

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



**DERIVÁTY THIAZOLU
JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA**

Diplomová práce

Hradec Králové 2008

Petra Hiršová

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za její vstřícnost a ochotu, za cenné rady a pomoc, kterou mi poskytla při vzniku této práce a Mgr. Janu Doleželovi za vedení experimentální práce.

Dále děkuji paní V. Hronové za provedení elementárních analýz, paní I. Vencovské za změření IČ spekter, Doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za změření NMR spekter, PharmDr. J. Jampilkovi, Ph.D. z firmy ZENTIVA za HPLC ověření čistoty produktů a Mgr. M. Vejsově za provedení antifungálních testů.

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

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce	8
3. Teoretická část	12
3.1 Přehled lékařsky významných hub	12
3.2 Onemocnění vyvolávaná houbami	13
3.3 Antifungální látky	15
3.3.1 Antifungální látky používané v současné terapii	18
3.3.1.1 Antimykotika s nescifickým mechanismem účinku	18
3.3.1.2 Polyenová antimykotika	19
3.3.1.3 Griseofulvin	23
3.3.1.4 Flucytosin	24
3.3.1.5 Allylaminy	25
3.3.1.6 Thiokarbamáty	27
3.3.1.7 Azolová antimykotika	28
3.3.1.8 Amorolfín	38
3.3.1.9 Ciklopirox	39
3.3.1.10 Echinokandiny a pneumokandiny	40
3.3.2 Vývoj strukturně nových typů antifungálních látek	45
4. Metodická část	53
4.1 Reaktivita rhodaninu	53
4.2 Příprava thiosemikarbazonů	55
4.3 Cyklizace thiosemikarbazonů v thiazolidin-4-on	57
4.4 Metodika vlastní práce	58
5. Experimentální část	60
5.1 Chemická část	60
5.1.1 Deriváty rhodaninu	62

5.1.1.1	Příprava (4-oxo-5-pyrazin-2-ylmetylen-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny	62
5.1.1.1.1	Esterifikace pyrazin-2-karboxylové kyseliny	62
5.1.1.1.2	Redukce methylesteru kyseliny pyrazin-2-karboxylové tetrahydroboritanem sodným	62
5.1.1.1.3	Oxidace pyrazin-2-ylmethanolu aktivním MnO ₂	63
5.1.1.1.4	Příprava (4-oxo-5-pyrazin-2-ylmetylen-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny	63
5.1.1.2	Příprava 3-amino-5-pyridin-2-ylmetylen-2-thioxothiazolidin-4-onu	65
5.1.1.3	Příprava (4-oxo-5-pyridin-2-ylmetylen-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny	66
5.1.1.4	Příprava (4-oxo-5-pyridin-3-ylmetylen-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny	67
5.1.1.5	Příprava 3-(2-hydroxyethyl)-5-(pyridin-2-ylmetylen)-2-thioxothiazolidin-4-onu	68
5.1.1.6	Příprava (4-oxo-5-pyridin-4-ylmetylen-2-thioxo-thiazolidin-3-yl)octové kyseliny	69
5.1.1.7	Příprava (5-benzyliden-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny	70
5.1.2	<i>Deriváty thiazolidin-4-onu</i>	71
5.1.2.1	Příprava 2-(pyrazin-2-ylmetylenhydrazono)thiazolidin-4-onu	71
5.1.2.1.1	Příprava pyrazin-2-karbaldehyd-thiosemikarbazonu	71
5.1.2.1.2	Příprava 2-(pyrazin-2-ylmetylenhydrazono)thiazolidin-4-onu	72
5.1.2.2	Příprava 2-(pyridin-2-ylmetylenhydrazono)thiazolidin-4-onu	73
5.1.2.2.1	Příprava pyridin-2-karbaldehyd-thiosemikarbazonu	73
5.1.2.2.2	Příprava 2-(pyridin-2-ylmetylenhydrazono)thiazolidin-4-onu	74
5.1.2.3	Příprava 2-(pyridin-3-ylmetylenhydrazono)thiazolidin-4-onu	76

5.1.2.3.1	Příprava pyridin-3-karbaldehyd-thiosemikarbazonu	76
5.1.2.3.1	Příprava 2-(pyridin-3-ylmethylenhydrazono)thiazolidin-4-onu	77
5.1.2.4	Příprava 2-(pyridin-4-ylmethylenhydrazono)thiazolidin-4-onu	79
5.1.2.4.1	Příprava pyridin-4-karbaldehyd-thiosemikarbazonu	79
5.1.2.4.2	Příprava 2-(pyridin-4-ylmethylenhydrazono)thiazolidin-4-onu	80
5.1.2.5	Příprava 2-(benzylidenhydrazono)thiazolidin-4-onu	82
5.1.2.5.1	Příprava benzaldehyd-thiosemikarbazonu	82
5.1.2.5.2	Příprava 2-(benzylidenhydrazono)thiazolidin-4-onu	83
5.2	Biologická část	85
5.2.1	<i>Hodnocení antifungální aktivity in vitro</i>	85
6.	<i>Diskuse</i>	88
7.	<i>Závěr</i>	93
8.	<i>Seznam použité literatury</i>	94
9.	<i>Přílohy</i>	100

1. ÚVOD

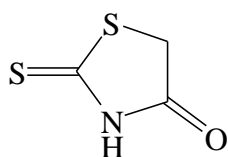
Od 80. let 20. století významně a trvale roste incidence invazivních fungálních infekcí vyskytujících se u člověka [1 – 4]. K tomuto vývoji přispívá zejména neustále rostoucí počet imunokomprimovaných jedinců, kteří jsou náchylní k množství oportunních houbových patogenů (tj. houbových patogenů, které by jen vzácně vyvolaly onemocnění u zdravého jedince). Rizikovými osobami jsou zejména pacienti s deficitem imunity (AIDS, krevní malignity), pacienti léčení imunosupresivy, protinádorovými chemoterapeutiky, širokospektrými antibiotiky, pacienti po transplantaci, pacienti s diabetem, s popáleninami apod. [4, 5]. K rizikovým faktorům patří i stále více používané invazivní metody jako jsou např. intravaskulární či močová katetrizace nebo parenterální výživa [6]. Velkým problémem se také stává nárůst multirezistentních nozokomiálních nákaz způsobovaných houbovými mikroorganismy [7]. K těmto tendencím bude v budoucnu přispívat mimo jiné též demografický trend stárnutí populace ve vyspělých zemích [5].

Invazivní mykózy se vyznačují vysokou morbiditou a mortalitou, nesnadno se diagnostikují a těžko se jim předchází. Nejčastějšími původci jsou kvasinky *Candida* spp. (zejména *C. albicans*) a vláknité houby *Aspergillus* spp. Nově se významnými patogeny stávají také *Zygomycetes*, *Fusarium* spp. či *Scedosporium* spp. [2, 3].

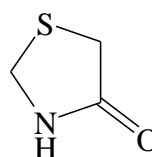
Terapie invazivních mykotických infekcí je závislá především na podávání antifungálních léčiv (antimykotik). Chirurgické zásahy či imunomodulace tvoří jen doplňkovou léčbu. Bohužel paleta vhodných antifungálních léčiv není v současnosti až tak široká. Použití dostupných antimykotik je navíc limitováno několika skutečnostmi: závažnými nežádoucími účinky (polyeny), závažnými lékovými interakcemi (azoly), vznikem rezistence (zejména azoly), mezerami ve spektru antifungálního účinku či omezenou flexibilitou v dávkování. Je zřejmé, že potřeba lepších antifungálních látek v současnosti stále roste a jejich vývoji je věnována velká pozornost [8].

2. CÍL PRÁCE

Mezi látky s potenciální antifungální aktivitou patří sloučeniny obsahující ve své molekule 2-thioxothiazolidin-4-on (rhodanin) (**1**) [9 – 12] nebo thiazolidin-4-on (**2**) [13 – 17]. Několika takovým sloučeninám a jejich inhibiční aktivitě na růst vybraných patogenních hub je věnována tato diplomová práce.



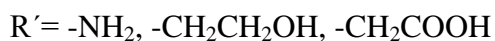
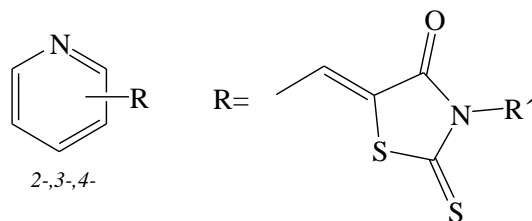
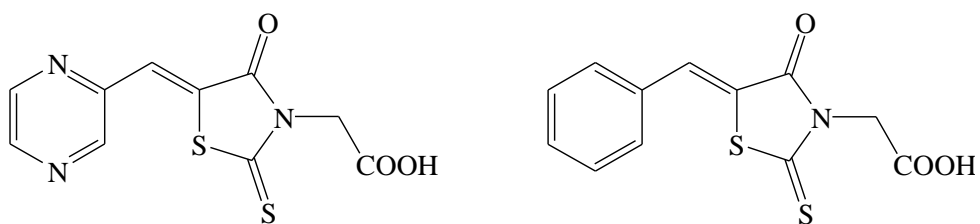
1



2

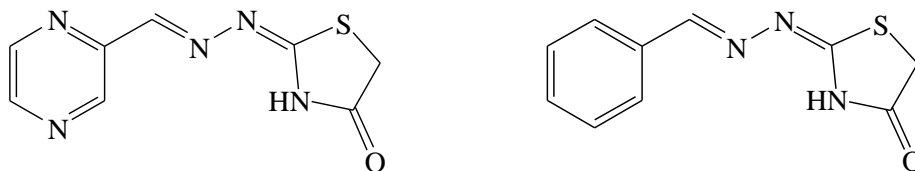
Studium derivátů rhodaninu (**1**) probíhá na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv již několik let. V jejich průběhu byla připravena série 5-(1-arylethyliden)rhodaninů [18] a 5-arylmethylidenrhodaninů [19 – 22] s nejrůznější substituací na aromatickém jádře, ale i bez ní. Tyto látky byly testovány na antifungální a antimykobakteriální aktivitu [23], také byl sledován jejich vliv na fotosyntetické procesy [24]. Prvně jmenované látky byly prakticky ve všech testech neúčinné, zatímco některé 5-benzylidenrhodaniny vykázaly antifungální působení ($\text{MIC} = 15.62 - 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$). 5-Benzylidenrhodanin a 5-(4-chlorobenzyliden)rhodanin inhibovaly růst vysoce rezistentní zygomycety *Absidia corymbifera* [25].

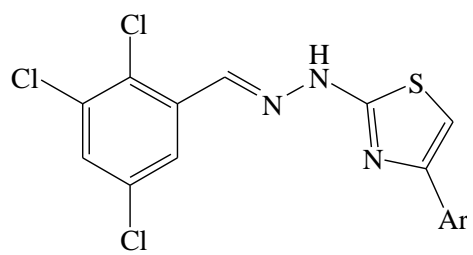
Cílem mé práce bylo doplnit paletu těchto látek o další 5-arylmethylidenrhodaniny, které však budou substituovány na dusíku thiazolidinového cyklu. Přesněji řečeno, připravit kondenzační produkty *N*-substituovaného rhodaninu s benzaldehydem, pyrazin-2-karbaldehydem a s různými polohovými izomery pyridinkarbaldehydu a tyto látky podrobit biologickému hodnocení na antifungální aktivitu. Struktury cílových látek jsou uvedeny níže.



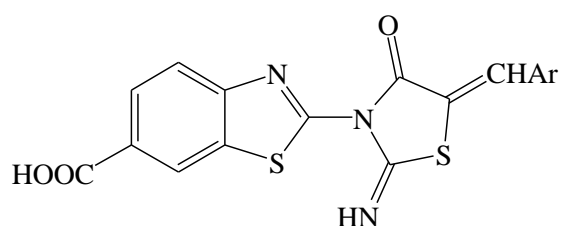
Substituce karboxymethylem na dusíku rhodaninu byla zvolena cíleně, neboť u derivátů rhodanin-3-oxové kyseliny byl popsán inhibiční účinek na fungální protein mannosyltransferasu 1 (PMT1). Tento enzym katalyzuje klíčový krok v biosyntéze mannosproteinů, které jsou důležitou součástí buněčné stěny mnohých patogenních hub a které umožňují adhezi k hostitelské buňce [9].

V druhé části své práce jsem měla za úkol připravit deriváty thiazolidin-4-onu (**2**), které byly opět předány k testování antifungální aktivity. Struktury cílových látek vystihují vzorce uvedené dále.





7



8

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Přehled lékařsky významných hub

Houby tvoří samostatnou říši živých organismů, která se nazývá Fungi. V současné době v této říši rozeznáváme šest kmenů [28]:

- Zygomycota (houby spájkivé)
- Ascomycota (houby vřeckovýtrusné)
- Basidiomycota (houby stopkovýtrusné)
- Deuteromycota (houby nedokonalé, Fungi Imperfecti)
- Chytridiomycota
- Glomeromycota

Prakticky všechny pro člověka potenciálně patogenní druhy hub náleží mezi první čtyři jmenované kmeny. Fungi Imperfecti jsou umělým taxonem, který zahrnuje nepohlavní stádia hub (tj. houby rozmnožující se výhradně pomocí konidií nebo vegetující jen jako sterilní mycelium).

Přehled hlavních zástupců lékařsky významných hub je uveden v tabulce 1.

<p>Zygomycetes</p> <p>MUCORALES</p> <p><i>Mucor, Rhizopus, Rhizomucor, Absidia</i></p> <p>ENTOOPHTHORALES</p> <p><i>Basidiobolus, Conidiobolus</i></p>
<p>Ascomycetes</p> <p><i>Talaromyces, Eurotium, Arthroderma, Claviceps, Pneumocystis</i></p>
<p>Basidiomycetes</p> <p>AGARICALES</p> <p><i>Amanita, Boletus, Inocybe, Tricholoma</i></p>
<p>Deuteromycetes (Fungi Imperfecti)</p> <p>BLASTOMYCETES (imperfektní kvasinky)</p> <p><i>Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Malassezia, Rhodotorula</i></p> <p>HYPHOMYCETES (vláknité houby rozmnožující se konidiiemi)</p> <p><i>Alternaria, Aspergillus, Blastomyces, Epidermophyton, Fusarium, Geotrichum, Histoplasma, Microsporium, Penicillium, Trichophyton</i></p>

Tabulka 1: Přehled hlavních zástupců lékařsky významných hub [29]

3.2 Onemocnění vyvolávaná houbami

Rozeznávají se čtyři základní způsoby poškození zdraví člověka houbami: mycetismy, mykotoxikózy, mykoalergie a mykózy.

Mycetismy jsou alimentární otravy, které jsou následkem požití vyšších hub a intoxikací jejich toxiny. Původci náležejí především mezi jedovaté stopkovýtusné houby (Basidiomycetes) a jsou to např. *Amanita phalloides*, *A. pantherina*, *A. muscaria*, *Entoloma lividum*, *Boletus satanas*. Mykotoxiny stopkovýtusných hub mohou být cytotoxické (amanitoxiny, fallotoxiny) nebo neurotoxické (muskarin).

Mykotoxikózy jsou otravy toxiny nebo jinými toxickými látkami sekundárního metabolismu hub, které jsou obvykle součástí kontaminované

potravy. Vzácněji dochází k intoxikaci také kontaktem či inhalací. Hlavními producenty mykotoxinů jsou vláknité houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Mezi nejvýznamnější mykotoxiny patří aflatoxiny (produkují *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*), ochratoxiny (*Aspergillus ochraceus*) či patulin (*Penicillium patulum*). K mykotoxikózám též patří tzv. ergotismus, což je intoxikace námelovými alkaloidy, které jsou obsažené ve sklerotiu askomycet *Claviceps purpurea* a *C. paspali*.

Mykoalergie jsou hypersenzitivní reakce imunitního systému hostitele na antigenní stimulaci houbového alergenu, obvykle představovaného spórami. Nejvýznamnější a nejfrekventovanější alergenní houby jsou rody *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*. Houbové alergeny mohou vyvolat alergickou rhinitis, pneumonitis, astma či toxický syndrom reakce na organický prach.

Mykózy jsou onemocnění charakterizované kolonizací, následnou proliferací a případnou diferenciací a sporulací houby v tkáních nebo tělních tekutinách hostitele, které mají za následek jeho poškození. Tento proces může být doprovázen projevy intoxikace a hypersenzitivní reakce na přítomnost patogenního agens.

Houbové infekce lze dělit podle různých hledisek, nejčastěji podle anatomické lokalizace na:

- povrchové (superficiální)
- kožní (kutánní) – dermatomykózy
- podkožní (subkutánní)
- hluboké (orgánové, viscerální).

Dle rozsahu postižení se rozlišují mykózy:

- lokalizované – zasažen jeden orgán nebo určitá anatomická lokalita
- systémové (generalizované) – postiženy dva a více orgánů.

Nejčastějšími původci lokálních mykóz jsou keratinofilní dermatofyty (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*), které postihují zejména pokožku, vlasy a nehty, a dále *Candida albicans*, která je častou příčinou recidivujících infekcí sliznic, kůže i vnitřních orgánů.

Systemové mykózy lze dělit na primární a sekundární. Primární mykózy působí dimorfní houby rodu *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides* a někdy také kvasinka *Cryptococcus neoformans*. Tato agens mohou vyvolat onemocnění i u lidí s nenarušenou obranyschopností. Zatímco sekundární mykózy jsou infekce imunoalterovaných jedinců, které jsou způsobené oportunními houbami. Nejčastěji se vyskytují jako nozokomiální nákazy (hospitalismy), jsou obtížně diagnostikovatelné, nezřídka vyžadují empirickou antimykotickou terapii a vyznačují se vysokou smrtností. Jsou vyvolávány zejména kandidami (nejčastěji *C. albicans* – 50 – 90% všech kandidóz, dále tzv. non-albicans druhy: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* atd.), aspergily (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*), kryptokoky, zygomycetami (*Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Absidia*) [29, 30].

3.3 Antifungální látky

Antifungální látky (antimykotika) jsou léčiva inhibující růst plísní a kvasinek (fungistatický účinek) nebo způsobující jejich uhynutí (fungicidní účinek). Podle mechanismu účinku je můžeme rozdělit na specifická a nespecifická.

Nespecifická antimykotika mají obecný antifungální účinek a obvykle též účinek antibakteriální vzhledem k tomu, že denaturují bílkoviny, ovlivňují permeabilitu buněčné membrány, případně vedou ke změně pH. V současné době, kdy existuje řada vysoce specifických antimykotik, se nespecifická většinou používají jako doplněk léčby specifickými. Jsou vhodná k občasnému střídání terapie, aby nedocházelo ke vzniku rezistence na specifická antimykotika.

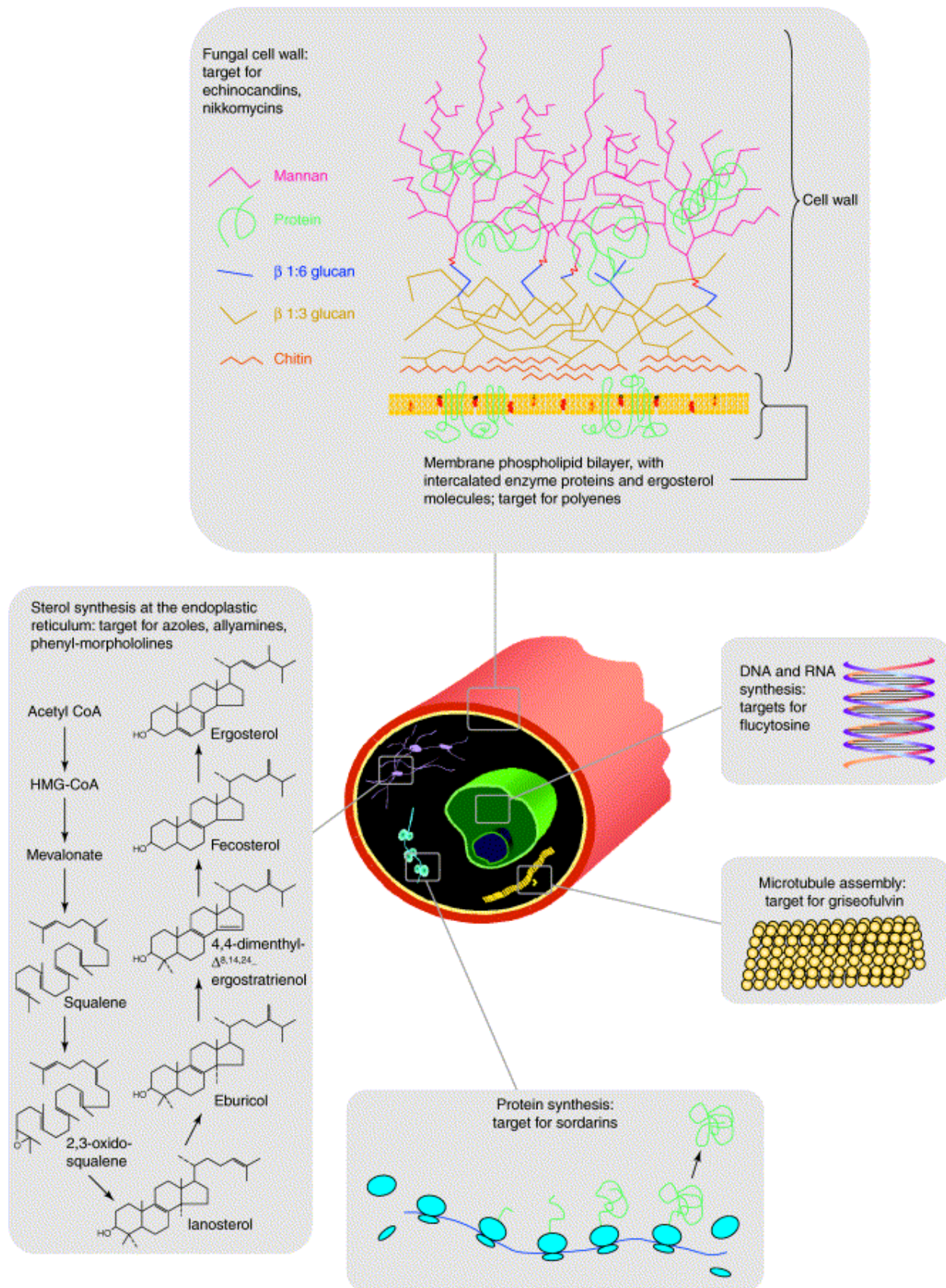
Mechanismus účinku specifických antimykotik je založen na cytologických, metabolických a transportních rozdílech mezi buňkou patogenu a hostitele. Problémem je, že buňky hub i buňky jejího hostitele (lidského organismu) jsou eukaryotické a mají tudíž do značné míry shodnou strukturu i metabolismus. Z podobnosti obou buněk rovněž vyplývají i četné nežádoucí účinky antimykotik.

Většina látek s antifungální aktivitou zasahuje do syntézy ergosterolu, který je, podobně jako cholesterol u živočišných buněk, důležitou součástí cytoplazmatické membrány hub. Allylaminy a thiokarbamáty působí inhibicí skvalenepoxidasy, azolová antimykotika inhibují cytochrom-P450-dependentní lanosterol-14- α -demethylasu a amorolfín způsobuje kumulaci 14-ignosterolu. Polyenová antimykotika (amfotericin B, nystatin, natamycin) se vážou na ergosterol z vnější strany cytoplazmatické membrány, což má za následek vytvoření póru v membráně a nekontrolovatelný únik důležitých intracelulárních iontů a molekul. Odlišným mechanismem působí flucytosin, jehož metabolit po inkorporaci do RNA inhibuje syntézu nukleových kyselin. Mechanismus působení griseofulvinu nejspíš spočívá v destrukci mitotického vřeténka.

V poslední době se výzkum zaměřil rovněž na antifungální látky, působící na jiné struktury houbových buněk, než je ergosterol. Echinokandiny, pneumokandiny, papulakandiny, polyoxiny a nikkomyciny působí inhibicí syntézy některých polysacharidů (β -glukanu, chitinu), které jsou nezbytnou složkou buněčných stěn některých hub. Pradimyciny a syringotoxiny se váží na některé proteiny membránového povrchu hub a poškozují funkci plazmatické membrány. Aureobasidiny inhibují syntézu sfingolipidů, sordariny inhibují translaci nukleových kyselin. Obrázek 1 znázorňuje místa působení některých antifungálních látek.

Podle způsobu aplikace můžeme klinicky používaná antifungální léčiva rozdělit do dvou skupin: systémová a lokální. Mezi systémová antimykotika patří antibiotika (amfotericin B, griseofulvin), deriváty imidazolu (ketokonazol, mikonazol), deriváty triazolu (flukonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol, ravukonazol), allylaminy (terbinafin), derivát pyrimidinu (flucytosin) a echinokandiny (kaspofungin, mikafungin, anidulafungin). Griseofulvin, terbinafin, ketokonazol a mikonazol se používají též pro terapii lokálních infekcí.

Lokálně se aplikují antibiotika (nystatin, natamycin), deriváty azolů (klotrimazol, ekonazol, oxikonazol, izokonazol, tiokonazol, terkonazol, bifonazol a další), allylaminy (naftifin), thiokarbamáty (tolciklát, tolnaftát) a další (např. ciklopirox, amorolfín).



Obrázek 1: Cílové struktury antifungálních látek (převzato z lit. [31])

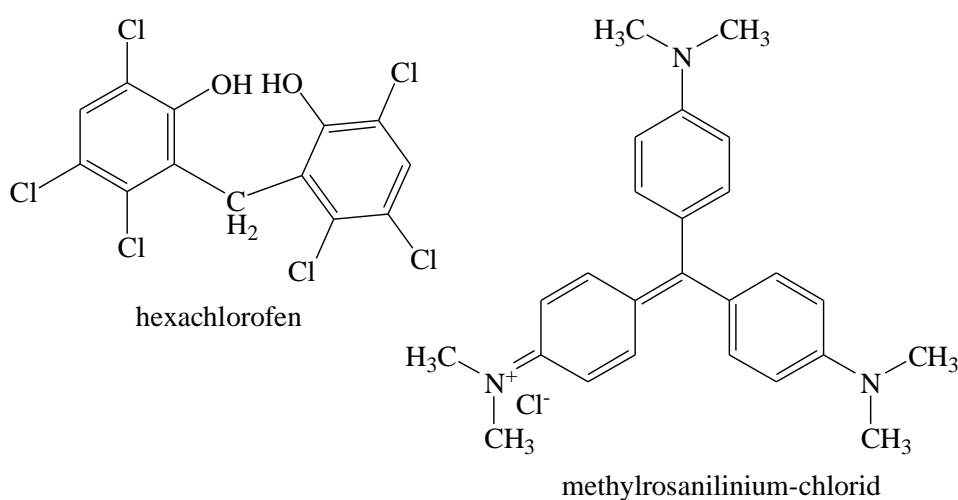
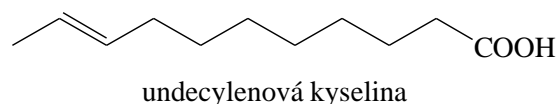
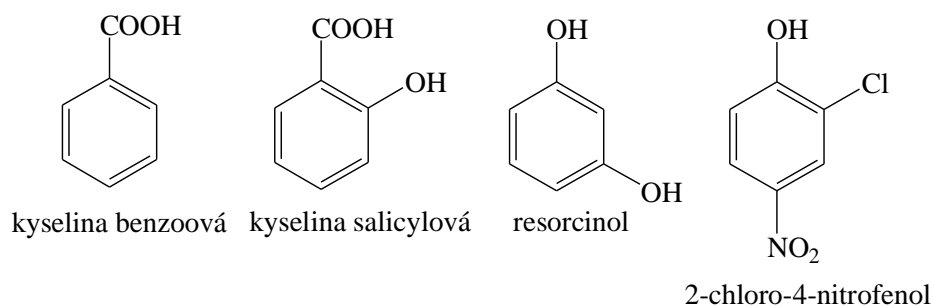
3.3.1. Antifungální látky používané v současné terapii

3.3.1.1 Antimykotika s nescifickým mechanismem účinku

Nescifická antimykotika se používají k terapii a v některých případech i k profylaxi infekcí kůže a nehtů způsobených kvasinkami a mikromycetami. Preventivní aplikace aerosolových lékových forem se používá při dekontaminaci obuvi nebo rukavic.

Nescifická antimykotika mají obecný fungistatický a obvykle i baktericidní účinek, vzhledem k tomu, že denaturují bílkoviny, ovlivňují permeabilitu buněčné membrány, případně vedou ke změně pH [32].

Jedná se o různé kyseliny (kyselina boritá, benzoová, salicylová, undecylenová) a jejich deriváty, některé aldehydy (formaldehyd), organická barviva (methylosanilinium-chlorid, malachitová zeleň), deriváty fenolů (2-chlor-4-nitrofenol, resorcinol, hexachlorofen, chinolin-8-ol), jód a jeho sloučeniny, sloučeniny rtuti (boritan fenylrtuťnatý), síru a její sloučeniny. Tyto látky způsobují současně i odlučování svrchní části pokožky. Jsou nespolehlivé zejména u hloubkových mykóz, ale i u infekcí nehtů a vlasů. Navíc se vyznačují nepříjemným zápachem, značnou dráždivostí a toxicitou [33]. Příklady nescificky působících antimykotik jsou uvedeny níže.



3.3.1.2 Polyenová antibiotika

Polyenová antibiotika jsou chemicky vzájemně příbuzné látky, které se získávají z některých druhů streptomycet. Patří mezi ně amfotericin B, nystatin a natamycin [34].

Amfotericin B

Amfotericin A a B jsou antifungální antibiotika, produkovaná *Streptomyces nodosus*, která byla izolována v roce 1956. Zatímco amfotericin A se díky své toxicitě do praxe nedostal, amfotericin B (9) je společně s flucytosinem používán při terapii systémových infekcí již od 60. let [35]. Jeho amfoterní molekulu tvoří makrocyclický laktonový kruh obsahující v jedné části konjugované dvojné vazby a v druhé polyhydroxylový polární řetězec.

K hydrofilní části skeletu je ještě připojena jedna volná karboxylová skupina a jedna glykosidicky vázaná molekula mykosaminu. Přesto však je amfotericin B ve vodě nerozpustný [33].

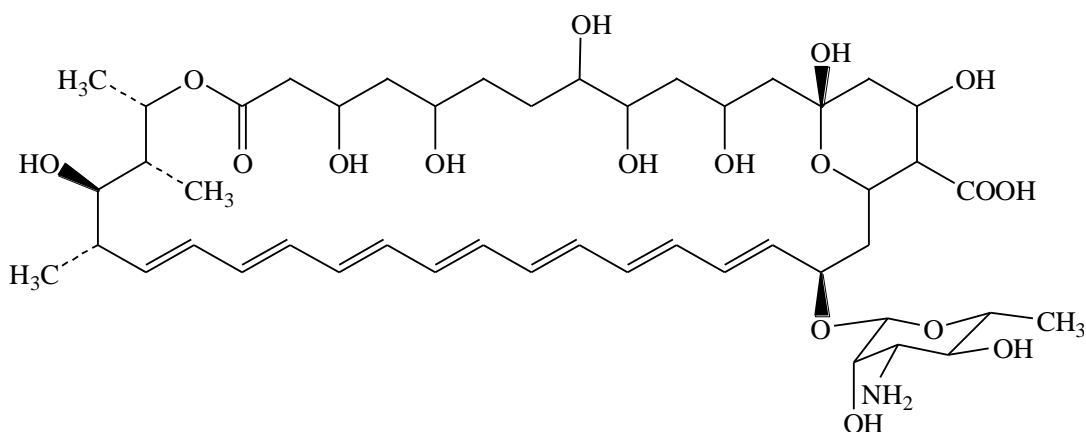
Mechanismus antifungálního účinku amfotericinu B spočívá ve vazbě na ergosterol obsažený v buněčné membráně hub. Tato vazba má za následek vytvoření póru v membráně, což vede k úniku důležitých intracelulárních iontů a molekul. Díky tomu působí převážně fungicidně a má široké spektrum účinku [6]. Při dlouhodobějším podávání dochází k vývoji rezistence v mnohem menší míře než u jiných antimykotik. Tato případná rezistence je dána snížením množství ergosterolu v membráně či modifikací jeho struktury [36].

Po perorální aplikaci se amfotericin B téměř nevstřebává, proto se podává pouze parenterálně jako pomalá infuze. Distribuce do méně prokrvených tkání a ostatních tělesných tekutin je dosti nízká, navíc se silně (až z 99%) váže na bílkoviny krevní plazmy. Injikované léčivo se vylučuje močí a žlučí velice pozvolna. Zbytky látky jsou vylučovány řadu dní až týdnů po ukončení terapie. Podávání amfotericinu je spojeno s četnými nežádoucími účinky, z nichž nejzávažnější bývá nefrotoxicita [6, 37].

Toxické působení je dáváno do souvislosti se schopností amfotericinu B vázat se do určité míry i na cholesterol, jenž je obsažený v membránách živočišných buněk. Molekula houbového ergosterolu má cylindrickou trojrozměrnou strukturu, zatímco u cholesterolu má sigmoidální tvar. Tento rozdíl v konformaci pravděpodobně stačí k vysvětlení větší afinity amfotericinu B k ergosterolu než cholesterolu. Rozdíl v konformaci a vyšší poměr ergosterolu k fosfolipidům v buněčné membráně hub (než poměr cholesterolu k fosfolipidům v membráně savčích buněk) je základem pro antifungální selektivitu amfotericinu B. Nicméně tato selektivita není až tak vysoká a umožní amfotericinu B být potenciálně toxický i pro savčí buňky [31].

I přes uvedené nevýhodné vlastnosti je amfotericin B stále považován za zlatý standard v léčbě hluboce uložených infekcí způsobených vláknitými houbami (např. *Aspergillus*, *Mucor*) a v léčbě systémových kandidóz u neutropenických pacientů. Je nejčastěji používaným lékem v empirické terapii mykotických infekcí u febrilních neutropenických pacientů [6].

Pokusy o modifikaci struktury s cílem snížit toxické účinky a vylepšit farmakokinetický profil nevedly prozatím k uspokojivému cíli [38]. Avšak určitého pokroku bylo dosaženo technologickou úpravou lékových forem. Kromě konvenčního amfotericinu B (koloidní suspenze s deoxycholovou kyselinou) jsou v současné době dostupné další tři formy s výhodnějšími vlastnostmi: amfotericin B v koloidní disperzi s cholesteryl-sulfátem (ABCD), amfotericin B inkorporovaný do liposomů (AmBi), agregáty amfotericinu B stabilizované pomocí lipidů (ABLCL). Takto upravený amfotericin B se po parenterální aplikaci uvolňuje z vehikula daleko pomaleji, neváže se tak silně na plazmatické bílkoviny a lépe proniká do tkání. Působí méně toxicky, ale je stejně účinný jako konvenční. Navíc u těžších případů lze podávat vyšší dávky [39]. Výzkum se zabývá i dalšími možnostmi technologické úpravy (např. cochleate-amfotericin B, solid lipid nanoparticles) [40].



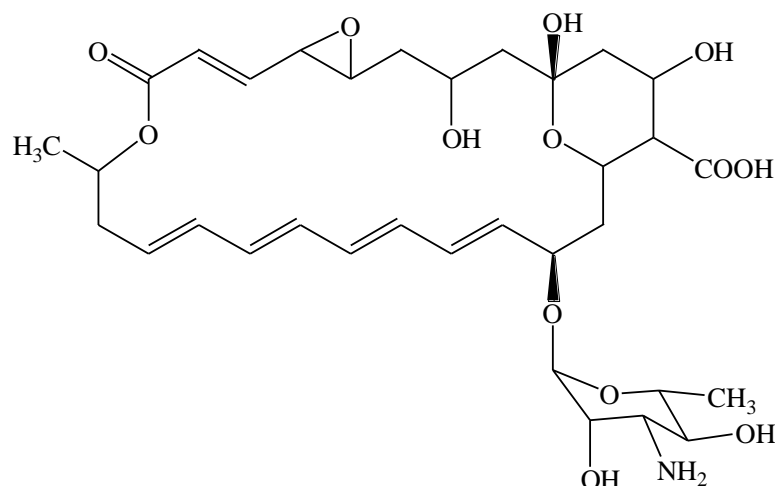
9

Nystatin

Nystatin (**10**) je produkován *Streptomyces noursei*. Jeho mechanismus účinku i struktura jsou blízké amfotericinu B [34].

Z kůže, sliznic nebo z gastrointestinálního traktu se nystatin významněji neabsorbuje. Pro parenterální podání je příliš toxický.

Použití nystatinu je omezeno na lokální léčbu kožních a slizničních mykóz vyvolaných druhem *Candida*. Perorálně je nystatin podáván pro částečné



11

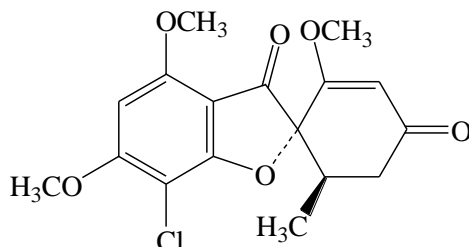
3.3.1.3 Griseofulvin

Griseofulvin (**12**) je antibiotikum, které bylo izolováno již v roce 1939 z *Penicillium griseofulvum*, ale do klinického používání pro léčbu dermatofytóz bylo uvedeno v roce 1957. Jeho molekula obsahuje dvě centra chiralit, přírodní izomer má absolutní konfiguraci (+)-2*S*,6'*R*-. Ve vodě je velice špatně rozpustný [33, 35].

Přesný mechanismus jeho působení není zcela znám. Jednou z možných hypotéz je, že interferuje s mikrotubuly dělicího vřeténka a tím inhibuje mitózu fungálních buněk. Také možná zasahuje do syntézy důležitých komponent buněčné stěny (např. chitinu) [4, 31]. Působí fungistaticky a jeho spektrum účinku je omezeno pouze na dermatofyty (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton* spp.) a *Trichosporum* [4].

K místu svého působení musí dospět krevní cestou, proto se podává perorálně. Pro lepší absorpci je připravován v mikronizované či ultramikronizované formě. Absorbovaný griseofulvin má afinitu k infikované kůži, v níž se ukládá vázaný na keratin. Keratin se tím stává rezistentní k růstu hub a nově rostoucí vlasy nebo nehty jsou již zbaveny infekce. Odlučující se keratinizované struktury jsou nahrazovány neinfikovanými. Celková četnost nežádoucích účinků je nízká, ale jsou popisovány i projevy přímé toxicity. U laboratorních zvířat má griseofulvin teratogenní a karcinogenní účinky [34, 41].

Po zavedení terbinafinu a azolových antimykotik ztratil svůj terapeutický význam [6].



12

3.3.1.4 Flucytosin

Flucytosin (**13**), neboli 5-fluorocytosin byl původně připraven v roce 1957 jako antineoplastikum antimetabolitového typu. Avšak místo antiproliferativní aktivity vykázal antifungální působení [35].

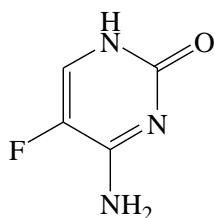
Jeho mechanismus antifungálního účinku využívá biochemické zvláštnosti některých hub. Flucytosin je konvertován uvnitř buňky na 5-fluoruracil, který je inkorporován do molekuly RNA, a zásahem do zabudování thymidinu je tak inhibována syntéza DNA. Pro tento sled dějů musí mít daná buňka cytosinpermeasu (pro transport molekuly flucytosinu přes plazmatickou membránu), cytosindeaminasu (k přeměně proléčiva na 5-fluoruracil) a uracilfosforibosyltransferasu (k přeměně 5-fluoruracilu na substrát pro syntézu nukleových kyselin). Většina vláknitých hub postrádá tyto enzymy, proto je spektrum účinku flucytosinu omezeno jen na patogenní kvasinky [31].

Flucytosin se obvykle podává nitrožilní infúzí, ale může být podán i perorálně, neboť se dobře absorbuje. Rozsáhle se distribuuje do tkání včetně mozkomíšního moku, na plazmatické bílkoviny se váže nevýznamně [6]. Flucytosin je z velké části vylučován ledvinami v nezměněné podobě a koncentrace v moči dosahuje až desetinásobku jeho koncentrace v plazmě. Při selhání ledvin se proto může kumulovat až k dosažení toxických hladin. Kumulace flucytosinu v organismu a následné toxické působení může být rovněž způsobeno nefrotoxitou současně podávaného amfotericinu B [41].

Pro savčí buňky je flucytosin relativně netoxický. Pravděpodobně je to proto, že postrádají specifickou permeasu nutnou pro jeho transport dovnitř buňky. Nežádoucí účinky tedy nejsou časté. Případné poruchy krvetvorby lze přičíst toxicitě 5-fluoruracilu, který vzniká zřejmě vlivem střevní mikroflóry [35].

Indikací flucytosinu (v souladu s mechanismem účinku) jsou infekce způsobené *Cryptococcus neoformans* a některými druhy *Candida*. Největší uplatnění má kombinace s amfotericinem B při léčbě kryptokokové meningitidy. Kombinace je spojena s potenciací antifungálního účinku a také umožní snížení dávek amfotericinu B [39].

Flucytosin se podává výhradně v kombinaci s jinými antimykotiky, protože se má za to, že se velmi často objevuje primární i sekundární rezistence. Nicméně nedávné velmi rozsáhlé testování vnímavosti druhů *Candida* současnou doporučenou metodologií překvapivě odhalilo jen několik primárně rezistentních klinických izolátů, což kontrastuje s výsledky nestandardizovaných testů provedených v 70. letech 20. století. Flucytosin by snad proto mohl být v praxi používán častěji než doposud [31, 43].



13

3.3.1.5 Allylaminy

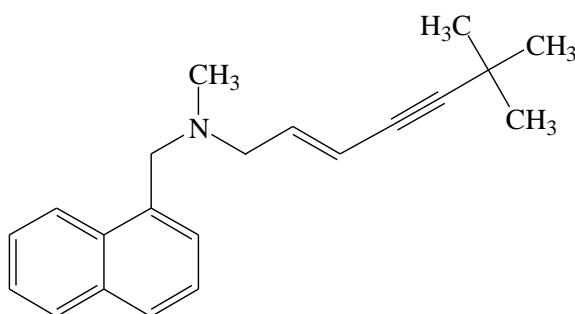
Antifungální látky typu allylaminu byly připraveny koncem 70. let 20. století. Mezi jejich zástupce patří terbinafin, naftifin a butenafin. Označení této skupiny je dnes spíše tradiční, společným rysem uvedených látek je naftylmethylaminové uspořádání [33].

Terbinafin

Synteticky připravený terbinafin (**14**) je reverzibilní, nekompetitivní inhibitor skvalenepoxidasy, která katalyzuje jeden z prvních kroků biosyntézy ergosterolu. Nedostatek ergosterolu a hlavně hromadění toxického skvalenu způsobí narušení funkce buněčné membrány s následným zánikem fungální buňky [31, 44]. Terbinafin působí fungicidně na dermatofyty (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*), ale i na *Aspergillus* spp., *Blastomyces dermatitidis* a *Histoplasma capsulatum* [45].

Používá se lokálně k terapii superficiálních dermatofytóz (tinea pedis, tinea corporis, pityriasis versicolor apod.). Perorálně se podává u onychomykóz a kožních infekcí, nereagujících na místní léčbu, nebo u rozsáhlých a chronických stavů. Podle klinických zkušeností je snášenlivost terbinafinu dobrá, občas se vyskytují gastrointestinální nežádoucí účinky nebo kopřivka [44]. Popsány jsou vzácné (ale velmi závažné) kožní reakce jako Stevensův-Johnsonův syndrom a toxická epidermální nekrolýza (s četností asi 1 : 100 000, avšak až 40% úmrtností) [34].

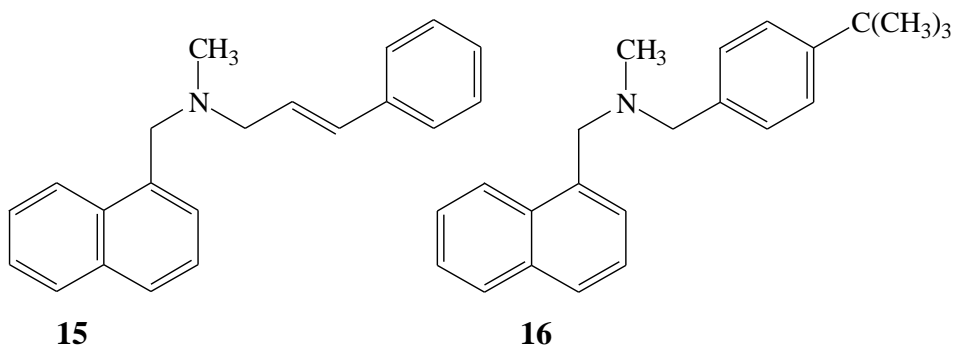
Přestože terbinafin není schválen pro léčbu viscerálních mykóz, existuje zájem o možnost kombinovat terbinafin s ostatními inhibitory syntézy ergosterolu k docílení synergistického inhibičního působení [31].



14

Naftifin, butenafin

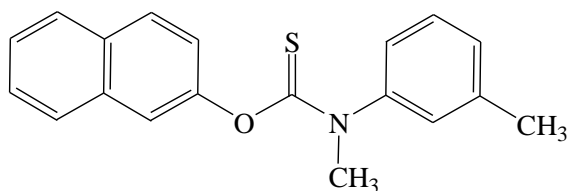
Naftifin (**15**) a butenafin (**16**) jsou strukturou a mechanismem účinku příbuzné terbinafinu. Aplikují se lokálně k léčbě kožních infekcí, zejména dermatofytóz. Naftifin navíc působí protizánětlivě [34].

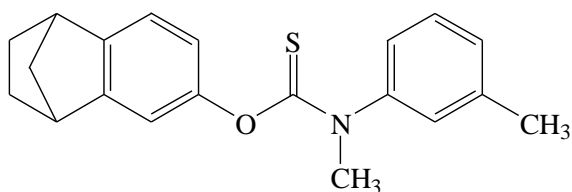


3.3.1.6. Thiokarbamáty

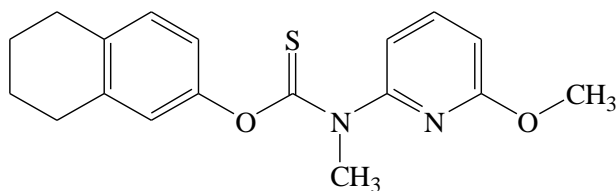
Thiokarbamáty jsou další skupinou syntetických lokálních antimykotik, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici skvalenepoxidasy. Jako první byl připraven **tolnaftát (17)** v roce 1960. Jeho indikací byly onychomykózy a mykózy vlasů či vousů. Později byl připraven lipofilnější derivát **tolciclát (18)**. Nejmladším zástupcem klinicky používaným zástupcem je **liranaftát (19)** [33].

Tyto látky mají podobné spektrum účinku zahrnující hlavně dermatofyty (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*). Dnes už je od jejich použití opuštěno [34].





18



19

3.3.1.7 Azolová antimykotika

Přestože první zpráva o antifungální aktivitě azolové sloučeniny (benzimidazolu) pochází z roku 1944, začal se výzkum více zajímat o azolové sloučeniny až po roce 1958, kdy byl do praxe zaveden chlormidazol (derivát benzimidazolu). Ten se uplatnil hlavně proti dermatofytům, ale i proti grampozitivním bakteriím. V polovině 60. let byla zaznamenána antimykotická aktivita i u jiných derivátů imidazolu (např. anthelmintik thiabendazolu, tetramizolu, mebendazolu), a v pozdějších letech (koncem 60. let) byla vyvinuta řada imidazolových antimykotik (klotrimazol, mikonazol, ekonazol). V roce 1977 byl vyvinut ketokonazol, první perorálně podávané systémové azolové antimykotikum. Výměnou imidazolového kruhu za triazolový byla získána v polovině 80. let nová skupina azolových antimykotik (triazoly), vhodná zejména pro systémové podávání [46].

Antimykotika typu azolů se tedy dělí podle centrálního pětičlenného heterocyklu na starší deriváty imidazolu a na novější látky triazoly, obsahující jeden či dva triazolové kruhy. Pro účinek jsou esenciální atomy dusíku (u imidazolu v poloze 3, u triazolu v poloze 4), které se účastní vazby na cílovou

molekulární strukturu. Bohatá substituce lipofilními skupinami je výhodná pro průchod přes buňčné membrány [33].

Fungistatické působení azolů je spojeno se narušením syntézy ergosterolu inhibicí 14 α -demethylace lanosterolu, u některých druhů hub též inhibicí pozdějšího kroku Δ 22-desaturace. Nedostatek ergosterolu v plazmatické membráně a jeho náhrada neobvyklými steroly poškodí její permeabilitu a fluiditu, také sekundárně ovlivní aktivitu několika transmembránových enzymů (např. chitinsyntasy). Hlavním molekulárním cílem azolů je cytochrom P450-Erg11p (cytochrom-P450-dependentní lanosterol-14- α -demethylasa neboli Cyp51p), který katalyzuje oxidativní odštěpení methylové skupiny vazané v poloze 14 α v molekule lanosterolu a/nebo v molekule eburikolu. Tento enzym ve své aktivní části obsahuje protoporfyrin s atomem železa, na který se azoly váží díky svému atomu dusíku obsaženému v imidazolovém nebo triazolovém kruhu. Zbývající část molekuly azolu se váže na apoprotein (různým způsobem v závislosti na vlastnostech struktury azolu). Konkrétní konformace aktivní části proteinu se liší u jednotlivých druhů hub i u savců. Přesná podstata interakce mezi molekulou azolu a jednotlivými druhy cytochromu P450 proto určuje rozsah inhibičního působení daného azolu u odlišných druhů hub [4, 31, 46].

Vzhledem relativně neselektivní podstatě terapeutického cíle dochází také k inhibici P450-dependentních enzymů v biochemických drahách savců, což je pak zodpovědné za určitou toxicitu. Avšak u novějších látek (např. itraconazolu, vorikonazolu) je tato toxicita podstatně nižší a méně závažná než u starších, což může být vysvětleno větší afinitou k fungálním než savčím P450-dependentním enzymům při terapeutických koncentracích [46].

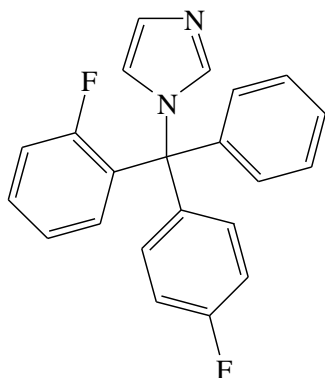
U azolů existuje riziko vzniku rezistence, zejména při jejich dlouhodobém podávání. Může to být následkem mutace genu, který kóduje cílovou molekulu (14 α -demethylasu), nebo následkem zvýšené exprese membránových efluxních transportérů. Kombinace těchto dvou mechanismů byla zjištěna u některých izolátů *C. albicans*. [36]

Imidazoly

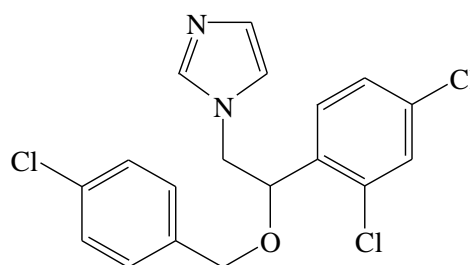
Zástupci této skupiny jsou např. klotrimazol, flutrimazol (**20**), ketokonazol, mikonazol, ekonazol (**21**), isokonazol, tiokonazol, bifonazol (**22**), oxikonazol (**23**). Mezi novější léčiva patří krokonazol, sertakonazol, omokonazol, eberkonazol, lanokonazol a řada dalších látek. Současný vývoj v této skupině směřuje k přípravě topických antimykotik se zlepšenou penetrací do tkání, což zvyšuje jejich účinnost zejména proti dermatofytům [33, 47].

Tato antimykotika se používají hlavně lokálně. Mají široké antifungální spektrum zahrnující dermatofyty (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*) a kvasinky, včetně *C. albicans*, *C. neoformans*. Používají se v dermatologických a gynekologických indikacích. Při lokální aplikaci se neresorbují, proto také nevyvolávají systémové nežádoucí projevy. [34]

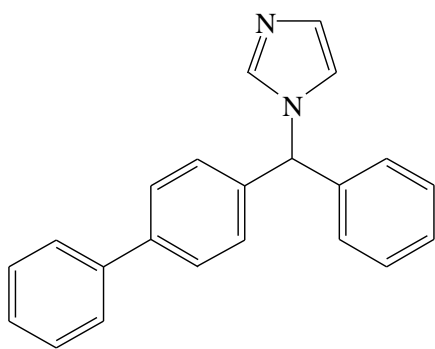
Většina imidazolových derivátů nemůže být podána systémově pro svou významnou biotransformaci v organismu vedoucí k nemožnosti dosažení účinných koncentrací v tkáních nebo z důvodu toxicity. Avšak systémově používané imidazoly (ketokonazol, mikonazol) jsou využívány i pro lokální terapii.



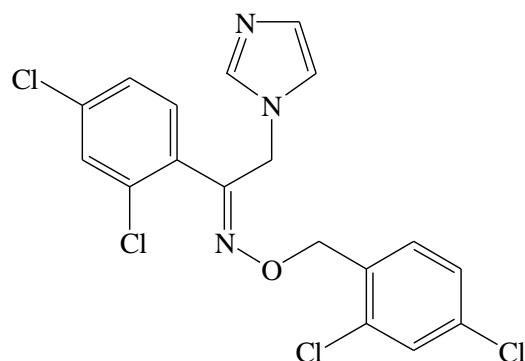
20



21



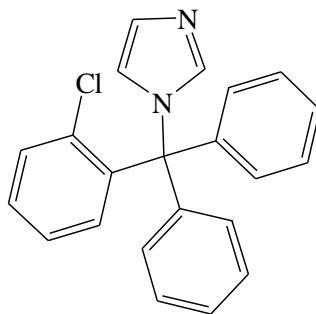
22



23

Klotrimazol

Klotrimazol (**24**) je fungistatické až fungicidní antimykotikum se širokým spektrem účinku. Působí nejen na kvasinky, dermatofyty a dimorfní houby, ale také na některé grampozitivní mikroorganismy (především stafylokoky a streptokoky), gramnegativní mikroorganismy (*Bacteroides* spp., *Gardnerella vaginalis*) a některá protozoa (*Trichomonas vaginalis*) [32].

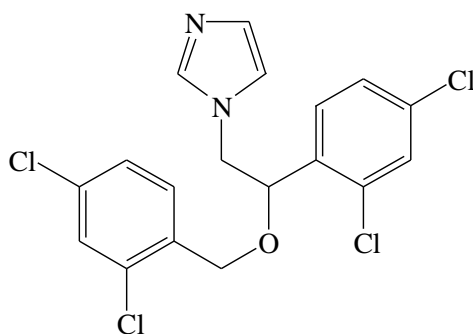


24

Mikonazol

Mikonazol (**25**) byl připraven v roce 1969 a stal se strukturním prototypem obsahujícím vysoce lipofilní fragment, který se později v různých modifikacích objevuje u většiny imidazolových antimykotik.

Mikonazol byl první azol použitelný pro systémové podání. Jeho enterální resorpce je ovšem nejistá, proto se musí být podáván intravenózně. Závažné nežádoucí účinky (jako hyperlipidemie, hyponatremie, tromboflebitida, hematologické poruchy a další) však omezily jeho praktické použití. Navíc jako silný inhibitor cytochromu P450 interaguje s mnoha léčivy, jejichž metabolismus je také spjat s tímto monooxygenasovým systémem [34, 35].



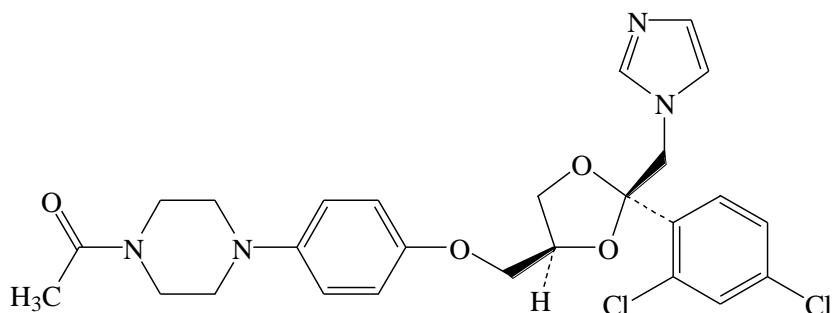
25

Ketokonazol

Byl prvním léčivem z této skupiny, které mohlo být podáváno perorálně a bylo přitom účinné u některých celkových mykóz. Do té doby, než byly uvedeny triazoly, byl ketokonazol (26) lékem volby u chronických mukokutánních kandidóz a alternativou amfotericinu B u méně závažných případů blastomykóz, histoplazmóz a parakocidioidomykóz.

Ketonazol se po perorálním podání dobře absorbuje a rozsáhle distribuuje, ale jeho koncentrace v centrálním nervovém systému jsou nízké. Jeho nevýhodou je, že inhibuje cytochrom P450 a tím i biotransformaci některých léčiv. Vysoké dávky snižují syntézu steroidů a androgenů v nadledvinách (např. testosteronu a kortizolu). Vzácně (zvláště při déletrvajícím podávání) se rozvíjí progredující hepatitida.

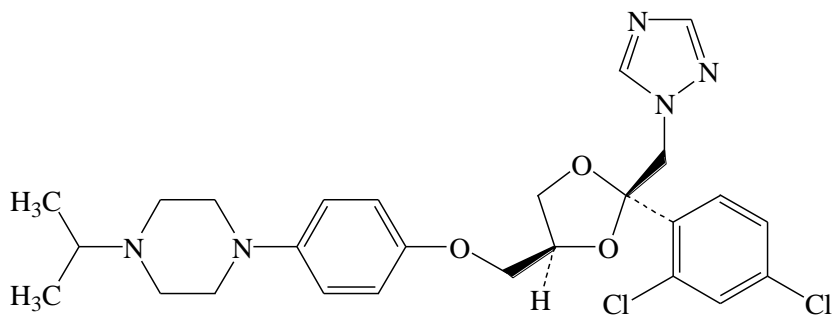
Pro perorální systémovou terapii jsou dnes k dispozici novější a lépe snášené azoly, proto se používá spíše k lokální terapii [34, 35].



26

Triazoly

Léčiva této skupiny byla odvozena od imidazolových antimykotik analogickou náhradou imidazolového cyklu za triazolový. Takto byl např. z ketokonazolu připraven **terkonazol (27)**, první zástupce triazolů registrovaný pro humánní užití, který je účinný u dermatomykóz a vaginálních kandidóz. Další látky byly připraveny rozsáhlejší obměnou modelových struktur. Ty jsou navíc vhodné i pro systémovou terapii. Mají široké spektrum antimykotické účinnosti, jsou dostatečně účinné i při použití relativně malých dávek a jsou relativně dobře snášeny [34].



27

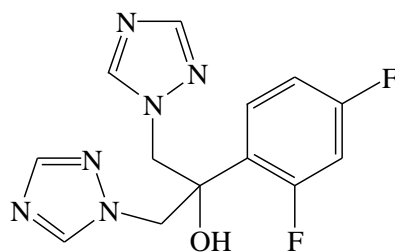
Flukonazol

Flukonazol (**28**) ve své molekule obsahuje dva triazolové kruhy a mimoto hydroxyskupinu, která snižuje hydrofobicitu, proto je látka poměrně dobře

rozpuštná ve vodě a může se podávat intravenózně. Po perorálním podání má flukonazol velmi dobrou biologickou dostupnost, rozsáhle se distribuuje do tkání a tělesných tekutin včetně mozkomíšního moku. Avšak může interagovat s řadou léčiv metabolizovaných cytochromem P450 [34].

Spektrum účinku zahrnuje např. rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Trichophyton*. Indikací flukonazolu jsou mykózy vnitřních orgánů vyvolané kandidami a kryptokoky.

U flukonazolu je popsán vznik rezistence *Candida* spp. a výskyt zkřížené rezistence s ostatními azoly. S rezistentními druhy rodu *Candida* se lze setkat zejména u pacientů, kterým bylo toto léčivo podáváno dlouhodobě. Tím se vyselektovaly druhy jako *C. krusei* a *C. glabrata*, které jsou již z podstaty méně citlivé na flukonazol. Flukonazol-rezistentní *C. albicans* se vyskytuje nejčastěji u pacientů s AIDS, částečně díky širokému užívání flukonazolu v léčbě závažných orálních a faryngeálních kandidóz u těchto pacientů a také částečně proto, že se v jejich orofaryngeální oblasti vyskytuje obrovské množství těchto kvasinek, takže zde roste šance vzniku rezistence jako následek spontánních mutací [6].



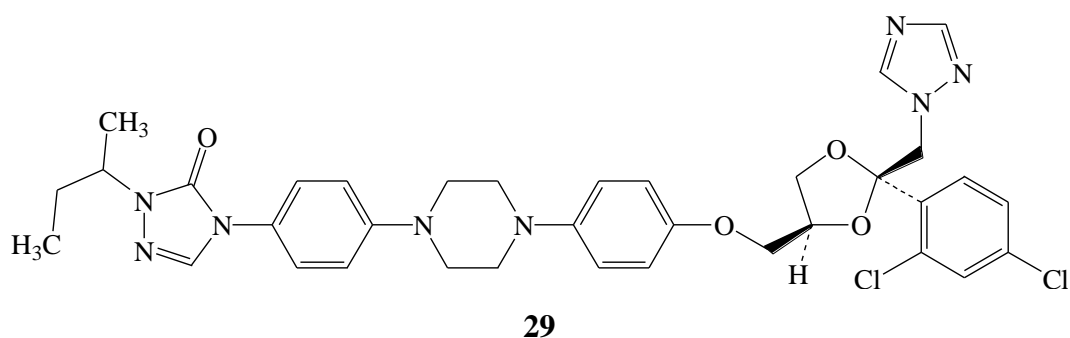
28

Itrakonazol

Itrakonazol (**29**) je strukturně blízký ketokonazolu. Oproti flukonazolu má širší spektrum účinku, zahrnující i *Aspergillus* spp., avšak horší farmakokinetické vlastnosti. Po perorálním podání má nižší biologickou dostupnost a navíc pro absorpci vyžaduje nižší žaludeční pH. Lepší perorální absorpci má itrakonazol-cyklodextrinový komplex, který je však možné aplikovat

i parenterálně. Itrakonazol se silně kumuluje v tkáních a pomalu se vylučuje ve formě metabolitů vytvořených v játrech ($t_{1/2} \sim 30$ hodin). Je relativně dobře snášen a na rozdíl od ketokonazolu neovlivňuje funkci jater a syntézu steroidních hormonů. Může také inhibovat odbourávání jiných léčiv ovlivněním cytochromu P450 [34, 41].

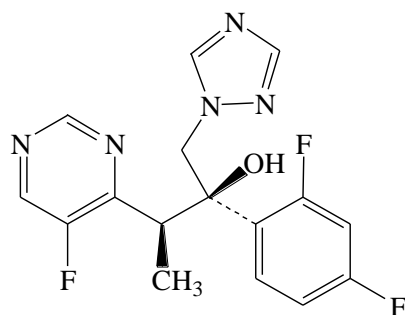
Itrakonazol se používá perorálně k terapii lokálních mykóz, které dostatečně nereagují na místní léčbu. Lze jej podávat i při určitých systémových mykózách (např. aspergilóze, kandidóze, kryptokokóze, histoplazmóze) [34].



Vorikonazol

Je strukturně podobný flukonazolu. Má velmi široké spektrum účinku zahrnující rody *Candida* (včetně flukonazol-rezistentních) a *Aspergillus*. Kromě toho vykazuje aktivitu vůči *Scedosporium* spp. nebo *Fusarium* spp., které mají omezenou vnímavost vůči jiným současným antimykotikům. Vorikonazol (**30**) je tedy indikován k léčbě invazivních aspergilóz, kandidemií (u pacientů bez neutropenie), závažných flukonazol-rezistentních kandidóz, scedosporióz a fusarióz [48]. Díky svému fungicidnímu účinku vůči *Aspergillus* spp. by mohl vorikonazol časem nahradit amfotericin B v terapii invazivních aspergilóz [6].

K dispozici jsou lékové formy jak pro perorální, tak i pro intravenózní podání. Jeho výhodou oproti itrakonazolu je lepší gastroenterální resorpce, která není ovlivněna aciditou žaludku [6].

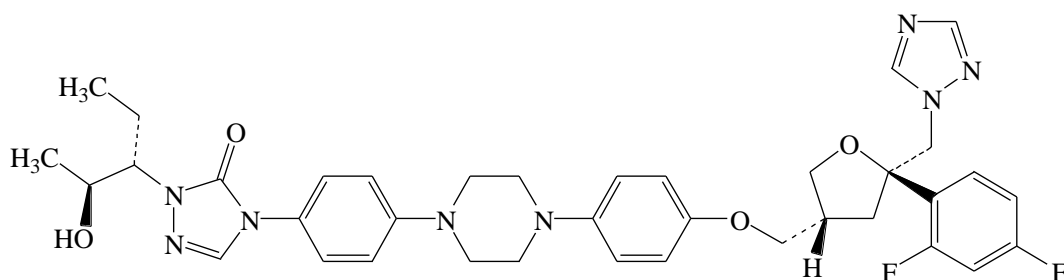


30

Posakonazol

Posakonazol (**31**) je strukturou blízký itrakonazolu (je jeho hydroxylovaným analogem). Z dostupných azolových antimykotik má nejširší spektrum účinku. Jako jediný z azolů působí i proti zygomycetám. Má rovněž vysokou trypanocidní aktivitu (i na druh *Trypanosoma cruzi*, jenž je rezistentní na nitrofurany a nitroimidazoly) [49].

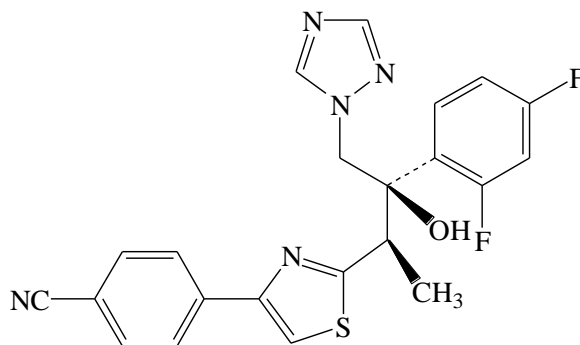
Posakonazol je schválen k profylaktickému podávání proti invazivní aspergilóze či kandidóze. Dále může být použit k léčbě ezofaryngeální kandidózy, invazivní aspergilózy, chromoblastomykózy, kokcidiomykózy, fusariózy či mycetomu (plísňového nádoru) u pacientů, kteří netolerují běžně používaná antimykotika nebo kde byla předchozí léčba běžnými antimykotiky neúčinná [2].



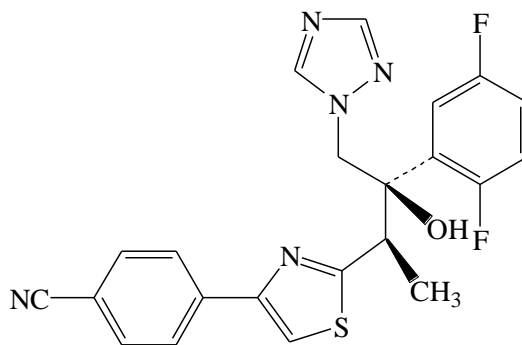
31

Ravukonazol, Isavukonazol

Ravukonazol (**32**) a isavukonazol (**33**) jsou deriváty lišící se polohou atomu fluoru. Mají velmi široké spektrum aktivity a velmi dlouhý poločas. Dobré výsledky ze studií *in vivo* poukazují na jejich účinnost u aspergilóz a kandidóz. Obě tato léčiva jsou nyní v třetí fázi klinického zkoušení [8, 50].



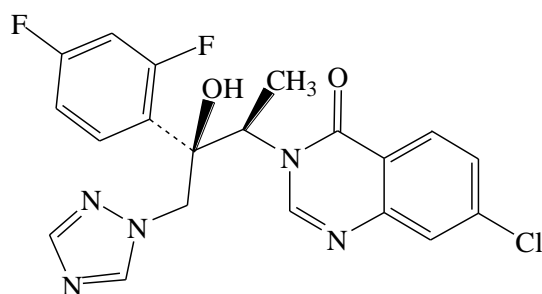
32



33

Albakonazol

Albakonazol (**34**) má velmi široké spektrum účinku, dobré farmakokinetické vlastnosti a výbornou biologickou dostupnost po perorálním podání. Nyní má za sebou první dvě fáze klinického zkoušení [8, 50].



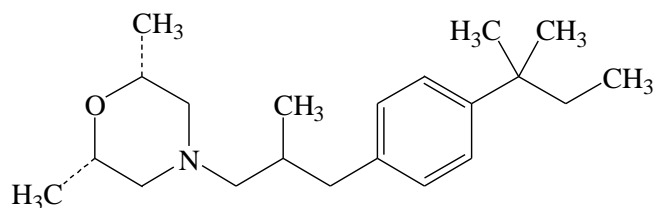
34

3.3.1.8 Amorolfin

Amorolfin (35), jediný používaný zástupce ze skupiny derivátů fenylnorfolinu, byl zaveden do praxe v polovině 80. let 20. století.

Inhibuje syntézu ergosterolu na dalším stupni za místem působení azolů. Děje se tak ve dvou krocích a to inhibicí enzymu Erg24p ($\Delta 14$ -reduktasy) a Erg2p ($\Delta 8$ - $\Delta 7$ -izomerasy). Výsledkem je nedostatek ergosterolu a kumulace $\Delta 14$ -ignosterolu v plazmatické membráně. Působí fungistaticky až fungicidně a má široké spektrum účinku (kvasinky, dermatofyty, dimorfní houby) [31, 51].

V experimentálních modelech systémových mykóz nevykazoval amorolfin významnou aktivitu [52]. Používá se pouze k lokální léčbě superficiálních mykóz. Dobře prostupuje do hmoty nehtu, proto se používá hlavně k léčbě onychomykóz, kde se aplikuje ve formě laku [34].



35

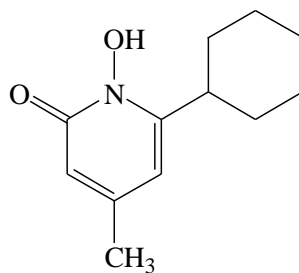
3.3.1.9 Ciklopirox

Tento derivát *N*-hydroxypyridonu je fungicidní antimykotikum se širokým spektrem aktivity (*Candida*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton* spp., *Malassezia furfur*).

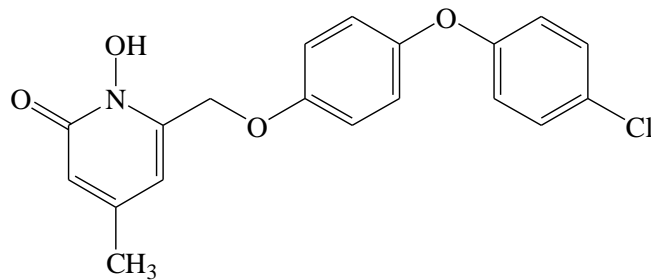
Mechanismus antimykotického účinku ciklopiroxu (**36**) je velmi komplexní a zasahuje do různých metabolických procesů fungálních buněk. Principiálně je založen na vysoké afinitě ciklopiroxu k trivalentním kationtům kovu (např. Fe^{3+} , Al^{3+}), jenž bývají často důležitými kofaktory enzymů. Vazbou na ně tedy dochází k inhibici těchto enzymů. Tak je například snížena aktivita katalas a peroxidas, které jsou zodpovědné za intracelulární odbourávání toxických peroxidů. Ciklopirox také poškozuje metabolismus mykotických buněk působením na jejich transportní mechanismy umístěné v buněčné membráně. Tento specifický způsob účinku ciklopiroxu svědčí o nízkém riziku rozvoje rezistence a minimalizuje riziko zkřížené rezistence s jinými antimykotiky [53, 47].

Ciklopirox se používá pouze lokálně. Má vysokou penetrační schopnost, proniká dobře i do silně zrohovatělé kůže a nehtů [34].

Podobné vlastnosti a použití má i **rilopirox (37)**, novější a lipofilnější derivát ciklopiroxu [47].



36



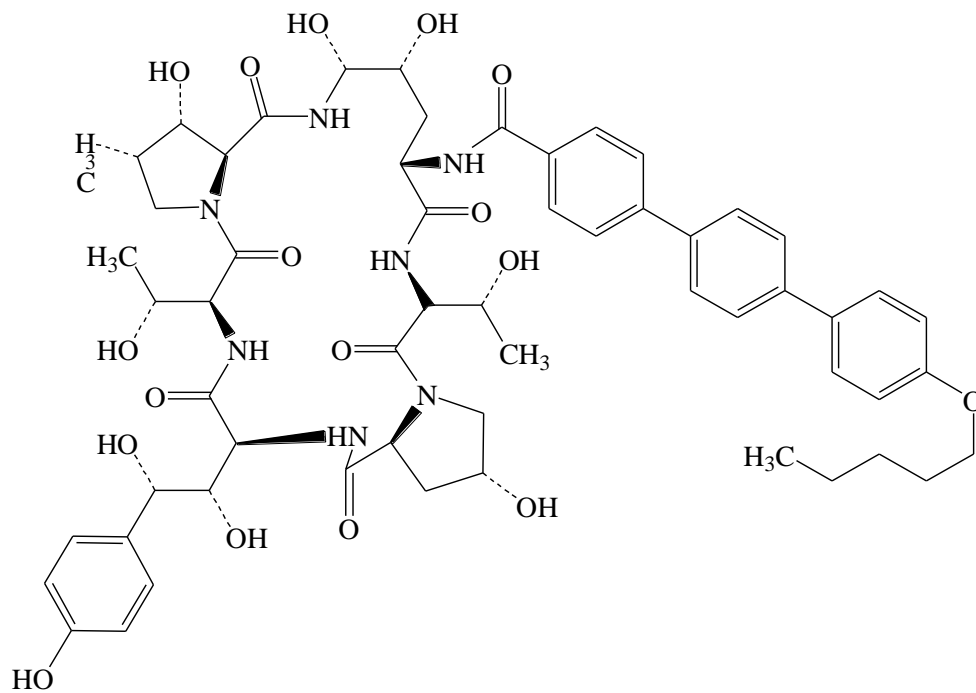
37

3.3.1.10 Echinokandiny a pneumokandiny

Látky těchto dvou skupin jsou produkty sekundárního metabolismu hub. Jsou to deriváty cyklických hexapeptidů, u nichž je vždy jedna aminoskupina acylována mastnou kyselinou. Prototypové látky, echinokandin B a akuleacin, byly objeveny při náhodném screeningu v 70. letech 20. století. Cilofungin, připravený modifikací echinokandinu B, byl doveden až do druhé fáze klinického zkoušení, ale nakonec byl jeho vývoj zastaven kvůli prokázané toxicitě. Ke konci 90. let vstoupily do klinického vývoje další tři sloučeniny: kaspofungin, anidulafungin a mikafungin [31, 54].

Tato antimykotika nekompetitivně inhibují syntézu β -(1,3)-D-glukanu, který je základní složkou buněčné stěny mnoha vláknitých hub a kvasinek. Toto cílové místo nemá svůj ekvivalent v savčích buňkách, proto poskytuje selektivní toxicitu pro houbové mikroorganismy. Tyto látky mají velmi široké spektrum zahrnující *Candida* spp. (včetně flukonazol-rezistentní *C. albicans*) a *Aspergillus* spp., nepůsobí však na *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. a zygomycety. Mimo jiné vykazují aktivitu vůči *Pneumocystis carinii* [31, 55].

Echinokandiny a příbuzné pneumokandiny jsou velmi perspektivní skupinou antifungálních léčiv. Klinicky používané látky mají příznivý bezpečnostní profil, aplikují se intravenózně (kvůli velké molekulární hmotnosti), díky dlouhému poločasu se podávají jednou denně. Výhodou je, že jejich metabolismus není spojen s cytochromem P450, což minimalizuje riziko lékových interakcí v porovnání s azoly [6, 41].



40

Aminokandin

Aminokandin (**41**) má velmi podobné vlastnosti a spektrum účinku s ostatními echinokandiny. V současné době má za sebou úspěšně ukončenou první fázi klinického zkoušení [8, 60].

3.3.2. Vývoj strukturně nových typů antifungálních látek

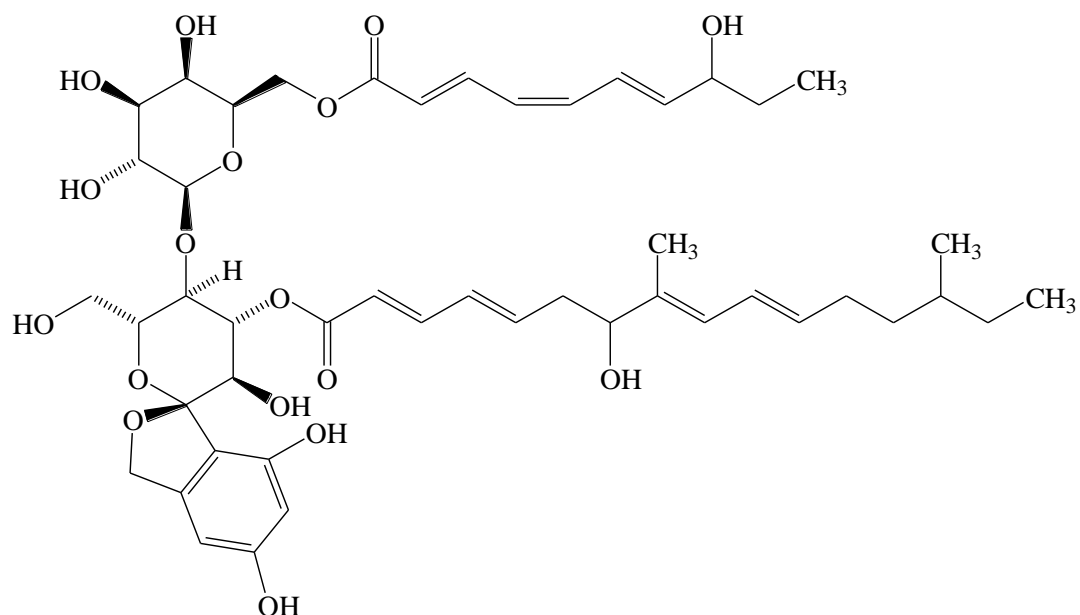
Při vývoji nových léčiv se velmi často používá modifikace předlohové struktury o určité biologické aktivitě, s cílem získat léčivo s výhodnějšími vlastnostmi (vyšší účinnost, nižší toxita, lepší farmakokinetické parametry). Zatímco v případě amfotericinu B se strukturní modifikace zatím neseťkaly s úspěchem [38], mnohem lepší perspektivy jsou patrné u azolových antimykotik, kterým je v současné době věnována velká pozornost.

Nové strukturní typy antimykotik jsou získávány především screeningem, kdy jsou nově izolované nebo syntetizované látky testovány na antifungální účinnost v testech *in vitro*. U perspektivních látek je pak prováděn další vývoj, s cílem vytvořit optimální strukturu. Výhodou nových struktur je rovněž skutečnost, že by jejich aktivita mohla být spojena s nějakým novým mechanismem antifungálního účinku [61].

Následující přehled uvádí některé skupiny antifungálních látek, které jsou v současné době intenzivně studovány. Jejich účinek je většinou namířen proti různým specifickým strukturám fungálních buněk.

Papulakandiny

Papulakandiny jsou glykolipidy, které byly poprvé izolovány v roce 1977 z houby *Papularia sphaerosperma*. Pro jejich spirocyklickou strukturu je typický disacharid, β -(1,4)-galaktosylglukosa, esterifikovaný dvěma mastnými kyselinami. Podobně jako echinokandiny působí prostřednictvím inhibice syntézy β -(1,3)-D-glukanu. *In vitro* výrazně inhibují růst kvasinek, zejména *C. albicans*, avšak při testech na zvířecích modelech vykazovaly jen omezený účinek, např. papulakandin B (**42**). Zároveň se zkoumají další přírodní látky jako chaetiakandin, Mer-WF3010, sarikandin, furanokandin, korynekandin a fusakandin A, které jsou svou strukturou příbuzné papulokandinům [54, 62].



42

FR-901469 a analogy

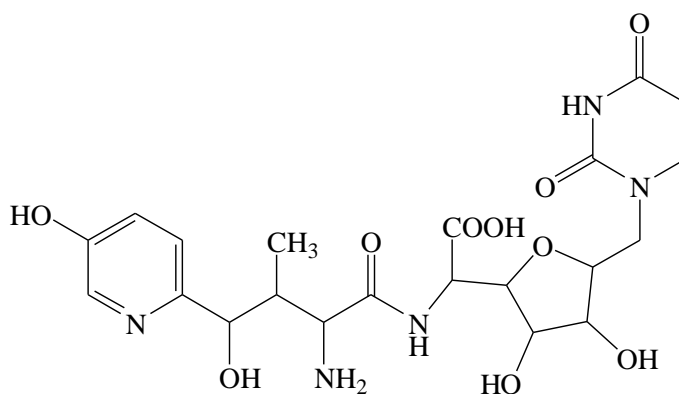
FR-901469 je makrocyklický ("neechinokandinový") lipopeptidový lakton, který patří do nové skupiny přírodních látek inhibujících syntézu β -(1,3)-D-glukanu. Tato látka vykazovala vysokou aktivitu v modelu systémové kandidózy, avšak také určitou hepatotoxicitu. Její novější analogy mají ještě větší antimykotickou účinnost a jsou méně toxické [54, 62].

Polyoxiny a nikkomyciny

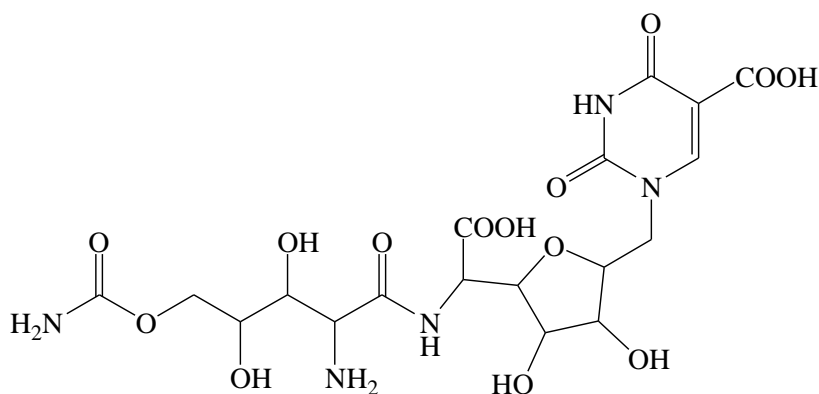
Jsou opět přírodní látky. Strukturně se jedná o peptidové nukleosidy. Příkladem je nikkomycin Z (**43**) a polyoxin D (**44**). Jejich antifungální působení je zprostředkováno inhibicí chitinsyntasy, která katalyzuje β -(1,4)-spojování UDP-*N*-acetylglukosaminů do molekuly chitinu. Polysacharid chitin je významnou složkou buněčné stěny hub, udržuje morfologický tvar buněk a má nezastupitelnou roli v morfogenezi. Protože se chitin nevyskytuje v savčích buňkách, lze u těchto látek předpokládat nízkou toxicitu při klinickém použití [63, 64].

Jejich spektrum není příliš široké, silnou aktivitu vykazují zejména vůči *C. albicans*. V testech *in vivo* byla zaznamenána snížená aktivita, způsobená zřejmě jejich malou stabilitou vůči hydrolýze. Ale na druhou stranu některé studie poukazují na synergismus účinku v kombinaci s azoly a inhibitory syntézy glukanu. Značná snaha se dále soustředí na syntézu přírodních peptidových nukleosidů, jejich složek a analogů k určení závislosti aktivity na struktuře (structure-activity-relationship, SAR) pro vývoj nových antifungálních látek [54, 62].

Nikkomycin Z je současné době v druhé fázi klinického zkoušení, jeho indikací je kokcidiomykóza, známá v USA jako Valley fever [50].



43

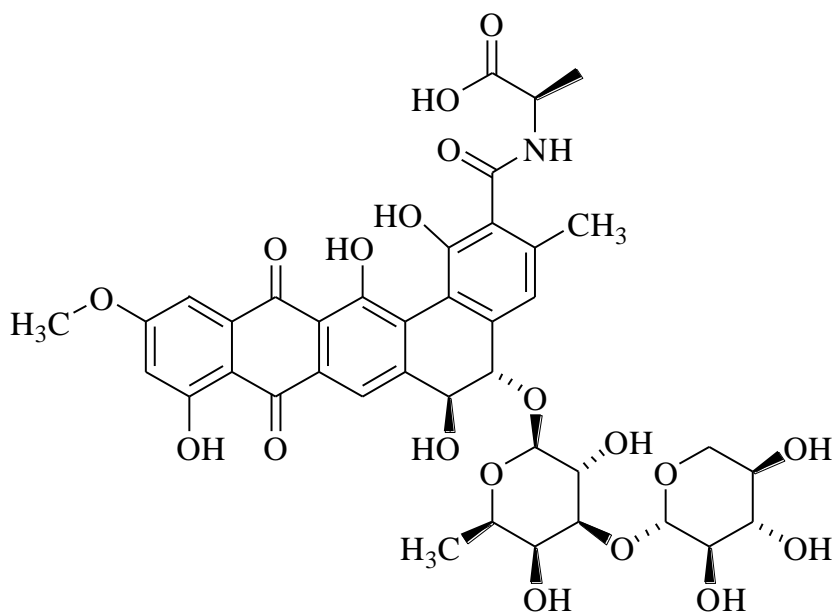


44

Pradimiciny

Pro tuto skupinu látek je charakteristický benzo[*a*]tetracenchinonový skelet, glykosidicky navázaný disacharid a volná karboxylová skupina. Jsou produkovány aktinomycetami rodu *Actinomadura*. Pradimiciny se váží na mannoproteiny, které jsou součástí buněčné stěny hub, a způsobují poškození plazmatické membrány s následnou lýzou buňky (mají fungicidní účinek). Kromě antifungálního účinku mají též účinek antivirotický.

Pradimicin a jeho analogy, např. benanomycin A (**45**), měly v testech na zvířecích modelech vynikající aktivitu vůči *C. albicans*, *A. fumigatus* a *C. neoformans*. Do klinického zkoušení postoupil pradimicin BMS-181184, avšak jeho další vývoj byl zastaven již v první fázi z důvodů závažné hepatotoxicity [42, 62, 65].



45

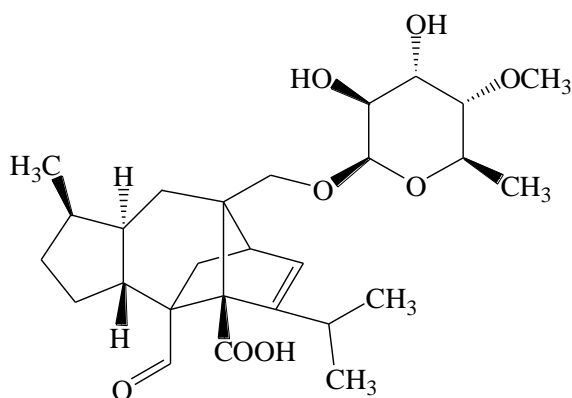
Sordariny

Sordarin (**46**), předlohou látkou této skupiny, je diterpenický glykosid produkováný askomycetou *Sordaria araneosa*. Jeho antifungální aktivita byla objevena při náhodném screeningu již na počátku 70. let 20. století. Avšak hlubší zájem o něj se objevil teprve nedávno a to díky screeningu inhibitorů proteinové

syntézy u *C. albicans*, který identifikoval podstatu jeho antifungálního účinku. Tou je inhibice funkce proteinového komplexu EF2 (Elongation Factor 2) při translaci nukleových kyselin a tím následná inhibice syntézy proteinů. Experimenty odhalily, že EF2 *C. albicans* má více než z 85 % shodnou sekvenci aminokyselin jako jeho ekvivalent v lidských buňkách. Přesto sordarin stabilizuje selektivně fungální komplex ribosom/EF2 [42, 62].

Nejvíce studovanými deriváty sordarinu jsou zofimarin, BE31405, SCH57404, GR135402, hypoxysordarin či azasordariny. Azasordariny mají největší terapeutický potenciál.

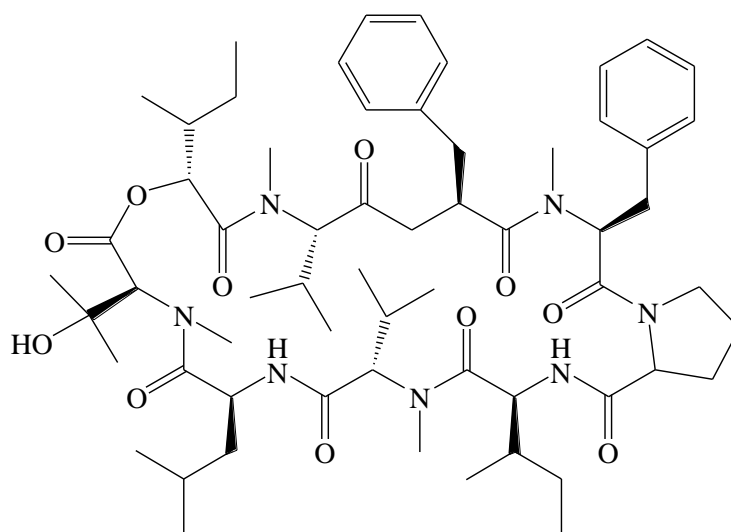
Sordariny jsou velmi nadějnou skupinou. Jejich atraktivní mechanismus účinku, vysoká specifita k fungální cílové struktuře a poměrně jednoduchá syntéza slibují kladný budoucí vývoj [31, 62].



46

Syringotoxiny, syringomyciny, syringostatiny

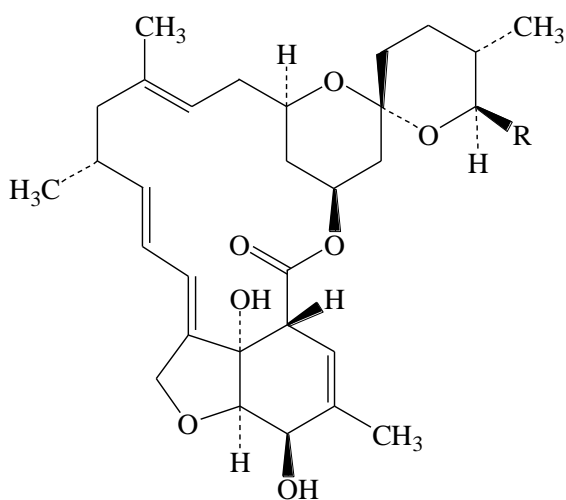
Tato skupina látek byla izolována z bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* a je známa též pod pojmem "nekrózu-indukující lipodepsipeptidové toxiny" (necrosis-inducing lipodepsipeptide toxins). Jedná se o cyklické lipodepsinonapeptidy, které mají fytotoxický a fungistatický účinek. Jejich působení je zaměřeno na plazmatickou membránu a na poškození její funkce. Syringomycin (47) vytváří v membráně póry, které zvýší pasivní tok iontů přes tuto membránu [54, 66].



48

Milbemyciny

Milbemyciny působí jako inhibitory efluxních transportérů. Bylo prokázáno, že milbemycin (49) a jeho analogy potencují antifungální aktivitu triazolů či terbinafinu vůči *Candida* spp. Mohly by tak v budoucnu pomoci bojovat s rostoucím výskytem rezistence [69 – 71].



49

Ostatní

Existuje velké množství dalších potenciálních antifungálních látek, které jsou v současnosti studovány. Příkladem látek přírodního původu mohou být další inhibitory syntézy β -glukanu – arborkandiny; inhibitory syntézy chitinu – fellinsin A, arthichitin; inhibitory syntézy sfingolipidů – sfingofunginy, lipoxamyciny, viridiofunginy, australifungin či minimoidin. Příkladem látek, u nichž není znám mechanismus účinku, může být viskosinamid, glomosporin, jaspamid, cykloolithistid A, lobocyklamid nebo halolitoraliny [54, 62, 72].

Současný výzkum se také zabývá možností vakcinace proti významným patogenům jako je *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* nebo *Aspergillus fumigatus*. Ochrana proti houbovým patogenům může být vyvolána stimulací jak humorální, tak i buněčné imunity či obou zároveň. Existují přesvědčivé důkazy o tom, že humorální imunita může modifikovat průběh infekce způsobené *C. albicans* a *Cryptococcus neoformans*. Poznatky získané ze studií na zvířecích model jsou dnes tak pokročilé, že vývoj antifungální vakcíny pro klinické použití se stává reálným a dosažitelným cílem [73].

Vzrůstá též zájem o použití protilátek v prevenci a léčbě fungálních infekcí. Důkazem toho je klinické testování konjugované GXM-TT vakcíny či myší monoklonální protilátky proti *C. neoformans* [74]. V roce 2007 byla podána žádost o registraci efungumabu, rekombinantní lidské protilátky proti proteinu tepelného šoku 90 (Heat Shock Protein 90 - hsp90). Hsp 90 se účastní tvorby a opravy buněčné stěny hub a je důležitý pro přežití buňky. Vazbou protilátky na hsp90 je blokována jeho běžná činnost, buněčná stěna se stává oslabenou a nemůže růst. Efungumab je určen k léčbě invazivní kandidózy v kombinaci s amfotericinem B [75].

4. METODICKÁ ČÁST

4.1 Reaktivita rhodaninu

Rhodanin (1) je velmi reaktivní a poskytuje celou řadu reakcí. Zejména se jedná o kondenzace, přeměny jeho kondenzačních produktů nebo substituce na jádře. Díky přítomnosti aktivní CH_2 skupiny v poloze 5 podstupují rhodaniny a jejich *N*-substituované deriváty kondenzační reakce se všemi typy aromatických, alifatických a nenasycených aldehydů. Reakce s ketony probíhají obtížněji (schéma I).

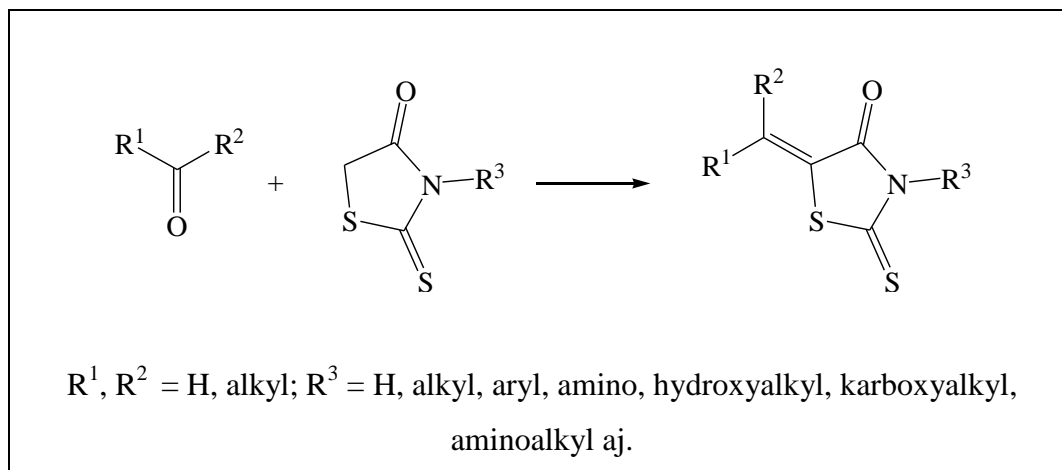


Schéma I: Kondenzace rhodaninu a *N*-substituovaných rhodaninů s karbonylovými sloučeninami

Kondenzace rhodaninu s karbonylovými sloučeninami se nejčastěji uskutečňují následujícími postupy:

- v kyselém prostředí, kdy se aldehyd a rhodanin rozpustí v kyselině octové a směs se několik hodin vaří s ekvivalentním množstvím octanu sodného a acetanhydridu
- v alkalickém prostředí, kdy se kondenzace katalyzuje směsí chloridu amonného a amoniaku ve vodně-alkoholickém roztoku.

Druhý způsob je šetrnější a pro kondenzaci ketonů s rhodaninem se dokonce žádný jiný nedoporučuje [76].

Značný syntetický význam mají přeměny kondenzačních produktů, které v roce 1922 popsal Gränacher. Tyto reakce se označují jako Gränacherova syntéza. Dnes je však obvyklé takto nazývat i vlastní kondenzaci rhodaninu s karbonylovými sloučeninami. Preparativní možnosti Gränacherova syntézy jsou znázorněny na schématu II. Jak je patrné, lze Gränacherovu syntézu využít k přípravě homologických aldehydů, nitrilů, aminokyselin a ketokyselin [76].

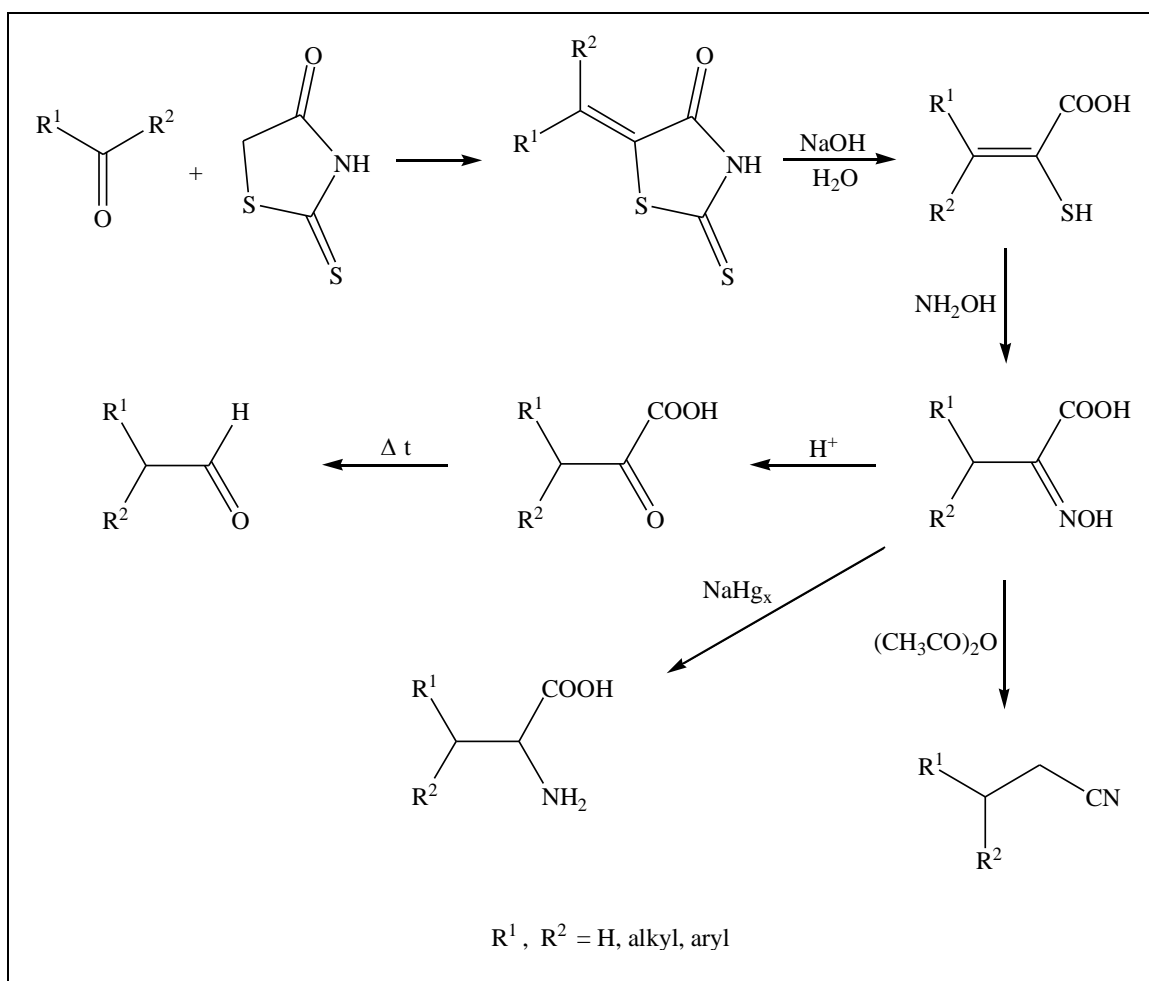
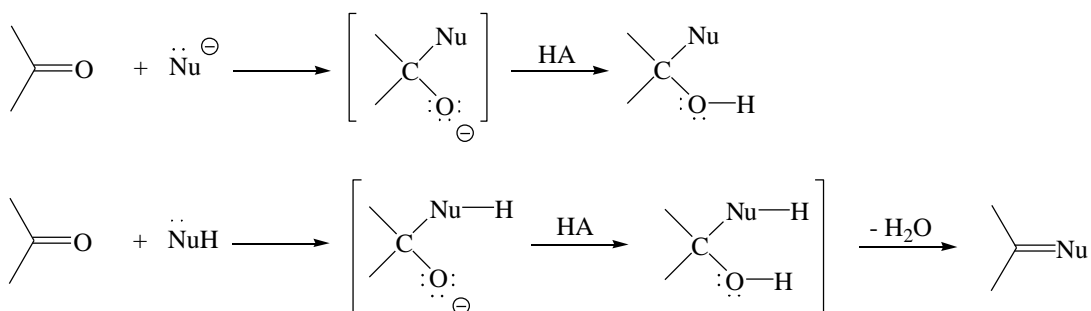


Schéma II: Gränacherova syntéza

V posledních letech byla publikována řada modifikací základních postupů pro kondenzaci rhodaninu s karbonylovými sloučeninami, např. metodami kombinatoriální chemie [77], s využitím mikrovlnného záření [78] nebo pomocí katalyzátorů fázového přenosu [79].

4.2 Příprava thiosemikarbazonů

Thiosemikarbazony se připravují reakcí karbonylových sloučenin s thiosemikarbazidem. Jedná se o nukleofilní adici. Adici nukleofilního činidla na karbonyl je možno obecně znázornit (podle jeho náboje) jedním ze schémat [80]:



Obecně se reakce nezastaví ve stádiu primárního aduktu a následuje přenos protonu z rozpouštědla a eventuálně eliminace vody (podle reakčních podmínek, struktury substrátu a nukleofilu) [81].

Konkrétní mechanismus adice thiosemikarbazidu na karbonylovou funkční skupinu vystihuje schéma III:

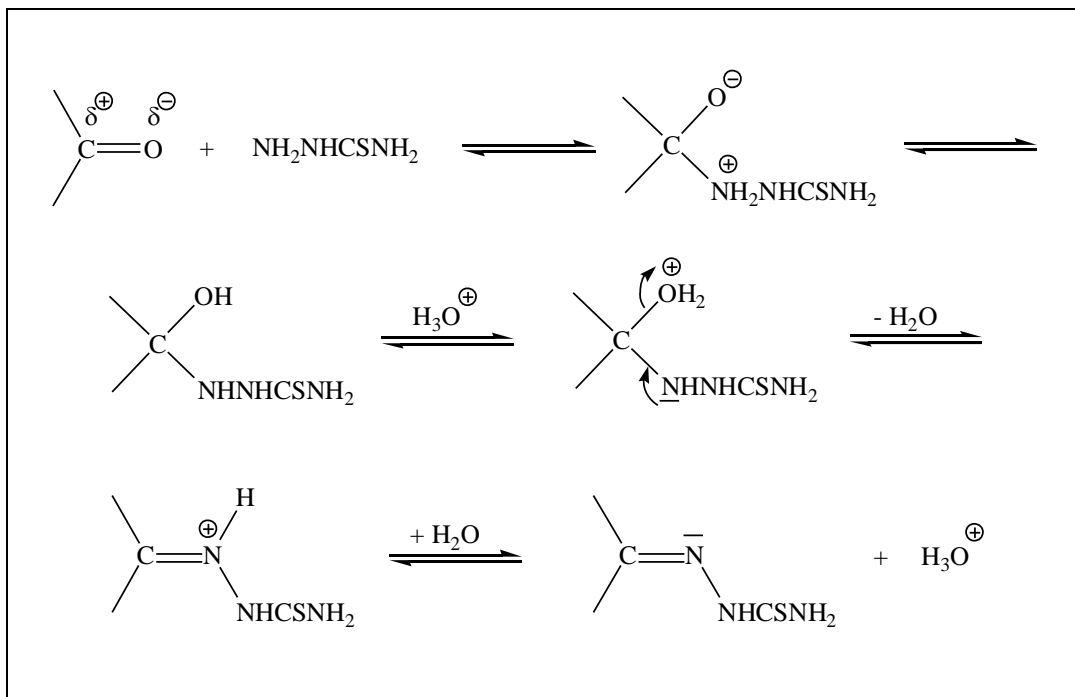
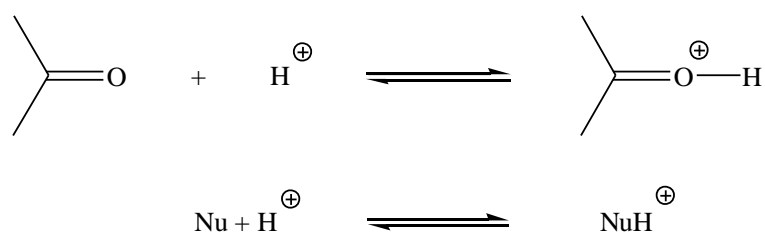
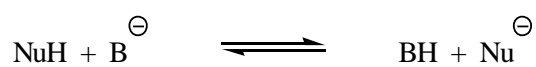


Schéma III: Mechanismus reakce thiosemikarbazidu s karbonylovou funkční skupinou (převzato z lit. [82])

Nukleofilní adiční reakce mohou být katalyzovány kyselé i bazicky. Při kyselé katalýze vzniká konjugovaná kyselina substrátu, která je reaktivnější než původní substrát. Protože i nukleofil podléhá protonaci, je nutno volit reakční podmínky tak, aby byl nukleofil přítomen v postačující koncentraci:



Bazická katalýza se naopak týká nukleofilního činidla, které se tak mění na reaktivnější konjugovanou bázi:



4.3 Cyklizace thiosemikarbazonů v thiazolidin-4-on

Thiosemikarbazony, jako *N,S*-nukleofily, se používají k přípravě derivátů thiazolidin-4-onu (**2**), resp. 2-iminothiazolidin-4-onů (pseudothiohydantoinů). Schéma IV znázorňuje několik publikovaných syntéz, kde různé thiosemikarbazony reagují např. s α -halogenkyselinami, maleinanhydridem, maleinimidy či s aroylakrylovými kyselinami. Reakční prostředí může tvořit samotné rozpouštědlo nebo rozpouštědlo s přidavkem octanu sodného [13, 83, 84].

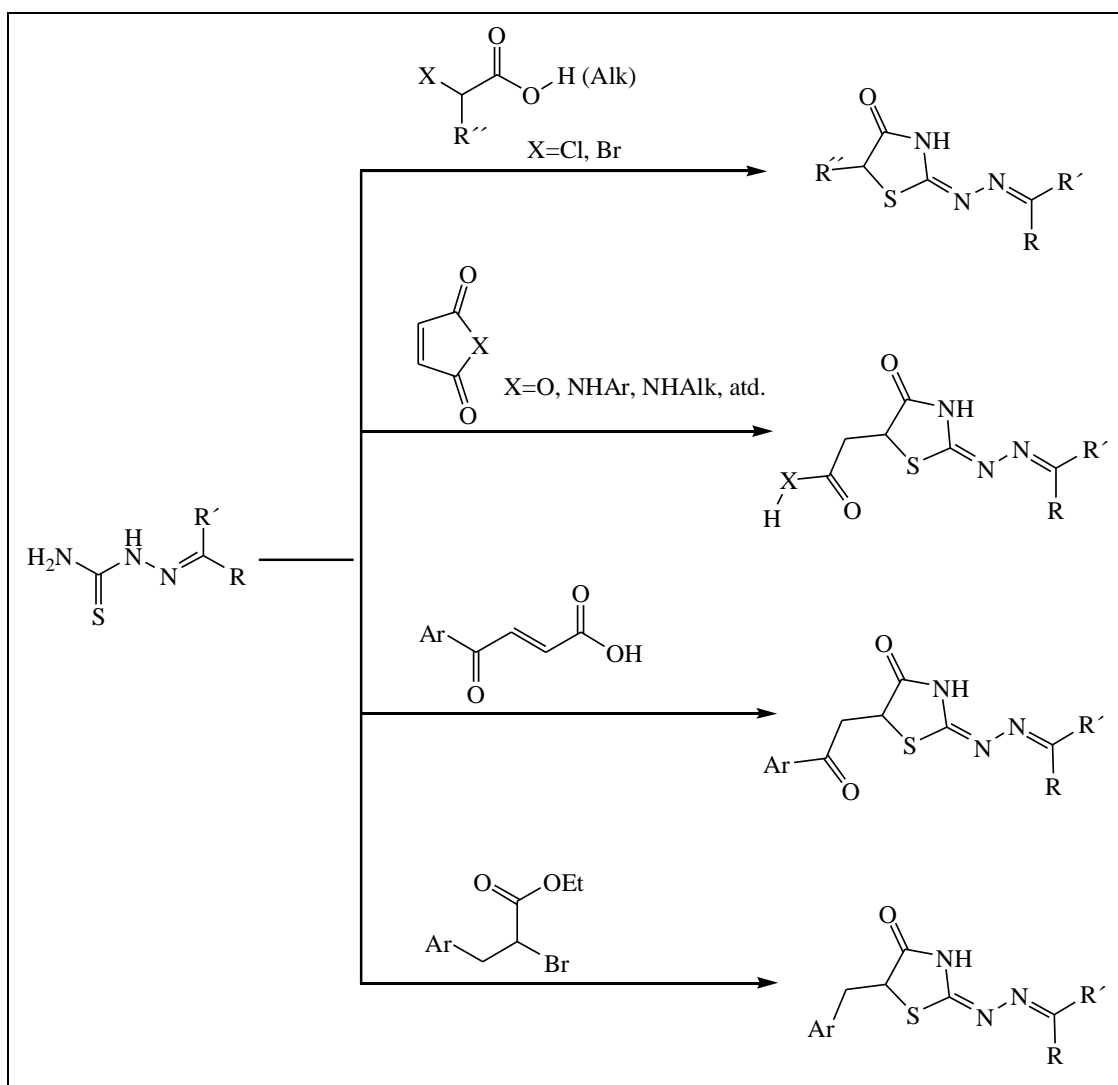


Schéma IV: Cyklizace thiosemikarbazonů (převzato z lit. [13])

4.4 Metodika vlastní práce

První část diplomové práce je zaměřena na přípravu kondenzačních produktů *N*-substituovaných rhodaninů s pyrazinkarbaldehydem, benzaldehydem nebo s různými polohovými izomery pyridinkarbaldehydu (schéma V). Jedná se o Knoevenagelovu kondenzaci [85]. Pro přípravu produktů je použito buď kyselé prostředí ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}/(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{O}$) nebo alkalické ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3/\text{EtOH}$) v závislosti na charakteru rhodaninového derivátu.

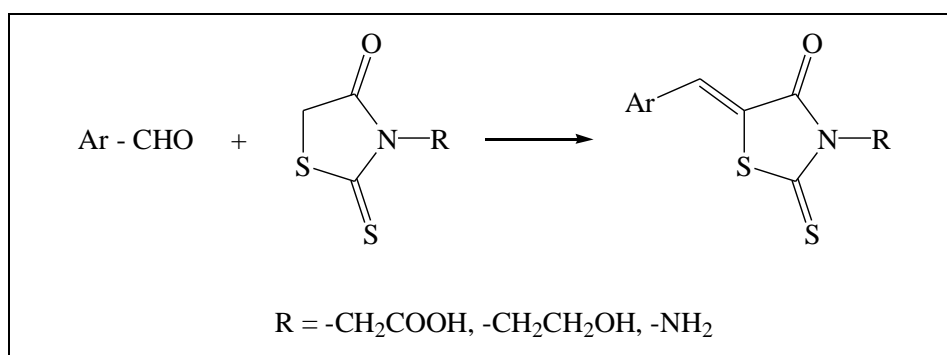


Schéma V: Kondenzace *N*-substituovaných rhodaninů s arylaldehydem

Druhá část diplomové práce je věnována syntéze 2-substituovaného thiazolidin-4-onu, který vzniká cyklizací thiosemikarbazonu chloroctovou kyselinou. Obecný postup znázorňuje schéma VI.

Reakcí aldehydu s thiosemikarbazidem v prostředí methanolu vzniká thiosemikarbazon. Jde o nukleofilní adici, která probíhá adičně-eliminačním mechanismem. Reakce je katalyzována stopou kyseliny (v našem případě koncentrované kyseliny octové). Druhým krokem syntézy je reakce thiosemikarbazonu s chloroctovou kyselinou v prostředí ethanolu s přidavkem octanu sodného.

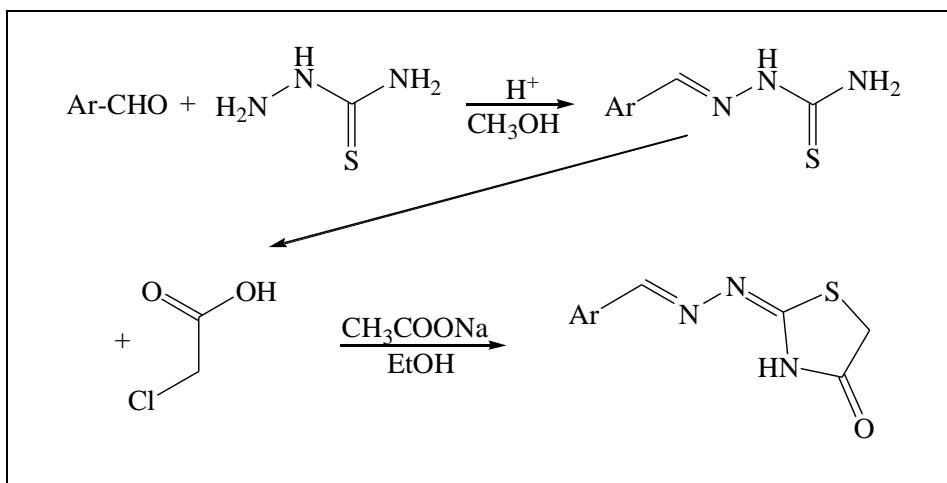


Schéma VI: Příprava 2-substituovaného thiazolidin-4-onu

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemická část

Při přípravě byly použity komerčně dostupné výchozí sloučeniny:

- pyridin-2-karbaldehyd, 99% (Aldrich)
- pyridin-3-karbaldehyd, 98% (Aldrich)
- pyridin-4-karbaldehyd, 97% (Aldrich)
- (4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina, purum (Fluka)
- 3-aminorhodanin, 99% (Aldrich)
- thiosemikarbazid, purum (Fluka)
- chlorooctová kyselina, purum (Fluka).

3-(2-Hydroxyethyl)rhodanin, jako surovina pro syntézu 5.1.1.5, byl připraven podle patentu [86].

Pyrazin-2-karbaldehyd byl připraven postupem vypracovaným na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv [87]. Jako výchozí surovina byla použita pyrazin-2-karboxylová kyselina, 99 % (Fluka). Redukce methyl-pyrazin-2-karboxylátu byla provedena pomocí tetrahydroborátu sodného, purum p. a. (Fluka). K oxidaci pyrazin-2-ylmethanolu byl použit oxid manganičitý, srážený, aktivní pro syntézu (Merck).

Sloupcové chromatografie byly prováděny za použití silikagelu 60 Fluka (0,063 - 0,2 mm).

TLC chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck).

Vzorky látek pro analýzu byly sušeny 24 hodin v exsikátoru nad oxidem fosforečným při tlaku 1,33 kPa.

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném bloku Bötia a nebyly korigovány.

Elementární analýzy byly provedeny na analyzátoru EA 1110 CHNS firmy Carlo Erba.

Čistota produktů byla ověřena pomocí HPLC za těchto podmínek:

Separční modul: Waters Alliance 2695 XE s chromatografickým softwarem Millennium³²® Chromatography Manager Software, Waters 2004

Kolona: Symmetry[®] C₁₈ 5 μm, 4.6 × 250 mm

Mobilní fáze: methanol + voda 70:30 (v/v), průtok 0,9 ml/min, nástřik 30 μl

Detekce: Waters Photodiode Array Detector 2996, 210 nm

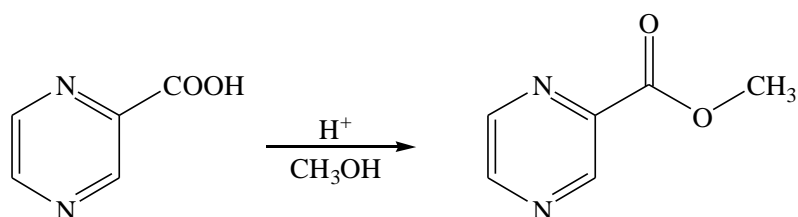
IČ analýza byla provedena na spektrofotometru NICOLET IMPACT 400 metodou ATR. Vlnočty jsou uváděny v cm⁻¹.

¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-V_xBB 300 v DMSO. ¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra všech připravených látek lze nalézt v přílohách 1 – 2.

5.1.1 Deriváty rhodaninu

5.1.1.1 Příprava [4-oxo-5-(pyrazin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]- octové kyseliny

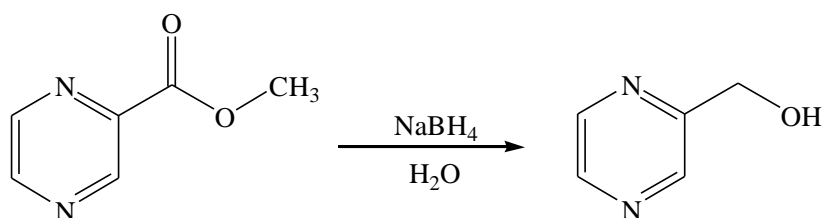
5.1.1.1.1 Esterifikace pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Směs 12,4 g (0,1 mol) pyrazin-2-karboxylové kyseliny, 50 ml methanolu a 0,3 ml koncentrované kyseliny sírové byla zahřívána do varu po dobu 6 hodin. Po ochlazení byla zneutralizována pevným hydrogenuhličitanem sodným a zfiltrována. Z filtrátu byl oddestilován methanol na vakuové odparce. Bylo získáno 13,5 g methylesteru kyseliny pyrazin-2-karboxylové, což odpovídá 98 % teoretického výtěžku.

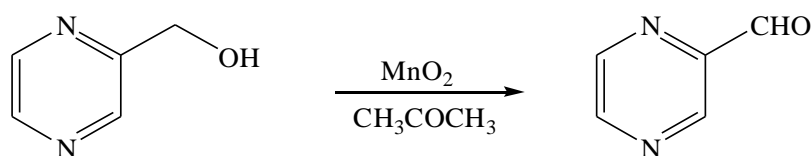
Totožnost produktu byla ověřena pomocí TLC, jako standard byl použit dříve připravený methylester kyseliny pyrazin-2-karboxylové (soustava benzín + ethyl-acetát 1:1).

5.1.1.1.2 Redukce methylesteru kyseliny pyrazin-2-karboxylové tetrahydroborátem sodným



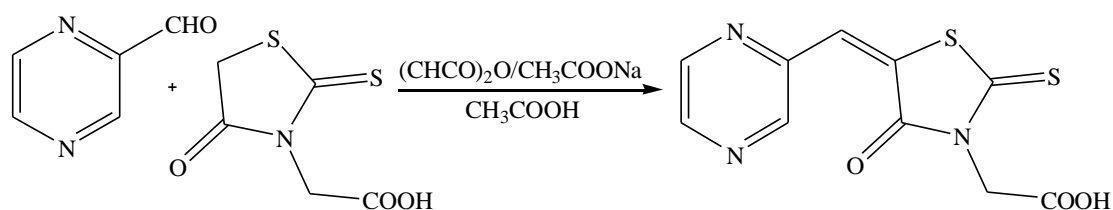
Směs 13,5 g (0,098 mol) methylesteru kyseliny pyrazin-2-karboxylové a 19 g (0,5 mol) tetrahydroborátu sodného ve 250 ml vody byla míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 150 ml ethanolu a takové množství uhličitanu draselného, aby se oddělily dvě fáze. Poté byla směs kontinuálně extrahována ethyl-acetátem. Směs výchozí látky a produktu byla rozdělena pomocí sloupcové chromatografie (soustava toluen + aceton 1:1). Takto bylo získáno 9,6 g pyrazin-2-ylmethanolu, což odpovídá 89 % teoretického výtěžku.

5.1.1.1.3 Oxidace pyrazin-2-ylmethanolu aktivním MnO_2



Směs 3,0 g pyrazin-2-ylmethanolu (0,028 mol), 150 ml acetonu a 15 g MnO_2 se ponechala reagovat v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty po dobu 4 hodin. Poté byl MnO_2 odfiltrován a filtr byl důkladně promyt acetonem. Z filtrátu se oddestiloval aceton na vakuové odparce a odparek obsahující směs pyrazin-2-karbaldehydu a pyrazin-2-ylmethanolu byl rozdělen chromatograficky (soustava benzín + ethylacetát 3:2). Takto bylo získáno 1,3 g pyrazin-2-karbaldehydu, což odpovídá 43 % teoretického výtěžku.

5.1.1.1.4 Příprava [4-oxo-5-(pyrazin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]-octové kyseliny



Směs 1,0 g (0,009 mol) pyrazin-2-karbaldehydu a 1,8 g (0,009 mol) (4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny byla rozpuštěna v ledové kyselině octové. Bylo přidáno ekvimolární množství octanu sodného a acetanhydridu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Nakonec byl produkt čištěn krystalizací z koncentrované kyseliny octové.

Sumární vzorec: $C_{10}H_7N_3O_3S_2$

Molekulová hmotnost: 281,31

Výtěžek: 1,8 g (71 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 266 – 268 °C

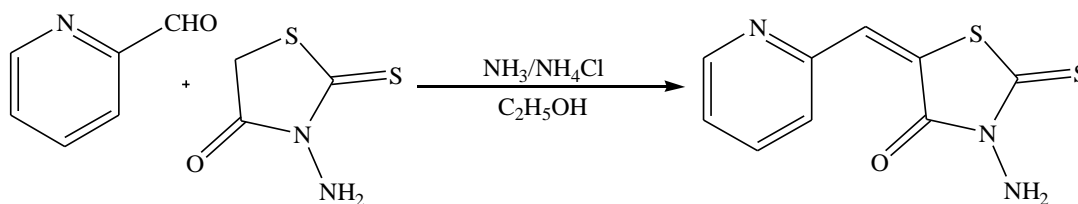
Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	42,70	2,51	14,94	22,80
Nalezeno:	42,83	3,20	12,95	18,89

HPLC čistota: 94,11 %

IČ spektrum: 3051 (CH), 1737 (C=O(OH)), 1709 (C=O), 740 (C=S)

5.1.1.2 Příprava 3-amino-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-onu



Směs 1,0 g (0,009 mol) pyridin-2-karbaldehydu, 1,7 g (0,009 mol) 3-aminorhodaninu, 0,7 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu byla přivedena k varu pod zpětným chladičem. K čirému roztoku byl přidán roztok 0,7 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 2 hodiny. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odfiltrovány, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Nakonec byl produkt čištěn krystalizací z acetonu.

Sumární vzorec: C₉H₇N₃OS₂

Molekulová hmotnost: 237,30

Výtěžek: 1,3 g (73 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 228 – 231 °C

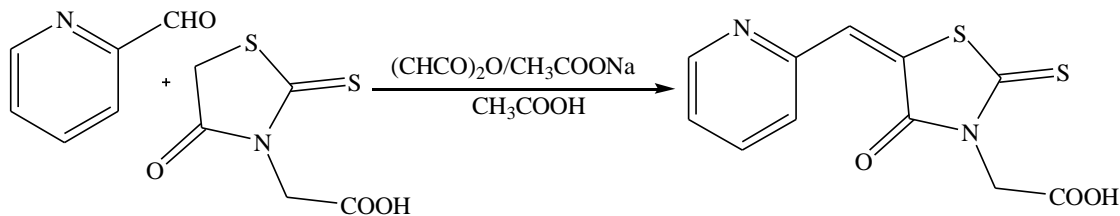
Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	45,55	2,97	17,71	27,02
Nalezeno:	45,35	3,23	17,67	27,44

HPLC čistota: 95,65 %

IČ spektrum: 3140 (NH₂), 3050 (CH), 1721, (C=O(OH)), 1701 (C=O), 774 (C=S)

5.1.1.3 Příprava [4-oxo-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]-octové kyseliny



Směs 1,0 g (0,009 mol) pyridin-2-karbaldehydu a 1,8 g (0,009 mol) (4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny byla rozpuštěna v ledové kyselině octové. Bylo přidáno ekvimolární množství octanu sodného a acetanhydridu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Nakonec byl produkt čištěn krystalizací z koncentrované kyseliny octové.

Sumární vzorec: $C_{11}H_8N_2O_3S_2$

Molekulová hmotnost: 280,32

Výtěžek: 2,0 g (76 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 260 – 261 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 253 – 254 °C /konfigurace neuvedena, kyselina octová/

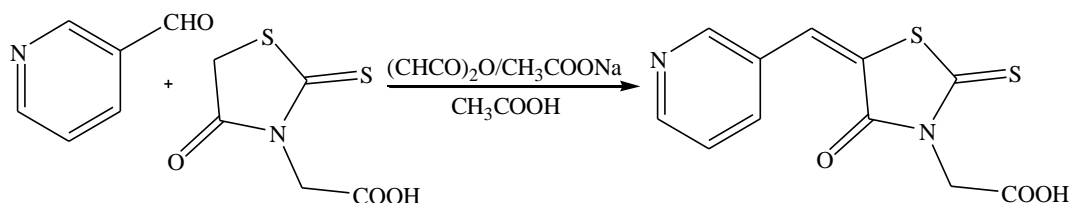
Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	47,13	2,88	9,99	22,88
Nalezeno:	46,75	3,12	9,81	22,59

HPLC čistota: 93,98 %

IČ spektrum: 3042 (CH), 1740 (C=O(OH)), 1705 (C=O), 750 (C=S)

5.1.1.4 Příprava [4-oxo-5-(pyridin-3-ylmetylen)-2-thioxothiazolidin-3-yl]-octové kyseliny



Směs 1,0 g (0,009 mol) pyridin-3-karbaldehydu a 1,8 g (0,009 mol) (4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny byla rozpuštěna v ledové kyselině octové. Bylo přidáno ekvimolární množství octanu sodného a acetanhydridu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Nakonec byl produkt čištěn krystalizací z koncentrované kyseliny octové.

Sumární vzorec: C₁₁H₈N₂O₃S₂

Molekulová hmotnost: 280,32

Výtěžek: 1,6 g (61 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 257 – 258 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 255 – 256 °C /konfigurace neuvedena, kyselina octová/

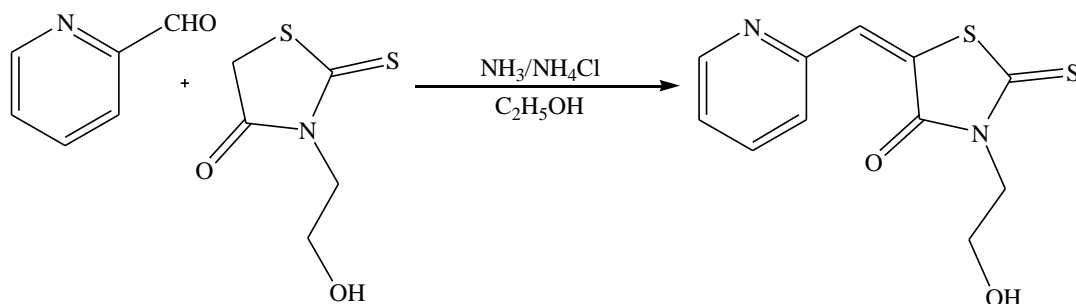
Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	47,13	2,88	9,99	22,88
Nalezeno:	46,89	3,15	9,86	23,17

HPLC čistota: 97,75 %

IČ spektrum: 1704 (C=O), 745 (C=S)

5.1.1.5 Příprava 3-(2-hydroxyethyl)-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thiothiazolidin-4-onu



Směs 1,0 g (0,009 mol) pyridin-2-karbaldehydu, 1,7 g (0,009 mol) 3-(2-hydroxyethyl)rhodaninu, 0,7 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu byla přivedena k varu pod zpětným chladičem. K čirému roztoku byl přidán roztok 0,7 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu po dobu 2 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odfiltrovány, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Nakonec byl produkt čištěn krystalizací z methanolu.

Sumární vzorec: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$

Molekulová hmotnost: 266,34

Výtěžek: 0,9 g (37 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 181 – 183 °C

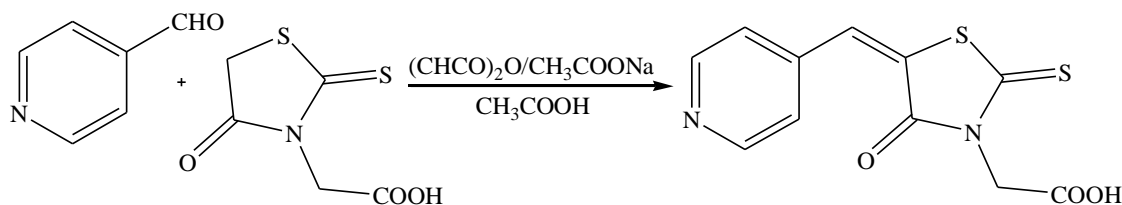
Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	49,61	3,78	10,52	24,08
Nalezeno:	49,17	3,95	10,37	23,66

HPLC čistota: 94,11 %

IČ spektrum: 3515 (OH), 1706 (C=O), 753 (C=S)

5.1.1.6 Příprava [4-oxo-5-(pyridin-4-ylmethyliden)-2-thioxo-thiazolidin-3-yl]- octové kyseliny



Směs 1,0 g (0,009 mol) pyrazin-4-karbaldehydu a 1,8 g (0,009 mol) (4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny byla rozpuštěna v ledové kyselině octové. Bylo přidáno ekvimolární množství octanu sodného a acetanhydridu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Nakonec byl produkt čištěn krystalizací z koncentrované kyseliny octové.

Sumární vzorec: $C_{11}H_8N_2O_3S_2$

Molekulová hmotnost: 280,32

Výtěžek: 2,03g (80 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 277 – 280 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 260 – 261 °C /konfigurace neuvedena, kyselina octová/

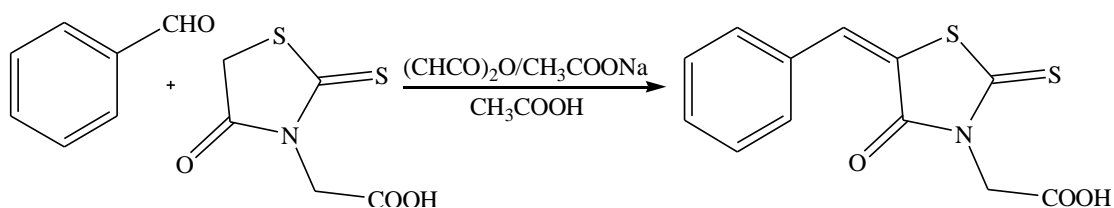
Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	47,13	2,88	9,99	22,88
Nalezeno:	46,36	2,74	9,73	21,08

HPLC čistota: 96,30 %

IČ spektrum: 3037 (CH), 1797 (C=O(OH)), 1708 (C=O), 754 (C=S)

5.1.1.7 Příprava (5-benzyliden-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny



Směs 1,0 g (0,009 mol) benzaldehydu a 1,8 g (0,009 mol) (4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny byla rozpuštěna v ledové kyselině octové. Bylo přidáno ekvimolární množství octanu sodného a acetanhydridu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po zchlazení byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Nakonec byl produkt čištěn krystalizací z koncentrované kyseliny octové.

Sumární vzorec: C₁₂H₉NO₃S₂

Molekulová hmotnost: 279,33

Výtěžek: 1,67g (66 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 247 – 248 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 186 °C /*E*-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/
- 240 °C /*E*-izomer, kyselina octová/
- 202 – 205 °C /konfigurace neuvedena, voda, dimethylformamid/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	51,60	3,25	5,01	22,96
Nalezeno:	51,23	3,08	4,99	20,75

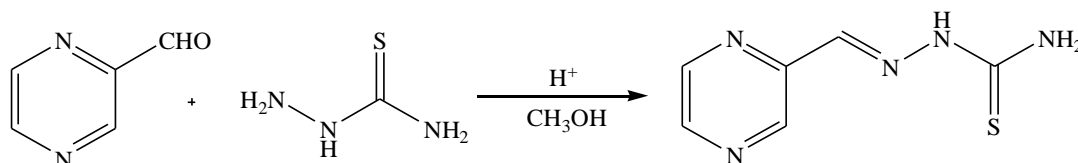
HPLC čistota: 99,83 %

IČ spektrum: 3017 (CH), 1731 (C=O(OH)), 1707 (C=O), 759 (C=S)

5.1.2 Deriváty thiazolidin-4-onu

5.1.2.1 Příprava 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu

5.1.2.1.1 Příprava pyrazin-2-karbaldehyd-thiosemikarbazonu



K 1,3 g (0,014 mol) thiosemikarbazidu bylo přidáno 80 ml methanolu a směs byla míchána několik minut v ultrazvukové lázni. Pak byl thiosemikarbazid za horka rozpuštěn, bylo přidáno katalytické množství koncentrované kyseliny octové a 1,5 g (0,014 mol) pyrazin-2-karbaldehydu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 4 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty postupně 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl následně překrystalizován z methanolu. Totožnost a čistota produktu byly ověřeny porovnáním teploty tání s teplotou uvedenou v literatuře a elementární analýzou.

Sumární vzorec: $C_6H_7N_5S$

Molekulová hmotnost: 181,21

Výtěžek: 1,9 g (76 %)

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Teplota tání: 238 – 239 °C

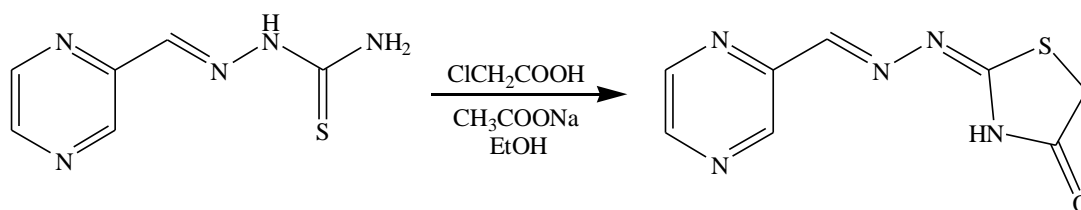
Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 237 – 239 °C /*E*-izomer, ethanol/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	39,77	3,89	38,65	17,69
Nalezeno:	38,23	3,80	38,23	15,63

5.1.2.1.2 Příprava 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu



Směs 0,6 g (0,003 mol) pyrazin-2-karbaldehyd-thiosemikarbazonu a octanu sodného (0,07 g) byla za horka rozpuštěna v ethanolu (100 ml). Následně bylo přidáno 0,3 g (0,003 mol) kyseliny chloroctové. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin. Po zchladnutí směsi byly vyloučené krystaly odsáty a následně promyty 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl přečištěn krystalizací z ethanolu.

Sumární vzorec: C₈H₇N₅OS

Molekulová hmotnost: 221,24

Výtěžek: 0,5 g (69 %)

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 283 – 292 °C

Elementární analýza:

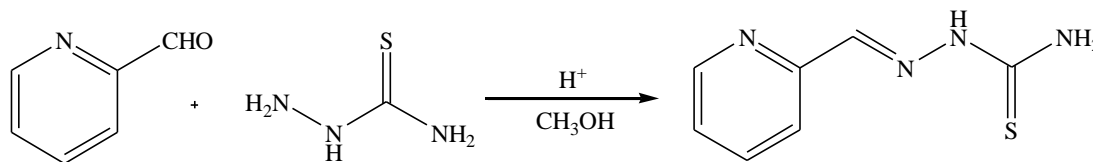
	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	43,43	3,19	31,66	14,49
Nalezeno:	43,27	3,16	31,62	14,46

HPLC čistota: 98,49 %

IČ spektrum: 3057 (NH), 2930 (CH₂), 2734 (CH), 1710 (C=O)

5.1.2.2 Příprava 2-[(pyridin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu

5.1.2.2.1 Příprava pyridin-2-karbaldehyd-thiosemikarbazonu



K 1,3 g (0,014 mol) thiosemikarbazidu bylo přidáno 80 ml methanolu a směs byla míchána několik minut v ultrazvukové lázni. Pak byl thiosemikarbazid za horka rozpuštěn, bylo přidáno katalytické množství koncentrované kyseliny octové a 1,5 g (0,014 mol) pyridin-2-karbaldehydu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 4 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty postupně 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl následně překrystalizován z methanolu. Totožnost a čistota produktu byly ověřeny porovnáním teploty tání s teplotami uvedenými v literatuře a elementární analýzou.

Sumární vzorec: C₇H₈N₄S

Molekulová hmotnost: 180,23

Výtěžek: 1,8 g (71 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 218 – 219 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

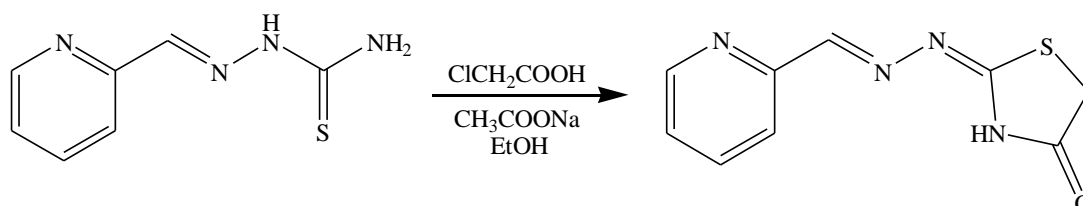
- 218 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 211 – 215 °C /konfigurace neuvedena, ethanol, voda/
- 210 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 210 – 212 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 210 – 211 °C za rozkladu /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/

- 209 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 209 – 211 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 209 – 210 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 204 – 205 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 202 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 207 – 208 °C /*E*-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	46,65	4,47	31,09	17,79
Nalezeno:	46,52	4,40	31,33	16,47

5.1.2.2.2 Příprava 2-[(pyridin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu



Směs 0,9 g (0,005 mol) pyridin-2-karbaldehyd-thiosemikarbazonu a octanu sodného (0,1 g) byla za horka rozpuštěna v ethanolu (50 ml). Následně bylo přidáno 0,5 g (0,005 mol) kyseliny chloroctové. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin. Po zchladnutí směsi se byly vyloučené krystaly odsáty a následně promyty 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl přečištěn krystalizací z ethanolu.

Sumární vzorec: C₉H₈N₄OS

Molekulová hmotnost: 220,25

Výtěžek: 0,4 g (36 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 262 – 264 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 251 °C / *E,E*-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/
- 264 °C / *E,E*-izomer, ethanol/
- 264 °C / *E,E*-izomer, kyselina octová/

Elementární analýza:

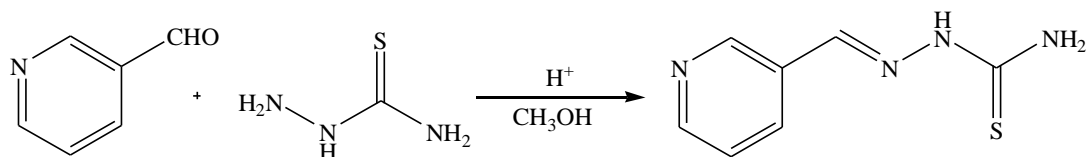
	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	49,08	3,66	25,44	14,56
Nalezeno:	48,81	3,92	25,03	12,40

HPLC čistota: 98,15 %

IČ spektrum: 2933 (CH₂), 2618 (CH), 1706 (C=O)

5.1.2.3 Příprava 2-[(pyridin-3-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu

5.1.2.3.1 Příprava pyridin-3-karbaldehyd-thiosemikarbazonu



K 1,3 g (0,014 mol) thiosemikarbazidu bylo přidáno 80 ml methanolu a směs byla míchána několik minut v ultrazvukové lázni. Pak byl thiosemikarbazid za horka rozpuštěn, bylo přidáno katalytické množství koncentrované kyseliny octové a 1,5 g (0,014 mol) pyridin-3-karbaldehydu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu čtyř hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty postupně 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl následně překrystalizován z methanolu. Totožnost a čistota produktu byly ověřeny porovnáním teploty tání s teplotami uvedenými v literatuře a elementární analýzou.

Sumární vzorec: C₇H₈N₄S

Molekulová hmotnost: 180,23

Výtěžek: 2,42 g (96 %)

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Teplota tání: 221 – 223 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

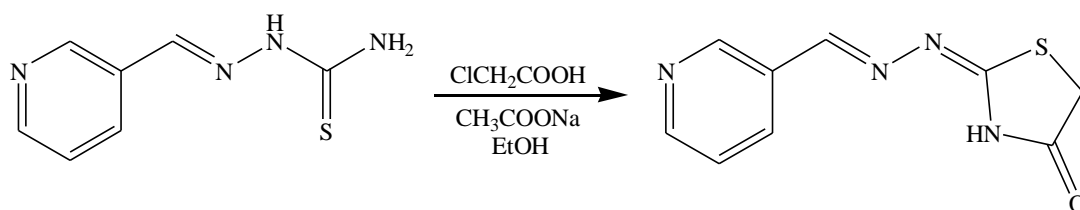
- 237 °C /konfigurace neuváděna, ethanol/
- 237 – 238 °C /konfigurace neuváděna, rozpouštědlo neuváděno/
- 226 °C za rozkladu /konfigurace neuváděna, butanol/
- 224 °C /konfigurace neuváděna, ethanol/
- 223 – 226 °C /konfigurace neuváděna, voda/

- 223 – 224 °C za rozkladu /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 222 – 224 °C /konfigurace neuvedena, voda/
- 222 – 223 °C za rozkladu /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 217 – 218 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 213 – 216 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	46,65	4,47	31,09	17,79
Nalezeno:	46,45	4,36	31,05	19,88

5.1.2.3.2 Příprava 2-[(pyridin-3-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu



Směs 0,9 g (0,005 mol) pyridin-3-karbaldehyd-thiosemikarbazonu a octanu sodného (0,1 g) byla za horka rozpuštěna v ethanolu (70 ml). Následně bylo přidáno 0,5 g (0,005 mol) kyseliny chloroctové. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin. Po zchladnutí směsi byly vyloučené krystaly odsáty a následně promyty 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl přečištěn krystalizací z ethanolu.

Sumární vzorec: C₉H₈N₄OS

Molekulová hmotnost: 220,25

Výtěžek: 1,0 g (91 %)

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 288 – 291 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 278 °C / *E,E*-izomer, ethanol/
- 278 °C / *E,E*-izomer, kyselina octová/

Elementární analýza:

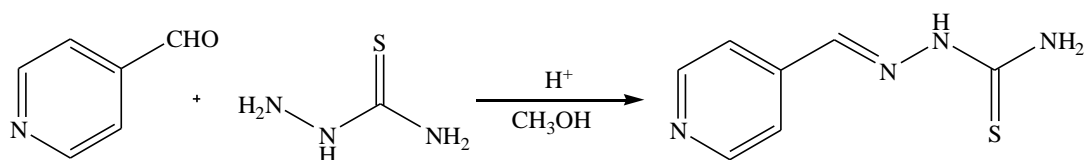
	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	49,08	3,66	25,44	14,56
Nalezeno:	48,80	3,92	25,32	12,51

HPLC čistota: 98,89 %

IČ spektrum: 3027 (NH), 2941 (CH₂), 2754 (CH), 1705 (C=O)

5.1.2.4 Příprava 2-[(pyridin-4-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu

5.1.2.4.1 Příprava pyridin-4-karbaldehyd-thiosemikarbazonu



K 1,3 g (0,014 mol) thiosemikarbazidu bylo přidáno 80 ml methanolu a směs byla míchána několik minut v ultrazvukové lázni. Pak byl thiosemikarbazid za horka rozpuštěn, bylo přidáno katalytické množství koncentrované kyseliny octové a 1,5 g (0,014 mol) pyridin-4-karbaldehydu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu čtyř hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty postupně 50 ml destilované vody a 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl následně překrystalizován z methanolu. Totožnost a čistota produktu byly ověřeny porovnáním teploty tání s teplotami uvedenými v literatuře a elementární analýzou.

Sumární vzorec: C₇H₈N₄S

Molekulová hmotnost: 180,23

Výtěžek: 2,0 g (79 %)

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 238 – 240 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

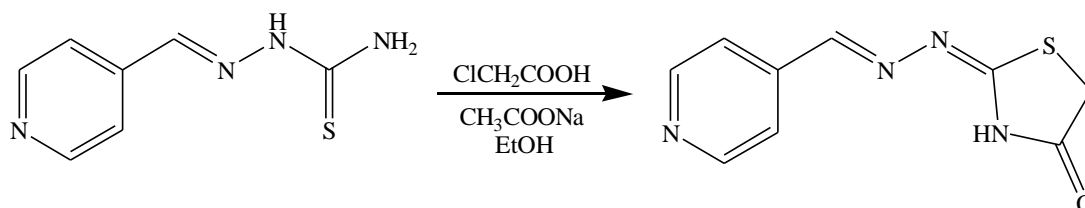
- 258 °C /konfigurace neuvедena, ethanol/
- 253 – 254 °C /konfigurace neuvедena, rozpouštědlo neuvедeno/
- 240 °C /konfigurace neuvедena, methanol/
- 240 °C za rozkladu /konfigurace neuvедena, methanol/
- 238 °C /konfigurace neuvедena, ethanol/
- 235 °C za rozkladu /konfigurace neuvедena, zředěný ethanol/

- 234 °C /konfigurace neuvedena, voda/
- 233 – 237 °C /konfigurace neuvedena, voda/
- 232 – 234 °C za rozkladu /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 228 °C za rozkladu /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	46,65	4,47	31,09	17,79
Nalezeno:	46,32	4,30	31,25	16,60

5.1.2.4.2. Příprava 2-[(pyridin-4-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu



Směs 0,9 g (0,005 mol) pyridin-4-karbaldehyd-thiosemikarbazonu a octanu sodného (0,1 g) byla za horka rozpuštěna v ethanolu (50 ml). Následně bylo přidáno 0,5 g (0,005 mol) kyseliny chloroctové. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin. Po zchladnutí směsi byly vyloučené krystaly odsáty a následně promyty 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl přečištěn krystalizací z ethanolu.

Sumární vzorec: C₉H₈N₄OS

Molekulová hmotnost: 220,25

Výtěžek: 1,0 g (86 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 269 – 270 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 258 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 271 °C /*E,E*-izomer, ethanol/
- 271 °C /*E,E*-izomer, kyselina octová/

Elementární analýza:

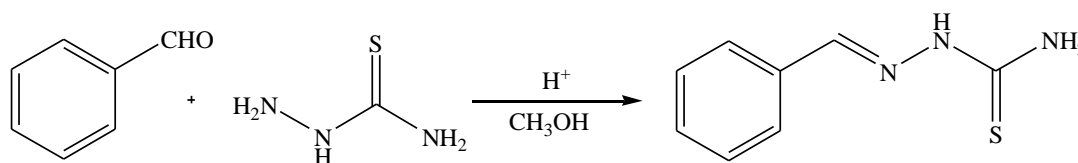
	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	49,08	3,66	25,44	14,56
Nalezeno:	46,04	3,73	25,48	13,36

HPLC čistota: 98,57 %

IČ spektrum: 3044 (NH), 2940 (CH₂), 2766 (CH), 1709 (C=O)

5.1.2.5 Příprava 2-(benzylidenhydrazono)thiazolidin-4-onu

5.1.2.5.1 Příprava benzaldehyd-thiosemikarbazonu



K 1,3 g (0,014 mol) thiosemikarbazidu bylo přidáno 80 ml methanolu a směs byla míchána několik minut v ultrazvukové lázni. Pak byl thiosemikarbazid za horka rozpuštěn, bylo přidáno katalytické množství koncentrované kyseliny octové a 1,5 g (0,014 mol) benzaldehydu. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 4 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty postupně 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl následně překrytalizován z methanolu. Totožnost a čistota produktu byly ověřeny porovnáním teploty tání s teplotami uvedenými v literatuře a elementární analýzou.

Sumární vzorec: C₈H₉N₃S

Molekulová hmotnost: 179,24

Výtěžek: 1,0 g (41 %)

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 160 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

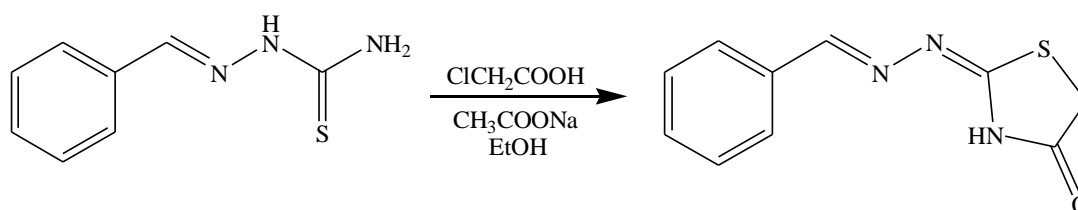
- 180 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 170 °C /konfigurace neuvedena, benzen/
- 163 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 162 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 162 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 160 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 160 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/

- 160 – 162 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 159 – 161 °C /konfigurace neuvedena, methanol, voda/
- 159 – 160 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 159 – 160 °C /konfigurace neuvedena, voda/
- 154 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 153,5 – 154,5 °C /konfigurace neuvedena, methanol/
- 151 – 152 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 148 – 150 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 161 – 162 °C /Z-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/
- 159 – 161 °C /E-izomer, vodný ethanol/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	53,61	5,06	23,44	17,89
Nalezeno:	53,30	4,93	23,78	17,76

5.1.2.5.1 Příprava 2-(benzylidenhydrazono)thiazolidin-4-onu



Směs 0,9 g (0,005 mol) benzaldehyd-thiosemikarbazonu a octanu sodného (0,1 g) byla za horka rozpuštěna v ethanolu (70 ml). Následně bylo přidáno 0,5 g (0,005 mol) kyseliny chloroctové. Reakční směs byla zahřívána do varu pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin. Po zchladnutí směsi se byly vyloučené krystaly odsáty a následně promyty 50 ml destilované vody a 50 ml zředěného ethanolu (1:1, v/v). Produkt byl přečištěn krystalizací z ethanolu.

Sumární vzorec: C₁₀H₉N₃OS

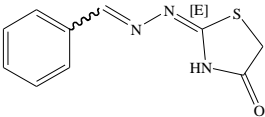
Molekulová hmotnost: 219,26

Výtěžek: 0,9 g (82 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 247 – 249 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [88]:

- 259 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 257 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 256 °C /konfigurace neuvedena, vodný pyridin/
- 257 – 259 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 254 – 255 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 252 °C /konfigurace neuvedena, kyselina octová/
- 252 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 249 – 250 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/
- 254 °C  /rozpouštědlo neuvedeno/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	54,78	4,14	19,16	14,62
Nalezeno:	55,76	4,13	18,53	12,99

HPLC čistota: 99,36 %

IČ spektrum: 3055 (NH), 2966 (CH₂), 2755 (CH), 1708 (C=O)

5.2 Biologická část

5.2.1 Hodnocení antifungální aktivity *in vitro*

Citlivost fungálních kmenů (*Candida albicans* ATCC 44859 – **CA**, *Candida tropicalis* 156 – **CT**, *Candida krusei* E28 – **CK**, *Candida glabrata* 20/I – **CG**, *Trichosporon asahii* 1188 – **TA**, *Aspergillus fumigatus* 231 – **AF**, *Absidia corymbifera* 272 – **AC** a *Trichophyton mentagrophytes* 445 – **TM**) na připravené látce byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou. Kmeny byly uchovávány na Sabouraudově dextrosovém agaru (SDA, Difco) při 4 °C. Před testováním byl každý kmen pasážován na SDA a inokula byla připravena suspendováním kvasinek, konidií nebo sporangiospor ve sterilním 0,85% fyziologickém roztoku. Hustota buněk byla pomocí Bürkerovy komůrky upravena tak, aby zásobní suspenze obsahovala $(1,0 \pm 0,2) \times 10^5$ CFU ml⁻¹. Konečné inokulum bylo připraveno zředěním zásobní suspenze testovacím médiem v poměru 1:20.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Jejich antifungální aktivita pak byla stanovena v tkáňovém kultivačním médiu RPMI 1640 (Sevapharma), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 (\pm 0,1) pomocí 0,165 M 3-morfolinylpropansulfonové kyseliny (Sigma). Konečná koncentrace DMSO v testovacím médiu byla max. 1 % (v/v) a neovlivňovala přirozený růst hub. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), definované jako koncentrace vyvolávající 80% inhibici růstu ve srovnání s kontrolami, byly odečteny po 24 a 48 hodinách (v případě *T. mentagrophytes* po 72 a 48 hodinách) statické kultivace při teplotě 35 °C. Flukonazol (FLU) a amfotericin B (AMB) byly použity jako pozitivní kontrola. Výsledky testů jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC ₈₀ (μmol/l)								
		5.1.1.1	5.1.1.2	5.1.1.3	5.1.1.4	5.1.1.5	5.1.1.6	5.1.1.7	FLU	AMB
CA	24h	>250	>125	500	>500	>250	>500	>500	1,09	0,025
	48h	>250	>125	500	>500	>250	>500	>500	2,17	0,057
CT	24h	>250	>125	0,98	500	>250	>500	>500	2,72	0,090
	48h	>250	>125	1,95	>500	>250	>500	>500	5,44	0,113
CK	24h	>250	>125	1,95	500	>250	>500	>500	87,07	0,135
	48h	>250	>125	1,95	>500	>250	>500	>500	174,14	0,180
CG	24h	>250	>125	0,98	250	>250	>500	>500	21,77	0,034
	48h	>250	>125	1,95	500	>250	>500	>500	69,65	0,090
TA	24h	>250	>125	1,95	500	>250	>500	>500	4,35	1,082
	48h	>250	>125	1,95	>500	>250	>500	>500	8,71	1,803
AF	24h	>250	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>419,93	0,180
	48h	>250	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>419,93	0,225
AC	24h	>250	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>419,93	1,082
	48h	>250	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>419,93	2,164
TM	72h	>250	>125	>500	>500	>250	>500	>500	17,41	1,082
	120h	>250	>125	>500	>500	>250	>500	>500	26,12	1,082

Tabulka 2: Minimální inhibiční koncentrace testovaných sloučenin (5.1.1)

5.1.1.1 = [4-oxo-5-(pyrazin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina

5.1.1.2 = 3-amino-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on

5.1.1.3 = [4-oxo-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina

5.1.1.4 = [4-oxo-5-(pyridin-3-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina

5.1.1.5 = 3-(2-hydroxyethyl)-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on

5.1.1.6 = [4-oxo-5-(pyridin-4-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina

5.1.1.7 = (5-benzyliden-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC ₈₀ (μmol/l)						
		5.1.2.1	5.1.2.2	5.1.2.3	5.1.2.4	5.1.2.5	FLU	AMB
CA	24h	62,5	7,81	>250	>500	>250	1,09	0,025
	48h	62,5	15,62	>250	>500	>250	2,17	0,057
CT	24h	125	3,9	250	>500	>250	2,72	0,090
	48h	125	7,81	>250	>500	>250	5,44	0,113
CK	24h	62,5	7,81	125	>500	>250	87,07	0,135
	48h	125	7,81	250	>500	>250	174,14	0,180
CG	24h	15,62	3,9	125	>500	>250	21,77	0,034
	48h	31,25	7,81	125	>500	>250	69,65	0,090
TA	24h	62,5	7,81	250	>500	>250	4,35	1,082
	48h	62,5	7,81	250	>500	>250	8,71	1,803
AF	24h	>250	15,62	>250	>500	>250	>419,93	0,180
	48h	>250	62,5	>250	>500	>250	>419,93	0,225
AC	24h	500	31,25	>250	>500	>250	>419,93	1,082
	48h	>500	31,25	>250	>500	>250	>419,93	2,164
TM	72h	31,25	7,81	125	500	>250	17,41	1,082
	120h	62,5	31,25	125	>500	>250	26,12	1,082

Tabulka 3: Minimální inhibiční koncentrace testovaných sloučenin (5.1.2)

5.1.2.1 = 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on

5.1.2.2 = 2-[(pyridin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on

5.1.2.3 = 2-[(pyridin-3-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on

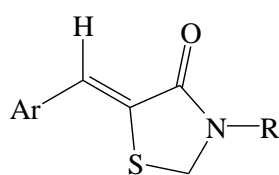
5.1.2.4 = 2-[(pyridin-4-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on

5.1.2.5 = 2-(benzylidenhydrazono)thiazolidin-4-on

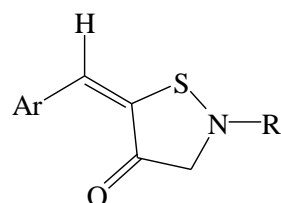
6. Diskuse

Prvním úkolem mé diplomové práce bylo navázat na práce mých předchůdců [18 – 22] a připravit deriváty rhodaninu substituované na dusíku v poloze 3 rhodaninového kruhu. Pro přípravu 3-amino-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-onu (5.1.1.2) a 3-(2-hydroxyethyl)-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-onu (5.1.1.5) jsem zvolila postup použitý ve výše zmíněných diplomových pracích. Pro kondenzaci rhodanin-3-octové kyseliny s arylkarbaldehydy však bylo vhodnější, vzhledem k povaze výchozích látek, použít prostředí kyseliny octové s octanem sodným a acetanhydridem. Celkem jsem připravila sedm sloučenin, z nichž všechny kromě [4-oxo-5-(pyrazin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octové kyseliny (5.1.1.1) a 3-amino-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-onu (5.1.1.2) byly již popsány v literatuře [88,89]. Avšak jejich fyzikálně-chemická charakterizace je většinou neúplná. Spektrální údaje jsou uvedené pouze u jediné sloučeniny, a to u (5-benzyliden-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny.

Obecně 5-benzylidenrhodaniny a jejich heterocyklické analogy mohou tvořit dvě izomerní formy:



Z-izomer



E-izomer

Podle většiny literárních údajů vzniká při syntéze 5-benzylidenrhodaninů Z-izomer. Obě izomerní formy je možno rozlišit na základě NMR spekter. $^1\text{H-NMR}$ signály vodíku methinové skupiny Z-izomerů leží při vyšších hodnotách magnetického pole než v případě E-izomerů [90 – 93]. V $^1\text{H-NMR}$ spektrech kalkulovaných pomocí programu CS ChemOffice 7.0 (Cambridge Soft, USA) je

pro mnou připravené látky uváděna hodnota δ v rozmezí 7,40 – 7,63 ppm pro Z-izomery a δ 6,78 – 7,01 ppm pro E-izomery. Ze srovnání experimentálně získaných $^1\text{H-NMR}$ posunů s vypočítanými hodnotami a signály uváděnými v literatuře [93] vyplynulo, že všechny mnou připravené 5-arylidenrhodaniny byly získány jako čisté Z-izomery.

Sloučenina	E-izomer	Z-izomer	Publikované hodnoty	Experimentální hodnota
5.1.1.1	6,80 ^a	7,42 ^a	N ^c	7,95
	6,80 ^b	7,42 ^b		
5.1.1.2	7,01 ^a	7,63 ^a	N ^c	7,86
	7,01 ^b	7,63 ^b		
5.1.1.3	7,01 ^a	7,63 ^a	N ^c	7,91
	7,01 ^b	7,63 ^b		
5.1.1.4	6,80 ^a	7,42 ^a	N ^c	7,95
	7,72 ^b	7,68 ^b		
5.1.1.5	7,01 ^a	7,63 ^a	N ^c	7,81
	7,01 ^b	7,63 ^b		
5.1.1.6	6,78 ^a	7,40 ^a	N ^c	7,87
	7,70 ^b	7,78 ^b		
5.1.1.7	6,80 ^a	7,42 ^a	N ^c	7,90
	7,72 ^b	7,80 ^b		

Tabulka 4. Srovnání $^1\text{H NMR}$ signálu vodíku methinové skupiny

^aCS ChemOffice 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.); ^bCS ChemOffice 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.); ^c vodíkové posuny pro mnou připravené sloučeniny nejsou v literatuře dostupné, ale pro analogické sloučeniny substituované na benzenové jádře se vodíkový posun methinové skupiny pohybuje v rozmezí δ 7,8 až 7,9 ppm, což odpovídá Z-izomeru [93]

Přestože u sloučenin tohoto typu byli popsány antifungální účinky, testy provedené na Katedře biologických a lékařských věd (FaF UK) nepotvrdily

prakticky žádnou aktivitu (viz. tabulka 2). Výjimkou je pouze [4-oxo-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina (5.1.1.3), která výrazně inhibovala růst *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* a *Trichosporon asahii* (MIC/IC₈₀ = 0,98 – 1,95 μmol.l⁻¹).

Antifungální účinky některých 5-arylidenrhodaninů studovali nedávno Sortino et al. [12]. Zjistili, že růst *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes* inhibují nejvíce 5-benzylidenrhodaniny substituované na benzenovém jádře elektronnegativními substituenty (Br, F, CF₃). Zatímco analogické sloučeniny odvozené od pyridinu nebyly účinné. Naproti tomu v testech provedených na Katedře biologických a lékařských věd (FaF UK) vykázal derivát odvozený od pyridin-2-karbaldehydu (5.1.1.3) výraznou aktivitu. Za zvýšení antifungální aktivity této sloučeniny je patrně odpovědná karboxymethylová skupina na dusíku rhodaninového kruhu, protože analogický *N*-nesubstituovaný derivát připravený v předchozí diplomové práci [22] byl neaktivní. Sortino et al. [12] také studovali mechanismus účinku těchto sloučenin a dospěli k názoru, že se ani neváží na ergosterol, ani na fungální membrány hub. U derivátů benzylidenrhodanin-3-octové kyseliny je prokázáno, že inhibují funkci fungálního proteinu mannosyltransferasy 1 (PMT1) [9].

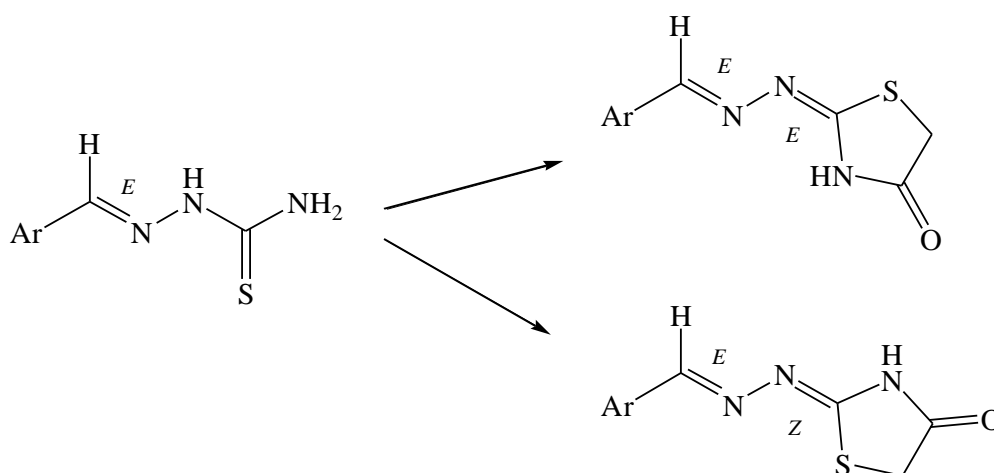
V další části své diplomové práce jsem se věnovala cyklizačním reakcím thiosemikarbazonů odvozených od arylkarbaldehydů. Tyto thiosemikarbazony jsem připravovala metodou již dříve vyzkoušenou na našem pracovišti [94].

Kondenzaci thiosemikarbazonů s monochloroctovou kyselinou lze podle Singha a spolupracovníků [95] provést v ethanolu či pyridinu. V prostředí ethanolu vzniká touto cyklizací thiazolidin-4-on, zatímco v prostředí pyridinu cyklizuje thiosemikarbazon za vzniku 2-thioxoimidazolidin-4-onu. Protože moje práce byla zaměřena na přípravu derivátu thiazolu, použila jsem při cyklizaci prvně uvedené prostředí.

Takto jsem připravila celkem pět derivátů arylmethylidenhydrazono-thiazolidin-4-onu, z nichž není popsán v literatuře pouze 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on. Ostatní sloučeniny (5.1.2.2 – 5.1.2.5)

připravil Buu-hui et al. [96] jako potenciální antituberkulotika. Kromě teploty tání a elementární analýzy však neuvádí žádné další charakteristiky.

Vzhledem k přítomnosti dvou dvojných vazeb mohou tyto sloučeniny teoreticky tvořit čtyři geometrické izomery. V literatuře je zmiňována pouze konfigurace *E,E*, avšak toto tvrzení není dostatečně podloženo experimentálními důkazy [88]. Pokusila jsem se tedy tento problém vyřešit pomocí molekulového modelování. Je doloženo, že obdobné thiosemikarbazony připravené dříve na našem pracovišti byly vždy *E*-izomery [97]. Přednostní vznik *E*-izomeru u pyridin-2-thiosemikarbazonu dokládá i Temperini et al. [98]. Vzhledem k tomu, že je málo pravděpodobné, že by při jejich cyklizaci docházelo ke změně konfigurace na dvojně vazbě, lze očekávat vznik jen dvou izomerů arylmethylidenhydrazono-thiazolidin-4-onu:



Na základě molekulového modelování se jeví *E,E*-izomer jako termodynamicky stabilnější, proto by měl vznikat přednostně.

Na základě studia literatury jsem zjistila, že analogické sloučeniny odvozené od substituovaných benzaldehydů byli již dříve připraveny v Japonsku a testovány proti fytopatogenním houbám [17]. Také El-Gendy a spolupracovníci se zabývali fungitoxicitou substituovaných 2-(benzylidenhydrazono)thiazolidin-4-onů [16]. Tyto studie avšak nezahrnovaly deriváty odvozené od heterocyklických aldehydů. V testech provedených na Katedře lékařských a biologických věd (FaF UK v Hradci Králové) měly některé mnou připravené sloučeniny poměrně dobrou

aktivitu (viz. tabulka 3). V případě 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]-thiazolidin-4-onu (5.1.2.1) byla zaznamenána střední účinnost, tj. MIC = >10 – 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, vůči *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *T. asahii* a *T. mentagrophytes*. Pyridinový analog výše zmíněné sloučeniny 2-[(pyridin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on (5.1.2.2) inhiboval růst všech testovaných kmenů hub v hodnotách MIC/IC₈₀ od 3,9 do 62,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Mechanismus antifungálního účinku arylmethylidenhydrazono-thiazolidin-4-onů nebyl dosud podrobněji studován. Thiosemikarbazony použité jako výchozí sloučeniny jsou trojvaznými ligandy a jejich aktivita je připisována schopnosti tvořit komplexy s kovy, např. železem [99]. Podobný mechanismu účinku lze očekávat i u jejich cyklizačních produktů.

Kromě přípravy sloučenin uvedených v této diplomové práci jsem se také podílela na syntéze derivátů thiazolidin-4-onu odvozených od acetylpyrazinových thiosemikarbazonů (viz příloha 3).

7. Závěr

V rámci této diplomové práce byly připraveny následující sloučeniny:

- [4-oxo-5-(pyrazin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina
- 3-amino-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on
- [4-oxo-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina
- [4-oxo-5-(pyridin-3-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina
- 3-(2-hydroxyethyl)-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on
- [4-oxo-5-(pyridin-4-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina
- (5-benzyliden-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina
- 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on
- 2-[(pyridin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on
- 2-[(pyridin-3-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on
- 2-[(pyridin-4-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-on
- 2-(benzylidenhydrazono)thiazolidin-4-on

S výjimkou [4-oxo-5-(pyrazin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]-octové kyseliny (5.1.1.1), 3-amino-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-onu (5.1.1.2) a 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu (5.1.2.1) byly všechny tyto látky již dříve připraveny, ale jejich fyzikálně-chemická charakterizace je často neúplná, především pokud se jedná o spektrální údaje. V této diplomové práci jsou tyto údaje doplněny.

V testech antifungální aktivity vykazala [4-oxo-5-(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina (5.1.1.3) silný inhibiční efekt ($MIC/IC_{80} = 0,98 - 1,95 \mu\text{mol.l}^{-1}$) na růst *Trichosporon asahii* a některých druhů *Candida*. V případě 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]thiazolidin-4-onu (5.1.2.1) byla zaznamenána střední účinnost ($MIC/IC_{80} = 15,62 - 62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) proti většině testovaným kmenům hub. Také 2-[(pyridin-2-ylmethyliden)-hydrazono]thiazolidin-4-on (5.1.2.2) inhiboval růst všech testovaných kmenů hub ($MIC/IC_{80} = 3,9 - 62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

8. Seznam použité literatury

1. DE PAUW, B. E.: Increasing fungal infections in the intensive care unit. *Surgical Infections* **2006**, 7, 93 – 96.
2. PETRIKKOS, G., SKIADA, A.: Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2007**, 30, 108 – 117.
3. SPANAKIS, E. K. et al.: New agents for the treatment of fungal infections: Clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, 43, 1060 – 1068.
4. FRANCOIS, I. et al.: Currently used antimycotics: Spectrum, mode of action and resistance occurrence. *Curr. Drug Targets* **2005**, 6, 895 – 907.
5. BARRETT, D.: From natural products to clinically useful antifungals. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1587, 224 – 233.
6. WALKER, R., WHITTLESEA, C.: *Clinical pharmacy and therapeutics*, 3. Ed., Elsevier, Edinburgh 2007, s. 599 – 613.
7. DOLEŽAL, M.: Pokroky ve vývoji antifungálních léčiv. *Čes. Slov. Farm.* **2002**, 51, 226 – 235.
8. PASQUALOTTO, A. C., DENNING, D. W.: New and emerging treatments for fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, 61, (Suppl. 1), i19 – i30.
9. ORCHARD, M. G. et al.: Rhodanine-3-acetic acid derivatives as inhibitors of fungal protein mannosyl transferase 1 (PMT1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3975 – 3978.
10. HABIB, N. S. et al.: Synthesis and antimicrobial activity of rhodanine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, 32, 759 – 762.
11. DAS, K. et al.: Rhodanine derivatives. *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 58 – 60.
12. SORTINO, M. et al.: Synthesis and antifungal activity of (Z)-5-arylidenerhodanines. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 15, 484 – 494.
13. LESYK, R. B., ZIMENKOVSKY, B. S.: 4-Thiazolidones: Centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 1547 – 1577.
14. BONDE, C. G., GAIKWAD, N. J.: Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. *Biorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2151 – 2161.
15. ABDEL-RAHMAN, R. M.: Chemoselective heterocyclization and pharmacological activities of new heterocycles – a review. Part V: Synthesis of biocidal 4-thiazolidinones derivatives. *Boll. Chim. Farm.* **2001**, 140, 401 – 410.
16. EL-GENDY, Z. et al.: Biologically active thiazolidinone. Part II. Synthesis and fungitoxicities of isolated and fused thiazolidinones. *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 927 – 929.
17. USUI, Y.: Fungicides. XVIII. Antifungal activity of 2-hydrazinothiazole derivatives and thiazolidin-5-ylacetic acid derivatives. *Ann. Rep. Takeda Res. Lab.* **1968**, 27, 144 – 158.
18. DOLEŽEL, J.: Kondenzační produkty acetylpyrazinů s rhodaninem jako potenciální léčiva.

- Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové **2004**.
19. ŠPANINGEROVÁ, E.: Kondenzační produkty aldehydů s rhodaninem jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové **2004**.
 20. KEŠETOVIČOVÁ, D.: Deriváty rhodaninu jako potencionální léčiva I. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové **2007**.
 21. VLČKOVÁ, M.: Deriváty rhodaninu jako potencionální léčiva II. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové **2007**.
 22. MAJD, M. M.: Derivatives of rhodanine as potencial antifungal and antimycobacterial drugs. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové **2007**.
 23. PETRIK, P. et al.: Antifungal and antimycobacterial properties of 5-arylmethylidenerhodanines and their N^3 -substituted analogues. Book of Abstracts of the 5th International Postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics (IPORSIP – 2007), Istanbul, September 13 – 15, 2007. In: *Acta Pharmaceutica Scientia* **2007**, 49 (Suppl.), 77.
 24. OPLETALOVÁ, V. et al.: Vliv derivátů rhodaninu na fotosyntézu a růst rostlin. Zborník 36. konferencie Syntéza a analýza liečiv, Bratislava, 11. – 13. septembra **2007**, s. 107.
 25. OPLETALOVÁ, V. et al.: Antifungální účinky benzylidenrhodaninů. Sborník 35. konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice, 12. – 15. září **2006**, s. 120.
 26. KAREGOUDAR, P. et al.: Synthesis of some novel 2,4-disubstituted thiazoles as possible antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 43, 261 – 267.
 27. CHAVAN, A. A., PAI, N. R.: Synthesis and antimicrobial screening of 5-arylidene-2-imino-4-thiazolidinones. *Arkivoc* **2007**, 16, 148 – 155. Dostupné z URL: <http://www.arkat-usa.org>
 28. HIBBETT, D. S. et al.: A higher level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol. Res.* **2007**, 111, 509 – 547.
 29. BUCHTA, V. et al.: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*, Nakladatelství Karolinum, Praha 1998, s. 146 – 151.
 30. KOĐOUSEK, R.: *Mykózy – Lékařsky významná mykotická onemocnění člověka*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2003, s. 9 – 18.
 31. ODDS, F. C. et al.: Antifungal agents: Mechanism of action. *Trends Microbiol.* **2003**, 11, 272 – 279.
 32. SUCHOPÁR, J. et al.: *Remedia Compendium*, 2. vyd., Panax, Praha 1997, s. 259 – 263.
 33. HARTL, J. et al.: *Farmaceutická chemie IV.*, Nakladatelství Karolinum, Praha 2006, s. 35 – 48.
 34. LULLMAN, H. et al.: *Farmakologie a toxikologie*, GRADA, Praha 2002, s. 509 – 516.
 35. KATZUNG, B. G. et al.: *Základní & klinická farmakologie*, Nakladatelství H&H, 2006, s. 780 – 785.
 36. BALKIS, M. M. et al.: Mechanisms of fungal resistance. *Drugs* **2002**, 62, 1025 – 1040 .
 37. LEMKE, A. et al.: Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 151 – 162.
 38. BOROWSKI, E.: New approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmaco* **2000**, 55, 206 – 208.

39. PATTERSON, T. F.: Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* **2005**, 366, 1013 – 1025.
40. LEMKE, A., KIDERLEN, A. F., Kayser, O.: Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 151 – 162.
41. RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K.: *Pharmacology*, 5. Ed., Elsevier Science, Edinburgh 2003, s. 666 – 671.
42. KRISHNAN-NATESAN, S., CHANDRASEKAR, P. H.: Current and future therapeutic options in the management of invasive aspergillosis. *Drugs* **2008**, 68, 265 – 282.
43. PHALLER, M. A., et al.: In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: Global assessment of primary resistance using national committee for clinical laboratory standards susceptibility testing methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 3518 – 3521.
44. GUPTA, A. K. et al.: The efficacy and safety of terbinafine in children. *J. Eur. Acad. Dermatolog. Venerol.* **2003**, 17, 627 – 640.
45. McCLELLAN, K. J. et al.: Terbinafine – An Update of its use in superficial mycoses. *Drugs* **1999**, 58, 179 – 202.
46. MAERTENS, J. A.: History of the development of azole derivatives. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, 10 (Suppl. 1), 1 – 10.
47. RUBIN, A. I. et al.: Six novel antimycotics. *Am. J. Clin. Dermatolog.* **2002**, 3, 71 – 81.
48. SCOTT, L. J., SIMPSON, D.: Voriconazol: A review of its use in the management of invasive fungal infections. *Drugs* **2007**, 67, 269 – 298.
49. SORRELL, T. C., CHEN, S. C. A.: Antifungal agents. *Med. J. Aust.* **2007**, 187, 404 – 409.
50. ClinicalTrials.gov [online]. © The U.S. National Institutes of Health, **2008** [cit. 2008-03-29]. Dostupné z URL: <http://clinicaltrials.gov>
51. HARIA, M., BRYSON, H. M.: Amorolfine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of onychomycosis and other superficial fungal infections. *Drugs* **1995**, 49, 103 – 120.
52. POLAK, A.: Preclinical data and mode of action of amorolfine. *Dermatology* **1992**, 184 (Suppl 1), 3 – 7.
53. GUPTA, A. K., BLUHM, R.: Ciclopirox (Loprox[®]) gel for superficial fungal infections. *Skin Therapy Lett.* **2004**, 9, 3 – 7.
54. CHEN, S. H., RODRIGUEZ, M.: Antifungal lipopeptides: A tale of pseudomycin prodrugs and analogues. *Drugs Future* **2003**, 28, 441 – 463.
55. BOUCHER, H. W. et al.: Newer systemic antifungal agents: Pharmacokinetics, safety and efficacy. *Drugs* **2004**, 64, 1997 – 2020.
56. McCORMACK, P. L., PERRY, C. M.: Caspofungin: A review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* **2005**, 65, 2049 – 2068.
57. JARVIS, B. et al.: Micafungin. *Drugs* **2004**, 64, 969 – 982.

58. MURDOCH, D., PLOSKER, G. L.: Anidulafungin. *Drugs* **2004**, *64*, 2249 – 2258.
59. COHEN-WOLKOWIEZ, M. et al.: Anidulafungin: A new echinocandin for the treatment of fungal infection. *Drugs Today* **2006**, *42*, 533 – 544.
60. *Indevus Products Pipeline* [online]. © Indevus Pharmaceuticals, Inc., **2008** [cit 2008-03-29]. Dostupné z URL: www.indevus.com
61. SCHILLER, R.: Syntéza a biologické hodnocení šestičlenných nenasycených laktonů. Disertační práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové **2004**, s. 18.
62. VICENTE M. F. et al.: Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9*, 15 – 32.
63. YEAGER, A. R., FINNEY, N. S.: Second-generation dimeric inhibitors of chitin synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 6451 – 6460.
64. RUIZ-HERRERA, J., SAN-BLAS, G.: Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2003**, *3*, 77 – 91.
65. HABER, J.: Nová antimykotika – jaká jsou a co přinášejí. *Remedia* **2005**, *15*, 247 – 258.
66. MÁTYUS, E. et al.: Structure and dynamics of the antifungal molecules Syringotoxin-B and Syringopeptin-25A from molecular dynamics simulation. *Eur. Biophys. J.* **2007**, *37*, 495 – 502.
67. SUGIMOTO, Y. et al.: IPC Synthase as a useful target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2004**, *4*, 311 – 322.
68. TIBERGHEN, F. et al.: Aureobasidins: Structure-activity relationships for the inhibition of human MDR1 P-glycoprotein ABC-transporter. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2547 – 2556.
69. HABER, J.: Současný stav a perspektivy antimykotik se systémovým účinkem (Present Status and Perspectives on Antimycotics with Systemic Effects). *Cas. Lek. Cesk.* **2001**, *140*, 596 – 604.
70. LEE, M. D. et al.: Microbial fermentation-derived inhibitors of efflux-pump-mediated drug resistance. *Farmacology* **2001**, *56*, 81 – 85.
71. RYDER, N. S.: Antifungal agents. *IDrugs* **1999**, *2*, 1253 – 1255.
72. AFELTRA, J., VERWEIJ, P. E.: Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *22*, 397 – 497.
73. CUTLER, J. E. et al.: Advances in combating fungal diseases: Vaccines on the threshold. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 13 – 28.
74. CASADEVALL, A. et al.: Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **2002**, *5*, 368 – 391.
75. REFUSAL CHMP ASSESSMENT REPORT FOR MYCOGRAB. Procedure No. EMEA/H/C/658 [online]. European Medicines Agency, London, 20 March **2007** [cit. 2008-03-29] Dostupné z URL: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/mycograb/H-658-RQ&A-en.pdf>
76. PLEŠEK, J., ZOBÁČOVÁ, A.: Preparativní reakce v organické chemii V. Aldolisace a příbuzné reakce. 1.vyd. Nakladatelství ČSAV, Praha **1960**, s. 403 – 408.
77. KATO, E. et al.: Synthetic inhibitor of leaf-closure that reveals the biological importance of leaf-

- movement for the survival of leguminous plants. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5909 – 5917.
78. ŠTURM, K. et al.: Permeability characteristics of novel aldose reductase inhibitors using rat jejunum in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 128 – 133.
79. LUO, J., LI, Y., ZHOU, M.: Condensation of aryl aldehydes with rhodanine in water media catalyzed by Tween 80. *Chemical Journal on Internet* **2006**, *8*, 17.
Dostupné z URL: <http://www.chemistrymag.org/cji/2006/083017ne.htm>
80. McMURRY, J. et al.: *Organická chemie*. Nakladatelství VUTIUM, Brno 2007, s. 689.
81. VEČEŘA, M., PANCHARTEK, J.: *Laboratorní příručka organické chemie*, SNTL/ALFA Praha 1987, s. 109 – 110.
82. HRABÁLEK, A. et al.: *Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty*, Karolinum Praha, 1999, s. 64.
83. MEHER, S. S. et al.: Studies on thiazolidinones. Part XI: Synthesis and fungitoxicities of thiazolidinines, thiohydantoin and their derivatives derived from thiosemicarbazones. *J. Indian Chem. Soc.* **1981**, *58*, 274 – 276.
84. HOZIEN, Z. A.: Synthesis of some new heterocyclic systems derived from 2-acetylbenzimidazole. *J. Chem. Tech. Biotech.* **1993**, *57*, 335 – 341.
85. BECKER, H. et al.: *Organická synthesa*, Academia Praha, 1971, 1. vyd., s. 479 – 480.
86. SAGURA, J. J.; UNRUH, C. C.: *Light-sensitive rhodanine esters of maleic anhydride copolymers*. USA pat. US 2,824,087. 1958-02-18. [cit. 2008-03-29] Dostupné z URL: http://ep.espacenet.com/?locale=en_EP
87. OPLETALOVÁ V. et al.: Oxidace hydroxymethylpyrazinu s využitím ultrazvuku. Zborník XXIII. konferencie Syntéza a analýza liečiv, Bratislava, 4. – 10. októbra **1994**, s. 25.
88. CrossFire Beilstein [databáze online]. © Elsevier MDL [cit. 2008-03-25]. Dostupné z URL: http://www.mdli.com/products/knowledge/crossfire_beilstein
89. SciFinder Scholar [databáze online]. © American Chemical Society [cit. 2008-03-25]. Dostupné z URL: <http://www.cas.org/products/sfacad/index.html>
90. OHISHI, Y. et al.: Preparations of 5-alkylmethylidene-3-carboxymethyl- rhodanine derivatives and their aldose reductase inhibitory activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1911 – 1919.
91. WHITESITT, C. A. et al.: Synthesis and structure-activity relationships of benzophenones as inhibitors of cathepsin D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2157 – 2162.
92. KHODAIR, A. I.: A Convenient synthesis of 2-arylidene-5H-thiazolo[2,3-b]quinazoline-3,5[2H]-diones and their benzoquinazoline derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* **2002**, *39*, 1153 – 1160.
93. ORCHARD, G. M., NEUSS, J. C.: *Thiazolidine derivatives and its use as antifungal agent*. USA pat. US 6,740,670. 2004-05-25. [cit. 2008-04-29]. Dostupné z URL: <http://www.patentstorm.us>
94. JAMPÍLEK, J. et al.: Thiosemicarbazones of Acetylpyrazines: Preparation and Their Hydrophobic Properties. In Seijas, J. A. and Tato, M. P. V. Proceedings of the 9th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-9), November 1-30, 2005 [CD-ROM ed.] Basel, MDPI, 2005.

95. SINGH, I. P. et al.: Synthesis and anti-inflammatory activity of thiazolidinones and imidazolidinones derived from thiosemicarbazones. *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* **1985**, *20*, 283 – 286.
96. BUU-HOI, N. P. et al.: New thiosemicarbazones and 4-oxo- Δ^2 -thiazolin-2-ylhydrazones. *J. Chem. Soc.* **1956**, *21*, 713 – 714.
97. OPLETALOVÁ, V. et al.: Thiosemicarbazones of acetylpyrazines as potential drugs. Book of Abstracts of the 11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Brno, August 28-September 1, 2005, PO-70.
98. TEMPERINI, M. L. A. et al.: Spectroscopic study of the isomerization of Z- to E-pyridine-formyl thiosemicarbazone. *Spectrochimica Acta Part A* **1995**, *51*, 1517 – 1524.
99. KALINOWSKI, D. S., RICHARDSON, D. R.: The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 547 – 583.

PETRA HIRŠOVÁ: Derivatives of Thiazole as Potential Drugs. Diploma Thesis, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2008

Abstract

Within this diploma thesis, condensation products of *N*-substituted rhodanine and arylcarbaldehydes were prepared. According to the character of *N*-substituent, the reaction was carried out in either water-alcoholic medium using $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ as a catalyst or glacial acetic acid with sodium acetate and acetic anhydride. Antifungal activity of prepared substances was tested against eight pathogenic fungal strains (*Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E 28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445) by the microdilution broth method. Strong inhibition effect ($\text{MIC}/\text{IC}_{80} = 0,98 - 1,95 \mu\text{mol.l}^{-1}$) against *Trichosporon asahii* and non-albicans strains of *Candida* was found with [4-oxo-5-(pyridin-2-ylmethylidene)-2-thioxothiazolidin-3-yl]acetic acid.

Next, a series of arylmethylidenhydrazonothiazolidin-4-ones was prepared. First, thiosemicarbazones were synthesized from arylcarbaldehydes. These thiosemicarbazones then reacted with monochloroacetic acid in ethanol and gave thiazolidine-4-one derivatives. Products were tested for antifungal activity as well. The medium antifungal activity ($\text{MIC}/\text{IC}_{80} = 15,62 - 62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) against most of the strains was observed with 2-[(pyrazin-2-ylmethylidene)hydrazono]thiazolidin-4-one. 2-[(Pyridin-2-yl-methylidene)-hydrazono]thiazolidin-4-one inhibited growth of all tested fungal strains ($\text{MIC}/\text{IC}_{80} = 3,9 - 62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

All prepared substances were characterized by NMR and IR spectra. Their purity was checked by the elemental analysis and HPLC.

PETRA HIRŠOVÁ: Deriváty thiazolu jako potenciální léčiva. Diplomová práce, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008

Abstrakt

V rámci této diplomové práce byly připraveny kondenzační produkty *N*-substituovaného rhodaninu s arylkarbaldehydy. Kondenzace byla provedena v závislosti na charakteru substituentu rhodaninového kruhu buď ve vodně-alkoholickém roztoku za katalýzy směsí NH₄OH/NH₄Cl nebo v prostředí kyseliny octové a octanu sodného s přídavkem acetanhydridu. U připravených látek byla následně mikrodiluční bujónovou metodou hodnocena antifungální aktivita proti osmi patogenním kmenům hub (*Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E 28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445). Silný inhibiční efekt (MIC/IC₈₀ = 0,98 – 1,95 μmol.l⁻¹) na růst non-albicans druhů *Candida* a *Trichosporon asahii* vykázala [4-oxo-5--(pyridin-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina.

Dále byla připravena série arylmethylidenhydrazonothiazolidin-4-onů. Prvně byly nasyntetizovány thiosemikarbazony příslušných arylkarbaldehydů, které následně reagovaly s monochloroctovou kyselinou v prostředí ethanolu za vzniku derivátů thiazolin-4-onu. U těchto látek byla obdobně sledována antifungální aktivita. V případě 2-[(pyrazin-2-ylmethyliden)hydrazono]-thiazolidin-4-onu byla zaznamenána střední antifungální účinnost (MIC/IC₈₀ = 15,62 – 62,5 μmol.l⁻¹) proti většině testovaných kmenů. 2-[(Pyridin-2-ylmethyliden)hydrazono]-thiazolidin-4-on inhiboval růst všech testovaných kmenů hub (MIC/IC₈₀ = 3,9 – 62,5 μmol.l⁻¹).

Všechny připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR a IČ spekter. Čistota produktů byla hodnocena elementární analýzou a pomocí HPLC.