

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie



**Syntéza antibakteriálně aktivních
salicylanilidových esterů**

Diplomová práce

2013

Anwar Alabed

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

Na tomto místě bych velice rád poděkoval mým školitelům prof. RNDr. Jarmile Vinšové, CSc. a PharmDr. et Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D. za pomoc, cenné rady a odborné vedení při vzniku této práce. Dále děkuji celému kolektivu laboratoře za příjemné pracovní prostředí, přátelskou atmosféru a pomoc.

Anotace

Alabed, Anwar. *Syntéza antibakteriálně aktivních salicylanilidových esterů* Hradec Králové, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, 2013.

Diplomová práce se zabývá syntézou salicylanilidů a jejich esterů. Byly připraveny konkrétně *N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid a *N*-[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid a poté byla snaha připravit jejich estery v podobě isonikotinátů a pyrazinkarboxylátů za účelem rozšíření série salicylanilidových esterů pro studium vztahů mezi strukturou a antibakteriální aktivitou.

Práce shrnuje problematiku tuberkulózy, její léčby, vývoje, moderní léčby v preklinickém a klinickém stadiu, které mají potenciál k léčbě TBC. Velká část této práce se zabývá salicylanilidy, jejich potenciálem a problematikou.

Annotation

Alabed, Anwar. *Synthesis of salicylanilide esters with antibacterial activity* Hradec Králové, Faculty of Pharmacy, Charles University, 2013

This diploma thesis is concerned with synthesis of salicylanilides and their esters. Namely *N*-[4-Brom-3-(trifluormethyl)phenyl]-5chloro-2-hydroxybenzamide and *N*-[3,5 Bis(trifluormethyl)phenyl]-5-chloro-2-hydroxybenzamide were produced and then we tried to synthesize their esters as isonicotinates and pyrazincarboxylates to enlarge the series of salicylanilid esters for structure - antibacterial activity studies.

This thesis summarizes the problems with tuberculosis, its therapy, development and modern therapy in preclinic and clinic phase, which has potential to treat TBC. Most of this thesis is concerned with salicylanilides, their potential and problems.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Antituberkulóza	8
2.1.1	Vývoj	8
2.1.2	Moderní léčba TBC	9
2.1.3	Základy léčby TBC ⁴	12
2.1.4	Terapie multirezistentní TBC ⁴	12
2.1.5	Léčiva v preklinickém a klinickém stadiu ²	13
2.1.5.1	Linezolid	13
2.1.5.2	OPC-67683.....	14
2.1.5.3	SQ109 (.....	14
2.1.5.4	FAS20013	15
2.1.5.5	TMC207	15
2.1.5.6	PA-824	15
2.1.5.8	BM212 (XII) ²	16
2.1.6	Salicylanilidy	17
3	Cíl práce.....	32
4	Experimentální část.....	33
4.1	Obecné charakteristiky práce	33
4.1.1	Jednotlivé syntézy.....	34
5	Diskuse a závěr	44
6	Seznam zkratk	49
	Použitá literatura	50

1 Úvod

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění, jehož příčinou je *Mycobacterium tuberculosis* (MCTBC)¹. V současné době se zvýšil výskyt multilékově rezistentní tuberkulózy (multidrug-resistant tuberculosis; MDR-TBC), rezistentní proti isoniazidu (INH) a rifampicinu (RIF), které patří mezi nejúčinnější antituberkulotika vůči tuberkulóze. Nově je užíván termín XDR-TBC (extenzivně rezistentní tuberkulóza, extremely/extensively drug-resistant tuberculosis). Tento druh je kromě výše zmíněného rezistentní i vůči jakémukoliv fluorochinolonu a nejméně jednomu z injekčních léčiv druhé volby-amikacin, kanamycin².

Deriváty salicylanilidu (*N*-fenyl-2-hydroxybenzamid) mají široký potenciál a dobré biologické účinky především proti plísním, bakteriím a mykobakteriím.

Některé estery salicylanilidů vykazaly podobnou účinnost ve srovnání s INH a také některé estery salicylanilidových derivátů byly účinné in vitro při minimální inhibiční koncentraci (MIC) vůči MD-TBC a XDR-TBC.

2 Teoretická část

2.1 Antituberkulotika

Dnes se používají různé chemické struktury s rozdílnými mechanismy účinku proti nákaze vyvolané *Mycobacterium tuberculosis* popř. *M. avium*. V terapii se obvykle využívá kombinace tří až čtyř léčiv s rozdílnou strukturou a mechanismem účinku s cílem zabránit vzniku rezistence³.

2.1.1 Vývoj³

Vývoj antituberkulotik začal v roce 1882 po objevení bakterie *M. tuberculosis* Robertem Kochem. První pokusy léčby začaly při hledáním účinných látek jako silice, barviva, dezinfekční prostředky ze skupiny derivátů fenolu (kresoly). Byly zkoumány přírodní estery cyklopent-2-enylalkanových kyselin které byly použity pro léčbu lepry, ale proti tuberkulóze účinné nebyly. V roce 1921 byla proti tuberkulóze použita vakcína BCG (bacillus calmette guerin) která oslabila kmen mykobakterií.

Důležitým zdrojem nových léčiv byly syntetické skupiny látek. Mezi první syntetizované látky patří sulfony, konkrétně dapson (4,4'-diaminodifenylsulfon), který se i v současné době stále používá v léčbě lepry. Mechanismus účinku dapsonu je shodný se sulfonamidy. Kromě účinnosti vůči *M. tuberculosis* a *M. leprae* účinkuje i na jiné druhy protozoí (*Toxoplasma gondii*).

Mezi důležité látky, které byly připraveny jako meziproducty pro výrobu sulfonamidů, patří thiosemikarbazony. Řadíme sem thioacetazon, který se dodnes používá v chudých zemích, protože je finančně dostupný, jeho nevýhodou je však značná toxicita. Dalším z meziproductů thiosemikarbazonů je isoniazid, který se používá od roku 1952.

Druhá linie vývoje antimykobateriálních látek byla zaměřena na studium metabolismu mykobakterií. Při těchto studiích bylo zjištěno, že kyselina salicylová

zvyšuje příjem kyslíku mykobakteriemi. Nejúčinnější látka byla *p*-aminosalicylová kyselina, která se v dnešní době již moc nepoužívá.

Další studie zkoumaly vliv pyrazinamidu a potvrdily jeho účinnost (1952). V roce 1961 byl zaveden ethambutol. V osmdesátých letech se začaly jako antituberkulotika používat fluorované chinolony (ciprofloxacin). V polovině 20. století se začala používat přírodní antituberkulotika třetí generace. Do této skupiny patří aminoglykosidové antibiotikum streptomycin, který je stále používán jako antituberkulotikum. Poté byl objeven rifampicin, patřící do skupin ansamycinových antibiotik. Ve 21. století se vývoj nových antimykobakteriálních látek soustřeďuje na ovlivnění buněčné stěny a DNA bakterií.

2.1.2 Moderní léčba TBC ⁴

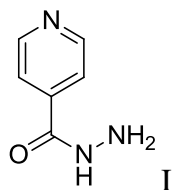
WHO rozdělila antituberkulotika do dvou skupin. Linie I zahrnuje vysoce efektivní látky, jejichž účinnost byla prokázána. Z linie I to jsou isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol. Linie II zahrnuje léky, které mají také vysokou účinnost, ale jsou toxičtější a využívají se při rezistenci na první linii. Do této skupiny patří ethionamid, cykloserin, kanamycin, amikacin, capreomycin, viomycin, thiacetazon, rifabutin a fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin).

Tabulka dávek antituberkulotik první linie podle WHO ⁴

Lék	Doporučené dávkování (rozmezí) v mg/kg			
	denní aplikace		3x týdně	
	Dávka (rozmezí)	Maximum (mg)	Dávka (rozmezí)	Maximum (mg)
isoniazid	5 (4-6)	300	10 (8-12)	900
rifampicin	10 (8-12)	600	10 (8-12)	600
pyrazinamid	25 (20-30)	-	35 (30-40)	-
streptomycin	15 (12-18)		15 (12-18)	1000
ethambutol	15 (15-20)	-	30 (25-35)	-

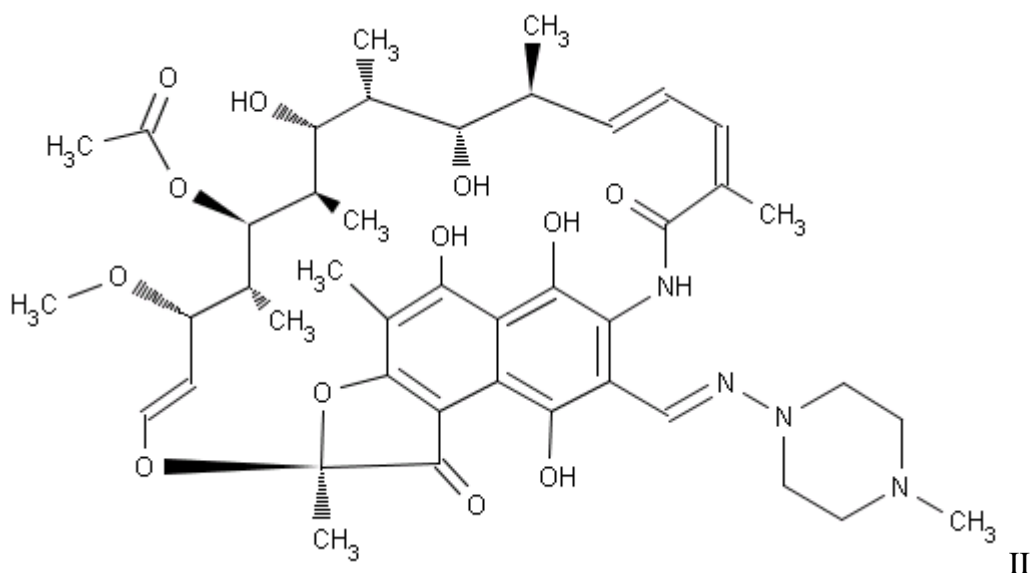
2.1.2.1 Isoniazid (INH)⁴ (I)

Mechanismus účinku isoniazidu spočívá především v blokaci syntézy kyseliny mykolové. Má silný baktericidní účinek. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je 0.25 μ g/L. INH je po perorálním podání absorbován až z 90%, rychle prostupuje do tkání a tělních tekutin, prochází hematoencefalickou bariérou. Hlavní nežádoucí účinky INH jsou neurotoxicita a hepatotoxicita.



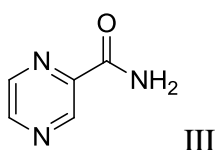
2.1.2.2 Rifampicin (RMP)(II)⁴

Rifampicin inhibuje transkripci mRNA. Má baktericidní účinek. MIC je v rozmezí 0,05-0,2 μ g/L. Rychle přechází do tkání a tělních tekutin. Má nižší nežádoucí účinky.



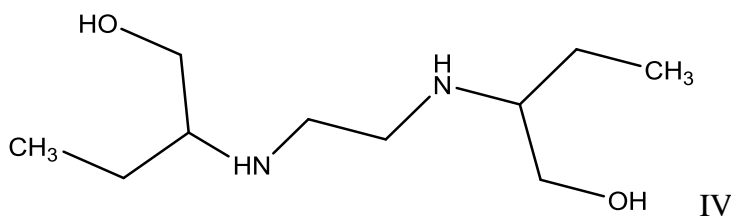
2.1.2.3 Pyrazinamid (PZ)(III)⁴

Mechanismus účinku pyrazinamidu je blokáce nikotinamidázy. V kyselém prostředí působí baktericidně. Optimální pH je 5,5. MIC v rozmezí 10-15 μ g/L. PZ se rychle vstřebává z gastrointestinálního traktu do tělních tekutin⁴. Mezi jeho nežádoucí účinky patří hepatotoxicita⁵.



2.1.2.4 Ethambutol (EMB)(IV) ⁴

Ethambutol působí bakteriostaticky inhibicí syntézy DNA mykobakterie. 80-85 % je absorbováno difuzí do tkání a tělních tekutin. Játerní eliminace je nízká. Je eliminován především ledvinami.



2.1.3 Základy léčby TBC ⁴

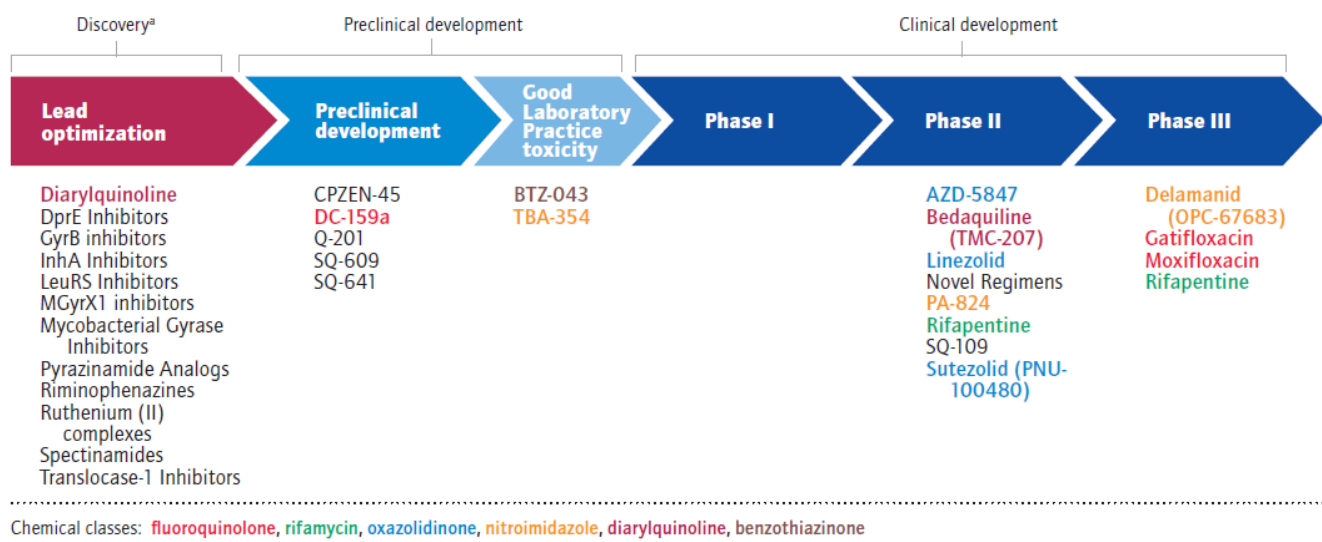
Pro úspěšnou terapii je nezbytné zvolit kombinační léčbu. Léčba probíhá ve dvou fázích. První je tzv. počáteční fáze, při níž se používá kombinace 3-4 léků po dobu 2 měsíců za účelem snížení replikačních schopností patogenů. Ve druhé fázi se používají dva léky. Tato fáze trvá 4 měsíce za účelem úspěšného odstranění patogenů. V pokročilé fázi se většinou používá kombinace isoniazidu a rifampicinu.

2.1.4 Terapie multirezistentní TBC ⁴

V současné době doporučuje WHO k terapii multirezistentní TBC kombinaci pyrazinamidu se čtyřmi dalšími léky: fluorochinolony třetí nebo čtvrté generace, prothionamid, terizidon a amikacin nebo kanamycin

2.1.5 Léčiva v preklinickém a klinickém stadiu ²

Tab.1 vývoje nových léčiv podle WHO ⁶



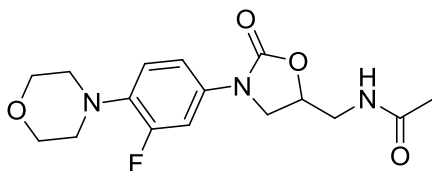
Podle tab.1 je sedm nových léčiv vůči TBC v II. fázi klinické studie (AZD-5847, linezolid, TMC-207, PA824, rifapentin, SQ-109, sutezolid) a další čtyři léčiva jsou v III. fázi klinické studii (OPC-67683, gatifloxacin, moxifloxacin, rifapentin).

Začátkem roku 2013 FDA schválila léčivo bedaquilin jako součást kombinované terapie multirezistentní plicní tuberkulózy ¹³.

Linezolid byl testován k léčbě XDR-TBC v dávce 600 mg / den v Korejské republice ⁶.

2.1.5.1 Linezolid (V)²

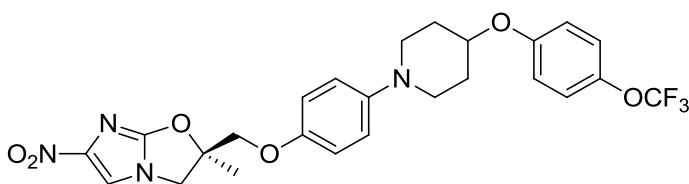
Je užíván v terapii infekcí způsobených multirezistentními bakteriemi. V České republice je dostupný pod názvem Zyvoxid. V terapii tuberkulózy se používá v dávce 600 mg až 2x denně. Mechanismus účinku je inaktivace 30S nebo 70S ribosomálního komplexu, čímž ovlivňuje syntézu proteinů.



V

2.1.5.2 OPC-67683 (VI)²

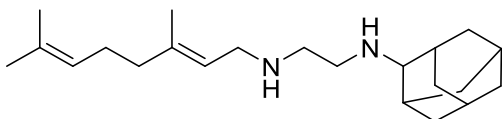
Má až 7x vyšší účinnost než obvykle užívaná antituberkulotika, jeho MIC proti *M. TBC* je v rozmezí 0,006- 0,024 $\mu\text{g/mL}$ *in vitro* vykazuje dobrou aktivitu vůči rezistentním a senzitivním TBC kmenům. Tato látka má dlouhý biologický poločas, není metabolizována enzymy CYP a její účinnost byla prokázána i u imunokompromitovaných myší. Díky těmto vlastnostem by mohla být používána u HIV pozitivních pacientů infikovaných tuberkulózou.



VI

2.1.5.3 SQ109 (VII)²

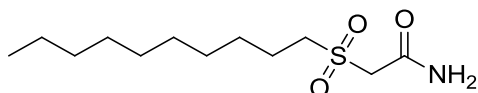
má velmi dobrou aktivitu vůči *M. TBC*. (MIC 0,16-0,64 $\mu\text{g/ml}$). SQ109 je pro léčivo, které je metabolizováno v játrech. Přesný mechanismus účinku není znám, pravděpodobně se jedná o zásah do biosyntézy buněčné stěny.



I

2.1.5.4 FAS20013 (VIII)²

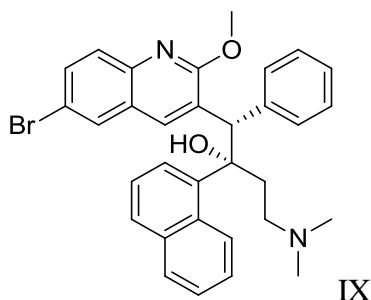
Působí v koncentracích 0,75 až 1,5 µg/ml. Pravděpodobně narušuje syntézu ATP a inhibuje syntézu mykolových kyselin. Je velmi výhodným antituberkulotikem působícím baktericidně na pomalu rostoucí bakterie.



II

2.1.5.5 TMC207 (IX)²

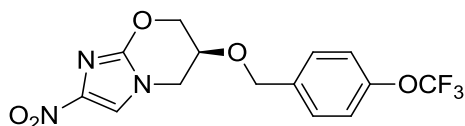
Je diarylchinolin od firmy Johnson & Johnson. Má dobré vlastnosti, hlavně vysokou účinnost proti rezistentním TBC kmenům. Díky dlouhému biologickému poločasu je podáván jednou týdně. Jeho mechanismem účinku je inhibice mykobakteriální ATP-synthasy.



IX

2.1.5.6 PA-824 (X)²

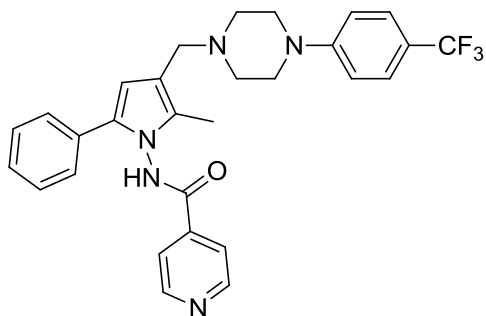
Inhibuje syntézu ketomykolových kyselin. Působí na mono- i multirezistentní kmeny *M. TBC* v koncentracích 0,015 – 0,25 µg/ml. Na rozdíl od běžných antituberkulotik vykazuje baktericidní aktivitu i vůči všem MDR i latentním kmenům.



X

2.1.5.7 Pyrrol LL-3858 (XI)²

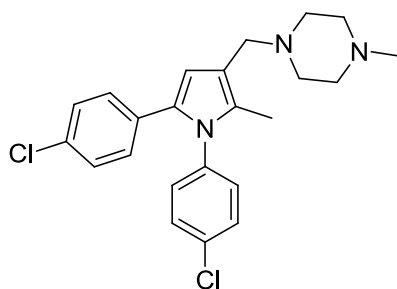
Je rostlinný alkaloid obsahující isoniazidovou část. Má baktericidní účinky jako INH v rozmezí MIC 0,025-0,12 µg/ml. Sloučenina má dobrou biodostupnost. Dávkování je jednou denně.



XI

2.1.5.8 BM212 (XII)²

Patří do skupiny pyrrolových derivátů. MIC je v rozmezí 0,7-1,5 µg/ml.



XII

2.1.6 Salicylanilidy

2.1.6.1 Mechanismus účinku salicylanilidů ⁷:

Mechanismus účinku je založen na inhibici dvousložkového regulačního systému bakteriální buňky. U všech druhů bakterií je přítomen dvousložkový regulační systém řídící transkripci několika genů. Dvousložkový regulační systém je složen z proteinu (histidin protein-kináza HPK) a protein vázající DNA.

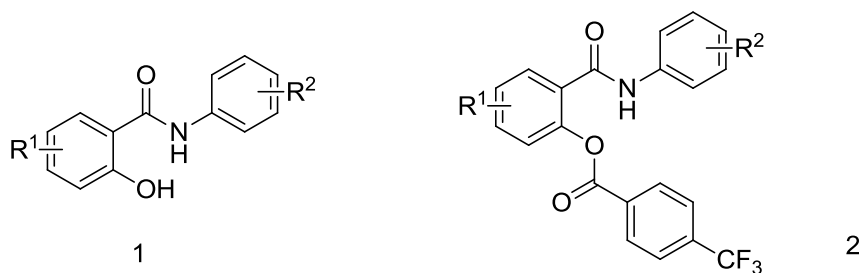
Regulační dvousložkový systém funguje tak, že pomocí kinázy dojde k rozpoznání a přenosu signálu z vnějšího prostředí dovnitř buňky. Kináza vyvolá katalýzu intercelulárního ATP k zachování histidinového zbytku. Fosfátová skupina kinázy je následně převedena na aspartátový zbytek v amino-konci přijímajících jednotek, jejichž funkcí je aktivace DNA. Inhibice regulačního systému bakterií by mohla být použita jako doplněk léčby v kombinaci s jinými baktericidními látkami.

2.1.6.2 Antifungální účinnost salicylanilidů a jejich esterů s 4-(trifluormethyl)benzoovou kyselinou ⁸

Salicylanilidy (2-hydroxy-*N*-fenybenzamidů) mají volnou fenolickou skupinu, která je nezbytná pro antimikrobiální účinek. Pro zlepšení biologické dostupnosti, propustnosti a snížení toxicity je často esterifikována. Důležitým poznatkem je zjištění, že estery salicylanilidů jsou účinnější proti vláknitým houbám než proti kmenům *Candida*. Na základě těchto poznatků byly syntetizovány nové série esterů salicylanilidů s 4-(trifluormethyl)benzoovou kyselinou, estery derivátů imidazolu s 3,4-(trifluormethyl)benzoovou kyselinou) a byl zkoušen a hodnocen jejich antimykotický potenciál proti kmenům *Candida* (C.).

In vitro byly zkoumány antimykotické vlastnosti 37 salicylanilidových derivátů, které byly testovány proti čtyřem *Candidovým* kmenům (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*).

Tab 2. Aktivita salicylanilidových derivátů vůči čtyřem kmenům *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*) a *Trichosporon asahii*



MIC/IC ₈₀ [μmol/L]													
kód	R ¹	R ²	clogP	<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>Trichosporon asahii</i>	
				24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
2a	4-Cl	3-Cl	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1b	4Cl	3-Cl	5.18	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125
2b	5-Cl	3-Cl	6.71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1c	5-Cl	4-Cl	5.50	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125
2c	4-Cl	4-Cl	6.68	62.5	□250	□250	□250	□250	□250	□250	□250	□250	□250
1d	4-Cl	4-Cl	4.83	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125
2d	5-Cl	4-Cl	6.37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1e	5-Cl	3,4-diCl	6.51	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125
2e	4-Cl	3,4-diCl	7.69	□500	□500	7.81	31.25	7.81	31.25	□500	□500	□500	□500
1f	4-Cl	3,4-diCl	5.84	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	3.9	15.62
2f	5-Cl	3,4-diCl	7.38	□125	□125	□125	□125	62.5	□125	□125	□125	31.25	□125
1g	5-Cl	3-Br	5.92	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	15.62	62.5
2g	4-Cl	3-Br	7.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1h	4-Cl	3-Br	5.25	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	1.95	62.5
2h	5-Cl	3-Br	6.87	□125	□500	□500	□500	125	250	□500	□500	62.5	250
1i	5-Cl	4-Br	5.88	□500	□500	□500	□500	□500	□500	□500	□500	3.9	3.9
2i	4-Cl	4-Br	7.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1j	4-Cl	4-Br	5.21	7.81	□125	□125	□125	7.81	□125	□125	□125	1.95	7.81

2j	5-Cl	4-Br	6.74	15.62	31.25	500	□500	31.25	62.5	500	□500	15.62	31.25
1k	5-Cl	3-F	5.20	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125
2k	4-Cl	3-F	6.37	250	□250	□250	□250	□250	□250	□250	□250	□250	□250
1l	4-Cl	3-F	4.53	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125	□125
2l	5-Cl	3-F	6.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

V této studii žádná z těchto sloučenin při koncentraci 125 $\mu\text{mol/L}$ neinhibovala *Candida glabrata*, zatímco u jiných kmenů inhibovala. Čtyři estery (2c,2h,2j,2r; viz. tab.2) a dva salicylanilidy (1j,1t, viz.Tab.2) inhibovaly růst *Candida albicans* až do koncentrace 500 $\mu\text{mol/L}$. Pouze ester 2e vykazoval inhibici růstu *C. tropicalis* při nízkých koncentracích.

C. krusei byla inhibována sedmi sloučeninami (2e, 2f, 2h, 1j, 2j, 2r, 1t, viz. tab.2) v koncentraci 7,81 $\mu\text{mol/L}$. Čtrnáct salicylanilidových derivátů inhibovalo kvasinky *Trichosporon asahii*, v rozmezí koncentrací 1,95-500 $\mu\text{mol/L}$. Žádný z těchto derivátů nedosahoval účinnosti flukonazolu proti *C. albicans*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*. Čtyři z těchto derivátů vykazovaly účinnost na *C. krusei* při koncentraci nižší než MIC flukonazolu. Čtyři deriváty překonaly účinnost flukonazolu proti *T. asahii* po 24 hodinách inkubace.

Byla očekávána vyšší účinnost salicylanilidových derivátů vůči plísním, avšak pouze dva estery inhibovaly růst *A. fumigatus* při koncentraci 15,62, 31,25 $\mu\text{mol/L}$ a sedmnáct sloučenin ovlivnilo *A. corymbifera* při koncentraci 3,9-500 $\mu\text{mol/L}$ (salicylanilidy 1a, 1b, 1c, 1f, 1g, 1i, 1J, 1o,1s,1t a pět esterů 2c, 2h, 2k, 2j , 2r, viz. Tab.2). Pouze jeden ester nevykazoval žádnou účinnost vůči *Trichophyton mentagrophytes*. Tento kmen je nejcitlivější při MIC 0,49 $\mu\text{mol/L}$.

Na základě srovnání MIC hodnot se zdá, že účinek proti *A. corymbifera* je fungicidní, na rozdíl od kmenů *Candida*

2.1.6.3 Hodnocení salicylanilidových benzoátů a jejich účinek proti rezistentním kmenům mykobakterií⁹

2.1.6.3.1 *In vitro* antimykobakteriální hodnocení

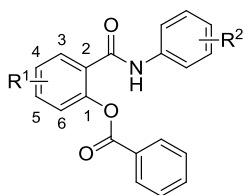
Kmen *M. avium* měl ze zkoumaných kmenů nejnižší citlivost. Substituované deriváty anilinu: 3-chlor, 4-brom a 4-trifluormethyl měly dobrý účinek. Naopak u 3-fluorderivátů byl účinek minimální. Dvě sloučeniny odvozené od 5-chlorsalicylové kyseliny vykazovaly vyšší účinek než sloučeniny odvozené od 4-chlorsalicylové kyseliny.

Proti *M. kansasii* byly výhodnější substituované deriváty anilinu s 4-trifluormethyl, 3-trifluormethyl, 3,4-dichlor a 4-bromem. Esterifikovaný 5-chlor-2-hydroxy-*N*-fenybenzamid nebyl účinný proti *M. kansasii*.

Nejúčinnější derivát salicylanilidových benzoátů byl 4-chlor-2-[4(trifluoromethyl)fenylkarbamoyl]fenyl-benzoát, který vykazoval podobnou aktivitu ve srovnání s INH. U všech derivátů byla vysoká účinnost proti kmenům *M. avium* a *M. kansasii* (0.25–1 $\mu\text{mol/L}$). Salicylanilidové benzoáty, které byly zkoumány, měly nižší nebo shodnou hodnotu MIC ve srovnání s acetáty a benzensulfonáty. *N*-Acetyl-L-fenylalanin salicylanilidový ester měl výbornou účinnosti proti kmenům *M. tuberculosis*, ale horší účinek proti *M. avium*.

Závěrem lze říci, že zavedení benzoylu do salicylanilidu vedlo ke zvýšení účinnosti proti čtyřem kmenům mykobakterií.

2.1.6.3.2 *In vitro* účinnost proti kmenům tuberkulózy



Tab 3

	R ¹	R ²	MIC [μmol/L]									
			<i>M. tuberculosis</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
			14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
1a	4-Cl	3-Cl	2	2	4	8	2	4	8	4	4	8
1b	5-Cl	3-Cl	4	4	8	8	2	4	4	4	4	8
1c	4-Cl	4-Cl	4	4	8	16	4	8	8	4	8	8
1d	5-Cl	4-Cl	2	4	4	4	2	2	4	2	2	4
1e	4-Cl	3-Br	2	2	8	16	2	4	8	2	4	8
1f	5-Cl	3-Br	4	4	4	8	2	4	4	2	4	4
1g	4-Cl	4-Br	2	2	4	8	2	4	4	2	4	4
1h	5-Cl	4-Br	2	2	4	4	2	4	4	2	4	4
1i	4-Cl	3-F	4	4	8	16	2	4	8	2	4	4
1j	5-Cl	3-F	4	8	8	16	2	8	8	2	4	8
1k	4-Cl	4-F	4	4	8	16	2	8	8	2	4	4
1l	5-Cl	4-F	8	8	4	8	2	4	8	4	8	8
1m	4-Cl	3,4-diCl	1	1	8	8	2	4	4	1	2	2
1n	5-Cl	3,4-diCl	2	2	8	8	1	2	4	1	2	4
1o	4-Cl	4-CF ₃	0.5	1	4	4	1	1	1	2	2	2
1p	5-Cl	4-CF ₃	2	2	8	8	1	2	4	1	2	4
1q	4-Cl	3-CF ₃	2	2	8	16	2	4	4	2	4	4
1r	4-Br	4-CF ₃	1	1	4	4	2	2	2	2	2	2
INH	-	-	0.5-1	0.5-1	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4-8
PAS	-	-	62.5	62.5	32	125	125	1000	>1000	32	125	500
BA	-	-	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	250	1000	1000

Nejlepší hodnoty jsou uvedeny tučně; INH: isoniazid; PAS: *para*-aminosalicylová kyselina
BA: benzoová kyselina.

Čtyři estery salicylanilidových benzoátů (1m, 1n, 1o and 1r, viz tab. 3) byly zkoumány *in vitro* proti pěti MDR-TBC kmenům a jednomu kmeni XDR-TBC (extenzivně rezistentní tuberkulóza). Všechny čtyři deriváty měly velmi nízké MIC (0,25-2 $\mu\text{mol/L}$). 4-Trifluormethylderivát byl z těchto testovaných sloučenin nejúčinnější. Deriváty 5-chlorsalicylové kyseliny měly *in vitro* lepší účinnosti než deriváty 5-bromsalicylové kyseliny. Salicylanilidové benzoáty vykazovaly vyšší účinnost než salicylanilidové estery s *N*-acetyl-L-fenylalaninem a podobné nebo o něco lepší hodnoty MIC ve srovnání s karbamáty.

Tab 4

	MIC [$\mu\text{mol/L}$]											
	<i>M. tuberculosis</i> 234/2005		<i>M. tuberculosis</i> 53/2009		<i>M. tuberculosis</i> Praha 1		<i>M. tuberculosis</i> Praha 131		<i>M. tuberculosis</i> 7357/1998		<i>M. tuberculosis</i> 9449/2006	
	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d
1m	0.25	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5	1
1n	0.25	0.5	1	2	1	1	0.5	1	0.5	1	2	2
1o	0.25	0.25	0.5	1	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5
1r	0.5	0.5	1	2	1	1	0.5	1	0.25	0.5	1	1
INH	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	58.3	58.3

Nejlepší hodnoty MIC jsou uvedeny tučně. INH: isoniazid. MDR-TB kmeny: 357/2005 a 7357/1998 (resistentní na INH, RIF, rifabutin, streptomycin, ethambutol a ofloxacin); 53/2009 (resistentní na INH, RIF, rifabutin, streptomycin, ethambutol); Praha 1 (resistentní na INH, RIF, rifabutin, streptomycin, ethambutol a clofazimin) a 9449/2006 (resistentní na INH, RIF, rifabutin a streptomycin); XDR-TB kmen: Praha 131 (resistentní na INH, RIF, rifabutin, streptomycin, ethambutol, ofloxacin, gentamicin a amikacin).

2.1.6.4 Blokáda *Mycobacterium tuberculosis* salicylanilidovými deriváty prostřednictvím inhibice isocitrát lyasy a methionin aminopeptidasy¹⁰

Isocitrát lyasa (ICL) u *M. tuberculosis* je nezbytným enzymem pro metabolismus mastných kyselin. Narušením genu ICL dojde k oslabení růstu bakterie bez ovlivnění růstu bakterií během akutní fáze infekce. ICL má dvě izoformy (ICL1 a ICL2). Narušení ICL1 nebo ICL2 genů mělo malý účinek na růst bakterií. Narušení obou genů ovlivnilo úplně intracelulární replikaci a způsobilo rychlé odstranění *M. tuberculosis* z plic.

In vitro byla pozorována aktivita salicylanilidových benzoátů a pyrazin-2-karboxylátů vůči *Mycobacterium tuberculosis* (MIC je v 0.5 $\mu\text{mol/L}$). 19 z nich bylo testováno jako inhibitory mykobakteriálních enzymů, methionin aminopeptidasy a isocitrát lyasy, které jsou nezbytné pro růst bakterie v latentní fázi. Salicylanilidy působí jako inhibitory methionin aminopeptidasy a též ovlivňují i funkci mykobakteriální isocitrát lyasy. 4-Brom-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenylpyrazin-2-karboxylát byl nejúčinnější inhibitor mykobakteriální methionin aminopeptidasy (41% inhibice při 10 $\mu\text{mol/L}$) 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid a 4-chloro-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenylpyrazin-2-karboxylát působil až 59% inhibici isocitrát lyasy při koncentraci 100 mmol/L . 4-Brom-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenyl-2-acetamido-3-fenylpropanoát inhiboval 22% při 10 $\mu\text{mol/L}$.

U bakterií je syntéza proteinů zahájena *N*-formylmethioninem. Odstranění koncové části *N*-methioninu je potenciální cíl účinku proti *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* má dva izomery, enzymy MtMetAP1a a MtMetAP1c. Tyto dva enzymy mohou hrát důležitou roli v různých fázích růstu *M. tuberculosis*. Oba enzymy MtMetAP jsou potenciálními cíli při vývoji nových antibiotik, včetně antimykobakteriálních látek.

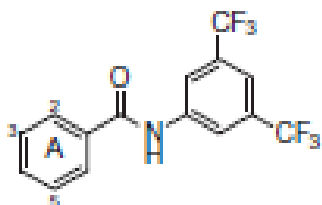
Peptidodeformylasa katalyzuje odstranění *N*-formylové skupiny z *N*-formylmethioninu před nástupem methionin aminopeptidasy. Methionin aminopeptidasa je nezbytný klíčový enzym katalyzující klíčový krok pro posttranslační

modifikace nově vznikajících proteinů tím, že odstraní *N*-terminální methionin. Methionin aminopeptidasa je nezbytná pro životaschopnost buněk.

2.1.6.5 Vztah mezi strukturou a biologickou účinností antituberkulotických salicylanilidů ¹¹

2.1.6.5.1 SAR (vztah mezi účinkem a strukturou) aromatických jader 5-chlorsalicylanilidů:

Tab 5



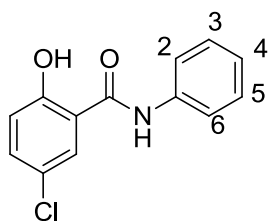
	2	3	5	MIC(μmol)	IC ₅₀ (μmol)
1	OH	H	Cl	3,1	5,2
2	OH	H	H	>>6,3-13	12
3	H	Cl	H	>50	>60
4	H	H	H	>50	
5	OH	H	1-Pyrol	3,1	3,1
6	OH	H	CH ₃	6,3-13	5,4
7	OH	H	F	3,1	2,5
8	OH	H	Br	6,3	4,9
9	OH	H	I	6,3	5,6
10	OH	H	OMe	6,3	7,7
11	OH	Cl	Cl	6,3 -13	>60
12	OH	OH	H	13	1,7
13	OH	H	NO ₂	50->50	>60
14	OAc	H	Cl	1,6-3,1	>60
15	OMe	H	Cl	>50	>60
16	NH ₂	H	Cl	>50	>60
17	Cl	H	H	>50	1,7

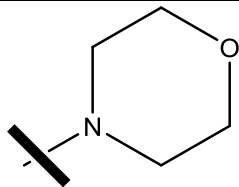
U nesubstituovaných aromatických jader salicylanilidů, byla při odstranění 5-chlor substituentu (**2** viz Tab 5) pozorována 2 až 4x nižší účinnost. Při odstranění 2-hydroxyskupiny (**3**) byla zcela zrušena účinnost salicylanilidů.

Náhrada v páté poloze jinými halogeny (fluor, **7**; brom, **8**; nebo jod, **9**) měla za následek menší změny, než se předpokládalo. Neočekávaný výsledek při zachování účinnosti salicylanilidů byl objeven při substituci v páté poloze methoxy skupinou (**10**).

Pro snížení toxicity byla provedena acetylace do polohy 2 (**14**). Methylace (**15**) nebo benzylace (**16**) fenolu měla za následek ztrátu účinnosti.

Tab 6



	2	3	4	5	6	MIC(μ mol)	IC ₅₀ (μ mol)
18	H	CF ₃	H	CF ₃	H	3.1	5.2
19	H	H	H	H	H	13 25	22
20	H	CF ₃	H	H	H	316.3	5.9
21	CF ₃	H	H	H	H	13 25	19
22	H	H	CF ₃	H	H	1.6 3.1	2.8
23	H	CF ₃	CF ₃	H	H	0.8 1.6	4.9
24	CF ₃	CF ₃	H	H	H	6.3 13	8.1
25	CF ₃	H	H	CF ₃	H	3.1	6.6
26	SO ₂ Ph	H	H	H	H	□50	□60
27	H	F	H	H	H	6.3 13	15
28	H	Br	H	H	H	6.3 13	5.7
29	H	CN	H	H	H	25 50	10
30	H	COH	H	H	H	50	□60
31	H	CO ₂ Et	H	H	H	13	17
32	H	CONH ₂	H	H	H	□50	□60
33	H	CONHPh	H	H	H	□50	□60
34	H	H	F	H	H	13 25	17
35	H	H	OCF ₃	H	H	3.1 6.3	7.3
36	H	H	CN	H	H	13 25	11
37	H	H	OPh	H	H	13	43
38	H	H	t-butyl	H	H	13 25	19
39	H	H	OMe	H	H	□50	□60
40	H	H		H	H	□50	N.D
41	H	H	CONH ₂	H	H	□50	□60

42	H	H	CONHPh	H	H	□50	□60
43	H	H	SO ₂ NHPh	H	H	□50	□60
44	Me	CF ₃	H	H	H	3.1-6.3	8.0
45	F	CF ₃	H	H	H	3.1-6.3	5.3
46	F	F	H	H	H	13	13
47	CF ₃	H	F	H	H	6.3-13	13
48	CF ₃	H	Br	H	H	6.3-13	11
49	Cl	H	CF ₃	H	H	0.8-1.6	2.4
50	F	H	F	H	H	13	8.5
51	Br	H	H	CF ₃	H	0.8-1.6	2.9
52	H	F	F	F	H	1.6	4.7
53	H	Cl	Cl	Cl	H	1.6	5.4
54	H	F	Br	F	H	1.6-3.1	4.3
55	H	CF ₃	Me	CF ₃	H	0,8	□1.9
56	F	F	F	H	H	6.3	6.7
57	F	H	F	F	H	3.1-6.3	6.2

2.1.6.5.2 SAR aromatických jader 3,5-bis(trifluormethyl)salicylanilidů ¹¹

Odstranění jedné z trifluormethylových skupin z anilinové částí (**18** viz Tab 6), mělo nepatrný vliv na účinnost salicylanilidů, zatímco odstraněním obou trifluormethylových skupin účinnost klesla 4-6x (**19**). Změnou jedné pozice trifluormethylu, který je vázaný na původní anilinové částí z *meta* do *ortho* polohy došlo ke snížení účinnosti 4-8x (**21**), zatímco posunem trifluormethylu do *para* polohy došlo ke zvýšení účinku (**22**). U substituovaných 3,4 (**23**) a 3,5 (**18**) bis(trifluormethyl) sloučenin bylo zjištěno, že nejúčinnější sloučenina je 3,4 bis(trifluormethyl), má MIC v rozmezí 0,8-1,6 $\mu\text{mol/L}$.

Meta poloha salicylanilidu byla vhodnější s halogeny (fluor, **27**; brom, **28**), u nichž byla zaznamenána účinnost, zatímco u nitrilové skupiny (**29**), kyseliny (**30**), ethylesteru (**31**), nesubstituovaných (**32**) a substituovaných amidů (**33**) byla postrádána účinnost. Při *para* substituci salicylanilidu (kyano (**36**), fenoxo (**37**), *terc*-butyl (**38**)) byla objevena slabá aktivita, zatímco u *para*-[methoxy (**39**), morfolino (**40**), karboxyamido (**41**), fenyلكarboxyamido (**42**), a fenylsulfonamido (**43**)] postrádána účinnost. Výměna u 2,3 disubstituovaných salicylanilidů za fluor měla za následek snížení účinnosti (**46**). 2,4 disubstituované salicylanilidy přinesly účinnější sloučeniny jako 2-chlor-4-trifluormethylderivát (**49**), který ukázal MIC v rozmezí 0,8-1,6 μmol . Naproti tomu u 2,4-difluorderivátu byla účinnost nejslabší (**50**). 2,5 Disubstituované salicylanilidy také přinesly některé silně účinné sloučeniny s 2-brom, 5-trifluormethylem (**51**). Dále byla zkoumána řada trisubstituovaných analogů 3,4,5-trifluor (**52**), 3,4,5-trichlor (**53**) a 3,5-difluor-4-brom (**54**), všechny měly stejnou účinnost jako u dihalogenových analogů. Zavádění methylové skupiny do *ortho* polohy nepřineslo žádný účinek. Při zavádění methylové skupiny do *para* polohy došlo k mírnému zlepšení účinnosti (**55**). 2,4,5-Trifluorovaný analog (**57**) měl účinnost podobnou jako 3,4-difluorovaný analog. 2,3,4-Trifluorovaný analog (**56**) měl lepší účinnost.

3 Cíl práce

V poslední době se rozšířila závažná MDR-TBC, odolná proti antituberkulotikům první linie INH a RIF. XDR-TBC je odolná navíc vůči ještě fluorochinolům. Rezistentní formy tuberkulózy byly zaznamenány ve více než 45 zemích světa. Na základě této skutečnosti začal vývoj nových léčiv s novým mechanismem účinku.

V současné době probíhá na Katedře anorganické a organické chemie vývoj léčiv ze skupiny derivátů salicylanilidů. Salicylanilidy mají široký potenciál a dobré biologické účinky proti plísním, bakteriím a mykobakteriím.

Esterifikací salicylanilidů vzniká proléčivo, které má lepší biologickou dostupnost, absorpci z trávicího traktu, fyzikálně chemické vlastnosti a sníženou toxicitu.

Některé estery salicylanilidů vykazují podobnou účinnost ve srovnání s INH.

Cílem této práce byla syntéza dvou salicylanilidů: *N*-[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-5chlor-2-hydroxybenzamid a *N*-[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid a čtyř esterů: 2-{[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-isonikotinát, 2-{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-isonikotinát, 2{[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát a 2{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát.

4 Experimentální část

4.1 Obecné charakteristiky práce

Použité chemikálie a rozpouštědla byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich a Penta Chemicals

Průběh chemických reakcí a čistota krystalických látek byla kontrolována za použití tenkovrstvé chromatografie (TLC), desky byly protažené 0.2mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck. Jako mobilní fáze byla používána soustava toluen:ethyl-acetát v poměru 4:1.

U syntetizovaných produktů byla stanovena teplota tání za pomoci přístroje „Melting Point Machine B-540“ od firmy Büchi.

Infračervená spektra produktů byla měřena paní Ivou Vencovskou na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK za pomoci spektrofotometru Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

NMR spektra byla měřena panem doc. PharmDr. Jiřím Kunešem CSc. na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK za použití rozpouštědla dimethylsulfoxidu (DMSO) při laboratorní teplotě na přístroji Varian Mercury Vxbb 300 (300 MHz pro ^1H a 75,5 pro ^{13}C) nebo Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C).

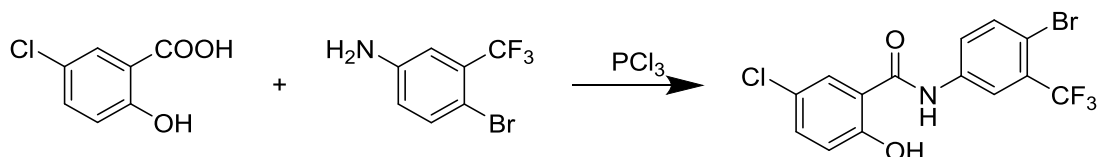
Reakce probíhala za stálého míchání v mikrovlnném reaktoru MicroSYNTH Milestone (530 W, 600 rpm).

Chemické vzorce byly vytvořeny v programu ChemBioDraw Ultra.

4.1.1 Jednotlivé syntézy

N-[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid

Reakční schéma:



Sumární vzorec: C₁₄H₈BrClF₃NO₂

Molekulová hmotnost: 392,94

Pracovní postup:

Bylo smícháno 1,73 g (0,01 mol) 5-chlorsalicylové kyseliny s 2,29 g (0,01 mol) 4-brom-3-(trifluormethyl)anilinu v 50 ml chlorbenzenu. Ke směsi bylo přidáno 0,44 ml (0,01 mol) chloridu fosforitého. Směs byla podrobena reakci v mikrovlnném reaktoru 22 minut při nastavení TEMP1=100 °C, TEMP=120 °C a výkonu 450 W. Poté byla směs za horka přefiltrována a vložena do lednice. V následujícím kroku bylo ze směsi odpařeno rozpouštědlo za pomoci rotační vakuové odpary. Surový produkt byl krystalizován v soustavě ethanol-voda (2:1). Čistota produktu byla monitorována pomocí tenkovrstvé chromatografie (toluen:ethyl-acetát 4:1). Reakce byla opakována šestkrát.

Teoretický výtěžek: 3,92 g

Výtěžek: 2,80 g (71,42 %); 2,6 g (66,32%); 2,4 g (61,24%); 2,4 g (61,31%); 2,9 g (73,97%); 2,8 g (71,42%)

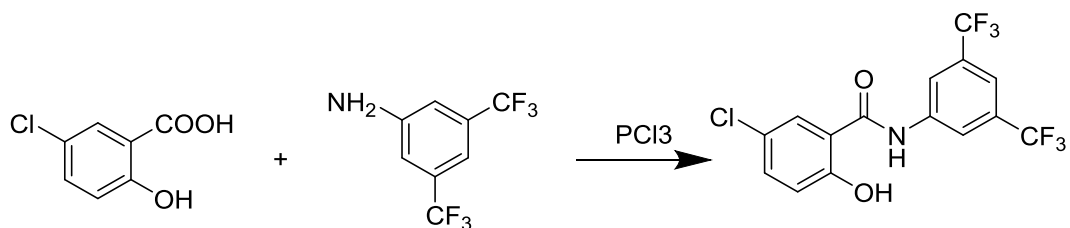
teplota tání: 237-238 °C

Toluen:ethyl-acetát 4:1

RF=0,84

N-[3,5-*Bis*(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid

Reakční schéma:



Sumární vzorec: C₁₅H₈ClF₆NO₂

Molekulová hmotnost: 383,67

Pracovní postup:

Bylo smícháno 1,73 g (0,01 mol) 5-chlorsalicylové kyseliny s 2,40 g (0,01 mol) 3,5-bis(trifluormethyl)anilinem a rozpuštěno v 50 ml chlorbenzenu. Ke směsi bylo přidáno 0,44 ml (0,01 mol) chloridu fosforitého. Směs byla zahřívána v mikrovlnném reaktoru 22 minut při nastavení TEMP1=100 °C, TEMP=120 °C a výkonu 450 W. Poté byla směs za horka přefiltrována a následně uložena do lednice. V následujícím kroku bylo ze směsi odpařeno rozpouštědlo za pomoci rotační vakuové odparky. Vzniklé krystaly byly následně rekrystalizovány v soustavě etanol-voda (2:1). Čistota produktu byla monitorována pomocí tenkovrstvé chromatografie (toluen:ethyl-acetát 4:1). Reakce byla opakována pětkrát.

Teoretický výtěžek: 3,83g

Výtěžek: 2,5 g (65,27 %); 2,6 g (67,88); 2,8 g (73,10%); 2,5 g (65,27 %); 2,4 g (62,66)

Teplota tání: 169-170 °C

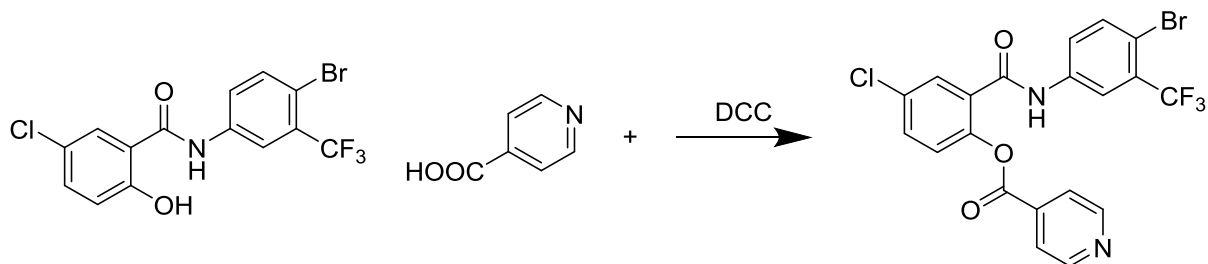
TLC: Toluen:ethyl-acetát 4:1

R_f=0,85

Tato látka byla na začátku r. 2013 připravena v Jižní Koreji a publikována T.t. ¹¹

2-[[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]-4-chlorfenyl-isonikotinát

Reakční schéma:



Sumární vzorec: $C_{20}H_{11}BrClF_3N_2O_3$

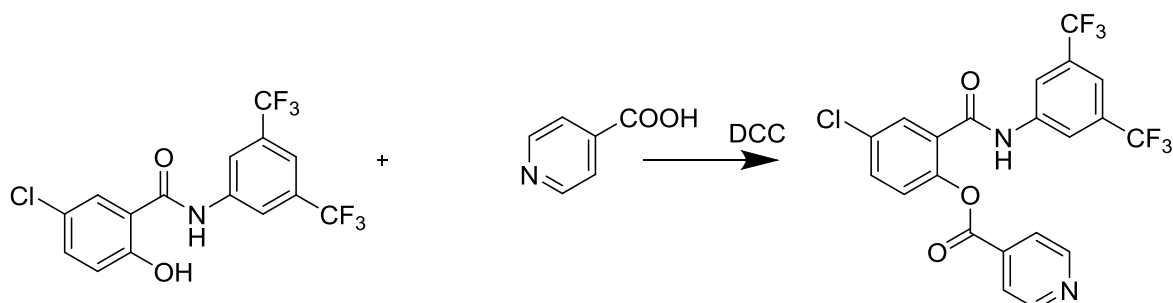
Molekulová hmotnost: 497,96

Pracovní postup:

Bylo smícháno 0,59 g (0,0015 mol) *N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamidu s 0,18 g (0,0015 mol) isonikotinové kyseliny. Následně byla tato směs rozpuštěna v 10 mL dichlormethanu (DCM), 10 mL (DMF) a při teplotě 0 °C za stálého míchání do ní byl během 1 hodiny po třech stejných dílech přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid. Dále byla směs ponechána při laboratorní teplotě a poté byla uložena do lednice. Ze směsi byla odfiltrována nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina a filtrát byl za pomoci rotační vakuové odparky odpařen do sucha. Ke zbylé vysušené látce bylo přidáno minimální množství ethyl-acetátu a nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina byla opět odfiltrována. V následujícím kroku byl ethyl-acetát částečně oddestilován a přidáním hexanu došlo ke krystalizaci. K dočištění produktu byla směs ještě několikrát rekrystalizována (ethyl-acetát:hexan).

2-[[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbonyl]-4-chlorfenyl-isonikotinát

Reakční schéma:



Sumární vzorec: $C_{21}H_{11}ClF_6N_2O_3$

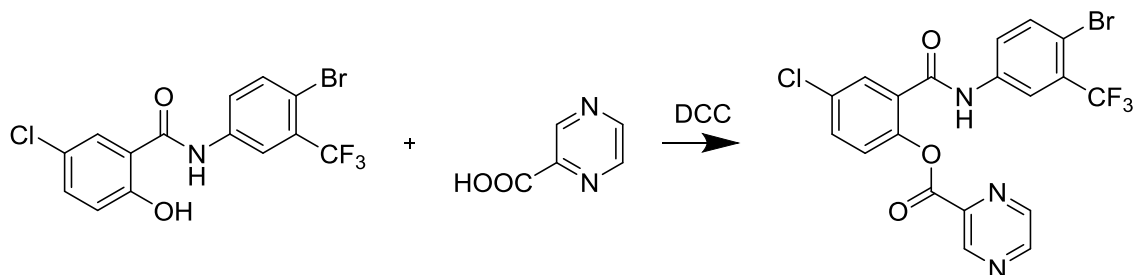
Molekulová hmotnost: 488,77

Pracovní postup:

Bylo smícháno 0,57 g (0,0015 mol) *N*-[3,5-bis(trimethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamidu s 0,18 g (0,0015 mol) isonikotinové kyseliny. Následně byla tato směs rozpuštěna v 10 ml dichlormethanu (DCM), 10 ml *N,N'*-dimethylformamidu (DMF) a při teplotě 0 °C za stálého míchání do ní byl během 1 hodiny po třech stejných dílech přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid. Dále byla směs ponechána při pokojové teplotě a poté byla uložena do lednice. Ze směsi byla odfiltrována nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina a filtrát byl za pomoci rotační vakuové odparky odpařen do sucha. Ke zbylé vysušené látce bylo přidáno minimální množství ethyl-acetátu a nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina byla opět odfiltrována. V následujícím kroku byl ethyl-acetát částečně oddestilován a přidáním hexanu došlo ke krystalizaci. K dočištění produktu byla směs ještě několikrát rekrystalizována (ethyl-acetát:hexan).

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

Reakční schéma:



Sumární vzorec: C₉H₁₀BrClF₃N₃O₃

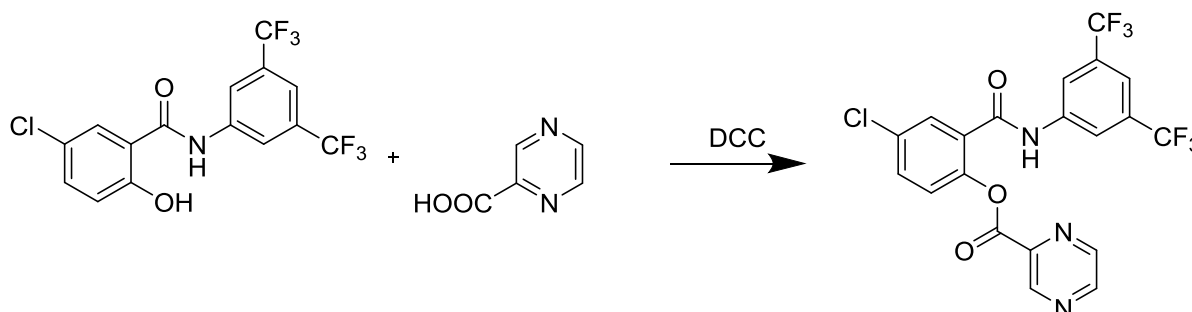
Molekulová hmotnost: 500,66

Pracovní postup:

Bylo smícháno 0,59 g (0,0015 mol) *N*-[4-brom-3-(trimethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid s 0,19 g (0,0015 mol) pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Následně byla tato směs rozpuštěna v 10 ml dichlormethanu (DCM), 10 ml *N,N'*-dimethylformamidu (DMF) a při teplotě 0 °C za stálého míchání do ní byl během 1 hodiny po třech stejných dílech přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid. Dále byla směs ponechána při pokojové teplotě a poté byla uložena do lednice. Po dvou dnech byla ze směsi odfiltrována nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina a filtrát byl za pomoci rotační vakuové odpary odpařen do sucha. Ke zbylé vysušené látce bylo přidáno minimální množství ethyl-acetátu a nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina byla opět odfiltrována. V následujícím kroku byl ethyl-acetát částečně odpařen za pomoci rotační vakuové odpary a přidáním hexanu došlo ke krystalizaci. K dočištění produktu byla směs ještě několikrát rekrystalizována (ethyl-acetát:hexan)

2{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbomyl}-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát

Reakční schéma:



Sumární vzorec: $C_{20}H_{10}ClF_6N_3O_3$

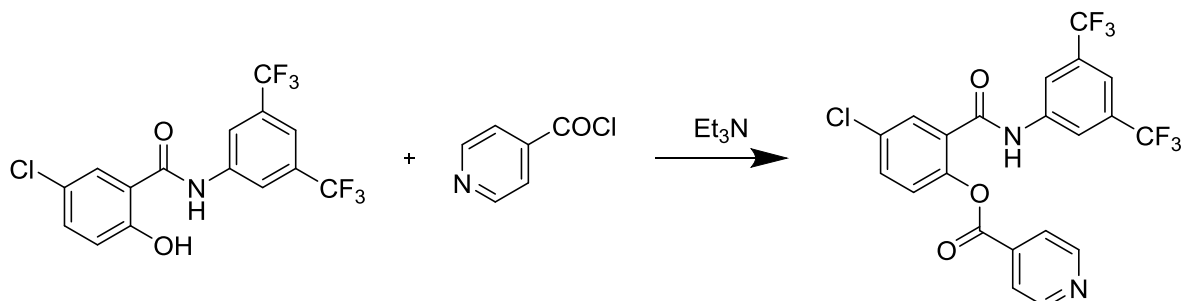
Molekulová hmotnost: 489,76

Pracovní postup:

Bylo smícháno 0,57 g (0,0015 mol) *N*-[3,5-bis(trimethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamidu s 0,19 g (0,0015 mol) pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Následně byla tato směs rozpuštěna v 10 ml dichlormethanu (DCM), 10 ml *N,N'*-dimethylformamidu (DMF) a při teplotě 0 °C za stálého míchání do ní byl během 1 hodiny po třech stejných dílech přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid. Dále byla směs ponechána při pokojové teplotě a poté byla uložena do lednice. Po dvou dnech byla ze směsi odfiltrována nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina a filtrát byl za pomoci rotační vakuové odparky odpařen do sucha. Ke zbylé vysušené látce bylo přidáno minimální množství ethyl-acetátu a nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina byla opět odfiltrována. V následujícím kroku byl ethyl-acetát částečně odpařen za pomoci rotační vakuové odparky a přidáním hexanu došlo ke krystalizaci. K dočištění produktu byla směs ještě několikrát rekrystalizována (ethyl-acetát:hexan)

2-{{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbomyl}-4-chlorfenyl-isonikotinát

Reakční schéma:



Sumární vzorec: C₂₁H₁₁ClF₆N₂O₃

Molekulová hmotnost: 488,77

Pracovní postup:

0,384 g (0.001 mol) *N*-[3,5-bis(trimethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamidu bylo rozpuštěno v 10 ml dichlormethanu a přidány 3 ekvivalenty triethylaminu. Směs byla míchána 5 minut do úplného rozpuštění reaktantů. Poté byl přidán postupně ve třech částech hydrochlorid chloridu kyseliny isonikotinové (1,3 ekvivalent). Směs se následně nechala míchat 24 hodin při pokojové teplotě.

Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC v soustavě toluen/ethyl-acetát 4:1. Po 24 hod. byla směs extrahována 15 ml 5% vodného roztoku NaHCO₃ a poté 15 ml destilované vody. Dichlormethanová vrstva byla oddělena a vysušena za pomoci Na₂SO₄ a poté byla směs přefiltrována a odpařena do sucha. Následovala krystalizace soustavou ethyl-acetát/hexan.. Produkt byl ponechán 24 hodiny v lednici. Vzniklé krystaly byly následně opět rekrystalizovány ethyl-acetát:hexanem.

Výtěžek: 0,098 g (2%)

Teplota tání: 126-127 °C

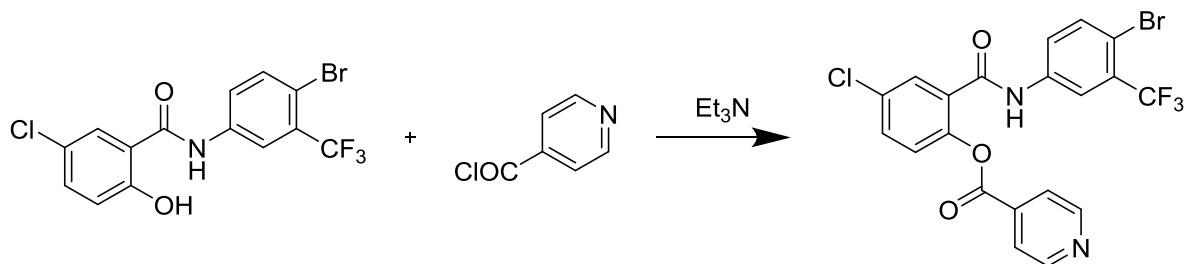
RF: 0,81

TLC: Toluen:ethyl-acetát

4:1

2-[[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]-4-chlorfenyl-isonikotinát

Reakční schéma:



Sumární vzorec: C₂₀H₁₁BrClF₃N₂O₃

Molekulová hmotnost: 497,96

Pracovní postup:

0.395 g (0,001 mol) *N*-[4-brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamidu bylo rozpuštěno v 10 ml dichlormethanu a přidáno 0,420 ml triethylaminu. Směs byla míchána 5 minut do úplného rozpuštění reaktantů. Poté byl přidán postupně ve třech částech hydrochlorid chloridu kyseliny isonikotinové 0.231g (1,3 ekvivalent). Směs se následně nechala míchat 24 hodin při laboratorní teplotě.

Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC v soustavě toluen:ethyl-acetát 4:1. Po 24 hod. bylo přidáno 15 ml 5% vodného roztoku NaHCO₃ a poté 15 ml destilované vody. Dichlormethanová vrstva byla oddělena a vysušena za pomoci Na₂SO₄ a poté byla směs přefiltrována a odpařena do sucha. Následovala krystalizace soustavou ethyl-acetát:hexan. Produkt byl ponechán 24 hodin. Vzniklé krystaly byly následně opět rekrystalizovány ethyl-acetát:hexanem.

Výtěžek: 0,037 g (0.72%)

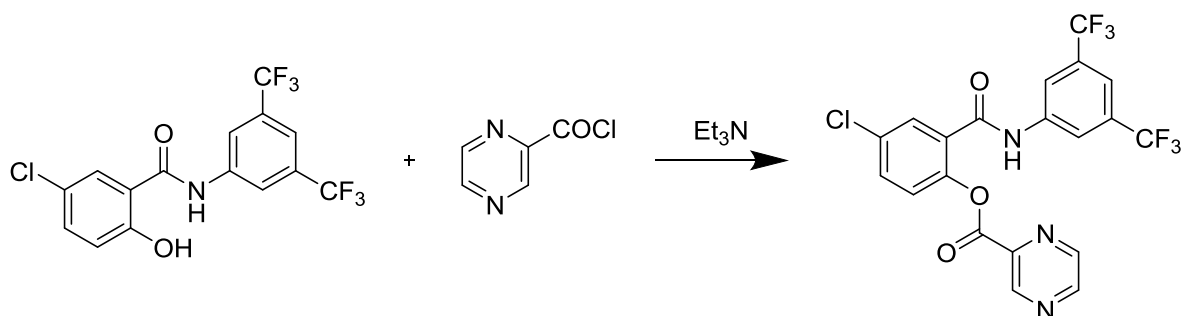
Teplota tání: 227-229 °C

RF: 0,80

TLC: Toluen:ethyl-acetát

4:1

2{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbomyl}-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát



Sumární vzorec: C₂₀H₁₀ClF₆N₃O₃

Molekulová hmotnost: 489,76

Pracovní postup:

(3.7 g 0,03mol) pyrazin karboxylové kyseliny byla rozpuštěná v 15 ml thionylu chloridu. Směs byla vařena za stálého míchání pod zpětným chladičem dvě hodiny. Tmavý červený pyrazinoyl chlorid byl čištěn sublimací při teplotě 50-60 °C.

0,384 g (0.001 mol) *N*-[3,5-bis(trimethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamidu bylo rozpuštěno v 10 ml dichlormethanu a přidány 3 ekvivalenty triethylaminu(0,420 ml). Směs byla míchána 5 minut do úplného rozpuštění reaktantů. Poté byl přidán postupně ve třech částech pyrazinoyl chlorid (1,3 ekvivalent). Směs se následně nechala míchat 24 hodin při pokojové teplotě.

Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC v soustavě toluen/ethyl-acetát 4:1. Po 24 hod. byla směs extrahována 15 ml 5% vodného roztoku NaHCO₃ a poté 15 ml destilované vody. Dichlormethanová vrstva byla oddělena a vysušena za pomoci Na₂SO₄ a poté byla směs přefiltrována a odpařena do sucha. Následovala krystalizace soustavou ethyl-acetát/hexan.. Produkt byl ponechán 24 hodiny v lednici. Vzniklé krystaly byly následně opět rekrystalizovány ethyl-acetát:hexanem.

Výtěžek: 0,083 g (1.7%)

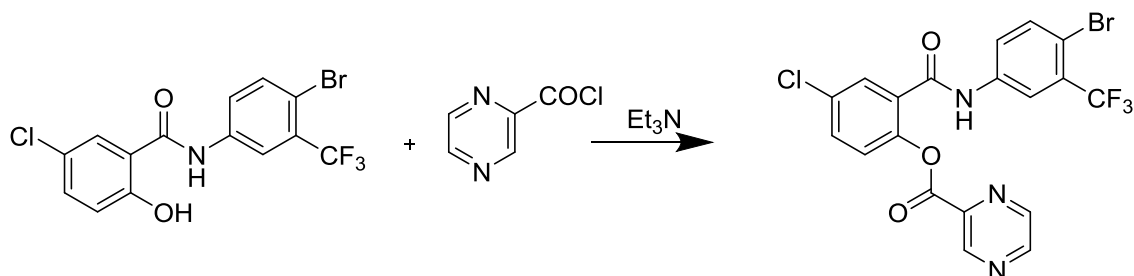
Teplota tání: 125-127 °C

RF: 0,76

TLC: Toluen:ethyl-acetát

4:1

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



Sumární vzorec: C₉H₁₀BrClF₃N₃O₃

Molekulová hmotnost: 500,66

Pracovní postup:

(3.7 g 0,03mol) pyrazin karboxylové kyseliny byla rozpuštěná v 15 ml thionylu chloridu. Směs byla vařena za stálého míchaní pod zpětným chladičem dvě hodiny. Tmavý červený pyrazinoyl chlorid byl čištěn sublimací při teplotě 50-60 °C.

0,395 g (0.001 mol) N-[4-brom-3-(trimethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid bylo rozpuštěno v 10 ml dichlormethanu a přidány 3 ekvivalenty triethylaminu(0,420 ml). Směs byla míchána 5 minut do úplného rozpuštění reaktantů. Poté byl přidán postupně ve třech částech pyrazinoyl chlorid (1,3 ekvivalent). Směs se následně nechala míchat 24 hodin při pokojové teplotě.

Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC v soustavě toluen/ethyl-acetát 4:1. Po 24 hod. byla směs extrahována 15 ml 5% vodného roztoku NaHCO₃ a poté 15 ml destilované vody. Dichlormethanová vrstva byla oddělena a vysušena za pomoci Na₂SO₄ a poté byla směs přefiltrována a odpařena do sucha. Následovala krystalizace soustavou ethyl-acetát/hexan.. Produkt byl ponechán 24 hodiny v lednici. Vzniklé krystaly byly následně opět rekrystalizovány ethyl-acetát:hexanem.

Výtěžek: 0.055 g (2%)

Teplota tání: 229-230 °C

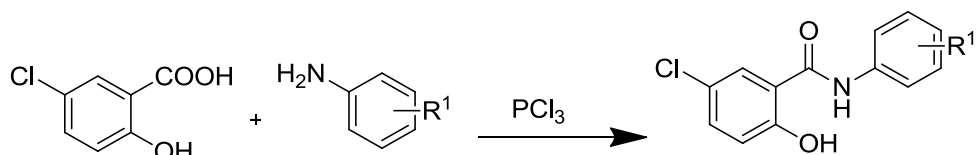
RF: 0,74

TLC: Toluen:ethyl-acetát

4:1

5 Diskuse a závěr

Prvním krokem byla reakce 5-chlorsalicylové kyseliny s příslušným anilinem v přítomnosti PCl_3 a chlorbenzenu.



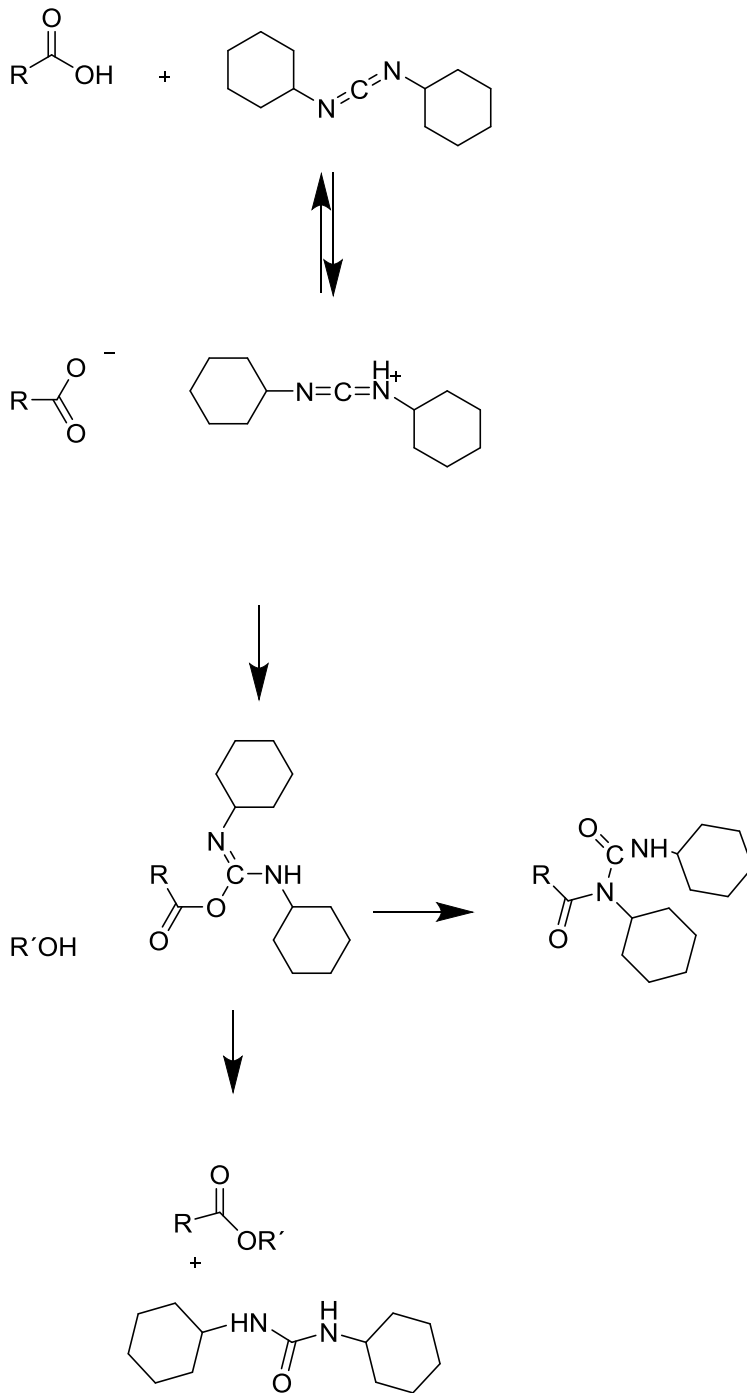
Při této reakci byl získán dostatek salicylanilidů, které byly potřeba k syntéze salicylanilidových esterů.

Druhým krokem byla snaha připravit estery 4-chlorsalicylanilidů (Schéma č.12), kdy reagoval 5-chlorsalicylanilid s příslušnou karboxylovou kyselinou v přítomnosti N,N' -dicyclohexylkarbodiimidu (DCC). První problém při této reakci byla tvorba meziprojektu O -acylmočoviny. Tento krok syntézy přinesl řadu různých produktů: salicylanilidy, dicyklohexylmočovina a N -acylmočovina¹².

Druhý problém byla nízká reaktivita, zvláště u isonikotinové karboxylové kyseliny.

Třetí problém byla obtížná izolace díky vzniku mnoha meziprojektů. Izolace byla prováděna pouze za pomoci krystalizace. Sloupcová chromatografie nebyla z důvodu nestability esteru vhodná.

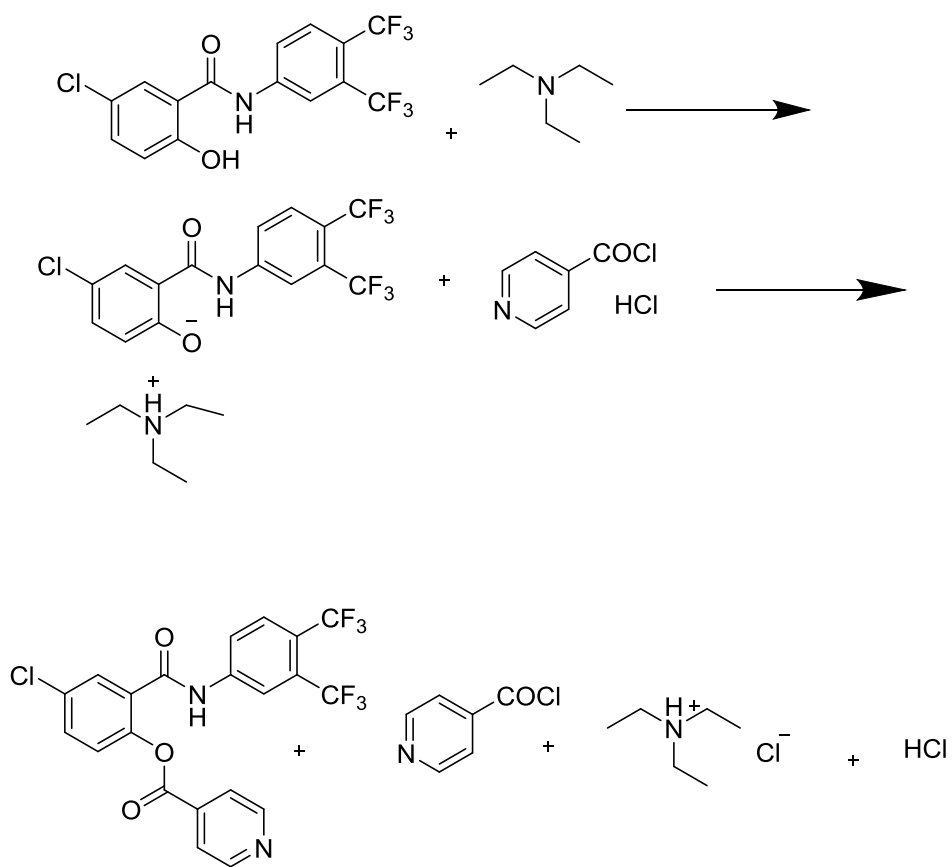
Schéma č. 12



Po neúspěšných pokusech syntetizovat 4-chlorsalicylanilidové isonikotináty za pomoci *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu byla navržena jiná reakce (Schéma č.13): 5-chlorsalicylanilid s triethylaminem, a následně byl postupně přidáván hydrochlorid kyseliny isonikotinové s cílem vytvořit ester salicylanilidu. Největším problémem zde byl vznikající poměr 1:1 mezi 5-chlorsalicylanilidem a 4-chlorsalicylanildem isonikotinátu, což značně znesnadňovalo krystalizaci. Touto reakcí byly připravovány: 2-{{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbomyl}-4-chlorfenyl isonikotinát a 2-{{[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl isonikotinát.

Stejným postupem jsem připravil estery pyrazinkarboxylátů. Nejprve jsem převedl pyrazin karboxylové kyseliny na pyrazinoyl chlorid a poté jsem připravil jejich estery: 2{{[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát a 2{{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbomyl}-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát

Schéma č. 13



Závěr:

Výsledkem mé diplomové práce byla snaha připravit antibakteriálně aktivní salicylanilidy a jejich estery. Povedlo se připravit tyto látky:

N-[3,5-*Bis*(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid

N-[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]-5-chlor-2-hydroxybenzamid

2-[[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]-4-chlorfenyl-isonikotinát

2-[[3,5-*Bis*(trifluormethyl)fenyl]karbomyl]-4-chlorfenyl-isonikotinát

2[[4-Brom-3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát

2[[3,5-*Bis*(trifluormethyl)fenyl]karbomyl]-4-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát

6 Seznam zkratek

C.	<i>candida</i>
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylkarbodiimid
DMF	<i>N,N'</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EMB	ethambutol
FDA	Food and Drug Administration
INH	isoniazid
ICL	isocitrát lyasa
MDR-TBC	multilékově rezistentní tuberkulóza
MCTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PZ	pyrazinamid
RMP	rifampicin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TBC	tuberkulóza
XDR-TBC	extenzivně rezistentní tuberkulóza (extremely/extensively drug-resistant tuberculosis)

Použitá literatura

Citováno dle CSN ISO 690 a CSN ISO 690-2

-
- ¹ World Health Organization , [Cit. **1.5 2013**] přístup z <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/internet>
- ² Vinšová, J.; Krátký, M. *Chem. Listy st:998-1005 vol.17 2010*
- ³ Hartl, J.; Doležal, M.; Miletín, M.; Opletalová, V.; Zimčík, P. *Farmaceutická chemie IV. Karolinum. Praha. 2008. 166 s. ISBN 978-80-246-1169-3*
- ⁴ Schaberg, T.; Bauer, T.; Loddenkemper, R. *Moderne Tuberkulose therapie Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013* [Cit. **3.5 2013**] přístup z <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00108-013-3244-5.pdf>
- ⁵ Lincová, D., Farghali, H., a kol. *Základní a aplikovaná farmakologie. 2. Vyd. Praha: Karolinum s.120-125 ISBN 80-246-1169-4 2007*
- ⁶ World Health Organization , *Global tuberculosis report*, Genava: WHO Press , 89 s, ISBN 978 92 4 156450 2 **2012**
- ⁷ Krátký, M.; Vinšová, J. *Current Pharmaceutical Design* vol. 17, s. 3494-3505 **2011**
- ⁸ Krátký, M ; Vinšová, J *Molecules* vol. 17 s. 9426-9442 **2012**
- ⁹ Krátký, M ; Vinšová, J ; Stolaříková, J *Molecules* vol. 17, s. 12812-12820 **2012**
- ¹⁰ Krátký, M.; Vinšová, J.; Novotná, Eva; a kol. *Tuberculosis* vol. 92, s. 434-439 **2012**
- ¹¹ Lee, IY.; Gruber, TD ; Samuels, A ; Yun, M ; Nam, B; Kang, M ; Crowley, K ; Winterroth, B ; Boshoff, HI ; Barry, CE *Bioorganic & Medicinal Chemistry* vol. 21 s. 114-126 **2013**
- ¹² Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews* vol. 38 Issue: 2 s. 606-631 **2009**

¹³ Zdravotnické Noviny MF ZDN [Cit. **31.8 2013**] přístup z
<http://zdravi.e15.cz/clanek/mlada-fronta-zdravotnicke-noviny-zdn/uspechy-klinickych-hodnoceni-uplynuleho-roku-468535>