

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra anorganické a organické chemie**

# **Syntéza salicylanilidových proléčiv**

**Diplomová práce**

**2008**

**Martin Krátký**

Prohlašuji na svou čest, že tato diplomová práce je mým původním dílem, které jsem vypracoval sám. Veškeré použité informační zdroje a literatura jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne 12. 5. 2008

Na tomto místě bych chtěl velice rád poděkovat vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Jarmile Vinšové, CSc., za odborné vedení, pomoc při sepisování této práce a celkově za její vysoce profesionální přístup, podnětné rady, návrhy a připomínky.

Zároveň bych chtěl poděkovat osazenstvu laboratoře č. 2111 za přátelské a podnětné prostředí, za trpělivost a pomoc při zvládnutí vybraných metod práce v chemické laboratoři.

## Anotace

KRÁTKÝ, Martin. *Syntéza salicylanilidových proléčiv*. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta University Karlovy, 2008. 75 s. Diplomová práce.

Diplomová práce se zabývá syntézou antimykobakteriálních proléčiv na bázi esterů salicylanilidů s aminokyselinami. Nejprve charakterizuje proléčiva, jejich význam a sumarizuje popsané biologické účinky a využití salicylanilidů. Hlavním cílem práce byla příprava proléčiv esterifikací salicylanilidů s aminokyselinami. Některé připravené látky byly zhodnoceny z hlediska účinku zejména vůči atypickým mykobakteriím. Připravené deriváty jeví antimykobakteriální aktivitu, která je však nižší než u výchozího 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamidů.

Diplomová práce potvrzuje existenci přesmyku po uvolnění  $\alpha$ -aminoskupiny esteru *Z*-aminokyseliny a salicylanilidů za vzniku látek se dvěma amidickými vazbami. Takto vzniklý diamid byl podroben esterifikaci se *Z*-aminokyselinami (L-Phe a Gly), odbourání *N*-protektivní skupiny a uvolnění aminoskupiny. Zdá se, že při uvolnění aminoskupiny pravděpodobně probíhá obdobný přesmyk jako při formování diamidů za vzniku triamidů. Jsou diskutovány dva navržené mechanismy těchto přesmyků – přes sedmičlenný benzoxazepindionový cykl nebo přes pětičlenný hydroxyimidazolinon, přičemž se na základě nově zjištěných okolností, ke kterým tato diplomová práce přispěla, přiklání k druhé možnosti. Výsledky práce naznačují, že tento přesmyk by mohl být obecně probíhající reakcí esterů salicylanilidů s  $\alpha$ -aminokyselinami.

### Klíčová slova:

Salicylanilidy, biologická aktivita, antimykobakteriální aktivita, estery aminokyselin, proléčiva, přesmyk.

## Annotation

KRÁTKÝ, Martin. *Synthesis of Salicylanilide Prodrugs*. Hradec Králové: Faculty of Pharmacy of Charles University, 2008. 75 pp. Diploma Thesis.

This diploma thesis is concerned with synthesis of antibacterial prodrugs based on esters of salicylanilides with amino acids. First there are characterized prodrugs and their importance and then biological activities and application of salicylanilides. The main goal of this work was the synthesis of prodrugs of salicylanilides amino acids esters. Some synthesized compounds were evaluated especially for their activity against atypical *Mycobacteria* strains. These compounds possess antimycobacterial activity, but it is lower than initial salicylanilide 5-chloro-*N*-(3-chlorophenyl)-2-hydroxybenzamide.

This diploma thesis acknowledges rearrangement after *N*-deprotection and  $\alpha$ -amino group liberation of *N*-protected amino acids esters with salicylanilides to furnish diamides. The diamide was esterified by *Z*-amino acids (L-phenylalanine and glycine). These obtained esters were *N*-deprotected and the amino group was liberated. After this liberation there was described rearrangement to furnish probably triamides, analogously to furnishing of diamides. There are discussed two possible mechanisms of rearrangement – with forming of seven-membered benzoxazepinedione rings or with five-membered hydroxyimidazoline intermediates. The second version is considered to be more probable because of new knowledge. This diploma thesis contributed to these findings. It seems that this type of rearrangement could be generally a running reaction of the esters of salicylanilides with  $\alpha$ -amino acids.

### Keywords:

Salicylanilides, biological activity, antimycobacterial activity, amino acids esters, prodrugs, rearrangement.

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2. Teoretická část – proléčiva</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Charakteristika proléčiv</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Rozdělení proléčiv podle účelu</b>	<b>11</b>
2.2.1. Prekursory se zvýšenou rozpustností ve vodě	12
2.2.2. Prekursory se zlepšeným vstřebáváním	12
2.2.3. Prekursory se specifitější distribucí	12
2.2.4. Prekursory se sníženou toxicitou a redukovanými vedlejšími účinky	13
2.2.5. Prekursory s protrahovaným účinkem	13
2.2.6. Prekursory se zvýšenou stálostí	13
<b>2.3. Příklady proléčiv antibakteriálně účinných látek</b>	<b>13</b>
2.3.1. Sulfonamidy a chloramfenikol	13
2.3.2. Betalaktamy	15
2.3.3. Tetracykliny a makrolidy	17
2.3.4. Antimykobakteriální léčiva (antituberkulóza)	18
<b>3. Cíl práce a jeho teoretická východiska</b>	<b>21</b>
<b>4. Přehled biologické aktivity a použití salicylanilidů</b>	<b>23</b>
4.1. Antibakteriální a antifungální aktivita	23
4.2. Inhibice EGFR tyrosin kinázy	28
4.3. Anthelmintická a antiprotozoární aktivita	30
4.4. Herbicidní aktivita	32
4.5. Další účinky	33
<b>5. Experimentální část</b>	<b>34</b>
5.1. Obecné charakteristiky práce	34
5.2. Jednotlivé syntézy	36
<b>6. Biologické hodnocení vybraných syntetizovaných derivátů salicylanilidu</b>	<b>58</b>

<b>7. Diskuse a závěr</b>	<b>61</b>
<b>7.1. Připravené sloučeniny a postup syntézy</b>	<b>61</b>
<b>7.2. Problematika mechanismu přesmyku</b>	<b>63</b>
<b>7.3. Závěr a shrnutí biologické aktivity připravených derivátů salicylanilidu</b>	<b>68</b>
<b>8. Seznam použitých zkratk</b>	<b>71</b>
<b>9. Literatura</b>	<b>73</b>
<b>Přílohy</b>	<b>76</b>

# 1. Úvod

Deriváty salicylanilidu (*N*-fenyl-2-hydroxybenzamid) jsou skupinou látek vyznačující se širokým spektrem biologických účinků. Již dříve byly využívány jako topická antimykotika<sup>1</sup>, humánní i veterinární anthelmintika a antiprotozoární léčiva. Popsány jsou dále účinky antibakteriální, antimykobakteriální, kdy některé deriváty jeví vysokou aktivitu na kmeny atypických mykobakterií, které jsou rezistentní ke standardní léčbě, a také moluskocidní, antialgální a obecně herbicidní působení.<sup>2</sup> Velký potenciál při léčbě nádorových onemocnění by mohla mít inhibiční aktivita salicylanilidů na tyrosin kinázy spjaté s EGFR.<sup>3,4</sup>

Masivní a ne vždy racionální expozice mikrobiální a fungální populace antibakteriálními chemoterapeutikům a antimykotikům vede u původně citlivých kmenů ke vzniku rezistence. U některých druhů jako methicilin nebo vankomycin rezistentních stafylokoků nebo vankomycin a na aminoglykosidy rezistentních enterokoků tato sekundární rezistence představuje významný klinický problém.<sup>5</sup> Obdobná situace je pozorována u tuberkulózy, kdy byl již v roce 1996 hlášen na evropském kontinentu výskyt multirezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis*<sup>6</sup>, a atypických mykobakterií. Jednu z možností řešení, kromě jiných opatření, přináší právě syntéza a výzkum nových antimikrobně aktivních látek, přičemž salicylanilidy tvoří jednu z velice nadějných skupin.

Předmětem studia salicylanilidů kromě syntéz, účinků v živých systémech a jejich mechanismů jsou vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou a také příprava pro léčiv.



## 2. Teoretická část – proléčiva

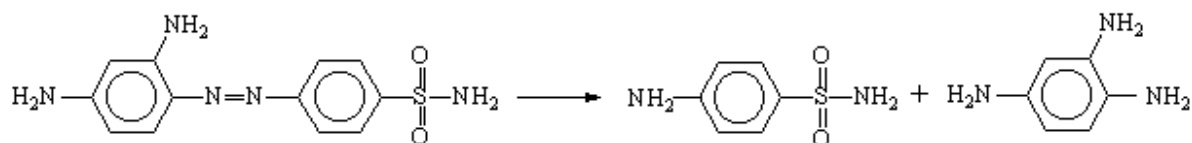
### 2.1. Charakteristika proléčiv

Jedním z úkolů farmacie je vyhledávat nové molekuly využitelné jako potenciální léčiva. Kromě izolace léčivých látek z biologických materiálů (rostliny a houby, živočichové, mikroorganismy) rozeznáváme pět základních způsobů získávání nových léčiv – nahodilý screening, objevování ztraceného, studium chemických obměn známých biologicky aktivních látek, využití kombinatoriální chemie a využití poznatků farmaceutické chemii příbuzných oborů, zejména biochemie, biologie a klinických oborů medicíny.<sup>7</sup>

Při velice frekventně užívaném přístupu obměn struktury se využívá poznatků o isomerii, homologii, analogii a proléčivech.<sup>7</sup>

Proléčiva neboli prekursor léčiv (též profarmaka, anglický termín prodrugs) patří ve farmakoterapii k hojně používaným látkám. Jedná se o obměněnou strukturu biologicky aktivní látky, která je *in vitro* neúčinná nebo jen velmi málo účinná, a farmakologický účinek získá až po aplikaci do biologického systému, nejčastěji metabolickou transformací.<sup>7</sup>

V minulosti byly některé látky zavedeny do praxe, aniž se vědělo, že šlo o proléčiva. Tento poznatek byl získán až během klinického používání. Příkladem může být Domagkův Prontosil, zavedený do terapie roku 1935, jakožto prekursor antibakteriálně účinného sulfanilamidu, na který se v organismu přeměňuje metabolickou redukcí azoskupiny.<sup>7</sup>



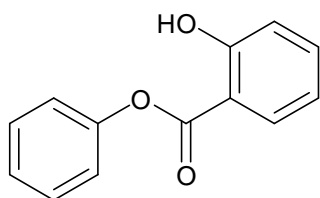
Obr. 2.1. Metabolická přeměna Prontosilu na sulfanilamid a benzen-1,2,4-triamin

Prvním záměrně navrženým proléčivem bylo urinární antiseptikum methenamin (hexamethylentetramin, urotropin; 1894), jež v kyselém prostředí uvolňuje amoniak a účinný formaldehyd.<sup>7</sup>

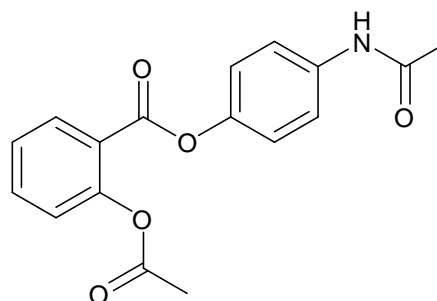
Od sedmdesátých let 20. století až do současnosti je hlavním cílem přípravy proléčiv změna některých vlastností mateřského léčiva, které se jeví jako nevhodné, za účelem jejich posunu požadovaným směrem. Můžeme tak ovlivňovat rozpustnost,

vstřebávání, distribuci, případnou toxicitu apod. Jde zpravidla o cílené a záměrné změny a úpravy na základě moderních poznatků přírodních věd, nikoli o náhodné objevy.<sup>7</sup>

Přípravu a funkci proléčiv jakožto reversibilních derivátů je možné přirovnat k použití chránících skupin při chemických syntézách. Jedná se o zásah do základní struktury molekuly léčiva připojením netoxických chránících (protektivních) a modifikujících skupin, které po určitou dobu mění fyzikálně – chemické vlastnosti žádoucím směrem. Před vlastním farmakodynamickým efektem dojde k odštěpení této chránící skupiny za uvolnění vlastního léčiva. Proléčivo však může vzniknout i kombinací dvou molekul léčiv. Takovým příkladem může být antibiotikum sultamicilin (ampicilin + sulbaktam), desinficiens salol (salicylová kyselina + fenol) nebo analgetikum – antipyretikum benorilát (acetylsalicylová kyselina + paracetamol).<sup>7,8</sup>



Obr. 2.2. Salol



Benorilát

Vazba poutající chránící skupinu může být vazbou kovalentní, optimálně snadno hydrolyzovatelnou – např. esterická, amidická, etherická, acetalová nebo poloacetalová. Mezi proléčivy nacházíme organické sloučeniny typu Schiffových či Mannichových bazí, možné je však také využití metabolicky redukovatelných vazeb (např. azoskupina u Prontosilu nebo antirevmatika a léčiva nespecifických střevních zánětů sulfasalazinu). Možný je i vztah komplexní nebo iontový (depotní antibiotikum prokain-benzylpenicilin).<sup>7</sup>

V současné farmakoterapeutické paletě je zastoupeno mnoho proléčiv. Kromě níže uvedených antibakteriálních látek jsou proléčiva v současné praxi využívána např. v následujících skupinách léčiv (podle AISLP<sup>9</sup>):

- psychofarmaka: depotní neuroleptika (estery flufenazin-dekanoát, flupentixol-dekanoát, zuclopentixol-dekanoát), benzodiazepinové anxiolytikum chlordiazepoxid
- analgetika – antipyretika a nesteroidních antirevmatika: aloxiprin (derivát acetylsalicylové kyseliny), prekursor flufenamové kyseliny etofenamát

- léčiva kardiovaskulárního systému: antihypertezivum alfa-methyldopa, betablokátor bopindolol, většina inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu (enalapril, ramipril, perindopril, fosinopril a další), blokátory AT1 receptorů losartan, kandesartan-cilexetil, olmesartan-medoxomil
- vasodilatačně a antianginózně působící nitráty: glycerol-trinitrát, isosorbit-dinitrát, isosorbit-mononitrát
- hypolipidemika: skupina fibrátů (fenofibrát, etofylinklofibrát) a statinů I. generace (lovastatin, simvastatin)
- léčiva GIT: antiulcerózně účinné inhibitory protonové pumpy (omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, esomeprazol), léčiva užívaná při nespecifických střevních zánětech (sulfasalazin), laxativa pikosulfát a bisakodyl, opioidní antidiarhoikum difenoxylát
- vitamíny: provitamíny, což jsou látky, které se v organismu mění na vlastní účinné vitamíny (např. karoteny, panthenol, látky ze skupiny derivátů vitamínů D)<sup>1</sup>
- pohlavní hormony: gestageny norgestimát, desogestrel, medroxyprogesteron-acetát, hydroxyprogesteron-kapronát, lynestrenol, atypický gestagen tibolon, androgeny testosteron-isobutyrylát a undekanoát, estrogeny estradiol-benzoát, valerát, dipropionát, steroidní anabolika nandrolon-dekanoát a fenypropionát
- celkové i lokální kortikoidy: betamethason-propionát a fosfát, hydrokortison-hemisukcinát sodný, butyrát, triamcinolon-acetonid, fluocinolon-acetonid, methylprednison-aceponát, prednikarbát
- další léčiva: antiparkinsonikum levodopa přeměňující se na dopamin, expektorans bromhexin metabolizující se na ambroxol, depotní insuliny, imunosupresivum azathioprin, antivirotikum oseltamivir, cytostatika irinotekan, estramustinfosfát, ifosfamid, cytostatikum a imunosupresivum cyklofosfamid nebo antagonist aldosteronu a diuretikum spironolakton

## 2.2. Rozdělení proléčiv podle účelu

Bylo připraveno velké množství derivátů – proléčiv mateřských molekul, z nichž mnoho našlo uplatnění v klinické praxi. Proléčiva se dělí podle účelu, ke kterému slouží modifikace vlastností, do několika skupin<sup>7</sup>:

- 1) prekursory se zvýšenou rozpustností ve vodě

- 2) prekursory se zlepšeným vstřebáváním
- 3) prekursory se specifitější distribucí
- 4) prekursory se sníženou toxicitou a redukovanými vedlejšími účinky
- 5) prekursory s protražovaným účinkem
- 6) prekursory se zvýšenou stálostí

### **2.2.1. Prekursory se zvýšenou rozpustností ve vodě<sup>7</sup>**

Zvýšení hydrofility je nutné u některých léčiv k lepšímu transportu v organismu a dále u léčiv aplikovaných ve vodných roztocích. Obecně se zvýšení rozpustnosti ve vodě dosahuje jednak na fyzikálně – chemickém základě, jednak zásahem do struktury léčiva a tvorbou proléčiv. Lze využít tvorbu solí, zavedení hydrofilních skupin (hydroxylová, karboxylová, sulfonová, aminová aj.) do molekuly nebo tvorbu proléčiva skládajícího se z původní molekuly a nově zavedeného lehce odštěpitelného hydrofilního fragmentu.

Příkladem takovýchto proléčiv může být hydrokortison-hemisukcinát sodný, „rozpustný menadiol“ nebo prekursor paracetamolu pro injekční podání propacetamol.

### **2.2.2. Prekursory se zlepšeným vstřebáváním<sup>7</sup>**

Zlepšení vstřebávání ve většině případů spočívá ve zvýšení lipofility léčiva, neboť přiměřeně lipofilní látky obecně prostupují biologickými bariérami lépe než hydrofilní. Při nejčastějším prostupu léčiv biomembránami pasivní difúzí prostupuje pouze nedisociovaná forma ionizovatelného léčiva.

Zvýšení lipofility je obecně možné blokováním hydrofilních skupin etherifikací, esterifikací nebo tvorbou amidu s lipofilní molekulou. Také je možné vnést do molekuly fragment zvyšující log *P* (alkyl, alkoxy, halogen a další).

Příkladem mohou být glukokortikoid triamcinolon-acetonid nebo sympatomimetikum, antiglaukomatikum a prekursor adrenalinu dipivefrin.

### **2.2.3. Prekursory se specifitější distribucí<sup>7</sup>**

Specifická distribuce znamená hromadění léčiva v určité tkáni. Je to žádoucí vlastnost zejména u cytostatik. Příkladem mohou být cytostatika estramustinfosfát (terapie hormonálně dependentních nádorů) nebo azathioprin (štěpí se na účinný 6-merkaptopurin v nádorech se zvýšenou aktivitou thioglukosidázy), z jiných léčiv dopaminergní antiparkinsonikum levodopa prostupující hematoencefalickou bariérou.

#### **2.2.4. Prekursory se sníženou toxicitou a redukovanými vedlejšími účinky<sup>7</sup>**

Jedním z hlavních cílů syntézy proléčiv je redukce toxicity a dráždivosti původního léčiva. Lokálně dráždivou aldehydickou skupinu je možno dočasně blokovat tvorbou Schiffových bazí, např. u již zmíněného antiseptika methenaminu nebo hydratací u sedativa chloralhydrátu. Dalším příkladem může být blokáda dráždivé fenolické skupiny acetylací u laxativních proléčiv bisakodylu a oxyfenisatindiacetátu nebo sulfatací u pikosulfátu. Dále sem lze zařadit lokální antimykotikum triacetin uvolňující glycerol a octovou kyselinu nebo analgetikum – antipyretikum aloxiprin, kondenzát acetylsalicylové kyseliny a oxidu hlinitého, který má snížené lokálně dráždivé účinky na GIT.

#### **2.2.5. Prekursory s protražovaným účinkem<sup>7</sup>**

Tyto prekursorů umožňují udržet po delší dobu potřebnou terapeutickou hladinu léčiva. Prolongace účinku se dosahuje tvorbou špatně rozpustných, lipofilních derivátů – nejčastěji solí a esterů. Typicky se jedná o depotní psychofarmaka, hormony nebo antibiotika. Jako příklad mohou sloužit estery estrogenu estradiolu (propionát, dipropionát, valerát, benzoát aj.), antipsychotikum flufenazin-dekanoát nebo dlouhodoběji působící komplexy insulínu se  $Zn^{2+}$  a bílkovinou protaminem.

#### **2.2.6. Prekursory se zvýšenou stálostí<sup>7</sup>**

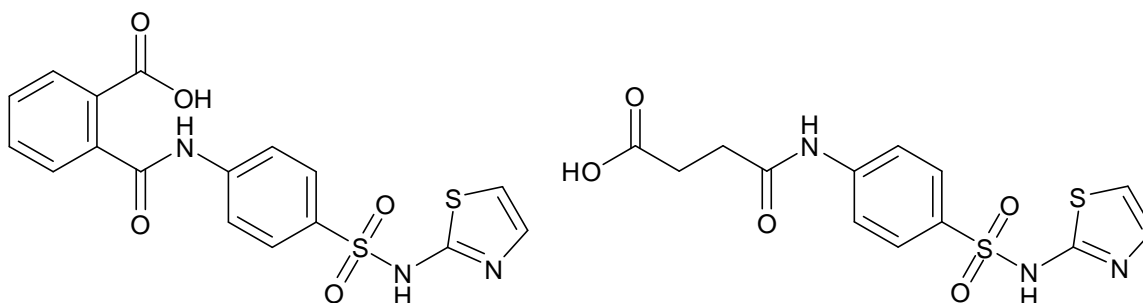
K reakcím dávajícím vznik této skupiny proléčiv patří např. esterifikace primární alkoholické skupiny retinolu (vitamin A) kyselinou palmitovou, čímž je chráněna před oxidací na aldehyd, resp. kyselinu, nebo acetylace fenolické skupiny tokoferolů (vitaminy skupiny E). Dalším příkladem může být stabilizace prostaglandinů, za laboratorních podmínek nestálých kapalin, esterifikací nebo acetalizací.

### **2.3. Příklady proléčiv antibakteriálně účinných látek**

#### **2.3.1. Sulfonamidy a chloramfenikol**

Sulfonamidy byly prvními do praxe úspěšně zavedenými antibakteriálními chemoterapeutiky, dále mají významné antiprotozoární účinky využívané v humánní a zejména veterinární medicíně.<sup>10,11</sup> První prakticky užívanou sloučeninou byl Prontosil, který se *in vivo* metabolizuje na účinný sulfanilamid a benzen-1,2,4-triamin.

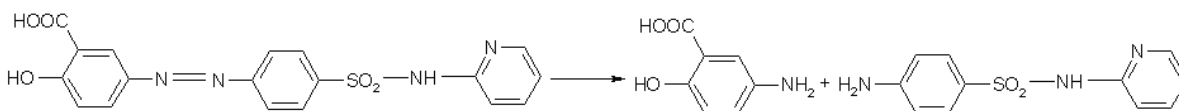
Mezi prolečiva patří  $N^4$ -substituované sulfonamidy. Jelikož nezbytnou podmínkou účinku je volná aminoskupina v poloze 4, lze použít jako prolečiva pouze ty deriváty, které tuto primární aromatickou aminovou skupinu uvolňují. V praxi se dříve při střevních infekcích používaly nevstřebatelné sulfonamidy ftalylsulfathiazol a sukcinylsulfathiazol, které se ve střevě mění redukcí střevními bakteriemi na mateřskou látku sulfathiazol, která zde dosahuje vysokých koncentrací.<sup>11,12</sup>



Obr. 2.3. Ftalylsulfathiazol

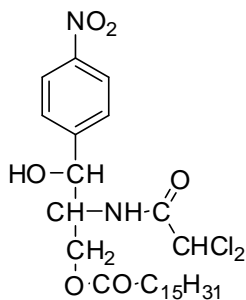
Sukcinylsulfathiazol

Jiným příkladem je sulfasalazin, adukt sulfapyridinu a 5-aminosalicylové kyseliny, užívaný při revmatoidní artritidě a nespecifických střevních zánětlivých onemocněních. Sulfasalazin se v tlustém střevě rozkládá redukcí štěpením azoskupiny na uvedené účinné látky. 5-Aminosalicylová kyselina působí lokálně protizánětlivě, sulfapyridin působí lokálně antibakteriálně, vstřebaný podíl účinkuje systémově protirevmaticky. Také olsalazid a balsalazid, další látky této farmakoterapeutické skupiny, účinkují jako prolečiva 5-aminosalicylové kyseliny.<sup>11,12</sup>

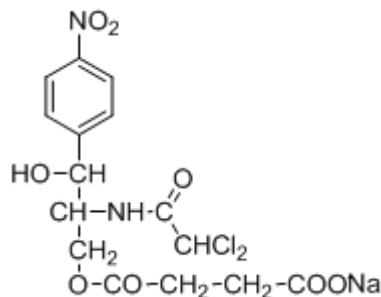


Obr. 2.4. Štěpení sulfasalazinu na 5-aminosalicylovou kyselinu a sulfapyridin

Chloramfenikol, zástupce nepočtené skupiny amfenikolů, byl jedním z prvních širokospektrých antibiotik. Mezi jeho prolečiva patří estery s palmitovou a jantarovou kyselinou. Palmitát byl syntetizován za účelem přípravy perorální suspenze, neboť chloramfenikol-palmitát je velmi málo hydrosolubilní, umožňuje tudíž tvorbu suspenzí a navíc je díky nízkému součinu rozpustnosti maskována intenzivně hořká chuť volného chloramfenikolu. Naopak sodná sůl chloramfenikol-hemisukcinátu je ve vodě velmi dobře rozpustná, což umožňuje aplikaci roztoků injekčně nebo lokálně (oftalmologie).<sup>7,12</sup>



Obr. 2.5. Chloramfenikol-palmitát



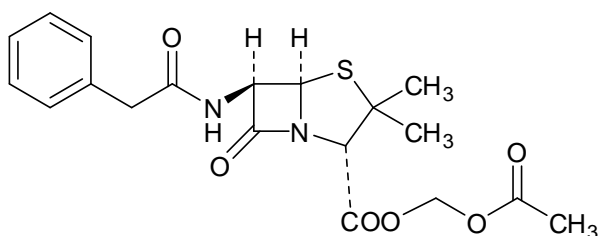
Chloramfenikol-hemisukcinát sodný

### 2.3.2. Betalaktamy

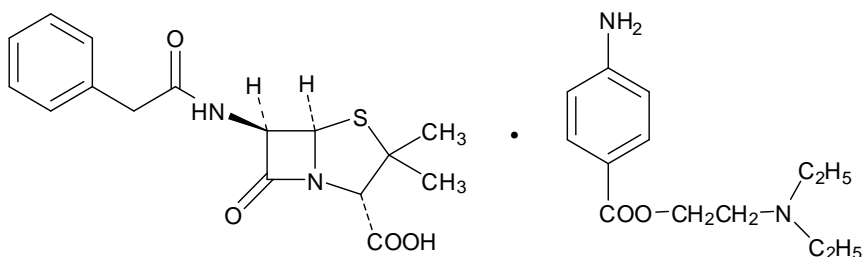
Betalaktamová antibiotika (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy) jsou velice rozsáhlou a terapeuticky rozšířenou skupinou, což odráží i značný počet modifikací struktur včetně proléčiv, kterých bylo připraveno a je využíváno nejvíce mezi nejstarší skupinou penicilinů.

Základním penicilinem je benzylpenicilin (G-PNC), který je však acidolabilní a nelze jej tudíž podávat *per os*. Jednou z možností, jak tuto nevýhodu překonat, je převedení na antibakteriálně neúčinný lipofilní acetyloxymethylester – penamecilin. Penamecilin z velké části prochází žaludkem, resorbuje se ve střevě a rychle se hydrolyzuje zpět na benzylpenicilin. Další výhodou této látky je prodloužení intervalů mezi podáváním (krystalický G-PNC se podává parenterálně po 4 – 6 hodinách, penamecilin po 8 hod).<sup>11,12</sup>

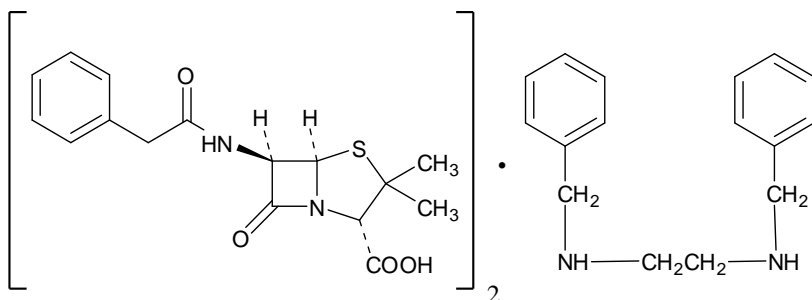
Druhou nevýhodou G-PNC je jeho krátký biologický poločas. Prodloužení doby účinku a tím snížení počtu aplikací bylo dosaženo tvorbou solí s organickými bázemi, které antibiotikum pomalu uvolňují. Používá se prokain-benzylpenicilin, který udrží terapeutickou hladinu po 24 hod, a benzathin-benzylpenicilin udržující dostatečné hladiny po 2 – 4 týdny. Je využívána i jejich kombinace. Obdobně lze použít i benzathinovou sůl perorálně účinného fenoxymethylpenicilinu (V-PNC).<sup>11,12</sup>



Obr. 2.6. Penamecilin

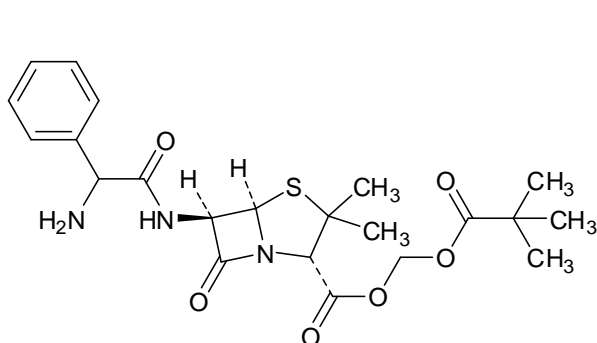


Obr. 2.7. Prokain-benzylpenicilin

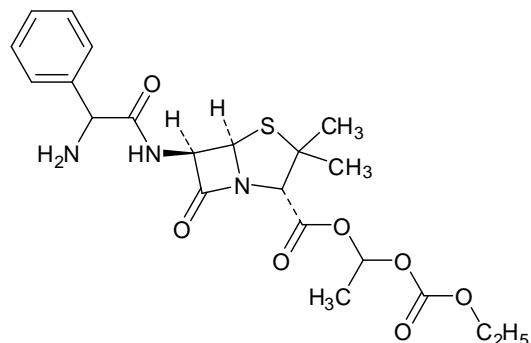


Obr. 2.8. Benzathin-benzylpenicilin

Další modifikovanou látkou je širokospektrý aminopenicilin ampicilin. Jeho pivaloyloxymethylester pivampicilin má výrazně vyšší vstřebatelnost než mateřská látka, na niž se v organismu hydrolyzuje. Obdobné vlastnosti má i bacampicilin, 1-ethoxykarbonyloxyethylester ampicilinu. Kombinací ampicilinu s inhibitorem betalaktamáz sulbaktamem vzniká sultamicilin nejen s lepší vstřebatelností *p.o.* (sulbaktam se sám *per os* nevstřebává, ampicilin omezeně), ale navíc díky inhibici ampicilin hydrolyzujících enzymů betalaktamáz má rozšířené spektrum účinku.<sup>12</sup> Dalším, terapeuticky však nyní v ČR neužívaným proléčivem ampicilinu je hetacilin, kondenzát s acetonem, s vyšší stabilitou pro parenterální podání.<sup>7</sup>

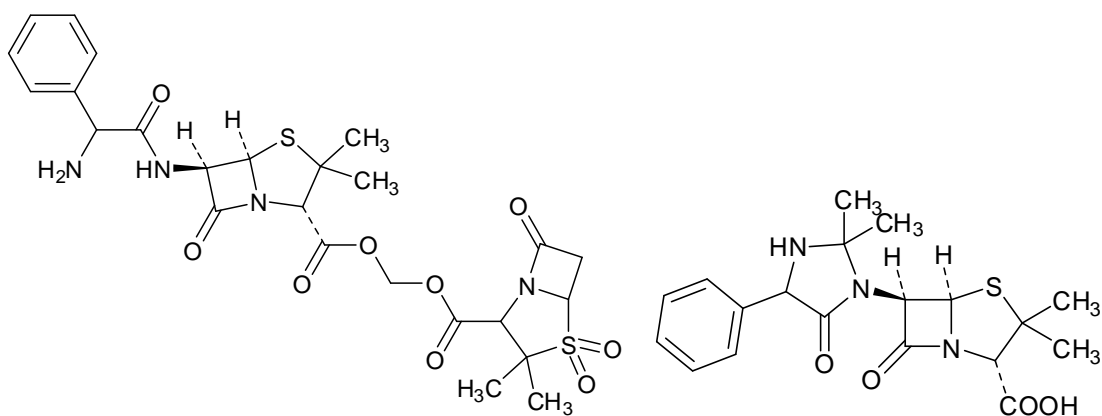


Obr. 2.9. Pivampicilin



Bacampicilin

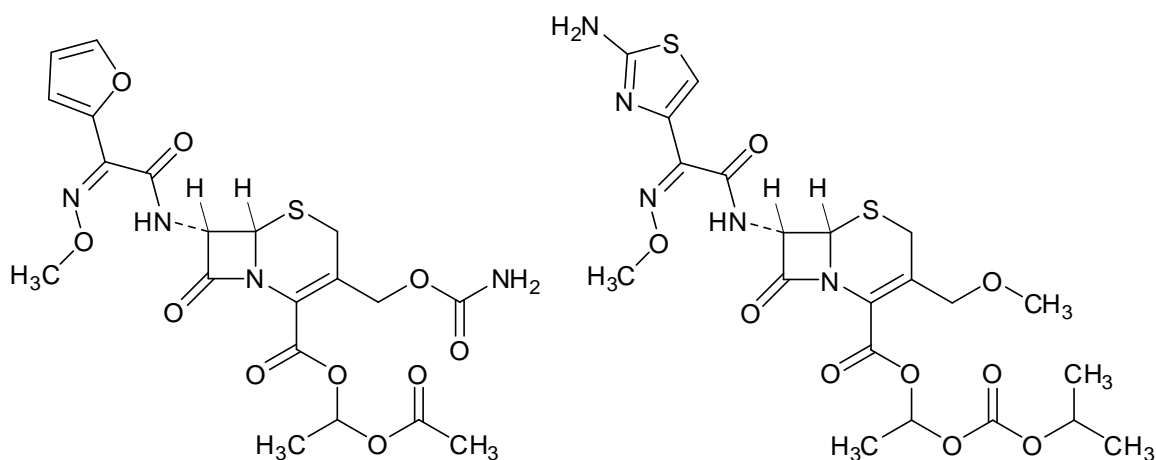




Obr. 2.10. Sultamicilin

Hetacilin

Druhou skupinou betalaktamových antibiotik jsou cefalosporiny. Zde se využívá k obměně zejména esterifikace primárně injekčně podávaných léčiv, vzniklý ester je pak oproti mateřské látce vstřebatelný po *p.o.* podání. Jako příklad mohou sloužit perorální cefalosporiny II. generace cefuroxim-axetil (1-acetoxyethylester cefuroximu), cefpodoxim-proxetil [1-(isopropoxykarbonyloxy)ethylester cefpodoximu]<sup>12</sup> nebo cefetamet-pivoxyl (pivaloyloxymethylester cefetamet) ze III. generace.<sup>11</sup> Tyto estery se po vstřebání hydrolyzují ve střevní stěně na účinný cefuroxim, resp. cefpodoxim a cefetamet.



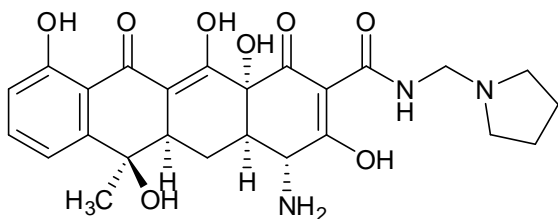
Obr. 2.11. Cefuroxim-axetil

Cefpodoxim-proxetil

### 2.3.3. Tetracykliny a makrolidy

Širokospektrá antibiotika tetracykliny také patří mezi déle užívané látky s množstvím připravených obměn. Příkladem takových obměn mohou být injekčně podávané Mannichovy báze rolitetracyklin, adukt tetracyklinu s formaldehydem a pyrrolidinem, lymecyklin vzniklý reakcí tetracyklinu s formaldehydem a aminokyselinou

lysinem nebo pipacyklin, sloučenina tetracyklinu s formaldehydem a *N*-(2-hydroxyethyl)piperazinem, jež se v organismu rozkládají na uvedené látky.<sup>1</sup>



Obr. 2.12. Rolitetracyklin

Ve skupině makrolidů byly syntetizovány a studovány zejména soli a estery nejstaršího užívaného zástupce erythromycinu. K solím náleží erythromycin-laktobionát pro injekční podání nebo špatně rozpustný stearát k *p.o.* podání. Estery jsou lipofilnější než volná baze erythromycinu, mají lepší biodostupnost. Patří k nim ethylsukcinát a estolát (laurylsulfát erythromycin-propionátu). Dříve se používal oleandomycin a jeho triacetylovaný precursor troleandomycin s lepší biodostupností. Poměrně novým proléčivem je dirithromycin, lipofilní lépe vstřebatelný kondenzát 9(*S*)-erythromycylaminu s (2-methoxyethoxy)acetaldehydem.<sup>12</sup>

#### 2.3.4. Antimykobakteriální léčiva (antituberkulotika)

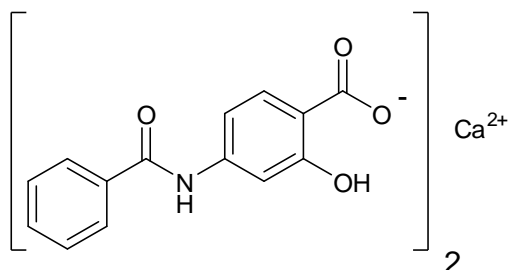
Antituberkulotika jsou chemicky heterogenní skupinou léčiv, neboť tato skupina je vytvořena podle cílového organismu, nikoli podle chemické struktury anebo mechanismu účinku. Jedná se o léčiva účinkující bakteriostaticky nebo baktericidně na druh *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* a tzv. atypická mykobakteria, mezi které se taxonomicky řadí např. *Mycobacterium kansasii*, *fortuitum*, *chelonae*, *marinum*, *xenopi* nebo *M. avium intracelulare complex*.<sup>6</sup>

K antimykobakteriálním proléčivům patří precursor *para*-aminosalicylové kyseliny vápenatá sůl 4-benzamidosalicylové kyseliny (benzoyl-*p*-aminosalicylové).<sup>1</sup> Proléčivo dithofal maskující zápach účinné látky odštěpuje aktivní ethanthiol.<sup>7</sup>

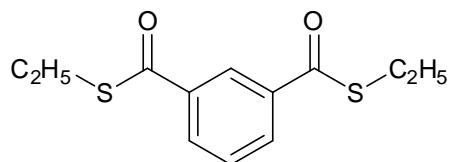
Také jedny z nejužívanějších antituberkulotik pyrazinamid a isoniazid (INH) je možno považovat za proléčiva. Pyrazinamid se v buňkách hydrolyzuje v mírně kyselém prostředí pyrazinamidázou na pyrazin-2-karboxylovou kyselinu, INH na isonikotinovou kyselinu, které v buňce ovlivňují syntézu mykolových kyselin, tvořících základní složku buněčné stěny mykobakterií.<sup>12</sup> Novější výzkumy ukázaly, že INH vstupuje pasivní difúzí do mykobakteriální buňky, kde je aktivován specifickým bifunkčním O<sub>2</sub>-dependentním

enzymem s katalázovou a peroxidázovou aktivitou (KatG, kódovaný genem *katG*) na vysoce reaktivní deriváty s baktericidní aktivitou (superoxidové, peroxidové, acylperoxidové, hydroxylové, isonikotinoylové, pyridylové radikály, isonikotinový aniont aj.). Tyto deriváty jednak blokují syntézu mykolových kyselin, fosfolipidů, DNA a proteosyntézu, jednak způsobují nahromadění sacharidů a fosfátových esterů. INH interferuje též s metabolismem nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD), neboť je do jeho struktury inkorporován místo nikotinamidu. Vzniklý pseudo-NAD nemůže plnit funkci elektronového akceptoru, čímž mimo jiné brzdí energetický metabolismus i reparaci DNA. Navíc metabolity isoniazidu inhibují InhA, enzym nutný k prodlužování mastných kyselin při syntéze mykolových kyselin. Následný deficit mykolových kyselin vede ke ztrátě odolnosti buněčné stěny vůči kyselinám.<sup>13</sup>

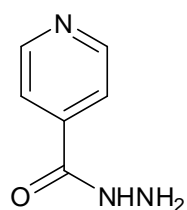
Od isoniazidu je kondenzací se sacharidem odvozen hydrofilnější prekursor se sníženou dráždivostí glykoniazid.<sup>7</sup> Jako proléčivo INH byl připraven i iproniazid. Při jeho používání se ukázalo, že navíc působí antidepresivně, což je způsobeno inhibicí enzymu monoaminoxidázy.<sup>12</sup>



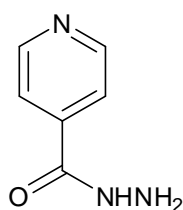
Obr. 2.13. Benzamidosalicylan vápenatý



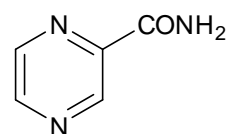
Dithofal



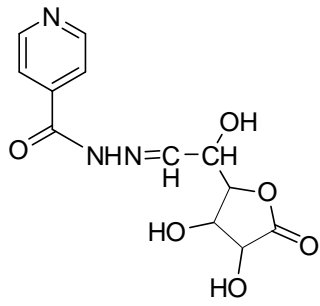
Obr. 2.14. Isoniazid



Iproniazid



Pyrazinamid

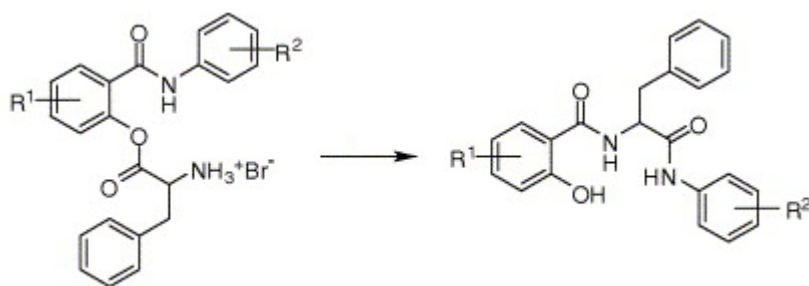


Obr. 2.15. Glykoniazid

### 3. Cíl práce a jeho teoretická východiska

Jednou ze slibných možností modifikace fyzikálně – chemických a tím i biologických vlastností salicylanilidů je jejich esterifikace aminokyselinami za vzniku proléčiv. Předpokládá se možný targeting a snížení nežádoucích účinků, přičemž volbou aminokyseliny či krátkých peptidů lze cíleně ovlivnit konkrétní lipofilně – hydrofilní charakter proléčiva.<sup>2</sup> Příprava těchto esterů, kdy reaguje fenolický hydroxyl salicylové části s *N*-chráněnou aminokyselinou (nechráněné aminokyseliny nereagují), sleduje dočasným blokováním fenolické skupiny zlepšení fyzikálně – chemických vlastností, zejména rozpustnosti, snížení toxicity a modifikaci transportu v organismu. V organismu je pak takovéto proléčivo odbouráno na vlastní účinný salicylanilid a zcela netoxickou aminokyselinu.<sup>14</sup>

Tímto přístupem se zabývá také skupina doc. J. Vinšové. Při esterifikaci salicylanilidů *Z*-glycinem a *Z*-L-alaninem byl oproti ostatním *Z*-aminokyselinám pozorován překvapivý vznik sedmičlenného benzoxazepinového cyklu při současném odštěpení benzylalkoholu. U dalších reagujících *Z*-aminokyselin vznikají požadované estery salicylanilidu s příslušnou *Z*-AMK. Při acidolytickém odbourávání *N*-chránící skupiny bromovodíkem v bezvodé kyselině octové, neboť hydrogenace na palladiu vedla ke směsici produktů, vzniká hydrobromid příslušného esteru, kdy se proton aduje na uvolněnou  $\alpha$ -aminoskupinu esteru za vzniku amoniové soli. Uvolněním aminoskupiny působením triethylaminu ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) v bezvodých podmínkách vzniká překvapivě místo očekávaného „volného“ esteru dvojitý amid (diamid) bez volné aminoskupiny a naopak s volnou fenolickou skupinou, což bylo s jistotou prokázáno pomocí metod fyzikální organické chemie.<sup>14</sup>



Obr. 3.1. Schéma vzniku diamidu při uvolnění  $\alpha$ -aminoskupiny esteru substituovaného salicylanilidu s L-fenylalaninem pomocí triethylaminu (převzato a upraveno podle článku „Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings“<sup>14</sup>)

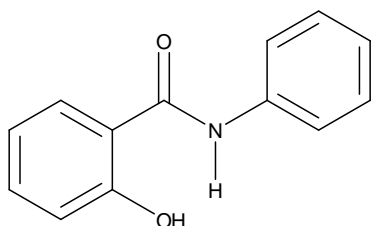
Cílem této diplomové práce byla příprava salicylanilidových proléčiv na bázi esterifikace s aminokyselinami. Výchozí látkou byl 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid jakožto vysoce antimykobakteriálně aktivní sloučenina, která byla podrobena esterifikaci s *Z*-L-valinem (valin je lipofilní neutrální aminokyselina), odbourání chránící skupiny, uvolnění aminoskupiny valinu, čímž přesmykem vznikl diamid. K potvrzení existence a mechanismu výše nastíněného přesmyku byl připravený diamid opětovně podroben esterifikaci s *Z*-L-fenylalaninem (opět lipofilní neutrální AMK) a *Z*-glycinem, odbourání chránící skupiny a uvolnění  $\alpha$ -aminoskupiny. Přesmykem by tak měly analogicky vzniknout příslušné látky se třemi amidickými vazbami (triamidy).

Deriváty připravené ve větším množství byly podrobeny testování na aktivitu vůči mykobakteriím.

Tato práce, její cíle a metodika úzce navazují na doktorandskou výzkumnou činnost a disertační práci Ing. Aleše Imramovského, Ph.D.<sup>15</sup>

## 4. Přehled biologické aktivity a použití salicylanilidů

Salicylanilidy, tj. různě substituované amidy salicylové kyseliny a anilinu, se vyznačují neobyčejně širokým spektrem biologických aktivit.<sup>16</sup> K nejdůležitějším patří antibakteriální účinek včetně antimykobakteriálního, antifungální, antiprotozoární, anthelmintická a herbicidní aktivita. Mnohé z těchto látek jsou v praxi používány již dlouhou dobu. Využití, účinky a některé vztahy chemické struktury a biologické aktivity salicylanilidů známé do roku 2004 přehledně shrnuje článek J. Vinšové a A. Imramovského.<sup>2</sup>



Obr. 4.1. Salicylanilid

### 4.1. Antibakteriální a antifungální aktivita

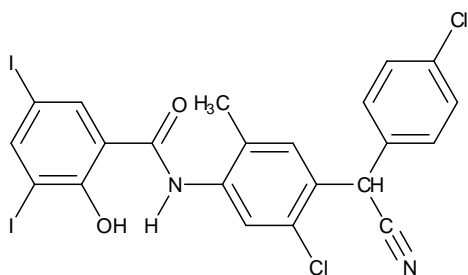
U salicylanilidů je jejich antibakteriální (včetně antimykobakteriální) a antifungální aktivita známa již delší dobu. Skupina prof. K. Waisera připravila velké množství salicylanilidů antimykobakteriálně aktivních *in vitro*, a to zejména proti atypickým mykobakteriím (*Mycobacterium avium*, *M. fortuitum* a *M. kansasii*). Tyto látky svou aktivitou (nižší minimální inhibiční koncentrace – MIC) převyšují běžně užívaná antituberkulotika.<sup>2,17</sup>

V roce 1998 byl navržen nový mechanismus antibakteriálního působení salicylanilidů, který je založen na schopnosti inhibice dvoukomponentových regulačních systémů (TCS) bakterií. Tyto systémy jsou složeny z histidin proteinkinázy (environmental sensing protein) a DNA-vazebného proteinu, který má funkci regulátoru odpovědi. Aktivace nebo represe je dosažena fosforylací z adenosintrifosfátu (ATP), kdy se fosfátová skupina přenesse na specifický zbytek aspartamové kyseliny, regulátoru odpovědi, přes vysoce energetický fosfohistidinový intermediát příbuzné kinázy.<sup>2,18</sup>

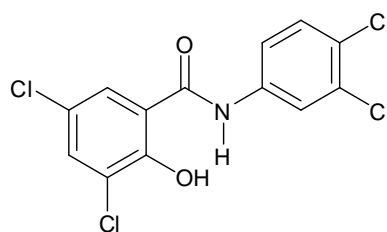
TCS se vyskytují u všech bakterií včetně mykobakterií a některých hub, chybí však v buňkách eukaryotů. V bakteriích je mnoho takových dvoukomponentových systémů,

každý z nich kontroluje transkripci několika genů. Sloučeniny blokující TCS blokují tyto signální cesty a mohou způsobit úhyn citlivých buněk bakterií a hub.<sup>2</sup>

Pro antibakteriální účinek je nezbytný salicylanilidový farmakofor, elektronakceptorový substituent v salicylové části molekuly a hydrofobní substituce v anilidové části. Takto snížená hydrofilita hraje důležitou roli při průniku léčiva lipidickou buněčnou membránou mikroorganismů.<sup>15</sup> Kromě hydrofobicity (hydrofobní substituční konstanta  $\pi$ ) hrají roli i elektronové (Hammettova konstanta  $\sigma$ ) a strukturní parametry.<sup>2,17</sup> Tento nový poznatek o mechanismu účinku byl studován na molekulách closantelu a tetrachlorsalicylanilidu.<sup>2</sup>



Obr. 4.2. Closantel



Tetrachlorsalicylanilid

Salicylanilidy vykazují vysokou aktivitu proti bakteriální patogenům, a to i těm, které díky vzrůstající rezistenci představují čím dál tím větší klinický problém. Jsou významně aktivní vůči gram-pozitivním bakteriím včetně methicilin rezistentním kmenům *Staphylococcus aureus* a vankomycin rezistentního *Enterococcus faecium* (v obou případech se MIC pohybuje v rozmezí 1 – 2  $\mu\text{g/ml}$ ).<sup>2,19</sup>

Jak již bylo uvedeno, pro antibakteriální účinek je nezbytná přítomnost volné hydroxylové skupiny v salicylové části molekuly. Tuto fenolickou skupinu lze dočasně blokovat esterifikací s aminokyselinami (glycin, alanin aj.) nebo kyselinou octovou za vzniku proléčiv, která mají výhodnější fyzikálně – chemické vlastnosti a která jsou v organismu biotransformována na vlastní účinné látky.<sup>16</sup>

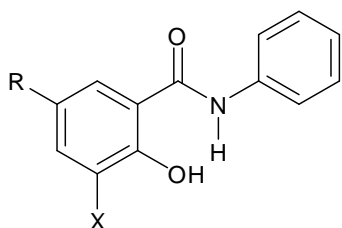
93 analogů salicylanilidu bylo testováno na aktivitu vůči bakteriím *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*<sup>20</sup>, což jsou častí gram-negativní původci komunitních i nosokomiálních infekcí.<sup>6</sup> V jednotně testované koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  vykazovaly salicylanilidy více než 95% inhibici růstu kmenů *E. coli*, ovšem také nulový účinek vůči *P. aeruginosa*.  $\text{EC}_{50}$  pro *E. coli* dosáhla hodnoty 4  $\mu\text{mol/l}$ . Jejich cytotoxicita vůči savcím buňkám linie HeLa byla zhodnocena jako mírná, toxické koncentrace přesahovaly 6  $\mu\text{mol/l}$ . Z hlediska vztahů mezi strukturou a aktivitou bylo zjištěno, že látky se substitucí



halogeny na jednom či obou benzenových kruzích jsou účinné a dobře snášené, osvědčila se chlor a dibrom substituce salicylu, event. salicyl nesubstituovaný, v anilidové části pak účinek zvyšuje mono, di nebo trihalogen substituce, případně nitroskupina, methyl nebo hydroxyl. Jako farmakofor byl v souladu s dalšími zjištěními identifikován amidický můstek s hydroxylem v *ortho* poloze vůči karboxylu. Přítomnost fenoxu, naftoxy nebo benzoyl skupiny v anilidové části vede ke ztrátě účinku, podobně jako náhrada salicylové kyseliny naftoovou kyselinou nebo karbazolovým analogem.<sup>20</sup>

Halogenované salicylanilidy jako např. tribromsalan (3,4',5-tribromsalicylanilid), dibromsalan (4',5-dibromsalicylanilid), metabromsalan (3,5-dibromsalicylanilid) a tetrachlorsalicylanilid (3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilid) našly využití jako antimikrobní látky v kosmetických přípravcích.<sup>2</sup>

Fluorofen (3'-trifluormethyl-3,5-dibromsalicylanilid) byl užíván jako léčivo při infekcích a zánětech periodontu. Vykazoval však fotoalergizující účinek, patrně způsobený přítomností halogenů.<sup>2,21</sup> Proto se zájem přenesl k výzkumu především látek substituovaných v salicylové části. 5-Acylované deriváty salicylanilidu jsou účinnější a rozpustnější. Alkylovaná sulfoskupina pak zvyšuje kyselost fenolického hydroxyly a zároveň lipofilitu molekuly. 5-Alkylsulfonyl deriváty vykazují *in vitro* vyšší aktivitu než tribromsalan proti častým periodontálním patogenům *Actinomyces viscosus* a *Streptococcus mutans*. Mají navíc i protizánětlivé účinky.<sup>2,22,23</sup>



Obr. 4.3. 5-Alkylsulfonylsalicylanilidy; X = -CN, -NO<sub>2</sub>, halogen, nižší halogenovaný alkyl; R = (ne)substituovaný C1-20 alkylsulfonyl

Již před poznáním a popsáním molekulárního mechanismu účinku salicylanilidů na TCS byly na území ČR používány jako lokální nespecificky působící antimykotika nesubstituovaný salicylanilid, užívaný též jako antifungálně účinkující pesticid<sup>24</sup>, a 5-brom-4'-chlorsalicylanilid (*Salifungin liq.*), u kterého byly navíc popsány a terapeuticky využívány antibakteriální účinky.<sup>1</sup>

Série *O*-acetylovaných derivátů salicylanilidu se 4- nebo 5-chlor substituovaným salicylovým jádrem a chlor, brom nebo trifluormethyl substitucí v polohách 3', 4'

anilidové části, příp. ještě acetylované na karboxamidovém dusíku, byla *in vitro* testována na antifungální aktivitu na kmenech osmi běžných humánních houbových patogenů: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigelii*, *T. mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*. MIC testovaných látek v rozpětí 0,49 – 31,25 µg/ml byla konfrontována s MIC vysoce potentního a klinicky široce užívaného triazolového antimykotika flukonazolu. Nejvyšší aktivitu vykazovaly testované sloučeniny proti *Trichosporon mentagrophytes*. Všechny látky dosahovaly nižších MIC než flukonazol u kmenů *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera*, některé měly s flukonazolem shodnou účinnost u *Candida krusei*. Ostatní houbové patogeny byly naopak citlivější na flukonazol. Celkově nejnižší účinnost vykazoval *O,N*-diacetylovaný derivát, z čehož lze vyvodit, že vodík na amidickém dusíku je nezbytný pro antifungální aktivitu.<sup>16</sup>

V rámci této skupiny sloučenin se ukázalo, že optimální antifungální aktivita je spojena s určitým rozsahem lipofility charakterizované hodnotami log *K* (retenční faktor), a to v rozsahu 0,40 – 0,50. Přítomnost bromu a zejména trifluormethylového zbytku v anilidové části účinnost zvyšuje, což potvrzuje fakt, že nejaktivnější molekulou se ukázal 4-chlor-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenylacetát (log *K* = 0,4637).<sup>16</sup>

Stejná série salicylanilidů byla studována *in vitro* na antimykobakteriální aktivitu u kmenů druhů *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii*. Zde byly testované látky porovnávány s MIC široce užívaného antituberkulotika 1. linie isoniazidu. Acetylované salicylanilidy vykazovaly u jednoho kmene *M. kansasii* stejnou účinnost jako isoniazid, u druhého kmene *M. kansasii* a na *M. avium*, obou INH rezistentních, dosahovaly velmi dobré účinnosti. Testovaný kmen *M. tuberculosis* vykazoval vyšší citlivost na standardní isoniazid. Oproti antimykotické aktivitě v tomto případě acetylace amidického dusíku účinnost snížila. 4-Chlor substituce v salicylové části zvyšuje antimykobakteriální aktivitu a naopak snižuje účinnost proti houbám. Účinek pozitivně moduluje i 4' substituce či 3', 4' disubstituce. Antimykobakteriálně nejaktivnějším proti *M. tuberculosis* se jevil 4-chlor-2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)fenylacetát, nejlipofilnější zkoušená látka (log *K* = 0,6053). Vůči atypickým mykobakteriím vykazoval nejnižší MIC (2 – 4 µg/ml), stejně jako u hub, 4-chlor-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenylacetát.<sup>16</sup>

Negativním rysem vysoké antibakteriální a antifungální účinnosti salicylanilidů je jejich cytotoxicita, za kterou vysoce pravděpodobně zodpovídá fenolická skupina salicylu, zároveň klíčová pro aktivitu. Ve srovnání s INH je IC<sub>50</sub> cytotoxického účinku vůči buňkám lidského střevního epitelu (linie HCT-8) *O*-acetylovaných salicylanilidů výrazně nižší,

pohybuje se v rozmezí 0,27 – 60,60 µg/ml – pro zmiňovaný nejaktivnější 4-chlor-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenylacetát to je 12,60 µg/ml, zatímco u INH IC<sub>50</sub> přesahuje 100 µg/ml.<sup>16</sup> *O*-acetylované salicylanilidy tak stále zůstávají relativně cytotoxickými. Prof. Waisser a kol. shrnují<sup>17</sup>, že ačkoli jsou salicylanilidy svou strukturou relativně jednoduché, vykazují široké antimykobakteriální spektrum a jsou strukturně odlišné od jiných užívaných antituberkulotik. Navíc jsou aktivnější proti podmíněně patogenním druhům mykobakterií než bazální antituberkulotikum isoniazid.

Heterocyklickými deriváty salicylanilidů jsou 3-fenyl-1,3-benzoxazin-2,4-diony připravené kondenzací příslušných salicylanilidů s ethylchloroformiátem v pyridinu nebo acetonitrilu. Skupina kolem prof. Waissera připravila velké množství těchto derivátů jako potenciálních antituberkulotik.<sup>25</sup> Ukázalo se, že tyto heterocyklické deriváty jsou méně aktivní než otevřené formy. Pro antibakteriální účinnost se jeví výhodnou přítomnost alespoň dvou halogenových atomů, substituované polohy 2 a 5 na fenylovém zbytku v poloze 3 naopak nejsou pro účinek výhodné.<sup>2</sup>

Zkoumána byla i syntéza, antibakteriální a antifungální aktivita jodsalicylanilidů (4'-jodsalicylanilid, 4-jodsalicylanilid, 5-jodsalicylanilid, 4,4'-dijodsalicylanilid).<sup>2,26</sup> Jako antibakteriální a fungicidní látky byly dále připraveny penta a hexakoordinační sloučeniny cínu a křemíku se salicylanilidy nebo jejich thiosemikarbazony jako ligandy.<sup>2,27</sup> β-Aminoestery salicylanilidů jsou patentovány jako antifungálně aktivní látky.<sup>2</sup>

Antibakteriální a antifungální aktivitu jeví dále heterocyklické analogy salicylanilidů, kdy je základní skelet salicylamidu *N*-substituován místo fenylu (anilin) substituovanými heterocykly (pyridin, pyrimidin, pyrazin, triazol, benzimidazol, thiazol či isoxazol)<sup>28,29</sup>, dále vyšší homology *N*-benzylsalicylamidy<sup>30</sup> či thiosalicylanilidy.<sup>2</sup>

Salicylanilidy dále vykazují aktivitu jako inhibitory proteinové sekrece typu III (T3S) rodu *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*). T3S je nezbytným prvkem pro virulenci a vyskytuje se i u mnoha dalších bakterií, např. z čeledi enterobakterií – *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* spp., enteropatogenních kmenů *E. coli* a dále u *Chlamydia* spp. T3S je nutná k proniknutí do hostitelské buňky a zároveň umožňuje bakterii vyhnout se imunitní odpovědi hostitele. Inhibitory T3S tak snižují virulenci. Prvním popsáním salicylanilidem s tímto účinkem byl 2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4,6-dijodfenylacetát, od něhož byly odvozeny a syntetizovány další analogy. Také zde se ukázalo, že pro biologickou aktivitu je nezbytná hydroxylová nebo acetylovaná skupina. Pokud se ukázal acetylovaný salicylanilid aktivní, deacetylovaný účinkoval též. U acetylovaných derivátů lze nahradit bez ztráty účinku jod

v poloze 6 vodíkem, oproti tomu u neacetylovaných molekul stejná obměna vedla ke snížení aktivity. Záměna obou jodů za vodík vede vždy k poklesu aktivity. Vysoce potentním inhibítorem se ukázal 4'-brom-5-jodsalicylanilid, resp. jeho acetyléster. Při zkoumání salicylanilidů jako inhibítorů T3S kromě její inhibice některé také blokovaly růst bakterií rodu *Yersinia* – především deacetylované struktury, což je v souladu s výše uvedenými zjištěními. Koncentrace nutné k inhibici růstu jsou však vyšší než ty, které stačí k úplné inhibici T3S. Růst je též inhibován u bakterií bez přítomnosti T3S. Deriváty s volnou hydroxylovou skupinou a elektronakceptorovými substituenty v salicylové části (tj. kyselejší) mají schopnost blokovat syntézu ATP rozpojením oxidativní fosforylace, a to snížením protonmotivní síly (elektrochemického gradientu) na mitochondriální membráně. Acetylace hydroxyly umožňuje vyhnout se snížení protonmotivní síly, ačkoli je možné, že se acetylderiváty v organismu metabolizují na deacetylované. Zajímavostí je, že i když *Y. pseudotuberculosis* obsahuje množství TCS, nebylo zatím referováno o vzájemné vazbě mezi TCS a T3S, zatímco toto spojení bylo prokázáno u *Pseudomonas syringae* a *Salmonella spp.*<sup>31</sup>

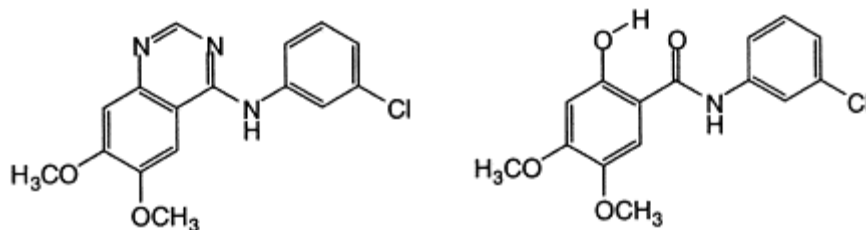
## 4.2. Inhibice EGFR tyrosin kinázy

Tyrosin kinázy jsou bílkovinami nezbytnými k přenosu signálů dovnitř buňky. Jejich vystupňovaná aktivita byla pozorována u některých závažných patologických stavů (např. maligní bujení, psoriáza, restenóza). Mnoho druhů nádorů má dysfunkční (deregulované) protein kinázy spjaté s receptory pro růstové faktory, což může zapříčinit nekontrolovatelnou buněčnou proliferaci. Proto jsou tyrosin kinázy atraktivními molekulami pro zásah potenciálních léčiv působících proti zhoubnému bujení, neboť jejich blokáda může zastavit růst nádoru.<sup>4</sup>

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) patří do rozsáhlé rodiny transmembránových receptorů pro růstové faktory. Je exprimován v řadě různých nádorů epitelálního původu (karcinom prsu, ovarií, nemalobuněčný karcinom plic a další). Inhibitory s EGFR spjatých protein kináz kompetují o vazbu s ATP na katalytickou doménu enzymu. Příkladem mohou být 4-fenylaminochinazoliny, na základě jejichž struktury bylo modelováno místo, kde se váží na receptor.<sup>4</sup>

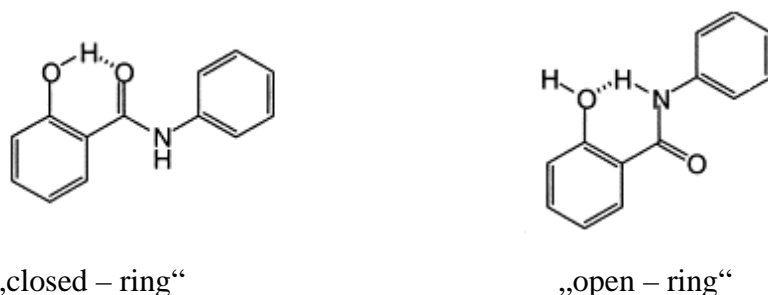
Prokázalo se, že pseudo-šestičlenný kruh salicylanilidů tvořený intramolekulárním vodíkovým můstkem hydroxyskupiny salicyly s karboxamidovým kyslíkem může imitovat

pyrimidinový kruh chinazolinu. Proto se mohou vázat na stejné vazebné místo EGFR jako chinazoliny. Konformace s vodíkovým můstkem na amidickém dusíku se stává významnou při 3 a/nebo 2'/6' substituci.<sup>4</sup>



Obr. 4.4. Srovnání podobnosti 4-fenylaminochinazolinu a „closed – ring“ konformace (vysvětlení viz níže) salicylanilidu<sup>4</sup>

Salicylanilidy mohou existovat ve dvou konformacích. První a dominantní je tzv. „closed – ring“ (uzavřená) s intramolekulárním vodíkovým můstkem z fenolického hydroxyly na karbonylový kyslík, druhá, tzv. „open – ring“ (otevřená), je charakterizována vodíkovým můstkem fenolického hydroxyly na amidický dusík.<sup>4</sup> V přítomnosti anionu, např. dihydrogenfosfátu, dochází u většiny salicylanilidů ke změně konformace na otevřenou, neboť ta díky „přeskupené“ hydroxylové skupině lépe váže aniont, a to přes amidický a hydroxylový vodík a vodík na 2' uhlíku. Naopak u salicylanilidu substituovaného v 4' poloze vysoce elektronakceptorovou (např. kyanidovou) skupinou byla i v přítomnosti dihydrogenfosfátu prokázána převaha konformace typu „closed – ring“, neboť díky snížení elektronové hustoty v anilinovém kruhu nedochází v interakci s aniontem k přeskupení intramolekulárního vodíkového můstku na intermolekulární, aniont je vázán pouze přes dva vodíky (hydroxylový a na 2' uhlíku anilinu). Proto je vazba přes tři vodíky „closed – ring“ konformace stabilnější. Tato zjištění ilustrují, proč je výhodná elektronakceptorová substituce v anilinové části molekuly, neboť usnadňuje a stabilizuje „closed – ring“ konformaci nezbytnou pro aktivitu díky imitaci pyrimidinového cyklu chinazolinu.<sup>32</sup>



Obr. 4.5. Porovnání dvou konformerů salicylanilidu<sup>4</sup>

Pro optimální účinek je třeba v salicylové části nesubstituovaná poloha 3 a substituce elektrondonorovými skupinami v polohách 4 a 5 (methoxyl, hydroxyl aj.). V anilidové části je optimální substituce malým lipofilním a elektronakceptorovým substituentem v poloze 3' (např. chlor) a nesubstituované polohy 2', 4', 5' a 6'. Blokádou (methylace, benzoylace) fenolického hydroxyly díky nemožnosti vytvořit pseudošestičlenný cykl aktivita mizí.<sup>4</sup>

Salicylanilidy se v souladu s uvedenými předpoklady ukázaly být potentními inhibitory EGFR. Nejaktivnější sloučeniny měly  $IC_{50}$  v rozmezí 23 – 71 nmol/l.<sup>4</sup>

Inhibiční účinek na EGFR mají i 4- nebo 5-akryloylaminosalicylanilidy. Salicylanilidy s akrylamidovou skupinou se kromě výše uvedeného mechanismu účinku (isosterická imitace derivátů chinazolinu) jejím prostřednictvím váží mechanismem Michaelovy adice na thiolovou skupinu cysteinu 773 EGFR. Nejúčinnějším se jevil 5-akryloylamino-3'-bromsalicylanilid, kdy při koncentraci 0,01 mol/l vykazoval 76% inhibici EGFR tyrosin kinázy. Opět se ukázalo, že blokáda salicylového hydroxyly (etherifikace) vede ke snížení aktivity. Obdobný efekt má náhrada akrylamidu propionamidem, jenž neposkytuje Michaelovu reakci. Naopak účinnou se ukázala substituce v poloze 3 anilinu objemnými substituenty (fenyl, fenoxyskupina).<sup>3</sup>

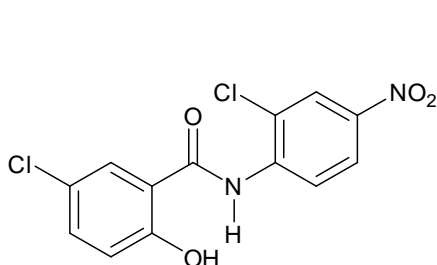
### **4.3. Anthelmintická a antiprotozoární aktivita**

Deriváty salicylanilidu našly uplatnění v humánní i veterinární medicíně jako anthelmintika, zejména jako anticestoda a antitrematoda. Šířeji pojato, patří do skupiny halogenovaných fenolů, z nichž mají vysokou účinnost zejména látky se dvěma benzenovými jádry navzájem spojenými jednočlenným až dvoučlenným řetězcem (–S–, u salicylanilidů –CONH–). Účinek příznivě ovlivňuje bohatá substituce halogenovými a nitroskupinami (2',5-dichlor-4'-nitrosalicylanilid = niklosamid), dále pak má pozitivní vliv zavedení fenoxyskupiny (rafozanid). Za obecný mechanismus účinku halogenovaných fenolů jakožto anthelmintik se uvažuje interakce kyselé fenolické skupiny s bazickými skupinami proteinů helmintů a rozpojení oxidativní fosforylace v mitochondriích parazita.<sup>12</sup> Předností salicylanilidových anthelmintik je jejich nízká toxicita.<sup>2</sup>

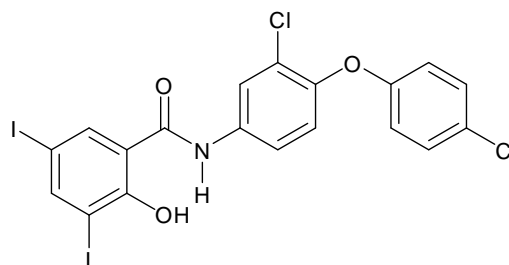
Z prakticky užívaných salicylanilidů se jedná zejména o látky niklosamid a rrafozanid.

Niklosamid je ve vodě nerozpustná látka, obtížně se proto absorbuje z GIT a působí prakticky výhradně intraluminálně. Kromě uvedeného obecného účinku navíc blokuje citrátový cyklus, inhibuje příjem glukózy parazitem a tlumí inkorporaci anorganického fosfátu do ATP.<sup>11</sup> Díky tomuto účinku dojde k depleci energetických zásob a scolex (hlavička tasemnice) se odpojí od stěny střeva a parazit je vypuzen peristaltikou z organismu ven, někdy dojde k jeho natrávení. V humánní medicíně se používá k léčbě infekcí tasemnicemi *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Diphyllobotrium latum*, *Dipylidium caninum*, *Heterophyes heterophyes*, *Mesocestoides variabilis*, účinný je však i proti motolicím, zejména *Fasciola hepatica*, a mírně při nákaze *Enterobius vermicularis*.<sup>33</sup> Nepůsobí však proti vajíčkům. Podává se jednorázově na lačno nebo ráno po snídani v jedné dávce, tablety se rozkoušou. Možná jsou i jiná schémata podávání. Užití laxativa není nutné, doporučuje se však jako prevence vzniku cysticercózy při infekci *Taenia solium*.<sup>11</sup> Nežádoucí účinky nejsou významné, objevují se zejména trávicí potíže. Během léčby se nedoporučuje konzumovat alkoholické nápoje. Dříve se užíval přípravek *Yomesan* tbl.<sup>33</sup>, v současné době není v ČR žádný humánní přípravek registrován, niklosamid je tak využíván pouze v kompozitních přípravcích<sup>9</sup> ve veterinární medicíně k léčbě dipylidiózy a tenióz u koček, psů a dalších masožravců, kteří nejsou určeni pro lidský konzum.<sup>10</sup>

Rafoxanid je užíván pouze ve veterinárním lékařství jako antitreumatodum a anticestodum. Působí na larvy i dospělé, oproti niklosamidu dochází k jeho úplnému vstřebání. Není metabolizován, nežádoucí účinky jsou velmi malé. V ČR se podává pouze spárkaté zvěři, v zahraničí také hospodářským zvířatům. Indikován je k *p.o.* léčbě fasciolóz a cephenemyiázy, působí však i insekticidně proti některým ektoparazitům, např. střečkům.<sup>9,10</sup>

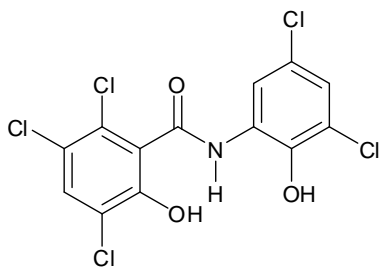


Obr. 4.6. Niclosamid

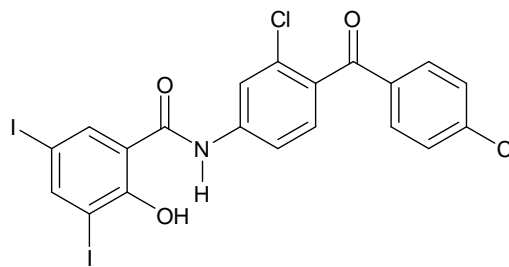


Rafoxanid

Dále lze jako antiparazitika využít oxyklozanid, salantel, closantel či deriváty salicylanilidu s připojenou 5-chlorchinolin-8-oxyskupinou v anilidové části.<sup>2</sup>



Obr. 4.7. Oxyklozanid



Salantel

U closantelu, který má v organismu díky vysoké vazbě na plazmatické bílkoviny velmi dlouhý biologický poločas, se u myších zárodečných a somatických buněk *in vivo* prokázal dávkově závislý klastogenní efekt, tj. schopnost způsobovat poškození (zlomy) chromozómů buněk.<sup>34</sup>

S cílem zvýšit antiparazitární aktivitu analogicky jako u salantelu byly připraveny látky s obměnami v salicylové části molekuly, např. zavedením substituovaného benzoylu do polohy *meta*.<sup>2</sup> Na základě zjištění, že přítomností elektronakceptorové nitroskupiny ve struktuře se zvyšuje anthelmintická aktivita (niclosamid a jeho isomer cestodicid, 2,5'-dichlor-4'-nitrosalicylanilid), byla připravena a studována série derivátů 5-chlorsalicylanilidů s nitroskupinou v poloze 3' a elektrondonorovou skupinou v poloze 4'. Zjistilo se, že anticestodní aktivita proti *Hymenolepis nana* roste u derivátů, které mají větší elektronovou hustotu v poloze 4' díky zavedení cyklické amino- nebo iminoskupiny, nejčastěji ve formě piperidinu.<sup>2,35</sup>

Prakticky využívána je též sodná sůl niklosamidu bayluscid. Je registrována jako herbicid a je také používána ke kontrole rybího parazita mihule mořské (*Petromyzon marinus*), která působí úhyn sladkovodních ryb, zejména v severoamerických Velkých jezerech.<sup>2,36</sup> Jako pesticidy se užívají i piperazinová a 2-aminoethanolová (olaminová) sůl niklosamidu. Kromě uvedené aktivity proti mihulím působí jako moluskocidní látky, zejména vůči vodním šnekům. Ve vodních ekosystémech se nekumulují, jen mírně ovlivňují vodní rostliny, fyto- a zooplankton.<sup>37</sup>

#### 4.4. Herbicidní aktivita

5-Nitrosalicylanilidy s etherifikovanou nebo neutralizovanou (sůl) fenolickou skupinou a s delším substituovaným uhlovodíkovým řetězcem v anilidové části vykazují



vysokou účinnost jako agrochemické mikrobicidy vůči čeledím *Pythiaceae* a *Peronosporaceae*.<sup>2,38</sup>

V Japonsku se jako herbicid při pěstování rýže (*Oryza sativa*) používá 2',5-dichlor-4'-nitrosalicylanilid<sup>2,39</sup>, jehož účinnost je vyšší než u běžně používaných herbicidů ze skupin sulfonamidů, oxyacetamidů a tetrazolinů.

Salicylanilidy substituované výhradně v anilidové části (4'-CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -Br, -Cl, -NO<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 3'-Cl, -NO<sub>2</sub>; 3',4'-Cl) vykazují inhibiční účinek na chloroplasty špenátu setého (*Spinacia oleracea*)<sup>2,40</sup>, přičemž hodnoty IC<sub>50</sub> se pohybují v rozmezí 4 μmol/l (R = 3'-Cl) až 339,8 μmol/l pro R = 4'-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Inhibiční aktivita na fotosyntézu koreluje s Hametovými konstantami δ a hydrofobním parametrem π daných substituentů.

U další série těchto salicylanilidů substituovaných v poloze 5 fluorem, bromem nebo nitroskupinou byla sledována antialgální aktivita proti *Chlorella vulgaris*.<sup>2,41</sup> Neaktivnější sloučeniny vykazovaly IC<sub>50</sub> v koncentracích mezi 2,4 – 5,0 μmol/l, přičemž jejich aktivita opět záleží na hydrofobicitě a elektronových parametrech substituentů.

#### 4.5. Další účinky

1-(2-Hydroxybenzoyl)benzotriazoly vzniklé cyklizací 2'-aminosalicylanilidů s kyselinou dusitou jsou studovány jako aktivátory sodíkových kanálů. Tuto aktivitu vykazují i jejich prekursory 2'-nitrosalicylanilidy.<sup>2,42</sup>

Salicylanilidy substituované alkyly a halogeny v salicylové části molekuly, hydroxyly, alkyly a halogeny v anilidové části a event. alkylované na amidickém dusíku se uplatňují i v průmyslové fotochemii, kde bylo patentováno jejich použití do vývojek barev v textilním průmyslu.<sup>2,43</sup>

Deriváty odvozené od 2,5-dichlorsalicylanilidu tvoří s ionty přechodných prvků (Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>) barevné komplexy. Zajímavé však je, že mají schopnost inhibovat korozi železa způsobenou přítomností kyselých roztoků.<sup>44</sup>

## 5. Experimentální část

### 5.1. Obecné charakteristiky práce

Většina použitých chemikálií byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich, Fluka, Merck a Lachema, nebo připravena přímo v naší laboratoři (např. Z-glycin). Bezvodá rozpouštědla byla vysušena pomocí molekulových sít 4A, příp. bezvodého síranu sodného, a předestilována v suché destilační aparatuře pod  $\text{CaCl}_2$  nebo  $\text{N}_2$ .

Průběh chemických reakcí a čistota výsledných produktů byly kontrolovány za použití tenkovrstvé chromatografie (TLC) pomocí komerčních desek Silufol UV 254 (firma Kavalier nebo Merck). Jako mobilní fáze byly používány soustavy o složení toluen-ethylacetát v poměru 9:1 a toluen-ethylacetát v poměru 4:1; u 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamidů (5,3'-dichlorsalicylanilidů) byla použita také soustava petrolether-ethylacetát (9:1). Látky byly detekovány pod UV lampou při vlnových délkách 254 a 366 nm, volná aminoskupina ninhydrinovou reakcí.

Produkty odbourávání hydrobromidových solí byly čištěny chromatograficky na sloupci silikagelu (Kieselgel 60, Merck). Některé produkty byly přečištěny jednou nebo dvěma rekrystalizacemi z adekvátního vroucího rozpouštědla.

Teploty tání krystalických látek byly stanoveny na Koflerově bloku (firma Nagema) nebo kapilární metodou v přístroji Melting Point B-450 (Büchi) a nejsou korigovány.

Infračervená (IČ) spektra získaných krystalických látek byla měřena laskavostí paní Ivy Vencovské na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v infračerveném spektrofotometru Nicolet Impact 670 v rozsahu  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  v tabletách získaných vysokotlakým slisováním s bromidem draselným (KBr). V přehledu připravených látek jsou uvedeny pouze některé charakteristické vibrace.

NMR spektra byla měřena na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v  $\text{CDCl}_3$  nebo  $\text{DMSO-d}_6$  při laboratorní teplotě na přístroji Varian Mercury Vx BB 300 pracujícím s frekvencí 300 MHz pro  $^1\text{H}$  NMR a při 75 MHz pro  $^{13}\text{C}$  NMR spektra. Chemické posuny jako udány jako hodnoty  $\delta$  v ppm a jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu.

Hmotnostní spektra byla stanovena na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty UK na hmotnostním spektrometru Micromass Quattro Micro API (triple quadrupole, ESCI Ion Source, MassLynx 4.1 software Waters, Česká republika).

Při syntézách bylo postupováno podle obecné metodiky přípravy esterů salicylanilidů s Z-AMK, odbourávání chránící skupiny a uvolňování  $\alpha$ -aminoskupiny publikované nejprve v článku „Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings“<sup>14</sup>, později shrnuté v disertační práci Ing. Aleše Imramovského, Ph.D.<sup>15</sup>

Názvosloví připravených sloučenin bylo vytvořeno podle pravidel IUPAC programem ChemBioOffice 2008 a převedeno do českého jazyka.

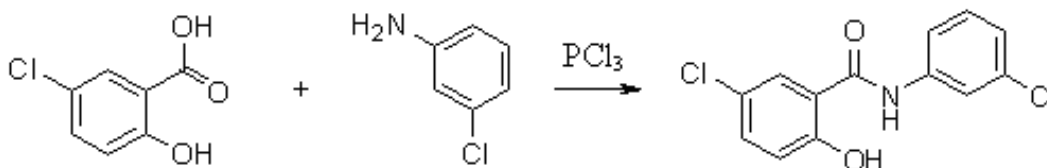
### 5.3. Jednotlivé syntézy

#### 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid

**Sumární vzorec:** C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

**Molekulová hmotnost:** 282,12

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

Ve 400 ml chlorbenzenu bylo za laboratorní teploty rozpuštěno 12,2 g (0,096 mol) 5-chlorsalicylové kyseliny a 16,6 g (0,096 mol) 3-chloranilinu. Pak bylo přidáno 8,3g (5,3 ml; 0,048 mol) PCl<sub>3</sub>. Reakční směs byla umístěna do mikrovlnného reaktoru MicroSYNTH MLS ETHOS 1600 URM, kde se ponechala při výkonu 530 W reagovat 21 minut. Po mírném zchladnutí se reakční směs přelila do Erlenmayerovy baňky a ponechala vykristalizovat. Reakční směs byla ochlazena a krystaly odfiltrovány na Büchnerově nálevce. Filtrát zahuštěn na rotační vakuové odparce (RVO) a opět ponechán krystalizovat. Oba získané podíly byly spojeny a překrystalizovány z vroucího 96 % ethanolu.

**Výtěžek:** 21,2 g (78,2 % teorie)

**Teplota tání:** 223 – 225 °C (EtOH; lit.<sup>45</sup> 222 – 223 °C)

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,49

petrolether-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,25

**IČ spektrum (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

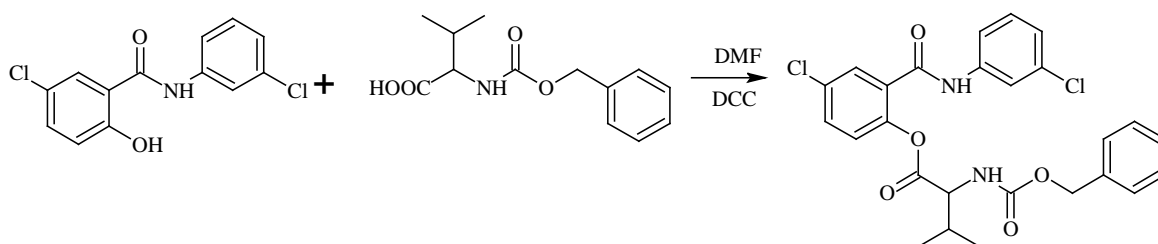
3432, 3092, 1633 (amid I), 1431, 820.<sup>45</sup>

**(S)-4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenyl-2-**  
**(benzyloxykarbonylamino)-3-methylbutanoát**

**Sumární vzorec:** C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Molekulová hmotnost:** 515,39

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

5,03 g Z-L-Val (0,02 mol) bylo rozpuštěno v 90 ml suchého *N,N*-dimethylformamidu (DMF), přidáno 5,64 g (0,02 mol) 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamidu a směs pod chlorkalciovým uzávěrem byla za stálého míchání ochlazená na -10 °C. Za udržování této teploty byl během jedné hodiny do roztoku ve třech částech přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) v mírném nadbytku (4,52 g, tj. 0,022 mol). Po přidání posledního podílu se chlazená reakční směs nechala míchat ještě 1 hodinu. Poté byla nechána 48 hod při teplotě 4 °C. Vyloučená *N,N'*-dicyklohexylmočovina (DCU; M. hm. = 224,35) byla odfiltrována a zvážena. Získáno celkem 3,77 g, tj. 84,0 % teorie. Filtrát byl na RVO zahuštěn do vytvoření medově žluté tekutiny vazké konzistence. Ke směsi přidáno 30 ml ethylacetátu, opět se vyloučila DCU, odfiltrována na fritě. Do filtrátu přidáno 35 ml hexanu, což vedlo k vyloučení krystalů. Ponecháno stát 24 hod při 4 °C, bezbarvé krystaly zfiltrovány a vysušeny.

**Výtěžek:** 6,01 g, tj. 58,3 % teoretického výtěžku

**Teplota tání:** 140 – 141 °C

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,58

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

3330, 2965, 1764 (C=O ester), 1712, 1667, 1592, 1532, 1481, 1424, 1310, 1199, 1104, 896, 781, 752, 700, 530.<sup>15</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ:**

8,21 (1H, bs, NH), 7,82-7,72 (2H, m, H3, H2'), 7,53-7,40 (2H, m, H5, H6'), 7,36-7,28 (4H, m, H5', H3'', H4'', H5''), 7,28-7,20 (2H, m, H2'', H6''), 7,16-7,09 (2H, m, H4', H6), 5,28 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, NH), 5,11 (1H, d,  $J=12,1$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 5,02 (1H, d,  $J=12,1$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 4,39 (1H, dd,  $J=8,0$  Hz,  $J=5,2$  Hz, CH), 2,37-2,17 (1H, m, CH), 1,03 (3H, d,  $J=6,9$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0,93 (3H, d,  $J=6,9$  Hz, CH<sub>3</sub>).<sup>15</sup>

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:**

170,6, 162,8, 156,4, 145,6, 138,6, 135,8, 134,6, 132,2, 132,0, 130,0, 129,9, 129,8, 128,6, 128,3, 128,2, 124,9, 124,3, 120,7, 118,5, 67,4, 59,7, 30,4, 19,2, 17,6.<sup>15</sup>

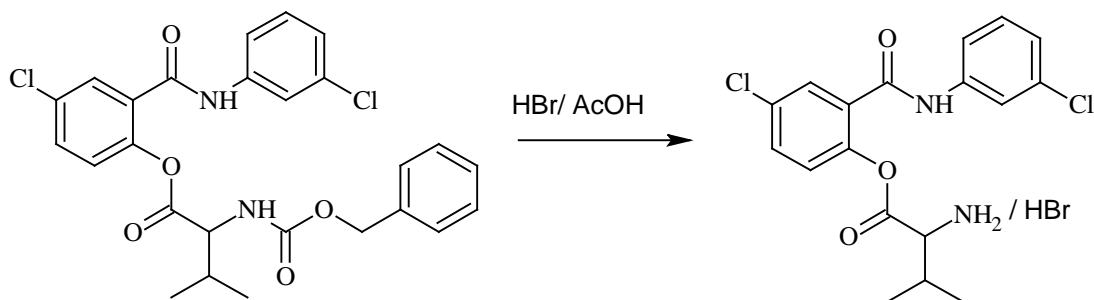
Reakce opakována ve stejných navážkách za výtěžku 5,79 g, tj. 56,2 %.

**(S)-1-[4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenoxy]-3-methyl-1-oxobutan-2-  
amonium bromid**

**Sumární vzorec:** C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Molekulová hmotnost:** 461,39

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

5,46 g (S)-4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-methylbutanoátu (0,0106 mol) bylo vsypáno do baňky a za míchání bylo najednou odměrným válcem přidáno 32 ml 33 % roztoku bromovodíku v kyselině octové. Reakční směs míchána 30 minut do vyčeření žlutohnědého roztoku. Pozorován únik CO<sub>2</sub> z odbourávané chránicí skupiny, bylo proto nutno občas nadzdvihnout uzávěr baňky. Po vyčeření a ukončení míchání bylo přidáno 5 ml diethyletheru (DEE), po 5 minutách další 3 ml DEE. Když se začaly vylučovat bezbarvé krystaly, přidáno ještě 10 ml DEE. Krystaly zfiltrvány na fritě, 2 x promyty 15 ml DEE, 2 x 7 ml sušeného CHCl<sub>3</sub> a opět 2 x 15 ml DEE. Získaná bezbarvá krystalická látka vysušena ve vakuu za laboratorní teploty.

**Výtěžek:** 4,29 g (87,7 % teorie)

**Teplota tání:** 200 – 202 °C

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,00 (sůl)

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

3420, 2969, 1765 (CO ester), 1668, 1593, 1515, 1483, 1422, 1298, 1199, 1107, 777, 677, 539.<sup>15</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ:**

10,77 (1H, bs, NH), 8,54 (3H, bs, NH<sub>2</sub>·HBr), 7,90 (1H, t,  $J=1,8$  Hz, H2'), 7,85 (1H, d,  $J=2,7$  Hz, H3), 7,73 (1H, dd,  $J=8,7$  Hz,  $J=2,5$  Hz, H5), 7,57 (1H, d,  $J=8,7$  Hz, H6), 7,42-7,35 (2H, m, H6', H4'), 7,17 (1H, dd,  $J=8,0$  Hz,  $J=0,9$  Hz, H5'), 4,21 (1H, m, CH), 2,35-2,24 (1H, m, CH), 0,99 (3H, d,  $J=6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0,97 (3H, d,  $J=6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>).<sup>15</sup>

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO) δ:**

167,7, 162,9, 155,3, 145,8, 140,4, 133,2, 131,8, 131,0, 130,7, 129,0, 125,3, 124,0, 119,4, 118,4, 57,6, 29,3, 18,0, 17,9.<sup>15</sup>

Reakce provedena dvakrát za stejných podmínek. Odbourání Z-skupiny realizováno stejně, k vyčeřenému roztoku přidáno 5 ml DEE, po 10 min 3 ml DEE. Když po chvíli začaly vypadávat bezbarvé krystaly, přidáno 5 ml DEE. Tyto krystaly odfiltrovány na fritě, promyty 3 x 15 DEE a zváženy. Získáno 4,15 g, tj. 84,9 % výtěžek.

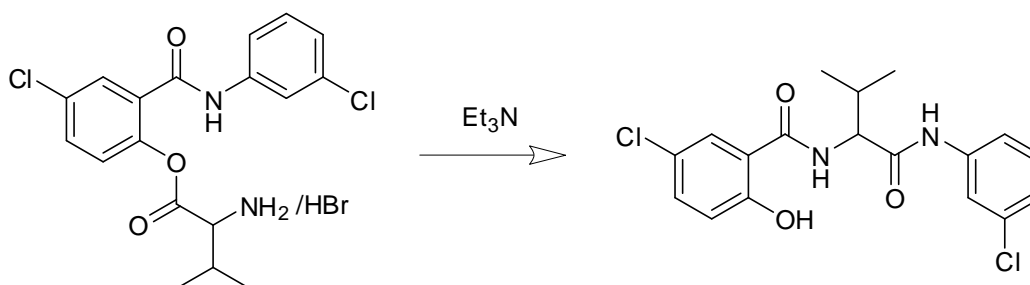


**(S)-5-chlor-N-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid**

**Sumární vzorec:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Molekulová hmotnost:** 381,25

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

1,00 g (S)-1-[4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenoxy]-3-methyl-1-oxobutan-2-amonium hydrobromidu (0,00217 mol) byl rozpuštěn v 18 ml suchého chloroformu. Mikropipetou bylo přidáno 0,2781 ml triethylaminu (0,00206 mol, 95 % ekvimolárního množství hydrobromidu;  $\rho = 0,7225 \text{ g cm}^{-3}$ ) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 30 minut, poté byl odfiltrován nerozpustný podíl. Do filtrátu přidány 4,0 g silikagelu a směs byla na RVO zahuštěna do sucha. Takto připravený vzorek byl dělen na sloupci silikagelu (kolona o průměru 40 mm, náplň 50,0 g silikagelu), a to nejprve elucí 75 ml směsi toluen-ethylacetát (9:1) a následně 365 ml směsi toluen-ethylacetát (4:1). Průběžně byly jímány do zkumavek frakce, ve kterých byl pomocí UV detekce identifikován produkt. Podíly obsahující produkt byly spojeny, na RVO zahuštěny a vysušeny za vzniku bezbarvých krystalů.

**Výtěžek:** 0,474 g, tj. 60,4 % teorie

**Teplota tání:** 214 – 216 °C

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,34

toluen-EtOAc 4:1

R<sub>f</sub> = 0,45

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

3282, 2969, 1660, 1632, 1595, 1535, 1481, 1418, 1375, 1355, 1279, 1251, 1200, 1170, 867, 822, 790, 771, 721, 649.<sup>15</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ:**

12,01 (1H, s, NH), 10,44 (1H, bs, OH), 8,94 (1H, d,  $J=8,1$  Hz, NH), 8,00 (1H, d,  $J=2,4$  Hz, H6), 7,83 (1H, t,  $J=2,0$  Hz, H2'), 7,48-7,41 (2H, m, H6', H4'), 7,33 (1H, t,  $J=8,1$  Hz, H5'), 7,11 (1H, ddd,  $J=8,7$  Hz,  $J=2,2$  Hz,  $J=1,0$  Hz, H4), 6,97 (1H, d,  $J=8,7$  Hz, H3), 4,53 (1H, t,  $J=7,5$  Hz, CH), 2,23-2,12 (1H, m, CH), 0,96 (6H, d,  $J=6,6$  Hz, CH<sub>3</sub>).<sup>15</sup>

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:**

170,4, 165,7, 156,9, 140,2, 133,3, 133,2, 130,7, 129,2, 123,5, 123,1, 119,2, 119,0, 118,6, 117,9, 59,3, 30,9, 19,4, 18,6.<sup>15</sup>

Reakce opakována třikrát. Při druhém odbourání bylo použito 5,4 g výchozí hydrobromidové soli (0,0117 mol), která se suspendovala v 50 ml sušeného chloroformu, a mikropipetováno bylo 1,558 ml Et<sub>3</sub>N (0,0111 mol). Dělení na koloně vedlo k získání 2,34 g, tj. 55,3 % teorie.

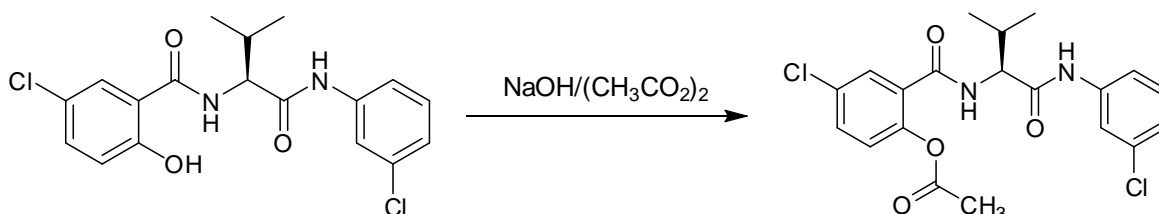
Při třetím uspořádání byla výchozí hydrobromidová sůl (0,5 g  $\cong$  0,0011 mol) do reakce vnesena už v chloroformovém roztoku po jejím čištění. Opět přidáno 95 % ekvimolárního množství Et<sub>3</sub>N (0,001 mol) a postupováno analogicky. Při zahušťování filtrátu na RVO však vznikla viskózní olejovitá kapalina, která byla rozpuštěna v 5 ml sušeného chloroformu. Tento roztok byl kvantitativně nanesen přímo na připravenou kolonu a eluován výše popsaným způsobem za získání 0,244 g produktu (62,1 %).

**(S)-4-chlor-2-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methylbutan-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenylacetát**

**Sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 423,29

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

1 g NaOH (0,025 mol) rozpuštěn v 40 destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 0,95 g (0,0025 mol) (S)-5-chlor-N-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamidu a směs byla za stálého míchání ochlazená na 0 °C. K roztoku bylo najednou přidáno pipetou 2,6 ml acetanhydridu (mírný nadbytek 0,0275 mol, ρ = 1,08 g cm<sup>-3</sup>) a směs byla za stálého chlazení míchána 30 minut. Bezbarvá sraženina odsáta na Büchnerově nálevce, promyta menším množstvím studené destilované vody a ve vakuu při laboratorní teplotě vysušena do sucha. Produkt byl rekrystalizován ze soustavy ethanol-hexan.

**Výtěžek:** 0,650 g (61,4 % teorie)

**Teplota tání:** 211 – 214 °C (EtOH-hexan)

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,15

toluen-EtOAc 4:1

R<sub>f</sub> = 0,29

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

3412, 3277, 2965, 1769 (C=O ester), 1643, 1596, 1534, 1481, 1426, 1371, 1302, 1198, 1110, 894, 778, 682.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ:**

10,36 (1H, s, NH), 8,60 (1H, d, J=8,1 Hz, NH), 7,84 (1H, t, J=2,1 Hz, H2'), 7,60 (2H, m, H3, H6'), 7,47 (1H, dd, J=8,4 Hz, J=0,9 Hz, H5), 7,34 (1H, t, J=8,1 Hz, H5'), 7,25 (1H, d,

$J=8,5$  Hz, H6), 7,12 (1H, dd,  $J=9,0$  Hz,  $J=0,9$  Hz, H4'), 4,38 (1H, t,  $J=8,1$  Hz, CH), 4,23 (1H, m, CH), 2,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0,95 (3H, d,  $J=3,6$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0,93 (3H, d,  $J=3,6$  Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:**

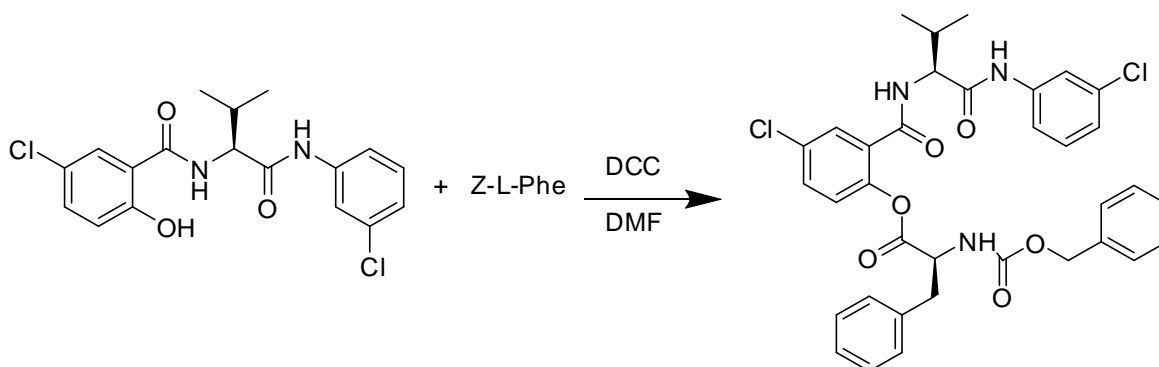
170,4, 168,8, 164,3, 146,9, 140,3, 133,3, 131,2, 130,7, 130,0, 129,1, 125,5, 123,4, 118,9, 118,8, 117,9, 59,8, 30,5, 20,8, 19,3, 18,8.

**(S)-4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoát**

**Sumární vzorec:** C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

**Molekulová hmotnost:** 662,56

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

0,299 g (0,001 mol) Z-L-fenylalaninu bylo rozpuštěno ve 30 ml DMF, přidáno 0,381 g (0,001 mol) (S)-5-chlor-N-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamidu a roztok (pod chlorkalciovým uzávěrem) byl za stálého míchání ochlazen na - 10 °C. Při této teplotě byl během hodiny ve třech podílech přidán DCC celkově v mírném nadbytku 0,248 g (0,0012 mol), přičemž po přidání poslední části stále chlazená reakční směs ponechána míchat ještě 1,5 hodiny. Poté byla nechána stát 7 dní při teplotě 4 °C. Krystaly DCU vypadávaly velmi zvolna, zfiltrovány na Büchnerově nálevce. Filtrát byl na RVO zahuštěn do vytvoření vazké kapaliny medově žluté barvy. Ke směsi přidáno 2 x 10 ml EtOAc, opět se vyloučila DCU, ta odfiltrována. Do filtrátu přidáván postupně po několika ml hexan (celkem 20 ml), což vedlo k vylučování krystalů produktu. Ponecháno stát 24 hod při 4 °C, zfiltrováno a vysušeno. Z filtrátu získán další podíl produktu. Spojené podíly byly dvakrát překrystalovány z EtOAc.

**Výtěžek:** 0,417 g, tj. 62,9 % teorie

**Teplota tání:** 162 – 164 °C (EtOAc)

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,16

toluen-EtOAc 4:1

R<sub>f</sub> = 0,43

**IČ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :**

3410, 3285, 2963, 2934, 1767 (C=O ester), 1696, 1643, 1596, 1526, 1481, 1349, 1261, 1204, 1145, 1109, 1080, 1056, 897, 779, 697.

**$^1\text{H}$  NMR (DMSO) a  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO):**

viz příloha č. 1

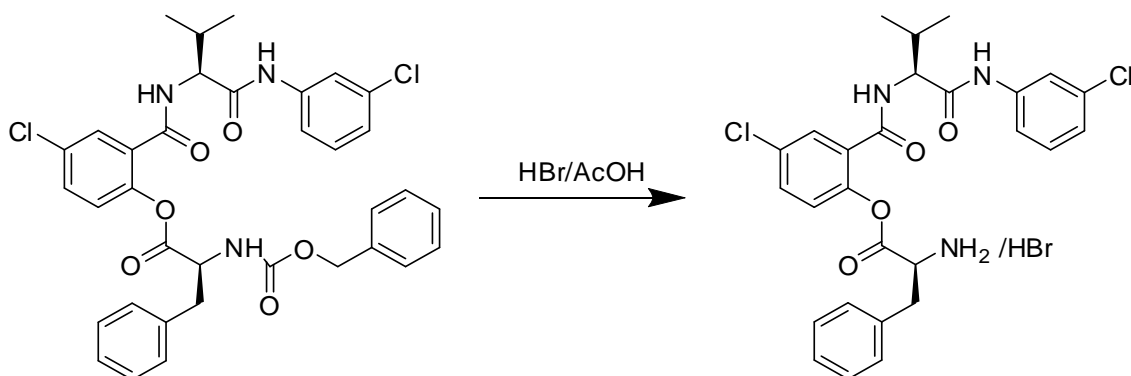
Reakce provedena dvakrát za obdobných podmínek, druhá reakce se pouze lišila tím, že reakční směs ponechána po přidání DCC stát při 4 °C 48 hod. Výtěžek činil 0,402 g (60,6 %).

**(S)-1-{4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-3-fenyl-1-oxopropan-2-amonium bromid**

**Sumární vzorec:** C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 610,36

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

K 0,300 g (0,443 mmol) (S)-4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoátu bylo za míchání najednou přidáno 1,33 ml 33 % roztoku HBr/AcOH. Reakční směs ponechána uzavřená míchat 30 minut až do rozpuštění všech krystalů. Rezultoval žlutohnědý roztok, z něhož unikal CO<sub>2</sub> (z chránící skupiny), proto bylo nutno několikrát uvolnit uzávěr baňky. Po vyčeření přidáno 3 ml diethyletheru, po 5 min opět 3 ml DEE, po 10 min 2 ml DEE – začaly vypadávat bezbarvé krystaly. Krystaly zfiltrvány na fritě, 2 x promyty 5 ml DEE, 2 x 2 ml sušeného CHCl<sub>3</sub> a 2 x 5 ml DEE. Získaná látka vysušena ve vakuu za laboratorní teploty.

**Výtěžek:** 0,121 g, tj. 44,8 % teorie

**Teplota tání:** 190 – 194 °C

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,00 (sůl)

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

3366, 2966, 1741 (C=O ester), 1637, 1602, 1542, 1480, 1415, 1288, 1206, 1111, 824, 784, 701, 531.

Reakce realizována dvakrát ve stejném provedení. Ponecháno reagovat 0,040 g ( $0,6 \times 10^{-5}$  mol) (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoátu a 0,177 ml HBr/AcOH. Získáno 0,017 g hydrobromidu, tj. 46,2 % teoretického výtěžku.

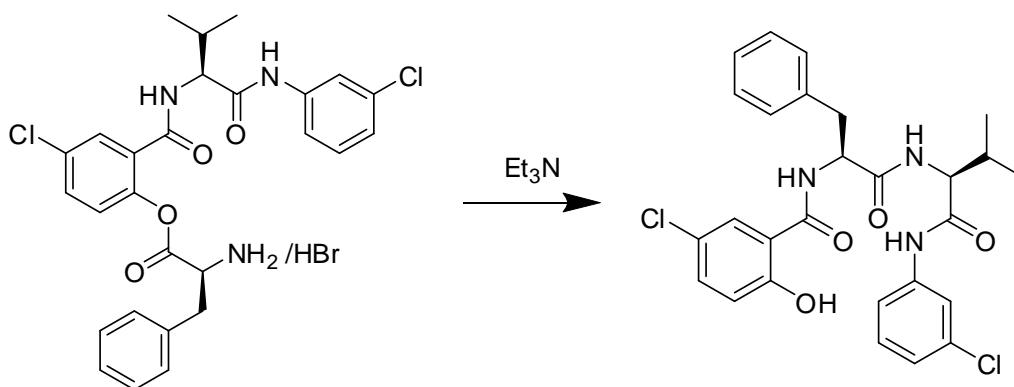


**5-chlor-N-{(S)-1-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl}-2-hydroxybenzamid**

**Sumární vzorec:** C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 528,43

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

0,120 g (0,196 mmol) (S)-1-{4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-3-fenyl-1-oxopropan-2-amonium bromidu bylo rozpuštěno v 5 ml suchého chloroformu. Mikropipetou bylo jednorázově přidáno 26  $\mu$ l triethylaminu (95 % ekvimolárního množství, 0,187 mmol,  $\rho = 0,7225 \text{ g cm}^{-3}$ ) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Nerozpustný podíl byl odfiltrován na fritě. Mezitím se naplnila kolona o průměru 20 mm 4,0 g silikagelu. Filtrát nanesen na kolonu a eluován celkem 180 ml směsí toluen-ethylacetát (9:1). Odtékající frakce byly kontinuálně jímány. Produkt v nich byl detekován pomocí UV lampy. Obsahy zkumavek s produktem byly spojeny, na rotační vakuové odparce zahuštěny a vzniklé bezbarvé krystaly vysušeny.

**Výtěžek:** 43,5 mg, tj. 44,1 % teorie

**Teplota tání:** 204 – 206,5 °C

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,37

toluen-EtOAc 4:1

R<sub>f</sub> = 0,57

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

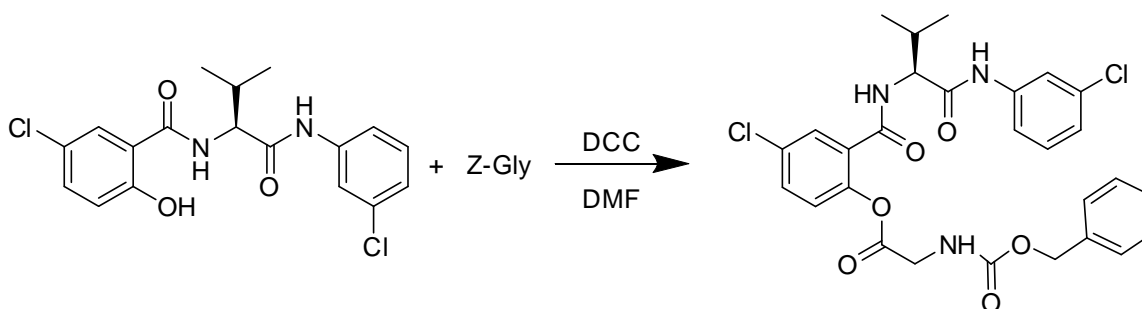
3282, 2968, 2930, 1660, 1633, 1595, 1537, 1482, 1376, 1287, 1200, 1169, 1097, 867, 822,  
790, 771, 681, 649, 534.

**(S)-4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetát**

**Sumární vzorec:** C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

**Molekulová hmotnost:** 572,44

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

0,209 g Z-Gly (0,001 mol) bylo rozpuštěno ve 30 ml suchého DMF, přidáno 0,381 g (0,001 mol) (S)-5-chlor-N-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamidu a směs ponechána pod chlorkalciovým uzávěrem za stálého míchání ochlazená na - 12 °C, tato teplota byla udržována po celou dobu reakce. Během hodiny bylo ve třech podílech přidáno 0,248 g DCC (mírný nadbytek, 0,0012 mol), přičemž po přidání posledního podílu se stále chlazená reakční směs nechala míchat ještě 1,5 hodiny. Poté byla reakční směs uložena na 40 hod do chladu (4 °C). Vyloučená DCU (krystaly vypadávaly pozvolna) zfiltrována na fritě. Filtrát byl na RVO zahuštěn do vytvoření medově žluté tekutiny vazké konzistence. Ke směsi přidáván postupně EtOAc, vyloučila se další DCU, která byla opět odfiltrována. Do filtrátu přidáván postupně po několika mililitrech hexan (celkově 25 ml), což vedlo k vypadávání krystalů produktu. Ponecháno stát 24 hod při 4 °C, zfiltrováno a vysušeno. Tento filtrát přiveden zahuštěním a následným přidáním 15 ml hexanu k opětovné krystalizaci, získaný produkt odfiltrován. Podíly produktu byly spojeny, provedena dvakrát rekrystalizace z EtOAc.

**Výtěžek:** 0,329 g, tj. 57,5 % teorie

**Teplota tání:** 189 – 191,5 °C (EtOAc)

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,08

toluen-EtOAc 4:1

R<sub>f</sub> = 0,22

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

3319, 3064, 2931, 2856, 1778 (C=O ester), 1709, 1693, 1658, 1596, 1529, 1481, 1453, 1412, 1340, 1260, 1227, 1163, 1061, 892, 779, 731, 696.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO) a <sup>13</sup>C NMR (DMSO):**

viz příloha č. 2

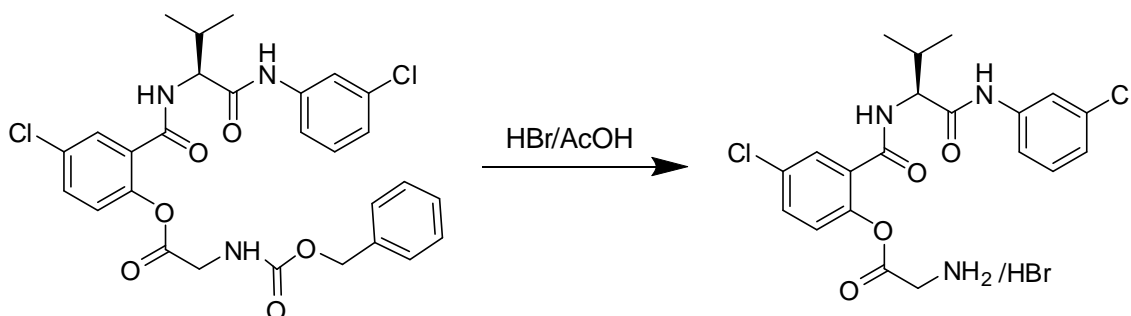
Reakce opakována se stejnými navážkami. Soustava ponechána stát při 4 °C 48 hodin, k vysrážení DCU přidáno 6 ml EtOAc, po filtraci do filtrátu přidáno 10 ml hexanu. Ponecháno stát 1,5 hod při 4 °C, produkt odfiltrován. Filtrát přiveden ke krystalizaci, spojené podíly produktu jedenkrát překrystalizovány z EtOAc. Výtěžek – 0,303 g (52,9 %).

**(S)-2-{4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-2-oxoethan-1-amonium bromid**

**Sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 519,22

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

K 0,200 g (0,35 mmol) (S)-4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetátu bylo najednou přidáno mikropipetou 1,05 ml 33 % HBr/EtOAc. Reakční směs ponechána uzavřená míchat 30 minut, dokud se všechny krystaly nerozpustily a vzniklý žlutohnědý roztok nebyl čirý. Pozorován únik CO<sub>2</sub> pocházejícího z odbourávané chránicí skupiny. Po 30 minutách přidáno 3 ml diethyletheru, po 5 min opět 3 ml DEE, po 10 min 2 ml DEE. Začaly vypadávat nažloutlé krystaly. Krystaly zfiltrvány na fritě, 2 x promyty 5 ml DEE, 2 x 2 ml suchého CHCl<sub>3</sub> a opět 2 x 5 ml DEE. Získaná látka vysušena ve vakuu za laboratorní teploty.

**Výtěžek:** 0,0435 g, tj. 23,0 % teorie

**Teplota tání:** 182 – 186 °C

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,00 (sůl)

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

2931, 2857, 1773 (C=O ester), 1654, 1637, 1559, 1507, 1474, 1425, 1396, 1214, 1195, 1106, 570.

Reakce provedena dvakrát, druhé provedení se lišilo závěrem. Navážka (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetátu – 0,330 g (0,576 mmol), přidáno 1,73 ml HBr/AcOH. Postup analogický s uvedeným až do okamžiku, kdy začal být přidáván ether. Po přidání celkem 35 ml (postupně 3, 2, 5, 5, 10, 5 ml) DEE vypadlo jen minimum soli, která byla odfiltrována a promyta 2 x 2 ml DEE a 2 ml sušeného CHCl<sub>3</sub>. Získáno 22,1 mg (7,4 %). Ve filtrátu v baňce u dna (pod vrstvou DEE) zůstalo velké množství olejovité viskózní žlutohnědé kapaliny. Ether odpařen na RVO, ke zbytku přidáno 5 ml DEE, ten odpařen, pak 5 ml hexanu, taktéž zahuštěno do sucha na RVO. Zbytek úplně rozpuštěn v 5 ml sušeného CHCl<sub>3</sub>. Tento roztok podroben dalšímu kroku, reakci s triethylaminem. Celkové množství vzniklého produktu tak nemohlo být kvantifikováno vážením, jeho množství spočítáno z teoretického výtěžku 0,2993 g podle rovnice:

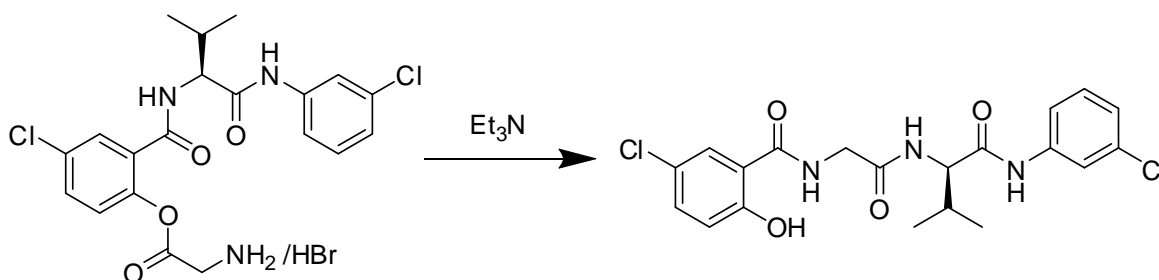
$$m_1 \text{ (hydrobromidu v roztoku)} = m_c \text{ (teoret. výtěžek hydrobromidu)} - m_2 \text{ (isolovaný hydrobromid)} = 0,2993 \text{ g} - 0,0221 \text{ g} = 0,2772 \text{ g}.$$

**5-chlor-N-{2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-2-oxoethyl}-2-hydroxybenzamid**

**Sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 438,30

**Reakční schéma:**



**Pracovní postup:**

První část produktu byla připravena vpravením 0,045 g ( $8,67 \times 10^{-5}$  mol) hydrobromidové soli do 3,5 ml sušeného CHCl<sub>3</sub>. Mikropipetou jednorázově přidáno 11,5 μl Et<sub>3</sub>N ( $8,67 \times 10^{-5}$  mol, tj. 95 % ekvimolárního množství;  $\rho = 0,7225 \text{ g cm}^{-3}$ ) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Nerozpustný podíl odfiltrován na fritě.

Druhá část byla připravena vpravením 71,0 μl Et<sub>3</sub>N (0,507 mmol; 95 % předpokládaného látkového množství druhého reaktantu) do chloroformového roztoku hydrobromidové soli z druhého postupu předchozí reakce. Roztok byl míchán 30 minut při laboratorní teplotě. U tohoto roztoku na TLC (UV detekce při 254 nm; vyvíjecí soustava toluen-EtOAc 4:1) detekovány velké skvrny s R<sub>f</sub> = 0,00. Tato látka (přesmykem vzniklý 5-chlor-N-{2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-2-oxoethyl}-2-hydroxybenzamid) byla z roztoku vysrážena postupným přidáváním celkem 25 ml DEE. Sraženina odsáta na fritě, filtrát vakuově zahuštěn a opět přidáno 25 ml DEE za vylučování krystalů produktu, jež byly odfiltrovány. Krystaly promyty 2 x 10 ml DEE. Vzniklý filtrát vysušen na RVO a následně rozpuštěn v 5 ml sušeného chloroformu.

Oba připravené roztoky byly spojeny, na RVO částečně ponecháno odpařit rozpouštědlo. Do roztoku přidáno 200 mg silikagelu, vakuově vysušeno. Mezitím byl 6,5 g silikagelu naplněn sloupec o průměru 10 mm. Připravená suchá směs nanášena na kolonu a eluována celkem 45 ml soustavy toluen-EtOAc 4:1. Odtékající frakce byly kontinuálně jímány do zkumavek. Látky byly detekovány pomocí UV (254 nm).

Jako vedlejší produkty reakce byly rozděleny a identifikovány meziproducty přesmyku (mechanismus viz diskuse) – 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-hydroxy-5-oxoimidazolidin-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid (isomer přesmyknutého triamidu) a 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid, vzniklý dehydratací předchozí látky.

**Výtěžek:** 0,1005 g (38,6 % teorie)

**Teplota tání:** při 236 – 238 °C taje za rozkladu

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1  $R_f = 0,00$

toluen-EtOAc 4:1  $R_f = 0,00$

**IČ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :**

2975, 2938, 2738, 2677, 2491, 1732, 1685, 1654, 1647, 1636, 1595, 1577, 1559, 1541, 1475, 1434, 1398, 1384, 1171, 1036, 820.

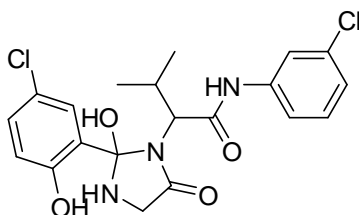
**Vedlejší izolované látky**

**2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-hydroxy-5-oxoimidazolidin-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid**

**Sumární vzorec:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4$

**Molekulová hmotnost:** 438,30

**Strukturní vzorec:**



**Získané množství:** 7,5 mg

**Teplota tání:** díky nízkému množství získané látky nestanovena

**TLC:**

toluen-EtOAc 4:1  $R_f = 0,70$

**IČ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :**

2956, 2915, 2847, 1719 (cyklický C=O), 1638, 1593, 1534, 1481, 1413, 1373, 1354, 1286, 1258, 1207, 1158, 1138, 1091, 1019, 868, 800, 718, 681.

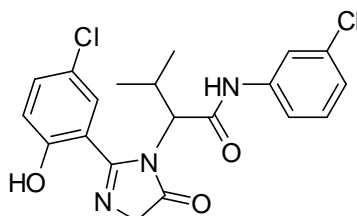


**2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl]-N-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid**

**Sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Molekulová hmotnost:** 420,29

**Strukturní vzorec:**



**Získané množství:** 10,5 mg

**Teplota tání:** 167,5 – 168,5 °C

**TLC:**

toluen-EtOAc 9:1

R<sub>f</sub> = 0,16

toluen-EtOAc 4:1

R<sub>f</sub> = 0,34

**IČ (KBr) cm<sup>-1</sup>:**

1725 (cyklický C=O), 1656, 1622, 1592, 1532, 1479, 1414, 1372, 1352, 1267, 1198, 1162, 1137, 1093, 1074, 1019, 991, 935, 884, 865, 821, 768, 720, 680.

## 6. Biologické hodnocení vybraných syntetizovaných derivátů salicylanilidu

Antimykobakteriální aktivita připravených derivátů salicylanilidu byla *in vitro* testována v Národní referenční laboratoři pro *Mycobacterium kansasii* Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, vedoucí MUDr. Jarmila Kaustová. Všechny kmeny, na kterých byly prováděny testy citlivosti, byly získány z české Národní sbírky typových kultur (CNCTC), pouze *M. kansasii* 6509/96 bylo klinicky izolováno od pacienta z okresu Karviná. Stanovení MIC bylo prováděno mikrometodou v Šulově půdě (firma Sevac) v plastických P-destičkách. Testované salicylanilidy byly do média přidávány jako roztok v DMSO v koncentracích 250, 125, 62, 32, 16, 8, 8, 4, 2 a 1  $\mu\text{mol/l}$ . MIC byla odečtena po inkubaci při 37 °C po 7, 14 a 21 dnech.<sup>16</sup>

Testované kmeny mykobakterií byly *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88 (koncentrace kmene v médiu  $10^{-3}$   $\mu\text{mol/l}$ ), *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80 (koncentrace  $10^{-4}$   $\mu\text{mol/l}$ ), *M. kansasii* 6509/96 ( $10^{-4}$   $\mu\text{mol/l}$ ) a *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88 ( $10^{-5}$   $\mu\text{mol/l}$ ).

Tabulka č. 6.1. MIC hodnocených salicylanilidových derivátů (v  $\mu\text{mol/l}$ )

Látka	<i>M. tbc.</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
5,3'-diClSal <sup>45</sup>	4	8	8	16	-	4	8	-	-	-
Acetyl-5,3'-diClSal <sup>16</sup>	8	8	16	16	-	8	8	-	8	16
Z-L-Val-diClSal <sup>15</sup>	4	4	16	16	8	16	16	8	16	16
L-Val-diamid <sup>15</sup>	32	62,5	125	125	62,5	62,5	125	32	62,5	62,5
Acetyl-L-Val-diamid	16	32	62,5 n	62,5 n	32	62,5	62,5 n	32	62,5	62,5 n
Z-Gly-L-Val-diamid	125	125 n	250 n	250 n	125	125	125 n	62,5	125	125
Z-L-Phe-L-Val-diamid	62,5	125	62,5 n	125 n	62,5	62,5 n	62,5 n	62,5	62,5	125
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

Vysvětlení zkratk v tabulce a v následujícím komentáři:

- nehodnoceno
- 5,3'-diClSal 5-chlor-N-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid

acetyl-5,3'-diClSal	4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenylacetát
Z-L-Val-diClSal	(S)-4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-methylbutanoát
L-Val-diamid	(S)-5-chlor-N-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid
acetyl-L-Val-diamid	(S)-4-chlor-2-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methylbutan-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenylacetát
Z-Gly-L-Val-diamid	(S)-4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetát
Z-L-Phe-L-Val-diamid	(S)-4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoát
písmeno n u MIC	při dané koncentraci pozorován nárůst

Příslušné hydrobromidové soli vzniklé deprotekcí *N*-chráněné AMK nebyly testovány, neboť při styku s vodou dochází k jejich hydrolyze za vzniku příslušného diamidu, resp. triamidu. Triamidy a meziproducty jejich přesmyku nebyly testovány z důvodů získání malého množství. Pro porovnání MIC byly zvoleny výchozí salicylanilidy 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid a jeho *O*-acetyléster, 4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenylacetát.

Zjištěná antimykobakteriální aktivita *in vitro* všeobecně klesá v řadě hodnocených sloučenin v pořadí: 5,3'-diClSal > acetyl-5,3'-diClSal ≥ Z-L-Val-diClSal > acetyl-L-Val-diamid > L-Val-diamid ≥ Z-L-Phe-L-Val-diamid > Z-Gly-L-Val-diamid.

Zajímavé je srovnání acetylovaných a neacetylovaných derivátů – u dvojice L-Val-diamid a acetyl-L-Val-diamid je účinnější acetylovaný derivát, zatímco u dvojice 5,3'-diClSal a jeho *O*-acetylésteru je účinnost acetylované látky nižší. Z-L-Val-diClSal je neaktivnější látkou celé série vůči *Mycobacterium tuberculosis* 331/88, zatímco u atypických mykobakterií je méně účinný než 5,3'-diClSal a jeho *O*-acetyléster.

Při srovnání aktivit Z-L-Phe-L-Val-diamidu a Z-Gly-L-Val-diamidu se ukazuje, že lipofilnější molekula obsahující Z-L-fenylalanin je aktivnější než sloučenina esterifikovaná Z-glycinem, chudší o benzylový fragment. Obecně se však ukazuje, že substituované salicylanilidy s vyšší molekulovou relativní hmotností jsou sice antimykobakteriálně stále aktivní, ovšem jejich účinnost klesá s rostoucí velikostí molekuly, tedy s každou do molekuly vnesenou (Z)-aminokyselinou. Antimykobakteriální aktivita tak v souladu s obecnými zjištěními<sup>2</sup> závisí na lipofilitě, jejíž optimální hodnota usnadňuje průnik vysoce

hydrofobní buněčnou stěnou mykobakterií<sup>15</sup>, elektronových parametrech a také na strukturálních parametrech. Právě komplikovanější prostorové uspořádání molekul s více aminokyselinami v molekule (a vyšší molekulovou hmotností) by mohlo být jednou z příčin jejich nižší aktivity. Jako příklad lze uvést dvojici L-Val-diamid a Z-L-Phe-L-Val-diamid, kde celkově vzato jen mírně nižší účinnost druhé látky vůči první (u některých kmenů atypických mykobakterií a některých dobách inkubace je MIC stejná, někdy dokonce nižší) může být vysvětlena vyšší lipofilitou a zároveň protichůdně působícím složitějším prostorovým uspořádáním Z-L-Phe-L-Val-diamidu.

Zajímavé je porovnání MIC testovaných sloučenin s MIC základního a široce užívaného antituberkulotika isoniazidu. Žádná z hodnocených látek není tuberkulostaticky účinnější než INH vůči kmenu *M. tuberculosis* 331/88 (INH výrazně účinnější; při 21 dní trvající inkubaci INH 0,5 µmol/l, Z-L-Val-diClSal jako nejaktivnější uvedená látka – 4 µmol/l) a *M. kansasii* 6509/96 (jedenadvacetidenní inkubace, INH – 4 µmol/l, nejaktivnější opět Z-L-Val-diClSal a acetyl-5,3'-diClSal – 8 µmol/l). Naopak všechny testované salicylanilidy jeví vyšší aktivitu než isoniazid vůči kmenům *M. avium* 330/88 a *M. kansasii* 235/80, které jsou de facto vůči isoniazidu rezistentní. Nejnižší MIC jevíly 5,3'-diClSal a acetyl-5,3'-diClSal (21 dní inkubace, *M. avium* – 16 µmol/l, *M. kansasii* 235/80 – 8 µmol/l) a Z-L-Val-diClSal (*M. avium* – 16 µmol/l, *M. kansasii* – 16 µmol/l).

## 7. Diskuse a závěr

### 7.1. Připravené sloučeniny a postup syntézy

V rámci diplomové práce byly připraveny jako proléčiva deriváty salicylanilidu s aminokyselinami. Cíleně bylo syntetizováno 11 následujících sloučenin: 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid (jako výchozí salicylanilid), (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid (označovaný jako diamid), 5-chlor-*N*-{(*S*)-1-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl}-2-hydroxybenzamid (označený jako L-Phe-triamid) a 5-chlor-*N*-{2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-2-oxoethyl}-2-hydroxybenzamid (Gly-triamid), dále estery s chráněnými aminokyselinami (*S*)-4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-methylbutanoát, (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoát, (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetát, ester s kyselinou octovou (*S*)-4-chlor-2-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methylbutan-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenylacetát a tři amoniové soli (bromidy) (*S*)-1-[4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenoxy]-3-methyl-1-oxobutan-2-amonium bromid, (*S*)-1-{4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-3-fenyl-1-oxopropan-2-amonium bromid a (*S*)-2-{4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-2-oxoethan-1-amonium bromid. Dále byly vyisolovány dva meziprodukty přesmyku, pětičlenné cykly: 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-hydroxy-5-oxoimidazolidin-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid a jeho dehydratovaná forma 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid.

V rámci diplomové práce bylo připraveno sedm původních, v literatuře dosud nepopsaných sloučenin, a to sledem reakcí zahrnující sedmistupňovou syntézu. Některé kroky musely být opakovány vícekrát, aby bylo možné získat dostačující množství konečných produktů.

Při syntézách bylo využito metodiky, která byla publikována v disertační práci Ing. Aleše Imramovského, Ph.D.<sup>15</sup>

Výchozí salicylanilid kondenzuje v DMF s *Z*-chráněnou aminokyselinou (*Z*-L-valinem) aktivovanou *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem za vzniku esteru (*S*)-4-chlor-2-(3-

chlorfenylkarbamoyl)fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-methylbutanoátu, což je běžná metoda peptidové chemie. *N*-Chránící skupina byla v bezvodém prostředí acidolyticky odbourána bromovodíkem v kyselině octové za vzniku hydrobromidové amoniové soli – (*S*)-1-[4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenoxy]-3-methyl-1-oxobutan-2-amonium bromidu.

Při odbourávání tohoto bromidu amoniové soli esteru, ve snaze o získání esteru s volnou  $\alpha$ -aminoskupinou pomocí triethanolaminu v bezvodém prostředí, byly identifikovány překvapivé produkty reakce.<sup>14</sup> Místo očekávaného uvolněného esteru vznikají látky se dvěma amidickými vazbami (dvojitě amidy, diamidy) a volnou fenolickou skupinou – v této práci (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid. Struktura takovýchto sloučenin byla potvrzena pomocí 2D NMR.<sup>14</sup> Tyto diamidy proto neposkytují barevnou reakci s ninhydrinem prokazující volnou aminoskupinu, naopak dávají reakce typické pro fenoly, např. podléhají *O*-acetylaci acethanhydridem v bazickém prostředí – v případě této diplomové práce za vzniku (*S*)-4-chlor-2-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methylbutan-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenylacetátu.

Přesmykem vzniklý (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid byl kondenzován v DMF s *Z*-L-fenylalaninem nebo *Z*-glycinem za využití výše prezentované aktivace karboxylu *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem. Obě esterifikace probíhají v takové míře, že lze získat dostatečné množství produktu. NMR spektra těchto esterů odpovídají předpokladům, jejich interpretace bude dodána později. U příslušných esterů (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoátu a (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetátu byla provedena acidolýza (33 % HBr/AcOH) za vzniku soli (*S*)-1-{4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-3-fenyl-1-oxopropan-2-amonium bromidu a (*S*)-2-{4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-2-oxoethan-1-amonium bromidu.

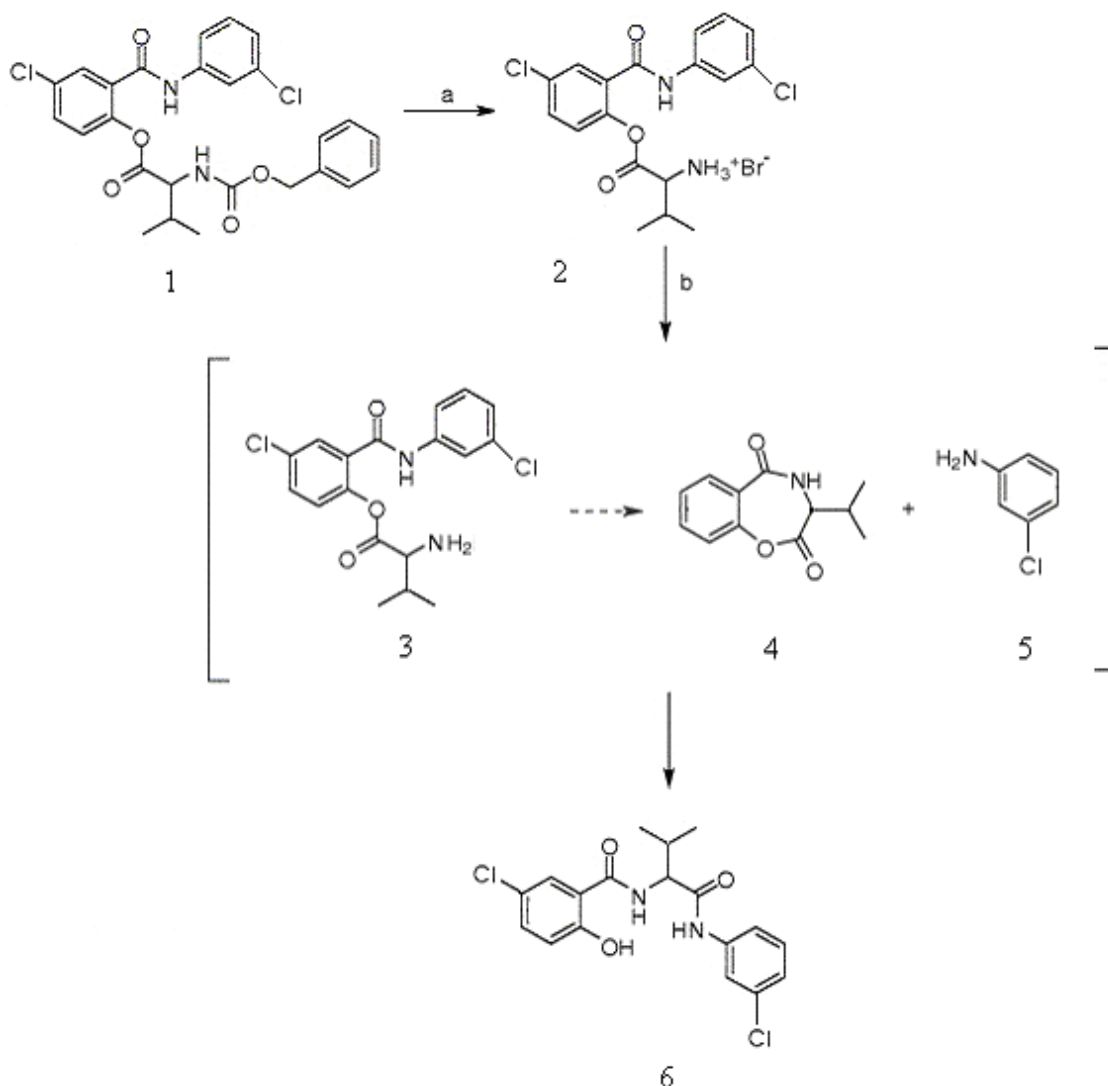
Při odbourávání *Z*-skupiny esteru *Z*-L-Phe vzniká sůl v kvantitativně dostatečném množství. V případě (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetátu odstranění benzyloxykarbonylové skupiny za vzniku hydrobromidové soli a její následná izolace nejsou dostatečně kvantitativní pro preparativní účely (výťažky opakované reakce 23,8 % a 7,8 %). Proto při druhém uspořádání reakce byl podroben reakci s triethylaminem přímo chloroformový

roztok (S)-2-{4-chlor-2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-2-oxoethan-1-amonium bromidu bez předešlé izolace této látky.

Hydrobromidy byly podrobeny reakci v bezvodém prostředí s Et<sub>3</sub>N za uvolnění bromovodíku. Zdá se, že obdobným typem přesmyku jako při přípravě diamidů patrně vznikají sloučeniny se třemi amidickými vazbami – triamid 5-chlor-*N*-{(S)-1-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl}-2-hydroxybenzamid (L-Phe-triamid) a 5-chlor-*N*-{2-[(S)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-2-oxoethyl}-2-hydroxybenzamid (Gly-triamid). V případě syntézy Gly-triamidu byly jako vedlejší produkty izolovány dva pětičlenné heterocykly 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-hydroxy-5-oxoimidazolidin-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid a 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid.

## 7.2. Problematika mechanismu přesmyku

Při popisu uvedeného přesmyku za vzniku diamidů byl zároveň navržen mechanismus tohoto přesmyku. Návrh vychází z podobnosti vzniku sedmičlenného benzoxazepinového cyklu, který byl získán při esterifikaci halogensubstituovaných salicylanilidů se *Z*-glycinem a *Z*-L-alaninem.<sup>14</sup> Autoři předpokládali, že  $\alpha$ -aminoskupina uvolněná reakcí triethylaminu s amoniovou hydrobromidovou solí s Et<sub>3</sub>N okamžitě nukleofilně atakuje benzamidový karbonyl. Tímto atakem dochází zároveň k odštěpení substituovaného anilinu. Vzniká tak benzoxazepindionový cykl salicylové kyseliny a příslušné aminokyseliny (v případě této diplomové práce valinu). Tento cyklický meziprodukt je záhy opět nukleofilně atakován primární aminoskupinou uvolněného substituovaného anilinu na esterovém karbonylu za otevření sedmičlenného cyklu, vzniku diamidu a současném uvolnění fenolické skupiny.



Obr. 7.1. Schéma přesmyku podle původního návrhu jeho mechanismu – výchozí látky 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid a *Z*-*L*-Val

1 – (*S*)-4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-methylbutanoát

a – odbourání *N*-chránící skupiny (33% HBr/AcOH)

2 – (*S*)-1-[4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenoxy]-3-methyl-1-oxobutan-2-amonium bromid

b – odbourání hydrobromidu (Et<sub>3</sub>N)

3 – hypotetický ester s volnou  $\alpha$ -aminoskupinou

4 – cyklický benzoxazepindionový meziprodukt

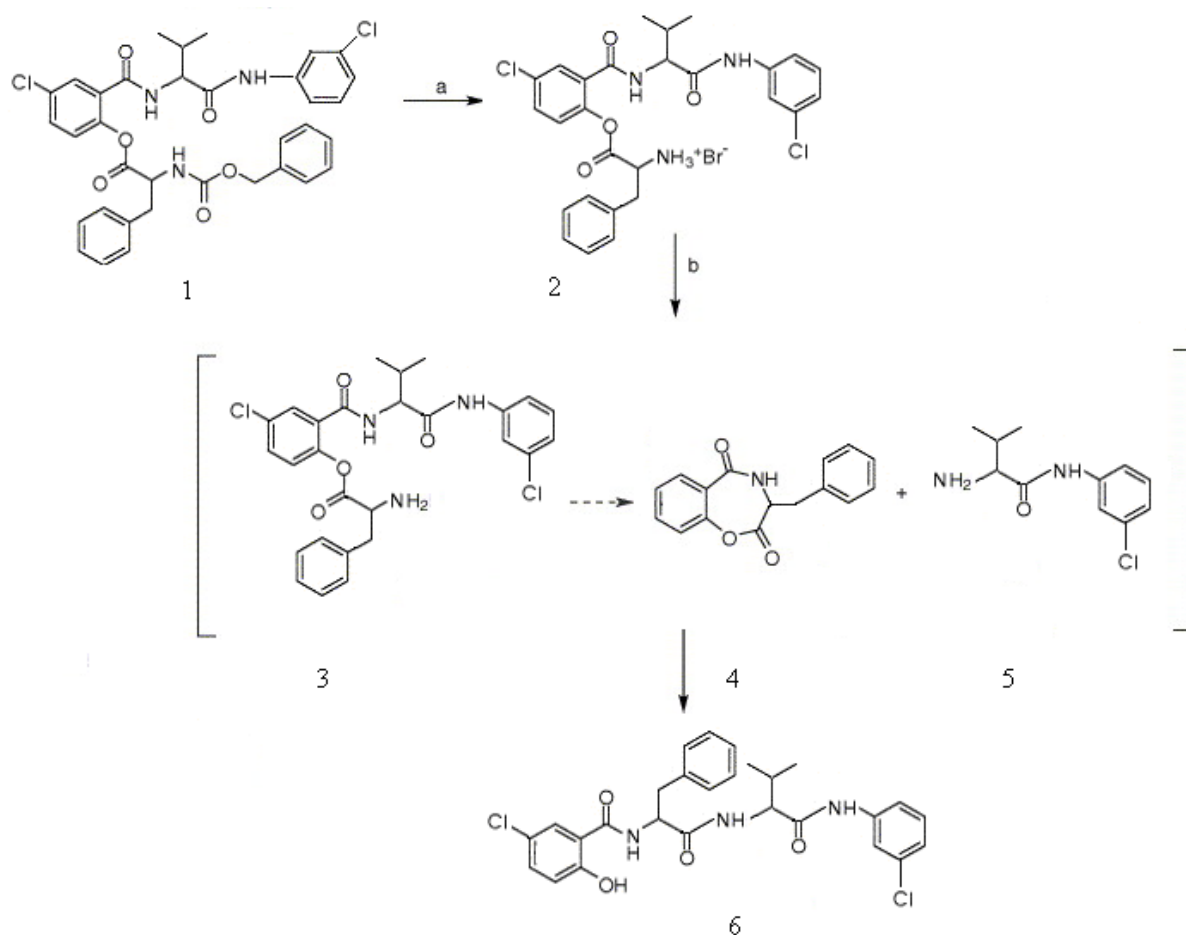
5 – uvolněný 3-chloranilin, který atakuje cyklický intermediát

6 – (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid

(převzato a upraveno podle článku „Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings“<sup>14</sup>)



Také hydrobromidové soli připravené reakcí diamidu (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamidu se *Z*-AMK (glycin, *L*-fenylalanin) a acidolytickým odbouráním chránících skupin jsme nechali reagovat s triethylaminem za uvolnění bromovodíku. Zdá se, že analogickým přesmykem pravděpodobně vznikají sloučeniny se třemi amidickými vazbami (triamidy).



Obr. 7.2. Vznik triamidu z (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoátu podle původně navrženého mechanismu přesmyku (s glycinem reakce probíhá obdobně)

1 – (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl 2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoát

a – odbourání *N*-chránící skupiny (33 % HBr/AcOH)

2 – (*S*)-1-{4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenoxy}-3-fenyl-1-oxopropan-2-amonium bromid

b – odbourání hydrobromidu (Et<sub>3</sub>N)

3 – hypotetický ester s uvolněnou  $\alpha$ -aminoskupinou

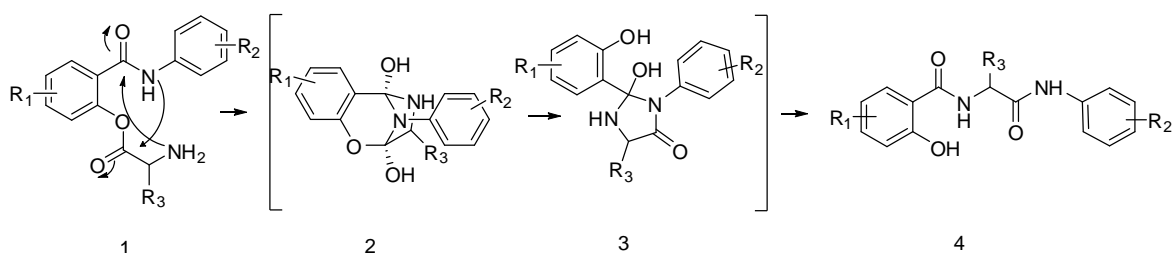
4 – cyklický benzoxazepinový meziprodukt

5 – uvolněný *N*-(3-chlorfenyl)-*L*-valin atakující primární aminoskupinou cyklický intermediát

6 – 5-chlor-*N*-{(*S*)-1-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl}-2-hydroxybenzamid

K potvrzení tohoto navrženého mechanismu byla realizována řada experimentů s aktivovaným anilinem nesoucím silnější nukleofilní substituent v poloze *para*. Nebyl však izolován nový rekombinovaný diamid, získány byly pouze produkty vázané jako acyly primární aminoskupiny anilinu, tedy reagující stejně jak anilin bez nukleofilní substituce v *para* poloze.

Proto byl navržen druhý mechanismus přesmyku, který byl následně potvrzen spektrálními metodami. Uvolněná  $\alpha$ -aminoskupina atakuje benzamidový karbonyl a současně benzamidový dusík atakuje karbonyl esteru za vzniku bicyklického intermediátu, který se spontánně přeměňuje na pětičlenný difenylhydroxyimidazolinonový cykl.



Obr. 7.3. Schéma druhého mechanismu přesmyku

1 – hypotetický ester s uvolněnou  $\alpha$ -aminoskupinou

2 – bicyklický intermediát

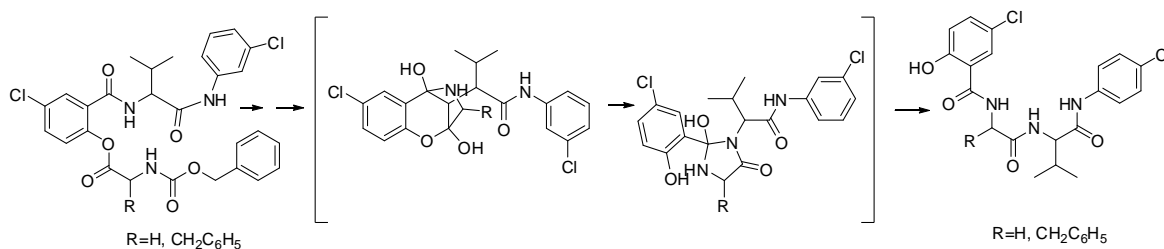
3 – hydroxyimidazolinonový meziprodukt

4 – diamid

V případě přesmyku za vzniku (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid byla izolována dehydratovaná forma imidazolinonového intermediátu – 1*H*-imidazol-5(4*H*)-on. Tato struktura byla potvrzena MS, IČ,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR a  $^{15}\text{N}$  NMR ve 2D experimentech. IČ spektrum meziproduktu ( $\text{R}^1 = 5\text{-Cl}$ ,  $\text{R}^2 = 3\text{-Cl}$ ,  $\text{R}^3 = \text{isopropyl}$ ) má charakteristický absorpční pás při 1748 (cyklický amid), 1625, 1591 (amidový pás I), 1560  $\text{cm}^{-1}$  (amidový pás II), zatímco pro přesmyknutý diamid (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid jsou typické vibrace amidu při 1660, 1632, 1595 (amidový pás I) a

1535  $\text{cm}^{-1}$  (amidový pás II). Tyto zjištěné údaje a výsledky jsou v současné době připravovány k publikaci.

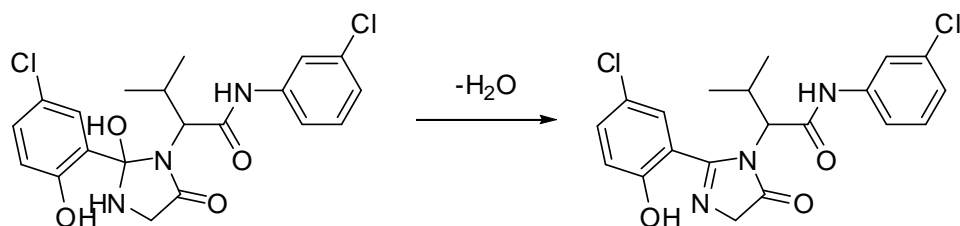
Zdá se, že tento přesmyk poskytují všechny salicylanilidové estery s aminokyselinami po odbourání *N*-chráničcí skupiny. U látek vzniklých esterifikací 5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamidu *Z*-glycinem a *Z*-*L*-fenylalaninem při odbourávání *N*-chráničcí skupiny a uvolnění primární aminoskupiny triethylaminem pravděpodobně vznikají obdobným způsobem analogické triamidy.



Obr. 7.4. Návrh přesmyku (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoátu ( $R = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ), resp. (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetátu ( $R = \text{H}$ ) na 5-chlor-*N*-{(*S*)-1-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl}-2-hydroxybenzamid ( $R = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ) a 5-chlor-*N*-{2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-2-oxoethyl}-2-hydroxybenzamid ( $R = \text{H}$ )

V rámci diplomové práce byly izolovány oba zmíněné triamidy, jejichž struktura nebyla dosud určena. V případě přípravy 5-chlor-*N*-{2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-2-oxoethyl}-2-hydroxybenzamid se podařilo vyisolovat v malém množství dva meziprodukty: 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-hydroxy-5-oxoimidazolidin-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid a jeho dehydratovaný derivát 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid, což podporuje navržený bicyklický mechanismus přesmyku. Jejich struktura byla potvrzena pouze hmotnostní spektrometrií a IČ. NMR hodnocení ještě není hotovo, stejně jako v případě 5-chlor-*N*-{2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-2-oxoethyl}-2-hydroxybenzamid a 5-chlor-*N*-{(*S*)-1-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylamino]-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl}-2-hydroxybenzamid. Na základě IČ spekter, TLC hodnot a díky izolaci výše uvedených

cyklických meziproductů předpokládáme, že by se mohlo jednat o navržené triamidické struktury.



Obr. 7.5. Dehydratace meziproductu 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-hydroxy-5-oxoimidazolidin-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamidu na 2-[2-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-1-yl]-*N*-(3-chlorfenyl)-3-methylbutanamid

Gly-triamid (R = H) má charakteristické vibrace v IČ spektru: 1654, 1636, 1595 (amidový pás I), 1537  $\text{cm}^{-1}$  (amidový pás II), a dehydratovaný intermediát jeho přesmyku (R = H) – 1725 (cyklický C=O amidu), 1656, 1622, 1592 (amidový pás I) a 1532  $\text{cm}^{-1}$  (amidový pás II).

### 7.3. Závěr a shrnutí biologické aktivity připravených derivátů salicylanilidu

Na počátku diplomové práce byla provedena důkladná literární rešerše týkající se biologických aktivit a využití salicylanilidů. V publikované literatuře bylo zjištěno široké spektrum účinků, přičemž nejvíce a nejdéle zkoumanými jsou antibakteriální, antimykobakteriální, antifungální, antiprotozoární a anthelmintická aktivita. Dále jsou a mohou být využívány herbicidní, antialgální, moluskocidní účinky nebo působení proti mihulím nebo při zánětlivých onemocněních parodontu.<sup>2</sup> Velice perspektivní by mohlo být uplatnění salicylanilidů jakožto inhibitorů EGFR tyrosin kináz s potencionálním protirakovinným působením.<sup>3,4</sup> Je také popsána řada vztahů chemická struktura – biologická aktivita v jednotlivých podskupinách salicylanilidů, a to jak farmakofor, tak optimální nebo neefektivní substituce.

Diplomová práce potvrdila existenci přesmyku po uvolnění  $\alpha$ -aminoskupiny monoesteru Z-AMK a salicylanilidu. Tímto přesmykem vzniklý diamid (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamid byl jednak acetylován a dále podroben analogickému sledu reakcí (kondenzace se Z-AMK Z-L-

fenylalaninem a Z-glycinem, odbourání *N*-protektivní skupiny a uvolnění aminoskupiny) jako výchozí salicylanilid 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid. Zdá se, že při uvolnění aminoskupiny probíhá obdobný přesmyk jako při formování diamidů za vzniku triamidů a uvolnění fenolické skupiny salicylu. Byl porovnán a diskutován původně navržený mechanismus přesmyku s novými zjištěními, ke kterým tato diplomové práce přispěla, v čemž spočívá jeden z jejich přínosů. Ukazuje se, že přesmyk probíhá jinak než podle původně navrženého mechanismu, a to přes heterocyklický pětičlenný imidazolinonový meziprodukt, který lze izolovat. Navíc byl při dělení směsi produktů po uvolnění aminoskupiny sloupcovou chromatografií s použitím silikagelu izolován jeho analog lišící se nepřítomností hydroxylové skupiny a její eliminací vzniklou dvojnou vazbou v tomto heterocyklu.

Zdá se, že lze nejspíše zobecnit, že výše popsaný přesmyk je obecně probíhající reakcí látek stejného strukturálního typu jako v diplomové práci popsaných esterů salicylanilidů s AMK, tj. různých *N*-substituovaných 2-(2-alkyl-2-aminoacetyloxy)benzamidů, které vznikají *in situ* uvolněním bromovodíku triethylaminem z příslušných amoniových solí.

Díky tomuto přesmyku za vzniku diamidů a triamidů nelze metodikou použitou v diplomové práci připravit estery -OH skupiny salicylanilidů s  $\alpha$ -karboxylovou skupinou nechráněné (resp. uvolněné)  $\alpha$ -aminokyseliny. Tudíž *N*-nesubstituované a nederivatizované  $\alpha$ -AMK nemohou zastávat funkci chránící skupiny, neboť při snaze o jejich uvolnění dochází k popsanému přesmyku za uvolnění fenolické skupiny, která vysoce pravděpodobně zodpovídá za cytotoxické a dráždivé účinky salicylanilidů. Přitom ale právě tyto nevýhodné vlastnosti vedly ke snaze modifikovat fenol esterifikací s aminokyselinami za tvorby méně dráždivých a toxických proléčiv.

Původně syntetizované sloučeniny připravené ve větším množství byly jako salicylanilidová proléčiva testovány na antimykobakteriální aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 a atypickým mykobakteriálním kmenům *Mycobacterium avium* 330/88, *Mycobacterium kansasii* 235/50 a *M. kansasii* 6509/96. Účinnost (*S*)-5-chlor-*N*-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-2-hydroxybenzamidů, (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)-3-fenylpropanoátu, (*S*)-4-chlor-2-[(*S*)-1-(3-chlorfenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenyl-2-(benzyloxykarbonylamino)acetátu a (*S*)-4-chlor-2-[1-(3-chlorfenylamino)-3-methylbutan-1-oxobutan-2-ylkarbamoyl]fenylacetátu je však v porovnání s (*S*)-4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenyl-2-

(benzyloxykarbonylamino)-3-methylbutanoátem, s 5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamidem a 4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenylacetátem nižší. Všechny vykazují vyšší aktivitu vůči *Mycobacterium avium* 330/88 a *Mycobacterium kansasii* 235/50 než isoniazid.

Salicylanilidy stále zůstávají nadějnou a potentní skupinou chemoterapeutik působících jako inhibitory TCS, EGFR tyrosin kináz a rozpojovače oxidativní fosforylace se širokým rozsahem biologických aktivit, jejichž fyzikálně – chemické a tím i terapeutické vlastnosti lze modulovat např. obměnami základní struktury či tvorbou proléčiv.

## 8. Seznam použitých zkratek

AcOH	octová kyselina
AISLP	Automatizovaný informační systém léčivých přípravků
AMK	aminokyselina, aminokyseliny
AT1	typ 1 receptoru pro angiotensin II
ATP	adenosintrifosforečná kyselina
C.	<i>Candida</i>
CNCTC	Czech National Collection of Type Cultures
ČR	Česká republika
d	den
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCU	<i>N,N'</i> -dicyklohexylurea ( <i>N,N'</i> -dicyklohexylmočovina)
DEE	diethylether
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC <sub>50</sub>	koncentrace léčiva (testované látky), při které 50 % sledovaných buněk či organismů jeví požadovanou odpověď (např. zástavu růstu a množení)
EGFR	epidermal growth factor receptor; receptor pro epidermální růstový faktor
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
GIT	gastrointestinální trakt
Gly	glycin
IC <sub>50</sub>	koncentrace léčiva (testované látky), při které je dosaženo 50% inhibice růstu pozorovaných buněk (např. bakteriálních nebo houbových)
IČ	infračervená spektroskopie
INH	isoniazid
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
log <i>K</i>	logaritmus <i>K</i> , tj. retenčního faktoru; charakterizuje míru lipofility
log <i>P</i>	logaritmus rozdělovacího koeficientu, poměr aktivity rozpuštěné látky v oktán-1-olu a aktivity neionizované látky rozpuštěné ve vodě
L-Phe	L-fenylalanin

L-Val	L-valin
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
M. hm.	molekulová hmotnost
MS	mass spectroscopy; hmotnostní spektroskopie
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>p.o.</i>	per os, perorální, tj. přijímaný ústy
PNC	penicilin
ppm	partes per milion
RVO	rotační vakuová odparka
T3S	type III secretion; proteinová sekrece typu III
TCS	two-component system; dvoukomponentový regulační systém
TLC	thin layer chromatography; tenkovrstvá chromatografie
UK	Karlova universita
UV	ultraviolet; ultrafialové záření
Z	benzyloxykarbonyl-, <i>N</i> -chránící skupina



## 9. Literatura

- 
- <sup>1</sup> Melichar, B., a kol. *Chemická léčiva*. 1. vyd. Praha : Avicenum, 1972. 960 s. ISBN neuvedeno.
- <sup>2</sup> Vinšová, J.; Imramovský, A. *Čes. Slov. Farm.* **2004**, *6*, 294.
- <sup>3</sup> Deng, W.; Guo, Z.; Guo, Y.; Feng, Z.; Juany, Y.; Chu, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 469.
- <sup>4</sup> Liechti, C.; Séquin, U.; Bold, G.; Furet, P.; Meyer, T.; Traxler, P. *Eur. J. of Med. Chem.* **2004**, *39*, 11.
- <sup>5</sup> Vacek, V. Dopad antibiotik na tvářnost infekčních onemocnění. In *Éra antibiotik*. Brno : Dr. David Jappel, 1997, s. 20-30. ISBN neuvedeno.
- <sup>6</sup> Bednář, M., a kol. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha : Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- <sup>7</sup> Hartl, J., a Palát, K. *Farmaceutická chemie I*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2004. 102 s. ISBN 80-7184-619-8
- <sup>8</sup> Hartl, J., Palát, K., a kol. *Farmaceutická chemie II. (centrální a periferní nervový systém)*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 1994. 172 s. ISBN 80-7066-834-2.
- <sup>9</sup> Mikro-verze AISLP – ČR 2007.2 pro MS Windows
- <sup>10</sup> Lamka, J., a Ducháček, L. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 3. vyd. Praha : Karolinum, 2006. 151 s. ISBN 80-246-1243-7.
- <sup>11</sup> Lincová, D., Farghali, H., a kol. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Praha : Galén, Karolinum, 2005. 601 s. ISBN 80-246-0538-4 (Karolinum).
- <sup>12</sup> Hartl, J., Doležal, M., a kol. *Farmaceutická chemie IV*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2006. 166 s. ISBN 80-246-1169-4.
- <sup>13</sup> Shi, R.; Itagaki, N.; Sugawara, I. *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1177.
- <sup>14</sup> Imramovský, A.; Vinšová J.; Monreal Ferriz J.; Kuneš, J.; Pour, M.; Doležal, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5007.
- <sup>15</sup> Imramovský, A. *Preparation and evaluation of new potential antimicrobial drugs and prodrugs*. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta UK, 2007. 65 s. Disertační práce.
- <sup>16</sup> Vinšová, J.; Imramovský, A.; Buchta, V.; Čečková, M.; Doležal, M.; Štaud, F.; Jampílek, J.; Kaustová, J. *Molecules* **2007**, *12*, 1.

- 
- <sup>17</sup> Waisser, K.; Bureš, O.; Holý, P.; Kuneš, J.; Oswald, R.; Jirásková, L.; Pour, M.; Klimešová, V.; Kubicová, L.; Kaustová, J. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, *1*, 53.
- <sup>18</sup> Macielag, M. J.; Demers, J. P.; Fraga-Spano, S. A.; et al. *J. Med. Chem.* **1998**, *4*, 2939.
- <sup>19</sup> Hlasta, D. J.; Demers, J. P.; Foleno, B. D.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 923.
- <sup>20</sup> De La Fuente, R.; Sonawane, R. D.; Arumainayagam, D.; Verkman, A. S. *British J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 551.
- <sup>21</sup> Yamamoto, O.; Tokura, Y. *J. Derm. Sci.* **2003**, *32*, 85.
- <sup>22</sup> Clark, M. T.; Coburn, R. A.; Evans, R. T.; Genco, R. J. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 25.
- <sup>23</sup> Evans, R. T.; Coburn, R. A.; Genco, J. A. US pat. **1999**; 59589; ref. Chem. Abstr., **1999**, *3*, 223499.
- <sup>24</sup> *Salicylanilide*. [cit. 17.4.2008]. Přístup z: <http://www.alanwood.net/pesticides/salicylanilide.html>
- <sup>25</sup> Waisser, K.; Bureš, O.; Holý, P.; Kuneš, J.; Oswald, R.; Jirásková, L.; Pour, M.; Klimešová, V.; Palát, K.; Kaustová, J.; Danse, H. M.; Mollmann, U. *Pharmazie* **2003**, *58*, 83.
- <sup>26</sup> Truyong, P.; Tran, T. D. *Tap Chui Duoc Hoc.* **1997**, *10*, 7; Chem. Abstr., **1998**, *28*, 255057.
- <sup>27</sup> Belwal, S.; Joshi, S. C.; Singh, R. V. *Main Group Metal Chemistry*, **1997**, *20*, 33; ref. Chem. Abstr., **1997**, *27*, 95350.
- <sup>28</sup> Matyk, J.; Waiser, K.; Dražková, K.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Palát Jr., K.; Kaustová, J. *Il Farmaco* **2005**, *60*, 399.
- <sup>29</sup> Waisser, K.; Dražková, K.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Kaustová, J. *Il Farmaco* **2004**, *59*, 615.
- <sup>30</sup> Waisser, K.; Peřina, M.; Boudová, I.; Kuneš, J.; Kaustová, J. *Čes. Slov. Farm.* **2003**, *52*, 291.
- <sup>31</sup> Dahlgren, M. K.; Kauppi, A. M.; Olsson, M.; Linusson, A.; Elofsson, M. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6177.
- <sup>32</sup> Guo, L.; Wang, Q. L.; Jiang Q. Q.; Ju Jiang, Q. J.; Jiang, Y. B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9947.
- <sup>33</sup> Bozděch, V., a Kocna, A. *Moderní léčba parazitárních onemocnění*. 1. vyd. Praha : Avicenum, 1985. 192 s. ISBN nevedeno.
- <sup>34</sup> Souria M. Donya; Entessar E. Hassan. *Cytologia* **2007**, *72*, 29.

- 
- <sup>35</sup> Singh, H.; Singh, A. G.; Iyer, R. N. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 826.
- <sup>36</sup> Schreier, T. M.; Dawson, V. K.; Choi, Y.; et al. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 222.
- <sup>37</sup> *Niclosamide (PDS)*. [cit. 17.4.2008]. Přístup z:  
[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest63\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest63_e.htm)
- <sup>38</sup> Iwamura, H.; Mitsuyoshi, H.; Endo, Y.; et al. *Jap. Pat.*, **1997**; 0927873; ref. Chem. Abstr., **1998**, *29*, 89.
- <sup>39</sup> Yasui, K.; Goto, K.; Ito, S.; Ueno, C. *Jap. Pat.*, **1998**; 028708; ref. Chem. Abstr., **1998**, *29*, 45856.
- <sup>40</sup> Kubicová, L.; Králová, L.; Šeršeň, F.; et al. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2000**, *25*, 89.
- <sup>41</sup> Kubicová, L.; Kissová, K.; Waisser, K. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2000**, *25*, 67.
- <sup>42</sup> Biangi, G.; Giorgi, I.; Livi, O.; et al. *Il Farmaco* **2001**, *56*, 827.
- <sup>43</sup> Akutu, M.; Tominaga, N.; Ooya, K.; Tomita, A. *Jap. Pat.*, **1995**; 0725703; ref. Chem. Abstr., **1996**, *24*, 60447.
- <sup>44</sup> El-Mossalamy, E. H.; Ahmed, I. S.; Basahl, S. N. *Bull. Electrochem.* **2005**, *21*, 59.
- <sup>45</sup> Waisser, K., Hladůvková, J., Kuneš, J., Kubicová, L., Klimešová, V., Karajannis, P., Kaustová, J. *Chem. Pap.* **2001**, *56* (2), 121.