

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**DERIVÁTY RHODANINU JAKO  
POTENCIÁLNÍ LÉČIVA III.**

Diplomová práce

Hradec Králové 2009

Stanislava Kalafutová

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala sú uvedené v zozname literatúry a v práci riadne citované.

*Ďakujem doc. RNDr. Veronike Opletalovej, Ph.D. za obetavú pomoc a cenné rady pri vzniku tejto práce.*

*Ďalej ďakujem Mgr. M. Kučerovej za jej ochotu pomôcť pri experimentálnej práci, pani V. Hronovej za prevedenie elementárnych analýz, pani I. Vencovskej za zmeranie IČ spektier, doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za meranie a interpretáciu NMR spektier, pani I. Dufkovej a Mgr. M. Vejsovej z Katedry biologických a lekárskeho vied za prevedenie antifungálnych a antibakteriálnych testov.*

<b>Obsah</b>	
<b>1. ÚVOD</b>	<b>6</b>
<b>2. CIEĽ PRÁCE</b>	<b>7</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČASŤ</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Tuberkulóza</b>	<b>8</b>
3.1.1. Etiológia	8
3.1.2. Patogéneza	9
3.1.3. Primárna tuberkulóza	10
3.1.4. Postprimárna tuberkulóza	10
3.1.5. Závažné formy tuberkulózy	11
3.1.5.1. Miliárna tuberkulóza	11
3.1.5.2. Kazeózna tuberkulóza	11
3.1.5.3. Tuberkulóza vnútrohruďníkových uzlín	11
3.1.5.4. Mykobakteriózy	11
3.1.6. Terapia tuberkulózy	12
<b>3.2. Potenciálne antituberkulotiká</b>	<b>13</b>
3.2.1. Nitroimidazolové zlúčeniny	13
3.2.2. Nitroimidazooxazoly	15
3.2.3. Diarylchinolin TCM-207	16
3.2.4. Oxazolidinóny	16
3.2.5. Fenotiazíny	18
3.2.6. Isotiosemikarbazóny	20
3.2.7. Mykobaktíny	20
3.2.8. 1,8-Naftiridíny	21
3.2.9. Fenazíny	22
3.2.10. Puríny	24
3.2.11. Pyridíny	24
3.2.12. Pyrroly	26
3.2.13. Kumaríny	27
3.2.14. Chalkóny a zlúčeniny podobné chalkónom	28
3.2.15. Tiolaktomycínové deriváty	29
3.2.16. Toluidíny	30
3.2.17. Rodaníny	30
<b>3.3. Nové ciele antituberkulotík</b>	<b>31</b>
3.3.1. Enzýmy glyoxylátového skratu	32

3.3.2. Cyklopropan-syntáza	32
<b>3.4. Klinicky používané antituberkulotiká</b>	<b>33</b>
3.4.1 Streptomycín	34
3.4.2. Isoniazid	35
3.4.3. Rifamycíny	35
3.4.4. Etambutol	36
3.4.5. Makrolidy	37
3.4.6. p-Aminosalicylová kyselina	39
3.4.7. Pyrazínamid	39
3.4.8. Cykloserín	40
<b>4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Chemická časť</b>	<b>41</b>
4.1.1. Príprava 5-(3-brómbenzylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	42
4.1.2. Príprava 5-(2-brómbenzylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	43
4.1.3. Príprava 5-(3-chlórbenzylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	44
4.1.4. Príprava 5-(2-chlórbenzylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	45
4.1.5. Príprava 5-(4-fluórbenzylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	46
4.1.6. Príprava 5-(3-fluórbenzylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	47
4.1.7. Príprava 5-(2-fluórbenzylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	48
4.1.8. Príprava 5-(pyridín-4-ylmetylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	49
4.1.9. Príprava 5-(pyridín-3-ylmetylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	51
4.1.10. Príprava 5-(furán-2-ylmetylidén)-2-thioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu	52
<b>4.2. Biologická časť</b>	<b>53</b>
4.2.1. Hodnotenie antifungálnej aktivity	53
4.2.2. Hodnotenie antibakteriálnej aktivity	55
<b>5. DISKUSIA</b>	<b>58</b>
<b>6. ZÁVER</b>	<b>61</b>
<b>7. ABSTRAKT</b>	<b>62</b>
<b>8. PRÍLOHY</b>	<b>64</b>
<b>9. POUŽITÁ LITERATÚRA</b>	<b>65</b>

# 1.ÚVOD

Rodanín (2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón) bol prvýkrát syntetizovaný z amónium-tiokyanátu a kyseliny monochlóroctovej v roku 1877 poľským chemikom Marceliom Neckiom<sup>1</sup>. Pri ďalšom štúdiu rodanínu boli objavené nové spôsoby jeho prípravy a rôzne možnosti jeho uplatnenia.

Okrem antibakteriálnej, antifungálnej, antivirotickej, antiprotozoálnej<sup>2</sup> a insekticídnej<sup>3</sup> aktivity boli popísané aj ich protizápalové<sup>4</sup>, antiproliferačné<sup>5</sup>, antikonvulzívne<sup>6</sup>, antidiabetické<sup>7</sup> a hypocholesterolemické<sup>8</sup> účinky. V súčasnosti jedinou terapeuticky využívanou molekulou je epalrestát<sup>9</sup> - liečivo, ktoré inhibuje aldózareduktázu a je registrované len v Japonsku, kde sa úspešne používa v liečbe diabetickej retinopatie.<sup>10,11</sup>

## 2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce je naviazať na výskum derivátov rodanínu, ktorý na Katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv prebieha už od roku 2003. Výskum začal syntézou 5-(1-aryletylidén)rodanínov<sup>12</sup>, avšak látky odvodené od ketónov neprejavili výraznejšiu antifungálnu ani antimykobakteriálnu aktivitu. Výskum sa preto ďalej zamerlal na syntézu kondenzačných produktov rodanínu s aldehydmi.<sup>13</sup>

# 3. TEORETICKÁ ČASŤ

## 3.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je špecifická infekčná choroba, ktorá môže postihnúť ktorýkoľvek orgán, ale najčastejšou orgánovou lokalizáciou sú pľúca.<sup>14</sup> Je to hlavná príčina smrti celosvetovo, najmä však v Afrike a Ázii. Globálne sa za rok 2006 vyskytlo 9,2 miliónov nových prípadov a 1,7 milióna úmrtí, z ktorých 0,7 milióna úmrtí bolo u HIV-pozitívnych pacientov. Populácia infikovaných pacientov sa v porovnaní s predchádzajúcimi rokmi zväčšila. Nárast pozitívnych a reinfikovaných pacientov bol prvýkrát pozorovaný v roku 2007. Počet nových prípadov sa zdá mať globálny dopad od roku 2003 a to vo všetkých šiestich regiónoch WHO, okrem Európskeho regiónu, kde je približne stály.<sup>15</sup>

Výskyt tejto choroby je spojený s hustotou populácie, nedostatočnou výživou a hygienou.<sup>16</sup> Problém tuberkulózy sa však netýka len rozvojových zemí, ale stáva sa vážnou hrozbou aj pre rozvinuté krajiny<sup>17</sup>. Je to vo veľkej miere spôsobené vysokou migráciou obyvateľov.<sup>18</sup> Najpostihnutejšími oblasťami sú najmä Afrika, juhovýchodná Ázia a oblasť západného Pacifiku.<sup>16</sup>

Práve v týchto oblastiach je vysoký počet HIV-pozitívnych pacientov, ktorí sa chorobou vďaka slabému imunitnému systému ľahšie nakazia.

### 3.1.1. Etiológia

Pôvodcom tuberkulózy sú baktérie patriace do kmeňa *Actinomycetes*.

*Mycobacterium tuberculosis* je etiologický agens tuberkulózy u človeka, ktorý tvorí pre baktérie akýsi rezervoár.<sup>19</sup>

*Mycobacterium bovis* je etiologický agens tuberkulózy u krávk a len výnimočne u človeka. Ten sa môže infikovať konzumáciou nepasterizovaného



mlieka. Táto cesta prenosu môže viesť k vývoju extrapulmonárnej tuberkulózy.<sup>19</sup> Infekcia *M. bovis* už u nás prakticky neexistuje.<sup>14</sup>

Iné ľudské patogény patriace k mykobaktériam zahŕňajú *Mycobacterium avium*, ktoré vyvoláva tuberkulóze podobné ochorenie rozšírené hlavne u AIDS pacientov, a *Mycobacterium leprae*, spôsobujúce lepru.<sup>19</sup>

Mykobaktérie sa môžu všeobecne charakterizovať ako nepohyblivé, tyčinkovité, acidorezistentné bacily, ktoré sú mierne gram-pozitívne.<sup>20</sup>

Ďalej sa delia na:

- obligátne ľudské patogény
- fakultatívne ľudské patogény

Medzi obligátne patogény patria *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium leprae*.<sup>20</sup>

Fakultatívne patogény sa ešte môžu deliť podľa rýchlosti rastu a podľa tvorby pigmentu po expozícii na svetle na:

- pomaly rastúce mykobaktérie
  1. fotochromatogénne
  2. skotochromatogénne
  3. nechromatogénne
- rýchlo rastúce mykobaktérie<sup>20</sup>

### 3.1.2. Patogenéza

Prenos nákazy sa uskutočňuje cestou:

- inhalačnou (kvapôčková forma pri kontakte s nakazeným tuberkulózou)
- priamym kontaktom – inokulačná forma tuberkulózy je obvyčajne profesionálneho pôvodu
- alimentárnou<sup>14</sup>

Bránou vstupu a najčastejšou orgánovou lokalizáciou tuberkulózy u človeka sú pľúca.<sup>14</sup>

Monitorovanie účinnosti vyhľadávania a liečby tuberkulózy sa zisťuje frekvenciou pozitívnych kožných reakcií na tuberkulínový test u detí.

Z nárastu pozitívnych reakcií je možné vypočítať výskyt neznámych zdrojov TB infekcie v populácii. U nás sa prepočítava z 11-ročných detí testovaných tuberkulínovým testom pri revakcinácii a je nízke (0,1 %), čo znamená, že priemerne jedno dieťa z 1000 sa ročne infikuje tuberkulózou. Z toho sa dá odhadnúť účinnosť vyhľadávania TB ochorení, ktorá sa u nás pohybuje v rozmedzí 55 – 73 %.

Účinnosť antituberkulotickej liečby je možné sledovať stupňom dosiahnutých trvalých negativizácií spúta.<sup>14</sup>

### **3.1.3. Primárna tuberkulóza**

Primárna tuberkulóza je výsledkom prvého kontaktu hostiteľa s mykobakteriálnou infekciou u osôb, ktoré neboli očkované BCG vakcínou.

*Mycobacterium tuberculosis* sa za vhodných podmienok dostane inhalačnou cestou do pľúc, kde sa pomnoží a vyvolá TB zápal. V priebehu niekoľkých hodín sa mykobaktéria začnú šíriť lymfatickými cievami do regionálnych uzlín, ktoré sa zväčšia<sup>14</sup>, pretože dôjde k akumulácii makrofágov v mieste infekcie<sup>16</sup>. Toto zväčšenie uzlín spolu so zápalom v pľúcach sa označuje ako primárny tuberkulózný komplex.<sup>14</sup>

### **3.1.4. Postprimárna tuberkulóza**

Vzniká u osôb, ktoré sú už infikované, obvykle mnoho rokov po primoinfekcii. Táto sekundárna forma tuberkulózy vzniká pri ďalšej exogennej infekcii.

Častejšia je však progresia alebo reaktivácia primárnej tuberkulózy. Dôvodom reaktivácie je perzistencia mykobaktérií a ich dlhodobé prežívanie s nízkou metabolickou aktivitou.<sup>14</sup> Hilarné lymfaticke uzliny sa môžu ľahšie

infikovať, pretože makrofágy v nich sú infikované aktívnymi bacilmi. Uvoľnené mikroorganizmy sa lymfatickým a krvným obehom dostávajú do rôznych častí tela a infikujú:

- retikuloendoteliálny systém ( pečeň, slezina a lymfatické uzliny)
- serózne povrchy
- miesta s vysokou kyslíkovou perfúziou (pľúcne vrcholy, kôra obličiek a epifýzy dlhých kostí)<sup>16</sup>

### 3.1.5. Závažné formy tuberkulózy

#### 3.1.5.1. Miliárna tuberkulóza

Predstavuje hematogénnu generalizovanú tuberkulózu s postihnutím pľúc a ďalších orgánov.<sup>14</sup>

#### 3.1.5.2. Kazeózna pneumónia

Predstavuje exsudatívnu fázu pľúcnej tuberkulózy. Vzniká zväčšovaním primárneho infektu.<sup>14</sup>

#### 3.1.5.3. Tuberkulóza vnútrohruďníkových uzlín

Prejavuje sa postihnutím prevažne hilových alebo paratracheálnych uzlín. Patrí do rámca primárnej tuberkulózy.<sup>14</sup>

#### 3.1.5.4. Mykobakteriózy

Pľúcne ochorenie – mykobakteriózu – môže spôsobiť veľký počet acidorezistentných baktérií iných než *Mycobacterium tuberculosis complex*. Označujú sa ako atypické netuberkulózne mykobaktérie.<sup>14</sup>

Najčastejšími pôvodcami sú:

- *Mycobacterium kansasii*
- *Mycobacterium avium-intracellulare*
- *Mycobacterium xenopi*

### 3.1.6. Terapia tuberkulózy

Tuberkulóza je síce liečiteľná pomocou chemoterapeutík, napriek tomu je však liečba mimoriadne dlhá a trvá šesť až deväť mesiacov. Odhliadnúc od toxicity vedie práve jej dĺžka k vytvoreniu slabej compliance pacienta, ktorá je obvykle príčinou vedúcou k selekcii rezistentných a multi-rezistentných mykobaktérií. V súčasnej dobe pozostáva chemoterapia tuberkulózy z kokteilu liekov patriacich do prvej línie (izoniazid, rifampicín, pyrazínamid a etambutol), ktorý sa podáva šesť mesiacov.<sup>21</sup> Hoci sú na jej liečbu využívané kombinácie troch alebo štyroch liečiv s rôznym mechanizmom účinku, vzniká na recentne používané látky rezistencia<sup>22</sup>.

Ak táto liečba zlyhá a má za následok vytvorenie rezistencie alebo netolerancie jedného alebo viacerých liekov, použijú sa lieky patriace do druhej línie (para-aminosalicylová kyselina, kanamycín, fluorochinolóny, kapreomycín, etionamid a cykloserín), ktoré sú spravidla buď menej efektívne, alebo viac toxické s vážnymi vedľajšími účinkami.<sup>21</sup>

Liečba je pomerne náročná kvôli prítomnosti metabolicky neaktívnych, perzistujúcich alebo spiacich baktérií vo vnútri hostiteľových lézií, ktoré nie sú citlivé na antimykobakteriálne lieky. Tieto antituberkulotiká zvyčajne zabíjajú len rastúce baktérie, avšak nie sú schopné zabiť perzistujúce baktérie. Počas interakcie medzi mykobaktériou a hostiteľskou bunkou môže dôjsť k cyklickej reinfekcii hostiteľského makrofága bacilom tuberkulózy a to dovoľuje dlhodobé prežitie a perzistenciu bacila. Je takmer nemožné dosiahnuť úplnú sterilizáciu lézií.<sup>21</sup>

Táto vlastnosť bacila, že vydrží chemoterapiu a útoky imunitného systému nakazeného jedinca a prežíva tak desaťročia než sa znovu aktivuje, robí tuberkulózu tak ťažko liečiteľnou a eradikovateľnou.

Mnoho výskumov zaostruje svoje úsilie na pochopenie biológie životaschopnosti týchto bacilov a rozvíja terapie, ktoré efektívnejšie zničia práve perzistujúce bacily. Zväčšujúci sa problém multi-rezistentných kmeňov mykobaktérií zvyšuje pozornosť na vývoj nových liekov, ktoré nie sú účinné len

proti rezistentným kmeňom, ale tiež skrátiť dĺžku terapie. To je naliehavá potreba a hlavný záujem vo vývoji nových antituberkulotík.

## 3.2. Potenciálne antituberkulotiká

Stále častejšia rezistencia na antituberkulotiká a HIV pandémie sú hlavnými výzvami pre kontrolu tuberkulózy vo svete. Lieky používané na liečbu tuberkulózy boli objavené pred vyše 40 rokmi a preto je potrebná nová generácia vysoko účinných liečiv.<sup>21</sup>

Súčasný výskum sa zameriava na :

- testovanie nových alebo preformovaných starých liekov
- skrátenie dĺžky terapie kombináciou rôznych liekov
- zníženie frekvencie a množstva podávaných liekov
- oblasť molekulárnych cieľov

Cieľom je nájsť lepšie a bezpečnejšie lieky, ktoré skrátiť dobu liečby, s nižšou toxicitou a poskytnúť náhradu pri vzniku rezistencie.<sup>21</sup>

Prístupy zahŕňajú :

- chemickú modifikáciu existujúcich liečiv
- identifikáciu cieľov liečiv
- použitie microarray analýzy a molekulárno-biologických prostriedkov
- vytváranie základnej štruktúry a *in vivo* a *in vitro* screening vedúci

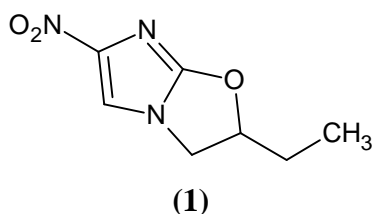
k identifikácii nových liečiv

- posúdenie netypických kombinácií liečiv
- poradie liekov podávaných pri liečbe<sup>21</sup>

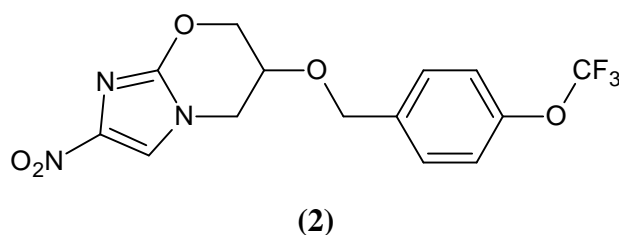
### 3.2.1. Nitroimidazolové zlúčeniny

Mnoho týchto zlúčenín, najmä imidazo-oxazolových a imidazo-oxazinových derivátov, boli skúšané pre ich *in vitro* a *in vivo* antimikrobiálnu aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis*.<sup>23</sup>

5-nitroimidazolová zlúčenina 2-etyl-6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*][1,3]oxazol (**1**) ukázala veľmi sľubnú antituberkulotickú aktivitu, ktorá inhibovala citlivé aj rezistentné kmene *Mycobacterium tuberculosis*. Tiež nevykázala skríženú rezistenciu s bežne používanými antituberkulotikami.<sup>24</sup>



Teoreticky každá nitroimidazolová zlúčenina, ktorá bola doteraz testovaná, má potenciálnu mutagenitu. Prítomnosť nitroskupiny v polohe 5 mala väčšiu súvislosť s celkovou potenciálnou mutagenitou. Pozoruhodne, *in vitro* experimenty na bunkových kultúrach ukázali pozitívnu indikáciu génotoxicity, dokonca aj v prípade mierne mutagénneho metronidazolu.<sup>23</sup>



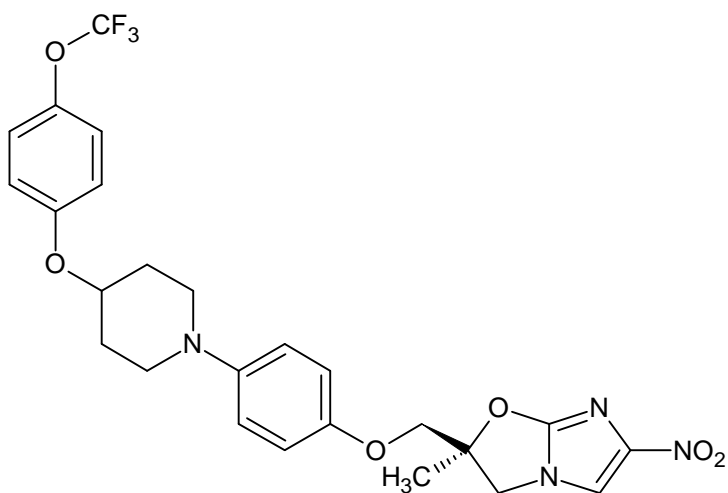
PA-824 (**2**) je veľmi nádejná zlúčenina zo série nitroimidazopyranov syntetizovaná ako derivát 5-nitroimidazolu **CGI-17341** (2-etyl-5-nitro-2,3-dihydro[2-1b]imidazo-oxazol), má vysokú aktivitu na multi-rezistentné kmene a prejavila baktericídny účinok na nečinné mykobaktérie.<sup>25</sup> Má tiež dost' redukovaný mutagénny potenciál v porovnaní s CGI-17341. PA-824 (**2**) vykazuje silnú mikrobicídnu účinnosť, hlavne priamu inhibičnú aktivitu na syntézu proteínov a lipidov v mykobakteriálnom organizme. V porovnaní s existujúcimi antituberkulotikami je pozoruhodné, že prejavuje baktericídnu aktivitu aj na replikujúce sa a aj na statické mykobaktérie.<sup>23</sup> V minulom roku bola publikovaná štúdia, že baktericídny účinok na nereplikujúce sa mykobaktérie je sprostredkovaný metabolizmom PA-824. Deazaflavínindependentná nitroreduktáza

metabolizuje PA-824 na tri primárne metabolity, z ktorých najdôležitejší je des-nitroimidazol. Jeho tvorba prebieha za uvoľnenia reaktívnych foriem dusíku, vrátane oxidu dusnatého (NO), a práve tie sú nositeľmi baktericídnej aktivity za anaeróbných podmienok.<sup>26</sup>

Minimálna baktericídna dávka PA-824 (**2**) bola 100 mg/kg/deň a tá zabránila selekcii INH-rezistentných kmeňov mykobaktérií, keď sa podávala v kombinácii s INH (**36**). Práve baktericídna aktivita na nereplikujúce sa mykobaktérie môže viesť k skráteniu liečby.<sup>23</sup>

PA-824 bola v roku 2005 posunutá do I. fázy klinických skúšok v USA po splnení požadovaných preklinických bezpečnostných testov.<sup>23</sup>

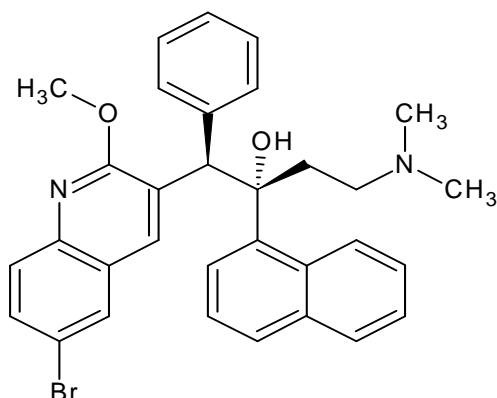
### 3.2.2. Nitroimidazooxazoly



(3)

Látka, ktorá sa v súčasnej dobe nachádza vo fáze II klinických štúdií sa označuje ako OPC-67683 (**3**). Vykazuje v porovnaní s PA-824 (**2**) väčšiu antituberkulotickú aktivitu a väčšiu bezpečnosť.<sup>23</sup>

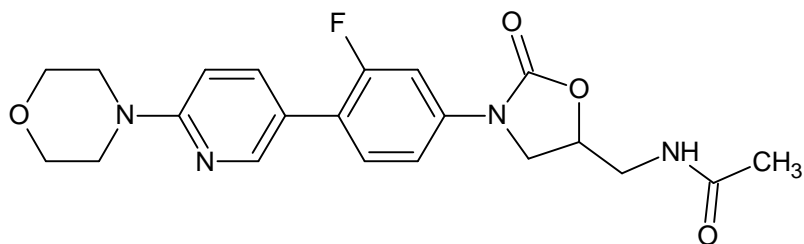
### 3.2.3. Diarylchinolin TCM-207 (4)



(4)

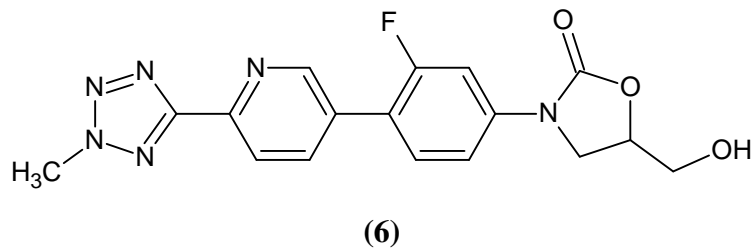
TCM-207 (4) je najslubnejšia zlúčenina medzi diarylchinolónmi. Pôsobí na protónovú pumpu ATP-syntázy v mykobakterii<sup>27</sup>. Má unikátne spektrum silnej a selektívnej antimykobakteriálnej aktivity *in vitro*. Cieľom účinku TCM-207 (4) je oligomérická podjednotka C v ATP-syntáze.<sup>28</sup> TCM-207 (4) je účinná na všetky skupiny mykobaktérií, vrátane *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* komplex, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. ulcerans* a *M. abscessus*.<sup>23</sup> Bola podrobená testom na TB infikovaných morčatách a po 6 týždňoch mala liečba vysoký efekt. Podarilo sa skoro kompletne eradikovať mykobaktérie z nekrotickej lézie vytvorenej po aerosólovej infekcii a z lézie, ktorá bola vytvorená hematogénnou disemináciou patogénov.<sup>29</sup> TCM-207 (4) je preto veľmi sľubnou chemoterapeutickou látkou na liečbu citlivých aj rezistentných kmeňov tuberkulózy. V súčasnej dobe sa nachádza vo fáze II klinických skúšok.<sup>23</sup>

### 3.2.4. Oxazolidinóny



(5)





Oxazolidinóny, vrátane linezolidu (**5**), eperezolidu, PNU-100480, DA-7157 (**6**) a RBx 8700, sú aktívne na mykobaktérie a prejavujú dobrú terapeutickú efektívnosť na tuberkulóznú infekciu u myší.<sup>23</sup>

Oxazolidinóny predstavujú unikátnu skupinu antimikróbných látok.

Majú:

- unikátny mechanizmus pôsobenia, ktorý zložitým spôsobom inhibuje ribozomálnu syntézu proteínov tak, že interferuje s počiatočnou formáciou komplexu, týmto dôjde k inhibícii proteosyntézy vo veľmi rannom štádiu, taktiež sa neprejavila skrížená rezistencia s existujúcimi antimikrobiálnymi látkami
- spektrum aktivity, ktoré zahŕňa množstvo dôležitých bakteriálnych kmeňov
- lepšiu biodostupnosť po perorálnom a parenterálnom podaní
- menšie riziko vzniku rezistentných mutantov<sup>23</sup>

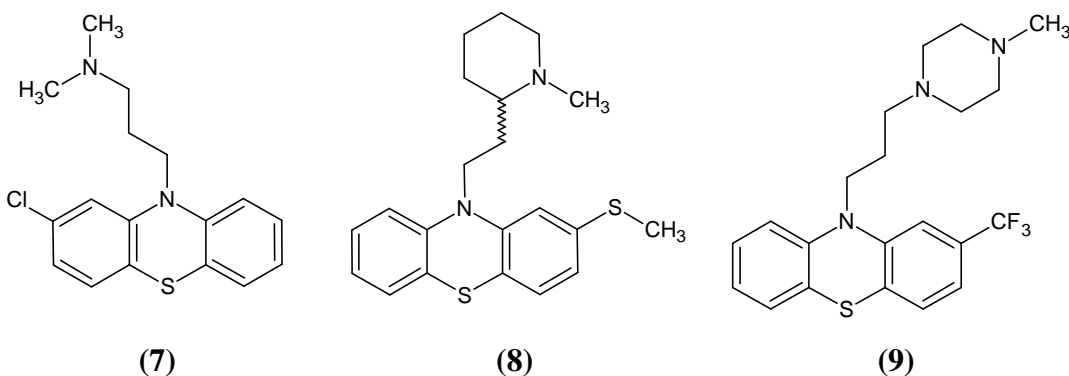
Eperezolid a linezolid (**5**) prejavili silnú antimikróbnu aktivitu proti rezistentným kmeňom a nebola u nich objavená skrížená rezistencia so štandardnými antituberkulotickými látkami. Pre linezolid (**5**) to bolo potvrdené v nedávnych štúdiách so 117 klinicky izolovanými mykobaktériami vrátane mikroorganizmov citlivých, rezistentných a multi-rezistentných na lieky prvej línie v liečbe tuberkulózy. V inej štúdií boli zaznamenané značne vyššie hodnoty MIC u 39 multi-rezistentných kmeňov, ale tieto hodnoty MIC (minimálna inhibičná koncentrácia) boli nižšie ako zlomový bod určený maximálnou koncentráciou v séru. V TB modeli u myší sa chemoterapeutická aktivita prejavila v poradí PNU-100480 > linezolid > eperezolid. Aktivita PNU-100480 bola

podobná ako u izoniazidu (**36**) a rifampicínu (**37**). V novej štúdií prejavil linezolid (**5**) vynikajúcu aktivitu proti klinicky izolovaným mykobaktériám.<sup>23</sup>

V nedávnej dobe sa začalo s klinickými skúškami. V nich sa linezolid (**5**) kombinoval s inými liekmi, vrátane etambutolu (**38**), amikacínu, kapreomycínu, tioacetazónu, klofazimínu (**14**) a zamerali sa na dlhotrvajúcu liečbu multi-rezistentných pacientov. U linezolidu (**5**) bol preukázaný významný antituberkulotický efekt, ale tiež silná periférna neuropatia a útlm kostnej drene.<sup>30</sup>

DA-7867 (**6**) bol tiež podrobený toxikologickým testom na potkanoch, ale bola u neho preukázaná nízka tolerancia.<sup>23</sup>

### 3.2.5. Fenotiazíny



Skupina fenotiazínových zlúčenín, vrátane chlorpromazínu (**7**), tioridazínu (**8**) a trifluorperazínu (**9**), ktoré sú bežnými liekmi používanými pri liečbe psychóz majú určitý stupeň antimikrobiálnej aktivity. Podľa Amarala et al. fenotiazíny inhibujú všetky kmene mykobaktérií bez ohľadu na to, či sú citlivé, multi-rezistentné, alebo poly-rezistentné.<sup>31</sup>

Hodnotenie aktivity proti multi-rezistentným kmeňom bolo nasledovné: chlorpromazín = tioridazín > prometazín > promazín = desipramín.<sup>23</sup>

Cieľ pôsobenia antituberkuloticky účinných fenotiazínov ako napríklad trifluorperazínu (**9**) je mykobakteriálna NADH-menachinonoxidoreduktáza typu II (NDH-2).<sup>23</sup>

Koncentrácia fenotiazínov požadovaná pre dostatočnú *in vitro* inhibíciu bola vyššia ako klinicky dosiahnutá v krvi a tkanivách. Napriek tomu sa zdá, že fenotiazíny sú schopné vyvinúť dostatočnú úroveň terapeutickú aktivitu *in vivo*, pretože sa koncentrujú v makrofágoch, v ktorých sa mykobaktérie rozmnožujú.<sup>31</sup>

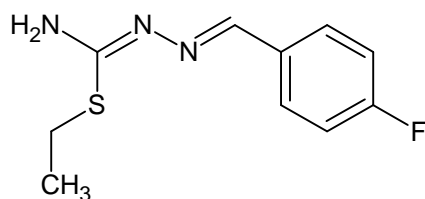
Skutočne bolo preukázané, že MIC hodnoty fenotiazínov účinných proti makrofágovým mykobaktériám boli nižšie ako ich MIC hodnoty proti extracelulárnym mykobaktériám. Ďalej bolo zistené, že klinické koncentrácie tioridazínu (8) a chlorpromazínu (7) účinne zabili intramakrofágové mykobaktérie.<sup>31</sup>

Okrem toho bolo preukázané, že sa fenotiazínom podarilo usmrtiť mykobaktérie v minimálnej baktericídnej koncentrácii potrebnej k zabitíu 99 % buniek. Z toho sa dá vyvodzovať možnosť pre rýchlejšie odstránenie infekcie, keď sa bude infikovaným pacientom podávať v kombinácii s inými antituberkulotikami.<sup>23</sup> Tioridazín (8) zvyšuje aktivitu rifampicínu (37) u polyrezistentných kmeňov, pokiaľ sa s ním podáva v kombinácii. Tieto látky, hlavne tioridazín (8), ktorý má značne slabšie nežiadúce účinky ako chlorpromazín (7), je možné zvažovať ako pomocné látky pre riadenie skoro diagnostikovanej tuberkulózy u pacientov vyskytujúcich sa v populácii s vysokou prevalenciou multi-rezistentných kmeňov.

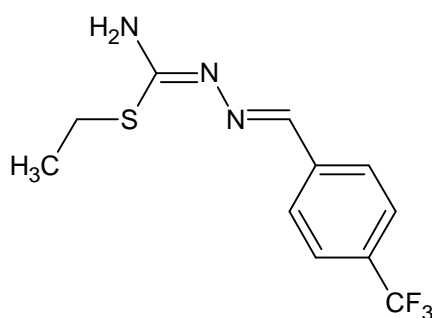
V nedávnej SAR štúdií fenotiazínových analógov s obmenami na kruhu vykazovali najúčinnnejšie zlúčeniny z novo syntetizovaných derivátov mierny antituberkulotický účinok a celkovo redukovanú afinitu k dopamínovym a serotonínovym receptorom (vykazovali nízky stupeň vedľajších účinkov) v porovnaní s chlorpromazínom (7) a trifluorperazínom (9).

Pre zistenie, či tieto látky môžu byť použité ako účinné a bezpečné antituberkulotiká, sú potrebné klinické skúšky.<sup>23</sup>

### 3.2.6. Izotiosemikarbazóny



(10)



(11)

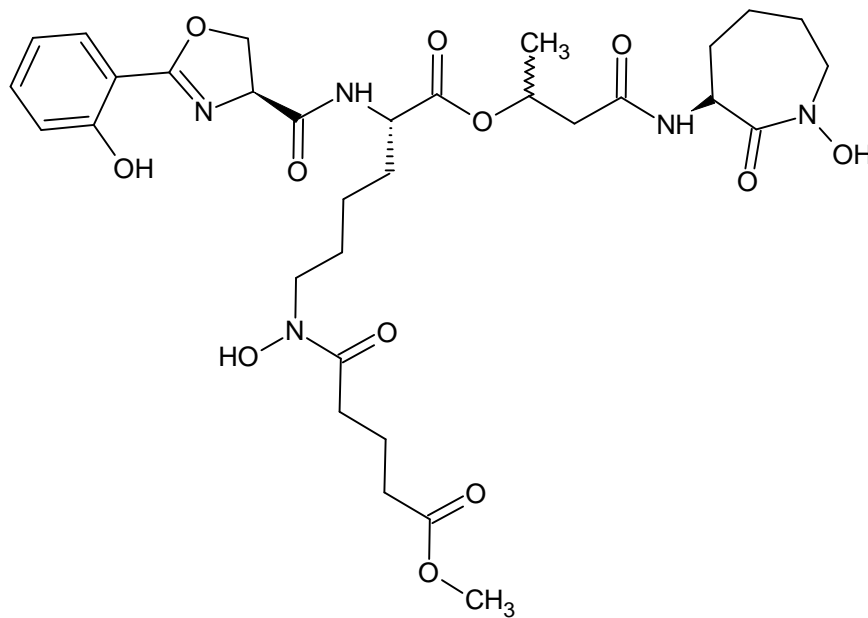
Izotiosemikarbazónové deriváty, vyvinuté z tiosemikarbazónov, ktoré sú známe hlavne kvôli antibakteriálnym, antimalarickým a antivirotickým vlastnostiam, boli syntetizované pre ich biologickú aktivitu proti rôznym kmeňom mykobaktérií. Zlúčenina (10) a (11) prejavila určitú aktivitu na citlivé kmene *Mycobacterium tuberculosis*. V prípade zlúčeniny (10) bola zaznamenaná aj výborná aktivita proti *M. avium*.<sup>24</sup>

### 3.2.7. Mykobaktíny

Viazanie železitých iónov z okolitého prostredia je nevyhnutné pre prežitie mnohých mikroorganizmov vrátane *Mycobacterium tuberculosis*. Mikroorganizmy majú vyvinuté ligandy s extrémne vysokou afinitou k železitým iónom, ktoré viažu ióny z okolitého prostredia.<sup>24</sup>

Mykobaktérie produkujú tri typy Fe-viažúcich zlúčenín, ktoré sa klasifikujú ako mykobaktíny, exochelíny a karboxymykobaktíny. Metylkarboxymykobaktín

T 7 (**12**), ktorý obsahuje nasýtený alkylový reťazec a esterovú skupinu, bol izolovaný z *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>24</sup>

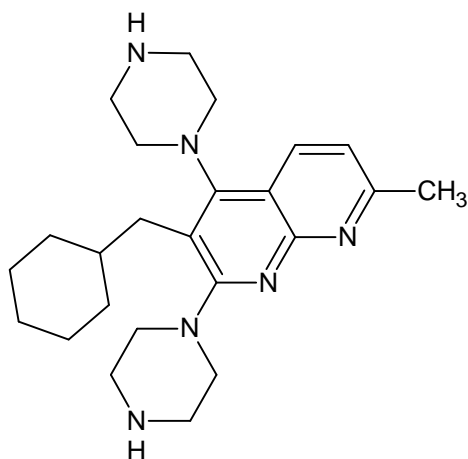


(12)

V snahe vytvoriť kompetetívne inhibítory, ktoré by zabránili mykobaktériam viazať železo, boli nasyntetizované analógy metylkarboxymykobaktínu T 7 (**12**). Fe-viažúca aktivita syntetizovaných derivátov bola testovaná v kompetetívnom sulfoxínovom teste pričom analógy vykazali takmer podobnú selektivitu. Všetky inhibovali rast *M. avium* počas prvého týždňa. V nasledujúcich týždňoch však nebola pozorovaná inhibícia mykobaktérií, ktorá by mohla byť pripísaná skutočnosti, že tieto látky, mohli byť metabolizované alebo degradované v mykobaktériách, čím by sa znížila koncentrácia nutná ku kontrole rastu.<sup>24</sup>

### 3.2.8. 1,8-Naftiridíny

Naftiridíny patria medzi dôležitú triedu antibakteriálnych látok. Na základe tejto skutočnosti boli syntetizované 1,8-naftiridíny a testované ako potencionálne antituberkulotiká. Veľmi účinná zlúčenina (**13**) vykazala 96% inhibíciu.

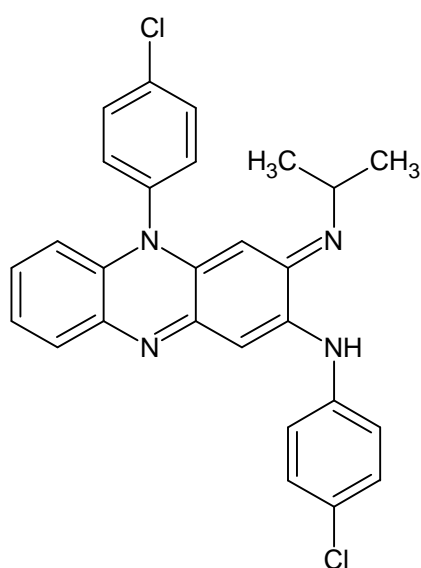


(13)

Zistený terapeutický potenciál tejto triedy zlúčenín však ešte vyžaduje hodnotenie najúčinniejšieho analóga proti rezistentným kmeňom.<sup>24</sup>

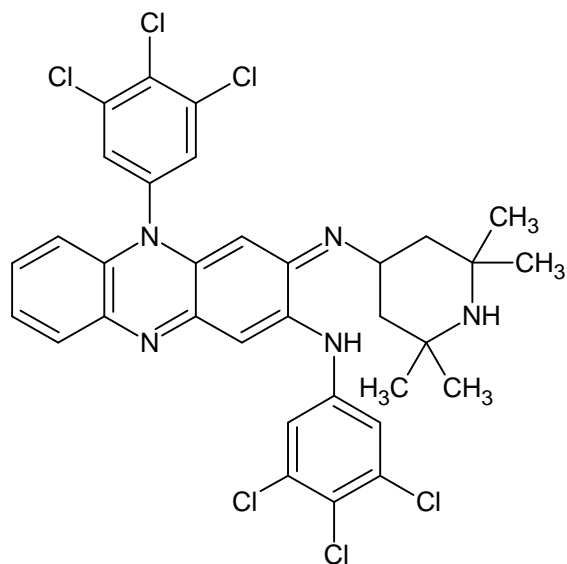
### 3.2.9. Fenazíny

Jedná sa o novú sériu zlúčenín patriacu do tetrametylpiperidínofenazínovej triedy a blízko súvisiacu s liekmi proti lepre. Patrí tu klofazimín (14), ktorý je účinný proti citlivým kmeňom.



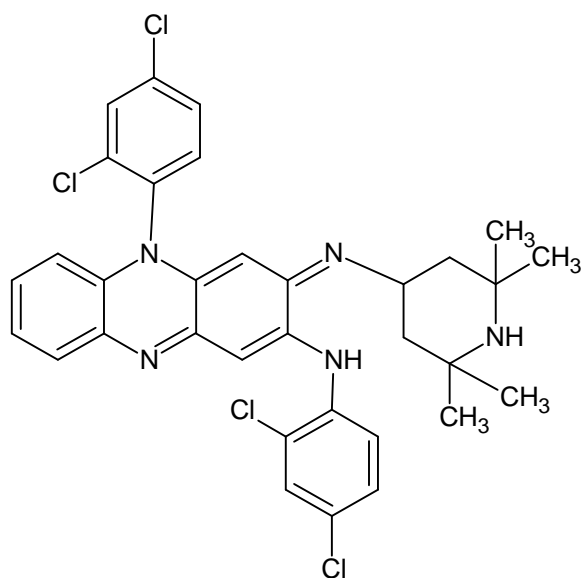
(14)

Fenazínový derivát **(15)** prejavil vyššiu aktivitu proti citlivým aj rezistentným kmeňom ako spomínaný klofazimín **(14)**.



**(15)**

Zlúčenina **(16)** z rovnakej triedy preukázala významnú intracelulárnu aktivitu proti infikovaným monocytom.<sup>24</sup>



**(16)**

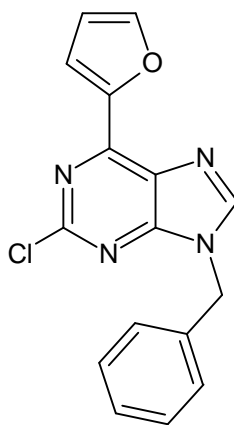
Oba tieto deriváty **(15)** a **(16)** vykázali nižšiu pigmentáciu, predchádzali mortalite a mali za následok výrazné zníženie kolónií v pľúcach a slezine.

Stanovenie ich toxicity bude asi rozhodujúcim faktorom pre ich ďalší klinický výskum.<sup>24</sup>

### 3.2.10. Puríny

Dve série derivátov 6-fenyl-9benzylpurínov a 6-aryl-9-benzylpurínov boli syntetizované a hodnotené *in vitro*.

Najsľubnejšia zlúčenina 2-chlór-4-(2-furanyl)-9-benzylpurín (**17**) mala výbornú aktivitu a inhibovala *M. tuberculosis*. Tiež prejavila nízku toxicitu.<sup>24</sup>



(17)

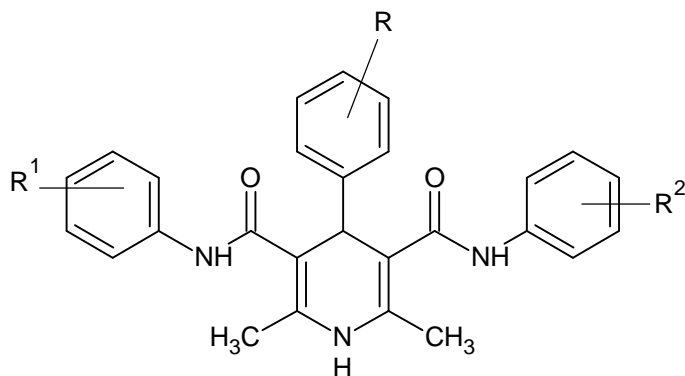
Substituované puríny sú zásluhou dobrej *in vitro* aktivity, nízkej toxicity, neobjavenej skríženej rezistencie so štandardnými antituberkulotikami a novej subštruktúrnej konštitúcie dôležitou triedou antimykobakteriálnych látok, o ktorých terapeutickom potenciále bude rozhodnuté až po vykonaní *in vivo* biologických štúdií.<sup>24</sup>

### 3.2.11. Pyridíny

Nové 1,4-dihydropyridíny nesúce na svojom kruhu lipofilné skupiny boli syntetizované a testované pre antituberkulotickú aktivitu na základe predpokladu,



že látky by mohli fungovať ako proliečivá a po penetrácii cez bunkovú stenu by mohli po enzymatickej hydrolyze konvertovať na 3,5-karboxylový anión. Najúčinnnejšie deriváty **(18)**, **(19)**, **(20)**, a **(21)** preukázali viac ako 97% inhibíciu, pričom aktivita bola porovnateľná s rifampicínom **(37)**.<sup>24</sup>



**(18)**: R= 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>= 4-NO<sub>2</sub>

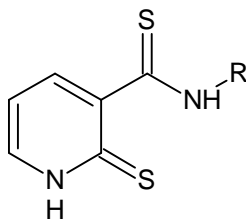
**(19)**: R= 4-SCH<sub>3</sub>, R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>= 4-NO<sub>2</sub>

**(20)**: R= 4-SCH<sub>3</sub>, R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>= 3-NO<sub>2</sub>

**(21)**: R= 2,4-Cl<sub>2</sub>, R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>= 3-NO<sub>2</sub>

*N*-alkyl-1,2-dihydro-2-tioxo-3-pyridínkarbotioamidy boli označené ako nová pyridínová skupina zlúčenín s antituberkulotickou aktivitou.

Zlúčeniny **(22)** a **(23)** vykazovali výborný účinok proti citlivým kmeňom. Je však ešte potrebné vyriešiť problémy týkajúce sa rozpustnosti vo vode a farmakokinetických parametrov.<sup>24</sup>



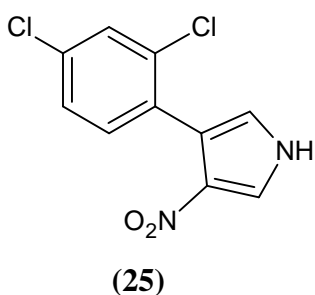
**(22)**: R= C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

**(23)**: R= C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>

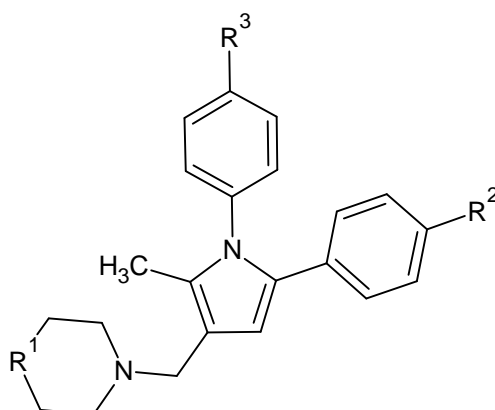
**(24)**: R= (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH

### 3.2.12. Pyrroly

Veľký počet pyrrollov, odvodených od prírodného antifungálneho antibiotika izolovaného zo *Streptomyces pyrrocinia*, bolo testovaných proti rôznym kmeňom mykobaktérií. Najúčinnější zlučienina 3-(2,4-dichlórfenyl)-4-nitro-1*H*-pyrrol (**25**) vykázala silnú účinnosť proti *M. tuberculosis*, ktorá bola porovnateľná so streptomycínom (**35**).<sup>24</sup>



Štruktúrno-aktivitné štúdie poukázali na stratu aktivity, v prípade že nitroskupina v polohe C-3 bola nahradená. Okrem toho viedlo odstránenie atómu chlóru z benzénového jadra k úplnému vymiznutiu účinku. Rozšírenie tohto pozorovania a biologický výskum viedol k identifikácii nových pyrrollov s dvojakou aktivitou proti rodom *Mycobacterium* a *Candida*.<sup>24</sup>

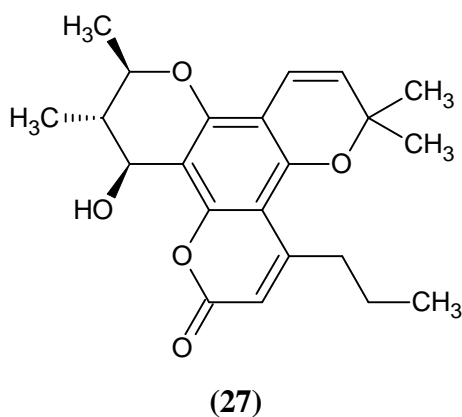


**(26):**  $R^1 = NCH_3$ ,  $R^2 = R^3 = Cl$

Zlúčenina (26) je účinná proti kmeňom rezistentným voči etambutolu (38), izoniazidu (36), amikacínu, streptomycínu (35), rifampicínu a rifambutínu a proti intracelulárnym mykobaktériam. Z tohto dôvodu sa tento derivát považoval za sľubné vodítko smerujúce k objaveniu silnejších antituberkulotických látok. Podobný účinok bol popísaný aj u ďalších látok skupiny.<sup>24</sup>

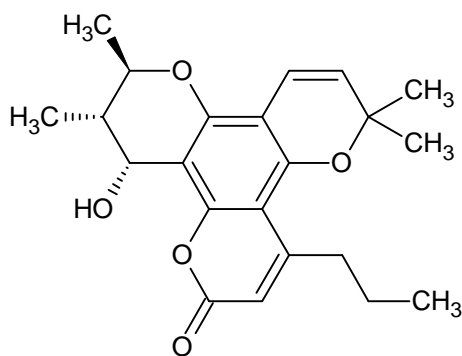
### 3.2.13. Kumaríny

Prírodné zlúčeniny predstavujú jednu z veľmi dôležitých ciest v hľadaní nových biologicky aktívnych zlúčenín. Kalanolid A (27), prírodný pyranokumarín, je jedným z najzaujímavejších zástupcov, pretože sa môže pochváliť dvojakou aktivitou proti tuberkulóze i proti HIV-infekcii.<sup>24</sup>



Táto zlúčenina, pôsobiaca aj ako inhibítor HIV-1 reverznej transkriptázy, prejavila sľubné výsledky *in vitro* aktivity proti *M. tuberculosis*.

Kalanolid B (28) vykazoval porovnateľné spektrum aktivity ako Kalanolid A (27). Výhodou je, že sa môže ľahko získavať z oleja semien rastliny rodu *Calophyllum*.<sup>24</sup>



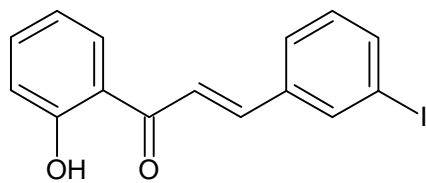
(28)

Kumaríny izolované z prírodných zdrojov je možné označiť za novú dôležitú triedu antituberkulotických zlúčenín. Štrukturálne rysy týchto derivátov, ktoré sú odlišné od používaných látok, by im mohli zabezpečiť aktivitu proti rezistentným kmeňom.<sup>24</sup>

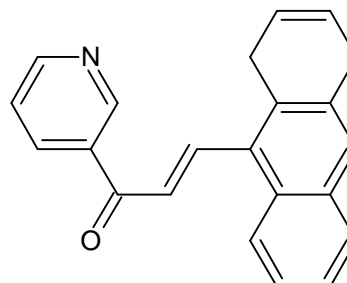
### 3.2.14. Chalkóny a zlúčeniny podobné chalkónom

Chalkóny predstavujú dôležitú skupinu zlúčenín, ktorá už od začiatku prejavovala silné biologické pôsobenie proti rôznym protozoálnym infekciám vrátane malárie a leishmaniózy.

V úsilí objaviť nové antituberkulotické látky bola u niektorých chalkónov a zlúčenín podobných chalkónom preukázaná inhibičná aktivita proti bacilom tuberkulózy.



(29)

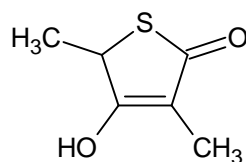


(30)

Najmä vyššie uvedené zlúčeniny **(29)** a **(30)** preukázali vysokú účinnosť na rastúce baktérie *M. tuberculosis*.<sup>24</sup>

Na Katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv Farmaceutickej fakulty je už niekoľko rokov venovaná pozornosť pyrazínovým analógom chalkónov.<sup>32, 33, 34</sup> Niektoré z týchto zlúčenín disponujú výraznou antituberkulóznou aktivitou. Boli však zároveň značne cytotoxické a hlavne kvôli tomuto negatívu neboli vybrané do ďalšieho vývoja.

### 3.2.15. Tiolaktomycínové deriváty



**(31)**

Thiolaktomycín (TLM) **(31)** je tiolaktónové antibiotikum izolované z pôdných húb rodu *Nocardia*. TLM **(31)** prejavil silnú aktivitu proti mnohým patogénnym Gram-negatívnym i Gram-pozitívnym baktériam a tiež *M. tuberculosis*.

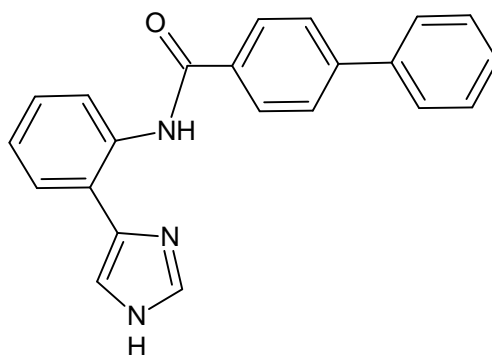
Selektívne inhibuje syntázu mastných kyselín typu II (FAS-II) prítomnú v *M.tuberculosis*, pričom syntázu typu-I (FAS-I) prítomnú u cicavcov neovplyvňuje.<sup>24</sup>

To vedie k blokáde biosyntézy mastných kyselín, ktoré tvoria dôležitú zložku bakteriálnej steny čím dochádza k bunkovej smrti. Ďalšie zvýšenie aktivity bolo dosiahnuté zavedením benzénového kruhu nesúceho objemnú *tert*-butylovú alebo 4-benzyloxymetylovú skupinu.

Tieto deriváty sú prospešné pre ďalší výskum a možno poskytnú ďalšie informácie a potvrdia FAS-II ako možný cieľ antituberkulotických látok.<sup>24</sup>

### 3.2.16. Toluidíny

Biava so spolupracovníkmi<sup>35</sup> pripravili sériu toluidínových derivátov, z ktorých niektoré vykázali zaujímavú aktivitu *in vitro* voči *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. goodnae* a *M. avium*. Obzvlášť významná aktivita bola zaznamenaná u derivátov s bifenylovým zbytkom v molekule, napr. v prípade zlúčeniny **32**, ktorá bola zároveň zo všetkých študovaných derivátov najmenej toxická.



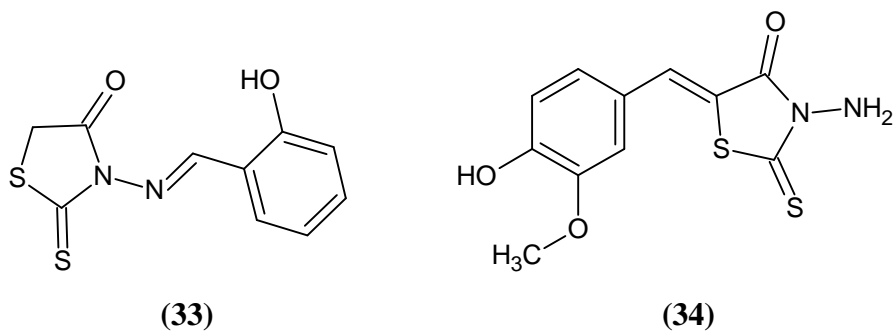
(32)

### 3.2.17. Rodaníny

V screeningovej štúdií, zameranej na vyhľadávanie zlúčenín inhibujúcich syntézu bunkovej steny *M. tuberculosis* zásahom do syntézy deoxytimidíndifosfát-L-ramnózy (dTDP-Rha), bolo skúšaných asi 8 000 látok, pričom 11 z nich bolo schopných inhibovať syntézu dTDP-Rha z viac než 60 %. Trojica látok z tejto jedenástky zástupcov obsahovala priamo rodanínový cyklus a jedna vlastnila motív rodanínu podobný.<sup>36</sup>

Opačným postupom hľadania nových liečiv je syntéza látok analogických s dosiaľ užívanými liečivami. To je i prípad série 5-substituovaných aminorodanínov, ktoré svojou štruktúrou pripomínajú antituberkuloticky

účinkujúci izoniazid (36). Niektoré deriváty aminorodanínu majú tuberkulostatický účinok.<sup>37</sup> Predovšetkým látky (33) a (34) sa zo skúmaných látok svojim *in vitro* tuberkulotickým účinkom a nižšou toxicitou javia ako najvhodnejšie pre ďalšie testovanie.



Tiež niektoré arylalkylidénrodaníny pripravené na Katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv Farmaceutickej fakulty UK a popísané v predchádzajúcich diplomových prácach<sup>12,13,18,22,38</sup> boli už podrobené skúškam na antimykobakteriálnu aktivitu<sup>39</sup> a výsledky boli publikované formou plagátového zdedenia<sup>40</sup>. Zatiaľ čo deriváty získané kondenzáciou rodanínu s acetylpyrazínmi boli bez sledovaného účinku, aktivita kondenzačných produktov rodanínu s rôznymi aldehydmi sa voči *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv pri dávke 6,25 µg/ml pohybovala v rozmedzí 34 – 72 % a doterajšie výsledky naznačujú, že pre antimykobakteriálny účinok je vhodná substitúcia elektróny odťahujúcim substituentom (electron withdrawing group, EWG) v aldehydovej časti molekuly.

### 3.3. Nové ciele antituberkulotík

Pokroky v znalostiach biológie a genetiky mykobaktérií umožňujú racionálny výber zlúčenín interferujúcich s biosyntetickými pochodmi a ovplyvňujúcich permeabilitu mykobakteriálnej steny. Podrobný zoznam týchto mechanizmov podáva Tomioka. Mimoriadne dôležitou úlohou je tiež nájdenie zlúčenín pôsobiacich na spiace mykobaktérie. Identifikácia mechanizmov, pomocou

ktorých mykobaktérie dokážu perzistovať v hostiteľovi, bude viesť k schopnosti navrhnuť štruktúru nových typov antituberkulotických látok, ktoré cielene pôsobia na perzistujúce bacily, definovať ako mykobaktériálny organizmus, tak riadenie terapie, pravdepodobne cez schopnosť pozastaviť replikáciu u tých mykobaktérií, u ktorých replikácia pokračovala po odstránení liekov. Použitie takýchto antituberkulotických liekov, aktívnych proti perzistujúcim mykobaktériám, umožní skrátiť chemoterapiu bez rastúcej miery recidívy. Okrem toho by profylaktické podávanie antituberkulotických liekov účinných proti spiacim mykobaktériám mohlo znížiť výskyt postprimárnej tuberkulózy reaktivovanej u 1,7 miliardy ľudí na celom svete. Nasledujúce enzýmy by mohli byť sľubnými cieľmi v liečbe perzistujúcej mykobakteriálnej infekcie.<sup>23</sup>

### **3.3.1. Enzýmy glyoxylátového skratu**

Je známe, že u perzistujúcich mykobaktérií dôjde ku zvratu, v ktorom bakteriálna glykolýza je znížená a glyoxylátový skrat je zvýšený. Preto dovoľuje baktérii využiť  $C_2$  substrát vytváraný pri  $\beta$ -oxidácii mastných kyselín. V tejto súvislosti je izocitrát-lyáza (Icl), ktorá je kľúčovým enzýmom v glyoxylátovom cykle, zvýšená v baktériách vystavených anaeróbnym podmienkam v stacionárnej fáze alebo rastúcich vo vnútri makrofágov.<sup>23</sup>

Táto indikácia, že Icl gén hrá kľúčovú úlohu u perzistujúcich mykobaktérií, vedie k tvrdeniu, že Icl je nutná pre prežitie mykobaktérií v aktivovaných makrofágoch, avšak nie v neaktivovaných.<sup>41</sup> Keďže človek nemá funkčný glyoxylátový skrat, poslúži Icl ako špecifický cieľ.<sup>23</sup>

### **3.3.2. Cyklopropán-syntáza**

Mykobaktérie majú extrémne rigidnú bunkovú stenu hojne obsahujúcu mykolovú kyselinu, ktorá je pre nich charakteristická.<sup>23</sup>

Takéto vlastnosti bunkového obalu sú dôležité pre virulenciu a schopnosť perzistovať v nepriaznivých podmienkach. Silná štruktúra bunkovej steny dáva



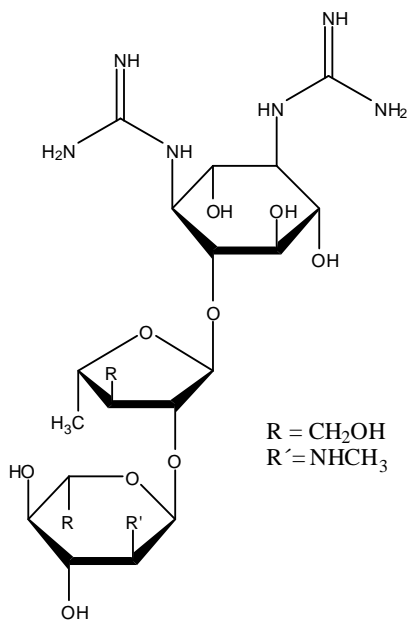
baktérii vysokú odolnosť voči makrofágovým antibakteriálne pôsobiacim molekulám, ktoré sú uvoľňované do makrofágmi fagocytovaných baktérií.<sup>23</sup>

Metyl-transferáza (PcaA) zakódovaná v PcaA géne bola počas testovania identifikovaná. PcaA syntetizuje jednoduchý cyklopropánový zbytok na mykolovej kyseline. K syntéze dôjde počas prechodu z fázy rastu do stacionárnej fázy. Takto upravená mykolová kyselina je hlavnou zložkou bunkovej steny patogénnych, ale nie saprofytických mykobaktérií. Uvedená modifikácia mykolovej kyseliny skutočne zvyšuje odolnosť baktérie voči antimikrobiálnemu účinku aktívnych kyslíkových medziproduktov, ktoré sú jedným z hlavných antimikrobiálnych nástrojov makrofágov. Preto môže byť PcaA zaujímavým cieľom pôsobenia nových antituberkulotických látok.<sup>23</sup>

### **3.3. Klinicky používané antituberkulotiká**

V súčasnej dobe používané antituberkulotiká boli postupne objavené v druhej polovici 20. storočia a odvtedy sa farmakoterapia výrazne nezmenila.<sup>42</sup> V nasledujúcej časti budú tieto látky zhrnuté stručne, podrobnejšie sú spracované v diplomovej práci Morida Mahmoudi Majda.<sup>38</sup>

### 3.3.1 Streptomycín (35)



(35)

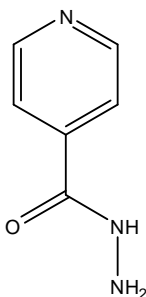
Streptomycín (35) je aminoglykozidové antibiotikum izolované zo *Streptomyces griseus*. Je tvorený z 3 štrukturálnych zložiek:

1. streptidínu
2. streptózy
3. *N*-metyl-L-glukozamínu

Keďže má veľmi slabú absorpciu z gastrointestinálneho traktu, podáva sa buď intramuskulárne alebo príležitostne intratekálnou cestou.<sup>16</sup>

Častejšie sa ale používa vo forme síranu, ktorý je vo vode rozpustný veľmi dobre.<sup>42</sup> Vo vysokých dávkach je však dosť toxický a to hlavne na periférny a centrálny nervový systém. Navyše sa u neho často objavuje hypersenzitívna reakcia. Preto streptomycín nie je veľmi obľúbenou voľbou.<sup>16</sup>

### 3.3.2. Isoniazid (36)

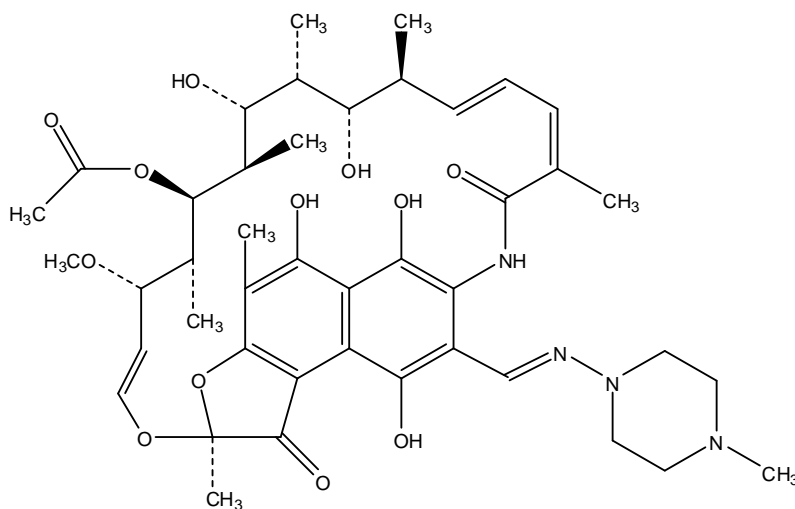


(36)

Dôležitým objavom bolo odhalenie účinku hydrazidu izonikotínovej kyseliny izoniazidu (36). Ten sa ako základné chemoterapeutikum používa už od roku 1952.<sup>42</sup>

Isoniazid (36) je proliečivo vyžadujúce, aby bol mykobakteriálny katalázový peroxidázový systém aktívny. Jeho funkčnosť udáva mykobaktériam citlivosť. Je účinný orálne a prejavuje bakteriostatickú účinnosť na inaktívne bacily a vysokú účinnosť proti *M. tuberculosis* komplex. Isoniazid (36) inhibuje syntézu mykolovej kyseliny prostredníctvom vplyvu na mykolovú syntatázu.<sup>16, 42</sup>

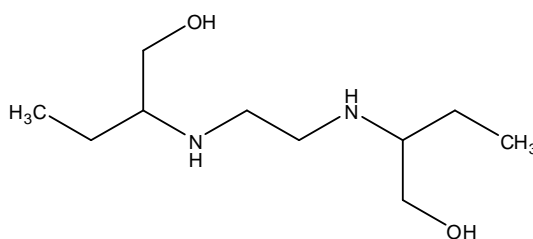
### 3.3.3. Rifamycíny



(37)

Rifamycíny tvoria skupinu semisyntetických antibiotík odvodených od rifamycínu B, ktorý bol izolovaný zo *Streptomyces mediterrani*.<sup>16</sup> Spoločným znakom štruktúry tejto skupiny je makrocyklus, najčastejšie ho tvorí naftochinónový alebo naftohydrochinónový cyklus. Dve nesusedné miesta makrocyklu sú spojené reťazcom v ansa- usporiadaní.<sup>42</sup> Inhibuje prokaryotnú DNA-dependentnú RNA polymerázu<sup>42</sup> - enzým nevyhnutný pre syntézu RNA<sup>16</sup>. Pôsobí na  $\beta$ -podjednotku tohto enzýmu vytvorením stabilného komplexu. Lipofilné vlastnosti molekuly sú dôležité pre väzbu liečiva na polymerázu a tiež zlepšujú transport látky cez mykobakteriálnu bunkovú stenu. Aby sa zabránilo rýchlemu rozvoju rezistencie, kombinuje sa spolu s inými látkami prvej línie (najmä s izoniazidom (36) alebo etambutolom (38)).<sup>16</sup>

#### 3.3.4. Etambutol (38)



(38)

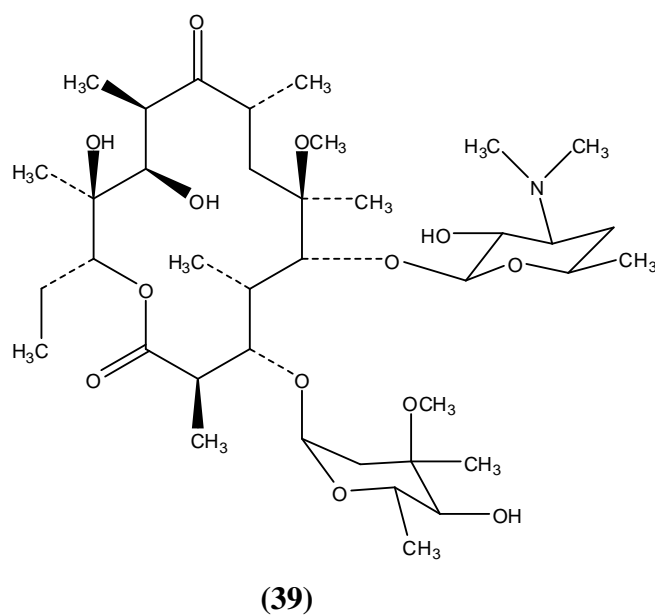
Je syntetický aminoalkohol s dvoma izolovanými chirálnymi atómami uhlíku.<sup>42</sup>

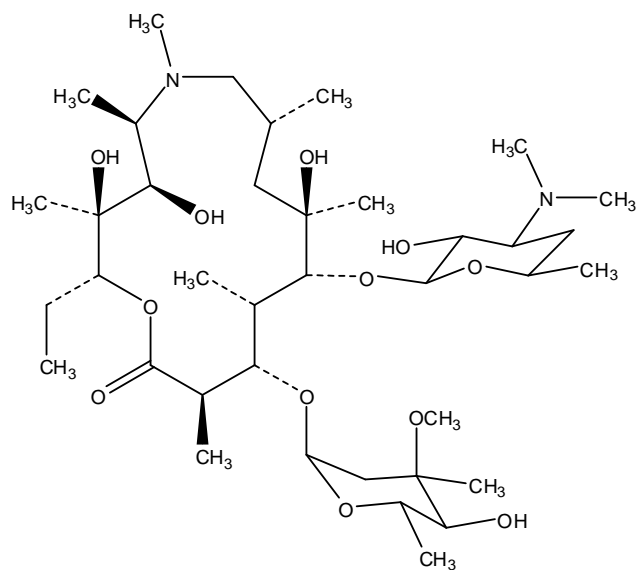
Účinný je len pravotočivý S,S-(+)-izomér, zatiaľ čo ľavotočivý je inaktívny a ďalšie stereoizoméry sú toxické. Mechanizmus účinku etambutolu (38) spočíva v polymerizácii arabinózy v bunkovej stene mykobaktérie. Miestom zásahu je arabinofuranosyltransferáza, ktorá katalyzuje biosyntézu lipoarabinomannanu nevyhnutného pre zachovanie integrity mykobakteriálnej steny. Na účinku sa zrejme prejavuje chelatačná schopnosť tejto látky.<sup>42</sup>

### 3.3.5. Makrolidy

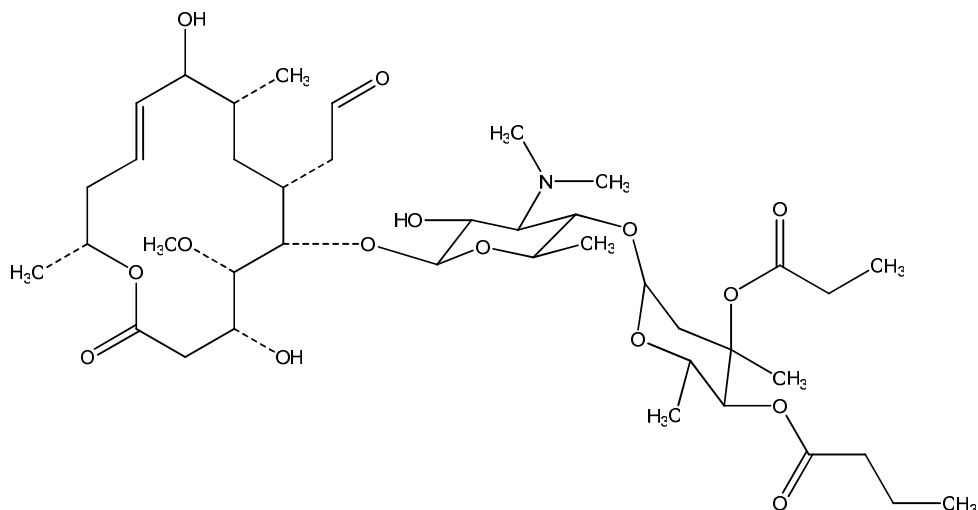
Makrolidy zahrnujú skupinu antibiotík počnúc erytromycínom až po mnoho syntetických derivátov.<sup>16</sup>

Erytromycín je 14-členný makrocyclický laktón, na ktorý sú naviazané 2 cukorné zbytky.<sup>16, 42</sup> Novšie deriváty sú odlišné od pôvodného erytromycínu veľkosťou a/alebo substitúciou na laktónovom kruhu a zahŕňajú napr. klaritromycín **(39)**, azitromycín **(40)**, rokitamycín **(41)**.<sup>16</sup>





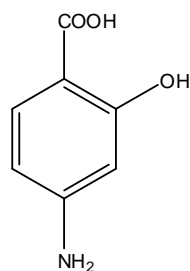
(40)



(41)

Hoci viaceré syntetické deriváty so zlepšenými farmakokinetickými vlastnosťami sa zdajú byť nádejné v liečbe mykobakteriálnej infekcie, našli svoje uplatnenie hlavne v liečbe netuberkulotických chorôb.<sup>16</sup> Mechanizmus ich pôsobenia spočíva vo väzbe na 50S ribozomálnu podjednotku, spôsobujúcu odlúčenie peptidyl-tRNA z ribozómu a tým inhibíciu bakteriálnej proteosyntézy.<sup>16</sup>

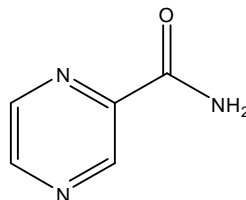
### 3.3.6. p-Aminosalicylová kyselina (42)



(42)

Je to jedna z najstarších antituberkulotických látok.<sup>42</sup> Mykobakteriálna aktivita bola objavená v roku 1946, aj keď syntetizovaná bola už dlho predtým.<sup>16</sup> Nie je účinná proti žiadnym iným baktériam. V súčasnej dobe sa už veľmi nepoužíva. Mechanizmus jej účinku ešte stále nie je dostatočne objasnený<sup>16</sup>, ale predpokladá sa, že spočíva v chelatacii kationov železa a tým v zabránení ich prenosu prostredníctvom sideroforu mykobaktínu.<sup>42</sup>

### 3.3.7. Pyrazínamid (43)



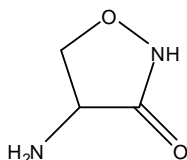
(43)

Pyrazínamid (43), štruktúrally analóg nikotínamidu, je liekom prvej línie v terapii tuberkulózy.<sup>16</sup> Používa sa v iniciálnej fáze liečby na rýchle usmrtenie replikujúcich sa a čiastočne nereplikujúcich kmeňov, alebo pri zasiahnutí CNS pre jeho veľmi dobrý prienik.<sup>42</sup> Kombinuje sa hlavne s izoniazidom (36) a rifampicínom (37)<sup>16,42</sup>, s tým že skraca dobu terapie na 6 mesiacov.<sup>16</sup>

Nebol preukázaný signifikantný baktericídny efekt, ale predpokladá sa, že sa uplatňuje sterilizačný mechanizmus. Aktivita pyrazínamidu (43) závisí od

prítomnosti bakteriálnej amidázy, ktorá ho konvertuje na pyrazín-2-karboxylovú kyselinu.<sup>16</sup>

### 3.3.8. Cykloserín (44)



(44)

D-cykloserín (44), štruktúrálly derivát aminokyseliny D-alaninu, vykazuje aktivitu proti širokému spektru baktérií. Blokuje biosyntézu inhibíciou enzýmu D-alaninracemázy a D-alaninylalaninsynthetázy.<sup>16</sup>



# 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

## 4.1. Chemická časť

Vzorky látok pre analýzu boli sušené 24 hodín v exsikátore nad oxidom fosforečným pri tlaku 1,33 kPa. Teploty topenia boli stanovené na mikrovýhrevnom bloku Bötia a neboli korigované.

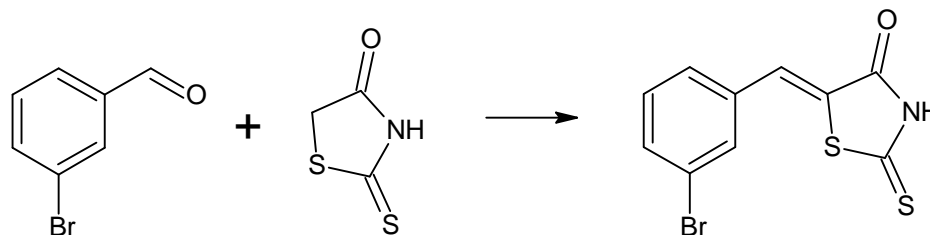
TLC bola vyvíjaná na hliníkových fóliách Silikagel 60 254 (Merck) za použitia sústavy benzín : etylacetát vo vhodnom pomere.

Elementárne analýzy boli robené na analyzátore EA 1110 CHNS Analyzer (Carlo Erba).

IČ spektrá boli merané na spektrofotometri NICOLET 6700. Vlnočty sú uvádzané v  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$ -NMR a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrá boli merané na prístroji VARIAN Mercury-V<sub>x</sub>BB 300. Chemické posuny sú uvádzané v  $\delta$ , ppm a interakčné konštanty  $J$  v Hz.

#### 4.1.1. Príprava 5-(3-brómbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 2,78 g (0,015 mol) 3-brómbenzaldehydu, 2,0 g (0,015 mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čírej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Analyticky čistý produkt bol získaný kryštalizáciou z bezvodného etanolu.

Molekulová hmotnosť: 300,19

Výťažok: 2,03 g (45%)

Vzhľad: žltá kryštalická látka

Teplota topenia: 244 – 246 °C (rozkl.)

Teplota topenia uvedená v literatúre<sup>43</sup>:

- 238 °C (Z-izomér, kyselina octová)

Elementárna analýza:

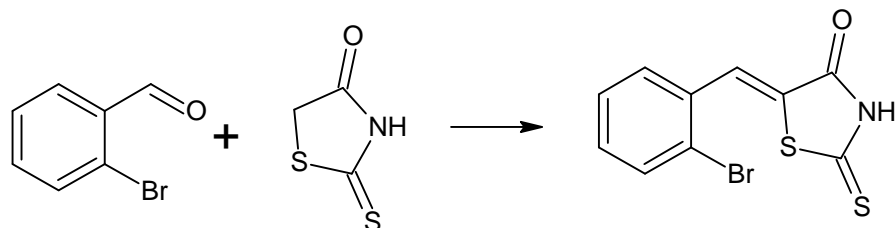
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	40,01	2,01	4,67	21,36
<b>Nájdené:</b>	40,14	1,98	4,53	22,19

IČ spektrum: (KBr) 3435, 3111 (NH); 1717 (C=O)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 13.88 (1H, bs, NH), 7.80 (1H, s, H2'), 7.71 – 7.64 (1H, m, H4'), 7.61 (1H, s, CH), 7.55 (1H, d, J = 7.6 Hz, H6'), 7.48 (1H, t, J = 7.6 Hz, H5')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  195.6, 169.5, 135.6, 133.4, 133.3, 131.6, 129.9, 128.7, 127.5, 122.7

#### 4.1.2. Príprava 5-(2-brómbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 2,78 g (0,015mol) 2-brómbenzaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čírej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Analyticky čistý produkt bol získaný kryštalizáciou z bezvodného etanolu.

Molekulová hmotnosť: 300,19

Výtťažok: 2,66 g (59 %)

Vzhľad: jemné svetložlté kryštály

Teplota topenia: 185 – 186 °C (rozkl.)

Teploty topenia uvedené v literatúre<sup>43</sup>:

- 183,5 °C (Z-izomér, kyselina octová)
- 189 °C (Z-izomér, etanol)

Elementárna analýza:

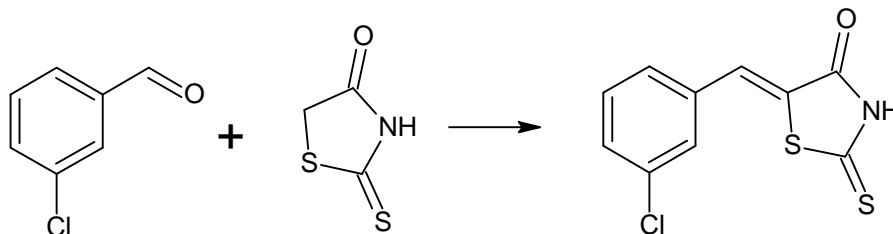
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	40,01	2,01	4,67	21,36
<b>Nájdené:</b>	89,90	1,89	4,62	22,01

IČ spektrum: (KBr) 3445, 3096 (NH); 1732, 1702 (C=O)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  13.97 (1H, bs, NH), 7.82 – 7.78 (1H, m, H3'), 7.70 (1H, s, CH), 7.61 – 7.47 (2H, m, H4', H6'), 7.45 – 7.37 (1H, m, H5')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  195.8, 169.3, 133.9, 132.7, 132.4, 129.6, 129.3, 129.1, 129.0, 125.9

#### 4.1.3. Príprava 5-(3-chlórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 2,11 g (0,015 mol) 3-chlórbenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čirej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Analyticky čistý produkt bol získaný kryštalizáciou z bezvodného etanolu.

Molekulová hmotnosť: 255,74

Výťažok: 2,93 g (76 %)

Vzhľad: žltoranžové jemné kryštály

Teplota topenia: 234 – 235 °C (rozkl.)

Teplota topenia uvedená v literatúre<sup>43</sup>:

- 233 °C (Z-izomér, kyselina octová)

Elementárna analýza:

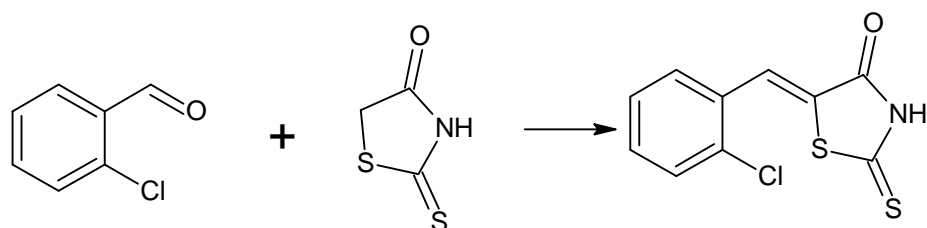
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	46,96	2,36	5,48	25,08
<b>Nájdené:</b>	46,86	2,28	5,48	25,71

ÍČ spektrum: (KBr) 3435, 3109 (NH); 1718 (C=O)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  13.90 (1H, bs, NH), 7.68 (1H, s, CH), 7.62 – 7.47 (4H, m, H2', H4', H5', H6')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  195.5, 169.4, 135.3, 134.2, 131.4, 130.5, 130.4, 130.0, 128.3, 127.5

#### 4.1.4. Príprava 5-(2-chlórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 2,11 g (0,015 mol) 2-chlórbenzaldehydu, 2,0 g (0,015 mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čirej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Analyticky čistý produkt bol získaný kryštalizáciou z bezvodného etanolu.

Molekulová hmotnosť: 255,74

Výtťažok: 1,85 g (48%)

Vzhľad: žltá kryštalická látka

Teplota topenia: 191 – 193 °C

Teploty topenia uvedené v literatúre<sup>43</sup>:

- 169 °C (konfigurácia nie je uvedená, etanol)
- 192 °C (konfigurácia nie je uvedená, kyselina octová)
- 182 – 183 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)

Elementárna analýza:

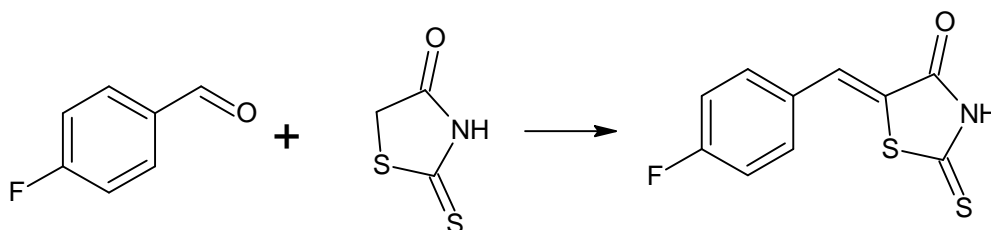
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	46,96	2,36	5,48	25,08
<b>Nájdene:</b>	47,06	2,38	5,41	25,49

IČ spektrum: (KBr) 3435, 3069 (NH); 1734, 1698 (C=O)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  13.93 (1H, bs, NH), 7.74 (1H, s, CH), 7.66 – 7.60 (1H, m, H3'), 7.54 – 7.47 (3H, m, H4', H5', H6')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  195.7, 169.3, 135.0, 132.3, 131.0, 130.7, 129.5, 129.3, 128.5, 126.3

#### 4.1.5. Príprava 5-(4-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 1,86 g (0,015mol) 4-fluórbenzaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čirej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Analyticky čistý produkt bol získaný kryštalizáciou z bezvodného etanolu.

Molekulová hmotnosť: 239,29

Výťažok: 2,80 g (78 %)

Vzhľad: žlté ihličkovité kryštály

Teplota topenia: 225 – 227 °C (rozkl.)

Teploty topenia uvedené v literatúre<sup>43</sup>:

- 226 – 227 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)

- 214 – 215 °C (konfigurácia nie je uvedená, benzén, etanol)
- 223 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)
- 217 – 219 °C (*E*-izomér, etylacetát, hexán)
- 221,85 °C (*Z*-izomér, dimetylformamid)
- 219 °C (*Z*-izomér, etanol)

Elementárna analýza:

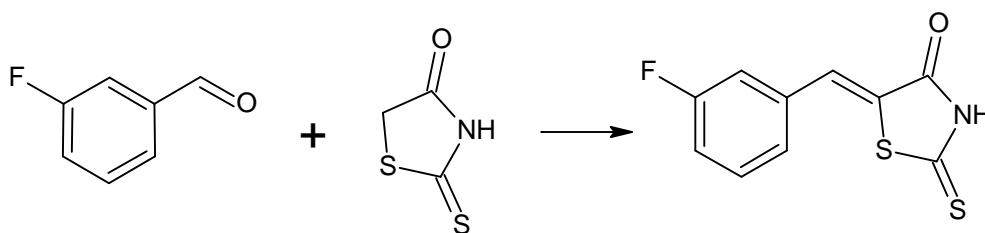
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	50,19	2,53	5,85	26,80
<b>Nájdené:</b>	50,00	2,51	5,87	26,74

IČ spektrum: (KBr) 3103 (NH); 1724 (C=O)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 13.83 (1H, bs, NH), 7.70 – 7.60 (2H, m, H2', H6'), 7.64 (1H, s overlapped, CH), 7.58 – 7.32 (2H, m, H3', H5')

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 195.8, 169.6, 163.2 (d, *J* = 251.7 Hz), 133.2 (d, *J* = 8.7 Hz), 130.7, 129.9 (d, *J* = 3.4 Hz), 125.4 (d, *J* = 2.9 Hz), 116.8 (d, *J* = 21.9 Hz)

#### 4.1.6. Príprava 5-(3-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 1,86 g (0,015mol) 3-fluórbenzaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čírej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Analyticky čistý produkt bol získaný kryštalizáciou z bezvodného etanolu.

Molekulová hmotnosť: 239,29

Výtťažok: 1,66 g (46 %)

Vzhľad: žlté hrudkovité kryštály

Teplota topenia: 199 – 200 °C (rozkl.)

Teplota topenia uvedená v literatúre<sup>43</sup>:

- 201 °C (Z-izomér, rozpúšťadlo nie je uvedené)

Elementárna analýza:

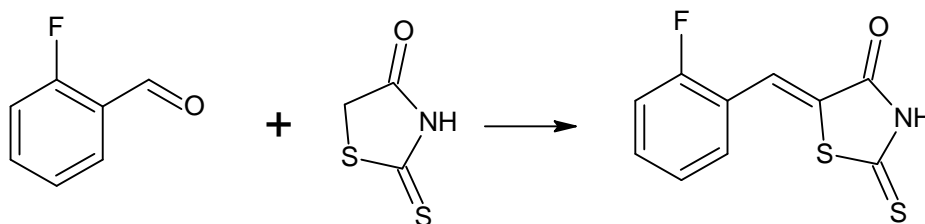
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	50,19	2,53	5,85	26,80
<b>Nájdené:</b>	50,36	2,72	6,05	26,31

IČ spektrum: (KBr) 3391, 3184 (NH); 1705 (C=O)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 13.88 (1H, bs, NH), 7.63 (1H, s, CH), 7.62 – 7.52 (1H, m, H6'), 7.48 – 7.29 (3H, m, H2', H4', H5')

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 195.6, 169.5, 162.5 (d, *J* = 245.3 Hz), 135.5 (d, *J* = 8.1 Hz), 131.7 (d, *J* = 8.7 Hz), 130.2 (d, *J* = 2.3 Hz), 127.4, 126.1 (d, *J* = 8.9 Hz), 117.7 (d, *J* = 21.4 Hz), 117.3 (d, *J* = 22.5 Hz)

#### 4.1.7. Príprava 5-(2-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 1,86 g (0,015mol) 2-fluórbenzaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čírej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50



ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Analyticky čistý produkt bol získaný kryštalizáciou z bezvodného etanolu.

Molekulová hmotnosť: 239,29

Výtťažok: 2,40 g (67 %)

Vzhľad: žlté ihličkovité kryštály

Teplota topenia: 201 – 203 °C (rozkl.)

Teploty topenia uvedené v literatúre<sup>43</sup>:

- 201 – 203 °C (Z-izomér, rozpúšťadlo nie je uvedené)
- 164,85 °C (Z-izomér, dimetylformamid)
- 165 °C (Z-izomér, etanol)

Elementárna analýza:

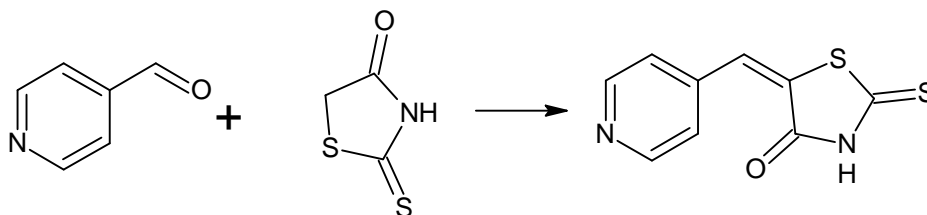
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	50,19	2,53	5,85	26,80
<b>Nájdené:</b>	50,27	2,70	6,11	26,42

IČ spektrum: (KBr) 3441, 3159 (NH); 1698 (C=O)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 13.91 (1H, bs, NH), 7.59 (1H, s, CH), 7.58 – 7.32 (4H, m, H3', H4', H5', H6')

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 195.6, 169.4, 160.8 (d, *J* = 252.3 Hz), 133.3 (d, *J* = 8.6 Hz), 129.6, 128.3, 125.8 (d, *J* = 3.5 Hz), 122.5 (d, *J* = 6.3 Hz), 121.1 (d, *J* = 11.5 Hz), 116.5 (d, *J* = 21.3 Hz)

#### 4.1.8. Príprava 5-(pyridín-4-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 1,61 g (0,015mol) pyridín-4-karbaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čírej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Produkt sa nerozpúšťal v etanole ani za varu, bol teda znovu odsatý a použitý pre analýzu.

Molekulová hmotnosť: 222,29

Výtťažok: 2,93 g (87 %)

Vzhľad: žltoranžová kryštalická látka

Teplota topenia: 320 – 322°C (rozkl.)

Teploty topenia uvedené v literatúre<sup>43</sup>:

- 320 – 322 °C (konfigurácia nie je uvedená, dimetylformamid)
- 295 – 305 °C (konfigurácia nie je uvedená, bután-2-ón)
- 279 °C (konfigurácia nie je uvedená, nitrobenzén)

Elementárna analýza:

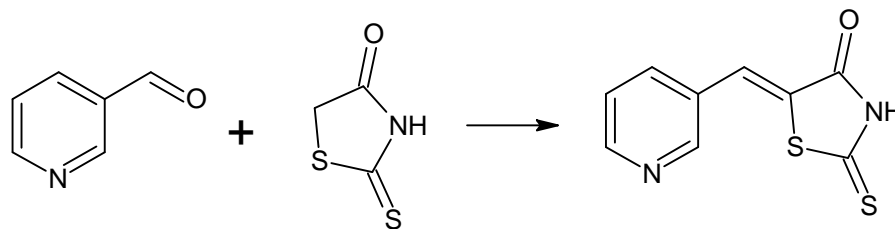
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	48,63	2,72	12,60	28,85
<b>Nájdené:</b>	48,53	3,22	12,68	29,12

IČ spektrum: (KBr) 3420 (NH); 1701 (C=O)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.74 - 8.68 (2H, m, H2', H6'), 7.55 (1H, s, CH), 7.54 – 7.50 (2H, m, H3', H5')

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) – nešlo zmerať kvôli zlej rozpustnosti

#### 4.1.9. Príprava 5-(pyridín-3-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 1,61 g (0,015mol) pyridín-3-karbaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čírej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Analyticky čistý produkt bol získaný kryštalizáciou z bezvodného etanolu.

Molekulová hmotnosť: 222,29

Výťažok: 2,28 g (68 %)

Vzhľad: žltá kryštalická látka

Teplota topenia: 309 – 313 °C (rozkl.)

Teploty topenia uvedené v literatúre<sup>43</sup>:

- 318 – 320 °C (konfigurácia nie je uvedená, dimetylformamid)
- 300 °C (konfigurácia nie je uvedená, vodná kys. octová)
- 285 – 288 °C (konfigurácia nie je uvedená, metanol)
- 295 °C (Z-izomér, etanol)

Elementárna analýza:

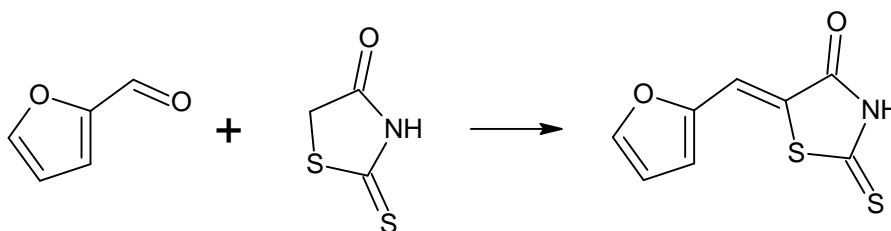
	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	48,63	2,72	12,60	28,85
<b>Nájdené:</b>	48,49	2,81	12,41	28,45

IČ spektrum: (KBr) 3431 (NH) ; 1709 (C=O)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  8.82 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H2), 8.62 (1H, dd,  $J = 4.8$  Hz,  $J = 1.9$  Hz, H6), 7.96 – 7.88 (1H, m, H4), 7.66 (1H, s CH), 8.62 (1H, dd,  $J = 4.8$  Hz,  $J = 1.9$  Hz, H5)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  195.5, 169.4, 151.9, 150.9, 136.5, 129.3, 128.3, 128.0, 124.5

#### 4.1.10. Príprava 5-(furán-2-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu



Zmes 1,44 g (0,015mol) furán-2-karboxaldehydu, 2,00 g (0,015mol) rodanínu a 15 ml etanolu sa zahreje k varu pod spätným chladičom. K čirej zmesi sa pridá 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a roztok z 1,0 g chloridu amónneho v 2 ml destilovanej vody zahriatej na 80 °C. Táto reakčná zmes bola zahrievaná k varu 2 hodiny. Po vychladnutí boli vylúčené kryštály odsaté a premyté najprv 50 ml destilovanej vody a potom 50 ml vodného etanolu (1:1, v/v). Po prekryštalizovaní v bezvodnom etanole bolo získaných 2,27 g (71%) látky (t.t. = 235 – 237 °C rozkl.), avšak získaný produkt bol zmesou dvoch látok.

Produkt bol preto ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou na silikagele 60 (0,063 – 0,200 nm) za použitia sústavy benzín-etylacetát 8:2.

Po zahustení frakcií obsahujúcich požadovaný produkt a kryštalizácii z bezvodného etanolu bol získaný analyticky čistý produkt.

Molekulová hmotnosť: 211,26

Výt'azok: 1,74 g (55 %)

Vzhľad: oranžová práškovaná látka

Teplota topenia: 235 – 237 °C (rozkl.)

Teploty topenia uvedené v literatúre<sup>43</sup>:

- 220 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)
- 232 – 233 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)

- 229 – 231 °C (konfigurácia nie je uvedená, etanol)
- 28,2 – 28,5 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)
- 232 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)
- 229 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)
- 236 – 237 °C (konfigurácia a rozpúšťadlo nie sú uvedené)
- 238 °C (Z-izomér, etanol)

Elementárna analýza:

	% C	% H	% N	% S
<b>Vypočítané:</b>	45,48	2,39	6,63	30,36
<b>Nájdené:</b>	45,44	2,48	6,43	30,44

ÍČ spektrum: (KBr) 3441, 3141 (NH); 1689 (C=O)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 13.67 (1H, bs, NH), 8.09 (1H, dd,  $J = 1.9$  Hz,  $J = 0.69$  Hz, H5), 7.47 (1H, s, CH), 7.16 (1H, dd,  $J = 3.6$  Hz,  $J = 0.6$  Hz, H3), 6.75 (1H, dd,  $J = 3.6$  Hz,  $J = 1.9$  Hz, H4)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 196.7, 169.2, 149.6, 148.5, 122.6, 120.1, 117.9, 114.1

## 4.2. Biologická časť

### 4.2.1. Hodnotenie antifungálnej aktivity

Antifungálna účinnosť pripravených derivátov rodanínov bola hodnotená na kmeňoch *Candida albicans* ATCC 44859 (**CA1**), *Candida tropicalis* 156 (**CT**), *Candida krusei* E28 (**CK2**), *Candida glabrata* 20/I (**CG**), *Trichosporon beigeli* 1188 (**TB**), *Aspergillus fumigatus* 231 (**AF**), *Absidia corymbifera* 272 (**AC**), *Trichophyton mentagrophytes* 445 (**TM**) mikrodilučnou bujónovou metódou. Kmene boli uchovávané na Sabouraudovom dextrózovom agare (SDA, Difco) pri

4 °C. Pred testovaním bol každý kmeň pasážovaný na SDA a inokulá boli pripravené suspendovaním kvasiniek, konídií alebo sporangiospór v sterilnom 0,85% fyziologickom roztoku. Hustota buniek bola pomocou Bürkerovej komôrky upravená tak, aby zásobná suspenzia obsahovala  $(1,0 \pm 0,2) \times 10^5$  CFU/ml. Konečné inokulum bolo pripravené zriedením zásobnej suspenzie testovacím médiom v pomere 1:20. Testované zlúčeniny boli rozpustené v DMSO. Ich antifungálna aktivita potom bola stanovená v tkanivovom kultivačnom médiu RPMI 1640 (Sevapharma), ktorého pH bolo upravené na hodnotu 7,0 pomocou 0,165 M 3-(*N*-morfolinyl)propansulfónovej kyseliny (Sigma). Konečná koncentrácia DMSO v testovacím médiu bola max. 1 % (v/v) a neovplyvňovala prirodzený rast húb. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC), definovaná ako koncentrácia vyvolávajúca 80% inhibíciu rastu v porovnaní s kontrolami, boli odpočítané po 24 a 48 hodinách (v prípade *T. mentagrophytes* po 48 a 72 hodinách) statickej kultivácie pri teplote 35 °C

Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 1. a č. 2.

Tabuľka 1. Antifungálna aktivita pripravených zlúčenín

KMEŇ		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC <sub>80</sub> (μmol/l)						
		4.1.1	4.1.2.	4.1.3.	4.1.4.	4.1.5.	AMP-B	FLU
CA	24h	>250	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>	0,002	0,82
	48h	>250	<b>250</b>	>125	<b>125</b>	<b>62,5</b>	0,068	1,63
CT	24h	>250	<b>125</b>	>125	<b>250</b>	>125	0,068	1,63
	48h	>250	<b>250</b>	>125	<b>250</b>	>125	0,068	> 417,90
CK	24h	>250	>250	>125	<b>250</b>	>125	0,135	52,24
	48h	>250	>250	>125	<b>500</b>	>125	0,135	104,47
CG	24h	>250	<b>125</b>	>125	<b>250</b>	>125	0,034	13,06
	48h	>250	<b>250</b>	>125	<b>250</b>	>125	0,135	52,24
TA	24h	>250	<b>125</b>	>125	<b>125</b>	>125	1,082	3,26
	48h	>250	>250	>125	<b>250</b>	>125	2,164	6,53
AF	24h	>250	<b>62,5</b>	>125	<b>125</b>	>125	0,271	> 417,90
	48h	>250	<b>250</b>	>125	<b>250</b>	>125	0,135	> 417,90
AC	24h	<b>125</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	1,082	> 417,90
	48h	>250	<b>62,5</b>	>125	<b>125</b>	<b>125</b>	2,164	> 417,90
TM	72h	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	1,082	26,12
	120h	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	1,082	52,24

Tabuľka 2. Antifungálna aktivita pripravených zlúčenín

KMEŇ		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC <sub>80</sub> (μmol/l)						
		4.1.6	4.1.7	4.1.8	4.1.9	4.1.10	AMP-B	FLU
CA	24h	<b>125</b>	<b>125</b>	>125	>125	<b>500</b>	0,002	0,82
	48h	<b>250</b>	<b>125</b>	>125	>125	<b>500</b>	0,068	1,63
CT	24h	<b>250</b>	<b>125</b>	>125	>125	>500	0,068	1,63
	48h	<b>250</b>	<b>125</b>	>125	>125	>500	0,068	> 417,90
CK	24h	<b>250</b>	>250	>125	>125	>500	0,135	52,24
	48h	<b>250</b>	>250	>125	>125	>500	0,135	104,47
CG	24h	<b>250</b>	>250	>125	>125	>500	0,034	13,06
	48h	<b>250</b>	>250	>125	>125	>500	0,135	52,24
TA	24h	<b>250</b>	<b>125</b>	>125	>125	<b>500</b>	1,082	3,26
	48h	<b>250</b>	<b>250</b>	>125	>125	<b>500</b>	2,164	6,53
AF	24h	<b>125</b>	<b>250</b>	>125	>125	<b>250</b>	0,271	> 417,90
	48h	<b>125</b>	<b>250</b>	>125	>125	<b>250</b>	0,135	> 417,90
AC	24h	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	>125	>125	<b>62,5</b>	1,082	> 417,90
	48h	<b>62,5</b>	<b>125</b>	>125	>125	<b>125</b>	2,164	> 417,90
TM	72h	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	>125	>125	<b>31,25</b>	1,082	26,12
	120h	<b>31,25</b>	<b>125</b>	>125	>125	<b>62,5</b>	1,082	52,24

#### 4.2.2. Hodnotenie antibakteriálnej aktivity

Antibakteriálna účinnosť pripravených derivátov rodanínov bola hodnotená na kmeňoch *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (**SA**), *Staphylococcus aureus* H 5996/08 **Meticilín** rezistentný (**MRSA**), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 (**SE**), *Enterococcus sp.* J 14365/08 (**EF**), *Escherichia coli* CCM4517 (**EC**), *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 (**KP**), *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 **ESBL** pozitívny (**KP-E**), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (**PA**) mikrodilučnou bujónovou metódou. Kmene boli uchovávané na Mueller-Hintonovom agare (Difco) pri 4 °C. Pred testovaním bol každý kmeň pasážovaný znovu na Mueller-Hintonovom agare (Difco) a inokulá boli pripravené suspendovaním v sterilnej vode. Hustota suspenzie bola pomocou denzitometra nastavená na 0,5 stupňa McFarlanda.

Testované zlúčeniny boli rozpustené v DMSO. Ich antibakteriálna aktivita potom bola stanovená v Mueller-Hintonovom bujóne (Difco), ktorého pH bolo 7,0. Konečná koncentrácia DMSO v testovacom médiu bola max. 1 % (v/v) a neovplyvňovala prirodzený rast baktérií. Minimálna inhibičná koncentrácia, definovaná ako koncentrácia vyvolávajúca 95% inhibíciu rastu v porovnaní s kontrolami, boli odčítané po 24 a 48 hodinách statickej kultivácie pri teplote 37 °C.

Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 3. a č. 4.

Tabuľka 3. Antibakteriálna aktivita pripravených zlúčenín

KMEŇ		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC <sub>95</sub> (μmol/l)				
		4.1.1	4.1.2	4.1.3	4.1.4	4.1.5
SA	24h	<b>15,62</b>	<b>3,9</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>
	48h	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>
MRSA	24h	<b>7,81</b>	<b>3,9</b>	<b>31,25</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>
	48h	<b>15,62</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>
SE	24h	<b>3,9</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>	>250
	48h	<b>15,62</b>	>250	<b>125</b>	<b>125</b>	>250
EF	24h	>250	<b>250</b>	>250	>125	>250
	48h	>250	>250	>250	>125	>250
EC	24h	>250	>250	>250	>125	>250
	48h	>250	>250	>250	>125	>250
KP	24h	>250	>250	>250	>125	>250
	48h	>250	>250	>250	>125	>250
KP-E	24h	>250	>250	>250	>125	>250
	48h	>250	>250	>250	>125	>250
PA	24h	>250	>250	>250	>125	>250
	48h	>250	>250	>250	>125	>250



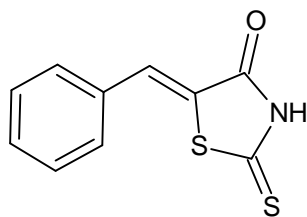
Tabuľka 4. Antibakteriálna aktivita pripravených zlúčenín

KMEŇ		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC <sub>95</sub> (μmol/l)				
		<i>4.1.6</i>	<i>4.1.7</i>	<i>4.1.8</i>	<i>4.1.9</i>	<i>4.1.10</i>
SA	24h	<b>62,5</b>	>250	>125	>125	<b>250</b>
	48h	<b>250</b>	>250	>125	>125	>250
MRSA	24h	<b>15,62</b>	>250	>125	>125	<b>250</b>
	48h	<b>15,62</b>	>250	>125	>125	<b>250</b>
SE	24h	<b>250</b>	>250	>125	>125	>250
	48h	>250	>250	>125	>125	>250
EF	24h	>250	>250	>125	>125	>250
	48h	>250	>250	>125	>125	>250
EC	24h	>250	>250	>125	>125	>250
	48h	>250	>250	>125	>125	>250
KP	24h	>250	>250	>125	>125	>250
	48h	>250	>250	>125	>125	>250
KP-E	24h	>250	>250	>125	>125	>250
	48h	>250	>250	>125	>125	>250
PA	24h	>250	>250	>125	>125	>250
	48h	>250	>250	>125	>125	>250

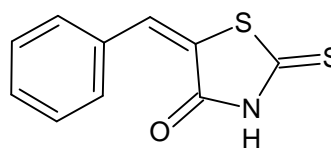
## 5. DISKUSIA

Ako už bolo uvedené v predchádzajúcich kapitolách moja diplomová práca je pokračovaním série prác zameraných na prípravu 5-arylalkylidénrodanínov.<sup>12, 13, 18, 22, 38</sup> Kondenzáciou rodanínov s aldehydmi vo vodnom alkoholickom roztoku za katalýzy  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$  som pripravila 10 produktov. Kondenzácia prebiehala bez problémov a s dobrými výťažkami. Charakterizácia produktov a overenie ich čistoty bolo vykonané bežnými metódami (elementárna analýza, IČ a NMR spektrá). Všetky mnou pripravené produkty boli už v minulosti popísané v literatúre.<sup>43</sup>

Benzylidénrodaníny môžu tvoriť *Z*- a *E*- izoméry.



***Z*-izomér**



***E*-izomér**

Podľa väčšiny literárnych údajov vzniká pri syntéze *Z*-izomér. Obe izomérmné formy sa dajú rozlíšiť na základe NMR spektier.  $^1\text{H}$ -NMR signály vodíkov metínovej skupiny *Z*-izomérov ležia pri vyšších hodnotách magnetického poľa než u *E*-izomérov.<sup>44, 45, 46</sup>

Hodnoty NMR signálov vodíkov metínovej skupiny pre rodanínové deriváty študované v tejto práci (kalkulované s využitím počítačového programu, nájdené v literatúre, stanovené experimentálne) sú uvedené v tabuľke č. 5.

Tabuľka 5. Porovnania <sup>1</sup>H NMR signálu vodíku metínovej skupiny

Zlúčenina	<i>E</i> -izomér	<i>Z</i> -izomér <sup>a</sup>	Publikované hodnoty	Experimentálna hodnota
4.1.1.	6,80 <sup>a</sup> 7,72 <sup>b</sup>	7,42 <sup>a</sup> 7,80 <sup>b</sup>	N	7,61
4.1.2.	7,07 <sup>a</sup> 7,99 <sup>b</sup>	7,69 <sup>a</sup> 8,07 <sup>b</sup>	N	7,70
4.1.3.	6,80 <sup>a</sup> 7,72 <sup>b</sup>	7,42 <sup>a</sup> 7,80 <sup>b</sup>	N	7,68
4.1.4.	7,07 <sup>a</sup> 7,99 <sup>b</sup>	7,69 <sup>a</sup> 8,07 <sup>b</sup>	N	7,74
4.1.5.	6,80 <sup>a</sup> 7,72 <sup>b</sup>	7,42 <sup>a</sup> 7,80 <sup>b</sup>	7,65 <sup>c</sup> 7,68 <sup>d</sup>	7,64
4.1.6.	6,80 <sup>a</sup> 7,72 <sup>b</sup>	7,42 <sup>a</sup> 7,80 <sup>b</sup>	N	7,63
4.1.7.	7,07 <sup>a</sup> 7,99 <sup>b</sup>	7,69 <sup>a</sup> 8,07 <sup>b</sup>	7,59 <sup>c</sup>	7,59
4.1.8.	6,78 <sup>a</sup> 7,70 <sup>b</sup>	7,40 <sup>a</sup> 7,78 <sup>b</sup>	7,58 <sup>c</sup>	7,55
4.1.9.	6,80 <sup>a</sup> 7,72 <sup>b</sup>	7,42 <sup>a</sup> 7,68 <sup>b</sup>	7,60 <sup>c</sup>	7,66
4.1.10.	6 <sup>a</sup> 7,64 <sup>b</sup>	7,42 <sup>a</sup> 7,37 <sup>b</sup>	N	7,47

<sup>a</sup>CS ChemOffice 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.); <sup>b</sup>CS ChemOffice 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.); <sup>c</sup>*Z*-izomér<sup>47</sup>; <sup>d</sup>*Z*-izomér<sup>48</sup>; e konfigurácia neuvedená<sup>49</sup>

Na základe experimentálne získaných <sup>1</sup>H-NMR posunov mnou pripravených produktov sa dá len konštatovať, že všetky zlúčeniny boli získané ako čisté izoméry. Dá sa predpokladať, že vo všetkých prípadoch sa jedná o *Z*-izomér, ale k definitívnemu rozhodnutiu by bolo nutné vykonať ďalšie experimenty, najlepšie rentgenografickú analýzu. Táto metóda je však finančne veľmi náročná a vyžaduje veľmi čisté kryštály.

U produktov získaných v mojej diplomovej práci bolo najprv vykonané hodnotenie antifungálnej aktivity. Testy boli uskutočnené na Katedre biologických a lekárskeho vied FaF UK v Hradci Králové. Z výsledkov uvedených v tabuľkách 1 a 2 vyplýva, že pripravené kondenzačné produkty rodanínu s aldehydmi nevykazujú v porovnaní s flukonazolom a amfotericínom B

významnejšiu antifungálnu aktivitu. Zaujímavá je však stredná účinnosť 2-Br- (4.1.2.), 2-Cl- (4.1.4.), 4-F- (4.1.5.), 3-F- (4.1.6.), 2-F- (4.1.7.) a furfurylidenderivátu (4.1.10.) voči *Absydia corymbifera*. Táto vláknitá huba je pomerne vzácnou príčinou oportúnnej infekcie známej ako zygomykóza alebo mukormykóza. U imunokomprimovaných pacientov býva táto choroba smrteľná, pretože existujú len dve klinicky využiteľné antimykotiká, na ktoré je pôvodca ochorenia citlivý (amfotericín B a posakonazol).<sup>50</sup> Antifungálne účinky rodanínových derivátov boli študované už v minulosti. Väčšinou sa však antimykotické účinnosti rodanínových derivátov popísaných v tejto diplomovej práci nedajú porovnať s aktivitou publikovanou pre analogické zlúčeniny, lebo v každej štúdií bola použitá iná metóda hodnotenia. Porovnateľná metodika bola použitá len v práci argentínskych a španielskych autorov.<sup>47</sup> Z testovaných zlúčenín boli najúčinnnejšie deriváty substituované v aldehydovej časti fluórom alebo trifluórmetylovou skupinou. Kondenzačné produkty rodanínu s pyridínkarbaldehydmi boli bez účinku. Porovnanie účinnosti voči *A. corymbifera* nie je žiaľ možné, pretože táto huba nebola do testovania zahrnutá.<sup>47</sup> Výsledky hodnotenia antifungálnej aktivity benzylidenrodanínov pripravených na Katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv boli už čiastočne publikované.<sup>40,</sup><sup>51</sup> Prezentovaný poster, na ktorom som sa podieľala ako spoluautorka, je prílohou 1 tejto diplomovej práce.

Nedávno bola na Katedre biologických a lekárskeho vied vyvinutá tiež metodika pre testovanie antibakteriálnej aktivity. Halogenované benzylidénrodaníny 4.1.1. – 4.1.6. boli účinné voči *Streptococcus aureus* a tiež voči meticilín-rezistentnej variante tohto druhu. MIC pre pozitívne kontroly bohužiaľ zatiaľ nie sú k dispozícii. O antibakteriálne pôsobiacich rodanínových derivátoch je podrobnejšie pojednávané v predchádzajúcich diplomových prácach.<sup>12, 13, 18, 22</sup>

V súčasnosti prebieha u mnou pripravených zlúčenín hodnotenie ich antimykobakteriálnej aktivity a hodnotenie vplyvu na fotosyntetické procesy.

## 6. ZÁVER

V rámci mojej diplomovej práce boli pripravené nasledujúce produkty:

- 5-(3-brómbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(2-brómbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(3-chlórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(2-chlórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(4-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(3-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(2-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(pyridín-4-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(pyridín-3-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón
- 5-(furan-2-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ón

Pripravené zlúčeniny boli podrobené antifungálnym a antibakteriálnym testom na Katedre biologických a lekárskech vied Farmaceutickej fakulty UK. Zlúčeniny nevykazujú významnú antifungálnu aktivitu. Zaujímavá je však stredná účinnosť 2-Br- (4.1.2.), 2-Cl- (4.1.4.), 4-F- (4.1.5.), 3-F- (4.1.6.), 2-F- (4.1.7.) a furfurylidenderivátu (4.1.10.) voči *Absydia corymbifera*. Halogenované benzylidénrodaniny 4.1.1. – 4.1.6. boli účinné voči *Streptococcus aureus* a tiež voči metecilín-rezistentnej variante tohto druhu. V súčasnosti prebieha hodnotenie antituberkulotickej účinnosti a stanovenie vplyvu na fotosyntetické procesy.

# 7.ABSTRAKT

Univerzita Karlová v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,  
Katedra farmaceutickej chémie a kontroly liečiv

Diplomová práca

## Deriváty rodanínu ako potenciálne liečiva III.

Stanislava Kalafutová

V tejto diplomovej práci je v prvej časti teórie rozobraná tuberkulóza ako choroba vrátane etiológie, patogenézy, delenia tuberkulóz a terapie. Druhá časť teórie je zameraná na potenciálne budúce antituberkuloticky pôsobiace látky. V tretej časti sú spomenuté ciele, na ktoré by sa mali zamerať nové antituberkulotiká a v štvrtej časti sú stručne zhrnuté súčasne používané látky v terapii tuberkulózy.

Experimentálna časť sa sústreďuje na syntézu nasledujúcich zlúčenín:

5-(3-brómbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(2-brómbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(3-chlórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(2-chlórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(4-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(3-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(2-fluórbenzylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(pyridín-4-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(pyridín-3-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu, 5-(furán-2-ylmetylidén)-2-tioxo-1,3-tiazolidín-4-ónu.

Tieto látky boli testované na antifungálnu a antibakteriálnu aktivitu.

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,  
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Diploma thesis

**Rhodanine derivatives as potential drugs III.**

Stanislava Kalafutová

In the first part of the diploma thesis there is generally written about different types of tuberculosis in the various aspects as ethiology, pathogenesis and pharamacotherapy. The second part is focused on the newly tested potential antituberculotic drugs. Especially in the third part there are mentioned different drug targets of these promising antituberculotics. Finally the fourth part of the theoretical introduction briefly summarizes currently used drugs in the treatment of this infectious disease.

The experimental work deals with number of synthesis of following compounds:

5-(3-bromobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(2-bromobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(3-chlorobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(2-chlorobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(4-fluorobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(3-fluorobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(2-fluorobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(pyridine-4-ylmethylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(pyridine-3-ylmethylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one, 5-(furane-2-ylmethylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one.

All synthesized compounds were tested for an antifungal and antibacterial activity in conclusion.

## **8. PRÍLOHY**



## 9. POUŽITÁ LITERATÚRA

- 
- <sup>1</sup> NENCKI, M.: Über die Einwirkung der Monochloressigsäure auf Sulfoeyansäure und ihre Salze. *J. Prakt. Chem.* 1877, 16, 1 – 17.
- <sup>2</sup> MADADI, N. E. *et al.*: 3-Aminorhodanine and 2-hydrazino-2-imidazoline hydrazones. Synthesis and antiparasitic pharmacology. *Boll. Chim. Farm.* 1991, 130, 124 – 127.
- <sup>3</sup> INAMORI, Y. *et al.*: Insecticidal and antifungal activities of aminorhodanine derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62, 1025 – 1027.
- <sup>4</sup> SILVA, A. A. R. *et al.*: Antiedematogenic activity of two thiazolidine derivatives: *N*-tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-rhodanine (GS26) and *N*-tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzylidene)-2,4-thiazolidinedione (GS28). *Chem. Pharm. Bull.* 2003, 51, 1351 – 1355.
- <sup>5</sup> DELANEY, E. M. *et al.*: *In vitro* photobiological evaluation of Rhodac, a new rhodacyanine photosensitizer. *Photochem. Photobiol.* 2001, 74, 331 – 338.
- <sup>6</sup> MISHRA, S., SRIVASTAVA S. K., SRIVASTAVA S. D.: Synthesis of 5-arylidene-2-aryl-3-(phenothiazino/benzotriazoloacetamidyl)-1,3-thiazolidine-4-ones as anti-inflammatory anticonvulsant analgesic and antimicrobial agents. *Indian J. Chem. Sect. B* 1997, 36, 826 – 830.
- <sup>7</sup> TAJIMA, H., KITAGAWA K., OHNO H.: Polypeptide of protein p140 and DNAs encoding it. *USA pat. US 5, 506, 205.* 1996-09-04. [cit. 2009-04-03]  
Dostupné z : <http://www.freepatentsonline.com/>
- <sup>8</sup> MARTIN, R. *et al.*: Preparation of phenylimino thiazolidine thiazolidinones and other heterocyclic modulators of nuclear receptors with therapeutic uses. *PCT Int. Appl. WO 2003060078* 2003-07-24; *Chem Abstr.* 2003, 139, 571107.
- <sup>9</sup> TERASHIMA, H. *et al.*: Effects of a new aldose reductase inhibitor on various tissues *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1984, 229, 226 – 230.

- 
- <sup>10</sup> BROWN, F. C. *et al.*: Mildew-preventing activity of rhodanine derivatives. *Ind. Eng. Chem.* 1954, 46, 1508 – 1512.
- <sup>11</sup> MALLICK, S. K., MARTIN A. R., LINGARD R. G.: Synthesis and antimicrobial evaluation of some 5-(5-nitrofurylidene)rhodanines, 5-(5-nitrofurylidene)thiazolidine-2,4-diones, and their vinylogs. *J. Med. Chem.* 1971, 14, 528 – 532.
- <sup>12</sup> DOLEŽEL, J.: Kondenzační produkty acetylpyrazinů s rhodaninem jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2004, 64 s.
- <sup>13</sup> KEŠETOVIČOVÁ, D.: Deriváty rhodaninu jako potenciální léčiva I. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2007, 66 s.
- <sup>14</sup> KLENER, P. *et al.*: Vnitřní lékařství. 3. přepracované a doplněné vydání. Galén, Praha, 2006, s. 380 – 386.
- <sup>15</sup> Global tuberculosis control – epidemiology, strategy, financing, WHO Report 2009, WHO/HTM/TB/2009.411[online]. © WHO 2009 [2009-05-15]. Dostupné z [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html)
- <sup>16</sup> TRIPATHI, R. P. *et al.*: Fighting tuberculosis: An old disease with new challenges. *Med. Res. Rev.* 2005, 25, 93 – 131.,
- <sup>17</sup> *Tuberculosis (TB)* [online]. © The Board of Trustees of the University of Illinois 2006 [cit. 2009-05-04]. Dostupné z <http://www.mckinley.uiuc.edu/Handouts/tuberculosis.html>
- <sup>18</sup> ŠPANINGEROVÁ, E.: Kondenzační produkty aldehydů s rhodaninem jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2006, 58 s.
- <sup>19</sup> *Textbook of bacteriology* [online]. © Kenneth Todar, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology 2006 [cit. 2009-05-04]. Dostupné z <http://www.textbookofbacteriology.net/>
- <sup>20</sup> JOGI, R., TYRING, S. K.: Therapy of nontuberculous mycobacterial infections. *Dermatol. Ther.* 2004, 17, 491 – 498.

- 
- <sup>21</sup> ZHANG, Y., POST-MARTENS, K., DENKIN, S.: New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discov. Today* 2006, 11, 21 – 27.
- <sup>22</sup> VLČKOVÁ, M.: Deriváty rhodaninu jako potenciální léčiva II. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2007, 54 s.
- <sup>23</sup> TOMIOKA, H.: Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. *Expert Opinion Drug Discov.* 2008, 3, 21 – 49.
- <sup>24</sup> NAYYAR, A., JAIN, R.: Recent advances in new structural classes of anti-tuberculosis agents. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 1873 – 1886.
- <sup>25</sup> STOVER, C. K. *et al.*: A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* 2000, 405, 962 – 966.
- <sup>26</sup> SINGH, R. *et al.*: PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science* 2008, 322, 1392 – 1395.
- <sup>27</sup> ANDRIES, K. *et al.*: A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2005, 307, 223 – 227.
- <sup>28</sup> KOUL, A., *et al.*: Diarylquinolines target subunit C of mycobacterial ATP synthase. *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 323 – 324.
- <sup>29</sup> LENAERTS, AJ. *et al.*: Location of persisting mycobacteria in the guinea-pig model of tuberculosis revealed by R207910. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51, 3338 – 3345.
- <sup>30</sup> FORTÚN, J., *et al.*: Linezolid for the treatment of multi-drug resistant tuberculosis. *J. Antimicrob Chemother* 2005, 56, 180 – 185.
- <sup>31</sup> AMARAL, L. *et al.*: Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother* 2001, 47, 505 – 511.
- <sup>32</sup> OPLETALOVÁ, V. *et al.*: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* 2002, 57, 135 – 144.
- <sup>33</sup> OPLETALOVÁ, V. *et al.*: Synthesis and Biological Evaluation of (*E*)-3-(Nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2006, 71, 44 – 58.

- 
- <sup>34</sup> CHLUPÁČOVÁ, M. *et al.*: Synthesis and Biological Evaluation of Some Ring-substituted (*E*)-3-Aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2005, 33, 31 – 43.
- <sup>35</sup> BIAVA, M. *et al.*: Antimycobacterial activity of new *ortho*-, *meta*- and *para*-toluidine derivatives. *Farmaco* 1999, 54, 721 – 727.
- <sup>36</sup> MA Y. *et al.*: Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 1407 – 1416.
- <sup>37</sup> STAINIER, C., LAPIERE, C. L.: Quelques dérivés de la rhodanine à action tuberculostatique in vitro. *Bull. Acad. R. Med. Belg.* 1958, 23, 335 – 345.
- <sup>38</sup> MAID, M. M.: Derivatives of rhodanine as potential antifungal and antimycobacterial drugs. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2007, 70 s.
- <sup>39</sup> Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility – TAACF [online]. © The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) 2004. [cit. 2009-05-08]. Dostupné z <http://www.taacf.org/>
- <sup>40</sup> PETRIK, P. *et al.*: Antifungal and antimycobacterial properties of 5-arylmethylidenerhodanines and their *N*<sup>3</sup>-substituted analogues. Book of Abstracts of the 5<sup>th</sup> International Postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics (IPORSIP – 2007), Istanbul, September 13 – 15, 2007. In: *Acta Pharmaceutica Scientia* 2007, 49 (Suppl.), 77.
- <sup>41</sup> MICKINNEY, J. D. *et al.*: Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 2000, 406, 735 – 738.
- <sup>42</sup> HARTL, J. *et al.*: Farmaceutická chemie IV. Karolinum, Praha, 2006, s. 99 – 100, 107 – 115, 119 – 124.
- <sup>43</sup> CrossFire Beilstein 2009/ 1 [databáze online]. Elsevier MDL [cit. 2009-05-11]. Dostupné z URL: <http://www.info.crossfirebeilstein.com/>

- 
- <sup>44</sup> KHODAIR, A. I.: A convenient synthesis of 2-arylidene-5*H*-thiazolo[2,3-*b*]quinazoline-3,5[2*H*]-diones and their benzoquinazoline derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* 2002, 39, 1153 – 1160.
- <sup>45</sup> OHISHI, Y. *et al.*: Preparations of 5-alkylmethylidene-3-carboxymethylrhodanine derivatives and their aldose reductase inhibitory activity. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, 1911 – 1919.
- <sup>46</sup> WHITESITT, C. A. *et al.*: Synthesis and structure-activity relationships of benzophenones as inhibitors of cathepsin D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 2157 – 2162.
- <sup>47</sup> SORTINO, M. *at al.*: Synthesis and antifungal activity of *Z*-5-arylidenerhodanines. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 484 – 494.
- <sup>48</sup> Kumar, B. R. P. *et al.*: Microwave induced synthesis of the thiazolidine-2,4-dione motif and efficient solvent free-solid phase parallel syntheses of 5-Benzylidene-2-thioxo-thiazolidine-4-one Compounds. *J. Heterocyclic Chem.* 2006, 43, 897 – 903.
- <sup>49</sup> LUO, J., YIQUN, L., MEIYUN, Z.: Condensation of aryl aldehydes with rhodanine in water media catalyzed by Tween 80. *Chemical Journal on Internet* 2006, 8(3), 1 – 4 [online]. © CJI1999 - 2009 [cit. 2009-04-20].  
Dostupné z URL: <http://www.chemistrymag.org/cji/2006/083017ne.htm>
- <sup>50</sup> SPELLBERG, B. EDWARDS, J. JR., IBRAHIM, A.: Novel Perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18, 556 – 569.
- <sup>51</sup> OPLETALOVÁ, V. *et al.*: Antifungální účinky benzylidenrhodaninů. Sborník 35. konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice, 12. – 15. září 2006, s. 120.