

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Syntéza salicylanilidových esterů působících na MDR-TB

Diplomová práce



2013

Rudolf Vosátka

Prohlašuji na svou čest, že tato diplomová práce je mým původním dílem, které jsem vypracoval sám. Veškeré použité informační zdroje a literatura jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne 15. 5. 2013

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své školitelce prof. RNDr. Jarmile Vinšové a kolektivu její laboratoře. Děkuji jim za pomoc, cenné a odborné rady, za jejich vedení při vzniku této práce a v neposlední řadě za trpělivost.

Abstrakt

VOSÁTKA, Rudolf., *Syntéza salicylanilidových esterů působících na MDR-TB*, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, 2013, 54 s, Diplomová práce.

Tato diplomová práce se zabývá syntézou a aktivitou salicylanilidů a jejich esterů působících na MDR-TB. Konkrétně 4-brom-3-(trifluormethyl)anilinem, 3,5-bis(trifluormethyl)anilinem a jejich estery v podobě isonikotinátů, pyrazinkarboxylátů a 1*H*-imidazol-4-karboxylátů. Navíc je zde ještě 5-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-hydroxybenzamid, který mimo jiné vykazoval nejlepší MIC v porovnání s ostatními syntetizovanými látkami.

Práce shrnuje problematiku tuberkulózy, její současnou léčbu a doplňuje ji o současný trend ve vývoji a výzkumu na konkrétních příkladech potenciálních léčiv. Velká část této práce se zabývá problematikou salicylanilidů.

Abstract

VOSÁTKA, Rudolf., *Synthesis of salicylanilide esters active against MDR-TB*, Hradec Králové: Faculty of Pharmacy of Charles University, 2013, 54 s, Diploma thesis.

This diploma thesis deals with the synthesis and activity of salicylanilides and their esters against MDR-TB. Specifically, 4-bromo-3-(trifluoromethyl) aniline, 3,5-bis(trifluoromethyl) aniline and their esters as isonicotinates, pyrazincarboxylates and 1H-imidazole-4-carboxylates. Moreover, there is also 5-chloro-N-(3,4-dichlorophenyl)-2-hydroxybenzamide, which inter alia demonstrates the best MIC compared to other synthesized substances.

Thesis summarizes problems of tuberculosis, its current treatment and supplementing to the current trend in the development and research on specific examples of potential drugs. Much of this thesis deals with salicylanilides.

Obsah

1	Úvod.....	8
1.1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Tuberkulóza.....	11
2.2	Léčba tuberkulózy.....	12
2.2.1	Vývoj.....	12
2.3	Současná léčba.....	19
2.3.1	Léčiva první linie.....	19
2.3.2	Léčiva druhé linie.....	21
2.4	Salicylanilidy.....	22
2.4.1	Mechanismus antibakteriálního účinku salicylanilidů.....	22
2.4.2	Toxicita a nežádoucí účinky.....	24
2.4.3	Salicylanilidové estery a jejich antimikrobiální aktivita.....	24
3	Cíl práce.....	29
3.1	Cíl práce.....	30
4	Experimentální část.....	31
4.1	Obecná charakteristika práce.....	32
4.2	Jednotlivé syntézy.....	33
4.2.1	5-Brom- <i>N</i> -[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid.....	33
4.2.2	4-Brom-2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl isonikotinát.....	34
4.2.3	4-Brom-2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl pyrazin-2-karboxylát.....	35
4.2.4	4-Brom-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl 1 <i>H</i> -imidazol-4-karboxylát.....	36
4.2.5	<i>N</i> -[3,5- <i>Bis</i> (trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamid.....	37
4.2.6	5-Chlor- <i>N</i> -(3,4-dichlorfenyl)-2-hydroxybenzamid.....	38

4.2.7	2-[[3,5- <i>Bis</i> (trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]-4-bromfenyl pyrazin-2-karboxylát 39	
4.2.8	2-[[3,5- <i>Bis</i> (trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]-4-bromfenyl isonikotinát	40
5	Biologické hodnocení vybraných syntetizovaných derivátů salicylanilidů	41
5.1	Biologické testování vybraných syntetizovaných derivátů salicylanilidů.....	42
6	Diskuse a závěr.....	45
6.1	Diskuze	46
6.2	Závěr.....	49
7	Seznam použitých zkratk.....	50
7.1	Seznam použitých zkratk	51
8	Literatura	52
8.1	Literatura	53

1 Úvod

1.1 Úvod

Léčba TB se současným rozšířením MDR-TB a XDR-TB se v poslední době stává stále větším problémem. Problémem je hlavně vznikající rezistence, která spočívá například v modifikaci cílových míst mykobakterie, zvýšeném počtu těchto cílových míst, změněné farmakokinetice, popřípadě v biotransformaci léčiv. Pro mykobakterie je typická jejich vysoce lipofilní a strukturálně velice složitá buněčná stěna, která brání v průchodu většině antibiotik do buňky a zapříčiňuje tím také vznik rezistence. Příčiny rezistence však můžeme hledat i v lidské nedbalosti. Tou je například nevhodné dodržování léčebného režimu pacienta s TB či preskripce lékařů.^{1,2,4}

Salicylanilidové (2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidové) deriváty jsou perspektivní skupinou léčiv vyznačující se širokým spektrem biologického účinku. Jejich některé estery vykazují významnou inhibiční aktivitu vůči mykobakteriálním kmenům včetně MDR-TB a XDR-TB, viz. publikace Vinšová a spol. dostupné ve Web of Science (WOS). Zároveň nevykazují zkříženou rezistenci se současně užívanými antituberkulotickými léčivy. Esterifikace je pro účinek salicylanilidových derivátů důležitá, neboť zlepšuje jejich farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. Esterifikované salicylanilidy figurují jako proléčiva.

2 Teoretická část

2.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je infekční bakteriální onemocnění vyvolané komplexem *Mycobacterium tuberculosis*. Tuto bakterii objevil jako první 24. března 1882 Robert Koch, za což si i následně v roce 1905 vysloužil Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.¹

Mycobacterium tuberculosis je aerobní, acidorezistentní bakterie s velice pomalým buněčným dělením. Buněčná stěna je složená převážně z lipidů. Strukturálně je tato buněčná stěna velice složitá, lipofilní a tudíž většina antibiotik skrz tuto stěnu neprochází.^{1,2}

Terapie TB je dlouhodobá a díky rychle vznikající rezistenci je nutná kombinace antituberkulotických léčiv, aby byla i úspěšná. Prognóza pro neléčenou TB je 5 let života. TB postihuje většinou plíce, avšak u 1/4 pacientů se může vyvinout mimoplicní forma TB. Přenáší se kapénkovým aerosolem ve vzduchu. Tuberkulózu lze rozdělit na primární a sekundární, přičemž primární TB se projevuje prakticky okamžitě po nákaze, zatímco sekundární TB je asymptomatická forma, kde se symptomatická forma projeví u jednoho z deseti onemocněných. Rizikovými faktory pro vznik aktivní formy jsou například silikóza, HIV a malnutrice.¹

Tuberkulózou je podle odhadů WHO postižena 1/3 světové populace, čímž se tato nemoc stává globálním problémem. Podle poslední zprávy z roku 2011 je za rok odhadováno 9 miliónů nových symptomatických případů a 1,4 miliónu úmrtí na TB (990 000 HIV-negativních pacientů a 430 000 HIV- pozitivních pacientů). TB je nemocí převážně chudých a rozvojových zemí, z čehož plyne fakt, že ve světě není rozmístěna rovnoměrně. Postiženými regiony jsou hlavně Afrika a Asie. V rámci světového boje proti TB byl sestaven organizací WHO plán, který by měl do roku 2015 snížit o 50% výskyt a úmrtí na tuto nemoc v porovnání s rokem 1990 a do roku 2050 eliminovat TB jako světový problém.³

2.2 Léčba tuberkulózy

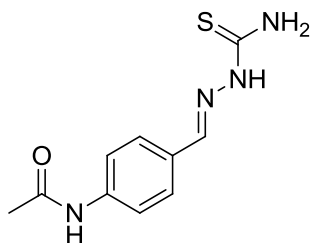
Jak již bylo výše uvedeno, TB je díky své rychle nastupující rezistenci v současné době velkým problémem, kde je prakticky nemožné u většiny antituberkulotik využít monokompozitní léčbu. Jsou využívány kombinace tří až čtyř léčiv, které mají odlišnou strukturu i mechanismus účinku. Spektrum současně užívaných léčiv proti TB je velice široké a sahá krom různorodých struktur a mechanismů účinku od léčiv syntetických či polysyntetických až po léčiva přírodního původu. Současná antituberkulotika jsou dělena podle účinnosti a závažnosti jejich nežádoucích účinků na dvě hlavní linie.^{1,2,5}

2.2.1 Vývoj

Poté co byl roku 1882 objeven a popsán Robertem Kochem původce onemocnění TB se pozornost zaměřila na vývoj nových antituberkulotik. Vývoj začal u skupiny barviv, silic, popřípadě antiseptik fenolového typu a těžkých kovů. Za potenciální léčivo byly považovány i látky izolované z chalmogrového oleje (přírodní estery cyklopent-2-enylalkanových kyselin), které se však jako antituberkulotika díky své neúčinnosti vůči TB kmenům neuplatnily, ale našly uplatnění počátkem 20. století jako antileprotika. Potenciál léčby TB byl spatřen i ve zvápenatění tuberkulózních ložisek, kdy se k této myšlence začaly syntetizovat adekvátní sloučeniny s vápníkem, celé se to ovšem ukázalo jako mylné a vývoj antituberkulotik se vydal jiným směrem. Jistým milníkem ve vývoji se stal rok 1906, kdy Albert Calmette a Camille Guérin přišli s vakcínou BCG (bacil Calmettův-Guérinův), vakcína byla poprvé použita na lidech rokem 1921 ve Francii. Vakcína však bohužel neposkytuje naprostou ochranu vůči TB.^{1,2}

Krokem vývoje vpřed byla 40. léta dvacátého století, kdy našly uplatnění sulfony, látky ze skupiny sulfonamidů. V léčbě TB byl z této skupiny používán především dapson (4,4'-diaminodifenylsulfon), nyní užívaný pouze jako antileprotikum. Dapson působí podobně jako sulfonamidy bakteriostatickým efektem a v jeho spektru účinku můžeme nalézt *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania spp.*, *Babesia spp.* či houbu *Pneumocytis carinii*.²

Vývoj pokračoval dál a v roce 1946 byly Domagkem zavedeny do léčby TB thiosemikarbazony, dodnes se pro svou cenu využívá v nejhudších částech světa jejich zástupce thioacetazon (I).²



I

V roce 1952 se začal poprvé používat jako antituberkulotikum isoniazid (hydrazid kyseliny isonikotinové), jako antituberkulotikum se užívá dodnes a je řazen mezi látky první linie v léčbě TB.^{2,5}

V další fázi vývoje antituberkulotik byla pozornost zaměřena na metabolismus mykobakterií. Příkladem tohoto výzkumu je kyselina salicylová, u níž se zjistilo, že ovlivňuje příjem kyslíku. Do praxe byl v roce 1946 zaveden její derivát kyselina *p*-aminosalicylová. V současné době již ztratila své uplatnění v léčbě TB. Výsledkem studia metabolismu však byla i léčiva užívaná dodnes. Jsou to pyrazinamid zavedený v roce 1952 a ethambutol zavedený v roce 1961, obě tyto látky jsou součástí první linie antituberkulotik.^{2,5}

Z léčiv druhé linie přichází na scénu koncem osmdesátých let fluorované chinolony, jmenovitě ciprofloxacin, který nachází své uplatnění v léčbě TB dodnes. Dalšími léčivy druhé linie, které přicházejí na scénu jsou aminoglykosidová antibiotika v podobě streptomycinu (1944) a méně užívaného kanamycinu a amikacinu. V této škále registrovaných antituberkulotik druhé linie můžeme nalézt i cykloserin či polypeptidové antibiotikum kapreomycin. Z makrolidových antibiotik nachází uplatnění klarithromycin. Jiným a velmi důležitým příkladem antituberkulotik jsou i ansamycinová antibiotika jako rifampicin (1965) a jeho derivát rifabutin.^{2,5}

V současné době došlo bohužel k rozšíření multilékově rezistentní tuberkulózy (multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB), která je rezistentní vůči dvěma současně

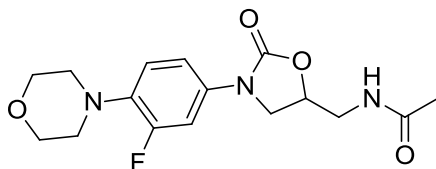
nejúčinnějším antituberkulotikům, isoniazidu a rifampicinu. Od roku 2006 byl navíc zaveden pojem extenzivně rezistentní tuberkulóza (extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB), což v praxi znamená rezistenci ještě ke všem fluorochinolonům a nejméně jednomu z injekčních antituberkulotických léčiv druhé linie. XDR-TB se díky své rezistentní povaze stává obrovským problémem, kdy ji zatím nejsme schopni adekvátně léčit a pacienti na ni bohužel většinou umírají. Dalším problémem jsou latentní kmeny mykobakterií, především těch zmutovaných, které se stávají hrozbou při snížené imunitě jedince.⁴

Jak je ze zde výše psaného patrné, rezistence je v léčbě TB ohromným problémem, tomuto faktu odpovídá i výzkum a vývoj nových léčiv zaměřených proti TB. Současný vývoj je již mnohem specifičtější a koncentruje se na konkrétní kroky v biosyntéze buněčné stěny, zmapování genomu či na určení genů mající vliv na virulenci a latenci *Mycobacterium tuberculosis*. Co se týče současných nároků na vývoj nových antituberkulotik, jsou preferovány především malé molekuly s předem definovanými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, kde je nízká minimální inhibiční koncentrace a vhodný toxikologický profil určen indexem selektivity.^{2,4} Další nároky na vývoj a léčbu MDR-TB jsou sumarizovány do tří následujících bodů:

- Důraz je kladen na zkrácení léčby z původních 6-9 měsíců na pouhé dva a méně, kde bude projeven sterilizační účinek na mykobakterie.
- Důraz na nový mechanismus účinku bez zkřížené reakce s ostatními antituberkulotiky
- Důraz na zlepšení léčiv působící proti latentním mykobakteriím.⁴

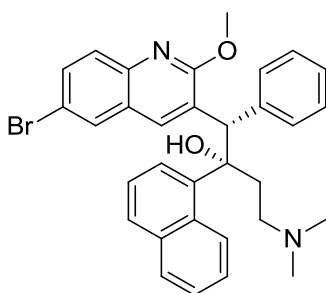
V rámci látek s velkým léčebným antituberkulotickým potenciálem nacházejících se v současné době v preklinických či klinických studiích můžeme nalézt linezolid, TMC207, PA-824, OPC-67683, SQ109, FAS20013, LL-3858 a BM212.⁴

Linezolid (II)- základní strukturou je oxazolidinon, který blokuje 30S nebo 70S chromozomální komplex, čímž brání syntéze proteinů. V dávce 600 mg jednou až dvakrát denně měl při testech příznivou antituberkulotickou aktivitu.⁴



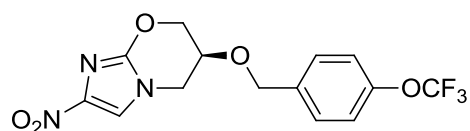
II

TMC207 (III)- strukturou diarylchinolin inhibuje mykobakteriální ATP-synthasu, která je velice specifická a odlišná od lidské, což dává tomuto léčivu velký léčebný potenciál podpořený neexistující zkříženou resistencí s antituberkulotiky první linie. Působí na latentní i aktivní formu mykobakterií, což je pro antituberkulotika atypické. Celkově je toto léčivo velkým příslibem do budoucnosti.⁴



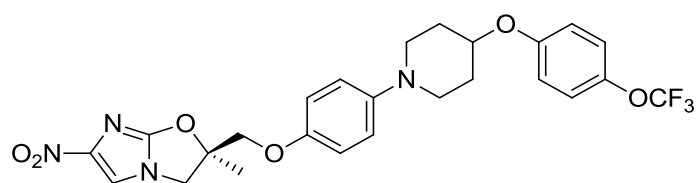
III

PA-824 (IV)- strukturou nitroimidazopyranový derivát strukturně vycházející z metronidazolu je pro léčivo, které se aktivuje *in vivo* redukcí nitroskupiny na aminoskupinu. Působí na aktivní a částečně i latentní formu TB bez zkřížené rezistence s běžně užívanými antituberkulotiky. Svým mechanismem účinku blokuje syntézu ketomykolových kyselin a proteinů. Má vysokou účinnost vůči MDR-TB a je též velkým příslibem.^{2,4}



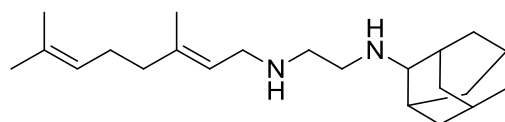
IV

OPC-67683 (V)- je proléčivo metabolizující se na nitroderivát. Blokuje syntézu methoxymykolových a ketomykolových kyselin. Svým účinkem 6-7x převyšuje účinek užívaných antituberkulotika a nemá zkříženou rezistenci s léky první linie.⁴



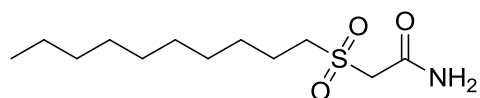
V

SQ109 (VI)- je analog ethambutolu s ethylendiaminovým farmakoforem. Jako proléčivo je aktivováno v játrech s doposud neznámým mechanismem účinku aktivní formy léčiva, ač se předpokládá ovlivňování biosyntézy buněčné stěny mechanismem jiným než má ethambutol.⁴



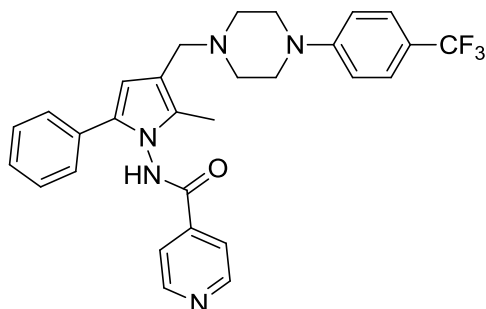
VI

FAS20013 (VII)- je sulfonylacetamidový analog β -ketoacyl synthasy. Pravděpodobně ovlivňuje metabolické dráhy mykobakterií a dále blokuje biosyntézu mykolových kyselin. Nebyla u něj nalezena rezistence a účinkuje velice efektivně, za 4 hodiny usmrtil více bakterií než isoniazid a rifampicin za 12-14 dní. Dle laboratorních testů je účinný i na latentní formu TB.⁴



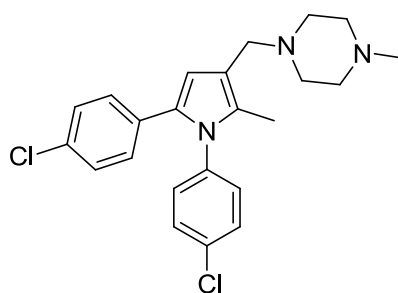
VII

LL-3858 (VIII)- je povahou rostlinný alkaloid obsahující isoniazidovou část. Má baktericidní působení s dobrou biologickou dostupností.⁴



VIII

BM212 (IX)- je pyrrolový derivát s aktivitou proti rezistentním i latentním mykobakteriím.⁴



IX

Tabulka I Vývoj nových antituberkulotik, červenec 2012, WHO³

Potenciální léčiva	Preklinický vývoj (PV)	PV- Příznivé laboratorní výsledky toxicity	Klinická fáze 1	Klinická fáze 2	Klinická fáze 3
Diarylchinoliny	CPZEN-45	BTZ-043		AZD-5847	Delamanid (OPC-67683)
DprE inhibitory	DC-159a	TBA-354		Bedaquiline (TMC-207)	Gatifloxacin
GyrB inhibitory	Q-201			Linezolid	Moxifloxacin
InhA Inhibitory	SQ-609			Nové režimy	Rifapentin
LeuRS inhibitory	SQ-641			PA-824	
MGyrX1 inhibitory				Rifapentin	
Mykobacteriální Gyrasové inhibitory				SQ-109	
Pyrazinamidová analoga				Sutezolid (PNU-100480)	
Riminofenaziny					
Ruthenium (II) komplexy					
Spectinamidy					
Translokasa-1 inhibitory					

Skupiny léčiv:

Fluorochinolony,
rifamycin,
oxazolidinon,
nitroimidazol,
diarylchinolin,
benzothiazinon

Čtyři léčiva jsou ve III. fázi a sedm jich je ve fázi II. Z III. fáze jsou testovány v 4 měsíčním kombinovaném režimu fluorochinolony (gatifloxacin nebo moxifloxacin), kdy v léčbě nahrazují isoniazid nebo ethambutol, výsledky jsou očekávány v roce 2013. Ve III. fázi se nachází i rifapentin, což je vlastně rifampicin s delším biologickým poločasem. OPC-67683, III. fáze, je testován jako léčivo pro optimalizaci terapie vůči MDR-TB.

Ze sedmi léčiv z II. fáze je TMC-207 testován jako doplněk pro základní terapii MDR-TB. Dále linezolid, který je testován v léčbě XDR-TB při denní dávce 600 mg v Korejské republice. Sutezolid, oxazolidinonový analog linezolidu; PA-824, nitroimidazopyranový

derivát; SQ-109, původně syntetizovaný jako derivát ethambutolu; rifapentin a oxazolidinonový AZD-5847.

Tyto sloučeniny jsou dále testovány v různých kombinacích a to jak s léčivy novými, tak i se současně užívanými.³

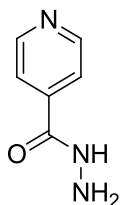
2.3 Současná léčba

2.3.1 Léčiva první linie:

- Rifampicin
- Isoniazid
- Ethambutol
- Pyrazinamid

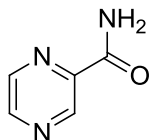
Rifampicin je ansamycinové antibiotikum používané od roku 1952. Inhibuje DNA-dependentní RNA- polymerasu. Působí dále i na další G+ bakterie a většinu G- bakterií.^{2,5}

Isoniazid (hydrazid kyseliny isonikotinové), (X)- je používán od roku 1952. Svým mechanismem účinku inhibuje biosyntézu buněčné stěny.^{2,5}



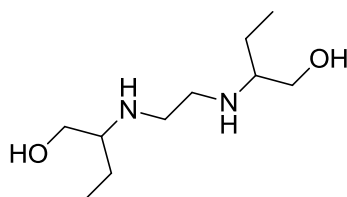
X

Pyrazinamid (pyrazin-2-karboxamid), (XI)- je používán od roku 1952, inhibuje nikotinamidasu.^{2,5}



XI

Ethambutol (XII)- je derivát ethylendiaminu, používán od roku 1961. Používá se pouze pravotočivý *S,S*-(+)- izomer, jelikož levotočivý izomer je inaktivní a ostatní jeho stereoizomery jsou toxické. Ethambutol interferuje v biosyntéze buněčné stěny.^{2,5}



XII

2.3.2 Léčiva druhé linie:

- Kapreomycin
- Cykloserin
- Streptomycin
- Klarithromycin
- Ciprofloxacin

Léčiva druhé linie přicházejí na scénu při rezistenci nebo u závažných nežádoucích účinků na první linii léčiv.

Kapreomycin je polypeptidové antibiotikum.^{2,5}

Cykloserin je antibiotikum odvozené od alaninu.^{2,5}

Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum objevené v roce 1943. Inhibuje proteosyntézu mykobakterií.^{2,5}

Klarithromycin je semisyntetické makrolidové antibiotikum, které blokuje proteosyntézu mykobakterií.^{2,5}

Ciprofloxacin je chinolonové antibiotikum. Inhibuje DNA-gyrasu a topoisomerasu IV. Je řazen do druhé generace chinolonů.^{2,5}

2.4 Salicylanilidy

2.4.1 Mechanismus antibakteriálního účinku salicylanilidů⁶

Salicylanilidy jsou v medicíně užívány již od 40. let minulého století. Před objevem schopnosti inhibovat dvoukomponentový regulační systém bakterií byl jejich hlavní účinek připisován volné hydroxylové skupině na aromatickém kruhu kyseliny. Přičemž jejich toxický vliv byl připisován vlivu na energetický metabolismus savčích a bakteriálních buněk.

Rok 1998 však přinesl nový pohled na salicylanilidy a jejich mechanismus účinku. Bylo zjištěno, že místem jejich účinku je fosfolipidová dvojvrstva biomembrány, kam salicylanilidy proniknou a následně mohou fosfolipidové molekuly i vytěšňovat. Tímto způsobem dochází k narušení pH gradientu a celkové integrity membrány buněk, což má za následek narušení transportních, dýchacích a celkově energetických procesů uvnitř buňky. Toto už byl jen krůček od navržení jejich mechanismu v podobě inhibice dvoukomponentových regulačních systémů bakterií, nebo-li TCS. Tyto systémy jsou přítomny ve všech bakteriích, kde řídí transkripci několika genů. Ve své podstatě mají vliv na udržování homeostázy, vnitřní a vnější reakce na prostředí, energetický metabolismus a v neposlední řadě i na rezistenci vůči antibiotikům. TCS je složen z histidin proteinkinasy (HPK), která rozpoznává a přenáší signál a z DNA-vazebného proteinu (RR) fungujícího jako regulátor odpovědi. Jednoduše lze říci, že se jedná o systém integrálních membránových proteinů, které umožňují rozpoznání a přenos signálu z vnější strany buňky na stranu vnitřní. Aktivace či potlačení genu pro řízení tohoto děje se děje pomocí fosforylace z adenosintrifosfátu, kdy se fosfátová skupina naváže na regulátor odpovědi v podobě specifického zbytku aspartamové kyseliny a to díky vysoce energetickému fosfohistidinovému meziproductu kinasy. TCS jsou často propojeny v komplex regulačních sítí fosforyláz, které umožňují vyšší kontrolu a usnadnění přenosu signálu.

Pět výhod cílené léčby proti TCS:

- Přítomnost TCS v bakteriích
- Mnoho bakterií obsahují více druhů TCS a každý kontroluje jinou funkci
- HPK a RR mají nejvyšší stupeň homologie okolo aktivního místa
- Systém TCS nebyl doposud nalezen u žádného obratlovce ani bezobratlovce
- Při rentgenových krystalografických testech struktury bylo zjištěno několik RR pro HPK

Zajímavě se jeví fakt, že například niklosamid brání internalizaci antraxových toxinů do buňky a zároveň ji ochraňuje před antraxovým toxinem či fúzí proteinů s *Pseumónádovým* exotoxinem a difterickým toxinem. Niklosamid pravděpodobně interferuje s toxiny a brání jejich internalizaci do buňky, čímž poskytuje kompletní ochranu už v mikromolárních koncentracích. Mechanismus účinku je inhibice oxidativní fosforylace a tím ovlivnění tvorby ATP. V současnosti se niklosamid používá jako anticestodikum.^{6,7,8}

Salicylanilidy přerušují oxidativní fosforylaci a fosforylaci v mitochondriích či chloroplastech. Podstata je v proton-translokačním systému, kdy je bráněno propustnosti normálně propustným protonům přes membránu a tím zabráněno funkci ATP-synthasy. Protony jsou přenášeny přes membránu a měněny mezi vnitřním a vnějším prostředím formou slabě kyselých disociovatelných sloučenin protonových a deprotonových forem (kyvadlová reakce). Tvorba stabilní hydrofobní koplánární aniontové formy s delokalizovaným záporným nábojem je základem pro proton-hybnou sílu. To umožňuje molekule proniknout do buňky jak v iontovém tak i neutrálním stavu.

Tato rozpojovací vlastnost byla demonstrována na 25 substituovaných salicylanilidech, kdy byla vyjádřena jako minimální koncentrace plně uvolňující stav mitochondriální respirace (znamená jako zvýšené vychytávání kyslíku bez ADP), téměř všechny sloučeniny stimulovaly stav dýchání více než 5x. Nejefektivněji se v tomto jevil 3-*terc*-butyl-5-chlor-*N*-(2-chlor-4-nitrofenyl)-2-hydroxybenzamid s hodnotou 31.6 nM, nejslabší byl s hodnotou 45.7 μM 2-hydroxy-*N*-(2-nitrofenyl)benzamid. Hydrofobní vlastnosti a elektron-akceptorové vlastnosti substituentů jsou nezbytné pro rozpojovací (uncoupling) aktivitu. Například zavedením

hydrofobního substituentu v podobě chloru na oba kruhy, popřípadě jeden a silnou elektron-akceptorovou skupinu na salicylový kruh má příznivý efekt na rozpojovací činnost.

2.4.2 Toxicita a nežádoucí účinky⁶

Testy provedené na kostní dřeni myší *in vivo* prokázaly záměny sesterských chromatid a chromozomové aberace. Například niklosamid byl toxický v dávkách 25 mg/kg *i.v.* a 125 mg/kg *p.o.* Přičemž je buď biotransformován v játrech, nebo nejprve hydrolyzován v gastrointestinálním traktu na 5-chlorsalicylovou kyselinu a 2-chlor-4-nitroanilin. Důsledkem tohoto jsou klastrogenní a mutagenní účinky. Přítomnost halogenů a nitroskupiny je zase spojována s genotoxicitou.

Salicylanilidy nanesené v 2% masti neměly na kůži nežádoucí vliv, opak však nastal při podání do kůže, kdy se projevila fototoxicita. Tato skutečnost byla popsána zejména u sloučenin obsahující halogeny. Existují dvě hypotézy vysvětlující tuto fototoxicitu. První z nich praví, že salicylanilidový fotosenzitér je zároveň fotohapténem, který se kovalentně váže na proteinový nosič při ozáření UV. Druhá hypotéza praví, že salicylanilidový fotosenzitér je již fotohapténem, který je plně konvertován na fotohaptén až při UV ozáření.

2.4.3 Salicylanilidové estery a jejich antimikrobiální aktivita

Hydrofobnost je jedním ze základních faktorů ovlivňující biologickou účinnost salicylanilidů, zatímco přítomnost volné fenolické hydroxy skupiny je nutná pro jejich aktivitu. Tyto obecné vlastnosti jsou důvodem jejich iritačních a rozpojovacích schopností. Přeměna na estery se provádí za účelem zlepšení fyzikálně-chemických vlastností, lipofility, biodostupnosti a též snížení toxicity. Proléčiva jsou farmakoterapeuticky často užívanými sloučeninami, kdy se strukturní obměnou stává z biologicky neaktivní látky látka aktivní, přičemž *in vitro* je neaktivní či jen sporadicky. Obměna je nejčastěji formou transformace. Proléčiva jsou často připravována i za účelem zlepšení orální dostupnosti či absorpce z trávicího traktu, což je častý limitující faktor při léčbě.^{6,9}

Základním strukturálním požadavkem pro optimální aktivitu se zdá být přítomnost elektron-akceptorové skupiny na salicylovém kruhu a přítomnost hydrofobní skupiny na kruhu anilidovém. Přítomnost hydroxy skupiny na salicylovém kruhu je samozřejmostí.⁶

Při studii *O*-acetylovaných halogenovaných salicylanilidů, kdy byla testována antimykobakteriální aktivita se ukázalo, že mnoho z nich vykazuje *in vitro* srovnatelnou aktivitu s isoniazidem proti *Mycobacterium kansasii* a též i proti *M. avium* mají dobrou aktivitu. *N*-Acetylací amidického dusíku nedocházelo ke snížení aktivity jako u antifungálních testů. Substitucí chloru v poloze *meta* na acetylsalicylovém kruhu byl též dosažen vyšší antimykobakteriální účinek a naopak nižší antifungální. Na anilinové části se pro lepší mykobakteriální aktivitu uplatňují polohy 3 a 4. Nejlepší výsledky proti *M. tuberculosis* měl vysoce hydrofóbní 4-chlor-2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)fenyl acetát. Sloučeniny vykazovaly nejvyšší aktivitu v koncentraci 2–4 $\mu\text{mol/L}$. Bohužel cytotoxicita testovaných látek ukazovala vysoce nepříznivé hodnoty na střevní buňky HTC-8 ($\text{IC}_{50} = 0,27\text{--}60,60 \mu\text{g/ml}$ v porovnání s isoniazidem ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$)).⁶

Při výzkumu antimykobakteriální aktivity byly podrobeny testům i estery salicylanilidů a aminokyselin. Nejlepších výsledků proti *M. tuberculosis* H37Rv bylo dosaženo u (*S*)-4-chlor-2-(4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl)fenyl 2-(benzyloxykarbonylamino)propanoátu (99% inhibice při MIC 3,13 $\mu\text{g/ml}$) a (*S*)-4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenyl 2-(benzyloxykarbonylamino)propanoátu (97% inhibice při MIC 3,13 $\mu\text{g/ml}$). Tyto výsledky naznačují, že podobně jako u antifungální aktivity není jasný vztah mezi MIC a lipofilitou. Typ a pozice substituentů jsou však pro antimykobakteriální aktivitu důležité. Nejvhodnější je C4' substituce CF_3 na anilinovém kruhu. Tedy mezi elektron-akceptorovými skupinami jako CF_3 a/nebo Cl a vysokou antituberkulózní aktivitou se zdá být jasný vztah. Dále platí, že málo objemný substituent jako methyl a absence alkylu na α -uhlíku aminokyseliny jsou dalšími parametry vhodnými pro vysokou antituberkulózní aktivitu. Velice důležitá je i stereoizomerie. Některé (*S*)-enantiomery vykazovaly mnohem nižší aktivitu než (*R*)-enantiomery, ale bohužel se objevily i opačné případy. Obecně též platí, že nejvyšší vliv na aktivitu má ze všech částí esterovaného salicylanilidu právě substituovaný kruh anilinu.⁶

Z výzkumu di- nebo trihalogenovaných salicylanilidových esterů s *N*-acetyl-L-fenylalaninem vyplynulo, že (*S*)-4-chlor/ 4-brom-2-(4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl)fenyl 2-acetamido-3-fenylpropanoát vykazoval výbornou aktivitu proti *M. tuberculosis* (0,25/0,5

μmol/L po 14/21 dní inkubace) a také proti atypickým kmenům (*M. avium* a dva kmeny *M. kansasii*) při 0,5–2 μmol/L. Tato látka dokonce inhibovala růst pěti multirezistentních kmenů tuberkulózy a jednoho extrémně rezistentního kmene při koncentraci 1 nebo 2 μmol/L, bez zkřížené rezistence s běžně užívanými antituberkulotiky. Obecně tyto estery vykazují i dobrou antifungální aktivitu, která je výraznější u vláknitých hub (*A. corymbifera* a *T. mentagrophytes*) než u *Candida sp.*⁶

Při testech 18 salicylanilidových benzoátů proti *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* a dvěma kmenům *Mycobacterium kansasii* se minimální inhibiční koncentrace pohybovaly v rozmezí 0,25–16 μmol/L. Nelepším se ukázal 4-chlor-2-[4-(trifluoromethyl)-fenylkarbamoyl]fenyl benzoát (0,25–1 μmol/L).¹⁰

Čtyři nejaktivnější z těchto esterů vykazovaly MIC 0,25–2 μmol/L proti pěti kmenům MDR-TB a jednomu kmenu XDR-TB. Zajímavé v tomto testování bylo, že vykazovaly ve většině případů vyšší účinnost proti MDR kmenům, než proti lékově sensitivním kmenům. Tyto čtyři estery zároveň vykazovaly i vyšší aktivitu (MIC) proti rezistentním kmenům než salicylanilidové estery s *N*-acetyl-L-fenylalaninem a zároveň i o něco lepší aktivitu než salicylanilidové karbamáty. Toto vše je však vykoupeno jejich toxicitou, která je sice nižší než u jejich mateřských salicylanilidů, ale i tak je stále vysoká.¹⁰

Testováním *in vitro* 18 esterů salicylanilidových benzensulfonátů proti *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* a dvěma kmenům *Mycobacterium kansasii* bylo dosaženo minimální inhibiční koncentrace v rozmezí od 1 do 500 μmol/L (u *M. tuberculosis* byla MIC v rozmezí 1–16 μmol/L). Nejúčinnější sloučeniny proti *M. tuberculosis* byly 4-chlor-2-(4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl)fenyl benzenesulfonát s MIC 1 μmol/L a 4-chlor-2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)fenyl benzenesulfonát s MIC 0,5 μmol/L, jejichž MIC je srovnatelná s léčivou první linie isoniazidu a ethambutolu. Vůči *M. kansasii* byl nejaktivnějším 5-chlor-2-(4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl)fenyl benzenesulfonát s MIC 2–4 μmol/L. *M. avium* byl kmenem nejméně citlivým. Obecně však salicylanilidy benzenesulfonátů nepřekonalu aktivitu salicylanilidových esterů karboxylových kyselin. Co se týče substitucí na anilinový kruh, tak se nejvíce osvědčila substituce trifluormethylem a 3,4-dichlorem, přičemž substituce fluorem se ukázala jako nejhorší. Salicylanilidové benzensulfonáty naplnily antimykobakteriální očekávání, ač s vyššími koncentracemi než tomu je u salicylanilidových esterů karboxylových kyselin.¹¹

Sledováním aktivity salicylanilidových benzoátů a pyrazin-2-karboxylátů proti *Mycobacterium tuberculosis* přineslo následující výsledky. Devatenáct z těchto sloučenin bylo zkoušeno jako inhibitory vůči esenciálním mykobakteriálním enzymům, methionin aminopeptidase a isocitrát lyase, které jsou nezbytné pro bakterie v latentní fázi tuberkulózy. Salicylanilidy jsou mírnými inhibitory obou mykobakteriálních a bohužel i lidské methionin aminopeptidasy, přičemž mají vliv i na funkci mykobakteriální isocitrát lyasy. 4-Brom-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenyl pyrazin-2-karboxylát byl s nejvyšší selektivitou i nejúčinnější inhibitor mykobakteriální methionin aminopeptidasy (41% při 10 $\mu\text{mol/L}$). 5-Chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid a 4-chlor-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenyl pyrazin-2-karboxylát vykazoval 59% inhibici isocitrát lyasy při 100 $\mu\text{mol/L}$ a (*S*)-4-brom-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenyl 2-acetamid-3-fenylpropanoát inhiboval z 22% při MIC 10 $\mu\text{mol/L}$. Ze studie se zdá, že méně lipofilní estery salicylanilidů jako jsou pyrazin-2-karboxylová kyselina a *N*-acetyl-*L*-fenylalanin vykazují lepší inhibici.¹²

Zahájení syntézy proteinů je u mykobakterií vždy spojeno s *N*-formylmethioninem. Odštěpování *N*-terminálního methioninu je teoretickým cílem nových antituberkulotik. Odštěpení *N*-terminálního proteinu je univerzální a zároveň nezbytný krok spojený s posttranslačními úpravami potřebnými pro činnost bakterie, myšleno tím stabilita, buněčné umístění či cílené odbourávání mnohých proteinů. Peptidodeformylasa katalyzuje odštěpení *N*-formylové skupiny z *N*-formylmethioninu před nástupem methionin aminopeptidasy. Methionin aminopeptidasa je klíčovým enzymem katalyzující posttranslační modifikace nově vznikajících proteinů tím, že odstraní *N*-terminální methionin, přičemž u mykobakterií jsou známy dvě izoformy tohoto enzymu- MtMetAP1a a MtMetAP1c. Methionin aminopeptidasa je pro životaschopnost buněk nezbytná.¹²

Stabilita *M. tuberculosis* v organismu je podmíněna isocitrátovou lyasou, enzymem nezbytným pro metabolismus mastných kyselin. Narušením tohoto enzymu má za následek oslabení stálosti a virulence bakterie, ovšem bez ovlivnění růstu v aktivní fázi. Při chronické fázi nemoci v plicní formě se předpokládá, že mastné kyseliny jsou hlavním zdrojem uhlíku a energie pro mykobakterie.¹²

Velký potenciál přináší i kombinace salicylanilidů s oxazolidiny, zde v podobě linezolidu. Tato syntetická sloučenina přináší široké spektrum antibakteriálního účinku v podobě multirezistentních Gram-pozitivních bakterií, včetně methicillin-rezistentních

(*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), penicillin-rezistentních (*Streptococcus pneumoniae*) a vankomycin-rezistentních (*enterococci*). Též i jejich antimykobakteriální aktivita se jeví příznivě a to jak proti nerezistentním, tak i rezistentním kmenům. Pozitivum je i v novém mechanismu účinku, kdy dochází k selektivní a unikátní inhibici 50S podjednotky.⁶

3 Cíl práce

3.1 Cíl práce

Tuberkulóza a zvláště její formy v podobě latentní TB, MDR-TB a XDR-TB jsou v současné době ohromným problémem. Dle zprávy WHO je TB postižena až 1/3 světové populace, což jí bezesporu dává globální charakter. Tato alarmující fakta mají odezvu i ve vývoji a výzkumu nových antituberkulotik. Současný vývoj se již mnohem více specifikuje na konkrétní kroky v biosyntéze buněčné stěny, zmapování genomu, popřípadě na určení genů mající vliv na virulenci a latenci *Mycobacterium tuberculosis*. Jednou z těchto potenciálních skupin léčiv budoucnosti je i skupina salicylanilidových derivátů, kterou se mimo jiné zabývá i tým složený okolo prof. RNDr. Jarmily Vinšové, CSc.

Esterifikací salicylanilidů vznikají sloučeniny, které v organismu fungují jako proléčiva. Proléčiva jsou často připravována za účelem zlepšení orální dostupnosti, či absorpce z trávicího traktu, což je častý limitující faktor při léčbě. Proléčiva dále zlepšují fyzikálně chemické vlastnosti, lipofilitu, biodostupnost a snižují toxicitu. Jedním z takovýchto proléčiv jsou i různě substituované (na anilidové části) estery 4-bromsalicylanilidů, konkrétně isonikotinátů, pyrazinkarboxylátů a 1-*H*-imidazol-4-karboxylátů, kterými jsem se zabýval v rámci této diplomové práce já.

Některé estery, dříve na katedře připravené, vykazaly vysoké aktivity vůči multilékově rezistentním kmenům tuberkulózy při minimální inhibiční koncentraci (MIC) $\geq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$, viz. publikace Vinšová a spol. dostupné ve Web of Science (WOS). Proto byla zaměřena pozornost na sloučeniny, u nichž byl zaveden elektronakceptorní substituent, především CF_3 skupina v anilidové části, která přispívá k vyšší účinnosti nejenom na *Mycobacterium tuberculosis*, ale i dalším kmenům *M. avium*, *M. kansasii*, a esterifikace byla provedena některými kyselinami, které vznikají při metabolické přeměně pyrazinamidu a isoniazidu.

Cílem této práce byla příprava a změření antimykobakteriální aktivity 4-bromsalicylových esterů fungujících v organismu jako proléčiva. Výchozí strukturou pro přípravu těchto esterů byly antimykobakteriálně účinné 5-brom-*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid a *N*-[3,5-*bis*(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamid, které byly dále převáděny na příslušné estery.

4 Experimentální část

4.1 Obecná charakteristika práce

Při syntézách se vycházelo z chemikálií od firem Sigma-Aldrich a Penta Chemicals. Přičemž chemikálie v podobě reaktantů pro syntézy byly zakoupeny od Sigma-Aldrich a rozpouštědla od Penta Chemicals.

Průběh všech syntéz byl pravidelně monitorován tenkovrstvou chromatografií, TLC destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck. Jako mobilní fáze byla používána soustava toluen-ethylacetát 4:1 a jako detekční zařízení sloužila UV lampa při vlnových délkách 254 a 366 nm.

Teplota tání se stanovovala pomocí kapilární metody v přístroji Melting Point machine B-540 od Büchi.

Infračervená spektra byla měřena pomocí techniky ATR (attenuated total reflectance) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 400-4000 cm^{-1} . Měření probíhala na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK paní Vencovskou.

NMR spektra byla též měřena na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian Mercury – Vxbb 300 (300 MHz pro ^1H a 75.5 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp. Palo Alto, USA) a Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp. Palo Alto, USA). Jako rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid. Chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm za použití tetramethylsilanu jako vnitřního standartu. Couplingová konstanta (J) je uvedena v Hz.

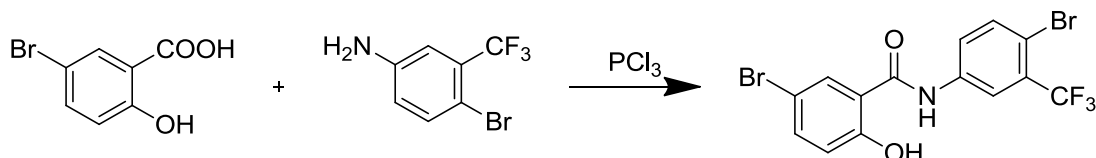
Příprava počátečních salicylanilidů byla prováděna pomocí mikrovlnného reaktoru (530 W, 600 rpm, MicroSYNTH Milestone) na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK.

Názvosloví sloučenin bylo vytvářeno dle IUPAC za pomoci ChemBioOffice 2010, verze 12,0.

4.2 Jednotlivé syntézy

4.2.1 5-Brom-N-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid

(RV1)



Sumární vzorec: $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{Br}_2\text{F}_3\text{NO}_2$

Molární hmotnost: 439,02

2,17 g (0,01 mol) 5-Bromsalicylové kyseliny bylo rozpuštěno v 50 ml chlorbenzenu, bylo přidáno 2,4 g (0,01 mol) 4-brom-3-(trifluormethyl)anilinu a 0,44 ml (0,005 mol) chloridu fosforitého. Baňka byla umístěna do mikrovlnného reaktoru (nastavení: čas= 22 minut; TEMP1= 80 °C; TEMP2= 118 °C; výkon= 450 W). Po ukončení reakce byla směs přefiltrována a filtrát vakuově oddestilován do sucha a překrystalován ze směsi ethanol/ voda (2:1). Čistota produktu byla monitorována tenkovrstvou chromatografií (toluen/ ethyl-acetát 4:1). Prvotně bylo získáno 3,84 g tj. 87,5 % o teplotě tání 225-226 °C. Reakce byla 5x opakována z důvodu potřeby tohoto produktu pro následující přípravu esterů. Následující výtěžky: 3,52 g (80,2 %); 3,60 g (82,0 %), 3,46 g (78,8 %); 3,90 g (88,8 %); 3,78 g (86,1 %).

IC $\nu(\text{CONH-}) = 1629 \text{ cm}^{-1}$; látka potvrzena $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$

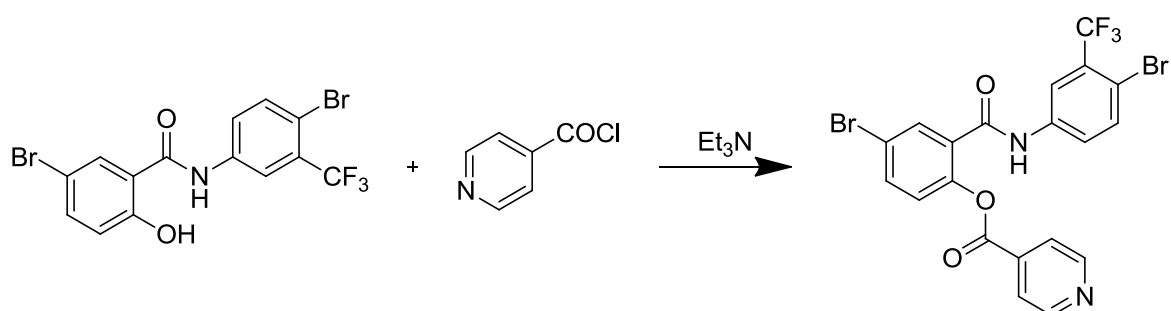
Teoretický výtěžek: 4,39 g

TLC: toluen/ ethyl-acetát 4:1

Rf= 0,64

4.2.2 4-Brom-2--[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl isonikotinát

(RV2)



Sumární vzorec: C₂₀H₁₁Br₂F₃N₂O₃

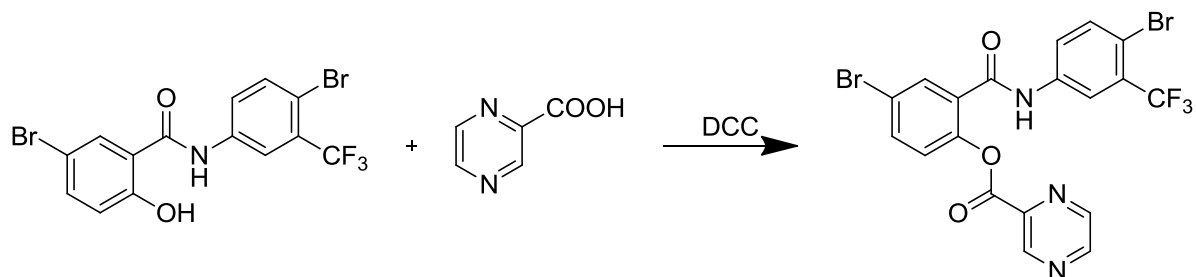
Molární hmotnost: 544,12

0,66 g (0,0015 mol) 5-Brom-*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid bylo spolu s 0,42 ml (0,003 mol) triethylaminu za stálého míchání rozpuštěno v 10 ml dichlormethanu, kdy bylo do směsi následně pomalu přidáváno 0,231 g (0,0013 mol) hydrochloridu chloridu kyseliny isonikotinové. Reakce byla poté za stálého míchání po dobu 24 hodin monitorována tenkovrstvou chromatografií (5, 15 minut, 1, 2 a 24 hodin). Po uplynutí této doby následovalo nejprve protřepání 15 ml vodného roztoku 5% NaHCO₃ a poté 15 ml destilované H₂O. Dichlormethanová vrstva byla následně na 30 minut odlita do baňky s Na₂SO₄, která se pak uzavřela. Po 30 minutách byla směs přefiltrována přes vat a filtrát vakuově oddestilován do sucha. Krystalizací se nepodařilo látku zcela vyčistit, proto nelze uvést teplotu tání, chromatografie na sloupci vedla k rozložení produktu.

Teoretický výtěžek: 0,82 g

4.2.3 4-Brom-2--[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl pyrazin-2-karboxylát

(RV3)



Sumární vzorec: $C_{19}H_{10}Br_2F_3N_3O_3$

Molární hmotnost: 545,10

0,66 g (0,0015 mol) 5-Brom-*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid bylo rozpuštěno v 15 ml *N,N'*-dimethylformamidu a smícháno s pyrazin-2-karboxylovou kyselinou 0,19 g (0,0015 molu). Směs byla ochlazena na $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a během 1 hodiny za stálého míchání do ní byl po třech stejných dílech přidáván *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC), poté byla při této teplotě ještě 1,5 hodiny míchána. Následně byla směs míchána dalších 48 hodin při laboratorní teplotě a poté vložena do lednice na 48 hodin. Vzniklá sraženina *N,N'*-dicyklohexylmočoviny byla vakuově odfiltrována a rozpouštědlo oddestilováno za sníženého tlaku. Zbytek byl rozpuštěn v minimálním množství ethyl-acetátu a nerozpustná část *N,N'*-dicyklohexylmočovina byla opět odfiltrována pomocí vakuové filtrace. Následovala destilace za sníženého tlaku a krystalizace pomocí ethyl-acetát/ hexan. K získání čistého produktu bylo zapotřebí rekrystalizaci několikrát zopakovat. Bylo získáno 0,25 g, tj. 30,5 % o teplotě tání $182\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ÍČ $\nu(\text{CONH-}) = 1629\text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{COO-}) = 1727\text{ cm}^{-1}$; látka potvrzena $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$

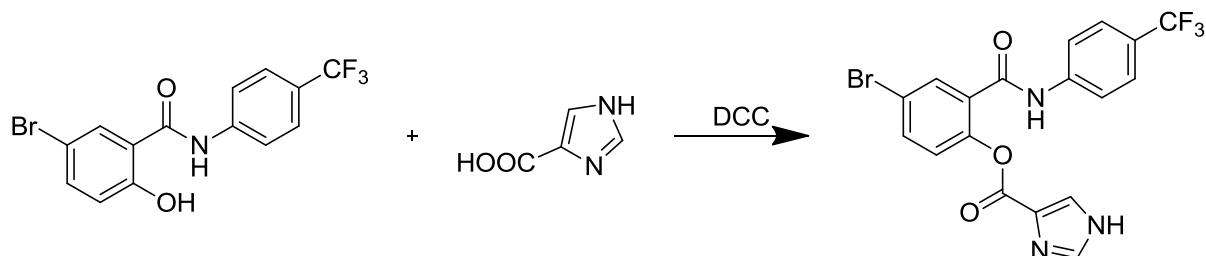
Teoretický výtěžek: 0,82 g

TLC: toluen/ ethyl-acetát 4:1

R_f = 0,54

4.2.4 4-Brom-2--[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl 1H-imidazol-4- karboxylát

(RVX)



Sumární vzorec: C₁₈H₁₁BrF₃N₃O₃

Molární hmotnost: 454,20

0,54 g (0,0015 mol) 5-Brom-2-hydroxy-*N*-(4-(trifluormethyl)fenyl)benzamidu bylo rozpuštěno ve směsi 10 ml *N,N'*-dimethylformamidu, 10 ml dichlormethanu a mícháno s 1*H*-imidazol-4-karboxylovou kyselinou 0,17 g (0,0015 mol). Směs byla ochlazena na -15 °C a během 1 hodiny za stálého míchání do ní byl po třech stejných dílech přidáván *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC), poté byla při této teplotě ještě 1,5 hodiny míchána. Následně byla směs míchána dalších 48 hodin při laboratorní teplotě a poté vložena do lednice na 48 hodin. Vzniklá sraženina *N,N'*-dicyklohexylmočoviny byla vakuově odfiltrována a rozpouštědlo oddestilováno za sníženého tlaku. Zbytek byl rozpuštěn v minimálním množství ethyl-acetátu a nerozpustná část *N,N'*-dicyklohexylmočovina byla opět odfiltrována pomocí vakuové filtrace. Následovala destilace za sníženého tlaku a krystalizace pomocí ethyl-acetát/ hexan. K získání čistého produktu bylo zapotřebí rekrystalizaci několikrát zopakovat. Bylo získáno 0,14 g, tj. 20,59 % o teplotě tání 205 °C.

ÍČ $\nu(\text{CONH-}) = 1630 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{COO-}) = 1788 \text{ cm}^{-1}$; látka potvrzena $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$

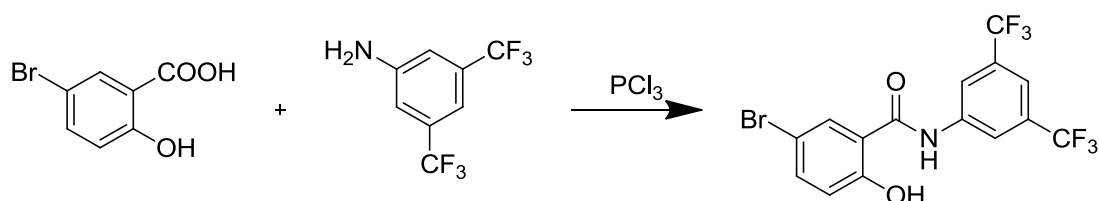
Teoretický výtěžek: 0,68 g

TLC: toluen/ ethyl-acetát 4:1

R_f= 0,58

4.2.5 N-[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamid

(RV4)



Sumární vzorec: C₁₅H₈BrF₆NO₂

Molární hmotnost: 428,12

2,17 g (0,01 mol) 5-Bromsalicylové kyseliny bylo rozpuštěno v 50 ml chlorbenzenu, bylo přidáno 1,56 ml (0,01 mol) 3,5-bis(trifluormethyl)anilinu a 0,44 ml (0,005 mol) chloridu fosforitého. Baňka byla umístěna do mikrovlnného reaktoru (nastavení: čas= 22 minut; TEMP1= 80 °C; TEMP2= 118 °C; výkon= 450 W). Po ukončení reakce byla směs přefiltrována a filtrát vakuově oddestilován do sucha a překrystalován ze směsi ethanol/ voda (2:1). Čistota produktu byla monitorována tenkovrstvou chromatografií (toluen/ ethyl-acetát 4:1). Bylo získáno 3,80 g, tj. 88,78 % o teplotě tání 201-202 °C. Reakce byla 7x opakována z důvodu potřeby tohoto produktu pro následující přípravu esterů. Následující výtěžky: 3,65 g (85,3 %); 3,88 g (90,7 %), 3,55 g (82,9 %); 3,86 g (90,2 %); 3,66 g (85,5 %); 3,89 (90,9 %); 3,90 g (91,1 %).

ÍČ $\nu(\text{CONH-}) = 1642 \text{ cm}^{-1}$; látka potvrzena ¹H-NMR a ¹³C-NMR

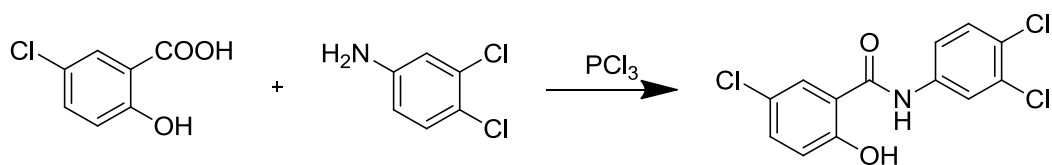
Teoretický výtěžek: 4,28 g

TLC: toluen/ ethyl-acetát 4:1

R_f= 0,69

4.2.6 5-Chlor-N-(3,4-dichlorfenyl)-2-hydroxybenzamid

(RV6)



Sumární vzorec: $C_{13}H_8Cl_3NO_2$

Molární hmotnost: 316,57

1,73 g (0,01 mol) 5-Chlorsalicylové kyseliny bylo rozpuštěno v 50 ml chlorbenzenu, bylo přidáno 1,62 g (0,01 mol) 3,4-dichloranilinu a 0,44 ml (0,005 molu) chloridu fosforitého. Baňka byla umístěna do mikrovlnného reaktoru (nastavení: čas= 22 minut; TEMP1= 80 °C; TEMP2= 118 °C; výkon= 450 W). Po ukončení reakce byla směs přefiltrována a filtrát vakuově oddestilován do sucha a překrystalován ze směsi ethanol/ voda (2:1). Čistota produktu byla monitorována tenkovrstvou chromatografií (toluen/ ethyl-acetát 4:1). Bylo získáno 2,86 g, tj. 90,50 % o teplotě tání 245-246 °C.

IČ $\nu(\text{CONH-}) = 1626 \text{ cm}^{-1}$; látka potvrzena $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$

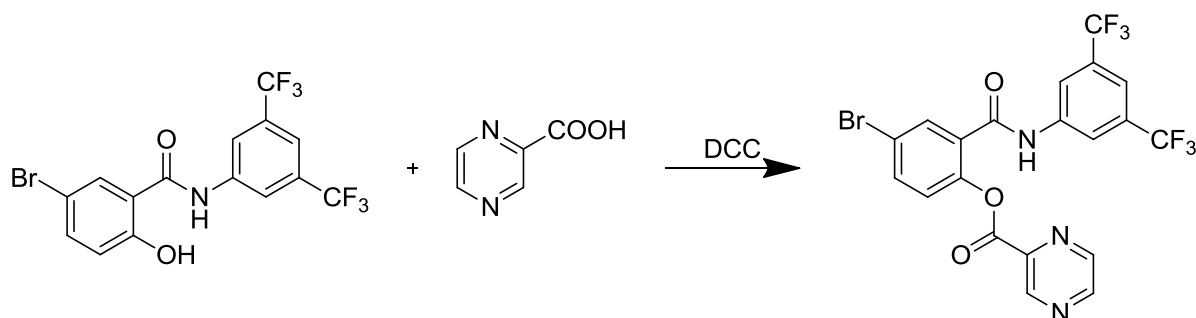
Teoretický výtěžek: 3,17 g

TLC: toluen/ ethyl-acetát 4:1

R_f= 0,68

4.2.7 2-{{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-bromfenyl pyrazin-2- karboxylát

(RV5)



Sumární vzorec: $C_{20}H_{10}BrF_6N_3O_3$

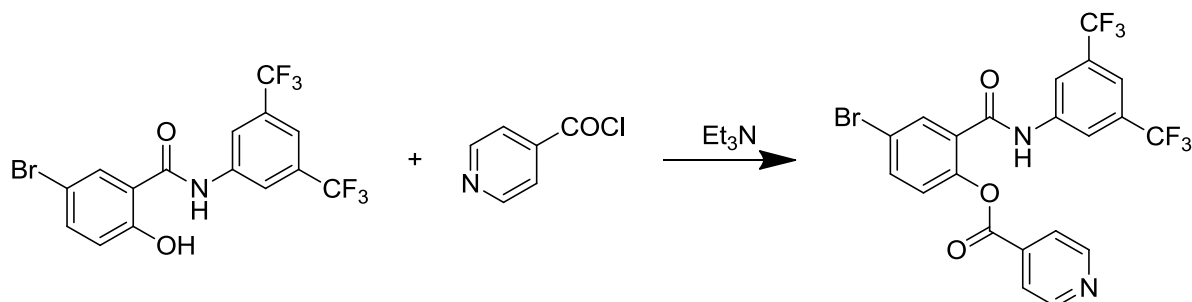
Molární hmotnost: 534,21

0,64 g (0,0015 mol) *N*-[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamidu bylo rozpuštěno v 15 ml *N,N'*-dimethylformamidu a smícháno s pyrazin-2-karboxylovou kyselinou 0,19 g (0,0015 molu). Směs byla ochlazena na -15 °C a během 1 hodiny za stálého míchání do ní byl po třech stejných dílech přidáván *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC), poté byla při této teplotě ještě 1,5 hodiny míchána. Následně byla směs míchána dalších 48 hodin při laboratorní teplotě a poté vložena do lednice na 48 hodin. Vzniklá sraženina *N,N'*-dicyklohexylmočoviny byla vakuově odfiltrována a rozpouštědlo oddestilováno za sníženého tlaku. Zbytek byl rozpuštěn v minimálním množství ethyl-acetátu a nerozpustná část *N,N'*-dicyklohexylmočovina byla opět odfiltrována pomocí vakuové filtrace. Následovala destilace za sníženého tlaku a krystalizace pomocí ethylacetát/ hexan. Krystalizací se nepodařilo látku zcela vyčistit, proto nelze uvést teplotu tání, chromatografie na sloupci vedla k rozložení produktu.

Teoretický výtěžek: 0,80 g

4.2.8 2-[[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]-4-bromfenyl isonikotinát

(RV7)



Sumární vzorec: C₂₁H₁₁BrF₆N₂O₃

Molární hmotnost: 533,22

0,428 g (0,001 mol) *N*-[3,5-*bis*(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamidu bylo spolu s 0,42 ml (0,003 mol) triethylaminu za stálého míchání rozpuštěno v 10 ml dichlormethanu, kdy bylo do směsi následně pomalu přidáváno 0,231 g (0,0013 mol) hydrochloridu chloridu kyseliny isonikotinové. Reakce byla poté za stálého míchání po dobu 24 hodin monitorována tenkovrstvou chromatografií (5, 15 minut, 1, 2 a 24 hodin). Po uplynutí této doby následovalo nejprve protřepání 15 ml vodného roztoku 5% NaHCO₃ a poté 15 ml destilované H₂O. Dichlormethanová vrstva byla následně na 30 minut odlita do baňky s Na₂SO₄, která se pak uzavřela. Po 30 minutách byla směs přefiltrována přes vatku a filtrát vakuově oddestilován do sucha. Krystalizací se nepodařilo látku zcela vyčistit, proto nelze uvést teplotu tání, chromatografie na sloupci vedla k rozložení produktu.

Teoretický výtěžek: 0,80 g

**5 Biologické hodnocení vybraných
syntetizovaných derivátů
salicylanilidů**

5.1 Biologické testování vybraných syntetizovaných derivátů salicylanilidů

Testování antimykobakteriální aktivity vybraných salicylanilidových derivátů bylo provedeno *in vitro* ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě pod vedením RNDr. Jiřiny Stolaříkové. Testovanými kmeny byly *M. kansasii* MY 235/80 (koncentrace kmene v médiu 10^{-4} $\mu\text{mol/L}$), *M. kansasii* 6 509/96 (kmen izolovaný od pacienta z okresu Karviná; koncentrace kmene v médiu 10^{-4} $\mu\text{mol/L}$), *M. avium* MY 330/88 (koncentrace kmene v médiu 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$).

Preparáty (RV1, RV3, RV4, RVX, RV6) byly ředěny na 0,5-500 $\mu\text{mol/L}$ a 1-1000 $\mu\text{mol/L}$, isoniazid na 0,5-250 $\mu\text{mol/L}$. Preparáty byly ředěny pomocí DMSO, isoniazid sterilní destilovanou vodou.

Hodnocení testů u *M. kansasii* probíhalo po 7, 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C. U *M. avium* po 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C.

Mikrometoda pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací léků se prováděla v Šulově půdě v plastických P–destičkách (MIC v $\mu\text{mol/L}$).

Tabulka II MIC testovaných salicylanilidových derivátů ($\mu\text{mol/L}$)

Preparát	<i>M.kansasii</i> 235/80			<i>M.kansasii</i> 6 509/96			<i>M.avium</i> 330/88	
	7d	14d	21d	7d	14d	21d	14d	21d
RV1	4	8	8	4	8	8	32	62,5
RV3	8	8	8	8	8	8	32	32
RV4	4	8	8	4	8	8	16	16
RVX	4	4	8	4	8	8	32	32
RV6	4	4	8	4	8	8	16	16
Isoniazid	> 250	> 250	> 250	4	8	8	> 250	> 250

Celé názvy preparátů:

- ✓ RV1- 5-Brom-*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid
- ✓ RV3- 4-Brom-2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl pyrazin-2-karboxylát

- ✓ RV4- *N*-[3,5-*Bis*(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamid
- ✓ RVX- 4-Brom-2- {[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl 1*H*-imidazol-4-karboxylát
- ✓ RV6- 5-Chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-hydroxybenzamid

Při testování preparátů proti *M. kansasii* MY 235/80 klesala aktivita v tomto pořadí: RV6, RVX > RV1, RV4 > RV3. Výsledky ukazují, že nejlepší aktivitu vykazoval chlorovaný 5-chlorsalicylanilid spolu s 4-bromsalicylanilidovým 1*H*-imidazol-4-karboxylátem. Naproti tomu 4-bromsalicylanilidový pyrazinkarboxylát se ukázal jako nejméně účinný.

Při testech proti *M. kansasii* 6 509/96 byla sledovaná aktivita preparátů obdobná, s tím rozdílem, že aktivita všech testovaných preparátů byla srovnatelná až na 4-bromsalicylanilidový pyrazinkarboxylát, který byl opět účinný nejméně.

Proti *M. avium* MY 330/88 vykazoval nejvyšší aktivitu chlorovaný 5-chlorsalicylanilid spolu s jedním 5-bromsalicylanilidem (RV4), naproti tomu druhý 5-bromsalicylanilid (RV1) vykazoval aktivitu nejmenší.

Celkové shrnutí antimykobakteriální aktivity tedy jasně hovoří ve prospěch chlorovaného 5-chlorsalicylanilidu, který vykazoval jednoznačně nejlepší aktivitu z této série testovaných preparátů. Nejhorší aktivitu z této série naopak vykazoval 4-bromsalicylanilidový pyrazinkarboxylát.

Výsledky aktivity vůči *M. tuberculosis* H₃₇Rv nebyly dosud dodány.

U RV1 byla dále testována aktivita proti *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (SA), *Staphylococcus aureus* H 5996/08 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 (SE), *Enterococcus* sp. J 14365/08 (EF), *Escherichia coli* CCM4517 (EC), *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 (KP), *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 (KP-E), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (PA). Testy byly provedeny mikrodiluční bujónovou metodou v destičkách – M27A-M1, jako médium byl použit Mueller Hintonův bujón. Doba inkubace byla 24 a 48 hodin při 35 °C. Způsob inkubace byl statický, ve tmě, při humidní atmosféře. Jako rozpouštědlo byl použit DMSO. Výsledky byly odečítány vizuálně/fotometricky (OD 540nm); MIC= IC90 (90% inhibice kontroly). Testy byly provedeny na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK Mgr.Vejsovou M. a Dufkovou I.

Tabulka III MIC testovaného salicylanilidu ($\mu\text{mol/L}$)

TESTOVANÁ LÁTKA- MIC/IC ₈₀ ($\mu\text{mol/L}$)		
Kmen	Hodin	RV1
SA	24	0,49
	48	0,49
MRSA	24	0,49
	48	0,49
SE	24	0,49
	48	0,49
EF	24	7,81
	48	250
EC	24	>500
	48	>500
KP	24	>500
	48	>500
KP-E	24	>500
	48	>500
PA	24	>500
	48	>500

6 Diskuse a závěr

6.1 Diskuze

Cílem této diplomové práce byla příprava následující sloučenin:

- 5-Brom-*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid
- *N*-[3,5-*Bis*(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamid
- 5-Chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-hydroxybenzamid
- 4-Brom-2-{{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl 1*H*-imidazol-4-karboxylát
- 4-Brom-2-{{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl pyrazin-2-karboxylát
- 2-{{[3,5-*Bis*(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-bromfenyl pyrazin-2-karboxylát
- 2-{{[3,5-*Bis*(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-bromfenyl isonikotinát
- 4-Brom-2-{{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl isonikotinát

První krok syntézy vedoucí k požadovanému esteru salicylanilidu spočíval v přípravě samotného salicylanilidu, kdy reagovala kyselina 5-bromsalicylová s různě substituovaným anilinem. Jednou byla v přípravě 5-bromsalicylová kyselina nahrazena kyselinou 5-chlorsalicylovou, tento 5-chlorsalicylanilid však v dalších krocích syntéz užíván už nebyl. (Schéma 1)

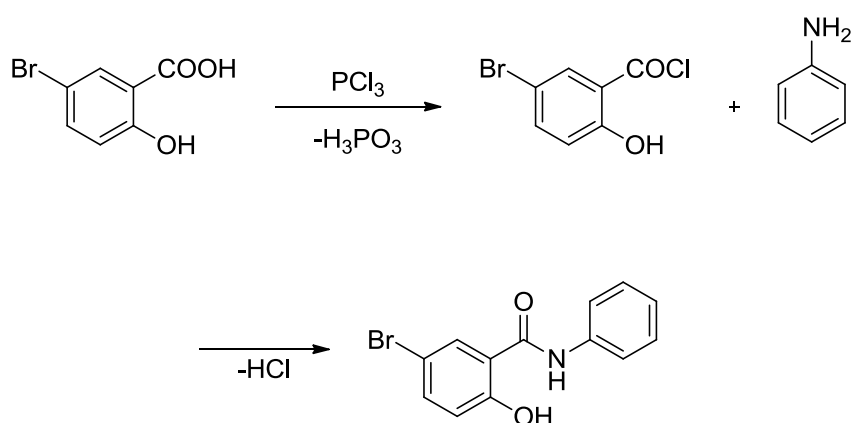


Schéma 1

Syntéza salicylanilidu spočívala nejdříve ve vytvoření chloridu kyseliny 5-brom/chlorsalicylové pomocí PCl_3 . Halogenidy karboxylových kyselin patří obecně k nejreaktivnějším derivátům karboxylových kyselin. S touto prvotní syntézou nebyl prakticky nikdy problém. Chlorid kyseliny 5-brom/chlorsalicylové reagoval se substituovaným anilinem bez problému s vysokými výtěžky. K urychlení a zvýšení efektivity reakce bylo užíváno mikrovlnného reaktoru. Tímto způsobem byly připraveny 5-brom-*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid, *N*-[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamid a 5-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-hydroxybenzamid.

Druhý krok syntézy představoval přípravu konečného esteru 4-bromsalicylanilidu. Prvotně byl realizován pouze jeden typ syntézy na přípravu všech esterů 4-bromsalicylanilidů. (Schéma 2)

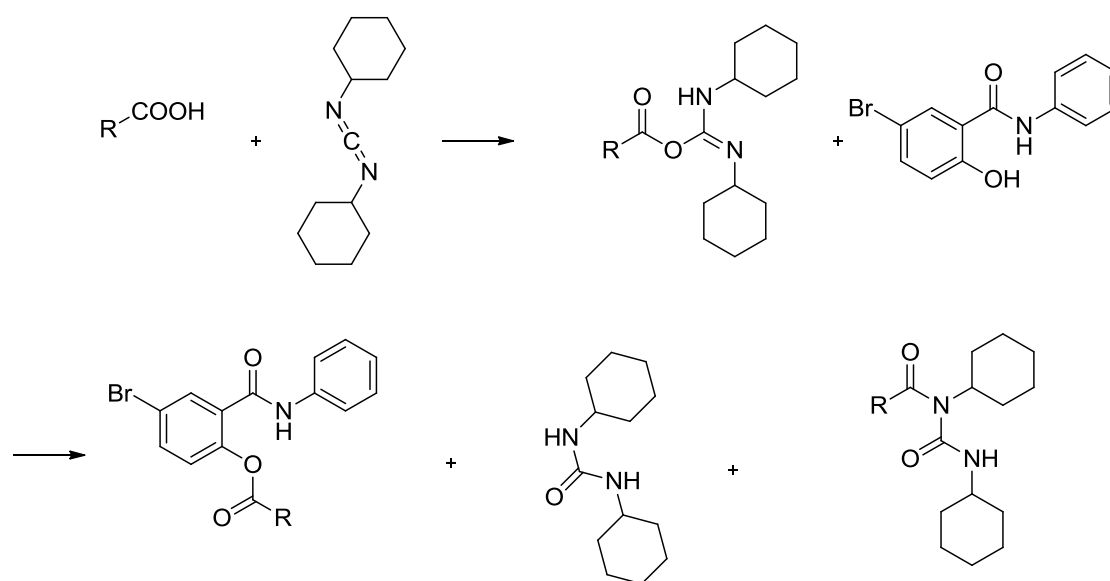


Schéma 2

Tato syntéza spočívala v aktivaci karboxylové skupiny *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem za vzniku příslušné *O*-acylmočoviny. Nevýhodou tohoto meziprojektu je ovšem fakt, že vzniká více různých konečných produktů. Vznikal jednak kýžený ester 4-bromsalicylanilidu, ale též dicyklohexylmočovina, *N*-acylmočovina a také anhydrid příslušné karboxylové kyseliny, z kterého následnou reakcí, díky přítomnému nezreagovanému 5-bromsalicylanilidu, vznikl příslušný ester 4-bromsalicylanilidu spolu s volnou karboxylovou

kyselinou.¹³ Dalším problémem byla nízká reaktivita reaktantů, zvláště v případě kyseliny isonikotinové, a konečně i izolace esterového produktu. Izolace se prováděla pouze za pomoci krystalizace s celkově nízkými výtěžky. Sloupcová chromatografie nebyla z důvodu nestability esteru možná. Touto syntézou byly připravovány 4-brom-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl 1*H*-imidazol-4-karboxylát, 4-brom-2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl pyrazin-2-karboxylát, 2-{[3,5-*bis*(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-bromfenyl pyrazin-2-karboxylát.

Po mnohonásobných neúspěšných pokusech syntetizovat 4-bromsalicylanilidové isonikotináty za pomoci *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu bylo nakonec od této syntézy upuštěno a bylo navrženo nové schéma mechanismu reakce. (Schéma 3)

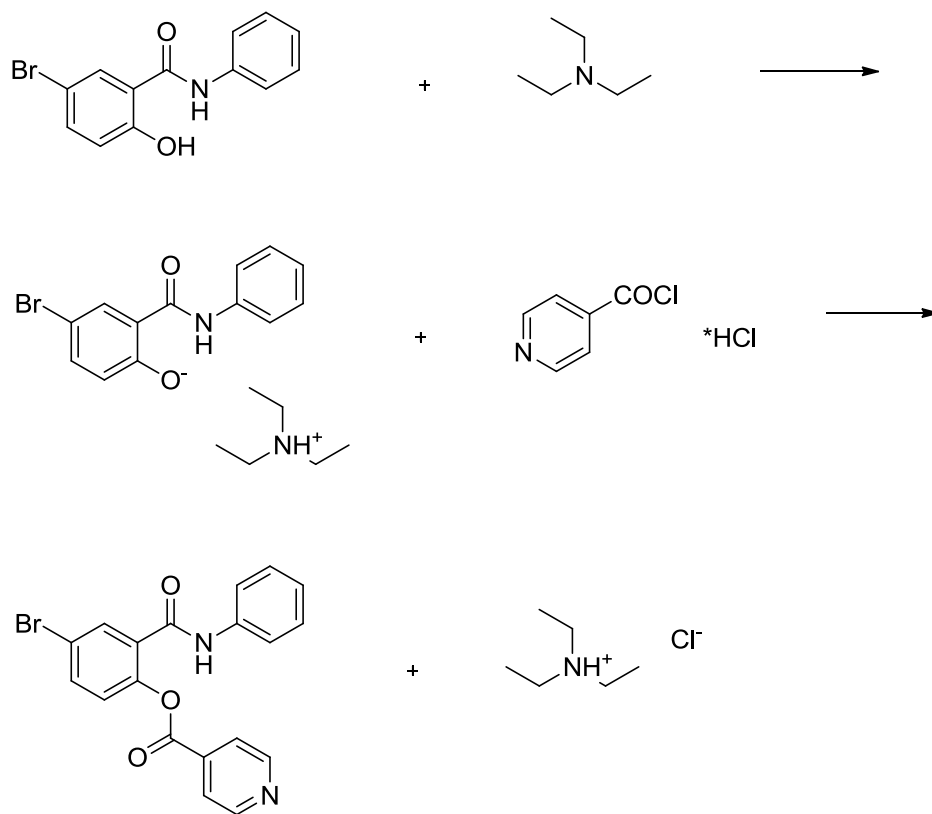


Schéma 3

Syntéza spočívala ve vytvoření soli triethylamonia 4-brom-2-(fenylkarbamoyl)fenolátu mezi 5-bromsalicylanilidem a triethylaminem, kam byl následně přidáván hydrochlorid chloridu kyseliny isonikotinové s cílem vytvořit kýžený ester 4-bromsalicylanilidu. Reakce musela být neustále monitorována tenkovrstvou chromatografií z důvodu určení fáze reakce. Největším problémem zde byl vznikající poměr mezi 5-bromsalicylanilidem a 4-bromsalicylanildem isonikotinátu, který byl 1:1, což značně znesnadňovalo krystalizaci. Touto reakcí byly připravovány 2-{{3,5-bis(trifluormethyl)fenyl}}karbamoyl}-4-bromfenyl isonikotinát a 4-brom-2-{{4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl}}karbamoyl}fenyl isonikotinát.

6.2 Závěr

Výsledkem této práce byla snaha připravit a naměřit antimykobakteriální aktivitu výše zmíněných sloučenin. Připravit a naměřit se nakonec podařilo 5-brom-*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid, *N*-[3,5-*bis*(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamid, 5-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-hydroxybenzamid, 4-brom-2-{{4-(trifluormethyl)fenyl}}karbamoyl}fenyl 1*H*-imidazol-4-karboxylát a 4-brom-2-{{4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl}}karbamoyl}fenyl pyrazin-2-karboxylát.

7 Seznam použitých zkratek

7.1 Seznam použitých zkratk

HPK	histidin proteinkinasa
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MDR-TB	multidrug resistant tuberculosis; multilékově rezistentní tuberkulóza
RR	DNA-vazebný protein, regulátor odpovědi
TB	tuberkulóza
TCS	two-component systém; dvoukomponentový regulační systém
XDR-TB	extensively drug resistant tuberculosis, extenzivně rezistentní tuberkulóza

8 Literatura

8.1 Literatura

Citováno dle CSN ISO 690 a CSN ISO 690-2

¹ Tuberkulóza. [cit. 2013-4-1]. URL: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Tuberkul%C3%B3za>

² Hartl, J.; Doležal, M.; Miletín, M.; Opletalová, V.; Zimčík, P., *Farmaceutická chemie IV*. 1. dotisk 1. vydání. Praha: Karolinum, 2008. 166 s, ISBN 978-80-246-1169-3

³ World Health Organization, *Global tuberculosis report 2012*, Geneva: WHO Press, 2011, 89 s, ISBN 978-92-4-156450-2

⁴ Krátký, M.; Vinšová, J., *POKROKY VE VÝVOJI ANTITUBERKULOTIK PŮSOBÍCÍCH NA MULTILÉKOVĚ REZISTENTNÍ KMENY*, Chem. Listy, 2010, 104, 998-1005

⁵ Krátký, M.; Vinšová, J., *POKROKY VE VÝVOJI ANTITUBERKULOTIK PŮSOBÍCÍCH NA MULTILÉKOVĚ REZISTENTNÍ KMENY – SUPLEMENT*, Chem. Listy, 2010, 104, 998-1005

⁶ Krátký, M.; Vinšová, J., *Salicylanilide Ester Prodrugs as Potential Antimicrobial Agents - a Review*, Curr. Pharm. Design, 2011, 17, 3494-3505

⁷ Lamka, J.; Ducháček, L., *VETERIÁRNÍ LÉČIVA pro posluchače farmacie*, 1. dotisk 3. vydání, Praha: Karolinum, 2008, 151 s, ISBN 978-80-246-1243-0

⁸ Ducháček, L.; Lamka, J., *VETERINÁRNÍ VADEMECUM PRO FARMACEUTY*. 1. vydání, Praha: Karolinum, 2006, 127 s, ISBN 80-246-1263-1

⁹ Hartl, J.; Palát, K. *Farmaceutická chemie I*, 4. dotisk 2. vydání, Praha: Karolinum, 2007, 102 s, ISBN 978-7184-619-2

¹⁰ Krátký, M.; Vinšová, J.; Stolaříková, J., *Antimycobacterial Assessment of Salicylanilide Benzoates including Multidrug-Resistant Tuberculosis Strains*, Molecules, 2012, 17, 12812-12820

¹¹ Krátký, M.; Vinšová, J.; Rodriguez, NG.; Stolaříková, J., *Antimycobacterial Activity of Salicylanilide Benzenesulfonate*, Molecules, 2012, 17, 492-503

¹² Krátký, M.; Vinšová, J.; Novotná, E.; Mandíková, J.; Wsól, V.; Trejtnar, F.; Ulmann, V.; Stolaříková, J.; Fernandes, S.; Bhat, S.; Liu, JO., *Salicylanilide derivatives block Mycobacterium tuberculosis through inhibition of isocitrate lyase and methionine aminopeptidase*, TUBERCULOSIS, 2012, 92, 434-439

¹³ Valeur, E.; Bradley, M., *Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents*, CHEM SOC REV, 2009, 38, 606-631