

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**KONDENZAČNÍ PRODUKTY ALDEHYDŮ
S RHODANINEM JAKO POTENCIÁLNÍ
LÉČIVA**

Diplomová práce

Hradec Králové 2006

Eliška Španingerová

RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. děkuji za obětavou pomoc a cenné rady při psaní, jakož i závěrečných úpravách mé diplomové práce a podporu, jaké se mi od ní, nejen při vzniku této práce, dostávalo.

Dále děkuji paní V. Hronové za provedení elementárních analýz, paní I. Vencovské za změření IČ spekter, doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter, PharmDr. J. Jampilkovi, Ph.D. z firmy ZENTIVA za HPLC ověření čistoty produktů a doc. RNDr. V. Buchtovi, CSc. a jeho spolupracovníkům z Katedry biologických a lékařských věd za provedení antifungálních testů.

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD | 5 |
| 2. CÍL PRÁCE | 6 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 3.1 Rhodaniny jako potenciální léčiva | 8 |
| 3.1.1 Antibakteriální účinek | 8 |
| 3.1.1.1 <i>Inhibitory syntézy buněčné stěny</i> | 8 |
| 3.1.1.2 <i>Inhibitory β-laktamas třídy C</i> | 10 |
| 3.1.1.3 <i>Sloučeniny působící neznámými mechanismy</i> | 12 |
| 3.1.1 Antifungální účinek | 14 |
| 3.1.2.1 <i>Inhibitory protein:manosyltransferasy 1</i> | 14 |
| 3.1.2.2 <i>Sloučeniny působící neznámými mechanismy</i> | 16 |
| 3.1.3 Antivirový účinek | 18 |
| 3.1.3.1 <i>Inhibitory proteasy viru hepatitidy C</i> | 18 |
| 3.1.3.2 <i>Inhibitory HIV-1 integrasy</i> | 19 |
| 3.1.3.3 <i>Inhibitory neuraminidasy</i> | 20 |
| 3.1.4 Antituberkulotický účinek | 21 |
| 3.1.5 Antimalarický účinek | 23 |
| 3.1.6 Insekticidní účinek | 25 |
| 3.1.7 Antikarcinogenní účinek | 26 |
| 3.1.7.1 <i>Inhibitory protein:tyrosinfosfatas</i> | 26 |
| 3.1.8 Jiné účinky | 29 |
| 3.2 Současné využití rhodaninových derivátů | 32 |
| 4. METODICKÁ ČÁST | 34 |
| 4.1 Vlastnosti rhodaninu | 34 |
| 4.2 Reaktivita rhodaninu | 35 |
| 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 37 |
| 5.1 Chemická část | 37 |
| 5.1.1 Příprava 5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu | 38 |

| | |
|---|----|
| 5.1.2 Příprava 5-benzyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu | 39 |
| 5.1.3 Příprava 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu | 40 |
| 5.1.3.1 Příprava 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu I. | 41 |
| 5.1.3.2 Příprava 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu II. | 41 |
| 5.1.3.3 Příprava 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu III. | 42 |
| 5.1.4 Příprava 5-(3-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu | 44 |
| 5.1.5 Příprava 5-(4-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu | 45 |
| 5.2 Hodnocení antifungální aktivity | 47 |
| 6. DISKUSE | 49 |
| 7. ZÁVĚR | 52 |
| 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 53 |

1. ÚVOD

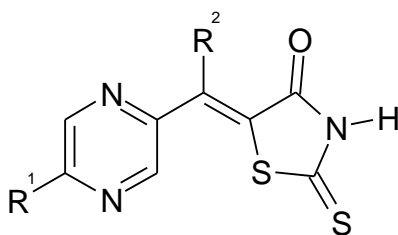
Jedním z možných přístupů k nalezení nového léčiva je tzv. objevování ztraceného. Při tomto přístupu se studují starší práce ve snaze nalézt a využít takové poznatky, které v době publikování nebyly a nemohly být dostatečně doceněny [1]. Pokud se při studiu literatury zjistí, že některá skupina sloučenin je dobře prostudována po chemické stránce, ale málo je známo o biologických účincích těchto látek, je možné tyto sloučeniny znovu připravit a podrobit biologickému hodnocení v testech založených na nových biologických a biochemických poznacích. Mezi sloučeniny, jejichž biologický potenciál nebyl dosud plně prostudován a doceněn patří také deriváty rhodaninu [2].

Rhodanin (2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on) poprvé připravil Nencki v roce 1877 reakcí amonium-thiokyanátu s kyselinou monochloroctovou. Později byly pro jeho přípravu vypracovány i další postupy [3]. V prvních desetiletích 20. století byla připravena a chemicky charakterizována celá řada derivátů rhodaninu [4 – 14]. Pozornost byla věnována také možností otevření rhodaninového kruhu za vzniku odpovídajících thiokyselin [15, 16] a odstranění thioxo skupiny za vzniku odpovídajících derivátů 1,3-thiazolidin-4-onu [17]. V roce 1922 popsal Gränacher několik významných přeměn kondenzačních produktů karbonylových sloučenin s rhodaninem a otevřel tak cestu k širokému syntetickému využití rhodaninu a jeho derivátů [18]. Důležitým přínosem bylo také podrobnější prostudování reakcí rhodaninu s ketony [19].

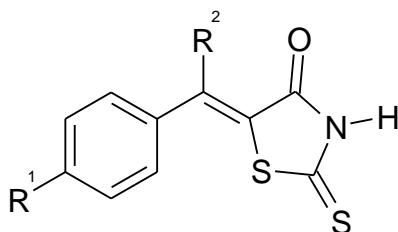
Metody vypracované v první polovině 20. století a těsně po 2. světové válce jsou dodnes široce využívány. Pokroky v oblasti chemických a biologických věd umožňují poznatky o rhodaninu a jeho derivátech nadále zpřesňovat. Objevují se nové modifikace klasických syntetických postupů, produkty jsou charakterizovány pomocí spektrálních metod, případně jsou vlastnosti připravených sloučenin studovány pomocí počítačových modelů, a jsou publikovány nové poznatky o biologických účincích rhodaninových derivátů [2, 20 – 24]. Příspěvkem k řešení této problematiky je i moje diplomová práce.

2. CÍL PRÁCE

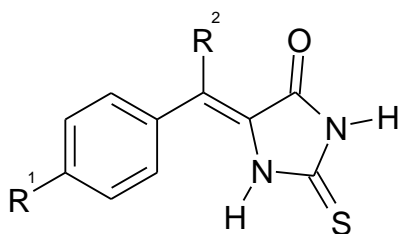
Studium derivátů rhodaninu bylo na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv započato v roce 2003. V rámci diplomové práce J. Doležela [25] bylo připraveno šest 5-(1-pyrazin-2-ylethyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onů (**1**) a analogický 5-(1-fenylethyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (**2**) Syntéza těchto sloučenin byla již publikována formou plakátového sdělení [26]. Biologické hodnocení těchto sloučenin ukázalo, že jsou prakticky neaktivní jak v antifungálních, tak antimykobakteriálních testech. Neaktivní byly i při studiu vlivu na fotosyntetické procesy. To je patrně způsobeno přítomností methylové skupiny na exocyklické dvojně vazbě v poloze 5. U analogických derivátů thiohydantoinu (**3**) bylo rovněž pozorováno vymizení antimykobakteriální účinnosti v případě, že $R^2 = \text{methyl}$ [27].



1: $R^1 = \text{H, alkyl}; R^2 = \text{CH}_3$



2: $R^1 = \text{H, alkyl}; R^2 = \text{CH}_3$



3: $R^1 = \text{fenyl}; R^2 = \text{H, CH}_3$

Bylo proto rozhodnuto, že nadále nebudou studovány kondenzační produkty rhodaninu s ketony, ale s aldehydy. Úkolem mé diplomové práce je připravit několik derivátů tohoto typu a předat je k biologickému hodnocení.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Rhodaniny jako potenciální léčiva

3.1.1 Antibakteriální účinek

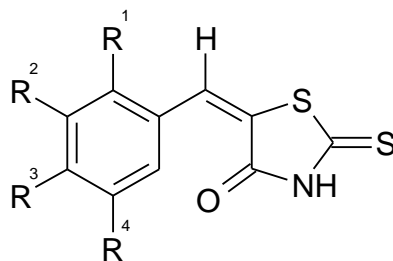
Vývoj bakteriálních kmenů rezistentních na současná antibiotika podnítil hledání nových látek této farmakologické skupiny. Látky s antibakteriální aktivitou, potenciální antibiotika a chemoterapeutika, byly hledány a nalezeny také u rhodaninových derivátů.

3.1.1.1 Inhibitory syntézy buněčné stěny

Jedním z nejúčinnějších mechanismů antibakteriálního účinku je porušení celistvosti bakteriální buněčné stěny. Ta se tak stává častým cílem zásahu potenciálních antibakteriálních léčiv.

a) Inhibitory enzymu MurC

Nezbytnou součástí buněčné stěny gramnegativních i grampozitivních bakterií je peptidoglykan. Syntéza této pro bakterie esenciální sloučeniny probíhá ve čtyřech krocích, ve kterých jsou aminokyselinové zbytky postupně navázány na uridindifosfo-*N*-acetylmuramovou kyselinu (UDP-MurNAc). Každý z těchto kroků je katalyzován enzymem z rodiny Mur-syntetas. Enzym UDP-*N*-acetylmuramát/*L*-Alanin ligasa, který se účastní vzniku první peptidové vazby mezi UDP-MurNAc a *L*-alaninem, je vysoce specifický a je přítomen pouze u Eubakterií. Tyto vlastnosti z něj činí vhodné místo pro antibakteriální zásah. Slibnými inhibitory MurC se ukázaly benzyldenrhodaniny **4**.



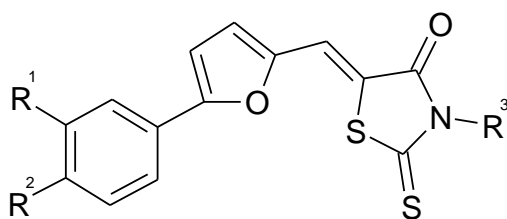
4: R¹ = H, *p*-Cl-benzylsulfanyl, *p*-Cl-fenylsulfanyl, *p*-Cl-fenoxy; R² = H, fenoxy, benzyloxy; R³ = H, benzylden; R⁴ = NO₂, benzyloxy

Ze čtyřiceti připravených benzylidenrhodaninů vykázalo schopnost inhibice tohoto enzymu pouze pět. Ze vztahu struktury a účinku vyplývá, že pro antibakteriální účinek je nezbytná volná NH skupina v poloze 3 rhodaninového kruhu. Ta je patrně nutná k tvorbě vodíkové vazby mezi danou látkou a aktivním místem enzymu. Výsledky testů dále ukázaly, že přítomnost nitroskupiny na benzylidenovém substituentu naopak pro účinek esenciální není.

Kromě inhibice vlastního enzymu MurC byl u všech připravených derivátů hodnocen inhibiční efekt proti intaktní bakteriální buňce. Ani jeden z pěti testovaných derivátů nevykázal inhibiční efekt proti gramnegativní *Escherichia coli*. U třech z nich byla objevena jen slabá inhibice grampozitivního meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* [28].

b) *Inhibitory penicilin vázajících proteinů (DD transpeptidas)*

Základem peptidoglykanu je polysacharidový řetězec tvořený *N*-acetylglukosaminem a *N*-acetylmuramovou kyselinou, ke které je připojen polypeptidový řetězec zakončený dvěma aminokyselinama D-alanyl-D-alaninem. Kompaktní bariéra vzniká odštěpením terminálního D-alaninu a napojením zbytku polypeptidového řetězce na řetězec sousedního peptidoglykanu. Tuto reakci (transpeptidaci) katalyzuje penicilin vázající protein – PBP (penicilin binding protein). Transpeptidace je vhodným cílem antibakteriálního zásahu, neboť probíhá na zevní straně cytoplazmatické membrány a je tak snadno přístupná působení léčiva. Navíc je peptidoglykan specifický pro prokaryotní buňky. Schopnost inhibovat aktivitu PBP byla objevena také u arylalkylidenrhodaninů **5**.



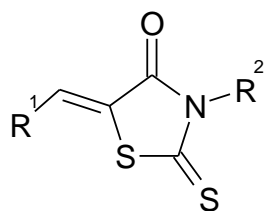
Testování byly podrobeny různé typy PBP. Účinek potenciálních inhibitorů byl hodnocen jako zbytková hydrolytická aktivita enzymu vůči thiolesteru

v přítomnosti inhibitoru (50 $\mu\text{mol/l}$). V případě enzymů PBP3 a PBP5 izolovaných z *Escherichia coli* byla zbytková aktivita nižší než 20 %.

Enzym PBP2xS, produkt penicilin-senzitivního druhu *Streptococcus pneumoniae*, byl inhibován třemi ze čtyř testovaných arylalkylidenrhodaninů až z 95 %. U enzymu PBP2xR, produkovaného druhem *Streptococcus pneumoniae* rezistentním na penicilin, byly efektivní dva rhodaninové deriváty, avšak k dosažení 85% inhibice enzymové aktivity bylo nutné zvýšit koncentraci těchto látek dvojnásobně (tj. na 100 $\mu\text{mol/l}$). Nízká afinita PBP2a, enzymu izolovaného ze *Staphylococcus aureus*, je zodpovědná za rezistenci stafylokoků vůči β -laktamovým antibiotikům. I tento enzym byl však působením testovaných látek inhibován. U neúčinnějších arylalkylidenrhodaninů byla hodnota IC_{50} 5 $\mu\text{mol/l}$. U všech výše uvedených arylalkylididecrhodaninů byl také testován vliv na buněčný růst. Výsledky testů ukázaly, že rhodaninové analogy jsou aktivní proti několika grampozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) a gramnegativním (*Moraxella catarrhalis*, *Hemophilus influenzae*) bakteriím. Testované látky byly účinné i proti rezistentním druhům bakterií (meticylin-rezistentní *S. aureus* - MRSA, vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium* - VRE), kde léčba ampicilinem či cefotaximem vyžaduje vysoké koncentrace nebo je neúčinná. Tomu odpovídají také hodnoty MIC těchto sloučenin, které jsou oproti referenčním antibiotikům nízké. Naproti tomu v případě penicilin rezistentního *Streptococcus pneumoniae*, který je na ampicilin a cefotaxim citlivý, jsou arylalkylidenrhodaniny prakticky neúčinné. V případě *E. coli* a penicilin-senzitivního kmenu *S. pneumoniae* byly rovněž inaktivní [29].

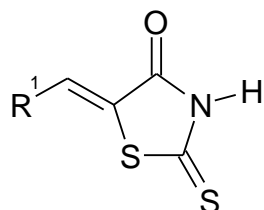
3.1.1.2 Inhibitory β -laktamas třídy C

Na základě chemické struktury rozeznáváme čtyři třídy β -laktamas. Největší význam mají enzymy třídy A a C, neboť především tyto podmiňují vývoj bakteriální rezistence. Současně dostupné inhibitory β -laktamas: kyselina klavulanová, tazobaktam a sulbaktam inaktivují nejběžněji se vyskytující β -laktamasy třídy A, ale v případě β -laktamas třídy C jsou neefektivní. Možné řešení absence inhibitorů třídy C skýtají arylalkylidenrhodaniny **6**.



6: R¹ = fenyl, 2-OH-fenyl, 2-NO₂-fenyl, 4-NO₂ fenyl aj.; R² = H, C₂H₅, CH₂COOH aj.

Tyto látky jsou schopné inhibovat jak β-laktamasy třídy A, tak i C. Byla připravena řada derivátů rhodaninu, které byly podrobeny testování proti β-laktamasám obou tříd, avšak s důrazem na selektivní inhibici třídy C. Testy byly provedeny na enzymech získaných izolací z *Enterobacter cloacae* - enzym P99 (zástupce třídy C) a z *Escherichia coli* - enzym TEM 1 (zástupce třídy A). Ze studia vztahu struktury a účinku vyplývá, že nejselektivněji vůči enzymu P99 působí sloučeniny, které postrádají substituent na dusíku rhodaninového kruhu (7).



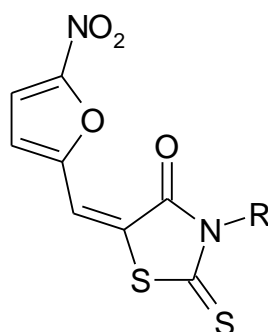
7: R¹ = , , , , ,

Antibakteriální účinek se přitom stupňuje navázáním nitroskupiny na benzyldenový substituent, přičemž látky s nitroskupinou v poloze *para* vykazují několikanásobně vyšší aktivitu než tytéž látky s nitroskupinou v poloze *ortho*. Náhradou benzenového kruhu v poloze 5 furanem byly získány analogy z vyšší aktivitou. 5-nitrofurany byly dokonce nejsilnějšími inhibitory ze souboru testovaných látek (IC₅₀ = 0,45 μM). Prodloužení spojovacího řetězce mezi substituentem R¹ a rhodaninovým kruhem vede ke zvýšení inhibiční aktivity. Zajímavé je též zjištění, že antibakteriální aktivita nasycených sloučenin je vyšší než aktivita nenasycených analogů [30].

3.1.1.3 Sloučeniny působící neznámými mechanismy

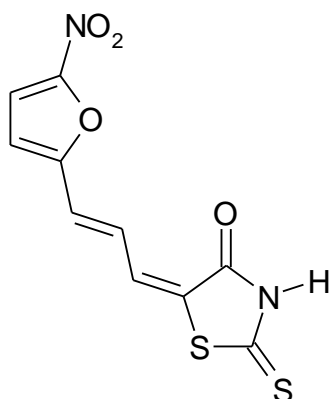
Antibakteriální aktivita byla popsána u celé řady dalších arylalkylidenrhodaninů, jejichž mechanismus účinku nebyl podrobněji studován. Jako příklad je možno uvést následující sloučeniny.

5-(5-nitrofurfuryliden)rhodaniny obecného vzorce **8** mají poměrně široké spektrum antimikrobiálního účinku. Kromě antibakteriálního, vykazují též účinek antifungální a antiprotozoální.



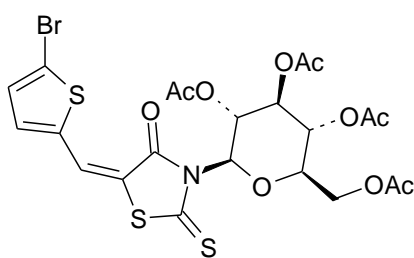
8: R = H , CH₃, C₂H₅, CH₂CH=CH₂, C₂H₄OH, C₆H₅, *p*-Cl-C₆H₄CH₂

Ve snaze nalézt optimální strukturu vzhledem k antibakteriálnímu účinku byla připravena celá řada derivátů lišících se povahou substituentů na dusíku a spojovacího řetězce mezi rhodaninovým a furanovým kruhem. Tyto látky byly následně podrobeny testování proti vybraným druhům bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*). Z výsledků testů vyplývá, že jednou z nejúčinnějších látek byl samotný 5-(5-nitrofurfuryliden)rhodanin (R = H). Alkylací na *N*-3 došlo k poklesu antibakteriální aktivity, přičemž oslabení účinnosti bylo tím výraznější, čím objemnější byl substituent. Též zavedení hydrofilní skupiny do substituentu mělo negativní dopad na účinek. Naopak u *N*-fenylderivátu byla pozorována vysoká bakteriostatická aktivita proti *S. aureus* a *S. pyogenes*. Významné zvýšení aktivity přineslo vnesení vinylové skupiny do molekuly těchto látek. Získané vinylogy, 5-(5-nitrofurylakryliden)rhodaniny **9**, vykazaly silný antibakteriální účinek proti všem testovaným bakteriím. I v této řadě bylo možné pozorovat snížení účinku substitucí dusíku rhodaninového kruhu methylem. Náhradou thioxoskupiny rhodaninového kruhu oxoskupinou došlo k významnému zvýšení účinku [31].

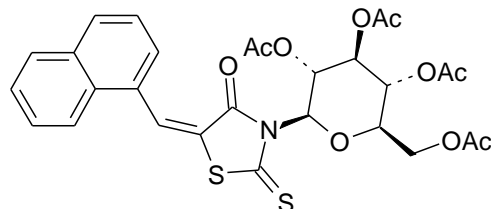


9: R = H, CH₃

Některé *N*-tetracetylglukopyranosylové deriváty 5-arylmethylidénrhodaninů, studované jako potenciální antivirotika, byly testovány také proti bakteriím. Vesměs byly antibakteriálně neaktivní. Výjimku představují pouze deriváty 5-[(5-2-bromthienyl)methylidén]rhodaninu (**10**) a 5-(1-naftylmethylidén)rhodaninu (**11**), které působí na *S. aureus* [32].

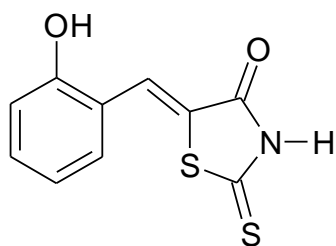


10

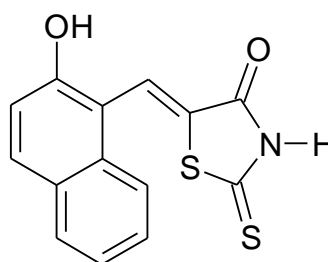


11

5-(2-hydroxybenzylidén)rhodanin (**12**) a 5-(2-hydroxynaftylidén)rhodanin (**13**) působily především proti *S. faecalis* a *S. aureus* [33].



12



13

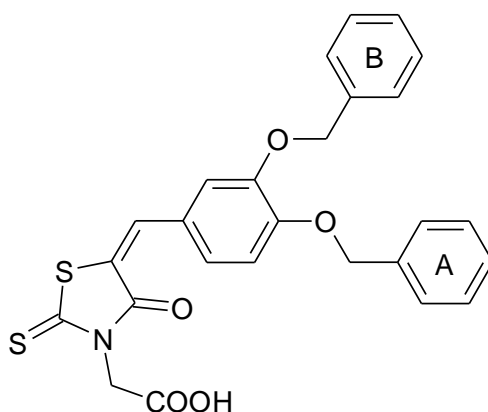
3.1.2 Antifungální účinek

V důsledku růstu populace imunodeficientních osob došlo k prudkému vzestupu incidence život ohrožujících infekcí vyvolaných houbami. Současné možnosti léčby jsou však limitovány nežádoucími účinky (nefrotoxicitou) polyenů a rezistencí některých druhů hub na azoly. Naléhavá potřeba nových antifungálních léčiv a následný výzkum vedly k objevu antifungálního účinku u rhodaninových derivátů [34].

3.1.2.1 Inhibitory protein:manosyltransferasy 1

Významnou složkou buněčné stěny mnohých patogenních hub jsou manoproteiny. Ty propůjčují buněčnému povrchu vlastnosti důležité pro interakce s hostitelem. Pro biosyntézu těchto sloučenin jsou klíčové enzymy z rodiny manosyltransferas. Jedná se o membránové proteiny lokalizované v endoplasmatickém retikulu, které katalyzují přenos iniciálního manosového zbytku z dolicholfosfo- β -D-manosy na serin/threoninové zbytky. Delece genu kódujícího enzym protein: manosyltransferasu (PMT1) má za následek ztrátu virulence daného mikroorganismu. Látky inhibující PMT1 by se tak v budoucnu mohly stát významnými antifungálními léčivy.

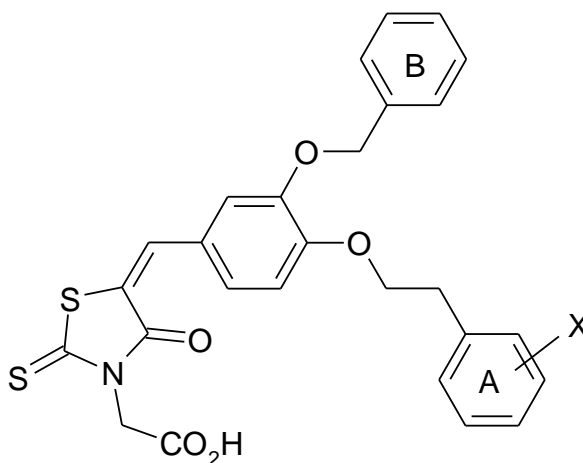
Schopnost inhibovat aktivitu enzymu PMT1 byla objevena u látek odvozených od 5-arylalkylidenrhodanin-3-octové kyseliny, respektive od jejího 3,4-bis(benzyloxy) derivátu **14**.



14

Účinek těchto látek byl testován *in vitro* jak na samotném enzymu, tak na intaktních buňkách *Candida albicans*. Z provedených testů pak vyplynuly

příslušné poznatky o vztahu struktury a účinku. Substitucí kruhu A došlo k mírnému zvýšení inhibiční aktivity, a to jak v případě PMT1, tak celkové inhibice *C. albicans*, zatímco zavedení téhož substituentu na kruh B vedlo k jejímu oslabení. Substituce obou kruhů měla za následek ztrátu aktivity. Prodloužení řetězce mezi etherovým kyslíkem a fenylem vedlo jen k malému zvýšení inhibiční aktivity vůči PMT1. V případě látek z fenylethoxyskupinou (**15**) však došlo ke znatelnému zesílení inhibičního účinku proti *C. albicans* ($IC_{50} = 0,5 \mu M$). Substituce kruhu A takto modifikovaných sloučenin nepřinesla významnější zvýšení aktivity vůči enzymu PMT1, ale v případě *C. albicans* bylo zvýšení inhibičního účinku značné. Nejvyšší hodnoty ($IC_{50} = 0,05 \mu M$) byly zaznamenány u chlor- (**16**) a fluorderivátu (**17**).



15: X = H; **16:** X = 4-Cl; **17:** X = 4-F

Substitucí spojovacího řetězce mezi etherovým kyslíkem a fenylem se inhibiční účinek dále výrazně stupňoval. Zajímavá je skutečnost, že sloučeniny s nepolárními substituenty vykazaly vyšší inhibiční účinek v případě *C. albicans* než proti PMT1. Naopak sloučeniny s polárními substituenty byly silnějšími inhibitory PMT 1 než *C. albicans*. Příčinou je pravděpodobně lepší membránová prostupnost nepolárních derivátů.

Nezbytnost karboxymethylové skupiny vázané na dusík rhodaninového kruhu pro antifungální účinek byla potvrzena testováním analogů s různými *N*-substituenty

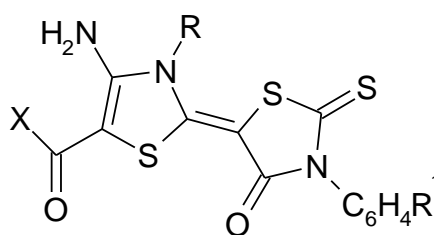
(karboxylová, esterová, amidová skupina). Ani jeden z nich nevykázal antifungální účinek [34].

3.1.2.2 Sloučeniny působící neznámými mechanismy

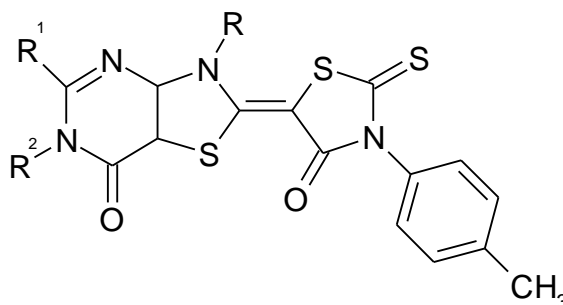
Výše uvedené deriváty 5-(5-nitro-2-furfuryliden)rhodaninu **8** vykazují kromě antibakteriálního též antifungální a antiprotozoální účinek. Zatímco u antibakteriálního účinku byla zřejmá určitá závislost mezi charakterem *N*-substituentů a účinkem, v případě antifungální aktivity nebyla pozorována žádná souvislost. Nepolární sloučeniny, stejně jako polárnější deriváty, vykazaly vysokou aktivitu vůči *C. albicans*, některé dokonce vyšší než amfotericin B. Vinylové analogy, 5-(5-nitro-2-furylakryliden)rhodaniny **9**, se rovněž ukázaly jako významné antifungální látky s výjimkou *N*-methylovaných derivátů, u kterých došlo k poklesu aktivity.

Náhrada thiokarbonylové skupiny oxoskupinou a následné zavedení methyl- či *p*-chlorbenzyl substituentu na dusík rhodaninového kruhu vedlo k látkám se silnějším antifungálním účinkem (MIC = 0,7 a 0,15 µg/ml) než má amfotericin B (MIC = 5 µg/ml). Nitroskupina je pro účinek nezbytná, neboť připravené 5-(2-furfuryliden)rhodaniny byly inaktivní [31].

Kondenzační produkty *N*-substituovaných rhodaninů s thiazolo-2-thiony (**18**) nebo thiazolo[4,5-*d*]pyrimidiny (**19**).



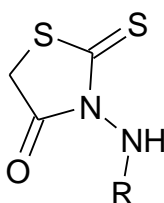
18: R = CH₂CH=CH₂, C₆H₅; R¹ = *p*-CH₃, *p*-Cl; X = NH₂, OC₂H₅



19: R = CH₂CH=CH₂, C₆H₅, *m*-CH₃-C₆H₄; R¹ = H, CH₃;
R² = H, CH₃, N=CH-*p*-OCH₃-C₆H₄

Obě skupiny látek byly testovány *in vitro* proti bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*) a na houbách (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*) a jejich účinnosti porovnávány se standardními antibiotiky a chemoterapeutiky (ampicilinem, klotrimazolem a streptomycinem). Výsledky testů ukázaly nejvýraznější účinek proti houbám *A. niger* a *Penicillium sp.*, ale i neúčinnější z těchto látek, (thiazolopyrimidiny s allylovou skupinou v poloze 3 a thiazolopyrimidiny s *p*-methoxybenzylidenaminoskupinou v poloze 6), byly pětikrát méně účinné než standardní antimykotikum klotrimazol [35].

Látky s významným antifungálním a insekticidním účinkem byly nalezeny i ve skupině derivátů aminorhodaninu.



20: R = H; **21:** R = COCH₃; **22:** R = COC₆H₅

Testování bylo provedeno na šesti druzích patogenních hub: *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Hansenula anomala*, *Penicillium expansum*, *Fusarium oxysporum*. Aminorhodanin (**20**) byl účinný vůči pěti z nich, přičemž nejsilnější aktivita byla zaznamenána proti *A. niger* (MIC = 6,25 µg/ml). Jen v případě *F. oxysporum* byl neaktivní. Na důležitost aminoskupiny lze usuzovat z hodnot MIC, které jsou u aminorhodaninu znatelně nižší (MIC = 6,25 µg/ml) než u rhodaninu (MIC = 200 – 800 µg/ml).

Přípravou *N*-acetyl- (**21**) a *N*-benzoyl- (**22**) derivátů došlo ke ztrátě účinku. Z toho je zřejmé, že pro antifungální účinek je důležité, aby aminoskupina vázaná na dusík rhodaninového kruhu zůstala volná [36].

Antifungální aktivitu vykazovaly také 5-(2-hydroxybenzyliden)rhodanin (**12**) a 5-(2-hydroxynaftyliden)rhodanin (**13**) zmíněné v předcházející části (**3.1.1.3**). Byly účinné hlavně vůči *A. fumigatus* [33].

3.1.3 Antivirový účinek

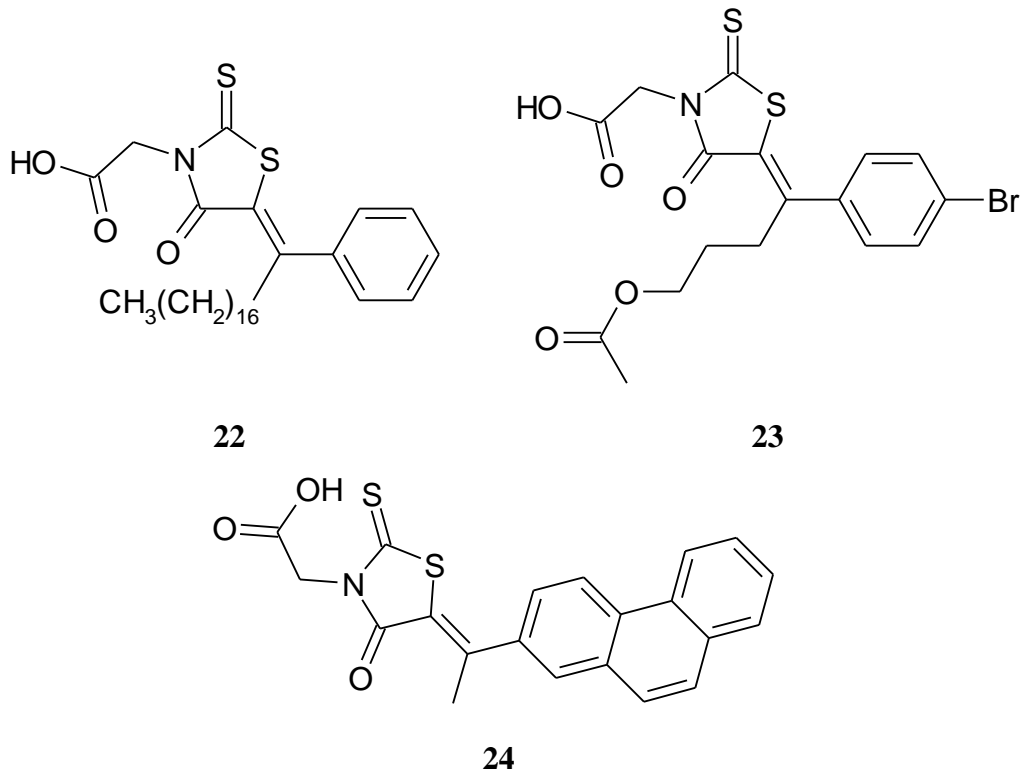
Rhodaniny mají schopnost inhibovat viry na základě různých mechanismů. Mohou inhibovat syntézu virových proteinů nezbytných pro stavbu virového obalu nebo na základě schopnosti vytvářet komplexy s ionty železa inhibovat ribonukleosiddifosfátreduktasu, neboť ta vyžaduje ionty železa jako kofaktor, a znemožňovat tak syntézu DNA. Není vyloučeno, že rhodaniny by mohly působit i jako analogy purinových bází při syntéze nukleových kyselin.

Hydrolytické produkty rhodaninů, α -sulfanylakrylové kyseliny, jsou schopné inhibovat enzymy označované jako neuraminidasy, které ovlivňují vstup viru do hostitelské buňky a uvolnění virových částic v ní [37].

3.1.3.1 Inhibitory proteasy viru hepatitidy C (HCV)

Virus hepatitidy C patří mezi RNA viry z čeledi *Flaviviridae*. Infekce tímto virem zapříčiňuje akutní a chronickou hepatitidu, jaterní cirhózu a v některých případech též hepatocelulární karcinom. Léčba interferony je účinná pouze u 25% pacientů. Vysoké procento relapsů, významné vedlejší účinky a vysoká cena, jež jsou spojené s léčbou, se staly impulsem pro rozsáhlé hledání nových účinných preparátů [37].

Jeden z možných cílů terapeutického zásahu byl nalezen při sledování sekvencí genomu tohoto viru. Nestrukturální protein 3 (NS3), vykazující serinproteasovou aktivitu, hraje důležitou roli v procesu štěpení nestrukturálních virových proteinů, které jsou nezbytné pro replikaci viru [38]. Na základě provedených testů bylo zjištěno, že některé arylalkylidenrhodaniny jsou schopny enzym NS3 inhibovat. Příklady jsou uvedeny ve vzorcích **22**, **23**, **24**.



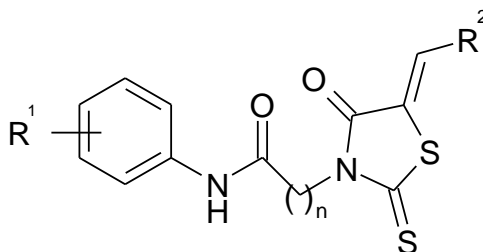
Současně byla testována jejich inhibiční aktivita proti dvěma dalším serinovým proteasám – chymotrypsinu a plasminu, aby bylo možné posoudit míru selektivity jejich účinku. Většina arylmethylidenrhodaninů byla lepšími inhibitory právě těchto kontrolních proteas [37, 38]. Výrazné zlepšení ve smyslu zvýšení selektivity k NS3, ale i zesílení samotného účinku, přineslo zavedení objemných a hydrofobnějších substituentů do molekuly [37]. Nejsilnější inhibici HCV proteasy vykazala látka **22**, nejselektivněji působícím inhibitorem byla látka **23** [38].

3.1.3.2 *Inhibitory HIV-1 integrasy*

Současná kombinovaná terapie výrazně zlepšila výsledky léčby pacientů infikovaných virem HIV-1, neboť dokázala snížit množství viru na nedetekovatelnou úroveň. Problémem však nadále zůstává eradikace tohoto viru, který persistuje v latentní formě v paměťových CD4^+ T-lymfocytech a rezistence některých druhů viru k současně dostupným lékům.

HIV-1 integrasa je enzym nezbytný pro replikaci viru, neboť katalyzuje začlenění virové DNA do lidského genomu. Umožňuje tak stálou replikaci viru a tím

chronickou infekci. Schopnost inhibovat HIV-1 integrasu byla pozorována u amidů 5-arylmethylidenrhodanin-3-alkanových kyselin **24** [12].



25

Významnou aktivitu vykázaly deriváty, u nichž byl na amidový dusík vázán fenyl substituovaný v poloze 3 karboxylovou a v poloze 4 hydroxylovou skupinou, respektive v poloze 3 hydroxylovou a v poloze 4 karboxylovou skupinou. Hodnoty IC_{50} zjištěné u těchto látek nepřesáhly 44 μ M. V případě fenylu substituovaného pouze karboxylovou či hydroxylovou skupinou, ať už v poloze 3 nebo 4, byly příslušné sloučeniny neaktivní ($IC_{50} > 100 \mu$ M) nebo vykázaly jen velmi slabý účinek ($IC_{50} = 84 - 98 \mu$ M). Silný inhibiční efekt byl zaznamenán u derivátů s 5-nitro- nebo 5-chlor-2-hydroxyfenylem vázaným na amidový dusík. Nízké hodnoty IC_{50} těchto látek (20 μ M, respektive 32 μ M) naznačují, že elektronegativní substituenty přispívají ke zvýšení inhibiční aktivity.

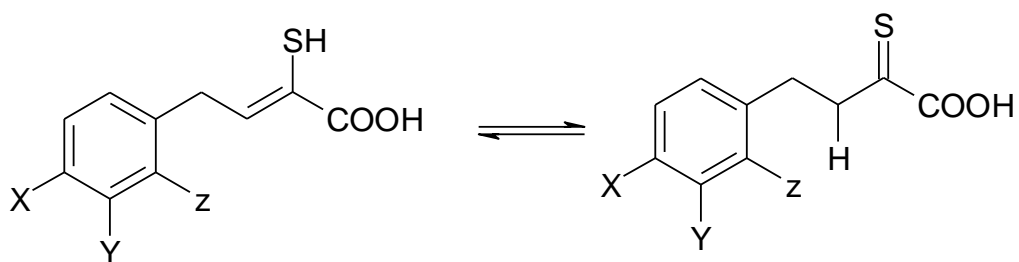
Aktivitu rovněž významně ovlivňuje charakter substituentu R^2 . Silný inhibiční efekt byl zaznamenán u sloučenin, kde $R^2 = 4$ -ethylfenyl, 4-ethoxyfenyl, 3,4-dioxymethylenfenyl a 2-thienyl [39].

3.1.3.3 *Inhibitory neuraminidasy*

Neuraminidasa je enzym lokalizovaný na povrchu viru chřipky. Selektivně odštěpuje terminální část sialové kyseliny od cukerné složky. Bylo zjištěno, že virus chřipky se váže na červené krvinky prostřednictvím zbytků sialové kyseliny v její buněčné membráně. Adsorpce viru je pak provázena aglutinací erytrocytů. Aby mohl být virus z vazby na červené krvinky uvolněn, musí mít k dispozici neuraminidasu. Uvolněný virus je plně infekční, schopný napadat další buňky.

Inhibitory neuraminidasy by mohly zabraňovat myxoviru v desorpci z ochranných mukoproteinů, které se nacházejí na povrchu epitelu respiračního traktu. Takové látky by se pak mohly používat v terapii infekcí vyvolaných myxoviry.

Inhibice neuraminidasy byla pozorována v přítomnosti β -fenyl- α -sulfanylakrylových kyselin **26**, hydrolytických produktů rhodaninů. Mohou se vyskytovat v obou tautomerních formách, přičemž převažuje enolforma.



26: X = H, Cl, NO₂, OH, COOH, N(CH₃)₂; Y = H, Cl, NO₂; Z = H, Cl

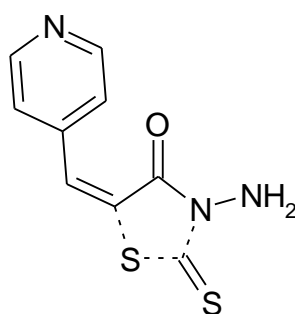
Jejich afinita k neuraminidase je dána jejich podobností s pyrohroznovou kyselinou, která je nezbytnou součástí neuraminové kyseliny. Elektronegativní substituent v poloze *meta* nebo *para* aromatického kruhu zvyšuje účinnost příslušné sloučeniny. Nejúčinnější inhibitory byly nalezeny mezi nitroderiváty s nitroskupinou v poloze *meta* (IC₅₀ = 0,16 μ mol/ml) a s nitroskupinou v poloze *para* (IC₅₀ = 0,14 μ mol/ml) [40].

3.1.4 Antituberkulotický účinek

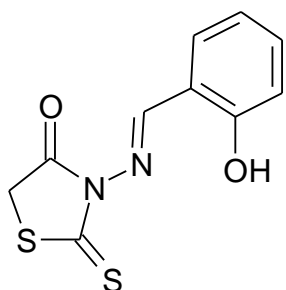
Mycobacterium tuberculosis je jedním z nejvýznamnějších bakteriálních původců lidských infekčních onemocnění. Z globálního pohledu jsou zřetelné rozdíly v incidenci tuberkulózy ve vyspělém světě a rozvojových zemích. Zatímco ve vyspělých zemích byla mortalita postupně eliminována, v rozvojových zemích zůstává incidence, stejně jako mortalita tuberkulózy vysoká a má nadále vzestupný charakter. Přes značnou snahu zlepšit epidemiologickou situaci plošnou aktivní imunizací, zůstává ze socioekonomických důvodů tuberkulóza značnou hrozbou. Ovšem také ve vyspělých zemích je otázka tuberkulózy v důsledku migrace obyvatel z rozvojových zemí stále aktuální. Existence multirezistentních

kmenů *M. tuberculosis* a nárůst imunodeficientních osob značně zhoršují celou situaci. Hledání nových antituberkulotik se tak stává nezbytností.

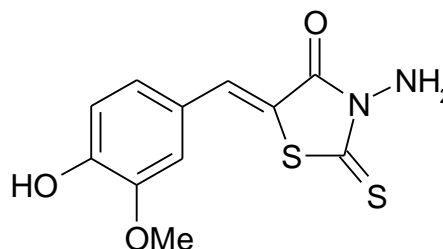
První zmínka o antimykobakteriálním působení rhodaninových derivátů byla publikována v roce 1958. Studovány byly deriváty aminorhodaninu, protože 3-amino-5-(4-pyridylmethyliden)rhodanin (**27**) lze považovat za vinylog isoniazidu. Ze studovaných sloučenin měly nejvýhodnější vlastnosti 3-[(2-hydroxybenzyliden)amino]rhodanin (**28**) a 3-amino-5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)rhodanin (**29**) [41].



27



28



29

Minimální inhibiční koncentrace 5-(2-hydroxybenzyliden)rhodaninu (**12**) a 5-(2-hydroxynaftyliden)rhodaninu (**13**) vůči *M. tuberculosis* H₃₇Rv byly 100 µg/ml a 98 µg/ml [33].

V poslední době jsou intenzivně studovány sloučeniny zasahující do syntézy mykobakteriální stěny. Buněčná stěna *M. tuberculosis* sestává ze tří typů makromolekul. Vnější část tvoří molekuly mykolové kyseliny, velké rozvětvené mastné kyseliny, obsahující 70 – 90 atomů uhlíku. Na ni je esterovou vazbou vázán arabinogalaktan (AG), polymer D-galaktofuranosy a D-arabinofuranosy.

Arabinogalaktan je prostřednictvím disacharidu α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-N-acetylglukosaminosyl-1-fosfátu spojen se zbytkem muramové kyseliny peptidoglykanu, jež tvoří vnitřní část buněčné stěny. Toto strukturální uspořádání buněčné stěny naznačuje důležitost rhamnosylových zbytků pro připojení arabinogalaktanu k peptidoglykanu, a tedy jejich esenciální roli v syntéze buněčné stěny *M. tuberculosis*. Enzymy, označované jako Rm1A až Rm1D, které katalyzují syntézu dTDP-L-rhamnosy z α -D-glukoso-1-fosfátu a dTTP, jsou proto vhodným cílem zásahu potenciálních antituberkulotik. Dalším vhodným cílem zásahu proti bakteriálnímu růstu by mohl být enzym rhamnosyltransferasa, jež využívá dTDP-L-rhamnosy jako substrátu pro rhamnosylové zbytky přenášené k arabinogalaktanu. Přesto však má cílení účinku směrem k inhibici enzymů Rm1A až Rm1D některé výhody. Krystalová struktura těchto enzymů získaných z bakterií je nejbližší enzymům Rm1A až Rm1D přítomných v *M. tuberculosis*. Další výhodou je, že pro jeden z těchto enzymů – Rm1B – byly vypracovány detailní studie jeho působení.

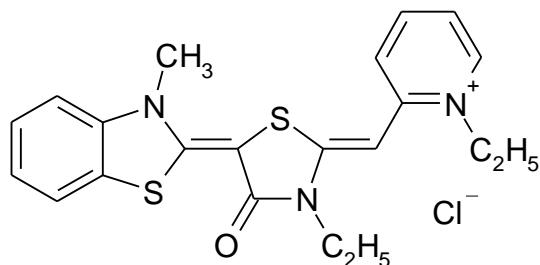
Při vývoji biologického testu pro sledování aktivity výše zmíněných enzymů bylo testováno celkem 8000 různých sloučenin, z nichž jedenáct inhibovalo použité enzymy v 10 μ M koncentraci. Z těchto jedenácti obsahovaly tři rhodaninový kruh. Dva z rhodaninových derivátů byly z celého souboru hodnocených látek nejúčinnější a vykazaly inhibiční aktivitu jak proti enzymům Rm1B a Rm1D (jeden dokonce i proti Rm1C), tak proti celé buňce *M. tuberculosis* (MIC = 64 a 16 μ g/ml). Jejich přesná struktura není v publikaci uvedena [42].

3.1.5 Antimalarický účinek

Malárie je nejvážnějším parazitárním onemocněním tropického a subtropického pásma. V důsledku globálního oteplování však mohou být malárií ohroženi i obyvatelé mírného pásma. Situaci navíc komplikuje rezistence plazmodií na současná chemoterapeutika. Hledání nových antimalarik s odlišným mechanismem účinku se tak stává celosvětovou záležitostí.

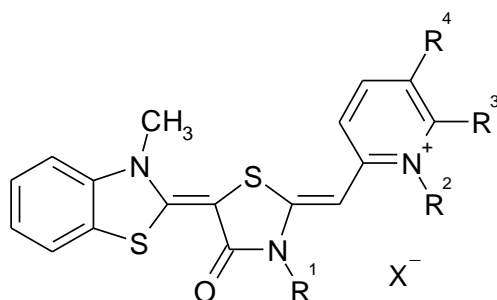
Antimalarická aktivita byla *in vitro* objevena u rhodacyaninových barviv, konkrétně u látky MKT-077 (**30**). Tato sloučenina vykazovala silnou antimalarickou aktivitu proti erytrocytárnímu stádiu *Plasmodium falciparum* ($EC_{50} = 7.10^{-8}$ M) a

nízkou cytotoxicitu. Na základě těchto poznatků lze říci, že by mohla být téměř tak účinná jako tradiční antimalarika chlorochin ($EC_{50} = 1,8 \cdot 10^{-8}$ M) a chinin ($EC_{50} = 1,1 \cdot 10^{-7}$ M). Kromě antimalarického účinku vykazuje tato sloučenina antikarcinogenní účinek [43].



30

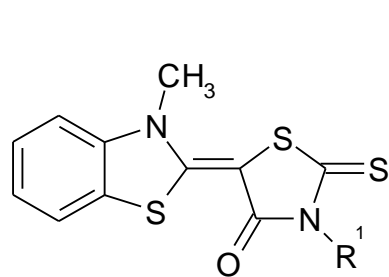
Rhodacyaninová barviva **31** se skládají ze tří lineárně spojených heterocyklických kruhů, přičemž dva krajní heteroaromatické obklopují prostřední thiazolidinový. Jedná se o konjugované systémy složené ze dvou odlišných jednotek, neutrálního merocyaninu a kationického cyaninu [43].



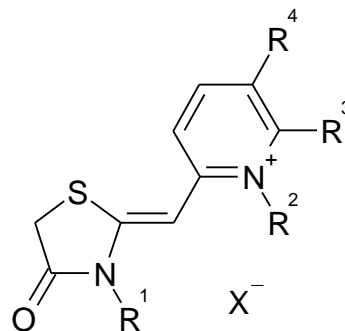
31: $R^1 = C_2H_5, CH_2Ph, (CH_2)_4CO_2H$; $R^2 = CH_3, (CH_2)_2OH, (CH_2)_4CO_2H$
 $R^3 = H, \text{fenyl}$; $R^4 = H$ nebo $R^3, R^4 = (CH)_4$; $X = Cl, Br, OH$

Antimalarická aktivita těchto sloučenin byla hodnocena *in vitro* proti *P. falciparum* a jejich cytotoxicita testována na myších nádorových buňkách (FM3A). Selektivní cytotoxicita pak byla definována na základě poměru hodnot EC_{50} pro FM3A a EC_{50} pro *P. falciparum*.

Velmi nízká aktivita samotné merocyaninové složky a slabá antimalarická aktivita samotného cyaninu ($EC_{50} = 5,1 \cdot 10^{-7}$ M) dokázaly, že nezbytnou podmínkou významnějšího antimalarického účinku je přítomnost všech tří heterocyklických kruhů v molekule.



merocyanin



cyanin

Bylo zjištěno, že analog MKT-077, který má na pyridinovém dusíku methyl, má vyšší antimalarickou aktivitu ($EC_{50} = 2,6 \cdot 10^{-8}$ M) než předlohová látka, jež má na dusíku pyridinového cyklu vázán ethyl. Barviva s pyridinioovým dusíkem v poloze 4 jsou stejně účinná jako analogické deriváty s dusíkem v poloze 2.

Cytotoxicitu těchto rhodacyaninových barviv významně ovlivňuje charakter substituentu vázaného na dusík thiazolidinového kruhu. Náhradou ethylu methylem nebo benzylem došlo k výraznému zvýšení toxicity, zatímco antimalarická aktivita jen mírně poklesla. Naopak *N*-allylrhodacyaniny vykázaly nízkou toxicitu ($EC_{50} = 1,2 \cdot 10^{-5}$ M) a silný antimalarický účinek ($EC_{50} = 1,2 \cdot 10^{-8}$ M).

Účinnost rhodacyanových barviv zásadně ovlivňují hydrofobně-hydrofilní vlastnosti molekuly. Zavedení hydrofilních skupin má za následek výrazný pokles antimalarického účinku. Přítomnost hydrofobních aromatických zbytků v molekule zapříčiňuje zvýšení cytotoxicity, antimalarický účinek však zůstává nezměněn. Z těchto poznatků vyplývá, že k dosažení optimálního antimalarického účinku je nutná určitá rovnováha mezi hydrofilitou a hydrofobicitou dané molekuly [43].

3.1.6. Insekticidní účinek

Jak již bylo zmíněno, aminorhodaniny **20**, **21** a **22** vykazují vedle antifungálního účinku i silný účinek insekticidní. Testování insekticidního účinku bylo provedeno na dospělých hmyzu *Culex pipiens pallens* a *Musca domestica*. Jako pozitivní kontrola byl použit fenitrothion, který způsobuje 100% úhyn hmyzu již v dávce 0,008 μ g/hmyzího jedince.

Kromě aminorhodaninu (**20**), byly testování podrobeny *N*-acetyl- (**21**) a *N*-benzoyl- (**22**) deriváty a rhodanin. Nejsilnější účinek z uvedených sloučenin vykázal aminorhodanin, i když mnohem slabší než fenitrothion. Naproti tomu ani jeden z *N*-acylovaných derivátů aminorhodaninu nebyl účinný, a to ani ve vysoké dávce 5,0 µg/hmyzího jedince. Tato skutečnost poukazuje na nezbytnost volné aminoskupiny pro daný účinek. Také rhodanin byl v dávce 5,0 µg/hmyzího jedince neúčinný, z čehož lze usuzovat na to, jak důležitá je přítomnost aminoskupiny pro insekticidní účinek [36].

3.1.7 Antikarcinogenní účinek

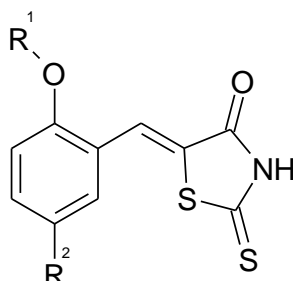
3.1.7.1 Inhibitory protein:tyrosinfosfatas (PTP)

Protein:tyrosinfosfatas tvoří rodinu klíčových regulačních enzymů, které defosforylují fosforylované tyrosinové zbytky v proteinových substrátech. Tyto enzymy regulují buněčné procesy zahrnující růst, proliferaci, diferenciaci, metabolismus, imunitní odpověď, mezibuněčnou adhezi a komunikaci s matrix. Porucha jejich funkce je spojena s různými onemocněními, například rakovinou, neurologickými chorobami, diabetem. Jejich inhibice by proto mohla významně napomoci léčbě těchto onemocnění. Mezi protein:tyrosinfosfatas řadíme jaterní tyrosinfosfatas (PRL-1, PRL-2, PRL-3) [44] a fosfatas s duální specifitou (DSP) [45].

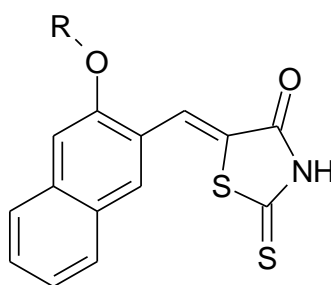
a) Inhibitory enzymu PRL-3

Enzym PRL-3 byl identifikován jako enzym, který má spojitost s tvorbou metastáz. Zvýšená exprese genu pro PRL-3 byla nalezena v transformující se lidské zárodečné buňce ledvin a v jaterních metastázách kolorektálního karcinomu. Dále bylo zjištěno, že PRL proteiny podporují pohyblivost buňky, invazivitu a vznik metastáz. Enzym PRL-3 tak není pouze možným diagnostickým markerem, ale též slibným cílem terapeutického zásahu. Dosud je znám pouze jediný inhibitor PRL enzymů s antikarcinogenním účinkem – pentamidin.

Mezi rhodaninovými deriváty však byly nalezeny látky schopné enzym PRL-3 inhibovat. Jedná se o arylmethylidenrhodaniny odvozené od salicylaldehydu **32** a 3-hydroxynaftalen-2-karbaldehydu **33**.



32: $R^1 = \text{H, benzyl, 2-chlorbenzyl, 4-brombenzyl, 2-brombenzyl}$
 $R^2 = \text{H, Br, fenyl, benzofuran-3-yl, benzo}[b]\text{thiofen-3-yl}$



33: $R = \text{benzyl, 4-fenylbenzyl, 2-chlor-6-fluorbenzyl}$

Ve skupině salicylidenrhodaninů měl základní derivát ($R^1 = \text{H}$ a $R^2 = \text{Br}$) $\text{IC}_{50} = 9,5 \mu\text{M}$. Náhrada fenolické skupiny v poloze 2 benzyloxyskupinou vedla k významnému zvýšení inhibiční aktivity ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$). Chlorace nebo bromace benzyloxyskupiny vedla k dalšímu zvýšení inhibiční aktivity. Hodnota IC_{50} pro 2-chlorderivát byla $2,4 \mu\text{M}$, v případě analogu s 2-brombenzylem pak dokonce $0,9 \mu\text{M}$, což vypovídá o téměř 60násobně silnějším účinku v porovnání s pentamidinem jako referenční látkou ($\text{IC}_{50} = 53,6 \mu\text{M}$). Redukcí dvojně vazby se aktivita jen mírně snížila ($\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{M}$). Náhradu bromu v poloze 5 benzofuran-3-ylem ($\text{IC}_{50} = 1,2 \mu\text{M}$) a benzo[*b*]thiofen-3-ylem ($\text{IC}_{50} = 0,9 \mu\text{M}$) rovněž vedla k silně účinným sloučeninám. Naopak náhrada bromu v poloze 5 vodíkem, *N*-methylace rhodaninového kruhu nebo záměna rhodaninového kruhu thiazolidionem mají za následek ztrátu účinku.

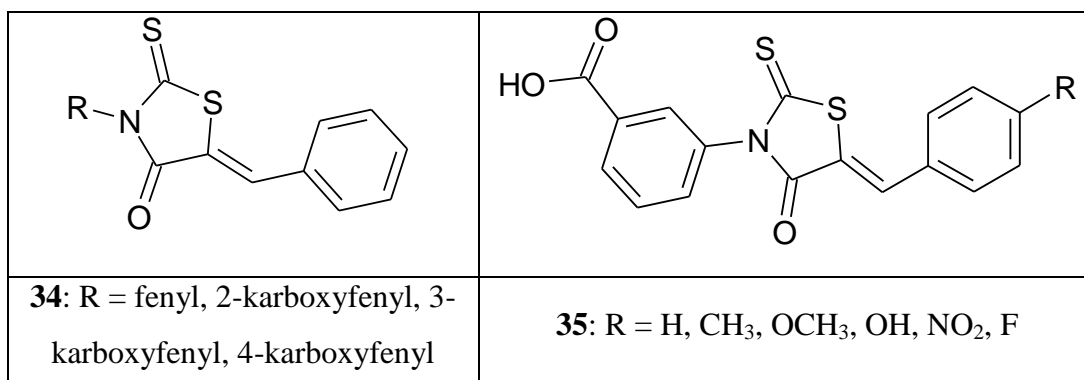
Naftylidenrhodaniny vykázaly účinek srovnatelný se salicylidenrhodaniny. Hodnoty IC_{50} derivátů naftylidenové řady se pohybovaly mezi 3,1 - 1,7 μM v závislosti na lipofilitě substituentu R. Se vzrůstající lipofilitou substituentu R se rovněž zvyšovala účinnost příslušných látek.

Ze znalosti struktury proteinu PRL-1 byly vyvozeny určité obecné předpoklady pro interakci rhodaninových derivátů s PRL proteiny. Anion vzniklý disociací sklabě kyselé NH-skupiny rhodaninového kruhu napodobuje negativně nabitě substráty těchto enzymů a pravděpodobně tato část molekuly směřuje sloučeninu k určitému místu aktivního centra enzymu obklopenému pozitivně nabitými skupinami aminokyselin. Proto *N*-methylace rhodaninového kruhu má za následek ztrátu aktivity. Zjištění, že okolí aktivního centra enzymu má vysoce hydrofobní charakter, odpovídá poznatku, že aktivita rhodaninových derivátů se zvyšuje se vzrůstající hydrofobicitou substituentů v molekule [44].

b) *Inhibitory enzymu JSP-1*

Enzym JSP-1 se řadí mezi fosfatasy s duální specifitou (DSP), jež jsou podtřídou protein:tyrosinfosfatas (PTP). Jejich název vyplývá z jejich schopnosti hydrolyzovat esterovou (fosfátovou) vazbu jak na tyrosinovém, tak i serinovém či threoninovém zbytku. Substrátová specifita enzymu JSP-1 zatím nebyla objasněna. Látky schopné inhibovat JSP-1 by však mohly poskytnout nové možnosti léčby různých zánětlivých a proliferativních onemocnění.

Schopnost inhibovat enzym JSP-1 byla hodnocena u sloučenin obecného vzorce **34** a **35**.



Studie vztahu struktury a účinku se soustředily na modifikaci fenylu na N-3, benzyldenového substituentu a samotného rhodaninového kruhu. Bylo zjištěno, že nezbytnou podmínkou účinku je přítomnost kyselé funkční skupiny na fenylu vázaném na dusíku rhodaninového kruhu. V případě nesplnění tohoto požadavku vznikají inaktivní sloučeniny. Účinnost je však značně závislá též na poloze kyselé funkční skupiny. Sloučeniny s karboxylovou skupinou v poloze *meta* jsou třikrát účinnější než ty s karboxylovou skupinou v poloze *para*. Substitucí *ortho* polohy fenylu dochází k výraznému zeslabení až ztrátě inhibiční aktivity, patrně v důsledku omezení otáčivosti kolem vazby C-N.

Naopak navázání karboxylové skupiny do jakékoli polohy benzyldenového substituentu má za následek ztrátu účinku. Sloučeniny, v nichž je benzylden substituován slabými elektron-akceptorovými až elektron-donorovými funkčními skupinami vykazují jen mírný účinek ($IC_{50} = 157 - 16 \mu M$). Z hodnot IC_{50} je patrné, že byly slabšími inhibitory než sloučeniny obsahující nesubstituovaný benzylden ($IC_{50} = 7 \mu M$). Naproti tomu analogy se silnými elektron-akceptorovými skupinami vykazaly nejsilnější inhibiční účinek. Příkladem jsou 4-nitro- ($IC_{50} = 2,6 \mu M$) a 4-fluoranalogy ($IC_{50} = 1,3 \mu M$).

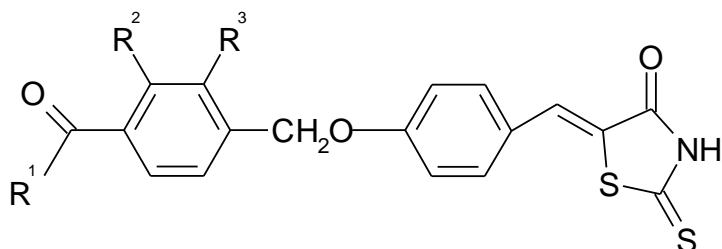
Jakákoli obměna heteroatomu rhodaninového kruhu vedla k látkám neschopným inhibice JSP-1 [45].

3.1.8 Jiné účinky

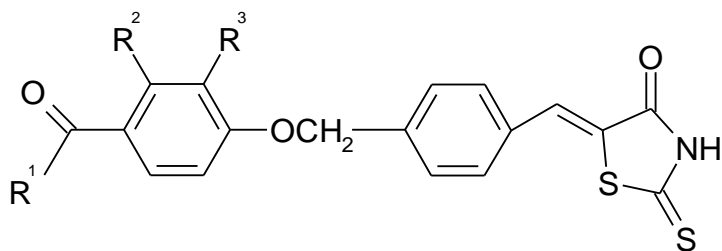
Z ostatních aktivit rhodaninových derivátů je zajímavé **inhibiční působení na kathepsin D**. Kathepsin D je lysosomální proteolytický enzym patřící do rodiny pepsinu. Je zapojen do mnoha chorobných procesů, například Alzheimerovy choroby, nádorových onemocnění a destrukce kloubu. Studie ukazují, že za určitých okolností dochází působením kathepsinu D k proteolytickému štěpení amyloidového prekurzorového proteinu (APP) na fragment, který tvoří významnou součást senilních plaků u Alzheimerovy nemoci. Tento poznatek odpovídá nálezům značné imunoreaktivity kathepsinu D v senilních placích přítomných v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou. Nadprodukce kathepsinu D nádorovými buňkami by mohla být zodpovědná za progresi maligního onemocnění. Kathepsin D dále vykazuje fibrinolytickou aktivitu a

ovlivňuje účinky *insulin-like growth faktoru* (ICF) změnou struktury nebo funkce *insulin-like growth faktor binding proteinu* 3.

Inhibiční účinek vůči kathepsinu D byl objeven u rhodaninových derivátů **36** a **37**.



36: $R^1 = \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5$; $R^2 = \text{H}, \text{OH}$; $R^3 = \text{H}, \text{C}_3\text{H}_7$

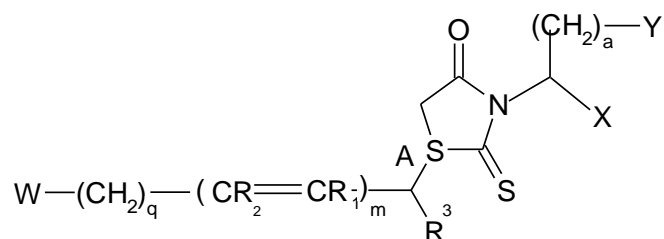


37: $R^1 = \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5$; $R^2 = \text{H}, \text{OH}$; $R^3 = \text{H}, \text{C}_3\text{H}_7$

Nejúčinnější inhibitory byly nalezeny ve skupině benzofenonových derivátů. Pro účinek je dále nezbytná přítomnost hydroxylové skupiny, propylu a rhodaninového kruhu. Převrácení spojovacího řetězce mezi oběma benzenovými kruhy má jen malý vliv na schopnost těchto sloučenin inhibovat kathepsin D.

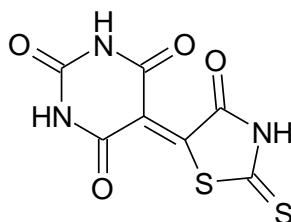
Rhodaniny byly studovány také jako potenciální **léčiva pro terapii a prevenci poruch kostního metabolismu**. U zdravého člověka jsou anabolické a katabolické procesy probíhající v kostech v rovnováze, tzn. aktivita osteoblastů a osteoklastů je vyrovnaná. Pokud však dojde k narušení této rovnováhy ve prospěch osteoklastů či neprospěch osteoblastů, dochází k redukcí kostní hmoty a následně k negativním změnám struktury a funkce kostí. V současné době používané inhibitory resorpce kosti – estrogény, kalcitonin, bifosfonáty – se používají především v léčbě poruch kostního metabolismu. Užívání těchto látek je však omezeno a navíc nevykazují požadovaný efekt u všech pacientů.

Zjistilo se, že deriváty rhodanin-3-karboxylové kyseliny **38** stimulují prostřednictvím receptoru pro parathormon syntézu cAMP a spouštějí tak kaskádu dějů vedoucí k syntéze kostní hmoty. Mohly by se proto používat zejména k terapii onemocnění, jejichž příčinou je narušená osteosyntéza, například osteoporóza nebo osteogenesis imperfecta. Lze je však podat též lokálně k podpoře regenerace kosti při hojení zlomenin a vhojování kostních implantátů či pseudoartróze. S ohledem na zmíněné vlastnosti by mohly nalézt uplatnění též v profylaxi osteoporózy. Dále by mohly být indikovány k terapii revmatoidní artritidy, osteoartritidy a degenerativní artrózy [47].



38: $m = 0 - 8$; $q = 0 - 8$; $a = 0 - 4$; A = jednoduchá nebo dvojná vazba; $R^1 = H$, alkyl; $R^2 = H$, alkyl; $R^3 = H$, alkyl; X = H, $-(CH_2)_b-COR^4$, kde $b = 0 - 4$; Y = H, $-COR^4$, fenyl, indolyl; $R^4 =$ hydroxyl, alkoxy, dialkylamino; W = heterocyklický zbytek

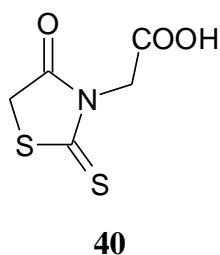
Neopomenutelným účinkem rhodaninových derivátů je jejich vliv na životní pochody rostlin. Již v roce 1973 byl patentován 5-(5-barbituryliden)rhodanin (**39**) jako algicidní látka [48].



39

Výrazný inhibiční vliv na tvorbu chlorofylu, klíčení a růst kořenů byl zaznamenán i u dalších derivátů rhodaninu, především u rhodanin-3-octové kyseliny (**40**) a aminorhodaninu (**20**). Podobně jako u antifungálního a insekticidního účinku došlo při

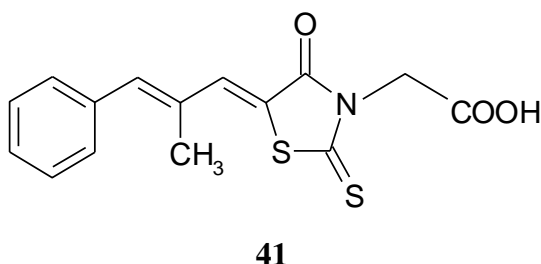
substituci aminoskupiny acylem (**21**, **22**) k výraznému snížení inhibiční aktivity [49, 50, 51].



Rhodaninové deriváty byly využity i při studiu nyktinastie u rostlin čeledi Fabaceae [52].

3.2. Současné využití rhodaninových derivátů

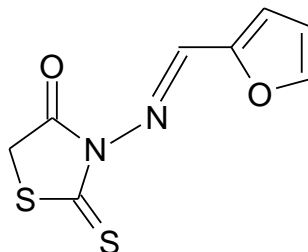
Z nepřeberného množství testovaných rhodaninů dosáhl terapeutického uplatnění pouze jeden jediný – epalrestat (**41**).



Užívá se **v prevenci chronických komplikací diabetu** (periferních neuropatií a retinopatie), neboť je schopen inhibovat aldosa reduktasu. Aldosa reduktasa je enzym, který přeměňuje aldosa na alditoly (glukosa na sorbitol). Při hyperglykemii se tvorba sorbitolu zvyšuje, jeho koncentrace uvnitř buněk vzrůstá a vede k jejich edému. Zadržování vody v oční čočce omezuje její transparentnost a vzniká katarakta. Stejně postižení Schwanových buněk a neuronů má za následek nervové poruchy. Přípravky obsahující epalrestat jsou však registrovány pouze v Japonsku [2, 53].

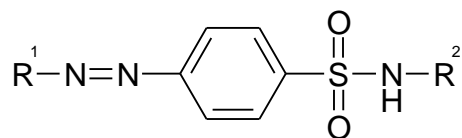
Schopnosti rhodaninů vytvářet komplexy s různými kovy se využívá **v analytické chemii**. Z této vlastnosti se vycházelo rovněž při konstrukci **membránového senzoru potenciometrické elektrody**. Příměs 3-[(2-furylmethyliden)amino]-rhodaninu (**42**) značně zvýšila selektivitu a citlivost k zinečnatým iontům.

Elektroda byla úspěšně použita pro důkaz zinečnatých iontů v odpadních vodách a jako indikační elektroda při titracích s EDTA [54].



42

Azobarviva obsahující rhodaninovou složku (**43**) se používají jako **antioxidační přísada** do oceli [55] a některé rhodaninové deriváty jsou v literatuře zmiňovány jako **vulkanizační činidla** pro různé druhy gum [22].



43

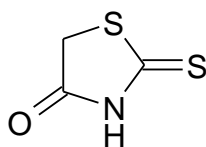
4. METODICKÁ ČÁST

4.1. Vlastnosti rhodaninu

Rhodanin (**42**) lze připravit různými postupy:

- reakcí kyseliny chloroctové s amonium-thiokyanátem
- reakcí ethyl-chloracetátu a amonium-dithiokarbamátem v ethanolu za přítomnosti HCl
- sycením roztoku ethanolického roztoku thioglykolové kyseliny a kalium-thiokyanátu plynným chlorovodíkem
- cyklizací thiokarbamoylthioglykolové kyseliny za různých reakčních podmínek

Podrobnější údaje lze nalézt v literatuře [3].



42

Databáze Beilstein [51] uvádí pro rhodanin tyto vlastnosti :

M.h. = 133,18

Název: 2-thioxothiazolidin-4-on

Sumární vzorec: C₃H₃NOS₂

Pomocí programu CS ChemOffice 7.0 (Cambridge Soft, USA) byly vypočteny následující charakteristiky:

Elementární analýza: C 27,05; H 2,27; N 10,52; O 12,01; S 48,15

Log P: 0,26; Clog P: -0,431

Další experimentálně stanovené i vypočítané fyzikálněchemické hodnoty a spektrální údaje s odkazy na původní zdroj je možné najít v Chemical Abstracts s využitím programu SciFinder Scholar™ 2006, např.

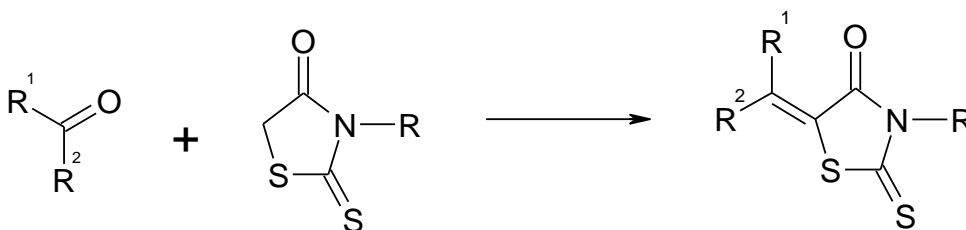
Teplota tání: 170 °C

pKa: 5,20 ± 0,10

4.2. Reaktivita rhodaninu

Rhodanin je velmi reaktivní a poskytuje celou řadu reakcí. Díky přítomnosti aktivní CH₂ 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 – viz schéma I.

Schéma I: Kondenzace rhodaninu a *N*-3-substituovaných rhodaninů s karbonylovými sloučeninami:



R = H, alkyl, aryl, amino, hydroxyalkyl, karboxyalkyl, aminoalkyl aj.; R¹, R² = H, alkyl

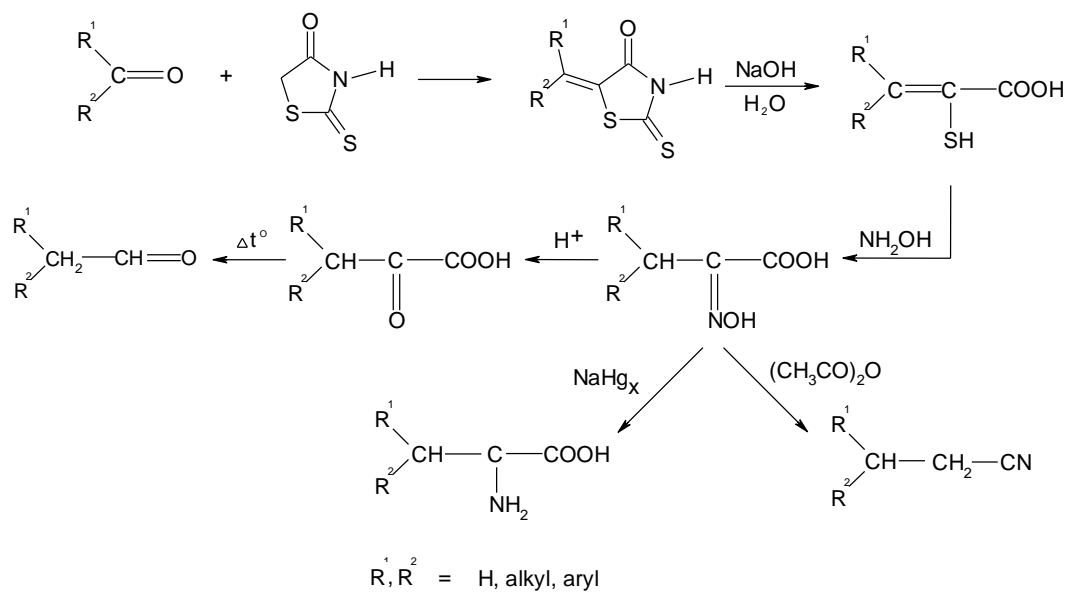
Tyto reakce se uskutečňují dvěma postupy. Buď v kyselém prostředí, kdy se aldehyd a rhodanin rozpustí v kyselině octové a směs se několik hodin vaří s ekvivalentním množstvím octanu sodného a acetanhydridu, nebo alkalickém, kdy se kondenzace katalyzuje směsí chloridu amonného a amoniaku ve vodně-alkoholickém roztoku. Druhý způsob je šetrnější a pro kondenzaci ketonů s rhodaninem se dokonce žádný jiný nedoporučuje.

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 ze schématu II, lze Gränacherovu syntézu využít k přípravě homologických aldehydů, nitrilů, aminokyselin a ketokyselin [18].

V posledních letech byla publikována řada modifikací základních postupů pro kondenzaci rhodaninu s karbonylovými sloučeninami, např. metodami kombinatoriální chemie [52], s využitím mikrovlnného záření [53] nebo pomocí katalyzátorů fázového přenosu [24].

Schéma II: Gränacherova syntéza



5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemická část

Pro kondenzaci byly použity komerčně dostupné výchozí sloučeniny:

- vanilin BP 80 (Zdravotnické zásobování)
- benzaldehyd, čistý (VEB Laborchemie)
- salicylaldehyd, p. a. (Reachim)
- 3-hydroxybenzaldehyd pro syntézu (Merck)
- 4-hydroxybenzaldehyd pro syntézu (Merck)
- rhodanin, puriss. p. a. (Fluka)

Sloupcové chromatografie byly prováděny „flash“ technikou za použití akvarijního motorku jako přetlaku.

TLC chromatografie byla prováděna na Silufolu UV 254 (Kavalier Votice). Jako mobilní fáze byla používána směs benzín + ethyl-acetát 60:40 (v/v).

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

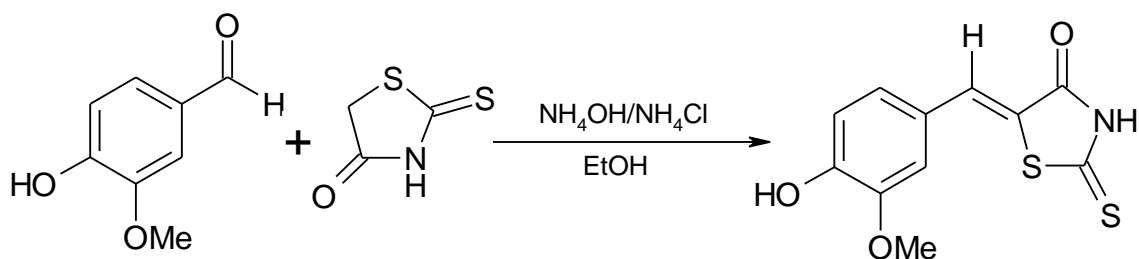
Mobilní fáze: methanol + voda 70:30 (v/v), průtok 0,9 ml/min, nástřik 30 μl

Detekce: Waters Photodiode Array Detector 2996, 210 nm

IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET IMPACT 400. Vlnočty jsou uváděny v cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-V_xBB 300. Chemické posuny jsou uváděny v δ , ppm a interakční konstanty J v Hz.

5.1.1 Příprava 5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 2,28 g (0,015 mol) vanilinu, 2,00 g (0,015 mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na $80\text{ }^\circ\text{C}$ a reakční směs byla zahřívána do varu 5 hodin. Po zchlazení byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 3,01 g (75 %) surového produktu. Pro analýzu byla sloučenina překrystalována z bezvodého ethanolu.

Molekulová hmotnost: 267,32

Vzhled: žlutá, jemně krystalická látka

Teplota tání: $233 - 234\text{ }^\circ\text{C}$

Teploty tání uvedené v literatuře:

- $227 - 228\text{ }^\circ\text{C}$ /konfigurace neuvedena, aceton/ [59]

Elementární analýza:

| | % C | % H | % N | % S |
|-------------------|-------|------|------|-------|
| Vypočteno: | 49,42 | 3,39 | 5,24 | 23,99 |
| Nalezeno: | 49,46 | 3,17 | 5,24 | 22,56 |

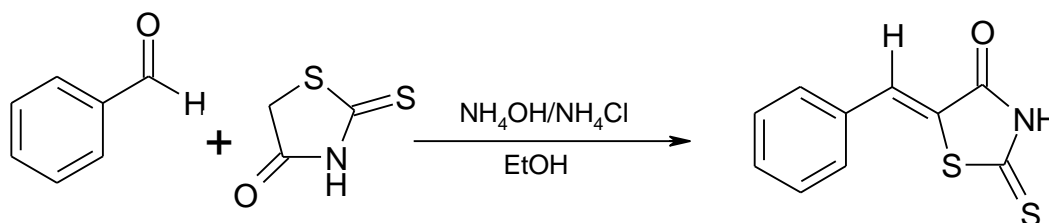
Čistota: 99,87 %

IČ spektrum (KBr): 3340(OH); 3269 (NH); 1714 (C=O); 1240 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,09 (1H, bs, OH); 7,56 (1H, s, CH); 7,14 (1H, d, *J* = 2,1, H-2); 7,07 (1H, dd, *J* = 8,4 a 2,1, H-6); 6,92 (1H, d, *J* = 8,4, H-5); 3,82 (3H, s, OCH₃)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): δ 195,7; 169,7; 150,2; 148,3; 133,0; 125,3; 124,6; 121,3; 116,6; 114,5; 55,8

5.1.2 Příprava 5-benzyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 1,59 g (0,015 mol) benzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 5 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 2,16 g (65 %) surového produktu. Pro analýzu byla sloučenina překrystalována z bezvodého ethanolu.

Molekulová hmotnost: 221,30

Vzhled: žlutá, krystalická látka

Teplota tání: 206 – 207 °C

Teploty tání uvedené v literatuře:

- 208 – 210 °C /Z-izomer, ethanol/ [60]
- 199 – 200 °C /konfigurace neuvedena, ethanol-voda/ [61]
- 204 – 205 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/ [62]
- 204 – 205 °C /konfigurace neuvedena, methanol/ [63]

Elementární analýza:

| | % C | % H | % N | % S |
|-------------------|-------|------|------|-------|
| Vypočteno: | 54,27 | 3,19 | 6,33 | 28,98 |
| Nalezeno: | 54,03 | 3,13 | 6,35 | 26,42 |

Čistota: 99,90 %

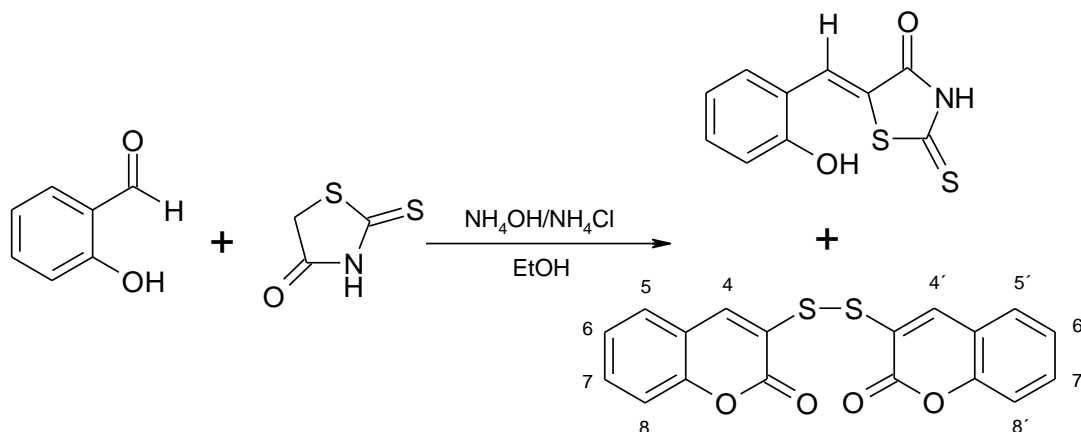
ÍČ spektrum (KBr): 3154 (NH); 1700 (C=O); 1236 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7,63 (1H, s, CH); 7,61 – 7,45 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): δ 195,9; 169,6; 133,2; 131,9; 131,0; 130,7; 129,7; 125,7

5.1.3 Příprava 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thio-1,3-thiazolidin-4-onu

Při této reakci docházelo k tvorbě vedlejšího produktu:



Pro získání čistého 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu bylo nutné reakci několikrát opakovat a produkt oddělit z reakční směsi chromatograficky.

5.1.3.1 Příprava 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu I.

Směs 1,83 g (0,015 mol) 2-hydroxybenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 5 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 1,58 g směsi žlutých (T. t. = 207 – 219 °C) a oranžových (T. t. = 218 – 229 °C) krystalů. Směs byla překrystalována z bezvodého ethanolu bylo získáno 0,11 g oranžového prášku (T. t. = 208 – 216 °C). Podle NMR spekter nebyl takto získaný vzorek čistý.

5.1.3.2 Příprava 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu II.

Směs 1,83 g (0,015 mol) 2-hydroxybenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 10 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 5 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 1,43 g směsi žlutých (T. t. = 205 – 218 °C) a oranžových (T. t. = 218 – 223 °C) krystalů. Směs byla překrystalována z bezvodého ethanolu bylo získáno 0,24 g (5 %) nažloutlých krystalů. Po změření fyzikálněchemických charakteristik byl produkt na základě srovnání s literaturou [64, 65] identifikován jako 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-on.

Molekulová hmotnost: 354,40

Vzhled: nažloutlá, jemně krystalická látka

Teplota tání: 249 – 250 °C

Teploty tání uvedené v literatuře:

- 225 – 226 °C /methanol/ [64, 65]

Elementární analýza:

| | % C | % H | % S |
|-------------------|-------|------|-------|
| Vypočteno: | 61,00 | 2,84 | 18,10 |
| Nalezeno: | 60,93 | 2,65 | 16,98 |

IČ spektrum (KBr): 1716 (C=O)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8,13 (2H, s, H-4 a H-4'); 7,73 (2H, d, *J* = 7,8, H-5 a H-5'); 7,57 (2H, t, *J* = 7,8, H-7 a H-7'); 7,44 (2H, d, *J* = 7,8, H-8 a H-8'); 7,32 (2H, t, *J* = 7,8, H-6 a H-6')

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): δ 158,8; 152,1; 137,2; 131,8; 128,2; 125,1; 123,5; 119,4; 116,3

5.1.3.3 Příprava 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu III.

Směs 1,83 g (0,015 mol) 2-hydroxybenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 5 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 3,20 g směsi žlutooranžové látky (T. t. = 207 – 230 °C). Při krystalizaci z bezvodého ethanolu bylo získáno 0,69 g nažloutlých krystalů, jejichž teplota tání (248 – 250 °C) odpovídá výše popsanému 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-onu.

Odpařením matečných louhů pak bylo získáno 2,03 g (57 %) žlutooranžového odparku (T. t. = 215 – 223 °C). Tento odparek byl spojen se vzorkem získaným postupem 3.3.3/I a matečnými louhy zbylými po přípravě 3.3.3/II a vzniklá směs byly podrobena chromatografickému dělení na sloupci.

Chromatografické podmínky:

Adsorbent: Silikagel 60 (0,040 – 0,063 mm) – 200 g

Objem frakce: 25 ml

Soustava:

frakce 1 – 22: benzín; frakce 23 – 60: benzín + diethylether 20:80

Požadovaný produkt ($R_f = 0,52$) byl obsažen převážně ve frakcích 41 – 55 a byl doprovázen malým množstvím 3-[(2-oxo-2H-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2H-1-benzopyran-2-onu ($R_f = 0,67$). Tyto frakce byly znovu podrobeny chromatografickému dělení:

Chromatografické podmínky:

Adsorbent: Silikagel 60 (0,040 – 0,063 mm) – 300 g

Objem frakce: 25 ml

Soustava: benzín + ethyl-acetát 60:40

Požadovaný produkt ($R_f = 0,50$) byl obsažen ve frakcích 35 – 73, jejichž odparek byl překrytalizován z bezvodého ethanolu a byl získán 1 g 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu.

Molekulová hmotnost: 237,30

Vzhled: žlutooranžová, krystalická látka

Teplota tání: 219 – 226 °C

Teploty tání uvedené v literatuře:

- 245 – 246 °C /Z-izomer; methanol/ [64, 65]
- 224 – 225 °C /E-izomer; chloroform/ [64, 65]
- 200 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/ [4]
- 220 °C /E-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/ [66]
- 197 – 198 °C /konfigurace neuvedena, methanol/ [63]
- 218 °C / konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/ [67]

Elementární analýza:

| | % C | % H | % N | % S |
|-------------------|-------|------|------|-------|
| Vypočteno: | 50,61 | 2,97 | 5,90 | 27,03 |
| Nalezeno: | 50,81 | 2,94 | 5,83 | 26,93 |

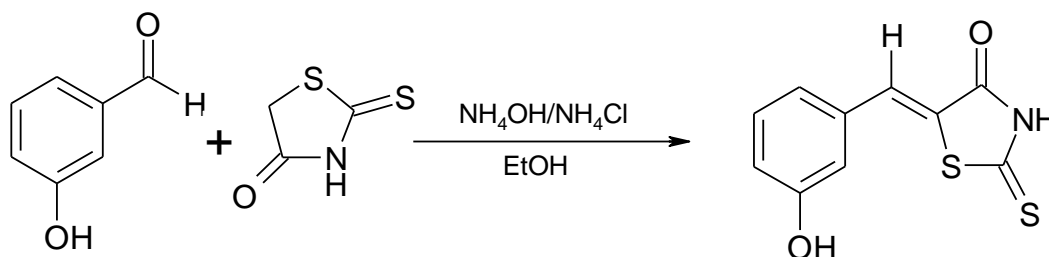
Čistota: 98,55 %

IČ spektrum (KBr): 3153 (NH); 1700 (C=O); 1238 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): δ 13,73 (1H, bs, NH); 10,66 (1H, bs, OH); 7,84 (1H, s, CH); 7,37 – 7,26 (2H, m, H-4 a H-6); 6,99 – 6,90 (2H, m, H-3 a H-5)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): δ 196,2; 169,8; 157,8; 133,0; 129,5; 127,5; 124,0; 120,2; 120,1; 116,4

5.1.4 Příprava 5-(3-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 1,83 g (0,015mol) 3-hydroxybenzaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 5 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 2,27 g (64 %) surového produktu. Pro analýzu byla sloučenina překrystalována z bezvodého ethanolu.

Molekulová hmotnost: 237,30

Vzhled: žlutooranžová, krystalická látka

Teplota tání: 244 – 251 °C

Teploty tání uvedené v literatuře:

- 253 – 255 °C /*E*-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/ [66]
- 240 – 245 °C /konfigurace neuvedena, methanol/ [63]
- 244 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/ [67]

Elementární analýza:

| | % C | % H | % N | % S |
|-------------------|-------|------|------|-------|
| Vypočteno: | 50,61 | 2,97 | 5,90 | 27,03 |
| Nalezeno: | 50,45 | 2,80 | 5,93 | 25,39 |

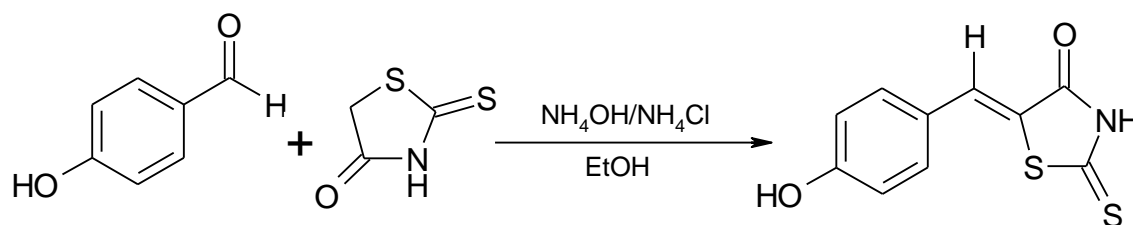
Čistota: 99,60 %

IČ spektrum (KBr): 3343 (OH); 3169 (NH); 1699 (C=O); 1211 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): δ 9,86 (1H, bs, OH); 7,53 (1H, s, CH); 7,32 (1H, t, *J* = 8,0, H-5); 7,06 – 7,01 (1H, m, H-6); 6,96 (1H, t, *J* = 1,9, H-2); 6,91 – 6,86 (1H, m, H-4)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): δ 196,0; 169,6; 158,2; 134,3; 132,1; 130,8; 125,5; 122,1; 118,3; 116,4

5.1.5 Příprava 5-(4-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 1,83 g (0,015mol) 4-hydroxybenzaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu

pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 5 hodin. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 2,76 g (78 %) surového produktu. Pro analýzu byla sloučenina překrystalována z bezvodého ethanolu.

Molekulová hmotnost: 237,30

Vzhled: oranžová, krystalická látka

Teplota tání: 294 – 295 °C

Teploty tání uvedené v literatuře:

- 276 – 278 °C /Z-izomer, ethanol/ [60]
- 293 – 295 °C /E-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/ [66]
- 285 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/ [15]
- 275 – 285 °C /konfigurace neuvedena, ethanol/ [61]
- 218 – 220 °C /konfigurace neuvedena, methanol/ [63]
- 275 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/ [67]

Elementární analýza:

| | % C | % H | % N | % S |
|-------------------|-------|------|------|-------|
| Vypočteno: | 50,61 | 2,97 | 5,90 | 27,03 |
| Nalezeno: | 50,42 | 2,91 | 5,82 | 25,94 |

Čistota: 99,92 %

IČ spektrum (KBr): 3393 (OH); 3145 (NH); 1688 (C=O); 1234 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,42 (1H, bs, OH); 7,55 (1H, s, CH); 7,50 – 7,41 (2H, m, AA', BB', H-2 a H-6); 6,95-6,87 (2H, m, AA', BB', H-3 a H-5)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): δ 195,7; 169,7; 130,6; 133,3; 132,7; 124,2; 121,1; 116,8

5.2 Hodnocení antifungální aktivity

Citlivost fungálních kmenů (*Candida albicans* ATCC 44859 – **CA**, *Candida tropicalis* 156 – **CT**, *Candida krusei* E 28 – **CK**, *Candida glabrata* 20/I – **CG**, *Trichosporon beigeli* 1188 – **TB**, *Aspergillus fumigatus* 231 – **AF**, *Absidia corymbifera* 272 – **AC** a *Trichophyton mentagrophytes* 445 – **TM**) na připravené látky byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou. Kmeny byly uchovávány na Sabouraudově dextrosové 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 mediu RPMI 1640 (Sevapharma), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,165 M 3-(*N*-morfolinyl)propansulfonové kyseliny (Sigma). Konečná koncentrace DMSO v testovacím mediu 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 (Pfizer) byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Minimální inhibiční koncentrace testovaných sloučenin

| KMEN | | TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹) | | | | | | |
|------|------|--|--------------|----------------|--------------|--------------|----------------|------------|
| | | <i>5.1.1</i> | <i>5.1.2</i> | <i>5.1.3.3</i> | <i>5.1.4</i> | <i>5.1.5</i> | <i>5.1.3.2</i> | <i>FLU</i> |
| CA | 24h | 500 | 125 | > 500 | > 500 | > 250 | 62,5 | 0,82 |
| | 48h | > 500 | > 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | 1,63 |
| CT | 24h | > 500 | > 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | 1,63 |
| | 48h | > 500 | > 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | > 417,90 |
| CK | 24h | > 500 | > 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | 52,24 |
| | 48h | > 500 | > 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | 104,47 |
| CG | 24h | > 500 | > 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | 13,06 |
| | 48h | > 500 | > 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | 52,24 |
| TB | 24h | 500 | 125 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | 3,26 |
| | 48h | > 500 | 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | 6,53 |
| AF | 24h | 125 | 62,5 | 250 | > 500 | > 250 | > 62,5 | > 417,90 |
| | 48h | 500 | 250 | > 500 | > 500 | > 250 | > 62,5 | > 417,90 |
| AC | 24h | 500 | 62,5 | 500 | > 500 | > 250 | 62,5 | > 417,90 |
| | 48h | 500 | 62,5 | > 500 | > 500 | > 250 | 62,5 | > 417,90 |
| TM | 72h | 125 | 31,25 | 125 | 500 | 250 | 62,5 | 26,12 |
| | 120h | 250 | 31,25 | 125 | 500 | 250 | 62,5 | 52,24 |

5.1.1 = 5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on

5.1.2 = 5-benzyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on

5.1.3.3 = 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on

5.1.4 = 5-(3-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on

5.1.5 = 5-(4-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on

5.1.3.2 = 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-on

6. DISKUSE

Kondenzační produkty rhodaninu s aldehydy se většinou připravují Knoevenagelovou kondenzací v ledové kyselině octové, v ethanolu nebo v toluenu za přítomnosti vhodného katalyzátoru [18]. V poslední době byly pro jejich přípravu publikovány i postupy s využitím mikrovlnného záření, na pevných fázích, bez použití rozpouštědel nebo ve vodném prostředí s použitím katalyzátorů fázové přenosu [24, 52, 53]. Ve své diplomové práci jsem používala reakční podmínky z diplomové práce J. Doležela [25, 26]. Ten se zabýval kondenzací rhodaninu s ketony a používal proto Gränacherovu syntézu katalyzovanou směsí amoniaku a amonium-chloridu. S výjimkou přípravy 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu jsem při kondenzaci rhodaninu s aldehydy v alkalickém prostředí nenarazila na žádné závažné problémy. Ve výše uvedeném případě vznikala směs dvou látek:

- 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.3.3)
- 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-on (5.1.3.2)

Vznik 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-onu (5.1.3.2) popsal poprvé Kandeel při kysele katalyzované kondenzaci rhodaninu s 2-hydroxybenzaldehydem [64, 65]. Je zajímavé, že ostatní autoři [4, 63, 66, 67], kteří se rovněž zabývali touto reakcí, vznik dimeru neuvádějí. Experimenty provedené v této diplomové práci však nejsou plně v souladu se závěry Kandeela [64, 65]. Kandeel uvádí, že při chromatografickém dělení směsi produktů získal dimer při použití čistého benzínu (destilační rozmezí 60 – 80 °C). V mém případě obvykle většina dimeru vykristalizovala již při chladnutí reakční směsi. Při chromatografickém dělení směsi obou látek se dimer benzínem ze sloupce neeluoval. Při použití soustavy benzín + diethylether 80:20, kterou Kandeel [64, 65] doporučuje pro eluci 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu, se látky eluovaly v tomto pořadí:

- 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-on: $R_f = 0,67$
- 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on: $R_f = 0,52$

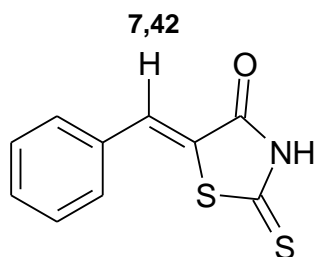
Vzhledem k malému rozdílu mezi R_f hodnotami nedošlo k dokonalému oddělení a chromatografii bylo nutné opakovat. Při opakovaném chromatografickém dělení

jsem použila soustavu benzín + ethyl-acetát 60:40. Frakce 29 -32 obsahovaly stopy 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-onu ($R_f = 0,62$), frakce 33 – 34 obsahovaly směs obou produktů a frakce 35 – 73 obsahovaly požadovaný 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on ($R_f = 0,50$). Z chromatografického dělení lze vyvodit tyto závěry :

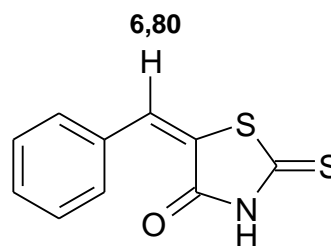
- Oddělení obou produktů lze provést buď v soustavě benzín + diethylether 80:20 nebo benzín + ethyl-acetát 60:40. Ani v jedné soustavě není rozdíl v R_f hodnotách výrazný a k dokonalému oddělení je třeba opakovaného dělení s následnou krystalizací frakcí obsahujících požadovaný 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on.
- Kandeel dále uvádí, že při chromatografii došlo k rozdělení 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu na *E* a *Z* izomer. Při svých experimentech jsem však v obou soustavách získala pouze *Z*-izomer (viz spektrální údaje).

Charakterizace produktů a ověření jejich čistoty bylo provedeno běžnými metodami (elementární analýza, HPLC, IČ spektra a NMR spektra). Ačkoliv výsledky elementární analýzy nebyly vždy v souladu s vypočtenými hodnotami, především v případě síry, výsledky HPLC analýzy ukazují, že produkty byly získány ve vyhovující čistotě (98,55 – 99,92 %). Také charakter spekter odpovídá literárním údajům [60, 64, 65].

Benzylidenrhodaniny mohou tvořit dvě izomerní formy:



Z-izomer



E-izomer

Podle většiny literárních údajů vzniká při syntéze *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 [46, 60, 68]. V NMR spektrech kalkulovaných pomocí programu CS ChemOffice 7.0 (Cambridge Soft, USA) je pro *Z*-izomery uváděna hodnota δ 7,42 a pro *E*-izomery δ 6,80 ppm. Ze srovnání experimentálně získaných ¹H-NMR posunů mnou připravených produktů s vypočítanými hodnotami a signály uváděnými v literatuře [46, 60, 68] vyplynulo, že všechny mnou připravené benzylidenrhodaniny byly získány jako čisté *Z*-izomery.

U produktů získaných v mé diplomové práci bylo již provedeno hodnocení antifungální aktivity. Testy byly provedeny na Katedře biologických a lékařských věd FaF UK v Hradci Králové. Z výsledků uvedených v tabulce 1 vyplývá, že kondenzační produkty rhodaninu s aldehydy nevykazují významně vyšší antifungální účinky než dříve připravené produkty kondenzace rhodaninu s ketony [25, 26]. Pouze v případě 5-benzyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.2) a 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-on (5.1.3.2) byla zaznamenána střední antifungální účinnost, tj. MIC = > 10 – 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ vůči *A. corymbifera* a *T. mentagrophytes*. Zajímavá je především inhibice růstu *A. corymbifera*, která patří mezi kmeny značně odolné proti účinkům antifungálních chemoterapeutik. MIC sloučenin 5.1.2 a 5.1.3.2 vůči tomuto patogenu byly podstatně nižší než MIC flukonazolu, který byl použit jako pozitivní kontrola. Hodnocení mnou připravených sloučenin na antimykobakteriální aktivitu a hodnocení jejich vlivu na fotosyntetické procesy v současné době probíhá a výsledky prozatím nejsou k dispozici.

7. ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem získala následující produkty:

- 5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 5-benzyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 5-(2-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 5-(3-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 5-(4-hydroxybenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-on

Všechny uvedené sloučeniny byly již dříve připraveny kondenzací rhodaninu s aldehydy většinou za použití směsi AcOH/AcONa jako katalyzátoru. V této diplomové práci byla kondenzace provedena s použitím směsi NH₄OH/NH₄Cl a bylo zjištěno, že i v alkalickém prostředí vzniká vždy *Z*-izomer.

Dále experimenty ukázaly, že reakce s aldehydy probíhá podstatně snadněji než kondenzace s ketony, a proto doporučuji zkrátit při syntéze dalších benzylidenrhodaninů reakční dobu.

V testech antifungální aktivity nebyla zjištěna významně výraznější účinnost oproti dříve připraveným produktům kondenzace rhodaninu s ketony. Dvě testované sloučeniny – 5-benzyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on a 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-on – vykazaly zajímavý inhibiční efekt vůči *A. corymbifera*.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. HARTL, J., PALÁT, K.: Farmaceutická chemie I. 2. přepracované.vyd. Karolinum, Praha 1998, s. 15.
2. BOYD, D. B.: On the rhodanines and their presence in biologically active ligands. *Theochem – J. Mol. Struct.* **1997**, 401, 227 – 234.
3. REDEMANN, C. E., ICKE, R. N., ALLEN G. A.: Rhodanine. In: *Org. Syntheses, Vol. 27*. Shiner, R. L. et al. (Edits.). John Wiley & Sons, Inc., New York, 1947, p. 73 – 76.
4. ZIPSER, A.: Über Kondensationsprodukte der Rhodaninsäure und verwandter Körper mit Aldehyden. *Monatsh. Chem.* **1902**, 23, 958 – 972.
5. ANDREASCH, R., ZIPSER, A.: Über substituierte Rhodaninsäuren und ihre Aldehydkondensationsprodukte. *Monatsh. Chem.* **1903**, 24, 499 – 518.
6. ANDREASCH, R., ZIPSER, A.: Über substituierte Rhodaninsäuren und deren Aldehydkondensationsprodukte. II. Mitteilung. *Monatsh. Chem.* **1904**, 25, 159 – 180.
7. ANDREASCH, R., ZIPSER, A.: Über substituierte Rhodaninsäuren und ihre Aldehydkondensationsprodukte. *Monatsh. Chem.* **1905**, 26, 1191 – 1208.
8. ANDREASCH, R.: Über substituierte Rhodaninsäuren und deren Aldehydkondensationsprodukte. *Monatsh. Chem.* **1906**, 27, 1211 – 1222.
9. ANDREASCH, R.: Über substituierte Rhodanine und deren Aldehydkondensationsprodukte. *Monatsh. Chem.* **1910**, 31, 785 – 795.
10. ANTULICH, O.: Über substituierte Rhodanine und deren Aldehydkondensationsprodukte. *Monatsh. Chem.* **1910**, 31, 891 – 895.
11. BUTSHER, E.: Über substituierte Rhodanine und deren Kondensationsprodukte mit Aldehyden und ketoartigen Körpern. XI. Mitteilung. *Monatsh. Chem.* **1911**, 32, 9 – 19.
12. NÄGELE, H.: Über substituierte Rhodanine und einige ihrer Aldehydkondensationsprodukte. *Monatsh. Chem.* **1912**, 33, 941 – 965.
13. STIEGER, K. H.: Zur Kenntnis der Rhodaninen, Parabansäuren und verwandter Körper. *Monatsh. Chem.* **1916**, 37, 635 – 658.

14. ANDREASCH, R.: Über substituierte Rhodanine und einige ihrer Aldehydkondensationsprodukte. XIII. Mitteilung. *Monatsh. Chem.* **1917**, *38*, 121 – 139.
15. ANDREASCH, R.: Über Aldehydderivate der Rhodanine und ihre Spaltungsprodukte. *Monatsh. Chem.* **1918**, *39*, 419 – 440.
16. GENDELMAN, L.: Über Aldehydderivate der Rhodanine und ihre Spaltungsprodukte. II. Mitteilung. *Monatsh. Chem.* **1923**, *43*, 537 – 543.
17. ANDREASCH, R.: Zur Kenntnis der Rhodanine und verwandter Verbindungen. *Monatsh. Chem.* **1928**, *49*, 122 – 132.
18. PLEŠEK, J., ZOBÁČOVÁ, A.: Preparativní reakce v organické chemii V. Aldolisace a příbuzné reakce. 1.vyd. Nakladatelství ČSAV, Praha 1960, s. 403 – 408.
19. BROWN, F. C. et al.: Rhodanine derivatives of ketones. *J. Org. Chem.* **1950**, *15*, 174 – 176.
20. GATTOW, G., RACH, W.: Über Chalkogenolate. 130. Untersuchungen über Rhodanine 1. Darstellung und Charakterisierung von Rhodanin und 5-Methylrhodanin. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1983**, *506*, 140 – 144.
21. GATTOW, G., KIEL, G., RACH, W.: Über Chalkogenolate. 131. Untersuchungen über Rhodanine 2. Kristall- und Molekülstruktur von 5-Methylrhodanin. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1983**, *506*, 145 – 152.
22. ENCHEV, V., CHORBADJIEV, S., JORDANOV, B.: Comparative study of the structure of rhodanine, isorhodanine, thiazolidine-2,4-dione, and thiorhodanine. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2002**, *38*, 1110 – 1120.
23. LESYK, R. B., ZIMENKOVSKY, B. S.: 4-Thiazolidones: centerian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *8*, 1547 – 1577.
24. 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(3)*, 17. Dostupné z URL: <http://www.chemistrymag.org/cji/2006/083017ne.htm>
25. DOLEŽEL, J.: Kondenzační produkty acetylpyrazinů s rhodaninem jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2004, 64 s.

26. DOLEŽEL, J. et al.: Syntéza derivátů rhodaninu jako potenciálních léčiv. Sborník příspěvků XXXIV. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno, 12. – 14. září 2005, s. 54.
27. KIEĆ-KONONOWICZ, K., SZYMAŃSKA E.: Antimycobacterial activity of 5-arylidene derivatives of hydantoin. *Farmaco* **2002**, *57*, 909 – 916.
28. SIM, M. M. et al.: Benzylidene rhodanine as novel inhibitors of UDP-N-acetylmuramate/L-alanine ligase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 697 – 699.
29. ZERVOSEN, A. et al.: Interaction between penicilin-binding protein (PBP) and two novel classes of PBP inhibitors, arylalkylidene rhodanines and arylalkylidene iminothiazolidin-4-ones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 961 – 969.
30. GRANT, B. E. et al.: The synthesis and SAR of rhodanines as novel class C β -laktamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2179 – 2182.
31. MALLICK, S. K. et al.: Synthesis and antimicrobial evaluation of some 5-(5-nitrofurylidene)rhodanines, 5-(5-nitrofurylidene)thiazolidine-2,4-diones, and their vinylogs. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 528 – 532.
32. FOYE, W. O., TOVIVICH, P.: N-glucopyranosyl-5-arylidenerhodanines: synthesis and antibacterial and antiviral activities. *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 1607 – 1611.
33. VAJPAI, R., TIWARI, B. M. L., TIWARI, K. S.: A comparative study of synthesis, characterization and applications of 5-(salicylidene)rhodanine and 5-(2-hydroxynaphtalidene)rhodanine. *Asian J. Chem.* **1999**, *11*, 414 – 419.
34. ORCHARD, M. D. et al.: Rhodanine-3-acetic acid derivatives as inhibitors of fungal protein mannosyl transferase 1 (PMT1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3975 – 3978.
35. HABIB, N. S. et al.: Synthesis and antimicrobial activity of rhodanine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 759 – 762.
36. INAMORI, Y. et al.: Insecticidal and antifungal activities of aminorhodanine derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1025 – 1027.

37. SING, W. T. et al.: Arylalkyliden rhodanine with bulky and hydrophobic functional group as selective HCV NS3 protease inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 91 – 94.
38. SUDO, K. et al.: Novel hepatitis C virus protease inhibitors: thiazolidine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *238*, 643 – 647.
39. DAYAM, R. et al.: β -Diketo acid pharmacophore hypothesis. 1. Discovery of a novel class of HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 111 – 120.
40. HASKELL, T. H. et al.: Neuraminidase inhibition and viral chemotherapy. *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 697 – 704.
41. STAINIER, C., LAPIERE, C. L.: Quelques dérivés de la rhodanine à action tuberculostatique in vitro. *Bull. Acad. R. Med. Belg.* **1958**, *23*, 335 – 345.
42. MA, Y. et al.: Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1407 – 1416.
43. TAKASU, K. et al.: Rhodacyanine dyes as antimalarials. 1. Preliminary evaluation of their activity and toxicity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 995 – 998.
44. AHN, J. H. et al.: Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives as PRL-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2996 – 2999.
45. Cutshall, N. S., O'Day, C., Prezhdo, M.: Rhodanine derivatives as inhibitors of JSP-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3374 – 3379.
46. 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.
47. ESSWEIN, A. et al.: *Rhodanine carboxylic acid derivatives for the treatment and prevention of metabolic bone disorders*. USA pat. US 6,673,816. Dostupné z URL: <http://www.freepatentsonline.com/>
48. KERST, A. F., DOUROS, J. D. JR., BROKL, M.: *Controlling algae with 5-(5-barbiturylidene)rhodanine*. USA pat. US 3,765,864 . Dostupné z URL: <http://www.freepatentsonline.com/>

49. INAMORI, Y. et al.: Phytogrowth-inhibitory activity of sulfur-containing-compounds. 1. Inhibitory activities of thiazolidine derivatives on plant-growth. *Chem. Pharm.Bull.* **1992**, *40*, 2854 – 2856.
50. MURO, C. et al.: Inhibitory activities of rhodanine derivatives on plant growth. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 1368 – 1371.
51. MURO, C. et al.: Effect of rhodanine and 2(5*H*)-thiophene in green algae and liverwort cells. *J. Pestic. Sci.* **1997**, *22*, 1 – 5.
52. 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.
53. ŠTURM, K. et al.: Permeability characteristics of novel aldose reductase inhibitors using rat jejunum in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 128 – 133.
54. BOYD, D. B.: On the rhodanine and their presence in biologically active ligands. *Journal of molecular structure (Teochem)* **1997**, *401*, 227 – 234.
55. ABDALLAH, M.: Rhodanine azosulpha drugs as corrosion inhibitors for corrosion of 304 stainless steel in hydrochloric acid solution. *Corrosion Sci.* **2002**, *44* 717 – 728.
56. CrossFire Beilstein 7.0 [databáze online]. Elsevier MDL. Dostupné z URL: http://www.mdli.com/products/knowledge/crossfire_beilstein/index.jsp.
57. LEE, C. L., SIM, M. M.: Solid-phase combinatorial synthesis of 5-arylalkylidene rhodanine. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5729 – 5732.
58. LÁCOVÁ, M. et al.: Effect of microwave irradiation on the condensation of 6-substituted 3-formylchromones with some five-membered heterocyclic compounds. *Molecules* **2000**, *5*, 167 – 178.
59. FISHER, H. E., HIBBERT, H.: Studies on lignin and related compounds. LXXXIII. Synthesis of 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 1208 – 1210.
60. KHODAIR, A. I.: A Convenient synthesis of 2-arylidene-5*H*-thiazolo[2,3-*b*]quinazoline-3,5[2*H*]-diones and their benzoquinazoline derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* **2002**, *39*, 1153 – 1160.
61. GAUDRY, R., McIVOR, R. A.: Synthèse des acides amines à partir de la rhodanine. *Can. J. Chem.* **1951**, *29*, 427 – 438.

62. CAMPAIGNE, E., CLINE, R. E.: Preparation and absorption spectra of some β -aryl- α -mercaptoacrylic acids and related disulfides. *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 32 – 38.
63. RAVAZZONI, C., VALERIO, R.: Plant growth substances. Substituted aryl thionictiolic acids and their oxidation and reduction derivatives. *Ann. Chim. (Rome)* **1962**, *52*, 305 – 312.
64. KANDEEL, K. A.: *E,Z*-5-Arylmethylene-4-oxo-2-thioxo-1,3-thiazolidine and 3,3'-dithiobis-2*H*-1-benzopyran-2-one derivatives and their reactions with some amines. *Bull. Pol. Acad. Sci. Chem.* **2001**, *49*, 213 – 223.
65. KANDEEL, K. A.: The behaviour of *E,Z*-5-arylmethylidene-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one and 3-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)dithio]-2*H*-1-benzopyran-2-one derivatives towards some amines. *Chem. Pap.* **2004**, *58*, 334 – 340.
66. GASHA M. et al.: Antimicrobial activity of 5-oxothiazolidine-2-thione and rhodanine derivatives. *Yakugaku Zasshi* **1972**, *92*, 490 – 497; cit. dle CrossRef Beilstein 7.0 [databáze online]. Elsevier MDL. Dostupné z URL: http://www.mdli.com/products/knowledge/crossfire_beilstein/index.jsp.
67. HYOZO, T. et al.: Chemotherapeutics for *Mycobacterium tuberculosis*. XI. Syntheses and antibacterial activity of 4-thiazolodinone derivatives containing α,β -unsaturated ketone group. 1. *Yakugaku Zasshi* **1956**, *76*, 154 – 157.; cit. dle *Chem. Abstr.* **1956**, *50*, 739.
68. OHISHI, Y. et al.: Preparations of 5-alkylmethylidene-3-carboxymethylrhodanine derivatives and their aldose reductase inhibitory activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1911 – 1919.