

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra anorganické a organické chemie**

**Diplomová práce**

**Modifikace antimykobakteriálně  
aktivních sulfonamidů**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Martin Kufa

## Poděkování

Děkuji svému školiteli PharmDr. Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D., za vedení práce a odbornou pomoc. Dále poděkování zasluží Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D., za podnětné rady a pomoc při řešení práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 13. 5. 2016

Martin Kufa

## Abstrakt

S narůstajícím problémem rezistence mykobakterií na současně používaná léčiva roste i význam výzkumu zabývajícího se hledáním nových antimykobakteriálně aktivních látek. Problémy s rezistencí se však týkají i bakterií a hub. Jednou z možností, jak přistoupit k tomuto problému, je obměna sloučenin se známou antimikrobiální aktivitou. Mezi takovéto sloučeniny patří i sulfonamidy, jejichž deriváty jsme připravili. Jedná se o amidy vzniklé reakcí příslušných chloridů kyselin a sulfathiazolu, substituované močoviny připravené reakcí s isokyanáty, které byly cyklizovány pomocí oxalyl chloridu za vzniku substituovaných 2,4,5-trioximidazolidinů.

Z látek testovaných na antimykobakteriální aktivitu se ukázal být nejúčinnější 4-[(2-fenylethyl)karbamoyl]amino}-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid, který měl vůči *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88 nižší hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC = 4  $\mu\text{mol/l}$ ) než sulfathiazol a u testovaných atypických mykobakterií (*M. avium* My 330/88, *M. kansasii* My 235/88 a *M. kansasii* My 6509/96) byly hodnoty MIC srovnatelné ( $\geq 2 \mu\text{mol/l}$ ). *M. kansasii* bylo výrazně citlivější než *M. avium*. Také amidy vykázaly signifikantní antimykobakteriální aktivitu, zejména vůči *M. tuberculosis*.

Dále byly nově připravené látky testovány na antibakteriální a antifungální aktivitu, modifikace výchozího sulfathiazolu však nevedla k významnému snížení hodnot MIC.

## Abstract

The importance of the searching for novel antimycobacterial active agents is continually increasing with growing mycobacterial resistance to currently used drugs. However, the resistance-related problems are also associated with other bacteria and fungi. The systematic modification of compounds with a known antimicrobial activity represents one of the possible approaches to overcome this problem. Sulphonamide derivatives may be considered to be such a kind of compounds. That is why we synthesized various sulphathiazole derivatives. Amides were obtained by the reaction of sulphathiazole with appropriate acyl chlorides, substituted ureas from corresponding isocyanates. These ureas were cyclized *via* oxalyl chloride to form substituted 2,4,5-trioxoimidazolidines.

Among derivatives evaluated for their antimycobacterial action, 4-(3-phenethylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzenesulphonamide showed the highest activity. Its minimum inhibitory concentrations (MIC) against *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88 (4  $\mu\text{mol/l}$ ) were superior to those obtained for sulphathiazole. In the case of nontuberculous mycobacteria (*M. avium* My 330/88, *M. kansasii* My 235/88 and *M. kansasii* My 6509/96), their activities were comparable ( $\geq 2$   $\mu\text{mol/l}$ ). Amides showed also a significant antimycobacterial activity, especially against *M. tuberculosis*.

All of the newly synthesized compounds were investigated for their antibacterial and antifungal activities. However, any modification of parent sulphathiazole did not lead to substantially decreased MIC values.

## Seznam zkratek

ACP	acyl carrier protein
AT	antituberkulotika
ATR	attenuated total reflectance (zeslabená úplná reflektance)
CT	výpočetní tomografie
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DMAP	4-( <i>N,N</i> -dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO-d <sub>6</sub>	deuterovaný dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid
ESBL	průkaz beta-laktamáz širokého spektra
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IČ spektroskopie	infračervená spektroskopie
MDR-TB	multirezistentní kmen tuberkulózy
MeCN	acetonitril
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
NTM	nontuberculous mycobacteria (atypické mykobakterie)
PABA	<i>para</i> -aminobenzoová kyselina
PAS	<i>para</i> -aminosalicylová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina

RTG	rentgenové
STS	sulfathiazol
TBC	tuberkulóza
TDR-TB	totálně rezistentní kmen tuberkulózy
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
T <sub>i</sub>	teplota tání
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	extenzivně lékově rezistentní kmen tuberkulózy

# Obsah

Obsah .....	8
1. Úvod.....	10
1.1 Mykobakterie.....	10
1.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	10
1.1.2 Atypické mykobakterie .....	10
1.2 Tuberkulóza.....	10
1.2.1 Zdroj a přenos infekce.....	10
1.2.2 Klinický obraz.....	11
1.2.3 Diagnostika.....	11
1.2.4 Terapie.....	11
1.2.5 Farmakoterapie .....	12
1.3 Rezistence.....	16
1.4 Sulfonamidy .....	17
1.4.1 Historie sulfonamidů .....	18
1.4.2 Mechanismus účinku.....	18
1.4.3 Zástupci sulfonamidů .....	19
2. Cíl práce.....	21
3. Přehled modifikací sulfathiazolu za účelem zvýšení jeho antimykobakteriální aktivity .....	22
4. Experimentální část .....	24
4.1 Obecná část.....	24
4.2 Přípravy .....	25
Chloridy kyselin.....	27
<i>N</i> -[4-(Thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-3-karboxamid (NI-STS) .....	28
<i>N</i> -[4-(Thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-4-karboxamid (IN-STS) .....	29
<i>N</i> -[4-(Thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid (PZ-STS) .....	30
4-[(Fenylkarbamoyl)amino]- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ph-STS) .....	31
4-[(Benzylnkarbamoyl)amino]- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ben-STS)..	32
4-[[2-Fenylethyl]karbamoyl]amino}- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (PhEt-STS).....	33
4-[(Cyklohexylkarbamoyl)amino]- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Cy-STS) .....	34
4-[[Adamantan-1-yl]karbamoyl]amino}- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ada-STS).....	35



<i>N</i> -(Thiazol-2-yl)-4-(2,4,5-trioxo-3-fenylimidazolidin-1-yl)benzensulfonamid (Ph-STS-Ox) .....	36
4-(3-Benzyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ben-STS-Ox) .....	37
<i>N</i> -(Thiazol-2-yl)-4-[2,4,5-trioxo-3-(2-fenylethyl)imidazolidin-1-yl]benzensulfonamid (PhEt-STS-Ox) .....	38
4-(3-Cyklohexyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Cy-STS-Ox) .....	39
4-(3-Adamantan-1-yl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ada-STS-Ox) .....	40
5. Biologická aktivita .....	41
5.1 Hodnocení antimykobakteriální aktivity .....	41
5.2 Hodnocení antibakteriální aktivity .....	41
5.3 Hodnocení antifungální aktivity .....	42
5.4 Výsledky biologického hodnocení .....	42
6. Diskuze .....	46
7. Závěr .....	49
8. Použitá literatura .....	50
9. Příspěvky na konferencích .....	53

# 1. Úvod

## 1.1 Mykobakterie

Jde o rod převážně tyčkovitých, nepohyblivých, nesporulujících, grampozitivních bakterií, které mají v buněčné stěně zvýšený obsah lipofilních látek. Díky složení buněčné stěny se tedy jedná o acidorezistentní mikroorganismy, dokazují se pomocí Ziehl-Neelsenova barvení. Jedná se o početnou skupinu, jejímž důležitým zástupcem je *Mycobacterium tuberculosis*, které způsobuje tuberkulózu (TBC), další důležití zástupci patří do skupiny tzv. atypických mykobakterií (NTM). Mezi mykobakterie patří také původce lepry *M. leprae*. (1)

### 1.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Jedná se o komplex aerobních mykobakterií, které jsou nejčastějšími původci onemocnění zvaného tuberkulóza. Buněčná stěna *M. tuberculosis* obsahuje jako u ostatních mykobakterií velké množství lipidů, konkrétně mykolových kyselin, což je označení pro nerozvětvené alifatické kyseliny s řetězcem C<sub>54</sub> až C<sub>63</sub>, na alfa uhlíku mají vázaný nerozvětvený alifatický řetězec C<sub>22</sub> až C<sub>24</sub>, v beta poloze mají vázanou alkoholickou skupinu. Poprvé byl tento původce TBC popsán v roce 1882 Robertem Kochem. (2, 3)

### 1.1.2 Atypické mykobakterie

Označované také jako nontuberculous mycobacteria (NTM). Jedná se o mykobakterie, které nepatří do komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, ale přesto způsobují mykobakterií, tzn. jsou patogenní. Mezi klinicky významné lze zařadit *M. avium*, *M. xenopi*, *M. intracellulare*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*. (4)

## 1.2 Tuberkulóza

Jde o infekční onemocnění způsobené mykobakteriemi z komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Jedná se o nemoc, která doprovází lidstvo od pravěku, jak bylo zjištěno z kosterních pozůstatků lidí z období neolitu. Mykobakterium jako takové bylo k danému onemocnění přiřazeno v roce 1882 Robertem Kochem. Nejčastější je tzv. plicní forma, onemocnění má i mimoplicní formy. (5)

Tuberkulózou onemocnělo na celém světě v roce 2014 9,6 milionu osob, z toho 1,2 miliónu byli lidé s HIV, u 480 000 osob se došlo k mutaci kmene TBC na multirezistentní TBC a 1,5 milionu osob zemřelo v důsledku této infekce. (6)

### 1.2.1 Zdroj a přenos infekce

Zdrojem může být nakažený člověk nebo živočich. Přenos je nejčastěji inhalační cestou, a to vdechnutím kapének, méně častá inhalační cesta jsou prachové částice. Možný je i přenos potravou, tzv. alimentární cestou, nebo přímým kontaktem s nakaženou osobou či živočichem. Poslední případ připadá v úvahu především u

zdravotníků anebo chovatelů zvířat. Inkubační doba je 4 týdny až 2 roky po expozici patogenu. (7)

### **1.2.2 Klinický obraz**

Infekce se dělí na primární a postprimární s tím, že primární infekce zůstává často nezaznamenána a jelikož je u zdravého jedince asymptomatická, projeví se nejčastěji u populace s oslabenou imunitou, např. dětí, seniorů nebo imunodeficientních pacientů. Většinou jsou příznaky primární infekce podobné chřipce, tzn. zvýšená teplota, nechutenství, únava.

Postprimární infekce může probíhat rovněž asymptomaticky, ale častější je manifestní forma, kdy je průběh podobný chřipce s dlouhým trváním a stupňováním symptomů, kašel je z počátku suchý, později produktivní. V závažných případech zůstává neodhalena až do stádia, kdy dochází k hemoptýze.

Latentní forma TBC představuje stav, kdy v organizmu jsou přítomny mykobakterie TBC, které vyvolávají imunitní reakci, tzn. je pozitivní tuberkulinový test, ale pacient nemá žádné subjektivní potíže ani příznaky a není ani infekční pro své okolí. (7)

### **1.2.3 Diagnostika**

Při podezření na TBC je třeba provést komplexní vyšetření, které zahrnuje důkladnou anamnézu pacienta, vyšetření hrudníku pomocí zobrazovacích metod, biochemické vyšetření, hematologické, histologické a mikrobiologické vyšetření.

Jako zobrazovací metoda se nejčastěji používá rentgen nebo CT hrudníku.

Jako biologické vzorky se odebírají krev, nejčastěji pak sputum, kdy se preferuje spontánně získané ranní sputum před indukovaným, jako alternativu lze provést bronchoalveolární laváž, žaludeční laváž či odebrat pleurální výpotek. Odebírají se zpravidla tři vzorky, ideálně na lačno a před ranní zubní hygienou.

Vzorky jsou odeslány na mikrobiologické vyšetření, kdy se provádí mikroskopické vyšetření sputa, kultivace (pozitivní kultivace není podmínkou zahájení terapie; pokud je vážné podezření na TBC podloženo ostatními testy, bývá zahájena terapie před výsledky kultivace), PCR, interferon- $\gamma$  release assay.

Dále se provádí tuberkulinový kožní test, který je rychlým ukazatelem přítomnosti protilátek proti bakteriím TBC v těle. (7,8)

### **1.2.4 Terapie**

Onemocnění TBC je velmi závažné, a to jak z pohledu samotného pacienta, tak z pohledu jeho okolí, které je vystaveno zvýšenému riziku přenosu infekce. Proto by měl být omezen kontakt pacientů trpících TBC s dětmi do 5 let, osobami s HIV a ostatními osobami s imunodeficitem. Toho by mělo být zajištěno karanténními opatřeními u infekčních osob a zvýšenou opatrností v průběhu léčby. Každý případ onemocnění TBC musí být proto hlášen. Rolí lékaře není jen předepsání dané léčby,

ale především zajištění dobré adherence k léčbě, neboť jedině tak může být docíleno plného uzdravení a omezení rizika vzniku rezistence. (9)

Povinné očkování proti TBC bylo v ČR zrušeno vyhláškou č. 299/2010 Sb., tzn. Toto očkování je dobrovolné. U rizikových skupin uvedených ve vyhlášce č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, je očkování plně hrazeno ze zdravotního pojištění. V ostatních případech kdy požádá pojištěnec nebo jeho zákonný zástupce o očkování je jím hrazeno v plné výši. (10,11)

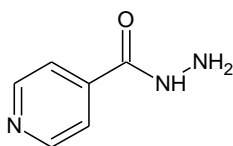
## 1.2.5 Farmakoterapie

Podle WHO je doporučena šestiměsíční farmakoterapie s tím, že první dva měsíce je doporučeno zahájit tzv. iniciální čtyřkombinací, kterou většinou tvoří: isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol. Po dvou měsících se přestupuje na udržovací dvoukombinaci, většinou jde o isoniazid a rifampicin po dobu čtyř měsíců. Pokud není zajištěna dobrá adherence k léčbě, volí se často kombinace isoniazidu a ethambutolu. Kombinovaná léčba se volí především s ohledem na riziko vzniku rezistence. (9)

Základní antituberkulotika (AT-1) představují léky první volby, patří mezi ně isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol a streptomycin. Pokud dojde k selhání léčby základními antituberkulotiky, volí se antituberkulotika rezervní (AT-2), mezi něž patří kanamycin, amikacin, ofloxacin, ciprofloxacin, *para*-aminosalicylová kyselina a další léčiva.

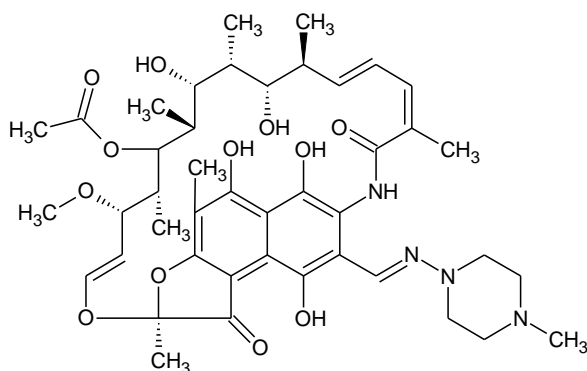
### 1.2.5.1 Základní antituberkulotika (AT-1)

Isoniazid (obr. 1) je více než sto let stará struktura, poprvé byla syntetizována v roce 1912. Antituberkulotické účinky byly objeveny počátkem 50. let 20. století, poprvé byl použit v roce 1952. Strukturně se jedná o hydrazid kyseliny isonikotinové. Jde o prodrug aktivované pomocí peroxidázového systému mykobakterie, vzniklý produkt inhibuje ACP reduktázu, tím je zasažena syntéza mastných kyselin včetně narušení syntézy mykolových kyselin. Doporučené dávkování je 5 mg/kg u dospělých a 10-20 mg/kg u dětí, většinou v jedné denní dávce, která se užívá hodinu před nebo 2 hodiny po jídle. (12)



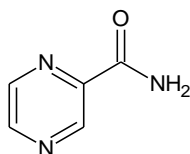
Obrázek 1

Rifampicin (obr. 2) je ansamycinové antibiotikum, semisyntetický derivát rifamycinu. Patří mezi nejpoužívanější léčiva v terapii TBC. Mechanismus účinku je založen na inhibici genu pro beta podjednotku DNA-dependentní RNA-polymerázy, čímž blokuje prodlužování RNA řetězce, tzn. syntézu RNA uvnitř bakterie. Dávkování je 10 mg/kg v jedné denní dávce, neměla by překročit 600 mg. Podává se orálně nebo i.v. (13)



Obrázek 2

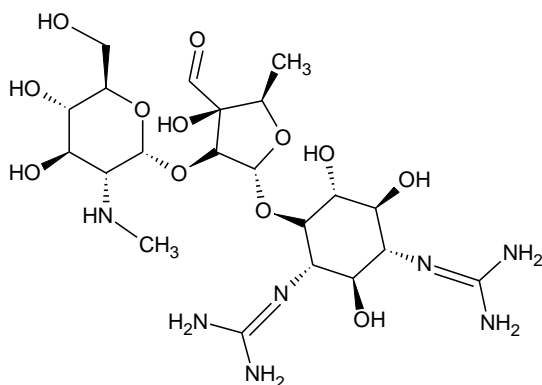
Proléčivo pyrazinamid (obr. 3), chemicky amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové, je jedním z nejdůležitějších léčiv v iniciální fázi terapie. Používá se zásadně v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Jeho účinek je založen na jeho aktivaci pomocí nikotinamidázy, která hydrolyzuje pyrazinamid na kyselinu pyrazinkarboxylovou, která se hromadí uvnitř buňky a ovlivňuje intracelulární pH. Pokud se dostane pH pod optimální hodnoty, dochází k inhibici mnoha systémů, např. syntézy mastných kyselin, membránového transportu. Tento klasický pohled na mechanismus účinku byl doplněn o novější, podle kterého pyrazinamid inhibuje translaci a posttranslačních úpravy nebo také aspartát dekarboxylázu. Dávkování je 20-25 mg/kg denně nebo 50-70 mg/kg ve třech dávkách týdně. (14, 15)



Obrázek 3

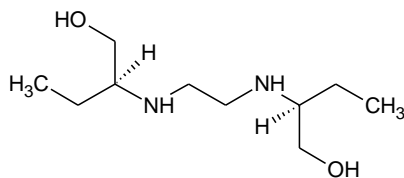
Aminoglykosidové antibiotikum streptomycin (obr. 4) bylo první účinnou léčbou TBC, dnes již méně užívané oproti ostatním základním antituberkulotikům, ale stále se jedná o významné antibiotikum užívané i u jiných infekcí. Při jeho užití je třeba kontrolovat funkci ledvin, protože má nefrotoxické vedlejší účinky, mezi další nežádoucí vlastnosti patří ototoxicita. Mechanismus účinku je založen na vazbě na A místo 16S rRNA v rámci 30S podjednotky ribozomu, čímž blokuje vazbu formyl-methionyl-tRNA k 30S podjednotce, což způsobí chybné čtení kodonu. To vede

k zástavě proteosyntézy a smrti buňky. Pro systémový účinek je nutné podávat streptomycin i.v. nebo i.m., nejčastěji se volí 1 g v jedné dávce. (16)



Obrázek 4

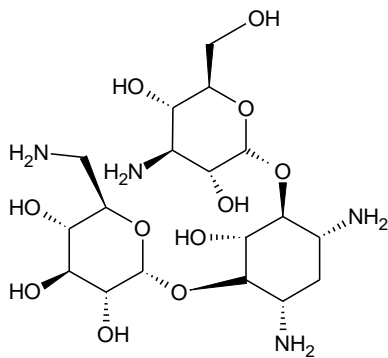
Etambutol (obr. 5) – jedná se o derivát ethylendiaminu, poprvé byl použit v roce 1966. Ve své molekule má dvě chirální centra, jako léčivo lze použít pouze pravotočivý *S,S*-(+)-izomer, jiné jsou neúčinné, levotočivý dokonce toxický (způsobuje poruchy vizu). Používá se v kombinacích s dalšími antituberkulotiky, většinou v iniciační fázi terapie. Není doporučován pro léčbu těhotných pro riziko poškození zraku plodu. Jeho účinek je založen na poškození formující se buněčné stěny, při syntéze mykolových kyselin, kdy dochází k inhibici arabinosyl transferázy, která je potřebná pro tvorbu mykoly-arabinogalaktan-peptidoglykanového komplexu v buněčné stěně. Používá se v dávkách 15 mg/kg až 25 mg/kg, u vyšších dávek je nutno monitorovat zrakové funkce. (17)



Obrázek 5

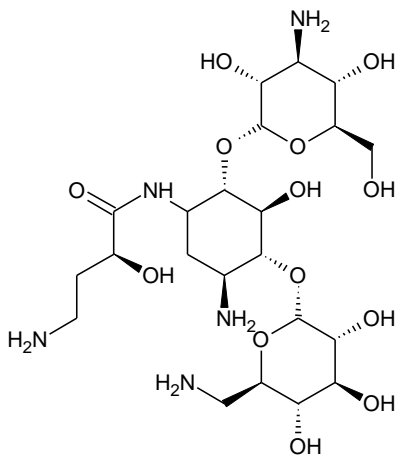
#### 1.2.5.2 Rezervní antituberkulotika (AT-2)

Kanamycin (obr. 6) je aminoglykosidové antibiotikum izolované z bakterií *Streptomyces kanamyceticus*. Pro použití se většinou volí jeho sůl ve formě sulfátu. Mechanismus účinku je obdobný jako u streptomycinu, tj. inhibice proteosyntézy. Dávkování je 1 g i.v. nebo i.m. (18)



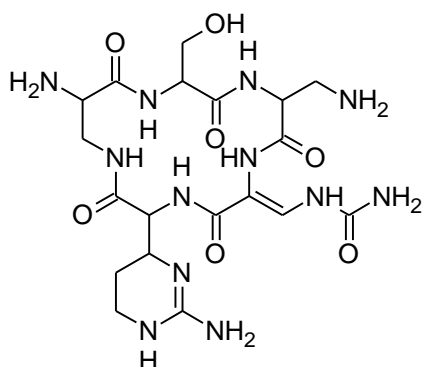
Obrázek 6

Amikacin (obr. 7) je další aminoglykosidové antibiotikum, z čehož vyplývá jeho mechanismus účinku, který je obdobný jako u výše popsaného streptomycinu a kanamycinu. Dávkování se používá 1 g i.v. nebo i.m. (19)



Obrázek 7

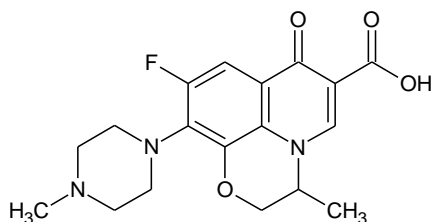
Mechanismus účinku polypeptidového antibiotika kapreomycinu (obr. 8) je založen na vazbě na podjednotku ribozomu, což vede k inhibici proteosyntézy. Jeho nežádoucí účinky jsou podobné, jako u aminoglykosidů, tzn. ototoxicita, nefrotoxicita. Dávkování je 1 g/d z počátku léčby a poté 1 g 3x týdně. (20)



Obrázek 8

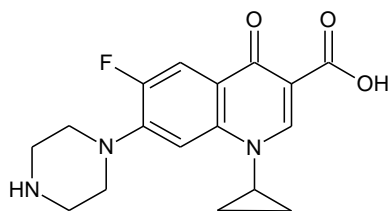
Ofloxacin (obr. 9) patří mezi fluorochinolonová antibiotika patřící do druhé generace antituberkulotik. Používá se ve formě racemické směsi, ale účinný je pouze levotočivý enantiomer, tzv. levofloxacin. Jeho podávání není vhodné u dětí. Účinek je založen

na vazbě na DNA gyrázu, což je enzym spadající do skupiny topoizomeráz II, které mají za úkol rozplétat terciální strukturu DNA při dělení a rozštěpit vlákna dvoušroubovice DNA a poté je znovu spojit. Při jejím poškození nedochází k opravám DNA a je přerušena její replikace. Dávkování je 500-1000 mg. (21, 22)



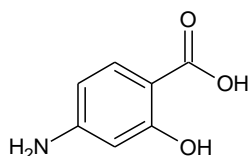
Obrázek 9

Ciprofloxacin (obr. 10), fluorochinolon druhé generace, má obdobný mechanismus účinku jako ofloxacin. Dávkování je obvykle 500-1000 mg denně. (22, 23)



Obrázek 10

*Para*-aminosalicylová kyselina (obr. 11; PAS) je jedno z nejstarších antituberkulotik, ale dnes už je ve vyspělých zemích užívána jen výjimečně. Její účinek je založen na kompetici s kyselinou listovou, která je důležitá pro růst bakterií. PAS je přeměněna pomocí dihydropteridin syntetázy na antimetabolit, který inhibuje dihydrofolát reduktázu, účinek je tudíž bakteriostatický. Dávkování je 8-12 g denně rozdělených do 2 dávek. (24)



Obrázek 11

### 1.3 Rezistence

Rezistentní kmeny *Mycobacterium tuberculosis* nejsou v dnešní době výjimkou a lékaři se s nimi setkávají stále častěji. Největší problém představují v zemích východní Evropy, především bývalého SSSR, a v zemích Asie, což koreluje s výskytem TBC ve světě. Jako rezistentní jsou označovány ty kmeny, na které nepůsobí léčiva, která jsou v terapii jinak účinná.

Hlavní příčinou vzniku rezistence je mutace bakteriálního genotypu, což má za následek změnu cílového místa působení léčivé látky. Další častou příčinou je amplifikace nebo naopak zeslabení genů pro přenašečové systémy bakterií. Mezi příčiny, které nemůžeme opomenout, patří také nedostatky v terapii. Zde připadá



v úvahu více možností, chyba může být způsobena špatně zvolenou farmakoterapií, ale také špatnou adherencí.

WHO (25) doporučuje označovat rezistentní kmeny *Mycobacterium tuberculosis* takto:

- 1) monorezistentní – kmen rezistentní vůči 1 léčivu ze skupiny AT-1,
- 2) polyrezistentní – kmen rezistentní vůči 2 a více léčivům ze skupiny AT-1,
- 3) multirezistentní (MDR-TB) – kmen rezistentní minimálně vůči kombinaci isoniazid + rifampicin (26)
- 4) extenzivně léková rezistentní (XDR-TB) – kmen rezistentní vůči isoniazidu, rifampicinu, jakémukoli fluorochinolonu a k nejméně jednomu ze tří injekčních antibiotik z druhé linie léčiv (amikacin, kanamycin nebo kapreomycin),
- 5) totálně rezistentní (TDR-TB) – kmen rezistentní vůči všem AT-1 i AT-2.

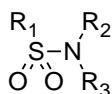
Rezistenci jako takovou dělíme na primární a sekundární s tím, že jako primární je označována rezistence vzniklá v průběhu léčby, která ještě nepřekročila dobu 1 měsíce. Jako sekundární se označuje rezistence vzniklá u pacienta, který byl již léčen na TBC nebo, který se léčí déle než jeden měsíc. Toto rozdělení má smysl především pro sledování šíření již rezistentních kmenů, které se projeví jako primárně rezistentní.

Rezistence je narůstající problém, jehož důsledkem je nutné neustále hledat nové léčivé látky, které působí i na rezistentní kmeny, k řešení lze využít poznatky získané díky zmapování genomu kmene *M. tuberculosis*.

Mezi nová léčiva, která jsou účinná i na řadu jinak rezistentních kmenů, patří delamanid a bedaquilin, přesto však není problém rezistence vyřešen a je třeba stále hledat nové perspektivní molekuly, které by se mohly stát novými léčivy. (27, 28)

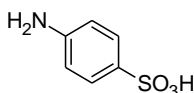
## 1.4 Sulfonamidy

Jedná se o skupinu látek, které mají antimikrobiální účinek a ve své molekule obsahují sulfonamidovou funkční skupinu (obr. 12).



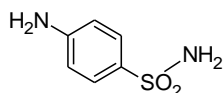
Obrázek 12

Většina klinicky užívaných antimikrobiálních sulfonamidů jsou deriváty kyseliny sulfanilové (obr. 13), jejíž struktura je zásadní pro mechanismus účinku sulfonamidů.

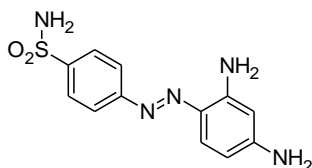


Obrázek 13

Prvním účinným sulfonamidem byl sulfanilamid (obr. 14), který v těle vzniká rozkladem Prontosilu (obr. 15). Sulfanilamid je předlohou většiny dnes používaných sulfonamidů.



Obrázek 14



Obrázek 15

### 1.4.1 Historie sulfonamidů

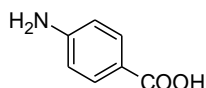
Sulfonamidy byly první systémově užívané látky s antimikrobiálním účinkem. Prvním byl Prontosil syntetizovaný v laboratořích firmy Bayer v Německu. V rámci firmy Bayer, která se zabývala především výrobou barviv, byla zřízena laboratoř, v níž probíhalo testování nově připravených látek jako potenciálních léčiv. Tuto laboratoř vedl Gerhard Domagk. Díky jeho testům došlo k objevu antibiotických vlastností Prontosilu. Domagk byl za tento objev v roce 1939 oceněn Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu. V Pasteurově institutu ve Francii se vědecký tým zabýval problémem, který vyvstal ohledně účinnosti Prontosilu, neboť ten byl účinný pouze *in vivo* a nikoli *in vitro*. Tento rozpor byl vysvětlen tak, že Prontosil není léčivem, ale proléčivem a samotnou účinnou látkou je sulfanilamid, který vzniká metabolismem Prontosilu v organismu. Sulfanilamid byl znám již od roku 1906, ale do té doby nikdo neobjevil jeho antibiotický potenciál. Výhodou oproti Prontosilu bylo také to, že nebyl patentově chráněn, což umožnilo jeho rychlejší a levnější rozšíření. Tímto objevem byly položeny základy tzv. antibiotické revoluce. Záhy byla syntetizována řada analogů sulfanilamidu, které měly výhodnější vlastnosti. (29,30)

Sulfonamidy byly také od počátku testovány pro léčbu TBC, ale po objevu streptomycinu byl zájem o látky k léčbě TBC přesunut jiným směrem. Nad sulfonamidy se začalo znovu uvažovat až s rostoucím problémem rezistence na běžně používaná léčiva.

### 1.4.2 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku je založen na strukturní analogii s kyselinou *para*-aminobenzoovou (PABA) (obr. 16). Dochází ke kompetitivní inhibici enzymu dihydropteroát syntázy, který je důležitou součástí syntézy kyseliny listové v buňce. Kyselina listová je klíčovým koenzymem při syntéze nukleových kyselin *de novo*. Prokaryotické buňky bakterií nejsou schopny si PABA syntetizovat a musí ji přijímat ze svého okolí. Sulfonamidy tudíž působí bakteriostaticky. (31)

Nově byl popsán další mechanismus, kterým mohou sulfonamidy účinkovat a který je založen na inhibici karboanhydrázy. (32)



Obrázek 16

### 1.4.3 Zástupci sulfonamidů

Sulfamethoxazol používá se především v kombinaci s trimethoprimem, tato kombinace se nazývá kotrimoxazol. Kotrimoxazol má baktericidní účinek díky synergistickému působení jeho složek. V lékové formě bývá fixní poměr trimethoprim/sulfamethoxazol 1:5, který byl stanoven za základě hodnot distribučních objemů. Trimethoprim má větší distribuční objem, protože lépe proniká lipofilními membránami. Používá se především k léčbě pneumonií vyvolaných *Pneumocystis carinii*, enteritid vyvolaných *Shigellami*, u salmonelóz rezistentních vůči ampicilinu a především u komplikovaných infekcí močových cest a prostatitid. Jeho MIC testované proti *Mycobacterium tuberculosis* je 1000 µg/ml, avšak jiné zdroje uvádějí hodnotu MIC lepší. Hodnoty MIC jednotlivých sulfonamidů jsou shrnuty v tabulce č. 1. (33, 34)

Sulfathiazol používá se především lokálně. Sulfathiazol vykazuje jednu z nejnižších hodnot MIC proti *Mycobacterium tuberculosis* mezi sulfonamidy. Je dobře účinný i proti atypickým mykobakteriím, což je jeden z důvodů, proč jsme vybrali sulfathiazol jako předlohovou strukturu pro další modifikace. (31, 34)

Sulfadiazin používá se systémově i lokálně. V kombinaci s pyrimethaminem se používá k léčbě toxoplasmózy. Je řazen mezi základní léčiva podle WHO právě pro jeho použití při toxoplasmóze. (31, 35)

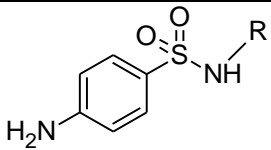
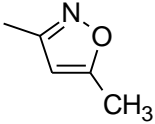
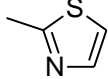
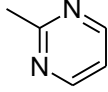
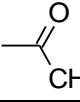
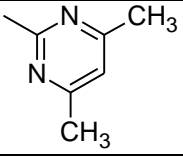
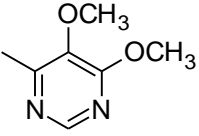
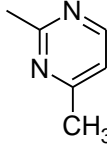
Sulfacetamid se používá lokálně v očním lékařství ve formě sodné soli, která je dobře rozpustná ve vodě. (36, 37)

Sulfadimidin (sulfamethazin) je perorálně užívaný sulfonamid s krátkou dobou účinku. Používá se především ve veterinární medicíně proti salmonelózám, infekcím způsobeným *E. coli* a také proti kokcidióze převážně u králíků a drůbeže. (34, 36, 37)

Sulfadoxin jedná se o sulfonamid s velmi dlouhou dobou účinku. Používá se většinou v kombinaci s pyrimethaminem jako profylaxe nebo léčba malárie. (34, 36)

Sulfamerazin dlouhodobě působící sulfonamid. Používá se většinou v kombinaci s dalšími sulfonamidy, a to sulfadiazinem a sulfamethazinem. (34, 36, 37)

Tabulka č. 1. Zástupci sulfonamidů a jejich antimykobakteriální aktivita

		
název	R	MIC pro <i>M. tuberculosis</i> [μg/ml]
sulfamethoxazol		1000
sulfathiazol		10
sulfadiazin		50
sulfacetamid		64
sulfadimidin		32
sulfadoxin		32
sulfamerazin		32

## 2. Cíl práce

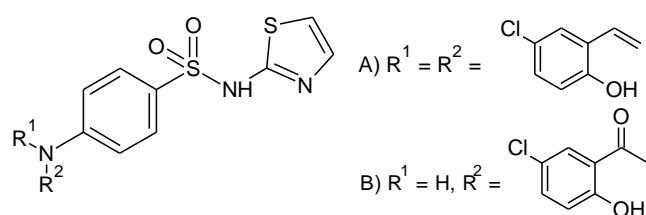
Cílem této práce je příprava N<sup>4</sup>-substituovaných derivátů sulfathiazolu jako potenciálně antimikrobiálně působících látek. Práce tak navazuje na přechozí publikace (31,38), v nichž byly jako výchozí látky použity i jiné sulfonamidy. Sulfathiazol (STS) byl vybrán jako parentní struktura na základě dobrých MIC jeho derivátů syntetizovaných a testovaných v předešlé práci. (31) Hlavním cílem je příprava derivátů s vystupňovanou antimikrobní aktivitou a v ideálním případě i sníženou toxicitou a prodlouženým biologickým poločasem. Tyto struktury v sobě budou kombinovat dva molekulové fragmenty účinné vůči mykobakteriím – sulfonamidovou část a dusíkatý heteroaryl či močovinu (38).

Ke spojení sulfathiazolu s dalšími aktivními strukturami byly použity v předešlé práci amidové a iminomethylenové můstky (Schiffovy baze). Cílem této práce bylo připravit amidy sulfathiazolu s dalšími aktivními molekulami a dále připravit močoviny, které se v předešlé práci (38) ukázaly jako výhodné, a tento močovinový můstek následně cyklizovat na imidazolidin-2,4,5-trion. Substituenty v případě močovin byly zvoleny na základě předešlé práce. (38)

### 3. Přehled modifikací sulfathiazolu za účelem zvýšení jeho antimykobakteriální aktivity

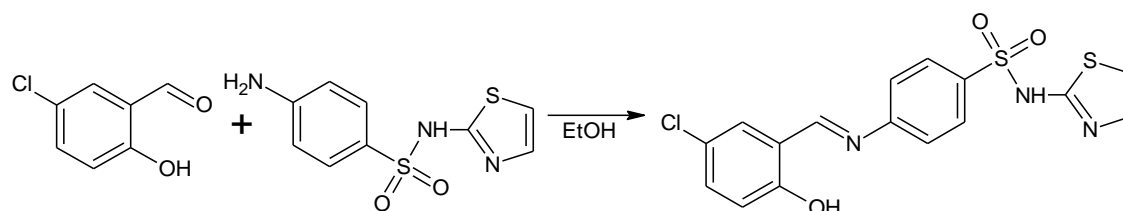
Modifikací sulfathiazolu se zabývalo mnoho prací, ale jen malé množství z nich se zabývalo jeho modifikací pro antimykobakteriální použití. Při výběru parentní molekuly pro tuto práci jsme vycházeli především z výsledků dvou prací, z nichž jedna je z naší skupiny (31) a druhou vypracovali na turecké Yeditepe University (36).

V práci (31) byl modifikován sulfathiazol za vzniku Schiffovy báze a amidu. Konkrétně se jednalo o 4-[(5-chlor-2-hydroxybenzyliden)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (obr. 17A) a 5-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]benzamid (obr. 17B).



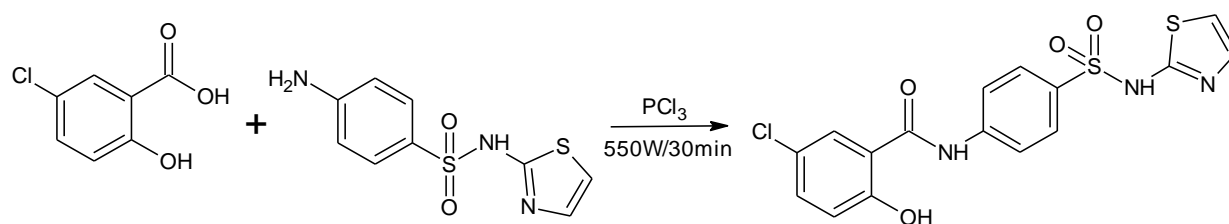
Obrázek 17

Schiffova báze byla připravena (reakční schéma 1) z 5-chlorsalicylaldehydu a sulfathiazolu tříhodinovým varem pod zpětným chladičem v 96% EtOH. Výtěžek reakce byl 92 %.



Reakční schéma 1

Amid byl připraven (reakční schéma 2) reakcí příslušné kyseliny se sulfathiazolem a  $\text{PCl}_3$ . Směs byla suspendována ve směsi toluenu a chlorbenzenu 1:1. Reakce probíhala v mikrovlnném reaktoru při 550 W po dobu 30 min, výtěžek byl 44 %.

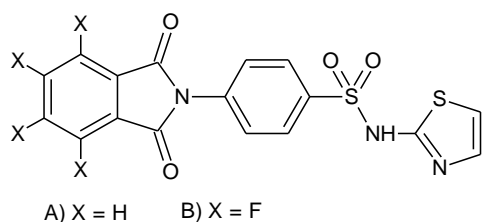


Reakční schéma 2

Hodnoty MIC 14d/21d [ $\mu\text{mol/l}$ ] proti *M. tuberculosis* My 331/88 byly u sulfathiazolu 32/62,5, u připravené Schiffovy báze byly 32/62,5 a u připraveného amidu byly

250/250  $\mu\text{mol/l}$ , z čehož vyplývá, že ani jedna úprava nevedla k lepším hodnotám, než vykazovala výchozí látka, a příprava amidu vedla dokonce ke zhoršení aktivity.

V práci (36) byl modifikován sulfathiazol za vzniku ftalimidu. Ten byl připraven kyselé katalyzovanou reakcí ftalanhydridu se sulfathiazolem. Jako druhá modifikace byl použit tetrafluorftalanhydrid. Takto byly připraveny látky 4-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (obr. 18A) a 4-(4,5,6,7-tetrafluoro-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (obr. 18B).



Obrázek 18

Hodnoty MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] pro výchozí látku byla 4 pro 4-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid byla 256, v případě 4-(4,5,6,7-tetrafluoro-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu byla 64. Příprava derivátů tudíž nevedla ke zlepšení antimykobakteriální aktivity výchozí molekuly.

## 4. Experimentální část

### 4.1 Obecná část

Při syntézách byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla od firem Sigma-Aldrich a Penta Chemicals, které byly použity bez dalšího přečištění.

Průběh všech reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie, jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60F254 od firmy Merck. Jako mobilní fáze byla použita soustava ethyl-acetát/methanol 5:1 (v/v), detekce byla provedena při vlnových délkách 254 a 366 nm.

Teploty tání ( $T_f$ ) byly naměřeny v otevřené kapiláře na přístroji BÜCHI melting point B-540 a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla změřena technikou ATR (attenuated total reflectance) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR v rozmezí 400-4000 $\text{cm}^{-1}$ . Měření probíhala na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

NMR spektra byla změřena na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian Mercury-Vxbb 300 a Varian VNMR S500. Jako rozpouštědlo byl použit deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- $d_6$ ). Hodnoty chemického posunu  $\delta$  [ppm] v protonových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jako vnitřnímu standardu. Uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla (DMSO- $d_6$  při  $\delta = 39,5$  ppm). Interakční konstanta je uvedena v Hz.

Čistota připravených látek byla ověřena pomocí NMR spektroskopie, TLC, IČ spektroskopie a teploty tání.

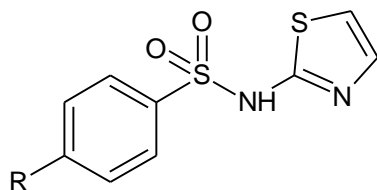
Logaritmus rozdělovacího koeficientu ( $\log P$ ) byl vypočítán pomocí programu ACD/ChemSketch verze 12.0, tentýž program byl použit pro vzorce a reakční schémata.

Připravené látky jsou shrnuty v tabulce č. 2, kde jsou uvedeny kódy, pod kterými byly připravovány, jejich teploty tání, relativní molekulové hmotnosti, logaritmus rozdělovacího koeficientu a výtěžky v [%], se kterými byly připraveny.

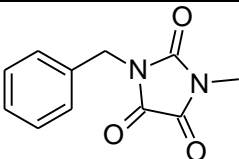
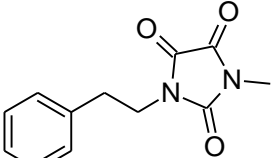
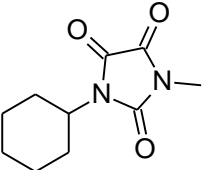
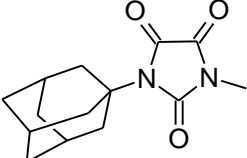


## 4.2 Přípravy

Tabula č. 2. Přehled připravených látek a některých jejich vlastností

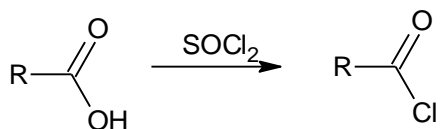


Kód látky	R	M <sub>r</sub> látky	T <sub>t</sub>	Výtěžek	log <i>P</i>
NI-ST5		360,41	283,0-285,0°C	59 %	1,52
IN-ST5		360,41	248,0-250,3°C	34 %	1,15
PZ-ST5		361,40	289,0-290,3°C	61 %	0,93
Ph-ST5		374,44	256,2-258,0°C	78 %	2,65
Ben-ST5		388,46	228,7-231,0°C	69 %	2,68
PhEt-ST5		402,49	216,3-218,9°C	68 %	3,09
Cy-ST5		380,49	231,4-233,5°C	76 %	2,96
Ada-ST5		432,56	260,4-263,4°C	74 %	3,78
Ph-ST5-Ox		428,44	332,4-334,6°C	83 %	0,13

Kód látky	R	M <sub>r</sub> látky	T <sub>t</sub>	Výtěžek	log <i>P</i>
Ben-STS-Ox		442,47	322,5-325,2°C	27 %	0,16
PhEt-STS-Ox		456,49	243,5-245,3°C	79 %	0,57
Cy-STS-Ox		434,49	262,6-264,7°C	86 %	0,44
Ada-STS-Ox		486,56	317,5-320,2°C	80 %	1,26

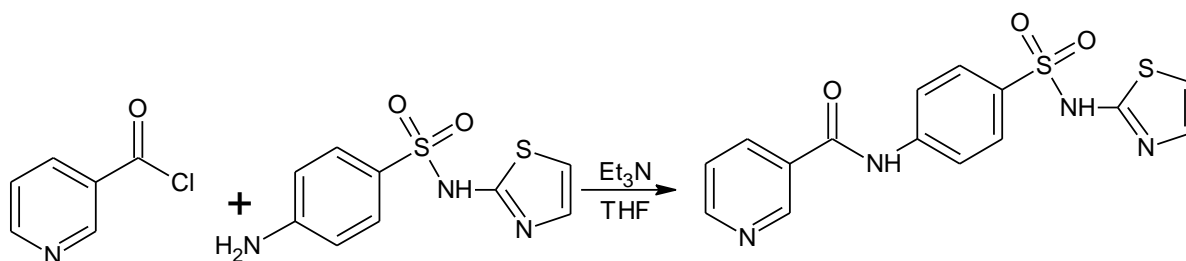
## Chloridy kyselin

Chloridy kyseliny pro přípravu amidů byli připraveny pomocí thionylchloridu, postup byl u všech tří kyselin (nikotinová, isonikotinová, pyrazin-2-karboxylová kyselina) shodný (reakční schéma 3). K 0,75 mmol kyseliny bylo přidáno 30 ml thionylchloridu a reakční směs byla uvedena k varu na dobu 2 h. Poté byl přebytečný thionylchlorid oddestilován, zbytek byl suspendován v bezvodém THF, který byl poté oddestilován za sníženého tlaku (vodní vývěva). Toto promytí pomocí THF bylo provedeno 3x.



*Reakční schéma 3*

## *N*-[4-(Thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-3-karboxamid (NI-STS)



### Reakční schéma 4

0,75 mmol (106,2 mg) nikotinoyl chloridu bylo rozpuštěno ve 30 ml bezvodého THF a za míchání byly přidány 3 mmol (0,416 ml) triethylaminu. Ke směsi bylo za míchání přidáno ve třech dílech 0,80 mmol (204,26 mg) sulfathiazolu. Směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem přes noc, po ochlazení na laboratorní teplotu došlo ke krystalizaci a směs byla zfiltrována. Pevná fáze byla promyta vodou a třikrát roztokem NaHCO<sub>3</sub>, promytá pevná fáze byla poté usušena při teplotě 120 °C. Výtěžek reakce byl 160 mg, tj. 59 % *N*-[4-(thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-3-karboxamidu.

**T<sub>t</sub>** = 283-285 °C

**Výtěžek** = 59 %

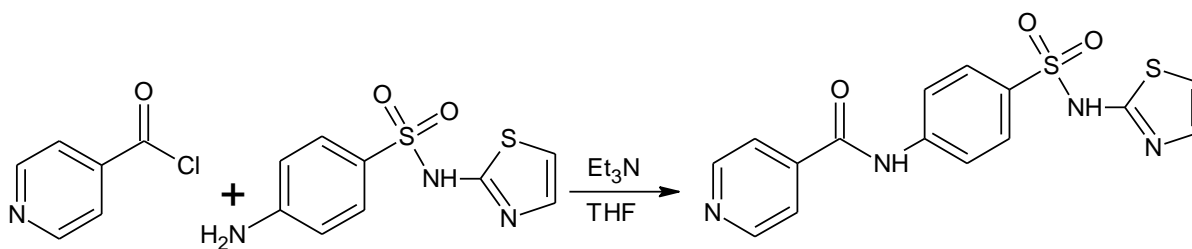
**Log P** = 1,52

**IR:** 3370 (-NH-), 3152, 3108, 2940, 1684 (-CO- amid), 1665, 1592, 1569, 1529, 1498, 1425, 1400, 1324, 1293, 1275, 1142, 1119, 1088, 927, 850, 835, 730, 699, 676 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):** δ 12.40 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 10.71 (1H, s, CONH), 9.09 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H2), 8.78-8-7.58 (1H, m, H6), 8.30-8.27 (1H, m, H4), 8.18-8.15 (1H, m, H5), 7.91 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H2', H6'), 7.79 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H3', H5'), 7.17 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-N), 6.73 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-S).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO):** δ 168.32, 166.14, 154.51, 152.22, 148.19, 147.59, 128.50, 127.90, 125.86, 112.56, 107.54, 106.92.

## ***N*-[4-(Thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-4-karboxamid (IN-STS)**



Reakční schéma 5

0,75 mmol (106,2 mg) isonikotinoyl chloridu bylo rozpuštěno ve 30 ml bezvodého THF a za míchání byly přidány 3 mmol (0,416 ml) triethylaminu. Ke směsi bylo za míchání přidáno ve třech dílech 0,80 mmol (204,26 mg) sulfathiazolu. Směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem přes noc, po ochlazení na laboratorní teplotu došlo ke krystalizaci a směs byla zfiltrována. Pevná fáze byla promyta vodou a třikrát roztokem NaHCO<sub>3</sub>, promytá pevná fáze byla poté usušena při teplotě 120°C. Výtěžek reakce byl 93 mg, tj. 34 % *N*-[4-(thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-4-karboxamidu.

**T<sub>t</sub>** = 248-250,3 °C

**Výtěžek** = 34 %

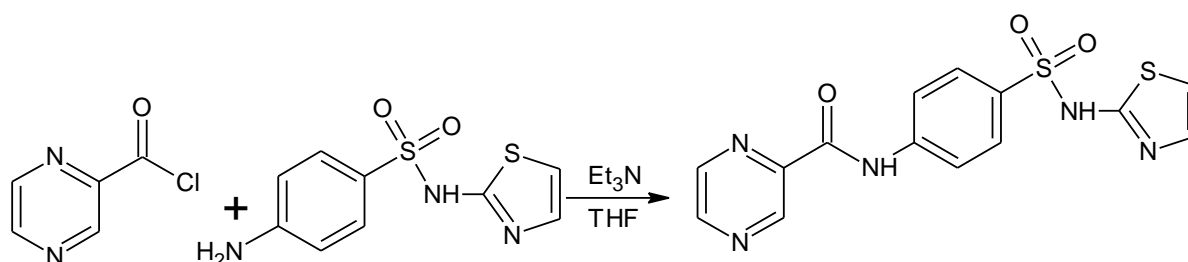
**log P** = 1,15

**IR:** 3392 (-NH-), 3100, 2608, 2499, 1672 (-CO- amid), 1578, 1532, 1513, 1444, 1419, 1400, 1319, 1278, 1143, 1089, 1066, 1038, 1009, 931, 855, 836, 757, 733, 712, 659 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO):** δ 12.71 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 10.78 (1H, s, CONH), 8.81-8.77 (2H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 7.95-7.89 (2H, m, H<sub>3</sub>', H<sub>5</sub>'), 7.87-7.83 (2H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>), 7.83-7.77 (2H, m, H<sub>2</sub>', H<sub>6</sub>'), 7.25 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-N), 6.82 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-S).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO):** δ 169.20, 164.87, 150.73, 142.23, 142.00, 137.73, 127.31, 124.90, 122.08, 120.43, 108.62.

## ***N*-[4-(Thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid (PZ-STS)**



Reakční schéma 6

0,75 mmol (107,0 mg) pyrazin-2-karboxamoyl chloridu bylo rozpuštěno ve 30 ml bezvodého THF poté byly za míchání přidány 3 mmol (0,416 ml) triethylaminu. Ke směsi bylo za míchání přidáno ve třech dílech 0,80 mmol (204,26 mg) sulfathiazolu. Směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem přes noc, po ochlazení na laboratorní teplotu došlo ke krystalizaci a směs byla zfiltrována. Pevná fáze byla promyta vodou a třikrát roztokem NaHCO<sub>3</sub>, promytá pevná fáze byla poté usušena při teplotě 120°C. . Výtěžek reakce byl 166 mg, tj. 61 % *N*-[4-(thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamidu.

$T_t = 289-290,3$  °C

Výtěžek = 61 %

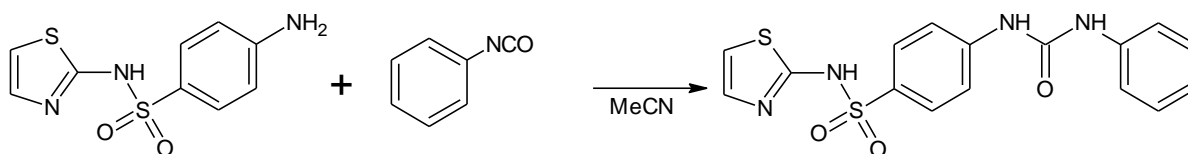
log **P** = 0,93

**IR:** 3321 (-NH-), 3115, 2895, 1686 (-CO- amid), 1591, 1571, 1522, 1413, 1397, 1327, 1299, 1251, 1149, 1117, 1092, 1020, 937, 868, 854, 839, 771, 735, 653, 659 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):** δ 12.71 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 11.02 (1H, s, CONH), 9.29 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H3), 8.93 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H6), 8.81 (1H, dd, *J* = 2.5 Hz, *J* = 1.5 Hz, H5), 8.05 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H3', H5'), 7.79 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H2', H6'), 7.24 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-N), 6.81 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-S).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO):** δ 168.96, 162.34, 148.09, 144.91, 144.38, 143.43, 141.50, 137.61, 126.90, 124.65, 120.44, 108.34.

## 4-[(Fenylkarbamoyl)amino]-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ph-STS)



Reakční schéma 7

2 mmol (510,64 mg) sulfathiazolu bylo rozpuštěno po mírném zahřátí v 10 ml bezvodého MeCN a za míchání bylo přidáno v jednom dílu 2,1 mmol (250,15 mg) fenylisokyanátu. Směs byla pozvolna přivedena k varu pod zpětným chladičem na 4 h, poté byla ponechána zchladnout a následně stát přes noc při +4 °C. Směs byla zfiltrována a pevná fáze byla promyta MeCN. Krystaly byly rekrystalizovány z EtOAc. Výtěžek byl 581,1 mg, tj. 78 % 4-[(fenylkarbamoyl)amino]-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu.

$T_t = 256,2\text{-}258,0\text{ }^\circ\text{C}$

Výtěžek = 78 %

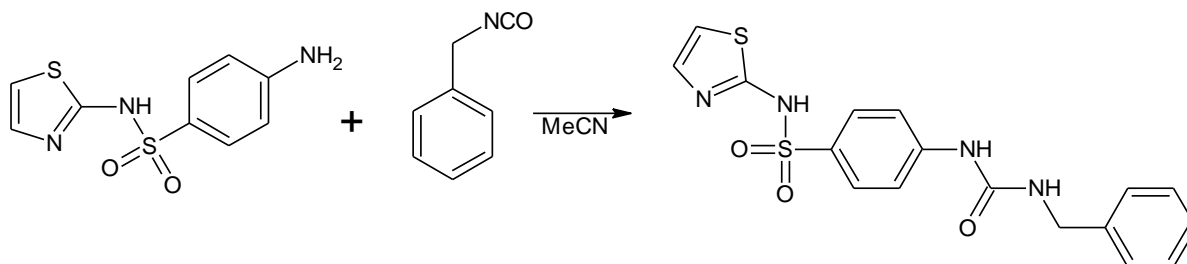
Log P = 2,65

**IR:** 3340 (-NH-), 3182, 1655 (-CO- močovinový), 1592, 1497, 1443, 1402, 1315, 1277, 1236, 1183, 1139, 1087, 932, 854, 792, 734, 702, 692, 662  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  12.63 (1H, s,  $\text{SO}_2\text{NH}$ ), 9.04 (1H, s,  $\text{N}^1\text{H}$  ureido), 8.75 (1H, s,  $\text{N}^3\text{H}$  ureido), 7.72-7.68 (2H, m,  $\text{H}_2'$ ,  $\text{H}_6'$ ), 7.59-7.55 (2H, m,  $\text{H}_3'$ ,  $\text{H}_5'$ ), 7.46-7.42 (2H, m,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_6$ ), 7.30-7.25 (2H, m,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_5$ ), 7.23 (1H, d,  $J = 4.6$  Hz, thiazol =CH-N), 6.98 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 6.80 (1H, d,  $J = 4.6$  Hz, thiazol =CH-S).

**$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO):**  $\delta$  168.79, 152.35, 143.27, 139.45, 135.01, 128.98, 127.21, 124.48, 122.35, 118.56, 117.60, 108.13.

## 4-[(Benzylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ben-STS)



### Reakční schéma 8

2 mmol (510,64 mg) sulfathiazolu bylo rozpuštěno po mírném zahřátí v 10 ml bezvodého MeCN za míchání bylo přidáno v jednom dílu 2,1 mmol (279,62 mg) benzyloisokyanátu. Směs byla pozvolna přivedena k varu pod zpětným chladičem na 4 h, poté byla ponechána zchladnout a následně stát přes noc při +4 °C. Směs byla zfiltrována a pevná fáze byla promyta MeCN. Krystaly byly rekrystalizovány z EtOAc. Výtěžek byl 537,63 mg, tj. 69 % 4-[(benzylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu.

$T_t = 228,7\text{-}231,0\text{ }^\circ\text{C}$

Výtěžek = 69 %

$\log P = 2,68$

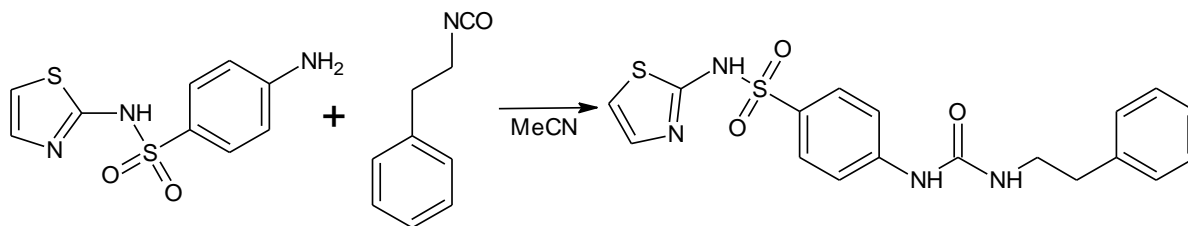
**IR:** 3392 (-NH-), 3340, 3112, 1726, 1700 (-CO- močovinový), 1589, 1529, 1496, 1481, 1455, 1403, 1330, 1316, 1294, 1224, 1200, 1183, 1139, 1086, 930, 915, 903, 833, 818, 755, 699, 682, 657  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  12.60 (1H, s,  $\text{SO}_2\text{NH}$ ), 8.97 (1H, s,  $\text{N}^1\text{H}$  ureido), 7.65 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz,  $\text{H}2'$ ,  $\text{H}6'$ ), 7.52 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz,  $\text{H}3'$ ,  $\text{H}5'$ ), 7.35-7.20 (6H, m,  $\text{H}2$ ,  $\text{H}3$ ,  $\text{H}4$ ,  $\text{H}5$ ,  $\text{H}6$ , thiazol =CH-N), 6.80-6.73 (2H, m, thiazol =CH-S,  $\text{N}^3\text{H}$  ureido), 4.29 (2H, d,  $J = 5.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO):**  $\delta$  154.96, 144.01, 140.20, 128.67, 128.47, 127.62, 127.29, 127.16, 126.93, 124.67, 117.05, 107.20, 42.92.



## 4-[[2-(Fenylethyl)karbamoyl]amino]-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (PhEt-STS)



### Reakční schéma 9

2 mmol (510,64 mg) sulfathiazolu bylo rozpuštěno po mírném zahřátí v 10 ml bezvodého MeCN za míchání bylo přidáno v jednom dílu 2,1 mmol (309,06 mg) fenethylisokyanátu. Směs byla pozvolna přivedena k varu pod zpětným chladičem na 4 h, poté byla ponechána zchladnout a následně stát přes noc při +4 °C. Směs byla zfiltrována a pevná fáze byla promyta MeCN. Krystaly byly rekrystalizovány z EtOAc. Výtěžek byl 549,80 mg, tj. 68 % 4-[[2-(fenylethyl)karbamoyl]amino]-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu.

**T<sub>t</sub>** = 216,3-218,9 °C

**Výtěžek** = 68 %

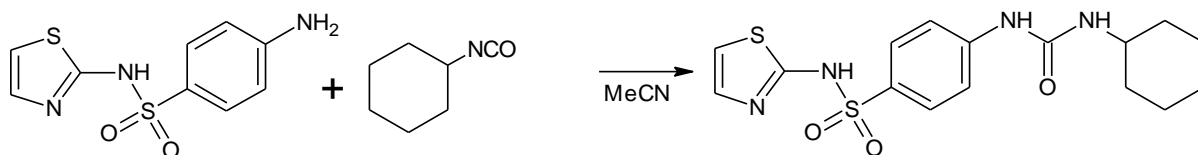
**log P** = 3,09

**IR:** 3349 (-NH-), 3246, 3107, 3028, 2933, 1741 (-CO- močovinový), 1594, 1529, 1496, 1327, 1287, 1220, 1198, 1179, 1139, 1086, 911, 830, 740, 695, 669, 652 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):** δ 12.52 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 9.30 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, N<sup>3</sup>H ureido), 7.43 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H2', H6'), 7.30-7.19 (6H, m, H2, H3, H4, H5, H6, thiazol =CH-N), 6.84 (1H, d, *J* = 5.1 Hz, thiazol =CH-S), 6.59 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H3', H5'), 6.05 (1H, s, N<sup>1</sup>H ureido), 3.55 (2H, q, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 2.80 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, PhCH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO):** δ 165.37, 153.41, 148.94, 138.78, 128.79, 128.62, 128.53, 126.46, 125.15, 124.34, 112.72, 106.69, 41.99, 34.70.

## 4-[(Cyklohexylkarbamoyl)amino]-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Cy-STS)



Reakční schéma 10

2 mmol (510,64 mg) sulfathiazolu bylo rozpuštěno po mírném zahřátí v 10 ml bezvodého MeCN za míchání bylo přidáno v jednom dílu 2,1 mmol (262,86 mg) cyklohexylisokyanátu. Směs byla pozvolna přivedena k varu pod zpětným chladičem na 4 h, poté byla ponechána zchladnout a následně stát přes noc při +4 °C. Směs byla poté zfiltrována a pevná fáze byla promyta MeCN. Krystaly byly rekrystalizovány z EtOAc. Výtěžek byl 577,58 mg, tj. 76 % 4-[(cyklohexylkarbamoyl)amino]-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu.

$T_t = 231,4-233,5\text{ °C}$

Výtěžek = 76 %

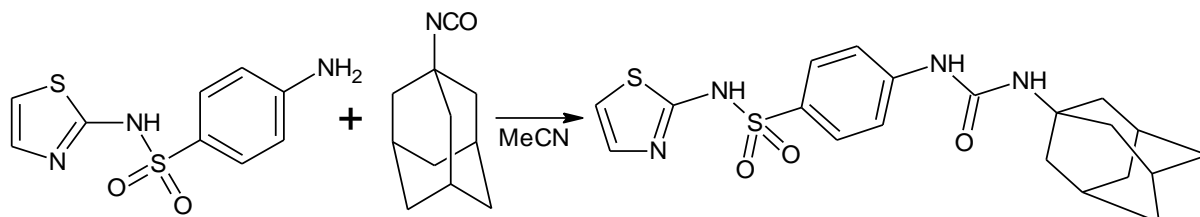
$\log P = 2,96$

**IR:** 3344 (-NH-), 3114, 2933, 2852, 1653 (-CO- močovinový), 1598, 1531, 1475, 1450, 1329, 1283, 1186, 1133, 1085, 929, 828, 812, 732, 701, 682  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  12.44 (1H, s,  $\text{SO}_2\text{NH}$ ), 7.67 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz,  $\text{N}^3\text{H}$  ureido), 7.49 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz,  $\text{H}2'$ ,  $\text{H}6'$ ), 6.87 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz, thiazol =CH-N), 6.61 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz,  $\text{H}3'$ ,  $\text{H}5'$ ), 6.10-6.03 (2H, m,  $\text{N}^1\text{H}$  ureido, thiazol =CH-S), 3.76-3.68 (1H, m, H1), 1.76-1.68 (5H, m, H2, H3, H4, H5, H6), 1.52-1.27 (5H, m, H2, H3, H4, H5, H6).

**$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO):**  $\delta$  165.06, 153.46, 147.93, 128.36, 125.39, 124.28, 112.78, 106.64, 48.37, 31.31, 25.18, 22.92.

## 4-[[Adamantan-1-yl]karbamoyl]amino}-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ada-STS)



### Reakční schéma 11

2 mmol (510,64 mg) sulfathiazolu bylo rozpuštěno po mírném zahřátí v 10 ml bezvodého MeCN za míchání bylo přidáno v jednom dílu 2,1 mmol (372,20 mg) 1-adamantylisokyanátu. Směs byla pozvolna přivedena k varu pod zpětným chladičem na 4 h, poté byla ponechána zchladnout a následně stát přes noc při +4 °C. Směs byla zfiltrována a pevná fáze byla promyta MeCN. Krystaly byly rekrystalizovány z EtOAc. Výtěžek byl 636,73 mg, tj. 74 % 4-[[adamantan-1-yl]karbamoyl]amino}-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu.

**T<sub>t</sub>** = 260,4-263,4 °C

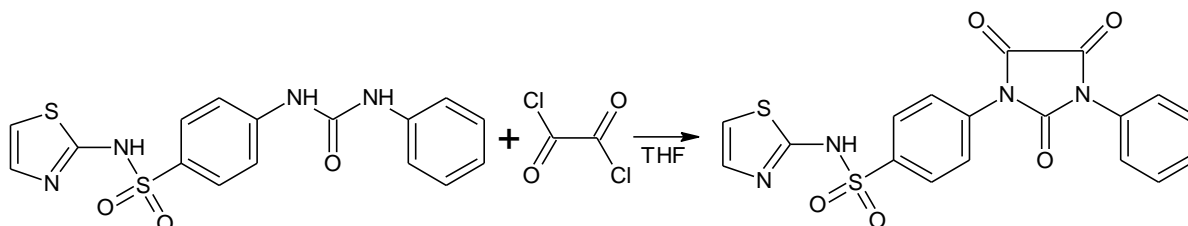
**Výtěžek** = 74 %

**log P** = 3,78

**IR:** 3375 (-NH-), 3133, 3096, 2907, 2850, 2815, 1664 (-CO- močovinový), 1567, 1521, 1416, 1399, 1360, 1344, 1325, 1303, 1279, 1223, 1190, 1127, 1086, 1052, 1036, 874, 858, 843, 817, 765, 745, 735, 714, 659 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):** δ 12.58 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 8.62 (1H, s, N<sup>1</sup>H ureido), 7.61 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H2', H6'), 7.44 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H3', H5'), 7.21 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-N), 6.78 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-S), 5.98 (1H, s, N<sup>3</sup>H ureido), 2.03-1.99 (3H, m, CH), 1.92-1.90 (6H, m, CCH<sub>2</sub>CH), 1.63-1.59 (6H, m, CHCH<sub>2</sub>CH).  
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO):** δ 153.58, 144.15, 133.89, 127.15, 124.44, 116.64, 112.58, 108.00, 50.20, 41.68, 36.16, 29.05.

***N*-(Thiazol-2-yl)-4-(2,4,5-trioxo-3-fenylimidazolidin-1-yl)benzensulfonamid (Ph-STS-Ox)**



*Reakční schéma 12*

1 mmol (374,44 mg) 4-[(fenylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého THF, poté bylo za míchání přidáno 1,2 mmol (0,102 ml) oxalyl chloridu. Směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem na 2 hodiny, poté byla ponechána 1,5 h zchladnout za laboratorní teploty a poté krystalizovala 24 h při 4°C. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty malým množstvím DCM. Následně byly rekrystalizovány v EtOAc a přefiltrovány. Výtěžek byl 355,6 mg, což je 83 % *N*-(thiazol-2-yl)-4-(2,4,5-trioxo-3-fenylimidazolidin-1-yl)benzensulfonamidu.

$T_f = 332,4-334,6 \text{ } ^\circ\text{C}$

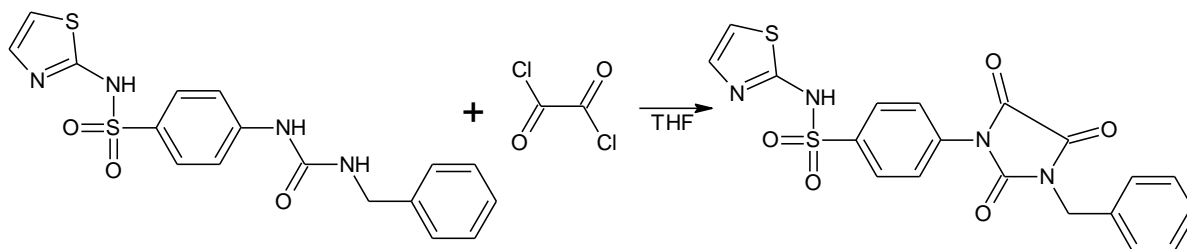
**Výtěžek = 83 %**

**log P = 0,13**

**IR:** 3107, 2916, 2849, 1704 (-CO-CO-), 1571, 1525, 1503, 1349, 1296, 1285, 1145, 902, 879, 855, 832, 761, 743, 706, 674  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  10.99 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 7.77 (2H, d,  $J = 8.1$  Hz, H2', H6'), 7.59-7.38 (2H, m, H3', H5', H2, H6), 7.30-7.23 (3H, m, H3, H5, thiazol =CH-N), 6.94 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz, H4), 6.90 (1H, d,  $J = 4.4$  Hz, thiazol =CH-S).

### 4-(3-Benzyl-2,4,5-trioximidazolidin-1-yl)-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ben-STS-Ox)



Reakční schéma 13

1 mmol (388,46 mg) 4-[(benzylkarbamoyl)amino]-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého THF, poté bylo za míchání přidáno 1,2 mmol (0,102 ml) oxalyl chloridu. Směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem na 2 hodiny, poté byla ponechána 1,5 h zchladnout při laboratorní teplotě, látka krystalizovala již za horka. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty malým množstvím DCM. Výtěžek byl 118,1 mg, což je 27 % 4-(3-benzyl-2,4,5-trioximidazolidin-1-yl)-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu.

U tohoto produktu jsme zjistili problém s rozpustností, nenašli jsme vhodné rozpouštědlo ani jejich směs, proto nemohla být látka identifikována pomocí NMR.

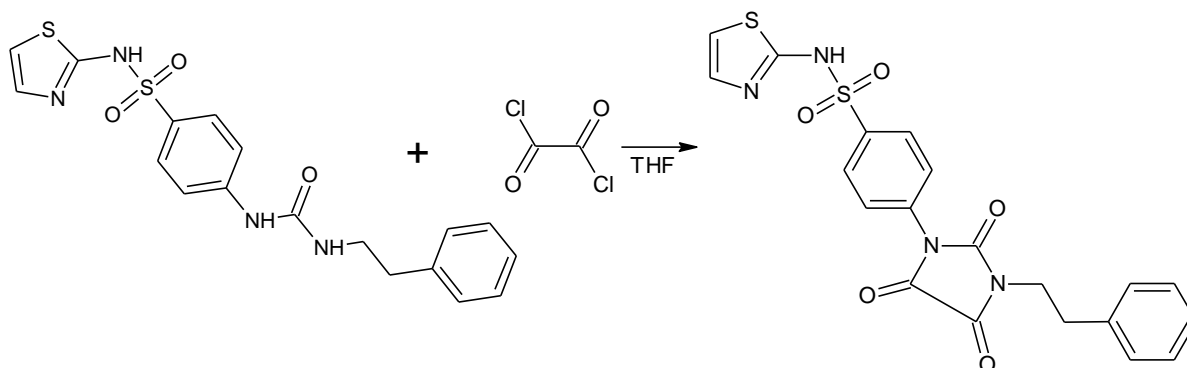
$T_t = 322,5-325,2 \text{ } ^\circ\text{C}$

**Výtěžek** = 27 %

**log P** = 0,16

**IR:** 3234, 3195, 3117, 2970, 1703 (-CO-CO-), 1677, 1570, 1525, 1501, 1348, 1320, 1295, 1273, 1256, 1170, 1145, 878, 831, 759, 743, 706, 679, 666  $\text{cm}^{-1}$ .

***N*-(Thiazol-2-yl)-4-[2,4,5-trioxo-3-(2-fenylethyl)imidazolidin-1yl]benzensulfonamid (PhEt-STS-Ox)**



*Reakční schéma 14*

1 mmol (402,49 mg) 4-[[2-fenylethyl]karbamoyl]amino-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého THF, poté bylo za míchání přidáno 1,2 mmol (0,102 ml) oxalyl chloridu. Směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem na 2 hodiny, poté byla ponechána zchladnout 1,5 h při laboratorní teplotě a bylo přidáno malé množství *n*-hexanu pro iniciaci krystalizace, ta probíhala přes noc při +4 °C. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty malým množstvím DCM. Poté byly rekrystalizovány z EtOAc. Výtěžek byl 359,3 mg, což je 79 % *N*-(thiazol-2-yl)-4-[2,4,5-trioxo-3-(2-fenylethyl)imidazolidin-1yl]benzensulfonamidu.

**T<sub>t</sub>** = 243,5-245,3 °C

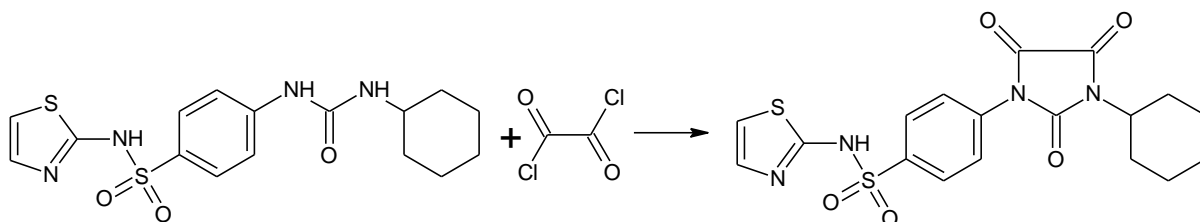
**Výtěžek** = 79 %

**logP** = 0,57

**IR:** 3352, 2978, 1697 (-CO-CO-), 1570, 1520, 1466, 1401, 1363, 1319, 1299, 1258, 1143, 1090, 1031, 936, 907, 835, 782, 752, 744, 695, 675 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):** δ 11.16 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 7.79 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H2', H6'), 7.59 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H3', H5'), 7.35-7.22 (6H, m, H2, H3, H4, H5, H6, thiazol =CH-N), 6.82 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-S), 3.58 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 2.89 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, PhCH<sub>2</sub>).

## 4-(3-Cyklohexyl-2,4,5-trioximidazolidin-1-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Cy-STS-Ox)



### Reakční schéma 15

1 mmol (380,49 mg) 4-[(cyklohexylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého THF, poté bylo za míchání přidáno 1,2 mmol (0,102 ml) oxalyl chloridu. Směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem na 2 hodiny, poté byla ponechána zchladnout 1,5 h při laboratorní teplotě a bylo přidáno malé množství *n*-hexanu pro iniciaci krystalizace, ta probíhala přes noc při +4 °C. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty malým množstvím DCM. Poté byly rekrystalizovány z EtOAc. Výtěžek byl 372,4 mg, což je 86 % 4-(3-cyklohexyl-2,4,5-trioximidazolidin-1-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu.

**T<sub>t</sub>** = 262,6-264,7 °C

**Výtěžek** = 86 %

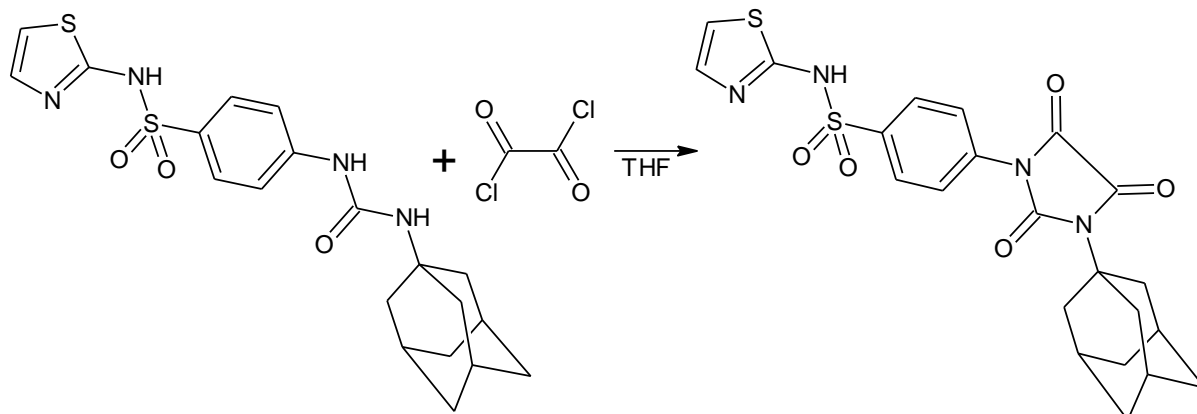
**log P** = 0,44

**IR:** 3177, 3108, 2944, 2860, 1697 (-CO-CO-), 1685, 1655, 1589, 1568, 1518, 1402, 1321, 1301, 1278, 1251, 1224, 1140, 1089, 1067, 934, 841, 830, 781, 764, 730, 717, 703, 674 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):** δ 11.16 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 7.62 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H2', H6'), 7.49 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H3', H5'), 7.21 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-N), 6.78 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, thiazol =CH-S), 3.49-3.42 (1H, m, H1), 1.80-1.61 (5H, m, H2, H3, H4, H5, H6), 1.32-1.05 (5H, m, H2, H3, H4, H5, H6).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO):** δ 168.95, 168.60, 158.84, 154.24, 144.26, 133.88, 127.15, 120.51, 116.68, 108.05, 49.45, 32.95, 30.50, 23.89.

### 4-(3-Adamantan-1-yl-2,4,5-trioximidazolidin-1-yl)-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ada-STS-Ox)



#### Reakční schéma 16

1 mmol (432,56 mg) 4-[[adamantan-1-yl]karbamoyl]amino-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého THF, poté bylo za míchání přidáno 1,2 mmol (0,102 ml) oxalyl chloridu. Směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem na 2 hodiny, poté byla ponechána zchladnout 1,5 h za laboratorní teploty a bylo přidáno malé množství *n*-hexanu pro iniciaci krystalizace, která probíhala přes noc při +4 °C. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty malým množstvím DCM. Poté byly rekrystalizovány z EtOAc. Výtěžek byl 388,3 mg, což je 80 % 4-(3-adamantan-1-yl-2,4,5-trioximidazolidin-1-yl)-N-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu.

$T_f = 317,5-320,2 \text{ } ^\circ\text{C}$

Výtěžek = 80 %

$\log P = 1,26$

**IR:** 3112, 2943, 2860, 1702 (-CO-CO-), 1570, 1524, 1402, 1348, 1322, 1294, 1255, 1143, 1090, 1011, 933, 851, 832 760, 740, 705, 688, 674, 663, 652  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):**  $\delta$  11.01 (1H, s, SO<sub>2</sub>NH), 7.77 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H2', H6'), 7.69 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H3', H5'), 7.26 (1H, d,  $J = 4.6$  Hz, thiazol =CH-N), 6.88 (1H, d,  $J = 4.6$  Hz, thiazol =CH-S), 2.52-2.47 (6H, m, CCH<sub>2</sub>CH), 2.39-2.34 (3H, m, CH), 1.86-1.60 (6H, m, CHCH<sub>2</sub>CH).



## 5. Biologická aktivita

### 5.1 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

U derivátů NI-STS, IN-STS, PZ-STS, Ph-STS, Ben-STS, PhEt-STS, Cy-STS a Ada-STS byla stanovena *in vitro* antimykobakteriální aktivita. Testovanými kmeny byly *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 (H<sub>37</sub>R<sub>V</sub>) v ředění 10<sup>-3</sup>, dále tři kmeny atypických mykobakterií: *Mycobacterium avium* 330/88 (rezistentní na isoniazid, rifampicin, ofloxacin a ethambutol) v ředění 10<sup>-5</sup>, *Mycobacterium kansasii* 235/88 ředění 10<sup>-4</sup> a *Mycobacterium kansasii* 4509/96 v ředění 10<sup>-4</sup>. Posledně jmenovaný kmen byl izolován od pacienta z okresu Karviná, ostatní kmeny byly získány z České národní sbírky typových kultur.

Stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) bylo prováděno mikrometodou v Šulově půdě od firmy SEVAC v plastových P-destičkách. Testované látky byly přidány v roztoku dimethylsulfoxidu tak, aby výsledné koncentrace činily 1000, 500, 250, 125, 62,5, 32, 16, 8, 4, 2 a 1 μmol/l. Hodnoty MIC byly odečteny po 14 a 21 dnech kultivace při 37 °C, u *Mycobacterium kansasii* byly odečteny navíc i po 7 dnech.

Hodnota MIC udává nejnižší koncentraci, při které byla pozorována úplná inhibice růstu mykobakterií. Jako referenční látka bylo použito základní léčivo isoniazid a dále pak byla stanovena aktivita výchozí molekuly sulfathiazolu. Testování antimykobakteriální aktivity bylo provedeno ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, laboratoř pro diagnostiku mykobakterií a tuberkulózy, pod vedením RNDr. Jiřiny Stolaříkové. (39)

### 5.2 Hodnocení antibakteriální aktivity

U všech připravených sloučenin byla stanovena *in vitro* antibakteriální aktivita proti osmi kmenům Gram pozitivních a Gram negativních bakterií: *Staphylococcus aureus* CCM 4518/08, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* H 5996/08 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus* sp. J 14365/08, *Escherichia coli* CCM 4517, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, ESBL-pozitivní (pozitivní na průkaz beta-laktamáz širokého spektra) *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. Ke stanovení antibakteriální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách podle standardu M07-A07 v Müller-Hintově bujónu. Velikost inokula byla 0,5 podle McFarlandovy stupnice (1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml), pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 ± 0,2. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO tak, aby finální koncentrace byly: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,91, 1,95, 0,98 a 0,49 μmol/l. Hodnoty MIC byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a v humidní atmosféře při 35 °C ± 0,1 °C.

Hodnota MIC je definována jako minimálně 95% redukce růstu bakterií ve srovnání s kontrolou. Inhibice růstu byla stanovena vizuální metodou. Dále byla stanovena aktivita výchozí látky sulfathiazolu. Antibakteriální aktivita byla stanovena

pod vedením paní Idy Dufkové na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. (39)

### **5.3 Hodnocení antifungální aktivity**

*In vitro* antifungální aktivita byla testována na osmi kmenech patogenních hub: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Ke stanovení antifungální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách podle standardů CLSI M27-A3 a M38-A2 v RPMI mediu s glutaminem od firmy KlinLab pufrovaném 0,165 M 3-morfolinpropan-1-sulfonovou kyselinou od firmy Sigma-Aldrich na pH 7,0. Finální velikost inokula byla v případě kvasinkových mikroorganismů  $5,0 \times 10^3$  CFU/ml, u vláknitých hub  $0,5-5,0 \times 10^4$  CFU/ml. Velikost inokula byla zkontrolována pomocí Bürkerovy komůrky. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO tak, aby výsledné koncentrace byly: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,91, 1,95, 0,98 a 0,49  $\mu\text{mol/l}$ . Hodnoty MIC byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a v humidní atmosféře při  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ , v případě *Trichophyton mentagrophytes* byly hodnoty odečteny po 72 a 120 hodinách.

Hodnota MIC je v případě kvasinek definována jako minimálně 80% redukce růstu ve srovnání s kontrolou. U vláknitých hub minimálně 50% inhibice růstu. Inhibice byla stanovena vizuálně. Dále byla stanovena aktivita výchozí látky sulfathiazolu.

Antifungální aktivita byla stanovena pod vedením paní Idy Dufkové na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. (40)

### **5.4 Výsledky biologického hodnocení**

Výsledky biologického hodnocení jsou zaneseny v tabulkách č. 3, 4 a 5.

Tabulka č. 3. Hodnocení antimykobakteriální aktivity

	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> My 6509/96		
Délka inkubace	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
Látka	MIC [ $\mu\text{mol/l}$ ]									
IN-STS	<b>8</b>	16	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	<b>8</b>	16	32	16	32	32
NI-STS	<b>8</b>	16	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	16	32	32	16	32	62,5
PZ-STS	<b>8</b>	16	>1000	>1000	<b>8</b>	<b>8</b>	16	<b>4</b>	<b>8</b>	16
Ph-STS	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>
Ben-STS	125	125	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	250	250	250 <sub>nárůst</sub>	250	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>
PhEt-STS	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>32</b>	<b>62,5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
Cy-STS	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>62,5</b>	125	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	16
Ada-STS	16	32	250 <sub>nárůst</sub>	250 <sub>nárůst</sub>	16	16	32	16	32	32
isoniazid	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	4	8	8
sulfathiazol	32	62,5	62,5	62,5	2	4	4	1	2	2

Tabulka č. 4. Antibakteriální aktivita

Testované kmeny															
1. SA <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516/08															
2. MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08 methicilin rezistentní															
3. SE <i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6960/08															
4. EF <i>Enterococcus</i> sp. J 14365/08															
5. EC <i>Escherichia coli</i> CCM 4517															
6. KP <i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08															
7. KP-E <i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08 ESBL-pozitivní															
8. PA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961															
Výsledky															
Kmen		Testované látky MIC [ $\mu\text{mol/l}$ ]													
		IN-STS	NI-STS	PZ-STS	Ph-STS	Ben-STS	PhEt-STS	Cy-STS	Ada-STS	Ph-STS-Ox	Ben-STS-Ox	PhEt-STS-Ox	Cy-STS-Ox	Ada-STS-Ox	STS
SA	24h	<b>62,5</b>	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	<b>500</b>	>500	>125	>125	>250	>250	>125	31,25
	48h	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	62,5
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	<b>250</b>	>500	>125	>125	>250	>250	>125	62,5
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	<b>500</b>	>500	>125	>125	>250	>250	>125	125
SE	24h	<b>250</b>	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	<b>125</b>	>125	<b>250</b>	>250	>125	>500
	48h	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	<b>125</b>	>125	<b>250</b>	>250	>125	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125	>250	>250	>125	>500

Tabulka č. 5. Antifungální aktivita

Testované kmeny															
1. CA <i>Candida albicans</i> ATCC 44859															
2. CT <i>Candida tropicalis</i> 156															
3. CK <i>Candida krusei</i> E28															
4. CG <i>Candida glabrata</i> 20/1															
5. TA <i>Trichosporon asahii</i> 1188															
6. AF <i>Aspergillus fumigatus</i> 231															
7. AC <i>Absidia corymbifera</i> 272															
8. TM <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445															
Výsledky															
Kmen		Testované látky MIC [ $\mu\text{mol/l}$ ]													
		IN-STS	NI-STS	PZ-STS	Ph-STS	Ben-STS	PhEt-STS	Cy-STS	Ada-STS	Ph-STS-Ox	Ben-STS-Ox	PhEt-STS-Ox	Cy-STS-Ox	Ada-STS-Ox	STS
CA	24h	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
	48h	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
CT	24h	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
	48h	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
CK	24h	>500	>500	>500	>500	<b>125</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
	48h	>500	>500	>500	>500	<b>125</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
CG	24h	>500	>500	>500	>500	<b>125</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
	48h	>500	>500	>500	>500	<b>125</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
TA	24h	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
	48h	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
	48	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
TM	72h	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250
	120h	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>125	>500	>125	>125	>125	>250	>250	>125	>250

## 6. Diskuze

V rámci této diplomové práce bylo připraveno 13  $N^4$ -substituovaných derivátů sulfathiazolu, z toho byly tři amidy, pět substituovaných močovin a pět substituovaných 2,4,5-trioxoimidazolidinů odvozených od sulfathiazolu. Připravené produkty byly charakterizovány pomocí teplot tání, infračervené spektrofotometrie a NMR.

Amidy byly připraveny z chloridů příslušných kyselin. Tento postup byl zvolen poté, co se neosvědčily postupy s kyselinou aktivovanou  $N,N'$ -dicyklohexylkarbodiimidem (DCC), respektive  $N$ -(3-dimethylaminopropyl)- $N'$ -ethylkarbodiimidem (EDC), s přídavkem katalytického množství 4-( $N,N$ -dimethylamino)pyridinu (DMAP) v suchém DMF. DCC jsme zkoušeli nahradit EDC v domnění, že reakce je bráněna stericky, což se nepotvrdilo, protože ani reakce s EDC nevedla k vyšším výtěžkům. Podle TLC byl produkt přítomen, ale nebyli jsme ho schopni izolovat v dostatečném množství pro určení identity. Oba postupy jsme zkoušeli ve třech teplotních režimech, prvním bylo zchlazení směsi příslušné kyseliny, sulfathiazolu a DMAP na  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  a poté přídavek DCC, resp. EDC, ve třech dílech během 1 h, poté byla směs 1,5 h míchána a následně odstavena na 48 h při  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  s kontrolou po 24 h pomocí TLC. Druhým bylo provedení obdobné, pouze reakce probíhala za laboratorní teploty. Při třetím provedení byla teplota reakční směsi přibližně  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Dále jsme zkoušeli prodloužit reakční čas, ale ani jeden z těchto postupů nevedl ke zvýšení výtěžku. Proto jsme zvolili postup přes chlorid kyseliny, který jsme připravili z příslušné kyseliny a thionylchloridu. Reakce sulfathiazolu s chloridem kyseliny v přítomnosti terciální báze podle očekávání vedla k dostatečným výtěžkům, které se pohybovaly v rozmezí 34-61 % čisté látky.

Močoviny byly připraveny z příslušných komerčně dostupných isokyanátů, reakční podmínky nebylo třeba měnit, výtěžky se pohybovaly v rozmezí 68-78 % čisté látky, což bylo dostačující na potřebné testy a pro zajištění dostatečného množství pro následnou cyklizaci.

2,4,5-Trioxoimidazolidiny byly připravené reakcí příslušných močovin s oxalylchloridem, nastavenou teplotu a reakční čas nebylo třeba měnit, výtěžky se pohybovaly v rozmezí 26-86 %. Problém nastal u 4-(3-benzyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)- $N$ -(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu, u kterého jsme nenašli rozpouštědlo, které by umožnilo změření jeho NMR spektra. U této látky se problém s rozpustností projevil nejmarkantněji, ale problém byl i u dalších látek této skupiny: Ph-STS-Ox, PhEt-STS-Ox a Ada-STS-Ox nemají proto změřené uhlíkové spektrum z důvodu nízké rozpustnosti.

Přehled připravených sloučenin:

Amidy:

- $N$ -[4-(thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-3-karboxamid
- $N$ -[4-(thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-4-karboxamid
- $N$ -[4-(thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid

Močoviny:

- 4-[(fenylkarbamoyl)amino]- $N$ -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid
- 4-[(cyklohexylkarbamoyl)amino]- $N$ -(thiazol-2-yl)benzensulfonamid

- 4-[(benzylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid
- 4-[[2-fenylethyl]karbamoyl]amino}-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid
- 4-[(adamantan-1-yl)karbamoyl]amino}-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid

#### 2,4,5-Trioxoimidazolidiny:

- *N*-(thiazol-2-yl)-4-(2,4,5-trioxo-3-fenylimidazolidin-1-yl)benzensulfonamid
- 4-(3-cyklohexyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid
- 4-(3-benzyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid
- *N*-(thiazol-2-yl)-4-[2,4,5-trioxo-3-(2-fenylethyl)imidazolidin-1-yl]benzensulfonamid
- 4-(3-adamantan-1-yl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid

4-[(Benzylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ben-STS) byl již publikován, a to v práci, která se zabývala látkami s vlivem na sodíkové kanály. U této sloučeniny byla popsána aktivita na sodíkový kanál, ale látka jako taková v článku (41) není charakterizována. 4-[(Cyklohexylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Cy-STS) je patentově chráněn jako látka s potenciálem ovlivňovat aktivitu sodíkových kanálů. U látky nebyla stanovena její aktivita na daný sodíkový kanál ani nebyla charakterizována. (42)

Výsledky antimykobakteriálního hodnocení látek jsou v době odevzdání diplomové práce známé pro výchozí sulfathiazol, amidy a močoviny, kdežto 2,4,5-trioxoimidazolidiny jsou stále testovány. Připravené amidy vykazovaly vzájemně velmi podobné hodnoty MIC, které byly proti *M. tuberculosis* lepší než u výchozí molekuly. Močoviny byly z tohoto pohledu méně sourodou skupinou látek. Dvě látky ze skupiny močovín překonaly hodnoty MIC amidů. Nejlepších hodnot MIC vůči mykobakteriím dosahoval u všech testovaných kmenů 4-[[2-fenylethyl]karbamoyl]amino}-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (PhEt-STS) s aktivitou 4 μmol/l proti *M. tuberculosis* My 331/88, 32 μmol/l proti *M. avium* My 330/88, 4 μmol/l proti *M. kansasii* My 235/80, 2 μmol/l proti *M. kansasii* My 6509/96. Další látkou s obdobně dobrými *in vitro* výsledky byl 4-[(cyklohexylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Cy-STS). Obě tyto látky mají také jedny z nejvyšších rozdělovacích koeficientu (3,09, resp. 2,96), hned po adamantyl derivátu. Tyto látky také vykázaly lepší hodnoty MIC proti *M. tuberculosis* My 331/88 než sulfathiazol, proti ostatním kmenům vykazovaly výsledky srovnatelné nebo horší než výchozí molekula. Deriváty Ph-STS a Ben-STS vykazovaly výrazně horší aktivitu. Z výsledků MIC lze vypožorovat, že zkrácením řetězce spojujícího benzen s močovinovým dusíkem dojde ke snížení aktivity, což je vidět na snižující se aktivitě PhEt-STS, Ben-STS, Ph-STS. Dále lze pozorovat pokles aktivity v důsledku aromatizace cyklohexylu na fenyl, viz hodnoty MIC Cy-STS a Ph-STS. Z tohoto pohledu by bylo zajímavé v další práci připravit deriváty s cyklohexylmethylem a cyklohexylethylem. V době odevzdání diplomové práce nejsou k dispozici výsledky testování cytotoxicity, tudíž je nemůžeme porovnat s výchozí molekulou.

Výsledky antibakteriální aktivity nepřevýšily hodnoty MIC výchozí látky. Nejlepších výsledků dosáhla látka *N*-[4-(thiazol-2-ylsulfamoyl)fenyl]pyridin-4-karboxamid (IN-STS) s MIC proti *S. aureus* 62,5 μmol/l, ale ani tato hodnota nepřekonala výchozí látku; dále vykazovala aktivitu proti *S. epidermidis*, u ostatních kmenů byla neaktivní. Všechny látky

byly neaktivní proti gramnegativním bakteriím. U grampozitivních bakterií vykazovaly aktivitu pouze látky IN-STs, PhEt-STs a Cy-STs.

Z hlediska antifungální aktivity se ukázala být aktivní pouze jedna látka, 4-[(benzylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Ben-STs), jejíž aktivita (MIC = 125-250  $\mu\text{mol/l}$ ) byla lepší než u výchozí sloučeniny, avšak pouze o jedno ředění. Tato látka byla neaktivní na kmeny *A. fumigatus* 231 a *A. corymbifera* 272. Prodloužení nebo zkrácení spojovacího řetězce mezi močovinným dusíkem a benzenovým jádrem o jeden uhlík vedlo ke ztrátě aktivity.



## 7. Závěr

V této diplomové práci bylo připraveno 13 látek, tři amidy, pět substituovaných močovin a pět substituovaných 2,4,5-trioxoimidazolidinů odvozených od sulfathiazolu. Amidy byly připraveny z chloridů příslušných kyselin a sulfathiazolu v přítomnosti triethylaminu a jejich výtěžky se pohybovaly v rozmezí 34-61 %. Močoviny byly získány reakcí se substituovanými isokyanátů (výtěžek 68-77 %). 2,4,5-Trioxoimidazolidiny byly připraveny cyklizací močovin oxalyl chloridem a s výtěžky v rozmezí 27-86 %. Všechny látky byly identifikovány pomocí TLC a IČ spektra, většina látek byla dále identifikována také pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektra a látky, které to svou rozpustností umožnily, byly identifikovány také pomocí  $^{13}\text{C}$  NMR spektra. Ze syntetického pohledu tak byly cíle práce kompletně splněny.

Antimykobakteriální hodnoty MIC se pohybovaly v rozmezí 2-1000  $\mu\text{mol/l}$ , hodnoty MIC proti dalším bakteriím pak v rozmezí 62,5-500  $\mu\text{mol/l}$ , u hub byly MIC  $\geq 125$   $\mu\text{mol/l}$ . Biologické testování prokázalo u 4-[[2-fenylethyl]karbamoyl]amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu (PhEt-STS) a 4-[(cyklohexylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu (Cy-STS) lepší nebo srovnatelnou hodnotu MIC vůči mykobakteriálním kmenům než sulfathiazol, také všechny amidy vykazovaly lepší aktivity proti *M. tuberculosis*. U bakteriálních kmenů byly u všech látek hodnoty MIC vyšší než u výchozí látky a u antifungální aktivity byly hodnoty MIC v porovnání se sulfathiazolem lepší pouze v případě 4-[(benzylkarbamoyl)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamidu (Ben-STS). V obecné rovině mají všechny připravené deriváty intermediární až nízkou antibakteriální a antifungální aktivitu, některé jsou pak vysloveně inaktivní. Biologické hodnocení nebylo zatím dokončeno kompletně.

V souhrnu se podařilo připravit deriváty s lepší účinností vůči *M. tuberculosis*, než má výchozí sulfathiazol, kdežto u atypických mykobakterií byla aktivita srovnatelná či mírně nižší. Kombinace dvou různých strukturních prvků se známou antimykobakteriální aktivitou se tak ukázala být výhodnou právě u *M. tuberculosis*, i když podstatně závisí také na dalších substituentech.

## 8. Použitá literatura

1. Van Soolingen, D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine*, 2001, 249, 1-26.
2. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S. a Pfaller, M. A. *Medical Microbiology*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2009, 947 p. ISBN 978-0-323-05470-6
3. Yuan, Y.; Mead, D.; Schroeder, B. G.; Zhu, Y. a Barry, C. E. The Biosynthesis of Mycolic Acid in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Methyl(ene) Transfer to Acyl Carrier Protein Bound Meromycolic Acid *in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273, 21282-21290.
4. Rahama, O. a Thaker, H. Atypical mycobacteria: an important differential for the general physician. *Clinical Medicine*. 2013, 13, 504-506.
5. Sakula, A. Robert Koch: Centenary of the discovery of the tubercle bacillus. *Thorax*. 1982, 37, 246-51.
6. Global tuberculosis report 2015. URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf) [cit. 2016-2-20]
7. Vašáková, M. Tuberkulóza v České republice. Současný stav. Diagnóza, léčba, prevence. *Vnitřní Lekarství / Internal Medicine*. 2013, 59, 284-289
8. Tuberculosis NICE guideline. URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng33/resources/tuberculosis-1837390683589> [cit. 2016-3-16]
9. Guidelines for treatment of tuberculosis fourth edition. URL: [www.who.int/tb/publications/2010/2789241547833/en/](http://www.who.int/tb/publications/2010/2789241547833/en/) [cit. 2016-3-21]
10. Metodika očkování proti TBC v ČR. URL: [www.mzcr.cz/verejne/obsah/metodika-ockovani-proti-TBC-v-cr\\_2546\\_5.html](http://www.mzcr.cz/verejne/obsah/metodika-ockovani-proti-TBC-v-cr_2546_5.html) [cit. 2016-3-21]
11. Vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů.
12. Isoniazid. *Tuberculosis*, 2008, 88, 112-116.
13. Rifampin. *Tuberculosis*, 2008, 88, 141-144.
14. Pyrazinamide. *Tuberculosis*, 2008, 88, 151-154.
15. Shi, WL.; Chen, JZ.; Feng, J.; Cui, P.; Zhang, S.; Weng, XH.; Zhang, WH. a Zhang, Y. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infection*, 2014, 3, e58.
16. Streptomycin. *Tuberculosis*, 2008, 88, 162-163.
17. Ethambutol. *Tuberculosis*, 2008, 88, 102-105.
18. Kanamycin. *Tuberculosis*, 2008, 88, 117-118.
19. Amikacin. *Tuberculosis*, 2008, 88, 87-88.
20. Akbergenov, R.; Shcherbakov, D.; Matt, T.; Duscha, S.; Meyer, M.; Wilson, D. N. a Böttger, E.C. Molecular basis for the selectivity of antituberculosis compounds capreomycin and viomycin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2011, 55, 4712-4717.
21. Levofloxacin. *Tuberculosis*, 2008, 88, 119-121.

22. Lata, M.; Sharna, D.; Deo, N.; Tiwari, P. K.; Bisht, D. a Venkatesan, K. Proteomic analysis of ofloxacin-mono resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Proteomic*, 2015, 127, 114-121.
23. Nuermberger, E. a Grosset, J. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Issues in the Threatment of Mycobacterial Infections. *European Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 23, 243-255.
24. Para-aminosalicylic acid. *Tuberculosis*, 2008, 88, 137-138.
25. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. 5<sup>th</sup> Edition. URL: [apps.who.int/iris/bitstream/10665/174597/1/9789241549134\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/174597/1/9789241549134_eng.pdf) [cit. 2016-4-1]
26. Cadosch, D.; Abel zur Wiesch, P.; Kouyos, R. a Bonhoeffer, S. The Role of Adherence and Retreatment in De Novo Emergence of MDR-TB. *Plos Computational Biology*, 2016, 12, 1-19.
27. The use of delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis URL: [apps.who.int/iris/bitstream/10665/137334/1/WHO\\_HTM\\_TB\\_2014.23\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137334/1/WHO_HTM_TB_2014.23_eng.pdf) [cit. 2016-4-24]
28. The use of bedaquiline in the treatment of multidrug resistant tuberculosis. URL: [www.who.int/tb/challenges/mdr/Report\\_EGM\\_BDQ\\_2013.pdf](http://www.who.int/tb/challenges/mdr/Report_EGM_BDQ_2013.pdf) [cit. 2016-4-24]
29. Iyer, H. V. History Revisited-Prontosil Red. *The Journal of Emergency Medicine*, 2008, 35, 209-210.
30. Wainwright, M. a Kristiansen, E. J. On the 75<sup>th</sup> anniversary of Prontosil. *Dyes and Pigments*, 2011, 88, 231-234.
31. Krátký, M.; Vinšová, J.; Volková, M.; Buchta, V.; Trejtnar, F. a Stolaříková, J. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *European Journal of Medical Chemistry*, 2012, 50, 433-440.
32. Carta, F.; Maresca, A.; Covarrubias, S. A.; Mowbray, L. S.; Jones, A. T.; Supuran, T. C. Carbonic anhydrase inhibitors. Characterization and inhibition studies of the most active beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Rv 3588c, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19, 6649-6654.
33. Forgacs, P.; Wengenack, L. N.; Hall, L.; Zimmerman, K. S.; Silverman, L. M. a Roberts, D. G. Tuberculosis and trimethoprim-sulfamethoxazol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53, 4789-4793.
34. Švihovec J. a Šmíd M. (eds.). Základní & klinická farmakologie. Vyd. v ČR 2., v H & H 1. Redaktor Bertram G Kartzung. Jinočany: H & H, 1995. s. 694-699.
35. 19th WHO Model List of Essential Medicines 2015. URL: [www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015\\_8-May-15.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf) [cit. 2016-4-18]
36. Akgün, H.; Karamelekoglu, Í.; Berk, B.; Kurnaz, I.; Saribiyik, G.; Öktem, S. a Kocagöz, T. Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, 20, 4149-4154.
37. Hartl J. Farmaceutická chemie IV. 1. vyd. Praha: Karolinum 2006, s. 63-69
38. Krátký, M.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Buchta, V.; Stoklasová, J. a Vinšová, J. Synthesis and antimicrobial aktivty of sulphamethoxazole-based ureas and imidazolidine-2,4,5-triones. *Chemical Papers*, 2015, 69, 1108-1117.

39. Krátký, M.; Vinšová, J.; Novotná, E.; Mandíková, J.; Trejtnar, F. a Stolaříková, J. Antibacterial Activity of Salicylanilide 4-(Trifluoromethyl)-benzoates. *Molecules*, 2013, 18, 3674-3688.
40. Krátký, M.; a Vinšová, J.; Antifungal Activity of Salicylanilides and Their Esters with 4-(Trifluoromethyl)benzoic acid. *Molecules*, 2012, 17, 9426-9442.
41. Wang, L.; Zellner G. S.; Printzenhoff, M. D. a Castle, A. N. Addition of a single methyl group to a small molecule sodium channel inhibitor introduces a new mode of gating modulation. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172, 4905-4918.
42. Gonzales, J. E. III.; Termin, A. P.; Martinborough, E. a Zimmerman, N. Composition useful as inhibitors of voltage-gated sodium channels. Patent: WO2005/13914 A2, 2005

## 9. Příspěvky na konferencích

1. Vinšová, J.; Krátký, M.; Kufa, M.; Stolaříková, J. Synthesis and antimicrobial activity of novel sulfonamide derivatives. 67. Zjazd chemikov, Horný Smokovec, 7.-11. 9. 2015, sborník str. 163-164, (poster).
2. Vosátka, R.; Krátký, M.; Kufa, M.; Vinšová, J. Syntéza a antimykobakteriální aktivita nových sulfathiazolových derivátů. 45. konference Syntéza a analýza léčiv. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 22.-24. 6. 2016 (poster).