for applying the Hansch approach to drug design. *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 463-469.
53. Lieber E.; Pillai C.N.; Hites R.D.: The reaction of nitrous acid with 4-substituted thiosemicarbazides. *Can. J. Chem.* **1957**, 35, 832-842.
54. Chattaway F.D.; Hardy R.K.; Watts H.G.: Halogen-substituted aryl thiocarbamides. *J. Chem. Soc.* **1924**, 1552.
55. Werner A.: Action of acetic anhydride on substituted thiocarbamides, and on improved method for preparing aromatic thiocarbamides. *J. Chem. Soc.* **1891**, 396.
56. Hodgkins J.E.; Reewes W.P.: The modified Kaluza synthesis III. The synthesis of some aromatic isothiocyanates. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 3089-3099.
57. Altland H.W.: Smiles Rearrangement of 2-tetrazolyl-thio-3-amidopyridines. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 3395-3399.
58. Borková K.: Deriváty tetrazolu s předpokládanou antimykobakteriální aktivitou. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové **1999**.
59. Tvrdíková H.: 5-Alkylthiotetrazoly jako potenciální antituberkulotika. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové **1988**.

-
60. Tichotová L.: Zkoumání příčin cytotoxicity konjugátů butenolidů s heterocykly. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové **2006**.
61. Morrison D.C.; Furst A.: Quinoxaline-2-thiols. *J.Org. Chem.* **1956**, 21, 470-471.
62. Hrabálek A.; Myznikov L.; Kuneš J.; Vávrová K.; Koldobskij G.: A simple method for the preparation of 5-alkylsulfinyl-1-aryltetrazoles. *Tetrahedron Letters*. **2004**, 45, 7955-7957.
63. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically Approved Standard. NCCLS Document M7-A4, 4th ed.; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Villanova, PA, 1997.
64. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Document M27-A, Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
65. Adamec J.; Beckert R.; Weiß D.; Klimešová V.; Waisser K.; Möllmann U.; Kaustová J.; Buchta, V.: Hybrid molecules of estrone: New compounds with potential antibacterial, antifungal, and antiproliferative activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 2898-2906.
66. Waisser K.; Adamec J.; Kuneš J.; Kaustová J.: Antimycobacterial 1-Aryl-5-benzylsulfanyltetrazoles. *Chem.Pap* **2004**, 58 (3), 214-219.
67. Neidlein R.; Tauber J.: Tetrazolylmercaptomethyl-isocyanate und ihre Derivate. *Chem. Ber.* **1967**, 100 (3), 736-740.
68. Ono M.; Itoh I.: N-methyl-2-dimethylaminoacetohydroxamic acid as a new reagent for the selective cleavage of active esters under neutral conditions. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30 (2), 207-210.
69. Tsuboyama K.; Takeda K.; Torii K.; Ogura H.: Convenient synthesis of allylic sulfides and application to allylic carbon-carbon bond formation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1990**, 38, 2357-2363.
70. Gol'tsberg M.A.; Koldobskii G.I.: Tetrazoles. XXXI. Phase-Transfer Reactions of 1-Substituted Tetrazole-5-thiones and Their Derivatives. *Russ. J. Org.Chem.* **1996**, 32 (8), 1194-1201.
71. Adamec J.; Waisser K.; Kuneš J.; Kaustová J.: A Note on the Antitubercular Activities of 1-Aryl-5-benzylsulfanyltetrazoles. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, 338, 385-389.
72. Waisser K.; Adamec J.; Doležal R.; Kaustová J.: 1-Aryl-5-benzylsulfanyltetrazoles, a New Group of Antimycobacterial Compounds against Potentially Pathogenic Strains. *Folia Microbiol.* **2005**, 50, 195-197.

73. Klimešová V.; Kočí J.; Pour M.; Stachel J.; Waisser K.; Kaustová J: Synthesis and preliminary evaluation of benzimidazole derivatives as antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 409-418.

74. Kočí J.; Klimešová V.; Waisser K.; Kaustová J.; Dahse H.-M.; Möllmann U.: Heterocyclic benzazole derivatives with antimycobacterial *in vitro* activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 3275.