

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra anorganické a organické chemie



**Nové skupiny potenciálních antituberkulotik s thioxo
skupinou**

Hradec Králové 2008

Petra Husáková

**CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY
IN HRADCI KRÁLOVÉ**

Department of Inorganic and Organic Chemistry



**Development of new group of potential
antituberculotics**

Hradec Králové 2008

Petra Husáková

Za odborné vedení a kritické připomínky děkuji prof. RNDr. Karlu Waisserovi, DRSc. a Mgr. Josefu Matykovi. Za nakreslení grafů děkuji Mgr. Rafaelu Doležalovi. Za měření NMR spekter děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. Za měření IČ spekter vděčím Ivě Venkovské. Za elementární analýzy děkuji pracovníkům UOChB AV ČR v Praze. Za měření antimikrobní aktivity děkuji MUDr. Jarmile Kaustové ze Zdravotního ústavu v Ostravě.

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

9.2. Český abstrakt	60
10. Přehled používaných zkratk	61

1. ÚVOD

Tuberkulóza

Tuberkulóza je bakteriální onemocnění, které nepatří jen do minulosti. Řadí se stále mezi nakažlivé a těžce léčitelné onemocnění, v roce 1993 vyhlásila Světová zdravotnická organizace tuberkulózu za nemoc ohrožující zdraví lidí po celém světě.¹⁾

Tuberkulóza se mezi lidmi vyskytuje několik staletí, teprve v roce 1882 odhalil původce onemocnění německý lékař Robert Koch.²⁾ Nemoc vyvolávají bakterie rodu *Mykobacterium*.

U člověka je hlavní původce *M. tuberculosis*, onemocnění může být vyvoláno i jinými druhy mykobakterií : *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*. K nákaze dochází cestou respirační nebo alimentární od nemocného člověka nebo zvířete. Vlastní onemocnění je projevem imunitní odpovědi na proniklá mykobakteria. Tkáň je ničena obrannými mechanismy a patologické projevy jsou odrazem průběhu onemocnění. Nakažlivá je forma plicní i mimoplicní, projevy jsou různé : meningitidy, pleuritidy, postižení ledvin, páteře či jiných kostí a kloubů. Po měsících, letech či desetiletích od proběhlé nemoci může dojít k reaktivaci. Stává se tak, pokud imunitní mechanismy nezničí všechna mykobakteria. Některá perzistují v těle a při dalším onemocnění nebo jiných stavech, kdy dochází k poklesu imunity se reaktivují. Týká se to zejména osob starých, pacientů po transplantaci nebo HIV pozitivních osob. V této fázi se objevují klasické příznaky jako horečka a kachektizace, plicní tkáň je zničena pomnožením mykobakterií a nemocný nemůže dýchat.

Mykobakteria obsahují silnou buněčnou stěnu bohatou na voskové lipidy. Ta způsobuje, že se mykobakteria při diagnostickém barvení nebarví běžným Gramovým barvivem, ale také znemožňuje působení většiny léčiv, která nedokážou přes tuto stěnu proniknout. Laboratorní diagnostika je založena na průkazu mikroskopickém po Zahl-Neelsenově barvení a na průkazu kultivačním. Mykobakteria na běžných kultivačních půdách rostou velmi pomalu - 3 a více týdnů, proto se používá obohacená tekutá půda Löwenstein-Jensenova.

Mezi obyvatelstvem je tuberkulóza rozšířená již několik staletí. Týkala se vždy všech společenských vrstev. Ze známých osobností, jimž se stala tuberkulóza smrtelnou můžeme

jmenovat například básníka Jiřího Wolкера, K.H. Borovského, skladatele Fryderika Chopaina nebo nejznámější jméno spojené s touto nemocí – rakouskou císařovnu Alžbětu „Sisi“.

Nejvíce nemocných bylo mezi nejchudším obyvatelstvem. Hromadné soužití ve vlhkých a sociálně slabých podmínkách, nedostatek potravy a také prostředků na léčbu, to vše rozvoj tuberkulózy jen podporovalo. Epidemie bývaly časté zejména v období válek a hladomoru nebo provázely jiná smrtelná onemocnění, mor, cholera, pravé neštovice.

Vrchol nárůstu tuberkulózy proběhl v 18. a 19. století, kdy nastala migrace obyvatelstva za prací z venkova do měst a také dovoz levných pracovních sil ze zahraničí.

Po objevení původce onemocnění a následně i ochranného očkování se šíření tuberkulózy omezilo. Očkování se dnes provádí bezpečnou vakcínou dánského původu z oslabeného kmene *Mycobacterium bovis* (BCG vakcína) s minimálními postvakcinačními účinky. V ČR je očkování proti tuberkulóze pro děti povinné, očkuje se více než 50 let. Vakcína chrání 80% dětí před onemocněním, u dospělých zabraňuje vzniku nejtěžších forem tuberkulózy. Očkování nezaručí, že člověk tuberkulózou neonemocní, průběh nemoci je ale mírnější a při správné léčbě pacienta neohrožuje na životě.

Předpokládalo se, že tuberkulóza ze světa zmizí, toho se díky pravidelnému očkování ve vyspělých zemích téměř podařilo dosáhnout. V rozvojových zemích je počet nemocných stále velký. Po otevření hranic došlo k nové migraci obyvatelstva a do naší země se dostalo velké množství uprchlíků. Především uprchlíci z bývalého Sovětského svazu jsou novým zdrojem tuberkulózní nárůstu, přinášejí rezistentní mykobakteriální kmeny. Je nutné tyto osoby sledovat, izolovat a léčit. Léčba v plicním sanatoriu je zdlouhavá a pro pacienta náročná i po psychické stránce. Pacient podstupuje šestiměsíční kontrolovanou léčbu, během které jsou podávány kombinace antituberkulotik. V prvních dvou měsících je dávkován izoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol, v následující fázi pacient užívá izoniazid a rifampicin.

V posledních letech vzrůstá počet onemocnění způsobených mykobakteriálními kmeny rezistentními na dosavadní léčiva a objevují se infekce způsobené potenciálně patogenními kmeny (*M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*). Tyto kmeny jsou častými původci u nemocných AIDS.

Onemocnění vyvolané kmenem *M. tuberculosis* rezistentním minimálně na kombinaci antituberkulotik izoniazidu a rifampicinu, označujeme jako multirezistentní tuberkulózu (MDR). Jedná se o specifické případy onemocnění, při kterých je dosavadní léčba neúčinná. V letech

1999-2001 byla nejběžnější multirezistence na antituberkulotika: izoniazid, rifampicin, etambutol a streptomycin potvrzena u 48,2% MDR kmenů.³⁾

Každý rok je do Registru tuberkulózy hlášeno tisíce nových tuberkulóz všech forem a lokalizací. Česká republika patří zatím do skupiny evropských zemí s příznivou situací a její účinnou kontrolou.⁴⁾

Ještě počátkem osmdesátých let dvacátého století se předpokládalo, že okolo roku 2000 tuberkulóza bude zcela vymýcena v průmyslově vyspělé části světa. Tento předpoklad se však ukázal mylným vzhledem k multirezistentním kmenům vůči běžným chemoterapeutikům. Počet chorob vyvolaných multirezistentními kmeny stoupá nejen u nás, ale v celém světě. Vývoj nových antituberkulotik tedy patří k soudobým trendům pátrání po nových léčivech.

2.CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo připravit řadu halogenovaných 4'-ethylsalicylanilidů a 4'-butylsalicylanilidů a od nich odvozených 3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů, respektive 3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů, s předpokládaným mechanismem účinku odlišným od používaných léčiv. Jedná se o inhibitory dvoukomponentového regulačního systému bakterií. Dále z připravených 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů provést záměnu jedné či obou oxo skupin za thioxo skupiny, protože podle našich předpokladů uvedená strukturní změna povede k významnému zvýšení antimykobakteriální aktivity a graficky vyhodnotit, zda předpoklad byl potvrzen. Snahou je získat látky antimykobakteriální aktivitou převyšující soudobá léčiva. U syntetizovaných látek potvrdit jejich strukturu a zaslat je k hodnocení antimykobakteriální aktivity. Připravené látky lze považovat za potenciální antituberkulotická léčiva.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1. MECHANISMY ÚČINKU ANTITUBERKULOTIK

Léčiva používaná k léčbě tuberkulózy nepředstavují jednotnou skupinu preparátů, ale látky s odlišnými mechanismy účinku. Mezi antituberkulotika zařadila WHO několik léčiv z různých lékových skupin, která jsou často toxická, s výraznými nežádoucími účinky, rychle se na ně vyvíjí rezistence. Zatím představují nejúčinnější skupinu látek ovlivňujících mykobakteria bakteriostaticky nebo baktericidně.

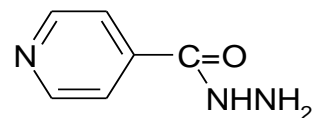
Z praktických důvodů byla antituberkulotika rozdělena do dvou skupin. První řadu tvoří antituberkulotika o nižší toxicitě. V chemoterapii se jim dává přednost. Antituberkulotika druhé řady se používají tehdy, kdy léčba antituberkulotiky první řady není úspěšná. V současné době v klinickém použití se využívá kombinace antituberkulotik, což umožňuje aplikovat nižší dávky jednotlivých léčiv, toxické efekty jsou tím sníženy a méně často dochází ke vzniku rezistentních kmenů.

Mezi antituberkulotika I.řady patří izoniazid, pyrazinamid, rifampicin, etambutol a streptomycin.⁵⁾

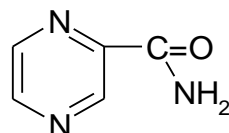
Izoniazid (INH) – hydrazid kyseliny isonikotinové. Je to látka silně hydrofilní, do buněk mykobakterií vniká póry v buněčné stěně. Buněčná stěna bakterií je silně lipofilní. INH inhibuje NADH-dependentní-enoyl-ACP-reduktázu (InhA) a tím brání biosyntéze mykolové kyseliny, hlavního lipidu bakteriální buněčné stěny.⁶⁾ Základ mechanismu aktivace je tvorba komplexu s NAD, vznikne účinná forma (acyl-NAD⁺), která inhibuje InhA. Jedná se o inhibici systému FAS II (fatty acid system)– elongace mastných kyselin.

Po vstupu do buňky je INH pomocí peroxidázy oxidován na sodnou sůl isonikotinové kyseliny, která již nemůže buňku opustit difuzí. Její vysoká koncentrace umožňuje, aby se vytvořil falešný NAD, ve kterém místo nikotinamidu je vázána isonikotinová kyselina. Falešný NAD je proto nefunkční. Rezistence vůči INH spočívá ve vyřazení peroxidázy z činnosti. INH se považuje vedle rifampicinu za nejdůležitější antituberkulotikum. Působí selektivně baktericidně na extra- a intracelulární aktivně rostoucí *M.tuberculosis*, u neaktivních forem

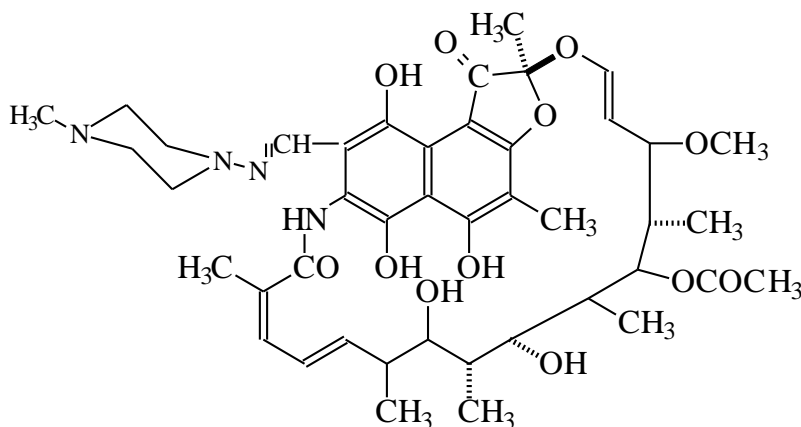
bakteriostaticky. Při profylaxi se vystačí s monoterapií. Nežádoucí účinky jsou hepatotoxicita a neurotoxicita. Je používán k léčbě všech plicních i mimoplicních forem tuberkulózy.



Pyrazinamid – mechanismus účinku je podobný izoniazidu. Je ještě více hydrofilní, aktivní je při slabě kyselém pH. Účinnost závisí na koncentraci léčiva v místě infekce. Přeměňuje se na pyrazinkarboxylovou kyselinu, snižuje pH, při kterém mykobakteria nemohou růst. Inhibuje syntézu prekurzorů krátkých mastných kyselin, může také působit jako antimetabolit nikotinamidu. Od izoniazidu je výrazně toxičtější, popsán je výskyt dny, porfyrií, hepatotoxicita, horečky, kožní reakce a jiné nežádoucí účinky. Používá se jen u akutní tuberkulózy, selhala-li předchozí léčba.

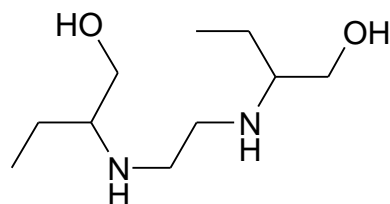


Rifampicin – polysyntetické úzkospektré antibiotikum, vazbou na β -podjednotku DNA dependentní RNA polymerázy inhibuje syntézu bakteriální RNA. Vazbou na promotor blokuje syntézu prvního dinukleotidu na nové molekule RNA, konformace části molekuly léčiva připomíná dva adenosinové nukleotidy v RNA. Rifampicin patří mezi neúčinnější antituberkulotika, působí baktericidně, rezistence na něj se vyvíjí nejméně často. Za sníženou bakteriální citlivost k rifampicinu bývá odpovědná mutace v β -podjednotce cílového enzymu.

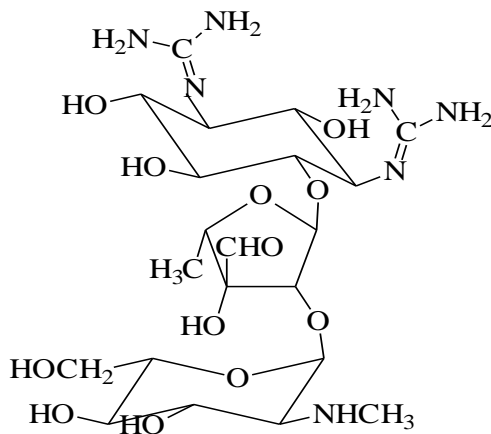


Rifabutin – byl získán modelováním struktury rifampicinu. Postihuje i řadu potenciálně patogenních kmenů. Rifapentin – je lipofilnější než rifampicin, lépe prostupuje tkáň, je efektivnější proti tuberkulóze a s lehčím dávkovým režimem. Mechanismus účinku je stejný jako u rifampicinu, inhibice syntézy RNA.

Etambutol – zasahuje do mykobakteriálního metabolismu inhibicí arabinofuranosyltransferázy účastníci se polymerace D-arabinofuranosy na arabinoglykan, složku buněčné stěny mykobakterií.⁷⁾ Působí pouze na aktivně rostoucí kmeny mykobakterií. Používá se v kombinaci s izoniazidem a streptomycinem, může poškozovat optický nerv, může se objevit porucha vnímání zelené barvy.



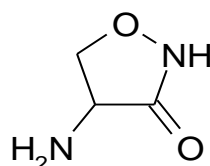
Streptomycin – jedno z prvních léčiv používaných k léčbě tuberkulózy. Byl připraven roku 1945. Řadí se mezi aminoglykosidová antibiotika, inhibuje syntézu proteinů vazbou na lehčí ribozomální podjednotku 30S. Inhibuje iniciaci peptidového řetězce a v buňkách s aerobním metabolismem inhibuje respiraci. Vedlejšími účinky jsou ototoxicita a dermatitidy, je účinný jen i.v. Rezistence bývá způsobena enzymaticky katalyzovanou inaktivací antibiotik.



Další léčiva podávaná při selhání primární léčby představují antituberkulotika II.řady. Některé látky se podobají antituberkulotikům I.řady, jsou zde i látky odlišné.

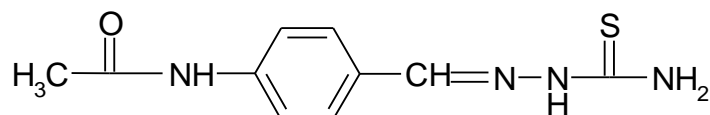
Cykloserin – širokospektré antibiotikum inhibující syntézu buněčné stěny. Je to strukturní analog D-alaninu. D-alaninovým transportérem je akumulován do bakterií, kde inhibuje alanin-racemázu a D-alanyl-D-alanin syntetázu, enzymy působící při syntéze peptidoglykanu. Peptidoglykan určuje mechanické vlastnosti buněčné stěny, tvar a rigiditu.

Je neurotoxický, používá se jen u kmenů s prokázanou citlivostí k cykloserinu, selhala-li primární léčba.

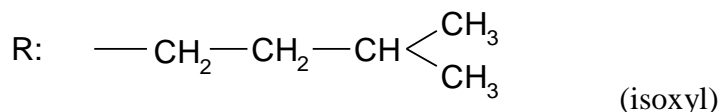
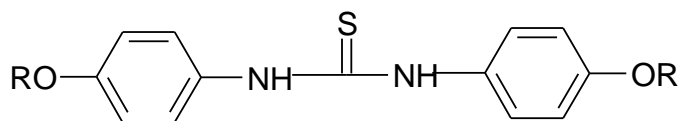


Ethionamid a prothionamid – thioamidy 2-alkyl-(ethyl nebo propyl)-isonikotinové kyseliny, blokuji syntézu mykolových kyselin. Aktivovány jsou flavindependentní monooxygenásou. Základem mechanismu aktivace je také tvorba komplexu s NAD. Protože jeho biopřeměny v buňce se neúčastní peroxidáza, nemá zkříženou rezistenci s INH.⁸⁾

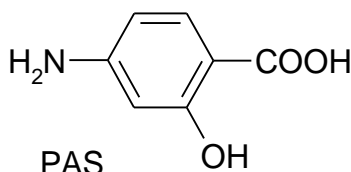
Thiacetazon patřil mezi první antituberkulotika. Mechanismus spočívá v inhibici syntézy mykolových kyselin. Pro levnou výrobu a nízkou cenu se používá v rozvojových zemích.



Isoxyl je derivát diarylthiomočoviny. Inhibuje syntézu mykolových kyselin. Dnes se převážně používá při léčbě lepry. (Malomocenství je onemocnění vyvolané *Mycobacterium leprae*).



PAS- kyselina para-aminosalicylová., blokuje syntézu DNA. Inhibuje syntézu folátu tím, že působí jako antimetabolit (je to strukturní analog kyseliny para-aminobenzoové). Folát je koenzym důležitý pro buněčný růst. Bakterie si jej musí vytvářet de novo, neumí jej přijímat. Dnes už se nepoužívá.



Jako antituberkulotika II.řady se používají některá aminoglykosidová antibiotika: amikacin, kanamycin, tobramycin, gentamycin, neomycin. Tyto látky blokují syntézu bílkovin v ribozomech vazbou na podjednotku 30S. Interferují s iniciačním komplexem při tvorbě peptidů. Liposolubilita aminoglykosidů je nízká. Špatně se vstřebávají ze zažívacího traktu, proto se musí aplikovat nitrožilně nebo nitrosvalově. V závislosti na dávce a délce podávání může jejich užívání vést ke ztrátě sluchu. Jiné nežádoucí účinky mohou být kožní reakce, horečka nebo anafylaktické reakce.

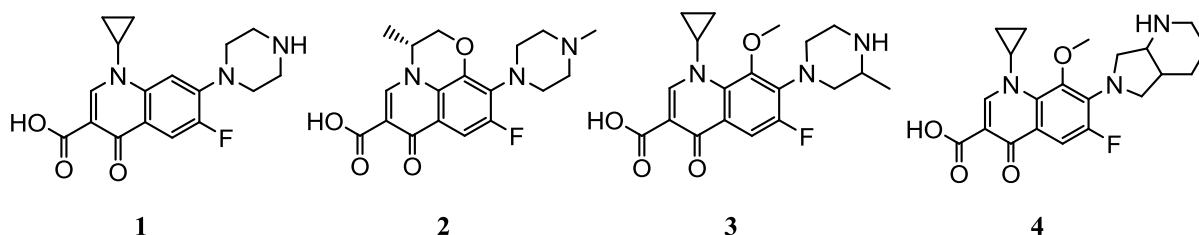
Gentamycin je nejúčinnější aminoglykosid, má stejné vlastnosti jako streptomycin. Amikacin je polysyntetický derivát kanamycinu. Neomycin působí lokálně.

Kapreomycin, viomycin, enviomycin – polypeptidová antibiotika, blokují syntézu proteinů. Kapreomycin má zkříženou rezistenci s viomycinem, méně s neomycinem a kanamycinem. Musí být podáván parenterálně. Je neurotoxický, současné podávání s jinými neurotoxickými látkami jako je streptomycin či viomycin není vhodné. Další nežádoucí účinky jsou ototoxicita, změny v krevním obraze, poruchy CNS. Klinicky se využívá výhradně k léčbě tuberkulózy v kombinaci s jinými antituberkulotiky.

Clarithromycin – makrolidové antibiotikum. Blokuje syntézu bílkovin vazbou na podjednotku 50S.

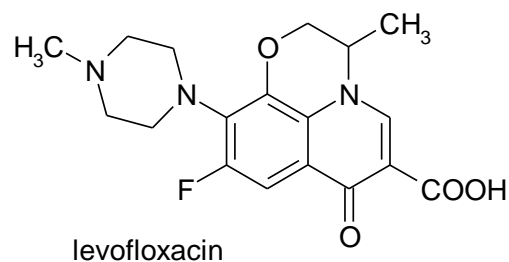
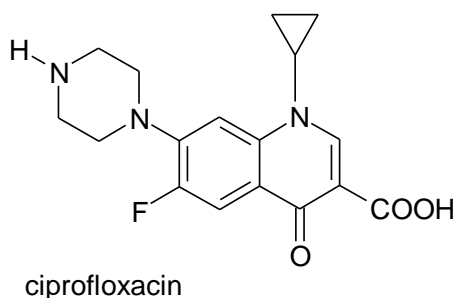
Mezi moderní antituberkulotika II. řady lze zařadit chinolonové preparáty. Jsou to látky odvozené od kyseliny nalidixové. Jsou to preparáty užívané při léčbě systémových onemocnění, účinná širokospektrá baktericidní léčiva. Mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriální DNA-gyrázy. Mají dvě ionizovatelná centra. Vytvářejí v membráně porinový kanál.

Nejúčinnější jsou preparáty fluorochinolonové (ciprofloxacin **1**, ofloxacin **2**, gatifloxacin **3**, moxifloxacin **4**). Inhibují replikaci DNA a transkripci vázáním se na topoizomerázu I a IV. Tento mechanismus nemá žádné známé přirozené antibiotikum, mykobakterium je přesto schopno i zde vyvinout resistenci. Tyto látky mají také nejméně vedlejších účinků. Může se vyskytnout nauzea, zvracení, fotosenzitivita, poškození nervů, praskání šlach nebo poškození srdečního svalu.



Minimální inhibiční koncentrace (MIC) fluorochinolonů pro MT se pohybují okolo 2 μ g/ml, vyšší generace jdou MIC ještě níže.

Rezistence bývá způsobena mutací v DNA gyráze a změnou permeability buněčné stěny. Nejefektivnější vůči širokému spektru bakterií je norfloxacin a ciprofloxacin, členové druhé generace 6-fluorochinolonů a lonefloxacin a levofloxacin, deriváty difluorované.



3.2. NOVÉ MECHANISMY ÚČINKU POTENCIÁLNÍCH ANTITUBERKULOZNÍCH LÉČIV

Léčba tuberkulózy kombinacemi antituberkulotik představuje zatím nejúčinnější způsob léčení. Stále častěji se ale objevují multirezistentní kmeny mykobakterií na tuto léčbu již nereagující. Mnohá antituberkulotika byla připravena obmněnou předlohou struktury, kterou představovalo již účinné léčivo, proto se u některých léčiv objevuje zkřížená rezistence. Výzkum s cílem zastavení tuberkulózních patogenů a procesů nemoci vedl k identifikaci biochemických procesů, které by mohly být účinnými cíli lékové terapie.⁹⁾ Teprve určení kompletní genomové sekvence *M.tuberculosis* odhalil detailní obraz metabolických procesů tohoto mikroorganismu.¹⁰⁾

Při hledání nových syntetických molekul s antimykobakteriální aktivitou byly vyloučeny přírodní produkty a přímé analogy dosavadních léčivých antituberkulózních agens.

V posledních letech tedy vzrůstá zájem o taková léčiva, která by měla odlišný mechanismus účinku než léčiva dosavadní. Cílem zásahu antimykobakteriální terapie je zpravidla buněčná stěna. Komplex lipoglykanové kalyx představuje významnou bariéru pro intracelulárně působící léčiva, aby mohla být léčiva účinná, musí proniknout buněčnou stěnou. (Tak působí například izoniazid a ethambutol).¹¹⁾ Jako nový biologický cíl byl navržen příslušný enzym v biosyntéze buněčné stěny, zejména v syntéze mykolové kyseliny. Tím nejčastějším cílem je enoyl-acyl carrier protein reductasa (InhA).¹²⁾ a také protein MabA, beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductasa *M. tuberculosis*.

V naší práci jsme se zaměřili na sloučeniny obsahující ve své molekule atomy síry, tyto látky by měly být inhibitory dvoukomponentového regulačního systému bakterií (TCS). Těmito novými potenciálně účinnými látkami by mohly být 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony a 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony. O účinnosti síry se dá usuzovat také proto, že řada sloučnin s thioxo skupinou byla používána jako antituberkulotika (thiacetazon, isoxyl, ethionamid, prothionamid). Zpravidla byly inhibitory syntézy mykolových kyselin.^{13,14)} Bakteriostatický a baktericidní efekt na buněčnou stěnu mají například 4-thiazolidinonové deriváty, inhibitory MurB. Thiazolidinon ovlivňuje biosyntézu cukerných nukleotidů v peptidoglykanu.¹⁵⁾

Antimykobakteriální aktivitu vykazují též deriváty 6-merkaptopurinu (*sulfonované nebo sulfenované*). Deriváty merkaptopurinu se užívají k léčbě leukémie a jiných kanceróz a zánětlivých střevních onemocnění.¹⁶⁾ Tyto sloučeniny vykazovaly aktivitu vůči *M.tuberculosis* a *M. avium*.

Antimykobakteriální aktivita je také spojená s řadou sloučenin obsahujících alkylmerkaptanovou skupinu atakující elektron-deficitní atom uhlíku.¹⁷⁾ Sloučeniny s antimykobakteriální aktivitou často obsahují benzothiazolovou strukturu nebo jemu strukturně podobný heterocykl^{18,19)}, aktivní byly také deriváty flourobenzylové.²⁰⁾ Důležité jsou zde elektronakceptorové vlastnosti substituentu připojeného na benzylovém kruhu.

3.3. INHIBITORY DVOUKOMPONENTNÍHO SYSTÉMU

Z výsledků různých prací vyplývá, že sloučeniny obsahující ve své molekule síru vykazují aktivitu vůči *M. tuberculosis*. Proto naše práce směřuje k syntéze látek, které by měly být účinné proti mykobakteriím a které by měly mít odlišný mechanismus účinku od dosavadních léčiv. Jedná se o inhibitory dvoukomponentového regulačního systému bakterií (TCS – two component regulatory systems).^{21,22)}

Podnětem ke studii tohoto systému byl zvyšující se nárůst multirezistentních kmenů bakterií, zejména v nemocnicích. Pacienti byli často dávkováni silnými a širokospektrými antibiotiky, zejména vankomycinem. Snahou bylo odhalit, jakým způsobem si bakterie vytvářejí rezistenci vůči používaným léčivům a jak tomu zabránit. Tak byl identifikován dvoukomponentový regulační systém, který bakterie používají ke sledování změn v okolí. TCS obsahuje informaci pro podporu homeostázy bakteriální buňky, účastní se reakce na stimuly vnějšího i vnitřního prostředí a expresi virulenních determinant. Například za rezistenci enterokoků k vankomycinu je zodpovědný právě tento systém.

V jednoduchých podmínkách se TCS skládá z citlivých proteinů (histidin-proteinkinázy) a DNA vázajícího proteinu, který představuje regulátor odpovědi. Přenosem fosfátu z ATP na zbytek asparagové kyseliny proteinu, představujícího regulátor odpovědi, dojde k aktivaci nebo represi genové transkripce. Přenosu fosfátu je dosaženo prostřednictvím vysokoergního fosfohistidinového intermediátu příbuzné kinázy. Naproti tomu eukaryotický signální systém používá ATP-dependentní serin/threonin a tyrosin protein kinázy. Tímto je dána strategická příležitost pro design nových selektivních antibiotik. Proteiny v systému se liší sekvencí aminokyselin, především v oblasti kódující autofosforylační a fosfotransferovou funkci. TCS se nacházejí v rostoucích bakteriálních buňkách, hrají klíčovou roli v regulaci replikace DNA a buněčného cyklu. Více než 100 TCS bylo již identifikováno u některých důležitých nosokomiálních patogenů (*S. aureus*, *E. faecium*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), také u kvasinek a hub, ne však u vyšších organismů. Proto může být tento systém vhodným terčem zásahu nových chemoterapeutik.

Při studii transdukčních systémů byl jako model TCS použit systém KinA/Spo0F z *Bacillus subtilis*, jako inhibitory byly zkoušeny chlorované salicylanilidy. Inhibitory dvoukomponentového regulačního systému zasahují do energetického metabolismu bakteriální

buňky, do syntézy ATP. U většiny bakterií je ATP tvořeno aerobně - oxidativní fosforylací substrátu (většinou cukry) nebo anaerobně, kdy je konečným akceptorem elektronů anorganická látka. Při oxidativní fosforylaci vzniká při transportu elektronů v řetězci elektrochemický gradient jako výsledek vypuzení páru protonů přes membránu a jejich návratu. Vzniká „proton-hnací síla“ využitá k syntéze ATP.

V roce 1998 bylo zjištěno, že oxidativní fosforylaci ovlivňují salicylanilidy (vybitím „proton-hnací síly“ potřebné k syntéze ATP) a že podobné účinky mají také 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony.²³⁾ Vztahy mezi strukturou a aktivitou jsou u obou skupin podobné. Optimální aktivita je dosaženo, když elektronakceptorové skupiny jsou přítomny na salicyloylovém kruhu. Elektronakceptorové vlastnosti substituentu na salicyloylovém kruhu a hydrofobicita anilinové části ovlivňují aktivitu.

Hlavní pozornost této práce je proto zaměřena na záměnu oxoskupiny za thioxoskupinu v halogenovaných 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionech, s alkylem v poloze 4 fenylu. Je to další varianta látek, vycházejících ze salicylanilidů. Zpravidla podobná záměna se projeví zvýšením antimykobakteriální aktivity. Popsaný efekt byl nalezen u analogických 3-arylquinazolin-2,4(1*H*, 3*H*)-dionů, kde sloučeniny s oxo skupinou jsou neaktivní a aktivita je dosaženo až po záměně oxo skupin za thioxo skupiny.²⁴⁾ a u 2,3-dihydro-1-alkylindol-2-thionů, kde obdobné sloučeniny s oxoskupinami jsou neúčinné.²⁵⁾

Na základě uvedených závěrů o mechanismech inhibice dvoukomponentového regulačního systému bakterií byl vytyčen cíl práce, který je mozaikou v celkových výzkumných studiích katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

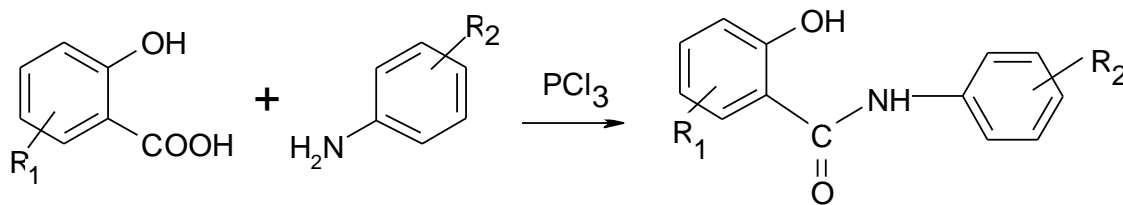
Byla připravena řada sirných sloučenin. 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-ony a 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithiony. Jako výchozí látky byly vybrány halogenované 4'-ethyl- a 4'-butyl-salicylanilidy. Připravené salicylanilidy byly zacyklizovány nadbytkem methylchloroformiatu na benzoxazindionové deriváty a ty byly použity pro přípravu sirných analog. Tyto sloučeniny vykazovaly antimykobakteriální aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium avium*.

4.1. PŘÍPRAVA 4'-ALKYL-SALICYLANILIDŮ

Substituovaná kyselina salicylová reagovala se substituovaným anilinem v prostředí toluenu a v přítomnosti chloridu fosforitého.^{26,27} (schéma 1). Pro naše reakce byla použita 4-chlor-, 5-chlorsalicylová kyselina, 5-brom-, 3,5-dibromsalicylová kyselina a anilin substituovaný v pozici 4 ethylem nebo butylem. Výtěžky, teploty tání, frekvence karbonylu, elementární analýza, NMR a IČ spektra jsou přiložena v tabulkách.

Postup přípravy:

Substituovaná kyselina salicylová (20 mmol) byla rozpuštěna ve 100ml toluenu, byl přidán substituovaný anilin (20 mmol) a chlorid fosforitý (10 mmol). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem k varu 3 hodiny, poté byl toluen odpařen na rotační vakuové odparce a produkty rekrystalizovány v 96% ethanolu. (Výtěžek reakce byl 52-79%)



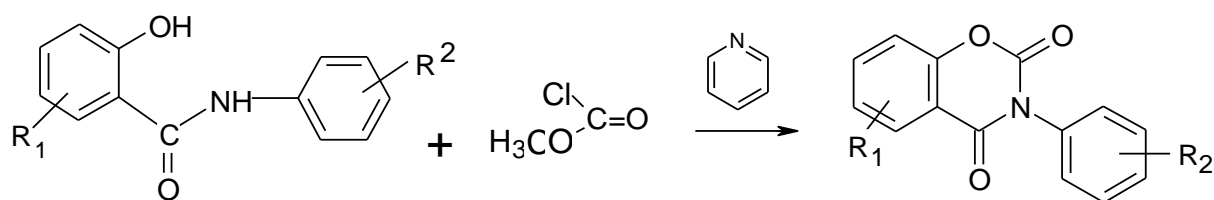
(schéma 1)

4.2. PŘÍPRAVA 3-(4-ALKYLFENYL)-2H-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3H)-DIONŮ

Příslušný 4'-alkyl-halogensalicylanilid reagoval v prostředí suchého pyridinu s methylchloroformiátem.²⁸⁾ (schéma 2) Výtěžky, teploty tání, frekvence karbonylu, elementární analýza, NMR a IČ spektra jsou přiložena v tabulkách.

Postup přípravy:

Halogenovaný 4'-alkyl-salicylanilid (40 mmol) byl rozpuštěn ve 20 ml suchého pyridinu a směs byla postavena do ledové lázně. Za stálého míchání a chlazení byl opatrně přikapáván do směsi methylchloroformiát (48mmol). Po 10 minutách byla ledová lázeň odstraněna a směs se nechala zahřívát 1 hodinu pod zpětným chladičem. Po ukončení zahřívání se reakční směs nechala 20 hodin stát. Poté byla převedena do 50 ml roztoku 5% kyseliny chlorovodíkové. Proběhlo vysrážení surového produktu, sraženina byla odfiltrována a převedena do 40 ml 5% hydroxidu sodného. Znovu byla odfiltrována a produkt byl přečištěn v 96% ethanolu. (Výtěžek reakce byl 55-65%)



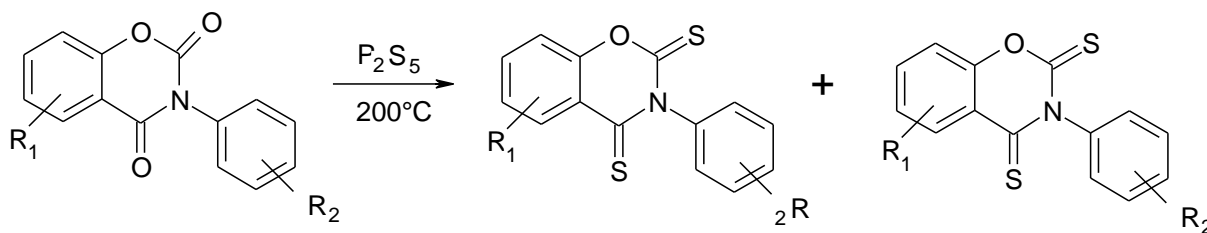
(schéma 2)

4.3. PŘÍPRAVA SIRNÝCH DERIVÁTŮ

Reakcí 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů s pentasulfidem fosforečným byla získána směs obsahující 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-ony a 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithiony.²⁸⁾ (schéma 3) Výtěžky, teploty tání, frekvence karbonylu, elementární analýza, NMR a IČ spektra jsou přiložena v tabulkách.

Postup přípravy:

Halogenovaný 3 - (4-alkylfenyl)- 2H - 1,3 -benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol), byl zahříván s ekvimolárním množstvím pentasulfidu fosforečného na kovové lázni pod zpětným chladičem. Od dosažení reakční teploty 200°C byla směs zahřívána 5 minut. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla reakční směs přečištěna 10% roztokem NaHCO₃ (100 ml) a extrahována do chloroformu. Po extrakci směsi sirných derivátů do chloroformové vrstvy byla vodná vrstva oddělena a chloroform odpařen na vakuové odparce. Směs obsahující žlutooranžový 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on a červený 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion byla rozdělena na silikagelové koloně sloupcovou chromatografií pomocí soustavy rozpouštědel hexan:toluen v poměru 3:1. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce, produkty byly rekrystalizovány v 96% ethanolu. Výtěžek reakce byl 29-42 % monosírného derivátu (35% průměr) a 17-50 % disírného derivátu (27% průměr).



(schéma 3)

4.4. FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI

Všechny látky byly vysušeny sušicí pistolí nad oxidem fosforečným 24 hodin. Teploty tání byly měřeny na Kofflerově bloku, jsou uvedeny v příložených tabulkách ve stupních Celsia. Elementární analýza byla provedena v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze. V tabulkách jsou uvedeny vypočtené a naměřené hodnoty procentuálního zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku. Infračervená spektra byla měřena v tabletách bromidu draselného na přístroji NIKOLET IMPACT 400. Hodnoty vlnočtů $\nu(\text{C}=\text{O})$ infračervených spekter jsou uvedeny v příložených tabulkách v jednotkách cm^{-1} . K ověření čistoty syntetizovaných látek byla použita tenkovrstevná chromatografie na silufolových deskách s fluorescenčním indikátorem SILUFOL UV 254 + 366 (Kavalier Votice, Česká Republika), vyvíjecí soustava: cyklohexan-aceton 3:1. Spektra nukleární magnetické rezonance změřena na přístroji VARIAN MERCURY- VX BB 300. Uhlíková spektra ^{13}C byla měřena při frekvenci 75 MHz, vodíková spektra ^1H při frekvenci 300 MHz. Pro analýzu byly látky rozpuštěny v D_6 -dimetylsulfoxidu. Hodnoty chemických posunů δ uvedené v ppm, jsou vztaženy k tetrametylsilanu, který představuje nepřímý standard.

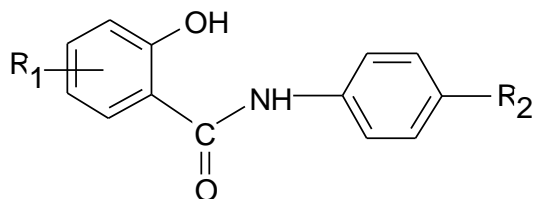
4.5. ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ HODNOCENÍ

Všechny syntetizované látky byly testovány proti kulturám *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80 a *Mycobacterium avium* My CNCTC 330/88, kmenům z České národní kolekce typových kultur (Czech national collection of type cultures) a proti kmenu *Mycobacterium kansasii* 6 509/96 izolovaného od pacienta z okresu Karviná. Látky byly rozpuštěny v dimetylsulfoxidu a naředěny na koncentrace od 0,5 do 1000 μmol , mykobakteriální kmeny byly naředěny na koncentrace v rozmezí 10^{-3} až 10^{-5} . Hodnocení minimálních inhibičních koncentrací bylo provedeno u *M. kansasii* po 7, 14 a 21 dnech inkubace při 37°C v Petriho miskách na Šulově půdě. U *M.tuberculosis* a *M.avium* bylo provedeno vyhodnocení po 14 a 21 dnech. Testování bylo provedeno ve Zdravotním ústavu v Ostravě.

4.6. PŘEHLED PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

4.6.1 Přehled připravených 4'-alkylsalicylanilidů

	R ₁		R ₂
1	4-Cl	a	ethyl
2	5-Cl	b	butyl
3	5-Br		
4	3,5-diBr		



Tab.1: Výtěžky, teploty tání, hodnoty vlnočtů infračervených spekter 4'-alkylsalicylanilidů

Látka	Výtěžek (%)	Teplota tání (°C)	$\nu(\text{C}=\text{O})$ (cm ⁻¹)	Sumární vzorec
1a (T 5724)	60	198-200	1622	C ₁₅ H ₁₄ ClNO ₂
2a (T 5725)	63	198-201	1621	C ₁₅ H ₁₄ ClNO ₂
3a (T 5726)	59	208-210	1629	C ₁₅ H ₁₄ BrNO ₂
4a (T 5727)	52	128-132	1648	C ₁₅ H ₁₃ Br ₂ NO ₂
2b (T 5538)	39	162-163	1628	C ₁₇ H ₁₈ ClNO ₂

Tab. 2: CHN analýza 4'-alkylsalicylanilidů

Látka	C % vypočtené/naměřené	H % vypočtené/naměřené	N % vypočtené/naměřené
T 5724	65,34 / 65,41	5,12 / 4,90	5,08 / 4,74
T 5725	65,34 / 65,24	5,12 / 4,95	5,08 / 4,75
T 5726	56,27 / 56,02	4,41 / 4,25	4,37 / 4,15
T 5727	45,15 / 45,26	3,28 / 3,18	3,51 / 3,23
T 5538	67,05 / 67,21	5,95 / 5,97	4,38 / 4,61

Přehled ^1H -NMR a ^{13}C -NMR

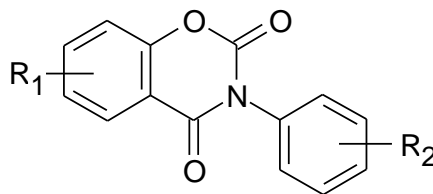
V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty signálů chemicky ekvivalentních vodíků z interpretovaných NMR spekter ve formě chemických posunů δ . V tabulce je uveden typ signálu (s- singlet, bs- široký singlet, d- dublet, dd- dublet dubletu, m-multiplet), počet vodíků, kterým signál přísluší a poloha prvku v molekule. U štěpených signálů je uvedena interakční konstanta J v Hz. Vodíková spektra jsou měřena při 300 MHz. Dále jsou uvedeny hodnoty chemických posunů δ uhlíků z interpretovaných spekter měřených při 75 MHz.

Tab.3: ^1H a ^{13}C NMR spektra 4'-alkylsalicylanidů

Látka	NMR, δ
T 5724	^1H NMR (300 MHz) δ 12.22 (1H, bs, NH), 10.31 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H6), 7.62-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.22-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-6.99 (2H, m, H3, H5), 2.57 (2H, q, $J=7.5$ Hz, CH ₂), 1.16 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz) δ 165.7, 159.4, 140.0, 137.6, 135.8, 130.9, 128.2, 121.2, 119.4, 117.0, 27.8, 15.9
T 5725	^1H NMR (300 MHz) δ 11.95 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.63-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.58 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.16 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz) δ 165.2, 157.3, 140.1, 135.8, 133.3, 128.4, 128.2, 122.9, 121.2, 119.4, 119.3, 27.8, 15.9
T 5726	^1H NMR (300 MHz) δ 11.95 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 8.09 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.62-7.56 (2H, m, AA', BB', overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd, overlapped, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.57 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.16 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz) δ 165.1, 157.8, 140.1, 136.1, 135.8, 131.3, 128.2, 121.2, 119.9, 119.8, 110.3, 27.9, 15.9
T 5727	^1H NMR (300 MHz) δ 10.60 (1H, bs, OH), 8.30 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H6), 7.99 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H4), 7.61-7.53 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.59 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.17 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz) δ 166.8, 156.9, 140.9, 138.8, 135.0, 129.8, 128.2, 122.2, 118.3, 112.5, 110.0, 27.9, 15.8
T 5538	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.93 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 7.97 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.61-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.22-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.54 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH ₂), 1.60-1.45 (2H, m, CH ₂), 1.36-1.21 (2H, m, CH ₂), 0.88 (3H, t, $J=7.4$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 138.7, 135.8, 133.3, 128.7, 128.5, 122.9, 121.1, 119.5, 119.3, 34.5, 33.4, 21.9, 14.0.

4.6.2 Přehled připravených 3-(4'-alkylfenyl)-2H-1,3- benzoxazin-2,4(3H)-dionů

	R ₁		R ₂
5	6-Cl	a	ethyl
6	7-Cl	b	butyl
7	6-Br		
8	6,8-diBr		



Tab. 4: Výtěžky, teploty tání, hodnoty vlnočtů infračervených spekter 3-(4'-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Látka	Výtěžek (%)	Teplota tání (°C)	$\nu(\text{C=O})$ (cm ⁻¹)	Sumární vzorec
5a T 5736	56	230-233	1770 1705	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₃
6a T 5735	58	185-189	1776 1708	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₃
7a T 5737	59	219-222	1772 1703	C ₁₆ H ₁₂ BrNO ₃
8a T 5738	55	250-253	1781 1704	C ₁₆ H ₁₁ Br ₂ NO ₃
5b T 5578	58	189-190	1771 1705	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₃

Tab. 5: CHN analýza 3-(4'-alkylfenyl)-2H-1,3- benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Látka	C % vypočtené/naměřené	H % vypočtené/naměřené	N % vypočtené/naměřené
T 5578	65,59 / 65,38	4,89 / 4,88	4,25 / 4,05
T 5735	63,69 / 63,59	4,01 / 3,95	4,46 / 4,36
T 5736	63,69 / 63,62	4,01 / 3,95	4,64 / 4,44
T 5737	55,51 / 55,67	3,49 / 3,55	4,05 / 3,80
T 5738	45,21 / 45,17	2,61 / 2,53	3,30 / 3,11

Přehled ^1H -NMR a ^{13}C -NMR

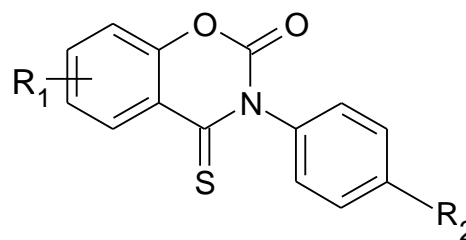
Tab.6: ^1H a ^{13}C NMR spektra 3-(4'-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Látka	NMR, δ
T 5578	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.96-7.87 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.36-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.64 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH ₂), 1.67-1.53 (2H, m, CH ₂), 1.43-1.26 (2H, m, CH ₂), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH ₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 151.5, 147.5, 143.3, 136.1, 132.7, 129.4, 129.1, 128.4, 126.5, 119.0, 116.7, 34.7, 33.3, 22.0, 14.0
T 5735	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5), 7.75 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6), 7.37-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 147.6, 144.6, 140.5, 132.8, 129.2, 128.6, 128.5, 125.8, 116.8, 114.2, 28.1, 15.7
T 5736	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.96-7.86 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=0.6$ Hz, H8), 7.38-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.7$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.7$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 151.5, 147.5, 144.7, 136.1, 132.8, 129.4, 128.6, 128.4, 126.5, 118.9, 116.7, 28.1, 15.7
T 5737	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07-7.97 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.37-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 151.9, 147.5, 144.7, 138.9, 132.8, 129.5, 128.6, 128.4, 119.2, 117.1, 117.0, 28.1, 15.7
T 5738	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.42 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.05 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H7), 7.38-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.5, 149.2, 146.9, 144.8, 140.8, 132.6, 129.1, 128.7, 128.3, 118.2, 117.2, 110.8, 28.1, 15.7

Látka T 5737 nebyla úplně čistá

4.6.3 Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů

	R ₁		R ₂
9	6-Cl	a	ethyl
10	7-Cl	b	butyl
11	6-Br		
12	6,8-diBr		



Tab.7: Výtěžky, teploty tání, hodnoty vlnočtů infračervených spekter 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů

Látka	Výtěžek (%)	Teplota tání (°C)	$\nu(\text{C=O})$ (cm ⁻¹)	Sumární vzorec
9a T 6145	33	199-202	1761	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₂ S
10a T 6146	39	188-190	1761	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₂ S
11a T 6149	42	227-229	1759	C ₁₆ H ₁₂ BrNO ₂ S
9b T 6151	29	149-152	1771	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₂ S
12a T 6005	32	223-225	1763	C ₁₆ H ₁₁ Br ₂ NO ₂ S

Tab.8: CHN analýza 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů

Látka	C % vypočtené/naměřené	H % vypočtené/naměřené	N % vypočtené/naměřené
T 6145	60,47 / 60,39	3,81 / 3,84	4,41 / 4,31
T 6146	60,47 / 60,33	3,81 / 3,79	4,41 / 4,22
T 6149	52,05 / 52,80	3,34 / 3,33	3,87 / 3,56
T 6151	62,51 / 62,38	4,66 / 4,73	4,05 / 3,91
T 6005	43,56 / 43,59	2,51 / 2,88	3,18 / 2,88

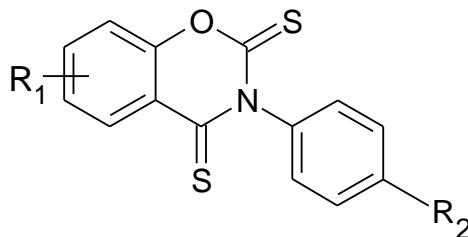
Přehled ^1H -NMR a ^{13}C -NMR

Tab.9: ^1H a ^{13}C NMR spektra 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů

Látka	NMR, δ
T 6145	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H5), 7.91 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.38-7.31 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.31-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.5, 148.7, 144.6, 144.5, 137.7, 135.8, 130.0, 129.7, 128.9, 128.0, 122.2, 119.2, 28.1, 15.6
T 6146	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.74 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H8), 7.50 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.2$ Hz, H6), 7.38-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.29-7.23 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.53 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.9, 150.2, 144.5, 144.5, 140.7, 137.6, 133.0, 128.9, 128.1, 126.2, 120.1, 116.8, 28.1, 15.6
T 6149	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 8.02 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.3$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.38-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.23 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 149.1, 144.5, 138.6, 137.6, 133.0, 128.9, 128.0, 122.5, 119.4, 117.4, 28.1, 15.6
T 6151	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H5), 7.91 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.36-7.29 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.29-7.22 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH ₂), 1.67-1.52 (2H, m, CH ₂), 1.42-1.26 (2H, m, CH ₂), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.5, 148.7, 144.5, 143.2, 137.6, 135.8, 13.0, 129.7, 129.4, 127.9, 122.2, 119.2, 34.7, 33.2, 22.0, 14.0
T 6005	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.43 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 8.32 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H7), 7.39-7.31 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.29-7.23 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, $J=7.3$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 190.6, 146.6, 144.7, 144.0, 140.4, 137.6, 132.8, 129.0, 127.9, 123.4, 117.4, 111.1, 28.1, 15.6

4.6.4 Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

	R ₁		R ₂
13	6-Cl	a	ethyl
14	7-Cl	b	butyl
15	6-Br		
16	6,8-diBr		



Tab.10: Výtěžky, teploty tání, hodnoty vlnočtů infračervených spekter 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

Látka	Výtěžek (%)	Teplota tání (°C)	Sumární vzorec
13a T 6147	21	173-174	C ₁₆ H ₁₂ ClNOS ₂
14a T 6148	50	205-208	C ₁₆ H ₁₂ ClNOS ₂
15a T 6150	17	195	C ₁₆ H ₁₂ BrNOS ₂
13b T 6152	26	125-127	C ₁₈ H ₁₆ ClNOS ₂

Tab.11: CHN analýza 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

Látka	C % vypočtené/naměřené	H % vypočtené/naměřené	N % vypočtené/naměřené
T 6147	57,56 / 57,45	3,62 / 3,53	4,20 / 4,04
T 6148	57,56 / 57,27	3,62 / 3,53	4,20 / 3,99
T 6150	50,80 / 50,64	3,20 / 3,25	3,70 / 3,44
T 6152	59,74 / 59,56	4,46 / 4,44	3,87 / 3,55

Přehled ^1H -NMR a ^{13}C -NMR

Tab.12: ^1H a ^{13}C NMR spektra 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

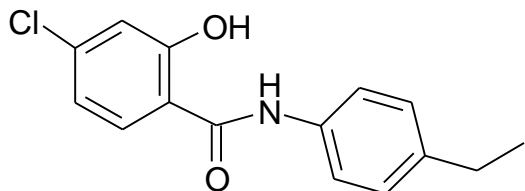
Látka	NMR, δ
T 6147	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.12 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 7.93 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.3$ Hz, H7), 7.63 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.38-7.29 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.25-7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.9, 177.8, 148.7, 144.3, 141.5, 136.2, 130.7, 130.0, 129.1, 127.8, 123.6, 118.9, 28.0, 15.4
T 6148	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.20 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.84 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.53 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6), 7.37-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.4, 177.9, 150.2, 144.3, 141.5, 141.2, 133.1, 129.1, 127.9, 127.1, 121.5, 116.5, 28.0, 15.4
T 6150	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 8.05 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.3$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.37-7.29 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.25-7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH ₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 144.3, 141.5, 138.9, 133.1, 129.2, 127.8, 123.9, 119.0, 118.5, 28.0, 15.5
T 6152	^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.13 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H5), 7.94 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H7), 7.63 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.35-7.27 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH ₂), 1.67-1.51 (2H, m, CH ₂), 1.41-1.24 (2H, m, CH ₂), 0.91 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH ₃) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.9, 177.8, 148.7, 143.0, 141.5, 136.2, 130.7, 130.0, 129.6, 127.8, 123.6, 118.9, 34.7, 33.1, 22.0, 14.0

4.7 VZORCE PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

4-Chlor-4'-ethylfenyl-salicylanilid (T 5724)

Sumární vzorec : $C_{15}H_{14}ClNO_2$

M_r : 275,74



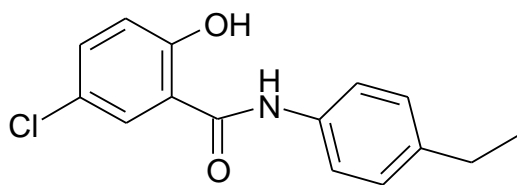
Použité chemikálie : kyselina 4-chlorsalicylová (0,02 mol)
4-ethylanilin (0,02 mol)
chlorid fosforitý (0,01 mol)
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 198-200 °C .

5-Chlor-4'-ethylfenyl-salicylanilid (T 5725)

Sumární vzorec : $C_{15}H_{14}ClNO_2$

M_r : 275,74



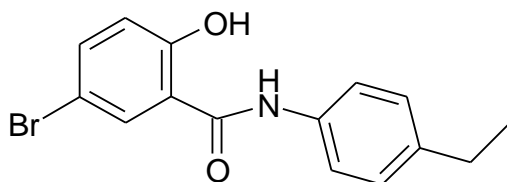
Použité chemikálie : kyselina 5-chlorsalicylová (0,02 mol)
4-ethylanilin (0,02 mol)
chlorid fosforitý (0,01 mol)
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 198-201 °C.

5-Brom-4'-ethylfenyl-salicylanilid (T 5726)

Sumární vzorec :C₁₅H₁₄BrNO₂

M_r : 320,19



Použité chemikálie :kyselina 5-bromsalicylová (0,02 mol)

4-ethylanilin (0,02 mol)

chlorid fosforitý (0,01 mol)

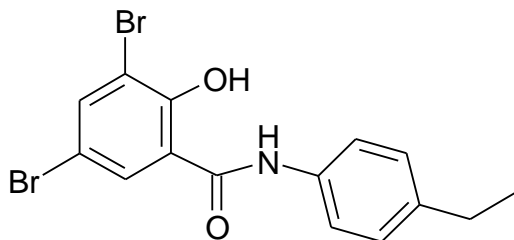
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 208-210 °C.

3,5-Dibrom-4'-ethylfenyl-salicylanilid (T 5727)

Sumární vzorec :C₁₅H₁₃Br₂NO₂

M_r : 399,08



Použité chemikálie :kyselina 3,5-dibromsalicylová (0,02 mol)

4-ethylanilin (0,02 mol)

chlorid fosforitý (0,01 mol)

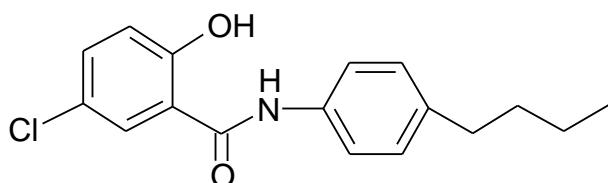
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 128-132 °C .

5-Chlor-4'-butylfenyl-salicylanilid (T 5538)

Sumární vzorec :C₁₇H₁₈ClNO₂

M_r : 303,79



Použité chemikálie :kyselina 5-chlorsalicylová (0,02 mol)

4-butylanilin (0,02 mol)

chlorid fosforitý (0,01 mol)

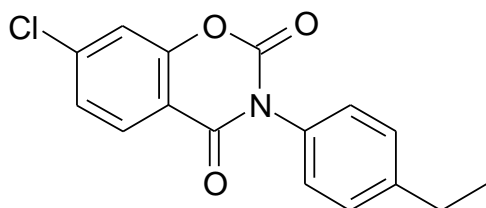
toluen (100 ml)

Bílá krystalická látka, teplota tání 162-163 °C.

7-Chlor-3-(4'-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5735)

Sumární vzorec :C₁₆H₁₂ClNO₃

M_r : 301,73



Použité chemikálie: 4-chlor-4'-ethylsalicylanilid (40 mmol)

suchý pyridin (20ml)

metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)

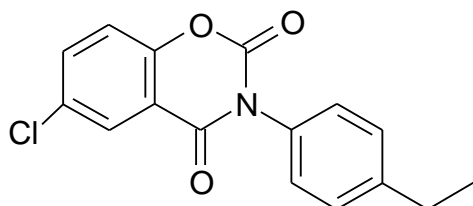
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 185-189 °C.

6-Chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5736)

Sumární vzorec : $C_{16}H_{12}ClNO_3$

M_r : 301,73



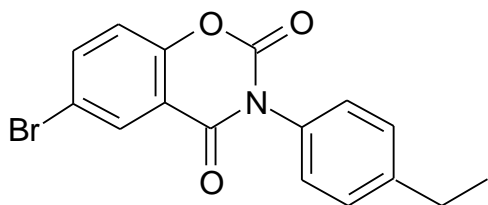
Použité chemikálie: 5-chlor-4'-ethylsalicylanilid (40 mmol)
suchý pyridin (20ml)
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 230-233 °C.

6-Brom-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5737)

Sumární vzorec : $C_{16}H_{12}BrNO_3$

M_r : 346,18



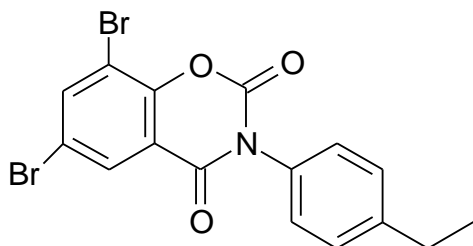
Použité chemikálie: 5-brom-4'-ethylsalicylanilid (40 mmol)
suchý pyridin (20ml)
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 219-222 °C.

6,8-Dibrom-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5738)

Sumární vzorec :C₁₆H₁₁Br₂NO₃

M_r : 425,08



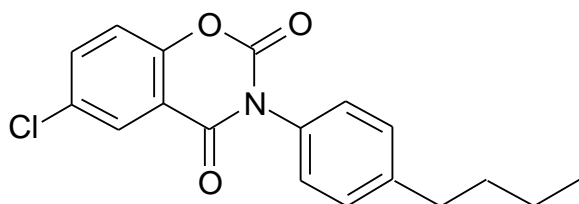
Použité chemikálie: 3,5-dibrom-4'-ethylsalicylanilid (40 mmol)
suchý pyridin (20ml)
metylester kyseliny chlormravenčí (48 mmol)
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 250-253 °C.

6-Chlor-3-(4'-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin -2,4(3H)-dion (T 5578)

Sumární vzorec :C₁₈H₁₆ClNO₃

M_r : 329,79



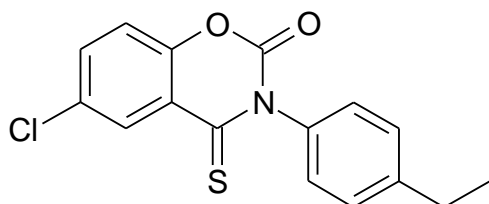
Použité chemikálie: 5-chlor-4'-butylsalicylanilid (40 mmol)
suchý pyridin (20ml)
metylester kyseliny chlormravenčí (48mmol)
ethanol 96 %

Bílá krystalická látka, teplota tání 189-190 °C.

6-Chlor-3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on (T 6145)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₂ClNO₂S

M.h.:317,8



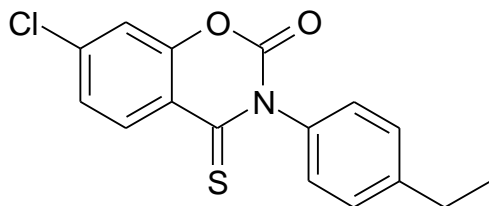
Použité chemikálie: 6-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)
P₂S₅ (4 mmol)

Žlutooranžová krystalická látka.

7-Chlor-3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on (T 6146)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₂ClNO₂S

M.h.:317,8



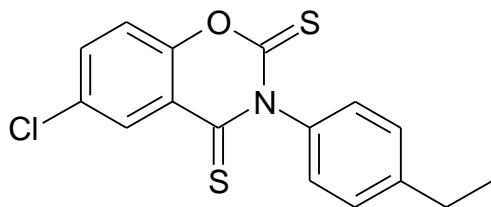
Použité chemikálie: 7-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)
P₂S₅ (4 mmol)

Žlutooranžová krystalická látka.

6-Chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (T 6147)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₂ClNOS₂

M.h.:333,86



Použité chemikálie: 6-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)

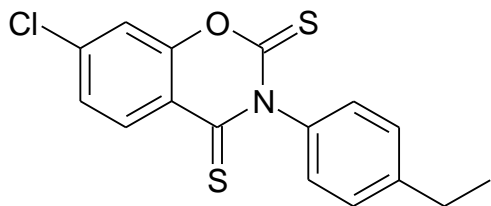
P₂S₅ (4 mmol)

Červená krystalická látka.

7-Chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (T 6148)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₂ClNOS₂

M.h.:333,86



Použité chemikálie: 7-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)

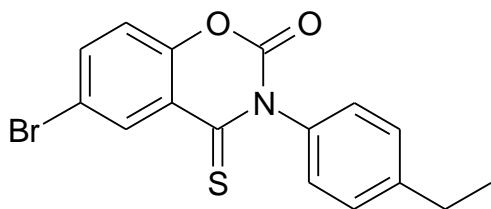
P₂S₅ (4 mmol)

Červená krystalická látka.

6-Brom-3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on (T 6149)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₂BrNO₂S

M.h.:362,25



Použité chemikálie: 6-brom-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)

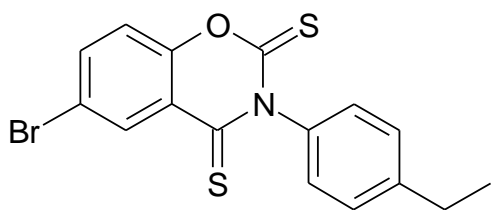
P₂S₅ (4 mmol)

Žlutooranžová krystalická látka.

6-Brom-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (T 6150)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₂BrNOS₂

M.H.: 378,31



Použité chemikálie: 6-brom-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)

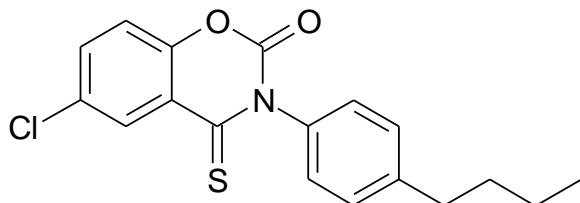
P₂S₅ (4 mmol)

Červená krystalická látka.

6-Chlor-3-(4-butylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on (T 6151)

Sumární vzorec: C₁₈H₁₆ClNO₂S

M.h.: 345,85



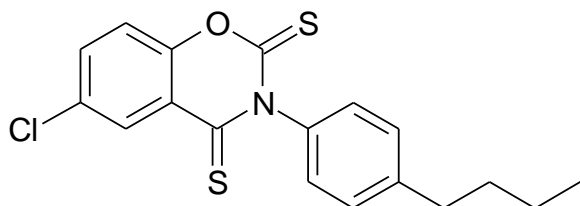
Použité chemikálie: 6-chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)
P₂S₅ (4 mmol)

Žlutooranžová krystalická látka.

6-Chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (T 6152)

Sumární vzorec: C₁₈H₁₆ClNOS₂

M.h.: 361,92



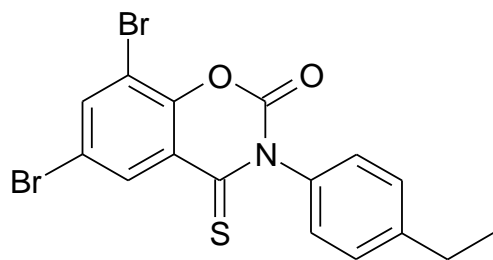
Použité chemikálie: 6-chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)
P₂S₅ (4 mmol)

Červená krystalická látka.

6,8-Dibrom-3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on (T 6005)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₁Br₂NO₂S

M.h.:441,14



Použité chemikálie: 6,8-dibrom-3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (4 mmol)
P₂S₅ (4 mmol)

Žlutá krystalická látka.

4.8 VYHODNOCENÍ ANTIMIKROBNÍHO TESTOVÁNÍ

Antimykobakteriální účinnost byla určena pomocí kmenů mykobakterií z Národního Institutu zdraví v Praze. Použity byly kmeny *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* My CNCTC 330/80 a jeden klinický izolát *Mycobacterium kansasii* 6 509/96 od pacienta z Karviné. Sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO, měření bylo prováděno s roztoky o koncentracích 1000, 500, 250, 125, 62,5, 32, 16, 8, 4, 2 $\mu\text{mol/l}$. Stanovení MIC bylo provedeno po inkubaci v Šulově půdě při 37°C po 14 a 21 dnech. Hodnoty vyhodnocené z třikrát opakovaného měření minimálních inhibičních koncentrací byly porovnány s izoniazidem jako standardem.

Tab.13: MIC syntetizovaných ethylderivátů

Látka	MIC [μmol]			
	Inkubační doba 14 / 21 dní			
	<i>M.tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
T 5724	8/8	8/16	16/16	16/16
T 5725	8/8	8/8	n/n	16/16
T 5726	16/32	16/62,5	62,5/62,5	32/62,5
T 5727	8/8	16/16	16/32	16/16
T 5735	8/8	16/16	8/16	16/16
T 5736	8/16	16/16	16,32	16/16
T 5737	8/8	8/16	32/32	16/16
T 5738	32/32	62,5/62,5	62,5/125	62,5/62,5
T 6146	0,5/0,5	8/8	8/8	8/8
T 6145	0,5/0,5	8/8	16/16	4/8
T 6005	2/4	32/32	125/125	16/32
T 6149	0,5/0,5	8/16	32/32	4/8
T 6148	0,5/0,5	8/16	4/8	8/16
T 6147	0,5/0,5	8/8	8/16	4/8
T 6150	1/2	8/16	62,5/62,5	4/4
INH	1/2	250/250	250/250	8/8

Tab.14. MIC syntetizovaných butylderivátů

Látka	MIC [μmol]			
	Inkubační doba 14 / 21 dní			
	<i>M.tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
T 5538	4/4	8/8	8/8	4/8
T 5578	16/16	8/8	16/16	8/16
T 6151	1/2	8/16	8/16	4/4
T 6152	2/4	8/8	8/16	8/8
INH	1/2	250/250	250/250	8/8

5. DISKUSE

5.1. DŮKAZ STRUKTURY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

Struktura látek byla ověřována NMR spektry, IČ-spektry a hodnotou vypočtených a experimentálně získaných hodnot elementární analýzy. V IČ spektrech salicylanilidů byly intenzivní absorpční pásy odpovídající $\nu(\text{C}=\text{O})$ karbonylu v oblasti 1621-1648 cm^{-1} . Pro infračervená spektra 3-(4'-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů je charakteristická dvojice absorpčních maxim. Vyšší vlnočet se nachází v oblasti 1770-1781 cm^{-1} , nižší pak v oblasti 1703-1708 cm^{-1} . Po záměně jedné oxo skupiny za thioxo skupinu je zřetelná opět pouze jedna vibrace v oblasti 1759-1771 cm^{-1} , která po záměně druhé oxoskupiny za thiooxoskupinu v IČ-spektrech vymizí. Polohu thiooxoskupiny u 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů jsme přiřadili ve shodě s našimi předchozími pracemi²⁷ do polohy 4.

5.2. MECHANISMUS ÚČINKU

Naše látky vycházejí ze salicylanilidů. To jsou inhibitory dvoukomponentového regulačního systému bakterií. Stejně tak benzoxazindiony. U sirných derivátů mechanismus účinku neznáme, ale vezme-li se v úvahu, že obsahují v molekule síru, můžeme předpokládat, že by mechanismus působení mohl být podobný jako u látek již používaných k léčbě tuberkulózy, které také obsahují ve své molekule síru. Například ethionamid, isoxyl a thiacetazon. O těchto látkách bylo zjištěno, že jsou to inhibitory syntézy mykolové kyseliny.

Základem mechanismu působení většiny dosavadních léčiv je inhibice syntézy buněčné stěny. Buněčná stěna bakterií se skládá ze tří kovalentně spojených makromolekul : peptidoglykan, arabinogalaktan a u mykobakterií ještě mykolové kyseliny. Toto spojení je označováno jako mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex (m AGP).

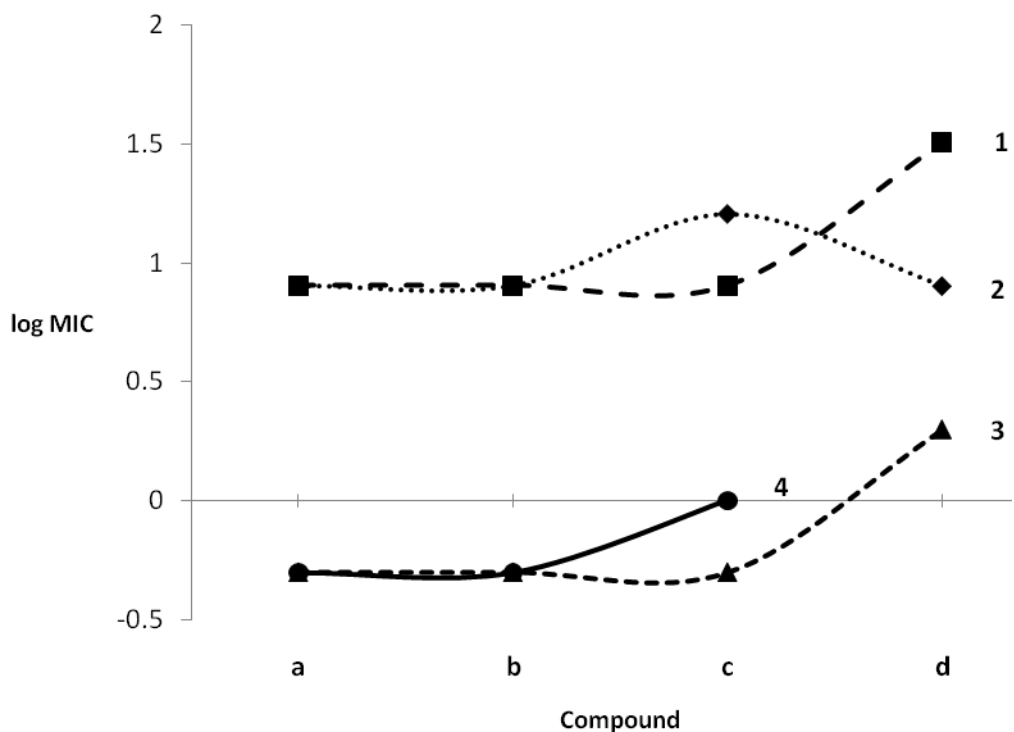
Peptidoglykan je polysacharid složený z opakujících se jednotek N-acetyl- β -D-glukosamin-(1 \rightarrow 4)-N-glykyl-murámové kyseliny propojených peptidovým řetězcem. Peptidoglykanová struktura je připojena k arabinogalaktanu (5-6 β -D-galaktofuranosových spojených jednotek) fosfodiesterovou vazbou. U *M. tuberculosis* je ještě k mAGP kostře nekovalentně asociovaný lipoarabinomanan (LAM), ten obsahuje ve struktuře fosfatidylinositoldiacylglycerolové domény). Tento glykolipid se účastní mnoha biologických funkcí: inhibuje aktivaci T buněk, makrofágů, vypouštění reaktivních mediátorů kyslíku, inhibuje aktivitu proteinkinázy C...

Mykolová kyselina, α -alkyl- β -hydroxy-mastná kyselina, představuje klíčovou komponentu mykobakteriální buněčné stěny. Mykolové kyseliny jsou α -větvené lipidy, které obsahují v molekule druhově závislý krátký řetězec složený z 20-26 atomů uhlíku a dlouhý řetězec složený z 50-60 atomů uhlíku, rozdělené na regulační oblasti cykloproplu (α -mykolát), α -metylketonu (ketomykolát) nebo α -metyl-metyletheru (metoxymykolát). U *M. tuberculosis* je nejčastější α -mykolát. Přítomnost dvojných vazeb, cyklopropanového kruhu většinou v cis-konfiguraci a kyslíkatých skupin má za cíl zejména udržování membránového prostředí- stálou fluiditu. Cyklopropanace byla pozorována jen u patogenních mykobakterií, cyklopropany jsou relativně inertní k oxidaci, což zvyšuje rezistenci vůči zabíjení hydrogenperoxidem.

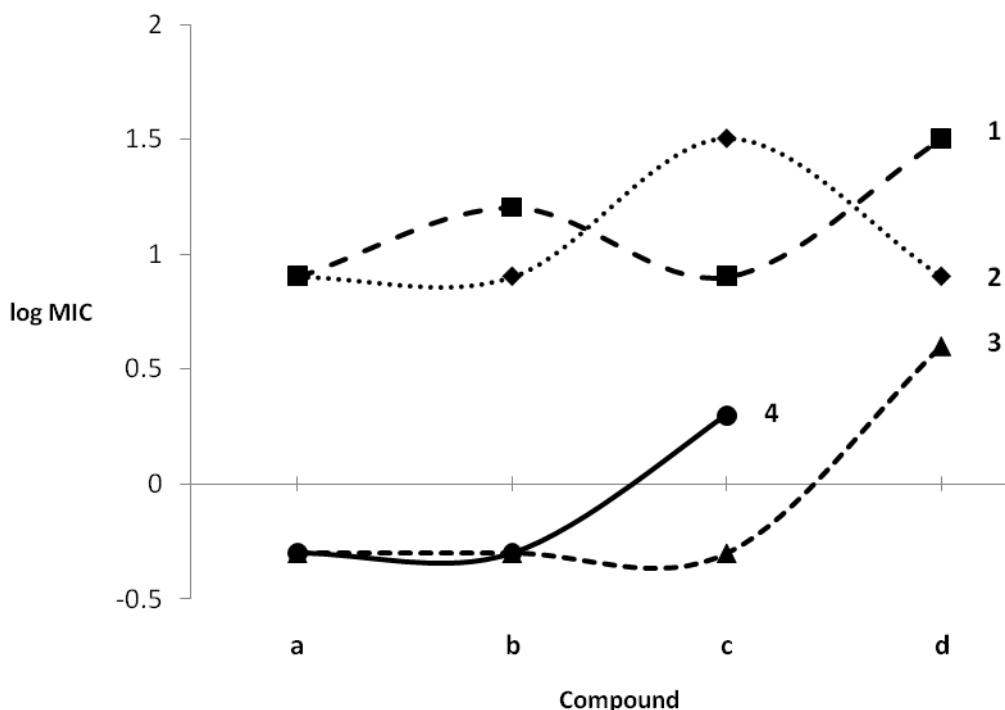
Biosyntetická cesta mykolové kyseliny zahrnuje 5 základních kroků. V prvním kroku je syntetizován krátký řetězec nasycené mastné kyseliny poskytující α -větvení, ve druhém kroku je syntetizován dlouhý řetězec meromykolové kyseliny, poskytující vlastní uhlíkovou kostru. Ve třetím kroku dochází k modifikaci této uhlíkové kostry zaváděním funkčních skupin, při tom vznikají cis-dvojně vazby. Čtvrtý krok představuje kondenzace Claisenova typu, kdy α -uhlík α -větvení nukleofilně atakuje meromykolátový uhlík karbonylu, následuje oddělení S-ACP skupiny z meromykolátového řetězce a redukce α -karbonylového kyslíku. V posledním kroku dochází k různým mykolyltransferázovým procesům buněčných lipidů. Vlastní mykolové kyseliny pak existují jednak ve formě kovalentně spojené s buněčnou stěnou nebo nekovalentně spojené ve formě 6,6'-trehalosadimykolátu (TDM) nebo monomykolátu (TMM).

Elongace mastných kyselin se stává z opakujících se cyklů kondenzace, β -ketoredukce, dehydratace a enoylredukce. Tyto reakce jsou katalyzovány dvěma typy synthasových systémů (Fatty acid systém, FAS). FAS I se vyskytuje u eukaryot, zejména rostlin. FAS II se vyskytuje u bakterií a rostlin. Na rozdíl od většiny organismů mají mykobakteria oba systémy. Mykobakteriální FAS I katalyzuje syntézu C16 a C18 MK (normální produkty de novo), ale také elongaci k C24 a C26 MK. Syntéza dlouhého řetězce probíhá pomocí FAS II. Mastná kyselina bude pro FAS II použita jako substrát pouze v přítomnosti ACP. Jako důležité byly objeveny dva geny, jejichž produkty jsou potřebné pro kompletní cyklus mastných kyselin. Gen *inhA* kóduje trans Δ^2 -enoylreduktázu (InhA) a gen *mabA* kódující β -ketoacylreduktázu (MabA). FAS I zajišťuje dlouhořetězcové acyl-CoA prekurzory, které kondenzují s malonyl-ACP, produkty mohou být elongovány pomocí FAS II za vzniku dlouhouhlíkatého řetězce meromykolátu (50 až 60 C). Mechanismus tvorby meromykolátového řetězce zahrnuje vznik nestabilního kationického intermediátu.²⁹⁾

Vliv struktury v řadě 4'-ethylsalicylanilidy (1), 3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3- benzoxazin-2,4(3H)-diony (2), 3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-ony (3) a 3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3- benzoxazin-2,4(3H)-dithiony (4) je zřetelný z přiloženého grafu (viz obr. 1 a obr. 2)



Obr. 1. Grafické znázornění vlivu struktury na antimykobakteriální aktivitu u halogenovaných 4'-ethylsalicylanilidů a z nich odvozených benzoxazinových derivátů. Další substituenty v salicylu byly a) 4-Cl, b) 5-Cl, c) 6-Br, d) 3,5-Br₂, a odpovídající substituenty v -(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu, 3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onu a 3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu, tj. a) 7-Cl, b) 6-Cl, c) 6-Br, d) 6,8-Br₂. Aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, 14 dní inkubace.



Obr. 2. Grafické znázornění vlivu struktury na antimykobakteriální aktivitu u halogenovaných 4'-ethylsalicylanilidů a z nich odvozených benzoxazinových derivátů. Další substituenty v salicylu byly a) 4-Cl, b) 5-Cl, c) 6-Br, d) 3,5-Br₂, a odpovídající substituenty v -(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu, 3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onu a 3-(4-ethylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu, tj. a) 7-Cl, b) 6-Cl, c) 6-Br, d) 6,8-Br₂. Aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, 21 dní inkubace.

Vliv thiooxo skupiny je nesporný. Látky překonávají isoniazid (hodnota log MIC 0). Mechanismus je však sporný, protože látky působí na některé gram pozitivní bakterie, které mykologické kyseliny neobsahují. (např. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*.³⁰)

5.3. BIOCHEMICKÉ ASPEKTY PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

Léčiva obsahující thiokarboonylovou skupinu jako ethionamid, thiacetazon a isoxyl katalyzována flavin-dependentní monooxygenásou, při metabolismu podléhají S-oxidaci. Enzym je většinou nazýván mikrosomální FAD-obsahující monoaminoxidáza (zkráceně FMO), protože se nachází převážně v mikrosomální frakci jater. Jako zdroj redukční síly využívá buď NADH nebo NADPH. Enzym katalyzuje oxygenaci mnoha nukleofilních organických dusíkatých a sirných sloučenin. Existují rozdílné isoformy FMO₁-FMO₅ s navzájem odlišnou substrátovou specifitou. Hlavní lidskou formou v játrech je FMO₃, ten má širokou substrátovou specifitu k léčivům a jiným xenobiotikům. Při vlastním mechanismu dochází nejprve k vlastní flavinové redukci oxidujícího enzymu, poté k vazbě kyslíku, dále proběhne vnitřní elektronový transfer formující peroxy-flavinový komplex. Tento komplex je silně elektrofilní a měl by být schopen oxidace nějaké nukleofilní sloučeniny, například N a S obsahující xenobiotika. Vazbou substrátu dojde k oxygenaci uvolňujícího se produktu, disociaci NAD(P)H⁺ a vzniku původní formy enzymu. V přítomnosti oxidovatelných substrátů se peroxyflavinový komplex pozvolna rozpadne za uvolnění peroxidu vodíku.³⁰⁾

6. ZÁVĚR

Antimykobakteriální aktivita našich látek je vysoká, řada z nich překonává i aktivitu izoniazidu. Záměna thioskupiny za oxoskupinu vedla k očekávanému zvýšení antimykobakteriální aktivity u většiny látek. Při zavedení druhé thioskupiny do molekuly již k výraznějšímu zvýšení účinnosti nedošlo. Sloučeniny monohalogenované byly účinnější než sloučenina dihalogenovaná, ta byla ze všech látek nejméně účinná. Sloučeniny, které obsahovaly v molekule chlor v pozici 7 nebo 6 byly účinnější než sloučeniny obsahující v molekule vázaný brom. Zdá se, že halogen v poloze 7 zvyšuje antimykobakteriální aktivitu více, než halogen v poloze 6. Kromě látek T 6005 (6,8-dibrom-3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-on) a T 6152 (6-chlor-3-(4-butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion) byly všechny připravené sirmé deriváty proti *M. tuberculosis* účinnější nebo stejně účinné v porovnání s izoniazidem jako standardem. Vůči ostatním testovaným kmenům mykobakterií vykazovaly sloučeniny výrazně vyšší účinnost než izoniazid.

Nejúčinnějšími látkami byly : T 6147 (6-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion), T 6146 (7-chlor-3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-on) a T 6148 (7-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion).

Z předložené práce vyplývá, že cíl byl splněn. Dospěli jsme k látkám, které aktivitou překonávají soudobá léčiva a mají pravděpodobně od nich odlišný mechanismus účinku. Na jejich význam může však ukázat pouze hodnocení vedlejších účinků. V uvedeném směru pracuje naše spolupracující pracoviště v Německu. (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute).

Literatura

- 1 Článek ze Zdravotního ústavu: MUDr. Marta Havelková, CSc., vedoucí Odborné skupiny mykobakteriálních infekcí a Národní referenční laboratoře pro mykobakterie SZÚ.
- 2 Greenwood D., Slack R.C., Peutherer J.F. a kol.: Lékařská mikrobiologie, str.215-220, Grada, Praha 1999.
- 3 Homolka J., Krejch F., Holub J.: Tuberkulóza v České republice v roce 2005. Čas. Lék. Čes. 145, (2006), 738-742.
- 4 Homolka J., Krejch F., Mazánková V.: Tuberkulóza v České republice v roce 2003. Čas. Lék. Čes. 143, (2004), 594-597.
- 5 Lincová D., Fagheli H.: Základní a aplikovaná farmakologie, str.461-463, Galén, Praha 2002.
- 6 Ducasse-Cabanot S., Cohen-Gonsaud M., Marrakchi H., Nguyen M., Zerbib D., Bernadou J., Daffé M., Labesse G., Quémard A.: In vitro inhibition of the Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA by isoniazid. Antimicrobial Agents Chemotherapy 48(1), (2004), 242-9.
- 7 Balle L., Field R.A., Duncan K., Young R.J.: Minireview-New small-molecule synthetic antimycobacterials Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, (2005), 2153-2163.
- 8 Wang F., Langley R., Gulten G., Dover L.G., Besra G.S., Jacobs W.R., Sacchettini J.C.: Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. J. Exp. Medicine 22, (2007), 73-78.

- 9 Duncan K., Identification and validation of novel drug targets in tuberculosis. *Curr. Pharm. Des.* 10, (2004), 3185–3194.
- 10 Cole S.T. et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, (1998), 537–544.
- 11 Gao L.Y., Laval F., Lawson E.H., Groger R.K., Woodruff A., Morisaki J.H., Cox J.S., Daffe M. and Brown E.J.: Requirement for kasB in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* 49, (2003), 1547–1563.
- 12 Banerjee, A., Dubnau E., Quemard A., Balasubramanian V., Um K.S., Wilson T., Collins D., de Lisle G. and Jacobs W.R.: InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *M. tuberculosis*. *Science* 263, (1994), 227–230.
- 13 Winder G., Collins P.B., Wheland J.: Effects of ethionamide and isoxyl on mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* 66, (1971), 379-380.
- 14 Leowski J.: Thiacetazon – a review. *Ind. J. Chest Dis. Allied Sci.* 24, (1963), 194-189.
- 15 Andres C.J., Bronson J.J., D’Andrea S.V., Deshpande M.S., Falk P.J., Grant-Young K.A., Harte W.E., Ho H.T., Misco P.F., Robertson J.G., Stock D., Sun Y. and Walsh A.W.: 4-Thiazolidinones: novel inhibitors of the bacterial enzyme MurB. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, (2000), 715–717.
- 16 Scozzafava A., Mastrolenzo A. and Supuran C.T.: Anti-mycobacterial activity of 9-sulfonylated/sulfonylated-6-mercaptopurine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, (2001), 1675–1678.
- 17 Waisser K., Klimešová V. and Odlerová Z.: Design of compounds active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 18, (1995), 31–37.

- 18 Gasparova R., Lacova M., El-Shaer H.M. and Odlerová Z.: Synthesis and antimycobacterial activity of some new 3-heterocyclic substituted chromones. *Farmaco* 52, (1997), 251–253.
- 19 Vicini P., Geronikaki A., Incerti M., Busonera B., Poni G., Cabras C.A. and La Colla P.: Synthesis and biological evaluation of benzo[d]isothiazole, benzothiazole and thiazole Schiff bases. *Bioorg. Med. Chem.* 11, (2003), 4785–4789.
- 20 Klimešová V., Palát K., Waisser K. and Klimeš J.: Combination of molecular modeling and quantitative structure-activity relationship analysis in the study of antimycobacterial activity of pyridine derivatives. *Int. J. Pharm.* 207, (2000), 1–6.
- 21 Hlasta D.J., Demers J.P., Foleno B.D. et al.: Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: Pharmacophore identification based on the screening hit closantel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, (1998), 1923-1928.
- 22 Macielag M.J., Demers J.P., Fraga-Spano S.A., Hlasta D.J. et al.: Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *J. Med. Chem.* 41, (1998), 2939-2945.
- 23 Waisser K., Dražková K., Holý P., Palát K. Jr., Kaustová J.: Correlation of antimycobacterial activity of substituted salicylanilides and 3-aryl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 29-30, (2003), 17-20.
- 24 Waisser K., Gregor J., Dostál H., Kuneš J., Kubicová L., Klimešová V., Kaustová J.: Influence of the replacement of the oxo function with the thioxo group on the antimycobacterial activity of 3-aryl-6,8-dichloro-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones and 3-arylquinazoline-2,4(1H, 3H)-diones. *Farmaco* 56, (2001), 803-807.

- 25 Waisser K., Heinisch L., Šlosárek M., Janota J.: New antimycobacterial 2,3-dihydro-1-alkylindole-2-thiones. *Folia Microbiologica* 51, (2006), 25-26.
- 26 Waisser K., Hladůvková J., Kuneš J., Kubicová L., Klimešová V., Karajannis P., Kaustová J.: Synthesis and antimycobacterial activity of salicylanilides substituted in position 5. *Chem. Pap.* 55, (2001), 121-129.
- 27 Waisser K., Matyk J., Divišová H., Husáková P., Kuneš J., Klimešová V., Kaustová J., Möllmann U., Dahse H. M., Miko M.: The oriented development of antituberculotics: Salicylanilides. *Arch. Pharm. (Chem. Life. Sci.)* 339, (2006), 616-620.
- 28 Wagner G., Singer D., Weuffen W.: Studies on 2-hydroxythiobenzamide and 2-hydroxythiobenzanilide. 1. Synthesis of the compounds. (Untersuchungen über 2-Hydroxythiobenzamide und 2-Hydroxythiobenzanilide. 1. Mitteilung: Synthese der Verbindungen). *Pharmazie* 21, (1966), 161-166.
- 29 Schroeder E.K., de Souza O.N., Santos D.S., Blanchard J.S. and Basso L.A.: Drug that inhibits mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current pharmaceutical biotechnology* 3, (2002), 197-225.
- 30 Möllmann U., soukromé sdělení
- 31 Gordon Gibson G., Shett P.: Introduction to drug metabolism, str. 54-57, Nelson Thornes Publishers 3. Vydání, Cheltenham 2001.

8. PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY MGR. PETRY HUSÁKOVÉ

Původní práce v zahraničních časopisech

1. WAISSER K., MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., MÖLLMANN U., DAHSE H.M., KIKO M.: The oriented development of antituberculotics: In acyl moiety halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides. Arch. Pharm. 339, (2006), 616-620
2. WAISSER K., MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: The Oriented Development of Antituberculotics:(part 2.) Halogenated 3-(4-Alkylphenyl)benzoxazine-2,4(3*H*)-diones. Arch. Pharm. Life Sci., 340, (2007), 264-267.

Předběžná sdělení uveřejněná v časopisech

MATYK J., ADAMEC J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., WAISSER K.: Příprava antimykobakteriálních salicylanilidů s předpokládaným výrazným účinkem.(Synthesis of salicylanilides with expected high activity) 32. konference Syntéza a analýza léčiv. Nitra 9. – 11. 9. 2004. Farm. Obzor 73, (2004), 248.

MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., WAISSER K.: Vysoce účinné antimykobakteriální salicylanilidy. (High active antimycobacterial salicylanides). Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii. Nymburk 26.-28. 11. 2004. Chem. Listy 98, 2004, 1041.

Abstrakty ve sbornících symposií

1. MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., WAISSER K., KAUSTOVÁ J.:
Perspektiva dalšího vývoje antituberkulotik, inhibitorů
dvoukomplementového systému bakterií. (Perspective of development
antituberculosics, inhibitors of two-complenets system of bacterium.) 34.
konference „Syntéza a analýza léčiv“, Brno 12.-14. 9. 2005. Sborník
abstrakt, str. 92. [ISBN 80-7305-533-3].

9. ABSTRAKT

9.1. ENGLISH ABSTRACT

In the rigorous thesis are described the influence of replacement oxo group for thioxo group in the series of halogenated 3-(4-ethylphenyl)benzoxazine-2,4(3*H*)-diones and 6-chloro-3-(4-butylphenyl)benzoxazine-2,4(3*H*)-dione. The starting ethyl (or butyl) salicylanilides were synthesis from substituted salicylic acid and ethyl (or butyl) aniline in toluene by the presence of phosphorus trichloride. (The set of halogenated salicyl acids compounds: 4-chloro-, 5-chloro-, 5-bromo- and 3,5-dibromosalicylic acid). The halogenated 4'-ethylsalicylanilides were reacted in dry pyridine with methyl-chloroformiate to form 3-(4-ethylphenyl)benzoxazine-2,4(3*H*)-diones. Similar were prepared 6-chloro-3-(4-butylphenyl)benzoxazine-2,4(3*H*)-diones. The mixture of 3-(4-ethylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one and 3-(4-ethylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione was prepared by the reaction of the halogenated 3-(4-ethylphenyl)- 2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones with phosphorus pentasulfide. The products were separated by chromatography. The 3-(4-ethylphenyl)-6-chloro-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 6-chloro-3-(4-ethylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones were prepared by similar way. The compounds were tested *in vitro* for antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* (two strains) and *M. avium*. The thioxo (or two thioxo) derivatives form the group of high active antimycobacterial compounds, active against INH-resistant strain *M. kansasii* and *M. avium* as well. The most active derivatives were against *Mycobacterium tuberculosis* more active as isonicotinhydrazide (INH). The study is interesting for orientation on compounds of the new mechanism of activity. It brings a biochemical interest in this way.

9.2. ČESKÝ ABSTRAKT

V rigorózní práci byl popsán vliv záměny oxo skupiny za thioxoskupinu v řadě halogenovaných 3-(4-ethylfenyl)benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů a 6-chlor-3-(4-butyfenyl)benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. Výchozí ethyl (nebo butyl) salicylanilidy byly syntetizovány z ethyl (nebo butyl) anilinu a substituované salicylové kyseliny v toluenu za přítomnosti chloridu fosforitého. (Skupina halogenovaných salicylových kyselin: 4-chlor-, 5-chlor-, 5-brom- and 3,5-dibrom salicylová kyselina.) Halogenované 4'-ethylsalicylanilidy reagovaly v suchém pyridinu s methylchloroformiátem za vzniku 3-(4-ethylfenyl)benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. Podobně byly připraveny 6-chlor-3-(4-butyfenyl)benzoxazin-2,3,(4-*H*)-diony. Směs 3-(4-ethylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onu a 3-(4-ethylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu byla připravena reakcí halogenovaných 3-(4-ethylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů se sulfidem fosforečným. Látky byly odděleny chromatograficky. Podobně byl získán 6-chlor-3-(4-butyfenyl)-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-on a 6-chlor-3-(4-butyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion. Látky byly hodnoceny *in vitro* na antimykobakteriální aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* (dva kmeny) a *M. avium*. Thioxo (nebo dithioxo) deriváty jsou vysoce aktivními antimykobakteriálními látkami, aktivními vůči INH-rezistentním kmenům *M. kansasii* a *M. avium*. Nejaktivnější deriváty byly proti *M. tuberculosis* více aktivní než isonikotin hydrazid (INH). Studie je zajímavá svým zaměřením na látky o novém mechanismu aktivity. Tím přináší i biochemicky zajímavou problematiku.

10. PŘEHLED POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

BCG – Bacillus Callmette Guerin

MDR – (multidrug rezistence) multirezistentní tuberkulóza

InhA – NADH-dependentní-enoyl-ACP-reduktáza

ACP – acyl carrier protein

FAS –fatty acid system (synthasový systém mastných kyselin)

MabA – beta-ketoacyl-acyl-carrier-protein reduktáza *M.tuberculosis*

TCS – two component regulatory system

MurB – murása B

ATP – adenosintrifosfát

mAGP – mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex

LAM – lipoarabinomanan

TDM – trehalosadimykolát

TMM – trehalosamonomykolát

MK – mastná kyselina

FAD – flavinadenindinukleotid

FMO – flavin monooxidáza

