

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

SALICYLANILIDY A JEJICH POUŽITÍ

Hradec Králové, 2007

Ing. Lucie ZAMYKALOVÁ, Ph.D.

Ráda bych poděkovala Doc. Jarmile Vinšové, CSc.
za cenné rady, podněty a všestrannou pomoc
při řešení mé bakalářské práce.

OBSAH

Poděkování	ii
Obsah	iii
Souhrn	iv
Summary	v
1. Úvod	6
2. Cíl práce	7
3. Seznam použitých zkratk	8
4. Teoretická část	9
4.1 Salicylanilidy	9
4.2 Příprava salicylanilidů	9
4.2.1 Salicylanilidy jako výchozí látky syntéz	12
4.3 Biologická aktivita salicylanilidů	15
4.3.1 Antimikrobiální aktivita	15
4.3.2 Antiparazitální aktivita	18
4.3.3 Jiné medicínské indikace	21
4.3.4 Další nemedicínské indikace	23
5. Experimentální část	25
5.1 Databáze patentové literatury	25
5.1.1 Databáze EPO	25
5.1.2 Databáze ÚPV	26
5.2 Databáze nepatentové literatury	26
6. Diskuse a závěr	27
7. Seznam použité literatury	29

SOUHRN

Salicylanilidy a jejich použití

Salicylanilidy jsou funkční deriváty kyseliny salicylové, 2-hydroxybenzoové, které vykazují antimikrobiální, antiparazitální a anthelmintický účinky. Pro jejich účinek je nezbytný elektron akceptorní substituent na salicylové části a hydrofobní skupiny na anilidové části molekuly. Cílem práce je provést rešerši primárně v patentové literatuře se zaměřením na způsoby přípravy salicylanilidů a jejich medicínské i nemedicínské použití.

K rešerši salicylanilidových derivátů a jejich použití byly využity patentové databáze esp@cenet, EPOQUE a databáze spravovaná Úřadem průmyslového vlastnictví.

Od 70-tých let minulého století zůstává nejpoužívanějším způsobem přípravy salicylanilidů reakcí kyseliny salicylové a substituovaného anilinu v poloze 4 v chlorbenzenu v přítomnosti PCl_3 . Salicylanilidy jsou využitelné také k ošetřování ústní dutiny, jako antimikrobiální složka detergentů, mýdel a kosmetických přípravků, jako diuretika, inhibitory transkripčního faktoru NF- κ B, antagonisté receptorů makrofágů, inhibitory růstu tumorů, sterilační činidla hmyzu nebo jako barevná vývojka.

SUMMARY

Salicylanilide and their use

Salicylanilides are functional derivatives of the salicyl acid, 2-hydroxybenzoic acid, which possess antimicrobial, antiparasitic, and anthelmintic activities. Electron-accepting substituents on the salicylic and hydrophobic groups on the anilide ring are most essential for the activity. The aim of present thesis is to search for salicylanilide preparation methods and their medical or non-medical uses primarily in the patent literature.

Patent databases such as Esp@cenet, EPOQUE, and that administered by Industrial Property Office of the Czech Republic were used for searching salicylanilides and their uses.

The most common method for salicylanilide preparation still is the reaction of the salicyl acid and 4-substituted aniline in chlorobenzene and PCl_3 . Salicylanilide are also useful for the treatment of oral cavity, as antimicrobial component of detergents, soaps, and cosmetics, as diuretics, as inhibitors of transcription factor NF- κ B, as macrophage scavenger receptor antagonists, as inhibitors of tumour growth, as insect chemosterilants or as a colour developer.

1. ÚVOD

Salicylanilidy jsou funkční deriváty kyseliny salicylové, 2-hydroxybenzoové, které jsou aktivní vůči grampozitivním patogenům včetně methicillin resistantního *Staphylococcus aureus* a vankomycin resistantního *Enterococcus faecium*, kmeny, které představují v současné době značný klinický problém. Podle nového mechanismu působení navrženého v roce 1998 inhibují dvoukomponentové regulační systémy bakterií. Pro jejich účinek je však nezbytný elektron akceptorní substituent na salicylové části a hydrofobní skupiny na anilidové části molekuly.

Kromě antimikrobiální aktivity vykazují salicylanilidy též antiparazitální aktivitu a nachází tak využití jako anthelmintika jak ve veterinární tak i humánní medicíně. Žádoucí je potlačení zejména motolice jaterní a hlístů u hospodářských zvířat, ovcí, dobytka a koz, protože u hostitele způsobují pokles výtěžnosti masa, mléka ale i vlny.

Patentová literatura představuje zajímavý zdroj informací nejen pro univerzitní laboratoře ale i pro všechna místa zabývající se výzkumem v oblasti salicylanilidových derivátů a jejich následného využití. Databáze či dokonce databázová centra patentové literatury jsou více či méně přístupná veřejnosti, nicméně dnes již uživatelům poskytují značný komfort při vyhledávání informací.

Dostupné informace zde lze vyhledávat podle různých kritérií, např. klíčová slova, jméno majitele patentu, přihlašovatele či původce, číslo přihlášky vynálezu nebo patentu. Třída mezinárodního patentového třídění představuje velmi důležité kritérium vyhledávání informací v patentové literatuře. Toto třídění bylo zavedeno k usnadnění provádění rešerší v dané oblasti techniky, ale také ke snadnějšímu uchovávání patentových informací nebo snadnějšímu zpracování statistik jednotlivých národních patentových úřadů.

2. CÍL PRÁCE

Cíle předkládaná bakalářská práce na téma „Salicylanilidy a jejich použití“ byly následující:

- ✦ provést rešerši primárně v patentové literatuře se zaměřením na způsoby přípravy salicylanilidů a jejich medicínské i nemedicínské použití;
- ✦ sumarizovat výsledky rešerše; a
- ✦ písemně je zhodnotit.

3. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DMF – dimethylformamid

TCS – dvoukomponentový regulační systém

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ATP – adenosintrifosfát

NF – nuclear factor

IL – interleucin

ICAM – intracelulární buněčné adhesivní molekuly

VCAM – vaskulární buněčné adhesivní molekuly

NO – oxid dusnatý

AIDS – syndrom získaného selhání imunity

MSR – macrophage scavenger receptor

HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě

GB – zkratka pro patentové spisy Velké Británie

CS/CZ - zkratka pro patentové spisy Československa/České republiky

WO – mezinárodní přihláška vynálezu

US – zkratka pro patentové spisy Spojených států Amerických

IE – zkratka pro patentové spisy Irska

EP – evropská přihláška vynálezu (A1-3) nebo patent (B1)

JP – zkratka pro patentové spisy Japonska

BE – zkratka pro patentové spisy Belgie

RU – zkratka pro patentové spisy Ruské federace

HU – zkratka pro patentové spisy Maďarska

DE – zkratka pro patentové spisy Německa

ÚPV – Úřad průmyslového vlastnictví

MPT – Mezinárodní patentové třídění

EPOQUE – patentová databáze Evropského patentového úřadu

EPO – Evropský patentový úřad

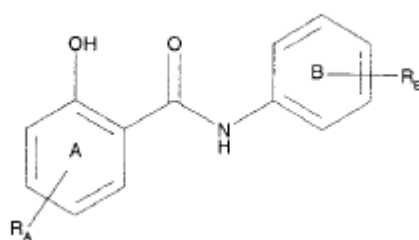
ECLA – Evropské patentové třídění (používané EPO, detailnější než MPT)

PCT – Smlouva o patentové spolupráci

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Salicylanilidy

Salicylanilidy jsou funkční deriváty kyseliny salicylové, 2-hydroxybenzoové, sekundární amidy, které mají na amidovém dusíku navázaný substituovaný fenyl, a jsou reprezentovány následujícím obecným vzorcem I:



Salicylanilidové deriváty vykazují řadu biologických aktivit, z nichž nejvýznamnější jsou antimikrobiální, anthelmintický, antibakteriální¹ a antimykobakteriální². Zásadní význam pro jejich biologickou aktivitu má reaktivní fenolická hydroxyskupina v poloze 2.

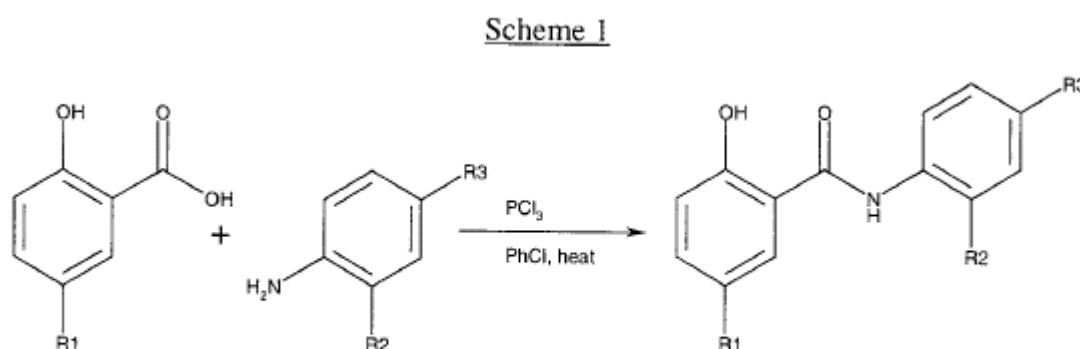
4.2 Příprava salicylanilidů

Obecně mohou být salicylanilidy připraveny v zásadě třemi způsoby³:

- ⇒ reakcí aktivované substituované kyseliny salicylové s anilinem substituovaným v poloze 3 nebo 4 v přítomnosti Lewisovy kyseliny, jako např. fluorid boritý, nebo v přítomnosti zásady, jako např. hydroxidu sodného; nebo jen za vyšší teploty, a to v závislosti na typu aktivující skupiny, kterou může být halogenová, alkoxy, aryloxy, OCOO-alkylová, nebo S-alkylová;
- ⇒ reakcí substituované kyseliny salicylové a substituovaného anilinu, jehož aminoskupina je aktivována, v přítomnosti alkylhalogenfosforitanu; nebo

⇒ reakcí substituované kyseliny salicylové a substituovaného anilinu v přítomnosti sloučeniny podporující reakci, jako např. alkylhalogenfosforitan, alkoxyacetylen, alkylhalogenformát.

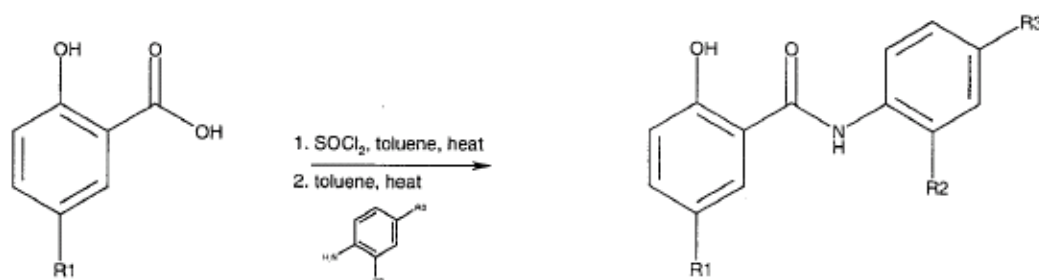
Waisser et al.² popisují přípravu salicylanilidů reakcí suspenze salicylové kyseliny a substituovaného anilinu v poloze 4 v chlorbenzenu po přidavku PCl_3 , přičemž reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 3 hodiny.



Stejná reakce vedoucí k přípravě salicylanilidů je popsána v GB 1 212 628⁴, GB 1 219 500⁵, CS 149651⁶, WO 99/65449⁷, US 2006/0035979⁸ a US 2003/0092771⁹. V GB 2 247 884¹⁰ a IE 63471¹¹ je popsána též reakce se specifikovaným inertním organickým rozpouštědlem, kterým je toluen, a ochlazení na teplotou mezi 65 až 85 °C, výhodně 70 až 80 °C.

Podle WO 99/65449⁷, US 2006/0035979⁸ a US 2003/0092771⁹ mohou být salicylanilidy také připraveny přeměnou substituované kyseliny salicylové na její odpovídající chlorid této kyseliny působením thionylchloridu za katalýzy DMF. Výsledný chlorid kyseliny salicylové se nechá reagovat se substituovaným anilinem v přítomnosti toluenu za zvýšené teploty za vzniku příslušného salicylanilidu. V dokumentu WO 2004/026821¹² je popsán podobný způsob přípravy salicylanilidů, kde je v druhém kroku přípravy využita směs chloroformu a kyseliny chlorovodíkové v poměru 2:1 pro promývání organické fáze.

Scheme 2

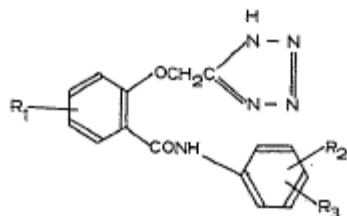


V EP 0 150 719¹³ je popsána příprava halogensubstituovaných salicylanilidových derivátů, kde se nechá reagovat chlorid halogensubstituované kyseliny salicylové se substituovaným anilinem v přítomnosti inertního organického rozpouštědla, jako např. dioxan, tetrahydrofuran, báze buď anorganické jako např. hydroxid sodný nebo draselný, uhličitán sodný, hydrogenuhličitán sodný, nebo organické jako např. diethylamin nebo triethylamin, a při teplotě 50 a 120 °C.

4.2.1 Salicylanilidy jako výchozí látky syntéz

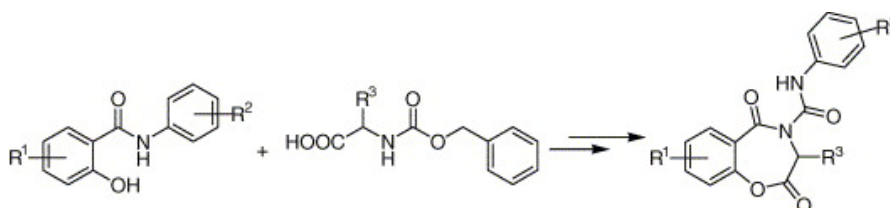
Při rešerši byly nalezeny i dokumenty, které popisují syntézy strukturně jiných sloučenin, než jsou salicylanilidy, avšak právě salicylanilidy v nich vystupují jako výchozí látky.

V dokumentu GB 1 185 539¹⁴ je popsána syntéza substituovaných tetrazolů spočívající v reakci substituovaného salicylanilidu, azidu sodného, chloridu amonného a N,N-dimethylformamidu. Vzniklé sloučeniny vzorce

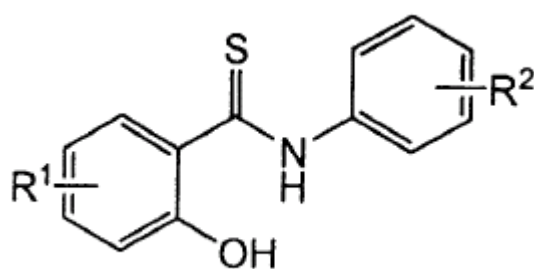


vykazují analgetickou a protizánětlivou aktivitu a jsou využívány při léčbě zánětlivých onemocnění, jako např. reumatoidní artritida.

Imramovský et al.¹⁵ s cílem připravit estery aminokyselin s vysoce aktivními salicylanilidy jako novou skupinu pro léčiv s vysokou aktivitou, zlepšenou rozpustností a nízkou toxicitou překvapivě zjistil, že tyto estery podléhají cyklizaci vedoucí k novým derivátům benzthiazepinu. Biologicky aktivní salicylanilidy je esterifikován N-chráněným glycinem nebo alaninem za vzniku Z-esteru příslušné aminokyseliny, který pak podléhá cyklizaci buď cestou za vzniku 9-členného kruhu nebo cestou za vzniku 7-členného meziprojektu benzthiazepinu, který se dále nechá reagovat se substituovaným anilinem za vzniku finálního benzthiazepinu.



V dokumentu CZ 297 581¹⁶ je popsána příprava thiosalicylanilidů spočívající v tom, že se na substituovaný salicylanilid působí thionačním činidlem jako např. sulfidem fosforečným (P₄S₁₀), Lawessovým činidlem, pyridinium-1-ylfosfono-chloridothionátem nebo dichloridem *N,N*-dimethylfosforamidothioové kyseliny v molárním poměru salicylamidu a thionačního činidla 1:0,5 až 10. Získané thiosalicylanilidy vzorce



vykazují antimykotickou a antimykobakteriální aktivitu, nachází využití též jako selektivní inhibitory aldoreduktázy ALR2, která hraje důležitou roli v rozvoji chronických diabetických komplikací včetně neuropatie, retinopatie a nefropatie. Nalézají však využití i v technické oblasti, a to např. při přípravě fotosenzorů na bázi azobarviv.

Waisser et al.² uvádí způsob přípravy 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů, který je založen na přikapávání ethylchlorformiátu při 0 °C za míchání k roztoku substituovaného salicylanilidu v pyridinu. Získané 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony vykazují antimykobakteriální aktivitu a jsou tak využitelné jako antituberkulotika.

4.3 Biologická aktivita salicylanilidů

4.3.1 Antimikrobiální aktivita

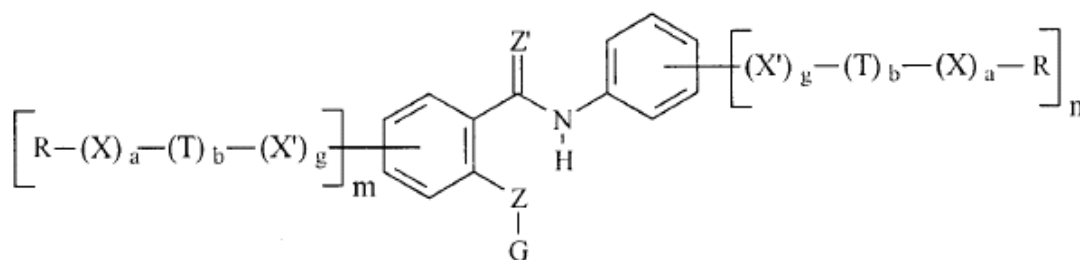
Antibakteriální a antifungální aktivita salicylanilidů je známa již řadu let^{3,17}. Waisser et al.² připravil řadu *in vitro* aktivních salicylanilidů, které svými antimykobakteriálními aktivitami převyšují běžná antituberkulotika, zejména vůči některým atypickým kmenům jako jsou *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium avium*. Mechanismus jejich působení byl nově navržen v roce 1998 a byl založen na inhibici dvoukomponentových regulačních systémů (TCS) bakterií. Tyto systémy jsou složeny z histidin-proteinkinázy a DNA-vazebného proteinu, který je regulátorem odpovědi. Aktivace nebo represe genové transkripce je dosažena fosforylací z ATP na specifický zbytek kyseliny aspartamové, regulátoru odpovědi přes vysoce energetický fosfohistidinový intermediát příbuzné kinázy. Vyskytují se u všech bakteriálních kmenů včetně mykobakterií a u některých hub, nejsou však přítomny u vyšších eukaryontních organismů. V bakteriích se nachází značný počet takovýchto dvoukomponentových systémů, přičemž každý z nich kontroluje transkripci několika genů. Sloučeniny, které inhibují TCS, blokují tyto signální dráhy a mohou tak způsobit uhynutí bakterií.¹

Pro účinek je nezbytný salicylanilidový farmakofor, elektron akceptorní substituent na salicylové části a hydrofobní skupina na anilidové části. Hydrofobicita však není jediným faktorem ovlivňujícím aktivitu, úlohu hrají též elektronové a strukturní parametry.¹

V dokumentu US 4 310 682¹⁷ jsou popsány halogenované salicylanilidy v poloze 5 salicylové části a poloze 4 anilidové části, přičemž halogenem salicylové části může být fluor nebo jod a anilidové pak fluor, chlor, brom nebo jod. Jejich antifungální a baktericidní aktivita byla testována vůči *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* a *Trichophyton rubrum*. Výhodou těchto sloučenin je zabránění bakteriím nebo houbám vytvořit si resistenci vůči těmto sloučeninám. Mechanismus jejich účinku

spočívá v zabránění syntézy proteinů v bakteriích nebo houbách. Bylo také zjištěno, že alkylová skupiny v pozici 2 anilidové části je významná pro aktivitu těchto sloučenin.

V dokumentu WO 01/60157¹⁸ je popsána antibakteriální kompozice obsahující antibakteriální činidlo, které představuje substituovaný salicylanilid obecného vzorce



kde m je 0 až 4 včetně, n 0 až 5 včetně, součet m a n větší než 0, Z a Z' jsou nezávisle O a S , přičemž antibakteriální činidla jsou volena z monosubstituovaných salicylanilidů zahrnujících 5-chlorsalicylanilid, 4-chlorsalicylanilid, 5-jodsalicylanilid, 4-jodsalicylanilid, 5-fluorsalicylanilid, 4-fluorsalicylanilid, 5-kyansalicylanilid, 4-kyansalicylanilid, 5-acetylsalicylanilid a 4-acetylsalicylanilid nebo jejich soli. Bakteriální kompozice je účinná proti *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium granulosum*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesius*, *Listeria monocytogenes* a *Enterococcus hirae*. Zmíněná kompozice nalézá uplatnění jako součást tekutých detergentů, detergentů pro těžký provoz, detergentů pro automatické mytí, pro povrchové čištění nebo čištění vláken.

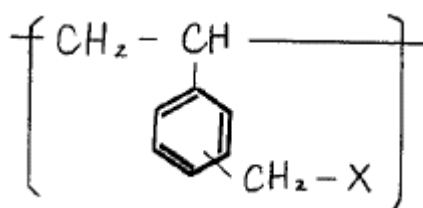
Antibakteriální aktivity salicylanilidů se také využívá pro kompozice pro ošetřování ústní dutiny ve formě např. ústní vody, zubního prášku, kloktadla, žvýkačky, k zabránění tvorby zubního plaku bakteriemi v ústech a tím potlačení halitózy. V těchto kompozicích jsou výhodně používány halogensalicylanilidy^{19,20,21}.

V dokumentu US 3 968 210²² je popsána směs 3,5-dimethyl-4-chlorfenolu a 3,4',5-tribromsalicylanilidu, která vykazuje synergickou germicidní aktivitu. Tato směs může být použita k přípravě mýdel, detergentů a kosmetických přípravků vykazujících germicidní aktivitu.

US 3 956 510²³ je popsána vodná antibakteriální kompozice, která se skládá z halogenovaného salicylanilidu, halogenovaného difenylhydroxyetheru nebo bifenyly a kvarterní soli odvozené od ethoxy- nebo propoxypolyolu. Kompozice vykazuje nízkou toxicitu a je účinná jak proti grampozitivním tak i gramnegativním bakteriím. Tuto kompozici lze využít jako čistící prostředek pro chirurgické nástroje, aseptický prostředek s aplikací na kůži nebo mléka na ruce.

Za zmínku stojí ještě dvě využití antiseptické aktivity salicylanilidů. První je popsáno v dokumentu JP 55098102²⁴ a týká se ochranné kompozice pro překližku. Tato kompozice se skládá ze substituovaného salicylanilidu a organocíníčitě sloučeniny, jako jsou trialkylcíníčitě a/nebo triarylcíníčitě sloučeniny. Kompozice může být přimíchána k adhezivu, aniž by byla snížena síla adheziva. Účinná látka kompozice snadno penetruje do pletiv dřeva, kde působí asepticky.

Druhé je popsáno v JP 63108009²⁵, které se týká vinylpolymeru obsahujícího opakující se strukturní jednotky vzorce,



kde X představuje fungicidní sloučeninu jako např. pentachlorfenol, *p*-chlor-*m*-kresol nebo salicylanilid. Tento polymer je připraven polymerací monomeru styrenu obsahujícího skupinu CH₂-X s jiným monomerem v rozpouštědle v přítomnosti iniciační látky za vzniku polymeru s relativní molekulovou hmotností 1 000 až 70 000. Získaný polymer je využitelný jako polymerní antifungicid, který nepodléhá hydrolyze a nemění formu, proto může být využit v požadovaném tvaru a stavu.

4.3.2 Antiparazitální aktivita

U salicylanilidů byla též prokázána antiparazitální aktivita a nachází tak využití jako anthelmintika jak ve veterinární tak i humánní medicíně. V dokumentu GB 1 493 375²⁶ jsou popsány salicylanilidové deriváty substituované v poloze 4 kyano-, alkanoyl-, fenylazo-, fenylthio-, fenylsulfinyl- nebo fenylsulfonylskupinou které se vykazují účinkem proti motolici jaterní a jsou tak využita jako anthelmintika.

V dokumentu GB 1 143 226²⁷ jsou popsány trifluormethylsalicylanilidy s trifluormethylem v pozici 4 v jejich anilidové části. Tyto sloučeniny jsou účinné proti motolici jaterní, *Fasciola hepatica*, u ovcí a hovězího dobytka. V dokumentu US 3 914 418²⁸ jsou popsány salicylanilidy mající aromatický kruh spojený a anilidovou částí prostřednictvím nekovového atomu, které taktéž nalézají použití v léčbě infekcí způsobených motolicí jaterní.

V dokumentech GB 1 472 385²⁹ a GB 2 247 884¹⁰ je popsán rafoxanid, 3'-chlor-4'-(*p*-chlorfenoxy)-3,5-dijodsalicylanilid, který nachází uplatnění v léčbě parazitálních onemocnění hospodářských zvířat, jako jsou ovce a hovězí dobytek, způsobených motolicí jaterní.

V dokumentech CS 149651⁶, GB 1 219 500⁵, GB 1 212 628⁴ jsou popsány halogenované deriváty substituovaných salicylanilidů, které mají na anilidovou část molekuly navázán další aromatický kruh prostřednictvím nekovového atomu. Tyto sloučeniny se vyznačují účinkem proti jak dospělým tak i nedospělým jedincům motolice jaterní, *Fasciola gigantica* a *Fasciola hepatica*, tedy obvyklým motolicím jater ovcí a hovězího dobytka. Obecně se dosahuje požadovaného účinku proti motolici, podává-li se sloučenina v jedné dávce od 1 do 300 mg na kg váhy zvířete.

Firma Bayer AG¹³ si nechala patentovat halogenované salicylanilidy s trifluormethylthiofenoxyskupinou vázanou v poloze 4 anilidové části molekuly, které jsou účinné proti patogenním endoparazitům, a to jak u člověka tak i u zvířat, kde se jedná zejména o motolici.

Kromě motolice jsou salicylanilidy účinné i proti jiným vnitřním parazitům teplokrevných zvířat. V dokumentu US 3 927 071³⁰ jsou popsány 3,5-dijod-2'-trifluormethyl-4'-chlorsalicylanilid a 3,5-dijod-3'-trifluormethyl-4'-bromsalicylanilid a jejich acetylové deriváty, které se vykazují účinky proti hlístům, *Haemonchus contortus*, který parazituje ve čtvrtém žaludku přežvýkavců. Vyskytující se v nadměrném množství způsobuje anémii a nakonec až smrt hostitele. Stejně jako motolice i hlísti způsobují u hostitele pokles výtěžnosti masa, mléka ale i vlny. Požadovaného účinku proti motolici je dosaženo podáním sloučeniny v jedné dávce od 1 do 50 mg na kg váhy zvířete.

Hennessy et al.³¹ poukázal na to, že salicylanilidy, jako closantel, jsou silně vázány na krevní albumin, což způsobuje jejich výskyt v krevním řečišti ještě asi 3 až 4 týdny po podání, a jsou tak účinné proti případným parazitům. Poskytují tedy profylaktický účinek. Na druhé straně bylo zjištěno, že closantel je pomalu vstřebáván v bacheru, slezu i střevech, tudíž přes 50% dávky je vyloučeno ve výkalech zvířete. Čas dostupnosti v organismu by bylo tedy s výhodou prodloužit. To bylo dosaženo vytvořením disperze substituovaných salicylanilidů v medium zajišťujícím vstřebávání salicylanilidů buď přímo nebo prostřednictvím krevní plazmy při průchodu kompozice gastrointestinálním traktem zvířete. Vedle closantelu jsou dále využitelné febantel (2'-(2,3-bis(methoxykarbonyl)guanidyl)-5'-fenylothio-2-methoxyacetanilide), oxyklozanid (3,3',5,5',6-pentachlor-2'-hydroxy-salicylanilid), rafoxanid (3'-chlor-4'-(p-chlorfenoxy)-3,5-dijodsalicylanilid), niklosamid (2',5-dichlor-4'-nitrosalicylanilid), nitroxynil (4-kyan-2-jod-6-nitrofenol). Tato sloučeniny jsou aktivní proti *Haemonchus* a *Fasciola* u ovcí a hovězího dobytka a proti *Bunostomum*, *Oesophagostomum*, *Moniezia* a *Paramphistomum* u hovězího dobytka.

Další řešení, jak zvýšit biodostupnost closantelu, je popsáno v dokumentech WO 03/072113³² a WO 2005/007241³³ a spočívá v podávání kombinované kompozice obsahující salicylanilidy, polymer jako např. polyvinylpyrrolidony nebo kopolymery polyoxypropylenu a polyoxyethylenu, a další antiparazitální sloučeninu, jako

avermektin nebo milbemycin. Je to právě polymer, který způsobuje zvýšení biodostupnosti closantelu z této kompozice.

V dokumentu GB 1 183 641³ jsou popsány halogenované salicylanilidové deriváty se substituovanou fenyloxyskupinou vázanou na anilidovou část molekuly. Tyto sloučeniny vykazují antiparazitální aktivitu i proti roztočům, zejména 3-nitro-5-brom-3'-chlor-4'-(*p*-chlorfenoxy)salicylanilid, v migrující fázi *Ascaris suum* u prasat v patologii plic. Aktivní látka je s výhodou podávána s krmivem a to v pevné formě, jako tablety či kapsle, nebo v tekuté formě.

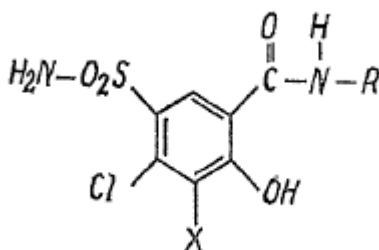
V dokumentu GB 1 537 929³⁴ jsou uvedeny salicylanilidy mající v poloze 4 anilidové části molekuly navázanou α -kyanarylmethylovou skupinu. Tyto sloučeniny vykazují parazitální aktivitu vůči motolici, hlístům, ale i řadě členovců, *Oestrus ovis*, *Hypoderma bovis*, *Dermatobia hominis* či *Lucilia*.

V dokumentu BE 748418³⁵ jsou popsány halogenované salicylanilidy, výhodně 5-chlor-2'-chlor-4'-nitrosalicylanilid, které vykazují aktivitu vůči tasemnici, *Hymenolepis diminuta*, a roupu, *Aspiculuris tetraptera*.

V dokumentu RU 2 112 508³⁶ je popsáno použití 3,5-dijod-3'-chlor-4'-(*p*-chlorfenoxy)salicylanilidu, disalanu, v kombinaci s jiným antiparazitálním činidlem, jako je ivermektin, avermektin nebo closantel, pro léčbu a profylaxi sarkoptoidosy hospodářských zvířat. Účinná dávka představuje 2 až 40 mg disalanu na kg hmotnosti zvířete.

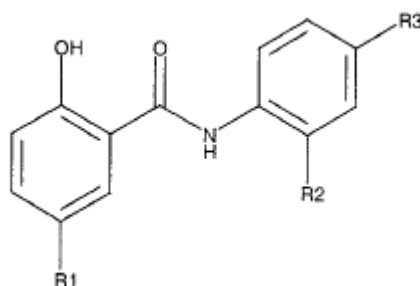
4.3.3 Jiné medicínské indikace

Z dalších medicínských indikací salicylanilidů byly v patentové literatuře popsány následující. V dokumentu GB 1 185 458³⁷ jsou uvedeny 5-sulfamylsalicylanilidy obecného vzorce



kde X představuje atom chloru nebo nitroskupinu a R fenyl substituovaný jedním nebo dvěma substituenty se skupiny atom chloru nebo C₁₋₄alkylová skupina. Tyto sloučeniny nacházejí uplatnění jako diuretika.

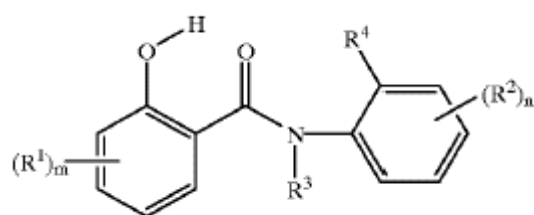
V dokumentech WO 99/65449⁷, US 2006/0035979⁸ a US 2003/0092771⁹ je popsána kompozice obsahující salicylanilidy obecného vzorce



kde R₁ je atom vodíku, trifluormethyl, nitroskupina, atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu; R₂ atom vodíku nebo fluoru a R₃ atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu, fenyl nebo skupina C(O)C₁₋₄alkylová. Sloučeniny vykazují inhibici transkripčního faktoru NF-κB, který náleží do rodiny značně podobných komplexů dimerických transkripčních faktorů složených z různých kombinací polypeptidů Rel/NF-κB. Proteiny NF-κB hrají významnou roli v regulované expresi řady prozánětlivých mediátorů zahrnujících cytokiny, např. IL-6 a IL-8, buněčné adhesivní molekuly, např. ICAM a VCAM, a indukovanou NO-synthasu. Tyto mediátory se uplatňují při migraci leukocytů do místa zánětu a v případě indukované NO-synthasy mohou vést

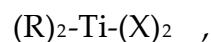
k orgánové destrukci u některých zánětlivých a autoimunních onemocnění. Sloučeniny tak nacházejí uplatnění při léčbě zánětlivých onemocnění, zejména reumatoidní artritidy, zánětu střev a astmatu; dermatóz, včetně psoriázy a atopické dermatitidy; autoimunních onemocnění; odmítnutí tkáně a orgánu; Alzheimerovy choroby; mrtvice; aterosklerosy; restenosy; rakoviny, včetně Hodgkinovy nemoci; virových infekcí, včetně AIDS; osteoartritidy; osteoporosy; a Ataxie Telangiectasia.

Substituované salicylanilidy obecného vzorce



kde R^1 je nezávisle atom vodíku, atom halogenu, fluoralkyl, halogenaryl, aryl, alkoxykupina, m je 1 až 4 včetně, R^2 nezávisle představuje R^1 -benzamidoskupinu, R^1 -benzylether, R^1 -benzylamino, amino, hydroxy, alkoxy, alkyl, fluoralkyl, kyano, nitro, aryloxy, nitroalkyl, arylskupinu a halogen, n je 1 až 4 včetně, R^3 atom vodíku nebo methyl, R^4 atom vodíku nebo hydroxyskupinu, které jsou popsány v dokumentech US 6 255 298³⁸ a WO 99/07382³⁹, nacházejí uplatnění jako antagonisté MSR (*macrophage scavenger receptor*). MSR antagonisté inhibují akumulaci lipidů pěnových buněk odvozených z makrofágů a brání tím vzniku plátu, zpomalují progresi plátu a iniciují ubývání plátu pomocí zpětného transportu cholesterolu k HDL. Tato sloučeniny jsou využitelné při léčbě kardiovaskulárních onemocnění, jako např. aterosklerosy, onemocnění koronárních tepen, renálních onemocnění, trombosy, krátkodobé ischemie způsobené sraženinou, mrtvice, infarktu myokardu, orgánových transplantací, odmítnutí organu a hypercholesterolemie.

V dokumentech WO 94/21652⁴⁰ a HU 212 105⁴¹ jsou popsány organotitaničité sloučeniny obecného vzorce

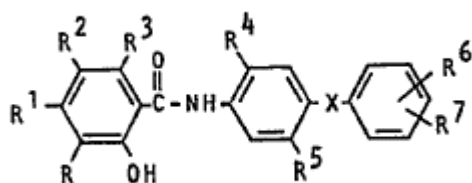


kde R znamená salicylanilidátovou skupinu a X atom chloru nebo ethoxyskupinu. Sloučeniny inhibují růst tumorů, oslabují stupeň imunosuprese, jsou využitelné pro léčbu pevných tumorů, zejména melanomů a rektálních tumorů.

4.3.4 Další nemedicínské indikace

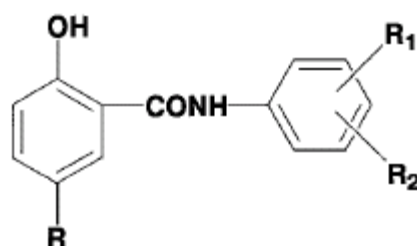
Při rešerši byly nalezeny i dokumenty popisující využití salicylanilidů mimo oblast medicíny. Acylaminosalicylanilidy popsané v dokumentu DE 196 26 311⁴² nacházejí uplatnění jako prostředek proti škůdcům.

V dokumentu EP 0 104 677⁴³ je uvedeno použití salicylanilidů obecného vzorce



, výhodně N-[5-chlor-4-[(4-chlorfenyl)kyanmethyl]-2-methylfenyl]-2-hydroxy-3,5-dijodbenzamid, jako chemického sterilačního činidla hmyzu, kterým je *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans* a *Ceratitis capitata*.

V dokumentu JP 2004250653⁴⁴ je popsána podvodní antivegetativní povrchová úprava obsahující salicylanilidové sloučeniny obecného vzorce



kde R představuje C₁₋₈alkyl a R₁ a R₂ atom vodíku, nitro nebo C₁₋₈alkylskupinu, dále silikonový olej a činidlo regulující rozpouštění.

Kompozice složená z antibiotika griesofulvin a bromsalicylanilidu jako sterilačního činidla rozpuštěné v ethylenglykolmonosalicylátu, která je využívána k vnějšímu ošetření nohou atletů, je popsána v dokumentu GB 1 188 589⁴⁵.

V technické oblasti nacházejí salicylanilidy, zejména 5-chlorsalicylanilid, využití jako barevná vývojka ve směsi s esterem hydroxybenzoové kyseliny⁴⁶. Dále se uplatňují jako přídatná látka v termosenzitivním záznamovém materiálu⁴⁷ nebo v barevném fototermografickém prvku pro scanery⁴⁸.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Databáze patentové literatury

K rešerši na stav techniky, tj. salicylanilidových derivátů a jejich použití, byly využity patentové databáze *esp@cenet*⁴⁹, EPOQUE a databáze spravovaná Úřadem průmyslového vlastnictví⁵⁰. Stav techniky, ve kterém je možné uskutečnit technické řešení, je rozdělen podle Mezinárodního patentového třídění na 8 sekcí označených A až H. Zjednodušeně se jedná o nástroj, který ulehčuje průzkumovým pracovníkům ÚPV provádět rešerše v daném stavu techniky. Je tedy podmínkou, že každé technické řešení obsažené v přihlášce vynálezu, která byla podána na ÚPV, je před jejím zveřejněním zatříděn do příslušné třídy MPT.

Salicylanilidy jsou podle 8. verze MPT zatřídovány do sekce C, třída 07, podtřídy C, skupiny 231, souhrnně pak C07C 231. MPT je tak s výhodou používáno jako kritérium vyhledávání, umožňuje-li to zvolená databáze. Mezi další kritéria vyhledávání lze zahrnout např. klíčová slova, jméno majitele patentu, přihlašovatele či původce, číslo přihlášky vynálezu nebo patentu.

5.1.1 Databáze EPO

Mezi databáze patentové literatury spravované EPO patří *esp@cenet*⁴⁹ a EPOQUE. *esp@cenet* je volně přístupná databáze z webových stránek EPO. V této databázi lze vyhledávat podle kritérií jako jsou klíčová slova, jméno majitele patentu, přihlašovatele či původce, číslo přihlášky vynálezu nebo patentu, MPT a ECLA. Relevantní dokumenty je možné si celé prohlédnout v PDF formátu, vytisknout či je-li to možné i uložit. Naproti tomu EPOQUE je placená databáze, kterou mají k dispozici průzkumoví referenti jak EPO tak i ÚPV a která by byla pro běžného uživatele komplikovanější. Nicméně průzkumovému pracovníku poskytuje řadu komfortních služeb jako je vyhledávání podle zadaného chemického vzorce nebo zvýraznění klíčových slov v textu patentových specifikací.

V obou databázích byla použita klíčová slova „salicylanilide“ a „closantel“. V EPOQUE pak ještě v kombinaci s „preparation“ OR „method“ OR „production“ OR „manufacture“ (termíny, které lze všechny použít v patentové literatuře pro vyjádření způsobu přípravy), nebo MPT „C07D231/02/ic/ec“, kde ic/ec znamená, že vyhledávání proběhlo jak v MPT tak i v ECLA.

5.1.2 Databáze ÚPV

ÚPV stejně jako jiné národní patentové úřady spravují databázi přihlášek vynálezů, patentů a užitných vzorů. Databáze je volně přístupná a pravidelně aktualizovaná o právě zveřejněné přihlášky vynálezů, udělené patenty a zapsané užitné vzory. Stejně jako u databází EPO i zde je možné vyhledávat požadované informace podle kritérií, kterými jsou klíčová slova, číslo přihlášky vynálezu nebo patentu jméno, MPT, majitele patentu, přihlašovatele či původce, nově i podle čísla WO, které se podávají v souladu se Smlouvou o patentové spolupráci – PCT. V této databázi byla použito klíčové slovo „salicylanilid%“ a příslušné MPT.

5.2 Databáze nepatentové literatury

Z databází nepatentové literatury byly využity následující: ScinceDirect⁵¹, scirus⁵² a PubMed⁵³. Pro veřejnost jsou k dispozici jen omezená uspořádání těchto databází, a to v abstraktové verzi. Nicméně i rešerše v nepatentové literatuře dané oblasti techniky patří k povinnostem průzkumného pracovníka ÚPV. V těchto databázích bylo použito klíčové slovo „salicylanilide“.

6. DISKUSE A ZÁVĚR

Z rešerše na přípravu salicylanilidů provedené v patentových databázích vyplynulo, že již od 70-tých let minulého století je nejpoužívanějším způsobem přípravy salicylanilidů reakce kyseliny salicylové a substituovaného anilinu v poloze 4 v chlorbenzenu v přítomnosti PCl_3 . Jedná se pravděpodobně o ča svě i ekonomicky nenáročnou reakci, jelikož zatím v patentové literatuře nebylo předloženo řešení spočívající ve vylepšení stávajícího způsobu přípravy nebo navrhuující zcela nový způsob. Zdá se tak, že inovační způsoby přípravy salicylanilidů nejsou předmětem zájmu výzkumných pracovišť.

Salicylanilidy jsou však využívány jako výchozí látky syntéz jiných sloučenin, jako např. substituovaných tetrazolů, náhodně připravených derivátů benzthiazepinu či thiosalicylanilidů, které pak vykazují jiné nebo podobné účinky jako salicylanilidy, a které jsou dále studovány.

Při rešerši byly nalezeny dokumenty potvrzující již několik let známou antimikrobiální i anthelmintickou aktivitu salicylanilidů. Antimikrobiální aktivita je vykazována jak vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím tak i houbám. Výzkumy jsou zaměřeny spíše na nová využití antimikrobiální aktivity salicylanilidů, jako např. k ošetřování ústní dutiny, jako antimikrobiální složka detergentů, mýdel a kosmetických přípravků, jako složka vodná antibakteriální kompozice využitelné jako čisticí prostředek pro chirurgické nástroje, aseptický prostředek s aplikací na kůži nebo mléko na ruce, nebo jako složka ochranné kompozice pro překližku, založená na aseptickém působení účinné látky kompozice, která snadno penetruje do pletiv dřeva.

Antiparazitární aktivita salicylanilidů byla v dokumentech patentové literatury předmětem zájmu v 70 – 90-tých letech minulého století. V dnešní době předmětem zájmů výzkumných pracovišť příprava kompozic zajišťující vyšší biologickou dostupnost salicylanilidů a nebo přípravy kombinovaných kompozic obsahujících vedle salicylanilidu jedno nebo více jiných antiparazitárních činidel.

Vedle antimikrobiální a anthelmintického účinku salicylanilidů byly v patentové literatuře popsány i jiné medicínské indikace. Jedná se zejména o využití salicylanilidů jako diuretik, inhibitorů transkripčního faktoru NF- κ B využitelných k léčbě zánětlivých a autoimunních onemocnění, antagonistů MSR s využitím v léčbě kardiovaskulárních onemocnění či inhibitorů růstu tumorů. Výzkumná pracoviště se stále snaží prozkoumat případné jiná použití salicylanilidů, zejména s ohledem na zatím terapeuticky nepodchycená onemocnění, jako je např. AIDS.

Salicylanilidy nacházejí uplatnění také jako prostředek proti škůdcům, sterilační činidla hmyzu nebo barevná vývojka v oblasti fototechniky.

Závěrem lze uvést, že salicylanilidy představují skupinu sloučenin s rozmanitým užitím jak v humánní či veterinární medicíně tak i mimo oblast medicíny a proto je s nimi ve výzkumu stále počítáno jako s potenciálními účinnými látkami.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vinšová J., Imramovský A. (2004): Salicylanilidy – stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou. *Česká a slovenská farmacie* **LIII**(6), 294 – 299.
2. Waisser K. et al. (2001): Antimykobakteriální salicylanilidy a 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony. *Česká a slovenská farmacie* **L**(3), 148 – 152.
3. GB 1 183 641 (Merck & Co. Inc.); 11.3.1970: Salicylanilide Derivatives, their preparation and compositions containing them. Str. 3 – 5.
4. GB 1 219 628 (Merck & Co. Inc.); 18.11.1970: Preparation of Salicylanilides derivatives. Str. 4.
5. GB 1 219 500 (Merck & Co. Inc.); 13.1.1971: Preparation of Salicylanilides derivatives. Str. 5.
6. CS 149651 (Earl Martin Chamberlin, Westfield); 20.11.1072: Způsob výroby halogenovaných derivátů salicylanilidu. Sloupec 8.
7. WO 99/65449 (SmithKline Beecham Corporation); 23.12.1999: Inhibitors of Transcription Factor NF- κ B. Str. 6.
8. US 2003/0092771 (GlaxoSmithKline); 15.5.2003: Inhibitors of Transcription Factor NF- κ B. Str. 3.
9. US 2006/0035979 (GlaxoSmithKline); 16.2.2006: Inhibitors of Transcription Factor NF- κ B. Str. 3.
10. GB 2 247 884 (Chanelle Chemicals Limited); 18.3.1992: Manufacture of a salicylanilide derivative. Str. 4 a 9.
11. IE 63471 (Chanelle Chemicals Limited); 19.4.1995: Manufacture of a salicylanilide derivative. Str. 4 a 9.
12. WO 2004/026821 (The Procter & Gamble Company); 1.4.2004: Non-halogenated Antibacterial Agents and processes for making same. Str. 15 – 16.
13. EP 0 150 719 (Bayer AG); 15.10.1986: Sustituierte Salicylsäureamide, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung als Arzneimittel. Str. 2 – 3.

14. GB 1 185 539 (T.J.Smith & Nephew Limited); 25.3.1970: Substituted Tetrazoles. Str. 1-18.
15. Imramovský A. et al. (2006): Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings. *Tetrahedron Letters* **47**, 5007 – 5011.
16. CZ 297 581 (Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové; Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická); 10.1.2007: Antimykotická a antimykobakteriální thiosalicylanilidy a způsob jejich přípravy. Str. 1 a 8.
17. US 4 310 682 (Isao Ozawa et al.); 12.1.1982: Halo-salicylanilide. Sloupce 1 – 10.
18. WO 01/60157 (The Procter and Gamble Company); 23.8.2001: Antibacterial Agents and Compositions, Methods and Systems Employing Same. Str. 1, 2, 11, 12, 14.
19. JP 7048238 (Colgate Palmolive Co.); 21.2.1995: Composition for Oral Cavity Containing Salicylanilide Antibacterium Agent. Abstrakt.
20. JP 10182383 (Lion Corp.); 7.7.1998: Composition for Oral Cavity. Abstrakt.
21. JP 11310522 (Sunstar Inc.); 9.11.1999: Composition for Application to Oral Cavity. Abstrakt.
22. US 3 968 210 (Ciba-Geigy Corporation); 6.7.1976: Synergistic Germicidal Compositions containing 3,5-Dimethyl-4-chlorophenol. Abstrakt
23. US 3 956 510 (Molnar Nicholas M.); 11.5.1976: Certain mixed antibacterials. Abstrakt.
24. JP 55098102 (Yoshitomi Pharmaceutical); 25.7.1980: Plywood Preservative for Compounding with Adhesive. Abstrakt.
25. JP 63108009 (Toyo Boseki); 12.5.1988: Antigungal Polymer. Abstrakt.
26. GB 1 493 375 (Imperial Chemical Industries Limited); 30.11.1977: Salicylanilide Derivatives. Str. 1 – 23.
27. GB 1 413 226 (Hoechst Aktiengesellschaft); 12.11.1975: Trifluoromethyl-salicylanilides and Process for Preparing Them. Str. 1 – 10.

28. US 3 914 418 (Merck & Co. Inc.); 21.10.1975: Methods of Controlling Liver Fluke Infections. Abstrakt.
29. GB 1 472 385 (Merck & Co. Inc.); 4.5.1977: Rafoxanide Formulations. Str. 1 – 5.
30. US 3 927 071 (ICI Australia Limited); 16.12.1975: Salicylanilides. Sloupec 1 – 8.
31. US 5 840 324 (Commonwealth Scientific and Industrial Organisation); 24.11.1998: Parasitical compositions. Sloupec 1 – 4.
32. WO 03/072113 (Norbrook Laboratories Limited); 4.9.2003: Long Acting Parasitocidal Composition Containing a Salicylanilide Compound, a Polymeric Species and at Least One Other Anti-parasitic Compound. Str. 6 – 11.
33. WO 2005/007241 (Norbrook Laboratories Limited); 27.1.2005: Parasitocidal Composition. 1 – 16.
34. GB 1 537 929 (Janssen Pharmaceutica N.V.); 10.1.1979: Salicylanilide derivatives. Str. 1 – 4.
35. BE 748418 (Hoechst AG); 2.10.1970: Gamma-resorcylic acid anilides anthelmintic agents. Abstrakt.
36. RU 2 112 508 (Piskov Vjacheslav Borisovich); 10.6.1998: Method of Treatment and Prophylaxis of Sarcoptoidosis in Animals. Abstract.
37. GB 1 185 458 (Beiersdorf Aktiengesellschaft); 25.3.1970: Salicylanilide Derivatives. Str. 1 – 4.
38. US 6 255 298 (SmithKline Beecham Corporation); 3.7.2001: Macrophage Scavenger Receptor Antagonists for Use in the Treatment of Cardiovascular Diseases. Sloupec 1 – 10.
39. WO 99/07382 (SmithKline Beecham Corporation); 18.2.1999: Macrophage Scavenger Receptor Antagonists for Use in the Treatment of Cardiovascular Diseases. Str. 1 – 21.
40. WO 94/21652 (Nitrokémia Ipartelepék); 29.9.1994: Novel Titanium Compounds Inhibiting Tumour Growth, Pharmaceutical Compositions Containing Them and Process for Preparing Same. Str. 1 – 7.

41. HU 212 105 (Nitrokémia Ipartelepék); 28.2.1996: Novel Titanium Compounds Inhibiting Tumour Growth, Pharmaceutical Compositions Containing Them and Process for Preparing Same. Abstrakt.
42. DE 196 26 311 (Bayer AG); 23.10.1997: Acylaminosalicylsäureamide. 1 – 68.
43. EP 0 104 677 (Janssen Pharmaceutica N.V.); 4.4.1984: Chemical Sterilisation of insects with salicyl anilides. 1 – 16.
44. JP 2004250653 (API Corp.); 9.9.2004: Underwater Antifouling Coating. Abstrakt.
45. GB 1 188 589 (Takeda Chemical Industries, Ltd.); 22.4.1970: Pharmaceutical Composition for External Application and a Method for Production Thereof. Str. 1 – 5.
46. JP 59124885 (Ricon KK); 19.7.1984: Heat-Sensitive Recording Material. Abstrakt.
47. JP 2001010237 (Mitsubishi Paper Mills Ltd.); 16.1.2001: Thermosensitive Recording Material. Abstrakt.
48. EP 1 113 316 (Eastman Kodak Company); 4.7.2001: Imaging Element Containing a Blocked Photographic Developer. Abstrakt.
49. <http://ep.espacenet.com>
50. www.upv.cz
51. www.sciencedirect.com
52. <http://www.scirus.com>
53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>