

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie



Design a syntéza nových potenciálně  
antibakteriálně účinných sloučenin

*Disertační práce*

Mgr. Rudolf Vosátka

Studijní obor:

Bioorganická chemie (1406V005)

Školitel:

prof. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.

Odborný konzultant:

PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.



„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením své školitelky a odborného konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, listopad 2018

.....

Mgr. Rudolf Vosátka

# Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především dvěma osobám, své školitelce prof. RNDr. Jarmile Vinšové, CSc., a odbornému konzultantovi PharmDr. Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D. Děkuji jim za veškerou pomoc spojenou s jejich odborným vedením, kterého se mi dostávalo od chvíle, kdy jsem se jako diplomant stal členem této pracovní skupiny. Děkuji jim rovněž za všechny cenné rady, pomoc při sepisování a trpělivost, kterou se mnou vždy měli.

Můj velký dík patří rovněž všem členům Katedry organické a biorganické chemie za možnost být její součástí a dále za jejich veškerou spolupráci a ochotou s ní spojenou. Děkuji také Maďarské akademii věd a naší spolupracující skupině Research Group of Peptide Chemistry zastoupené prof. Szilvií Bősze za to, že mně umožnili vědeckou stáž na jejich pracovišti.

Za měření a pomoc při interpretaci NMR děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., za měření IČ spekter paní Ivě Vencovské. Za testování antibakteriálních a antifunfálních aktivit děkuji paní Idě Dufkové, RNDr. Kláře Konečné, Ph.D., PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D., a RNDr. Jiřině Stolaříkové. Mé díky za stanovení cytotoxicity připravených derivátů patří doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc., a Mgr. Jiřímu Janouškovi.

V neposlední řadě děkuji za veškerou podporu během celého studia své rodině a blízkým přátelům.

Závěrem bych rád poděkoval všem podpůrným projektům, bez jejichž finančního přispění by byl vznik této práce obtížněji realizovatelný.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (SVV 260 401), Ministerstva zdravotnictví ČR (IGA NT 13346), Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR (TEAB, registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235). Dále je součástí projektu „Peptidové drug delivery systémy směřované do makrofágů pro antimykobakteriálně aktivní sloučeniny“ podpořené Grantovou agenturou České republiky (projekt číslo 17-27514Y).

# Seznam použitých zkratek

ACP	acyl carrier protein
AcpM	mycobacterial acyl carrier protein
AG	arabinogalaktan
AMP	adenosinmonofosfát
Ara	arabinoza
ATP	adenosintrifosfát
BMM $\Phi$	myší makrofágy pocházející z kostní dřeně
BCG	Bacillus Calmette-Guerin (oslabený živý kmen odvozený od <i>M. bovis</i> )
CFU	colony forming units (jednotky tvořící kolonie)
CmaA1-2	cyclopropane mycolic acid synthase 1-2
CoA	koenzym A
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DDS	drug delivery system neboli systém řízeného uvolňování léčiva
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	koncentrace vedoucí k odezvě u 50 % testovaných organismů vůči kontrole
EDAC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EGFR	epidermal growth factor receptor (receptor epidermálního růstového faktoru)
EMB	ethambutol
ESBL	extended-spectrum $\beta$ -lactamases (širokospektré $\beta$ -laktamázy)
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
<i>f</i>	furanózový kruh
FabH	$\beta$ -ketoacyl-ACP syntáza III
FabI	bakteriální enoyl-ACP reductáza
FadD32	fatty acyl-AMP ligase
FAME	fatty acid methyl esters (methylestery mastných kyseliny)
FAS I/II	fatty acid synthase I/II

FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, vládní agentura Spojených států amerických)
G	glycin
Gal	galaktóza
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
H37Rv	lékově-citlivý kmen <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 331/88
HadAB/BC	$\beta$ -hydroxyacyl-ACP dehydratáza
HepG2	buněčná linie odvozená z lidských buněk jaterního karcinomu
HIV	human immunodeficiency virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
IC <sub>50</sub>	koncentrace vedoucí k 50 % poklesu aktivity vůči kontrole
ICL	isocitrát lyáza
IgG	imunoglobulin G
INH	isoniazid
InhA	mykobakteriální enoyl-ACP reduktáza
K	lysin
KasA/B	$\beta$ -ketoacyl-ACP syntáza
KatG	kataláza/peroxidázový enzym
$K_i$	disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor
LAM	lipoarabinomannan
LM	lipomannan
MabA	$\beta$ -ketoacyl-ACP reduktáza
mAGP	mykolyt-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex
MAME	mycolic acid methyl esters (methylestery mykolových kyselin)
MDR-TB	multidrug-resistant tuberculosis (multilékově rezistentní tuberkulóza)
MeCN	acetonitril
Methyl-PAS	methyl- <i>p</i> -aminosalicylát
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MmaA1-4	mycolic acid methyltransferase 1-4
MonoMac6	lidská monocytární buněčná linie
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>

MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
MurNAc	<i>N</i> -acetylmuramová kyselina
MurNGlyc	<i>N</i> -glykolylmuramová kyselina
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaná forma)
NMR	nukleární magnetická rezonance
QAPRTáza	fosforibosyltransferáza kyseliny chinolinové
P	prolin
PanD	aspartát dekarboxyláza
PAS	<i>p</i> -aminosalicylová kyselina
PcaA	cyclopropane mycolic acid synthase 3
PG	peptidoglykan
Ph-Cl	chlorbenzen
PIM	fosfatidylinositol manosid
pK <sub>a</sub>	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty pro kyseliny
Pks13	polyketide synthase-13
POA	pyrazin-2-karboxylová kyselina
RR-TB	rifampicin-resistant tuberculosis (rifampicin-rezistentní tuberkulóza)
PZA	pyrazinamid
R	arginin
RNA	ribonukleová kyselina
RpsA	ribosomální protein S1
SAL	salicylanilid
SAR	structure-activity relationship (vztah mezi strukturou a aktivitou)
SBL	substrate-binding loop (aminokyselinové zbytky 196-219)
SI	index selektivity
T	threonin
TB	tuberkulóza
TCA	trikarboxylové kyseliny

TDM	trehalóza-dimykolát
TDR-TB	totally drug-resistant tuberculosis (totálně lékově-rezistentní tuberkulóza)
THF	tetrahydrofuran
TMM	trehalóza-monomykolát
tmRNA	transferová-mediátorová ribonukleová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TRC	triklosan
XDR-TB	extensively drug-resistant tuberculosis (extenzivně lékově-rezistentní tuberkulóza)



# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: Mgr. Rudolf Vosátka

Školitel: prof. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.

Odborný konzultant: PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Název disertační práce: Design a syntéza nových potenciálně antibakteriálně účinných sloučenin

Tuberkulóza (TB) spolu s jejími rezistentními formami patří celosvětově mezi jedno z nejčastějších příčin úmrtí. Je proto předmětem zájmu mnoha vědeckých skupin, stejně tak jako nezanedbatelné globální riziko vzrůstající rezistence bakterií a hub, se kterým se taktéž musí počítat a snažit se mu předcházet. Tato disertace se ve svých úvodních částech snaží shrnout současné poznatky o TB z hlediska epidemiologie, patogeneze, původci *Mycobacterium tuberculosis* a současné léčby i s jejím úskalím v podobě rezistence. Současně uvádí čtyři výchozí struktury, které pak tvoří základní stavební kameny pro část experimentální. Jedná se o triklosan, přímý inhibitor mykobakteriální enoyl-ACP reduktázy, antimikrobiálně vysoce účinné salicylanilidy, isoniazid jako jedno z nejvýznamnějších antituberkulotik a *p*-aminosalicylovou kyselinu, která je součástí druhé linie užívaných antituberkulotik.

Experimentální část se zabývá obměnami těchto struktur vedoucích k biologické odezvě, resp. antimykobakteriální, antibakteriální, antifungální a cytotoxické aktivitě. Získané výsledky jsou diskutovány ve vztahu struktury derivátu k jeho účinku. Za tímto účelem byla připravena knihovna čítající 98 dosud nepublikovaných a 93 publikovaných derivátů (viz čtyři přiložené publikace). Některá z těchto připravených analog dosáhla velmi vysokých inhibičních hodnot srovnatelných se standardy jako isoniazid, bacitracin či flukonazol. Biologickým testováním bylo navíc pokryto celé spektrum vybraných mikroorganismů a v neposlední řadě bylo v některých případech dosaženo i velmi nízkých hodnot toxicit, které jsou jedním z důležitých faktorů pro použitelnost daného léčiva v terapii.

# ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Department of Organic and Bioorganic Chemistry  
Candidate: Mgr. Rudolf Vosátka  
Supervisor: prof. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.  
Consultant: PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.  
Title of Doctoral Thesis: Design and synthesis of new potentially antibacterial active compounds

Tuberculosis (TB) and its resistant forms are one of the most often causes of death worldwide. It is therefore a matter of interest for many scientific groups, as well as a notable global risk of increasing resistance of bacteria and fungi, which must also be dealt with. The introduction of doctoral thesis deals with the TB in terms of epidemiology, pathogenesis, *Mycobacterium tuberculosis* and its current treatment, as well as its resistance problems. This work also present four basic structures, which then form the basic building blocks for the experimental part. It is triclosan, a direct inhibitor of mycobacterial enoyl-ACP reductase, antimicrobial highly effective salicylanilides, isoniazid as one of the most important antituberculotic drugs and *p*-aminosalicylic acid, which is a second line antituberculotic agent.

The experimental part deals with variations of these structures leading to biological response, respectively antimycobacterial, antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. The obtained results are discussed in relation the structure of derivatives to their biological activity. For this purpose was prepared a library of 98 unpublished and 93 published derivatives (four attached publications). Some of these prepared analogues have achieved very high inhibition values comparable to standards such as isoniazid, bacitracin or fluconazole. In addition, inhibition activities of prepared compounds covered all spectrum of selected microorganisms and sometimes was reached very low toxicity values which is one of the important factors for the application of the drug in the therapy.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>3</b>
3.1	TUBERKULÓZA A JEJÍ PŮVODCE .....	3
3.1.1	<i>Tuberkulóza obecně</i> .....	3
3.1.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
3.1.3	<i>Mykobakteriální buněčná stěna</i> .....	4
3.1.3.1	Mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex .....	5
3.1.4	<i>Patogeneze</i> .....	9
3.1.5	<i>Epidemiologie výskytu ve světě</i> .....	9
3.1.6	<i>Epidemiologie výskytu v České republice</i> .....	10
3.2	FARMAKOTERAPIE TUBERKULÓZY .....	11
3.2.1	<i>První linie antituberkulotik</i> .....	11
3.2.1.1	Isoniazid .....	11
3.2.1.2	Pyrazinamid .....	12
3.2.1.3	Rifampicin .....	14
3.2.1.4	Ethambutol .....	15
3.2.2	<i>Druhá linie antituberkulotik</i> .....	15
3.2.2.1	Kyselina <i>para</i> -aminosalicylová .....	15
3.2.2.2	Bedachilin .....	16
3.2.2.3	Delamanid .....	17
3.2.2.4	Pretomanid .....	19
3.2.3	<i>Ostatní léčiva druhé linie</i> .....	19
3.2.4	<i>Léčebné režimy tuberkulózy</i> .....	20
3.3	NOVÉ PŘÍSTUPY A SMĚRY VE VÝVOJI LÉČIV .....	22
3.3.1	<i>Peptidové nosiče na bázi tuftsinu</i> .....	23
3.3.2	<i>Salicylanilidy</i> .....	24
3.3.2.1	Protonoforový mechanismus salicylanilidů .....	25
3.3.2.2	Mykobakteriální isocitrát lyáza .....	26
3.3.2.3	Další možnosti působení salicylanilidů .....	28
3.3.2.4	Vztah mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou .....	29
3.3.2.5	Cytotoxicita a možnosti její redukce .....	30
3.3.3	<i>Triklosan</i> .....	30
3.3.3.1	Mechanismus působení .....	31

3.3.3.2	Bezpečnost a toxicita .....	32
3.3.3.3	Rezistence .....	32
3.3.3.4	Proléčivo s triklosanovým základem .....	33
<b>4</b>	<b>METODICKÁ ČÁST OBECNÁ .....</b>	<b>34</b>
4.1	CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	34
4.2	METODIKY BIOLOGICKÉHO HODNOCENÍ.....	34
4.2.1	<i>Hodnocení antimykobakteriální aktivity</i> .....	34
4.2.2	<i>Hodnocení antibakteriální aktivity</i> .....	35
4.2.3	<i>Hodnocení antifungální aktivity</i> .....	36
4.2.4	<i>Hodnocení in vitro cytotoxicity</i> .....	36
<b>5</b>	<b>KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM A NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY.....</b>	<b>38</b>
5.1	TRIKLOSANOVÉ DERIVÁTY .....	38
5.1.1	<i>Článek 1 „Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents“</i> .....	38
5.1.1.1	<i>Des-chlor-triklosanové deriváty</i> .....	39
5.1.1.2	<i>Chlor-triklosanové deriváty</i> .....	40
5.1.1.3	<i>Vztah mezi substitucí B-kruhu a typem inhibice InHA</i> .....	41
5.1.1.4	<i>TRC pomalu se vážající inhibitory</i> .....	44
5.1.1.5	<i>Triklosanové deriváty bez fenolické skupiny</i> .....	46
5.1.1.6	<i>In silico modelované triklosanové deriváty</i> .....	48
5.1.1.7	<i>Závěrečný komentář</i> .....	49
5.1.2	<i>Nepublikované triklosanové deriváty</i> .....	50
5.1.2.1	<i>Příprava esterových a (thio)karbamátových derivátů triklosanu</i> .....	50
5.1.2.2	<i>Hodnocení antimykobakteriální aktivity</i> .....	52
5.1.2.3	<i>Hodnocení antibakteriální aktivity</i> .....	54
5.1.2.4	<i>Hodnocení antifungální aktivity</i> .....	56
5.1.2.5	<i>Hodnocení cytotoxicity</i> .....	58
5.1.2.6	<i>Závěrečný komentář</i> .....	59
5.1.2.7	<i>Chemická charakterizace připravených derivátů</i> .....	59
5.2	SALICYLANILIDOVÉ DERIVÁTY.....	65
5.2.1	<i>Článek 2 „Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity“</i> .....	65
5.2.1.1	<i>Hodnocení antimykobakteriální aktivity</i> .....	66
5.2.1.2	<i>Hodnocení antimykobakteriální aktivity proti lékově-rezistentním kmenům</i> .....	67
5.2.1.3	<i>Hodnocení cytotoxicity</i> .....	67
5.2.1.4	<i>Závěrečný komentář</i> .....	67
5.2.2	<i>Nepublikované salicylanilidové deriváty</i> .....	68
5.2.2.1	<i>Příprava salicylanilidových derivátů</i> .....	68
5.2.2.2	<i>Hodnocení antimykobakteriální aktivity a cytotoxicity</i> .....	70

5.2.2.3	Hodnocení antimykobakteriální aktivity proti lékově-rezistentním kmenům .....	72
5.2.2.4	Závěrečný komentář .....	73
5.2.2.5	Chemická charakterizace připravených derivátů .....	73
5.2.3	<i>Článek 3 „In vitro biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tufts in conjugates“</i> .....	75
5.2.3.1	Výchozí struktura SAL konjugátů a jejich <i>in vitro</i> hodnocení antimykobakteriální aktivity .....	76
5.2.3.2	Hodnocení cytotoxicity.....	78
5.2.3.3	Hodnocení <i>in vitro</i> MonoMac6 intracelulární antimykobakteriální aktivity.....	79
5.2.3.4	Závěrečný souhrn .....	80
5.3	ISONIAZIDOVÉ DERIVÁTY .....	81
5.3.1	<i>Článek 4 „New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action“</i> .....	81
5.3.1.1	Hodnocení antimykobakteriální aktivity .....	82
5.3.1.2	Hodnocení antimykobakteriální aktivity proti lékově-rezistentní kmenům .....	83
5.3.1.3	Hodnocení cytotoxicity.....	84
5.3.1.4	Mechanismus účinku.....	84
5.3.1.5	Závěrečný komentář .....	85
5.4	DERIVÁTY KYSELINY PARA-AMINOSALICYLOVÉ .....	86
5.4.1	<i>Nepublikované para-aminosalicylové deriváty</i> .....	86
5.4.1.1	Příprava derivátů PAS.....	87
5.4.1.2	Hodnocení antimykobakteriální aktivity .....	89
5.4.1.3	Hodnocení antimykobakteriální aktivity proti lékově-rezistentním kmenům .....	92
5.4.1.4	Hodnocení antibakteriální aktivity .....	93
5.4.1.5	Hodnocení antifungální aktivity .....	95
5.4.1.6	Závěrečný komentář .....	97
5.4.1.7	Chemická charakterizace připravených derivátů .....	98
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ, PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ A PREZENTACÍ .....</b>	<b>112</b>
7.1	PUBLIKACE V IMPAKTOVANÝCH ČASOPISECH .....	112
7.2	PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ .....	113
7.3	PŘEDNÁŠKY .....	114
<b>8</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	

# 1 Úvod

Tuberkulóza (TB) a její rezistentní formy, multirezistentní (MDR-TB) a extenzivně rezistentní (XDR-TB) tuberkulóza, patří celosvětově mezi jedny z nejčastějších příčin úmrtí. Ve světě je toto nebezpečné infekční onemocnění rozšířeno nerovnoměrně a týká se především rozvojových zemí. Její kapénkově přenášený původce *Mycobacterium tuberculosis* je především intracelulární patogen, přežívající v organismu v latentní neboli spící formě, během které se nemnoží, ale pouze setrvává uvnitř hostitelské buňky (monocyty, makrofágy). Latentní tuberkulózou je postižena přibližně 1/3 světové populace a zhruba u 10 % z nich existuje významné riziko, že přejde do aktivní podoby onemocnění. Osoby s poškozeným imunitním systémem mají toto riziko mnohonásobně vyšší. Za rok 2016 bylo podle Světové zdravotnické organizace (WHO; World Health Organization) celosvětově nahlášeno 10,4 milionu nových případů a 1,3 milionu úmrtí. V České republice ve stejném roce bylo evidováno 517 případů a 26 s následkem smrti. Léčba TB je často zdlouhavá, podle typu rezistence může trvat i déle než 2 roky a vyžaduje vždy kombinaci několika antituberkulotik najednou. S délkou a složitostí léčby roste riziko nárůstu rezistence, nese s sebou nezanedbatelné množství vedlejších účinků a v neposlední řadě celkově zatěžuje nejen organismus samotný, ale i ekonomiku.

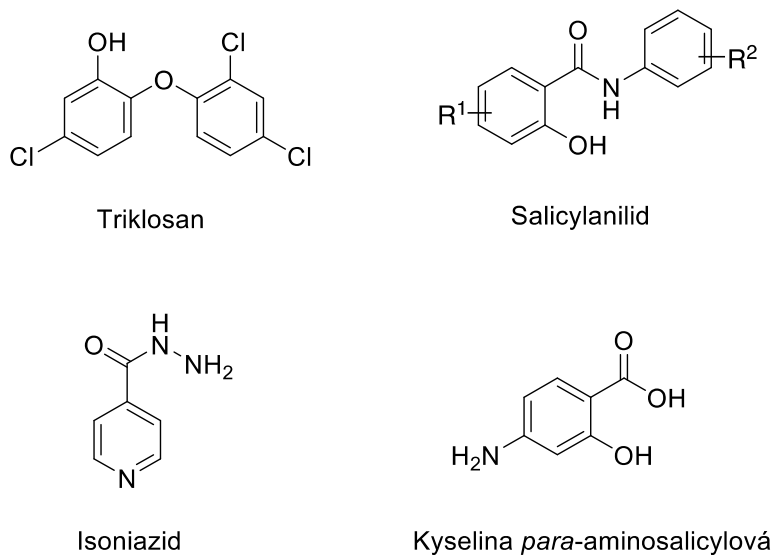
Dalším problémem je nadbytečné a nesprávné užívání antimikrobních látek v humánní a veterinární medicíně, které často vede k indukci a selekci získané necitlivosti a tím ke vzrůstajícímu počtu rezistentních kmenů bakterií či hub. Tyto lékové resistance představují taktéž významný problém ze zdravotnického i socioekonomického pohledu.

Současný vývoj antituberkulotik je zaměřen na konkrétní kroky v biosyntéze buněčné stěny, mapování metabolických cest nebo identifikaci specifických genů ovlivňujících virulenci či latentní fázi. Předmětem zájmu jsou především malé molekuly, které jsou schopny tyto funkce cílových proteinů narušovat a vedou k inhibici klíčových metabolických drah v mykobakterii. Navzdory mnoha identifikovaným molekulám s nízkou *in vitro* minimální inhibiční koncentrací (MIC) se však stále nedaří vypořádat se s nízkou biodostupností a buněčnou permeabilitou, případně nespecifickým zásahem cílových buněk hostících mykobakterie.

## 2 Cíl práce

Cílem disertační práce bylo navázání a rozšíření výzkumu vedeného profesorkou Vinšovou na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové v oblasti sloučenin s antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivitou. Jako základní struktury pro obměnu a biologické hodnocení byly vybrány triklosan, salicylanilid, isoniazid a *p*-aminosalicylová kyselina (Obrázek 1). Tyto čtyři antimikrobní látky jsou v současnosti v různé míře již užívány na poli farmaceutického průmyslu a blíže budou popsány v následujících kapitolách.

Experimentální část spočívala v syntetických obměnách výchozích molekul z důvodu zvýšení aktivity a biodostupnosti. Tímto způsobem byla sestavována chemická knihovna, která byla v následném kroku hodnocena pro svoji *in vitro* biologickou aktivitu. Jednalo se o mykobakteriální (včetně rezistentních), bakteriální a fungální kmeny či hodnocení cytotoxicity. Získané výsledky byly sumarizovány a diskutovány s ohledem na vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR; structure-activity relationship). Dalším dílčím cílem bylo sepsání souhrnného článku o vlivu triklosanové substituce na antimykobakteriální aktivitu, na základě doposud popsaných poznatků v odborné literatuře, za účelem optimalizace a směru vývoje výzkumu vedeného naší pracovní skupinou.



Obrázek 1 Výchozí struktury disertační práce

## 3 Teoretická část

### 3.1 Tuberkulóza a její původce

#### 3.1.1 Tuberkulóza obecně

Tuberkulóza je přenosné infekční onemocnění způsobené bakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex, který tvoří několik geneticky příbuzných druhů: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. canetti*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis* a *M. mungi*.<sup>1</sup> Počátky tohoto onemocnění pravděpodobně sahají až 70 000 let zpět k migraci lidí z Afriky.<sup>2</sup> Problematiku TB se snaží řešit a monitorovat WHO, která každoročně vydává hodnotící zprávu o aktuálním stavu této nemoci. V současné době se předpokládá, že je nakaženo zhruba 1,7 miliardy lidí (1/3 populace) latentní formou TB s rizikem rozvoje v její aktivní formu (5-15 %). Pravděpodobnost tohoto rozvinutí je daleko vyšší u lidí infikovaných HIV, při malnutrici, cukrovce, kouření, zvýšené konzumaci alkoholu, silikóze či chudobě.<sup>3,4,5</sup>

#### 3.1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

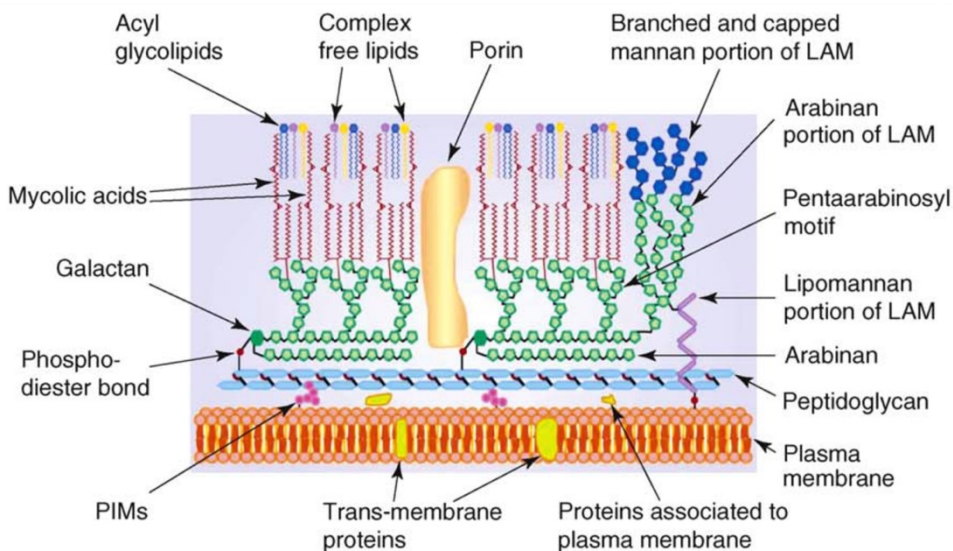
*Mycobacterium tuberculosis* neboli Kochův bacil je patogenní bakterie, kterou poprvé popsal Robert Koch 24. března 1882. Za tento objev obdržel v roce 1905 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství<sup>6</sup> a 24. březen dnes připomíná Světový den tuberkulózy. Dalším milníkem byl rok 1998, kdy S. T. Cole a jeho tým publikovali kompletní genomovou sekvenci *M. tuberculosis* (kmen H37Rv) čítající 4 411 529 párů bází a přibližně 4 000 genů. Dále byl popsán vliv jednotlivých genů ve vztahu k fyziologické funkci mykobakterií.<sup>7,8</sup>

*M. tuberculosis* je obligátně aerobní tyčkovitá bakterie o velikosti 0,3-0,6  $\mu\text{m}$  x 1-4  $\mu\text{m}$ , která je nepohyblivá a nesporulující. Je pro ni typický pomalý růst s generační dobou přibližně 24 hodin. Dalšími znaky jsou dormance, komplexní buněčný obal a intracelulární patogeneze. Je řazena mezi acidorezistentní Gram-pozitivní bakterie, ačkoliv kvůli vysokému obsahu lipidů v buněčné stěně neváže krystalovou violet a barvení dle Grama tedy u ní není možné. Pro její detekci se využívá Ziehl-Neelsenovo karbolfuchsinové odbarvení buněčné stěny, které zůstává i po promytí okyseleným alkoholem.<sup>7,9</sup>



### 3.1.3 Mykobakteriální buněčná stěna

Mykobakteriální buněčná stěna (Obrázek 2) obsahuje až 60 % lipidů a dělí se do dvou hlavních částí, vnitřní a vnější. Za plazmatickou membránou se nachází peptidoglykan (PG), na který je kovalentně vázán arabinogalaktan (AG), jenž je dále esterifikován mykolovými kyselinami. Tento vnitřní kovalentně vázaný mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex (mAGP) je zároveň jakýmsi základem celé bakteriální stěny. Vnější část je tvořena volnými, nekovalentně vázanými lipidy. V těchto dvou částech jsou dále roztroušeny proteiny, fosfatidylinositol mannosidy (PIM), lipidy obsahující phthiocerol, sulfolipidy, lipomannany (LM), lipoarabinomannany (LAM; virulentní faktor umožňující mykobakterii přežít v hostitelském prostředí tím, že moduluje imunitní odpověď), trehalóza-dimykolát (TDM neboli Cord faktor, což je virulentní faktor, který ovlivňuje imunitní odezvu jedince spolu s granulomatózní aktivitou a v preparátech mykobakteriálních kultur je zodpovědný za tvorbu podlouhlých útvarů, které připomínají spletené provazce) či trehalóza-monomykolát (TMM). Obecně lze říci, že tyto lipidy, proteiny a glykolipidy jsou signální efektorové molekuly v procesu onemocnění, zatímco nerozpustný mAGP komplex je nezbytný pro celkovou životaschopnost mykobakterie.<sup>10, 11</sup>



Obrázek 2 Schématické složení mykobakteriální buněčné stěny<sup>12</sup>

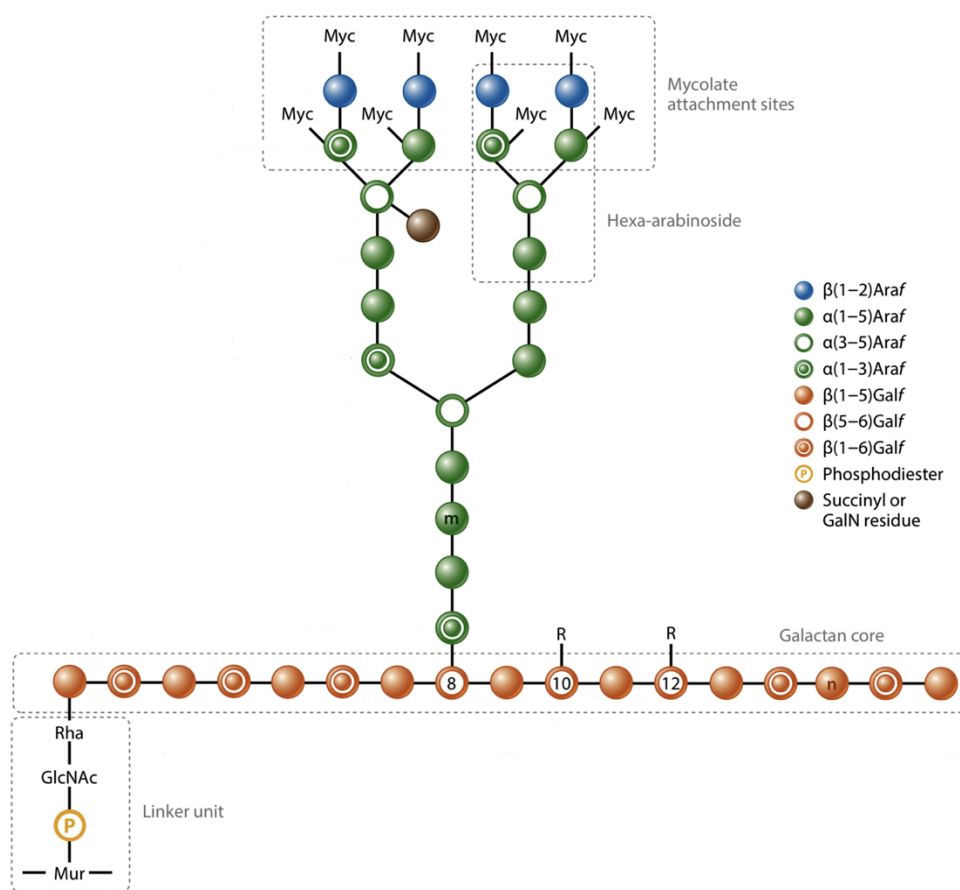
### 3.1.3.1 Mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex

#### 3.1.3.1.1 *Peptidoglykan*

Peptidoglykan je přítomen téměř ve všech bakteriích, kde ovlivňuje jejich tvar, tuhost a osmotickou stabilitu. Všechny bakteriální peptidoglykany mají podobnou základní strukturu tvořenou glykanovou páteří a krátkými zesíťovanými peptidovými postranními řetězci. Glykanová páteř je zpravidla tvořena *N*-acetylglukosaminem (GlcNAc) a *N*-acetylmuramovou kyselinou (MurNAc) spojenými  $\beta$ -(1→4) vazbou. Mykobakteriální PG mají jednu pozoruhodnou strukturní modifikaci v podobě kyseliny *N*-glykolylmuramové (MurNGlyc) místo MurNAc. Tato modifikace se pravděpodobně podílí na celkovém zvýšení pevnosti PG tím, že jednak poskytuje místa pro vodíkové vazby a dále snižuje citlivost vůči lysozomům. Dalším jedinečným rysem mykobakteriálního PG je jeho propojení s AG. To je uskutečněno vazbou na galaktan přes disacharidový můstek  $\alpha$ -L-rhamnopyranóza-(1→3)- $\alpha$ -D-GlcNAc-(1→P) propojený pomocí fosfodiesterové vazby s 10-12 % MurNGlyc v poloze 6 na PG řetězci (Obrázek 3).<sup>10, 13</sup>

#### 3.1.3.1.2 *Arabinogalaktan*

Tato vysoce rozvětvená část je složena (Obrázek 3) převážně z galaktózy (Gal) a arabinózy (Ara) ve formě furanózových kruhů (*f*). Galaktanovou složku tvoří lineární řetězec s přibližně třiceti střídajícími se (1→5) a (1→6)- $\beta$ -D-Galf. Vysoce rozvětvené arabinanové řetězce obsahující každý zhruba 30 Araf jsou připojeny k lineárnímu galaktanu pomocí  $\beta$ -(1→6)-Gal*f* v pozici 5. Vnitřní lineární část arabinanového řetězce obsahuje  $\alpha$ -(1→5)-D-Araf s klíčovým větvením na 3,5- $\alpha$ -D-Araf. Neredukující konce arabinanového řetězce se skládají z charakteristické hexaarabinosidové struktury, [ $\beta$ -D-Araf-(1→2)- $\alpha$ -D-Araf]<sub>2</sub>-3,5- $\alpha$ -D-Araf-(1→5)- $\alpha$ -D-Araf. Polohy 5 u terminálního  $\beta$ -D-Araf a předposledního 2- $\alpha$ -D-Araf pak slouží jako místa pro napojení mykolových kyselin, vázaných na hexaarabinosid v počtu čtyř a celkově zabírající asi dvě třetiny všech dostupných vazebných míst terminálních hexaarabinosidech.<sup>10, 13</sup>

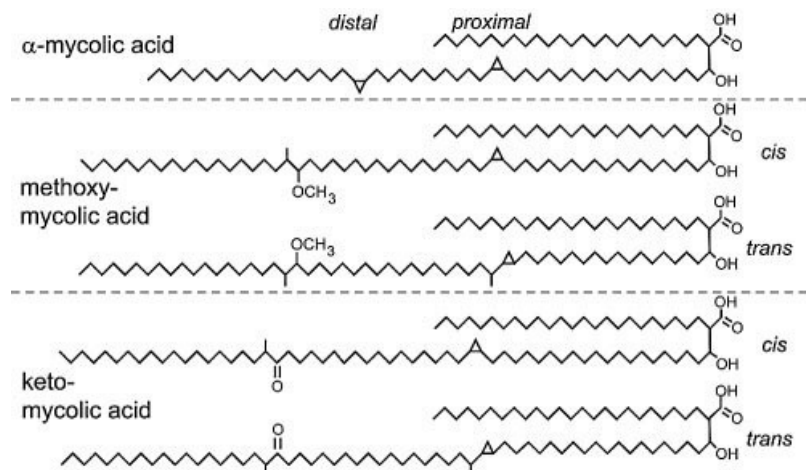


Obrázek 3 Arabinogalaktanová struktura navázaná na peptidoglykan v mykobakteriálním komplexu mAGP<sup>13</sup>

### 3.1.3.1.3 Mykolové kyseliny

Mykolové kyseliny jsou dlouhé  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy mastné kyseliny (Obrázek 4), které přispívají k celkové fluiditě a propustnosti buněčné stěny. V této stěně jsou nejčastěji zastoupeny formou esterů mykoly-l-arabinogalaktan-peptidoglykanového komplexu či trehalóza-mykolátů. Existují tři základní typy mykolových kyselin: (1)  $\alpha$ -mykolové kyseliny, které jsou nejrozšířenější, obsahují *cis*-cyklopropanový cykl, zatímco (2) methoxymykolové a (3) ketomykolové kyseliny mají cyklopropanové kruhy v *cis*- nebo *trans*-konfiguraci a obsahují methylový substituent. Tyto kyseliny mají minimálně dvě centra chiralit v polohách  $\alpha$  a  $\beta$  vůči karboxylové skupině a obsahují kyslíkaté substituenty jako methoxy, epoxy či oxo, případně dvojnou vazbu. Svým charakterem významně ovlivňují schopnost mykobakterií přežít a replikovat se uvnitř makrofágů. Zároveň bohužel rovněž snižují propustnost bakteriální stěny

pro mnohá léčiva.<sup>10, 13, 14, 15, 16</sup> Každá molekula mykolové kyseliny rodu *Mycobacterium* obsahuje 60 až 90 atomů uhlíku, *Corynebacteria* jich mají 22 až 36 a *Nocardia* 44 až 60. Přesný počet uhlíků se dále mění v závislosti na daném druhu a může tedy sloužit jako identifikační pomůcka konkrétních bakterií taxonu *Mycolata*.<sup>15, 16, 17</sup>

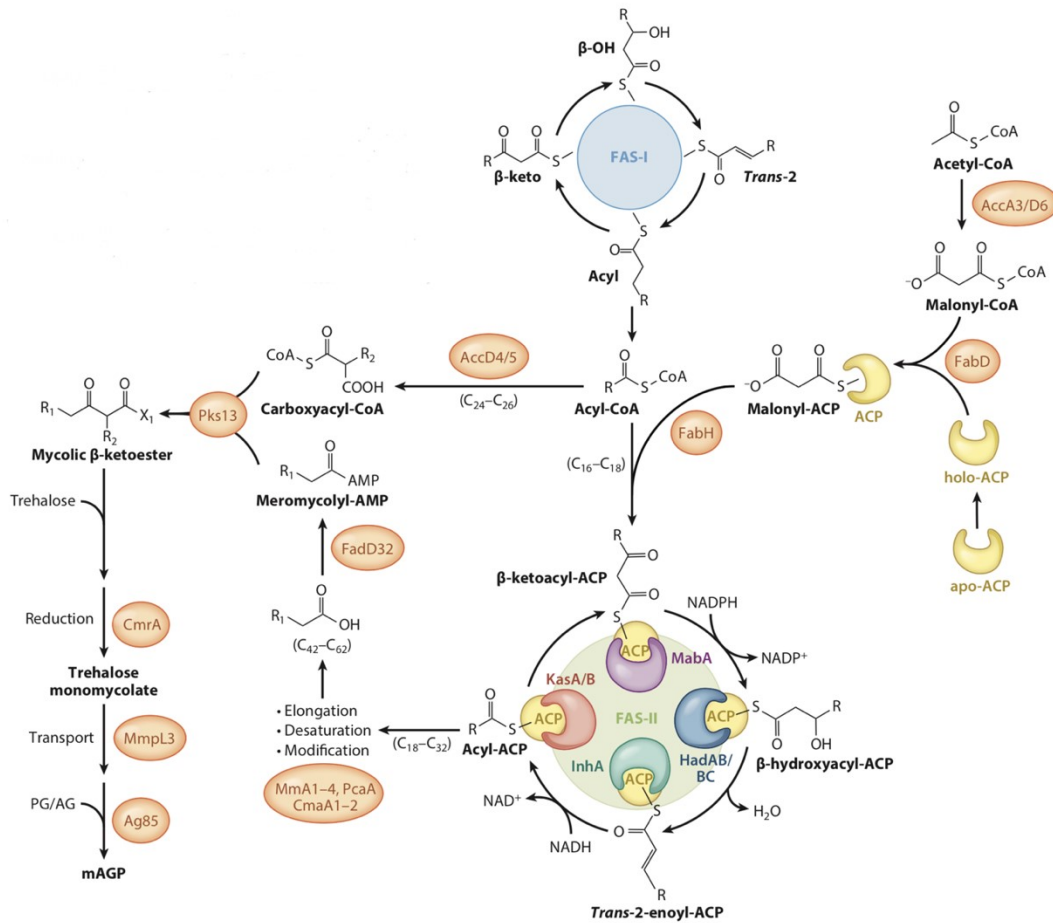


Obrázek 4 Typy mykolových kyselin<sup>18</sup>

### 3.1.3.1.3.1 Biosyntéza mykolových kyselin

Biosyntéza mykolových kyselin je pro životaschopnost mykobakterií nezbytná a zároveň odlišná od biosyntézy mastných kyselin savců. Tento složitý děj probíhá v několika odlišných krocích, viz Obrázek 5. Ve FAS I cyklu jsou za pomoci multienzymového komplexu syntetizovány mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C<sub>16-24</sub>). Tyto nasycené mastné kyseliny mohou poté tvořit α-alkylový řetězec (C<sub>24</sub>), nebo být prodlouženy ve FAS II fázi za vzniku mero-řetězce (C<sub>56</sub>). FAS II cyklus je zahajován kondenzační reakcí malonyl-AcpM a palmitoyl-CoA katalyzovanou FabH (β-ketoacyl-ACP syntázou III) za vzniku meziprojektu β-ketoacyl-AcpM. Tento meziprojekt je poté redukován MabA (β-ketoacyl-ACP reduktázou) na β-hydroxyacyl-AcpM a dehydratován HadAB/BC (β-hydroxyacyl-ACP dehydratázou) za vzniku *trans*-2-enoyl-AcpM. Následná redukce InhA (enoyl-ACP reduktázou) vede ke vzniku acyl-AcpM, který je tak prodloužen o dva atomy uhlíku. Prodlužování řetězce v rámci FAS II cyklu pokračuje kondenzací malonyl-AcpM s acyl-AcpM katalyzovanou KasA/B (β-ketoacyl-ACP syntázou) a návratem k výše uvedeným krokům zahrnujícím MabA, HadAB/BC a InhA. Tento cyklický děj pokračuje, dokud acylový řetězec nedosáhne délky 42 až 62 uhlíků, což dává základ dlouhému nasycenému meromykolátovému řetězci.

V následných krocích po FAS II cyklu je tato meromykolátová kostra doplňována o různé skupiny jako *cis-/trans*-cyklopropan, případně oxo či methoxy substituci. To vše probíhá za účasti široké řady enzymů zahrnujících CmaA1-2 (cyclopropane mycolic acid synthase 1-2), MmaA1-4 (mycolic acid methyltransferase 1-4) a PcaA (cyclopropane mycolic acid synthase 3). Tyto modifikace poté ovlivňují tekutost a propustnost buněčné stěny a zajišťují ochranu před hostitelským imunitním systémem. Takto upravená meromykolová kyselina (C<sub>42-62</sub>) je za pomoci FadD32 (fatty acyl-AMP ligase) aktivována pro Claisenovu kondenzaci na meromykolyl-AMP a následně katalýzou Pks13 (polyketide synthase-13) napojena na karboxyacil-CoA za vzniku  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto-mykolové kyseliny, která je redukována na  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy-mykolovou kyselinu.<sup>10, 13</sup>



Obrázek 5 Biosyntéza mykolových kyselin u *Mycobacterium tuberculosis*<sup>13</sup>

Naše pracovní skupina se hlouběji zabývala strukturami schopnými inhibice enoyl-acyl carrier protein (ACP) reduktázy (u mykobakteriích zvanou InhA) zapojené do FAS II fáze (Obrázek 5). Tento enzym katalyzující redukci *trans*-dvojně vazby je nezbytný

pro životaschopnost mykobakterie a jeho narušení vede k poškození buněčné stěny, její integrity a funkce, což vede ke smrti mykobakterie.<sup>19, 20</sup> Příkladem inhibitoru InhA je isoniazid (INH; 3.2.1.1) a triklosan (TRC; 3.3.3).

### 3.1.4 Patogeneze

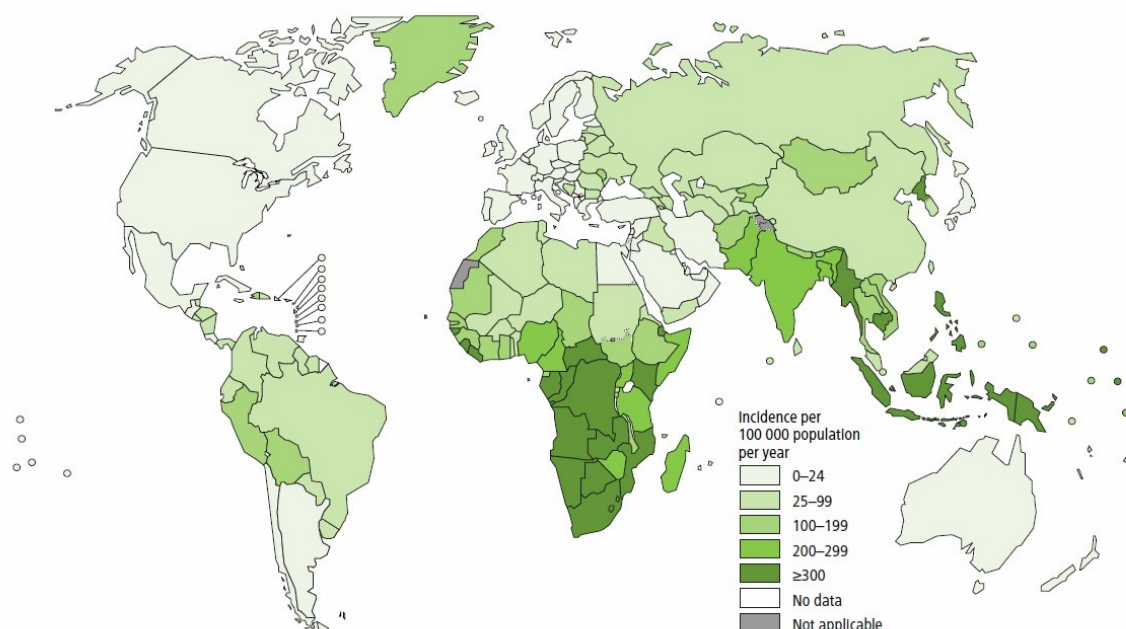
Z klinického pohledu je TB chronickým onemocněním, které je šířeno osobou s její propuknutou aktivní formou. Způsob přenosu je spojen zejména s kašlem, kýcháním či jiným kapénkovým uvolňováním slin do vzdušného prostředí. Po vdechnutí infikovaných kapének zdravým jedincem jsou mykobakterie fagocytárně pohlcovány alveolárními makrofágy a přeneseny do lymfatických uzlin plicního hilu. V kombinaci makrofágů se specifickými lymfocyty T a B dochází k imunitní odpovědi za uvolňování mediátorů zánětu (interleukiny, interferon gama, tumor nekrotizující faktor a další), což vyúsťuje v tvorbě specifických ložisek neboli granulomů. Infikované ložisko spolu se spádovou infikovanou lymfatickou uzlinou se nazývá primárním komplexem. Z tohoto místa se pak mohou skrze lymfatické cesty mykobakterie šířit dál (mozkové pleny, klouby, kosti, kůže, urogenitální systém) a vytvářet sekundární granulomy. V 85 % případů je tento nekrotizující granulomatózní zánět spojen s plícemi. V procesu, kdy granulomy ve svém středu znekrotizují a rozpadnou se, mluvíme o kaseifikaci čili zesýrovatění. K tomuto procesu ovšem nedojde u všech granulomů. Malé granulomy jsou imunitní reakcí vesměs zničeny. Problémem se stávají ty velké, které se opouzdří a následně kalcifikují. Díky tomu se přítomné mykobakterie stávají nedostupné pro imunitní systém a přecházejí do latentní formy, ve které se nacházejí různě dlouhou dobu. Podnětem pro jejich reaktivaci a další progres onemocnění je často oslabení imunity z různých příčin. Dostanou-li se bakterie do oběhové soustavy, mluvíme o miliární TB, která je charakterizovaná rozsevem malých zánětlivých ložisek (granulomů) v plicích a dalších orgánech. Mezi typické příznaky aktivní formy TB patří chronická únava, subfebrilie, profúzní noční pocení, hubnutí či déletrvající kašel, který je zpočátku bez a později s produkcí sputa.<sup>21, 22, 23, 24, 25</sup>

### 3.1.5 Epidemiologie výskytu ve světě

Dle WHO je toto infekční onemocnění devátou nejčastější příčinou mortality ve světě. Současnou incidenci zachycuje Obrázek 6 a ze zprávy WHO z roku 2017 vyplývá, že bylo za rok 2016 TB nakaženo 10,4 milionu lidí. Jednalo se zejména o dospělé osoby (90 %)

s převahou mužů (65 %). 10 % případů bylo evidováno ve spojitosti s HIV, a to zejména v Africe (74 %). 56 % všech případů TB spadá do Indie, Indonésie, Číny, Filipín a Pákistánu dohromady. S mortalitou je spojeno 1,3 milionu HIV-negativních a 374 000 HIV-pozitivních pacientů. Tato čísla dokládají velké riziko TB, kdy její neléčená mikroskopicky pozitivní forma vede až cca k 70 % úmrtnosti 10 let od diagnózy.<sup>5,26</sup>

Výraznou hrozbu představují rezistentní formy TB. Za rok 2016 bylo evidováno 600 000 nových případů s rezistencí vůči rifampicinu (RR-TB; rifampicin-resistant tuberculosis), z čehož 490 000 případů spadalo do MDR-TB, která je definována jako rezistence vůči rifampicinu a INH zároveň. Téměř polovina těchto případů (47 %) má svůj původ v Indii, Číně a Ruské federaci.<sup>5</sup>



Obrázek 6 Celosvětová incidence TB dle WHO<sup>5</sup>

### 3.1.6 Epidemiologie výskytu v České republice

V České republice (ČR) bylo za rok 2016 nahlášeno celkem 517 onemocnění TB, což je 4,9 případů na 100 000 obyvatel. Oproti roku 2015, kdy bylo hlášeno 518 případů, zůstal stav téměř nezměněn, avšak z dlouhodobé perspektivy výskytu TB v ČR lze pozorovat mírně klesající tendenci. V mezinárodním srovnání patří ČR k zemím s nízkým výskytem této nemoci.

Muži tvořili 70 % případů. Věk nejčastěji infikovaných lidí byl 40 až 59 let a oproti předchozímu roku vzrostl na dvojnásobek počet pacientů mladších 20 let. Ve srovnání krajů bylo hlášeno nejvíce případů s bydlištěm v Praze a to 105 (8,3/100 000 obyvatel). Z nahlášeného počtu případů bylo 151 cizinců (téměř 30 %), zejména původem z Ukrajiny (41 osob), Slovenska (21 osob), Vietnamu (21) a Rumunska (21). TB podlehl v ČR za rok 2016 26 osob (0,25/100 000 obyvatel).<sup>27</sup>

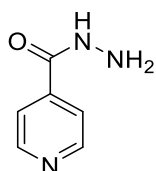
## **3.2 Farmakoterapie tuberkulózy**

Současná léčiva proti TB jsou rozdělena do první a druhé linie, z kterých se při léčbě vychází. Předkládaná kapitola se snaží tato léčiva blíže popsat a zároveň nastínit jejich využití v oblasti farmakoterapie.

### **3.2.1 První linie antituberkulotik**

#### **3.2.1.1 Isoniazid**

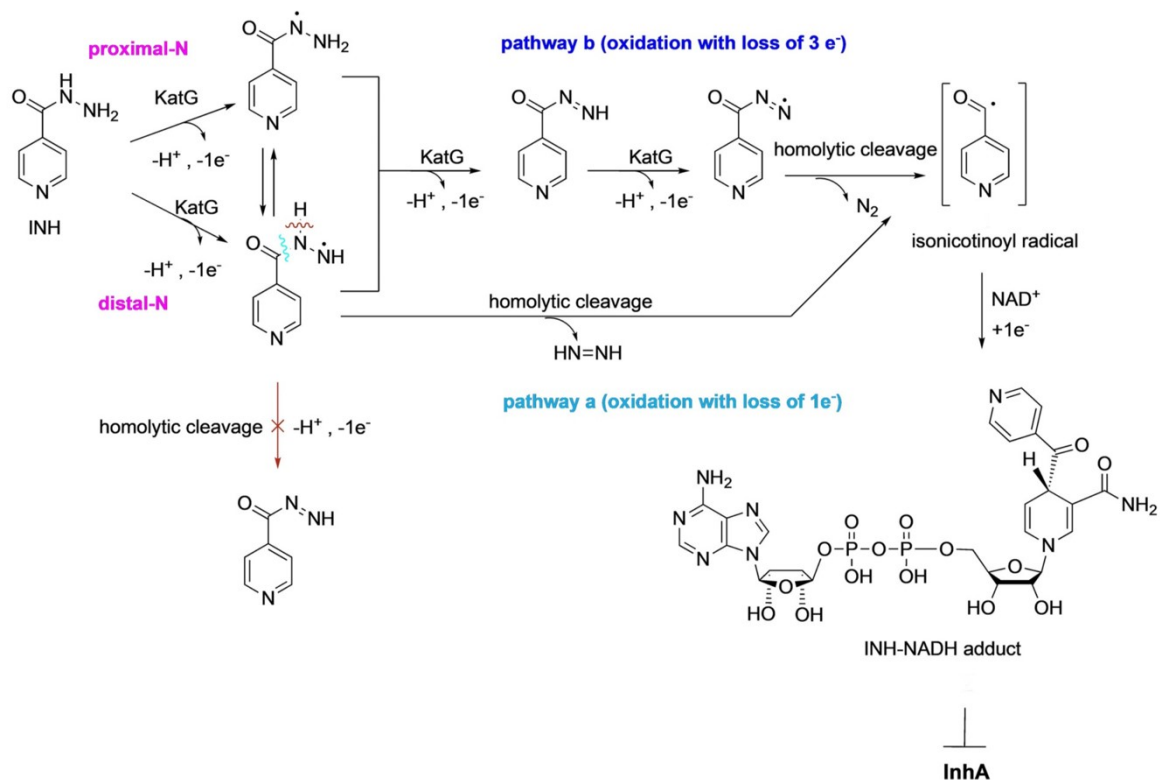
Isoniazid neboli hydrazid kyseliny isonikotinové (Obrázek 7) byl zaveden jako antituberkulotikum v roce 1952 a stále zůstává spolu s rifampicinem základním pilířem léčby TB. Na rozdíl od rifampicinu je INH účinný pouze proti metabolicky aktivním a replikujícím se mykobakteriím.



Obrázek 7 Isoniazid

INH je pro léčivo vyžadující aktivaci kataláza/peroxidázovým enzymem (KatG; Obrázek 8), který má v bakterii protektivní funkci před oxidativním stresem a je kódovaný genem *katG*. Při tomto kroku dochází ke vzniku nestabilního isonikotinoylového radikálu, který se následně stabilizuje vazbou s  $\text{NAD}^+$  za vzniku aktivního metabolitu INH-NADH. Vzniklý adukt poté soutěží s NADH o vazbu na NADH-dependentní enoyl-ACP reduktázu neboli *InhA*, čímž inhibuje syntézu mykolových kyselin.<sup>28, 29, 30, 31, 34</sup>





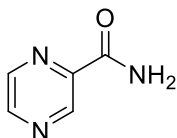
Obrázek 8 Aktivace INH v mykobakterii za účasti enzymu KatG<sup>34</sup>

V kontrastu s jednoduchostí struktury INH byly doposud popsány typy rezistence spojené s mutacemi na více genech: *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA* a *ndh*,<sup>30</sup> případně zvýšená funkce bakteriálních efluxních pump.<sup>32</sup> Genové mutace v *katG* nebo *inhA* a jeho promotorové oblasti ovšem zatím zůstávají nejrozšířenějšími rezistencemi. U genu *katG* je dominantní genová mutace zvaná S315T, která se projevuje nedostatečnou tvorbou komplexu INH-NADH potřebného pro antimykobakteriální účinnost a je spojena hlavně s MDR-TB. Mutace v oblasti *inhA* vede k nadměrné expresi InhA, případně méně často k mutaci v aktivním místě InhA vedoucí k nedostatečné afinitě ke komplexu INH-NADH. Nevýhodou mutace v genu *inhA* je i zkřížená rezistence s ethionamidem, neboť toto léčivo sdílí stejný cíl aktivního místa jako INH.<sup>30, 34</sup>

### 3.2.1.2 Pyrazinamid

Pyrazinamid (PZA; Obrázek 9) je rovněž v léčbě TB datován počátkem 50. let 20. století, konkrétně 1952 objevem jeho antituberkulotické aktivity.<sup>30, 33</sup> Je jedním z mála léčiv schopných inhibovat nereplikující se bakterie uvnitř makrofágů (latentní forma), kde je kyselá

prostředí s rozmezím pH 4,5-6,2. O pyrazinamidu je známo, že vykazuje silnou antituberkulární *in vivo* aktivitu, ovšem problematické je měření jeho *in vitro* aktivity. Důvodem je antibakteriální aktivita závislá na pH, kyslíku a teplotě, což je pro hodnocení latentních bakterií, kde není pozorován žádný růst, obtížné. Kyselé prostředí potřebné pro aktivitu PZA naopak není vhodné pro bakteriální růst, který je zde pomalý. Problémem je i nestabilita pH kultivačního média, které může být zvyšováno amoniakem jakožto produktu enzymatické bakteriální hydrolyzy PZA, což vyúsťuje v inaktivitu léčiva.<sup>30,34</sup>



Obrázek 9 Pyrazinamid

O mechanismu účinku PZA a jeho potenciálních buněčných cílech bylo napsáno již mnohé a stále nepanuje jasná shoda. PZA může přecházet přes bakteriální stěnu pasivní difúzí, ovšem i aktivní transport je možný. Rovněž jako INH je i PZA proléčivem, které je pyrazinamidázou/nikotinamidázou, kódovanou genem *pncA*, převáděno na svou aktivní formu, tj. pyrazinkarboxylovou kyselinu (POA). Mutace tohoto genu, tj. zablokování enzymatické přeměny amidu na karboxylovou kyselinu vede k rezistenci bakterie. V cytosolu mykobakterie (pH blízké 7) figuruje POA jako slabá kyselina v deprotonované formě, která je efluxním systémem z bakterie vylučována do kyselého prostředí makrofágů, kde je protonována a znovu resorbována pasivní difúzí do cytoplazmy bakterií, kterou v tomto cyklickém kroku okyseluje. Tímto způsobem dochází k narušení redoxní homeostázy, která se projeví narušením membránového transportu a v konečném důsledku bakteriálním poškozením.<sup>30,33</sup> Toto je klasický či „tradiční“ pohled na jeho mechanismus účinku.

Dalším z navržených mechanismů PZA je narušení biosyntézy mastných kyselin a metabolismu fosfátů, jakožto kompetitivního inhibitoru s NADPH (kofaktor FAS I) o vazebné místo FAS I.<sup>34,35</sup> Jinou možností mechanismu je narušení *de novo* biosyntézy nikotinamidadeninukleotidu (NAD) tím, že PZA inhibuje katalytickou aktivitu fosforibosyltransferázy kyseliny chinolinové (MtQAPRTáza: krystalická struktura QAPRTázy z *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv).<sup>35,36</sup>

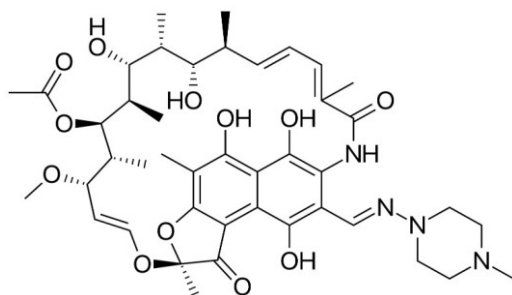
Mechanismus narušení trans-translace je uváděn v souvislosti s proteinem S1 (RpsA), který zde figuruje jako cílová struktura pro POA. S1 je ribozomální protein mající vliv na vazbu

tmRNA-zablokovaný ribozom. Role tmRNA (transferová-mediátorová RNA) spočívá v odstraňování zablokovaných ribozomů z mRNA templátu. Vazba POA na RpsA tedy brání tmRNA ve funkci, což se projeví zablokováním trans-translace a v konečném důsledku životaschopností bakterie. Nadměrná exprese a mutace RpsA je spojena s rezistencí vůči POA.<sup>34, 37</sup> Tento mechanismus byl však zpochybněn publikací od Dillona a jeho skupiny,<sup>38</sup> která přinesla zjištění, že působení PZA v *M. tuberculosis* je zcela nezávislé na RpsA a trans-translaci. Dle jejich výsledků protein RpsA interaguje s jednovláknovou RNA, ale ne s POA. Dále dříve objevený polymorfismus *rpsA* u PZA odolných kmenů neposkytuje rezistenci vůči tomuto léčivu při rekonstrukci v laboratorních podmínkách. Trans-translační *in vitro* test s purifikovanými ribozomy *M. tuberculosis* navíc ukázal, že interferující oligonukleotid má schopnost inhibovat trans-translaci, zatímco POA nikoliv.

Novějším poznatkem je spojitost mechanismu účinku a rezistence PZA s genem *panD*, který kóduje aspartát dekarboxylázu (PanD). Tento enzym je potřebný pro syntézu pantothenátu, což je důležitá komponenta koenzymu A, jenž má vliv na energetický metabolismus bakterie.<sup>34, 39</sup>

### 3.2.1.3 Rifampicin

Rifampicin (Obrázek 10) je rifamycinový derivát patřící do skupiny ansamycinových antibiotik. Jako antituberkulotikum byl do léčby zaveden v roce 1972 a doposud se jedná o jedno z nejúčinnějších antituberkulotik. Výhodou rifampicinu je jeho účinnost nejen vůči aktivnímu, ale i latentnímu stádiu mykobakterií. V současné době (2. a 3. fáze klinických studií) probíhá testování vysokých dávek rifampicinu (35 mg/kg) ve spojitosti se zkrácením a zvýšením efektivity léčby TB.<sup>5, 30</sup>

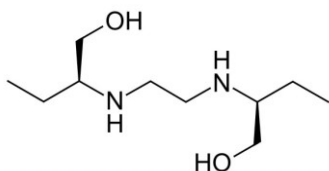


Obrázek 10 Rifampicin

Mechanismus účinku tohoto léčiva byl popsán jako inhibice syntézy RNA v podobě navázání se na DNA dependentní  $\beta$ -podjednotku RNA polymerázy. Většina klinicky izolovaných kmenů rezistentních mykobakterií na rifampicin obsahuje mutaci genu *rpoB* kódující DNA dependentní  $\beta$ -podjednotku RNA polymerázy. Důsledkem této mutace dochází ke konformačním změnám ovlivňujícím afinitu léčiva k danému enzymu. Rezistence je zkřížena s ostatními ansamycinovými antibiotiky.<sup>5, 30, 40</sup>

#### 3.2.1.4 Ethambutol

Ethambutol (Obrázek 11) se začal v léčbě TB používat v roce 1966, chemicky se jedná o chirální molekulu s účinným *S,S*-(+)-izomerem a názvem (2*S*)-2-[2-[(2*S*)-1-hydroxybutan-2-yl]amino}ethylamino]butan-1-ol.



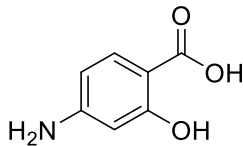
Obrázek 11 Ethambutol

Svým mechanismem účinku je to bakteriostatická látka narušující biosyntézu arabinogalaktanu a lipoarabinomannanu v bakteriální stěně inhibicí tří arabinosyl transferáz (EmbA, EmbB a EmbC), čímž zvyšuje její propustnost. Mutace genu *embB* kódujícího arabinosyl transferázu vede k rezistenci.<sup>30, 41, 42</sup>

### 3.2.2 Druhá linie antituberkulotik

#### 3.2.2.1 Kyselina *para*-aminosalicylová

Kyselina *p*-aminosalicylová (PAS; Obrázek 12) je užívána v léčbě TB od roku 1944, kdy byla zpočátku dokonce součástí první linie antituberkulotik společně s INH a streptomycinem. Postupem času však byla nahrazena ethambutolem a nyní je řazena do druhé linie léčiv proti TB.<sup>43, 44</sup>



Obrázek 12 Kyselina *para*-aminosalicylová

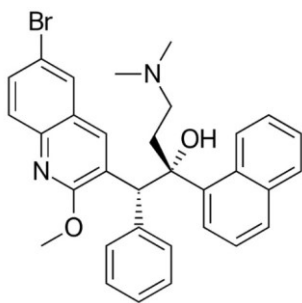
Mechanismus účinku PAS není zcela objasněn. Pravděpodobnou možností je kompetitivní inhibice s kyselinou *p*-aminobenzoovou při syntéze kyseliny tetrahydrofolové (kofaktor řady enzymů). Tato kyselina je u některých mikroorganismů na rozdíl od savců syntetizována *de novo*, čehož je využíváno při léčbě sulfonamidy (kompetitivní antagonisté kyseliny *p*-aminobenzoové o vazbu na dihydropteroát syntetázu) či trimethoprimem a methotrexátem (oba inhibují dihydrofolát reduktázu). PAS je jako prekurzor přeměněn dvěma enzymatickými reakcemi na hydroxy-dihydrofolát, který inhibuje dihydrofolát reduktázu a v konečném důsledku bakteriální biosyntézu kyseliny tetrahydrofolové.<sup>34, 43, 45</sup>

Druhým možným mechanismem PAS je nekompetitivní inhibice se salicyláty při syntéze mykobakteriálních sideroforů mykobaktinu a karboxymykobaktinu, čímž dochází k narušení bakteriálního vychytávání železa.<sup>34, 43, 46</sup>

Rezistence vůči PAS je spojena s více mechanismy zahrnujícími (1) její nedostatečnou bioaktivaci při folátové syntéze; (2) zmírnění dopadů inhibice dihydrofolát reduktázy (přeměna dihydrofolátu na tetrahydrofolát) cestou přes enzym RibD (riboflavin biosynthesis protein) zabezpečující pro bakterii dostatečnou konverzi tetrahydrofolátu; (3) mutace v genu *thyA* vedoucí k nefunkční thymidylát syntáze A a upřednostnění thymidylát syntázy X poskytující potřebný deoxythymidin monofosfát; (4) aktivace efluxního systému snižující kumulaci PAS v bakterii.<sup>34, 43</sup>

### 3.2.2.2 Bedachilin

Bedachilin (TMC207; (1*R*,2*S*)-1-(6-brom-2-methoxy-3-chinolinyl)-4-dimethylamino-2-(1-naftyl)-1-fenylbutan-2-ol; Obrázek 13) patří do nové třídy antimikrobiálních látek známých jako diarylchinoliny. Je to zároveň první lék po více než 40 letech, který byl schválen FDA jako antituberkulotikum. V současnosti probíhá také 3. fáze klinického testování, kdy je sledována jeho bezpečnost a účinnost v rámci krátkých režimů MDR-TB (6 a 9 měsíců) ve srovnání s aktualizovaným standardním zkráceným režimem, první výsledky jsou očekávány v roce 2020.<sup>5, 47</sup>



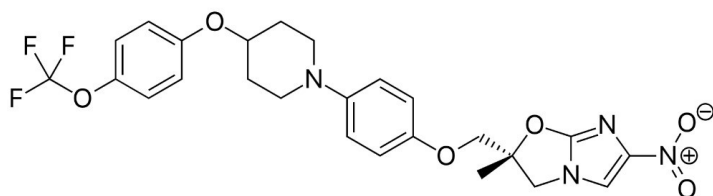
Obrázek 13 Bedachilin

Bedachilin selektivně cílí a inaktivuje bakteriální  $F_1/F_0$ -ATP syntázu (podjednotka c), přičemž na savčí  $F_1/F_0$ -ATP syntázu vliv nemá. Tento enzym je vysoce specifický a klíčový v procesu oxidativní fosforylace při produkci ATP.<sup>47, 48</sup>

Doposud bylo popsáno několik mechanismů rezistence na bedachilin. Nejvýznamnější z nich jsou mutace vyskytující se na dvou oddělených genech. První mutace genu vedoucí k rezistenci je v *atpE*, kóduje podjednotku c ATP syntázy, čímž dochází k narušení vazby mezi bedachilinem a jeho cílovým místem. Druhá je pak spojena s genem *rv0678*, který kóduje transkripční regulační protein Rv0678 a projevuje se up-regulací efluxních pump.<sup>47, 48</sup>

### 3.2.2.3 Delamanid

Delamanid (OPC-67683; (2*R*)-2-methyl-6-nitro-2-[(4-{4-[4-(trifluormethoxy)fenoxy]-1-piperidinyl}fenoxymethyl)-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*][1,3]oxazol; Obrázek 14) je dalším nově zavedeným léčivem proti TB. Toto perorální léčivo se zároveň nachází ve 3. fázi klinického testování, kdy bylo nedávno dokončeno hodnocení jeho bezpečnosti a účinnosti, jakožto doplňku k optimalizovanému základnímu režimu pro léčbu dospělých pacientů s MDR-TB. Konečné výsledky se očekávají v nejbližší době.<sup>5</sup>



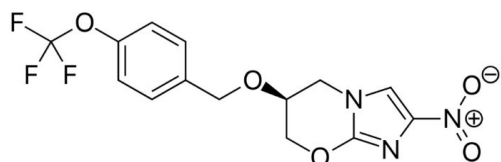
Obrázek 14 Delamanid

Nitroimidazooxazoly (zástupce delamanid) jsou jedinečné vzhledem k ostatním sloučeninám v nitroimidazolové třídě, kam patří např. nitroimidazooxaziny (pretomanid).



### 3.2.2.4 Pretomanid

Potenciální a zatím neschválené antituberkulotikum pretomanid (PA-824; (6*S*)-2-nitro-6-[[4-(trifluormethoxy)benzyl]oxy]-6,7-dihydro-5*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]oxazin; Obrázek 16) patří do nitroimidazolové skupiny nitroimidazooxazinů a aktuálně se nachází ve 3. fázi klinického testování jako součást kombinovaných léčebných režimů na citlivé a rezistentní kmeny TB. <sup>5</sup>



Obrázek 16 Pretomanid

Proléčivo pretomanid vyžaduje podobnou enzymatickou aktivaci mykobakteriální deazaflavin (F<sub>420</sub>)-dependentní nitroreduktázou jako delamanid. Mechanismus účinku je rovněž podobný s delamanidem, tj. (1) v aerobních podmínkách narušuje biosyntézu mykolových kyselin a v (2) anaerobních podmínkách granulomů (nereplikující se mykobakterie) dochází k uvolňování oxidu dusnatého. Rezistence je i zde spojena s biosyntézou koenzymu F<sub>420</sub>. <sup>52</sup>

### 3.2.3 Ostatní léčiva druhé linie

Tabulka 1 reportuje léčiva druhé linie obsažené v textu s jejich mechanismem účinku.

Tabulka 1 Seznam v textu zmíněných léčiv druhé linie

Skupina	Léčivo	Mechanismus účinku
<b><i>Fluorochinolony</i></b>	Levofloxacin * Moxifloxacin Gatifloxacin	Inhibice bakteriálních topoizomeráz typu II, což jsou esenciální enzymy zapojené do klíčových buněčných procesů včetně replikace DNA. <sup>53</sup>
<b><i>Aminoglykosidy</i></b>	Streptomycin*** Amikacin Kanamycin	Inhibice bakteriální proteosyntézy. <sup>54</sup>
<b><i>Polypeptidy</i></b>	Kapreomycin	Inhibice bakteriální proteosyntézy. <sup>55</sup>
<b><i>Thioamidy</i></b>	Ethionamid Prothionamid	Po mykobakteriální enzymatické aktivaci inhibují InhA. <sup>56</sup>



<b>Deriváty aminokyseliny</b>	Cykloserin Terizidon	Inhibice syntézy peptidoglykanové složky bakteriální buněčné stěny. <sup>57, 58</sup>
<b>Oxazolidinony</b>	Linezolid *	Inhibice bakteriální proteosyntézy. <sup>59</sup>
<b>Riminofenaziny</b>	Klofazimin **	Narušení bakteriální buněčné membrány uvolňováním reaktivních forem kyslíku (ROS). <sup>47</sup>
<b><math>\beta</math>-laktamová antibiotika</b>	<u>Karbapenemy</u> Imipenem Meropenem	Vazba na penicillin-binding proteiny a inhibice syntézy bakteriální stěny. <sup>60, 61</sup> Podávají se spolu s inhibitory $\beta$ -laktamáz (kyselina klavulanová) či dehydropeptidáz (cilastatin), které brání jejich rozkladu. <sup>62, 63</sup>
	<u>Peniciliny</u> Amoxicilin	
	Thioacetazon	Inhibice biosyntézy mykolových kyselin. <sup>65, 34</sup>

\* v současné době v 2. fázi klinického testování (podle WHO)

\*\* v současné době v 3. fázi klinického testování (podle WHO)

\*\*\* někdy řazen i do první linie antituberkulotik

### 3.2.4 Léčebné režimy tuberkulózy

Současná léčba lékově nerezistentních kmenů TB spočívá v dvouměsíční intenzivní čtyřsložkové léčebné proceduře, zahrnující rifampicin, INH, pyrazinamid a ethambutol, která je poté následována čtyřměsíční dvousložkovou v podobě rifampicinu a INH.<sup>64</sup>

Rizikovější podobou TB jsou její rezistentní formy, ke kterým kromě snadného přenosu onemocnění přispívá i nedostatečný celosvětový přístup pacientů k léčbě, respektive k léčivům. Tato neúplná léčba se odráží v celkovém rozvoji lékové rezistence. V konečném důsledku proto eradikace MDR-TB často trvá déle než 2 roky a spoléhá se na toxičtější a méně účinná léčiva druhé linie, která jsou v postižených oblastech mnohdy ještě daleko vzácnější než antituberkulotika první linie.<sup>5, 65</sup> Terapii TB často současně znesnadňují i lékové interakce při léčbě koinfekcí. Příkladem může být induktor cytochromu P450 (lidský enzym metabolizující léčiva) rifampicin s antiretrovirovými. Tato interakce vede při léčbě koinfikovaných pacientů (TB+HIV) k dramatickému snížení plazmatických hladin antiretrovirových léčiv, a tedy nedostatečné léčbě HIV. Pacienti jsou proto často nuceni dokončit léčbu TB před zahájením léčby HIV. Celková prognóza těchto koinfikovaných pacientů je z důvodu délky léčby TB velmi nepříznivá.<sup>65</sup>

Kromě již zmíněných MDR-TB a RR-TB byly popsány i další formy rezistencí: XDR-TB, která je definována jako MDR-TB plus rezistence na minimálně jedno léčivo z obou nejdůležitějších skupin antituberkulotik režimu MDR-TB: fluorochinolony a druhá linie injekčních léčiv (amikacin, kapreomycin nebo kanamycin). Totálně lékově-rezistentní tuberkulóza (TDR-TB; totally drug-resistant tuberculosis) byla svého času evidována v Číně, Indii, Africe či východní Evropě, ale s nástupem antituberkulotik nové generace, bedachilinu a delamanidu, byla prozatím eradikována.<sup>5, 65, 66</sup>

V roce 1997 byly vydány léčebné pokyny pro rezistentní formy TB, které jsou na základě studií neustále aktualizovány. Zatím poslední aktualizace proběhla v roce 2016, kdy byl doporučen standardizovaný 9 až 12 měsíční léčebný zkrácený režim jako první volba u pacientů s MDR-TB nebo RR-TB, kteří nebyli dříve léčeni léčivem druhé linie a u kterých byla vyloučena rezistence vůči fluorochinolonům a injekčním léčivům druhé linie nebo je považována za vysoce nepravděpodobnou.<sup>67</sup>

Zkrácený léčebný režim se skládá ze dvou odlišných částí: první čtyřměsíční intenzivní fáze (v případě vysoké detekce sputum-pozitivních nátěrů může trvat i 6 měsíců) zahrnuje gatifloxacin/moxifloxacin, kanamycin, prothionamid, klofazimin, vysoké dávky INH, pyrazinamid a ethambutol. Po této fázi následuje pětiměsíční terapie: gatifloxacin/moxifloxacin, klofazimin, pyrazinamid a ethambutol.<sup>66, 67</sup>

Delší režim léčby MDR-TB trvá obvykle 18 a více měsíců a může být standardizovaný či individuální. Jsou zde skupiny pacientů zahrnující formy RR-TB, včetně pacientů s kmeny citlivými na INH nebo s MDR-TB, případně XDR-TB.<sup>66, 67</sup> Při sestavování léčby delšího režimu MDR-TB je cílem zkombinovat nejméně pět účinných léčiv v intenzivní fázi léčby. Výběr léku je založen na pravděpodobnosti jejich účinnosti v souvislosti s formou rezistence dané mykobakterie, koinfekce či jiné spolu se vyskytující nemoci a rizik nebo výhod souvisejících s léčbou či léčivem. Při výběru se vychází z těchto skupin léčiv (viz Tabulka 2):<sup>66, 67</sup>

Tabulka 2 Obecný postup při sestavování dlouhého režimu MDR-TB<sup>66, 67</sup>

	levofloxacin
Jeden fluorochinolon nové generace	moxifloxacin gatifloxacin
Jedno injekční léčivo druhé linie	amikacin

	kapreomycin
	kanamycin
	streptomycin*
	ethionamid/prothionamid
Dvě nebo více léčiv druhé linie	cykloserin/terizidon
	linezolid
	klofazimin
Pyrazinamid či jakékoliv jiné léčivo první linie za předpokladu, že může pomoci posílit léčebný režim	pyrazinamid
	ethambutol
	vysoké dávky INH
V případě náhrady nebo posílení léčiva druhé linie v souladu se současně stanovenou lékovou politikou	bedachilin
	delamanid
	kyselina <i>p</i> -aminosalicylová
Pokud režim nelze sestavit jinak, přidává se některá z těchto látek či kombinací	imipenem-cilastatin
	meropenem
	amoxicilin-klavulanát
	thioacetazon

\* pokud nemohou být použity tři předešlé z této skupiny

V obecném souhrnu jsou mezi nejčastějšími rizikovými faktory při selhání léčby rezistentních forem TB uváděny: non-compliance (nedodržení léčebného postupu pacientem), nevhodné lékové režimy, kombinace a dávkování či primární infekce s již rezistentními kmeny na podaná léčiva.<sup>68</sup>

### **3.3 Nové přístupy a směry ve vývoji léčiv**

Při vývoji nových léčiv by měl být kladen důraz na hledání nového mechanismu účinku s ohledem na riziko zkřížené rezistence, rychlou baktericidní účinnost léčiva zkrácující délku léčby, na optimalizaci farmakokinetických/farmakodynamických vlastností umožňující perorální podání jednou denně, nízký interakční potenciál povolující kombinační léčbu, dobrý

bezpečnostní profil vhodný i pro děti a těhotné ženy. Dále pak cena, stabilita a tolerance pacientem.<sup>5, 65</sup>

S přibývajícím poznáním se rozšiřují i možnosti našeho experimentálního bádání, což za poslední dobu umožnilo objasnění několika činitelů ovlivňujících rezistenci vůči současně užívaným antituberkulotikům. Jedná se zejména o spontánní mutace, které interferují vazbu cíl-lék, například u rifampicinu je to mutace genu *rpoB* či pro fluorochinolony mutace *gyrA/B*. Jinou možností je znemožnění aktivace prekurzoru u INH v *katG* genu či *fgd* genu u PA-824, případně nadměrná exprese cíle v promotorové oblasti *inhA* u INH/ethionamidu. Fenotypovou rezistenci významné části klinicky izolovaných kmenů TB však nelze vysvětlit pouze těmito mutacemi. Totiž až 30 % izolovaných kmenů rezistentních vůči INH a přibližně 5 % rezistentních vůči rifampicinu neobsahují žádné mutace ve známých genech pro rezistenci. Dále pak začíná být zřejmé, že bakterie nejsou jen diváky své vlastní evoluce, nýbrž vyvíjejí řadu mechanismů, které jim usnadňují adaptaci na změny v prostředí (např. vystavení účinkům léčiv) a modulují svoji lékovou rezistenci, což jen ilustruje složitost této problematiky.<sup>69</sup>

### 3.3.1 Peptidové nosiče na bázi tuftsinu

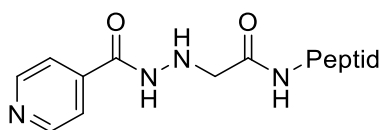
Současný vývoj antituberkulotických léčiv se snaží cílit na malé molekuly, které jsou schopny narušit funkce cílových proteinů s následnou inhibicí klíčových metabolických drah a mykobakteriálních funkcí. Navzdory mnoha identifikovaným molekulám s nízkou *in vitro* minimální inhibiční koncentrací se však stále nedaří vypořádat s nízkou biodostupností danou především špatnou rozpustností ve vodě, nízkou buněčnou permeabilitou či nespecifickým zásahem do buněk hostitele.<sup>70</sup> Tyto problémy by mohly překonat peptidové nosiče na bázi tuftsinu, které jsou jedním z přístupů zvyšování lékové specifity. Mají roli selektivního nosiče (tzv. targeting neboli cílené směřování) do infikovaných makrofágů, přičemž mohou dále přinášet řadu výhod, jako např. lepší rozpustnost a biodostupnost navázaných hydrofobních léčiv, prodloužený biologický poločas, zlepšený terapeutický index či možnost řízeného uvolňování léčiva spolu se sníženou imunogenicitou a toxicitou.<sup>71, 72, 73</sup>

Podle odhadů existuje až 70 000 tuftsin-vazebných míst na povrchu fagocytujících buněk.<sup>73</sup> Tuftsin je přírodní tetrapeptid (lidský: TKPR; psí: TKPK) produkováný při enzymatickém štěpení Fc-domény těžkého řetězce imunoglobulinu G (IgG) dvěma enzymy: leukokininázou a tuftsin endokarboxypeptidázou, která se vyskytuje ve slezině. Uvolněný

peptid následně aktivuje několik složek imunitního systému včetně granulocytů a makrofágů, čímž potencuje jejich aktivitu.<sup>74</sup>

V uplynulých letech byla na oddělení peptidové chemie Maďarské akademie věd v Budapešti vyvinuta nová skupina oligopeptidových nosičů založených právě na tuftsinové sekvenci s opakujícími se jednotkami pentapeptidu [TKPKG]<sub>n</sub> (n = 1, 2, 4, 6, 8). Tyto oligotuftsinové deriváty byly odvozeny od psiho tuftsinu (TKPK), který má díky svému druhému lysinovému zbytku v sekvenci širší kombinační možnost syntetických spojení peptidového nosiče s biologicky aktivní či případně hydrofobní molekulou (palmitová, máselná kyselina atd.) hrající důležitou roli v interakcích s lipidovou membránou bakterie (lipofilita, membránová afinita či zapouzdřovací efekt). Prodloužením řetězce o glycin na C-konci dochází zejména k omezení racemizace. Tyto vyvinuté nosiče jsou netoxické, neimunogenní a vykazují stejné biologické chování jako tuftsin (tj. vazba na makrofágové receptory, imunostimulace, stimulace chemotaxe monocytů a makrofágů).<sup>73, 75, 76, 77</sup>

Perspektivu nosičů s intracelulární aktivitou dokládá studie, kdy byly některé tuftsinové deriváty v konjugaci s INH *in vitro* vyzkoušeny proti kmeni *M. tuberculosis* H37Rv. Hodnoty MIC (počítány na obsah INH v nosiči) těchto konjugátů: GTKPK(INH-CH<sub>2</sub>-CO)G (MIC = 0,18 µg/ml) a [TKPK(INH-CH<sub>2</sub>-CO)G]<sub>4</sub> (MIC = 0,32 µg/ml), při propojení peptidového nosiče s INH skrze glycin (INH-glycin-NH-peptidový nosič; Obrázek 17) byly srovnatelné s INH (MIC = 0,16 µg/ml) a jsou tedy nadějným příslibem pro další experimentální vývoj.<sup>78</sup> Příkladem tohoto pokračujícího výzkumu může být například naše publikace<sup>73</sup> pojednávající o konjugaci nosičů se salicylanilidy za získání antimykobakteriálně aktivních sloučenin, viz kapitola 5.2.3.

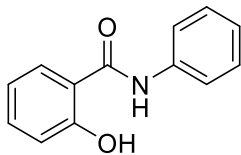


Obrázek 17 Spojení INH s peptidovým nosičem<sup>78</sup>

### 3.3.2 Salicylanilidy

Salicylanilidy (2-hydroxy-*N*-fenylobenzamidy; Obrázek 18) jsou širokospektré antifungální a antimikrobiální sloučeniny,<sup>79</sup> zahrnující antimykobakteriální aktivitu nejen vůči *Mycobacterium tuberculosis*, ale také proti atypickým mykobakteriálním kmenům

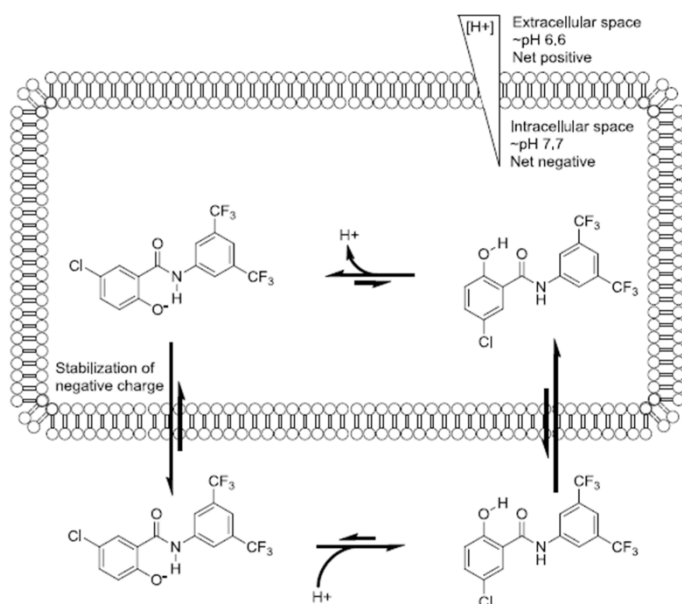
(*Mycobacterium avium*, *M. kansasii* či *M. abscessus*), kde standardní antituberkulotika často selhávají.<sup>73, 80, 81</sup>



Obrázek 18 Salicylanilid

### 3.3.2.1 Protonoforový mechanismus salicylanilidů

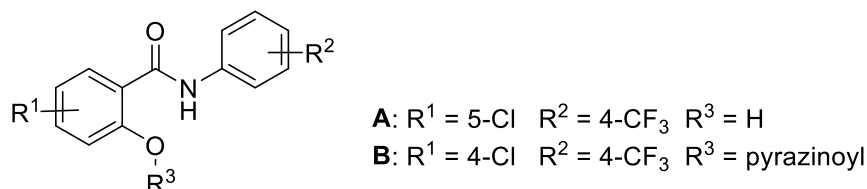
Pro biologickou aktivitu salicylanilidů je nezbytná fenolická skupina na salicylovém kruhu. Může jim například umožňovat funkci protonoforů (Obrázek 19) neboli protonového přenašeče do intracelulárního prostoru mykobakterie a mitochondrie. Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty ( $pK_a$ ) fenolické skupiny salicylového kruhu se nachází v blízkosti fyziologického rozmezí pH a v mírně zásaditém intracelulárním prostředí mykobakterie může disociovat za vzniku deprotonované fenolátové formy. Stabilizací fenolátu vodíkovou vazbou s  $-NH-$  skupinou je umožněn salicylanilidům za pomoci pozitivního elektrochemického gradientu návrat do extracelulárního prostoru. Zde v nižším pH je fenolát protonizován a připraven pro další prostup přes mykobakteriální membránu. Tímto okyselením intracelulárního mykobakteriálního prostředí dochází k narušení membránového transportu (protonový gradient) a oxidativní fosforylace, což má za následek smrt mykobakterie.<sup>81, 82</sup>



Obrázek 19 Mechanismus salicylanilidů narušující protonový gradient mykobakterií <sup>82</sup>

### 3.3.2.2 Mykobakteriální isocitrát lyáza

U salicylanilidových derivátů byla zjištěna schopnost narušovat působení mykobakteriální isocitrát lyázy, kdy deriváty **A** a **B** inhibovaly při 100  $\mu\text{M}$  koncentraci až cca 60 % enzymové aktivity (Obrázek 20). <sup>83</sup>



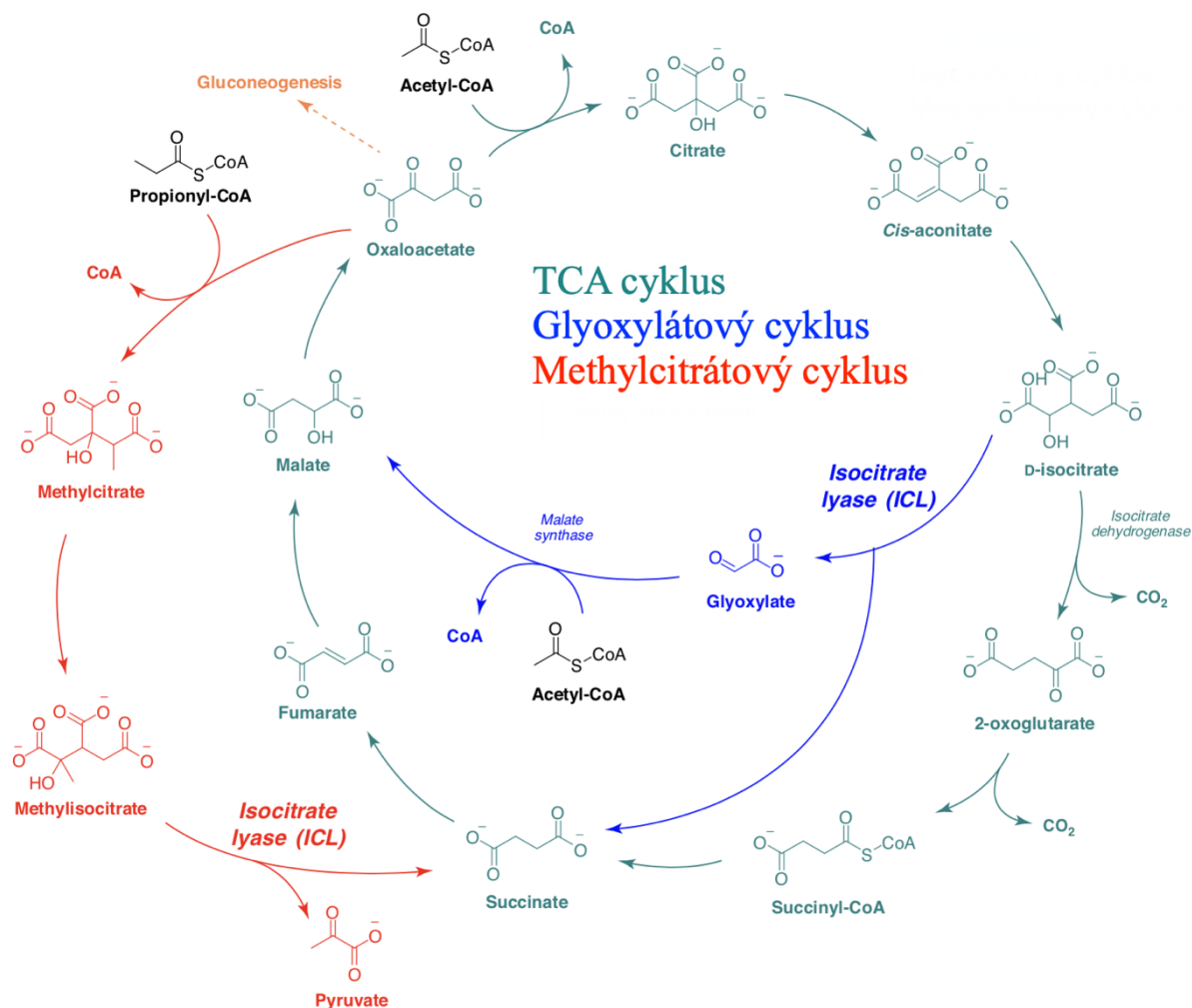
Obrázek 20 Dva nejúčinnější salicylanilidové inhibitory isocitrát lyázy <sup>83</sup>

Isocitrát lyáza (ICL) je  $\text{Mg}^{2+}$  dependentní enzym, který je přítomný v bakteriích (včetně mykobakterií), houbách i rostlinách, ale u obratlovců chybí. U *M. tuberculosis* jsou známy jeho dvě izoformy: ICL1 a ICL2, kódované geny *icl1* a *aceA (icl2)*. Kmen *M. tuberculosis* H37Rv má gen *aceA* rozdělen ještě na *aceAa* a *aceAb*, jejich funkce ovšem není zatím plně objasněna. ICL1 a ICL2 se zdají být nezbytné v metabolismu mastných kyselin *M. tuberculosis* během aktivní replikační fáze. Experimenty zároveň odhalují, že i pro přežití *M. tuberculosis* v nereplikujícím latentním období je ICL důležitá, ovšem přesná role ICL1 a ICL2 není ještě plně známa. Tento enzym hraje pravděpodobně roli v mykobakteriálním glyoxylátovém i methylcitrátovém cyklu, viz Obrázek 21. <sup>83, 84</sup>

Glyoxylátový cyklus je alternativní cestou metabolizace trikarboxylových kyselin (TCA) a zahrnuje dva enzymy: isocitrát lyázu a malát syntázu. Isocitrát lyáza katalyzuje štěpení D-isocitrátu na sukcinát a glyoxylát, který je poté za pomoci malát syntázy kondenzován s acetyl-CoA na malát. Meziprodukty TCA cyklu jako oxalacetát jsou průběžně doplňovány anaplerotickými reakcemi ze sukcinátu a malátu, produktů glyoxylátového cyklu. Mastné kyseliny jsou využívány mykobakteriemi jako zásoba uhlíku, přičemž během latentní fáze se dokonce mohou stát i preferovaným zdrojem. Tyto kyseliny jsou na principu  $\beta$ -oxidace odbourávány za vzniku acetyl-CoA, který je v glyoxylátovém cyklu asimilován bez ztrát uhlíku jako třeba oxidu uhličitého. Tento cyklus může být proto obzvláště důležitý pro latentní *M. tuberculosis* nacházející se v relativně hypoxickém prostředí bez přísunu vnějších živin. Právě zde může totiž mykobakteriím umožnit bezztrátové využití uhlíku pro nezbytnou glukoneogenezi.<sup>83, 84, 85</sup>

*M. tuberculosis* může během infekce využívat nejen své lipidové zásoby, ale i mastné kyseliny hostitele. Přestože jsou přírodní živočišné mastné kyseliny složeny pouze ze sudého počtu uhlíků, bakterie včetně mykobakterií mají schopnost syntetizovat i kyseliny s lichým řetězcem. Nicméně  $\beta$ -oxidace mastných kyselin s lichým řetězcem je pro bakterie potenciálně škodlivá, jelikož vzniká pro ně toxický propionyl-CoA a propionát. Dalším mykobakteriálním zdrojem uhlíku může být cholesterol, jehož odbourávání též přináší jako vedlejší produkt propionyl-CoA. Methylcitrátový cyklus umožňuje přeměnu propionátu a propionyl-CoA na méně toxické formy a mykobakteriální ICL je pravděpodobně jeho součástí.<sup>84</sup>





Obrázek 21 Schématické znázornění TCA, glyoxylátového a methylcitrátového cyklu <sup>84</sup>

### 3.3.2.3 Další možnosti působení salicylanilidů

Salicylanilidy mírně inhibují lidskou i bakteriální methionin aminopeptidázu, což je enzym katalyzující klíčový krok v posttranslační modifikaci vznikajících proteinů odstraněním *N*-koncového methioninu, tj. jednoho z úvodních kroků bakteriální proteosyntézy. <sup>83</sup> Spektrum jejich působnosti dále zahrnuje inhibiční vliv na dvou-komponentní regulační systém <sup>86</sup> či různé bakteriální enzymy jako transglykosyláza, <sup>87</sup> sortáza A, <sup>88</sup> D-alanin-D-alanin ligáza, <sup>89</sup> L-alanin dehydrogenáza, lysin  $\epsilon$ -aminotransferáza, chorismát mutáza, pantothenát syntetáza <sup>90</sup> nebo acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza. <sup>91</sup> Biologická, respektive cytotoxická aktivita salicylanilidů je známa rovněž v souvislosti s receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR) podílejících se na patogenezi různých nádorů epiteliálního původu (např. prsu, vaječníků či karcinom plic). <sup>92</sup>

### 3.3.2.4 Vztah mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou

#### 3.3.2.4.1 *Salicylový kruh*

Odstranění fenolické skupiny ze salicylového kruhu (při 3,5-bisCF<sub>3</sub> obsazení anilidového cyklu) vedlo k celkové ztrátě aktivity vůči mykobakteriálnímu kmeni H37Rv (MIC >50 μM). Při odstranění 5-Cl substituentu (MIC = 3,1 μM) se účinnost snížila 2-4x (MIC = 6,3-13 μM), zatímco jeho náhrada za jiný halogen (F, Br či I) mohla vést k mírnému poklesu aktivit (až 2x). Substituce 5-methoxy skupinou vedla k MIC = 6,3-13 μM a 5-NO<sub>2</sub> pak přinesla úplnou ztrátu účinku (MIC >50 μM). Výsledky naznačily pozitivní vliv slabě elektron-akceptorní skupiny na inhibiční aktivitu.<sup>82</sup>

Doposud získané SAR výsledky salicylového kruhu naznačují, že nejvýhodnější substituce je Cl v poloze 4 nebo 5 a Br v poloze 5. Konkrétně 5-brom-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid a 5-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid inhibující růst *M. tuberculosis* při koncentraci 1 až 2 μM patří k doposud nejúčinnějším zaznamenaným salicylanilidům.<sup>79, 80</sup> Zdvojnásobení počtu bromových či chlorových substituentů v polohách 4 a 5 aktivitu zachovává (H37Rv MIC = 1-4 μM).<sup>79</sup> Zajímavým se jeví zjištění, že při umístění NO<sub>2</sub> skupiny do 4 polohy bylo pozorováno mírnějších, ale stále vysokých aktivit vůči H37Rv s MIC ≥2 μM.<sup>143</sup>

##### 3.3.2.4.1.1 Shrnutí SAR pro salicylový kruh

- ✓ Fenolická skupina v poloze 2
- ✓ Slabě elektron-akceptorní atom Cl a Br v poloze 4 a/nebo 5

#### 3.3.2.4.2 *Anilidový kruh*

V této části se zdá být důležitá přítomnost lipofilnější a elektron-akceptorní skupiny (CF<sub>3</sub>, Cl, Br atd.), zejména trifluormethylové v poloze 4.<sup>79, 82</sup> Srovnání inhibičních aktivit vlivem této skupiny při jejím různém obsazení anilidového kruhu (za 5-chlorsalicylové substituce) přineslo následující výsledky. Hodnoty vůči mykobakteriálnímu kmeni H37Rv byly při poloze 2-CF<sub>3</sub> (*ortho* poloha) MIC = 13-25 μM, 3-CF<sub>3</sub> (*meta* poloha) MIC = 3,1-6,3 μM, 4-CF<sub>3</sub> (*para* poloha) MIC = 1,6-3,1 μM. Disubstituce odhalila klesající účinnost v řadě: 3,4-bisCF<sub>3</sub> (MIC = 0,8-1,6 μM) > 3,5-bisCF<sub>3</sub> = 2,5-bisCF<sub>3</sub> (MIC = 3,1 μM) > 2,3-bisCF<sub>3</sub> (MIC = 6,3-13 μM).<sup>82</sup>

#### 3.3.2.4.2.1 Shrnutí SAR pro anilidový kruh

- ✓ Elektron-akceptorní skupina s vyšší lipofilitou jako CF<sub>3</sub>, Cl či Br v poloze 3, 4, 5

#### 3.3.2.5 Cytotoxicita a možnosti její redukce

Navzdory širokému spektru biologické aktivity charakterizuje bohužel tyto sloučeniny nepříznivý cytotoxický profil, který značně omezuje jejich léčebný potenciál. Cytotoxicita je připisována fenolické skupině, která zároveň i určuje aktivitu a šíří jejich biologického působení.<sup>81, 82</sup>

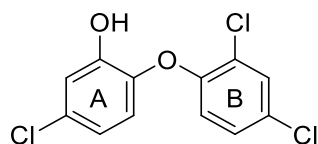
Naší pracovní skupině se na principu esterifikace fenolické skupiny salicylového kruhu podařilo úspěšně redukovat toxicitu salicylanilidových derivátů.<sup>93, 94, 95, 96, 97, 98</sup> Například formou 4-substituovaných benzoátů, které inhibovaly mykobakteriální kmeny v rozsahu MIC = 0,125-8 μM a zároveň nevykazovaly cytotoxicitu vůči lidským buňkám jaterního karcinomu (HepG2) při koncentraci 50 μM.<sup>98</sup>

Salicylanilidovou esterifikací tedy bylo dosaženo nejen vysokých inhibičních aktivit vůči mykobakteriálním kmenům, včetně atypických a rezistentních, ale zároveň i výrazně nižších hodnot cytotoxicity oproti výchozím salicylanilidům s volnou fenolickou skupinou. Proto jsme v této esterifikaci pokračovali s využitím strukturálních fragmentů antituberkulotik první linie: kyseliny isonikotinové a pyrazinkarboxylové. Myšlenka spočívala v tvorbě zdvojeného proléčiva (mutual prodrug) s výhodnějšími farmakologickými vlastnostmi (biodostupnost, fyzikálně-chemické vlastnosti, cytotoxicita atd.), které po své bioaktivaci poskytnou dvě účinné látky.

### 3.3.3 Triklosan

Triklosan známý i jako irgasan (TRC; 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol; Obrázek 22) je lipofilní širokospektrá antimikrobiální látka obecně užívaná při koncentracích 0,1-0,3 %, která je součástí domácího vybavení v podobě mýdel, čisticích prostředků, šamponů, zubních past, ústních vod, textilií či deodorantů.<sup>99, 100</sup> Tato širokospektrá biocidní látka proniká bakteriální buněčnou stěnou a cílí několik cytoplazmatických a membránových míst, včetně syntézy RNA a tvorby makromolekul. Při vysokých koncentracích narušuje syntézu bílkovin a lipidů či významně poškozuje bakteriální membrány. Naopak při nižších koncentracích inhibuje bakteriální enoyl-ACP reduktázu (FabI) ve FAS II cyklu, zahrnující například kromě

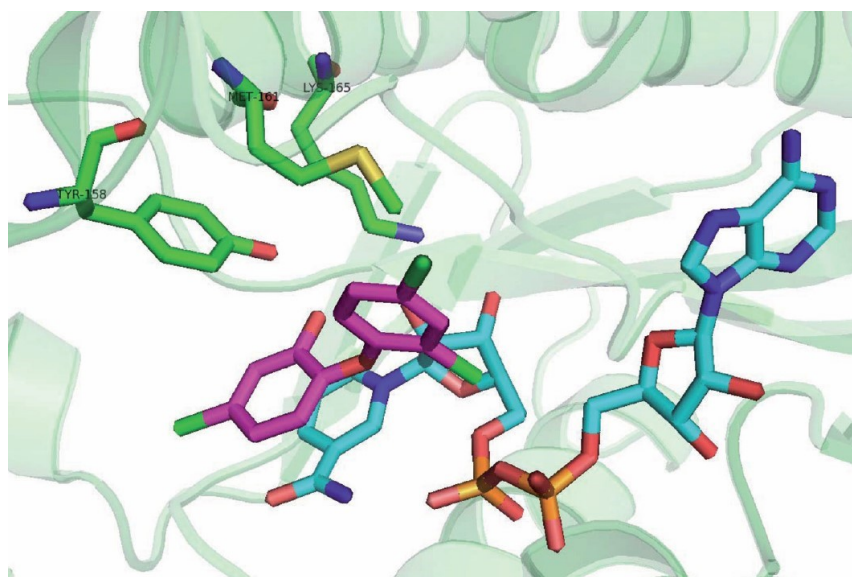
mykobakteriální InhA i její další homology v *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Plasmodium falciparum*, *Pseudomonas aeruginosa* či *Staphylococcus aureus*.<sup>99, 101, 102</sup> Více o triklosanu, jeho derivátech, SAR a antimykobakteriálních aktivitách je v následující části a našem review.<sup>102</sup>



Obrázek 22 Struktura triklosanu

### 3.3.3.1 Mechanismus působení

Triklosanová inhibice InhA spočívá v tvorbě komplexu s tímto enzymem (Obrázek 23) při uspořádání, kdy je A-kruh TRC (Obrázek 22) v ne vazebné  $\pi$ - $\pi$  interakci s nikotinamidovým kruhem ( $\text{NAD}^+$ ) a zároveň jsou zachovány vodíkové vazby mezi 2-hydroxylovou skupinou ribózy u  $\text{NAD}^+$  a fenolickými skupinami tyrosinu 158 (TYR-158) a triklosanu na A-kruhu. Zbývající interakce mají hydrofobní charakter. Orientaci TRC v prostoru zajišťuje ortogonální postavení jeho dichlorovaného B-kruhu (Obrázek 22) vůči A-kruhu.<sup>103</sup>



Obrázek 23 Triklosan-InhA komplex<sup>104</sup>

V nedávné studii byl TRC popsán jako protonofor narušující chod mitochondriálního protonového transportu v eukaryotických buňkách ( $\text{EC}_{50} = 3,0\text{-}13,7 \mu\text{M}$ ) bez vlivu na cytotoxicitu. TRC dále snižoval degranulaci leukemických potkaních buněk odvozených

od linie bazofilních mastocytů (rat basophilic leukaemia mast cells; RBL-2H3) a zároveň zvyšoval jejich spotřebu kyslíku. Methyloací fenolické skupiny A-kruhu, tj. odstraněním ionizovatelného protonu, došlo ke ztrátě této aktivity.<sup>105</sup> V souvislosti s dýchacím řetězcem byla dále popsána inhibiční aktivita vůči NADH oxidáze, sukcinát oxidáze, NADH-cytochrom *c* reduktáze a sukcinát-cytochrom *c* reduktáze.<sup>106</sup> Kromě těchto publikací vzniklo v poslední době i několik pojednávajících o protinádorových vlastnostech TRC, konkrétně ve spojitosti s retinoblastomem,<sup>107</sup> rakovinou prsu<sup>108</sup> a prostaty.<sup>109</sup>

### 3.3.3.2 Bezpečnost a toxicita

Lipofilní TRC ( $\log P = 4,76$ ) vzbuzuje neustálé otázky z hlediska možných dopadů na životní prostředí a lidské zdraví vyplývající z jeho téměř všudypřítomné expozice. Tento antimikrobiální přípravek hromaděný v tukových tkáních byl detekován v moči, mateřském mléce, plodové vodě či krvi. Ovšem dle rozsáhlého review<sup>100</sup> lze jeho rozumné užívání považovat za bezpečné. Dosavadní systémové studie toxicity provedené na savcích zároveň naznačily, že není akutně toxický, mutagenní, karcinogenní či jinak nebezpečný pro vývoj jedince. Každopádně definitivní stanovisko toxicity TRC bude ještě trvat a vyžaduje detailnější studie, včetně úplného popsání metabolisme v životním prostředí (*O*-methyltriklosan, dioxiny, chlorované fenoly a chloroform), jeho biokumulace, vlivu na vodní ekosystém či disruptivní ovlivnění endokrinního systému (tj. strukturální podobnost s některými androgeny, estrogeny a hormony štítné žlázy).<sup>99, 100</sup> Novější studie ovšem naznačují, že i přes protichůdnost a neúplnost získaných výsledků TRC narušuje širším mechanismem působení endokrinní systém s estrogení aktivitou, tj. ovlivnění metabolismu a funkce hormonů, včetně jejich biosyntézy a enzymů s ní souvisejících. Bohužel vlivem rozdílnosti těchto studií, použitých zvířat a experimentálních podmínek dosud nebylo dosaženo shody ohledně účinků a mechanismů, které vedou k narušení endokrinního systému. Dále pak dosavadní epidemiologické studie jasně neprokázaly vliv TRC na endokrinní systém člověka a je tedy zapotřebí dalšího výzkumu.<sup>110</sup>

### 3.3.3.3 Rezistence

Důležitou otázkou vzhledem k současnému rozšíření TRC je riziko vzniku rezistence.<sup>111, 112</sup> Rezistenci vůči TRC a jeho zkříženou rezistenci s antimikrobiálními léčivými v laboratorních podmínkách (mutace či nadprodukce enoyl-ACP reduktázy, změny propustnosti membrány či eflux) se prokázat podařilo, zatímco v klinických/skutečných

podmínkách potřebné důkazy stále ještě chybí a jsou předmětem bádání. Možné vysvětlení tohoto rozdílu spočívá v laboratorní čistotě kultur a prostředí bohatém na živiny, jež nejsou zcela srovnatelné s běžným prostředím. Dalším aspektem je podávaná dávka TRC, tj. při vyšších koncentracích je TRC méně selektivní (= vznik rezistence je kvůli počtu jeho biologických cílů méně pravděpodobný), na rozdíl od nižších koncentrací (nejsou typické, viz užívané koncentrace, které jsou mnohonásobně vyšší než MIC bakterií a hub) a vyšší selektivnosti (= vznik rezistence je více pravděpodobný).<sup>99, 100, 111, 112</sup>

#### 3.3.3.4 Proléčivo s triklosanovým základem

TRC je přímým inhibitorem InhA. Nevyžaduje pro své působení KatG, enzym, který je nezbytný pro aktivaci INH, ale je bohužel spojen i s častým výskytem rezistence vůči tomuto antituberkulotiku první linie. Výhodu přímé inhibice InhA jsme chtěli dále podpořit tvorbou proléčiva s výhodnějšími vlastnostmi. Fenolickou skupinu TRC jsme proto kondenzovali s širší škálou různých kyselin karboxylového a (thio)karbamového typu zahrnující alifatický, alicyklický či aromatický základ. Cílem těchto obměn bylo ovlivňování lipofility TRC za účelem lepšího vstřebávání a transportu, redukce potenciální toxicity či zvýšení biologické aktivity celkově.

## 4 Metodická část obecná

### 4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Výchozí chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od společností Sigma-Aldrich (Darmstadt, Německo) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika). Reakce a čistota produktů byly monitorovány za pomoci tenkovrstvé chromatografie (TLC) s využitím destiček, které byly potaženy 0,2 mm silikagelem Merck 60 F254 (Merck Millipore, Darmstadt, Německo) a vizualizovány UV zářením (254 nm). Teplota tání byla stanovena na přístroji Büchi Melting Point B-540 (BÜCHI, Flawil, Švýcarsko) s použitím otevřených kapilár, výsledné hodnoty jsou nekorigované.

Příprava výchozích salicylanilidů byla prováděna za pomoci mikrovlnného reaktoru (530 W, 600 rpm, MicroSYNTH Milestone). Infračervená spektra byla měřena ATR metodou spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) v rozmezí 600-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Měření  $^1\text{H-NMR}$  a  $^{13}\text{C-NMR}$  spekter probíhalo za laboratorní teploty na přístrojích Varian Mercury-Vxbb 300 (300 MHz pro  $^1\text{H}$  a 75,5 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ; Varian Comp., Palo Alto, Kalifornie, USA) a Varian VNMR S500 (500 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ; Varian Comp., Palo Alto, Kalifornie, USA). Chemické posuny ( $\delta$ ) jsou uvedeny v ppm za použití tetramethylsilanu (TMS) jako vnitřního standardu. Couplingová konstanta ( $J$ ) je uvedena v Hz.

Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na automatickém mikroanalyzátoru CHNS-O CE (FISONS EA 1110, Milán, Itálie). Hodnota  $\text{Clog}P$ , což je logaritmus rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda, byla stanovena za pomoci programu CS ChemOffice Ultra (verze 15.0 a 17.0; Cambridge-Soft, Cambridge, Massachusetts, USA).

### 4.2 Metodiky biologického hodnocení

#### 4.2.1 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Testování antimykobakteriální aktivity vybraných sloučenin bylo provedeno *in vitro* ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě pod vedením RNDr. Jiřiny Stolaříkové.

Antimykobakteriální aktivita připravených sloučenin byla testována proti *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88 (H37Rv; ředění kmene  $10^{-3}$ ), *M. avium* My 330/80 (ředění kmene  $10^{-5}$ ; rezistentní vůči INH, rifampicinu, ofloxacinu a ethambutolu), *M. kansasii* 235/80 (ředění kmene  $10^{-4}$ ) a *M. kansasii* 6509/96 (ředění kmene  $10^{-4}$ ). Vybrané deriváty byly hodnoceny vůči šesti MDR-TB kmenům (ředění kmenů  $10^{-3}$ ; 7357/1998 je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu a rifabutinu; 234/2005 je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu a rifabutinu; 8666/2010 je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, klofamizinu a rifabutinu; 9449/2007 je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu a rifabutinu; Praha 1 je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, klofamizinu a rifabutinu; Praha 4 je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, klofamizinu a rifabutinu) a jednomu XDR-TB kmeni (ředění kmene  $10^{-3}$ ; Praha 131 je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, gentamicinu, rifabutinu a amikacinu). Kmeny byly získány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC, Brno, Česká republika) Státního zdravotního ústavu s výjimkou *M. kansasii* 6509/96, který byl klinicky izolován. Antimykobakteriální aktivita testovaných sloučenin byla stanovena v Šulově semisyntetické půdě (SEVAC, Praha, Česká republika) mikrometodou pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) při 37 °C po 14 a 21 dnech a po 7, 14 a 21 dnech pro *M. kansasii*.<sup>113</sup> Testované sloučeniny byly přidávány do média jako DMSO roztoky, zatímco standard INH byl použit ve formě sterilního vodného roztoku. Použité koncentrace testovaných sloučenin byly: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 32, 16, 8, 4, 2, 1 a 0,5  $\mu\text{M}$ . Výsledné hodnoty MIC reprezentují nejnižší koncentraci testované sloučeniny, při které byla pozorována úplná viditelná inhibice růstu mykobakteriálního kmene.

#### 4.2.2 Hodnocení antibakteriální aktivity

Antibakteriální aktivita byla hodnocena na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK mikrodiluční bujónovou metodou. Vybrané bakteriální kmeny byly pro testování získány z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms) Masarykovy univerzity v Brně. *In vitro* antibakteriální aktivita byla testována celkově na osmi Gram-pozitivních a Gram-negativních kmenech: *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, meticilin-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 *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961.

Všechny testované kmeny byly kultivovány v Mueller-Hintonově bujónu upraveném na pH 7,0. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (jeho konečná koncentrace nepřesáhla 2,5 % a neovlivňovala tak růst bakterií, což bylo potvrzeno kontrolou) a převedeny do konečných koncentrací v rozmezí od 500 do 0,49  $\mu\text{M}$ . Bacitracin byl použit jako standard. Požadovaná hustota bakteriální suspenze byla připravena přenesením inokula do sterilního isotonického roztoku a upraveného na požadovaných 0,5 McFarlandovy stupnice zákalu ( $1,5 \pm 10^8$  CFU/ml). Minimální inhibiční koncentrace byly hodnoceny vizuálně jako snížení bakteriálního růstu alespoň o 95 % ( $\text{IC}_{95}$ ) ve srovnání s kontrolou. Hodnoty MIC byly stanovovány po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě při 35 °C v humidní atmosféře obsahující 5 %  $\text{CO}_2$ .<sup>114</sup>

#### 4.2.3 Hodnocení antifungální aktivity

Antifungální aktivita byla měřena *in vitro* na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK proti čtyřem kmenům *Candida* (*Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28 a *Candida glabrata* 20/I), *Trichosporon asahii* 1188 a třem kmenům vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Mikrodiluční bujónová metoda byla provedena v RPMI-1640 médiu s glutaminem pufrovaným na pH = 7,0 za pomoci 0,165 M kyseliny 3-morfolinpropan-1-sulfonové. DMSO (konečná koncentrace  $\leq 2,5$  %) sloužil jako rozpouštědlo pro všechny testované sloučeniny. U kvasinek byla konečná velikost inokula  $5 \times 10^3 \pm 0,2$  CFU/ml a v případě plísní 0,5- $5 \times 10^4$  CFU/ml. Jako standard byl použit flukonazol. Hodnoty výsledných MIC byly odečítány vizuálně jako snížení růstu o alespoň 80 % ( $\text{IC}_{80}$ ) nebo 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) ve srovnání s kontrolou. Stanovování probíhalo 24 a 48 hodin od počátku statické inkubace ve vlhké atmosféře za tmy při 35 °C, u kmene *Trichophyton mentagrophytes* pak po 72 a 120 hodinách inkubace.<sup>115</sup>

#### 4.2.4 Hodnocení *in vitro* cytotoxicity

Cytotoxicita testovaných sloučenin byla stanovována na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK vůči buněčné linii lidského jaterního karcinomu HepG2

(ECACC, Salisbury, UK) za použití standardní kolorimetrické metody spočívající v měření redukce tetrazoliových solí v živých buňkách (CellTiter® 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega G3580, Fitchburg, USA).

Buňky byly kultivovány při 37 °C ve vlhké atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého v Minimum Essentials Eagle Medium doplněného o 10 % fetální bovinní sérum, 1 % roztok L-glutaminu a roztok neesenciálních aminokyselin. Testované sloučeniny byly rozpuštěny ve velmi malém objemu DMSO a připraveny po třech opakováních pro osm zkoušených koncentrací. Paralelně pro kontrolu byly připraveny vzorky pro stanovení 100 % a 0 % (inkubace s 10 % DMSO) životaschopnosti buněk, kontrola možných interakcí testovaných sloučenin s činidly a kontrola nastavení inkubačního média.

Získané výsledky jsou prezentovány jako inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ), která vede ke snížení životaschopnosti buněk na 50 % oproti hodnotě maximální (kontrolní).  $IC_{50}$  byla vypočtena pro každou z testovaných látek za pomoci softwaru GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornie, USA) a Microsoft Excel 2010.

## 5 Komentáře k publikacím a nepublikované výsledky

Většina získaných výsledků byla prezentována na odborných konferencích ústní nebo plakátovou formou. Některé z nich byly dále publikovány v odborných impaktovaných vědeckých časopisech.

Kapitola je rozdělena podle výchozí struktury dané molekuly na čtyři základní části: triklosanové, salicylanilidové, isoniazidové a *p*-aminosalicylové deriváty. Konkrétní části pak mohou být dále členěny na komentáře k publikacím či prezentují doposud nepublikované výsledky. Publikace jsou v textu označeny formou Článek X (X = 1-4) a jejich originální podoba je umístěna v kapitole Přílohy.

### 5.1 Triklosanové deriváty

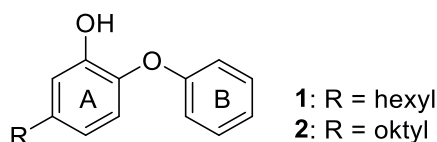
Triklosanové deriváty jsou členěny do dvou základních částí. Tou první je publikované review, které pojednává o doposud popsáných analozích TRC a jejich antimykobakteriálních aktivitách. Zároveň se snaží chronologicky i s ohledem na SAR popsat vývoj těchto sloučenin. Druhou částí jsou doposud nepublikovaná data esterových a (thio)karbamátových derivátů TRC, které byly podrobeny biologickému testování zaměřeného na antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální hodnocení.

#### 5.1.1 Článek 1 „Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents“

Schopnost přímé inhibice enoyl-ACP reduktázy dělá z triklosanu perspektivní sloučeninu na poli vývoje potenciálních antituberkulotik. Hodnoty MIC nejúčinnějších publikovaných derivátů vůči *M. tuberculosis* H37Rv dokonce začínaly od 0,156 µg/ml. Cílem této práce bylo shrnutí vývoje a současného stavu poznání této struktury v oblasti TB a vytvoření jakéhosi souhrnného základu pro budoucí optimalizaci strukturálních obměn vedoucí k vyšším biologickým aktivitám. Dále se práce snaží chronologicky diskutovat SAR ve vztahu k inhibici InhA a faktory související s *in vivo* aktivitou.

### 5.1.1.1 Des-chlor-triklosanové deriváty

Pracovní skupina okolo Sullivana <sup>116</sup> v roce 2006 jako jedna z prvních započala s obměnami triklosanu (konkrétně 2-fenoxyfenolu) s úmyslem zvýšení inhibice mykobakteriální InhA. Vycházeli přitom z myšlenky, že objemnější substituent na A-kruhu (fenolický kruh; Obrázek 24) může přispívat k lepšímu kontaktu s InhA v jeho vazebném místě. V připravené řadě 5-alkyl-2-fenoxyfenolů (alkyl = 2, 4, 5, 6, 8 a 14 uhlíků; Obrázek 24) byly nejpreferovanější alkyly s šesti **1** (InhA IC<sub>50</sub> = 11 nM; H37Rv MIC = 7,8 μM) a osmi uhlíky **2** (InhA IC<sub>50</sub> = 5,0 nM; H37Rv MIC = 6,4 μM) v porovnání s TRC (IC<sub>50</sub> = 1000 nM; MIC = 43,1 μM). Ve všech případech se jednalo o rychlé, reverzibilní a nekompetitivní inhibitory InhA, které se pravděpodobně váží na komplex InhA-NAD<sup>+</sup> stejně jako TRC (nezávisle na KatG aktivaci). <sup>116</sup>



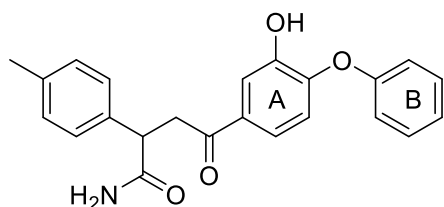
Obrázek 24 Výchozí 5-alkyl-2-fenoxyfenol a jeho dva nejúčinnější deriváty z této série <sup>116</sup>

Boyne a kolektiv v navazující studii <sup>117</sup> popsal pleiotropnější účinky TRC vůči bakteriím ve srovnání s deriváty **1** a **2**. Tato dvě analoga zvyšovala hlavně odpověď genů spojených s biosyntézou buněčné stěny, zahrnující *fas*, KAS operon, *accD4*, *pks13*, *pks16*, *fadD32* a *rv0241c*. Jinými slovy cílila zejména na biosyntézu mastných kyselin a produkty genů podílejících se na stavbě meromykolátů či arabinogalaktanů. TRC naproti tomu indukoval velké množství genů zapojených do  $\beta$ -oxidace. Transkripční profil (tj. aktivované geny) dále odhalil, že tyto alkylové modifikace A-kruhu zvyšovaly selektivitu k InhA. Problémem však byla jejich nedostatečná biodostupnost po perorálním podání (myší model) a tedy nedostatečná biologická odpověď. <sup>117</sup>

Společnou vlastností těchto derivátů je kromě slibné *in vitro* aktivity i jejich omezená *in vivo* účinnost, vysvětlovaná nízkou rozpustností ve vodě spolu s ClogP >5. Na tomto podkladu byla připravena nová řada polárnějších derivátů odvozených od **1** s obměnami na B-kruhu. Tyto obměny spočívaly buď v náhradě fenoxy kruhu za izosterický dusíkatý heterocykl, nebo v jeho substituci (polohy *ortho*, *meta* i *para*) nitro, amino, amidovou či

piperazinovou skupinou. Žádná z těchto obměn ovšem nevedla ve srovnání s **1** k nižší  $IC_{50}$  a MIC. *In vivo* testy provedeny nebyly.<sup>118</sup>

Za pomoci dokovacích výpočtů připravil Cinu a spol.<sup>119</sup> deriváty 2-fenoxyfenolu propojené prostřednictvím 5-aminomethylového můstku na A-kruhu se substituenty typu alkyl, pyrrolidin, piperidin, 4-methylpiperidin, morfolin či 4-methylpiperazin. Ovšem ve srovnání s TRC byla tato analoga i přes dobré dokovací výsledky a nižší lipofilitu *in vitro* méně účinná. V podobném trendu pokračoval i Kar se svým týmem<sup>120</sup> s výchozí 4-(3-hydroxy-4-fenoxyfenyl)-4-oxo-2-fenylbutanamidovou strukturou a jejím neúčinnějším analogem **3** (H37Rv MIC = 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Obrázek 25). Připravené deriváty byly netoxické, v porovnání s TRC méně lipofilní a s podobnou až horší inhibiční aktivitou. Autoři nijak nekomentovali chiralitu jimi připravených derivátů s vlivem na biologickou aktivitu, která může být u opticky aktivních látek u jednotlivých stereoizomerů rozdílná.

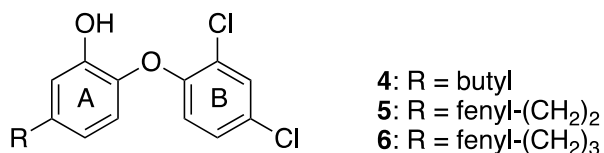


Obrázek 25 Neúčinnější karboxamidový analog **3**<sup>120</sup>

#### 5.1.1.2 Chlor-triklosanové deriváty

Freundlich s jeho skupinou<sup>121</sup> vycházeli z TRC obměněného v poloze 5 na A-kruhu (Obrázek 26). V této práci dospěli k závěru, že hydrofobní substituenty typu alkyl, fenylalkyl, cyklohexylmethyl či pyridylmethyl mají větší inhibiční vliv na InhA než ty hydrofilní jako -COOH, -CONH<sub>2</sub> či 2*H*-tetrazol-5-yl. Získané hodnoty byly srovnávány s TRC (InhA  $IC_{50}$  = 1100 nM a H37Rv MIC = 140  $\mu\text{M}$ ).

Inhibiční aktivita alkylových substituentů byla závislá na jejich délce, což pravděpodobně souvisí s interakčním rozsahem inhibitoru v enzymové kapse. S rozvětvením řetězce pak došlo k poklesu aktivit a naznačilo jistá sterická omezení vazebného místa. Tuto podobnou závislost délky alkylového řetězce na inhibiční aktivitě popsal i Sullivan.<sup>116</sup> Ve vzájemném srovnání vykazovaly chlor-TRC deriváty<sup>121</sup> oproti svým *des-chlor* protějškům<sup>116</sup> lepší *in vitro* aktivitu, která pravděpodobně souvisí se substitucí B-kruhu a jeho vlivu na vazbu mezi inhibitorem a enzymem. Z chlor-TRC alkylové řady dosahoval nejvyššího inhibičního účinku butylový derivát **4** (InhA  $IC_{50}$  = 55 nM; H37Rv MIC = 30  $\mu\text{M}$ ; Obrázek 26).



Obrázek 26 Chlor-TRC deriváty publikovány Freundlichovou skupinou <sup>121</sup>

V případě arylových/heteroarylových substituentů A-kruhu bylo zjištěno, že jejich přímé napojení bez spojovacího můstku vede ke ztrátě aktivity a nejspíše souvisí se sterickými interakcemi s Phe149. Nejvyššího inhibičního vlivu na InhA v této řadě dosahoval derivát s 2-fenylethylem **5** (InhA IC<sub>50</sub> = 21 nM; H37Rv MIC = 52 μM; Obrázek 26), ovšem jeho 3-fenylpropylový analog **6** (InhA IC<sub>50</sub> = 50 nM; H37Rv MIC = 13 μM; Obrázek 26) měl nižší MIC, což autoři zdůvodňují rozdílnými farmakokinetickými vlastnostmi.

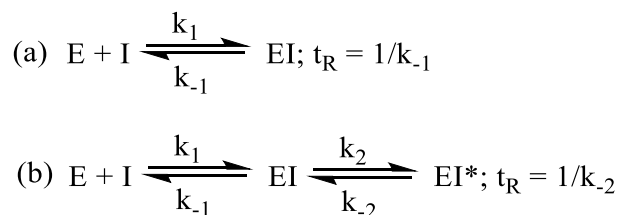
Tato tři analoga (**4**, **5** a **6**) byla účinná i vůči INH rezistentním kmenům *M. tuberculosis* (MIC ≥13 μM) s vyššími hodnotami MIC u kmenů s narušenou vazbou kofaktoru či nadprodukcí InhA. <sup>121</sup>

### 5.1.1.3 Vztah mezi substitucí B-kruhu a typem inhibice InhA

Podle nových studií je pro účinnost léčiva *in vivo* jedním z rozhodujících faktorů rezidenční čas (t<sub>R</sub>) neboli doba spojení inhibitoru s enzymem. Například INH je pomalu se vázající se inhibitor InhA s rezidenčním časem 62 min. Studie provedená na FabI z *Francisella tularensis* poukázala, že je t<sub>R</sub> dokonce lepším ukazatelem *in vivo* účinnosti nežli termodynamická afinita inhibitoru k enzymu. U zvířecího modelu nakaženého tularemii navíc nebyla zjištěna jakákoliv korelace mezi hodnotami K<sub>i</sub> (disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor), MIC či *in vivo* aktivitou. Na straně druhé byla zjištěna lineární korelace mezi t<sub>R</sub> a aktivitou *in vivo*. <sup>122</sup>

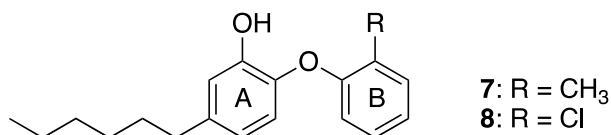
Aktivní jednotka InhA je homotetramerní struktura. Vazebná kapsa je chráněna za pomoci SBL (substrate-binding loop; aminokyselinové zbytky 196-219) a je delší oproti jiným enoyl-ACP reduktázám, čímž vytváří hlubší prostor pro vazbu se substrátem. SBL musí během interakce se substrátem přejít z otevřené do uzavřené konformace, jejíž stupeň uzavřenosti je závislý právě na strukturální povaze inhibitoru. Pomalu se vázající inhibitory vykazují delší t<sub>R</sub> s nižší disociací či asociací oproti rychle se vázajícím protějškům. Mechanismus navázání pomalu se vázajícího inhibitoru se skládá ze dvou kroků (Obrázek 27). První krok zahrnuje rychlou tvorbu počátečního otevřeného komplexu enzym-inhibitor (EI), následovaný

pomalejším druhým krokem konformační izomerizace vedoucího až ke konečnému uzavřenému komplexu enzym-inhibitor (EI\*).<sup>123, 124</sup>



Obrázek 27 Kinetické srovnání rychlého inhibitoru (a) a pomalu se vázajícího inhibitoru (b)

Luckner a kolektiv<sup>124</sup> na základě těchto údajů zkoumali závislost typu inhibice na interakcích mezi **1** (Obrázek 24) a **7** (Obrázek 28) s vazebnou kapsou enzymu InhA. Pomalu se vázající inhibitor **7** ( $K_i = 22$  pM;  $t_R = 24$  min) s methylovou skupinou na B-kruhu měl ve srovnání s rychlým protějškem **1** ( $K_i = 9,4$  nM;  $t_R = 0,1$  s) vyšší afinitu k enzymovému komplexu InhA-NAD<sup>+</sup>, která byla zdůvodněna právě vlivem tohoto methylové substituentu, jenž vytváří důležité van der Waalsovy interakce se třemi aminokyselinami SBL (Ala198, Met 199 a Ile202). Uspořádání SBL pokrývající vstup do vazebné kapsy tedy drží inhibitor v této dutině, čímž prodlužuje jeho  $t_R$ .



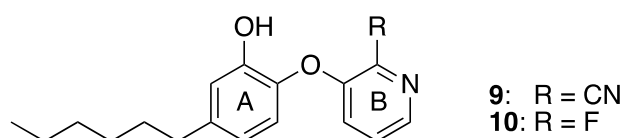
Obrázek 28 Inhibitory s různě substituovaným B-kruhem

Skupina okolo Pana<sup>125</sup> pokračovala v objasňování vlivu B-kruhu na typ inhibice InhA. Strukturně vycházeli z derivátu **1** a připravili řadu mono/disubstituovaných B-(hetero)kruhů. Práce potvrdila důležitost hydrofobních interakcí mezi B-*ortho*-substituentem a InhA. Žádná korelace mezi vazebnou afinitou a elektronegativitou substituentu ovšem pozorována nebyla, byl spíše patrný vliv velikosti substituentu. Preferovány byly malé skupiny (F, Cl, Br či CN), zatímco ty objemnější (I, CF<sub>3</sub>) a donory vodíkových vazeb (OH, NH<sub>2</sub>) působily v tomto ohledu nepříznivě se ztrátou pomalé inhibice.

Disubstituovaná (oba *ortho*, tj. 2, 6 pozice, nebo *ortho, para*, tj. 2, 4 pozice) analoga fenoxu B-kruhu nedosahovala vyšších inhibičních aktivit oproti svým monosubstituovaným

protějškům. Tento fakt byl zdůvodněn sterickými vlivy, omezenou rotací etherové vazby a nepříznivými van der Waalsovými interakcemi.<sup>125</sup>

Třetí série vycházející z heteroaromatického B-kruhu přinesla podobné SAR jako u mono/disubstituovaných fenoxu protějšků, ale zároveň i nižší MIC u svých nejúčinnějších pomalu se vážajících inhibitorů **9** a **10** (MIC = 0,313 µg/ml; Obrázek 29). 2-Substituovaný-pyridin-3-ylový kruh byl i přes podobné hydrofobní interakce na Ile202 a Met161 s 4-substituovaným-pyridin-3-ylovým cyklem preferovanější. Důvodem byla pravděpodobně tvorba vodíkových vazeb s amidovou skupinou Gly96.<sup>125</sup>



Obrázek 29 Nejúčinnější substituovaná B-kruh heteroaromatická analoga **9** a **10**<sup>125</sup>

Důležitost pomalu se vážajících inhibice byla podpořena v navazujících *in vivo* testech na myším modelu tuberkulózy. Dva pomalu se vážající *ortho*-monosubstituované inhibitory **7** a **8** (Obrázek 28) po intraperitoneálním podání snižovaly CFU (colony forming units; jednotky tvořící kolonie) ve slezině na hodnoty  $0,57 \pm 0,26$  (**7**) a  $0,69 \pm 0,22$  (**8**)  $\log_{10}$  v porovnání s neošetřenou kontrolní skupinou. Rychlý inhibitor **1** v těchto testech účinný nebyl a zároveň žádný z derivátů nepůsobil na plicní mykobakteriální ložiska infikovaných myší.<sup>125</sup>

Nevýhodnou nízkou rozpustnost ve vodě spojující první (**1**) i druhou generaci 2-fenoxyfenolů (**7** a **8**) se pokusil za pomoci metod farmaceutické technologie vyřešit Knudson s kolektivem.<sup>126</sup> Nejdříve neúspěšně podali deriváty **1** a **7** tuberkulózou infikovaným myším v dávce 300 mg/kg v 5 % ethanolu, nebo v 1 % dimethylsulfoxidu. Následně byla tato analoga za účelem lepší biodostupnosti a farmakokinetiky převedena do kosolventního (15 % ethanol, 20 % propylenglykol a 40 % polyethylenglykol) nebo samomikroemulgujícího systému (40 % Captex 200 P, 40 % Solutol HS15 a 20 % Capmul MCM NF) a opět podána infikovanému myšimu modelu. Kosolventně upravené deriváty **7** a **8** podávané jednou denně (200 mg/kg) neměly výrazný vliv na redukcii CFU v plicích a naopak významný vliv ve slezině, tj.  $0,99 \log_{10}$  pro **7** a  $1,47 \log_{10}$  pro **8**. Samomikroemulgující systém přinesl řadu farmakokinetických výhod, kdy po *in vivo* podání **1** došlo ke zlepšení několika parametrů v podobě vyššího AUC (area under curve; biodostupnost vyjádřena plochou pod koncentrační křivkou, která znázorňuje časový průběh koncentrace podaného léčiva v krevní plazmě) a s ním souvisejícího prodloužení

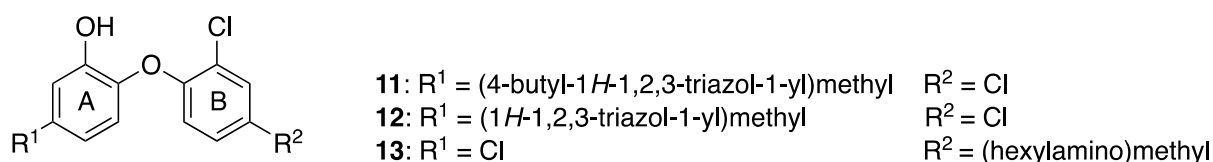


$T_{max}$  (čas maximální plazmatické koncentrace léčiva) a  $T_{1/2}$  (biologický poločas eliminace léčiva), což obecně přineslo zvýšenou biologickou dostupnost a expozici léčiva. Samomikroemulgující systém byl dále vyzkoušen v kombinovaném režimu léčby TB, kdy byly provedeny *in vitro* a *in vivo* studie analog **7** a **8** s rifampicinem. Jejich aditivní účinek redukce CFU se projevil zejména ve slezině, naopak v plicích byl nepatrný.<sup>126</sup>

#### 5.1.1.4 TRC pomalu se vázající inhibitory

V roce 2014 pokračoval Stec se svou skupinou v obměnách triklosanové struktury (Obrázek 30) v polohách 5 (A-kruh) a 4 (B-kruh) se substituenty typu triazol a isoxazol, morfolin, alkyl/arylamino-karbonyl, acyl či případně sekundární amin.<sup>127</sup>

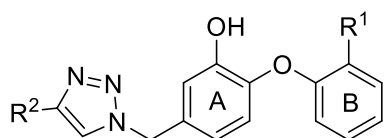
Nejúčinnějším derivátem byl 5-[(4-butyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol (**11**; Obrázek 30) s H37Rv MIC = 1,5  $\mu$ M (ve srovnání s TRC H37Rv MIC = 43  $\mu$ M). Odstraněním butylového řetězce (**12**; H37Rv MIC = 15  $\mu$ M; Obrázek 30) klesla 10x inhibiční účinnost a při jeho nahrazení fenylem došlo k úplné ztrátě aktivity, což naznačilo limity vazebné kapsy. Dalším poznatkem byla nezbytnost flexibilního spojovacího můstku (methylenový) mezi A-kruhem s jeho aromatickým substituentem v poloze 5 a naopak neaktivita derivátů s rigidní, polární amidovou vazbou bez tohoto spojovacího můstku. Důvodem jsou pravděpodobně opět sterické střety ve vazebné kapse enzymu. Řada substituentů v poloze 4 B-kruhu přinesla poněkud horší výsledky, kdy pouze analog **13** (MIC = 14  $\mu$ M; Obrázek 30) vykazoval zajímavější aktivitu.



Obrázek 30 Výchozí struktura pro deriváty **11**, **12** a **13**

Hodnocené deriváty mající zajímavou antimykobakteriální aktivitu (MIC  $\leq$ 45  $\mu$ M) bohužel sdílely vůči Vero buňkám nízký index selektivity (SI  $\leq$ 3,3). Tyto nejučinnější sloučeniny byly testovány proti rezistentním kmenům, kde opět dosahoval derivát **11** (MIC od 0,3 do >4,8  $\mu$ g/ml) nejlepších výsledků. Tento analog **11** byl podroben i *in vivo* studii při jednorázové perorální dávce 100 a 300 mg/kg (BALB/c myš). Úspěchu však dosaženo nebylo, což autoři přisuzují jeho velice nízké orální biodostupnosti spojené pravděpodobně s nízkou rozpustností ve vodě a rychlou 2. fází metabolizace.<sup>127</sup>

Celkovou efektivitu inhibitoru s  $t_R$  ovlivňuje substituce obou kruhů, tj. A- i B-kruhu. Zavedení objemné  $R^2$ -triazolové skupiny spolu s methylem  $R^1$  (Obrázek 31) vedlo k destabilizaci tranzitního stavu při SBL izomerizaci (tvorbě komplexu EI\*) se slabší celkovou vazbou, ovšem delším  $t_R$  na InhA. <sup>128</sup>



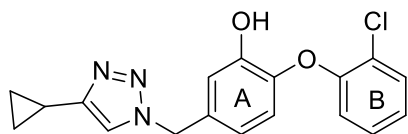
Obrázek 31 Výchozí triklosanový analog s prodlouženým tranzitním stavem

Tým vědců okolo Spagnuola se zabýval kinetickou charakterizací patnácti derivátů 5-( $R^2$ -triazolmethyl)-2-fenoxyfenolů (Obrázek 31) a pěti 5-hexyl-2-fenoxyfenolů (Obrázek 28). <sup>123</sup> Obecným rozdílem těchto dvou řad je rozsah jejich interakcí s aktivním místem. 5-Alkylové substituenty jsou součástí mnohočetných hydrofobních interakcí uvnitř enzymové kapsy, ale i přesto jsou interakce objemných 5-( $R^2$ -triazolmethylových) substituentů mnohem rozsáhlejší, různorodější a SBL konformaci více ovlivňující. Tyto vlastnosti se pak odrážejí v délce  $t_R$ , který je u 5-( $R^2$ -triazolmethylových) oproti 5-alkylovým derivátům mnohem delší, i když se k enzymu váží podobnou nebo dokonce menší afinitou. Delší rezidenční čas ( $t_R$ ) 5-( $R^2$ -triazolmethylových) analog je tedy výsledkem výrazně pomalejšího tranzitního stavu (~100-1000x pomalejší).

Přítomnost triazolmethylové části (A-kruh) přináší řadu výhod v podobě antimykobakteriální aktivity ( $MIC \leq 12,5 \mu\text{g/ml}$ ), metabolické stability,  $\pi$ - $\pi$  interakcí či snížené nežádoucí lipofility oproti 5-alkyl-2-fenoxyfenolům. Pro  $R^2$  substituci triazolového kruhu (Obrázek 31) není výhodný příliš dlouhý a objemný substituent, jelikož se pak kvůli sterickým vlivům ztrácejí klíčové interakce s enzymovou kapsou. Deriváty s CN skupinou na B-kruhu ( $R^1$ ; Obrázek 31) mají sníženou afinitu k InhA doprovázenou pomalejší rychlostí tranzitního stavu. Tato analoga dále postrádají výhodné hydrofobní interakce svých  $R^1$  protějšků (Cl a  $\text{CH}_3$ ), projevující se ovšem pouze mírnou až žádnou změnou  $t_R$  oproti  $\text{CH}_3$  ( $R^1$ ) se stejným A-kruhem ( $R^2$ ). Pro antimykobakteriální aktivitu je výhodná CN skupina B-kruhu ( $R^1$ ) v kombinaci s cykloalkylem/(brom)alkylem A-kruhu ( $R^2$ ) s hodnotami MIC v rozmezí 0,313 až 1,25  $\mu\text{g/ml}$ .

Analog **14** (Obrázek 32) dosáhl  $t_R$  na InhA  $220 \pm 49$  min, což bylo 3,5x více než adukt INH s NAD a zároveň měl nejnižší MIC (0,156  $\mu\text{g/ml}$ ) z celé této série. Autoři závěrem

konstatovali, že délka  $t_R$  komplexu inhibitor-enzym je spíše řízena interakcemi v tranzitním destabilizovaném stavu než v jeho konečném stabilizovaném (EI\*).<sup>123</sup>

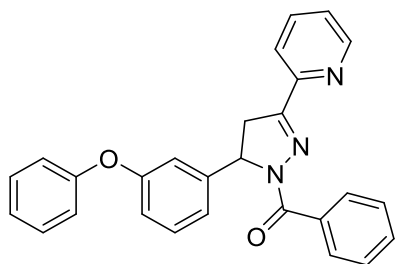


Obrázek 32 Analog 14

### 5.1.1.5 Triklosanové deriváty bez fenolické skupiny

Tato část vycházela z faktu, že právě etherový kyslík v difenyletherových sloučeninách je základním požadavkem pro inhibici InhA, jelikož je prioritní při tvorbě stabilního komplexu InhA-difenylether-NAD<sup>+</sup> a při jeho nahrazení atomem síry dochází ke ztrátě inhibiční aktivity.<sup>130</sup> Toto tvrzení je ovšem v rozporu s předchozí částí, která přisuzuje zásadní význam pro InhA inhibici fenolické skupině.<sup>102, 103</sup>

Kiniho skupina (2009)<sup>129</sup> připravila sérii deseti difenyletherů obměněných v polohách *ortho*, *meta* a *para* substitučními základy vycházejících z 1,2,4-triazolu, pyrazolinu, 1,2-isoxazolu či 1,3,4-oxadiazolu. Hodnoty H37Rv MIC těchto připravených derivátů byly od 2,4 do 3,7  $\mu\text{M}$ . Analog 15 (Obrázek 33) s navázaným pyrazolinovým cyklem byl nejúčinnější s MIC = 2,4  $\mu\text{M}$  vůči kmeni H37Rv. Potenciální mechanismus účinku těchto látek byl zkoumán za pomoci dokovacích a modelových studií,<sup>129</sup> avšak existují určité pochybnosti o správnosti výsledků. Dokovací studie byly totiž prováděny pouze za použití enoyl-ACP reduktázy *E. coli*, která není identická s enoyl-ACP reduktázou z *M. tuberculosis*. Například TRC je rychlý a reversibilní inhibitor *M. tuberculosis* s  $K_i = 0,2 \mu\text{M}$ , ale zároveň pomalý, pevně se vázající reversibilní inhibitor s  $K_i = 38 \text{ pM}$  u *E. coli*.<sup>102, 116, 124</sup>

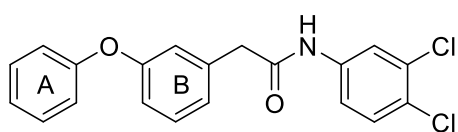


Obrázek 33 Nejúčinnější inhibitor 15<sup>129</sup>

Rozdílnost těchto dvou reduktáz byla potvrzena i jejich následnou rozšiřující studií (2010),<sup>130</sup> kde zjistili, že jsou deriváty *in vitro* prakticky neúčinné vůči enoyl-ACP reduktáze

z *E. coli*. Při jednotné koncentraci 100  $\mu\text{M}$  nevykazovalo sedm z deseti analog žádnou inhibiční aktivitu (tj. míra inhibice  $\leq 3\%$ ) a neúčinnější derivát, 5-(3-fenoxyfenyl)-3-fenylisoxazol, inhiboval enzym v rozsahu 27 %. Neaktivitu vůči reduktáze z *E. coli* autoři přisuzují nepřítomnosti 5-chlor skupině na triklosanovém A-kruhu, která je důležitá pro těsnou a pomalu se vázající inhibici enzymu. Autoři dále spekulují nad jiným mechanismem účinku jimi připravených derivátů oproti TRC. Závěrem nutno dodat, že z publikovaných dat není patrná žádná korelace mezi dokovacími skóre (2009)<sup>129</sup> a experimentálně doloženými hodnotami enzymové *in vitro* inhibice (2010).<sup>130</sup>

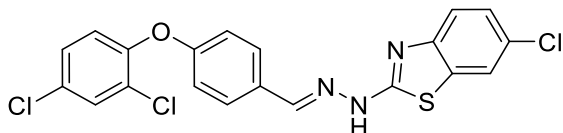
Yang se svým týmem připravil sérii *N*-aryl/arylalkyl-2-(3-fenoxyfenyl)acetamidů s hodnocením jejich *in vitro* antimykobakteriální aktivity proti kmeni H37Rv. MIC se pohybovaly od 4 do 64  $\mu\text{g/ml}$  s neúčinnějším derivátem **16** (Obrázek 34) a právě přítomnost *N*-(3,4-dichlorfenylového) substituentu se jevila jako významná pro inhibiční aktivitu. Deriváty s elektron-akceptorní (F, Br, CN, NO<sub>2</sub> a CF<sub>3</sub>) a elektron-donorovou (OCH<sub>3</sub>) skupinou na *N*-fenylu vykazovaly jen mírnou inhibiční aktivitu (MIC = 32-64  $\mu\text{g/ml}$ ). Halogenace fenoxu kruhu (A-kruh; Obrázek 34), případně jakákoliv změna délky methylenového můstku (tj. náhrada kyseliny octové za kratší: mravenčí či delší: propanová a butanová) zlepšení nepřinesla. Měření cytotoxicity byla provedena na HepG2 a všechny připravené deriváty sdílely nízkou toxicitu při jednotné koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Derivát **16** byl vyzkoušen *in vivo* na myším modelu *M. bovis* BCG (Bacille Calmette Guerin: oslabený živý kmen odvozený od *M. bovis*) infekce, kdy při perorálním podání (25 mg/kg jednou denně) vykazoval srovnatelnou redukci bakteriálního počtu v plicích a slezině stejně jako INH.<sup>131</sup>



Obrázek 34 Analog **16**<sup>131</sup>

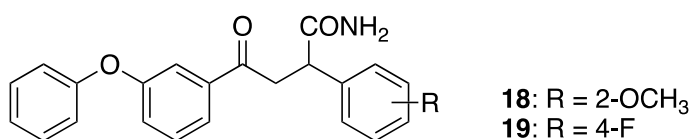
Telvekarova skupina nejdříve *in silico* navrhla a následně připravila řadu molekulárních hybridů sestávajících se ze dvou farmakoforů (benzothiazolu a difenyletheru) spojených prostřednictvím hydrazonového můstku. Připravené deriváty měly inhibiční aktivity vůči kmeni H37Rv v rozmezí 1,5-29,5  $\mu\text{g/ml}$  s neúčinnějším derivátem **17** (Obrázek 35). 6-Chlor substituce benzothiazolové části vedla obecně k vyšší inhibiční účinnosti následovaná jejím nesubstituovaným analogem. Naopak přítomnost CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub> skupiny v této pozici

(benzothiazol v poloze 6) inhibiční účinnost snižovala. V difenyletherové části v oblasti fenoxu kruhu pak byla nejpreferovanější 2,4-diCl substituce. Celkově byly MIC zde vytvořených sloučenin oproti jejich výchozím farmakoforům nižší, čímž byla potvrzena autorská myšlenka účinnějších hybridů. Bohužel v textu chybí kromě cytotoxicity i enzymová aktivita derivátů, ač byly jako InhA inhibitory prvotně *in silico* modelovány.<sup>132</sup>



Obrázek 35 Derivát 17

Kar a spol. v rámci jedné práce<sup>120</sup> (viz 5.1.1.1) publikovali i 4-oxo-4-(3-fenoxyfenyl)-2-fenylbutanamidy, tj. deriváty bez fenolické skupiny. Pouze dva z těchto připravených derivátů, **18** (R = 2-OCH<sub>3</sub>) a **19** (R = 4-F), (oba Obrázek 36), vykazovaly antimykobakteriální aktivitu při koncentraci 50 µg/ml, hodnoty MIC ostatních derivátů přesahovaly 100 µg/ml. Jak již bylo v textu zmíněno, chiralita připravených derivátů s ohledem na biologickou aktivitu komentovaná nebyla.

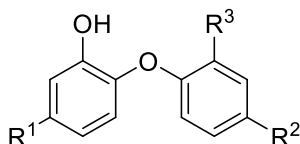


Obrázek 36 Analoga 18 a 19

### 5.1.1.6 *In silico* modelované triklosanové deriváty

V roce 2015 navrhla skupina okolo Owona *in silico* řadu inhibitorů enoyl-ACP reduktázy (z *M. tuberculosis* a *Plasmodium falciparum*) na bázi TRC derivátů. Vycházeli z připravené 3D knihovny patnácti InhA-TRC modelů s *in vitro* publikovanými výsledky. Z této série byl vytvořen QSAR model (kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou) pro design nových derivátů TRC a farmakoforní model na bázi ligandu (PH4) vycházející z nejúčinnějších derivátů této knihovny. PH4 model sloužil pro ověření strukturálních vlastností navržených derivátů s modelově doloženými farmakoforickými rysy nezbytnými pro InhA inhibici. Nejúčinnější *in silico* navržený derivát vykazoval InhA IC<sub>50</sub> = 7 nM [R<sup>1</sup> = (fenylamino)methyl, R<sup>2</sup> = fenyl, R<sup>3</sup> = ethyl; Obrázek 37]. V obecné rovině platí, že R<sup>1</sup> aromatický substituent propojený s 2-fenoxyfenolem krátkým alifatickým můstkem je výhodný, neboť vytváří příznivé

$\pi$ - $\pi$  interakce s Tyr158. Méně výhodná cyklohexylmethyllová R<sup>1</sup> substituce postrádá tyto  $\pi$ - $\pi$  interakce, ale zase dobře vyplňuje hydrofobní kapsu InhA (IC<sub>50</sub> = 24 nM). Pro R<sup>2</sup> substituci je preferována methylaminová, sulfanilmethyllová, isopropylová a zejména fenylová skupina, která poskytuje výhodné interakce s Phe97. V poloze R<sup>3</sup> se osvědčila přítomnost methyllové, ethylové či (di)methylaminové skupiny. Velkým nedostatkem této studie je ovšem absence biologického hodnocení. Veškeré získané inhibiční a SAR výsledky stojí pouze na *in silico* výpočtech.<sup>133</sup>



Obrázek 37 Výchozí struktura pro obměny<sup>133</sup>

#### 5.1.1.7 Závěrečný komentář

Triklosan je přímým inhibitorem mykobakteriální enoyl-ACP reduktázy bez předchozí aktivace KatG enzymem. InhA je klíčový enzym pro syntézu mykolových kyselin a jeho inhibice vede k narušení biosyntézy a lýze *Mycobacterium tuberculosis*.

Cílem tohoto review bylo shrnout nedávné pokroky ve vývoji TRC derivátů, jakožto potenciálních antimykobakteriálních struktur a je členěno do dvou částí: (1) fenoxifenoly s fenolickou skupinou na A-kruhu a (2) difenylethery bez fenolické skupiny.

(1) Studie s fenolickou skupinou na A-kruhu považující jí za klíčovou pro interakci s InhA jsou obsáhlejší a přinášejí podrobnější důkazy o antimykobakteriální aktivitě těchto derivátů, včetně několika *in vivo* hodnocení. Prozatím jsou deriváty obecně spojeny se zajímavou *in vitro* a nedostačující *in vivo* aktivitou. Autoři tento rozpor přisuzují špatné biodostupnosti a nepříznivé lipofilitě. Přímý vztah mezi enzymovou/buněčnou inhibicí a ClogP však zatím pozorován nebyl, naopak již byly připraveny účinné deriváty s hydrofilnějším i lipofilnějším charakterem ve srovnání s TRC. Obecně dle *in silico* a *in vitro* studií je pro A-kruh příznivý spíše hydrofobní substituent v poloze 5. Pro B-kruh jsou pak příznivé malé substituenty (např. Cl, CH<sub>3</sub> v *ortho* poloze) ovlivňující afinitu k enzymu a způsob inhibice, tedy pomalu se vážající inhibici. Tento způsob inhibice představuje poslední směr vývoje inhibitorů s lepší afinitou, delším t<sub>R</sub> a v několika případech i *in vivo* účinností.

(2) Publikace bez fenolické skupiny, považují za důležitý etherický kyslík, přináší výborné *in vitro* a jednou dokonce i *in vivo* výsledky. Někde ovšem vzbuzují mírné pochybnosti ohledně interpretovaných výsledků.

Celkovým problémem publikovaných triklosanových derivátů je jejich nesourodost a informační mezery, tj. některé studie publikují pouze enzymovou (InhA) inhibici, jiné zas pouze mykobakteriální inhibici a stejně tak v oblasti cytotoxicit, indexů selektivit atd. Budoucí vývoj problematiky by měl tedy kromě dalšího rozšíření chemické knihovny přinést i jistou shodu v publikovaných datech, aby byly získány kvalitnější podklady pro definování vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou. Dalším aspektem je pak optimalizace fyzikálně-chemických a farmakokinetických vlastností pro usnadnění *in vivo* působnosti.

## 5.1.2 Nepublikované triklosanové deriváty

V této části je popsána biologická aktivita 34 derivátů TRC založených na bázi esteru či (thio)karbamátu, které bývají díky své dobré hydrolyzovatelnosti s oblibou využívány pro tvorbu pro léčiv. U některých *O*-aromatických (thio)karbamátů byly dokonce popsány i jejich antimikrobní účinky, příkladem může být tolnaftát a tolciclát (oba thiokarbamáty).<sup>96, 134, 135</sup> Dalším důvodem tohoto typu obměny fenolické skupiny bylo ovlivnění lipofility s výhodnější biodostupností či absorpcí, nižší toxicitou a případně vyšší biologickou aktivitou. Připravené deriváty byly testovány *in vitro* vůči mykobakteriím, vybraným G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> kmenům bakterií, houbám, kvasinkám a dále byly provedeny zkoušky na cytotoxicitu.

### 5.1.2.1 Příprava esterových a (thio)karbamátových derivátů triklosanu

#### 5.1.2.1.1 Přímá acylace z chloridu kyseliny (Metoda A)

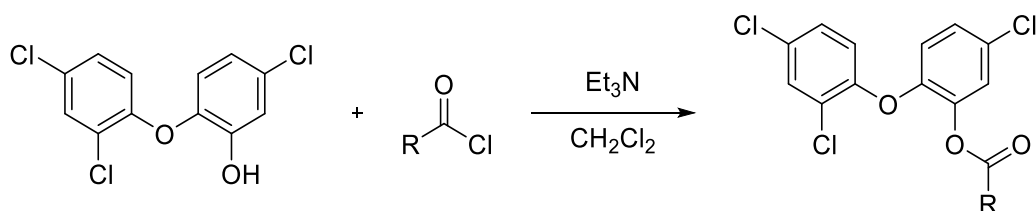


Schéma 1 Příprava triklosanových derivátů vycházející z chloridu kyseliny (Et<sub>3</sub>N = triethylamin; R = viz Chemická charakterizace připravených derivátů)

1 mmol Triklosanu a 1,5 ekvivalentu triethylaminu (Et<sub>3</sub>N) byly rozpuštěny v 5 ml dichlormethanu vysušeného CaCl<sub>2</sub>. Reakční směs se míchala 5 min za laboratorní teploty a poté bylo přidáno 1,3 ekvivalentu chloridu kyseliny. Reakce se ponechala míchat 2 hod do kompletní konverze na produkt (monitorováno pomocí TLC; soustava *n*-hexan/ethyl-acetát 4:1). Následně byla reakční směs odpařena do sucha, přidán ethyl-acetát, nerozpustný podíl (Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>Cl) byl odfiltrován, filtrát vytřepán s 10 % roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1M HCl, 5 % roztokem NaCl a vysušen stáním nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. V případě nečistot byla provedena sloupcová chromatografie za použití mobilní fáze hexan/acetone 12:1.

#### 5.1.2.1.2 Steglichova esterifikace vycházející z kyseliny (Metoda B)

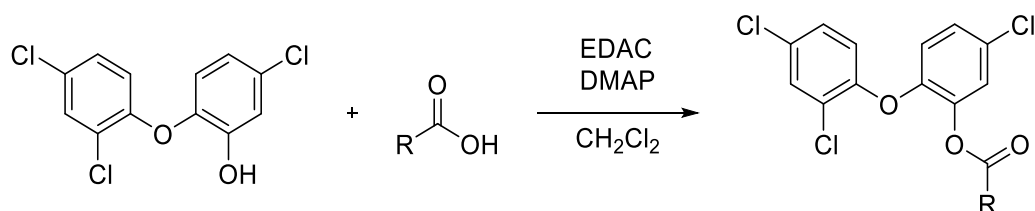


Schéma 2 Příprava triklosanových esterů za přítomnosti karbodiimidu (EDAC = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid; DMAP = 4-(dimethylamino)pyridin; R = viz Chemická charakterizace připravených derivátů)

1 mmol Kyseliny, 1 mmol triklosanu a 0,1 mmol 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP)\* byly rozpuštěny v 5 ml suchého CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, směs byla chlazená ledem na 0 °C, a pak byl najednou přidán 1,5 ekvivalentu 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDAC)/ 1,2 ekvivalentu DCC (*N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid) v případě přípravy analoga **23** (Schéma 3, b). Po 1 hodině bylo chlazení přerušeno a směs byla ponechána reagovat dalších 24 hod za laboratorní teploty. Monitorování reakce probíhalo za pomoci TLC, soustava *n*-hexan/ethyl-acetát 4:1. Reakční směs byla odpařena do sucha, byl přidán ethyl-acetát s následným vytřepáním 10 % roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M HCl, 5 % roztoku NaCl a vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. V případě nečistot byla provedena sloupcová chromatografie (hexan/acetone 12:1).

\* DMAP nebyl přidáván v případě reakce triklosanu s kyselinou propynovou (Schéma 3) při přípravě 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-propynoátu (**23**, viz b), jinak (i za přítomnosti jiných terciárních bází) probíhala nukleofilní adice<sup>136</sup> za vzniku 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-3-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenoxy]akrylátu (**45**, viz a).



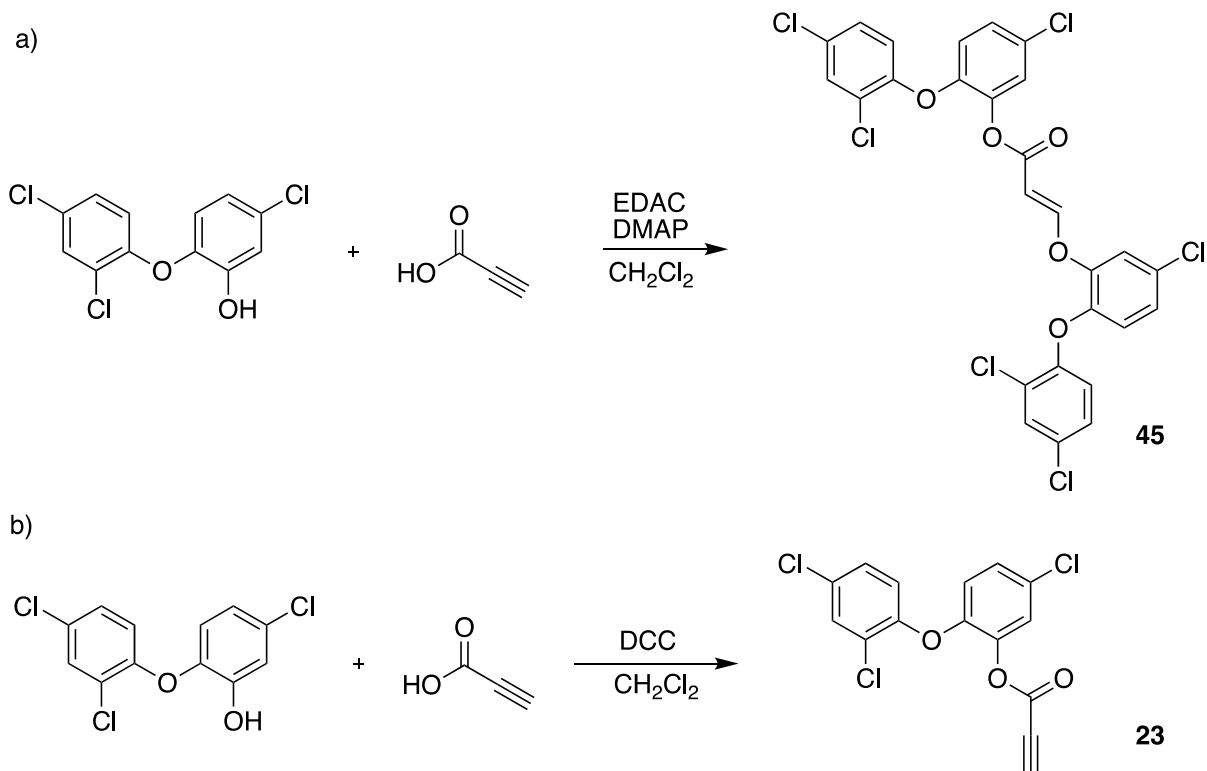


Schéma 3 Reakce triklosanu s kyselinou propynovou provedená v přítomnosti (a) a bez (b) přítomnosti terciární báze (EDAC = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid; DCC = *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid; DMAP = 4-(dimethylamino)pyridin)

### 5.1.2.2 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Tabulka 3 znázorňuje minimální inhibiční koncentrace vůči mykobakteriálním kmenům včetně atypických.

Tabulka 3 Minimální inhibiční koncentrace TRC derivátů vůči mykobakteriálním kmenům

Kód	Ester kyseliny (R)	MIC [ $\mu\text{M}$ ]										ClogP
		<i>M. tuberculosis</i> 331/88 (H37Rv)		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96			
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	
20	Octová	62,5	62,5	125	125	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5	4,83
21	Propionová	32	32	62,5	62,5	16	32	32	16	32	32	5,49
22	Propenová (Akrylová)	32	62,5	62,5	125	16	32	62,5	16	32	62,5	5,51
23	Propynová (Propiolová)	32	32	62,5	62,5	16	32	32	16	32	32	5,21
24	Hexanová	32	62,5	62,5	125	16	32	62,5	16	32	62,5	6,74

25	Palmitová	500	500	1000	1000	250	500	1000	500	500	500	10,91
26	Sorbová	32	32	62,5	62,5	16	32	32	16	32	32	6,40
27	Cyklopropankarboxylová	32	32	62,5	62,5	16	32	62,5	16	32	32	5,55
28	Undecylenová	32	62,5	125	125	32	62,5	62,5	32	32	62,5	8,55
29	Benzoová	32	32	62,5	62,5	16	32	32	16	32	32	6,73
30	4-CF <sub>3</sub> -Benzoová	32	32	<b>32</b>	<b>32</b>	16	32	32	16	16	32	7,65
31	4-Br-Benzoová	<b>16</b>	<b>32</b>	62,5	62,5	16	32	32	16	16	32	7,56
32	3-Br-Benzoová	32	32	62,5	62,5	16	32	32	16	32	32	7,56
33	2-Br-Benzoová	32	32	62,5	62,5	16	32	32	16	32	32	7,56
34	4-NO <sub>2</sub> -Benzoová	32	32	62,5	62,5	16	32	32	16	32	32	6,78
35	4-CHO-Benzoová	32	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5	16	32	32	6,48
36	4-CH <sub>3</sub> O-Benzoová	32	62,5	62,5	62,5	32	32	62,5	32	62,5	62,5	6,60
37	Acetylsalicyllová	32	32	<b>32</b>	62,5	16	32	32	16	16	32	6,31
38	Furan-2-karboxylová	32	62,5	62,5	62,5	16	32	32	<b>8</b>	16	32	5,34
39	Furan-3-karboxylová	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	16	32	32	<b>8</b>	16	16	5,29
40	5-Nitrofuran-2-karboxylová	32	32	<b>32</b>	<b>32</b>	16	32	32	<b>8</b>	16	16	5,84
41	Pyrazinkarboxylová	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	62,5	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	16	16	32	4,48
42	Nikotinová	32	32	<b>32</b>	<b>32</b>	16	32	32	<b>8</b>	16	16	5,39
43	Isonikotinová	32	32	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	16	5,39
44	Rhodanin-3-octová	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	62,5	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	16	16	32	4,90
45	T-T*	62,5	125	125	125	32	62,5	125	32	62,5	125	10,11
<b>(Thio)karbamát (R)</b>												
46	Dimethylkarbamát	500	1000	500	1000	125	500	1000	125	500	1000	4,97
47	Diethylkarbamát	>1000	>1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	5,65
48	Dimethylthiokarbamát	250	500	250	500	125	250	500	250	500	1000	5,96
49	Diethylthiokarbamát	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	6,64
50	Difenylkarbamát	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	8,30
51	Pyrrolidin-1-karboxylát	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	5,29
52	Piperidin-1-karboxylát	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	5,71
53	Morfolin-4-karboxylát	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	4,58
	<b>Triklosan</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>4,86</b>
	<b>INH</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>-0,64</b>
	<b>PAS</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>32</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>32</b>	<b>125</b>	<b>500</b>	<b>0,40</b>
	<b>EMB</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0,06</b>

\*3-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenoxy]akrylová kyselina

Z Tabulka 3 vyplývá, že estery kyselin (**20-45**) byly obecně účinnější než (thio)karbamáty (**46-53**). Některé estery se svými inhibičními hodnotami vůči testovaným kmenům přibližovaly či vyrovnaly standardu triklosanu, žádný ho ovšem nepřekonal. Naproti tomu inhibiční aktivity PAS byly estery většinou překonány. Vůči kmeni H37Rv se MIC **20-45** pohybovaly nejčastěji v rozmezí 16-62,5  $\mu\text{M}$  a nedosahovaly hodnot INH a EMB. Nejúčinnější deriváty byly odvozené od 4-brombenzoové (**31**), furan-3-karboxylové (**39**), pyrazinkarboxylové (**41**) a rhodanin-3-octové kyseliny (**44**). Naopak ester kyseliny palmitové (**25**) s inhibičními koncentracemi  $>250 \mu\text{M}$  proti všem testovaným kmenům byl v celé této **20-45** sérii nejméně účinným derivátem. Atypické kmeny *M. avium* (330/88) a *M. kansasii* (235/80) byly

připravenými **20-45** estery oproti INH obecně lépe inhibovány s koncentracemi nejčastěji mezi 8-62,5  $\mu\text{M}$ . *M. kansasii* (235/80) byl ve srovnání s *M. avium* (330/88) citlivějším kmenem. Kmen *M. kansasii* (6509/96) byl pak inhibován nejúčinnějšími deriváty **38, 39, 40, 42 a 43** v koncentracích podobných INH. V celkovém hodnocení **20-45** derivátů vykazovaly nejlepší inhibiční aktivity kyseliny s heterocyklickým kruhem (**38-44**). Mezi kyselinami s fenylovým kruhem (**29-37 a 45**) a alifatickým řetězcem (**20-28**) nebyl pozorován výrazný inhibiční rozdíl.

Hodnoty (thio)karbamátů (**46-53**) se v žádném měření nevyrovnaly a ani nepřiblížily hodnotám standardů v podobě TRC, INH a EMB. Nejnižší inhibiční koncentrace derivátů začínaly od 125  $\mu\text{M}$ .

### 5.1.2.3 Hodnocení antibakteriální aktivity

Příkladem problémových patogenů jsou například methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium* či multirezistentní G- bakterie jako *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>137</sup> Tabulka 4 reportuje výsledné inhibiční koncentrace vůči těmto vybraným bakteriální kmenům.

Tabulka 4 MIC esterových a (thio)karbamátových derivátů vůči vybraným kmenům bakterií

Kód	MIC [ $\mu\text{M}$ ]															
	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)		<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA; G+)		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (G+)		<i>Enterococcus sp.</i> (G+)		<i>Escherichia coli</i> (G-)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (G-)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ESBL; G-)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-)	
Ester	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	62,5	62,5	31,25	31,25	62,5	62,5	500	500	>500	>500
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	15,62	15,62	1,95	1,95	15,62	15,62	62,5	62,5	3,9	3,9	15,62	15,62	125	125	>125	>125
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
30	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
31	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

32	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
33	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
34	125	125	>125	>125	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
35	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
36	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
37	125	125	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
38	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>7,81</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	>500	>500
41	<b>1,95</b>	<b>3,9</b>	<b>1,95</b>	<b>7,81</b>	<b>1,95</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	>500	>500
42	<b>1,95</b>	<b>7,81</b>	<b>3,9</b>	<b>15,62</b>	<b>1,95</b>	<b>7,81</b>	>500	>500	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	>500	>500
43	<b>0,98</b>	<b>1,95</b>	<b>0,98</b>	<b>3,9</b>	<b>0,98</b>	<b>3,9</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	>500	>500
44	<b>0,98</b>	<b>1,95</b>	<b>0,98</b>	<b>3,9</b>	<b>0,98</b>	<b>3,9</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>125</b>	<b>15,62</b>	<b>125</b>	>250	>250
45	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>(Thio)karbamát</b>																
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	<b>3,9</b>	<b>3,9</b>	<b>3,9</b>	<b>15,62</b>	<b>3,9</b>	<b>7,81</b>	>500	>500	>500	>500	<b>125</b>	>500	<b>125</b>	>500	>500	>500
49	250	250	>500	>500	125	125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
50	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
51	62,5	62,5	125	125	62,5	62,5	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
52	125	>500	500	>500	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Triklosan</b>	<b>0,49</b>	<b>0,49</b>	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>	<b>7,81</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>1,98</b>	<b>1,98</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>	>500	>500
<b>Bacitracin</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

- nepodařilo se rozpustit v testovacím médiu

ESBL: Širokospektré  $\beta$ -laktamázy

MRSA: Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

Hodnocené deriváty (Tabulka 4) byly porovnávány se dvěma standardy: bacitracinem a vychozím triklosanem. V rámci tohoto srovnávání bylo v některých případech dosaženo podobných či lepších inhibičních koncentrací, zejména u esterových analog (20-45), která byla zároveň oproti (thio)karbamátovým 46-53 sloučeninám výrazně účinnější. Testováním bylo pokryto skoro celé spektrum bakterií kromě výjimky v podobě *Pseudomonas aeruginosa*, kde nebyl účinný žádný derivát a ani standard. Analoga karboxylových kyselin s heterocyklickým kruhem 5-nitrofurán-2-karboxylová (40), pyrazinkarboxylová (41), nikotinová (42), isonikotinová (43) a rhodanin-3-octová (44) společně s estery kyseliny propynové (23) a sorbové (26) byly nejúčinnějšími inhibitory a často se minimálně vyrovnaly svým standardům. Naopak estery aromatických kyselin (29-37) byly většinou bez aktivity. Zvláště zajímavých hodnot dosáhl 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-propynoát 23 proti stafylokokovým kmenům, včetně MRSA, s jednotnou inhibiční koncentrací 0,49  $\mu$ M, čímž několikanásobně překonal

bacitracin (MIC = 15,62-31,25  $\mu\text{M}$ ) i triklosan (MIC = 0,49-15,62  $\mu\text{M}$ ). V G- části překonal oba své standardy pouze 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-sorbát **26** u kmene *Escherichia coli* s MIC = 3,9  $\mu\text{M}$ , kde triklosan inhiboval v rozmezí 15,62-62,5  $\mu\text{M}$ .

(Thio)karbamáty **46-53** v těchto měření antibakteriální aktivitu spíše nevykazovaly. Výjimkou byl *O*-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]-dimethylthiokarbamat **48** vůči G+ stafylokokovým kmenům (včetně MRSA) s hodnotami od 3,9 do 15,62  $\mu\text{M}$ .

#### 5.1.2.4 Hodnocení antifungální aktivity

Rizika spojená s houbovými infekcemi a jejich rezistencemi jsou taktéž nezanedbatelným rizikem, spolu se socioekonomickým kontextem.<sup>138</sup> Proto jsme v rámci biologického hodnocení připravené deriváty testovali i vůči vybranému spektru hub, viz Tabulka 5.

Tabulka 5 MIC testovaných derivátů vůči vybraným fungálním patogenům

Kód	MIC [ $\mu\text{M}$ ]															
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Candida krusei</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Trichosporon asahii</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Absidia corymbifera</i>		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	
Ester	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	31,25	31,25	62,5	62,5	31,25	31,25	62,5	62,5	31,25	31,25	62,5	62,5	31,25	31,25	15,62	15,62
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
30	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	62,5	62,5
31	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	31,25	31,25
32	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	31,25	31,25
33	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	125
34	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
35	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	15,62	15,62
36	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	15,62	15,62

37	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	31,25	31,25	
38	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	15,62	15,62	
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	>500	>500	>500	>500	250	250	>500	>500	62,5	62,5	31,25	31,25	15,62	15,62	7,81	7,81	
41	250	250	125	125	>500	>500	250	250	31,25	31,25	62,5	62,5	15,62	15,62	7,81	7,81	
42	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	250	>500	>500	>500	>500	31,25	31,25	
43	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	31,25	31,25	
44	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	31,25	31,25	
45	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	250	
<b>(Thio)karbamát</b>																	
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	
49	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	
50	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	
51	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	
52	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	250	
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Triklosan</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>3,9</b>	<b>7,81</b>
<b>Flukonazol</b>	<b>0,24</b>	<b>0,24</b>	<b>&gt;500</b>	<b>&gt;500</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>&gt;500</b>	<b>&gt;500</b>	<b>&gt;500</b>	<b>&gt;500</b>	<b>7,81</b>	<b>125</b>	

- nepodařilo se rozpustit v testovacím médiu

Pro hodnocení antifungálních aktivit byly jako standardy vybrány flukonazol a triklosan. Esterové sloučeniny **20-45** i v tomto měření dosahovaly lepších inhibičních výsledků než (thio)karbamátové deriváty **46-53** (Tabulka 5). (Thio)karbamátové **46-53** sloučeniny dokonce v těchto testech nevykazovaly žádnou aktivitu (MIC >500 µM). V **20-28** části dosáhl nejlepšího výsledku 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-propynoát **23** při koncentracích 15,62-62,5 µM vůči celému testovanému spektru, čímž se podobal triklosanu (MIC = 3,9-62,5 µM) a předčil flukonazol (MIC = 0,24 až >500 µM). Byl to jediný účinný derivát z celé připravené série působící proti kvasinkám, žádný jiný derivát vůči těmto organismům zřetelnou aktivitu nevykazoval. Deriváty kyselin s heterocyklickou (**38 a 40-44**) a fenylovou (**30-32 a 35-37**) částí měly aktivitu zejména proti houbě *Trichophyton mentagrophytes*. Minimální inhibiční koncentrace esterů heterocyklických kyselin (**38-44**) začínaly od hodnoty 7,81 µM, konkrétně 5-nitrofurán-2-karboxylová (**40**) a pyrazinkarboxylová (**41**) kyselina, čímž se vyrovnaly triklosanu (MIC = 3,9-7,81 µM) a po 48 hodinách předčily flukonazol (MIC = 7,81-125 µM). Inhibičních koncentrací od 15,62 do 62,5 µM vůči *Trichophyton mentagrophytes* dosahovala analoga kyselin obsahujících benzenové jádro (**30-32 a 35-37**). Kromě analoga **23** působily podobně jako triklosan proti spektru testovaných hub bez kvasinek pouze chlor-2-(2,4-

dichlorfenoxy)fenyl-5-nitrofuran-2-karboxylát **40** a 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-pyrazin-2-karboxylát **41**, všechny tři s rozmezím MIC = 7,81-62,5  $\mu\text{M}$ , čímž překonaly flukonazol.

### 5.1.2.5 Hodnocení cytotoxicity

Nejúčinnějších dvacet derivátů (18 esterů, 1 thiokarbamát a 1 karbamát) bylo vybráno pro testování cytotoxicity na HepG2 buňkách neboli buněčné linii izolované z lidských buněk jaterního karcinomu. U hodnocených derivátů byl rovněž vypočítán index selektivity (SI =  $\text{IC}_{50}/\text{MIC}$  H37Rv po 21 dnech).

Tabulka 6 Přehled vybraných derivátů s jejich hodnotami  $\text{IC}_{50}$  a indexů selektivit

<b>Kód</b>	<b><math>\text{IC}_{50}</math></b>	<b>SI</b>
<b>Ester</b>	[ $\mu\text{M}$ ]	
<b>21</b>	19,78	0,62
<b>22</b>	7,89	0,13
<b>23</b>	1,66	0,05
<b>26</b>	28,42	0,89
<b>27</b>	34,45	1,08
<b>30</b>	61,88	1,93
<b>31</b>	109,60	<b>3,42</b>
<b>32</b>	63,62	1,99
<b>33</b>	62,18	1,94
<b>34</b>	24,25	0,76
<b>35</b>	22,46	0,70
<b>37</b>	73,78	2,31
<b>39</b>	48,45	1,51
<b>40</b>	21,95	0,69
<b>41</b>	9,74	0,30
<b>42</b>	31,21	0,98
<b>43</b>	22,11	0,69
<b>44</b>	25,84	0,81
<b>(Thio)karbamát</b>		
<b>48</b>	176,80	0,35
<b>51</b>	108,40	0,11
<b>Triklosan</b>	<b>10,63</b>	<b>0,33</b>

Získané výsledky (Tabulka 6) ukazují spíše cytotoxický charakter připravených látek. Hodnoty SI se zhruba pohybovaly okolo 1 s výjimkou 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-4-brombenzoátu (**31**; SI = 3,42). Obecně tak lze konstatovat, že jsou podobné své výchozí

struktūře triklosanu, který měl SI = 0,33. TRC bez ohledu na publikovanou literaturu a jeho relativní bezpečnost<sup>100, 110</sup> vykázal v těchto testech vyšší cytotoxické vlastnosti.

#### 5.1.2.6 Závěrečný komentář

Z celkového počtu 34 připravených derivátů (26 esterů, 6 karbamátů a 2 thiokarbamáty) měly vyšší inhibiční aktivitu estery (**20-45**) oproti (thio)karbamátům (**46-53**). Zajímavých výsledků dosahovaly převážně estery heterocyklických kyselin (**38-44**), z alifatických kyselin estery kyseliny propynové (**23**) a sorbové (**26**). Nutno dodat, že 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxi)fenyl-propynoát **23** vykazoval celkově vyšší aktivitu i v případech, kde ostatní nepůsobily (viz kvasinky) a lze ho považovat za nejúčinnější derivát z připravené série. Naopak deriváty (thio)karbamátové kyseliny neměly celkově výraznou biologickou aktivitu. Výjimkou byl pouze derivát *O*-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxi)fenyl]-dimethylthiokarbamát (**48**) vůči G+ stafylokokům, kde překonal i standard bacitracin. Hodnoty SI se přibližně rovnaly výchozímu TRC a sloučeniny byly cytotoxické.

#### 5.1.2.7 Chemická charakterizace připravených derivátů

##### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxi)fenyl-acetát<sup>139</sup> (**20**)

Žlutá kapalina; Metoda A; Výtěžek: 68 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3000, 1778, 1473, 1226, 1176; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.46 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.20-7.15 (m, 3H), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.27, 150.94, 146.70, 141.68, 130.37, 129.53, 129.20, 128.13, 126.96, 125.94, 124.40, 120.42, 120.09, 20.42; Anal. Calcd. pro C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (331.58): C, 50.71; H, 2.74. Nalezeno: C, 50.82; H, 2.44.

##### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxi)fenyl-propionát<sup>139</sup> (**21**)

Žlutá kapalina; Metoda B; Výtěžek: 59 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 2982, 2943, 1770, 1473, 1266, 1121, 807; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45 (d, *J* = 2.5, 1H), 7.20 (d, *J* = 2.5, 1H), 7.18-7.15 (m, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 2.50 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.17 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.83, 151.11, 146.54, 141.93, 130.35, 129.35, 128.09, 126.88, 125.72, 124.47, 120.37, 120.04, 116.57, 27.26, 8.93; Anal. Calcd. pro C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (345.61): C, 52.13; H, 3.21. Nalezeno: C, 52.33; H, 3.36.

##### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxi)fenyl-akrylát<sup>140, 141</sup> (**22**)

Bílá kapalina; Metoda B; Výtěžek: 59 %; Anal. Calcd. pro C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (343.59): C, 52.44; H, 2.64. Nalezeno: C, 52.32; H, 2.61. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

##### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxi)fenyl-propionát (**23**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 83.1-84.8 °C; Výtěžek: 42 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3255, 3095, 1727, 1489, 1267, 1198, 862, 753; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.48 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.09 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.30, 149.66, 146.85, 140.05, 130.55,



130.20, 128.92, 128.26, 127.74, 126.69, 123.93, 121.33, 119.31, 77.70, 73.40; Anal. Calcd. pro  $C_{15}H_7Cl_3O_3$  (341.57): C, 52.75; H, 2.07. Nalezeno: C, 52.82; H, 2.24.

#### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-hexanoát (24)

Žlutá kapalina; Metoda A; Výtěžek: 67 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 2958, 2872, 1770, 1488, 1266, 1099, 809;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.44 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.18-7.15 (m, 2H), 6.85 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 2.46 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.69-1.59 (m, 2H), 1.34-1.22 (m, 4H), 0.89-0.82 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.19, 151.09, 146.52, 141.95, 130.33, 129.35, 129.32, 128.08, 126.87, 125.69, 124.47, 120.34, 120.02, 33.80, 31.06, 24.44, 22.22, 13.80; Anal. Calcd. pro  $C_{18}H_{17}Cl_3O_3$  (387.68): C, 55.77; H, 4.42. Nalezeno: C, 55.60; H, 4.53.

#### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-palmitát (25)

Bezbarvá kapalina; Metoda B; Výtěžek: 72 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3096, 2939, 2864, 1727, 1490, 1290, 884;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.44 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.18-7.15 (m, 2H), 6.85 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 2.46 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.66-1.60 (m, 2H), 1.36-1.21 (m, 24H), 0.88 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.18, 151.08, 146.56, 141.96, 130.34, 129.35, 129.33, 128.09, 126.87, 125.76, 124.47, 120.30, 120.09, 33.86, 31.92, 29.69, 29.66, 29.65, 29.58, 29.50, 29.40, 29.35, 29.20, 29.12, 28.93, 24.78, 22.68, 14.15; Anal. Calcd. pro  $C_{28}H_{37}Cl_3O_3$  (527.95): C, 63.70; H, 7.06. Nalezeno: C, 63.90; H, 7.38.

#### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-sorbát (26)

Červená kapalina; Metoda A; Výtěžek: 74 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 2967, 1745, 1473, 1266, 1100, 809;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.42 (d,  $J = 2.5$ , 1H), 7.27 (s, 1H), 7.25 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.20-7.14 (m, 2H), 6.88 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.24-6.19 (m, 2H), 5.84 (d,  $J = 15.35$  Hz, 1H), 1.89 (d,  $J = 5.1$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  164.31, 151.26, 147.76, 146.70, 141.86, 141.45, 130.27, 129.59, 129.30, 129.22, 128.02, 126.75, 125.78, 124.62, 120.43, 120.18, 116.61, 21.02; Anal. Calcd. pro  $C_{18}H_{13}Cl_3O_3$  (383.65): C, 56.35; H, 3.42. Nalezeno: C, 56.44; H, 3.31.

#### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-cyklopropankarboxylát (27)

Bezbarvá kapalina; Metoda B; Výtěžek: 51 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 1756, 1473, 1266, 1126, 1094, 809;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.46 (d,  $J = 2.5$ , 1H), 7.22 (d,  $J = 2.5$ , 1H), 7.20-7.12 (m, 2H), 6.87 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 1.78-1.71 (m, 1H), 1.11-1.05 (m, 2H), 1.00-0.95 (m, 2H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  172.28, 151.19, 146.52, 141.92, 130.31, 129.37, 129.24, 128.03, 126.83, 125.68, 124.57, 120.51, 119.93, 12.60, 9.42 (2x); Anal. Calcd. pro  $C_{16}H_{11}Cl_3O_3$  (357.61): C, 53.74; H, 3.10. Nalezeno: C, 53.80; H, 3.22.

#### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-undec-10-enoát (28)

Bezbarvá kapalina; Metoda B; Výtěžek: 63 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 2962, 2854, 1769, 1488, 1266, 1101, 809;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.44 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.18-7.14 (m, 2H), 6.85 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 5.86-5.76 (m, 1H), 5.03-4.90 (m, 2H), 2.47 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.07-1.99 (m, 2H), 1.68-1.59 (m, 2H), 1.40-1.23 (m, 10H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.16, 151.07, 146.55, 141.94, 139.13, 130.34, 129.34, 129.32, 128.09, 126.87, 125.73, 124.46, 120.29, 120.08, 114.13, 33.83, 33.75, 29.21, 29.12, 29.02, 28.90, 28.87, 24.76; Anal. Calcd. pro  $C_{23}H_{25}Cl_3O_3$  (455.80): C, 60.61; H, 5.53. Nalezeno: C, 60.72; H, 5.65.

#### 5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-benzoát <sup>139</sup> (29)

Bílá krystalická látka; Metoda A; t. t. 63.5-65.2 °C; Výtěžek: 46 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3088, 2928, 1741, 1487, 1265, 1058, 711;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.09-8.01 (m, 2H), 7.67-7.58 (m, 1H), 7.51-7.42 (m, 2H), 7.35 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.22 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 6.93 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.90 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  164.01, 151.08, 146.80, 141.85, 133.88, 130.29, 130.22 (2x), 129.40, 129.29, 128.53 (2x), 128.39,

128.04, 127.02, 125.92, 124.63, 120.39, 120.36; Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{11}Cl_3O_3$  (393.64): C, 57.97; H, 2.82. Nalezeno: C, 57.87; H, 2.65.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-4-(trifluormethyl)benzoát (30)**

Bílá krystalická látka; Metoda A; t. t. 51-52.6 °C; Výtěžek: 60 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3078, 1744, 1475, 1103, 1080, 865;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.19 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.75 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.38-7.34 (m, 2H), 7.25 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.20 (dd,  $J = 8.8, 2.6$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  162.88, 150.81, 146.72, 141.40, 135.43, 131.65, 130.61, 130.59 (2x), 130.50, 129.70, 129.29, 128.13, 127.35, 126.05, 125.59 (2x), 124.41, 120.55, 120.16; Anal. Calcd. pro  $C_{20}H_{10}Cl_3F_3O_3$  (461.64): C, 52.04; H, 2.18. Nalezeno: C, 52.32; H, 2.30.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-4-brombenzoát (31)**

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 85.4-87.1 °C; Výtěžek: 61 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 2922, 1746, 1489, 1263, 1069, 862, 748;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.89 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.22 (dd,  $J = 8.8, 2.8$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 8.6, 2.5$  Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.90 (s, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163.34, 150.98, 146.71, 141.62, 131.95 (2x), 131.65 (2x), 130.36, 129.53, 129.30, 129.27, 128.08, 127.32, 127.21, 125.94, 124.52, 120.39, 120.35; Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{10}BrCl_2O_3$  (472.54): C, 48.29; H, 2.13. Nalezeno: C, 48.44; H, 2.20.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-3-brombenzoát (32)**

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 56.5-58 °C; Výtěžek: 65 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3091, 1740, 1471, 1241, 1058, 739;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.13 (t,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 7.98 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.76-7.73 (m, 1H), 7.38-7.32 (m, 3H), 7.22 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J = 8.7, 2.5$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  162.72, 150.99, 146.69, 141.53, 136.86, 133.10, 130.42, 130.31, 130.11, 129.61, 129.36, 128.78, 128.12, 127.28, 125.97, 124.50, 122.62, 120.39, 120.37; Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{10}BrCl_2O_3$  (472.54): C, 48.29; H, 2.13. Nalezeno: C, 48.13; H, 2.21.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-2-brombenzoát (33)**

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 66.3-68.2 °C; Výtěžek: 60 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3091, 1752, 1471, 1290, 1021, 752;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.91-7.86 (m, 1H), 7.72-7.68 (m, 1H), 7.41-7.35 (m, 4H), 7.22 (dd,  $J = 8.9, 2.5$  Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J = 8.7, 2.5$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.88 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163.15, 150.89, 146.74, 141.49, 134.66, 133.47, 131.97, 130.35, 130.06, 129.57, 129.25, 128.17, 127.26, 127.24, 126.03, 124.48, 122.56, 120.53, 120.05; Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{10}BrCl_2O_3$  (472.54): C, 48.29; H, 2.13. Nalezeno: C, 48.30; H, 2.26.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-4-nitrobenzoát (34)**

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 175.8-177.6 °C; Výtěžek: 43 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3111, 3080, 1742, 1491, 1259, 1083, 805, 713;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.33 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 8.25 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.38-7.35 (m, 2H), 7.26 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  162.23, 151.02, 150.69, 146.63, 141.19, 133.77, 131.35 (2x), 130.44, 129.84, 129.34, 128.18, 127.54, 126.07, 124.29, 123.68 (2x), 120.59, 120.12; Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{10}Cl_2NO_5$  (438.64): C, 52.03; H, 2.30; N, 3.19. Nalezeno: C, 52.18; H, 2.41; N, 3.27.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-4-formylbenzoát (35)**

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 112.5-114.1 °C; Výtěžek: 39 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 2926, 2853, 1748, 1473, 1264, 1060, 715;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  10.14 (s, 1H), 8.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.99 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.37 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.25 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  191.38, 163.06, 150.88, 146.69, 141.47, 139.75, 133.31, 130.82, 130.70 (2x), 130.39,

129.67, 129.56 (2x), 128.14, 127.36, 126.02, 124.43, 120.49, 120.27; Anal. Calcd. pro  $C_{20}H_{11}Cl_3O_4$  (421.65): C, 56.97; H, 2.63. Nalezeno: C, 56.80; H, 2.75.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-4-methoxybenzoát (36)**

Bílá kapalina; Metoda A; Výtěžek: 61 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 2840, 1737, 1472, 1253, 1056, 787;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.99 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.22 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 6.98-6.90 (m, 4H), 3.89 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  164.15, 163.70, 151.30, 146.81, 141.11, 132.41 (2x), 130.27, 129.38, 129.23, 128.02, 126.87, 125.80, 124.80, 120.66, 120.58, 120.20, 113.83 (2x), 55.53; Anal. Calcd. pro  $C_{20}H_{13}Cl_3O_4$  (423.67): C, 56.70; H, 3.09. Nalezeno: C, 56.82; H, 3.19.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-2-acetyloxybenzoát (37)**

Červená kapalina; Metoda B; Výtěžek: 70 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 1749, 1488, 1265, 1192, 1036, 752;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.02 (dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, 1H), 7.65-7.59 (m, 1H), 7.38-7.12 (m, 6H), 6.91 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 2.28 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.16, 169.42, 161.67, 151.26, 150.86, 146.87, 141.31, 134.87, 134.54, 132.20, 130.37, 129.63, 129.18, 128.08, 127.18, 126.12, 124.28, 121.55, 120.72, 119.97, 20.91; Anal. Calcd. pro  $C_{21}H_{13}Cl_3O_5$  (451.68): C, 55.84; H, 2.90. Nalezeno: C, 55.93; H, 2.87.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-furan-2-karboxylát (38)**

Bílá kapalina; Metoda B; Výtěžek: 66 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3141, 1745, 1471, 1292, 1266, 1084, 763;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.66-7.64 (m, 1H), 7.38 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.29-7.25 (m, 1H), 7.20 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J = 8.8, 2.6$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.56 (dd,  $J = 3.5, 1.7$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  155.62, 150.86, 147.58, 146.99, 142.91, 140.89, 130.27, 129.63, 129.12, 128.14, 127.23, 126.17, 124.48, 120.83, 120.13, 120.01, 112.23; Anal. Calcd. pro  $C_{17}H_9Cl_3O_4$  (383.61): C, 53.23; H, 2.36. Nalezeno: C, 53.46; H, 2.38.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-furan-3-karboxylát (39)**

Žlutá kapalina; Metoda A; Výtěžek: 58 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3151, 1750, 1488, 1266, 1159, 1100, 958, 873, 749;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.07-8.06 (m, 1H), 7.47-7.45 (m, 1H), 7.38 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.20 (dd,  $J = 8.7, 2.5$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 8.9, 2.5$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.88 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.75 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  160.08, 151.08, 148.97, 146.79, 144.09, 141.32, 130.31, 129.45, 129.31, 128.07, 127.08, 126.48, 125.92, 124.62, 120.35, 117.71, 109.93; Anal. Calcd. pro  $C_{17}H_9Cl_3O_4$  (383.61): C, 53.23; H, 2.36. Nalezeno: C, 53.39; H, 2.45.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-5-nitrofurán-2-karboxylát (40)**

Červená kapalina; Metoda B; Výtěžek: 42 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3138, 2923, 2851, 1756, 1473, 1265, 1182, 1101, 812, 750;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.43-7.37 (m, 3H), 7.32 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.26-7.18 (m, 2H), 6.96 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  154.07, 152.96, 150.28, 146.83, 143.04, 140.02, 130.46, 130.23, 129.04, 128.33, 127.87, 126.49, 124.00, 121.29, 120.67, 119.49, 111.46; Anal. Calcd. pro  $C_{17}H_8Cl_3NO_6$  (428.60): C, 47.64; H, 1.88; N, 3.27. Nalezeno: C, 47.76; H, 2.01; N, 3.43.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-pyrazin-2-karboxylát (41)**

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 69-70.5 °C; Výtěžek: 30 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3067, 1752, 1492, 1279, 1116, 827;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.38 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 8.84 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.79 (dd,  $J = 2.4, 1.5$  Hz, 1H), 7.40-7.36 (m, 2H), 7.24 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.19 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  161.41, 150.47, 148.35, 146.95, 146.82, 144.69, 142.10, 140.96, 130.39, 130.04, 129.10, 128.26, 127.61, 126.47,

124.15, 121.26, 119.53; Anal. Calcd. pro  $C_{17}H_9Cl_3N_2O_3$  (395.62): C, 51.61; H, 2.29; N, 7.08. Nalezeno: C, 51.80; H, 2.41; N, 7.19.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-nikotinát <sup>142</sup> (42)**

Bílá kapalina; Metoda A; Výtěžek 53 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3089, 1753, 1473, 1266, 1082, 732. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-isonikotinát (43)**

Bílá kapalina; Metoda A; t. t. 63.4-65.1 °C; Výtěžek: 49 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3042, 3010, 1750, 1486, 1263, 800;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.82 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 7.86 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.24 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J = 8.9, 2.5$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  162.67, 150.74 (2x), 146.66, 141.12, 135.69, 130.57, 130.45, 129.83, 129.26, 128.15, 127.50, 126.12, 124.24, 123.13 (2x), 120.34, 120.05; Anal. Calcd. pro  $C_{18}H_{10}Cl_3NO_3$  (394.63): C, 54.78; H, 2.55; N, 3.55. Nalezeno: C, 54.91; H, 2.40; N, 3.75.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetát (44)**

Žlutá krystalická látka; Metoda B; t. t. 144.6-145.7 °C; Výtěžek: 70 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3058, 2982, 2942, 1741, 1487, 1328, 1188, 812;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.49 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.26 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.22-7.17 (m, 2H), 6.85 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.81 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.07 (s, 2H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  199.79, 172.64, 163.63, 150.60, 146.44, 140.85, 130.54, 129.83, 129.10, 128.18, 127.52, 126.20, 124.05, 120.59, 119.80, 44.44, 35.63; Anal. Calcd. pro  $C_{17}H_{10}Cl_3NO_4S_2$  (462.74): C, 44.13; H, 2.18; N, 3.03. Nalezeno: C, 44.35; H, 2.26; N, 3.18.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-3-(5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenoxy)akrylát (45)**

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 92.4-94.1 °C; Výtěžek: 34 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3090, 2924, 2852, 1727, 1652, 1488, 1269, 1117, 1089, 825;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.77 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 7.47 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.42 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.24 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.22-7.15 (m, 5H), 6.89-6.82 (m, 4H), 5.56 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163.83, 161.10, 151.11, 150.25, 146.80, 145.63, 145.60, 141.55, 130.73, 130.34, 130.03, 129.63, 129.44, 129.26, 118.17, 128.12, 126.91, 126.68, 126.22, 125.89, 124.62, 121.51, 120.50, 120.38, 120.26, 120.23, 100.79; Anal. Calcd. pro  $C_{27}H_{14}Cl_6O_5$  (631.10): C, 51.39; H, 2.24. Nalezeno: C, 51.61; H, 2.11.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-dimethylkarbamát (46)**

Bezbarvá kapalina; Metoda A; Výtěžek: 36 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 1733, 1458, 1381, 1155, 749;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.45 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J = 8.7, 2.5$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 2.92 (s, 3H), 2.89 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  153.33, 151.68, 146.40, 142.89, 130.10, 129.61, 128.77, 127.96, 126.37, 125.14, 124.99, 121.08, 119.44, 36.77, 36.28; Anal. Calcd. pro  $C_{15}H_{12}Cl_3NO_3$  (360.62): C, 49.96; H, 3.35; N, 3.88. Nalezeno: C, 50.13; H, 3.46; N, 3.76.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-diethylkarbamát (47)**

Žlutá kapalina; Metoda A; Výtěžek: 28 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 2975, 2931, 1726, 1473, 1267, 1150, 1100, 750;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.43 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J = 8.8, 2.6$  Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 3.31-3.23 (m, 4H), 1.14-1.06 (m, 6H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  152.76, 151.65, 146.26, 143.11, 130.65, 130.11, 129.65, 128.62, 127.93, 126.24, 124.98, 121.06, 119.09, 42.45, 42.01, 13.84, 13.10; Anal. Calcd. pro  $C_{17}H_{16}Cl_3NO_3$  (388.67): C, 52.53; H, 4.15; N, 3.60. Nalezeno: C, 52.47; H, 4.24; N, 3.75.

**O-[5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]-dimethylthiokarbamát (48)**

Bílá kapalina; Metoda A; Výtěžek: 36 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 2931, 1733, 1539, 1472, 1266, 1115, 1100, 864, 798; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.44 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.20 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 186.40, 151.08, 147.11, 144.63, 130.13, 129.33, 128.95, 128.08, 126.90, 125.81, 125.67, 120.75, 120.03, 43.42, 38.65; Anal. Calcd. pro C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S (376.68): C, 47.83; H, 3.21; N, 3.72. Nalezeno: C, 47.76; H, 3.18; N, 3.50.

**O-[5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]-diethylthiokarbamát (49)**

Bílá krystalická látka; Metoda A; t. t. 80.5-82.3 °C; Výtěžek: 40 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 1749, 1684, 1576, 1570, 1521, 1473, 1096, 669; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.43 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.86-3.78 (m, 2H), 3.62-3.55 (m, 2H), 1.28-1.19 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 185.50, 150.97, 147.11, 144.67, 130.11, 129.21, 128.91, 128.04, 126.77, 125.72, 125.67, 120.57, 119.90, 48.54, 44.37, 13.17, 11.51; Anal. Calcd. pro C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S (404.73): C, 50.45; H, 3.98; N, 3.46. Nalezeno: C, 50.60; H, 3.87; N, 3.39.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-difenylkarbamát (50)**

Zelená kapalina; Metoda A; Výtěžek: 63 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 1735, 1489, 1473, 1339, 1267, 1031, 756, 696; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.47 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.33-7.19 (m, 11H), 7.17 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.79, 151.40, 146.16, 142.56 (2x), 130.73, 130.27, 129.63 (4x), 129.01, 128.88, 128.03, 126.77 (5x), 125.11, 124.76, 120.87 (3x), 119.22; Anal. Calcd. pro C<sub>25</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> (484.76): C, 61.94; H, 3.33; N, 2.89. Nalezeno: C, 61.83; H, 3.40; N, 2.71.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-pyrrolidin-1-karboxylát (51)**

Bílá krystalická látka; Metoda A; t. t. 99.8-101.6 °C; Výtěžek: 29 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3099, 2981, 2877, 1729, 1487, 1386, 1266, 1048, 838, 746; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.43 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.40-3.34 (m, 2H), 3.31-3.25 (m, 2H), 1.92-1.81 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.76, 151.52, 146.28, 142.87, 130.01, 129.70, 128.60, 127.93, 126.31, 125.07, 124.93, 121.30, 119.24, 46.52, 46.19, 25.66, 24.86; Anal. Calcd. pro C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> (386.65): C, 52.81; H, 3.65; N, 3.62. Nalezeno: C, 52.93; H, 3.64; N, 3.71.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-piperidin-1-karboxylát (52)**

Bílá krystalická látka; Metoda A; t. t. 74.2-76 °C; Výtěžek: 33 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 2922, 2857, 1730, 1471, 1285, 809; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.44 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.42-3.34 (m, 4H), 1.61-1.43 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 152.09, 151.79, 146.15, 143.09, 130.10, 129.76, 128.53, 127.91, 126.31, 125.07, 124.82, 121.33, 118.97, 45.55, 45.30, 25.55, 25.35, 24.12; Anal. Calcd. pro C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> (400.68): C, 53.96; H, 4.03; N, 3.50. Nalezeno: C, 53.93; H, 4.34; N, 3.66.

**5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-morfolin-4-karboxylát (53)**

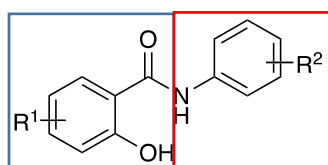
Bílá krystalická látka; Metoda A; t. t. 116.1-118.9 °C; Výtěžek: 38 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 2990, 2916, 2860, 1733, 1489, 1216, 1054, 883, 815; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.46 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.75-3.41 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 152.10, 151.61, 146.16, 142.63, 130.23, 129.82, 128.84, 128.01, 126.69, 124.97, 124.92, 121.28, 119.13, 66.46, 66.20, 48.82, 46.55; Anal. Calcd. pro C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>4</sub> (402.65): C, 50.71; H, 3.50; N, 3.48. Nalezeno: C, 50.62; H, 3.33; N, 3.29.

## 5.2 Salicylanilidové deriváty

Tato kapitola zabývající se tematikou salicylanilidů obsahuje komentáře ke dvěma publikacím a je dále doplněna o doposud nepublikované výsledky. Antimykobakteriální aktivitu ve vztahu k substituci halogeny na salicylovém kruhu řeší první publikace. Druhá pak pojednává o aktivitě salicylanilidů v konjugaci s peptidovým nosičem jakožto DDS (drug delivery system) systémem za účelem lepšího cílení a efektivnější penetrace do mykobakteriálně infikovaných monocytů. Nepublikovaná část se zabývá potenciálem zdvojených léčiv neboli mutual prodrugs, kdy jsou salicylanilidy esterifikovány dvěma výchozími kyselinami antituberkulotik první linie: isonikotinovou a pyrazinkarboxylovou.

### 5.2.1 Článek 2 „Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity“

Záměrem této práce bylo srovnávání antimykobakteriálních aktivit dihalogenovaných (Cl nebo Br) salicylanilidů s jejich monosubstituovanými protějšky na salicylovém kruhu. Konkrétně se jednalo o polohy 4 nebo 5 na salicylové části molekuly (Obrázek 38) při následující anilidové substituci: 4-Br, 3,4-diCl, 4-CF<sub>3</sub>, 3,5-diCF<sub>3</sub>. Z hlediska SAR je přítomnost slabě elektron-akceptorního substituentu pro antimykobakteriální aktivitu výhodná s potenciálem velmi nízkých hodnot MIC  $\leq 1 \mu\text{M}$ .<sup>81</sup> Jejím nahrazením silnou elektron-akceptorní skupinou NO<sub>2</sub> pak dochází ke snížení inhibičních aktivit. Ovšem při umístění NO<sub>2</sub> skupiny v poloze 4 salicylového kruhu je pokles inhibice mírnější (H37Rv MIC = 2-32  $\mu\text{M}$ ).<sup>143</sup> Cílem této práce bylo studium vlivu mono/dihalogenové substituce salicylového kruhu na antimykobakteriální aktivitu salicylanilidů včetně kmenů rezistentních.

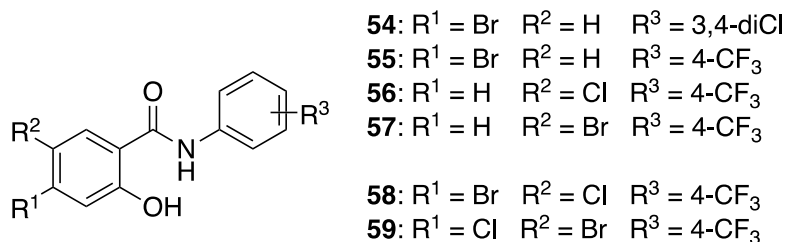


Obrázek 38 Obecná struktura salicylanilidu složená ze salicylové (modrá) a anilidové (červená) části

### 5.2.1.1 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Při monohalogenové substituci salicylového kruhu se pohybovaly hodnoty MIC vůči kmeni H37Rv v rozsahu 1-16  $\mu\text{M}$ . Při totožné poloze v salicylové a identické anilidové části byly brom deriváty oproti svým chlorovaným protějškům účinnější, což může být dáno jejich vyšší lipofilitou (ClogP). V anilidové části se ukázala nejvýhodnější  $\text{CF}_3$  skupina v poloze 4. Nejúčinnějšími monohalogenovými deriváty (Obrázek 39) z této série byly 5-brom-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (**57**), 4-brom-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-hydroxybenzamid (**54**) a 4-brom-2-hydroxy-*N*-[(4-(trifluormethyl)fenyl)]benzamid (**55**) s podobnými hodnotami H37Rv MIC (1-2  $\mu\text{M}$ ) jako u INH (H37Rv MIC = 0,5-1  $\mu\text{M}$ ). Inhibice netuberkulózních kmenů byla rovněž vysoká, ovšem s širším rozpětím hodnot MIC. Zejména u kmene *M. avium* s rozsahem 1-32  $\mu\text{M}$ , kde byl nejúčinnější analog **57**. Inhibiční hodnoty pro kmeny *M. kansasii* byly podobné. Derivát **56** měl ovšem u kmene 235/80 MIC 1  $\mu\text{M}$ , čehož u kmene 6509/96 nedosáhl žádný analog. Inhibiční koncentrace zbylých testovaných sloučenin pro oba tyto kmeny se pohybovaly podobně v rozmezí 2 až 16  $\mu\text{M}$ . Léčivo druhé linie PAS bylo ve srovnání s testovanými deriváty u všech kmenů výrazně méně účinné (MIC = 32 až >1000  $\mu\text{M}$ ).

Zavedením druhého halogenu na salicylovou část se u kmene H37Rv projevilo oproti monosubstituci celkovým zúžením inhibičních koncentrací v rozmezí MIC = 1-4  $\mu\text{M}$ . Disubstituce tedy přinesla podobné inhibiční koncentrace bez závislosti na ClogP (vlivem druhého Br/Cl došlo k jeho zvýšení). Přítomnost 4- $\text{CF}_3$  substituentu na anilidové části se i zde ukázala tou nejvýhodnější. Nejúčinnějšími analogy vůči kmeni H37Rv byly 4-brom-5-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (**58**) a 5-brom-4-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (**59**), oba s MIC = 1-2  $\mu\text{M}$ . Inhibiční hodnoty u *M. avium* přinesly oproti monohalogenovaným protějškům zvýšení MIC (16-62,5  $\mu\text{M}$ ). Inhibice obou kmenů *M. kansasii* pak byla podobná s rozmezím MIC 4-16  $\mu\text{M}$ .



Obrázek 39 Nejúčinnější připravené salicylanilidové deriváty s mono- a dihalogenovou substitucí v salicylové části

### 5.2.1.2 Hodnocení antimykobakteriální aktivity proti lékově-rezistentním kmenům

Nejperspektivnější deriváty z obou skupin (s 4-CF<sub>3</sub> substituentem na anilidové části) byly dále testovány vůči rezistentním kmenům (pět MDR-TB: 234/2005, 9449/2007, 242/2015, Praha 1 a Praha 4; jeden XDR-TB: Praha 131). Jejich inhibiční koncentrace byly v rozmezí MIC = 0,5-4 μM bez výraznějšího vlivu substituce salicylové části na aktivitu. Nejefektivnějším inhibitorem vůči všem šesti vystaveným rezistentním kmenům byl 5-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (**56**) s MIC = 0,5 μM.

### 5.2.1.3 Hodnocení cytotoxicity

Toto hodnocení na HepG2 buňkách spolu s výpočtem SI obecně odhalilo toxické vlastnosti testovaných derivátů. Cytotoxicita je zřejmě spojena i s přítomností volné fenolické skupiny, která je bohužel zároveň i nositelem biologické aktivity těchto sloučenin. Obecně dihalogenová substituce salicylového kruhu přinesla mírně příznivější hodnoty SI v rozmezí 1,27-6,21, přítomnost dvou CF<sub>3</sub> skupin na anilidovém kruhu v této sérii však pokaždé vedla k vyšší toxicitě při hodnotách H37Rv MIC = 2-4 μM. Nejlepších hodnot SI ovšem dosáhla analoga s halogenovou monosubstitucí na salicylovém kruhu **54** a **55** s 8,84 a 7,52.

### 5.2.1.4 Závěrečný komentář

Celkově bylo připraveno a antimykobakteriálně hodnoceno 32 salicylanilidových derivátů s mono- a dihalogenovanou (Cl či Br) substitucí v salicylovém kruhu. Srovnání inhibičních aktivit těchto dvou sérií nepřineslo patrnější rozdíl. Ten byl spíše pozorován v jejich celkovém rozmezí MIC a byl ve prospěch dihalogenované série („mono-série“: H37Rv MIC = 1-16 μM a „di-série“: H37Rv MIC = 1-4 μM). Dle tohoto užšího rozsahu lze tedy považovat přidání druhé slabé elektron-akceptorní skupiny na salicylové jádro za výhodnější. Vybrané salicylanilidy s 4-CF<sub>3</sub> anilidovou částí vykazovaly vysokou inhibiční aktivitu vůči všem testovaným multirezistentním kmenům s MIC 0,5-4 μM. Problémem těchto salicylanilidových sloučenin ovšem bohužel nadále zůstává toxicita, která značně omezuje jejich další použití.



## 5.2.2 Nepublikované salicylanilidové deriváty

Obsahem této části je biologické hodnocení 12 salicylanilidových derivátů, přičemž čtyři z nich jsou výchozí salicylanilidy, které byly převedeny na čtyři pyrazinoáty a čtyři isonikotináty, viz Tabulka 7. Esterifikace salicylanilidové fenolické skupiny byla provedena za účelem tvorby proléčiva, tj. sloučeniny, od které se očekává vyšší biologická aktivita či biodostupnost, lepší fyzikálně-chemické vlastnosti jako je lipofilita a v neposlední řadě nižší toxicita, která je často limitujícím faktorem pro podání léčiva. Esterifikací salicylanilidů již bylo dosaženo vysokých *in vitro* aktivit vůči lékově-citlivým, rezistentním, případně netuberkulózním kmenům mykobakterií s minimálními inhibičními koncentracemi začínajícími od  $\leq 0,5 \mu\text{M}$  při současně nízkých hodnotách cytotoxicit.<sup>81, 98</sup>

Modifikované salicylanilidy vycházející z SAR osvědčené antimykobakteriální substituce (salicylový kruh: malá elektron-akceptorní skupina Cl/Br; anilidový kruh: elektron-akceptorní skupina CF<sub>3</sub> či Br; Tabulka 7) byly esterifikovány isonikotinovou a pyrazinkarboxylovou kyselinou, což jsou strukturální fragmenty získané hydrolyzou antituberkulotik první linie, INH (hydrazid kyseliny isonikotinové) a pyrazinamidu. Kondenzace byla provedena za účelem tvorby mutual prodrugs (po biotransformaci vznikají dvě biologicky účinné látky). Testování derivátů probíhalo vůči lékově citlivým i rezistentním formám mykobakterií.

### 5.2.2.1 Příprava salicylanilidových derivátů

#### 5.2.2.1.1 První krok: příprava anilidů z chloridu salicylové kyseliny

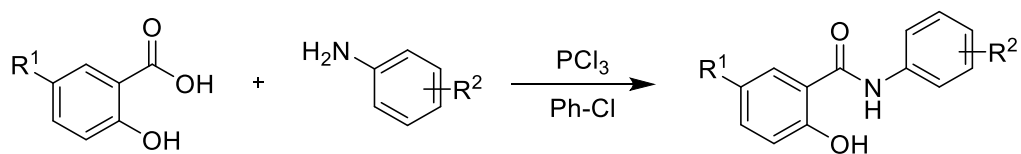


Schéma 4 Salicylanilidová syntéza derivátů **60-63** (Ph-Cl = chlorbenzen; R<sup>1</sup> = Cl/Br; R<sup>2</sup> = 3,5-diCF<sub>3</sub>/4-Br-3-CF<sub>3</sub>)

Substituovaná salicylová kyselina a příslušný anilin (oba 0,01 mol) byly suspendovány v 50 ml chlorbenzenu a byl přidán chlorid fosforitý (5 mmol). Směs byla poté vložena do mikrovlnného reaktoru (450 W) a po dobu 22 minut při teplotě 110 °C intenzivně míchána. Po skončení zahřívání následovala fitrace za horka a získaný filtrát byl ponechán stát při teplotě +4 °C 24 hod. Vzniklý produkt byl přefiltrován a filtrát vakuově odpařen do sucha. Získané

podíly produktů byly v případě nečistot krystalizovány z vodného ethanolu. Čistota produktů byla monitorována tenkovrstvou chromatografií (toluen/ethyl-acetát 4:1).

### 5.2.2.1.2 Druhý krok: esterifikace salicylanilidů

#### 5.2.2.1.2.1 Příprava isonikotinátů z chloridu kyseliny

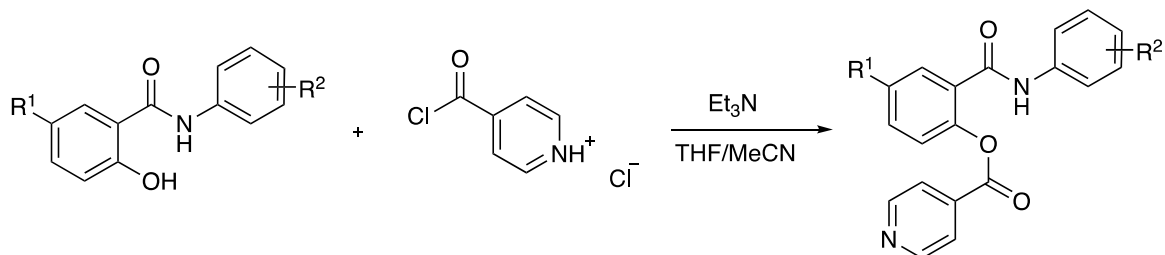


Schéma 5 Reakce salicylanilidů s chloridem isonikotinové kyseliny za vzniku esterů **64-67** (Et<sub>3</sub>N = triethylamin; MeCN = acetonitril; THF = tetrahydrofuran; R<sup>1</sup> = Cl/Br; R<sup>2</sup> = 3,5-diCF<sub>3</sub>/4-Br-3-CF<sub>3</sub>)

Salicylanilid (1 mmol) byl za přidání triethylaminu (3 mmol) rozpuštěn v kombinaci rozpouštědel tetrahydrofuranu a acetonitrilu (1:1; V/V), následovalo přidání hydrochloridu chloridu kyseliny isonikotinové (1,3 mmol). Směs se ponechala míchat za laboratorní teploty po dobu 24 hod a byla vakuově odpařena do sucha. Zbytek byl suspendován v ethyl-acetátu a vytřepán s 5 % NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 M HCl, 5 % roztokem NaCl a vysušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. V případě nečistot byl produkt překrystalizován ze směsi ethyl-acetát/hexan. Reakce byla monitorována tenkovrstvou chromatografií s mobilní fází toluen/ethyl-acetát 4:1.

#### 5.2.2.1.2.2 Steglichova esterifikace vycházející z pyrazinkarboxylové kyseliny

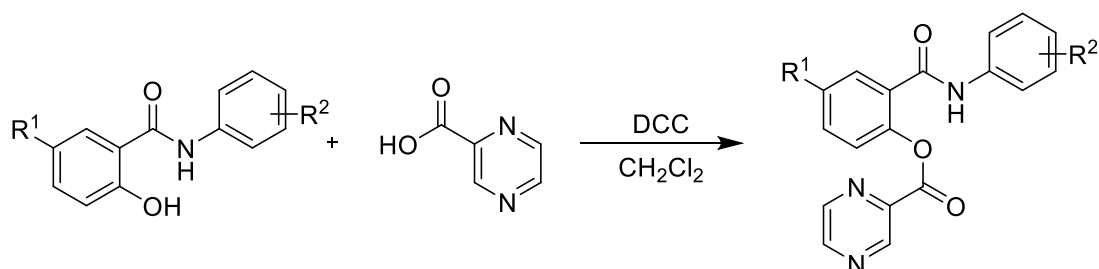


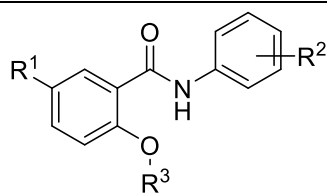
Schéma 6 Příprava pyrazinkarboxylových esterů salicylanilidů **68-71** (DCC = *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid; R<sup>1</sup> = Cl/Br; R<sup>2</sup> = 3,5-diCF<sub>3</sub>/4-Br-3-CF<sub>3</sub>)

Pyrazinkarboxylová kyselina s daným salicylanilidem (oba 1 mmol) byly rozpuštěny v sušeném (CaCl<sub>2</sub>) dichlormethanu (10 ml), ochlazeny na 0 °C a po třech částech během 1 hod byl přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (1,2 mmol). Následovalo 2 hod míchání při stejné teplotě (0 °C) a pak dalších 24 hod při teplotě laboratorní. Po uplynutí této doby byla odflitrována vzniklá sraženina *N,N'*-dicyklohexylmočoviny a filtrát vakuově odpařen do sucha. Získaný produkt byl krystalizován ze směsi ethyl-acetát/hexan. Pro sledování reakce byla využita tenkovrstvá chromatografie (toluen/ethyl-acetát 4:1).

### 5.2.2.2 Hodnocení antimykobakteriální aktivity a cytotoxicity

Tabulka 7 shrnuje výsledné hodnoty MIC, IC<sub>50</sub> a SI testovaných salicylanilidových derivátů.

Tabulka 7 Připravená salicylanilidová analoga a jejich MIC, IC<sub>50</sub>, SI a ClogP



Kód	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	MIC [μM]										IC <sub>50</sub> [μM]	SI	ClogP
				<i>M. tuberculosis</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96					
				14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d			
60	Cl	3,5-diCF <sub>3</sub>	H	4	8	32	32	8	16	16	8	16	16	10,2	1,28	4,85
61	Cl	4-Br, 3-CF <sub>3</sub>	H	4	4	32	32	16	16	16	8	8	16	4,7	1,18	4,76
62	Br	3,5-diCF <sub>3</sub>	H	2	2	16	16	4	8	8	4	8	8	7,8	3,90	5,12
63	Br	4-Br, 3-CF <sub>3</sub>	H	2	2	32	62,5	4	8	8	4	8	8	4,1	2,05	5,03
64	Cl	3,5-diCF <sub>3</sub>	Isonikotinoyl	2	2	16	32	8	8	8	4	8	8	2,7	1,35	5,39
65	Cl	4-Br, 3-CF <sub>3</sub>	Isonikotinoyl	≤1	≤1	16	32	4	8	8	4	8	8	5,7	5,70	5,29
66	Br	3,5-diCF <sub>3</sub>	Isonikotinoyl	2	2	16	32	8	8	8	4	8	8	3,8	1,90	5,66
67	Br	4-Br, 3-CF <sub>3</sub>	Isonikotinoyl	≤1	≤1	16	32	4	8	8	4	8	8	3,0	3,00	5,56
68	Cl	3,5-diCF <sub>3</sub>	Pyrazinoyl	≤1	2	32	32	4	8	8	4	8	8	3,2	1,60	4,47
69	Cl	4-Br, 3-CF <sub>3</sub>	Pyrazinoyl	≤1	2	32	32	4	8	8	4	8	8	5,1	2,55	4,38
70	Br	3,5-diCF <sub>3</sub>	Pyrazinoyl	≤1	2	32	32	4	8	8	4	8	8	2,8	1,40	4,74

71	Br	4-Br, 3-CF <sub>3</sub>	Pyrazinoyl	≤1	2	32	32	4	8	8	4	8	8	5,1	2,55	4,65
		INH		0,5	1	>250	>250	>250	>250	>250	4	8	8			-0,64
		PAS		62,5	62,5	32	125	125	1000	>1000	32	125	500			0,4
		EMB		1	2	16	16	1	2	2	1	2	2			0,06

Esterifikace salicylanilidů (**64-71**; Tabulka 7) přinesla až čtyřnásobné zvýšení inhibičních aktivit proti jejich výchozím strukturám (**60-63**), a to zejména u kmene H37Rv. Výsledky dále potvrdily doposud získané SAR, kdy substitucí salicylového (Br/Cl) a anilidového (CF<sub>3</sub> a Br) kruhu bylo dosaženo vysokých inhibičních hodnot začínajících dokonce na ≤1 μM. Získané koncentrace převyšovaly standard PAS. V případě EMB byly podobné u kmenů H37Rv a *M. avium* 330/88, nebo horší u *M. kansasii*. Ve vztahu s INH byly MIC připravených derivátů srovnatelné s H37Rv a *M. kansasii* 6509/96 a v případě *M. avium* 330/88 s *M. kansasii* 235/80 dokonce i nižší. Nejcitlivější kmen byl H37Rv s MIC od ≤1 μM a naopak nejméně citlivým byl *M. avium* 330/88 s inhibičními hodnotami začínajícími na 16 μM. Ve srovnání neesterifikovaných salicylanilidů (**60-63**) byla na salicylovém kruhu preferovanější 5-Br substituce s až 4x nižší hodnotou MIC oproti Cl protějšku, tento rozdíl po esterifikaci zmizel (**64-71**). Naopak vliv anilidové substituce (3,5-diCF<sub>3</sub> nebo 4-Br-3-CF<sub>3</sub>) nebyl výrazný. Analog **62** dosáhl v neesterifikované řadě (**60-63**) nejlepších inhibičních aktivit vůči celému testovanému spektru mykobakterií a zároveň byl i neúčinnějším z celé připravené série látek (**60-71**) proti atypickým kmenům. Ve srovnání aktivit esterové řady (**64-71**) isonikotinátů a pyrazinkarboxylátů nebyl patrný výrazný rozdíl v naměřených hodnotách, ovšem isonikotináty byly u kmene H37Rv v případě **65** a **67** mírně účinnějšími s MIC ≤1 μM i po 21 dnech. U kmene *M. avium* 330/88 začínaly inhibiční koncentrace isonikotinátů na 16 μM, čímž i zde překonaly pyrazinkarboxyláty s MIC = 32 μM. Vztah mezi lipofilitou a inhibiční aktivitou pozorován nebyl.

Dle získaných hodnot cytotoxicit IC<sub>50</sub> a z nich vypočítaných SI je patrný nepříznivý toxický profil. Vliv esterifikace fenolické skupiny na jeho snížení se v této práci bohužel nepotvrdil. Připravené deriváty měly hodnoty SI od 1,18 do 5,70. Nejvýhodnější selektivitu měl isonikotinový analog **65**, 2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorofenyl-isonikotinát.

### 5.2.2.3 Hodnocení antimykobakteriální aktivity proti lékově-rezistentním kmenům

Výsledné hodnoty MIC proti multirezistentním kmenům znázorňuje Tabulka 8.

Tabulka 8 Minimální inhibiční koncentrace vybraných salicylanilidových derivátů proti rezistentním kmenům *M. tuberculosis*

Kód	MIC [ $\mu$ M]													
	PRAHA 1		PRAHA 4		PRAHA 131		9449/2007		234/2005		7357/1998		8666/2010	
	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d
<b>62</b>	8	16	16	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16
<b>63</b>	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
<b>65</b>	4	8	4	8	4	8	4	8	4	4	4	8	4	8
<b>67</b>	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16
<b>68</b>	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16	16	16	8	16
<b>69</b>	8	16	8	16	8	16	4	8	4	8	8	16	8	16
<b>70</b>	16	32	16	32	16	32	16	32	8	16	16	32	16	32
<b>71</b>	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16

MDR kmeny:

**7357/1998** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu a rifabutin;

**234/2005** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu a rifabutin;

**8666/2010** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, klofamidinu a rifabutin;

**9449/2007** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu a rifabutin;

**Praha 1** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, klofamidinu a rifabutin;

**Praha 4** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, klofamidinu a rifabutin.

XDR kmen:

**Praha 131** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, gentamicinu, rifabutin a amikacinu.

Získané inhibiční hodnoty vůči všem testovaným rezistentním kmenům byly v rozmezí 4-32  $\mu$ M, přičemž nebyla pozorována jejich závislost na vlivu substituce salicylového a anilidového kruhu, případně esterifikaci (**65-71**) či neesterifikaci (**62-63**) salicylanilidové části. Výsledky dále odhalily celkově vyšší hodnoty MIC oproti lékově citlivému kmeni H37Rv (MIC od  $\leq 1$  do 8  $\mu$ M), tedy bez vlivu kyseliny (isonikotinová a pyrazinkarboxylová kyselina) použité pro esterifikaci za účelem tvorby mutual prodrug. Relativně neúčinnější analoga z tohoto měření byla 2-{-brom-3-(trifluormethyl)fenyl}karbamoyl}-4-chlorofenyl-isonikotinát (**65**) s MIC 4-8  $\mu$ M a neesterifikovaný 5-brom-N-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid (**63**) se stejným rozmezím inhibičních koncentrací.

#### 5.2.2.4 Závěrečný komentář

Připravená série vycházela ze čtyř salicylanilidových analog, která byla esterifikována kyselinami isonikotinovou a pyrazinkarboxylovou za získání celkového počtu 12 derivátů. Připravené sloučeniny byly hodnoceny proti mykobakteriálním kmenům včetně rezistentních. Rozdíl aktivit v závislosti na esterifikaci byl patrný zejména u H37Rv kmene s nepatrně účinnějšími isonikotinovými deriváty: 2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-isonikotinát (**65**) a 4-brom-2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl-isonikotinát (**67**) s MIC  $\leq 1 \mu\text{M}$ . U multirezistentních kmenů pozitivní vliv esterifikace vymizel a přinesl mírné zhoršení inhibičních koncentrací oproti lékově-citlivému kmeni H37Rv. Tyto hodnoty se pohybovaly v rozsahu od 4 do 32  $\mu\text{M}$  s neúčinnějším isonikotinovým **65** a neesterifikovaným **63** derivátem (MIC = 4-8  $\mu\text{M}$ ). Získané poznatky bohužel zcela teorii kondenzace dvou účinných látek za vzniku mutual prodrugs s nižšími inhibičními koncentracemi a výhodnější cytotoxicitou nepotvrdily.

#### 5.2.2.5 Chemická charakterizace připravených derivátů

*N*-[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid (**60**)<sup>79, 82</sup>

Bílá krystalická látka; t. t. 169-170 °C [literatura: 172-173 °C]; Výtěžek: 62 %. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid (**61**)<sup>144, 145</sup>

Bílá krystalická látka; t. t. 236-238 °C [literatura: 238-240 °C]; Výtěžek: 76 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3318, 3144, 1692, 1550, 1442, 1137, 896, 820, 682; <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  165.45, 156.62, 138.34, 135.61, 133.32, 128.84, 128.64, 125.55, 124.04, 122.94, 120.13, 119.76, 119.20, 112.70; Anal. Calcd. pro C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>BrClF<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (394.57): C, 42.62; H, 2.04; N, 3.55. Nalezeno: C, 42.50; H, 2.08; N, 3.30. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

*N*-[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]-5-brom-2-hydroxybenzamid (**62**)<sup>79, 82</sup>

Bílá krystalická látka; t. t. 201-202 °C [literatura: 194-195 °C]; Výtěžek: 83 %. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

5-brom-*N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-2-hydroxybenzamid (**63**)

Bílá krystalická látka; t. t. 224.5-226.1 °C; Výtěžek: 82 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3216, 1630, 1589, 1548, 1419, 1124, 1023, 895, 819, 702, 680; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.51 (s, 1H), 10.64 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.92-7.84 (m, 2H), 7.57 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  165.39, 157.01, 138.36, 136.13, 135.64, 131.51, 130.45, 128.59, 128.55, 125.59, 124.07, 121.89, 119.78, 112.71; Anal. Calcd. pro C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (439.03): C, 38.30; H, 1.84; N, 3.19. Nalezeno: C, 38.62; H, 1.67; N, 3.21.

2-{[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-isonikotinát (**64**)<sup>146</sup>

Bílá krystalická látka; t. t. 178.1-180 °C; Výtěžek: 48 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 1753, 1688, 1379, 1276, 1185, 1128, 889, 700; <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  164.21, 164.09, 151.80 (2), 148.09, 141.55, 137.07, 135.33, 133.11, 132.67, 132.41, 132.15, 131.12, 129.96, 126.29, 125.33, 123.77 (2), 121.92,

120.66, 117.86; Anal. Calcd. pro  $C_{21}H_{11}ClF_6N_2O_3$  (488.77): C, 51.61; H, 2.27; N, 5.73. Nalezno: C, 51.42; H, 2.17; N, 5.44. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-isonikotinát (**65**)

Bílá krystalická látka; t. t. 179.3-181.2 °C; Výtěžek: 52 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 1743, 1552, 1481, 1414, 1382, 1275, 1197, 1126, 1099, 889, 827, 714;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.03 (s, 1H), 8.83 (dd,  $J = 4.4, 1.7$  Hz, 2H), 8.18 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.98 (dd,  $J = 4.3, 1.7$  Hz, 2H), 7.94-7.89 (m, 2H), 7.77 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.71 (dd,  $J = 8.7, 2.6$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  163.35, 163.00, 151.10 (2), 146.84, 138.66, 135.96, 135.72, 132.20, 130.80, 130.31, 129.32, 128.55, 125.62, 124.86, 123.08 (2), 121.77, 119.10, 112.52; Anal. Calcd. pro  $C_{20}H_{11}BrClF_3N_2O_3$  (499.67): C, 48.08; H, 2.22; N, 5.61. Nalezno: C, 48.24; H, 2.27; N, 5.76.

2-{[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-bromfenyl-isonikotinát (**66**)

Bílá krystalická látka; t. t. 178.1-180 °C; Výtěžek: 52 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 1753, 1683, 1378, 1276, 1185, 1126, 889, 697;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.25 (s, 1H), 8.83 (dd,  $J = 4.3, 1.6$  Hz, 2H), 8.34 (s, 2H), 8.11 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.98 (dd,  $J = 4.2, 1.6$  Hz, 2H), 7.88 (dd,  $J = 8.7, 2.5$  Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  164.15, 163.99, 151.81 (2), 148.62, 141.55, 137.06, 136.15, 132.94, 132.86, 132.67, 132.41, 132.15, 131.37, 126.59, 125.33, 123.79 (2), 120.64, 119.75, 117.79; Anal. Calcd. pro  $C_{21}H_{11}BrF_6N_2O_3$  (533.22): C, 47.30; H, 2.08; N, 5.25. Nalezno: C, 47.42; H, 2.17; N, 5.34.

4-brom-2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl-isonikotinát (**67**)

Bílá krystalická látka; t. t. 176.3-178.2 °C; Výtěžek: 58 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 1742, 1551, 1481, 1275, 1195, 1125, 1088, 1061, 888, 827, 772, 713;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.05 (s, 1H), 8.83 (dd,  $J = 4.3, 1.6$  Hz, 2H), 8.18 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 2.5, 1H$ ), 7.97 (dd,  $J = 4.3, 1.6$  Hz, 2H), 7.91 (dd,  $J = 8.8, 2.6$  Hz, 1H), 7.85 (dd,  $J = 8.7, 2.4$  Hz, 1H), 7.76 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.47 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  164.12, 163.64, 151.80 (2), 148.56, 141.51, 139.57, 137.08, 136.42, 132.78, 131.68, 130.54, 130.30, 126.50, 125.32, 123.79 (2), 120.02, 119.68, 113.64; Anal. Calcd. pro  $C_{20}H_{11}Br_2F_3N_2O_3$  (544.12): C, 44.15; H, 2.04; N, 5.15. Nalezno: C, 44.30; H, 2.16; N, 5.18.

2-{[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát (**68**)

Bílá krystalická látka; t. t. 138.8-141.5 °C; Výtěžek: 32 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 1766, 1673, 1562, 1472, 1379, 1280, 1187, 1124, 940, 884, 699;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.38 (s, 1H), 9.40 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 8.97 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 8.84-8.81 (m, 1H), 8.43 (s, 2H), 8.08 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.79-7.76 (m, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  163.54, 162.48, 149.72, 148.00, 147.98, 146.64, 145.56, 143.50, 141.54, 133.32, 132.88, 132.34, 132.28, 130.73, 130.02, 126.09, 125.38, 123.21, 120.96, 117.89; Anal. Calcd. pro  $C_{20}H_{10}ClF_6N_3O_3$  (489.76): C, 49.05; H, 2.06; N, 8.58. Nalezno: C, 48.88; H, 2.19; N, 8.40.

2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát (**69**)

Bílá krystalická látka; t. t. 148.6-150.1 °C; Výtěžek: 30 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 1755, 1671, 1532, 1478, 1413, 1321, 1176, 1137, 1019, 820, 662;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.16 (s, 1H), 9.40 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 8.96 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 8.90-8.85 (m, 1H), 8.26 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 8.03 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J = 8.7, 2.6$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.75 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 7.66 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  163.10, 162.37, 149.57, 148.75, 147.84, 145.58, 143.38, 139.44, 136.27, 132.98, 132.10, 130.38, 130.18, 125.93, 125.57, 124.82, 122.65, 120.21, 113.58; Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{10}BrClF_3N_3O_3$  (500.66): C, 45.58; H, 2.01; N, 8.39. Nalezno: C, 45.69; H, 2.11; N, 8.52.

#### 2-{[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-bromfenyl-pyrazin-2-karboxylát (70)

Bílá krystalická látka; t. t. 140.3-141.8 °C; Výtěžek: 32 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 1764, 1674, 1557, 1474, 1380, 1276, 1180, 1127, 889, 682; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) δ 10.41 (s, 1H), 9.40 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.83 (dd, *J* = 2.4, 1.5 Hz, 1H), 8.43 (s, 2H), 8.22 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) δ 163.38, 162.32, 149.59, 148.68, 147.38, 146.53, 143.38, 140.80, 138.00, 136.21, 132.75, 132.26, 131.96, 130.26, 126.27, 123.09, 121.76, 120.13, 118.74, 117.71; Anal. Calcd. pro C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>BrF<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (534.21): C, 44.97; H, 1.89; N, 7.87. Nalezeno: C, 44.88; H, 1.79; N, 7.82.

#### 4-brom-2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl-pyrazin-2-karboxylát (71)

Bílá krystalická látka; t. t. 154.4-156 °C; Výtěžek: 35 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 1759, 1662, 1479, 1444, 1320, 1289, 1171, 1130, 1106, 882, 828, 765; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) δ 10.19 (s, 1H), 9.39 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.89-8.84 (m, 1H), 8.26 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) δ 163.06, 162.33, 149.55, 148.70, 147.33, 145.58, 143.39, 139.45, 136.27, 135.99, 133.42, 131.19, 130.38, 126.22, 125.57, 122.65, 120.22, 119.65, 113.56; Anal. Calcd. pro C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (545.11): C, 41.86; H, 1.85; N, 7.71. Nalezeno: C, 41.80; H, 1.77; N, 7.94.

### 5.2.3 Článek 3 „*In vitro* biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsins conjugates“

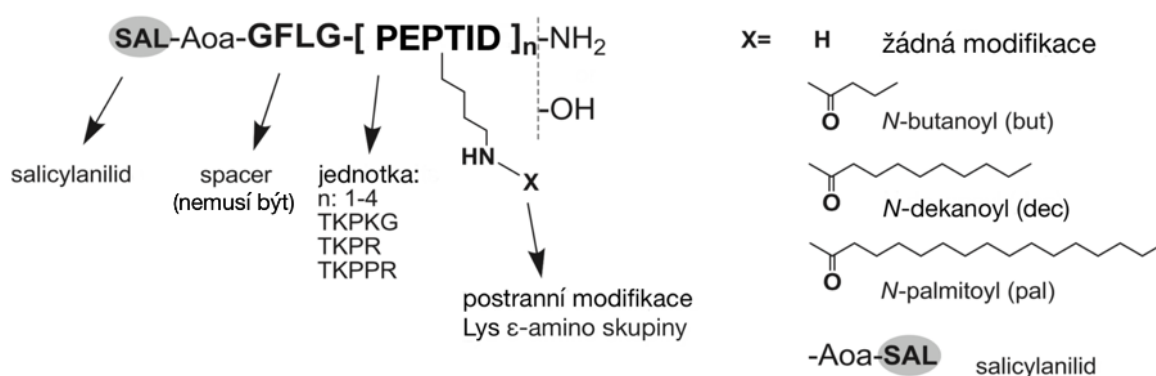
Drug delivery system (DDS) neboli systém řízeného uvolňování léčiva nachází uplatnění v současném preklinickém i klinickém výzkumu a podle druhu přináší řadu výhod, mezi jinými zvýšenou rozpustnost a biodostupnost navázaných hydrofobních léčiv, cílení neboli targeting léčiva, prodloužení biologického poločasu, zlepšení terapeutického indexu či možnost řízeného uvolňování léčiva spolu se sníženou imunogenicitou a toxicitou.<sup>72</sup>

Salicylanilidy a jejich deriváty mají komplexní mechanismus účinku, kdy inhibují dvousložkové regulační systémy bakterií, což jsou signální cesty nutné k virulenci i k udržení homeostázy,<sup>86</sup> či byla popsána jejich inhibice některých mykobakteriálních enzymů jako např. isocitrát lyázy a methionin aminopeptidázy.<sup>83</sup> Jejich vysoká *in vitro* antimykobakteriální aktivita je však do jisté míry zastíněna cytotoxickými vlastnostmi v savčích buňkách (lidské monocyty a hepatocyt), nízkou rozpustností, omezeným buněčným vychytáváním infikovanými hostitelskými buňkami či celkovou biodostupností.<sup>79, 81, 96, 98, 147</sup>

Publikace se zabývá zvyšováním buněčného vychytávání a vyšší intracelulární dostupností léčiva za pomoci cíleného směřování v podobě selektivních peptidových nosičů konjugovaných s méně biologicky dostupným léčivem. Jako selektivní nosiče byly použity deriváty tuftsinu s amidovým C-koncem, případně volnou karboxylovou skupinou (je-li v textu označeno příponou -OH; Obrázek 40): tetramer [TKPKG]<sub>4</sub> (OT20), heterotrimer TKPR-[TKPKG]<sub>2</sub> (TKPR-OT10), dimer [TKPKG]<sub>2</sub> (OT10), monomer TKPKG (T5), TKPR a tuftsinový



antagonista TKPPR. Zároveň byly některé tyto nosiče modifikovány na lysinovém (K) postranním řetězci zavedením palmitové, dekanové či máselné kyseliny za vzniku amidové vazby. Tyto úpravy byly provedeny za účelem zvýšení jejich lipofility, membránové afinity a enkapsulace. Konjugovatelné (acetylované či formylované) salicylanilidy byly připojeny k peptidovým nosičům pomocí oximové vazby (chemicky stabilní při pH 3-8) s využitím 2-(aminooxy)octové kyseliny (Aoa; Obrázek 40) a to buď přímo nebo vložení spojovacího můstku (tzv. spacer), tj. enzymaticky štěpitelného tetrapeptidu GFLG lysozomální cysteinovou proteázou, katepsinem B.



Obrázek 40 Schéma strukturálních obměn peptidového nosiče s C-koncem peptidu ve formě amidu karboxylové kyseliny ( $-\text{NH}_2$ ) nebo volné karboxylové skupiny ( $-\text{OH}$ )

### 5.2.3.1 Výchozí struktura SAL konjugátů a jejich *in vitro* hodnocení antimykobakteriální aktivity

Salicylanilidy (SAL1, 2 a 3; Tabulka 9) a jejich peptidové konjugáty byly hodnoceny *in vitro* vůči dvěma kmenům *M. tuberculosis*, lékově-citlivému H37Rv a multirezistentnímu A8 MDR (rezistence na INH a rifampicin), a proti rychle rostoucímu kmeni *M. abscessus*.

Tabulka 9 Minimální inhibiční koncentrace výchozích salicylanilidů vůči testovaným mykobakteriálním kmenům

Kód	MIC [ $\mu\text{M}$ ]		
	H37Rv	A8 MDR	<i>M. abscessus</i>
	28 d	28 d	7 d
SAL1	8,6	17,3	34,5
SAL2	7,5	15	59,8
SAL3	25,9	64,7	129,4
INH	1,17	7,3	291,8

Pro oximové propojení s peptidovým nosičem musely být salicylanilidy nejdříve strukturně upraveny (Schéma 7). SAL1-2 byly v anilidové části acetylovány se salicylovou substitucí Cl či Br. SAL3 byl naopak na salicylovém kruhu formylován s anilidovou substitucí CF<sub>3</sub>.

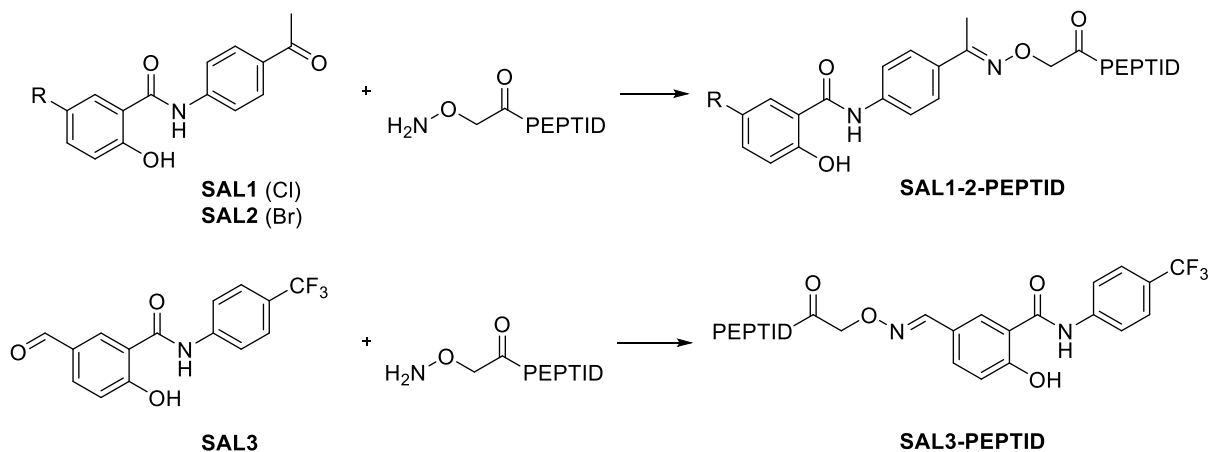


Schéma 7 Výchozí salicylanilidy a jejich peptidová konjugace [R = Cl (SAL1)/Br (SAL2)]

Po konjugaci těchto SALů s peptidovými nosiči klesla jejich *in vitro* aktivita na rozmezí H37Rv MIC = 20,3-186,5 μM. Tento mírný pokles aktivity po konjugaci je však typický a není to známka nefunkčnosti přístupu. Nejúčinnějšími konjugáty byly krátké SAL2-Aoa-TKPPR-OH (H37Rv MIC = 20,3 μM) a SAL2-Aoa-T5 (H37Rv MIC = 21,8 μM). Vložení enzymově štěpitelného GFLG spaceru nemělo žádný vliv na antimykobakteriální aktivitu konjugátů s jednou tuftsinovou jednotkou, a naopak v případě čtyř tuftsinových jednotek přítomnost GFLG spaceru aktivitu dokonce snižovala (SAL2-Aoa-OT20 s MIC H37Rv = 81,5 μM; SAL2-Aoa-GFLG-OT20 s MIC = 141,5 μM). Přítomnost zbytků mastných kyselin v postranním řetězci měla vyšší vliv spíše u kratších konjugátů, kde vedla k výraznému snížení aktivity.

Krátké tuftsinové deriváty s vyšší inhibiční účinností proti kmeni H37Rv byly otestovány vůči rezistentní formě *M. tuberculosis* A8 MDR s 2-5x snížením aktivity, MIC = 73,5-112,4 μM.

Vůči *M. abscessus* působily testované konjugáty v rozmezí MIC = 40,8-224,8 μM a zde byla naopak delší peptidová analoga účinnější oproti těm kratším (MIC = 146,9-224,8 μM), konkrétně SAL1-Aoa-OT20 (MIC = 41,5 μM), SAL2-Aoa-OT20 (40,8 μM) a SAL3-Aoa-OT20 (41,2 μM). Obměny těchto tetramerů v podobě druhého (dalšího) SALu v molekule,

mastné kyseliny v postranním řetězci či spaceru inhibiční aktivitu snižovaly (MIC = 70,4-79,3  $\mu\text{M}$ ).

### 5.2.3.2 Hodnocení cytotoxicity

*In vitro* cytotoxicita byla stanovována na lidské monocytární buněčné linii MonoMac6 a na lidských buňkách jaterního karcinomu HepG2 po 24 h inkubaci za použití 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu neboli MTT. Buňky MonoMac6 jsou považovány za *in vitro* model makrofágových buněk. Buňky HepG2 představují model pro hepatotoxicitu. Cytotoxická aktivita byla navíc hodnocena na myších makrofázích pocházejících z kostní dřeně (BMM $\Phi$ ) za pomoci MTT testu po 48 h inkubaci. BMM $\Phi$  buňky tvoří makrofágový model primární buněčné kultury a rovněž obsahující tuftsinové receptory. SI je poměr IC<sub>50</sub> ku H37Rv MIC po 4 týdnech.

Většina kontrolních acetylovaných peptidových nosičů (fragment SAL-Aoa nahrazen acylem) neměla cytostatickou aktivitu vůči MonoMac6 a HepG2 buňkám ani při nejvyšších měřených koncentracích (200  $\mu\text{M}$ ). Naopak nosiče obsahující v postranním řetězci kyselinu palmitovou měly cytostatický účinek na oba typy těchto buněk (IC<sub>50</sub> = 26,6-77,0  $\mu\text{M}$ ; samotná kyselina palmitová vůči MonoMac6 IC<sub>50</sub> = 178,1  $\mu\text{M}$ ). SAL1-3 vykazovaly cytostatické vlastnosti na oba typy buněk v rozmezí IC<sub>50</sub> 7,9-21,5  $\mu\text{M}$  a SI 0,7-2,5.

#### 5.2.3.2.1 *MonoMac6* buňky

SAL konjugáty s jednou tuftsinovou jednotkou bez mastné kyseliny spolu s jejich spacerovými protějšky neměly vůči MonoMac6 buňkám cytostatický efekt (IC<sub>50</sub> >200  $\mu\text{M}$ ; SI >3,1). Podobně bez cytostatického účinku tomu bylo i u konjugátů se dvěma a čtyřma tuftsinovými jednotkami neobsahující mastnou kyselinu, ovšem s výjimkou spacerového SAL2-Aoa-GFLG-OT20 konjugátu, který ji vůči MonoMac6 buňkám měl (IC<sub>50</sub> = 86,6  $\mu\text{M}$ ; SI = 0,6). Cytostatické účinky v nosiči se dále projevovaly při přítomnosti dvou molekul SAL. Konjugáty s mastnou kyselinou (dekanová a palmitová) v postranním řetězci měly významný cytostatický efekt na MonoMac6 buňky (IC<sub>50</sub> = 16,5-72,6  $\mu\text{M}$ ; SI = 0,2-0,4), což bylo částečně v rozporu s kontrolní acetylovanou řadou nosičů, kdy při přítomnosti dekanové kyseliny cytostáza patrná nebyla a stejně tak u i volné dekanové kyseliny (pro obojí bylo IC<sub>50</sub> >200  $\mu\text{M}$ ).

### 5.2.3.2 HepG2 buňky

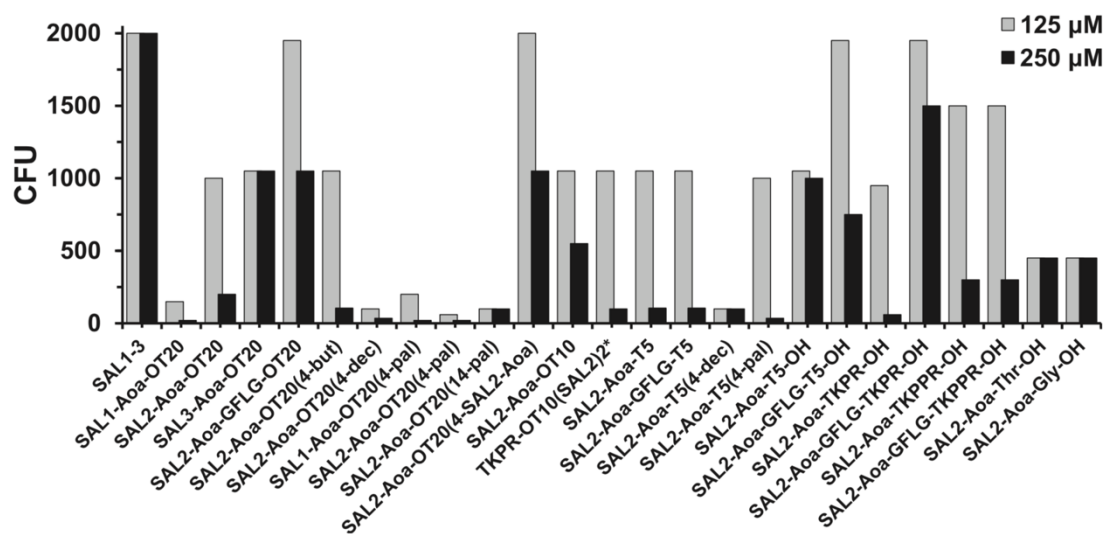
Cytostatický efekt hodnocený vůči HepG2 buňkám nebyl na výjimky pozorován u postranně nemodifikovaných konjugátů (tj. bez mastné kyseliny, spaceru nebo druhého SAL). Opak nastal u nosičů se spacerem s rozsahem  $IC_{50} = 58-162,6 \mu M$  a  $SI = 0,8-5,3$  a dále pak u konjugátů obsahujících dvě molekuly SAL či mastné kyseliny v postranním řetězci ( $IC_{50} = 23,2-113,3 \mu M$ ;  $SI = 0,1-2,7$ ).

### 5.2.3.2.3 BMM $\Phi$ buňky

Vliv konjugátů na BMM $\Phi$  buňky odhalil podobné zákonitosti jako u HepG2 buněk, tj. inkorporace spaceru a mastné kyseliny do nosiče vede ke zvýšení toxicity.

### 5.2.3.3 Hodnocení *in vitro* MonoMac6 intracelulární antimykobakteriální aktivity

V tomto testování byla měřena intracelulární inhibiční aktivita peptidových konjugátů se SAL (při 125 a 250  $\mu M$ ) vůči buňkám lidských monocytů linie MonoMac6 infikovaných kmenem H37Rv.



Obrázek 41 *In vitro* aktivity SAL a jejich peptidových konjugátů proti mykobakteriálnímu kmeni H37Rv intracelulárně infikovanému v MonoMac6 buňkách <sup>73</sup>

INH ani SAL (Obrázek 41) nedosahovaly žádných inhibičních aktivit oproti většině konjugátů, které v závislosti na použité koncentraci významně redukovaly CFU intracelulárních mykobakterií kmene H37Rv ve srovnání s jejich neošetřenou linií.

Při nižší koncentraci 125  $\mu\text{M}$  nebyl tolik patrný vliv délky nosičů na jejich inhibiční aktivitu. Opak nastal při 250  $\mu\text{M}$ , kde byl v SAL2 řadě neúčinnějším analogem bez mastné kyseliny krátký monomer SAL2-Aoa-T5 následovaný dlouhým tetramerem SAL2-Aoa-OT20. Přítomnost spaceru GFLG vliv na aktivitu spíše neměla. Zdvojení počtu SAL v OT20 vedlo k nižší aktivitě oproti původnímu SAL2-Aoa-OT20.

Přítomnost mastné kyseliny dekanové/palmitové obecně vedla k vyšším aktivitám. OT20 modifikované konjugáty s mastnou kyselinou dekanovou/palmitovou dosahovaly dokonce mimořádných inhibičních hodnot při obou měřených koncentracích, čímž překonaly i monomerní T5 nosiče mastných kyselin, které ovšem i tak byly účinnější oproti svému výchozímu SAL2-Aoa-T5. Inhibiční aktivita nejmenších metabolitů získaných během lyzozomální degradace (SAL2-Aoa-Thr-OH a SAL2-Aoa-Gly-OH) nebyla závislá na použité koncentraci.

Intracelulární inhibiční aktivity konjugátů a jejich cytostatické vlastnosti mohou být vzájemně propojeny, bereme-li v potaz zde použité koncentrace (125 a 250  $\mu\text{M}$ ) a hodnoty  $\text{IC}_{50}$  nižší než 125  $\mu\text{M}$  u některých derivátů. Zároveň mohou být při separačním kroku tyto usmrčené monocyty spolu s bakteriemi za poklesu CFU odstraněny. Avšak volné SAL mající při těchto koncentracích cytostatickou aktivitu CFU neredukovaly, a proto nemůže být inhibiční aktivita konjugátů připisována pouze jejich toxicitě vůči hostitelské buňce. Získané hodnoty CFU jsou tedy dané spíše vlivem lepší buněčné dostupnosti konjugátů oproti SAL nežli potenciální toxicitou.

#### 5.2.3.4 Závěrečný souhrn

Perspektivu salicylanilidů zastihuje jejich cytotoxicita. V případě některých salicylanilid-tuftsínových konjugátů propojených skrze oximovou skupinu antimykobakteriální aktivita zůstává zachována a je zároveň i bez cytotoxické odezvy, což může značit právě lepší selektivitu těchto konjugátů k mykobakteriím. Obecným znakem těchto účinných konjugátů je jedna tuftsínová jednotka (monomer), která může být doplněna o případný GFLG spacer.

Všechny testované konjugáty intracelulárně snižovaly CFU bakterií, zatímco volné SAL byly v těchto testech neúčinné. Tato intracelulární inhibiční účinnost konjugátů je pravděpodobně dána jejich lepším buněčným vychytáváním. Bohužel konjugáty s nejvyšší mírou buněčného vychytávání a intracelulárních inhibičních aktivit vykazovaly zároveň i nezanedbatelný stupeň toxicity. Toto se týkalo hlavně konjugátů s mastnou kyselinou

(dekanová a palmitová) v postranním řetězci. Z necytostatických analog vykazujících zároveň i zajímavou intracelulární aktivitu byly nejslibnějšími krátké monomerní konjugáty SAL2-Aoa-T5, SAL2-Aoa-GFLG-T5 a SAL2-Aoa-TKPR-OH.

Přímá spojitost lipofility s intracelulární inhibiční účinností v této práci nalezena nebyla. Příkladem je intracelulární inaktivita lipofilních SAL oproti jejich účinným lipofilním konjugátům. Avšak dle získaných poznatků mají lipofilnější konjugáty v podobě postranní modifikace kyselinou dekanovou či palmitovou větší vliv na míru buněčného vychytávání, intracelulární aktivitu a i cytotoxicitu. Vstup konjugátů do buněk je pravděpodobně spojen s fagocytózou či receptory řízenou endocytózou. U lipofilněji modifikovaných konjugátů se pak může projevat i nespecifický transport přes buněčnou membránu v podobě difúze.

Test stability vůči působení jaternímu lysosomálnímu homogenátu z potkana odhalil, že konjugáty s GFLG spacerem podléhají nejdříve enzymatickému štěpení. Přítomnost dekanové kyseliny zvyšuje, zatímco přítomnost palmitové kyseliny snižuje rychlost štěpení nosiče a zároveň stabilita kratších peptidů je větší oproti těm delším. Oximová skupina spojující SAL s nosným peptidem zůstala nedotčena.

## **5.3 Isoniazidové deriváty**

### **5.3.1 Článek 4 „New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action“**

Isoniazid patří mezi nejvýznamnější antituberkulotika první linie a hraje podstatnou roli v celosvětové léčbě TB. Nevýhodou a rizikem při dlouhodobé léčbě je neustále se rozvíjející rezistence. Příkladem mohou být dvě nejčastěji se vyskytující INH rezistence v *katG* a *inh* genu. Tato práce <sup>148</sup> se zabývala sloučeninami strukturně vycházejícími z INH: *N*-alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidy (**72-79**) a jejich cyklickými analogy *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (**80-82**). Hydrofobní alkylový řetězec byl do těchto sloučenin inkorporován za účelem jejich vyšší penetrace do lipofilní mykobakteriální buněčné stěny. Dalším důvodem funkcionalizace hydrazidové skupiny byla její ochrana před inaktivací *N*-arylaminoacetyl transferázou s potenciálem snížení rizika rezistence. Mezi již publikovanými obměnami lze například zmínit kondenzaci hydrazidové části na N<sup>2</sup> <sup>149, 150</sup> nebo

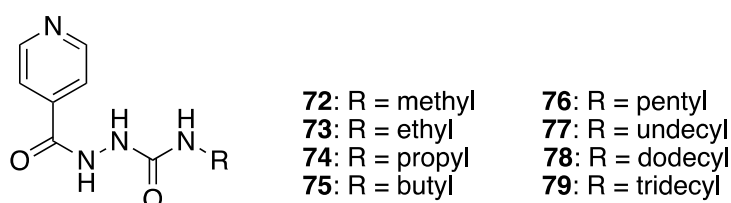
umístění jednoho <sup>151, 152</sup> či obou dusíků <sup>153</sup> této skupiny do heterocyklu. V druhém kroku naší práce byla hydrazidová část inkorporována do heterocyklického 1,3,4-oxadiazolového kruhu s 2-amino můstkem dále pokračujícího v různě dlouhý alkylový řetězec. Tato publikace navazuje a částečně i rozvíjí problematiku slibných oxadiazolů, které se jako součást některých prací prezentovaly velmi vysokými antimykobakteriálními aktivitami. <sup>154, 155, 156, 157</sup>

### 5.3.1.1 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

*N*-Alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidy (**72-79**; Obrázek 42) a jejich cyklická analoga *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (**80-82**; Obrázek 43) byly *in vitro* testovány proti *M. tuberculosis* 331/88 (H37Rv) a třem atypickým kmenům: *M. avium* 330/88, *M. kansasii* 235/80 a klinickému izolátu 6509/96.

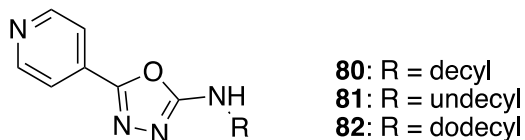
Minimální inhibiční koncentrace některých připravených analog dosahovaly slibných hodnot počínajících od 0,5  $\mu\text{M}$  (**72**, **73**, **74** a **82**). H37Rv byl nejcitlivějším kmenem s MIC  $\geq 0,5 \mu\text{M}$  pro *N*-alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidy (**72-79**) a MIC  $\geq 4 \mu\text{M}$  pro *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (**80-82**). *M. avium* byl naopak nejméně citlivým s MIC  $\geq 32 \mu\text{M}$  pro **72-79** a  $\geq 8 \mu\text{M}$  pro **80-82**. Oba kmény *M. kansasii* dosahovaly podobných inhibičních koncentrací začínajících od 4  $\mu\text{M}$  u **72-79** a 8  $\mu\text{M}$  u **80-82**.

V karboxamidové řadě **72-79** se vůči H37Rv ukázala výhodnější nižší lipofilita (ClogP <0) těchto analog spojená s přítomností krátkého alkylového řetězce (methyl, ethyl, propyl; **72-74**). Tato analoga dosahovala MIC  $\leq 2 \mu\text{M}$  a byla následována butylovým (**75**) a pentylovým (**76**) analogem s minimální koncentrací 8  $\mu\text{M}$ . S vyšší homologií této řady inhibiční aktivita nerostla a spíše se držela v rozmezí 32 až 62,5  $\mu\text{M}$ . V případě *M. avium* se naopak zdál výhodnější delší alkylový řetězec s 11 až 16 uhlíky a MIC  $\leq 125 \mu\text{M}$ . Nejúčinnější dodecylový analog **78** měl MIC = 32-62,5  $\mu\text{M}$ . Kmény *M. kansasii* byly nejvíce inhibovány 2-isonikotinoyl-*N*-propylhydrazin-1-karboxamidem **74** s MIC = 4-16  $\mu\text{M}$ , následovaným undecylovým (**77**), tridecylovým (**79**) a ethylovým (**73**) derivátem s rozsahem MIC 16-125  $\mu\text{M}$ .



Obrázek 42 Série *N*-alkyl substituovaných 2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidů

Cyklizace na lipofilnější oxadiazolová analoga **80-82** aktivitu nezvýšila. Nejzajímavějších inhibičních vlastností dosáhly deriváty se středně dlouhým decylovým (**80**), undecylovým (**81**) a dodecylovým (**82**) řetězcem. *N*-Dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin **82** byl neúčinnější proti kmenům H37Rv s MIC = 4-8  $\mu$ M a *M. avium* s MIC = 8-16  $\mu$ M, zatímco jeho decylový **80** homolog nejvíce inhiboval obě formy *M. kansasii* při MIC = 8-16  $\mu$ M.



Obrázek 43 Řada derivátů vycházející z *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu

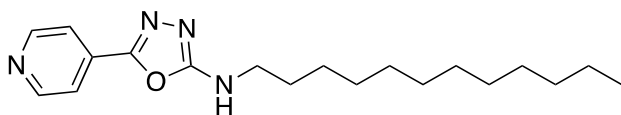
### 5.3.1.2 Hodnocení antimykobakteriální aktivity proti lékově-rezistentní kmenům

Neúčinnější deriváty z přechodí části *N*-alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidy **72** (methyl)/**73** (ethyl)/**74** (propyl) s H37Rv MIC  $\leq 2$   $\mu$ M a *N*-dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin **82** s H37Rv MIC  $\leq 8$   $\mu$ M byly testovány vůči rezistentním mykobakteriálním kmenům, tj. čtyřem MDR-TB a jednomu XDR-TB.

Aktivita karboxamidových analog **72-74** se pohybovala v rozmezí MIC = 16-125  $\mu$ M a byla oproti lékově-citlivému kmeni H37Rv méně účinná. Všechny deriváty **72-74** navíc inhibovaly rezistentní kmeny při jednotné koncentraci bez závislosti na konkrétním typu rezistence. 2-Isonikotinoyl-*N*-propylhydrazin-1-karboxamid **74** byl z této řady nejefektivnější s MIC = 16  $\mu$ M. Výsledky bohužel naznačily zkříženou rezistenci karboxamidové série **72-74** s výchozím INH.

Naopak inhibiční koncentrace vůči rezistentním formám byly u *N*-dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu (**82**) 4-8  $\mu$ M a nelišily se od kmene H37Rv, čímž naznačily mechanismus účinku na INH nezávislý či schopnost obejít mechanismus rezistence vztažený k INH. Dle výsledků je dále pravděpodobné, že oxadiazol **82** nesdílí zkříženou rezistenci s běžně používanými antituberkulotiky (INH, rifampicin, ethambutol, streptomycin, ofloxacin, klofazimin či aminoglykosidy). Současně analog **82** bez ohledu na přítomnost dvanácti uhlíkatého řetězce splnil Lipinského pravidlo pěti (Obrázek 44), definující rozsah čtyř fyzikálně-chemických parametrů (molekulová hmotnost  $\leq 500$ ,  $\log P \leq 5$ , počet donorů H-vazby  $\leq 5$  a počet akceptorů H-vazby  $\leq 10$ ). Parametry korelují s přijatelnou rozpustností ve vodě a střevní permeabilitou požadovanou pro perorální biologickou dostupnost.





Molekulová hmotnost:	330,48
Donor H-vazby:	1
Akceptor H-vazby:	5
CLogP:	4,94

Obrázek 44 Sloučenina **82** dle Lipinského pravidel pěti <sup>158</sup>

### 5.3.1.3 Hodnocení cytotoxicity

Cytotoxicita připravených sloučenin byla měřena za použití standardního *in vitro* modelu rakovinné linie HepG2 buněk. Použitý test CellTiter 96 je založen na kolorimetrickém stanovení redukce tetrazolového barviva MTS na formazan (fialová) v živých buňkách. Redukce MTS souvisí s dostupností NADH či NADPH, kdy pokles hladin těchto metabolicky důležitých molekul v buňce vede ke snížené tvorbě formazanu (tj. čím více živých buněk, tím intenzivnější fialové zbarvení).

Karboxamidové deriváty **72-79** a jejich oxadiazolová analoga **80-82** obecně sdílely nízkou cytotoxicitu při koncentracích, kdy se je podařilo v testovacím médiu rozpustit. Žádný z derivátů nebyl toxický při koncentraci 50  $\mu\text{M}$  a ve srovnání karboxamidových analog **72-79** s výchozím INH se jejich cytotoxicity podobaly. Dle vypočítaných indexů selektivit vyšších než 10 vykazovala analoga přijatelnou toxicitu.

### 5.3.1.4 Mechanismus účinku

2-Isonikotinoyl-*N*-methylhydrazin-1-karboxamid **72** a *N*-dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin **82**, jenž dosáhly nejlepších hodnot inhibice růstu kmene H37Rv, cytotoxicit a indexů selektivit (**72** SI >5000, **82** SI >6,25), byly podrobeny dvěma testům, které zkoumaly jejich mechanismu účinku.

V prvním testu byly vybrány dva kmeny *M. tuberculosis* H37Ra, které se lišily obsazením vektoru (nosič genetické informace) pMV261. První prázdný a druhý obsazený (pMV261-InhA) projevující se nadměrnou tvorbou InhA. V principu tohoto testování by měl být vůči inhibitoru InhA odolnější kmen s nadprodukcí proteinového cíle InhA oproti normálně produkujícímu. Kapkový test (drop dilution method) odhalil, že vůči karboxamidu **72** je kmen s nadprodukcí InhA opravdu výrazně odolnější, čímž zároveň i potvrdil, že je InhA molekulárním cílem **72** uvnitř mykobakterií. Naopak u dodecylového oxadiazolu **82** byly inhibice kmenů podobné, což naznačilo jiný, na InhA nezávislý mechanismus účinku.

Inhibice produkce mykolových kyselin a s nimi souvisejících glykolipidů (TMM, TDM) byla sledována u *M. tuberculosis* (H37Ra) v druhém testu a probíhala na principu metabolického značení radiouhlikem (<sup>14</sup>C izotop). INH byl použit jako standard. Při hodnocení glykolipidové inhibice byly tyto sloučeniny z mykobakterií nejdříve extrahovány, poté TLC rozděleny a autoradiograficky detekovány. Ze získaných výsledků bylo patrné, že inhibice syntézy trehalóza-monomykolátů a trehalóza-dimykolátů methylovým karboxamidem **72** probíhala podobně jako u INH. Další analýzou byla inhibice syntézy mastných kyselin (do 24 uhlíků) z FAS I cyklu a z něho vycházející syntéza mykolových kyselin (do 90 uhlíků) neboli FAS II fáze. Tyto kyseliny byly nejdříve saponifikovány, poté esterifikovány jodmethanem na odpovídající estery mastných (FAME; fatty acid methyl ester) a mykolových kyselin (MAME; mycolic acid methyl ester), extrahovány, separovány za pomoci TLC a autoradiograficky vizualizovány. Analog **72** i zde jako INH inhiboval syntézu všech typů mykolových kyselin (alfa-, methoxy- a keto-) z FAS II cyklu, zatímco FAS I fáze v podobě syntézy mastných kyselin narušena nebyla.

U dodecylovaného oxadiazolu **82** přes zevrubnou TLC analýzu extrahovaných glykolipidů, mastných a mykolových kyselin neodhalily radiouhlikově značené metabolické testy žádný rozdíl mezi kontrolní a ošetřenou kulturou. Mechanismus účinku tedy zůstává neobjasněn. Dle výsledků se ovšem zdá, že **82** necílí dráhy vedoucí k syntéze komponent mykobakteriální stěny.

#### 5.3.1.5 Závěrečný komentář

Dvě připravené řady po sedmácti derivátech: *N*-alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidy (**72-79**) a jejich cyklická analoga *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (**80-82**) byly testovány proti mykobakteriálním kmenům zahrnující i ty lékově rezistentní. Hodnoty MIC nejúčinnějších karboxamidových sloučenin **72**, **73** a **74** vůči kmeni H37Rv byly podobné INH. Z oxadiazolové řady dominoval dodecylový **82** analog s hodnotami H37Rv MIC = 4-8 μM. Vůči rezistentním kmenům byla pozorována zkřížená rezistence s INH u necyklických analog **72-74** a naopak na INH nezávislý účinek oxadiazolu **82**. Výhodou většiny připravených sloučenin byly jejich *in vitro* netoxické vlastnosti na HepG2 buněčné linii.

U nejperspektivnějších H37Rv inhibitorů 2-isonikotinoyl-*N*-methylhydrazin-1-karboxamid (**72**) a *N*-dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (**82**) byl zkoumán jejich

mechanismu účinku. V těchto testech se zjistilo, že **72** inhibuje InhA a syntézu mykolových kyselin včetně jejich glykolipidů podobně jako INH. U cyklického oxadiazolu **82** mechanismus účinku odhalen nebyl. Liší se od mechanismu INH a představuje tak možná novou a potenciálně slibnou skupinu látek s antimykobakteriálním účinkem.

## **5.4 Deriváty kyseliny *para*-aminosalicylové**

Předkládaná nepublikovaná část pojednává o biologické aktivitě a vzájemném srovnání řady derivátů kyseliny *p*-aminosalicylové a jejich methylesterů. PAS je v současné době součástí druhé linie léčiv s antituberkulotickou aktivitou, a právě její obměny mohou být možností zvýšení inhibičních aktivit a celkového potenciálu využití léčiva v celosvětové léčbě TB.

### **5.4.1 Nepublikované *para*-aminosalicylové deriváty**

Dvě řady derivátů PAS s různými lipofilními substituenty byly připraveny formou kondenzace 4-aminosalicylové skupiny s danými isokyanáty za vzniku *N*<sup>2</sup>-alkyl/cykloalkyl/aryl/arylalkyl diamidu kyseliny uhličitě (močoviny). Rozdílnost těchto dvou řad spočívala v esterifikaci karboxylové skupiny: volná karboxylová kyselina (**83-108**) a její methylester (**109-134**; oba Tabulka 10). Celkově bylo tímto způsobem získáno 52 derivátů, po 26 v každé řadě. Sloučeniny prošly hodnocením jejich biologické aktivity, zahrnující bakteriální G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> kmeny, mykobakterie či houby. Vzájemným porovnáním výsledků byla snaha o získání a formulování SAR.

### 5.4.1.1 Příprava derivátů PAS

#### 5.4.1.1.1 Příprava methylmočoviny z 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-methylkarbamátu

(Metoda A)

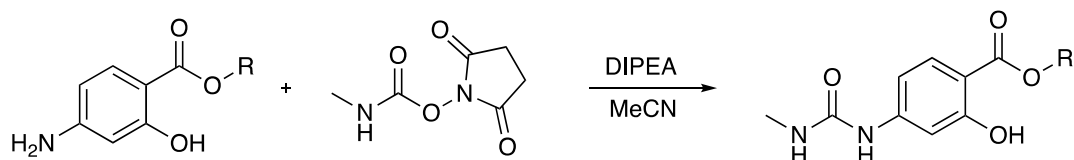


Schéma 8 Příprava methylmočoviny PAS a jejího methylesterového protějšku v přítomnosti Hunigovy báze (DIPEA = *N,N*-diisopropylethylamin; MeCN = acetonitril; R = H/CH<sub>3</sub>)

PAS nebo methyl-*p*-aminosalicylát (1 mmol), *N,N*-diisopropylethylamin (2 mmol) a 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-methylkarbamát (1,5 mmol) byly rozpuštěny v suchém acetonitrilu (8 ml). Následovalo míchání reakce při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Výsledné krystaly byly odfiltrovány a v případě potřeby rekrystalizovány z ethyl-acetátu. Reakce byla monitorována za pomoci TLC (PAS: dichlormethan/methanol 4:1; methyl-*p*-aminosalicylát: toluen/methanol 9:1).

#### 5.4.1.1.2 Příprava derivátů močoviny vycházející z PAS a komerčně dostupného

*R*-isokyanátu (Metoda B)

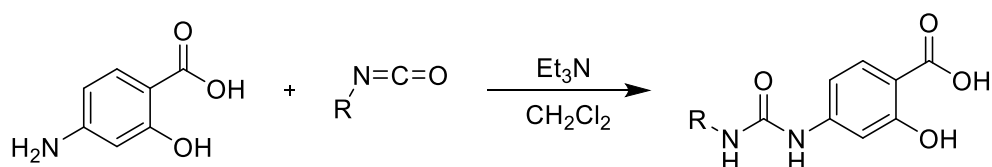


Schéma 9 Reakce PAS s daným isokyanátem (Et<sub>3</sub>N = triethylamin; R = viz Tabulka 10 s výjimkou analog s 1, 10, 13 a 15 uhlíky)

1 mmol PAS spolu s 1,5 mmolu triethylaminu byly rozpuštěny v 8 ml vysušeného (CaCl<sub>2</sub>) dichlormethanu. Reakční směs byla za stálého míchání přivedena k 60 °C, byl přidán 1 mmol isokyanátu a při stejné teplotě následovalo míchání po dobu 5-6 hod. Poté byla reakční směs míchána 12 hod při laboratorní teplotě a po uplynutí tohoto času byla vytřepána dvakrát s destilovanou vodou (30 ml) a jednou s 5 % roztokem hydrogenuhličitanu sodného (30 ml). Spojené vodné vrstvy byly následně okyseleny kyselinou chlorovodíkovou do zřetelně kyselé

reakce za vzniku sraženiny. Sraženina byla odfiltrována a promyta hexanem a diethyletherem. Vzniklý produkt byl v případě přítomnosti nečistot krystalizován ze směsi ethyl-acetát/hexan. Monitorování reakce probíhalo za pomoci TLC soustavy dichlormethan/methanol 4:1.

#### 5.4.1.1.3 Příprava derivátů močoviny vycházející z methyl-4-aminosalicylátu a R-isokyanátu (Metoda C)

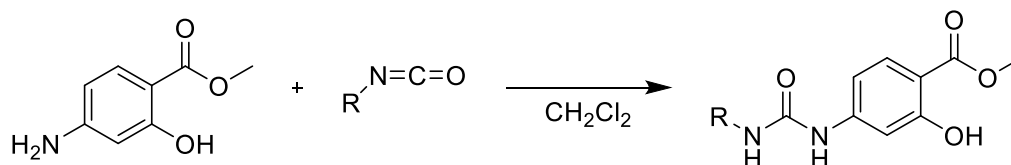


Schéma 10 Reakce methyl-*p*-aminosalicylátu s R-isokyanátem (R = Tabulka 10 s výjimkou analog s 1, 10, 13 a 15 uhlíky)

1 mmol Methyl-4-aminosalicylátu byl v 8 ml vysušeného ( $\text{CaCl}_2$ ) dichlormethanu za stálého míchání zahřát na 60 °C. Následovalo přidání 1 mmol daného R-isokyanátu a při zachování teploty byla směs míchána po dobu 5-6 hod. Poté se reakční směs ponechala míchat 12 hod při laboratorní teplotě. Po odpaření rozpouštědla za sníženého tlaku byl získaný produkt krystalizován ze směsi ethyl-acetát/hexan. Čistota produktů byla monitorována na TLC za pomoci mobilní fáze toluen/methanol 9:1.

#### 5.4.1.1.4 Příprava R-isokyanátu *in situ* a následná tvorba derivátů močoviny vycházející z PAS/methyl-4-aminosalicylátu (Metoda D)

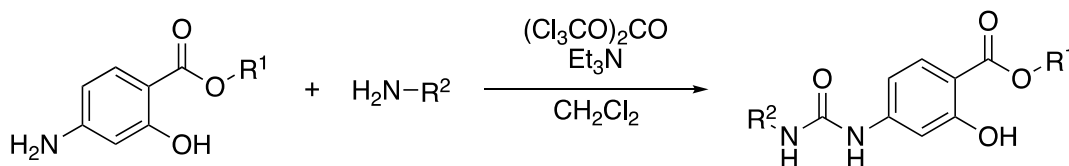


Schéma 11 Reakce s  $\text{R}^2$ -isokyanátem připraveným *in situ* [ $(\text{Cl}_3\text{CO})_2\text{CO}$  = trifosgen neboli bis(trichlormethyl)-karbonát;  $\text{Et}_3\text{N}$  = triethylamin;  $\text{R}^1$  = H/ $\text{CH}_3$ ;  $\text{R}^2$  = decyl, tridecyl a pentadecyl]

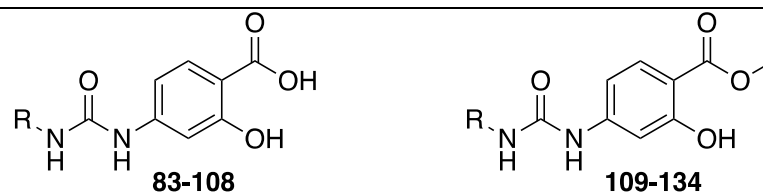
Trifosgen (0,4 mmol) byl v dusíkové atmosféře rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu (5 ml) a po kapkách byl přidáván  $\text{R}^2$ -amin (1 mmol) rozpuštěný v bezvodém dichlormethanu

(3 ml). Směs se ponechala míchat 30 minut při laboratorní teplotě a následovalo přidání triethylaminu (2 mmol) suspendovaného bezvodým dichlormethanem (3 ml). Po dalších 30 min míchání byl přidán PAS/methyl-*p*-aminosalicylát (1 mmol). Reakční směs se poté nechala v dusíkové atmosféře při laboratorní teplotě míchat po dobu 10 hod a následně byla odpařena do sucha. Získaný produkt byl krystalizován ze směsi ethyl-acetát/hexan a čistota byla monitorována za pomoci mobilní soustavy PAS: dichlormethan/methanol 4:1 a methyl-*p*-aminosalicylát: toluen/methanol 9:1.

### 5.4.1.2 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Výsledky antimykobakteriálního testování znázorňuje Tabulka 10.

Tabulka 10 Minimální inhibiční koncentrace připravených analog *para*-aminosalicylové kyseliny vůči mykobakteriálním kmenům



Kód	R	MIC [μM]										ClogP
		<i>M. tuberculosis</i> 331/88 (H37Rv)		<i>M. avium</i> 330/88			<i>M. kansasii</i> 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	
<b>83</b>	methyl	<b>8</b>	<b>8</b>	125	125	62,5	62,5	62,5	<b>32</b>	62,5	62,5	0,02
<b>109</b>		1000	1000	>1000	>1000	62,5	125	250	1000	1000	>1000	0,28
<b>84</b>	ethyl	<b>32</b>	<b>32</b>	1000	>1000	125	250	250	125	125	125	0,36
<b>110</b>		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,62
<b>85</b>	propyl	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	0,84
<b>111</b>		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1,10
<b>86</b>	butyl	125	125	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	1,26
<b>112</b>		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1,52
<b>87</b>	pentyl	500	500	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	1,68
<b>113</b>		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	1,94
<b>88</b>	hexyl	250	250	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	500	1000	1000	2,09
<b>114</b>		<b>16</b>	<b>32</b>	500	500	<b>16</b>	<b>32</b>	62,5	<b>32</b>	<b>32</b>	62,5	2,36
<b>89</b>	heptyl	125	125	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	500	1000	1000	2,51
<b>115</b>		<b>16</b>	<b>32</b>	500	500	<b>16</b>	<b>32</b>	62,5	<b>32</b>	<b>32</b>	62,5	2,77
<b>90</b>	oktyl	125	125	>1000	>1000	250	500	1000	250	500	1000	2,93
<b>116</b>		<b>4</b>	<b>8</b>	250	250	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	3,19
<b>91</b>	nonyl	250	250	1000	1000	250	500	1000	250	500	1000	3,34
<b>117</b>		<b>2</b>	<b>4</b>	250	250	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	3,61
<b>92</b>	decyl	125	125	500	1000	62,5	125	500	125	125	250	3,76

<b>118</b>		<b>2</b>	<b>4</b>	250	250	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	4,03
<b>93</b>	undecyl	125	125	500	500	62,5	125	500	125	125	250	4,18
<b>119</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	125	250	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	4,44
<b>94</b>	dodecyl	250	250	500	500	250	500	500	250	500	500	4,60
<b>120</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	125	250	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	4,86
<b>95</b>	tridecyl	62,5	62,5	500	500	125	250	500	250	250	500	5,01
<b>121</b>		<b>2</b>	<b>4</b>	250	250	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	5,28
<b>96</b>	tetradecyl	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	5,43
<b>122</b>		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	5,69
<b>97</b>	pentadecyl	125	125	500	500	500	500	500	500	500	500	5,85
<b>123</b>		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	6,11
<b>98</b>	hexadecyl	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	6,27
<b>124</b>		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	6,53
<b>99</b>	oktadecyl	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	7,10
<b>125</b>		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	7,36
<b>100</b>	fenyl	250	250	>1000	>1000	125	250	500	250	500	500	1,68
<b>126</b>		<b>16</b>	<b>32</b>	500	500	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	1,94
<b>101</b>	benzyl	250	250	>1000	>1000	250	500	1000	250	500	1000	1,75
<b>127</b>		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	2,01
<b>102</b>	fenylethyl	250	250	>1000	>1000	500	1000	1000	250	500	1000	2,03
<b>128</b>		500	500	500	500	X	X	X	250	500	500	2,29
<b>103</b>	fenylpropyl	62,5	62,5	>1000	>1000	<b>32</b>	62,5	125	62,5	125	250	2,45
<b>129</b>		500	500	500	500	X	X	X	250	500	500	2,71
<b>104</b>	fenylbutyl	<b>32</b>	62,5	>1000	>1000	<b>32</b>	62,5	62,5	<b>32</b>	62,5	125	2,86
<b>130</b>		<b>32</b>	62,5	500	500	X	X	X	<b>16</b>	<b>32</b>	62,5	3,13
<b>105</b>	cyklohexyl	250	250	>1000	>1000	500	1000	1000	1000	1000	1000	1,56
<b>131</b>		<b>32</b>	62,5	500	500	X	X	X	62	125	250	1,83
<b>106</b>	cykloheptyl	<b>32</b>	<b>32</b>	1000	1000	<b>16</b>	<b>32</b>	62,5	<b>32</b>	62,5	125	1,98
<b>132</b>		<b>4</b>	<b>8</b>	125	250	X	X	X	<b>32</b>	62,5	125	2,24
<b>107</b>	cyklohexylmethyl	250	250	>1000	>1000	62,5	125	250	<b>32</b>	62,5	125	1,99
<b>133</b>		<b>16</b>	<b>32</b>	500	500	X	X	X	<b>16</b>	<b>32</b>	62,5	2,26
<b>108</b>	adamantyl	<b>8</b>	<b>16</b>	>1000	>1000	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	62,5	1,84
<b>134</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	500	500	X	X	X	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	2,11
Kyselina <i>p</i> -aminosalicylová		<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>32</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>32</b>	<b>125</b>	<b>500</b>	<b>0,4</b>
Methyl- <i>p</i> -aminosalicylát		<b>250</b>	<b>250</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>0,66</b>
<b>INH</b>		<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>-0,64</b>
<b>EMB</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0,06</b>

X z důvodu změny testovaných kmenů (resp. zúžení) nebylo měřeno

Obě série připravených močovinných derivátů odvozených od PAS **83-108** a jejího methylesterového protějšku **109-134** ukázaly nízké hodnoty MIC. V případě kmene H37Rv začínala řada **83-108** na 8  $\mu$ M a **109-134** dokonce už na 1  $\mu$ M. Podobných hodnot bylo dosaženo i u atypických kmenů *M. kansasii*. Kmen *M. avium* 330/80 naopak vykazoval zvýšenou

rezistenci vůči oběma sériím s MIC začínající na 125  $\mu\text{M}$ . Analoga methylesterové řady **109-134** byla ve srovnání s **83-108** výrazně inhibičně účinnější. Přímý vztah mezi lipofilitou a SAR v těchto testech odhalen nebyl. Ve srovnání s výchozími standardy inhibiční aktivity připravených derivátů v některých případech výrazně převyšovaly jejich hodnoty. Kyselina *p*-aminosalicylová (H37Rv MIC = 62,5  $\mu\text{M}$  a atypické kmeny MIC  $\geq 32$   $\mu\text{M}$ ) ovšem na rozdíl od svých odvozených analog působila lépe vůči *M. avium* 330/88 (MIC = 32-125  $\mu\text{M}$ ). Methyl-*p*-aminosalicylát dosahoval proti kmeni H37Rv MIC = 250  $\mu\text{M}$  a vůči atypickým formám MIC  $\geq 1000$   $\mu\text{M}$ .

V řadě **83-108** byl preferován krátký řetězec v podobě methyly (**83**) a ethyly (**84**) či alicyklický cykloheptyl (**106**) a adamantyl (**108**) nebo případně aromatický fenylbutyl (**104**). U kmene H37Rv se ukázal nejvýhodnější methylový substituent (**83**) s MIC 8  $\mu\text{M}$ . Podobných inhibičních hodnot dosáhl i adamantylový **108** analog (MIC  $\geq 8$   $\mu\text{M}$ ) následovaný cykloheptylovým **106**, fenylbutylovým **104** a ethylovým **84** derivátem s inhibičními koncentracemi začínajícími na 32  $\mu\text{M}$ . Hodnoty ostatních derivátů už byly výrazně vyšší (MIC  $\geq 125$   $\mu\text{M}$ ) s mezistupněm u tridecylového (**95**) a fenylpropylového (**103**) analoga s MIC = 62,5  $\mu\text{M}$ . Kmeny *M. kansasii* ukázaly podobné zákonitosti SAR s rozdílem, že zde byl účinnější spíše alicyklický **106** a **108** (MIC = 8-125  $\mu\text{M}$ ), arylalkylový **103** a **104** (MIC = 32-250  $\mu\text{M}$ ) a methylový **83** analog s MIC = 32-62,5  $\mu\text{M}$ . Celkově nejlepších výsledků z celé řady dosahovala vůči testovanému spektru bez *M. avium* 4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoová kyselina (**108**) s rozsahem MIC 8-62,5  $\mu\text{M}$ .

V methylesterové řadě **109-134** naopak krátké řetězce typu methyl a ethyl aktivitu nepřinesly. Vyšší inhibiční aktivita byla pozorována u analog se středně dlouhými substituenty, které zase naopak nebyly účinné v případě derivátů řady **83-108**. Středně dlouhé řetězce od hexylu až po tridecyl (**114**, **115**, **116**, **117**, **118**, **119**, **120** a **121**) měly H37Rv MIC = 1-32  $\mu\text{M}$ . Zejména undecylový (**119**) a dodecylový (**120**) derivát vykazovaly výbornou inhibiční aktivitu proti kmeni H37Rv s MIC = 1-2  $\mu\text{M}$ , která byla srovnatelná s INH či EMB a zároveň spolu s adamantylovým analogem **134** úplně nejvyšší z celé série. Podobné SAR jako řada **83-108** přinesl vliv alicyklického cykloheptylu (**132**) s adamantylem (**134**) a arylalkylového fenylbutylu (**130**) na inhibiční vlastnosti. Zajímavé bylo srovnání cyklohexylových (**105** a **131**), cyklohexylmethylových (**107** a **133**) a fenylových (**100** a **126**) analog, kde byla pozorována aktivita výhradně u derivátů řady **109-134**. Velmi nízkých hodnot inhibice dosáhl z alicyklické skupiny methyl-4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoát (**134**) s H37Rv

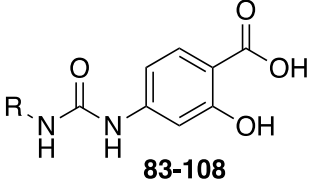


MIC = 1-2  $\mu\text{M}$ . Hodnoty ostatních alicyklických analog **131**, **132** a **133** byly H37Rv MIC = 4-62,5  $\mu\text{M}$ . Arylalkylový fenylbutylový derivát **130** měl H37Rv MIC = 32-62,5  $\mu\text{M}$  a fenyl (**126**) H37Rv MIC = 16-32  $\mu\text{M}$ . Ostatní arylalkylová analoga (benzyl, fenylethyl a fenylpropyl) měla nízkou inhibiční aktivitu. Podobných zákonitostí jako u kmene H37Rv bylo pozorováno i u atypického druhu *M. kansasii*. Byl rovněž odhalen příznivý vliv středně dlouhého alkylového řetězce od hexylu po tridecyl (**114**, **115**, **116**, **117**, **118**, **119**, **120** a **121**) s H37Rv MIC = 1-62,5  $\mu\text{M}$  a to zejména delšího undecylu (**119**), dodecylu (**120**) a tridecylu (**121**), jejichž hodnoty proti oběma kmenům *M. kansasii* byly v rozmezí 1-8  $\mu\text{M}$ . Inhibiční koncentrace alicyklických analog (**131**, **132**, **133** a **134**) proti *M. kansasii* 6509/96 byly 16-250  $\mu\text{M}$  a u fenylvého (**126**) a fenylbutylového derivátu (**130**) pak MIC = 16-62,5  $\mu\text{M}$ .

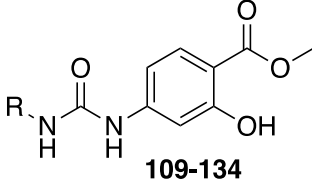
#### 5.4.1.3 Hodnocení antimykobakteriální aktivity proti lékově-rezistentním kmenům

Látky s nejvyššími inhibičními aktivitami z obou sérií byly současně otestovány vůči kmenům *M. tuberculosis* (Tabulka 11), jež jsou různým způsobem rezistentní vůči současně užívaným léčivům, viz text pod tabulkou.

Tabulka 11 Minimální inhibiční koncentrace vybraných derivátů vůči rezistentním kmenům *Mycobacterium tuberculosis*



**83-108**



**109-134**

Kód	MIC [ $\mu\text{M}$ ]													
	PRAHA 1		PRAHA 4		PRAHA 131		9449/2007		234/2005		7357/1998		8666/2010	
	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d
<b>83</b>	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4
<b>116</b>	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8	16
<b>117</b>	4	8	4	8	4	8	8	16	8	16	4	8	8	8
<b>118</b>	8	8	8	8	4	8	8	8	8	8	8	16	8	8
<b>119</b>	4	4	4	4	2	4	4	4	4	8	4	4	4	4
<b>120</b>	4	4	4	4	2	4	4	4	4	8	4	4	4	4

<b>121</b>	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
<b>126</b>	32	62	32	62	32	62	32	32	32	62	32	62	16	32
<b>132</b>	8	8	8	16	8	16	8	8	16	32	8	16	8	16
<b>108</b>	8	16	8	16	8	16	8	8	8	16	8	16	8	16
<b>134</b>	2	2	2	4	2	4	2	2	2	4	2	4	2	4

MDR kmeny:

**7357/1998** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu a rifabutin;u;

**234/2005** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu a rifabutin;u;

**8666/2010** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, klofamidinu a rifabutin;u;

**9449/2007** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu a rifabutin;u;

**Praha 1** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, klofamidinu a rifabutin;u;

**Praha 4** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, klofamidinu a rifabutin;u.

XDR kmen:

**Praha 131** je rezistentní vůči INH, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, gentamicinu, rifabutin;u a amikacinu.

Vybrané deriváty kyseliny *p*-aminosalicylové (Tabulka 11) dosáhly nízkých inhibičních koncentrací vůči celému spektru rezistentních kmenů *M. tuberculosis*. Zvláště účinných aktivit bylo dosaženo u methyl-4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoátu **134** a 2-hydroxy-4-(3-methylureido)benzoové kyseliny **83** s hodnotami od 2 do 4  $\mu\text{M}$ . Naopak u zbylých cyklických analog (126, 132 a 108) byl pozorován opačný trend s nejvyššími koncentracemi v celém spektru mykobaterií (MIC = 8-62  $\mu\text{M}$ ). Zejména fenylový derivát **126** s MIC = 32-62  $\mu\text{M}$  byl celkově nejméně účinným analogem. U alifatické řady byly pozorovány hodnoty v rozmezí 2 až 16  $\mu\text{M}$ . Nejlepších výsledků z ní dosáhla 2-hydroxy-4-(3-methylureido)benzoová kyselina **83** (MIC = 2-4  $\mu\text{M}$ ) a nejhorších naopak oktylový **116** derivát (MIC = 8-16  $\mu\text{M}$ ). Ve srovnání výsledků s lékově citlivým kmenem H37Rv došlo ve většině případů k vyrovnání až mírnému poklesu aktivit. Výjimkou byl pouze methylový analog **83**, který byl proti tomu až 4x účinnější. Snížení inhibičních aktivit proti rezistentním kmenům je možná důsledkem zkřížené rezistence analog s výchozími strukturami, ale pro potvrzení této domněnky je třeba důkladnějšího rozboru problematiky spočívající v dalších testech a hodnocení.

#### 5.4.1.4 Hodnocení antibakteriální aktivity

Testování probíhalo proti dvěma bakteriálním G<sup>+</sup> kmenům *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* a dvěma G<sup>-</sup> kmenům *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* (Tabulka 12).

Tabulka 12 Antibakteriální hodnoty MIC prezentovaných derivátů PAS

Kód	MIC [ $\mu\text{M}$ ]							
	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)		<i>Enterococcus faecalis</i> (G+)		<i>Escherichia coli</i> (G-)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>83</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>109</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<b>84</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>110</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>85</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>111</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>86</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>112</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>87</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>113</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>88</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>114</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>89</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>115</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>90</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>116</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>91</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>117</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>92</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>118</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>93</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>119</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>94</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>120</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>95</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>121</b>	<b>62,5</b>	125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>96</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>122</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>97</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>123</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>98</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>124</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>99</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>125</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>100</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

126	-	-	-	-	-	-	-	-
101	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
127	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
102	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
128	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
103	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
129	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
104	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
130	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
105	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
131	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
106	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
132	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
107	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
133	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
108	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
134	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PAS	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Methyl-PAS	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Bacitracin	15,62	31,25	31,25	31,25	>500	>500	>500	>500

- nepodařilo se rozpustit v testovacím médiu

Většina měřených derivátů [4-(3-substituované-ureido)salicylové kyseliny **83-108** a methyl-4-(3-substituované-ureido)salicyláty **109-134**] proti G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriím nevykazovalo žádnou aktivitu (Tabulka 12). Relativně nižších hodnot dosáhl proti G<sup>+</sup> *Staphylococcus aureus* methyl-2-hydroxy-4-(3-tridecylureido)benzoát (**121**) s MIC = 62,5-125 μM. Avšak ani touto hodnotou se nevyrovnal použitému standardu bacitracinu, který proti stejnému kmeni dosahoval MIC = 15,62-31,25 μM. Nerozpustnost některých derivátů v testovacím médiu je připisována jejich vyšší lipofilitě danou délkou alkylového řetězce.

#### 5.4.1.5 Hodnocení antifungální aktivity

Součástí tohoto testování bylo hodnocení inhibičních aktivit proti dvěma kvasinkám *Candida albicans* s *Candida krusei* a dvěma vláknitým houbám *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera* (Tabulka 13).

Tabulka 13 Přehled MIC testovaných sloučenin vůči fungálním patogenům

Kód	MIC [ $\mu\text{M}$ ]							
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Absidia corymbifera</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>83</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>109</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>84</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>110</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>85</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>111</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>86</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>112</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<b>87</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>113</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>88</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>114</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>89</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>115</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>90</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>116</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>91</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>117</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>92</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>118</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>93</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>119</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>94</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>120</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>95</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>121</b>	125	125	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	>125	>125	>125	>125
<b>96</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>122</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>97</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>123</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>98</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>124</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>99</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>125</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>100</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>126</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>101</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<b>127</b>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
<b>102</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>128</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>103</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>129</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>104</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>130</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>105</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>131</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>106</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>132</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>107</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>133</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>108</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>134</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>PAS</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>Methyl-PAS</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>Flukonazol</b>	<b>0,24</b>	<b>0,24</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500

- nepodařilo se rozpustit v testovacím médiu

Nízká aktivita připravených derivátů byla pozorována i v rámci hodnocení inhibičních koncentrací u kvasinek a vláknitých hub (Tabulka 13). Testovaná analoga vysokou aktivitu nevykazovala a zřetelnějších hodnot bylo pozorováno pouze v případě methyl-2-hydroxy-4-(3-tridecylureido)benzoátu (**121**) s MIC 31,25  $\mu\text{M}$  u kvasinky *Candida krusei*. Obecným problémem byla nižší rozpustnost v testovacím médiu u lipofilnějších analog.

#### 5.4.1.6 Závěrečný komentář

Z celkového počtu 52 derivátů byla účinnější methylesterová řada **109-134** oproti volné karboxylové **83-108**. V řadě **83-108** byly účinné zejména deriváty s krátkým řetězcem **83** a **84** (methyl a ethyl), případně alicyklickým cykloheptylem **106** a adamantylem **108** nebo aromatickým fenylbutylem **104**. Pro řadu **109-134** byl naopak výhodnější středně dlouhý řetězec od hexylu po tridecyl (**114** až **121**) či celá alicyklická část s methyl-4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoátem (**134**) prioritně nebo fenyl (**126**) a fenylbutyl (**130**) ze skupiny aromatické. Vůči ostatním bakteriím, vláknitým houbám a kvasinkám připravená analoga stejně jako jejich výchozí struktury aktivitu nevykazovala, což značí vyšší selektivitu k mykobakteriálním kmenům či specifický mechanismus účinku. Výjimkou byl pouze methyl-2-hydroxy-4-(3-tridecylureido)benzoát **121** vůči *Staphylococcus aureus* a *Candida krusei*

s inhibiční aktivitou začínající od 31,25  $\mu\text{M}$ . Naopak inhibiční koncentrace vůči mykobakteriím některých analog výrazně převyšovala své výchozí látky (PAS a methyl-*p*-aminosalicylát), vyrovnaly se standardům INH a EMB a jsou tedy značným příslibem pro další experimentální a teoretický vývoj této problematiky. Konkrétně methyl-2-hydroxy-4-(3-undecylureido)benzoát (**119**), methyl-4-(3-dodecylureido)-2-hydroxybenzoát (**120**) a methyl-4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoát (**134**) s inhibičními koncentracemi v rozsahu 1-2  $\mu\text{M}$  u kmene H37Rv. Proti rezistentním kmenům *M. tuberculosis* inhibiční aktivity derivátů nevymizely. Nejvýhodnější vlastnosti měly 2-hydroxy-4-(3-methylureido)benzoová kyselina (**83**) a methyl-4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoát (**134**), oba MIC = 2-4  $\mu\text{M}$ .

#### 5.4.1.7 Chemická charakterizace připravených derivátů

##### 5.4.1.7.1 Deriváty *p*-aminosalicylové kyseliny (83-134)

###### 2-Hydroxy-4-(3-methylureido)benzoová kyselina (**83**)

Bílá krystalická látka; Metoda A; t. t. 213.2-214.9 °C; Výtěžek: 40 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3051, 2940, 1680, 1494, 1235, 1189, 1163, 773, 735;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  13.38 (s, 1H), 11.26 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 7.60 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.81 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 2.63 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  172.20, 162.85, 155.77, 147.88, 131.31, 109.25, 105.69, 104.05, 26.57; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$  (210.19): C, 51.43; H, 4.80; N, 13.33. Nalezeno: C, 51.25; H, 4.72; N, 13.48.

###### 2-Hydroxy-4-(3-ethylureido)benzoová kyselina (**84**)<sup>159</sup>

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 181.6-183.4 °C; Výtěžek: 44 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3329, 2985, 1643, 1557, 1234, 1191, 786, 735. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

###### 2-Hydroxy-4-(3-propylureido)benzoová kyselina (**85**)<sup>159</sup>

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 197.5-199 °C; Výtěžek: 51 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3322, 2972, 1644, 1595, 1557, 1271, 784, 696. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

###### 2-Hydroxy-4-(3-butylureido)benzoová kyselina (**86**)<sup>159</sup>

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 192.1-194.3 °C; Výtěžek: 57 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3343, 2963, 2873, 1683, 1595, 1242, 1198, 774, 689. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

###### 2-Hydroxy-4-(3-pentylureido)benzoová kyselina (**87**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 182.8-184.3 °C; Výtěžek: 55 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3331, 2954, 2930, 1645, 1557, 1229, 780, 671;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  13.39 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.61 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.79 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 6.30 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.09-3.03 (m, 2H), 1.45-1.38 (m, 2H), 1.35-1.19 (m, 4H), 0.87 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  171.93, 162.60, 154.74, 147.50, 131.06, 108.97, 105.48, 103.80, 39.16, 29.43, 28.73, 22.03, 14.11; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$  (266.30): C, 58.63; H, 6.81; N, 10.52. Nalezeno: C, 58.44; H, 6.60; N, 10.87.

#### 2-Hydroxy-4-(3-hexylureido)benzoová kyselina (**88**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 181.5-183.1 °C; Výtěžek: 62 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3330, 2958, 2929, 2858, 1639, 1555, 1240, 780, 669; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.37 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 6.30 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.06 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.44-1.37 (m, 2H), 1.31-1.21 (m, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.22, 162.89, 155.03, 147.79, 131.34, 109.25, 105.75, 104.08, 40.18, 31.45, 30.00, 26.48, 22.54, 14.36; Anal. Calcd. pro C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (280.32): C, 59.99; H, 7.19; N, 9.99. Nalezeno: C, 60.06; H, 7.30; N, 9.80.

#### 2-Hydroxy-4-(3-heptylureido)benzoová kyselina (**89**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 181.4-183.2 °C; Výtěžek: 60 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3333, 2954, 2928, 2857, 1640, 1555, 1234, 780, 670; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.39 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 6.30 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.06 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.45-1.37 (m, 2H), 1.30-1.20 (m, 8H), 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.22, 162.89, 155.03, 147.79, 131.34, 109.24, 105.74, 104.08, 40.32, 31.72, 30.04, 28.89, 26.78, 22.51, 14.38; Anal. Calcd. pro C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (294.35): C, 61.21; H, 7.53; N, 9.52. Nalezeno: C, 61.26; H, 7.80; N, 9.63.

#### 2-Hydroxy-4-(3-oktylureido)benzoová kyselina (**90**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 172.6-174 °C; Výtěžek: 62 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3332, 2957, 2925, 2854, 1640, 1554, 1237, 814, 670; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.38 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 6.38 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.06 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.44-1.36 (m, 2H), 1.30-1.20 (m, 10H), 0.85 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.95, 162.62, 154.79, 147.55, 131.05, 108.94, 105.43, 103.75, 40.03, 31.32, 29.76, 28.90, 28.86, 26.54, 22.26, 14.10; Anal. Calcd. pro C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (308.38): C, 62.32; H, 7.84; N, 9.08. Nalezeno: C, 62.19; H, 7.67; N, 9.22.

#### 2-Hydroxy-4-(3-nonylureido)benzoová kyselina (**91**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 178.1-180 °C; Výtěžek: 55 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3336, 2954, 2925, 2850, 1638, 1556, 1229, 780, 670; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.41 (s, 1H), 11.37 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 6.45 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.05 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.43-1.36 (m, 2H), 1.30-1.18 (m, 12H), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.03, 162.67, 154.87, 147.62, 131.08, 108.94, 105.45, 103.74, 40.18, 31.51, 29.81, 29.22, 29.01, 28.91, 26.58, 22.32, 14.17; Anal. Calcd. pro C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (322.41): C, 63.33; H, 8.13; N, 8.69. Nalezeno: C, 63.20; H, 8.30; N, 8.85.

#### 4-(3-Decylureido)-2-hydroxybenzoová kyselina (**92**)

Bílá krystalická látka; Metoda D; t. t. 174.3-176.1 °C; Výtěžek: 53 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3335, 3292, 2957, 2922, 2850, 1683, 1555, 1245, 1183, 815, 672; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.41 (s, 1H), 11.35 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 6.44 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.05 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.43-1.35 (m, 2H), 1.30-1.17 (m, 14H), 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.01, 162.65, 154.84, 147.61, 131.06, 108.94, 105.41, 103.73, 40.32, 31.52, 29.80, 29.26, 28.99, 28.94, 28.92, 26.45, 22.32, 14.17; Anal. Calcd. pro C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (336.43): C, 64.26; H, 8.39; N, 8.33. Nalezeno: C, 64.33; H, 8.28; N, 8.52.

#### 2-Hydroxy-4-(3-undecylureido)benzoová kyselina (**93**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 174.1-175.8 °C; Výtěžek: 58 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3336, 2954, 2923, 2849, 1639, 1556, 1466, 1240, 780, 669; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.40 (s, 1H), 11.35 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 6.48 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.05 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.43-1.36 (m, 2H), 1.31-1.17 (m, 16H), 0.84 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.01, 162.66, 154.87, 147.63, 131.05, 108.93, 105.38,



103.71, 40.03, 31.52, 29.81, 29.65, 29.25, 29.23, 29.18, 28.95, 26.57, 22.33, 14.17; Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{30}N_2O_4$  (350.46): C, 65.12; H, 8.63; N, 7.99. Nalezeno: C, 65.25; H, 8.51; N, 8.12.

#### 4-(3-Dodecylureido)-2-hydroxybenzoová kyselina (94)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 167.6-169.1 °C; Výtěžek: 61 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3335, 2958, 2921, 2848, 1667, 1555, 1236, 1182, 790, 670;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.48 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 7.58 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.12 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J = 8.7, 2.0$  Hz, 1H), 6.63 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 3.05 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 1.43-1.34 (m, 2H), 1.30-1.16 (m, 18H), 0.84 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.13, 162.75, 155.05, 147.29, 130.99, 108.63, 106.39, 103.75, 40.11, 31.55, 29.87, 29.31, 29.28, 29.27, 29.24, 29.02, 28.97, 26.61, 22.34, 14.19; Anal. Calcd. pro  $C_{20}H_{32}N_2O_4$  (364.49): C, 65.91; H, 8.85; N, 7.69. Nalezeno: C, 65.70; H, 8.78; N, 7.50.

#### 2-Hydroxy-4-(3-tridecylureido)benzoová kyselina (95)

Bílá krystalická látka; Metoda D; t. t. 168.8-170.6 °C; Výtěžek: 45 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3335, 2954, 2920, 2849, 1639, 1557, 1235, 779, 722;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.38 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.80 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H), 6.49 (m, 1H), 3.05 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 1.44-1.36 (m, 2H), 1.31-1.15 (m, 20H), 0.86-0.82 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.93, 162.59, 154.84, 147.59, 130.99, 108.88, 105.35, 103.67, 40.03, 31.45, 29.74, 29.22, 29.20, 29.17, 29.09, 28.87, 28.69, 27.11, 26.49, 22.25, 14.10; Anal. Calcd. pro  $C_{21}H_{34}N_2O_4$  (378.51): C, 66.64; H, 9.05; N, 7.40. Nalezeno: C, 66.72; H, 9.37; N, 7.57.

#### 2-Hydroxy-4-(3-tetradecylureido)benzoová kyselina (96)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 172.4-174.3 °C; Výtěžek: 52 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3336, 2957, 2920, 2849, 1639, 1555, 1231, 814, 670;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.27 (s, 1H), 11.44 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.80 (dd,  $J = 8.7, 2.4$  Hz, 1H), 6.53 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.05 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 1.43-1.36 (m, 2H), 1.30-1.16 (m, 22H), 0.84 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.95, 162.62, 154.88, 147.58, 130.99, 108.85, 105.46, 103.68, 40.03, 31.47, 29.76, 29.25, 29.23, 29.21, 29.19, 29.18, 29.16, 28.92, 28.88, 26.51, 22.26, 14.11; Anal. Calcd. pro  $C_{22}H_{36}N_2O_4$  (392.54): C, 67.32; H, 9.24; N, 7.14. Nalezeno: C, 67.19; H, 9.20; N, 7.01.

#### 2-Hydroxy-4-(3-pentadecylureido)benzoová kyselina (97)

Bílá krystalická látka; Metoda D; t. t. 177.5-179.1 °C; Výtěžek: 45 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3335, 2954, 2920, 2849, 1639, 1556, 1230, 722, 671;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.21 (s, 1H), 11.35 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.80 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 6.60 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.05 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 1.42-1.36 (m, 2H), 1.30-1.15 (m, 24H), 0.84 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.96, 162.63, 154.92, 147.66, 130.97, 108.86, 105.34, 103.65, 40.03, 31.48, 29.78, 29.24, 29.22, 29.20, 29.18, 29.17, 29.14, 29.04, 28.95, 28.90, 26.53, 22.28, 14.11; Anal. Calcd. pro  $C_{23}H_{38}N_2O_4$  (406.57): C, 67.95; H, 9.42; N, 6.89. Nalezeno: C, 67.82; H, 9.35; N, 6.94.

#### 4-(3-Hexadecylureido)-2-hydroxybenzoová kyselina (98)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 186.2-188 °C; Výtěžek: 59 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3336, 2957, 2919, 2849, 1639, 1556, 1226, 780, 669;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.22 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.80-6.69 (m, 2H), 3.03 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.43-1.34 (m, 2H), 1.31-1.11 (m, 26H), 0.83 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.19, 162.71, 155.09, 147.11, 130.87, 108.42, 106.78, 103.67, 40.04, 31.50, 29.85, 29.28, 29.26, 29.24, 29.23, 29.22, 29.20, 29.18, 29.16, 29.00, 28.92, 26.58, 22.29, 14.11; Anal. Calcd. pro  $C_{24}H_{40}N_2O_4$  (420.59): C, 68.54; H, 9.59; N, 6.66. Nalezeno: C, 68.48; H, 9.67; N, 6.83.

#### 2-Hydroxy-4-(3-oktadecylureido)benzoová kyselina (99)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 177.3-178.8 °C; Výtěžek: 63 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3335, 2957, 2919, 2848, 1639, 1556, 1250, 779, 670;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.33 (s, 1H), 11.45 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 6.79 (dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, 1H), 6.49 (t,  $J$

= 5.7 Hz, 1H), 3.05 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 1.43-1.35 (m, 2H), 1.29-1.17 (m, 30H), 0.84 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.93, 162.60, 154.84, 147.51, 130.96, 108.81, 105.53, 103.67, 40.23, 31.44, 29.74, 29.25, 29.23, 29.21, 29.20, 29.19, 29.18, 29.17, 29.16, 29.15, 29.13, 28.89, 28.85, 26.49, 22.24, 14.09; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$  (448.65): C, 69.61; H, 9.89; N, 6.24. Nalezeno: C, 69.56; H, 9.72; N, 6.50.

#### 2-Hydroxy-4-(3-fenylureido)benzoová kyselina (**100**)<sup>160, 161</sup>

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 216.9-218.2 °C [literatura: 242 °C]; Výtěžek: 60 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3307, 3103, 1643, 1551, 1242, 733, 660;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.52 (s, 1H), 11.38 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.47-7.44 (m, 2H), 7.31-7.27 (m, 2H), 7.21 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.99 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 6.89 (dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.89, 162.54, 152.24, 146.62, 139.39, 131.24, 129.00 (2), 122.43, 118.61 (2), 109.43, 106.35, 104.52; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$  (272.26): C, 61.76; H, 4.44; N, 10.29. Nalezeno: C, 61.53; H, 4.36; N, 10.03.

#### 4-(3-Benzylureido)-2-hydroxybenzoová kyselina (**101**)<sup>162</sup>

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 196.1-198 °C [literatura: 180-182 °C]; Výtěžek: 57 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3306, 3030, 1652, 1558, 1230, 781, 696. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

#### 2-Hydroxy-4-(3-fenylethylureido)benzoová kyselina (**102**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 186.7-188.2 °C; Výtěžek: 54 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3340, 3027, 1641, 1553, 1261, 783, 701;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.41 (s, 1H), 11.34 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 7.61 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.34-7.16 (m, 6H), 6.79 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 6.33 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.34 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.75 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.21, 162.88, 155.02, 147.71, 139.87, 131.37, 129.12 (2), 128.82 (2), 126.56, 109.27, 105.83, 104.14, 41.03, 36.11; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$  (300.31): C, 63.99; H, 5.37; N, 9.33. Nalezeno: C, 63.86; H, 5.52; N, 9.44.

#### 2-Hydroxy-4-[3-(3-fenylpropyl)ureido]benzoová kyselina (**103**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 166.1-168.1 °C; Výtěžek: 56 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3313, 3026, 2941, 2865, 1641, 1557, 1232, 779, 660;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.33 (s, 1H), 11.32 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 7.62 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.30-7.16 (m, 6H), 6.82 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 3.12-3.06 (m, 2H), 2.63-2.54 (m, 2H), 1.76-1.69 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.95, 162.61, 154.84, 147.53, 141.81, 131.08, 128.43 (4), 125.91, 109.00, 105.48, 103.83, 38.81, 32.63, 31.56; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$  (314.34): C, 64.96; H, 5.77; N, 8.91. Nalezeno: C, 65.12; H, 5.98; N, 9.02.

#### 2-Hydroxy-4-[3-(4-fenylbutyl)ureido]benzoová kyselina (**104**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 171.3-172.9 °C; Výtěžek: 58 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3324, 3027, 2937, 2859, 1641, 1557, 1237, 1225, 780, 696;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.38 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 7.61 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.28-7.13 (m, 6H), 6.80 (dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 3.15-3.06 (m, 2H), 2.62-2.53 (m, 2H), 1.62-1.52 (m, 2H), 1.47-1.38 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.95, 162.61, 154.80, 147.54, 142.30, 131.07, 128.46 (4), 125.82, 108.98, 105.45, 103.80, 38.98, 35.01, 29.47, 28.56; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$  (328.37): C, 65.84; H, 6.14; N, 8.53. Nalezeno: C, 65.86; H, 5.98; N, 8.33.

#### 4-(3-Cyklohexylureido)-2-hydroxybenzoová kyselina (**105**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 205.6-207.2 °C; Výtěžek: 60 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3307, 2935, 2854, 1638, 1566, 1243, 779, 660;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.40 (s, 1H), 11.34 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.61 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.77 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 6.28 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 3.50-3.42 (m, 1H), 1.84-1.73 (m, 2H), 1.69-1.60 (m, 2H), 1.56-1.48 (m, 1H), 1.34-1.25 (m, 2H), 1.22-1.11 (m, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.94, 162.62, 153.96, 147.47, 131.10,

108.92, 105.47, 103.73, 47.81, 32.94 (2), 25.37, 24.45 (2); Anal. Calcd. pro  $C_{14}H_{18}N_2O_4$  (278.31): C, 60.42; H, 6.52; N, 10.07. Nalezeno: C, 60.20; H, 6.42; N, 9.88.

#### 4-(3-Cykloheptylureido)-2-hydroxybenzoová kyselina (**106**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 191.6-193.1 °C; Výtěžek: 59 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3327, 2933, 2859, 1662, 1552, 1230, 1189, 768, 655;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.33 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.77 (dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 3.70-3.64 (m, 1H), 1.87-1.74 (m, 2H), 1.63-1.34 (m, 10H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.94, 162.63, 153.91, 147.55, 131.07, 108.88, 105.38, 103.65, 49.98, 34.82 (2), 27.84 (2), 23.61 (2); Anal. Calcd. pro  $C_{15}H_{20}N_2O_4$  (292.34): C, 61.63; H, 6.90; N, 9.58. Nalezeno: C, 61.49; H, 6.80; N, 9.72.

#### 4-[3-(Cyklohexylmethyl)ureido]-2-hydroxybenzoová kyselina (**107**)

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 176.8-178.4 °C; Výtěžek: 55 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3320, 2927, 2853, 1645, 1568, 1228, 781, 672;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.39 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 7.60 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.79 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 6.46 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 2.93 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 1.75-1.56 (m, 5H), 1.40-1.32 (m, 1H), 1.24-1.10 (m, 3H), 0.94-0.83 (m, 2H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.56, 163.23, 155.49, 148.18, 131.67, 109.53, 106.01, 104.32, 46.00, 39.67, 31.09 (2), 26.84, 26.20 (2); Anal. Calcd. pro  $C_{15}H_{20}N_2O_4$  (292.34): C, 61.63; H, 6.90; N, 9.58. Nalezeno: C, 61.56; H, 6.78; N, 9.63.

#### 4-[3-(Adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoová kyselina (**108**)<sup>163</sup>

Bílá krystalická látka; Metoda B; t. t. 183.6-185.1 °C [literatura: 205-206 °C]; Výtěžek: 51 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 2907, 2851, 1663, 1540, 1223, 778, 668;  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.93, 162.62, 153.63, 147.75, 130.99, 108.79, 105.16, 103.46, 50.17, 41.69 (3), 36.20 (3), 29.05 (3); Anal. Calcd. pro  $C_{18}H_{22}N_2O_4$  (330.38): C, 65.44; H, 6.71; N, 8.48. Nalezeno: C, 65.53; H, 6.47; N, 8.28. Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.

### 5.4.1.7.2 Deriváty methylesteru *p*-aminosalicylové kyseliny (109-134)

#### Methyl-2-hydroxy-4-(3-methylureido)benzoát (**109**)

Bílá krystalická látka; Metoda A; t. t. 145.3-147 °C; Výtěžek: 39 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3317, 2952, 1673, 1602, 1269, 1155, 776, 684;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.82 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.47 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.11 (dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, 1H), 5.98 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.12 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  170.16, 168.76, 162.71, 146.24, 130.59, 110.23, 106.10, 104.30, 51.73, 23.65; Anal. Calcd. pro  $C_{10}H_{12}N_2O_4$  (224.22): C, 53.57; H, 5.39; N, 12.49. Nalezeno: C, 53.35; H, 5.64; N, 12.38.

#### Methyl-4-(3-ethylureido)-2-hydroxybenzoát (**110**)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 205.3-207.1 °C; Výtěžek: 51 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3350, 3208, 2969, 1680, 1594, 1241, 1149, 771 674;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.27-3.21 (m, 2H), 1.12 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  171.13, 163.74, 155.25, 148.76, 131.30, 110.04, 106.11, 105.16, 52.34, 35.23, 15.65; Anal. Calcd. pro  $C_{11}H_{14}N_2O_4$  (238.24): C, 55.46; H, 5.92; N, 11.76. Nalezeno: C, 55.40; H, 5.82; N, 11.64.

#### Methyl-2-hydroxy-4-(3-propylureido)benzoát (**111**)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 151.4-153.2 °C; Výtěžek: 61 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3343, 3264, 2957, 1677, 1645, 1557, 1226, 1191, 773, 698;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.18 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.59-1.47 (m, 2H), 0.91 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  171.11, 163.73, 155.39, 148.70, 131.30, 110.05, 106.14, 105.18, 52.33, 42.17, 23.96, 11.54;

Anal. Calcd. pro  $C_{12}H_{16}N_2O_4$  (252.27): C, 57.13; H, 6.39; N, 11.10. Nalezeno: C, 57.35; H, 6.04; N, 11.27.

#### Methyl-4-(3-butylureido)-2-hydroxybenzoát (112)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 159.8-161.5 °C; Výtěžek: 54 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3343, 3107, 2933, 1645, 1593, 1277, 1195, 783, 666;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.22 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.55-1.44 (m, 2H), 1.43-1.31 (m, 2H), 0.92 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  181.12, 173.74, 165.35, 158.73, 141.30, 120.04, 116.11, 115.16, 62.34, 50.07, 42.96, 30.59, 24.01; Anal. Calcd. pro  $C_{13}H_{18}N_2O_4$  (266.30): C, 58.63; H, 6.81; N, 10.52. Nalezeno: C, 58.47; H, 6.95; N, 10.36.

#### Methyl-2-hydroxy-4-(3-pentylureido)benzoát (113)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 139.7-141.2 °C; Výtěžek: 63 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3319, 2964, 2935, 1645, 1573, 1245, 1192, 882, 700;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.21 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.55-1.50 (m, 2H), 1.41-1.28 (m, 4H), 0.90 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  171.12, 163.74, 155.36, 148.72, 131.31, 110.04, 106.12, 105.17, 52.34, 40.38, 30.54, 29.74, 23.03, 14.26; Anal. Calcd. pro  $C_{14}H_{20}N_2O_4$  (280.32): C, 59.99; H, 7.19; N, 9.99. Nalezeno: C, 59.68; H, 7.23; N, 10.06.

#### Methyl-4-(3-hexylureido)-2-hydroxybenzoát (114)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 111.8-113.3 °C; Výtěžek: 58 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3325, 2957, 2932, 1666, 1566, 1262, 1150, 774, 701;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.21 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.56-1.47 (m, 2H), 1.45-1.25 (m, 6H), 0.89 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  171.11, 163.73, 155.38, 148.71, 131.30, 110.05, 106.11, 105.17, 52.33, 40.41, 32.27, 30.82, 27.24, 23.24, 14.26; Anal. Calcd. pro  $C_{15}H_{22}N_2O_4$  (294.35): C, 61.21; H, 7.53; N, 9.52. Nalezeno: C, 61.38; H, 7.42; N, 9.78.

#### Methyl-4-(3-heptylureido)-2-hydroxybenzoát (115)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 100.1-101.8 °C; Výtěžek: 59 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3267, 2946, 2931, 1673, 1646, 1281, 1192, 1149, 782, 726;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.79 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.24 (dd,  $J = 8.7, 2.2$  Hz, 1H), 5.90 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.24-3.18 (m, 2H), 1.55-1.23 (m, 10H), 0.96-0.86 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  165.64, 155.34, 153.05, 146.72, 132.65, 117.43, 114.55, 113.33, 51.77, 40.40, 32.55, 30.87, 30.20, 27.42, 23.23, 14.29; Anal. Calcd. pro  $C_{16}H_{24}N_2O_4$  (308.38): C, 62.32; H, 7.84; N, 9.08. Nalezeno: C, 62.16; H, 7.71; N, 9.22.

#### Methyl-2-hydroxy-4-(3-oktylureido)benzoát (116)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 119-120.6 °C; Výtěžek: 58 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3380, 2952, 2929, 1672, 1555, 1439, 1348, 1228, 780, 724;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 8.6, 2.2$  Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.24-3.19 (m, 2H), 1.55-1.49 (m, 2H), 1.38-1.26 (m, 10H), 0.91-0.86 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  171.12, 163.74, 155.36, 148.73, 131.30, 110.04, 106.11, 105.17, 52.33, 40.41, 32.53, 30.87, 30.03, 29.99, 27.58, 23.27, 14.30; Anal. Calcd. pro  $C_{17}H_{26}N_2O_4$  (322.41): C, 63.33; H, 8.13; N, 8.69. Nalezeno: C, 63.15; H, 8.37; N, 8.44.

#### Methyl-2-hydroxy-4-(3-nonylureido)benzoát (117)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 108.2-110 °C; Výtěžek: 60 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3384, 2925, 2852, 1673, 1553, 1256, 1227, 819, 726;  $^1H$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 3.91 (s,

3H), 3.22 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.56-1.49 (m, 2H), 1.36-1.23 (m, 12H), 0.89 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  171.12, 163.74, 155.37, 148.71, 131.30, 110.05, 106.12, 105.18, 52.34, 40.42, 32.57, 30.87, 30.28, 30.08, 29.98, 27.57, 23.28, 14.31; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$  (336.43): C, 64.26; H, 8.39; N, 8.33. Nalezeno: C, 64.19; H, 8.30; N, 8.43.

#### Methyl-4-(3-decylureido)-2-hydroxybenzoát (118)

Bílá krystalická látka; Metoda D; t. t. 126.5-128 °C; Výtěžek: 48 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3261, 2923, 1676, 1541, 1287, 638;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.66 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.72 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.30 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.09-2.98 (m, 2H), 1.48-1.38 (m, 2H), 1.32-1.19 (m, 14H), 0.88-0.82 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  165.43, 155.58, 153.26, 146.88, 132.57, 117.03, 114.37, 113.30, 51.46, 40.87, 32.86, 31.59, 31.18, 30.89, 30.62, 27.87, 25.14, 23.54, 14.42; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$  (350.46): C, 65.12; H, 8.63; N, 7.99. Nalezeno: C, 64.98; H, 8.46; N, 8.15.

#### Methyl-2-hydroxy-4-(3-undecylureido)benzoát (119)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 99.7-101.5 °C; Výtěžek: 55 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3334, 2922, 2848, 1636, 1556, 1437, 1267, 1178, 673;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ )  $\delta$  10.82 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.66 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.94 (dd,  $J = 8.7, 2.2$  Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.22 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.57-1.49 (m, 2H), 1.40-1.16 (m, 16H), 0.88 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  169.57, 161.88, 154.70, 147.68, 130.76, 109.29, 105.10, 103.97, 52.20, 40.20, 31.49, 29.73, 29.22, 29.20, 29.18, 28.94, 28.91, 26.52, 22.28, 14.11; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$  (364.49): C, 65.91; H, 8.85; N, 7.69. Nalezeno: C, 65.86; H, 8.71; N, 7.88.

#### Methyl-4-(3-dodecylureido)-2-hydroxybenzoát (120)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 114.2-116 °C; Výtěžek: 63 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3334, 2921, 2848, 1669, 1556, 1777, 810;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.63 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 7.62 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.83 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.08-3.03 (m, 2H), 1.47-1.10 (s, 20H), 0.84 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  171.14, 164.04, 155.19, 148.83, 131.23, 109.75, 106.13, 105.23, 52.04, 40.52, 32.86, 31.23, 30.66, 30.64, 30.63, 30.49, 30.32, 27.86, 25.15, 23.55, 14.42; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4$  (378.51): C, 66.64; H, 9.05; N, 7.40. Nalezeno: C, 66.74; H, 9.08; N, 7.52.

#### Methyl-2-hydroxy-4-(3-tridecylureido)benzoát (121)

Bílá krystalická látka; Metoda D; t. t. 94.1-95.7 °C; Výtěžek: 45 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3334, 2920, 2848, 1637, 1556, 1268, 1178, 753, 651;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  10.77 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.11 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.87 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.18 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.40-1.24 (m, 20 H), 0.90 (t,  $J = 6.6$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  171.18, 164.04, 155.32, 149.00, 131.09, 109.77, 106.00, 105.04, 52.02, 40.48, 32.87, 31.23, 30.66, 30.64, 30.63, 30.49, 30.40, 30.32, 27.90, 25.81, 23.56, 14.43; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4$  (392.54): C, 67.32; H, 9.24; N, 7.14. Nalezeno: C, 67.50; H, 9.17; N, 7.06.

#### Methyl-2-hydroxy-4-(3-tetradecylureido)benzoát (122)

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 112.5-114.2 °C; Výtěžek: 64 %; IR ( $\text{cm}^{-1}$ , ATR-Ge): 3321, 2921, 2849, 1678, 1638, 1556, 1177, 641;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  10.77 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.08 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.98 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.65 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.18 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 1.54-1.47 (m, 2H), 1.38-1.25 (m, 22H), 0.90 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  171.15, 164.05, 155.16, 148.86, 131.12, 109.74, 106.12, 105.10, 52.04, 40.51, 32.87, 31.22, 30.74, 30.64, 30.61, 30.56, 30.42, 30.38, 30.31, 30.20, 27.87, 23.55, 14.43; Anal. Calcd. pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$  (406.57): C, 67.95; H, 9.42; N, 6.89. Nalezeno: C, 67.78; H, 9.20; N, 7.02.

**Methyl-2-hydroxy-4-(3-pentadecylureido)benzoát (123)**

Bílá krystalická látka; Metoda D; t. t. 102.6-104.4 °C; Výtěžek: 44 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3333, 2920, 2849, 1637, 1557, 1468, 1178, 721; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 10.77 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.77 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.20-3.16 (m, 2H), 1.54-1.46 (m, 2H), 1.42-1.24 (m, 24H), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 171.17, 164.05, 155.22, 148.97, 131.09, 109.75, 106.03, 105.05, 52.02, 40.48, 32.87, 31.23, 30.72, 30.65, 30.62, 30.58, 30.52, 30.48, 30.41, 30.39, 30.31, 27.89, 23.56, 14.43; Anal. Calcd. pro C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (420.59): C, 68.54; H, 9.59; N, 6.66. Nalezeno: C, 68.40; H, 9.37; N, 6.84.

**Methyl-4-(3-hexadecylureido)-2-hydroxybenzoát (124)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 113.3-114.9 °C; Výtěžek: 57 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3317, 1638, 1557, 1441, 1178, 641; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 10.77 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.98 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 5.64 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.18 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.54-1.46 (m, 2H), 1.38-1.27 (m, 26H), 0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 171.15, 164.05, 155.15, 148.85, 131.12, 109.74, 106.13, 105.11, 52.04, 40.51, 32.87, 31.22, 30.67, 30.66, 30.65, 30.64, 30.62, 30.61, 30.60, 30.59, 30.38, 30.30, 27.87, 23.56, 14.43; Anal. Calcd. pro C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (434.62): C, 69.09; H, 9.74; N, 6.45. Nalezeno: C, 68.95; H, 9.54; N, 6.22.

**Methyl-2-hydroxy-4-(3-oktadecylureido)benzoát (125)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 114.7-116.5 °C; Výtěžek: 62 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3317, 2920, 2848, 1637, 1557, 1468, 1268 1226, 753, 648; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 10.77 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.98 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 5.64 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.53-1.47 (m, 2H), 1.38-1.26 (m, 30H), 0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 171.15, 164.05, 155.15, 148.85, 131.13, 109.74, 106.13, 105.11, 52.04, 40.51, 32.87, 31.22, 30.68, 30.67, 30.66, 30.65, 30.64, 30.63, 30.62, 30.60, 30.58, 30.38, 30.30, 27.87, 25.64, 23.56, 14.43; Anal. Calcd. pro C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (462.68): C, 70.09; H, 10.02; N, 6.05. Nalezeno: C, 69.88; H, 10.31; N, 6.23.

**Methyl-2-hydroxy-4-(3-fenylureido)benzoát (126)** <sup>161</sup>

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 210.1-211.8 °C [literatura: 220-221 °C]; Výtěžek: 57 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3294, 2955, 1683, 1647, 1555, 1226, 744, 648; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 10.83 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.50-7.45 (m, 2H), 7.27-7.20 (m, 2H), 7.16 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 171.08, 163.98, 152.51, 147.96, 140.59, 131.30, 129.46 (2), 123.08, 119.28 (2), 110.05, 106.90, 105.72, 52.16; Anal. Calcd. pro C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (286.29): C, 62.93; H, 4.93; N, 9.79. Nalezeno: C, 62.84; H, 4.76; N, 10.00.

**Methyl-4-(3-benzylureido)-2-hydroxybenzoát (127)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 190.4-192.1 °C; Výtěžek: 60 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3335, 3692, 1642, 1439, 1277, 783, 694; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 10.79 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.36-7.23 (m, 4H), 7.25-7.16 (m, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 6.07 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 171.14, 164.03, 155.23, 148.67, 141.13, 131.15, 129.13 (2), 128.31 (2), 127.70, 109.84, 106.32, 105.30, 52.07, 44.40; Anal. Calcd. pro C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (300.31): C, 63.99; H, 5.37; N, 9.33. Nalezeno: C, 63.89; H, 5.24; N, 9.06.

**Methyl-2-hydroxy-4-(3-fenylethylureido)benzoát (128)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 151.6-153.2 °C; Výtěžek: 63 %; IR (cm<sup>-1</sup>, ATR-Ge): 3382, 1698, 1556, 1242, 785, 700; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 10.78 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.30-7.18 (m, 4H), 7.21-7.12 (m, 1H), 7.10 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.98 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 5.70 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.46 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.84-2.80 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>) δ 171.15, 164.02, 155.21, 148.75, 140.67, 131.13, 129.61 (2), 129.16 (2), 126.88, 109.81, 106.20,

105.19, 52.05, 41.93, 37.10; Anal. Calcd. pro  $C_{17}H_{18}N_2O_4$  (314.34): C, 64.96; H, 5.77; N, 8.91. Nalezeno: C, 64.97; H, 5.58; N, 8.60.

**Methyl-2-hydroxy-4-[3-(3-fenylpropyl)ureido]benzoát (129)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 138.1-140 °C; Výtěžek: 58 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3329 3108, 1641, 1557, 1276, 1192, 780, 699;  $^1H$  NMR (500 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  10.79 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.64 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.27-7.10 (m, 6H), 6.99 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.74 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.23 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.65 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 1.85-1.78 (m, 2H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  171.13, 164.03, 155.26, 148.78, 142.84, 131.13, 129.10 (2), 129.02 (2), 126.48, 109.78, 106.18, 105.16, 52.04, 40.14, 33.96, 33.01; Anal. Calcd. pro  $C_{18}H_{20}N_2O_4$  (328.37): C, 65.84; H, 6.14; N, 8.53. Nalezeno: C, 65.57; H, 6.29; N, 8.58.

**Methyl-2-hydroxy-4-[3-(4-fenylbutyl)ureido]benzoát (130)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 131.7-133.2 °C; Výtěžek: 63 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3358, 3243, 1655, 1558, 1275, 1192, 695;  $^1H$  NMR (500 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  10.78 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.64 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.26-7.07 (m, 6H), 6.97 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.67 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.22 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.64 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 1.71-1.61 (m, 2H), 1.58-1.48 (m, 2H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  170.16, 163.05, 154.23, 147.81, 142.28, 130.15, 128.14 (2), 127.97 (2), 125.41, 108.78, 105.18, 104.16, 51.06, 39.28, 35.38, 29.81, 28.75; Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{22}N_2O_4$  (342.40): C, 66.65; H, 6.48; N, 8.18. Nalezeno: C, 66.74; H, 6.69; N, 8.33.

**Methyl-4-(3-cyklohexylureido)-2-hydroxybenzoát (131)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 171.4-172.2 °C; Výtěžek: 50 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3301, 2933, 1637, 1566, 1261, 1180, 773, 671;  $^1H$  NMR (500 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  10.78 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.07 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.53 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.64-3.57 (m, 1H), 1.97-1.91 (m, 2H), 1.76-1.67 (m, 2H), 1.64-1.58 (m, 1H), 1.45-1.33 (m, 2H), 1.26-1.11 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  171.16, 164.05, 154.36, 148.84, 131.14, 109.69, 106.10, 105.03, 52.04, 49.17, 34.35 (2), 26.65, 25.80 (2); Anal. Calcd. pro  $C_{15}H_{20}N_2O_4$  (292.34): C, 61.63; H, 6.90; N, 9.58. Nalezeno: C, 61.58; H, 6.72; N, 9.56.

**Methyl-4-(3-cykloheptylureido)-2-hydroxybenzoát (132)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 155.1-156.8 °C; Výtěžek: 53 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3378, 2927, 2858, 1672, 1536, 1228, 1552, 779 694;  $^1H$  NMR (500 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  10.77 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.07 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.59 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.61-3.58 (m, 1H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.66-1.41 (m, 10H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  171.15, 164.05, 154.29, 148.84, 131.14, 109.68, 106.10, 105.02, 52.03, 51.42, 36.19 (2), 29.10 (2), 24.91 (2); Anal. Calcd. pro  $C_{16}H_{22}N_2O_4$  (306.36): C, 62.73; H, 7.24; N, 9.14. Nalezeno: C, 62.92; H, 7.40; N, 9.09.

**Methyl-4-[3-(cyklohexylmethyl)ureido]-2-hydroxybenzoát (133)**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 158.4-160.1 °C; Výtěžek: 56 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3325, 2921, 1673, 1594, 1575, 1273, 1232, 804, 646;  $^1H$  NMR (500 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  10.78 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 5.73 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.05 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 1.73-1.63 (m, 5H), 1.50-1.41 (m, 1H), 1.30-1.15 (m, 3H), 1.00-0.91 (m, 2H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  171.15, 164.04, 155.28, 148.81, 131.13, 109.75, 106.14, 105.13, 52.05, 46.76, 39.60, 31.70 (2), 27.45, 26.86 (2); Anal. Calcd. pro  $C_{16}H_{22}N_2O_4$  (306.36): C, 62.73; H, 7.24; N, 9.14. Nalezeno: C, 62.50; H, 7.41; N, 9.29.

**Methyl-4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoát (134) <sup>163</sup>**

Bílá krystalická látka; Metoda C; t. t. 221.5-223.3 °C [literatura: 212-213 °C]; Výtěžek: 60 %; IR ( $cm^{-1}$ , ATR-Ge): 3350, 2906, 2851, 1668, 1538, 1274, 1194, 779;  $^{13}C$  NMR (126 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  171.15, 164.04, 153.84, 148.92, 131.08, 109.61, 105.96, 104.92, 52.02, 51.25, 42.87 (3), 37.41 (3), 30.74 (3);

Anal. Calcd. pro  $C_{19}H_{24}N_2O_4$  (344.41): C, 66.26; H, 7.02; N, 8.13. Nalezeno: C, 66.41; H, 7.19; N, 8.28.  
Neuvedená spektroskopická charakterizace byla v souladu s dříve publikovanými hodnotami.



## 6 Závěr

Předložená práce vznikla na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy pod vedením profesorky RNDr. Jarmily Vinšové, CSc., a PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. Zabývá se tematikou tuberkulózy, její současnou léčbou, problémy s rezistencí a designem nových aktivních molekul. V úvodu jsou po vymezení pojmu, epidemiologickém rozboru a charakterizaci TB s jejím původcem uvedena a popsána současně užívaná léčiva, kdy je kladen důraz především na jejich mechanismus působení a časté rezistence. Následující část nazvaná Komentáře k publikacím a nepublikované výsledky shrnuje dosažené výsledky autora a jeho pracovní skupiny.

Hlavní tématické celky jsou rozděleny podle výchozí struktury: (I) přímý inhibitor mykobakteriální enoyl-ACP reduktázy triklosan, (II) antimikrobiálně vysoce účinné salicylanilidy, (III) isoniazid jako jedno z nejvýznamnějších antituberkulotik a (IV) léčivo druhé linie antituberkulotik *p*-aminosalicylová kyselina. Uvedené sloučeniny byly za pomoci syntetických postupů strukturně modifikovány, nejčastěji formou kondenzace. Tímto způsobem vznikla knihovna derivátů, které byly testovány pro antimykobakteriální, antibakteriální, antifungální aktivitu a cytotoxicitu. Získané výsledky jsou komentovány ve vztahu mezi strukturou a biologickým účinkem. Celkově bylo připraveno 98 námi zatím nepublikovaných derivátů (triklosan: 34, salicylanilid: 12 a *p*-aminosalicylová kyselina: 52) a 93 námi publikovaných derivátů ve čtyřech přiložených publikacích. Autor disertační práce nepřipravoval všechny publikované sloučeniny sám, ale v různé míře se na jejich syntéze podílel, viz Publikace v impaktovaných časopisech.

Vývoj antimykobakteriálního poznání o triklosanu (I) a jeho derivátech byl shrnut v **Článku 1**. Tato publikace řeší SAR ve vztahu k mykobakteriální a enzymové inhibici či *in vivo* aktivitě. Je rozdělena na dvě části, na deriváty s fenolickou skupinou a bez fenolické hydroxyskupiny. Analoga s fenolickou skupinou často dosahují výborných *in vitro* výsledků, které se ztrácejí při *in vivo* testování. Dosavadní poznatky SAR popisují příznivý vliv hydrofobního substituentu v poloze 5 na fenolickém A-kruhu a malého substituentu (např. Cl, CH<sub>3</sub> v *ortho* poloze) umístěného na fenoxu B-kruhu. Tyto substituenty pozitivně ovlivňují afinitu k enzymu a způsob inhibice, konkrétně tu s pomalu se vázajícím inhibitorem, což zároveň představuje i poslední vývojový směr triklosanových analog. Druhá část derivátů

bez fenolické skupiny dosahuje výborných *in vitro* i *in vivo* výsledků, ale nemá zcela sjednocené SAR a je méně obsáhlá.

Navazující nepublikovaná část pojednává o esterových a (thio)karbamátových derivátech triklosanu připravených za účelem vzniku potenciálního proléčiva s vyšší aktivitou, nižší toxicitou a lepší biologickou dostupností. Připravené sloučeniny myšlenku proléčiv zatím zcela nepotvrdily. Žádný derivát v rámci antimykobakteriálního hodnocení nepřekonal výchozí standard TRC, vůči kmeni H37Rv se výrazně se nepřiblížil INH či EMB a zároveň všechny spojovala nezanedbatelná toxicita. Naopak standardy bacitracin a flukonazol byly v některých případech při antibakteriálním a antifungálním hodnocení překonány. Jednalo se zejména o 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-propynoát **23**, který vykazoval z celé série nejširší spektrum působnosti a zároveň s MIC = 0,49  $\mu\text{M}$  vůči G<sup>+</sup> stafylokokovým kmenům překonal i výchozí TRC.

V **Článku 2** je řešen vliv druhého halogenu (Cl nebo Br) na salicylovém kruhu v souvislosti s antimykobakteriální aktivitou série salicylanilidů (II). Výsledné srovnání inhibičních aktivit nepřineslo výrazný rozdíl, a to ani po stránce hodnocení cytotoxicity. Bylo pozorováno užší rozpětí MIC ve prospěch dihalogenované série („mono-série“: H37Rv MIC = 1-16  $\mu\text{M}$ , „di-série“: H37Rv MIC = 1-4  $\mu\text{M}$ ). Proti všem sledovaným rezistentním kmenům vykázal jednotnou nejvyšší antimykobakteriální aktivitu 5-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (**56**) s MIC = 0,5  $\mu\text{M}$ , zatímco u dalších sledovaných látek bylo MIC od 1 do 4  $\mu\text{M}$ .

Vliv esterifikace salicylanilidů pyrazinkarboxylovou či isonikotinovou kyselinou s možností vzniku tzv. zdvojených léčiv byl popsán v salicylanilidové nepublikované části. Připravené deriváty byly dále hodnoceny i vůči rezistentním kmenům. U mykobakteriálního kmene H37Rv byl po esterifikaci pozorován vyšší inhibiční účinek, zejména v případě 2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-isonikotinátu (**65**) a 4-brom-2-{[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl-isonikotinátu (**67**), oba s MIC  $\leq 1$   $\mu\text{M}$ . U lékově rezistentních kmenů vliv esterifikace vymizel a přinesl i mírné zhoršení inhibičních aktivit oproti citlivému H37Rv, konkrétně klesly inhibiční aktivity na 4-32  $\mu\text{M}$ . Analog **65** zde dosáhl MIC = 4-8  $\mu\text{M}$ . Získané výsledky nepotvrdily plně výhodu spojení dvou účinných látek za vzniku mutual prodrugs a též nepřinesly zlepšení v podobě cytotoxicit.

O salicylanilidové konjugaci s peptidovými nosiči za účelem vyšší intracelulární dostupnosti a selektivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* pojednává **Článek 3**. U všech

hodnocených konjugátů oproti volným salicylanilidům bylo dosaženo zvýšení intracelulární aktivity. Bohužel konjugáty s nejvyšší mírou buněčného vychytávání a intracelulárních inhibičních aktivit vykazovaly zároveň i nezanedbatelný stupeň toxicity. Jednalo se zejména o konjugáty s mastnou kyselinou (dekanová a palmitová) v postranním řetězci. Nejslibnější konjugáty bez toxicit byly hlavně monomerní SAL2-Aoa-T5, SAL2-Aoa-GFLG-T5 a SAL2-Aoa-TKPR-OH, které taktéž výrazně převyšovaly volné salicylanilidové výchozí molekuly, měly vysoký stupeň intracelulární aktivity a potvrdily slibnost rozvoje tuftsinové tematiky.

Obměny isoniazidu (III) zahrnující *N*-alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidy (**72-79**) a z nich vycházející cyklické *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (**80-82**), popisuje **Článek 4**. Nejúčinnější karboxamidové sloučeniny s methylem (**72**), ethylem (**73**) a propylem (**74**) vůči kmeni H37Rv se podobaly aktivitami výchozímu INH. Z oxadiazolové řady vyčníval dodecylový **82** analog s hodnotami MIC 4-8  $\mu\text{M}$ . Testy vůči rezistentním mykobakteriálním kmenům odhalily zkříženou rezistenci karboxamidových derivátů **72-79** s INH, což u oxadiazolového analogu **82** pozorováno nebylo (MIC = 4-8  $\mu\text{M}$ ). Sloučeniny vykazovaly celkově přijatelný cytotoxický profil. Nejúčinnější inhibitory *M. tuberculosis* H37Rv, 2-isonikotinoyl-*N*-methylhydrazin-1-karboxamid (**72**) a *N*-dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (**82**), byly podrobeny testům zabývajících se jejich mechanismem účinku. Tato zkoumání přinesla závěr, že mechanismus účinku derivátu **72** se shoduje s INH. Naopak analog **82** působí jiným způsobem, který zatím zůstává neobjasněn, čímž v sobě nese příslib do budoucího vývoje.

Poslední nepublikovaná část (IV) přináší srovnání aktivit methylesterové řady derivátů močoviny kyseliny *p*-aminosalicylové (**109-134**) oproti analogům s volnou karboxylovou skupinou (**83-108**). Deriváty působí zejména vůči mykobakteriálním kmenům. Pro řadu **83-108** se zdá výhodnější krátký řetězec jako methyl (**83**) nebo alicyklický adamantyl (**108**). Pro methylesterovou sérii **109-134** je naopak preferován středně dlouhý řetězec od hexylu po tridecyl (**114-121**) a rovněž adamantyl (**134**). Ve vzájemném srovnání obou sérií jsou methylestery výhodnější. Methyl-2-hydroxy-4-(3-undecylureido)benzoát (**119**), methyl-4-(3-dodecylureido)-2-hydroxybenzoát (**120**) a methyl-4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoát (**134**) inhibovaly kmen H37Rv s MIC = 1-2  $\mu\text{M}$ . Svými hodnotami minimální inhibiční koncentrace se vyrovnaly INH s EMB a výrazně překonaly analoga s volnou karboxylovou skupinou série **83-108** (MIC  $\geq 8 \mu\text{M}$ ). Aktivity proti rezistentním formám *M. tuberculosis* zůstaly u testovaných derivátů zachovány s MIC = 2-62  $\mu\text{M}$ . Nejnižších

koncentrací dosahovaly 2-hydroxy-4-(3-methylureido)benzoová kyselina (**83**) a methyl-4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-2-hydroxybenzoát (**134**), oba s MIC = 2-4  $\mu$ M.

V celkovém souhrnu se nám podařilo získat mnoho vysoce účinných analog. Připravené deriváty totiž často překonaly nejen své výchozí molekuly, ale i se vyrovnaly léčivům jako třeba INH a EMB, brané též jako obecné standardy pro hodnocení antimykobakteriálních aktivit. Výsledky jsou dokladem perspektivy struktur s potřebou dalšího rozvoje, který může nastínit jejich pozici v poli potenciálních antituberkulotik či antimikrobních látek celkově.

## 7 Seznam publikovaných prací, plakátových sdělení a prezentací

### 7.1 Publikace v impaktovaných časopisech

1. **VOSATKA, R.**, M. KRATKY and J. VINSOVA. Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018, **114**, 318-331. IF<sub>2017</sub> = 3,466.  
Přínos doktoranda: literární rešerše a podíl na sepisování publikace.
2. PARASKEVOPOULOS, G., S. MONTEIRO, **R. VOSATKA**, M. KRATKY, L. NAVRATILOVA, F. TREJTNAR, J. STOLARIKOVA and J. VINSOVA. Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* 2017, **25**, 1524-1532. IF<sub>2017</sub> = 2,881.  
Přínos doktoranda: příprava, izolace a charakterizace salicylanilidů (5).
3. BARANYAI, Z., M. KRATKY, **R. VOSATKA**, E. SZABO, Z. SENONER, S. DAVID, J. STOLARIKOVA, J. VINSOVA and S. BOSZE. *In vitro* biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsin conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, **133**, 152-173. IF<sub>2017</sub> = 4,816.  
Přínos doktoranda: příprava, izolace a charakterizace výchozího salicylanilidu (1) a peptidového nosiče (1).
4. **VOSATKA, R.**, M. KRATKY, M. SVARCOVA, J. JANOUSEK, J. STOLARIKOVA, J. MADACKI, S. HUSZAR, K. MIKUSOVA, J. KORDULAKOVA, F. TREJTNAR and J. VINSOVA. New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, **151**, 824-835. IF<sub>2017</sub> = 4,816.  
Přínos doktoranda: příprava, izolace a charakterizace publikovaných derivátů (cca ½), příprava dat a podíl na sepisování publikace.

## 7.2 Plakátová sdělení

- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY and J. VINSOVA. Synthesis of salicylanilide derivatives and their antimycobacterial effect. 4<sup>th</sup> Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network. Hradec Králové, 20.-22. června 2014, Book of Abstracts P-23.
  
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY and J. VINSOVA. Synthesis of triclosan derivatives and their antimycobacterial effect. 44. Konference Syntéza a analýza léčiv 2015. Brno, 2.-4. září 2015, Book of Abstracts P-63. ISBN: 978-80-7305-760-2.
  
- ✓ VINSOVA J., **R. VOSATKA**, M. KRATKY, J. STOLARIKOVA and K. MIKUSOVA. New lipophilic derivatives of isoniazid. BioMicroWorld2015 Conference, Antimicrobial agents and chemotherapy. Barcelona (Španělsko), 28.-30. října 2015, Book of Abstracts P-87.
  
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY, M. KUFA a J. VINSOVA. Syntéza a antimykobakteriální aktivita nových sulfathiazolových derivátů. 45. Konference Syntéza a analýza léčiv. Hradec Králové, 22.-24. června 2016, Sborník P-49.
  
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY, K. KONECNA and J. VINSOVA. Synthesis and antibacterial activity of new triclosan derivatives. 51<sup>st</sup> Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry „Liblice 2016“. Lázně Bělohrad, 11.-13. listopadu 2016, Book of Abstracts.
  
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY and J. VINSOVA. Salicylanilide mutual prodrugs: synthesis and biological activity. 10<sup>th</sup> Joint Meeting on Medicinal Chemistry. Dubrovnik (Chorvatsko), 25.-28. června 2017, Book of Abstracts P-159.
  
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY and J. VINSOVA. Novel salicylanilide mutual prodrugs: synthesis and biological activity. 52<sup>nd</sup> Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry „Liblice 2017“. Lázně Bělohrad, 3.-5. listopadu 2017, Book of Abstracts P-83.

### 7.3 Přednášky

- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY and J. VINSOVA. Salicylanilide derivatives and their conjugation with peptide carriers. 5. Postgradual and 3. Postdoctoral conference FAF UK, Hradec Králové, 3.-4. února 2015.
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY a J. VINSOVA. Syntéza a antimykobakteriální aktivita salicylanilidových derivátů. Závěrečná konference realizačního týmu projektu TEAB. Hradec Králové, 7. dubna 2015.
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY and J. VINSOVA. Synthesis of triclosan derivatives and their antimycobacterial activity. 6. Postgradual and 4. Postdoctoral conference FAF UK. Hradec Králové, 9.-10. února 2016.
- ✓ KRATKY M., Z. BARANYAI, S. BOSZE, **R. VOSATKA** and J. VINSOVA. Salicylanilide-oligotuftsin conjugates: Synthesis and biological activity. 6. Postgradual and 4. Postdoctoral conference FAF UK. Hradec Králové, 9.-10. února 2016, Book of Abstracts P-63.
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY, K. KONECNA and J. VINSOVA. Synthesis of triclosan derivatives and their biological activity. 1<sup>st</sup> WG a Paul Ehrlich meeting-MuTaLig COST Action. Budapešť (Maďarsko), 19.-20. listopadu 2016.
- ✓ **VOSATKA, R.**, M. KRATKY, K. KONECNA and J. VINSOVA. Synthesis and biological activity of novel triclosan derivatives. 7. Postgradual and 5. Postdoctoral conference FAF UK. Hradec Králové, 7.-8. února 2017.

## **8 Literatura**



<sup>1</sup> ALEXANDER, K.A., P.N. LAVER, A.L. MICHAEL, M. WILLIAMS, P.D. VAN HELDEN, R.M. WARREN and N.C.G. VAN PITTIUS. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, **16**, 1296-1300.

<sup>2</sup> COMAS, I., M. COSCOLLA, T. LUO, S. BORRELL, K.E. HOLT, M. KATO-MAEDA, J. PARKHILL, B. MALLA, S. BERG, G. THWAITES, D. YEBOAH-MANU, G. BOTHAMLEY, J. MEI, L.H. WEI, S. BENTLEY, S.R. HARRIS, S. NIEMANN, R. DIEI, A. ASEFFA, Q. GAO, D. YOUNG and S. GAGNEUX. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genet.* 2013, **45**, 1176-1182.

<sup>3</sup> LONNROTH, K., K.G. CASTRO, J.M. CHAKAYA, L.S. CHAUHAN, K. FLOYD, P. GLAZIOU and M.C. RAVIGLIONE. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. *Lancet* 2010, **375**, 1814-1829.

<sup>4</sup> DYE, C., P. GLAZIOU, K. FLOYD and M. RAVIGLIONE. Prospects for Tuberculosis Elimination. *Annu. Rev. Public Health.* 2013, **34**, 271-286.

<sup>5</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2017 [online]. WHO, 2017 [Cit. 7.12.2017]. Dostupné z: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259366/1/9789241565516-eng.pdf?ua=1>

<sup>6</sup> CAMBAU, E. and M. DRANCOURT. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, **20**, 196-201.

<sup>7</sup> COLE, S.T., R. BROSCHE, J. PARKHILL, T. GARNIER, C. CHURCHER, D. HARRIS, S.V. GORDON, K. EIGLMEIER, S. GAS, C.E. BARRY, F. TEKAIA, K. BADCOCK, D. BASHAM, D. BROWN, T. CHILLINGWORTH, R. CONNOR, R. DAVIES, K. DEVLIN, T. FELTWELL, S. GENTLES, N. HAMLIN, S. HOLROYD, T. HORNBY, K. JAGELS, A. KROGH, J. MCLEAN, S. MOULE, L. MURPHY, K. OLIVER, J. OSBORNE, M.A. QUAIL, M.A. RAJANDREAM, J. ROGERS, S. RUTTER, K. SEEGER, J. SKELTON, R. SQUARES, S. SQUARES, J.E. SULSTON, K. TAYLOR, S. WHITEHEAD and B.G. BARRELL. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998, **393**, 538-544.

<sup>8</sup> CAMUS, J.C., M.J. PRYOR, C. MEDIGUE and S.T. COLE. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology-(UK)* 2002, **148**, 2967-2973.

<sup>9</sup> DUCATI, R.G., A. RUFFINO-NETTO, L.A. BASSO and D.S. SANTOS. The resumption of consumption – A review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006, **101**, 697-714.

<sup>10</sup> RAJNI, R.N. and L.S. MEENA. Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and Cord Factor: An overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, article ID 274693.

<sup>11</sup> BRENNAN, P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003, **83**, 91-97.

<sup>12</sup> MEDJAHED, H., J.L. GAILLARD and J.M. REYRAT. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol.* 2010, **18**, 117-123.

<sup>13</sup> JANKUTE, M., J.A.G. COX, J. HARRISON and G.S. BESRA. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu. Rev. Microbiol.* 2015, **69**, 405-423.

<sup>14</sup> PAN, P. and P.J. TONGE. Targeting InhA, the FASII Enoyl-ACP Reductase: SAR Studies on Novel Inhibitor Scaffolds. *Curr. Top. Med. Chem.* 2012, **12**, 672-693.

<sup>15</sup> BARRY, C.E., R.E. LEE, K. MDLULI, A.E. SAMPSON, B.G. SCHROEDER, R.A. SLAYDEN and Y. YUAN. Mycolic acids: Structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* 1998, **37**, 143-179.

<sup>16</sup> CHATTERJEE, D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997, **1**, 579-588.

- 
- <sup>17</sup> LIU, J., CE. BARRY, GS. BESRA and H. NIKAIDO. Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 29545-29551.
- <sup>18</sup> TAKAYAMA, K., C. WANG and G.S. BESRA. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, **18**, 81-101.
- <sup>19</sup> KANETAKA, H., Y. KOSEKI, J. TAIRA, T. UMEI, H. KOMATSU, H. SAKAMOTO, G. GULTEN, J.C. SACCHETTINI, M. KITAMURA and S. AOKI. Discovery of InhA inhibitors with anti-mycobacterial activity through a matched molecular pair approach. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, **94**, 378-385.
- <sup>20</sup> INTURI, B., G.V. PUJAR and M.N. PUROHIT. Recent Advances and Structural Features of Enoyl-ACP Reductase Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Pharm.* 2016, **349**, 817-826.
- <sup>21</sup> RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 2012, **12**, 352-366.
- <sup>22</sup> GROSSET, J. *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, **47**, 833-836.
- <sup>23</sup> COLEMAN, M.T., R.Y. CHEN, M. LEE, P.L. LIN, L.E. DODD, P. MAIELLO, L.E. VIA, Y. KIM, G. MARRINER, V. DARTOIS, C. SCANGA, C. JANSSEN, J. WANG, E. KLEIN, S.N. CHO, C.E. BARRY and J.L. FLYNN. PET/CT imaging reveals a therapeutic response to oxazolidinones in macaques and humans with tuberculosis. *Sci. Transl. Med.* 2014, **6**, 265ra167.
- <sup>24</sup> PTÁKOVÁ, M. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterií. *Med. Praxi* 2011, **8**, 466-468.
- <sup>25</sup> DHEDA, K., C.E. BARRY and G. MAARTENS. Tuberculosis. *Lancet* 2016, **387**, 1211-1226.
- <sup>26</sup> TIEMERSMA, E.W., M.J. VAN DER WERF, M.W. BORGDORFF, B.G. WILLIAMS and N.J.D. NAGELKERKE. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. *PLoS One* 2011, **6**, e17601.
- <sup>27</sup> ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2016 [online]. ÚZIS ČR, 2017 [Cit. 8.4.2018]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/publikace/zakladni-prehled-epidemiologicke-situace-ve-vyskytu-tuberkulozy-v-cr-v-roce-2016>
- <sup>28</sup> SUAREZ, J., K. RANGUELOVA, A.A. JARZECKI, J. MANZEROVA, V. KRYMOV, X.B. ZHAO, S.W. YU, L. METLITSKY, G.J. GERFEN and R.S. MAGLIOZZO. An Oxyferrous Heme/Protein-based Radical Intermediate Is Catalytically Competent in the Catalase Reaction of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG). *J. Biol. Chem.* 2009, **284**, 7017-7029.
- <sup>29</sup> JUDGE, V., B. NARASIMHAN and M. AHUJA. Isoniazid: the magic molecule. *Med. Chem. Res.* 2012, **21**, 3940-3957.
- <sup>30</sup> PALOMINO J.C. and A. MARTIN. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*. 2014, **3**, 317-340.
- <sup>31</sup> TIMMINS, GS. and V. DERETIC. Mechanisms of action of isoniazid. *Mol. Microbiol.* 2006, **62**, 1220-1227.
- <sup>32</sup> LI, G.L., J.R. ZHANG, Q. GUO, Y. JIANG, J.H. WEI, L.L. ZHAO, X.Q. ZHAO, J.X. LU and K.L. WAN. Efflux Pump Gene Expression in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *PLoS One* 2015, **10**, e0119013.
- <sup>33</sup> ZHANG, Y., M.M. WADE, A. SCORPIO, H. ZHANG and Z.H. SUN. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, **52**, 790-795.
- <sup>34</sup> LABORDE, J., C. DERA EVE and V. BERNARDES-GENISSON. Update of Antitubercular Prodrugs from a Molecular Perspective: Mechanisms of Action, Bioactivation Pathways, and Associated Resistance. *ChemMedChem*. 2017, **12**, 1657-1676.
- <sup>35</sup> NJIRE, M., Y.J. TAN, J. MUGWERU, C.W. WANG, J.T. GUO, W.W. YEW, S.Y. TAN and T.Y. ZHANG. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Adv. Med. Sci.* 2016, **61**, 63-71.

- 
- <sup>36</sup> KIM, H., K. SHIBAYAMA, E. RIMBARA and S. MORI. Biochemical Characterization of Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Inhibition of Its Activity by Pyrazinamide. *PLoS One* 2014, **9**, e100062.
- <sup>37</sup> SHI, W.L., X.L. ZHANG, X. JIANG, H.M. YUAN, J.S. LEE, C.E. BARRY, H.H. WANG, W.H. ZHANG and Y. ZHANG. Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2011, **333**, 1630-1632.
- <sup>38</sup> DILLON, NA., ND. PETERSON, HA. FEAGA, KC. KEILER and AD. BAUGHN. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of *trans*-Translation and RpsA. *Sci Rep.* 2017, **7**, 6135.
- <sup>39</sup> SHI, W.L., J.Z. CHEN, J. FENG, P. CUI, S. ZHANG, X.H. WENG, W.H. ZHANG and Y. ZHANG. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Microbes Infect.* 2014, **3**, e58.
- <sup>40</sup> ZHANG, Y. and W.W. YEW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2015, **19**, 1276-1289.
- <sup>41</sup> GOUDE, R., A.G. AMIN, D. CHATTERJEE and T. PARISH. The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, **53**, 4138-4146.
- <sup>42</sup> SREEVATSAN S., K.E. STOCKBAUER, X. PAN, B.N KREISWIRTH, S.L. MOGHAZEH, W.R. JACOBS, A. TELENTI and J.M. MUSSER. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, **41**, 1677-1681.
- <sup>43</sup> DONALD, P.R. and A.H. DIACON. Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. *Lancet Infect. Dis.* 2015, **15**, 1091-1099.
- <sup>44</sup> MINATO, Y., J.M. THIEDE, S.L. KORDUS, E.J. MCKLVEEN, B.J. TURMAN and A.D. BAUGHN. *Mycobacterium tuberculosis* Folate Metabolism and the Mechanistic Basis for para-Aminosalicylic Acid Susceptibility and Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, **59**, 5097-5106.
- <sup>45</sup> NIXON, M.R., K.W. SAIONZ, M.S. KOO, M.J. SZYMONIFKA, H.M JUNG, J.P. ROBERTS, M. NANDAKUMAR, A. KUMAR, R.L. LIAO, T. RUSTAD, J.C. SACCHETTINI, K.Y RHEE, S. FREUNDLICH and D.R. SHERMAN. Folate Pathway Disruption Leads to Critical Disruption of Methionine Derivatives in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* 2014, **21**, 819-830.
- <sup>46</sup> NAGACHAR, N. and C. RATLEDGE. Knocking out salicylate biosynthesis genes in *Mycobacterium smegmatis* induces hypersensitivity to p-aminosalicylate (PAS). *FEMS Microbiol. Lett.* 2010, **311**, 193-199.
- <sup>47</sup> CHOLO, M.C., M.T. MOTHIBA, B. FOURIE and R. ANDERSON. Mechanisms of action and therapeutic efficacies of the lipophilic antimycobacterial agents clofazimine and bedaquiline. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017, **72**, 338-353.
- <sup>48</sup> SINGH, H., N.K. NATT, N. GAREWAL and T. PUGAZHENTHAN. Bedaquiline: a new weapon against MDR and XDR-TB. *Int J Basic Clin Pharmacol.* 2013, **2**, 96-102.
- <sup>49</sup> GUPTA, R., C.D. WELLS, N. HITTEL, J. HAFKIN and L.J. GEITER. Delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2016, **20**, S33-S37.
- <sup>50</sup> SHIMOKAWA, Y., K. SASAHARA, N. KOYAMA, K. KITANO, M. SHIBATA, N. YODA and K. UMEHARA. Metabolic Mechanism of Delamanid, a New Anti-Tuberculosis Drug, in Human Plasma. *Drug Metab. Dispos.* 2015, **43**, 1277-1283.
- <sup>51</sup> GURUMURTHY, M., T. MUKHERJEE, C.S. DOWD, R. SINGH, P. NIYOMRATTANAKIT, J.A. TAY, A. NAYYAR, Y.S. LEE, J. CHERIAN, H.I. BOSHOFF, T. DICK, C.E. BARRY and U.H. MANJUNATHA. Substrate specificity of the deazaflavin-dependent nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* responsible for the bioreductive activation of bicyclic nitroimidazoles. *FEBS J.* 2012, **279**, 113-125.
- <sup>52</sup> CELLITTI, S.E., J. SHAFFER, D.H. JONES, T. MUKHERJEE, M. GURUMURTHY, B. BURSULAYA, H.I. BOSHOFF, I. CHOI, A. NAYYAR, Y.S. LEE, J. CHERIAN, P. NIYOMRATTANAKIT, T. DICK, U.H. MANJUNATHA, C.E. BARRY, G. SPRAGGON and B.H.

---

GEIERSTANGER. Structure of Ddn, the Deazaflavin-Dependent Nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* Involved in Bioreductive Activation of PA-824. *Structure* 2012, **20**, 101-112.

<sup>53</sup> REDGRAVE, L.S., S.B. SUTTON, M.A. WEBBER and L.J.V. PIDDOCK. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014, **22**, 438-445.

<sup>54</sup> RAMIREZ, M.S. and M.E. TOLMASKY. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 2010, **13**, 151-171.

<sup>55</sup> STOKOWA, K., W. SZCZEPANIK, N. GAGGELLI, E. GAGGELLI, G. VALENSIN and M. JEZOWSKA-BOJCZUK. Capreomycin - A polypeptide antitubercular antibiotic with unusual binding properties toward copper (II). *J. Inorg. Biochem.* 2012, **106**, 111-116.

<sup>56</sup> THEE, S., A.J. GARCIA-PRATS, P.R. DONALD, A.C. HESSELING and H.S. SCHAAF. A review of the use of ethionamide and prothionamide in childhood tuberculosis. *Tuberculosis* 2016, **97**, 126-136.

<sup>57</sup> FRANCO, T.M.A., L. FAVROT, O. VERGNOLLE and J.S. BLANCHARD. Mechanism-Based Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* Branched-Chain Aminotransferase by D- and L-Cycloserine. *ACS Chem. Biol.* 2017, **12**, 1235-1244.

<sup>58</sup> HWANG, T.J., D.F. WARES, A. JAFAROV, W. JAKUBOWIAK, P. NUNN and S. KESHAVJEE. Safety of cycloserine and terizidone for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2013, **17**, 1257-1266.

<sup>59</sup> SWANEY, S.M., H. AOKI, M.C. GANOZA and D.L. SHINABARGER. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, **42**, 3251-3255.

<sup>60</sup> EL-GAMAL, M.I., I. BRAHIM, N. HISHAM, R. ALADDIN, H. MOHAMMED and A. BAHAAELDIN. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, **131**, 185-195.

<sup>61</sup> SAUVAGE, E., F. KERFF, M. TERRAK, J.A. AYALA and P. CHARLIER. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *Fems Microbiol. Rev.* 2008, **32**, 234-258.

<sup>62</sup> KEYNAN, S., N.M. HOOPER, A. FELICI, G. AMICOSANTE and A.J. TURNER. The renal membrane dipeptidase (dehydropeptidase-i) inhibitor, cilastatin, inhibits the bacterial metallo- $\beta$ -lactamase enzyme cpha. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, **39**, 1629-1631.

<sup>63</sup> LIRAS, P. and A. RODRIGUEZ-GARCIA. Clavulanic acid, a beta-lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, **54**, 467-475.

<sup>64</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care (2017 update) [online]. WHO, 2017 [Cit. 12.12.2017]. Dostupné z: [http://www.who.int/tb/publications/2017/dstb\\_guidance\\_2017/en/](http://www.who.int/tb/publications/2017/dstb_guidance_2017/en/)

<sup>65</sup> HOAGLAND, D.T., JY. LIU, R.B. LEE and R.E. LEE. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016, **102**, 55-72.

<sup>66</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis (2016 update) [online]. WHO, 2016 [Cit. 12.12.2017]. Dostupné z: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/treatment/resources/en/>

<sup>67</sup> FALZON, D., H.J. SCHUNEMANN, E. HARAUSZ, L. GONZALEZ-ANGULO, C. LIENHARDT, E. JARAMILLO and K. WEYER. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. *Eur. Resp. J.* 2017, **49**, 1602308.

<sup>68</sup> FORD, C.B., R.R. SHAH, M.K. MAEDA, S. GAGNEUX, M.B. MURRAY, T. COHEN, J.C. JOHNSTON, J. GARDY, M. LIPSITCH and S.M. FORTUNE. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nature Genet.* 2013, **45**, 784-790.

<sup>69</sup> FONSECA, J.D., G.M. KNIGHT and H.D. MCHUGH. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Infect. Dis.* 2015, **32**, 94-100.

<sup>70</sup> SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, **71**, 445-462.

<sup>71</sup> MAJUMDAR, S. and S.K. BASU. Killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by receptor-mediated drug delivery. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991, **35**, 135-140.

- 
- <sup>72</sup> PETROS, R.A. and J.M. DESIMONE. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, **9**, 615-627.
- <sup>73</sup> BARANYAI, Z., M. KRATKY, R. VOSATKA, E. SZABO, Z. SENONER, S. DAVID, J. STOLARIKOVA, J. VINSOVA and S. BOSZE. *In vitro* biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsins conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, **133**, 152-173.
- <sup>74</sup> AGRAWAL, A.K. and C.M. GUPTA. Tuftsins-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, **41**, 135-146.
- <sup>75</sup> JAIN, K., P. KESHARWANI, U. GUPTA and N.K. JAIN. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int. J. Pharm.* 2010, **394**, 122-142.
- <sup>76</sup> HORVATI, K., B. BACSA, N. SZABO, K. FODOR, G. BALKÁ, M. RUSVAI, E. KISS, G. MEZO, V. GROLMUSZ, B. VERTESSY, F. HUDECZ and S. BOSZE. Antimycobacterial activity of peptide conjugate of pyridopyrimidine derivative against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of *in vitro* and *in vivo* models. *Tuberculosis* 2015, **95**, S207-S211.
- <sup>77</sup> MEZO, G., A. KALASZI, J. REMENYI, Z. MAJER, A. HILBERT, O. LANG, L. KOHIDAI, K. BARNA, D. GAAL and F. HUDECZ. Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsins-like sequence. *Biopolymers.* 2004, **73**, 645-656.
- <sup>78</sup> HORVATI, K., G. MEZO, N. SZABO, F. HUDECZ and S. BOSZE. Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid – design, synthesis and antimycobacterial effect. *J. Pept. Sci.* 2009, **15**, 385-391.
- <sup>79</sup> PARASKEVOPOULOS, G., S. MONTEIRO, R. VOSATKA, M. KRATKY, L. NAVRATILOVA, F. TREJTAR, J. STOLARIKOVA and J. VINSOVA. Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* 2017, **25**, 1524-1532.
- <sup>80</sup> WAISSER, K., O. BURES, P. HOLY, J. KUNES, R. OSWALD, L. JIRASKOVA, M. POUR, V. KLIMESOVA, L. KUBICOVA and J. KAUSTOVA. Relationship between the structure and antimycobacterial activity of substituted salicylanilides. *Arch. Pharm.* 2003, **336**, 53-71.
- <sup>81</sup> KRATKY, M. and J. VINSOVA. Salicylanilide Ester Prodrugs as Potential Antimicrobial Agents - a Review. *Curr. Pharm. Design.* 2011, **17**, 3494-3505.
- <sup>82</sup> LEE, I.Y., T.D. GRUBER, A. SAMUELS, M. YUN, B. NAM, M. KANG, K. CROWLEY, B. WINTERROTH, H.I. BOSHOFF and C.E. BARRY. Structure-activity relationships of antitubercular salicylanilides consistent with disruption of the proton gradient *via* proton shuttling. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, **21**, 114-126.
- <sup>83</sup> KRATKY, M., J. VINSOVA, E. NOVOTNA, J. MANDIKOVA, V. WSOL, F. TREJTAR, V. ULMANN, J. STOLARIKOVA, S. FERNANDES, S. BHAT and J.O. LIU. Salicylanilide derivatives block *Mycobacterium tuberculosis* through inhibition of isocitrate lyase and methionine aminopeptidase. *Tuberculosis* 2012, **92**, 434-439.
- <sup>84</sup> BHUSAL, R.P., G. BASHIRI, B.X.C. KWAI, J. SPERRY and I.K.H. LEUNG. Targeting isocitrate lyase for the treatment of latent tuberculosis. *Drug Discov. Today* 2017, **22**, 1008-1016.
- <sup>85</sup> SHARMA, V., S. SHARMA, K.H.Z. BENTRUP, J.D. MCKINNEY, D.G. RUSSELL, W.R. JACOBS and J.C. SACCHETTINI. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Struct. Biol.* 2000, **7**, 663-668.
- <sup>86</sup> MACIELAG, M.J., J.P. DEMERS, S.A. FRAGA-SPANO, D.J. HLASTA, S.G. JOHNSON, R.M. KANOJIA, R.K. RUSSEL, Z.H. SUI, M.A. WEIDNER-WELLS, H. WERBLOOD, B.D. FOLENO, R.M. GOLDSCHMIDT, M.J. LOELOFF, G.C. WEBB and J.F. BARRETT. Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *J. Med. Chem.* 1998, **41**, 2939-2945.
- <sup>87</sup> CHENG, T.J.R., Y.T. WU, S.T. YANG, K.H. LO, S.K. CHEN, Y.H. CHEN, W.I. HUANG, C.H. YUAN, C.W. GUO, L.Y. HUANG, K.T. CHEN, H.W. SHIH, Y.S.E. CHENG, W.C. CHENG and C.H. WONG. High-throughput identification of antibacterials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the transglycosylase. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, **18**, 8512-8529.

- 
- <sup>88</sup> CHENNA, B.C., B.A. SHINKRE, J.R. KING, A.L. LUCIUS, S.V.L. NARAYANA and S.E. VELU. Identification of novel inhibitors of bacterial surface enzyme *Staphylococcus aureus* Sortase A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, **18**, 380-385.
- <sup>89</sup> TRIOLA, G., S. WETZEL, B. ELLINGER, M.A. KOCH, K. HUBEL, D. RAUH and H. WALDMANN. ATP competitive inhibitors of D-alanine-D-alanine ligase based on protein kinase inhibitor scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, **17**, 1079-1087.
- <sup>90</sup> KRÁTKÝ, M., E. NOVOTNÁ, S. SAXENA, P. YOGESHWARI, D. SRIRAM, M. ŠVARCOVÁ and J. VINŠOVÁ. Salicylanilide Diethyl Phosphates as Potential Inhibitors of Some Mycobacterial Enzymes. *Sci. World J.* 2014, article ID 703063.
- <sup>91</sup> KRATKY, M., S. STEPANKOVA, K. VORCAKOVA and J. VINSOVA. Salicylanilide diethyl phosphates as cholinesterases inhibitors. *Bioorganic Chem.* 2015, **58**, 48-52.
- <sup>92</sup> HU, M.H., W.F. YE, J.M. LI, G.C. ZHONG, G.W. HE, Q.L. XU and Y.C. ZHANG. Synthesis and Evaluation of Salicylanilide Derivatives as Potential Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* 2015, **85**, 280-289.
- <sup>93</sup> FERRIZ, J.M., K. VAVROVA, F. KUNC, A. IMRAMOVSKY, J. STOLARIKOVA, E. VAVRIKOVA and J. VINSOVA. Salicylanilide carbamates: Antitubercular agents active against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, **18**, 1054-1061.
- <sup>94</sup> KRATKY, M., J. VINSOVA, V. BUCHTA, K. HORVATI, S. BOSZE and J. STOLARIKOVA. New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, **45**, 6106-6113.
- <sup>95</sup> KRATKY, M., J. VINSOVA and V. BUCHTA. *In Vitro* Antibacterial and Antifungal Activity of Salicylanilide Pyrazine-2-carboxylates. *Med. Chem.* 2012, **8**, 732-741.
- <sup>96</sup> KRATKY, M., M. VOLKOVA, E. NOVOTNA, F. TREJTNAR, J. STOLARIKOVA and J. VINSOVA. Synthesis and biological activity of new salicylanilide *N,N*-disubstituted carbamates and thiocarbamates. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, **22**, 4073-4082.
- <sup>97</sup> BARANYAI, Z., M. KRATKY, J. VINSOVA, N. SZABO, Z. SENONER, K. HORVATI, J. STOLARIKOVA, S. DAVID and S. BOSZE. Combating highly resistant emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium tuberculosis* with novel salicylanilide esters and carbamates. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, **101**, 692-704.
- <sup>98</sup> KRATKY, M., S. BOSZE, Z. BARANYAI, I. SZABO, J. STOLARIKOVA, G. PARASKEVOPOULOS and J. VINSOVA. Synthesis and *in vitro* biological evaluation of 2-(phenylcarbamoyl)phenyl 4-substituted benzoates. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, **23**, 868-875.
- <sup>99</sup> RUSSELL, A.D. Whither triclosan? *J. Antimicrob. Chemother.* 2004, **53**, 693-695.
- <sup>100</sup> DANN, A.B. and A. HONTELA. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 2011, **31**, 285-311.
- <sup>101</sup> COTTELL, A., S.P. DENYER, G.W. HANLON, D. OCHS and J.Y. MAILLARD. Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *J. Hosp. Infect.* 2009, **72**, 71-76.
- <sup>102</sup> VOSATKA, R., M. KRATKY and J. VINSOVA. Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018, **114**, 318-331.
- <sup>103</sup> KUO, M.R., H.R. MORBIDONI, D. DALLAND, S.F. SNEDDON, B.B. GOURLIE, M.M. STAVESKI, M. LEONARD, J.S. GREGORY, A.D. JANJIGIAN, C. YEE, J.M. MUSSER, B. KREISWIRTH, H. IWAMOTO, R. PEROZZO, W.R. JACOBS, J.C. SACCHETTINI and D.A. FIDOCK. Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, 20851-20859.
- <sup>104</sup> HOLAS, O., P. ONDREJCEK and M. DOLEZAL. *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitors as potential antituberculotics: development in the past decade. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2015, **30**, 629-648.
- <sup>105</sup> WEATHERLY, L.M., J.Y. SHIM, H.N. HASHMI, R.H. KENNEDY, S.T. HESS and J.A. GOSSE. Antimicrobial agent triclosan is a proton ionophore uncoupler of mitochondria in living rat and human mast cells and in primary human keratinocytes. *J. Appl. Toxicol.* 2016, **36**, 777-789.



- 
- <sup>106</sup> NEWTON, A.P.N., S.M.S.C. CADENA, M.E.M. ROCHA, E.G.S. CARNIERI and M.B.M. DE OLIVEIRA. Effect of triclosan (TRN) on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *Toxicol. Lett.* 2005, **160**, 49-59.
- <sup>107</sup> DEEPA, P.R., S. VANDHANA, U. JAYANTHI and S. KRISHNAKUMAR. Therapeutic and toxicologic evaluation of anti-lipogenic agents in cancer cells compared with non-neoplastic cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012, **110**, 494-503.
- <sup>108</sup> LU, S.Y. and M.C. ARCHER. Fatty acid synthase is a potential molecular target for the chemoprevention of breast cancer. *Carcinogenesis* 2005, **26**, 153-157.
- <sup>109</sup> SADOWSKI, M.C., R.H. POWER, J.H. GUNTER, A.A. LUBIK, R.J. QUINN and C.C. NELSON. The fatty acid synthase inhibitor triclosan: repurposing an antimicrobial agent for targeting prostate cancer. *Oncotarget.* 2014, **5**, 9362-9381.
- <sup>110</sup> WANG, C.F. and Y. TIAN. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environ. Pollut.* 2015, **206**, 195-201.
- <sup>111</sup> GIULIANO, C.A. and M.J. RYBAK. Efficacy of triclosan as an antimicrobial hand soap and its potential impact on antimicrobial resistance: a focused review. *Pharmacotherapy* 2015, **35**, 328-336.
- <sup>112</sup> CAREY, D.E. and P.J. MCNAMARA. The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment. *Front. Microbiol.* 2015, **5**, article 780.
- <sup>113</sup> KAUSTOVÁ J. Quantitative micromethod for susceptibility testing of mycobacteria in Šula's medium. *J. Klin. Microbiol. Inf. Léč.* 1997, **3**, 115-124.
- <sup>114</sup> JONES, R.N. and A.L. BARRY. Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *J. Clin. Microbiol.* 1987, **25**, 1920-1925.
- <sup>115</sup> NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Methods for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Approved Standard M27-A2. NCCLS, 2002. ISBN 1-56238-469-4.
- <sup>116</sup> SULLIVAN, T.J., J.J. TRUGLIO, M.E. BOYNE, P. NOVICHENOK, X. ZHANG, C.F. STRATTON, H.J. LI, T. KAUR, A. AMIN, F. JOHNSON, R.A. SLAYDEN, C. KISKER and P.J. TONGE. High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem. Biol.* 2006, **1**, 43-53.
- <sup>117</sup> BOYNE, M.E., T.J. SULLIVAN, C.W. AMENDE, H. LU, V. GRUPPO, D. HEASLIP, A.G. AMIN, D. CHATTERJEE, A. LENAERTS, P.J. TONGE and R.A. SLAYDEN. Targeting fatty acid biosynthesis for the development of novel chemotherapeutics against *Mycobacterium tuberculosis*: Evaluation of A-ring-modified diphenyl ethers as high-affinity InhA inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, **51**, 3562-3567.
- <sup>118</sup> ENDE, C.W.A., S.E. KNUDSON, N. LIU, J. CHILDS, T.J. SULLIVAN, M. BOYNE, H. XU, Y. GEGINA, D.L. KNUDSON, F. JOHNSON, C.A. PELOQUIN, R.A. SLAYDEN and P.J. TONGE. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of B-ring modified diaryl ether InhA inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, **18**, 3029-3033.
- <sup>119</sup> CINU, T.A., S.S. KAR, I. BAIRY, V. BHAT, V.P. SHENOY and G.C. SHENOY. Design, synthesis and evaluation of antitubercular activity of triclosan analogues. *Arab. J. Chem.* 2015 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.09.003>>
- <sup>120</sup> KAR, S.S., G. BHAT, P.P.N. RAO, V.P. SHENOY, I. BAIRY and G.G. SHENOY. Rational design and synthesis of novel diphenyl ether derivatives as antitubercular agents. *Drug Des. Devel. Ther.* 2016, **10**, 2299-2310.
- <sup>121</sup> FREUNDLICH, J.S., F. WANG, C. VILCHEZE, G. GULTEN, R. LANGLEY, G.A. SCHIEHSER, D.R. JACOBUS, W.R. JACOBS and J.C. SACCHETTINI. Triclosan derivatives: towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem.* 2009, **4**, 241-248.
- <sup>122</sup> LU, H. and P.J. TONGE. Drug-target residence time: critical information for lead optimization. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010, **14**, 467-474.

- 
- <sup>123</sup> SPAGNUOLO, L.A., S. ELTSCHKNER, W. YU, F. DARYAEE, S. DAVOODI, S.E. KNUDSON, E.K.H. ALLEN, J. MERINO, A. PSCHIBUL, B. MOREE, N. THIVALAPILL, J.J. TRUGLIO, J. SALAFSKY, R.A. SLAYDEN, C. KISKER and P.J. TONGE. Evaluating the Contribution of Transition-State Destabilization to Changes in the Residence Time of Triazole-Based InhA Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 2017, **139**, 3417-3429.
- <sup>124</sup> LUCKNER, S.R., N.N. LIU, C.W.A. ENDE, P.J. TONGE and C. KISKER. A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 2010, **285**, 14330-14337.
- <sup>125</sup> PAN, P., S.E. KNUDSON, G.R. BOMMINENI, H.J. LI, C.T. LAI, N.N. LIU, M. GARCIA-DIAZ, C. SIMMERLING, S.S. PATIL, R.A. SLAYDEN and P.J. TONGE. Time-dependent diaryl ether inhibitors of InhA: structure-activity relationship studies of enzyme inhibition, antibacterial activity, and *in vivo* efficacy. *ChemMedChem*. 2014, **9**, 776-791.
- <sup>126</sup> KNUDSON, S.E., J.E. CUMMINGS, G.R. BOMMINENI, P. PAN, P.J. TONGE and R.A. SLAYDEN. Formulation studies of InhA inhibitors and combination therapy to improve efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2016, **101**, 8-14.
- <sup>127</sup> STEC, J., C. VILCHEZE, S.C. LUN, A.L. PERRYMAN, X. WANG, J.S. FREUNDLICH, W. BISHAI, W.R. JACOBS and A.P. KOZIKOWSKI. Biological evaluation of potent triclosan-derived inhibitors of the enoyl-acyl carrier protein reductase InhA in drug-sensitive and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem*. 2014, **9**, 2528-2537.
- <sup>128</sup> LAI, C.T., H.J. LI, W. YU, S. SHAH, G.R. BOMMINENI, V. PERRONE, M. GARCIA-DIAZ, P.J. TONGE and C. SIMMERLING. Rational modulation of the induced-fit conformational change for slow-onset inhibition in *Mycobacterium tuberculosis* InhA. *Biochemistry* 2015, **54**, 4683-4691.
- <sup>129</sup> KINI, S.G., A.R. BHAT, B. BRYANT, J.S. WILLIAMSON and F.E. DAYAN. Synthesis, antitubercular activity and docking study of novel cyclic azole substituted diphenyl ether derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, **44**, 492-500.
- <sup>130</sup> KINI, S.G., A. BHAT, Z. PAN and F.E. DAYAN. Synthesis and antitubercular activity of heterocycle substituted diphenyl ether derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2010, **25**, 730-736.
- <sup>131</sup> YANG, Y.H., Z.L. WANG, J.Z. YANG, T. YANG, W.Y. PI, W. ANG, Y.N. LIN, Y.Y. LIU, Z.C. LI, Y.F. LUO and Y.Q. WEI. Design, synthesis and evaluation of novel molecules with a diphenyl ether nucleus as potential antitubercular agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, **22**, 954-957.
- <sup>132</sup> TELVEKAR, V.N., V.K. BAIRWA, K. SATARDEKAR and A. BELLUBI. Novel 2-(2-(4-aryloxybenzylidene)hydrazinyl)benzothiazole derivatives as anti-tubercular agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, **22**, 649-652.
- <sup>133</sup> OWONO, L.C.O., F. NTIE-KANG, M. KEITA, E. MEGNASSAN, V. FRECER and S. MIERTUS. Virtually designed triclosan-based inhibitors of enoyl-acyl carrier protein reductase of *Mycobacterium tuberculosis* and of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Inf.* 2015, **34**, 292-307.
- <sup>134</sup> KRATKY, M. and J. VINSOVA. Salicylanilide *N*-monosubstituted carbamates: Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, **24**, 1322-1330.
- <sup>135</sup> CERNIKOVA A. a J. JAMPILEK. Strukturní modifikace léčiv ovlivňující biodostupnost a terapeutický účinek. *Chem. Listy* 2014, **108**, 7-16.
- <sup>136</sup> BIALECKA-FLORJANCZYK, E. A Simple Method for the Preparation of Substituted Phenoxyacrylic Acid Phenyl Esters. *Synth. Commun.* 2000, **30**, 4417-4424.
- <sup>137</sup> ZIEMSKA, J., A. RAJNISZ and J. SOLECKA. New perspectives on antibacterial drug research. *Cent. Eur. J. Biol.* 2013, **8**, 943-957.
- <sup>138</sup> MEHRA, T., M. KOBERLE, C. BRAUNSDORF, D. MAILANDER-SANCHEZ, C. BORELLI and M. SCHALLER. Alternative approaches to antifungal therapies. *Exp. Dermatol.* 2012, **21**, 778-782.
- <sup>139</sup> GEIGY A.G. BE659636. *Chem. Abstr.* 1966, **64**, 2010d.
- <sup>140</sup> NDSU RESEARCH FOUNDATION. Antimicrobial compositions. Vynálezci: B.J. CHISHOLM, D.C. WEBSTER a A.J. KUGEL. USA. WO2010/42935 A2. 2010.
- <sup>141</sup> ISP INVESTMENTS INC. Polymeric delivery and release systems for oral care actives. US6315987 B1. 2001.



- 
- <sup>142</sup> MISHRA, S., K. KARMODIYA, P. PARASURAMAN, A. SUROLIA and N. SUROLIA. Design, synthesis, and application of novel triclosan prodrugs as potential antimalarial and antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, **16**, 5536-5546.
- <sup>143</sup> PARASKEVOPOULOS, G., M. KRATKY, J. MANDIKOVA, F. TREJTNAR, J. STOLARIKOVA, P. PAVEK, G. BESRA and J. VINSOVA. Novel derivatives of nitro-substituted salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, **23**, 7292-7301.
- <sup>144</sup> KANG, S., H.J. MIN, M.S. KANG, M.G. JUNG and S. KIM. Discovery of novel 2-hydroxydiarylamide derivatives as TMPRSS4 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, **23**, 1748-1751.
- <sup>145</sup> KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY. 2-Hydroxyarylamide derivative or pharmaceutically acceptable salt thereof, preparation method thereof, and pharmaceutical composition for preventing or treating cancer containing same as active ingredient. Vynálezci: S. KIM, IY. LEE, HJ. MIN, EH. NAM, P. KIM, CS. YUN a DJ. KO. South Korea. US2014/221411 A1. 2014.
- <sup>146</sup> INSTITUTE OF MEDICINAL MOLECULAR DESIGN, INC. *O*-substituted hydroxyaryl derivatives. Japan. EP1512397 A1. 2005.
- <sup>147</sup> KRATKY, M., J. VINSOVA and J. STOLARIKOVA. Antimycobacterial Assessment of Salicylanilide Benzoates including Multidrug-Resistant Tuberculosis Strains. *Molecules* 2012, **17**, 12812-12820.
- <sup>148</sup> VOSÁTKA, R., M. KRÁTKÝ, M. ŠVARCOVÁ, J. JANOUŠEK, J. STOLAŘÍKOVÁ, J. MADACKI, S. HUSZÁR, K. MIKUŠOVÁ, J. KORDULÁKOVÁ, F. TREJTNAR and J. VINŠOVÁ. New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, **151**, 824-835.
- <sup>149</sup> KUMAR, D., G. KHARE, S. KIDWAI BEENA, A.K. TYAGI, R. SINGH and D.S. RAWAT. Novel isoniazid-amidoether derivatives: synthesis, characterization and antimycobacterial activity evaluation. *Med. Chem. Commun.* 2015, **6**, 131-137.
- <sup>150</sup> MARTINS, F., S. SANTOS, C. VENTURA, R. ELVAS-LEITAO, L. SANTOS, S. VITORINO, M. REIS, V. MIRANDA, H.E. CORREIA, J. AIRES-DE-SOUSA, V. KOVALISHYN, D.A.R.S. LATINO, J. RAMOS and M. VIVEIROS. Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, **81**, 119-138.
- <sup>151</sup> BABU, R.R., K. NARES, A. RAVI, B.M. REDDY and V.H. BABU. Synthesis of novel isoniazid incorporated styryl quinazolines as anti-tubercular agents against INH sensitive and MDR *M. tuberculosis* strains. *Med. Chem. Res.* 2014, **23**, 4414-4419.
- <sup>152</sup> SAHA, R., M.M. ALAM and M. AKHTER. Novel hybrid-pyrrole derivatives: their synthesis, antitubercular evaluation and docking studies. *RSC Adv.* 2015, **5**, 12807-12820.
- <sup>153</sup> NAPOLEON, A.A., F.R.N. KHAN, E.D. JEONG and E.H. CHUNG. Potential anti-tubercular agents: hexahydro-3-phenyl indazol-2-yl(pyridin-4-yl)methanones from anti-tubercular drug isoniazid and bis(substituted-benzylidene)cycloalkanones. *Chin. Chem. Lett.* 2015, **26**, 567-571.
- <sup>154</sup> NAVARRETE-VAZQUEZ, G., G.M. MOLINA-SALINAS, Z.V. DUARTE-FAJARDO, J. VARGAS-VILLARREAL, S. ESTRADA-SOTO, F. GONZALES-SALAZAR, E. HERNANDEZ-NUNEZ and S. SAID-FERNANDEZ. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**, 5502-5508.
- <sup>155</sup> BHAT, M.A. Synthesis and anti-mycobacterial activity of new 4-thiazolidinone and 1,3,4-oxadiazole derivatives of isoniazid. *Acta Pol. Pharm.* 2014, **71**, 763-770.
- <sup>156</sup> MAMOLO, M.G., D. ZAMPIERI, L. VIO, M. FERMEGLIA, M. FERRONE, S. PRICL, G. SCIALINO and E. BANFI. Antimycobacterial activity of new 3-substituted 5-(pyridin-4-yl)-3H-1,3,4-oxadiazol-2-one and 2-thione derivatives. Preliminary molecular modeling investigations. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, **13**, 3797-3809.
- <sup>157</sup> EARLY, J.V., A. CASEY, M.A. MARTINEZ-GRAU, I.C. GONZALES VALCARCEL, M. VIETH, J. OLLINGER, M.A. BAILEY, T. ALLING, M. FILES, Y. OVECHKINA and T. PARISH. Oxadiazoles

---

have butyrate-specific conditional activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016, **60**, 3608-3616.

<sup>158</sup> LIPINSKI, CA., F. LOMBARDO, BW. DOMINY and PJ. FEENEY. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, **46**, 3-26.

<sup>159</sup> HOOPER, A. E., S.R. KENNEDY, C.D. JONES and J.W. STEED. Gelation by supramolecular dimerization of mono(urea)s. *Chem. Commun.* 2016, **52**, 198-201.

<sup>160</sup> BENEDIKT, K. and H. EIBL. Über einige Derivate der *p*-Aminosalicylsäure und ihre tuberkulostatische Wirksamkeit. *Monatsh. Chem.* 1950, **81**, 419-423.

<sup>161</sup> AMAL and ONAT. *Astronomi-Fizik-Kimya*. 1962, **27**, 35.

<sup>162</sup> BRUNNER, K., S. MARIC, R.S. RESHMA, H. ALMQVIST, B. SEASHORE-LUDLOW, A.L. GUSTAVSSON, O. POYRAZ, P. YOGESWARI, T. LUNDBACK, M. VALLIN, D. SRIRAM, R. SCHNELL and G. SCHNEIDER. Inhibitors of the Cysteine Synthase CysM with Antibacterial Potency against Dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* 2016, **59**, 6848-6859.

<sup>163</sup> KASAGAMI, T., I.H. KIM, H.J. TSAI, K. NISHI, B. HAMMOCK and C. MORISSEAU. Salicylate-urea-based soluble epoxide hydrolase inhibitors with high metabolic and chemical stabilities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, **19**, 1784-1789.